

*AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN  
Prof. Dr. med. univ. Michael Melter*

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**EINFLUSS GENETISCHER INTERAKTIONEN AUF DAS AUFTRETEN VON  
ASTHMA UND NÄCHTLICHEM ASTHMA**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Vincent David Gaertner, B. Sc.

2019



*AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN  
Prof. Dr. med. univ. Michael Melter*

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**EINFLUSS GENETISCHER INTERAKTIONEN AUF DAS AUFTRETEN VON  
ASTHMA UND NÄCHTLICHEM ASTHMA**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Vincent David Gaertner, B. Sc.

2019

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. univ. Michael Kabesch
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Michael Arzt
Tag der mündlichen Prüfung:	17.07.2019



## **Gliederung**

1. Abstract.....	7
2. Hintergrund.....	9
2.1 Pathogenese von Asthma .....	9
2.2 Der zirkadiane Rhythmus und nächtliches Asthma .....	11
2.3 Genetische Grundlagen.....	13
2.3.1 Aufbau des Genoms .....	13
2.3.2 Mutationen der DNA.....	14
2.3.3 Auswirkungen von Mutationen in der DNA.....	15
2.3.4 Linkage Disequilibrium.....	15
2.4 Biologische und statistische Interaktionen .....	15
2.5 Ziel und Fragestellung dieser Arbeit .....	17
3. Methoden.....	18
3.1 Populationen .....	18
3.1.1 Populationen für Berechnungen .....	18
3.1.2 Genotypisierung .....	18
3.1.3 Whole Genome Amplification .....	19
3.2 Variablen/Phänotypen.....	21
3.3 SNP Selektion .....	23
3.4 Bioinformatische Analysen.....	23
3.5 Statistische Grundlagen .....	24
3.5.1 Testtheoretische Überlegungen.....	24
3.5.2 Statistische Grundlagen der Auswertung .....	25
3.5.3 Auswahl des geeigneten Tests.....	28
3.6 Statistische Auswertung der vorliegenden Arbeit .....	30
3.6.1 Qualitätskontrolle .....	30
3.6.2 Grundlagen der Auswertung .....	31
3.6.3 Umgang mit multiplem Testen.....	32
4. Ergebnisse.....	33
4.1 Das <i>NPS/NPSRI</i> -System beeinflusst Asthma.....	33
4.1.1 Hintergrund und Fragestellung.....	33
4.1.2 Ergebnisse in unserer Kohorte .....	36
4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	38

4.2 <i>RORA</i> und <i>NPSRI</i> beeinflussen nächtliches Asthma .....	39
4.2.1 Hintergrund: <i>RORA</i> und der zirkadiane Rhythmus .....	39
4.2.2 Ergebnisse .....	41
5. Diskussion .....	48
5.1 Reichweite der Arbeit .....	48
5.2 Stärken und Limitationen.....	49
5.2.1 Deduktive Analysen und biologische Plausibilität.....	49
5.2.2 Replikation .....	49
5.2.3 Phänotyp und Statistik.....	50
5.2.4 Limitationen .....	50
5.3 Ausblick .....	51
5.3.1 Ausblick Genetik.....	51
5.3.2 Ausblick Klinik und klinische Forschung.....	53
5.4 Schlussfolgerung.....	56
6. Literaturverzeichnis .....	57
7. Annex: .....	66
7.1 Publikation 1 – <i>Neuropeptide S (NPS)</i> variants modify the signaling and risk effects of <i>NPS Receptor 1 (NPSRI)</i> variants in asthma.....	66
7.2 Publikation 2 – Nocturnal asthma is affected by genetic interactions between <i>RORA</i> and <i>NPSRI</i> .....	83
7.3 Aufrufe Quality Control.....	94
7.4 Aufrufe Berechnungen Publikation 1 ( <i>NPS*NPSRI</i> ).....	111
7.5 Aufrufe Berechnungen Publikation 2 ( <i>RORA*NPSRI</i> ).....	122
8. Danksagung .....	147
9. Lebenslauf .....	148

## **1. Abstract**

Asthma ist eine komplexe Erkrankung, die klinisch durch die Trias aus chronischer Atemwegsentzündung, bronchialer Hyperreagibilität und reversibler Atemwegsobstruktion charakterisiert wird. Gleichzeitig zeigt sich der Phänotyp „*Asthma*“ nicht immer einheitlich. So wird angenommen, dass unterschiedlichen Ausprägungen von Asthma auch unterschiedliche pathogenetische Mechanismen zugrunde liegen könnten. Auf der Basis dieses Gedankens wird es zunehmend wichtig, Phäno- und Genotyp dieser Unterformen genau zu erforschen und zu definieren, um über das Verständnis der jeweiligen Pathogenese die klinischen Therapiemöglichkeiten verbessern zu können.

In der hier vorliegenden Arbeit werden genetische Interaktionen zweier Systeme näher beleuchtet. Die erste Publikation zeigt auf, inwiefern genetische Variationen innerhalb des kürzlich entdeckten *Neuropeptid S* und des korrespondierenden *Neuropeptid S Rezeptor 1 (NPSR1)* biologisch miteinander interagieren und wie eine spezifische Kombination von genetischen Mutationen das Entstehen von asthmatischen Symptomen beeinflussen könnte. Die zweite Veröffentlichung befasst sich dann mit Interaktionen zwischen *NPSR1* und dem *Retinoid Acid Receptor-Related Orphan Receptor Alpha (RORA)*. Von diesen beiden Genen ist bekannt, dass sie biologisch interagieren und dass sie einen direkten Einfluss auf das Entstehen von asthmatischen Symptomen haben. Da beide Gene und ihre Produkte allerdings auch den zirkadianen Rhythmus beeinflussen, war unsere Hypothese, dass sie insbesondere das Auftreten von nächtlichem Asthma beeinflussen könnten.

Interessanterweise konnten wir tatsächlich statistische Interaktionen zwischen *NPSR1* und *RORA* finden und zeigen, dass diese Interaktionen spezifisch sind für nächtliches Asthma und weniger Asthma ohne nächtliche Symptome beeinflussen. Während alle bisherigen Studien zum genetischen Hintergrund von nächtlichem Asthma Mutationen im beta 2 Adrenorezeptor untersuchten, was mutmaßlich eher allgemein mit dem Schweregrad und schlechter kontrolliertem Asthma zusammenhängt, konnte diese Studie genetische Einflüsse aufdecken, die spezifisch für nächtliche Symptome sind.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit sind auf verschiedene Art und Weise bedeutsam für die wissenschaftliche und klinische Beurteilung von Asthma. Erstens konnten wir zeigen, dass Gen-Gen-Interaktionen bei der Beurteilung der genetischen Grundlagen von Asthma nicht zu vernachlässigen sind. Zweitens konnten wir durch unsere genetischen Daten zeigen, dass der klinische Phänotyp „*Asthma*“ potenziell weiter differenziert werden könnte und den

*Einfluss genetischer Interaktionen auf das Auftreten von Asthma und nächtlichem Asthma*  
(Doktorarbeit zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin)  
Vincent D. Gaertner, B.Sc.

Subphänotypen potenziell unterschiedliche Pathogenesen zugrunde liegen könnten. Das wiederum führt zu der Annahme, dass diese unterschiedlichen Krankheitsentitäten auch unterschiedlich therapiert werden könnten. Auf Basis der Ergebnisse dieser Dissertation wird abschließend über molekulargenetische Therapieoptionen spekuliert.

## **2. Hintergrund**

### **2.1 Pathogenese von Asthma**

Asthma ist mit einer Prävalenz von ca. 10% die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter in Europa [1]. Pathogenetisch ist es eine komplexe Krankheit mit bekannten Einflüssen aus Genetik und Umwelt sowie zahlreichen Faktoren aus der Epigenetik und der Proteomik, die mit Asthma assoziiert sind [2,3]. Klinisch wird Asthma durch die Trias aus chronischer Atemwegsentzündung, bronchialer Hyperreagibilität und reversibler Atemwegsobstruktion charakterisiert. Dies resultiert üblicherweise in einer Limitierung des Atemflusses: Im akuten Anfall, der durch verschiedene Faktoren wie Sport, Allergenexposition oder psychische Belastung ausgelöst werden kann, kommt es zu einer akuten Bronchokonstriktion, zu einer Schwellung der Atemwegswände, sowie zu einer Dyskrinie mit vermehrter Schleimproduktion [4–6]. Diese Mechanismen resultieren schließlich in einem strukturellen Umbau der Atemwege, welche weiterhin hyperreagibel bleiben, sodass diese Anfälle häufig rezidivieren. Asthmatische Kinder präsentieren sich klinisch typischerweise mit respiratorischen Beschwerden wie anfallsartig auftretender Dyspnoe, die sich auskultatorisch durch Giemen, Pfeifen oder Brummen manifestiert. Typischerweise zeigen die betroffenen Kinder in den Ruheintervallen normale oder fast normale Werte in der Lungenfunktionsprüfung, lediglich im Anfall zeigen sich die typischen Zeichen einer reversiblen Atemwegsobstruktion [7,8]. Dies erschwert teilweise auch die initiale Diagnose. Außerdem können Giemen oder Brummen in den ersten Lebensjahren auch vorübergehend im Rahmen von viralen Infekten auftreten, da die Atemwege von Kleinkindern noch instabiler sind und daher eher zu verstärkter Konstriktion neigen [9], was die Diagnosestellung weiter erschwert. Auch gesunde Kleinkinder können aufgrund der ungünstigen mechanischen Verhältnisse der Atemwege in diesem Alter intermittierend, z.B. bei Infekten, giemen [10]. Zusätzlich können die Symptome durch ihre vorübergehende Natur oft nicht richtig gedeutet werden oder sie treten nur zu bestimmten Tageszeiten auf. Es ist zum Beispiel bekannt, dass durch eine Verminderung des Sympathikotonus in den frühen Morgenstunden und der damit einhergehenden Bronchokonstriktion in dieser Zeit auch eine Verschlechterung der asthmatischen Beschwerden auftritt [11]. Diese tageszeitlich abhängige Verschlechterung der Symptomatik tritt allerdings nicht bei allen Kindern gleichermaßen auf, was die Frage nach einer Differenzierung der Phänotypen aufwirft (siehe 2.2).

Die genannten Faktoren tragen bereits zu einer erschwerten Diagnose dieses Krankheitsbildes bei. Es wird allerdings zusätzlich noch diskutiert, dass Asthma eigentlich eine Mischung aus verschiedenen Phäno- und Endotypen ist, die lediglich gemeinsame Merkmale teilen. Dies impliziert wiederum, dass die Diagnose „*Asthma*“ eine Mischung aus eigentlich verschiedenen Krankheiten darstellt, welche sich ähnlich manifestieren. Diese Unterscheidung kann klinischer Natur sein, also auf dem Phänotyp basieren (so leiden manche Kinder vornehmlich an nächtlichen Asthmasymptomen, andere wiederum zeigen eher asthmatische Symptome bei Allergen- oder Noxenexposition) oder auch genetischer und pathophysiologischer Natur sein, also auf unterschiedlichen Endotypen basieren.

Seitdem in den ersten genetischen Assoziationsstudien die Wichtigkeit des genetischen Hintergrunds von Asthma gezeigt werden konnte, wurden immer mehr genetische Marker gefunden, die in der Pathogenese von Asthma eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen. Interessanterweise konnte aber schon 2010 in einer Studie des GABRIEL Consortiums gezeigt werden, dass die Genetik bei unterschiedlichen klinischen Ausprägungen von Asthma auch verschieden zu sein scheint [12]. In den letzten Jahren gewinnen diese Unterscheidungen basierend auf neuen pathogenetischen Erkenntnissen immer mehr an Bedeutung in Forschung und Klinik [12–19].

Derzeit wird die vollständige Symptomkontrolle und komplette Beschwerdefreiheit bei etlichen Kindern nicht erreicht. Neben fehlender Compliance könnte auch die unzureichende Individualisierung der Therapieschemata zu diesen mangelhaften Ergebnissen beitragen. Eine bessere Symptomkontrolle wäre wünschenswert, da dies die große individuelle Belastung dieser Krankheit verringern würde. So gab es in den letzten Jahren bereits etliche Versuche, auf Basis von erforschten Endotypen sogenannte Targeted Therapies zu entwickeln, um Asthma gezielt und individuell behandeln zu können [15–19]. Allerdings ist auch eine genauere Differenzierung des Phänotyps nötig, um eine bessere Symptomkontrolle zu erreichen. Es ist möglich, dass unter dem Überbegriff „*Asthma*“ eine Vielzahl an pathogenetisch unterschiedlichen Krankheiten steckt, welche dann konsekutiv auch einer individuelleren Behandlung bedürften. Insbesondere nächtlich auftretendes Asthma wird hierbei häufig als potenzieller Kandidat für eine eigene Krankheitsentität mit eigener Pathophysiologie genannt, verständliche und klärende Studien fehlen allerdings noch.

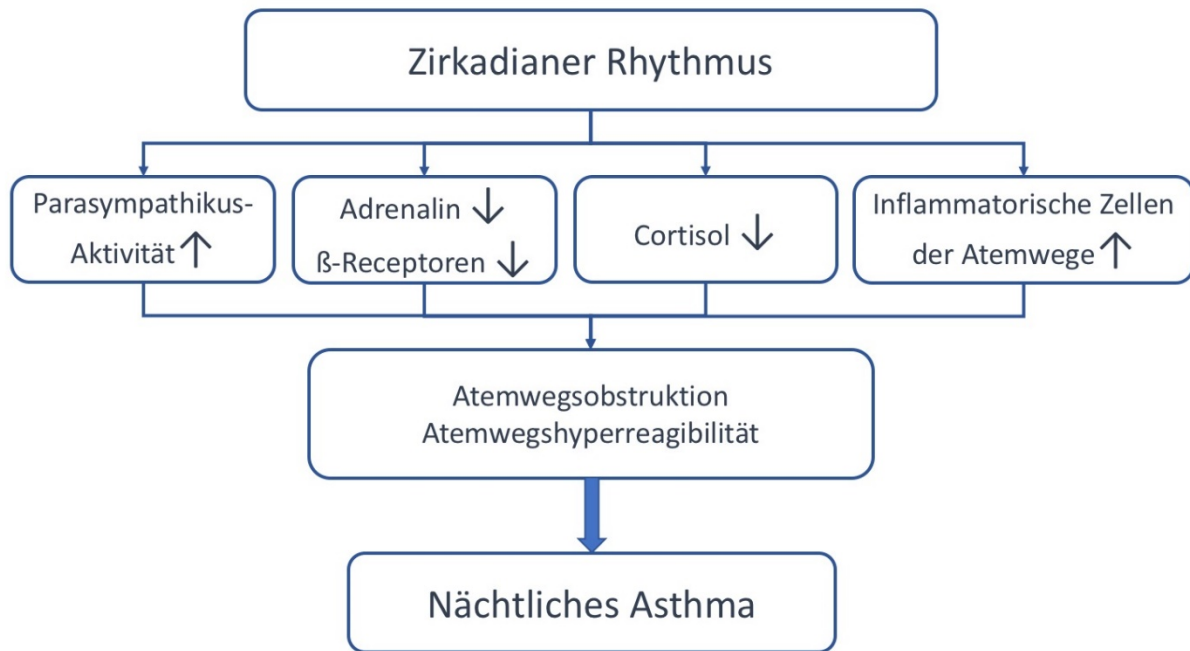
## **2.2 Der zirkadiane Rhythmus und nächtliches Asthma**

Der zirkadiane Rhythmus beeinflusst eine große Anzahl an physiologischen sowie pathologischen Prozessen (siehe Abbildung 1). So variieren die Aktivität des autonomen Nervensystems, die hormonelle Sekretion oder inflammatorische Prozesse über den Tages- und Nachtverlauf. In den frühen Morgenstunden, also noch während des Schlafes und vor dem Aufstehen, ist zum Beispiel die Parasympathikusaktivität noch hoch, daher ist der Adrenalin Spiegel im Blut niedrig,  $\beta$ -Adrenorezeptoren sind herunterreguliert und die Cortisolspiegel sind noch niedrig [11,20–22]. Außerdem gibt es interessanterweise eine höhere Anzahl an inflammatorischen Zellen im Lungengewebe [23,24]. Alle diese Faktoren sind primär physiologische Prozesse, welche aber auch zu einer pathologischen Bronchokonstriktion und damit zu einer Einschränkung des Atemflusses bei gleichzeitiger Hyperreagibilität der Atemwege führen können. Diese Symptome sind gleichbedeutend mit asthmatischen Symptomen, wodurch klar wird, dass der zirkadiane Rhythmus auch bei nächtlichen Asthmaanfällen eine Rolle spielen könnte. Interessanterweise konnte für alle diese *per se* genommen physiologischen Veränderungen eine deutliche Verstärkung dieser Einflüsse bei nächtlichen Asthmatikern im Vergleich zur gesunden Allgemeinpopulation festgestellt und somit deren pathophysiologische Bedeutsamkeit in der Entstehung von nächtlichem Asthma gezeigt werden [25–28]. So gibt es auch bereits Untersuchungen, die in eher kleinen Studienpopulationen eine Assoziation von genetischen Mutationen im beta 2 Adrenorezeptor-Gen (ADRB2) mit nächtlichen Asthmasymptomen finden konnten [29–33]. Diese Zusammenhänge könnten allerdings auch durch ein schlechter kontrolliertes und damit schwereres Asthma erklärt werden und weniger durch den spezifischen Einfluss des zirkadianen Rhythmus. Auch eine zirkadian verstärkte Atemwegsinflammation sowie erhöhte Level von Makrophagen und T-Lymphozyten bei nächtlichen Asthmatikern wurden festgestellt [23,24]. Interessanterweise treten diese molekularbiologischen Veränderungen insbesondere im Vergleich zu Asthmatikern ohne nächtliche Symptome verstärkt auf [23,34].

Insgesamt ist nächtliches Asthma aber bisher noch weitgehend unerforscht geblieben und erst kürzlich wurden die Bemühungen intensiviert, die Pathogenese dieser Krankheit weiter aufzuklären [22,35]. Wie bei regulärem Asthma auch [3], wird für nächtliches Asthma angenommen, dass es eine komplexe Krankheit mit exogenen und endogenen Einflüssen ist [36,37].

Nächtliche Atemnot kommt mit einer Gesamtprävalenz von 4-9% in der Bevölkerung und bei 30 bis 75% der Asthmatiker vor und ist ein sehr belastender Bestandteil dieser Erkrankung

[13,38–42]. Nächtliches Asthma ist definiert als die Verschlechterung von asthmatischen Beschwerden wie Giemen, Pfeifen oder einem Engegefühl auf der Brust während der Nacht [36,37]. Bei früh auftretenden nächtlichen Symptomen ohne die Erfüllung der Diagnosekriterien, erhöht sich das Risiko, bis zum Schulalter Asthma zu entwickeln [43]. Aus nächtlichem Asthma, das oftmals auch schwer zu kontrollieren ist, resultiert eine drastische Reduktion der kindlichen Lebensqualität durch eine massiv erhöhte Tagesmüdigkeit und schlechtere kognitive Leistungen [44–46]. Des Weiteren haben nächtliche Asthmatiker eine erhöhte Morbidität und Mortalität im Vergleich zu Asthmatikern ohne nächtliche Symptome [35]. Allgemein wird diskutiert, ob nächtliches Asthma pathophysiologisch auf eigenen und spezifischen molekularen Veränderungen basiert oder lediglich Ausdruck von schlecht kontrolliertem und schwererem Asthma ist [47].



**Abbildung 1. Pathophysiologische Überlegungen zur Beeinflussung von nächtlichen Asthmasymptomen durch den zirkadianen Rhythmus.** Modifiziert nach Burioka et al 2010. [11]



## **2.3 Genetische Grundlagen**

### **2.3.1 Aufbau des Genoms**

#### ***Nukleotide***

Nukleotide bestehen aus drei Komponenten: einem Kohlenhydrat (immer eine Pentose), einem Phosphatrest und einer organischen Base aus einem Ringsystem. Diese Base ist dabei mit der Pentose über eine N-glykosidische Bindung verbunden und macht den entscheidenden Anteil des Nukleotids aus. Sie kann entweder ein Purin- (Adenin und Guanin) oder ein Pyrimidinderivat (Thymin und Cytosin, in der mRNA auch Uracil) sein. Die Nukleotide werden während der Replikation sequenziell aneinandergesetzt, indem vom entsprechenden Nucleosidtriphosphat ein Pyrophosphat abgespalten wird und die Energie genutzt wird, um die entstandenen Nucleosidmonophosphate über 3'5'-Phosphorsäurediesterbindungen zu binden.

#### ***Nukleinsäuren***

Die aus den Nucleotiden zusammengesetzten Makromoleküle nennt man dann Nucleinsäuren, das sind z.B. die Desoxyribonucleinsäure (DNA) oder die Ribonucleinsäure (RNA). Die DNA beinhaltet, im Gegensatz zur RNA, eine 2'-Desoxyribose als Kohlenhydrat. Da die Nucleotide über 3'5'-Phosphorsäurediesterbindungen verbunden sind, bleibt am einen Ende eines jeden linearen Nucleinsäure-Stranges ein 3'-Ende übrig (Hydroxyl-Ende) und am anderen Ende ein 5'-Ende (Phosphat-Ende). Der Phosphorsäurediester, welcher das „Rückgrat“ der DNA bildet, ist negativ geladen.

#### ***DNA***

Insgesamt besteht die DNA aus ca.  $6,4 \cdot 10^9$  Basenpaaren, welche in 46 unterschiedlich langen Polynucleotidsträngen (2\*23 Chromosomen) aneinandergelagert sind. Die Basenzusammensetzung erfolgt dabei nach der sogenannten Chargaff-Regel, welche besagt, dass stets die gleiche Anzahl an Adenin und Thymin und die gleiche Anzahl an Cytosin und Guanin vorhanden sein müssen, da diese Basen jeweils über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind. Daraus ergibt sich auch, dass die DNA-Stränge immer komplementär zueinander sind und aus dem einen Strang die Basenabfolge des anderen berechnet, beziehungsweise hergestellt werden kann. Die Einzelstränge der DNA sind antiparallel angeordnet und zu einer Doppelhelix verdrillt. Diese Doppelhelix wird wiederum

durch eine Komplexbildung mit Proteinen, den sogenannten Histonen, komprimiert. Histone sind Proteine mit Resten von positiv geladenen Aminosäuren wie Arginin oder Lysin, welche mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA (oben erwähnte Phosphorsäurediester) interagieren und so die DNA zu binden vermögen. Bei epigenetischer Veränderung der Histone (z.B. durch eine Methylierung an den positiv geladenen Resten), verändert sich das Bindungsverhalten der Histone und die DNA wird verstärkt für die Transkription geöffnet.

### ***Das humane Genom***

Als Genom wird schließlich die Gesamtheit der vererbaren Informationen eines Lebewesens, bestehend aus den oben genannten 46 Chromosomen, bezeichnet. Es beinhaltet ca. 20.000 bis 35.000 proteinkodierende Gene, welche während der Transkription in RNA-Sequenzen umgeschrieben werden. Der informationstragende Anteil der DNA entspricht allerdings nur ca. 1-3% der gesamten DNA.

## **2.3.2 Mutationen der DNA**

Ein Single Nucleotide Polymorphism (SNP) ist eine Variation oder Mutation in einem einzelnen Nukleotid. So taucht zum Beispiel an einer bestimmten Basenposition des Genoms im Großteil der Population ein Thymin auf, aber in einer Minderheit liegt an dieser Stelle ein Cytosin – die beiden möglichen Ausprägungen C und T sind dann die zwei verschiedenen Allele für diese Basenposition. Wenn man nun überprüft, ob Menschen mit einer gewissen Mutation, also mit einem bestimmten Allel, ein höheres Risiko für eine beliebige Krankheit hat, so kann man die Assoziation dieses Allels mit der Krankheit darstellen. Auf diese Weise konnte schon vielfach gezeigt werden, dass SNPs mit einer erhöhten oder verminderten Suszeptibilität für verschiedene Krankheiten assoziiert sind. SNPs finden sich im gesamten Genom und können im Exon oder Intron liegen. Besonders bei einer Lage des entsprechenden SNPs im Exon oder in einem Promoterelement ist dieser ein plausibler Kandidat für eine funktionelle Beeinflussung einer spezifischen Krankheit, wie im folgenden Abschnitt erläutert wird.

### **2.3.3 Auswirkungen von Mutationen in der DNA**

Variationen im Genom (wie zum Beispiel SNPs) können potenziell einen (gegebenenfalls pathologischen) Einfluss auf die Genexpression ausüben:

- (1) Mutationen im Exon führen zu einer veränderten Basenabfolge in der mRNA und folglich potenziell zu einer fehlerhaften Faltung und eingeschränkter Funktionalität des Proteins oder sogar zu einem kompletten Translationsstopp und damit zu einem unvollständigen Protein.
- (2) Mutationen im Promoterbereich eines Gens können die Bindungswahrscheinlichkeit der Transkriptionsfaktoren und damit die folgende Genexpression stark beeinflussen.
- (3) Mutationen in proximalen oder distalen Elementen können ebenfalls zu einer veränderten Bindungswahrscheinlichkeit von Transkriptionsfaktoren oder Hormonen führen und so die Genexpression beeinflussen.

### **2.3.4 Linkage Disequilibrium**

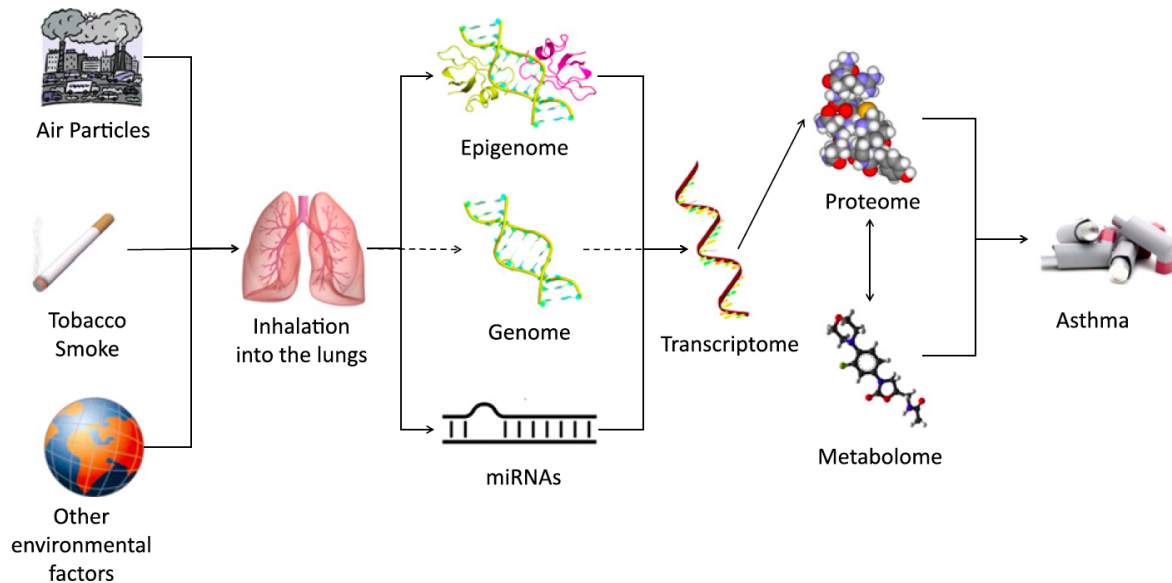
Die verschiedenen SNPs in einer Region sind für gewöhnlich nicht komplett unabhängig voneinander, sondern vielmehr zu einem mehr oder minder starken Grad miteinander assoziiert. Wenn also ein Allel von SNP X in 90% der Fälle gleichzeitig mit einem bestimmten Allel von SNP Y auftritt, so ist ihre gemeinsame Auftretenswahrscheinlichkeit 0,9. Diese nicht-zufällige Beziehung von Allelen wird *Linkage Disequilibrium* (LD) genannt. So kann es vorkommen, dass ein SNP mit einer Krankheit statistisch assoziiert ist, obwohl er keine funktionelle Relevanz besitzt, wenn er in hohem LD zu einem anderen, funktionell bedeutsamen SNP steht.

## **2.4 Biologische und statistische Interaktionen**

In den letzten Jahren wurde mehr und mehr Evidenz gesammelt, dass Asthma aus der Summe von verschiedensten Einflüssen resultiert: Genetische und epigenetische Faktoren spielen ebenso eine Rolle wie Umwelteinflüsse und das Feld der Omics mit dem Transkriptom, dem Proteom und dem Metabolom (siehe Abbildung 2). Zu diesen direkten Einflüssen der einzelnen Faktoren kommen aber auch noch Interaktionen innerhalb und zwischen den verschiedenen Einflussfaktoren dazu. So kann zum Beispiel, wie oben beschrieben, ein Protein an die DNA binden und damit die Genexpression regulieren. Genetische Variationen zweier Proteine können wiederum zu unterschiedlichen nachgeschalteten Effekten durch angestoßene

intrazelluläre Kaskaden führen. An dieser Stelle ist es wichtig, den Terminus „Interaktion“ näher zu definieren: genetisch und biologisch ist eine Interaktion die Wechselwirkung zweier Moleküle, die zu einem bestimmten biologischen Effekt führt. So kann zum Beispiel ein Peptid an einen Rezeptor binden, was wiederum intrazelluläre Kaskaden anstößt. Sollte im Peptid und im Rezeptor eine gewisse Mutation vorliegen, kann das zu einer erhöhten oder verminderten Effektivität resultieren und so zum Beispiel die Genexpression von nachgeschalteten Genen im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen herauf- oder herunterreguliert sein. Zusammengefasst ist eine Interaktion im biologischen Sinne also ein veränderter Effekt ausgelöst durch eine bestimmte Kombination an Mutationen in der DNA.

Eine statistische Interaktion liegt hingegen immer dann vor, wenn die Ausprägung eines Phänotyps in Abhängigkeit von zwei Faktoren systematisch von der Summe der beiden Haupteffekte der beiden Faktoren abweicht. Ein Haupteffekt ist der direkte Effekt eines Einflussfaktors auf die abhängige Variable. Wenn nun zwei einzelne, unabhängige Einflussfaktoren miteinander interagieren, so ist das Ergebnis anders als die Summe der Haupteffekte. Der Effekt kann hierbei größer oder kleiner als der durch die Summe der Haupteffekte erwartete Effekt sein. So kann beispielshalber eine erhöhte Expression eines bestimmten Rezeptors zu einer vermehrten Bronchodilatation führen (Haupteffekt 1), die Gabe eines Sympathomimetikums ebenfalls zu einer gewissen Bronchodilatation führen (Haupteffekt 2), die Gabe eines Sympathomimetikums bei einem Patienten mit einer hohen Expression eines  $\beta_2$ -Rezeptors allerdings zu einer besonders starken (und stärker als durch die einzelnen Effekte erwarteten) Bronchodilatation führen, bei einem Patienten mit geringer Expression des Rezeptors allerdings weniger effektiv sein (Interaktionseffekt).



**Abbildung 2. Multimodaler Ansatz zur Erklärung der Pathogenese von Asthma.** Modifiziert nach Baccarelli & Kaufman (2011). [3]

## 2.5 Ziel und Fragestellung dieser Arbeit

Basierend auf der Tatsache, dass Interaktionen in der wissenschaftlichen Beurteilung der genetischen Risikofaktoren von Asthma bisher noch nicht detailliert berücksichtigt wurden, versucht diese Arbeit durch die Zusammenfassung zweier Studien den Einfluss genetischer Interaktionen auf Asthma in zwei biologischen Systemen zu evaluieren. Genauer gesagt, war das Ziel der ersten Publikation, die biologischen und statistischen Interaktionen zwischen dem Neuropeptid S und dem Neuropeptid S Rezeptor 1 (NPSR1) aufzudecken und deren gemeinsamen Einfluss auf Asthma zu evaluieren. In der zweiten Publikation sollten dann zum Einen Interaktionen zwischen NPSR1 und dem Retinoid-Acid-Related Orphan Receptor Alpha (RORA) untersucht werden und zum Anderen basierend auf diesen Untersuchungen auch der Phänotyp „Asthma“ weiter differenziert werden. Insbesondere sollte die Rolle spezifischer genetischer Interaktionen auf die Entwicklung von nächtlichem Asthma begutachtet werden, um zu beurteilen, ob dieser Subkategorie von Asthma eine spezifische Pathogenese zugrunde liegen könnte.

## **3. Methoden**

### **3.1 Populationen**

#### **3.1.1 Populationen für Berechnungen**

Der Großteil der Berechnungen für die beiden vorliegenden Publikationen wurde in einem Fall-Kontroll-Design – bestehend aus den beiden Studien ISAAC II (International Study of Asthma and Allergies in Childhood phase II) und MAGICS (Multicenter Asthma Genetic In Childhood Study) – durchgeführt. Die Daten für ISAAC II wurden zwischen 1995 und 1996 in München, Dresden und Leipzig gesammelt, um die Prävalenz von Asthma und Allergien in Schulkindern (Alter: 9-11 Jahre) zu eruieren. Für die MAGICS-Studie wurden zwischen 2001 und 2007 Kinder (mittleres Alter: 11 Jahre) in Deutschland und Österreich rekrutiert, wobei die Methodik der MAGICS Studie grundsätzlich auf der Methodik der ISAAC Studie beruht. Hierbei wurden auch Asthma- und Allergiesymptome erfasst, wobei die Diagnosen durch objektive Labordiagnostik gefestigt und schließlich durch einen pädiatrischen Pulmonologen festgestellt werden mussten. Aus diesen beiden Studien wurden 1.454 Kinder im Sinne eines Fall-Kontroll-Designs selektiert. In der ersten Studie der vorliegenden Arbeit fungierte diese Kohorte als Replikationskohorte und in der zweiten Publikation ist sie die ursprüngliche Kohorte.

Die beiden Geburtskohorten BAMSE (Children Allergy Milieu Stockholm Epidemiology study; N=2,033) aus Schweden und MAAS (Manchester Asthma and Allergy Study; N=1085) aus Großbritannien dienten als Replikationskohorten. In der vorliegenden Arbeit sind alle Berechnungen mit der MAGICS/ISAAC II Kohorte, sowie die Berechnungen mit der BAMSE Kohorte in der zweiten Studie von mir selbst durchgeführt, die Replikation in MAAS wurde von einem Kollegen durchgeführt. Alle Studien waren vom jeweiligen Ethikkomitee bewilligt worden und die Eltern oder Erziehungsberechtigten der teilnehmenden Kinder hatten schriftlich die Zusage über die Teilnahme an der jeweiligen Studie erteilt.

#### **3.1.2 Genotypisierung**

In allen vorliegenden Studien wurde DNA von allen Probanden gesammelt und für weitere Analysen aufbereitet. Die Genotypisierung in MAGICS/ISAAC wurde mithilfe des Illumina Sentrix HumanHap300 BeadChip durchgeführt. In BAMSE wurde die iPLEX Chemie und die SEQUENOM Plattform am Mutationsanalyselabor des Karolinska Institut und in MAAS wurde

der Illumina 610 Quad verwendet. Sowohl MAGICIS/ISAAC als auch MAAS beinhalten außerdem Daten, die auf Imputationsanalysen, basierend auf dem 1000 Genomes Referenzgenom, beruhen, wenn keine Originalgenotypisierung vorhanden war. Die Imputation von Daten für nicht genotypisierte SNPs basiert auf der gemeinsamen Auftretenswahrscheinlichkeit mit anderen genetischen Mutationen (siehe auch *Linkage Disequilibrium*, 2.3.4). Wenn zwei Mutationen immer gemeinsam auftreten, kann man aus der Ausprägung des einen SNPs zu 100 % Wahrscheinlichkeit den bisher nicht genotypisierten SNP vorhersagen. Das gleiche funktioniert auch mit geringeren Übereinstimmungen zu anderen SNPs im Genom, wenn genug Informationen, bzw. genügend weitere in Verbindung stehende SNPs vorhanden sind. Zur Imputation der Daten wurde ein Markov Modell-basierter Algorithmus verwendet [48], mithilfe dessen auf Basis der bekannten Haplotypen aus dem 1000Genomes Projekt (<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/MaCH/download/1000G.2012-03-14.html>) die unbekannt Genotypen berechnet wurden [49]. Hierbei wurde, vereinfacht ausgedrückt, der echte Wert eines nicht genotypisierten SNPs über ein iteratives Verfahren geschätzt und dem SNP dann ein Wert zwischen 0 und 2 zugeordnet. Diese Zahl repräsentiert die Anzahl des selteneren Allels an dieser Stelle im Genom.

### **3.1.3 Whole Genome Amplification**

Um DNA in unserer ursprünglichen MAGICIS/ISAAC Kohorte zu sparen, führten wir zunächst eine Genomweite Amplifikation (Whole Genome Amplification = WGA) der Samples durch. Das ist eine genomweite Vervielfältigung der gesamten DNA aller ungefähr 1500 Samples. Der Prozess der Genomamplifikation ist unterteilt in die Fragmentierung der ursprünglichen DNA, die Vorbereitung und Generierung der Library und die anschließende Amplifizierung mittels Polymerase Chain Reaction (PCR). Der genaue Prozess der Vervielfältigung der genomischen DNA wird in Tabelle 1 dargestellt. Die ersten beiden Schritte habe ich dabei direkt sequenziell durchgeführt werden, da die Enden der Library leicht degradieren können, was wiederum die folgenden Schritte beeinflussen könnte. Das ideale Profil des dritten Schritts (DNA-Amplifikation) habe ich, basierend auf Vorarbeiten des Herstellers und Berichten in der Literatur, über ein iteratives Verfahren herausgefunden, indem ich verschiedene Temperaturkombinationen ausprobiert habe und die gewonnene DNA-Menge anschließend ausgewertet habe. Die final gewonnene WGA DNA wurde bei -20°C gelagert und besitzt die gleiche Stabilität wie genomische DNA.

**Tabelle 1. Prozess der Whole Genome Amplification in Einzelschritten.**

	<b>Einzelschritte</b>
<b>Fragmentierung der DNA</b>	1. Isolation der DNA und Quantifizierung der Konzentration mittels UV-Absorption
	2. Vorbereiten einer DNA Lösung mit 1 ng DNA pro µl
	3. Hinzufügen von 1 µl eines Fragmentations-Buffer zu 10 µl DNA
	4. Aufheizen des neuen Samples auf 95°C für genau 4 Minuten
	5. Sofortiges Kühlen und anschließendes Zentrifugieren des Samples
<b>Vorbereitung der Library</b>	6. Hinzufügen von 2 µl eines Library Preparation Buffer und 1 µl einer Library Stabilization Solution zu jedem Sample.
	7. Gründliches Vortexen und anschließendes Aufheizen auf 95°C für 2 Minuten.
	8. Abkühlen und Zentrifugieren der Samples
	9. Hinzufügen von 1 µl der Library Preparation Enzyme, gründliches Schütteln der Samples und kurzes Zentrifugieren
	10. Inkubieren der Samples bei folgenden Bedingungen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 16 °C für 20 Minuten</li> <li>• 24 °C für 20 Minuten</li> <li>• 37 °C für 20 Minuten</li> <li>• 75 °C für 5 Minuten</li> <li>• 4 °C hold</li> </ul>
	11. Kurzes Abzentrifugieren
<b>Amplifikation der DNA</b>	12. Vorbereitung des Master Mix: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 15 µl libraryDNA (s. Schritt 11)</li> <li>• 7.5 µl 10x Amplification Master Mix</li> <li>• 47.5 µl Wasser</li> <li>• 5 µl WGA DNA Polymerase</li> </ul>
	13. Gründliches Vortexen, kurzes Zentrifugieren
	14. Beginn des Thermocycling nach individuell evaluiertem Profil: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Initiale Denaturierung (95 °C für 3 Minuten)</li> </ul> Anschließend 14 Zyklen mit dem folgenden Ablauf: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Denaturieren (95 °C für 15 Sekunden)</li> <li>• Hybridisierung/Elongation (65 °C für 5 Minuten)</li> </ul>

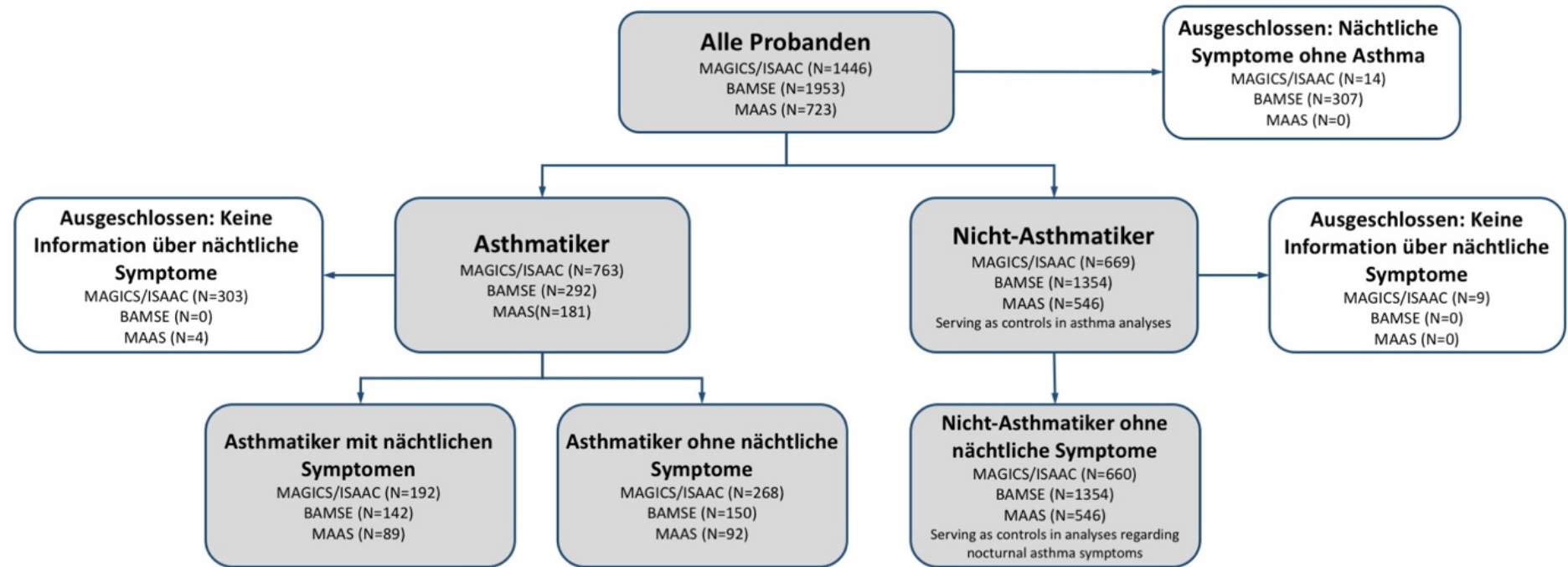


### **3.2 Variablen/Phänotypen**

**Asthma:** In der MAGICs-Studie wurden die Kinder basierend auf der klinischen Präsentation und labormedizinischen, objektiven Maßzahlen von einem pädiatrischen Pulmonologen als Asthmatiker oder Nicht-Asthmatiker klassifiziert. In der ISAAC II und der BAMSE-Studie basierte die Asthmadignose auf der elterlichen Angabe, dass beim eigenen Kind schon einmal Asthma von einem Arzt diagnostiziert worden war. In MAAS wurde die Diagnose Asthma dann vergeben, wenn mindestens zwei der folgenden drei Kriterien zutrafen: (1) Elterliche Angabe, dass das Kind in den letzten 12 Monaten Giemen oder Pfeifen gezeigt hatte; (2) Derzeitiger Gebrauch von Asthmamedikamenten; (3) Elterliche Angabe einer Asthmadignose irgendwann einmal im Leben. Kinder mit keinem der Kriterien fungierten hier als Kontrollen und Kinder, die nur eines dieser Kriterien erfüllten, wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

**Nächtliches Asthma:** In MAGICs/ISAAC und MAAS wurde nächtliches Asthma durch die Frage nach nächtlichem Aufwachen aufgrund von Giemen oder Pfeifen erfasst. Dies musste zur Diagnosestellung mindestens einmal in den letzten 12 Monaten vorgekommen sein. In BAMSE wurde anstelle von Giemen oder Pfeifen nach Husten oder generellen Atemproblemen gefragt. Daher benannten wir die Phänotypen etwas unterschiedlich: *Nächtliche Asthmasymptome* (MAGICs/ISAAC und MAAS) vs. *Nächtliche Atemprobleme* (BAMSE). Für beide Phänotypen mussten die Kinder natürlich auch eine Asthmadignose nach oben angegebenen Kriterien aufweisen. Kinder ohne nächtliche Atemwegsproblematik und ohne Asthma fungierten in allen Kohorten als Kontrollen. In MAAS wurden Asthma und nächtliche Asthmasymptome noch ein weiteres Mal mit 16 Jahren erfasst. Für die Anzahl der Patienten mit den verschiedenen Phänotypen, siehe Abbildung 3.

**Schweres Asthma:** Schweres Asthma ist im klinischen Gebrauch und in der Literatur nicht einheitlich definiert und basiert daher in allen Kohorten auf unterschiedlichen Kriterien. In MAGICs/ISAAC wurden die Krankenhausaufenthalte, sowie Notaufnahmen- und generelle Arztbesuche aufgrund von asthmatischen Beschwerden wie Dyspnoe, Giemen oder Engegefühl auf der Brust gezählt. In MAAS wurde es über die Anzahl der Exazerbationen in den letzten 12 Monaten operationalisiert und in BAMSE beinhaltet der Phänotyp die Auftretenshäufigkeit von Giemen oder nächtlichem Erwachen sowie den Gebrauch von Beta-Sympathomimetika.



**Abbildung 3. Flowchart der Patientenauswahl in allen drei Kohorten.** Abkürzungen der Studiennamen: siehe Fließtext.

### **3.3 SNP Selektion**

Da die Gene, die wir untersuchen wollten, relativ große Gene sind, wurden die SNPs für unsere Analysen nach einem stringenten und konservativen Ansatz ausgewählt. In der ersten Publikation wurden 3 SNPs in *NPS* und 29 (BAMSE) bzw. 23 SNPs (MAGICS/ISAAC) aus *NPSR1* ausgewählt. Die Polymorphismen wurden ausgewählt nach der Häufigkeit des Minor Allele (Minor Allele Frequency =  $MAF \geq 0.02$ ) und basierend auf der Annahme, dass SNPs in regulatorischen und kodierenden Genen die besten Kandidaten sind, eine kausale Rolle zu spielen. Für einige dieser SNPs waren bereits funktionelle Effekte bekannt [50].

In der zweiten Studie wurden Polymorphismen aus *RORA* und *NPSR1* ausgewählt: Zunächst schlossen wir alle SNPs ein, die bereits Teil einer Studie über die biologische Interaktion von *RORA* und *NPSR1* waren [51]. Nach einer stringenten Literaturrecherche fügten wir dann noch diejenigen SNPs hinzu, von denen bereits bekannt war, dass sie mit Asthma assoziiert sind, die aber noch nicht in obiger Studie eingeschlossen waren (die Suche wurde im Oktober 2017 durchgeführt und zuletzt im März 2018 aktualisiert). Ich suchte auf Pubmed nach “asthma[Title] AND GPRA [All Fields] AND polymorphism [All Fields]” und “asthma[Title] AND NPSR1 [All Fields] AND polymorphism [All Fields]” und “asthma[Title] AND RORA [All Fields] AND polymorphism [All Fields]” und schloss letztendlich 59 SNPs aus den folgenden Studien in die Analyse ein: [14–16,19,20,40–44].

### **3.4 Bioinformatische Analysen**

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass unsere Ergebnisse statistisch echte und vor allem biologisch plausible Interaktionen darstellen, führte ich eine systematische Datenbank-Analyse durch. Hierfür wurden Daten aus Datenbanken wie HaploReg, SNPinfo, SNIIPA, ENCODE, dem Roadmap Epigenomics project und der GRASP Datenbank mit Ergebnissen aus funktionellen Experimenten und Vorhersagen für die Top Hits unserer Analysen gescreent [52–56]. Ich untersuchte hierbei zunächst die Lage der relevanten SNPs in Bezug auf das nächste Gen (Intron, Exon, Promoter, Enhancer, etc.) und ob es Vorhersagen gibt, die basierend auf epigenetischen Histonmarkern eine Lage in Promoter- oder Enhancerregionen implizieren. So gibt es bestimmte Methylierungsmuster (z.B. H3K4me3, also die dreifache Methylierung des vierten Lysinrests am Histon 3), die stark mit Promoterregionen assoziiert sind, und auf Basis dieser bekannten Methylierungsmuster kann die Lage von Promotoren zuverlässig

vorhergesagt werden. Diese Regionen habe ich durch Abgleichen meiner Top Hits mit der Online Datenbank ENCODE und dem Roadmap Epigenomics Project für verschiedene Gewebe (Immunzellen, Leber, Lunge, etc.) herausgefunden [53,54]. Auch die SNPs, die in einer Enhancerregion liegen sollen, habe ich auf diese Weise extrahiert.

Wenn ein SNP in einer (vermuteten) Promoterregion lag, war es natürlich auch interessant, ob der Polymorphismus im Vergleich zum Wildtyp in verschiedenen Zelltypen zu einer unterschiedlichen Bindung von diversen Proteinen führt. Diese Proteinbindung konnte ich mithilfe der ENCODE Project ChIP-Seq Daten auf bioinformatischer Basis herausfinden [57]. Schließlich wollte ich auch noch herausfinden, ob die SNPs auch mit einer unterschiedlichen Genexpression als entscheidendem Schritt der Transkription assoziiert sind. So habe ich über die GTEx Pilot Studie v6, das GEUVADIS Projekt und die GRASP Datenbank solche Loci herausgesucht und systematisch mit unseren Top Hits abgeglichen [55,56,58,59]. Zusätzlich zu dieser Evaluierung der Beeinflussung der Gentranskription wollten wir auch herausfinden, ob unsere Top Hits über die Evolution hinweg konserviert waren. Es ist bekannt, dass stark konservierte Regionen funktionell einen großen Einfluss haben. Dies habe ich über die Recherche und Auswertung von SiPhy und GERP-Elementen evaluiert [60,61].

## **3.5 Statistische Grundlagen**

### **3.5.1 Testtheoretische Überlegungen**

Als *Konstrukt* bezeichnet man eine nicht direkt beobachtbare und hypothetische Eigenschaft oder Dimension, die aufgrund von Beobachtungen erschlossen werden muss. So stellen verschiedene Krankheiten die echten Konstrukte dar, die man über Beobachtungen und weitere Parameter erschließen muss. Die *Operationalisierung* ist hingegen die Erfassung der empirischen Merkmalsausprägungen, also im Falle einer Krankheit die phänotypische Charakterisierung über die Anamnese oder weitere klinische Parameter. So werden zum Beispiel klinische Diagnosen auf der Basis von klinischer Untersuchung, Beschwerdesymptomatik, laborchemischen Werten und gegebenenfalls weiteren Parametern gestellt. Dies basiert auf dem jeweils aktuellen Wissensstand, unterliegt jedoch einem steten Wandel. Dies liegt daran, dass neue wissenschaftliche Erkenntnisse eine differenziertere und oftmals bessere Grundlage für eine phänotypische Klassifizierung liefern.

Ganz generell kann man also annehmen, dass es theoretisch ein Konstrukt einer gewissen Krankheit gibt, welches Kliniker und Wissenschaftler abbilden möchten. Dafür fehlen aber

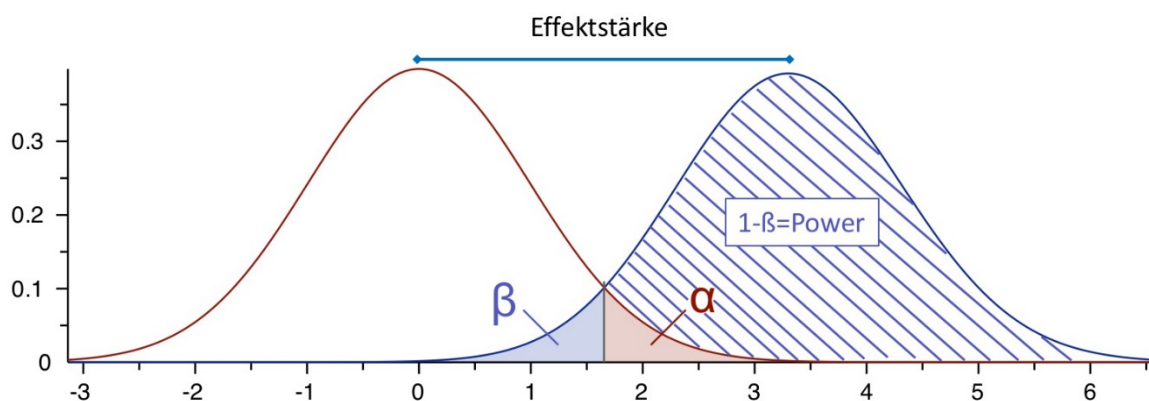
mithin die Mittel, dies vollumfänglich zu tun, weshalb wir das theoretische Konstrukt operationalisieren müssen und so versuchen, es nach bestem bisherigem Wissen zu definieren. So wird zum Beispiel Intelligenz in Form eines Intelligenz-Tests gemessen, auch wenn dies wahrscheinlich nicht alle Formen und Varianten von Intelligenz erfassen kann. Gleiches gilt für klinische Diagnosen. War man sich vor einigen Jahren noch sicher, dass Asthma eine einheitliche, größtenteils klinische Diagnose ist, wird zunehmend klarer, dass dies nicht unbedingt der Fall ist und die Diagnose Asthma, wie die meisten anderen medizinischen Diagnosen, eine Vielzahl an Unterformen beinhaltet, welche pathogenetisch potenziell auf unterschiedliche Weise zu erklären sind. Es scheint offensichtlich, dass ein klinisch und laborchemisch oder gar über genetische Tests abgesicherter Phänotyp wahrscheinlicher an das theoretisch zugrundeliegende Konstrukt heranreicht als ein einfacher Fragebogen. Diese Unterscheidung zwischen *Konstrukt* (theoretischer und „echter“ oder realer, zugrundeliegender Endotyp) und *Operationalisierung* (phänotypische Charakterisierung und Greifbarmachen über Fragen oder klinische Parameter) ist essenziell für das Verständnis dieser Doktorarbeit.

### **3.5.2 Statistische Grundlagen der Auswertung**

Bei der Auswertung einer beliebigen Fragestellung muss immer zunächst eine Hypothese auf Konstruktebene formuliert und aufgestellt werden. Diese kann dann mittels geeigneter Fragen oder anderer Parameter operationalisiert werden und auf Basis dieser Operationalisierung beantwortet werden. Durch die Operationalisierung kann ein gefundener Unterschied allerdings auch nur per Zufall durch die gezogene Stichprobe resultieren, obwohl auf Konstruktebene kein echter Unterschied besteht oder *vice versa*. Zum Verständnis gilt es hierbei, folgende Parameter verinnerlicht zu haben: Effektstärke, Alpha-Fehler, Beta-Fehler, statistische Power, p-Wert und Replikation (siehe auch Abbildung 4):

- Die **Effektstärke** beschreibt das Ausmaß des tatsächlich vorhandenen Unterschieds auf Konstruktebene.
- Der **Alpha-Fehler** oder Fehler erster Art bezeichnet die vorher festgelegte maximal akzeptierte Wahrscheinlichkeit, die Hypothese auf Basis der gezogenen Stichprobe anzunehmen, obwohl auf Konstruktebene kein echter Unterschied zwischen den Gruppen besteht. Dieser Fehler wird *a priori* meistens bei 5% festgelegt.

- Der **Beta-Fehler** oder Fehler zweiter Art beschreibt die Wahrscheinlichkeit, die Hypothese abzulehnen, obwohl tatsächlich (auf Konstruktebene) ein Unterschied besteht. Der Beta-Fehler soll mindestens  $<20\%$ , idealerweise jedoch auch  $<5\%$  sein.
- Die **Power**, auch Teststärke genannt, ist definiert als die inverse Wahrscheinlichkeit zum Beta-Fehler, also  $1-\beta$  und damit die Wahrscheinlichkeit, die formulierte Hypothese richtigerweise (also bei tatsächlich bestehendem Unterschied auf Konstruktebene) anzunehmen. Idealerweise beträgt sie  $95\%$ . Dies kann praktisch nur durch einen Mechanismus erreicht werden, nämlich die Vergrößerung der Stichprobengröße, da die Streuung um den tatsächlichen, echten Mittelwert verringert wird (siehe auch *Gesetz der Großen Zahl*). Damit würde sich die Überlappung der beiden Kurven in Abbildung 4 verringern, wodurch sich die Power vergrößert (schraffierte Fläche).
- Der **p-Wert** ist schließlich die *post hoc* (also nach Durchführung der Studie) herausgefundene Wahrscheinlichkeit, mit der der gefundene Unterschied in der Realität (also auf Konstruktebene) nicht vorhanden ist. Ergebnisse mit einem  $p < 0.05$  werden gemeinhin als signifikant gewertet. Dabei muss berücksichtigt werden, dass es selbst bei einem  $p < 0.05$  möglich ist, dass der gefundene Effekt eigentlich nur durch Zufall zustande gekommen ist, obwohl kein echter Unterschied besteht. Je mehr statistische Tests durchgeführt werden, desto größer wird dementsprechend auch die Wahrscheinlichkeit, dass ein gefundener signifikanter Unterschied nur auf Zufall basiert. Daher muss in diesem Fall der *a priori* definierte Alpha-Fehler bei multiplem Testen adäquat angepasst werden (z.B. mittels Bonferroni-, Bonferroni-Holm oder Benjamini-Hochberg-Korrektur).
- **Replikation**: Eine Replikation ist eine Wiederholung des gleichen Experiments in einer unabhängigen zweiten Kohorte, bzw. mit unabhängigen anderen Proben. Replikationen verringern die Wahrscheinlichkeit, falsch positive Ergebnisse zu erhalten. Zeigt ein Ergebnis in zwei unabhängigen Kohorten einen statistisch signifikanten Einfluss, dann sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Ergebnis rein zufällig entstanden ist: Da es sich um bedingte Wahrscheinlichkeiten handelt, kann man die gefundenen *p*-Werte der beiden Populationen multiplizieren, z.B.  $p_1=0.04 * p_2=0.03 \rightarrow p_{overall}=0.0012$ , also  $0.12\%$ .



**Abbildung 4. Veranschaulichung der relevanten statistischen Begrifflichkeiten.** Die rote und die blaue Kurve zeigen die Verteilung der Mittelwerte aus beliebig gezogenen Stichproben zweier unterschiedlicher Populationen. Die Effektstärke entspricht dem tatsächlichen Unterschied der beiden Populationen. Die Flächen unter den Kurven entsprechen Wahrscheinlichkeiten, eine Stichprobe aus der entsprechenden Gruppe zu ziehen. Die rote Fläche entspricht dem *Alpha-Fehler* und somit der Wahrscheinlichkeit, per Zufall eine Stichprobe zu ziehen, bei der ein Unterschied zum roten Mittelwert besteht, obwohl die Stichprobe auch zur roten Kurve gehört und somit fälschlicherweise ein Unterschied angenommen wird. Der *Beta-Fehler* ist umgekehrt die Wahrscheinlichkeit, eine Stichprobe zu ziehen, in der es keinen Unterschied gibt, obwohl in der zugrunde liegenden Population eigentlich ein Unterschied bestünde (blaue Fläche unter der blauen Kurve). Die *Power* ist die Wahrscheinlichkeit, eine Hypothese richtigerweise anzunehmen, es besteht also sowohl in der Stichprobe, als auch in der zugrunde liegenden Population ein signifikanter Unterschied (blau schraffierte Fläche).

### **3.5.3 Auswahl des geeigneten Tests**

Die Bedeutung der oben beschriebenen Parameter bildet die Grundlage für die dann folgende Testung der Hypothese. Allerdings müssen für eine adäquate Testung einer statistischen Hypothese einige Grundvoraussetzungen bekannt sein, um dann denjenigen Test auszuwählen, der für die Beantwortung der Frage unter Berücksichtigung der statistischen Gegebenheiten der geeignete ist. Diese Voraussetzungen und die verschiedenen Tests möchte ich im Folgenden kurz darlegen.

#### ***Verteilung der Werte***

Die erhobenen Werte können auf unterschiedliche Art und Weise verteilt sein. Entweder können sie einer Gauß'schen Normalverteilung folgen (siehe Abbildung 4) oder eben auf irgendeine Weise schief verteilt sein (wie z.B. biologische Werte, die bei Gesunden, also der überwiegenden Mehrheit, nahe der 0 liegen, aber im Krankheitsfall stark positiv sein können). Dies ist relevant, da eine Normalverteilung die Voraussetzung ist, um einige der bekannten statistischen Tests überhaupt anzuwenden. So kann ein t-Test für die Beurteilung eines Unterschieds zwischen zwei Gruppen nur bei normalverteilten Werten angewandt werden. Oftmals kann jedoch bei Variablen, bei denen keine Normalverteilung vorliegt, durch eine Transformation der Werte eine Normalverteilung erzielt werden. Eine solche Möglichkeit ist die logarithmische Transformation. Vor Durchführung eines bestimmten Tests sollte über den Shapiro-Wilks-Test überprüft werden, ob es eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung gibt und nur wenn es keine Abweichung gibt, dürfen diejenigen Tests angewendet werden, die eine Normalverteilung als Voraussetzung haben.

#### ***Regressionsanalyse***

Eine Regression berechnet den Zusammenhang zwischen einer (oder mehreren) unabhängigen Variablen (UV) und einer abhängigen Variable (AV). Dieses Verfahren wird insbesondere dann verwendet, wenn eine Vorhersage über die Ausprägung der AV getroffen werden soll. Die Regressionsanalyse verwendet folgendes mathematisches Modell, um die Ausprägung der AV vorherzusagen:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A$$

(Formel 1)



Wobei  $\beta_1$  das Gewicht und damit die Wichtigkeit des Faktors  $A$  bei der Vorhersage der AV  $Y$  und  $\beta_0$  den nicht durch diesen Faktor zu erklärenden Anteil der AV darstellt. Die Hypothese für einen Effekt lautet bei Regressionsanalysen jeweils, dass der Gewichtungsfaktor  $\beta_1$  signifikant von 0 abweicht und damit einen messbaren Einfluss auf  $Y$  hat.

Oftmals sind unabhängige Variablen in einem Experiment veränderte und so aktiv beeinflussbare Größen. Genetische Mutationen hingegen sind natürlich nicht aktiv vom Untersucher veränderbar. Allerdings kann aufgrund des biologischen Wissens davon ausgegangen werden, dass die Mutationen zuerst da waren und sich die Krankheit (in unserem Falle Asthma, bzw. nächtliches Asthma) erst im Folgenden ausgebildet hat. Diese biologische Plausibilität erlaubt es uns, die untersuchten SNPs als UVs und das jeweilige Outcome als AV anzusehen.

### ***Interaktionsanalysen***

Bei Hinzunahme eines weiteren Faktors muss die obige (Formel 1) schließlich erweitert werden. Es kommen ein Hauptfaktor  $B$  sowie der Interaktionsterm der beiden Variablen  $A \times B$  zur weiteren Aufklärung der Varianz der AV hinzu.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 AB$$

(Formel 2)

$\beta_2$  bezeichnet hier das Gewicht des Faktors  $B$  und  $\beta_3$  ist das Gewicht der Interaktion von Faktor  $A$  und Faktor  $B$ . Je größer das jeweilige Gewicht, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass der entsprechende Faktor (oder die Kombination aus zwei Faktoren) die abhängige Variable signifikant beeinflussen kann. Sollte  $\beta_3$  also signifikant von 0 abweichen, besteht eine statistisch bedeutsame Interaktion zwischen Faktor  $A$  und Faktor  $B$  bei der Vorhersage von  $Y$ . Dies bedeutet, dass die Ausprägung des Phänotyps  $Y$  systematisch von der Summe der beiden Haupteffekte ( $A$  oder  $B$  alleine) abweicht. So kann zum Beispiel der Faktor  $A$  die Ausprägung von  $Y$  um 1 Einheit erhöhen, der Faktor  $B$  für sich genommen erhöht  $Y$  um eine weitere Einheit, aber wenn  $A$  und  $B$  vorhanden sind, steigt die Ausprägung des Phänotyps  $Y$  systematisch um 5 statt um 2 Einheiten, wie es der Fall wäre, wenn nur die Haupteffekte vorhanden gewesen wären.

### ***Lineare vs logistische Regression***

Die Art der Regression, die verwendet werden kann, um das Outcome vorherzusagen, ist wiederum abhängig von der Ausprägung des Outcomes. Sollte die AV eine kontinuierliche Variable sein, kann eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt werden. Bei einer dichotomen Variablen (also einer Variable mit lediglich zwei Ausprägungen) kann hingegen keine Normalverteilung angenommen werden, weshalb bei solchen Variablen eine logistische Regression durchgeführt wird, um die AV vor der tatsächlichen Berechnung logarithmisch zu transformieren. Bei einer logistischen Regression wird (im Unterschied zu einer linearen Regression) normalerweise nicht der  $\beta$ -Wert berichtet, sondern die Odds Ratio (OR). Die OR entspricht dabei dem exponierten  $\beta$ -Wert:  $OR = e^{\beta}$ . Dementsprechend ist  $\beta = \log_e(OR)$ , was in der Logarithmisierung der AV reflektiert wird. Die OR ist ein Verhältnismaß, in dem zum Ausdruck kommt, ob eine UV die Ausprägung der AV erhöht ( $OR > 1$ ) oder vermindert ( $OR < 1$ ) und so einen Risiko- oder einen protektiven Faktor darstellt.

## **3.6 Statistische Auswertung der vorliegenden Arbeit**

### **3.6.1 Qualitätskontrolle**

Wie oben beschrieben, wurden MAGICs und ISAAC kombiniert, um eine kongruente Fall-Kontroll-Studie zu bilden [62,63]. Bevor die genetischen Daten dieser Population allerdings verwendet werden konnten, musste ich eine rigorose und konservative Qualitätskontrolle nach bestehenden Vorgaben durchführen [64–66]. Im Folgenden wird die Vorgehensweise der Qualitätskontrolle kurz skizziert und die genauen statistischen Aufrufe finden sich im Anhang (s. Anhang 3 am Ende dieser Arbeit).

Im Rahmen der Qualitätskontrolle habe ich zunächst die allgemeine Genotypisierungsqualität und die Heterozygotität der Proben bestimmt. Die Heterozygotitätsrate ist der prozentuale Anteil der Heterozygoten unter allen Proben. Alle Proben, für die mehr als 3% der Genotypen fehlten und alle Proben, deren Heterozygotitätsrate mehr als 3 Standardabweichungen vom über alle Proben hinweg gewonnenen Mittelwert abwichen, wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Anschließend testete ich die genetische Verwandtschaft zwischen allen Proben über die genetische Übereinstimmung der Proben, da wir keine Zwillinge oder Geschwister in unseren Analysen belassen wollten, um die Ergebnisse möglichst nicht systematisch zu verfälschen. Dafür habe ich bei Zwillingen beide Proben gelöscht, bei allen Geschwistern oder weiteren Verwandten mit einer genetischen Übereinstimmung von  $\leq 50\%$  und  $\geq 18.75\%$  behielt

ich das besser genotypisierte Sample. Nach Abschluss der Qualitätskontrolle der Samples, wollte ich natürlich noch diejenigen genetischen Marker ausschließen, die schlecht genotypisiert werden konnten ( $\geq 5\%$  fehlende Werte), die eine unterschiedliche Rate an fehlenden Werten zwischen Fällen und Kontrollen aufwiesen ( $p < 0.0001$ ) oder die sich nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befanden ( $p < 0.0001$ ). Das HWG beschreibt unter Anderem, dass Genotyphäufigkeiten in einer idealen Population eine Funktion der Allelhäufigkeiten sind. Im Falle von genetischen Assoziationsstudien bedeutet dies, dass die einzelnen Allele nicht überproportional häufig vorhanden sind. Eine Abweichung vom HWG kann verschiedene Ursachen haben, wie zum Beispiel Genotypisierungsfehler oder Fehler bei der Populationsstratifizierung, welche wiederum zu verzerrten Ergebnissen führen könnten. Um systematische Fehler zu vermeiden, hätten vom HWG abweichende SNPs von den Analysen ausgeschlossen werden müssen. Die ausgewählten Marker sind alle nicht hochgradig miteinander assoziiert ( $LD < 0.80$ ). Die so bereinigten Daten waren schließlich diejenigen, die ich für meine Berechnungen verwendet habe (siehe Anhang 3).

### **3.6.2 Grundlagen der Auswertung**

Da für genetische Varianten eine Normalverteilung angenommen werden kann, wurden für die Beurteilung von Assoziationen und Interaktionen Regressionen berechnet: für binäre Variablen wurden logistische Regressionen, und für kontinuierliche Variablen lineare Regressionen berechnet. Daher werden Odds Ratios (OR) und 95% Konfidenzintervalle (CI) für dichotome Variablen, sowie Beta-Werte ( $\beta$ ) und Standardfehler (SE) für kontinuierliche Variablen gezeigt (vgl. 3.5.3). Interaktionen wurden mittels dem --epistasis Befehl im Statistikprogramm PLINK (Version 1.0.7) berechnet [67]. Der Epistasis-Befehl nimmt oben bereits beschriebene Formel (Formel 2) für die Regressionsanalyse von Interaktionen ( $Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3AB$ ) und berechnet das Gewicht von  $\beta_3$  und damit die Bedeutung der Interaktion der zwei Faktoren für die Ausprägung der entsprechenden Krankheit über eine Vielzahl an SNPs auf einmal. Alle weiteren Analysen wurden in R statistics (Version 3.0.1) durchgeführt [68]. Die Interaktionsanalysen wurden unter der Annahme eines biologisch additiven Modells analysiert.

### **3.6.3 Umgang mit multiplem Testen**

Für alle Replikationsanalysen wurden  $p$ -Werte  $< 0.05$  als statistisch signifikant angesehen, da eine spezifische Hypothese getestet wurde. Um bei der Analyse der *de novo* Interaktionen für das Problem des multiplen Testens und der damit einhergehenden Alpha-Fehler-Inflation zu korrigieren (vgl. 3.5.2) und dadurch die Gefahr zu minimieren, falsch positive Ergebnisse zu erhalten, wurden nur diejenigen Polymorphismen berücksichtigt, für die die Anzahl an signifikanten Interaktionen die stochastisch erwartete Anzahl übersteigt. Dies wurde vor kurzem als valide Methode im Fachmagazin Nature Genetics beschrieben und diskutiert [69]. Im Fall der zweiten Studie, die sich maßgeblich mit genetischen Interaktionen befasst, bedeutet dies, dass ein SNP mit mindestens drei Polymorphismen des jeweils anderen Gens interagieren musste ( $24 \text{ SNPs} \times 0.05 = 1.2$  und  $35 \text{ SNPs} \times 0.05 = 1.75 \approx 2$  erwartete falsch positive Ergebnisse pro SNP). Die (signifikanten) Ergebnisse der anderen Interaktionen, die nicht die stochastisch erwartete Anzahl überstiegen, werden ebenfalls berichtet, aber diese Ergebnisse müssen mit großer Vorsicht interpretiert werden. Die gesamte Syntax, die zur Analyse der Daten programmiert wurde, findet sich im Anhang (s. 7.3 bis 7.5 in dieser Arbeit).

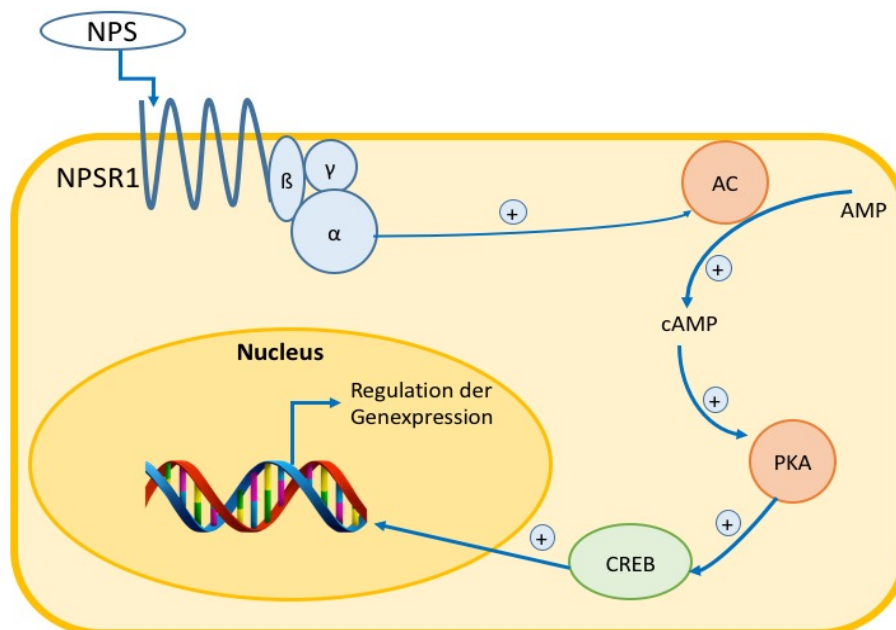
## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Das NPS/NPSR1-System beeinflusst Asthma**

#### **4.1.1 Hintergrund und Fragestellung**

##### *Neuropeptid S System*

Das Neuropeptid S ist ein 20 Aminosäuren großes Peptid mit einer hochkonservierten Sequenz, das eine funktionelle Einheit mit dem Neuropeptid S Rezeptor 1 (NPSR1) bildet und zentrale Prozesse zu beeinflussen scheint. Gleichzeitig wird angenommen, dass es auch eine Rolle im zirkadianen Rhythmus und der Pathogenese von Asthma spielt [70,71]. NPSR1 ist ein G-Protein gekoppelter Transmembranrezeptor mit drei Untereinheiten, alpha, beta und gamma. Bei Bindung von NPS an NPSR1 dissoziiert die alpha-Untereinheit und aktiviert die Adenylatzyklase, die dadurch die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) erhöht [72]. Das erhöhte cAMP erhöht indirekt die Aktivität des cAMP-response element (CRE). CRE diffundiert schließlich aus dem Zytosol in den Zellkern, wo es an die DNA bindet und die Genexpression verschiedener Gene moduliert (Abbildung 6).

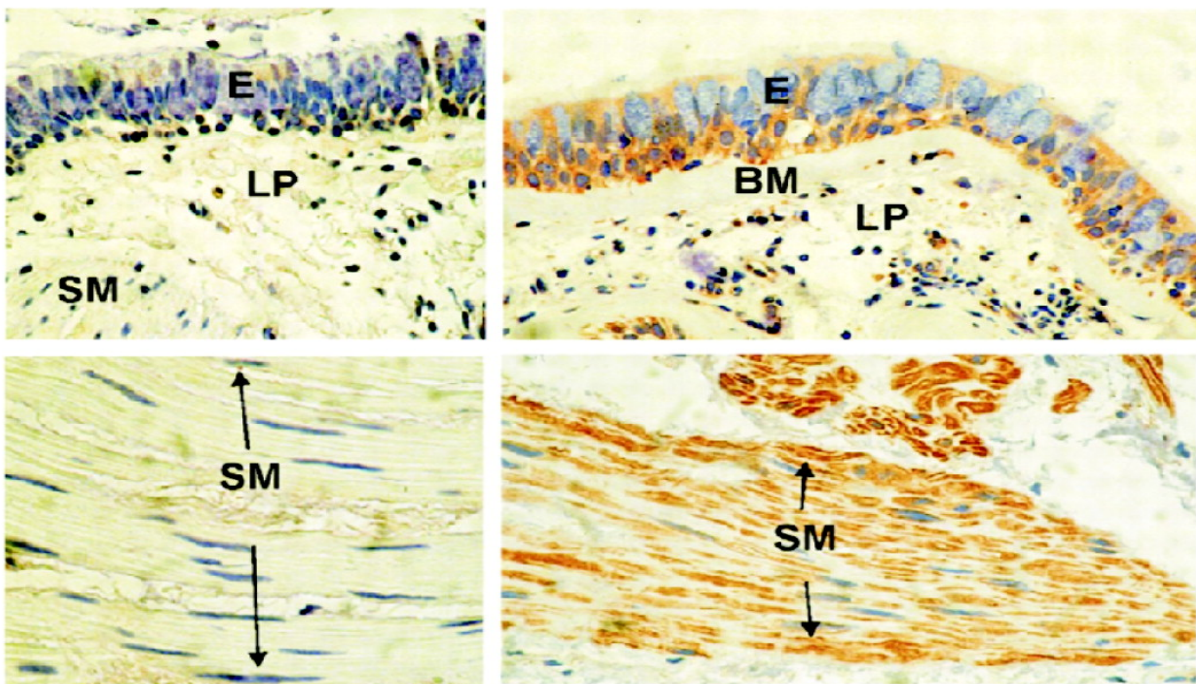


**Abbildung 6. Beispielhafte Darstellung der intrazellulären Kaskade, die durch die Aktivierung des NPS/NPSR1-System angestoßen wird.** Die Beschreibung des genauen Ablaufs findet sich im Fließtext. Abbildung modifiziert nach Leurs et al (2005). [73]

Abkürzungen: NPS – Neuropeptid S, NPSR1 – Neuropeptid S Rezeptor 1, AC – Adenylatzyklase, AMP – Adenosinmonophosphat, cAMP – zyklisches Adenosinmonophosphat, PKA – Proteinkinase A, CREB – cAMP response element binding protein.

### ***NPSR1 und Asthma***

In einer *positional cloning* Studie von Laitinen und Kollegen, die im Jahr 2004 in *Science* publiziert wurde, konnte von Juha Kere und seiner Gruppe gezeigt werden, dass *NPSR1*-Mutationen eine Rolle in der Pathogenese von Asthma spielen [74]: Immunhistochemische Markierungen ließen vermuten, dass *NPSR1* im Bronchusepithel sowie in der glatten Muskulatur der Bronchien von Asthmatikern überexprimiert ist (siehe Abbildung 7 [74]). Des Weiteren war die Genexpression von *NPSR1* in Mäusen bei Sensitivierung mit Ovalbumin erhöht, was ebenso auf eine Beteiligung in der allergischen Antwort hinweist [74]. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass *NPSR1* in Eosinophilen und im Plasma von Kindern mit Asthma verstärkt exprimiert wird [75,76].



**Abbildung 7. Immunhistochemische Färbung für NPSR1 aus Bronchialbiopsien einer gesunden Kontrolle (links) und eines Asthmaticers (rechts).** Abkürzungen: E – Bronchialepithel, BM – Basalmembran, LP – Lamina propria, SM – smooth muscle (glatte Muskulatur). Das Bronchialepithel und die glatte Muskulatur der gesunden Kontrolle zeigen nur eine leichte immunhistochemische Färbung, wohingegen die zilienträgenden Zellen und die glatte Muskulatur des Asthmaticers *NPSR1* stark zu exprimieren scheinen. Außerdem fallen eine Becherzellvermehrung, sowie eine Basalmembranverdickung auf, wie sie typisch sind für einen Asthmaticer. Abbildung entnommen aus Laitinen et al (2004). [74]

### ***Interaktion von NPS und NPSR1***

*NPSR1* war nach der initialen Studie von Laitinen und Kollegen noch mehrfach mit Asthma und einer Hyperreagibilität der Atemwege assoziiert [74,77–79]. Mutmaßlich wird dieser Zusammenhang über einen zentral regulierten Mechanismus vermittelt [80]. Allerdings konnten diese direkten genetischen Assoziationen diese Hypothese der vermuteten biologischen Beteiligung von *NPSR1* an der Pathogenese von Asthma bisher nur marginal unterstützen [74,77–79]. In anderen molekularen Pathways konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass in solchen Fällen auch Interaktionen der betroffenen Gene zu der nicht erklärten Varianz beitragen können [81–83]. So konnte zum Beispiel über die Analyse von statistischen Interaktionen zwischen IL4, IL13, dem IL4-Rezeptor alpha und STAT6 ein biologisch relevanter Mediatorschritt in der molekularen Kaskade der Pathogenese von Asthma herausgefunden worden [83]. Da die bis dato gefundenen Haupteffekte der relevanten *NPSR1*-SNPs nicht so eindeutig waren wie initial vermutet und durch biologische Studien suggeriert, lautete unsere Hypothese, dass der Effekt auf Asthma durch genetische Interaktionen zustande kommen könnte. Da *NPS* essentiell für die Aktivierung von *NPSR1* ist, wollten wir herausfinden, ob genetische Interaktionen zwischen diesen beiden Genen (1) funktionelle Veränderungen nach sich ziehen und (2) eine erhöhte Anfälligkeit für Asthma bedingen.

Um zu zeigen, dass genetische Varianten in *NPS* und *NPSR1* miteinander interagieren, und so das Auftreten von Asthma beeinflussen, hatten unsere Kollegen aus der Arbeitsgruppe von Juha Kere in Schweden zunächst die biologische Plausibilität dieser Hypothese weiter untermauert. Dabei untersuchten sie, ob spezifische Kombinationen genetischer Mutationen von *NPS* und *NPSR1* *in vivo* zu einer unterschiedlichen Aktivität des cAMP response element führen würden und so die nachfolgende biochemische Kaskade unterschiedlich aktiviert werden würde. Dies konnte in funktionellen Experimenten mittels Luciferase Assays tatsächlich bestätigt werden. Des Weiteren konnte in Folgeexperimenten festgestellt werden, dass die mRNA Expression von Downstream-Genen, die in Verbindung zu inflammatorischen Pathways stehen, durch dieselbe Interaktion der beiden Gene beeinflusst wird. Interessanterweise konnten unsere Kollegen dann über genetische Interaktionsanalysen feststellen, dass dieselben Varianten, die zu einer erhöhten Expression der entsprechenden inflammatorischen Gene führten, auch mit einem höheren Risiko für die Entwicklung von Asthma zusammenhingen. Im Besonderen führte die Kombination aus *NPS*-Val(6) und *NPSR1*-Ile(107) in BAMSE zu einer erhöhten Suszeptibilität für Asthma.

#### **4.1.2 Ergebnisse in unserer Kohorte**

In initialen molekularbiologischen Experimenten hatte sich also tatsächlich eine Interaktion zwischen *NPS* und *NPSRI* gezeigt. Insbesondere zeigte sich in Abhängigkeit der zwei Genotypen ein unterschiedliches Ausmaß an Aktivität des cAMP-response elements, sowie eine unterschiedliche Genexpression von downstream liegenden proinflammatorisch wirksamen Zielgenen. Anschließend konnte in der BAMSE-Kohorte gezeigt werden, dass statistische Interaktionen zwischen diesen Mutationen auch mit Asthma assoziiert waren. Zur Replikation der Ergebnisse wurde schließlich noch eine unabhängige Kohorte benötigt. Hierfür extrahierte ich zunächst aus unserem Datensatz mit genomweiten Daten diejenigen SNPs, die bereits von unseren Kollegen untersucht wurden. Da wir nur 14 SNPs original genotypisiert hatten, extrahierte ich die weiteren SNPs aus unserem oben beschriebenen Imputationsdatensatz. Darüber konnte ich Daten zu 12 weiteren SNPs extrahieren, wodurch wir die Interaktionen von 26 SNPs (3 aus *NPS* und 23 aus *NPSRI*) darstellen konnten. Für diese SNPs berechnete ich zunächst die Assoziation mit Asthma über eine logistische Regression im additiven und dominanten Modell. Anschließend berechnete ich die Interaktion (bzw. Epistasie) der beiden Gene. Da diese Funktion lediglich die Effektstärke und den p-Wert berechnet, musste ich schließlich noch eine Funktion programmieren, um das Konfidenzintervall der einzelnen Ergebnisse selbst zu berechnen. Die Ergebnisse unserer Kohorte sind in Tabelle 2 dargestellt und die genauen Aufrufe finden sich im Anhang (siehe 7.4). Interessanterweise ist die Interaktion von *NPS* rs10830123 und *NPSRI* rs17199659 die einzige signifikante Interaktion in MAGIC/ISAAC. Das ist auch diejenige Interaktion, welche in der primären Kohorte BAMSE eine signifikante Beeinflussung von Asthma gezeigt hatte.

Um zu zeigen, dass unsere Populationen vergleichbar sind, berechnete ich noch die Minor Allele Frequency (MAF) in unserer Population und verglich diese mit der MAF in BAMSE. So konnte ich zeigen, dass die Verteilung der genetischen Daten in beiden Populationen ähnlich ist.



**Tabelle 2. Epistasis von *NPS*\**NPSRI* SNPs auf Asthma in MAGIC/ISAAC.**

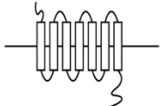
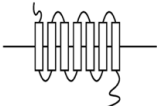
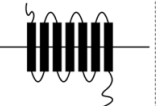
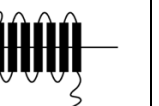
		<i>NPS</i>		
		rs1931704	rs10830123	rs4751440
<i>NPSRI</i>	rs1006392	1.11 (0.86-1.44) 0.43	0.91 (0.67-1.23) 0.53	1.26 (0.91-1.74) 0.16
	rs714588	1.09 (0.84-1.4) 0.52	1.1 (0.81-1.5) 0.53	0.98 (0.71-1.35) 0.89
	rs2125404	<i>1.49 (0.93-2.39) 0.099</i>	0.99 (0.57-1.71) 0.96	1.65 (0.89-3.06) 0.11
	rs2168891	<i>1.58 (0.96-2.59) 0.071</i>	1.07 (0.61-1.87) 0.82	1.63 (0.87-3.07) 0.13
	rs1963499	1.32 (0.77-2.24) 0.31	1.06 (0.58-1.93) 0.86	1.28 (0.62-2.66) 0.51
	rs1419793	0.27 (0.04-1.68) 0.16	0.55 (0.04-6.88) 0.64	0.16 (0.02-1.65) 0.13
	rs2530547	1.16 (0.88-1.54) 0.29	1.07 (0.78-1.47) 0.68	0.99 (0.7-1.4) 0.95
	rs887020	1.06 (0.82-1.38) 0.64	1.13 (0.83-1.54) 0.44	0.93 (0.67-1.29) 0.66
	rs2530552	1.1 (0.83-1.45) 0.51	1.13 (0.82-1.55) 0.46	0.97 (0.68-1.39) 0.87
	rs1379928	0.99 (0.73-1.32) 0.93	0.8 (0.55-1.16) 0.24	1.05 (0.71-1.57) 0.80
	rs11770777	0.93 (0.69-1.24) 0.61	1.05 (0.75-1.46) 0.78	0.83 (0.57-1.22) 0.35
	rs2530566	0.96 (0.74-1.25) 0.77	0.98 (0.72-1.34) 0.91	0.89 (0.64-1.25) 0.51
	rs963218	1.04 (0.8-1.35) 0.78	1.13 (0.83-1.55) 0.43	0.9 (0.64-1.26) 0.53
	rs2609215	1.4 (0.9-2.19) 0.14	0.92 (0.53-1.59) 0.77	<i>1.68 (0.93-3.03) 0.084</i>
	rs2531840	1.18 (0.9-1.55) 0.22	1.09 (0.8-1.48) 0.59	1.06 (0.75-1.51) 0.72
	rs323917	1.18 (0.69-1.99) 0.55	0.9 (0.46-1.77) 0.76	1.48 (0.7-3.14) 0.30
	rs324396	1.01 (0.77-1.31) 0.96	0.82 (0.59-1.15) 0.26	1.15 (0.81-1.63) 0.43
	rs740347	0.9 (0.64-1.28) 0.57	0.76 (0.49-1.16) 0.20	0.7 (0.45-1.09) 0.12
	rs324981	1.1 (0.86-1.42) 0.45	1.16 (0.85-1.58) 0.35	0.94 (0.67-1.32) 0.73
	rs17199659	1.09 (0.78-1.51) 0.62	<b>1.78 (1.19-2.67) 0.004</b>	0.75 (0.49-1.16) 0.20
rs10263447	1.21 (0.87-1.67) 0.25	0.96 (0.65-1.42) 0.84	1.32 (0.87-2.01) 0.20	
rs727162	1.06 (0.77-1.46) 0.71	1.37 (0.92-2.04) 0.12	0.77 (0.51-1.16) 0.21	
rs6972158	1 (0.59-1.7) 0.99	0.93 (0.68-1.27) 0.65	1 (0.71-1.41) 0.99	

Interaktionsergebnisse von *NPS*\**NPSRI* Interaktionen in MAGIC/ISAAC. Odds Ratios und 95%-Konfidenzintervalle, sowie *p*-Werte sind dargestellt. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt und Borderline signifikante Ergebnisse sind kursiv gedruckt. SNPs aus dem Originaldatensatz sind hellgrau hinterlegt und SNPs aus dem Imputationsdatensatz sind dunkelgrau hinterlegt.

### 4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Basierend auf allen gefundenen Ergebnissen kann man also die Aussage treffen, dass *NPS* und *NPSR1* miteinander interagieren und dass unterschiedliche Ausprägungen auf Genebene in einer unterschiedlichen Aktivierung der cAMP-Kaskade und schließlich in einer differenziellen Expression von Downstream liegenden Genen resultieren. Insbesondere die Kombination aus *NPS-Val(6)* und *NPSR1-Ile(107)* scheint zu einer maximalen Signaltransduktionsverstärkung zu führen und konsekutiv zur höchsten downstream Genexpression von inflammatorisch aktiven Genen (s. Tabelle 3). Dies scheint wiederum mit einer erhöhten Suszeptibilität für asthmatische Erkrankungen zusammenhängen. Durch die Replikation in unserer Kohorte von deutschen Kindern konnten wir zeigen, dass dieses Ergebnis nicht durch Zufall entstanden ist oder auf eine Population beschränkt ist und konnten dadurch die Ergebnisse validieren. Zweitens verringert die Replikation in unserer Kohorte die Wahrscheinlichkeit, dass die initialen Funde nur zufällig zustande gekommen waren, weil durch die Erhöhung der Fallzahl die statistische Power erhöht wurde.

**Tabelle 3. Überblick über die Interaktion zwischen *NPS* und *NPSR1* und die Beeinflussung der molekularbiologischen Folgen.**

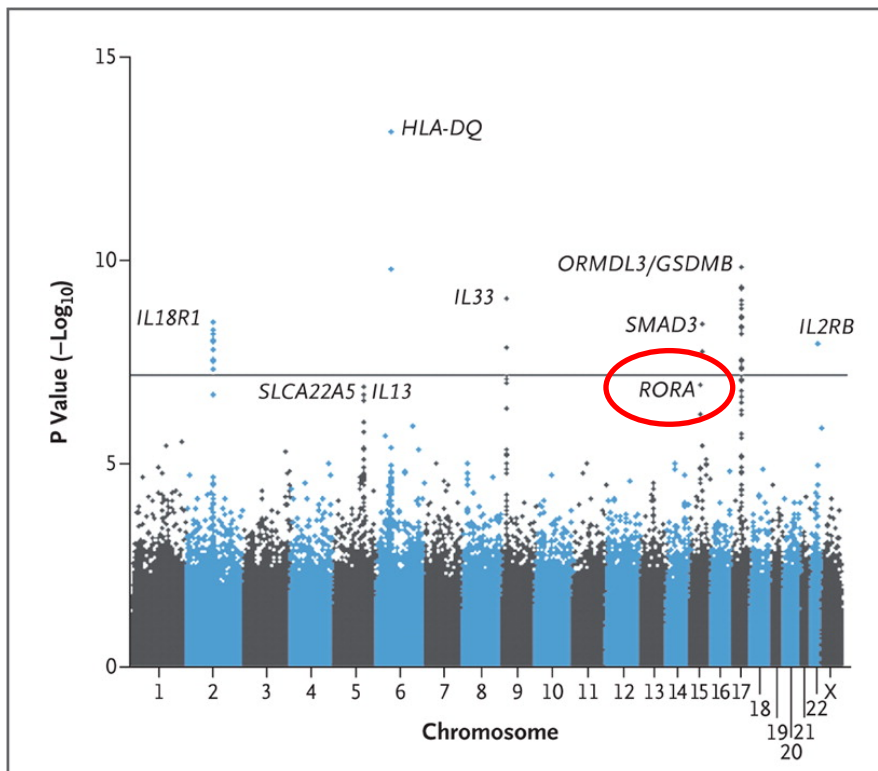
Kombination von <i>NPS</i> und <i>NPSR1</i>	<b>NPS-Leu(6)</b>  <b>NPSR1-Asn(107)</b>	<b>NPS-Val(6)</b>  <b>NPSR1-Asn(107)</b>	<b>NPS-Leu(6)</b>  <b>NPSR1-Ile(107)</b>	<b>NPS-Val(6)</b>  <b>NPSR1-Ile(107)</b>
Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade	+	++	+++	++++
Genexpression der inflammatorischen Zielgene	Referenzwert	3- bis 7-fach erhöhte Transkription	10- bis 11-fach erhöhte Transkription	18- bis 35-fach erhöhte Transkription

## 4.2 *RORA* und *NPSR1* beeinflussen nächtliches Asthma

### 4.2.1 Hintergrund: *RORA* und der zirkadiane Rhythmus

#### *RORA* und Asthma

Das Gen *RORA* kodiert für den *Retinoid Acid Receptor-Related Orphan Receptor Alpha*, der einen nukleären Hormonrezeptor der NR1 Familie darstellt. *RORA* ist auf vielfältige Weise mit der potenziellen Pathogenese von Asthma assoziiert: Bereits in einer der ersten genomweiten Assoziationsstudien zu Asthma konnte es als potenzieller Einflussfaktor auf die Entstehung von Asthma identifiziert werden (s. Abbildung 8) und in weiteren Studien bestätigte sich diese Assoziation [12,84]. Außerdem ist das entsprechende Protein Teil des gleichen Pathways wie IL33, IL1RL1 und IL13 und die Genexpression von *RORA* war stark hochreguliert in Kindern mit therapie-resistentem Asthma [85]. Zusätzlich ist bekannt, dass *RORA* eine unterschiedliche mRNA Expression während der Lungenreifung und während der pulmonalen Inflammation zeigt [86–90].

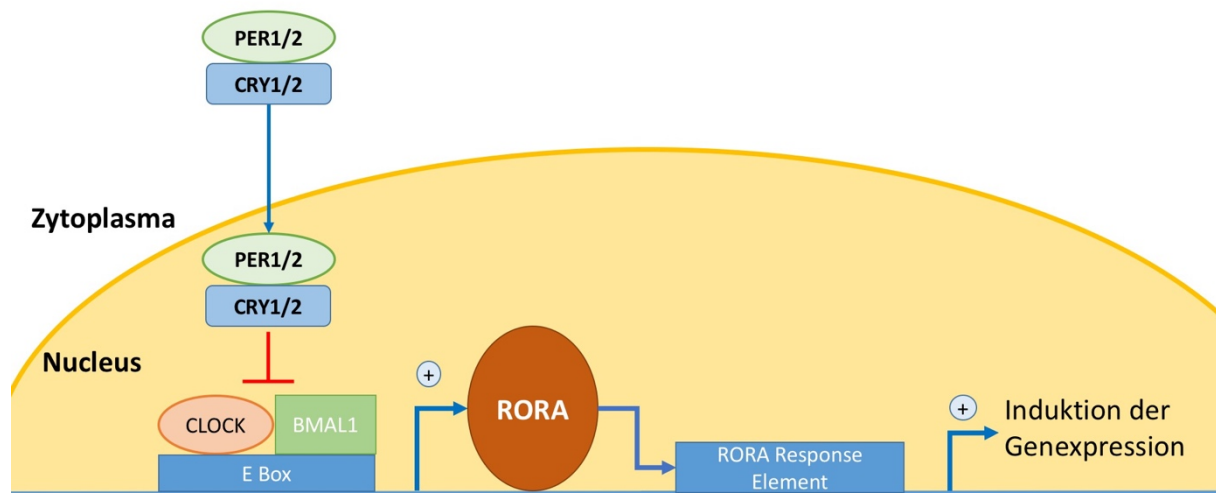


**Abbildung 8. Ergebnisse einer genomweiten Assoziationsstudie zu Asthma aus dem Jahr 2010.** In dieser Studie war *RORA* eines der Gene, welches mit Asthma assoziiert war. Modifiziert nach Moffatt et al (2010). [12]

### ***RORA und der zirkadiane Rhythmus***

RORA zeigt aber auch eine zirkadiane Rhythmik in verschiedenen Geweben, so zum Beispiel in der Lunge [91–93] und Rora-defiziente Mäuse zeigten ein fehlerhaftes Verhalten in Bezug auf ihren zirkadianen Rhythmus, wie zum Beispiel ein verändertes Fütterverhalten und verringerte Bewegungsperioden [89,92].

Als Hormonrezeptor wird RORA durch verschiedene Proteine des zirkadianen Rhythmus beeinflusst [92,94–97] und verändert wiederum die Genexpression verschiedener Gene, die wichtige Bestandteile des zirkadianen Rhythmus darstellen [86,89,90,92,98]. So wird RORA durch den Heterodimer aus CLOCK und BMAL1 aktiviert und erhöht die downstream Genexpression von verschiedenen Genen des zirkadianen Rhythmus wie PER1/2 und CRY1/2, was auch als negativer Feedback-Mechanismus dient (siehe Abbildung 9). Vor allem scheint RORA allerdings als Mediator zwischen dem zirkadianen Rhythmus und weiteren physiologischen Prozessen zu dienen, da es die Aktivität von downstream liegenden Zielgenen reguliert und so verschiedene physiologische Prozesse beeinflusst [89,90].



**Abbildung 9. Beteiligung von RORA am zirkadianen Rhythmus.** RORA stellt ein essenzielles Bindeglied zwischen Genen des zirkadianen Rhythmus und der Downstream Genexpression dar. Genaue Informationen finden sich im Fließtext. Modifiziert nach Gallego & Virshup (2007). [99]

### ***Interaktionen von RORA und NPSR1 beeinflussen Asthma***

Kürzlich hat schließlich die schwedische Forschergruppe um Juha Kere herausgefunden, dass Gen-Gen-Interaktionen zwischen *RORA* und *NPSR1* das Risiko von Asthma erhöhen [51]. Die Autoren konnten zeigen, dass *Npsr1*-defiziente Mäuse eine deutlich reduzierte Genexpression von *Rora* aufweisen und dass umgekehrt *RORA in vitro* die Promoter-Aktivität von *NPSR1* reguliert. Des Weiteren konnten sie aufdecken, dass etliche Interaktionen zwischen *RORA* und *NPSR1* existieren, die das Auftreten von Asthma beeinflussen [51].

### ***Fragestellung/Hypothese***

*RORA* und *NPSR1* scheinen also erstens individuell die zirkadiane Rhythmik sowie Asthma zu beeinflussen und zweitens konnte gezeigt werden, dass sie biologisch miteinander interagieren. Daher stellten wir die Hypothese auf, dass Gen-Gen-Interaktionen zwischen *RORA* und *NPSR1* spezifisch nächtliches Asthma beeinflussen könnten. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Interaktionen der beiden Gene auch den Asthma-Schweregrad beeinflussen.

## **4.2.2 Ergebnisse**

### ***Einfluss auf Asthma***

Bevor wir allerdings den Einfluss der beiden Gene auf nächtliches Asthma untersuchten, wollten wir zunächst versuchen, die Ergebnisse aus der Studie von Acevedo und Kollegen zu replizieren und zu erweitern [51]. Hierfür erweiterten wir die SNP-Selektion wie im Methodenteil angegeben und ich untersuchte, ob es spezifische Interaktionen gibt, die das Auftreten von Asthma beeinflussen. Um die zahlreichen signifikanten Interaktionen auf die wichtigsten zu reduzieren, betrachteten wir vor allem SNPs mit mindestens drei Interaktionen mit dem jeweils anderen Gen. All diese Interaktionen versuchten wir dann in zwei weiteren Kohorten spezifisch zu replizieren, wobei ich bei einer Kohorte auch selbst die Analysen durchführte. Interessanterweise konnten wir tatsächlich zeigen, dass nach unserer stochastischen Korrektur insgesamt 48 Interaktionen Asthma beeinflussen. Von diesen verbliebenen Interaktionen konnten wir schließlich 5 Interaktionen in mindestens einer der Kohorten replizieren ( $p < 0.05$ ) und 6 weitere Interaktionen zeigten einen Trend zur signifikanten Replikation ( $p < 0.10$ ; s. Tabelle 4). Alles in allem zeigte sich also, dass es

tatsächlich Interaktionen zwischen *RORA* und *NPSRI* gibt, die das Auftreten von Asthma beeinflussen.

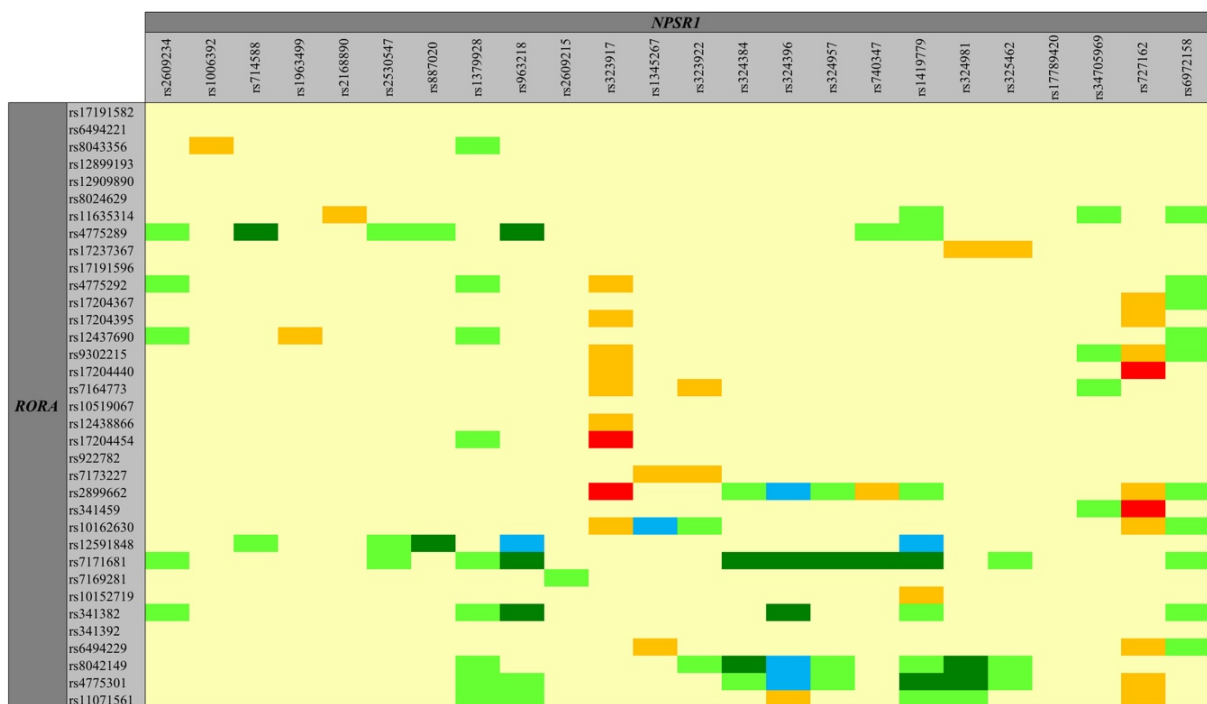
**Tabelle 4. Replikation der Interaktionen (*RORA* \* *NPSRI*) auf Asthma in allen Kohorten.**

Interaktionsterm <sup>a</sup>	MAGICS/ISAAC	MAAS	BAMSE
rs2899662 * rs887020	1.34 (1.06-1.7) <b>0.015</b>	1.46 (1.02-2.09) <b>0.0407</b>	1.41 (1.06-1.87) <b>0.018</b>
rs2899662 * rs963218	1.39 (1.1-1.75) <b>0.006</b>	1.29 (0.9-1.83) 0.162	1.33 (1.01-1.75) <b>0.045</b>
rs2899662 * rs324396	0.72 (0.55-0.93) <b>0.0135</b>	0.61 (0.41-0.92) <b>0.0166</b>	0.82 (0.61-1.1) 0.1836
rs8042149 * rs714588	1.27 (1.01-1.59) <b>0.041</b>	1.02 (0.72-1.45) 0.9143	1.58 (1.2-2.09) <b>0.0012</b>
rs4775301 * rs714588	1.29 (1.03-1.61) <b>0.025</b>	1.14 (0.8-1.63) 0.4583	1.39 (1.05-1.84) <b>0.020</b>
rs4775301 * rs324396	0.73 (0.57-0.93) <b>0.0116</b>	0.7 (0.48-1.02) <i>0.0605</i>	0.9 (0.67-1.2) 0.4701
rs12591848 <sup>b</sup> * rs2530547 <sup>c</sup>	0.54 (0.36-0.8) <b>0.0025</b>	0.81 (0.42-1.55) 0.5228	0.71 (0.48-1.06) <i>0.092</i>
rs12591848 <sup>b</sup> * rs963218	0.51 (0.35-0.74) <b>4.60e-04</b>	0.65 (0.36-1.18) 0.1603	0.71 (0.47-1.06) <i>0.090</i>
rs4775289 * rs963218	1.26 (1.01-1.58) <b>0.0428</b>	1.09 (0.78-1.52) 0.6272	1.3 (0.99-1.71) <i>0.058</i>
rs11071561 * rs727162	1.33 (1-1.76) <b>0.0471</b>	1.52 (0.99-2.33) <i>0.0557</i>	1.02 (0.73-1.43) 0.8856
rs7171681 * rs963218	1.39 (1.09-1.77) <b>0.0085</b>	1.01 (0.69-1.47) 0.9544	1.28 (0.98-1.69) <i>0.075</i>

Odds ratios, 95% Konfidenzintervalle und *p*-Werte für alle drei Datensätze sind abgebildet. *P*-Werte <0.05 sind fett gedruckt und der Hintergrund ist grün hinterlegt; *p*-Werte <0.10 sind kursiv gedruckt und der Hintergrund ist dunkelgrau hinterlegt. <sup>a</sup> Die Interaktion ist in folgendem Format abgebildet: *RORA*-SNP \* *NPSRI*-SNP. <sup>b</sup> rs12591848 wurde ersetzt durch rs746241 in BAMSE (SNPs sind in perfektem LD von 1.0). <sup>c</sup> Diese Interaktion war signifikant in einer kürzlichen Publikation von Acevedo et al (27), wo die Daten aus zwei Kohorten (BAMSE und PARSIFAL) kombiniert worden waren. Da wir hier nur die Ergebnisse aus BAMSE betrachten, weist die Interaktion weniger statistische Power auf und erreicht keine statistische Signifikanz mehr.

### **Einfluss auf Nächtliches Asthma**

Nachdem ich herausgefunden hatte, dass *RORA* und *NPSRI* tatsächlich gemeinsam das Auftreten von Asthma beeinflussten, fuhr ich in meinen Analysen fort, nun die Hypothese zu testen, ob die beiden Gene spezifisch nächtliches Asthma beeinflussen würden. In der Tat konnten wir zeigen, dass es zahlreiche Interaktionen gibt, die ganz spezifisch nächtliches Asthma beeinflussen (s. Abbildung 10). Nach unserer strengen stochastischen Korrektur blieben 74 signifikante Interaktionen zur weiteren Analyse erhalten, welche wir anschließend versuchten, zu replizieren. Tatsächlich konnten 7 dieser Interaktionen repliziert werden und 6 weitere zeigten eine Tendenz zur Signifikanz in einem der Replikationsdatensätze (s. Tabelle 5). Nachdem wir die Relevanz in verschiedenen Kohorten zeigen konnten, wollten wir außerdem herausfinden, ob diese Ergebnisse auch eine zeitliche Konstanz aufwiesen. Daher untersuchten wir, ob diese replizierten Interaktionen auch mit nächtlichen Asthmasymptomen im Alter von 16 Jahren zusammenhingen. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass 6 Interaktionen auch im zeitlichen Verlauf den gleichen Trend zeigten wie im Alter von 11 Jahren.



**Abbildung 10. Heat Map der Interaktionen zwischen *RORA* und *NPSRI* auf Asthma mit und auf Asthma ohne nächtliche Symptome in MAGIC/ISAAC.** Grüne Zellen zeigen eine signifikante Beeinflussung von Asthma mit nächtlichen Symptomen an, wohingegen orange und rote Zellen eine signifikante Beeinflussung von Asthma ohne nächtliche Symptome anzeigen. Zellen in hellblau zeigen Interaktionen an, die beide Outcomes beeinflussen. Stärkere Assoziationen sind durch dunklere Farben gekennzeichnet.

**Tabelle 5. Replikation der Interaktionen (*RORA* \* *NPSRI*) auf nächtliches Asthma.**

Interaktionsterm <sup>a</sup>	NAS <sup>b</sup> (MAGICS/ISAAC)	NAS <sup>b</sup> (MAAS)	NAP <sup>b</sup> (BAMSE)
rs1379928 * rs4775292	1.68 (1.08-2.6) <b>0.02</b>	2.11 (1.16-3.84) <b>0.0143</b>	1.23 (0.76-1.97) 0.3974
rs1379928 * rs12437690	0.62 (0.39-0.97) <b>0.036</b>	0.53 (0.3-0.93) <b>0.0254</b>	0.86 (0.54-1.37) 0.5355
rs1379928 * rs17204454	1.59 (1.04-2.43) <b>0.0318</b>	1.99 (1.14-3.46) <b>0.0149</b>	1.11 (0.71-1.75) 0.644
rs324384 * rs2899662	0.65 (0.44-0.96) <b>0.0317</b>	0.6 (0.36-0.98) <b>0.0395</b>	0.97 (0.67-1.41) 0.8682
rs324957 * rs2899662	0.65 (0.44-0.96) <b>0.032</b>	0.56 (0.34-0.91) <b>0.02</b>	na
rs324396 * rs2899662	0.61 (0.4-0.95) <b>0.0277</b>	0.48 (0.28-0.82) <b>0.0069</b>	0.73 (0.49-1.1) 0.1309
rs324396 * rs7171681	0.45 (0.28-0.73) <b>0.0013</b>	0.54 (0.3-0.99) <b>0.0459</b>	0.82 (0.54-1.24) 0.3384
rs324396 * rs341382	0.52 (0.32-0.85) <b>0.0094</b>	0.58 (0.31-1.07) <i>0.0825</i>	0.9 (0.58-1.4) 0.649
rs324396 * rs4775301	0.65 (0.44-0.96) <b>0.0307</b>	0.63 (0.38-1.03) <i>0.065</i>	0.87 (0.6-1.28) 0.4886
rs2609234 * rs341382	1.74 (1.03-2.93) <b>0.0376</b>	1.88 (0.96-3.7) <i>0.0675</i>	na
rs963218 * rs12591848 <sup>c</sup>	0.46 (0.25-0.84) <b>0.0108</b>	0.77 (0.37-1.6) 0.4834	0.6 (0.35-1.05) <i>0.0759</i>
rs324981 * rs11071561	1.51 (1.07-2.13) <b>0.02</b>	1.57 (0.99-2.5) <i>0.0577</i>	na
rs740347 * rs4775289	1.67 (1.02-2.73) <b>0.041</b>	1.03 (0.56-1.92) 0.9164	1.65 (0.97-2.8) <i>0.0646</i>

<sup>a</sup> Die Interaktion ist in folgendem Format abgebildet: *NPSRI*-SNP \* *RORA*-SNP. <sup>b</sup> NAS = Nächtliche Asthmasymptome; NAP = Nächtliche Atemprobleme. <sup>c</sup> rs12591848 wurde ersetzt durch rs746241 in BAMSE (SNPs sind in perfektem LD von 1.0). Odds ratios, 95% Konfidenzintervalle und *p*-Werte für alle drei Datensätze sind abgebildet. *P*-Werte <0.05 sind fett gedruckt und der Hintergrund ist grün hinterlegt; *p*-Werte <0.10 sind kursiv gedruckt und der Hintergrund ist dunkelgrau hinterlegt. na = Diese Interaktion konnte nicht berechnet werden, da mindestens einer der SNPs in der BAMSE-Kohorte nicht genotypisiert worden war.



### ***Ausschluss von konfundierenden Variablen***

Da Asthma mit nächtlichen Symptomen immer die Asthmadignose des Kindes beinhaltet, könnte es sein, dass es nicht die nächtlichen Asthmasymptome sind, die durch die Interaktionen beeinflusst werden, sondern eine andere Gemeinsamkeit der Kinder mit nächtlichen Asthmasymptomen. Daher evaluierten wir auch noch die Interaktionen der beiden Gene auf Asthma ohne nächtliche Symptome und verglichen die Ergebnisse mit den vorher berechneten Ergebnissen zu nächtlichem Asthma. Wenn *RORA* und *NPSRI* spezifisch für nächtliches Asthma wären, müssten die Interaktionen mit Asthma ohne nächtliche Symptome deutlich schwächer sein oder ganz wegfallen, was in der Tat der Fall war. Bei genauer Betrachtung zeigt sich, dass fast keine Interaktion zwischen *RORA* und *NPSRI* beide Subphänotypen von Asthma beeinflusst (s. Abbildung 10). Dies zeugt von einem spezifischen Einfluss der nächtlichen Symptome.

Um dann auch noch zu evaluieren, ob die Interaktionen maßgeblich mit dem asthmatischen Schweregrad und weniger mit den nächtlichen Asthmasymptomen zu tun hatten, berechneten wir auch noch den Einfluss der Interaktionen von *RORA* und *NPSRI* auf schweres Asthma und fanden heraus, dass dies in unserer Kohorte ein ganz anderes Interaktionsmuster zeigte als nächtliches Asthma (s. Publikation 2 im Anhang). Bei dem Versuch der Replikation dieser Ergebnisse zeigte sich allerdings, dass fast keine Interaktion repliziert werden konnte, ganz im Gegenteil zu unserer konstanten Replikation der Interaktionen auf nächtliches Asthma. Dies könnte mit dem in den verschiedenen Kohorten uneinheitlich definierten Phänotyp „schweres Asthma“ zu tun haben.

### ***Funktionelle Datenbankrecherche***

Nachdem wir herausgefunden hatten, dass *RORA* und *NPSRI* gemeinsam das Auftreten von nächtlichen Asthmasymptomen beeinflussen und einige mögliche konfundierende Variablen als Kofaktoren ausgeschlossen hatten, wollten wir die bereits bekannte funktionelle Relevanz der beteiligten SNPs durch eine funktionelle Datenbankrecherche noch vertiefen. Dafür verringerten wir zunächst die Anzahl der zu untersuchenden SNPs, indem wir nur diejenigen SNPs berücksichtigten, die entweder mit mindestens 25% der SNPs des anderen Gens interagierten oder diejenigen SNPs, von denen mindestens 2 Interaktionen repliziert werden konnten. Das führte zu einer Reduktion auf 10 Top Hits. Interessanterweise sind für 8 dieser 10 Top Hits bereits ein relevanter funktioneller Einfluss bekannt: rs6972158 führt zu einer nicht-konservativen Aminosäurenveränderung von Glutamin zu Arginin in *NPSRI* und 7 weitere

SNPs sind stark assoziiert mit SNPs, die in Promoterregionen lokalisiert sind. Fünf dieser SNPs verändern Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie GATA3, USF1 oder STAT3, welche wiederum dafür bekannt sind, eine wichtige Rolle in der Biologie der Immunantwort und der T-Zell-Entwicklung zu spielen [100–105]. 6 der 8 funktionell relevanten SNPs führen je nach Ausprägung auch zu einer unterschiedlichen Genexpression und 3 der ausgewählten SNPs sind in hochkonservierten Regionen lokalisiert (s. Tabelle 6).

**Tabelle 6A. Funktionelle Relevanz der selektierten Top Hits in *NPSRI*.**

SNP	Gen	N IA	N IA Replikation	Location	Vorhergesagte Promoterregion	SNP konserviert	eQTL	TFBS
rs1379928	<i>NPSRI</i>	9	3	Intron	ja	ja	<i>ABCA7, SLC4A2</i>	CFOS,STAT3,P300
rs324396	<i>NPSRI</i>	5	2 (4)	Intron	ja	--	--	26 Proteine, u.a. GATA3 und STAT3
rs6972158	<i>NPSRI</i>	10	0	Missense	--	ja	<i>NPSRI</i>	--
rs1419779	<i>NPSRI</i>	9	0	Intron	ja	--	<i>DPY19L1</i>	MAFF, MAFK

**Tabelle 6B. Funktionelle Relevanz der selektierten Top Hits in *RORA*.**

SNP	Gen	N IA	N IA Replikation	Location	Vorhergesagte Promoterregion	SNP konserviert	eQTL	TFBS
rs2899662	<i>RORA</i>	5	3	Intron	ja	--	<i>RORA</i>	USF1
rs7171681	<i>RORA</i>	11	1	Intron	ja	ja	--	STAT3
rs4775301	<i>RORA</i>	8	0 (1)	Intron	ja	--	<i>CTCF, NRSF</i>	--
rs8042149	<i>RORA</i>	8	0	Intron	--	--	--	--
rs4775289	<i>RORA</i>	7	0 (1)	Intron	--	--	--	--
rs341382	<i>RORA</i>	6	0 (2)	Intron	ja	--	<i>STAT3</i>	--

SNPs, die mit mindestens 25% der SNPs des anderen Gens interagierten oder mit mindestens zwei signifikanten Replikationen wurden ausgewählt und werden hier dargestellt. Informationen wurden in verschiedenen Datenbanken eingeholt und Ergebnisse für die ausgewählten SNPs, bzw. SNPs in hohem LD ( $\geq 0.8$ ) werden präsentiert. Die Anzahl der replizierten Interaktionen beinhaltet alle Replikationen mit  $p < 0.05$  und Borderline-signifikante Replikationen ( $p \leq 0.10$ ) in Klammern.

Abkürzungen: N – Anzahl, IA – Interaktion, eQTL – expression quantitative trait loci, TFBS – Transcription Factor Binding Site.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Reichweite der Arbeit**

Das *NPS/NPSRI*-System spielt nachgewiesenermaßen eine Rolle in der Kontrolle des zirkadianen Rhythmus, denn *Npsr* knockout Mäuse zeigten einen deutlich veränderten Schlaf-Wach-Rhythmus und *NPS*-Injektionen führten zu einer erhöhten Wachsamkeit und einer erhöhten Aktivität im EEG [106,107]. Außerdem gab es auch Hinweise auf eine Assoziation von Varianten in *NPSRI* mit der Schlafdauer [71,108]. *RORA* zeigt ebenfalls eine zirkadiane Rhythmik in verschiedenen Geweben, so zum Beispiel in der Lunge [91–93] und *Rora*-defiziente Mäuse zeigten ein fehlerhaftes zirkadianes Verhalten [89,92]. Als Hormonrezeptor wird *RORA* durch verschiedene Proteine des zirkadianen Rhythmus beeinflusst [92,94–97] und scheint als Mediator zwischen dem zirkadianen Rhythmus und weiteren physiologischen Prozessen zu dienen, da es vor allem weitere downstream Zielgene reguliert [86,89,90,92,98]. Gleichzeitig sind beide Gene und deren Produkte stark mit Asthma assoziiert [12,75–80,87,109]. Kürzlich konnte dann gezeigt werden, dass *NPSRI* und *RORA* auf molekularer Ebene miteinander interagieren, indem sie gegenseitig die mRNA-Expression, sowie die Promoteraktivität des jeweils anderen Gens regulierten [51]. Zusammengenommen war also bereits vor der Durchführung dieser Studie klar, dass *RORA* und das *NPS/NPSRI*-System stark miteinander verwoben sind und zahlreiche komplexe, immunvermittelte zirkadiane Outcomes regulieren.

Diese Doktorarbeit fasst schließlich zwei Studien zusammen, die erstens spezifische biologische Interaktionen im *NPS/NPSRI*-System und *RORA* als Faktoren in der Pathogenese von Asthma entdecken konnten, sich zweitens mit dem genetischen Hintergrund von nächtlichem Asthma befassen und über diese Analysen drittens die Frage aufwerfen, inwieweit der Phänotyp „*Asthma*“ noch weiter differenziert werden könnte, insbesondere im Hinblick auf nächtlich auftretendes Asthma. Basierend auf unseren Ergebnissen scheint nächtliches Asthma eine spezifische Pathogenese zu beinhalten, welche unter Anderem über den zirkadianen Rhythmus kontrolliert werden könnte.

## **5.2 Stärken und Limitationen**

### **5.2.1 Deduktive Analysen und biologische Plausibilität**

Alle untersuchten Gene waren bereits über genomweite Assoziationsstudien oder als Kandidatengene mit Asthma assoziiert und die Interaktionsanalysen basierten auf dem Kriterium der biologischen Plausibilität. Insbesondere die Untersuchung, ob *RORA* und *NPSRI* gemeinsam spezifisch nächtliches Asthma beeinflussten, fußte auf einer deduktiven Denkweise, da die biologische Interaktion bereits einige Jahre vorher gezeigt werden konnte [51]. Dies ist ungewöhnlich bei der Analyse von genetischen Assoziationen, da üblicherweise Assoziationen hypothesenfrei entdeckt werden und induktiv die biologischen Experimente nachgeschaltet werden. Da die biologischen Experimente über die Interaktion der beiden Gene bereits erfolgt waren und ihr Einfluss auf den zirkadianen Rhythmus und auf Asthma bekannt sind, basieren unsere Ergebnisse auf dem Primat der biologischen Plausibilität.

### **5.2.2 Replikation**

Trotz der biologischen Plausibilität hätten die Ergebnisse nur per Zufall entstanden sein können. Da wir unsere Ergebnisse jedoch in mehreren unabhängigen Kohorten replizieren konnten, ist dies sehr unwahrscheinlich: So ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Interaktion von rs324396 und rs2899662 nur per Zufall in allen drei Kohorten zustande gekommen ist  $0.0277 \cdot 0.0069 \cdot 0.1309 = 2.5 \cdot 10^{-5}$ , das entspricht einer Wahrscheinlichkeit von 0.0025%. In beiden Studien, die in dieser Doktorarbeit gezeigt werden, hatten wir mindestens eine Replikationskohorte für die Interaktionsanalysen. Die Tatsache, dass wir unsere Interaktionen regelhaft in weiteren Kohorten replizieren konnten, ist besonders erstaunlich, da die Replikation von Gen-Gen- oder Gen-Umwelt-Interaktionen selten erreicht wird: Üblicherweise ist eine große Anzahl an Probanden nötig, um Interaktionen zu replizieren [110–112]. Daher impliziert diese Replikation relativ große Effektstärken der entsprechenden Interaktionen, welche auch durch hohe Odds Ratios insbesondere in der zweiten Studie angezeigt werden. Man muss hierbei berücksichtigen, dass Interaktionseffekte auch fälschlicherweise signifikant erscheinen können, wenn die Haupteffekte sehr klein sind, wie dies auch bei uns der Fall ist. Allerdings ist es höchst unwahrscheinlich, dass dies in allen drei Kohorten gleichzeitig der Fall ist. Daher können wir, basierend auf der konstanten Replikation unserer Ergebnisse darauf schließen, dass *RORA* und *NPSRI* tatsächlich spezifisch nächtliches Asthma beeinflussen. Diese Ergebnisse

blieben in einer Kohorte sogar über die Zeit hinweg konstant, was auf die Wichtigkeit dieses Mechanismus hinweist.

### **5.2.3 Phänotyp und Statistik**

Eine weitere Stärke unserer Arbeiten ist die rigorose Beurteilung von statistisch signifikanten Interaktionen. Je mehr inferenzstatistische Tests durchgeführt werden, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit nur per Zufall ein statistisch signifikantes Ergebnis zu erhalten. Durch die Fokussierung auf Polymorphismen, für welche die Anzahl an signifikanten Interaktionen die stochastische Erwartung überstieg, reduzierte sich die Wahrscheinlichkeit falsch positive Ergebnisse zu erhalten, wenngleich sie natürlich nicht ausgeschlossen werden konnte. Zusätzlich hatten wir in der MAGICS-Kohorte einen klinisch definierten Phänotyp, der durch einen pädiatrischen Pneumologen erhoben wurde. Dies stellt offensichtlich eine bessere Operationalisierung der Diagnose Asthma dar als eine lediglich durch die Eltern berichtete Asthmadiagnose.

### **5.2.4 Limitationen**

Trotz dieser zahlreichen Stärken gibt es natürlich auch einige Einschränkungen unserer Analysen. Obwohl wir, wie oben beschrieben, versucht haben, auf rigorose Art falsch positive Ergebnisse zu verhindern, können wir natürlich nicht ausschließen, dass die gefundenen Assoziationen lediglich per Zufall zustande gekommen sind. Durch die deduktive Herangehensweise mit der bekannten biologischen Interaktion und vor allem den zahlreichen Replikationen ist die Wahrscheinlichkeit allerdings sehr gering, dass dies für die Ergebnisse in allen Kohorten der Fall ist.

Zweitens sind die Daten für unsere Studien bereits vor einigen Jahren gesammelt worden. Durch eine größere genetische Variabilität in einer stärker globalisierten Welt stellt sich die Frage, inwieweit die Ergebnisse auf eine heutige mitteleuropäische Population extrapoliert werden können. Allerdings sind die genetischen Grundlagen, die wir hier aufgedeckt haben, mutmaßlich konstant, auch wenn heutzutage potenziell weniger (oder mehr) Patienten in Mitteleuropa von diesen Mutationen betroffen sein könnten.

Drittens basiert die Diagnose *Nächtliches Asthma*, wie wir sie in allen Studien erhoben haben, lediglich auf dem Report der Eltern über nächtliche Symptome. Diese können sehr unzuverlässig sein [113–116]. Idealerweise würde man nächtliche Asthmasymptome mit Hilfe

eines Atemrekorders objektiv erfassen und dann die Experimente mit dieser objektiveren Methode wiederholen und erweitern. Allerdings sind die berichteten Symptome wie nächtliches Giemen oder Pfeifen pathophysiologisch stark mit asthmatischen Beschwerden assoziiert und geben so zumindest einen Hinweis auf den zugrundeliegenden Phänotyp. Außerdem würde man bei elterlichen Berichten über nächtliche Beschwerden eher ein sogenanntes Under-Reporting erwarten und die zu erwartenden Effektstärken wären somit eher größer als die hier gefundenen Effektstärken, da genetische Marker nicht mit einem potenziellen Bias im Under-Reporting zusammenhängen sollten.

## **5.3 Ausblick**

### **5.3.1 Ausblick Genetik**

Bisher gab es bereits einige Studien, die einen genetischen Einfluss auf nächtliches Asthma gezeigt hatten, indem sie einen Zusammenhang zwischen Mutationen im beta 2 Adrenorezeptor (ADRB2) und nächtlichen Symptomen untersuchten [29–33]. Dies geschah unter der Annahme, dass Mutationen in diesem Transmitter des sympathischen Nervensystems eine erhöhte Konstriktion der Atemwege mit sich führen könnten und so zu Therapieresistenz und stärkeren Symptomen, gegebenenfalls auch in der Nacht, führen könnten. Die Ergebnisse der oben genannten Studien basieren allerdings überwiegend auf kleinen Datensätzen und sind vom Ansatz her nicht spezifisch für nächtliche Asthmasymptome. Außerdem konnten die Ergebnisse in großen Studien nicht repliziert werden [12,117]. Die zweite Publikation, die in dieser Doktorarbeit beschrieben wird, ist in Anbetracht der bisherigen Ergebnisse besonders interessant, da sie einen Mechanismus im zirkadianen Rhythmus aufdeckt, der spezifisch nächtliche Symptome beeinflussen könnte. Wir konnten also – basierend auf dem Wissen über die gemeinsame Regulation von zirkadianen Outcomes durch *RORA* und das *NPS/NPSRI*-System – ein weiteres Puzzlestück in das Bild integrieren und deren gemeinsamen Einfluss auf nächtliches Asthma nachweisen.

Durch unseren systematischen Ansatz konnten wir erst einige Interaktionen finden, die Asthma und nächtliches Asthma beeinflussen und anschließend sukzessive die relevanten Interaktionen herausfiltern. Für diese relevanten SNPs führten wir eine Datenbankanalyse durch, in der wir deren mutmaßlichen pathogenetischen Einfluss evaluierten. Interessanterweise zeigten 8 der wichtigsten 10 Polymorphismen funktionelle genomische Effekte. Dabei spielte zum Beispiel *NPSRI* rs6972158 eine besondere Rolle. *NPSRI* rs6972158 ist ein missense-SNP, der in einer Aminosäurenveränderung von Glutamin zu Arginin an Position 344 der Isoform A von *NPSR1*

führt. Gln344 ist in der zytosolischen Domäne des transmembranären Rezeptors lokalisiert und könnte hier einen Einfluss auf die intrazellulären Signalwege haben. Im Rahmen dieser Ergebnisse wären weitere *in vitro* Studien angebracht, welche die spezifischen Effekte der beiden Allele von rs6972158 auf die Transkriptionsraten von Genen der inflammatorischen Antwort oder des zirkadianen Rhythmus genauer untersuchen. Zweitens könnte anschließend untersucht werden, wie dies *in vivo* in Zusammenhang mit der inflammatorischen Antwort in der Lunge steht.

Sieben der verbliebenen neun SNPs sind in hoher Assoziation zu SNPs, die mutmaßlich in Promoterregionen liegen sollen [53,54,118]. Diese Regionen sind bekannt als Transkriptionsfaktorbindungsstellen für Proteine wie GATA3, P300 oder STAT3, welche wiederum eine große Rolle in der Immunologie und der Chronobiologie zu spielen scheinen. GATA3 induziert die Sekretion von IL4, IL5 und IL13 und ist über den Th2 Pathway stark an der Entwicklung von Asthma beteiligt [105,119–123] und P300 ist ein bedeutsamer Teil der zirkadianen Uhr [124–126]. Besonders interessant ist allerdings STAT3, denn dieses Protein ist sowohl an der Pathogenese von Asthma als auch am zirkadianen Rhythmus beteiligt: Es ist bekannt, dass STAT3 die Th2 Zellantwort während der allergischen Inflammation der Lungen kontrolliert [102] und eine kritische Rolle in der Entwicklung von T-Helfer-Zellen spielt [100,127]. Eine Inhibierung von STAT3 verhinderte außerdem eine Inflammation in der Lunge in einem Asthma-Mausmodell [101]. Kürzlich wurde schließlich gezeigt, dass STAT3 in einer rhythmischen Art und Weise exprimiert wird, insbesondere im Nucleus Suprachiasmaticus, welcher einer der Taktgeber des zirkadianen Rhythmus ist [128–130]. Des Weiteren sind einige unserer wichtigsten SNPs mit einer erhöhten Downstream Genexpression assoziiert oder ihnen wird ein hohes regulatorisches Potenzial vorhergesagt. Alles in allem scheinen die wichtigsten Marker in unseren Studien also auf der einen Seite eine Rolle in der Pathogenese von Asthma zu spielen und auf der anderen Seite durch unterschiedlichen Einfluss auf die Genexpression wichtig für den zirkadianen Rhythmus zu sein. Weitere funktionelle genomische Experimente, welche auf den hier identifizierten SNPs basieren, sind notwendig, um unterscheiden zu können, inwiefern Asthma und nächtliches Asthma sich auch mechanistisch unterscheiden.

Ganz generell gibt es bereits eine steigende Anzahl an großen Datensätzen, mit Hilfe derer genomweite Assoziationsstudien durchgeführt wurden und werden. Sollte man diese zusammen analysieren, könnte man inzwischen auch genug statistische Power haben, um eine genomweite Interaktionsanalyse mit mehreren relevanten SNPs als Referenz-SNPs durchzuführen und so weitere Informationen erhalten, welche Interaktionen eine Rolle in der Pathogenese von (nächtlichem) Asthma spielen könnten.



Des Weiteren könnte man auch den Einfluss weiterer Gene des zirkadianen Rhythmus auf nächtliches Asthma untersuchen. Hierbei könnte gegebenenfalls auch die Hypothese untersucht werden, dass das sympathische Nervensystem eine Mediatorrolle einnimmt (s. Abbildung 1), indem biochemische Marker der sympathischen Aktivität gemessen werden. Anschließend könnte über biologische Experimente und bioinformatische Auswertungen der Zusammenhang zur Genexpression des zirkadianen Rhythmus festgestellt werden. Dies würde schließlich unser klinisches und pathophysiologisches Wissen von nächtlichem Asthma dramatisch erhöhen, was sich in einer deutlichen Verbesserung der Patientenversorgung niederschlagen könnte.

Schließlich wäre es auch interessant, epigenetische Veränderungen noch genauer auf ihre Assoziation mit nächtlichem Asthma zu untersuchen. Das könnte die wenigen Analysen, die es bisher zum genetischen Hintergrund von nächtlichem Asthma gibt, noch ergänzen und so weiterhelfen, den Einfluss der verschiedenen Einflüsse auf diesen spezifisch modulierten Subphänotyp herauszuarbeiten.

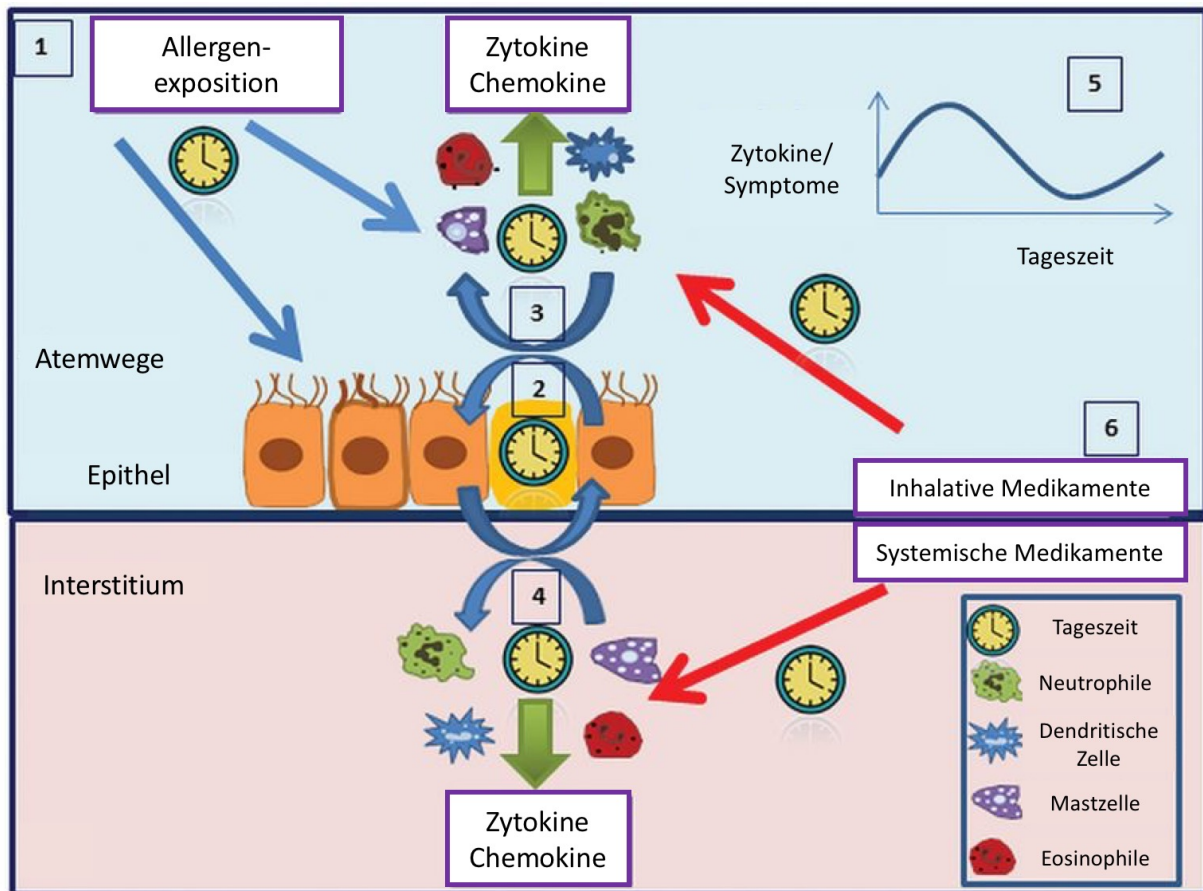
### **5.3.2 Ausblick Klinik und klinische Forschung**

Nächtliche asthmatische Atemnot ist mit bis zu 70% Prävalenz unter Asthmatikern ein häufiges Problem und führt zu einer massiven Reduktion der kindlichen Lebensqualität, da sie Tagesschläfrigkeit und schlechtere kognitive Leistungen nach sich ziehen kann [35,40,44–46]. Unsere Studie zeigt, dass hier potenziell eine andere Pathogenese als bei Asthma ohne nächtliche Symptome eine Rolle spielt. Allerdings wäre eine genauere phänotypische Differenzierung äußerst interessant, da wir die nächtlichen Symptome nur über einen Fragebogen erhoben haben und nächtliche Asthmasymptome nur sehr inkonsistent wiedergegeben werden können [113–116]. Eine solche objektivere Messung von nächtlichem Husten und nächtlichem Wheezing wäre daher sinnvoll, um den Phänotyp „Nächtliches Asthma“ klinisch evaluieren zu können. Andererseits muss auch die Endotypisierung in der Grundlagenforschung vorangetrieben werden, um konkretere und genauere Angaben machen zu können und später in die klinische Arbeit implementieren zu können. Mit unseren Studien wurde nun ein Anstoß gegeben, den Phäno- und Endotyp Asthma genauer unter die Lupe zu nehmen und die verschiedenen genetischen Marker, die damit in Zusammenhang stehen, zu differenzieren. Es kann gut sein, dass die Diagnose Asthma also eine Vielzahl an Endotypen beinhaltet, welche auf der Grundlage von weiterer Grundlagen- und klinischer Forschung noch weiter differenziert werden könnten. Allerdings wäre es hierfür wünschenswert, wenn man – z.B. über einen Atemrecorder – valide und überprüfbare Ergebnisse von Asthmatikern bekäme,

um diese dann in Relation zu genetischen und weiteren biologischen Markern zu setzen. Ganz konkret gibt es diesbezüglich auch schon erste Entwicklungen wie das LEO Sound System, welches Atemgeräusche über die Nacht aufnehmen kann. Diese können anschließend ausgewertet werden und so valide Daten zu nächtlichen Asthmasymptomen gewonnen werden. Wenn diese Informationen dann mit biologischen und klinischen Variablen korreliert werden, könnte der unzureichend beschriebene Phänotyp „Nächtliches Asthma“ noch besser definiert werden.

Da diese Studie die erste war, die genetische Interaktionen bei nächtlichem Asthma untersucht hat, kann man davon ausgehen, dass es noch weitere pathogenetische Unterschiede zwischen nächtlichem und nicht-nächtlichem Asthma gibt. Daher wären weitere Studien zu diesem Subtyp von Asthma wünschenswert, um diese Diagnose besser verstehen und pathogenetisch differenzieren zu können [22].

Die mutmaßlich unterschiedliche Pathogenese bei nächtlichen Asthmatikern könnte ein Grund dafür sein, dass diese oftmals medikamentös nur schwer einzustellen sind (s. Abbildung 11). Basierend auf Studien wie der hier vorliegenden könnte man auch Medikamente entwickeln, die zum Beispiel ganz spezifisch einen der biochemischen Pathways blockiert. So könnte man mit einem kompetitiven Inhibitor, der dem Neuropeptid S in der Bindungsstelle ähnelt, die Bindung an den NPSR1 in der Lunge inhibieren und so potenziell die nächtliche Auslösung von Asthmaattacken spezifisch verringern. Diese Blockade des NPSR ist durch erst kürzlich entwickelte bipyklische Piperazine (z.B. SHA66 und SHA68) effektiv möglich [131]. Gegebenenfalls könnte natürlich auch die nachgeschaltete intrazelluläre Signaltransduktion gehemmt werden, jedoch ist diese noch nicht *en detail* geklärt [132]. In der gleichen Art und Weise könnte man zum Beispiel auch die Dimerisierung von RORA mit BMAL1 oder die Bindung des Heterodimers an die DNA inhibieren, um so die Erhöhung der Genexpression von inflammatorischen Genen zu verhindern. Allerdings muss bei beiden Ansätzen bedacht werden, dass beide Proteine im ganzen Körper, insbesondere in zerebellären und zerebralen Zellen exprimiert werden. Daher könnte eine Inhibierung auch zu gravierenden Nebenwirkungen führen. Um dies zu verhindern, müsste eine Hemmung der Pathways auch eine hohe Spezifität für das Zielgewebe aufweisen. Dies könnte gegebenenfalls über eine inhalatorische Therapie versucht werden.



**Abbildung 11. Schema der Pathophysiologie von nächtlichem Asthma.** Die Zeit, zu der eine Asthmaexazerbation durch eine Allergenexposition getriggert wird, könnte einen signifikanten Einfluss auf die Höhe der inflammatorischen Antwort haben (1). Die periphere zirkadiane Uhr der Lunge ist teilweise in den Clara-Zellen lokalisiert (2). Immunologischer Crosstalk zwischen der Lungen-spezifischen zirkadianen Rhythmik und der zirkadianen Uhr von Immunzellen in den Atemwegen (3) und im Interstitium der Lunge (4) verursachen Veränderungen in lokalen Zytokin- und Chemokinkonzentrationen, sowie die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen (3&4). Daraus folgt wiederum eine über die Tageszeit verschiedene Ausprägung der Zytokinlevel und der asthmatischen Symptome (5). Das Timing der medikamentösen Behandlung (inhalativ und systemisch) ist daher besonders wichtig bei Patienten mit nächtlichen Asthmasymptomen (6). Modifiziert nach Durrington et al (2014). [21]

## **5.4 Schlussfolgerung**

Alles in allem zeigt diese Arbeit auf, dass es genetische Faktoren gibt, in denen sich nächtliches Asthma und Asthma ohne nächtliche Symptome unterscheiden. Nächtliches Asthma scheint hierbei stark vom zirkadianen Rhythmus beeinflusst zu werden. Eine genauere Differenzierung der entsprechenden Phäno- und Endotypen wäre im weiteren Verlauf sehr wichtig, da die Pathogenese von nächtlichem Asthma weiterhin noch sehr schlecht verstanden, die Krankheit aber gleichzeitig extrem belastend für die Patienten ist. Ein besseres Verständnis der Krankheit könnte schließlich in einer adäquateren medikamentösen und nicht-medikamentösen Patientenversorgung resultieren. Diese verbesserte Versorgung könnte wiederum eine verringerte Morbidität und Mortalität der betroffenen Patienten nach sich ziehen.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. Global Initiative for Asthma. 2018 GINA Report: Global Strategy for Asthma Management and Prevention | Global Initiative for Asthma – GINA. 2018. Available from: <http://ginasthma.org/2018-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>
2. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):470–3.
3. Baccarelli A, Kaufman JD. Ambient particulate air pollution, environmental tobacco smoking, and childhood asthma: interactions and biological mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Dec 15;184(12):1325–7.
4. Möller A, Szczepanski R, Basek P, Paul-Buck KP, Jung A. 31 Asthma bronchiale. In: Griese M, Nicolai T, editors. *Praktische Pneumologie in der Pädiatrie – Therapie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2013.
5. Pongratic JA, Krouse RZ, Babineau DC, Zoratti EM, Cohen RT, Wood RA, et al. Distinguishing characteristics of difficult-to-control asthma in inner-city children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Oct;138(4):1030–41.
6. Dick S, Doust E, Cowie H, Ayres JG, Turner S. Associations between environmental exposures and asthma control and exacerbations in young children: a systematic review. *BMJ Open*. 2014 Feb 12;4(2):e003827.
7. Bacharier LB, Strunk RC, Mauger D, White D, Lemanske RF, Sorkness CA. Classifying Asthma Severity in Children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Aug 15;170(4):426–32.
8. Jenkins C, Seccombe L, Tomlins R. Investigating asthma symptoms in primary care. *BMJ*. 2012 Apr 25;344:e2734–e2734.
9. Matricardi PM, Illi S, Grüber C, Keil T, Nickel R, Wahn U, et al. Wheezing in childhood: incidence, longitudinal patterns and factors predicting persistence. *Eur Respir J*. 2008 Sep 1;32(3):585–92.
10. Eising JB, Uiterwaal CSPM, van der Ent CK. Nocturnal wheeze measurement in preschool children. *Pediatr Pulmonol*. 2014 Mar;49(3):257–62.
11. Burioka N, Fukuoka Y, Koyanagi S, Miyata M, Takata M, Chikumi H, et al. Asthma: Chronopharmacotherapy and the molecular clock. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010 Jul 31;62(9–10):946–55.
12. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med*. 2010 Sep 23;363(13):1211–21.
13. Meijer GG, Postma DS, Wempe JB, Gerritsen J, Knol K, van Aalderen WM. Frequency of nocturnal symptoms in asthmatic children attending a hospital out-patient clinic. *Eur Respir J*. 1995 Dec;8(12):2076–80.
14. Bellanti JA, Setticone RA. Unraveling the conundrum of asthma phenotypes and endotypes. *Allergy asthma Proc*. 2018 Jan 1;39(1):1–2.
15. Kau AL, Korenblat PE. Anti-interleukin 4 and 13 for asthma treatment in the era of endotypes. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2014 Dec;14(6):570–5.

16. Fahy J V. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol.* 2015 Jan 1;15(1):57–65.
17. Varricchi G, Marone G, Spadaro G, Russo M, Granata F, Genovese A, et al. Novel Biological Therapies in Severe Asthma: Targeting the Right Trait. *Curr Med Chem.* 2018 Jan 9;
18. Wenzel S. Severe asthma: from characteristics to phenotypes to endotypes. *Clin Exp Allergy.* 2012 May;42(5):650–8.
19. Agache I, Akdis C, Jutel M, Virchow JC. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy.* 2012 Jul;67(7):835–46.
20. van Aalderen WM, Meijer GG, Oosterhoff Y, Bron AO. Epidemiology and the concept of underlying mechanisms of nocturnal asthma. *Respir Med.* 1993 Aug 1;87 Suppl B:37–9.
21. Durrington HJ, Farrow SN, Loudon AS, Ray DW. The circadian clock and asthma. *Thorax.* 2014 Jan;69(1):90–2.
22. Khan WH, Mohsenin V, D'Ambrosio CM. Sleep in Asthma. *Clin Chest Med.* 2014 Sep;35(3):483–93.
23. Kraft M, Djukanovic R, Wilson S, Holgate ST, Martin RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Nov;154(5):1505–10.
24. Kraft M, Martin RJ, Wilson S, Djukanovic R, Holgate ST. Lymphocyte and eosinophil influx into alveolar tissue in nocturnal asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Jan;159(1):228–34.
25. Barnes P, FitzGerald G, Brown M, Dollery C. Nocturnal Asthma and Changes in Circulating Epinephrine, Histamine, and Cortisol. *N Engl J Med.* 1980 Jul 31;303(5):263–7.
26. Sutherland ER, Ellison MC, Kraft M, Martin RJ. Elevated serum melatonin is associated with the nocturnal worsening of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Sep;112(3):513–7.
27. Sutherland ER, Ellison MC, Kraft M, Martin RJ. Altered pituitary-adrenal interaction in nocturnal asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jul;112(1):52–7.
28. Morrison JF, Pearson SB, Dean HG. Parasympathetic nervous system in nocturnal asthma. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1988 May 21;296(6634):1427–9.
29. Turki J, Pak J, Green SA, Martin RJ, Liggett SB. Genetic polymorphisms of the beta 2-adrenergic receptor in nocturnal and nonnocturnal asthma. Evidence that Gly16 correlates with the nocturnal phenotype. *J Clin Invest.* 1995 Apr 1;95(4):1635–41.
30. Martinez FD, Graves PE, Baldini M, Solomon S, Erickson R. Association between Genetic Polymorphisms of the Beta2-Adrenoceptor and Response to Albuterol in Children with and without a History of Wheezing. Vol. 100, *Journal of Clinical Investigation.* 1997.
31. Karam RA, Sabbah NA, Zidan HE, Rahman HMA. Association between genetic polymorphisms of beta2 adrenergic receptors and nocturnal asthma in Egyptian children. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2013;23(4):262–6.
32. Lee M-Y, Cheng S-N, Chen S-J, Huang H-L, Wang C-C, Fan H-C. Polymorphisms of the  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Correlated to Nocturnal Asthma and the Response of Terbutaline Nebulizer. 2011;

33. Santillan AA, Camargo CA, Ramirez-Rivera A, Delgado-Enciso I, Rojas-Martinez A, Cantu-Diaz F, et al. Association between beta2-adrenoceptor polymorphisms and asthma diagnosis among Mexican adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Dec;112(6):1095–100.
34. Kraft M, Striz I, Georges G, Umino T, Takigawa K, Rennard S, et al. Expression of epithelial markers in nocturnal asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Sep;102(3):376–81.
35. Greenberg H, Cohen RI. Nocturnal asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2012 Jan;18(1):57–62.
36. Sutherland ER. Nocturnal asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Dec;116(6):1179–86; quiz 1187.
37. Ginsberg D. An unidentified monster in the bed--assessing nocturnal asthma in children. *McGill J Med*. 2009 Jan;12(1):31–8.
38. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CKW, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet (London, England)*. 2006 Aug 26;368(9537):733–43.
39. Pearce N, Weiland S, Keil U, Langridge P, Anderson HR, Strachan D, et al. Self-reported prevalence of asthma symptoms in children in Australia, England, Germany and New Zealand: an international comparison using the ISAAC protocol. *Eur Respir J*. 1993 Nov;6(10):1455–61.
40. Chugh IM, Khanna P, Shah A. Nocturnal symptoms and sleep disturbances in clinically stable asthmatic children. *Asian Pacific J allergy Immunol*. 2006;24(2–3):135–42.
41. Turner-Warwick M. Epidemiology of nocturnal asthma. *Am J Med*. 1988 Jul 29;85(1B):6–8.
42. Raheison C, Abouelfath A, Le Gros V, Taytard A, Molimard M. Underdiagnosis of nocturnal symptoms in asthma in general practice. *J Asthma*. 2006 Apr;43(3):199–202.
43. Boudewijn IM, Savenije OEM, Koppelman GH, Wijga AH, Smit HA, de Jongste JC, et al. Nocturnal dry cough in the first 7 years of life is associated with asthma at school age. *Pediatr Pulmonol*. 2015 Sep;50(9):848–55.
44. Desager KN, Nelen V, Weyler JJJ, De Backer WA. Sleep disturbance and daytime symptoms in wheezing school-aged children. *J Sleep Res*. 2005 Mar;14(1):77–82.
45. Diette GB, Markson L, Skinner EA, Nguyen TT, Algatt-Bergstrom P, Wu AW. Nocturnal asthma in children affects school attendance, school performance, and parents' work attendance. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2000 Sep;154(9):923–8.
46. Fagnano M, Bayer AL, Isensee CA, Hernandez T, Halterman JS. Nocturnal asthma symptoms and poor sleep quality among urban school children with asthma. *Acad Pediatr*. 2011 Nov;11(6):493–9.
47. Calhoun WJ. Nocturnal asthma. *Chest*. 2003 Mar;123(3 Suppl):399S–405S.
48. Li N, Stephens M. Modeling linkage disequilibrium and identifying recombination hotspots using single-nucleotide polymorphism data. *Genetics*. 2003 Dec;165(4):2213–33.

49. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler DL, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010 Oct 28;467(7319):1061–73.
50. Anedda F, Zucchelli M, Schepis D, Hellquist A, Corrado L, D’Alfonso S, et al. Multiple polymorphisms affect expression and function of the neuropeptide S receptor (NPSR1). *PLoS One*. 2011;6(12):e29523.
51. Acevedo N, Sääf A, Söderhäll C, Melén E, Mandelin J, Pietras CO, et al. Interaction between retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha (RORA) and neuropeptide S receptor 1 (NPSR1) in asthma. *PLoS One*. 2013;8(4):e60111.
52. Ward LD, Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jan;40:D930-4.
53. Ward LD, Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 4;44(D1):D877–81.
54. Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, Heravi-Moussavi A, et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*. 2015 Feb 18;518(7539):317–30.
55. Ardlie KG, Deluca DS, Segre A V., Sullivan TJ, Young TR, Gelfand ET, et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. *Science*. 2015 May 8;348(6235):648–60.
56. Eicher JD, Landowski C, Stackhouse B, Sloan A, Chen W, Jensen N, et al. GRASP v2.0: an update on the Genome-Wide Repository of Associations between SNPs and phenotypes. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan 28;43(D1):D799–804.
57. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012 Sep 6;489(7414):57–74.
58. Westra H-J, Peters MJ, Esko T, Yaghootkar H, Schurmann C, Kettunen J, et al. Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nat Genet*. 2013 Oct 8;45(10):1238–43.
59. Lappalainen T, Sammeth M, Friedländer MR, ’t Hoen PAC, Monlong J, Rivas MA, et al. Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans. *Nature*. 2013 Sep 26;501(7468):506–11.
60. Lindblad-Toh K, Garber M, Zuk O, Lin MF, Parker BJ, Washietl S, et al. A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals. *Nature*. 2011 Oct 12;478(7370):476–82.
61. Davydov E V., Goode DL, Sirota M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S. Identifying a High Fraction of the Human Genome to be under Selective Constraint Using GERP++. Wasserman WW, editor. *PLoS Comput Biol*. 2010 Dec 2;6(12):e1001025.
62. Weiland SK, von Mutius E, Hirsch T, Duhme H, Fritzscher C, Werner B, et al. Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. *Eur Respir J*. 1999 Oct;14(4):862–70.
63. Michel S, Liang L, Depner M, Klopp N, Ruether A, Kumar A, et al. Unifying candidate gene and GWAS Approaches in Asthma. *PLoS One*. 2010 Nov 12;5(11):e13894.



64. Anderson CA, Pettersson FH, Clarke GM, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Data quality control in genetic case-control association studies. *Nat Protoc.* 2010 Sep 26;5(9):1564–73.
65. Ziegler A, König IR, Thompson JR. Biostatistical aspects of genome-wide association studies. *Biom J.* 2008 Feb;50(1):8–28.
66. Trynka G, Hunt KA, Bockett NA, Romanos J, Mistry V, Szperl A, et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet.* 2011 Dec 6;43(12):1193–201.
67. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007 Sep;81(3):559–75.
68. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013.
69. Esparza-Gordillo J, Weidinger S, Fölster-Holst R, Bauerfeind A, Ruschendorf F, Patone G, et al. A common variant on chromosome 11q13 is associated with atopic dermatitis. *Nat Genet.* 2009 May 6;41(5):596–601.
70. Hersh CP, Raby BA, Soto-Quirós ME, Murphy AJ, Avila L, Lasky-Su J, et al. Comprehensive testing of positionally cloned asthma genes in two populations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Nov 1;176(9):849–57.
71. Gottlieb DJ, O’Connor GT, Wilk JB. Genome-wide association of sleep and circadian phenotypes. *BMC Med Genet.* 2007 Sep 19;8 Suppl 1:S9.
72. Erdmann F, Kügler S, Blaesse P, Lange MD, Skryabin B V, Pape H-C, et al. Neuronal expression of the human neuropeptide S receptor NPSR1 identifies NPS-induced calcium signaling pathways. *PLoS One.* 2015 Feb 25;10(2):e0117319.
73. Leurs R, Bakker RA, Timmerman H, de Esch IJP. The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 Feb 24;4(2):107–20.
74. Laitinen T, Polvi A, Rydman P, Vendelin J, Pulkkinen V, Salmikangas P, et al. Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science.* 2004 Apr 9;304(5668):300–4.
75. Hamsten C, Häggmark A, Grundström J, Mikus M, Lindskog C, Konradsen JR, et al. Protein profiles of CCL5, HPGDS, and NPSR1 in plasma reveal association with childhood asthma. *Allergy.* 2016 Sep;71(9):1357–61.
76. Ilmarinen P, James A, Moilanen E, Pulkkinen V, Daham K, Saarelainen S, et al. Enhanced expression of neuropeptide S (NPS) receptor in eosinophils from severe asthmatics and subjects with total IgE above 100IU/ml. *Peptides.* 2014 Jan;51:100–9.
77. Melén E, Bruce S, Doekes G, Kabesch M, Laitinen T, Lauener R, et al. Haplotypes of G Protein-coupled Receptor 154 Are Associated with Childhood Allergy and Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 May 15;171(10):1089–95.
78. Kormann MSD, Carr D, Klopp N, Illig T, Leupold W, Fritsch C, et al. G-Protein-coupled receptor polymorphisms are associated with asthma in a large German population. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Jun 15;171(12):1358–62.
79. Castro-Giner F, de Cid R, Gonzalez JR, Jarvis D, Heinrich J, Janson C, et al. Positionally cloned genes and age-specific effects in asthma and atopy: an international population-based cohort study (ECRHS). *Thorax.* 2010 Feb;65(2):124–31.

80. Zhu H, Perkins C, Mingler MK, Finkelman FD, Rothenberg ME. The role of neuropeptide S and neuropeptide S receptor 1 in regulation of respiratory function in mice. *Peptides*. 2011 Apr;32(4):818–25.
81. Biagini Myers JM, Martin LJ, Kovacic MB, Mersha TB, He H, Pilipenko V, et al. Epistasis between serine protease inhibitor Kazal-type 5 (SPINK5) and thymic stromal lymphopoietin (TSLP) genes contributes to childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Oct;134(4):891–899.e3.
82. Orsmark-Pietras C, Melén E, Vendelin J, Bruce S, Laitinen A, Laitinen LA, et al. Biological and genetic interaction between Tenascin C and Neuropeptide S receptor 1 in allergic diseases. *Hum Mol Genet*. 2008 Jun 1;17(11):1673–82.
83. Kabesch M, Schedel M, Carr D, Woitsch B, Fritzscher C, Weiland SK, et al. IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Feb;117(2):269–74.
84. Torgerson DG, Ampleford EJ, Chiu GY, Gauderman WJ, Gignoux CR, Graves PE, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nat Genet*. 2011 Jul 31;43(9):887–92.
85. Persson H, Kwon AT, Ramilowski JA, Silberberg G, Söderhäll C, Orsmark-Pietras C, et al. Transcriptome analysis of controlled and therapy-resistant childhood asthma reveals distinct gene expression profiles. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Sep;136(3):638–48.
86. Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal*. 2007;4.
87. Melén E, Kho AT, Sharma S, Gaedigk R, Leeder JS, Mariani TJ, et al. Expression analysis of asthma candidate genes during human and murine lung development. *Respir Res*. 2011 Jun 23;12:86.
88. Jaradat M, Stapleton C, Tilley SL, Dixon D, Erikson CJ, McCaskill JG, et al. Modulatory role for retinoid-related orphan receptor alpha in allergen-induced lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Dec 15;174(12):1299–309.
89. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*. 2004 Aug 19;43(4):527–37.
90. Kang HS, Angers M, Beak JY, Wu X, Gimble JM, Wada T, et al. Gene expression profiling reveals a regulatory role for ROR alpha and ROR gamma in phase I and phase II metabolism. *Physiol Genomics*. 2007 Oct 22;31(2):281–94.
91. Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, et al. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*. 2002 Aug 1;418(6897):534–9.
92. Akashi M, Takumi T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol*. 2005 May;12(5):441–8.
93. Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W, Straume M, et al. Nuclear Receptor Expression Links the Circadian Clock to Metabolism. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):801–10.
94. Albrecht U. Invited Review: Regulation of mammalian circadian clock genes. *J Appl*

- Physiol. 2002 Mar;92(3):1348–55.
95. Isojima Y, Okumura N, Nagai K. Molecular mechanism of mammalian circadian clock. *J Biochem.* 2003 Dec;134(6):777–84.
  96. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* 2002 Aug 29;418(6901):935–41.
  97. Schibler U, Naef F. Cellular oscillators: rhythmic gene expression and metabolism. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 Apr;17(2):223–9.
  98. Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, Cermakian N. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms.* 2005 Oct;20(5):391–403.
  99. Gallego M, Virshup DM. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Feb 1;8(2):139–48.
  100. Levy DE, Lee C. What does Stat3 do? *J Clin Invest.* 2002 May;109(9):1143–8.
  101. Gavino AC, Nahmod K, Bharadwaj U, Makedonas G, Tweardy DJ. STAT3 inhibition prevents lung inflammation, remodeling, and accumulation of Th2 and Th17 cells in a murine asthma model. *Allergy.* 2016 Dec;71(12):1684–92.
  102. Lim H, Cho M, Choi G, Na H, Chung Y. Dynamic control of Th2 cell responses by STAT3 during allergic lung inflammation in mice. *Int Immunopharmacol.* 2015 Oct;28(2):846–53.
  103. Pascoe CD, Obeidat M, Arsenault BA, Nie Y, Warner S, Stefanowicz D, et al. Gene expression analysis in asthma using a targeted multiplex array. *BMC Pulm Med.* 2017 Dec 11;17(1):189.
  104. Roos AB, Barton JL, Miller-Larsson A, Dahlberg B, Berg T, Didon L, et al. Lung epithelial-C/EBP $\beta$  contributes to LPS-induced inflammation and its suppression by formoterol. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Jun 22;423(1):134–9.
  105. Krug N, Hohlfeld JM, Kirsten A-M, Kornmann O, Beeh KM, Kappeler D, et al. Allergen-Induced Asthmatic Responses Modified by a GATA3-Specific DNase. *N Engl J Med.* 2015 May 21;372(21):1987–95.
  106. Duangdao DM, Clark SD, Okamura N, Reinscheid RK. Behavioral phenotyping of Neuropeptide S receptor knockout mice. *Behav Brain Res.* 2009 Dec;205(1):1–9.
  107. Zhao P, Shao YF, Zhang M, Fan K, Kong XP, Wang R, et al. Neuropeptide S promotes wakefulness through activation of the posterior hypothalamic histaminergic and orexinergic neurons. *Neuroscience.* 2012 Apr;207:218–26.
  108. Spada J, Sander C, Burkhardt R, Häntzsch M, Mergl R, Scholz M, et al. Genetic association of objective sleep phenotypes with a functional polymorphism in the neuropeptide S receptor gene. *PLoS One.* 2014;9(6):e98789.
  109. Ramasamy A, Kuokkanen M, Vedantam S, Gajdos ZK, Couto Alves A, Lyon HN, et al. Genome-wide association studies of asthma in population-based cohorts confirm known and suggested loci and identify an additional association near HLA. *PLoS One.* 2012;7(9):e44008.
  110. Phillips PC. Epistasis--the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nat Rev Genet.* 2008 Nov;9(11):855–67.
  111. Cordell HJ. Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. *Nat Rev Genet.* 2009 Jun;10(6):392–404.

112. Murk W, Bracken MB, DeWan AT. Confronting the missing epistasis problem: on the reproducibility of gene–gene interactions. *Hum Genet.* 2015 Aug 22;134(8):837–49.
113. Chang AB, Newman RG, Carlin JB, Phelan PD, Robertson CF. Subjective scoring of cough in children: parent-completed vs child-completed diary cards vs an objective method. *Eur Respir J.* 1998 Feb;11(2):462–6.
114. Falconer A, Oldman C, Helms P. Poor agreement between reported and recorded nocturnal cough in asthma. *Pediatr Pulmonol.* 1993 Apr;15(4):209–11.
115. Dales RE, White J, Bhungara C, McMullen E. Parental reporting of childrens' coughing is biased. *Eur J Epidemiol.* 1997 Jul;13(5):541–5.
116. Boner AL, Piacentini GL, Peroni DG, Irving CS, Goldstein D, Gavriely N, et al. Children with nocturnal asthma wheeze intermittently during sleep. *J Asthma.* 2010 Apr 15;47(3):290–4.
117. Liang SQ, Chen XL, Deng JM, Wei X, Gong C, Chen ZR, et al. Beta-2 adrenergic receptor (ADRB2) gene polymorphisms and the risk of asthma: a meta-analysis of case-control studies. *PLoS One.* 2014;9(8):e104488.
118. Kimura H. Histone modifications for human epigenome analysis. *J Hum Genet.* 2013 Jul;58(7):439–45.
119. Lee N, You S, Shin MS, Lee W-W, Kang KS, Kim SH, et al. IL-6 Receptor  $\alpha$  Defines Effector Memory CD8<sup>+</sup> T Cells Producing Th2 Cytokines and Expanding in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Dec 15;190(12):1383–94.
120. Rayees S, Malik F, Bukhari SI, Singh G. Linking GATA-3 and interleukin-13: implications in asthma. *Inflamm Res.* 2014 Apr 22;63(4):255–65.
121. KleinJan A, Klein Wolterink RGJ, Levani Y, de Bruijn MJW, Hoogsteden HC, van Nimwegen M, et al. Enforced Expression of Gata3 in T Cells and Group 2 Innate Lymphoid Cells Increases Susceptibility to Allergic Airway Inflammation in Mice. *J Immunol.* 2014 Feb 15;192(4):1385–94.
122. Seumois G, Chavez L, Gerasimova A, Lienhard M, Omran N, Kalinke L, et al. Epigenomic analysis of primary human T cells reveals enhancers associated with TH2 memory cell differentiation and asthma susceptibility. *Nat Immunol.* 2014 Jul 6;15(8):777–88.
123. Yagi R, Zhu J, Paul WE. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *Int Immunol.* 2011 Jul;23(7):415–20.
124. Fiore P, Gannon RL. Expression of the transcriptional coactivators CBP and p300 in the hamster suprachiasmatic nucleus: possible molecular components of the mammalian circadian clock. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 Mar 17;111(1–2):1–7.
125. Gustafson CL, Partch CL. Emerging Models for the Molecular Basis of Mammalian Circadian Timing. *Biochemistry.* 2015 Jan 20;54(2):134–49.
126. Hosoda H, kato K, Asano H, Ito M, Kato H, Iwamoto T, et al. CBP/p300 is a cell type-specific modulator of CLOCK/BMAL1-mediated transcription. *Mol Brain.* 2009 Nov 19;2(1):34.
127. Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, et al. STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of Inflammatory Helper T Cells. *J Biol Chem.* 2007 Mar 30;282(13):9358–63.
128. Moravcová S, Červená K, Pačesová D, Bendová Z. Identification of STAT3 and

- STAT5 proteins in the rat suprachiasmatic nucleus and the Day/Night difference in astrocytic STAT3 phosphorylation in response to lipopolysaccharide. *J Neurosci Res.* 2016 Jan;94(1):99–108.
129. Bozek K, Relógio A, Kielbasa SM, Heine M, Dame C, Kramer A, et al. Regulation of Clock-Controlled Genes in Mammals. *PLoS One.* 2009 Mar 16;4(3):e4882.
130. Lech K, Ackermann K, Revell VL, Lao O, Skene DJ, Kayser M. Dissecting Daily and Circadian Expression Rhythms of Clock-Controlled Genes in Human Blood. *J Biol Rhythms.* 2016 Feb 2;31(1):68–81.
131. Okamura N, Habay SA, Zeng J, Chamberlin AR, Reinscheid RK. Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo profile of 3-oxo-1,1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-a]pyrazine-7-carboxylic acid 4-fluoro-benzylamide (SHA 68), a selective antagonist of the neuropeptide S receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Jun 27;325(3):893–901.
132. Jüngling K, Seidenbecher T, Lesting J, Reinscheid RK, Pape H-C. Neuropeptid S: Ein neues Transmittersystem im Gehirn. *Neuroforum.* 2009;

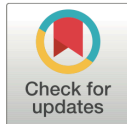
# 7. Annex:

## 7.1 Publikation 1

### Neuropeptide S (NPS) variants modify the signaling and risk effects of NPS Receptor 1 (NPSR1) variants in asthma

Nathalie Acevedo<sup>1</sup>, Sini Ezer<sup>2</sup>, Simon Kebede Merid<sup>3</sup>, Vincent D. Gaertner<sup>4</sup>, Cilla Söderhäll<sup>5,6</sup>, Mauro D'Amato<sup>7,8</sup>, Michael Kabesch<sup>4</sup>, Erik Melén<sup>3,9</sup>, Juha Kere<sup>2,5\*</sup>, Ville Pulkkinen<sup>10</sup>

**1** Department of Clinical Science and Education, Karolinska Institutet, and Sachs' Children and Youth Hospital, Södersjukhuset, Stockholm, Sweden, **2** Research Programs Unit, Program for Molecular Neurology, University of Helsinki, and Folkhälsan Institute of Genetics, Helsinki, Finland, **3** Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, **4** Department of Pediatric Pneumology and Allergy, University Children's Hospital Regensburg (KUNO), Regensburg, Germany, **5** Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden, **6** Department of Women's and Children's Health, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, **7** BioDonostia Health Research Institute and IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, San Sebastian Spain, **8** Clinical Epidemiology Unit, Department of Medicine Solna, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, **9** Sachs' Children's Hospital, Stockholm, Sweden, **10** Heart and Lung Center, Division of Pulmonary Medicine, University of Helsinki and Helsinki University Hospital, 00014 University of Helsinki, Helsinki, Finland



#### OPEN ACCESS

**Citation:** Acevedo N, Ezer S, Kebede Merid S, Gaertner VD, Söderhäll C, D'Amato M, et al. (2017) Neuropeptide S (NPS) variants modify the signaling and risk effects of NPS Receptor 1 (NPSR1) variants in asthma. PLoS ONE 12(5): e0176568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176568>

**Editor:** Yungling Leo Lee, National Taiwan University College of Public Health, TAIWAN

**Received:** December 16, 2016

**Accepted:** April 12, 2017

**Published:** May 2, 2017

**Copyright:** © 2017 Acevedo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** VP is financially supported by the Sigrid Jusélius Foundation, Research Funds of the University of Helsinki, the Paulo Foundation, Finnish Anti-Tuberculosis Association Foundation, the Finnish Cultural Foundation, and the EVO funding of the Helsinki University Hospital. In addition, this work was supported by the Swedish

© These authors contributed equally to this work.

\* [juha.kere@ki.se](mailto:juha.kere@ki.se)

#### Abstract

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) close to the gain-of-function substitution, Asn(107) Ile (rs324981, A>T), in Neuropeptide S Receptor 1 (*NPSR1*) have been associated with asthma. Furthermore, a functional SNP (rs4751440, G>C) in Neuropeptide S (*NPS*) encodes a Val(6)Leu substitution on the mature peptide that results in reduced bioactivity. We sought to examine the effects of different combinations of these *NPS* and *NPSR1* variants on downstream signaling and genetic risk of asthma. In transfected cells, the magnitude of *NPSR1*-induced activation of cAMP/PKA signal transduction pathways and downstream gene expression was dependent on the combination of the *NPS* and *NPSR1* variants with *NPS*-Val(6)/*NPSR1*-Ile(107) resulting in strongest and *NPS*-Leu(6)/*NPSR1*-Asn(107) in weakest effects, respectively. One or two copies of the *NPS*-Leu(6) (rs4751440) were associated with physician-diagnosed childhood asthma (OR: 0.67, 95%CI 0.49–0.92,  $p = 0.01$ ) and together with two other linked *NPS* variants (rs1931704 and rs10830123) formed a protective haplotype ( $p = 0.008$ ) in the Swedish birth cohort BAMSE (2033 children). *NPS* rs10830123 showed epistasis with *NPSR1* rs324981 encoding Asn(107)Ile ( $p = 0.009$ ) in BAMSE and with the linked *NPSR1* rs17199659 ( $p = 0.005$ ) in the German MAGIC/ISAAC II cohort (1454 children). In conclusion, *NPS* variants modify asthma risk and should be considered in genetic association studies of *NPSR1* with asthma and other complex diseases.

Research Council, Swedish Heart-Lung Foundation, Stockholm County Council (ALF), and Swedish Foundation for Strategic Research (SSF). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Neuropeptide S (NPS) affects multiple neuroendocrine, behavioral, and inflammatory responses via its G protein-coupled cell surface receptor NPSR1 (Neuropeptide S Receptor 1) [1–4]. *NPSR1* was identified as a susceptibility gene for asthma and related traits by positional cloning and the associations of *NPSR1* single nucleotide polymorphisms (SNPs) with asthma have been replicated in ethnically diverse populations [5–12], and marginally supported by a large-scale genome-wide association study (GWAS) [13]. In addition, *NPSR1* SNPs have shown genetic associations with other inflammatory phenotypes such as inflammatory bowel disease [14] and rheumatoid arthritis [15, 16]. However, the *NPSR1* locus has shown allelic heterogeneity with different markers (tag SNPs, intronic markers, and haplotypes) showing associations depending on the study design and population being studied. We have previously shown that several susceptibility alleles of low-to-moderate-effects in *NPSR1* may modify the asthma risk and show epistasis depending on the carrier status for variants in genes belonging to common biological pathways [17]. These effects may not be uncovered by SNP arrays which are suitable for detection of common polymorphisms but cannot detect the effects of less frequent coding mutations and low frequency functional SNPs.

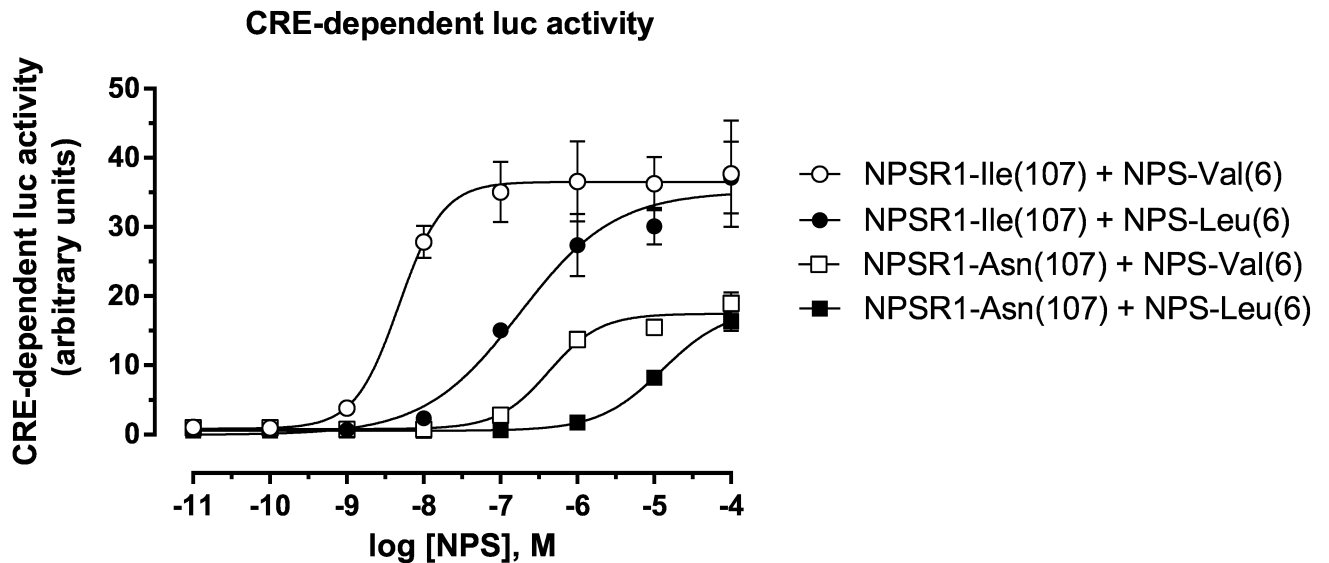
The functional *NPSR1* SNP rs324981 (A>T), encoding a substitution of Asn(107)Ile in the putative ligand-binding pocket of NPSR1 [5], has shown associations with neuropsychiatric phenotypes, such as panic disorders [18–20], psychological stress [21], and fear responses [22, 23]. A GWAS on circadian sleep parameters found an association between rs324981 and regular bedtime [24] and another study showed that the same SNP was associated with sleep and rest duration [25]. In cell models, the change of Asn(107) to Ile(107) results in 10-fold increase in NPS-mediated intracellular signaling [26] and changes in genome-wide transcriptional profiles [27]. In addition, the *NPSR1* SNP rs324981 has been associated with airway hyperresponsiveness to methacholine in a Chinese population [8]. Non-coding functional SNPs have also been detected in *NPSR1*, for instance rs2530547 which affects luciferase expression in gene reporter assays and *NPSR1* mRNA levels in human leukocytes [27]. By changing the levels of expression in this receptor, they may ultimately also affect signaling, and are hypothesized to affect neuroinflammatory phenotypes [28]. Thereby associations with individual *NPSR1* SNPs needs to be evaluated in the context of gene-gene interactions because a combination of functional polymorphisms may ultimately determine receptor properties and/or expression levels [27].

A functional SNP rs4751440 in *NPS* encodes a Val(6)Leu substitution in the mature NPS peptide that results in lower bioactivity [29]. We hypothesized that the interaction of functional *NPS* and *NPSR1* SNPs might lead to either strong or minimal downstream signaling depending on the genotype combination on both loci. The aims of this study were: 1) To clarify the potential functional crosstalk between NPS and *NPSR1* variants; 2) to identify the impact of putative *NPS* risk alleles on the susceptibility to asthma; and 3) to evaluate potential gene-gene interaction effects (epistasis) between *NPS* and *NPSR1* polymorphisms on asthma.

## Results

### Biological interaction of NPS and NPSR1 variants can lead to either strong or minimal downstream signaling

NPS is known to activate NPSR1 by increasing cAMP production [30, 31]. To compare the bioactivities of the two NPS variants, we measured the dose-responses of NPSR1-Ile(107) and NPSR1-Asn(107) coding variants to either wildtype NPS-Val(6) or alternative NPS-Leu(6) in a luciferase assay dependent on the activation of a cAMP-response element (CRE). This assay



**Fig 1. NPS variants and CRE luciferase activity.** Dose-response curves of NPS-Val(6) and NPS-Leu(6) (10 pM– 100 μM) based on the cAMP response element (CRE) luciferase activity in human embryonic kidney epithelial (HEK293) cells transiently transfected with either NPSR1-Ile(107) or NPSR1-Asn(107) coding variants. One representative experiment is shown. The CRE-driven luciferase activity is expressed in mean arbitrary units ± SEM of triplicates 3 h after NPS stimulation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176568.g001>

was used since elevation of the intracellular cAMP levels activates cAMP response element binding protein (CREB) via phosphorylation of protein kinase A (PKA). Activated CREB binds to CRE and induces the expression of downstream target genes of the cAMP/PKA signaling pathway. Because of the low endogenous expression levels of NPSR1 in majority of the available cell lines [26, 29], we first used HEK293 cells with forced NPSR1 expression as a model for ligand-receptor interactions. This approach allowed comparisons between the present and previous studies [26, 29]. HEK293 cells were transiently co-transfected with the two NPSR1 variants along with a CRE-responsive firefly luciferase construct and a construct constitutively expressing Renilla luciferase. Firefly and Renilla luciferase activity was measured 3 h after stimulation with serial dilutions of NPS (10 pM–100 μM). As shown in Fig 1, wildtype NPS—Val(6) peptide stimulated CRE—dependent luciferase activity at 50—fold lower concentrations than the NPS—Leu(6) peptide in NPSR1—Ile(107) cells (pEC 50: 8.4 ± 0.2 and 6.7 ± 0.2, p = 0.004, respectively), and at 15-fold lower concentrations in NPSR1—Asn(107) cells (pEC 50: 6.1 ± 0.3 and 4.9 ± 0.1, p = 0.03, respectively).

The maximum of luciferase activity was ~2-fold in cells transfected with the NPSR1-Ile (107) variant in comparison to the cells transfected with the NPSR1-Asn(107). Thus, the magnitude of NPSR1-induced activation of CRE was markedly different depending on the combination of the NPS and the NPSR1 variants resulting in either strong (NPS-Val(6) and NPSR1-Ile(107)) or minimal (NPS-Leu(6) and NPSR1-Asn(107)) downstream signal transduction.

The activation of CRE results in transcriptional changes of downstream target genes. To examine whether the observed differences in the promoter activity also affected gene expression, we measured the effects of NPS variants on known NPSR1 downstream target genes [27, 32, 33]. *NR4A1* (nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1), *FOS* (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog), and chemokine ligands *CXCL2* and *CCL20* were selected as they were among the most influenced genes after NPS stimulation and their expression also differed between transcriptome comparisons of HEK293 cells expressing either NPSR1-Ile

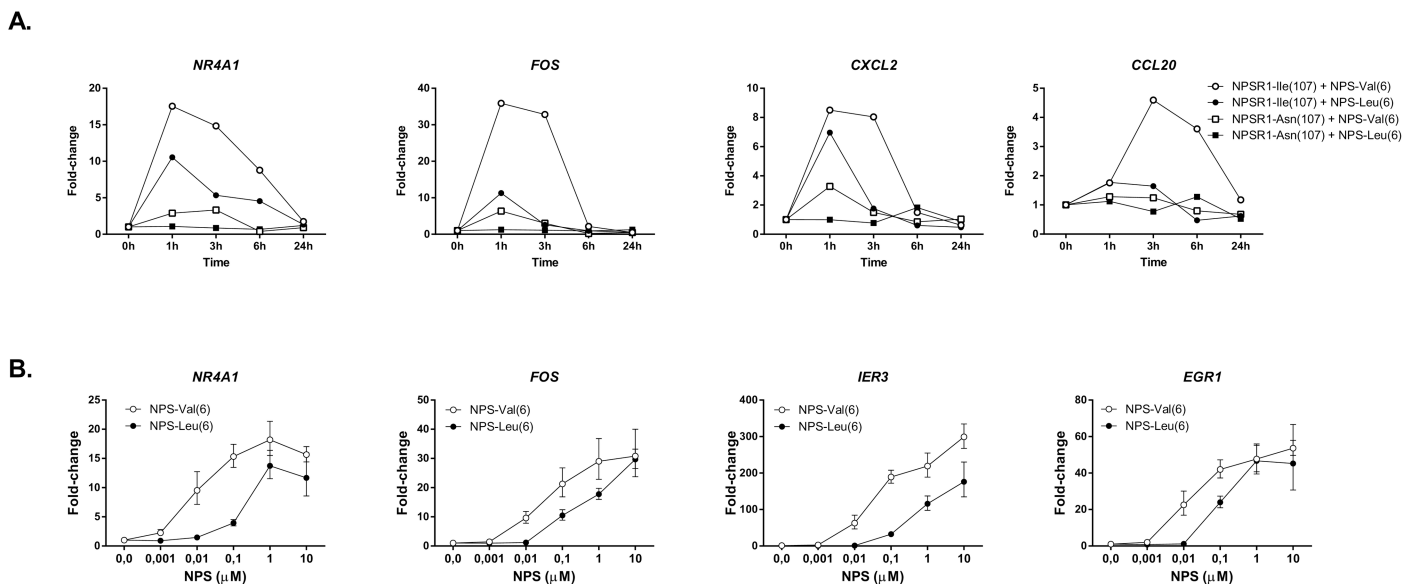


(107) or NPSR1-Asn(107) [27]. In the present study, HEK293 cells transiently transfected with either NPSR1-Ile(107) or NPSR1-Asn(107) coding variants were stimulated with 100 nM of either NPS-Val(6) or NPS-Leu(6) for 1, 3, 6, and 24 h, and changes in gene expression were analyzed with RT-PCR. In agreement with the results from the luciferase assay, NPS induced stronger downstream signaling in cells expressing NPSR1-Ile(107) than in cells expressing NPSR1-Asn(107), and wildtype NPS-Val(6) peptide was more potent than the NPS-Leu(6) peptide. mRNA expression of *NR4A1*, *FOS*, and *CXCL2* was induced 1 h after NPS stimulation whereas the expression of *CCL20* was up-regulated at 3 h (Fig 2A).

Altered neuroinflammatory mechanisms have been implicated in allergic airway inflammation [34]. Because NPSR1 is expressed in neuroendocrine tissues [35–37], we used SH-SY5Y neuroblastoma cells of neuroendocrine origin to validate the changes in gene expression observed in HEK293 cells. SH-SY5Y cells stably overexpressing NPSR1-Ile(107) [17, 36] were stimulated with either NPS-Leu(6) or NPS-Val(6) (0.0001–1 μM) for 3 h and the mRNA expression of known downstream target genes in these cells [36] was detected using RT-PCR. As expected, NPS stimulation increased the expression of *NR4A1*, *FOS*, *EGR1* (early growth response protein 1), and *IER3* (immediate early response 3) in SH-SY5Y cells over-expressing NPSR1-Ile(107) in a dose dependent manner (Fig 2B). Wildtype NPS-Val(6) peptide was more potent than the NPS-Leu(6) peptide. These observations validated the results detected in HEK293 cells in an independent cell line.

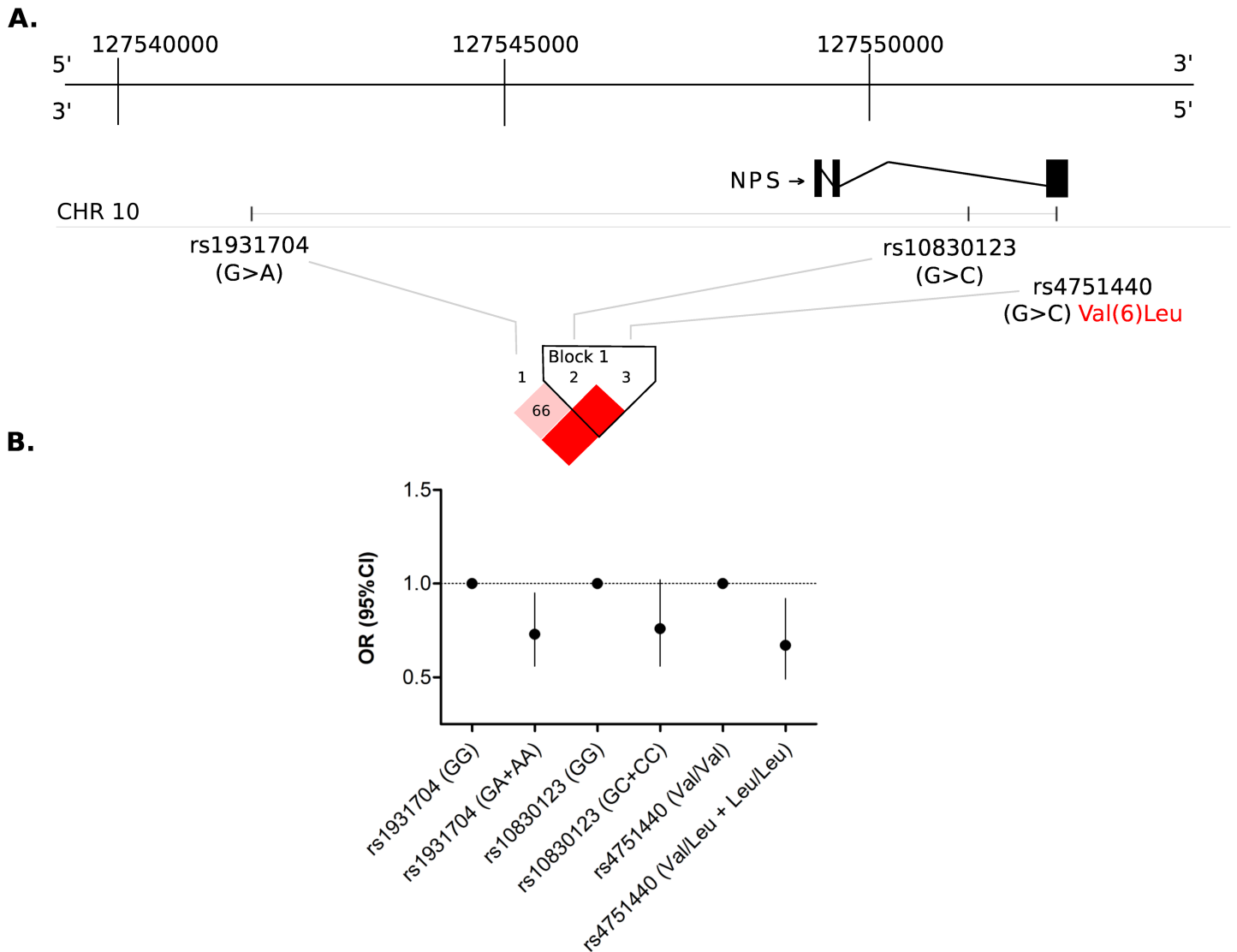
### NPS rs4751440 encoding Leu(6) is protective for childhood asthma

Because the SNP rs4751440 (G/C) encoding for NPS-Val(6) and NPS-Leu(6) is common in European and American mixed populations [29], and given its functional effects on NPSR1 signaling in cell assays, we hypothesized that this SNP might influence the genetic risk of diverse disease traits including asthma. The rs4751440 Val(6)Leu and two other NPS SNPs



**Fig 2. Real time RT-PCR analysis of NPSR1 downstream target genes.** (A) Time-dependent mRNA expression of *NR4A1*, *FOS*, *CXCL2*, and *CCL20* in human embryonic kidney epithelial (HEK293) cells transiently transfected with either NPSR1-Ile(107) or NPSR1-Asn(107) coding variants and stimulated with either NPS-Val(6) or NPS-Leu(6) NPS (100 nM) for 1, 3, 6, and 24 h. (B) Dose-response curves of *NR4A1*, *FOS*, *IER3*, and *EGR1* in human SH-SY5Y stable cell line over-expressing NPSR1-Ile(107) stimulated with either NPS-Leu(6) or NPS V6 (0.0001–1 μM) for 3 h. The results are presented as fold-changes in comparison to the unstimulated cells. *GAPDH* was used as the endogenous reference, and data are expressed as mean of triplicate samples. The error bars represent 95% confidence intervals. In all experiments, results were calculated with the comparative  $C_t$  method.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176568.g002>



**Fig 3. Location and block structure of three genotyped SNPs in the *NPS* gene.** (A) The scale represents the relative positions of rs1931704 (G>A) in the upstream regulatory region of *NPS*, followed by rs10830123 (G>C) in the intronic region and rs4751440 (G>C) in the coding region. Allele changes are indicated by > and given on the positive chromosomal strand of the Human Reference Assembly. The arrow indicates *NPS* transcription from the positive strand. (B) Effects of *NPS* SNPs on the risk of physician-diagnosed asthma in carriers of either one or two copies of the alternative allele. Bars represent 95% confidence intervals (CI). OR: Odds Ratio. Given the allele and genotype frequencies, the dominant model which best fits the data is shown.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176568.g003>

(rs1931704 and rs10830123) were analyzed for associations with physician-diagnosed childhood asthma in the prospective Swedish birth-cohort BAMSE ( $n = 2033$ ) [38, 39]. The SNPs spanned a region of 11 kb on chromosome 10q26.2 and were in linkage disequilibrium (LD) with each other (Fig 3A). The allele frequencies of the three *NPS* SNPs in cases and controls and the results of the association tests with asthma are presented in S1 Table. Two *NPS* SNPs (rs1931704 and rs4751440) in strong linkage disequilibrium ( $D' = 0.99$ ,  $r^2 = 0.69$ ) were significantly associated with physician-diagnosed childhood asthma at age 8 years under dominant ( $p = 0.01$ ) and additive models ( $p = 0.03$ ). For both *NPS* SNPs the effect was driven by a higher frequency of the minor allele in the control group (Fig 3B). These results revealed that the allele C in *NPS* rs4751440 encoding for Leu(6) is protective for asthma. The association

**Table 1. Haplotype association of NPS polymorphisms with asthma at 8 years.**

Haplotype	rs1931704 (G>A)	rs10830123 (G>C)	rs4751440 (G>C)	Frequency (controls)	Frequency (asthmatics)	OR 95%CI	(p-value)
1	G	G	G	0.70	0.76	1.0	-
2	A	G	C	0.14	0.10	0.71 (0.53–0.94)	0.01
3	A	C	G	0.11	0.10	0.87 (0.65–1.16)	0.3

Global haplotype association **p-value = 0.0077**

Allele changes are indicated by > and given on the positive chromosomal strand of the Human Reference Assembly.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176568.t001>

between *NPS* variants and asthma was also significant when comparing the haplotype frequencies between asthmatic children and controls with a protective effect driven by the haplotype AGC ( $p = 0.008$ ) (Table 1). There were no significant associations between *NPS* SNPs and atopic sensitization (data not shown).

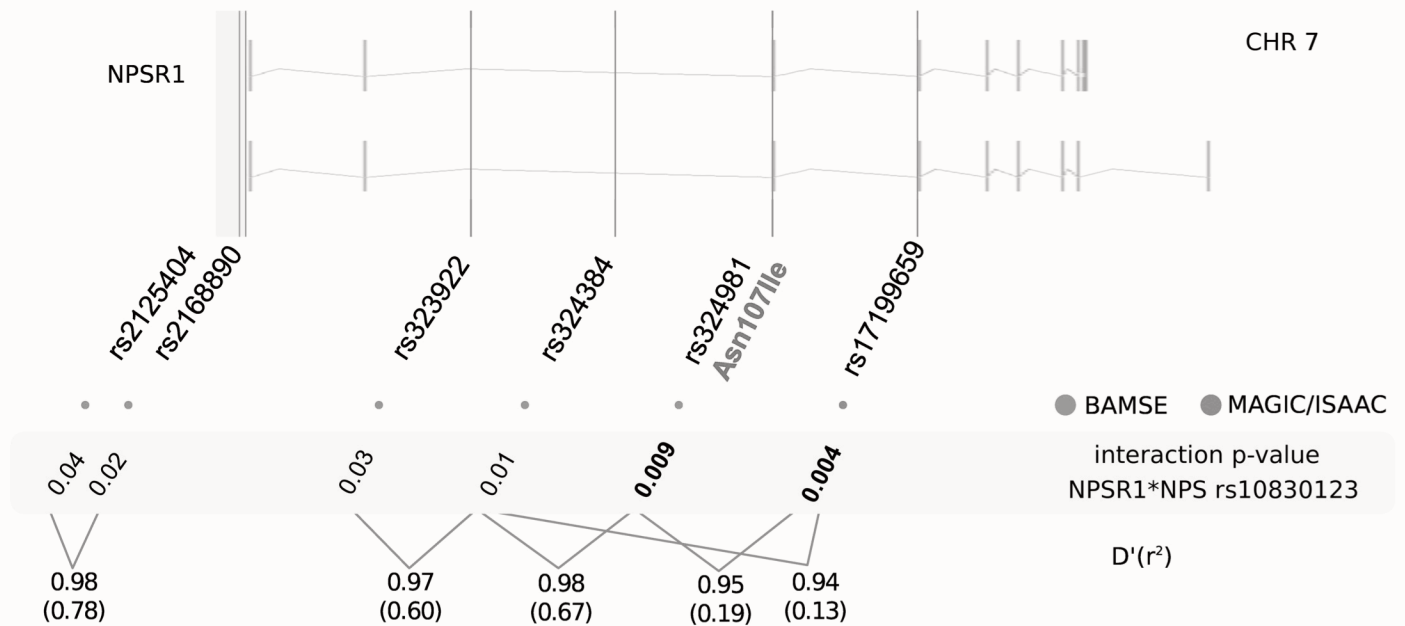
### Gene-gene interactions between *NPS* and *NPSR1* variants

Based on the effects of the *NPS* SNP rs4751440 on genetic asthma risk and *NPSR1* signaling, we first tested genetic association of 29 *NPSR1* SNPs with physician-diagnosed childhood asthma in BAMSE ( $n = 2033$ ), and then assessed epistasis between *NPS* and *NPSR1*. We detected significant association between three *NPSR1* SNPs (rs887020, rs2531840 and rs11770777) with asthma ( $p < 0.05$ ) and confirmed that the functional rs324981 (T>A) encoding for *NPSR1*-Ile(107) and *NPSR1*-Asn(107) had no significant main effects at present resolution (S2 Table). The next aim was to investigate if the effects of *NPS* SNPs (rs1931704, rs10830123 and rs4751440) on the risk of asthma were modified by the carrier status of alleles in the SNP rs324981 (A>T) encoding for *NPSR1*-Asn(107) and *NPSR1*-Ile(107), respectively, or by other variants with previous evidence of putative functional effects in the *NPSR1* gene. We detected significant interaction between *NPS* SNP rs10830123 and *NPSR1* rs324981 (interaction  $p$  value = 0.009). There were also significant interactions between *NPS* SNP rs10830123 with two additional *NPSR1* SNPs (rs323922 and rs324384) in linkage disequilibrium with *NPSR1* rs324981 (Fig 4). A second region with significant interactions between *NPS* and *NPSR1* was detected between two SNPs in the *NPSR1* promoter (rs2125404 and rs2168890) and *NPS* SNP rs10830123 (Fig 4) and S3 Table.

We then explored the gene-gene interaction between *NPS* and *NPSR1* SNPs in the MAGIC/ISAAC cohort ( $n = 1454$ ). *NPS* and *NPSR1* SNPs did not show any significant main effects on asthma risk in this dataset (data not shown). However, there was a significant interaction between *NPS* rs10830123 and *NPSR1* rs17199659 ( $p = 0.005$ ) (Fig 4 and S3 Table). *NPSR1* rs17199659 is in LD ( $D' = 0.95$ ,  $r^2 = 0.19$ ) with *NPSR1* rs324981 encoding for *NPSR1*-Asn(107) and *NPSR1*-Ile(107) and with rs324384, both showing significant gene-gene interactions in BAMSE (Fig 4). These results suggested that the epistatic signal with *NPS* was driven by genetic variants in the proximities of exon 3 and exon 4 in *NPSR1*.

### Discussion

Previous studies have shown that some polymorphic variants in the genes encoding *NPS* and *NPSR1* have functional effects in modifying peptide bioactivity or receptor signaling efficacy [26, 29]. However, no study has yet analyzed the functional outcomes of the different combinations of coding *NPS* and *NPSR1* variants upon ligand/receptor interactions. This is of critical relevance, because coding SNPs such as *NPS* rs4751440 or *NPSR1* rs324981 are commonly observed in humans, and cells in any given individual will carry one out of nine alternatives of



**Fig 4. Gene-gene interactions between NPSR1 and NPS.** Location of six *NPSR1* SNPs with significant interactions with *NPS* rs10830123 in the multiplicative model for epistasis in connection with their p-value for interaction and linkage disequilibrium. The most significant interaction signals in BAMSE (green) and MAGIC/ISAAC (orange) are marked in bold. Statistics on LD between the functional rs324981 and other interacting SNPs are provided as D' and r<sup>2</sup>.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176568.g004>

genotype combinations at these two loci. We examined the effects of the peptides NPS-Val(6) and NPS-Leu(6) on the signal transduction of NPSR1, expressed as two variants with different signaling efficacy (NPSR1-Ile(107) and NPSR1-Asn(107)). Our results clearly showed that the magnitude of NPSR1 signaling (as determined by reporter gene assays) and expression levels of downstream genes was dependent on the combination of NPS and NPSR1 variants, with the highest induction obtained upon stimulation of NPSR1-Ile(107) overexpressing cells with NPS-Val(6), and the lowest induction obtained with the combination of NPSR1-Asn(107) and NPS-Leu(6). Genetic association analyses further suggested epistasis between *NPS* and *NPSR1* variants with the most significant interactions being centered to the region of *NPSR1* rs324981 encoding for NPSR1-Ile(107) and NPSR1-Asn(107).

A key strength of this study is the use of robust *in vitro* cell assays that allowed us to dissect the functional effects of coding NPS/NPSR1 variants on receptor signaling and downstream gene expression. Our cell assays confirmed that stimulation of cells transfected with either NPSR1-Asn(107) or NPSR1-Ile(107) with the wildtype NPS-Val(6), induced CRE activity as described previously [26, 27]. Reinscheid *et al.* [26] have previously shown that upon stimulation with NPS-Val(6), stable HEK293 cell lines expressing NPSR1-Asn(107) and CRE-luciferase reporter gene displayed an induction of luciferase activity with a mean EC<sub>50</sub> of 45 nM, which was roughly 10-fold lower than in this study (428 nM). For NPSR1-Ile(107), the stimulation with NPS-Val(6) produced an increase in reporter gene expression with an EC<sub>50</sub> of 0.6 nM, which was 10-fold lower than what we observed (4.8 nM) [26]. The differences could be explained by the ~20-fold lower magnitude of reporter gene induction in transiently transfected cells compared with stable clones [26]. In agreement with our study, the maximum of reporter gene expression in HEK293 cells transiently transfected with NPSR1-Ile(107) was ~2-fold higher than in cells expressing NPSR1-Asn(107), indicating an increase in agonist efficacy. Another previous study observed EC<sub>50</sub> values of 37 nM and 586 nM for NPS-Val(6)



and NPS-Leu(6), respectively, in CRE-luciferase activity 18 h after stimulation of HEK293 cells transiently transfected with NPSR1-Asn(107) [29]. Overall, our results were in line with these previous observations, and methodological issues, such as differences in NPS incubation time and transfection efficiency, might well explain the differences observed.

Our genetic analyses in the birth cohort BAMSE uncovered the association between *NPS* rs4751440 and the presence of asthma by 8 years. Another *NPS* SNP (rs10830123) showed borderline association with asthma, and formed a protective haplotype with *NPS* rs1931704 and *NPS* rs4751440. The protective effect of the minor allele C in *NPS* rs10830123 became significant only in the presence of two copies of rs324981 (TT) encoding NPSR1-Ile(107). In the replication cohort, *NPS* rs10830123 showed interaction with *NPSR1* rs17199659 which is in linkage disequilibrium with rs324981 and rs324384. Due to the LD, *NPS* rs10830123 can be used as a proxy for the effects of *NPS* rs4751440 (Fig 4). Although the latter had significant main effects on asthma risk and proved to be functional in the cell assays, a lower frequency of informative GC heterozygotes in the patient group could have influenced the power to detect gene-gene interactions with *NPSR1*. Indeed, 24% of non-asthmatic children were heterozygous for *NPS* rs4751440 and there was a low frequency of CC carriers in the cohorts with only 2% of children being homozygous (CC) for NPS-Leu(6). This was in line with previous findings suggesting that 22% of Europeans are heterozygous for *NPS* rs4751440 [29]. Nevertheless, it is consistent in BAMSE and MAGIC/ISAAC that the most significant interaction was centered to the region of *NPSR1* rs324981 encoding for NPSR1-Ile(107) and NPSR1-Asn(107). Altogether, our results supported the role of the NPS/NPSR1 pathway in asthma and the notion of a “combinatory effect”, in which the phenotype is driven by the interaction of several variants of moderate effects that coincide and affect a biological pathway [17].

In BAMSE, the *NPS* rs10830123 also showed significant interactions with two SNPs located in the upstream region of *NPSR1* (rs2125404 and rs2168890). These were in LD with *NPSR1* rs2530547 previously found to affect *NPSR1* mRNA levels in human leukocytes [27] and with three SNPs affecting *NPSR1* mRNA expression in cerebellum (rs2530549, rs2530550, and rs2530566) according to the Genotype-Tissue Expression database (<http://gtexportal.org/home/gene/NPSR1>). Furthermore, a bioinformatic analysis on the transcription binding sites that are created or destroyed by the five *NPSR1* SNPs implicated in the gene-gene interactions with *NPS* (S3 Table) revealed that the change of cytosine (C) to guanine (G) in *NPSR1* rs323922 is predicted to affect the binding site of V\$NBRE/NBRE.01 related to the monomers of the nur subfamily of nuclear receptors (NR4A1-3, also known as nur77, nurr1, nor-1, S4 Table).

Previous transcriptome studies in HEK293 cells [32, 33] and SH-SY5Y cells [36] overexpressing NPSR1-Ile(107) revealed downstream target genes with *NR4A1* and *FOS* being among the most affected transcription factors. In our cells assays, the magnitude of the mRNA expression of *NR4A1* was clearly dependent on the combination of NPS and NPSR1 variants (Fig 2). *NR4A1* is expressed in lymphocytes upon stimulation and is anti-inflammatory [40–42]. *NR4A1* has been recently described as a key regulator of catecholamine production by macrophages linking sympathetic stress response and inflammation [43]. The hypothesis of a regulatory loop influenced by particular combinations of NPS/NPSR1 variants is further suggested by the up-regulation of the transcription factor *FOS* in cells expressing NPSR1-Ile(107) upon stimulation with NPS-Val(6) and the fact that the promoter region of *NPSR1* is known to contain *FOS* binding motifs [28]. The upregulation of *NR4A1* and *FOS* induced by the combination of NPS-Val(6) and NPSR1-Ile(107) is anticipated not only to interact in a feedback loop with their regulatory elements in *NPSR1* but also to regulate a number of other target genes including those involved in immune responses. For instance, the levels of serum pro-inflammatory cytokines could be activated by both central and peripheral administration of NPS in

pigs [44], and NPS has shown direct effects on phagocytosis [45] [46] and chemotaxis [47] [48]. Further insights to immune responses are suggested by the upregulation of *CXCL2* and *CCL20* encoding chemokine receptors ligands (Fig 2).

The findings of significant epistatic signals implicating coding and non-coding variants allowed us to suggest a model in which the divergent biological outcomes driven by coding variants in *NPS* and *NPSR1* do occur at the level of ligand/receptor interactions but also implicate the effects of polymorphic variants in non-coding regions and the cross-talk of regulatory elements in diverse loci (Fig 5). We must emphasize that the sample size analyzed in this study is underpowered to detect epistatic effects. However, the facts that the interaction signals in the two independent cohorts were narrowed to the same gene regions (Fig 4) and a recent meta-analysis on a larger dataset such as GABRIEL [49] confirmed the interaction signals that we originally identified in this population between *NPSR1* and *RORA* [17], suggest that the interactions between *NPS* and *NPSR1* may occur and are detectable at present resolution. Additional studies using larger sample sizes more suitable to test for epistasis are needed to confirm these findings.

In conclusion, our results supported the association of the *NPS/NPSR1* pathway with asthma and provided a molecular framework on how the different *NPS* and *NPSR1* variants interact in asthma. This study provides the basis for further investigations analyzing the interacting effects of *NPS/NPSR1* variants in many other phenotypes and also support that polymorphic variants in *NPS* should be taken into account when analyzing the effects of *NPSR1* SNPs. Such gene-gene interactions as observed here may dilute or dampen association signals in genetic association studies.

## Materials and methods

### Ethics statement

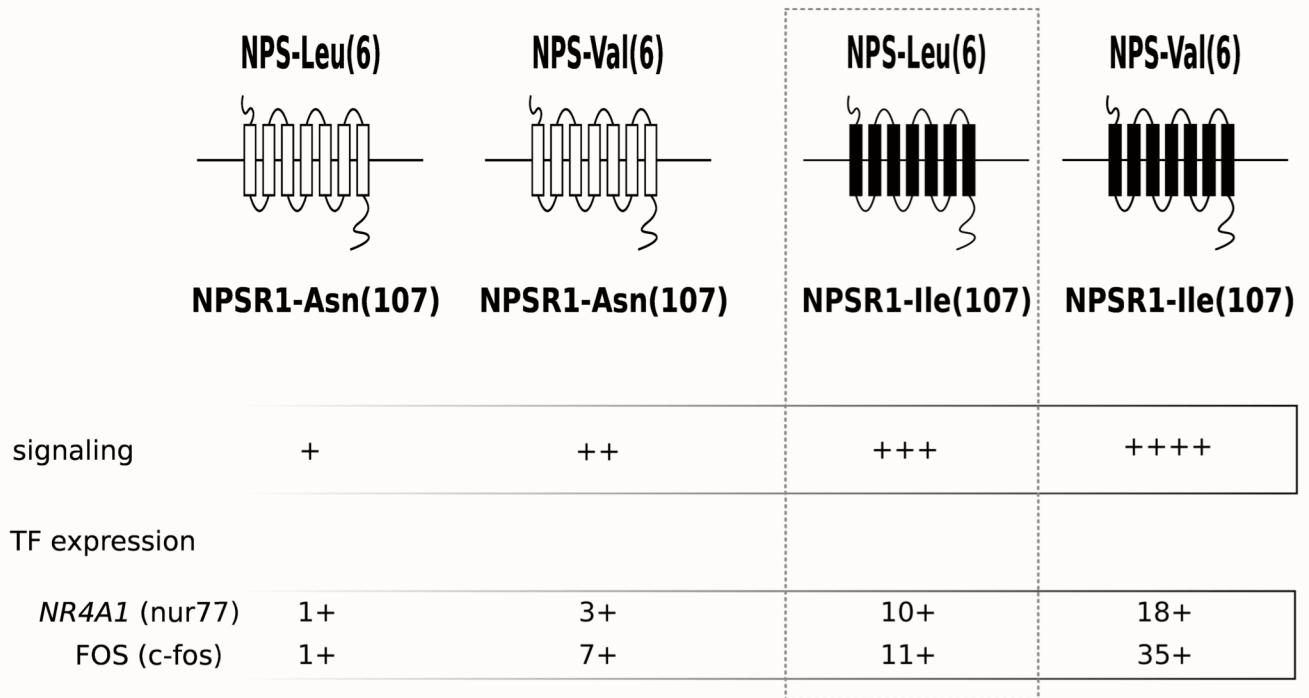
All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations and the study followed the ethical principles for medical research stated in the Declaration of Helsinki. All of the experimental protocols were approved by the Swedish Regional Ethics Committee at Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden in the BAMSE cohort (Dnr: 01–478 and 02–420) and by the Ethic Committee of the Bavarian Medical Council for MAGIC/ISAAC (approval nr. 01218). Written informed consent was obtained from parents/guardians on behalf of all child participants.

### Cell culture and NPS stimulations

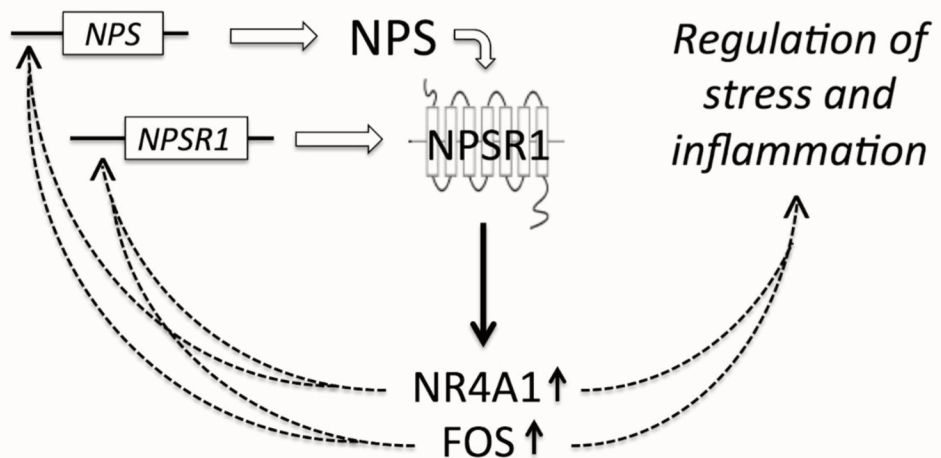
Human embryonic kidney cells (HEK293) were cultured in MEM+GlutaMAX-1 medium (Gibco/Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Biosera), 1% sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids and 1% penicillin/streptomycin (Gibco/Invitrogen). Cells were kept at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. The cells were transiently transfected (Lipofectamin™2000 Reagent, Invitrogen, Carlsbad, USA) with equal amounts of pCMV-*NPSR1-Ile(107)* or *NPSR1-Asn(107)* [27] in a ratio of 1:2 (DNA:Lipofectamin), and stimulated with NPS 24 h after transfection. The cells were stimulated with either 100 nM NPS-Val(6) (SFRNGVGTGMKKTSTFQRAKS) or 100 nM NPS-Leu(6) (SFRNGLGTGMKKTSTFQRAKS) (both from Proteogenix, France) for 1, 3, 6, and 24 h. The HEK293 cell line was chosen for ligand-receptor studies because it is a well-established model for addressing numerous questions in basic biology and is easy to transfect and amenable of stringent quantitative assessment.

The stable *NPSR1-A-GFP* expressing SH-SY5Y cells were engineered and cultured as described before [17]. For gene expression studies, the SH-SY5Y cells over-expressing *NPSR1*

**A.**



**B.**



**Fig 5. A schematic model on the functional crosstalk between NPS and NPSR1. (A)** The non-synonymous NPS-Leu(6) substitution affects NPS bioactivity. Depending on the NPSR1-Asn(107) or NPSR1-Ile(107) genotype, binding of NPS can lead to strong or minimal signaling as well as differential expression of downstream target genes such as the transcription factors FOS and NR4A1. **(B)** Two hypothetical mechanisms in which the differential expression of FOS and NR4A1 can modulate the outcomes of the NPS/NPSR1 pathway. FOS and NR4A1 bind to their regulatory elements in *NPSR1* creating a feed-back loop that affect cell surface expression of NPSR1 and availability, and also, affect a number of other downstream genes that modulate neuroinflammation and ultimately asthma risk.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176568.g005>

were seeded at  $0.5 \times 10^6$  cells/ml to 6-well plates. After 24 h, fresh cell media was added, and the cells were incubated with a dilution series of either NPS-Val(6) or NPS-Leu(6) (0.0001–10  $\mu$ M) for 3 h. The changes in gene expression were analyzed with real-time PCR (RT-PCR).

## Luciferase assays

For pharmacokinetic studies, HEK293 cells in 24-well plates were co-transfected with 700 ng of NPSR1 cDNA expression vectors specific for different coding variants and 50 ng each of cAMP response element (CRE) Firefly Luciferase reporter vector and CMV Renilla Luciferase reporter plasmid (purchased as pre-formulated mix from SABiosciences, Frederick, MD, USA). The day after transfection the cells were stimulated for 3 h with NPS at various concentrations (range 10 pM– 100  $\mu$ M) before preparation of total cell lysates. In all reporter assays, Luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions, in a Microplate Reader Infinite 200 (Tecan, Männedorf, CH). Experiments were performed three times in triplicates, and Firefly Luciferase activity was expressed in arbitrary units relative to the cells transfected with the vector without NPS stimulation, after normalization for transfection efficiency based on values obtained for Renilla Luciferase. The concentration-response curve values for pEC<sub>50</sub>, and E<sub>max</sub> were calculated using nonlinear regression analysis, and the data are presented as means  $\pm$  SE. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by unpaired *t*-test for comparison between two groups. For the analyses, GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA) was used.

## Real-time RT-PCR

Total cellular RNA was isolated with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Reverse transcription was performed with TaqMan reverse transcription reagents (Applied Biosystems, Rotkreuz, Switzerland) using random hexamer primers according to the manufacturer's protocol.

The mRNA expression was measured with qRT-PCR using either SYBR Green (for *NR4A1*, *FOS*, *IER3*, and *EGR1*, the primer sequences are given in [S5 Table](#)) or TaqMAN assay (Hs00601975 for *CXCL2* Hs00601975, Hs01011368 for *CCL20*, Hs01036497 for *NPSR1* and Pre-Developed TaqMAN Assay Reagents, Part No. 4310884 for *GAPDH*; Applied Biosystems).

The PCR assays were performed in a total volume of 10  $\mu$ l, using 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) with the following reaction conditions: 50°C for 2 min and 94°C for 10 min; followed by 45 cycles of 92°C for 14 s and 1 min at 60°C. A dissociation stage was added to the SYBR Green reactions to confirm primer specificity. Results are shown as relative expression compared with unstimulated cells and *GAPDH* (Applied Biosystems) was used as an endogenous control. Samples were normalized to *GAPDH* (in SH-SY5Y cells) or to *GAPDH* and *NPSR1* in order to control for the efficiency of the transient transfections (in HEK293 cells). The variation in NPSR1 expression (Ct values) between cells transfected with the NPSR1-Asn(107) and NPSR1-Ile(107) was within one cycle. Expression levels of mRNA in each sample were determined by the comparative C<sub>T</sub> method of relative quantification, and expressed in fold-changes relative to the chosen reference sample.

## Study populations

Genetic association analyses were conducted in the prospective Swedish birth-cohort BAMSE (Children Allergy Milieu Stockholm an Epidemiological study), which is an unselected, population-based Swedish birth cohort originally designed to assess risk factors for allergic diseases in childhood. This prospective study of 4,089 children has been described in detail elsewhere [38, 39]. At age 8, all children were invited to clinical testing and blood samples were obtained. After exclusion of samples with too little blood, incomplete questionnaire data, or lack of parental consent to genetic analysis there were 2033 samples with DNA extracted for genetic studies (of which 262 were asthmatics). All samples were analyzed coded. The study was



approved by the Regional Ethical Committee of Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. Written informed consent was obtained from the parents and/or legal guardians.

Replication studies were carried out in 1454 children from the Multicenter Asthma Genetic in Childhood (MAGIC) study (mean age 11 y) and the cross sectional International Study of Asthma and Allergies in Childhood phase II (ISAAC II) study (age 9–11 y) [50–52]. From both populations, all samples which had been part of the first GWAS on asthma [50] and for which we had imputation data available were selected for this study. After quality control (QC), 1,454 samples (763 asthmatics and 683 controls) remained for analysis. All study methods were approved by the local ethics committees and written informed consent was obtained from all parents of children included in this study. To control for population stratification, all children were of German descent. Considering that previous studies have detected only marginal genetic differences between Swedes and Germans, and that GWAS data supported that within Europe, Germans and Swedes are most closely related [53], it can be assumed that the Swedish BAMSE and the German ISAAC/MAGICS were comparable.

## Phenotype assessment

Information on the clinical outcomes was obtained from questionnaires filled out by the parents, except for atopic sensitization which was assessed from plasma samples. In BAMSE, *Asthma ever up to 8 years* was defined as a physician-diagnosed asthma between 3 mo after birth and up to 8 y of age [54]. *Atopic sensitization* was considered present if a child had levels of allergen-specific IgE >0.35 kU/L to Phadiatop, a mixture of cat, dog, horse, birch, timothy, mugwort, *Dermatophagoides pteronyssinus*, and *Cladosporium* allergens at 8 y of age (ImmunoCAP, Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Uppsala, Sweden).

In MAGIC, the assessed variables included asthma and allergy, which were diagnosed by a pediatric pulmonologist according to clinical guidelines and objective measures such as lung function tests, clinical examination, and allergy testing [51, 55]. In ISAAC II, children were classified as having asthma if parents reported a physician's diagnosis of asthma at least once, or of spastic or asthmatic bronchitis more than once in self-administered questionnaires [56, 57]. The populations of the Swedish BAMSE and the German ISAAC/MAGICS are assumed to be comparable because in both, the definition of the phenotype "asthma" was based on a physician-diagnosis and the age range of the children was comparable (8 years in BAMSE vs. 10 years in ISAAC/MAGICS) [58].

## SNP selection, genotyping and quality control

In BAMSE the *NPS* and *NPSR1* polymorphisms were genotyped by using the iPLEX chemistry on the SEQUENOM platform at the Mutation Analysis Facility (Karolinska Institutet), with the exception of rs4751440 which was genotyped by a TaqMan SNP Genotyping Assay in an ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. Primers for multiplex PCR and extension reactions were designed by the SpectroDesigner software (Sequenom GmbH, San Diego, CA, USA) and are available on request. Each assay was validated using 24 unrelated Caucasians and 3 CEPH DNA samples as well as 14 trios from the CEU population. Success rate for genotyping was 98.8%. In the MAGIC/ISAAC study, *NPS* and *NPSR1* SNPs were genotyped by the Illumina Sentrix Human-Hap300 BeadChip as previously described [50]. The *NPS* gene spans a region of 3.3 kb on chromosome 10q26.2 whereas the *NPSR1* gene spans over ~220 kb of genomic DNA on chromosome 7p14. The SNPs included in this study were selected based on their effects on protein function (e.g. variants encoding for *NPS*-Val(6)Leu and *NPSR1*-Asn(107)Ile); previous reports of association with asthma in children from BAMSE [6, 17] and other populations [5–12]; and

by their functional [27] and tagging properties [17, 19, 28]. We analyzed 3 *NPS* SNPs (rs1931704, rs10830123 and rs4751440 Val(6)Leu), 29 *NPSR1* SNPs in the BAMSE cohort [17, 19], and 23 *NPSR1* SNPs in MAGIC/ISAAC [50]. The discrepancy in the number of *NPSR1* SNPs was due to the fact that some SNPs genotyped in BAMSE were not present in the array. Genotype frequencies for all SNPs agreed with the expectations under Hardy-Weinberg equilibrium.

## Genetic association tests

Genetic association tests were conducted using Plink (version 1.07, <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>) using the commands—`assoc` and—`model`. The comparison of allele frequencies between cases and controls were done by  $\chi^2$  and Fisher's exact test. Full model associations were evaluated using the Cochran-Armitage trend test, and genotypic, dominant and recessive models. The genotypic and dominant/recessive tests were only conducted if there was a minimum number of five observations per cell either in the 2-by-3 or 2-by-2 tables. Since we tested 32 individual SNPs it was expected at least 1.6 SNPs to be significant ( $p < 0.05$ ) due to chance. Epistasis was evaluated using the—`epistasis` command in PLINK. All pairwise SNP combinations were tested in the case-control datasets. Allelic by allelic epistasis between *NPS* and *NPSR1* SNPs were calculated by logistic regression. The allele dosage of each SNP (A and B) was modeled in the form of  $Y \sim \beta_0 + \beta_1.A + \beta_2.B + \beta_3.AB + e$  and the test for interaction based on the coefficient  $\beta_3$ . In the equation,  $Y$  represents the presence of asthma as a function of the intercept ( $\beta_0$ ) and the coefficients of the different alleles, and  $e$  the residual error.

## Supporting information

**S1 Table. Genetic association of *NPS* polymorphisms with asthma at age 8 years in the BAMSE cohort.**

(DOCX)

**S2 Table. Genetic association of *NPSR1* polymorphisms with asthma at age 8 years in the BAMSE cohort.**

(XLSX)

**S3 Table. Interactions between *NPS* and *NPSR1* on the risk of asthma under the multiplicative model.**

(DOCX)

**S4 Table. Predicted changes in transcription factor binding sites encoded by the SNPs implicated in the epistasis between *NPS* and *NPSR1* as determined by the Genomatix Software Suite.**

(XLS)

**S5 Table. Primers used for qPCR analysis in the human cell lines and mice experiments.**

(DOCX)

## Acknowledgments

The authors thank all the children and their parents who participated in the BAMSE study. Christina Orsmark-Pietras, Francesca Anedda, Juri Olkkonen, Tinja Kanerva, Auli Saarinen, and the Mutation Analysis core Facility (MAF) at Karolinska Institutet are acknowledged for their help and skillful laboratory work. We thank Annika Scheynius and Göran Pershagen for support and discussions.

## Author Contributions

**Conceptualization:** NA VP JK.

**Data curation:** NA SKM VG CS EM MK VP.

**Formal analysis:** NA SKM VG CS EM VP.

**Funding acquisition:** MK JK VP.

**Investigation:** NA SE CS EM VP.

**Methodology:** NA JK VP.

**Project administration:** VP.

**Resources:** NA SE SKM CS MDA EM MK JK VP.

**Software:** SKM VG.

**Supervision:** JK VP.

**Validation:** MK JK VP.

**Visualization:** NA JK VP.

**Writing – original draft:** NA VP.

**Writing – review & editing:** NA SE SKM VG CS MDA EM MK JK VP.

## References

1. Xu YL, Reinscheid RK, Huitron-Resendiz S, Clark SD, Wang Z, Lin SH, et al. Neuropeptide S: a neuropeptide promoting arousal and anxiolytic-like effects. *Neuron*. 2004 Aug 19; 43(4):487–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.005> PMID: 15312648
2. Okamura N, Reinscheid RK. Neuropeptide S: a novel modulator of stress and arousal. *Stress*. 2007 Aug; 10(3):221–6. <https://doi.org/10.1080/10253890701248673> PMID: 17613937
3. Guerrini R, Salvadori S, Rizzi A, Regoli D, Calo G. Neurobiology, pharmacology, and medicinal chemistry of neuropeptide S and its receptor. *Medicinal research reviews*. 2010 Sep; 30(5):751–77. <https://doi.org/10.1002/med.20180> PMID: 19824051
4. Pape HC, Jungling K, Seidenbecher T, Lesting J, Reinscheid RK. Neuropeptide S: a transmitter system in the brain regulating fear and anxiety. *Neuropharmacology*. 2010 Jan; 58(1):29–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.06.001> PMID: 19523478
5. Laitinen T, Polvi A, Rydman P, Vendelin J, Pulkkinen V, Salmikangas P, et al. Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science*. 2004 Apr 9; 304(5668):300–4. <https://doi.org/10.1126/science.1090010> PMID: 15073379
6. Melen E, Bruce S, Doekes G, Kabesch M, Laitinen T, Lauener R, et al. Haplotypes of G protein-coupled receptor 154 are associated with childhood allergy and asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005 May 15; 171(10):1089–95. <https://doi.org/10.1164/rccm.200410-1317OC> PMID: 15710598
7. Kormann MS, Carr D, Klopp N, Illig T, Leupold W, Fritzscher C, et al. G-Protein-coupled receptor polymorphisms are associated with asthma in a large German population. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005 Jun 15; 171(12):1358–62. <https://doi.org/10.1164/rccm.200410-1312OC> PMID: 15764725
8. Feng Y, Hong X, Wang L, Jiang S, Chen C, Wang B, et al. G protein-coupled receptor 154 gene polymorphism is associated with airway hyperresponsiveness to methacholine in a Chinese population. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006 Mar; 117(3):612–7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.11.045> PMID: 16522461
9. Malerba G, Lindgren CM, Xumerle L, Kiviluoma P, Trabetti E, Laitinen T, et al. Chromosome 7p linkage and GPR154 gene association in Italian families with allergic asthma. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2007 Jan; 37(1):83–9.

10. Hersh CP, Raby BA, Soto-Quiros ME, Murphy AJ, Avila L, Lasky-Su J, et al. Comprehensive testing of positionally cloned asthma genes in two populations. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007 Nov 1; 176(9):849–57. <https://doi.org/10.1164/rccm.200704-592OC> PMID: 17702965
11. Vergara C, Jimenez S, Acevedo N, Martinez B, Mercado D, Gusmao L, et al. Association of G-protein-coupled receptor 154 with asthma and total IgE in a population of the Caribbean coast of Colombia. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009 Oct; 39(10):1558–68.
12. Castro-Giner F, de Cid R, Gonzalez JR, Jarvis D, Heinrich J, Janson C, et al. Positionally cloned genes and age-specific effects in asthma and atopy: an international population-based cohort study (ECRHS). *Thorax*. 2010 Feb; 65(2):124–31. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.119628> PMID: 19996348
13. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, et al. A large-scale, consortium-based genome-wide association study of asthma. *The New England journal of medicine*. 2010 Sep 23; 363(13):1211–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0906312> PMID: 20860503
14. D'Amato M, Bruce S, Bresso F, Zucchelli M, Ezer S, Pulkkinen V, et al. Neuropeptide s receptor 1 gene polymorphism is associated with susceptibility to inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007 Sep; 133(3):808–17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.06.012> PMID: 17854592
15. D'Amato M, Zucchelli M, Seddighzadeh M, Anedda F, Lindblad S, Kere J, et al. Analysis of neuropeptide S receptor gene (NPSR1) polymorphism in rheumatoid arthritis. *PloS one*. 2010; 5(2):e9315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009315> PMID: 20179762
16. Robledo G, Gonzalez-Gay MA, Fernandez-Gutierrez B, Lamas JR, Balsa A, Pascual-Salcedo D, et al. NPSR1 gene is associated with reduced risk of rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2012 Jun; 39(6):1166–70. <https://doi.org/10.3899/jrheum.111205> PMID: 22548958
17. Acevedo N, Saaf A, Soderhall C, Melen E, Mandelin J, Pietras CO, et al. Interaction between retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha (RORA) and neuropeptide S receptor 1 (NPSR1) in asthma. *PloS one*. 2013; 8(4):e60111. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060111> PMID: 23565190
18. Okamura N, Hashimoto K, Iyo M, Shimizu E, Dempfle A, Friedel S, et al. Gender-specific association of a functional coding polymorphism in the Neuropeptide S receptor gene with panic disorder but not with schizophrenia or attention-deficit/hyperactivity disorder. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2007 Oct 1; 31(7):1444–8.
19. Donner J, Haapakoski R, Ezer S, Melen E, Pirkola S, Gratacos M, et al. Assessment of the neuropeptide S system in anxiety disorders. *Biological psychiatry*. 2010 Sep 1; 68(5):474–83. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.039> PMID: 20705147
20. Domschke K, Reif A, Weber H, Richter J, Hohoff C, Ohrmann P, et al. Neuropeptide S receptor gene—converging evidence for a role in panic disorder. *Molecular psychiatry*. 2011 Sep; 16(9):938–48. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.81> PMID: 20603625
21. Kumsta R, Chen FS, Pape HC, Heinrichs M. Neuropeptide S receptor gene is associated with cortisol responses to social stress in humans. *Biological psychology*. 2013 May; 93(2):304–7. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2013.02.018> PMID: 23466585
22. Jungling K, Seidenbecher T, Sosulina L, Lesting J, Sangha S, Clark SD, et al. Neuropeptide S-mediated control of fear expression and extinction: role of intercalated GABAergic neurons in the amygdala. *Neuron*. 2008 Jul 31; 59(2):298–310. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.002> PMID: 18667157
23. Raczka KA, Gartmann N, Mechias ML, Reif A, Buchel C, Deckert J, et al. A neuropeptide S receptor variant associated with overinterpretation of fear reactions: a potential neurogenetic basis for catastrophizing. *Molecular psychiatry*. 2010 Nov; 15(11):1045, 67–74. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.79> PMID: 20628342
24. Gottlieb DJ, O'Connor GT, Wilk JB. Genome-wide association of sleep and circadian phenotypes. *BMC medical genetics*. 2007; 8 Suppl 1:S9.
25. Spada J, Sander C, Burkhardt R, Hantzsch M, Mergl R, Scholz M, et al. Genetic association of objective sleep phenotypes with a functional polymorphism in the neuropeptide S receptor gene. *PloS one*. 2014; 9(6):e98789. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098789> PMID: 24896296
26. Reinscheid RK, Xu YL, Okamura N, Zeng J, Chung S, Pai R, et al. Pharmacological characterization of human and murine neuropeptide s receptor variants. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2005 Dec; 315(3):1338–45. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.093427> PMID: 16144971
27. Anedda F, Zucchelli M, Schepis D, Hellquist A, Corrado L, D'Alfonso S, et al. Multiple polymorphisms affect expression and function of the neuropeptide S receptor (NPSR1). *PloS one*. 2011; 6(12):e29523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029523> PMID: 22216302
28. Henstrom M, Zucchelli M, Soderhall C, Bergstrom A, Kere J, Melen E, et al. NPSR1 polymorphisms influence recurrent abdominal pain in children: a population-based study. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2014 Oct; 26(10):1417–25.

29. Deng C, He X, Hsueh AJ. A single-nucleotide polymorphism of human neuropeptide s gene originated from Europe shows decreased bioactivity. *PLoS one*. 2013; 8(12):e83009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083009> PMID: 24386135
30. Erdmann F, Kugler S, Blaesse P, Lange MD, Skryabin BV, Pape HC, et al. Neuronal expression of the human neuropeptide S receptor NPSR1 identifies NPS-induced calcium signaling pathways. *PLoS one*. 2015; 10(2):e0117319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117319> PMID: 25714705
31. Liao Y, Lu B, Ma Q, Wu G, Lai X, Zang J, et al. Human Neuropeptide S Receptor Is Activated via a Gα<sub>q</sub> Protein-biased Signaling Cascade by a Human Neuropeptide S Analog Lacking the C-terminal 10 Residues. *The Journal of biological chemistry*. 2016 Apr 01; 291(14):7505–16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.704122> PMID: 26865629
32. Vendelin J, Bruce S, Holopainen P, Pulkkinen V, Ryttilä P, Pirskanen A, et al. Downstream target genes of the neuropeptide S-NPSR1 pathway. *Human molecular genetics*. 2006 Oct 1; 15(19):2923–35. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl234> PMID: 16926187
33. Pietras CO, Vendelin J, Anedda F, Bruce S, Adner M, Sundman L, et al. The asthma candidate gene NPSR1 mediates isoform specific downstream signalling. *BMC pulmonary medicine*. 2011; 11:39. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-11-39> PMID: 21707994
34. Talbot S, Abdulnour RE, Burkett PR, Lee S, Cronin SJ, Pascal MA, et al. Silencing Nociceptor Neurons Reduces Allergic Airway Inflammation. *Neuron*. 2015 Jul 15; 87(2):341–54. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.007> PMID: 26119026
35. Sundman L, Saarialho-Kere U, Vendelin J, Lindfors K, Assadi G, Kaukinen K, et al. Neuropeptide S receptor 1 expression in the intestine and skin—putative role in peptide hormone secretion. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2010 Jan; 22(1):79–87, e30.
36. Pulkkinen V, Ezer S, Sundman L, Hagstrom J, Remes S, Soderhall C, et al. Neuropeptide S receptor 1 (NPSR1) activates cancer-related pathways and is widely expressed in neuroendocrine tumors. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*. 2014 Aug; 465(2):173–83.
37. Hamsten C, Haggmark A, Grundstrom J, Mikus M, Lindskog C, Konradsen JR, et al. Protein profiles of CCL5, HPGDS and NPSR1 in plasma reveal association to childhood asthma. *Allergy*. 2016 May 3.
38. Wickman M, Kull I, Pershagen G, Nordvall SL. The BAMSE project: presentation of a prospective longitudinal birth cohort study. *Pediatric allergy and immunology: official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2002; 13 Suppl 15:11–3.
39. Kull I, Melen E, Alm J, Hallberg J, Svartengren M, van Hage M, et al. Breast-feeding in relation to asthma, lung function, and sensitization in young schoolchildren. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010 May; 125(5):1013–9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.01.051> PMID: 20392479
40. Hanna RN, Carlin LM, Hubbeling HG, Nackiewicz D, Green AM, Punt JA, et al. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C<sup>+</sup> monocytes. *Nature immunology*. 2011 Aug; 12(8):778–85. <https://doi.org/10.1038/ni.2063> PMID: 21725321
41. Hanna RN, Shaked I, Hubbeling HG, Punt JA, Wu R, Herrley E, et al. NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circulation research*. 2012 Feb 3; 110(3):416–27. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.253377> PMID: 22194622
42. Murphy EP, Crean D. Molecular Interactions between NR4A Orphan Nuclear Receptors and NF-κB Are Required for Appropriate Inflammatory Responses and Immune Cell Homeostasis. *Biomolecules*. 2015; 5(3):1302–18. <https://doi.org/10.3390/biom5031302> PMID: 26131976
43. Shaked I, Hanna RN, Shaked H, Chodaczek G, Nowyhed HN, Tweet G, et al. Transcription factor Nr4a1 couples sympathetic and inflammatory cues in CNS-recruited macrophages to limit neuroinflammation. *Nature immunology*. 2015 Dec; 16(12):1228–34. <https://doi.org/10.1038/ni.3321> PMID: 26523867
44. Yao Y, Su J, Zhang F, Lei Z. Effects of central and peripheral administration of neuropeptide s on the level of serum proinflammatory cytokines in pigs. *Neuroimmunomodulation*. 2014; 21(1):45–51. <https://doi.org/10.1159/000355977> PMID: 24216974
45. Yao Y, Su J, Yang G, Zhang G, Lei Z, Zhang F, et al. Effects of neuropeptide S on the proliferation of splenic lymphocytes, phagocytosis, and proinflammatory cytokine production of pulmonary alveolar macrophages in the pig. *Peptides*. 2011 Jan; 32(1):118–24. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.09.021> PMID: 20933561
46. Pulkkinen V, Majuri ML, Wang G, Holopainen P, Obase Y, Vendelin J, et al. Neuropeptide S and G protein-coupled receptor 154 modulate macrophage immune responses. *Human molecular genetics*. 2006 May 15; 15(10):1667–79. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl090> PMID: 16600990
47. Filafarro M, Novi C, Ruggieri V, Genedani S, Alboni S, Malagoli D, et al. Neuropeptide S stimulates human monocyte chemotaxis via NPS receptor activation. *Peptides*. 2013 Jan; 39:16–20. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.10.013> PMID: 23142110

48. Ilmarinen P, James A, Moilanen E, Pulkkinen V, Daham K, Saarelainen S, et al. Enhanced expression of neuropeptide S (NPS) receptor in eosinophils from severe asthmatics and subjects with total IgE above 100IU/ml. *Peptides*. 2014 Jan; 51:100–9. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.10.030> PMID: 24239856
49. Murk W, Bracken MB, DeWan AT. Confronting the missing epistasis problem: on the reproducibility of gene-gene interactions. *Human genetics*. 2015 Aug; 134(8):837–49. <https://doi.org/10.1007/s00439-015-1564-3> PMID: 25998948
50. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*. 2007 Jul 26; 448(7152):470–3. <https://doi.org/10.1038/nature06014> PMID: 17611496
51. Potaczek DP, Michel S, Sharma V, Zeilinger S, Vogelberg C, von Berg A, et al. Different FCER1A polymorphisms influence IgE levels in asthmatics and non-asthmatics. *Pediatric allergy and immunology: official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2013 Aug; 24(5):441–9.
52. Schieck M, Michel S, Suttner K, Illig T, Zeilinger S, Franke A, et al. Genetic variation in TH17 pathway genes, childhood asthma, and total serum IgE levels. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014 Mar; 133(3):888–91. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.08.048> PMID: 24184148
53. Heath SC, Gut IG, Brennan P, McKay JD, Bencko V, Fabianova E, et al. Investigation of the fine structure of European populations with applications to disease association studies. *European journal of human genetics: EJHG*. 2008 Dec; 16(12):1413–29. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.210> PMID: 19020537
54. Melen E, Granell R, Kogevinas M, Strachan D, Gonzalez JR, Wjst M, et al. Genome-wide association study of body mass index in 23 000 individuals with and without asthma. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2013 Apr; 43(4):463–74.
55. Michel S, Liang L, Depner M, Klopp N, Ruether A, Kumar A, et al. Unifying candidate gene and GWAS Approaches in Asthma. *PLoS one*. 2010; 5(11):e13894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013894> PMID: 21103062
56. Weiland SK, von Mutius E, Hirsch T, Duhme H, Fritzschn C, Werner B, et al. Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. *The European respiratory journal*. 1999 Oct; 14(4):862–70. PMID: 10573234
57. von Mutius E, Weiland SK, Fritzschn C, Duhme H, Keil U. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet*. 1998 Mar 21; 351(9106):862–6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)10100-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)10100-3) PMID: 9525363
58. Depner M, Fuchs O, Genuneit J, Karvonen AM, Hyvarinen A, Kaulek V, et al. Clinical and epidemiologic phenotypes of childhood asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014 Jan 15; 189(2):129–38. <https://doi.org/10.1164/rccm.201307-1198OC> PMID: 24283801



## 7.2 Publikation 2

### ORIGINAL ARTICLE



# Nocturnal asthma is affected by genetic interactions between RORA and NPSR1

Vincent D. Gaertner<sup>1</sup> | Sven Michel PhD<sup>1</sup> | John A. Curtin PhD<sup>2</sup> | Ville Pulkkinen PhD<sup>3</sup> | Nathalie Acevedo PhD<sup>4,5</sup> | Cilla Söderhäll PhD<sup>6,7</sup> | Andrea von Berg MD<sup>8</sup> | Albrecht Bufe MD<sup>9</sup> | Otto Laub MD<sup>10</sup> | Ernst Rietschel MD<sup>11</sup> | Andrea Heinzmann MD<sup>12</sup> | Burkhard Simma MD<sup>13</sup> | Christian Vogelberg MD<sup>14</sup> | Göran Pershagen PhD<sup>15</sup> | Erik Melén PhD<sup>15,16</sup> | Angela Simpson PhD<sup>2</sup> | Adnan Custovic PhD<sup>17</sup> | Juha Kere PhD<sup>6,18</sup> | Michael Kabesch MD<sup>1,19</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatric Pneumology and Allergy, University Children's Hospital Regensburg (KUNO), Regensburg, Germany

<sup>2</sup>Division of Infection Immunity and Respiratory Medicine, School of Biological Sciences, The University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, and Manchester University NHS Foundation Trust, Manchester, UK

<sup>3</sup>Heart and Lung Center, Division of Pulmonary Medicine, University of Helsinki and Helsinki University Central Hospital, Helsinki, Finland

<sup>4</sup>Department of Clinical Science and Education, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

<sup>5</sup>Institute for Immunological Research, University of Cartagena, Cartagena, Colombia

<sup>6</sup>Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden

<sup>7</sup>Department of Women's and Children's Health, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

<sup>8</sup>Children's Department, Research Institute for the Prevention of Allergic Diseases, Marien-Hospital, Wesel, Germany

<sup>9</sup>Department of Experimental Pneumology, Ruhr-University, Bochum, Germany

<sup>10</sup>Kinder- und Jugendarztpraxis Laub, Rosenheim, Germany

<sup>11</sup>Faculty of Medicine, University Children's Hospital, University of Cologne, Cologne, Germany

<sup>12</sup>Center for Pediatrics, Department of General Pediatrics, Adolescent Medicine and Neonatology, Faculty of Medicine, Medical Center - University of Freiburg, University of Freiburg, Freiburg im Breisgau, Germany

<sup>13</sup>Children's Department, University Teaching Hospital, Landeskrankenhaus Feldkirch, Feldkirch, Austria

<sup>14</sup>University Children's Hospital, Technical University Dresden, Dresden, Germany

<sup>15</sup>Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet and Centre for Occupational and Environmental Medicine, Stockholm County Council, Stockholm, Sweden

<sup>16</sup>Sachs' Children and Youth Hospital, Södersjukhuset, Stockholm, Sweden

<sup>17</sup>Department of Paediatrics, Imperial College, London, UK

<sup>18</sup>Research Programs Unit, Program for Molecular Neurology, University of Helsinki, Folkhälsan Institute of Genetics, Helsinki, Finland

<sup>19</sup>School of Basic & Medical Biosciences, King's College London, London, England

#### Correspondence

Michael Kabesch, Steinmetzstr. 1-3,  
93047 Regensburg, Germany.

Email: michael.kabesch@ukr.de (MK)

#### Abstract

**Background:** *Neuropeptide S Receptor 1 (NPSR1)* and *Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor Alpha (RORA)* interact biologically, are both known candidate genes

**Abbreviations:** BAMSE, Children Allergy Milieu Stockholm and Epidemiological study; CI, Confidence Interval; DPY19L1, DPY19-like C-mannosyltransferase 1; GATA3, GATA binding protein 3; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium; IL4, Interleukin 4 gene; IL5, Interleukin 5 gene; IL13, Interleukin 13 gene; ISAAC II, International Study of Asthma and Allergies in Childhood phase II; LD, Linkage disequilibrium; MAGIC, Multicenter Asthma Genetic in Childhood; NPS, Neuropeptide S; NPSR1, Neuropeptide S Receptor 1 gene; OR, Odds ratio; P300, Histone acetyltransferase p300; QC, Quality control; RORA, Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor Alpha gene; Rs, Reference SNP cluster code (dbSNP); SNP, Single-nucleotide polymorphism; STAT3, Signal transducer and activator of transcription 3.

## Q4Q5 Funding information

Distinguished Professor Award at Karolinska Institutet; Sigrid Jusélius Foundation; Swedish Heart-Lung Foundation; Asthma UK Grants, Grant/Award Numbers: 01/012, 362, 301, 04/014; BMA James Trust; JP Moulton Charitable Foundation; North west Lung Centre Charity; German Lung Research Center (DZL); Medical Research Council, Grant/Award Numbers: MR/L012693/1, G0601361, MR/K002449/1; Swedish Research Council

for asthma, and are involved in controlling circadian rhythm. Thus, we assessed (1) whether interactions between *RORA* and *NPSR1* specifically affect the nocturnal asthma phenotype and (2) how this may differ from other asthma phenotypes.

**Methods:** Interaction effects between 24 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in *RORA* and 35 SNPs in *NPSR1* on asthma and nocturnal asthma symptoms were determined in 1432 subjects (763 asthmatics [192 with nocturnal asthma symptoms]; 669 controls) from the Multicenter Asthma Genetic in Childhood/International Study of Asthma and Allergies in Childhood studies. The results were validated and extended in children from Manchester Asthma and Allergy Study (N = 723) and the Children Allergy Milieu Stockholm and Epidemiological cohort (N = 1646).

**Results:** *RORA*\**NPSR1* interactions seemed to affect both asthma and nocturnal asthma. In stratified analyses, however, interactions mainly affected nocturnal asthma and less so asthma without nocturnal symptoms or asthma severity. Results were replicated in two independent cohorts and seemed to remain constant over time throughout youth.

**Conclusion:** *RORA*\**NPSR1* interactions appear to be involved in mechanisms specific for nocturnal asthma. In contrast to previous studies focusing on the role of beta 2 receptor polymorphisms in nocturnal asthma as a feature of asthma control or severity in general, our data suggest that changes in circadian rhythm control are associated with nighttime asthma symptoms.

## KEYWORDS

childhood asthma, circadian rhythm, genetic epistasis, nighttime asthma

## 1 | INTRODUCTION

Nocturnal asthma is defined as the nighttime occurrence of asthmatic symptoms such as wheezing, coughing, or chest tightness.<sup>1,2</sup> Between 30% and 75% of patients with asthma experience these symptoms.<sup>3-5</sup> It is known that the circadian rhythm controls airway inflammation, vagal activity, and epinephrine release,<sup>6</sup> thus potentially aggravating asthma symptoms during the night.<sup>6,7</sup> Nocturnal asthma may either be a feature related to asthma severity or, alternatively, it may be a subphenotype of the disease, associated with the presence of specific and unique molecular patterns.<sup>8</sup> This goes along with the current understanding that asthma is not a homogeneous and uniform disease but rather a syndrome to which different mechanisms may contribute in the individual and specific group of patients.

Interestingly, two candidate genes for asthma, *Neuropeptide S Receptor 1* (*NPSR1*; chromosome 7p14.3) and *Retinoid Acid Receptor-Related Orphan Receptor Alpha* (*RORA*; chromosome 15q22.2), have recently been suggested to play a role in controlling circadian rhythm.<sup>9-11</sup> *NPSR1*, a G protein-coupled receptor, has been associated with asthma susceptibility in numerous studies,<sup>12-14</sup> while also having been related to the circadian rhythm in mice and humans.<sup>9,15</sup> *RORA*, a nuclear hormone receptor, was associated with asthma<sup>16,17</sup> and its mRNA expression varies during human lung development and during murine lung inflammation.<sup>11,18-20</sup> Also, *RORA* is known to

influence the circadian rhythm of various physiological processes.<sup>11,18-22</sup> Finally, it was recently suggested that *RORA* and *NPSR1* interact biologically by influencing promoter activity and each others' gene expression, thereby modifying asthma risk concomitantly.<sup>23</sup>

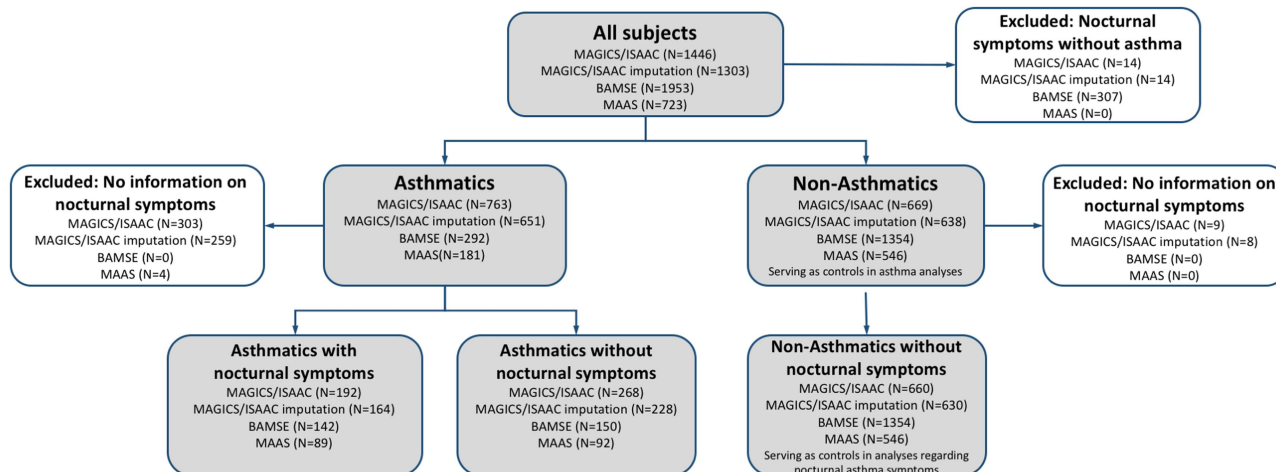
We hypothesized that through their effects on circadian rhythm and asthma, *RORA* and *NPSR1* would specifically influence nocturnal asthma. Thus, the aims of this study were (1) to investigate whether gene-gene interactions between *RORA* and *NPSR1* specifically affect the occurrence of nocturnal asthma and (2) to differentiate these effects from asthma without nocturnal symptoms or severe asthma.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Study populations

As a discovery population in a case reference design we investigated participants from the Multicenter Asthma Genetic in Childhood study (MAGICS) and the cross-sectional International Study of Asthma and Allergies in Childhood phase II (ISAAC II) as previously described in the first genome-wide association study on asthma (N = 1454).<sup>24</sup> Replication was carried out in two population-based birth cohorts: BAMSE (Children Allergy Milieu Stockholm and Epidemiology study; N = 2033) from Sweden and MAAS (Manchester Asthma and Allergy Study; N = 1085) from the UK. Study populations





**FIGURE 1** Schematic depiction of the cohorts and patients involved. Excluded patients and the reason for exclusion from analyses are written on white background. Gray background indicates included patients. All nonasthmatics served as controls when evaluating the effect of the two genes on asthma and only nonasthmatics without nocturnal symptoms served as controls when the nocturnal phenotypes were the outcome. Thus, patients without information on their nocturnal asthma status were excluded for stratified analyses on the impact of nocturnal symptoms. BAMSE, Children Allergy Milieu Stockholm and Epidemiological study; ISAAC, International Study of Asthma and Allergies in Childhood; MAAS, Manchester Asthma and Allergy Study; MAGICS, Multicenter Asthma Genetic in Childhood Study

have been described elsewhere.<sup>24–27</sup> The studies were approved by the respective ethics committees. Written informed consent was obtained from all parents.

## 2.2 | Phenotypes

In MAGICS, asthma was diagnosed by a pediatric pulmonologist based on clinical presentation and objective measures, including lung function and allergy tests. In ISAAC II and BAMSE, a parentally reported physician's diagnosis had to be present, while in MAAS, children with at least two of three features [(1) Wheezing or whistling in the chest in the last 12 months; (2) Current use of asthma medication; (3) Physician-diagnosed asthma ever] were compared with children with 0 of three features.

Nocturnal asthma was defined as asthma plus parentally reported wheezing or gasping during the night at least once over the previous 12 months in MAGICS/ISAAC and MAAS. In BAMSE, asthma plus any coughing or breathing difficulties throughout the night sufficed. Because of this slight disparity, phenotypes were denominated differently: *nocturnal asthma symptoms* (MAGICS/ISAAC and MAAS) and *nocturnal breathing difficulties* (BAMSE). In MAAS, phenotypes were also assessed at 16 years. Figure 1 displays the number of patients in each group. Subjects with neither asthma nor nocturnal symptoms served as controls in all cohorts.

Asthma severity is not unanimously defined, and it was thus assessed differently in all cohorts: in MAGICS/ISAAC, the number of hospital, emergency department, or doctor visits due to asthmatic symptoms was counted; in MAAS, the number of exacerbations over 12 months were counted; and in BAMSE, nighttime wheezing, the use of asthma medication, and activity limitation were assessed. Asthma severity was assessed as a continuous variable within the asthmatic cases only.

## 2.3 | Functional database scan

Functional databases (HaploReg, SNPinfo, SNIIPA, ENCODE, Roadmap Epigenomics Project, GRASP database) were systematically screened for functional relevance of associated SNPs. Sequence conservation analyses were based on SiPhy and GERP elements. Regulatory protein binding was obtained from the ENCODE ChIP-Seq data, epigenomic data from the Roadmap Epigenomics project, and eQTL from GTEx and the GRASP database.

For study design, SNP selection, and genotyping details, refer to the Supporting Information Materials.

## 2.4 | Statistical analysis

Associations of binary traits were evaluated by logistic regression, interactions were assessed using the  $-epistasis$  command, and deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was analyzed by the chi-square test in the control group, all using PLINK 1.0.7.<sup>28</sup> All further analyses were performed with the R software (3.0.1; <http://www.r-project.org/>). All markers were in HWE ( $P > 0.0001$ ). Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) are reported for dichotomous variables and beta-values and standard errors (SE) for continuous variables. We present OR and beta-values instead of providing figures for every single interaction for a better readability and clarity of the text. Linkage disequilibrium (LD) plots were generated with Haploview.<sup>29</sup>

Testing a specific hypothesis,  $P$  values less than 0.05 were considered statistically significant for the replication analyses. To account for multiple testing in de novo interaction analyses and to minimize the risk of reporting false-positive results, we discuss only polymorphisms for which the number of significant interactions exceeded stochastic expectation, as suggested previously.<sup>30</sup> More precisely, polymorphisms had to display at least three significant

interactions with SNPs from the respective other gene (24 SNPs\*0.05 = 1.2 and 35 SNPs\*0.05 = 1.75 ≈ 2 expected false-positive results per SNP).

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Interactions between *RORA* and *NPSR1* SNPs affect the risk for asthma

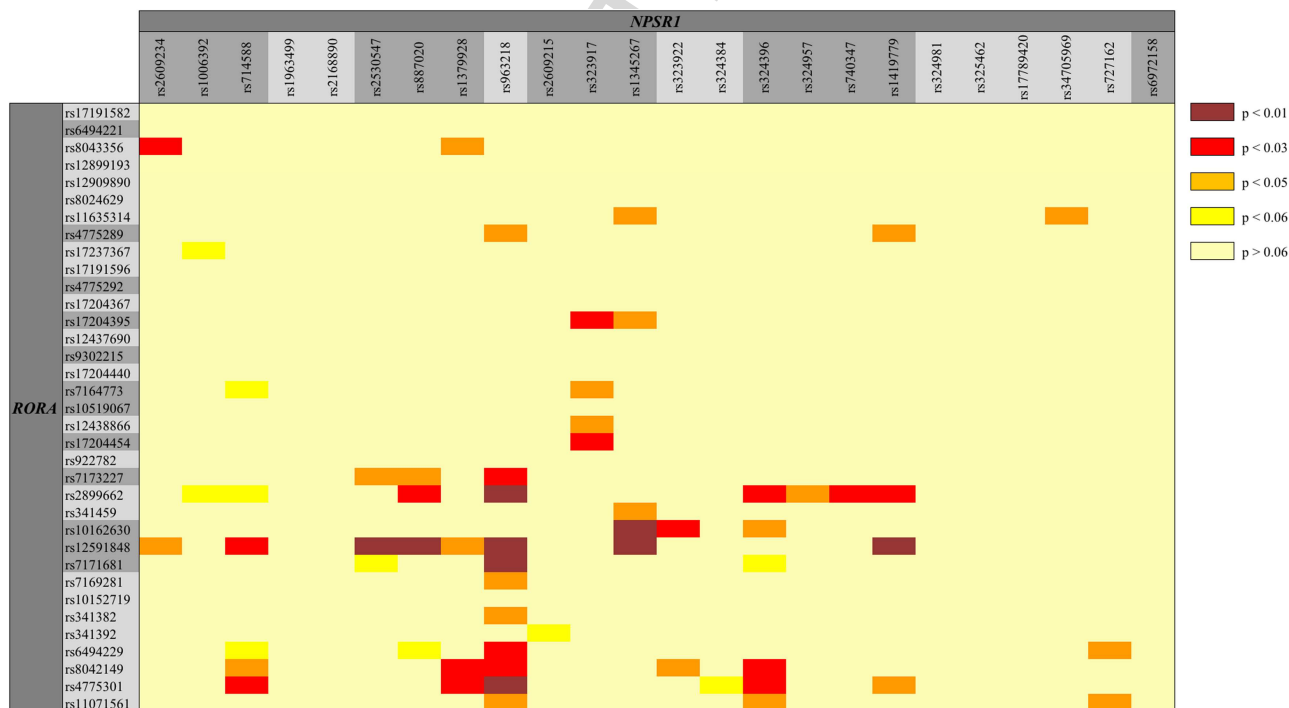
First, we investigated systematically if gene-gene interactions between *RORA* and *NPSR1* affect asthma in our MAGIC/ISAAC population. For that we enriched the two gene loci with all SNPs previously associated with asthma, confirming and expanding a previous report by Acevedo, where a smaller number of SNPs were studied in the BAMSE and PARSIFAL cohorts.<sup>23</sup> Indeed, seven SNPs within *RORA* and eight *NPSR1*-SNPs were found to significantly contribute to interactions associated with asthma in MAGIC/ISAAC (Figure 2 and Table S2). *RORA* rs12591848 interacted with eight SNPs in *NPSR1* (most strongly with rs1419779; OR [CI] = 0.45 [0.30-0.68];  $P = 1.51 \times 10^{-4}$ ) and *NPSR1* rs963218 interacted with nine SNPs in *RORA* (most strongly with rs12591848; OR [CI] = 0.51 [0.35-0.74];  $P = 4.60 \times 10^{-4}$ ). Of these newly found interactions, we could replicate five interactions in our additional cohorts (including BAMSE where they were not originally reported) and six of the newly found interactions showed a trend toward significance in the replication cohorts.

Especially, the combination of rs2899662 and rs887020 affected asthma constantly across populations (Table 1 and Table S3). Of note, only two combinations of SNPs in each gene were linked with an  $r^2 > 0.80$  (see Figures S3 and S4).

#### 3.2 | Interactions between *RORA* and *NPSR1* SNPs affect nocturnal asthma symptoms specifically

We then assessed epistasis effects on nocturnal asthma in our discovery population. Overall, 12 *RORA*-SNPs showed at least three significant interactions with SNPs in *NPSR1* in relation to nocturnal asthma. Six of these SNPs were only associated with nocturnal asthma, and not with asthma per se. Within *NPSR1*, 12 SNPs showed at least three significant interactions with *RORA* when nocturnal asthma symptoms were the outcome. Seven of these SNPs seemed to represent genuine associations with nocturnal asthma, as they did not interact with *RORA*-SNPs to affect asthma per se. The strongest overall signals were noted for rs6972158 in *NPSR1* and rs7171681 in *RORA*, which each interacted significantly with at least 10 SNPs from the respective other gene. The strongest single interaction affecting nocturnal asthma symptoms was found for *NPSR1* rs324396 and *RORA* rs7171681 (OR [CI] = 0.45 [0.28-0.73];  $P = 0.0013$ ) (see Figure 3 and Table S5). Taken together, we concluded that indeed numerous gene by gene interactions between *RORA* and *NPSR1* exist and that these may affect nocturnal asthma.

COLOR FIG



**FIGURE 2** Heat map of the interaction results of *RORA*\**NPSR1* on asthma in MAGIC/ISAAC. Color explanation to the right. Darker colors indicate stronger associations. SNPs obtained from the regular GWAS dataset are highlighted in dark gray, and imputed SNPs are highlighted in light gray. GWAS, genome-wide association study; ISAAC, International Study of Asthma and Allergies in Childhood; MAGIC, Multicenter Asthma Genetic in Childhood Study; *NPSR1*, Neuropeptide S Receptor 1; *RORA*, Retinoid Acid Receptor-Related Orphan Receptor Alpha; SNPs, single-nucleotide polymorphisms

**TABLE 1** Significant interaction results (*RORA* \* *NPSR1*) on asthma in all cohorts

Interaction on asthma <sup>a</sup>	MAGICS/ISAAC	MAAS	BAMSE
rs2899662 * rs887020	1.34 (1.06-1.7) <b>0.015</b>	1.46 (1.02-2.09) <b>0.0407</b>	1.41 (1.06-1.87) <b>0.018</b>
rs2899662 * rs963218	1.39 (1.1-1.75) <b>0.006</b>	1.29 (0.9-1.83) 0.162	1.33 (1.01-1.75) <b>0.045</b>
rs2899662 * rs324396	0.72 (0.55-0.93) <b>0.0135</b>	0.61 (0.41-0.92) <b>0.0166</b>	0.82 (0.61-1.1) 0.1836
rs8042149 * rs714588	1.27 (1.01-1.59) <b>0.041</b>	1.02 (0.72-1.45) 0.9143	1.58 (1.2-2.09) <b>0.0012</b>
rs4775301 * rs714588	1.29 (1.03-1.61) <b>0.025</b>	1.14 (0.8-1.63) 0.4583	1.39 (1.05-1.84) <b>0.020</b>
rs4775301 * rs324396	0.73 (0.57-0.93) <b>0.0116</b>	0.7 (0.48-1.02) 0.0605	0.9 (0.67-1.2) 0.4701
rs12591848 <sup>b</sup> * rs2530547 <sup>c</sup>	0.54 (0.36-0.8) <b>0.0025</b>	0.81 (0.42-1.55) 0.5228	0.71 (0.48-1.06) 0.092
rs12591848 <sup>b</sup> * rs963218	0.51 (0.35-0.74) <b>4.60e-04</b>	0.65 (0.36-1.18) 0.1603	0.71 (0.47-1.06) 0.090
rs4775289 * rs963218	1.26 (1.01-1.58) <b>0.0428</b>	1.09 (0.78-1.52) 0.6272	1.3 (0.99-1.71) 0.058
rs11071561 * rs727162	1.33 (1-1.76) <b>0.0471</b>	1.52 (0.99-2.33) 0.0557	1.02 (0.73-1.43) 0.8856
rs7171681 * rs963218	1.39 (1.09-1.77) <b>0.0085</b>	1.01 (0.69-1.47) 0.9544	1.28 (0.98-1.69) 0.075

Abbreviations: BAMSE, Children Allergy Milieu Stockholm an Epidemiological Study; ISAAC, International Study of Asthma and Allergies in Childhood; LD, linkage disequilibrium; MAAS, Manchester Asthma and Allergy Study; MAGICS, Multicenter Asthma Genetic in Childhood Study; *NPSR1*, Neuropeptide S Receptor 1; *RORA*, Retinoid Acid Receptor-Related Orphan Receptor Alpha; SNPs, single-nucleotide polymorphisms.

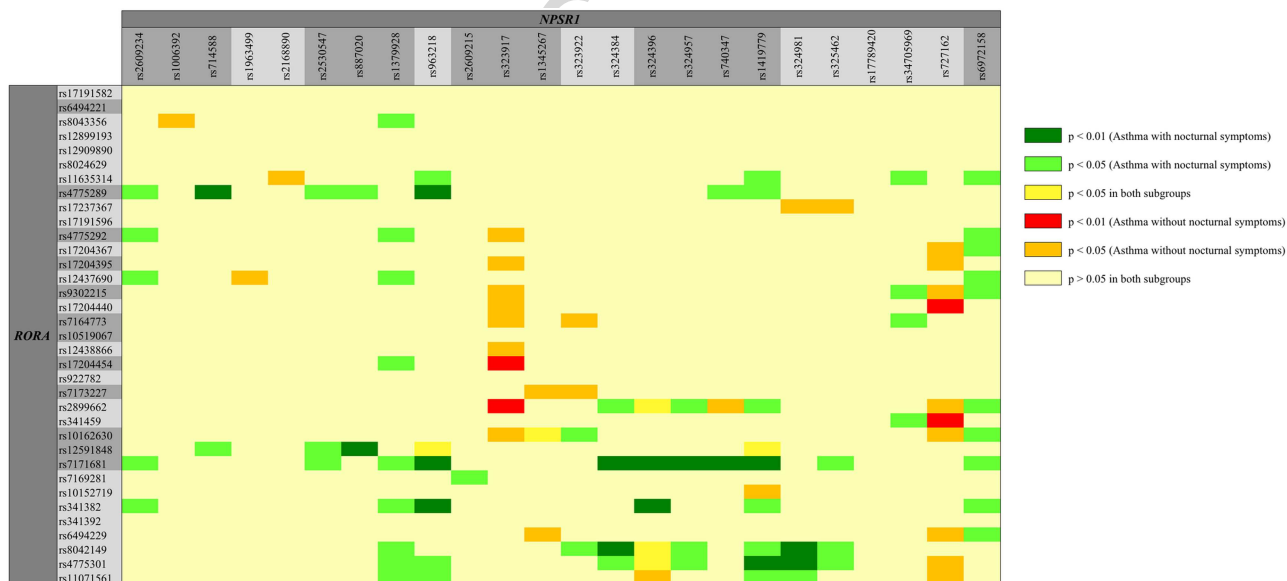
OR, 95% CI, and *P* values are reported for all datasets. *P* values of significant interactions are in bold letters and the background is marked green; borderline significant interactions are marked in olive green and *P* values are in italic.

<sup>a</sup>The interaction is shown in the following format: *RORA*-SNP \* *NPSR1*-SNP.

<sup>b</sup>rs12591848 was replaced by rs746241 in BAMSE (SNPs are reported to be in perfect LD).

<sup>c</sup>This interaction was significant in the recent paper by Acevedo et al<sup>23</sup> using BAMSE and PARSIFAL populations. Looking only at the BAMSE cohort, the interaction is less powerful and therefore does not reach statistical significance.

COLOR FIG



**FIGURE 3** Heat map of the interaction results of *RORA*\**NPSR1* on asthma with and asthma without nocturnal symptoms in MAGICS/ISAAC. Color coding is explained on the right. Green colors indicate a significant interaction when asthma with nocturnal symptoms was the outcome, whereas orange and red colors indicate a significant interaction when asthma without nocturnal symptoms was the outcome. Cells in yellow mark interactions that are significantly associated with both outcomes. Darker colors indicate a stronger association. SNPs obtained from the regular GWAS dataset are highlighted in dark gray, and imputed SNPs are highlighted in light gray. ISAAC, International Study of Asthma and Allergies in Childhood; MAGICS, Multicenter Asthma Genetic in Childhood Study; *NPSR1*, Neuropeptide S Receptor 1; *RORA*, Retinoid Acid Receptor-Related Orphan Receptor Alpha; SNPs, single-nucleotide polymorphisms

**TABLE 2** Replication of interaction effects between *RORA* and *NPSR1* on nocturnal asthma symptoms

Interaction <sup>a</sup>	NAS <sup>b</sup> (MAGICS/ISAAC)	NAS <sup>b</sup> (MAAS)	NBD <sup>b</sup> (BAMSE)
rs1379928 * rs4775292	1.68 (1.08-2.6) <b>0.02</b>	2.11 (1.16-3.84) <b>0.0143</b>	1.23 (0.76-1.97) 0.3974
rs1379928 * rs12437690	0.62 (0.39-0.97) <b>0.036</b>	0.53 (0.3-0.93) <b>0.0254</b>	0.86 (0.54-1.37) 0.5355
rs1379928 * rs17204454	1.59 (1.04-2.43) <b>0.0318</b>	1.99 (1.14-3.46) <b>0.0149</b>	1.11 (0.71-1.75) 0.644
rs324384 * rs2899662	0.65 (0.44-0.96) <b>0.0317</b>	0.6 (0.36-0.98) <b>0.0395</b>	0.97 (0.67-1.41) 0.8682
rs324957 * rs2899662	0.65 (0.44-0.96) <b>0.032</b>	0.56 (0.34-0.91) <b>0.02</b>	na
rs324396 * rs2899662	0.61 (0.4-0.95) <b>0.0277</b>	0.48 (0.28-0.82) <b>0.0069</b>	0.73 (0.49-1.1) 0.1309
rs324396 * rs7171681	0.45 (0.28-0.73) <b>0.0013</b>	0.54 (0.3-0.99) <b>0.0459</b>	0.82 (0.54-1.24) 0.3384
rs324396 * rs341382	0.52 (0.32-0.85) <b>0.0094</b>	0.58 (0.31-1.07) <i>0.0825</i>	0.9 (0.58-1.4) 0.649
rs324396 * rs4775301	0.65 (0.44-0.96) <b>0.0307</b>	0.63 (0.38-1.03) <i>0.065</i>	0.87 (0.6-1.28) 0.4886
rs2609234 * rs341382	1.74 (1.03-2.93) <b>0.0376</b>	1.88 (0.96-3.7) <i>0.0675</i>	na
rs963218 * rs12591848 <sup>c</sup>	0.46 (0.25-0.84) <b>0.0108</b>	0.77 (0.37-1.6) 0.4834	0.6 (0.35-1.05) <i>0.0759</i>
rs324981 * rs11071561	1.51 (1.07-2.13) <b>0.02</b>	1.57 (0.99-2.5) <i>0.0577</i>	na
rs740347 * rs4775289	1.67 (1.02-2.73) <b>0.041</b>	1.03 (0.56-1.92) 0.9164	1.65 (0.97-2.8) <i>0.0646</i>

Abbreviations: BAMSE, Children Allergy Milieu Stockholm an Epidemiological Study; CI, confidence intervals; ISAAC, International Study of Asthma and Allergies in Childhood; LD, linkage disequilibrium; MAAS, Manchester Asthma and Allergy Study; MAGICS, Multicenter Asthma Genetic in Childhood Study; *NPSR1*, Neuropeptide S Receptor 1; OR, odds ratios; *RORA*, Retinoid Acid Receptor-Related Orphan Receptor Alpha; SNPs, single-nucleotide polymorphisms.

<sup>a</sup>The interaction is shown in the following format: *NPSR1*-SNP \* *RORA*-SNP.

<sup>b</sup>NAS, nocturnal asthma symptoms; NBD, nocturnal breathing difficulties.

<sup>c</sup>rs12591848 was replaced by rs746241 in BAMSE (SNPs are reported to be in perfect LD). OR, 95% CI, and *P* values are reported for all datasets. *P* values of significant interactions are in bold letters and green background; borderline significant *P* values are marked in italic and cells are shaded olive green. na = interaction could not be calculated as at least one of the SNPs was not available in the BAMSE cohort.

Now we attempted to replicate the significant results with similar phenotypes in BAMSE and MAAS. Interestingly, we were able to replicate seven interactions in MAAS with six further interactions reaching borderline significance in one of the datasets. Of note, the effect direction was the same in the other replication dataset in most cases (Table 2 and Table S6). Particularly, the combination of rs324396\*rs2899662 and rs1379928\*rs4775292 affected nocturnal asthma strongly in all cohorts. To detect temporal continuity, we assessed whether interaction effects at age 11 remained associated with nocturnal asthma at age 16 in MAAS. Intriguingly, 2 of 11 interactions still affected nocturnal asthma significantly at age 16 (rs324396\*rs2899662 and rs324396\*rs341382) and four interactions reached borderline significance (Table S7).

Finally, we rigorously prioritized associated SNPs based on the number of original interactions (interacting with  $\geq 25\%$  of the other gene's SNPs) and the number of replicated interactions ( $\geq 2$  replications) to only include our main hits ( $N = 10$ , see Figure S5). Scanning various databases, we found that two of our top SNPs are predicted to have a relevant functional impact (Table 3): while one SNP (rs6972158) results in a nonconservative amino acid change from glutamine to arginine in *NPSR1*, seven of the remaining nine SNPs are tightly linked to SNPs predicted to be located in promoter regions and five SNPs alter transcription factor binding sites for

various proteins known to play important roles in immunology and chronobiology.<sup>31,32</sup> In turn, six of these SNPs also lead to a differential gene expression in tested tissues. Of note, three of these SNPs are located in phylogenetically highly conserved regions.

### 3.3 | *RORA* and *NPSR1* interactions have minor effects on asthma without nocturnal symptoms

Next, we analyzed if *RORA* by *NPSR1* interactions affect asthmatics without nocturnal asthma symptoms. If *RORA* by *NPSR1* interactions were involved in a mechanism specific for nocturnal asthma, associations in asthmatics without nocturnal symptoms would be expected to be absent or much weaker than the ones found in asthmatics with nocturnal symptoms. Indeed, there were fewer interactions associated with the occurrence of asthma without nocturnal symptoms: only four *NPSR1*-SNPs interacted with  $\geq 3$  *RORA*-SNPs and only two *RORA*-SNPs interacted with  $\geq 3$  SNPs in *NPSR1*. The strongest interaction was noted for *NPSR1* rs323917\**RORA* rs17204454 (OR [CI] = 0.29, [0.13-0.61]; *P* = 0.0012). We could replicate one interaction in BAMSE and most interactions had the same effect direction (Tables S8 and S9). In comparison, as seen above, there were a total of 24 SNPs from both genes interacting with  $\geq 3$  SNPs from the respective other gene when asthma with



**TABLE 3** A Functional relevance of selected top hits in (A) NPSR1 and (B) RORA interacting to be associated with nocturnal asthma symptoms

SNP	Gene	N IA	N IA replicated	Location	Predicted promoter region?	SNP conserved	eQTL	TFBS
<b>(A) NPSR1</b>								
rs1379928	NPSR1	9	3	Intron	BRN (LD 0.88)	LD (0.99)	gene expression change of ABCA7, GNB2L1, SLC442 in PBMC (LD 0.92)	CFOS, STAT3, P300 (LD 0.81)
rs324396	NPSR1	5	2 (4)	Intron NPSR1 / exon NCAPD2P1	LNG, CRVX, LIV (LD 0.98)	-	-	26 proteins, e.g. GATA3 and STAT3 (LD 0.98)
rs6972158	NPSR1	10	0	Missense / Splicing site	-	yes	eQTL of NPSR1 in Testis (LD 0.8)	-
rs1419779	NPSR1	9	0	Intron	GI, PANC, LIV (LD 0.99)	-	gene expression change of DPY19L1 in blood	MAFF, MAFK (LD 0.99)
<b>(B) RORA</b>								
rs2899662	RORA	5	3	Intron	BLD, MUS (LD 0.95)	-	differential exon level expression of RORA in brain cortex	USF1 (LD 0.85)
rs7171681	RORA	11	1	Intron	BLD	LD (0.97)	...	STAT3 (LD 0.98)
rs4775301	RORA	8	0 (1)	Intron	BLD (LD 0.82)	-	CTCF, NRSF (LD 0.82)	-
rs8042149	RORA	8	0	Intron	-	-	...	-
rs4775289	RORA	7	0 (1)	Intron	-	-	...	-
rs341382	RORA	6	0 (2)	Intron	ESC, BLD (LD 0.95)	-	STAT3 (LD 0.97)	-

Abbreviations: BLD, blood; BRN, brain; CRVX, cervix; eQTL, expression quantitative trait loci; GI, gastrointestinal tract; IA, interaction; LD, linkage disequilibrium; LIV, liver; LNG, lung; MUS, muscle; N, number; NPSR1, Neuropeptide S Receptor 1; PANC, pancreas; PBMC, peripheral blood monocytes; RORA, Retinoid Acid Receptor-Related Orphan Receptor Alpha; SNP, single-nucleotide polymorphism; TFBS, transcription factor binding site.

Information was obtained from several databases as indicated in the methods section. All SNPs interacting with at least 25% of the other gene's SNPs in the discovery cohort or with at least two significant replications were included (N = 10). If a SNP in LD was associated with a functional change, "LD" and the respective  $r^2$  value is put in brackets. The count of replicated interactions includes the replications with a  $P < 0.05$  and the replications with borderline significance ( $P < 0.10$ ) in brackets. Predicted promoter region is reported if the SNP was predicted to be located in a promoter region in a selected tissue. For an exact explanation of the columns please refer to the methods section. Part A includes SNPs from NPSR1 and Part B includes SNPs from RORA.

nocturnal symptoms was the outcome. Results of these analyses are displayed in a comparative manner in Figure 3. Of note, atopy status in asthmatics (71.8%) and nocturnal asthmatics (74.0%) was comparable.

### 3.4 | Effects of *RORA* and *NPSR1* interactions on asthma severity

To further disentangle whether *RORA* and *NPSR1* specifically affect nocturnal asthma, we also sought to describe the two genes' effects on asthma severity in our three populations, even though one has to be aware that severity definitions varied somewhat between these studies (as described in Section 2). This analysis was based on the assumption that the effects on nocturnal asthma may be influenced and/or partly explained by asthma severity. We could show that seven *RORA*-SNPs as well as nine *NPSR1*-SNPs interacted with  $\geq 3$  SNPs from the respective other gene to associate with asthma severity (Figure S2). Overall, there were 52 significant interactions (strongest interaction rs2530547\*rs4775289:  $\beta$ (SE) = 0.53 [0.14],  $P = 0.0002$ ). Some of these interactions also affected nocturnal asthma, thus implying that their effect on nocturnal asthma and on asthma severity may be confounded. However, most interactions between *RORA* and *NPSR1* remained specific for nocturnal asthma. Lastly, four SNPs in *RORA* as well as three *NPSR1*-SNPs seemed to be only associated with asthma severity and not nocturnal asthma. However, when trying to replicate our results in the two independent cohorts, we found that almost no interaction had the same effect direction in both replication cohorts for severity, very much in contrast to our constant replications for nocturnal asthma across different cohorts (Table S11).

## 4 | DISCUSSION

This study deciphers a plausible genetic mechanism for nocturnal asthma by demonstrating that interactions between *RORA* and *NPSR1* are specifically associated with nocturnal asthma, suggesting the involvement of a genetic mechanism related to circadian rhythm control.

We replicated and extended recent observations that interactions between *RORA* and *NPSR1* increase the risk to develop asthma in three independent cohorts. By systematically enriching both *RORA* and *NPSR1* gene loci, we identified a number of additional and novel gene-gene interactions driving asthma. The most intriguing and novel result from our study, however, is that interactions between *RORA* and *NPSR1* strongly associate with nocturnal asthma, rather than asthma per se. There has been limited evidence for a genetic background of nocturnal asthma, all relating to the beta2 adrenoceptor (*ADRB2*), coming from rather small datasets.<sup>33-35</sup> These studies followed the hypothesis that mutations in *ADRB2* increase airway constriction in asthmatics and reduce the response to treatment, thus increasing symptoms and severity, possibly even pronounced at night. Our study now shows a mechanism specific for nocturnal symptoms by deciphering molecular associations within

genes of the circadian rhythm: as both genes under investigation have been independently associated with asthma susceptibility<sup>12-14,16,23</sup> and seem to play a role in defining the circadian rhythm,<sup>15,18</sup> the observed associations are biologically plausible.

There are some limitations to our study: first, it has to be acknowledged that this was a retrospective study design with questionnaire-based definitions of nocturnal symptoms as well as asthma severity. This may have led to an underestimation of the number of nocturnal asthmatics, possibly indicated by the low number of nocturnal asthmatics in our study. This may potentially have skewed the results. However, a failure to assign some of the nocturnal asthmatics to any respective group would normally lead to an underestimation of the power of any found difference, thereby potentially even underestimating the actual effect size. Secondly, we tested a number of independent associations, thus raising the issue of multiple testing. We tried to avoid false-positive results by focusing on polymorphisms for which the number of significant interactions exceeded the stochastic expectation.<sup>30</sup> Considering only SNPs that showed  $\geq 3$  interactions reduced (but did not exclude) the probability of obtaining false-positive results. For interaction analyses, it is biologically plausible that SNPs would interact with several SNPs from the respective other gene if they have an impact on function.<sup>23</sup>

Intriguingly, we were able to replicate several interactions in MAAS even though replication of interaction analyses is only rarely achieved.<sup>36</sup> Replication analyses with the phenotype *nocturnal breathing difficulties* in BAMSE did not reach significance. This may partly be due to the difference in phenotypes: in MAGIC/ISAAC and MAAS, the phenotype was relatively specific for asthma as it asked for nocturnal wheezing or gasping. In BAMSE, however, parents were asked for general coughing and breathing difficulties at night, which is less specific for asthma. This could also explain why in BAMSE 307 children showed nocturnal breathing difficulties without having asthma, while only 14 children in MAGIC/ISAAC and no child in MAAS reported nocturnal symptoms without an asthma diagnosis. However, even in BAMSE, effect directions were the same for almost all interactions. The constant replication and the extension to nocturnal asthma at age 16 in MAAS implies (1) that this is a mechanism specific for nocturnal asthma and (2) that this mechanism is stable over populations and over time. The stability of these findings is intriguing, as replication of interaction effects is difficult to achieve.<sup>36</sup> To find and replicate interactions despite our relatively small sample sizes of approximately 1000 to 1500 individuals in each dataset implies a strong effect size of these interactions, indeed indicated by relatively high OR. A further strength of our study is the clinically defined asthma phenotype that was largely obtained by a pediatric pulmonologist rather than by parental report.

To assess whether these results are explained by the similarity between nocturnal asthma and severe asthma, we compared *RORA* by *NPSR1* effects on asthma severity with our findings on nocturnal asthma. However, it has to be noted that this analysis was performed to differentiate nocturnal asthma from severe asthma and should only be interpreted in relation to nocturnal asthma results. We found that the two genes also interact in affecting asthma severity in

MAGICS/ISAAC but could not replicate these results in MAAS or BAMSE. The inability to replicate results on this phenotype may be due to different definitions of asthma severity in the three datasets, reflecting the ambiguity of this phenotype. There are several clinical features that contribute to asthma severity, thus making it difficult to comprehensively investigate this phenotype. As nighttime awakenings are sometimes regarded as a feature of asthma severity, it is not yet understood to what extent nocturnal asthma is an independent phenotype. Thus, we sought to discriminate the effect of *RORA* and *NPSR1* on nocturnal asthma and on asthma severity. Based on our data, it seems as if nocturnal asthma and asthma severity are related but distinct features of asthma. However, we cannot draw final conclusions due to our failed replications and the ambiguous phenotypes.

The NPS/NPSR1 system as well as *RORA* have been shown to play a role in circadian rhythm: *NPSR* knockout mice exhibited lower activity levels under light-dark conditions, NPS injections lead to an increased wakefulness and nonsynonymous *NPSR1* rs324981 was recently associated with a delay of bedtime and sleep duration.<sup>9,10,15</sup> *RORA* gene expression varies throughout the day and *Rora*-deficient mice showed a decreased activity and could not adjust to light-dark cycles.<sup>18,21,23</sup> In addition, *RORA* modulates the rhythmic expression of downstream target genes, which were recently implicated in mast cell cytokine secretion<sup>37</sup> and lung epithelial chemokine production,<sup>38</sup> thereby connecting circadian rhythm genes with immunological processes.<sup>11,18–22</sup> Interestingly, *NPSR1*-overexpressing cells demonstrated an increased mRNA expression of *RORA* and other circadian genes<sup>23,39</sup> and in vivo *Npsr1*-deficient mice showed a lower *RORA* mRNA expression.<sup>23</sup> Reversely, it was shown that *RORA* regulates *NPSR1* promoter activity.<sup>23</sup> Taken together, both *RORA* and *NPS/NPSR1* signalling appear to be interwoven when acting upon complex immune-related circadian outcomes, and in our case nocturnal asthma.

By systematically scanning online databases for functional relevance of our main hits we found that 8 of 10 (or their proxy-SNPs in high LD) are predicted to have functional effects: rs6972158 is a missense SNP resulting in an amino acid change from glutamine to arginine at position 344 of the isoform A of *NPSR1*. Gln344 is located within the cytosolic domain of the *NPSR1* protein, and hence, it could have an effect on intracellular signaling. Future in vitro studies should address whether allele-specific effects of rs6972158 influence transcription rates of genes involved in the inflammatory response or the molecular clock in lung tissue.

Interestingly, seven of the remaining nine SNPs are tightly linked to SNPs predicted to be located in promoter regions<sup>40</sup> and known to be binding sites for protein playing an important role in immunology and chronobiology: *GATA3* induces IL-4, IL-5, and IL-13 secretion and is strongly involved in asthma susceptibility,<sup>32,41</sup> and *P300* is an important part of the circadian clock.<sup>42</sup> Most interestingly, four of our investigated top hits were in tight relation to *STAT3* gene expression or showed differential binding capabilities for this relevant transcription factor: upregulation of *STAT3* is associated with lung inflammation as well as an altered cytokine profile in asthmatic patients.<sup>31</sup> In addition, it is known to dynamically control

Th2 and Th17 cell responses during allergic lung inflammation in mice and humans<sup>31</sup> while being rhythmically expressed and triggered by the endogenous clock.<sup>43</sup> Furthermore, *NPSR1* rs1379928, rs1419779, and rs6972158 as well as *RORA* rs2899662, rs4775301, and rs341382 have been shown to increase downstream gene expression, while *RORA* rs2899662 and rs7171681 are linked to mono- or trimethylated histone mark H3K4 in T-helper cells, thus promoting downstream gene expression.<sup>40</sup> Therefore, new starting points for functional genomic assessments have been identified.

All in all, major SNPs showing association in interaction analyses in this study seem to be highly relevant for lung inflammation and asthma susceptibility while at the same time being involved in the circadian rhythm by promoting gene expression differentially. However, to conclusively determine biological plausibility of the results, further prospective and mechanistic studies are needed. Thus, it might be worthwhile to study the influence of further circadian rhythm genes on nocturnal asthma, potentially also investigating mitigation by the sympathetic nervous system. Understanding the pathogenesis of nocturnal asthma could increase our clinical and causal knowledge of the disease, thus potentially impacting on improvements in management and care for the affected patients.

Taking all aspects into account, we conclude that *RORA* and *NPSR1* interactions are consistent and that these interactions are mainly associated with the development of nocturnal asthma, an association that is not only statistically significant but biologically plausible due to the role of both genes in asthma and circadian rhythm. Our data imply that nocturnal asthma is no simple disease entity in the severity spectrum of the disease. Specific molecular patterns regulating the circadian clock, such as those studied here, are associated with nighttime symptoms. Further research could help to clarify mechanisms and introduce potential avenues of intervention in this subphenotype of asthma that is not well understood but highly troublesome for patients.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank all participants of the MAGIC, ISAAC II, MAAS, BAMSE, and PARSIFAL studies. We also thank the Mutation Analysis Core Facility (MAF) at the Karolinska University Hospital for supporting this study. This study was funded by the German Lung Research Center (DZL), Swedish Research Council, the Distinguished Professor Award at Karolinska Institute to JK, and the Sigrid Jusélius Foundation. BAMSE was supported by the Swedish Research Council, the Swedish Heart-Lung Foundation and the Swedish Research Council Formas. MAAS was supported by Asthma UK Grants No 301 (1995-1998), No 362 (1998-2001), No 01/012 (2001-2004), No 04/014 (2004-2007), BMA James Trust (2005) and The JP Moulton Charitable Foundation (2004-current), The North west Lung Centre Charity (1997-current) and the Medical Research Council (MRC) G0601361 (2007-2012), MR/K002449/1 (2013-2014), and MR/L012693/1 (2014-2018). AC received personal fees from Novartis, Regeneron/Sanofi, ALK, ThermoFisher, BoehringerIngelheim, Novartis, Philips, all outside the submitted work. AS reports grants from

Medical Research Council and from the National Institute of Health Research during the conduct of the study. MK received personal fees for lectures from ERS, EAACI, ATS, Novartis, Glaxo, Nutricia, and Hipp as well as research grants from the European Union, the German Ministry of Education and Research, and the German Research Foundation. VDG received travel fees for lectures from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI).

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

## ORCID

Vincent D. Gaertner  <http://orcid.org/0000-0001-5330-652X>

## REFERENCES

- Sutherland ER. Nocturnal asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(6):1179-1186. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.09.028>
- Ginsberg D. An unidentified monster in the bed—assessing nocturnal asthma in children. *McGill J Med*. 2009;12(1):31-38.
- Meijer GG, Postma DS, Wempe JB, Gerritsen J, Knol K, van Aalderen Aalderen WMC. Frequency of nocturnal symptoms in asthmatic children attending a hospital out-patient clinic. *Eur Respir J*. 1995;8(12):2076-2080.
- Raherison C, Abouelfath A, Gros VL, Taytard A, Molimard M. Underdiagnosis of nocturnal symptoms in asthma in general practice. *J Asthma*. 2006;43(3):199-202. <https://doi.org/10.1080/02770900600566744>
- Chugh IM, Khanna P, Shah A. Nocturnal symptoms and sleep disturbances in clinically stable asthmatic children. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2006;24(2-3):135-142.
- Burioka N, Fukuoka Y, Koyanagi S, et al. Asthma: chronopharmacotherapy and the molecular clock. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(9-10):946-955. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.03.012>
- Kraft M, Martin RJ, Wilson S, Djukanovic R, Holgate ST. Lymphocyte and eosinophil influx into alveolar tissue in nocturnal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(1):228-234. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.1.9804033>
- Calhoun WJ. Nocturnal asthma. *Chest*. 2003;123(3 Suppl):399S-405S.
- Duangdao DM, Clark SD, Okamura N, Reinscheid RK. Behavioral phenotyping of neuropeptide S receptor knockout mice. *Behav Brain Res*. 2009;205(1):1-9. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.07.024>
- Zhao P, Shao YF, Zhang M, et al. Neuropeptide S promotes wakefulness through activation of the posterior hypothalamic histaminergic and orexinergic neurons. *Neuroscience*. 2012;207:218-226. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.01.022>
- Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signaling*. 2007;7:4. <https://doi.org/10.1621/nrs.07003>
- Laitinen T, Polvi A, Rydman P, et al. Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science (New York, N.Y.)*. 2004;304(5668):300-304. <https://doi.org/10.1126/science.1090010>
- Melén E, Bruce S, Doekes G, et al. Haplotypes of G Protein-coupled Receptor 154 Are Associated with Childhood Allergy and Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(10):1089-1095. <https://doi.org/10.1164/rccm.200410-1317OC>
- Kormann MSD, Carr D, Klopp N, et al. G-Protein-coupled receptor polymorphisms are associated with asthma in a large German population. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(12):1358-1362. <https://doi.org/10.1164/rccm.200410-1312OC>
- Spada J, Sander C, Burkhardt R, et al. Genetic association of objective sleep phenotypes with a functional polymorphism in the neuropeptide S receptor gene. *PLoS One*. 2014;9(6):e98789. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098789>
- Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med*. 2010;363(13):1211-1221. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0906312>
- Torgerson DG, Ampleford EJ, Chiu GY, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nature Genet*. 2011;43(9):887-892.
- Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*. 2004;43(4):527-537. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.018>
- Kang HS, Angers M, Beak JY, et al. Gene expression profiling reveals a regulatory role for ROR alpha and ROR gamma in phase I and phase II metabolism. *Physiol Genomics*. 2007;31(2):281-294. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00098.2007>
- Melén E, Kho AT, Sharma S, et al. Expression analysis of asthma candidate genes during human and murine lung development. *Respir Res*. 2011;12:86. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-86>
- Akashi M, Takumi T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol*. 2005;12(5):441-448. <https://doi.org/10.1038/nsmb925>
- Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, Cermakian N. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms*. 2005;20(5):391-403. <https://doi.org/10.1177/0748730405277232>
- Acevedo N, Sääf A, Söderhäll C, et al. Interaction between retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha (RORA) and neuropeptide S receptor 1 (NPSR1) in asthma. *PLoS One*. 2013;8(4):e60111. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060111>
- Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*. 2007;448(7152):470-473. <https://doi.org/10.1038/nature06014>
- Kull I, Melen E, Alm J, et al. Breast-feeding in relation to asthma, lung function, and sensitization in young schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):1013-1019. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.01.051>
- Custovic A, Simpson BM, Murray CS, Lowe L, Woodcock A, NAC Manchester Asthma and Allergy Study Group. The National Asthma Campaign Manchester Asthma and Allergy Study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2002;13(Suppl 15):32-37.
- Michel S, Liang L, Depner M, et al. Unifying candidate gene and GWAS approaches in asthma. *PLoS One*. 2010;5(11):e13894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013894>
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. 2007;81(3):559-575. <https://doi.org/10.1086/519795>
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-265. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457>
- Esparza-Gordillo J, Weidinger S, Fölster-Holst R, et al. A common variant on chromosome 11q13 is associated with atopic dermatitis. *Nature Genet*. 2009;41(5):596-601. <https://doi.org/10.1038/ng.347>
- Levy DE, Lee C. What does Stat3 do? *J Clin Invest*. 2002;109(9):1143-1148. <https://doi.org/10.1172/JCI15650>
- Krug N, Hohlfeld JM, Kirsten A-M, et al. Allergen-induced asthmatic responses modified by a GATA3-specific DNase. *N Engl J Med*. 2015;372(21):1987-1995. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411776>



- 1 33. Turki J, Pak J, Green SA, Martin RJ, Liggett SB. Genetic polymorphisms  
2 of the beta 2-adrenergic receptor in nocturnal and nonnocturnal  
3 asthma. Evidence that Gly16 correlates with the nocturnal phenotype.  
4 *J Clin Invest.* 1995;95(4):1635-1641. <https://doi.org/10.1172/JC1117838>
- 5 34. Martinez FD, Graves PE, Baldini M, Solomon S, Erickson R.  
6 Association between genetic polymorphisms of the beta2-adreno-  
7 ceptor and response to Albuterol in children with and without a  
8 history of wheezing. *J Clin Invest.* 1997;100(12):3184-3188.
- 9 35. Santillan AA, Camargo CA, Ramirez-Rivera A, et al. Association  
10 between beta2-adrenoceptor polymorphisms and asthma diagnosis  
11 among Mexican adults. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(6):1095-  
12 1100. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.09.029>
- 13 36. Cordell HJ. Detecting gene-gene interactions that underlie human  
14 diseases. *Nat Rev Genet.* 2009;10(6):392-404. <https://doi.org/10.1038/nrg2579>
- 15 37. Christ P, Sowa AS, Froy O, Lorentz A. The circadian clock drives mast  
16 cell functions in allergic reactions. *Front Immunol.* 2018;9:1526.  
17 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01526>
- 18 38. Ince LM, Zhang Z, Beesley S, et al. Circadian variation in pulmonary  
19 inflammatory responses is independent of rhythmic glucocorticoid  
20 signaling in airway epithelial cells. *FASEB J.* 2019;33:126-139. <https://doi.org/10.1096/fj.201800026RR>
- 21 39. Pulkkinen V, Ezer S, Sundman L, et al. Neuropeptide S receptor 1  
22 (NPSR1) activates cancer-related pathways and is widely expressed  
23 in neuroendocrine tumors. *Virchows Arch.* 2014;465(2):173-183.  
24 <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1602-x>
- 25 40. Ward LD, Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal  
26 variants, cell types, regulators and target genes for human complex  
27 traits and disease. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D877-D881.  
28 <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1340>
- 29 41. Rayees S, Malik F, Bukhari SI, Singh G. Linking GATA-3 and interleukin-  
30 13: implications in asthma. *Inflammation Res.* 2014;63(4):255-265.  
31 <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0700-6>
- 32 42. Hosoda H, kato K, Asano H, et al. CBP/p300 is a cell type-specific  
33 modulator of CLOCK/BMAL1-mediated transcription. *Molecular*  
34 *Brain.* 2009;2(1):34. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-2-34>
- 35 43. Lech K, Ackermann K, Revelle VL, Lao O, Skene DJ, Kayser M.  
36 Dissecting daily and circadian expression rhythms of clock-controlled  
37 genes in human blood. *J Biol Rhythms.* 2016;31(1):68-81. <https://doi.org/10.1177/0748730415611761>

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**How to cite this article:** Gaertner VD, Michel S, Curtin JA, et al. Nocturnal asthma is affected by genetic interactions between *RORA* and *NPSR1*. *Pediatric Pulmonology.* 2019;1-11. <https://doi.org/10.1002/ppul.24292>

UNCORRECTED

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

## 7.3 Aufrufe Quality Control

### Anhang 3: Quality Control

```
knitr::opts_chunk$set(echo = TRUE)
library(knitr)
opts_chunk$set(tidy.opts=list(width.cutoff=60),tidy=TRUE)
```

+++

#### Qualitätskontrolle der Rohdaten

Folgende Schritte sind nötig

1. Rohdaten einlesen und Erstellung der Rohdatensatzes
2. Test der Genotypisierungsqualität und der Heterozygotitätsrate
3. Verwandtschaftstests
4. Missing data Rate
5. HWE und Genotypisierungsrate
6. Unterschiedliche Missingrate zwischen Fällen und Kontrollen

+++++

+++++

#### 1. Rohdaten einlesen und Erstellung der Rohdatensatzes

```
load("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/GenotypeOptiKielDecodeBGID.RData")

# MAGICS
write.table(GenotypeOptiKielDecodeBGID[which(GenotypeOptiKielDecodeBGID$Pop == "magic"), c("V1", "V2")],
"/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/GenotypeOptiKielDecodeBGID_2keepMAGIC.txt",
  sep = "\t", quote = F, col.names = F, row.names = F)

# ISAAC
write.table(GenotypeOptiKielDecodeBGID[which(GenotypeOptiKielDecodeBGID$Pop == "isaac"), c("V1", "V2")],
```

```
"/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/GenotypeOptiKielDeco  
deBGID_2keepISAAC.txt",  
  sep = "\t", quote = F, col.names = F, row.names = F)
```

### Test ob die Plink daten die gleichen Zahlen ergeben.

```
nrow(GenotypeOptiKielDecodeBGID[which(GenotypeOptiKielDecodeBGID$Pop ==  
  "magic"), c("V1", "V2")])  
## [1] 579  
nrow(GenotypeOptiKielDecodeBGID[which(GenotypeOptiKielDecodeBGID$Pop ==  
  "isaac"), c("V1", "V2")])  
## [1] 393
```

### PLINK-Aufrufe um die einzelnen Datensätze zusammenzustellen

```
# ./plink --bfile  
# /srv/Data/Genotype_opti/Genotype_2181Samples_build36/Genotype_121103  
# --keep  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/GenotypeOptiKielDecod  
eBGID_2keepMAGIC.txt  
# --make-bed --out  
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS  
# --noweb  
  
# ./plink --bfile  
# /srv/Data/Genotype_opti/Genotype_2181Samples_build36/Genotype_121103  
# --keep  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/GenotypeOptiKielDecod  
eBGID_2keepISAAC.txt  
# --make-bed --out  
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC  
# --noweb
```

alle Zahlen stimmen überein

## 2. Test der Genotypisierungsgüte und der Heterozygotenrate

PLINK-Aufrufe –missing und –het

```
# ./plink --bfile  
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS  
# --missing --out  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS_missi  
ng  
# --exclude
```

```
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/ResControlNOF.txt
# ./plink --bfile
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC
# --missing --out
#
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC_mis
sing
# --exclude
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/ResControlNOF.txt

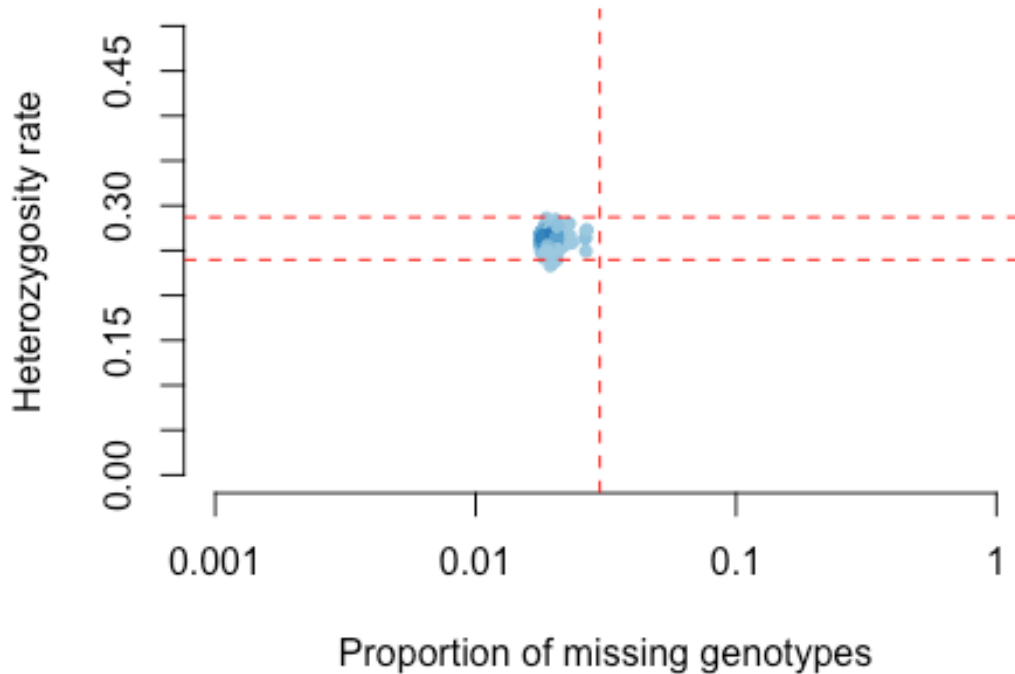
# ./plink --bfile
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS
# --het --out
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS_het
# --exclude
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/ResControlNOF.txt
# ./plink --bfile
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC
# --het --out
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC_het
# --exclude
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/ResControlNOF.txt
```

### Test in ISAAC

```
imiss =
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_
ISAAC_missing.imiss", h = T)
imiss$logF_MISS = log10(imiss[, 6])
het =
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_
ISAAC_het.het", h = T)
het$meanHet = (het$N.NM. - het$O.HOM.)/het$N.NM.
colors <- densCols(imiss$logF_MISS, het$meanHet)
```

### Plot der Heterozygotität vs missing genotypes

```
plot(imiss$logF_MISS, het$meanHet, col = colors, xlim = c(-3, 0), ylim =
c(0, 0.5), pch = 20, xlab = "Proportion of missing genotypes",
ylab = "Heterozygosity rate", axes = F)
axis(2, at = c(0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4,
0.45, 0.5), tick = T)
axis(1, at = c(-3, -2, -1, 0), labels = c(0.001, 0.01, 0.1, 1))
abline(h = mean(het$meanHet) - (3 * sd(het$meanHet)), col = "RED",
lty = 2)
abline(h = mean(het$meanHet) + (3 * sd(het$meanHet)), col = "RED",
lty = 2)
abline(v = -1.522879, col = "RED", lty = 2)
```



Alle

Probanden, die außerhalb der Linien liegen, müssen rausgenommen werden

### Überprüfen und Ausschluss

```
nrow(het[which(het$meanHet < (mean(het$meanHet) - (3 * sd(het$meanHet))),
])
## [1] 4
nrow(het[which(het$meanHet > (mean(het$meanHet) + (3 * sd(het$meanHet))),
])
## [1] 0
write.table(het[which(het$meanHet < (mean(het$meanHet) - (3 *
  sd(het$meanHet))), c("FID", "IID")],
"/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC_imiss_
_IDs2exclude.txt",
  sep = "\t", row.names = F, quote = F)
```

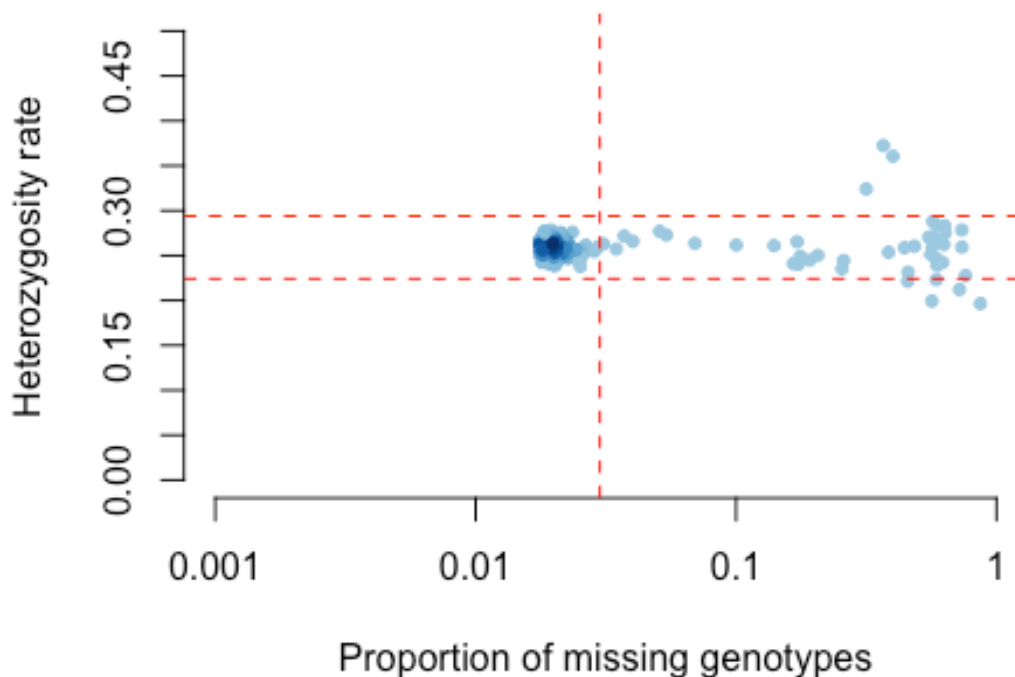
### Das Gleiche in MAGICs

```
imiss =
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_
MAGICs_missing.imiss",
  h = T)
imiss$logF_MISS = log10(imiss[, 6])
het =
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_
```

```
MAGICS_het.het",  
  h = T)  
het$meanHet = (het$N.NM. - het$O.HOM.)/het$N.NM.  
colors <- densCols(imiss$logF_MISS, het$meanHet)
```

#### Plot der Heterozygotität vs missing genotypes

```
plot(imiss$logF_MISS, het$meanHet, col = colors, xlim = c(-3,  
  0), ylim = c(0, 0.5), pch = 20, xlab = "Proportion of missing  
genotypes",  
  ylab = "Heterozygoty rate", axes = F)  
axis(2, at = c(0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4,  
  0.45, 0.5), tick = T)  
axis(1, at = c(-3, -2, -1, 0), labels = c(0.001, 0.01, 0.1, 1))  
abline(h = mean(het$meanHet) - (3 * sd(het$meanHet)), col = "RED",  
  lty = 2)  
abline(h = mean(het$meanHet) + (3 * sd(het$meanHet)), col = "RED",  
  lty = 2)  
abline(v = -1.522879, col = "RED", lty = 2)
```



```
nrow(imiss[which(imiss$F_MISS > 0.03), ])  
write.table(imiss[which(imiss$F_MISS > 0.03), c("FID", "IID")],  
  "/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS_imis
```

```
s_IDs2exclude.txt",  
  sep = "\\t", row.names = F, quote = F)
```

MAGICS hat größere probleme mit der Callrate... Die resultierenden 45 IDs für den Rest ausschließen

### 3. Verwandtschaftstests

PLINK-Aufruf –genome verwenden

```
# ./plink --bfile  
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS  
# --genome --out  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS_23608  
REL  
# --noweb --extract  
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/23608SNPs.txt  
# --remove  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS_imiss  
_IDs2exclude.txt  
# ./plink --bfile  
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC  
# --genome --out  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC_23608R  
EL  
# --noweb --extract  
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/23608SNPs.txt  
# --remove  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC_imiss_  
IDs2exclude.txt
```

#### 3.1 ISAAC

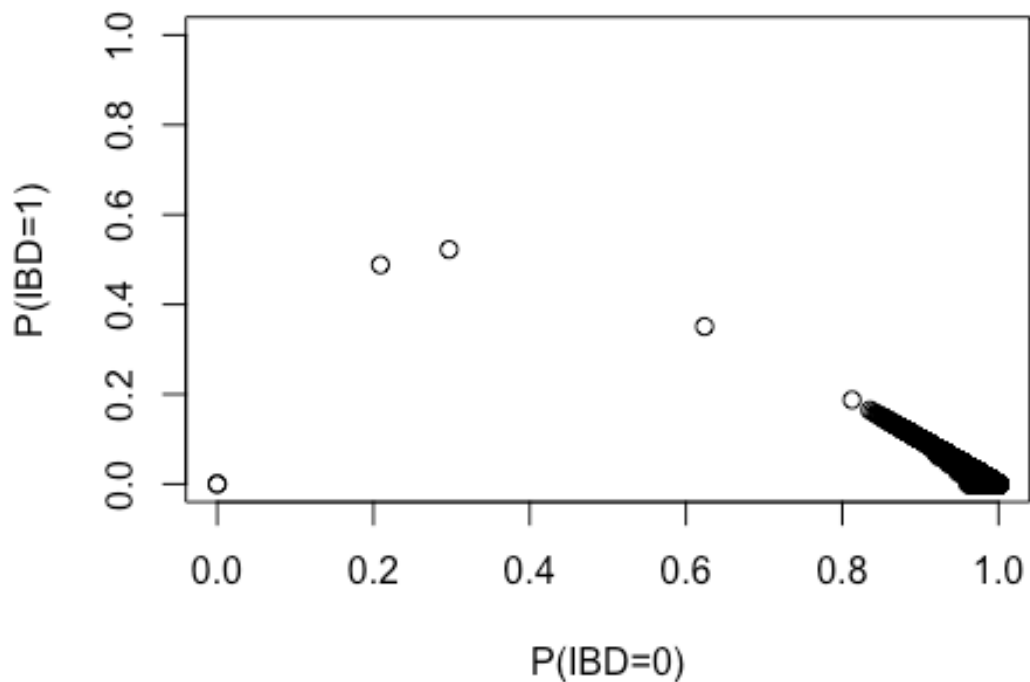
```
REL_ISAAC23608REL_CallR <-  
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_  
ISAAC_23608REL.genome",  
  header = T)
```

Plot der Verwandtschaftsgrade

```
plot(REL_ISAAC23608REL_CallR$Z0, REL_ISAAC23608REL_CallR$Z1,  
  xlab = "P(IBD=0)", ylab = "P(IBD=1)", xlim = c(0, 1), ylim = c(0,
```

```
1), main = "Scatterplot of pairwise P(IBD=0)X vs. P(IBD=1) Y  
(ISAAC)")
```

## Scatterplot of pairwise P(IBD=0)X vs. P(IBD=1) Y (ISA



```
REL_ISAAC23608REL_CallR[which(REL_ISAAC23608REL_CallR$PI_HAT >  
0.1875), ]
```

##	FID1	IID1	FID2	IID2	RT	EZ	Z0	Z1	Z2	
##	16662	0	ASDE_m_441005	0	HFDE_f_441778	OT	0	0.6238	0.3509	0.0253
##	35004	0	ASDE_m_441064	0	ASDE_m_441072	OT	0	0.0000	0.0000	1.0000
##	48678	0	ASDE_m_441118	0	ASDE_m_441126	OT	0	0.0000	0.0003	0.9997
##	67358	0	HFDE_f_441803	0	HFDE_m_441823	OT	0	0.2089	0.4881	0.3030
##	75272	0	HFDE_f_441911	0	HFDE_m_441927	OT	0	0.2968	0.5223	0.1808
##	PI_HAT	PHE	DST	PPC	RATIO					
##	16662	0.2007	1	0.775802	1	3.8510				
##	35004	1.0000	1	1.000000	1	NA				
##	48678	0.9999	1	0.999958	1	NA				
##	67358	0.5471	1	0.863623	1	13.6267				
##	75272	0.4420	1	0.834527	1	7.8776				

5 Verwandtschaftspaare: ###Lösche beide mit PI\_HAT>0.9 (Zwillinge oder gleiche Probe)

```
idsRemovePOP <-  
REL_ISAAC23608REL_CallR[which(REL_ISAAC23608REL_CallR$PI_HAT >
```



```
0.9), c("FID1", "IID1")]
colnames(idsRemovePOP) <- c("FID", "IID")
idsRemoveADD <-
REL_ISAAC23608REL_CallR[which(REL_ISAAC23608REL_CallR$PI_HAT >
0.9), c("FID2", "IID2")]
colnames(idsRemoveADD) <- c("FID", "IID")
idsRemovePOP <- rbind(idsRemovePOP, idsRemoveADD)
```

### Bei den anderen: besser genotypisierten behalten

```
idsRemovePOPb <-
REL_ISAAC23608REL_CallR[which(REL_ISAAC23608REL_CallR$PI_HAT <
0.9 & REL_ISAAC23608REL_CallR$PI_HAT > 0.1875), c("FID1",
"IID1", "FID2", "IID2")]
```

Das sind erstmal alle rausgesucht

### => for-Schleife über imiss, um die besser genotypisierten zu extrahieren

```
imiss =
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_
ISAAC_missing.imiss",
h = T)

for (i in 1:nrow(idsRemovePOPb)) {
  IID1 <- imiss[which(as.character(imiss$IID) ==
as.character(idsRemovePOPb[i,
"IID1"])), c("FID", "IID", "F_MISS")]
  IID2 <- imiss[which(as.character(imiss$IID) ==
as.character(idsRemovePOPb[i,
"IID2"])), c("FID", "IID", "F_MISS")]
  if (IID1$F_MISS > IID2$F_MISS) {
    idsRemovePOP <- rbind(idsRemovePOP, IID1[1:2])
  }
  if (IID1$F_MISS == IID2$F_MISS) {
    idsRemovePOP <- rbind(idsRemovePOP, IID1[1:2])
  }
  if (IID1$F_MISS < IID2$F_MISS) {
    idsRemovePOP <- rbind(idsRemovePOP, IID2[1:2])
  }
}
```

diese dann zu den IDs von vorhin dazuschreiben

```
ISAAC_exclude <-
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_
ISAAC_imiss_IDs2exclude.txt",
sep = "\t", header = T)
ISAAC_exclude <- rbind(ISAAC_exclude, idsRemovePOP)
```

### Gibt es noch zusätzliche Outlier?

=> durchschnittliche PI\_HAT pro ID berechnen

=> Originale ID-Definition pro Gruppe nehmen und Mittelwert einfügen

```
IDsISAAC <-  
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype0  
ptiKielDecodeBGID_2keepISAAC.txt",  
  header = F)  
colnames(IDsISAAC) <- c("FID", "IID")  
IDsISAAC$meanPI_HAT <- NA  
  
for (i in 1:nrow(IDsISAAC)) {  
  IDsISAAC[i, "meanPI_HAT"] <-  
mean(REL_ISAAC23608REL_CallR[which(as.character(REL_ISAAC23608REL_CallR$II  
D1) ==  
  as.character(IDsISAAC[i, "IID"]))], "PI_HAT"), na.rm = T)  
}  
head(IDsISAAC)  
uperB <- median(IDsISAAC$meanPI_HAT, na.rm = T) + 3 *  
IQR(IDsISAAC$meanPI_HAT,  
  na.rm = T)  
lowerB <- median(IDsISAAC$meanPI_HAT, na.rm = T) - 3 *  
IQR(IDsISAAC$meanPI_HAT,  
  na.rm = T)  
nrow(IDsISAAC[which(IDsISAAC$meanPI_HAT < lowerB | IDsISAAC$meanPI_HAT >  
  uperB), c("FID", "IID")])  
  
ISAAC_exclude <- rbind(ISAAC_exclude, IDsISAAC[which(IDsISAAC$meanPI_HAT <  
  lowerB | IDsISAAC$meanPI_HAT > uperB), c("FID", "IID")])  
write.table(ISAAC_exclude,  
  "/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC_IDs2e  
xclude.txt",  
  sep = "\t", row.names = F, quote = F)  
nrow(ISAAC_exclude)  
## [1] 13
```

13 IDs, die für die Assoziationsanalysen rausgefiltert werden

```
rm(idsRemovePOPb)  
rm(idsRemovePOP)
```

## 3.2 MAGICS

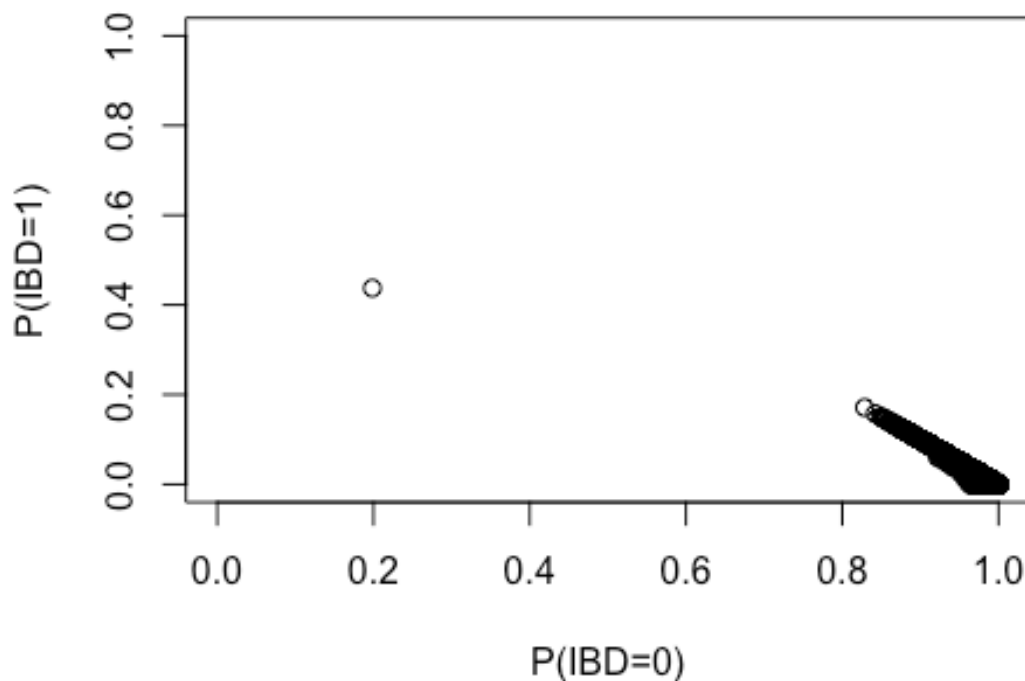
```
REL_MAGICS23608REL_CallR <-  
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_
```

```
MAGICS_23608REL.genome",  
header = T)
```

### Plot der Verwandtschaftsgrade

```
plot(REL_MAGICS23608REL_CallR$Z0, REL_MAGICS23608REL_CallR$Z1,  
      xlab = "P(IBD=0)", ylab = "P(IBD=1)", xlim = c(0, 1), ylim = c(0,  
      1), main = "Scatterplot of pairwise P(IBD=0)X vs. P(IBD=1) Y  
(MAGICS)")
```

### Scatterplot of pairwise P(IBD=0)X vs. P(IBD=1) Y (MAGICS)



```
REL_MAGICS23608REL_CallR[which(REL_MAGICS23608REL_CallR$PI_HAT >  
  0.1875), ]
```

1 Verwandtschaftspaar => beide löschen

```
idsRemovePOP <- data.frame(matrix(c("0", "0", "0", "0", "ASDE_m_441418",  
  "ASDE_m_441480", "ASDE_m_441675", "ASDE_m_441677"), 4, 2))  
colnames(idsRemovePOP) <- c("FID", "IID")
```

### Von den Verwandten den besser genotypisierten behalten

```
idsRemovePOPb <-  
REL_MAGICS23608REL_CallR[which(REL_MAGICS23608REL_CallR$PI_HAT <  
  0.9 & REL_MAGICS23608REL_CallR$PI_HAT > 0.1875), c("FID1",  
  "IID1", "FID2", "IID2")]
```

Das sind erstmal alle rausgesucht

=> for-Schleife über imiss, um die besser genotypisierten zu extrahieren

```
imiss =  
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_  
MAGICS_missing.imiss",  
           h = T)  
  
for (i in 1:nrow(idsRemovePOPb)) {  
  IID1 <- imiss[which(as.character(imiss$IID) ==  
as.character(idsRemovePOPb[i,  
                "IID1"]))], c("FID", "IID", "F_MISS")]  
  IID2 <- imiss[which(as.character(imiss$IID) ==  
as.character(idsRemovePOPb[i,  
                "IID2"]))], c("FID", "IID", "F_MISS")]  
  if (IID1$F_MISS > IID2$F_MISS) {  
    idsRemovePOP <- rbind(idsRemovePOP, IID1[1:2])  
  }  
  if (IID1$F_MISS == IID2$F_MISS) {  
    idsRemovePOP <- rbind(idsRemovePOP, IID1[1:2])  
  }  
  if (IID1$F_MISS < IID2$F_MISS) {  
    idsRemovePOP <- rbind(idsRemovePOP, IID2[1:2])  
  }  
}
```

diese zu den IDs von vorhin dazuschreiben

```
MAGICS_exclude <-  
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_  
MAGICS_imiss_IDs2exclude.txt",  
           sep = "\t", header = T)  
MAGICS_exclude <- rbind(MAGICS_exclude, idsRemovePOP)  
rm(idsRemovePOPb)  
rm(idsRemovePOP)
```

Gibt es noch zusätzliche Outlier?

=> durchschnittliche PI\_HAT pro ID berechnen

=> Originale ID-Definition pro Gruppe nehmen und Mittelwert einfügen

```
IDsMAGICS <-  
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype0  
ptiKielDecodeBGID_2keepMAGIC.txt",  
           header = F)  
colnames(IDsMAGICS) <- c("FID", "IID")  
IDsMAGICS$meanPI_HAT <- NA
```

```
for (i in 1:nrow(IDSMAGICS)) {
  IDSMAGICS[i, "meanPI_HAT"] <-
mean(REL_MAGICS23608REL_CallR[which(as.character(REL_MAGICS23608REL_CallR$
IID1) ==
  as.character(IDSMAGICS[i, "IID"]))], "PI_HAT"), na.rm = T)
}
head(IDSMAGICS)
uperB <- median(IDSMAGICS$meanPI_HAT, na.rm = T) + 3 *
IQR(IDSMAGICS$meanPI_HAT,
  na.rm = T)
lowerB <- median(IDSMAGICS$meanPI_HAT, na.rm = T) - 3 *
IQR(IDSMAGICS$meanPI_HAT,
  na.rm = T)
nrow(IDSMAGICS[which(IDSMAGICS$meanPI_HAT < lowerB | IDSMAGICS$meanPI_HAT
>
  uperB), c("FID", "IID")])
## [1] 1
```

diesen auch mit rausnehmen!

```
MAGICS_exclude <- rbind(MAGICS_exclude,
IDSMAGICS[which(IDSMAGICS$meanPI_HAT <
  lowerB | IDSMAGICS$meanPI_HAT > uperB), c("FID", "IID")])

write.table(MAGICS_exclude,
"/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS_IDs2
exclude.txt",
  sep = "\t", row.names = F, quote = F)
nrow(MAGICS_exclude)
## [1] 51
```

Insgesamt müssen also 51 IDs aus den Assoziationsrechnungen ausgeschlossen werden.

### Vorbereitung der neuen PLINK-Files nach individual QC

```
# ./plink --bfile
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS
# --remove
#
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS_IDs2e
xclude.txt
# --make-bed --out
#
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS_IDsRe
m
# --noweb
# ./plink --bfile
```

```
# /Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC
# --remove
#
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC_IDs2ex
clude.txt
# --make-bed --out
#
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC_IDsRem
# --noweb
```

+++++

## Marker QC starten

+++++

## 4. Missing Data Rate

```
# ./plink --bfile
#
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS_IDsRe
m
# --missing --out
#
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS_IDsRe
mMissing
# --noweb

# ./plink --bfile
#
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC_IDsRem
# --missing --out
#
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC_IDsRem
Missing
# --noweb
```

### filter alle SNPs mit mit $F_{MISS} > 0.05$ in MAGICS

```
MAGICSsnpsQC <-
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_
MAGICS_IDsRemMissing.lmiss",
  header = T)
head(MAGICSsnpsQC)

nrow(MAGICSsnpsQC[which(MAGICSsnpsQC$F_MISS > 0.05), ])
```

```
write.table(MAGICSnpsQC[which(MAGICSnpsQC$F_MISS > 0.05), "SNP"],  
"/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS_IDsRemMissing_SNPs2exclude.txt",  
row.names = F, quote = F, col.names = F)
```

#### filter alle SNPs mit F\_MISS > 0.05 in ISAAC

```
ISAACsnpsQC <-  
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC_IDsRemMissing.lmiss",  
header = T)  
head(ISAACsnpsQC)  
nrow(ISAACsnpsQC[which(ISAACsnpsQC$F_MISS > 0.05), ])  
# 6477  
write.table(ISAACsnpsQC[which(ISAACsnpsQC$F_MISS > 0.05), "SNP"],  
"/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC_IDsRemMissing_SNPs2exclude.txt",  
row.names = F, quote = F, col.names = F)
```

#### wieviele davon sind in beiden Populationen gleich?

```
length(intersect(ISAACsnpsQC[which(ISAACsnpsQC$F_MISS > 0.05),  
"SNP"], MAGICSnpsQC[which(MAGICSnpsQC$F_MISS > 0.05), "SNP"]))  
## [1] 6286
```

## 5. HWE und Genotypisierungsrate

#### Ausschluss der SNPs mit schlechter HWE oder zu geringer Genotypisierungsrate

```
# ./plink --bfile  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS_IDsRem  
# --geno 0.05 --hwe 0.0001 --make-bed --out  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_magics_Clean  
Data  
# --noweb  
  
# ./plink --bfile  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAAC_IDsRem  
# --geno 0.05 --hwe 0.0001 --make-bed  
# --  
out/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_isaac_Cle
```

```
anData
```

```
# --noweb
```

zu guter Letzt noch Files mit Cases und Controls erstellen.

```
# ./plink
```

```
# --
```

```
bfile/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_magics_CleanData
```

```
# --
```

```
bmerge/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_isaac_CleanData.bed/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_isaac_CleanData.bim/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_isaac_CleanData.fam
```

```
# --make-bed --out
```

```
#
```

```
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS_ISAAC_CleanData
```

```
# --noweb
```

## 6. Unterschiedliche Genotypisierungsrate zwischen Fällen und Kontrollen?

Ausschluss der SNPs mit zu großem Unterschied ( $P < 0.00001$ )

ISAAC vs MAGICS in einem Datensatz als Fälle und Kontrollen definieren

```
magics <-
```

```
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_magics_CleanData.fam",  
  header = F)
```

```
isaac <-
```

```
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_isaac_CleanData.fam",  
  header = F)
```

```
magics$pheno <- "mag"
```

```
isaac$pheno <- "isa"
```

```
magisa <- rbind(magics, isaac)
```

```
write.table(magisa[, c("V1", "V2", "pheno")],  
  "/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_magics_IIDF_ID.list",  
  row.names = F, col.names = F, quote = F, sep = "\t")
```

```
# ./plink --bfile  
#
```

```
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICS_ISAAC_CleanData
```

```
# --make-pheno
```



```
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_magics_IIDFI  
D.list  
# 'mag' --make-bed --keep  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/ID_study/MAGIC_ISAAC_  
SeverMildAsthma_IDS2keep.txt  
# --exclude  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_ISAACMAGICS_  
IDsRemMissing_ControlSNPs2Exclude.txt  
# --out  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICSvsISAA  
C  
# --noweb
```

#### –test missing in PLINK

```
# ./plink --noweb --bfile  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICSvsISAA  
C  
# --test-missing --out  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICSvsISAA  
C_IDSRemTestMissing
```

#### filter alle SNPs mit unterschiedlicher missing-rate ( $p < .00001$ ) in MAGIC vs ISAAC

```
missing_diff_MagicsvsIsaac <-  
read.table("/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_  
MAGICSvsISAAC_IDSRemTestMissing.missing",  
  header = T)  
nrow(missing_diff_MagicsvsIsaac[which(missing_diff_MagicsvsIsaac$P <  
  1e-05), ])  
fail_diffmiss_QC_magvsisa <-  
missing_diff_MagicsvsIsaac[which(missing_diff_MagicsvsIsaac$P <  
  1e-05), c("SNP")]  
write.table(fail_diffmiss_QC_magvsisa,  
  "/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/fail_diffmiss_QC_mag  
vsisa.txt",  
  row.names = F, col.names = F, quote = F, sep = "\t")  
# ./plink --noweb --bfile  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICSvsISAA  
C  
# --exclude
```

```
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/fail_diffmiss_QC_magv  
sis.txt  
# --geno 0.05 --hwe 0.0001 --make-bed --out  
#  
/Users/vincent/Documents/Uni/Medizin/Promotion/Daten/Genotype_MAGICSvsISAA  
C_cleanedData
```

## Ende der Quality Control

=>Diese Files können jetzt für die Analysen verwendet werden

## 7.4 Aufrufe Berechnungen Publikation 1 (*NPS\*NPSR1*)

### Anhang 4: NPSxNPSR1 Analysen

```
knitr::opts_chunk$set(echo = TRUE)
library(knitr)
opts_chunk$set(tidy.opts=list(width.cutoff=60),tidy=TRUE)
```

+++

#### Analyses for the replication of NPSxNPSR1 epistasis:

##### 1. Extraktion der SNPs

##### 2. Assoziation mit Asthma

##### 3. Epistasis der Gene

###### 3.1 Berechnung der Interaktionen in PLINK

###### 3.2 Berechnung der Konfidenzintervalle in R statistics

##### 4. Plots der Interaktionen

##### 5. MAFs from both cohorts for NPS\*NPSR1

+++++

+++++

#### 1. Extraktion der SNPs

Zunächst Extraktion aus dem regulären Datensatz, dann Ergänzung aus  
Imputationsdatensatz

```
# plink.exe --bfile
# B:\Mitarbeiter\Vincent\GWAS_allPhenoandGeno\GWAS_ALLRegeno_130319
# --hwe 0.0001 --extract
# B:\Mitarbeiter\Vincent\NPSxNPSR1\ExtractSNPs_NPSR1NPS.txt
# --recode --out
# B:\Mitarbeiter\Vincent\NPSxNPSR1\Data\GWASdata_SNPextract_NPSandNPSR1
# --tab --noweb
```

Datensatz hatte bereits Quality Control durchlaufen => ich muss nur noch das HWE in plink testen, nicht die Genotypisierungsraten, die Minor Allele Frequency, etc.

14 SNPs habe ich im regulären Datensatz

#### Im Imputations-Datensatz nachschauen:

```
# plink.exe --bfile
# B:\AG_KABESCH\Datenbanken_Studien\Datenmanagement\ISAAC_MAGICS\Datasets\
GWAS_MAGICS_ISAAC_HM2imputation\MAGIC_ISAAC_HM2imputation
# --hwe 0.0001 --extract
# B:\Mitarbeiter\Vincent\NPSxNPSR1\ExtractSNPs_NPSR1NPS.txt
# --recode --tab --out
# B:\Mitarbeiter\Vincent\NPSxNPSR1\Data\GWAS_Impudata_SNPextract_NPSandNPS
R1
# --noweb
```

die restlichen SNPs habe ich in diesem Datensatz

## 2. Assoziation mit Asthma berechnen (additiv und dominant)

#### Zunächst im regulären Datensatz

```
# plink.exe --file
# B:\Mitarbeiter\Vincent\NPSxNPSR1\Data\GWASdata_SNPextract_NPSandNPSR1
# --logistic --ci 0.95 --noweb --out
# B:\Mitarbeiter\Vincent\NPSxNPSR1\Results\NPSxNPSR1_LogAsthma_GWASData

# plink.exe --file
# B:\Mitarbeiter\Vincent\NPSxNPSR1\Data\GWASdata_SNPextract_NPSandNPSR1
# --logistic --ci 0.95 --dominant --noweb --out
# B:\Mitarbeiter\Vincent\NPSxNPSR1\Results\NPSxNPSR1_LogAsthma_GWASData_do
m
```

#### Dann noch die gleichen Berechnungen im Imputationsdatensatz

```
# plink.exe --file
# B:\Mitarbeiter\Vincent\NPSxNPSR1\Data\GWAS_Impudata_SNPextract_NPSandNPS
R1
# --logistic --ci 0.95 --noweb --out
# B:\Mitarbeiter\Vincent\NPSxNPSR1\Results\NPSxNPSR1_LogAsthma_ImpuDataHM

# plink.exe --file
# B:\Mitarbeiter\Vincent\NPSxNPSR1\Data\GWAS_Impudata_SNPextract_NPSandNPS
R1
# --logistic --ci 0.95 --dominant --noweb --out
# B:\Mitarbeiter\Vincent\NPSxNPSR1\Results\NPSxNPSR1_LogAsthma_ImpuDataHM_
dom
```

### 3. Epistasis der Gene berechnen

#### 3.1 Berechnung der Interaktionen in PLINK

Als erstes berechne ich die Epistasis in beiden Datensätzen

```
# plink.exe --file
# B:\Mitarbeiter\Vincent\NPSxNPSR1\Data\GWASdata_SNPextract_NPSandNPSR1
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .10 --noweb --out
# B:\Mitarbeiter\Vincent\NPSxNPSR1\Results\Epistasis_GWASData_NPSxNPSR1

# plink.exe --file
# B:\Mitarbeiter\Vincent\NPSxNPSR1\Data\GWAS_Impudata_SNPextract_NPSandNPSR1
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .10 --noweb --out
# B:\Mitarbeiter\Vincent\NPSxNPSR1\Results\Epistasis_ImpuDataHapMap_NPSxNPSR1
```

#### 3.2 Berechnung der Konfidenzintervalle in R statistics

Einlesen der Epistasis-Ergebnisse aus PLINK

```
Epistasis_Reg <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/NPSxNPSR1/Results/Epistasis_GWASData_NPSxNPSR1.epi.cc",
  header = T)
Epistasis_HM <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/NPSxNPSR1/Results/Epistasis_ImpuDataHapMap_NPSxNPSR1.epi.cc",
  header = T)
```

Zunächst muss ich dafür eine Funktion erstellen:

```
orci <- function(or) {
  or$beta <- log(or$OR)
  or$se <- abs(or$beta/sqrt(or$STAT))
  or$lower <- or$beta - 1.96 * or$se
  or$upper <- or$beta + 1.96 * or$se
  or$LOWER <- exp(or$lower)
  or$UPPER <- exp(or$upper)
  or$res <- paste(round(or$OR, 2), " (" , round(or$LOWER, 2),
    "-", round(or$UPPER, 2), ") ", round(or$P, 4), sep = "")
  return(or)
}
```

Dann kann ich die Konfidenzintervalle basierend auf der Funktion berechnen

```
or <- Epistasis_HM
Epistasis_HM_CI <- orci(or)
head(Epistasis_HM_CI)
##   CHR1      SNP1 CHR2      SNP2 OR_INT  STAT      P      beta
se
```

*Einfluss genetischer Interaktionen auf das Auftreten von Asthma und nächtlichem Asthma*  
(Doktorarbeit zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin)  
Vincent D. Gaertner, B.Sc.

```
## 1 7 rs1006392 7 rs714588 1.065 0.2959 0.58650 0.0629748 0.11576
95
## 2 7 rs1006392 7 rs2125404 1.658 3.6850 0.05491 0.5056121 0.26338
96
## 3 7 rs1006392 7 rs2168891 1.532 2.4150 0.12020 0.4265741 0.27449
59
## 4 7 rs1006392 7 rs1963499 1.540 1.9810 0.15930 0.4317824 0.30677
69
## 5 7 rs1006392 7 rs1419793 3.556 2.4780 0.11550 1.2686363 0.80590
99
## 6 7 rs1006392 7 rs2530547 1.108 0.6593 0.41680 0.1025566 0.12630
54
##          lower      upper      LOWER      UPPER      res
## 1 -0.16393350 0.2898831 0.8487985 1.336271 1.06 (0.85-1.34) 0.5865
## 2 -0.01063162 1.0218557 0.9894247 2.778346 1.66 (0.99-2.78) 0.0549
## 3 -0.11143792 0.9645861 0.8945469 2.623701 1.53 (0.89-2.62) 0.1202
## 4 -0.16950039 1.0330652 0.8440864 2.809665 1.54 (0.84-2.81) 0.1593
## 5 -0.31094708 2.8482197 0.7327527 17.257032 3.56 (0.73-17.26) 0.1155
## 6 -0.14500206 0.3501152 0.8650205 1.419231 1.11 (0.87-1.42) 0.4168
or <- Epistasis_Reg
Epistasis_Reg_CI <- orci(or)
head(Epistasis_Reg_CI)
##  CHR1      SNP1 CHR2      SNP2 OR_INT  STAT      P      beta
se
## 1 7 rs1006392 7 rs714588 1.112 0.7754 0.37860 0.10616020 0.1205
588
## 2 7 rs1006392 7 rs2530547 1.248 2.7280 0.09862 0.22154227 0.1341
326
## 3 7 rs1006392 7 rs887020 1.207 2.2940 0.12980 0.18813794 0.1242
166
## 4 7 rs1006392 7 rs1379928 1.062 0.1716 0.67870 0.06015392 0.1452
129
## 5 7 rs1006392 7 rs2609215 1.154 0.4210 0.51640 0.14323417 0.2207
525
## 6 7 rs1006392 7 rs2531840 1.238 2.9480 0.08601 0.21349717 0.1243
450
##          lower      upper      LOWER      UPPER      res
## 1 -0.13013500 0.3424554 0.8779769 1.408402 1.11 (0.88-1.41) 0.3786
## 2 -0.04135767 0.4844422 0.9594859 1.623269 1.25 (0.96-1.62) 0.0986
## 3 -0.05532662 0.4316025 0.9461761 1.539723 1.21 (0.95-1.54) 0.1298
## 4 -0.22446344 0.3447713 0.7989448 1.411667 1.06 (0.8-1.41) 0.6787
## 5 -0.28944068 0.5759090 0.7486822 1.778747 1.15 (0.75-1.78) 0.5164
## 6 -0.03021906 0.4572134 0.9702330 1.579666 1.24 (0.97-1.58) 0.086
```

### Abschließend kann ich die Ergebnisse speichern

```
write.table(Epistasis_HM_CI, "/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/NPSxNPSR1/Results/Epistasis_HMData1303_inclCI.txt",  
  quote = F, row.names = F, col.names = T, sep = "\t")  
write.table(Epistasis_Reg_CI, "/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/NPSxNPSR1/Results/Epistasis_GWASData1454_inclCI.txt",  
  quote = F, row.names = F, col.names = T, sep = "\t")
```

## 4. Plots der Interaktionen gewünscht

### Boxplot für die zwei Interaktionen, die replizieren

#### Zunächst Daten einlesen und formatieren

```
Impudata <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/NPSxNPSR1/Data/GWAS_Impudata_SNPextract_NPSandNPSR1.ped",  
  header = F, sep = "\t")  
map <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/NPSxNPSR1/Data/GWAS_Impudata_SNPextract_NPSandNPSR1.map",  
  header = F, sep = "\t")  
colnames(Impudata)[7:32] <- c("rs1006392", "rs714588", "rs2125404",  
  "rs2168891", "rs1963499", "rs1419793", "rs2530547", "rs887020",  
  "rs2530552", "rs1379928", "rs11770777", "rs2530566", "rs963218",  
  "rs2609215", "rs2531840", "rs323917", "rs324396", "rs740347",  
  "rs324981", "rs17199659", "rs10263447", "rs727162", "rs6972158",  
  "rs1931704", "rs10830123", "rs4751440")  
  
Impudata$asthma <- (Impudata$V6 - 1)  
Impudata$asthma[Impudata$asthma == -10] <- NA
```

#### Dann muss ich als nächstes die SNPs in ein 0-1-2 Format umkodieren

```
Impudata$rs10830123_012[Impudata$rs10830123 == "G G"] <- 0  
Impudata$rs10830123_012[Impudata$rs10830123 == "C G"] <- 1  
Impudata$rs10830123_012[Impudata$rs10830123 == "C C"] <- 2  
Impudata$rs10830123_012[Impudata$rs10830123 == "0 0"] <- NA  
  
homoMinor17199659 <- Impudata[which(Impudata$rs17199659 == "C C"),  
  ]  
hetero17199659 <- Impudata[which(Impudata$rs17199659 == "C T"),  
  ]  
homoMajor17199659 <- Impudata[which(Impudata$rs17199659 == "T T"),  
  ]
```

### Als nächstes lasse ich mir die Schätzer ( $\beta$ -Werte) ausgeben

```
resminor <- summary(glm(asthma ~ rs10830123_012, family = binomial,
  data = homoMinor17199659))
resminor$coef["rs10830123_012", "Estimate"]
## [1] 0.6520735
reshet <- summary(glm(asthma ~ rs10830123_012, family = binomial,
  data = hetero17199659))
reshet$coef["rs10830123_012", "Estimate"]
## [1] 0.4805917
resmajor <- summary(glm(asthma ~ rs10830123_012, family = binomial,
  data = homoMajor17199659))
resmajor$coef["rs10830123_012", "Estimate"]
## [1] -0.179816
```

### Zu guter Letzt schreibe ich eine Funktion, um die Ergebnisse in eine Tabelle einzufügen:

```
Results <- data.frame(matrix(NA, 3, 6))
colnames(Results) <- c("Estimate", "StdErr", "OR", "L95", "U95",
  "P")
row.names(Results) <- c("rs17199659_min", "rs17199659_het", "rs17199659_ma
j")
Results[1, 1] <- resminor$coef["rs10830123_012", "Estimate"]
Results[1, 2] <- resminor$coef["rs10830123_012", "Std. Error"]
Results[1, 3] <- round(exp(resminor$coef["rs10830123_012", "Estimate"]),
  4)
Results[1, 4] <- round(exp(resminor$coef["rs10830123_012", "Estimate"] -
  1.96 * resminor$coef["rs10830123_012", "Std. Error"]), 4)
Results[1, 5] <- round(exp(resminor$coef["rs10830123_012", "Estimate"] +
  1.96 * resminor$coef["rs10830123_012", "Std. Error"]), 4)
Results[1, 6] <- resminor$coef["rs10830123_012", "Pr(>|z|)"]
Results[2, 1] <- reshet$coef["rs10830123_012", "Estimate"]
Results[2, 2] <- reshet$coef["rs10830123_012", "Std. Error"]
Results[2, 3] <- round(exp(reshet$coef["rs10830123_012", "Estimate"]),
  4)
Results[2, 4] <- round(exp(reshet$coef["rs10830123_012", "Estimate"] -
  1.96 * reshet$coef["rs10830123_012", "Std. Error"]), 4)
Results[2, 5] <- round(exp(reshet$coef["rs10830123_012", "Estimate"] +
  1.96 * reshet$coef["rs10830123_012", "Std. Error"]), 4)
Results[2, 6] <- reshet$coef["rs10830123_012", "Pr(>|z|)"]
Results[3, 1] <- resmajor$coef["rs10830123_012", "Estimate"]
Results[3, 2] <- resmajor$coef["rs10830123_012", "Std. Error"]
Results[3, 3] <- round(exp(resmajor$coef["rs10830123_012", "Estimate"]),
  4)
Results[3, 4] <- round(exp(resmajor$coef["rs10830123_012", "Estimate"] -
  1.96 * resmajor$coef["rs10830123_012", "Std. Error"]), 4)
Results[3, 5] <- round(exp(resmajor$coef["rs10830123_012", "Estimate"] +
  1.96 * resmajor$coef["rs10830123_012", "Std. Error"]), 4)
```



```
Results[3, 6] <- resmajor$coef["rs10830123_012", "Pr(>|z|)"]
```

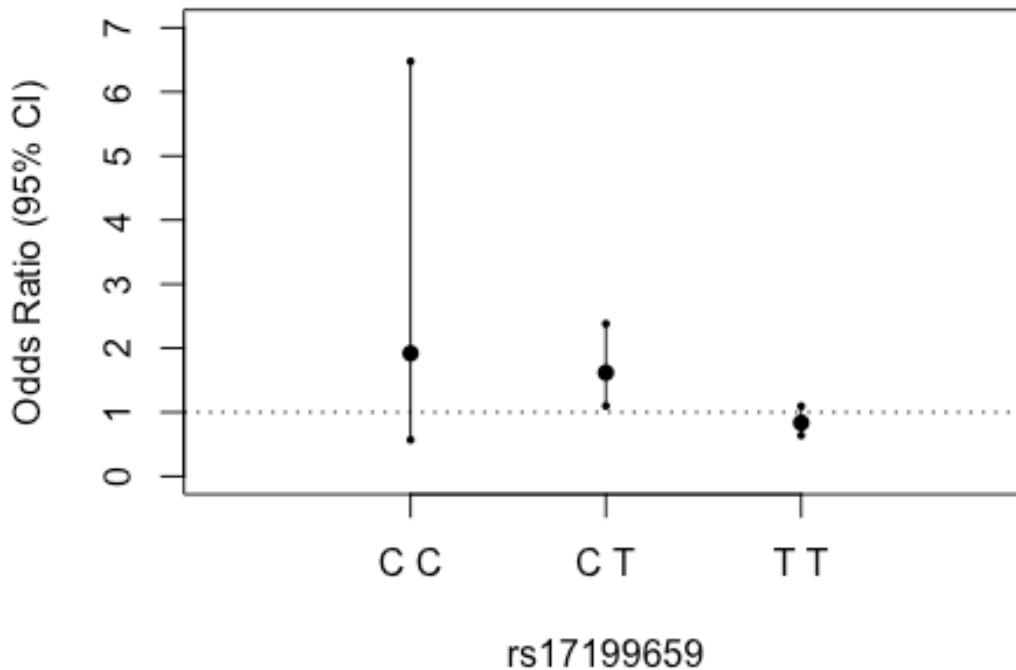
Results

```
##           Estimate   StdErr   OR   L95   U95       P
## rs17199659_min  0.6520735 0.6204073 1.9195 0.5690 6.4758 0.2932398
## rs17199659_het  0.4805917 0.1973592 1.6170 1.0983 2.3808 0.0148872
## rs17199659_maj -0.1798160 0.1379714 0.8354 0.6375 1.0948 0.1924775
```

**Abschließend Plotten der Ergebnisse für rs10830123\*rs17199659:**

```
plot(Results$OR, pch = 16, main = "Effect of rs10830123*rs17199659 on asthma",
     xlab = "rs17199659", xaxt = "n", xlim = c(0, 4), ylim = c(0, 7),
     ylab = "Odds Ratio (95% CI)")
points(Results$L95, pch = 16, cex = 0.5)
points(Results$U95, pch = 16, cex = 0.5)
abline(h = 1, lty = 3) #suggestive Line
segments(1, Results[1, "L95"], 1, Results[1, "U95"])
segments(2, Results[2, "L95"], 2, Results[2, "U95"])
segments(3, Results[3, "L95"], 3, Results[3, "U95"])
axis(1, at = 1:3, labels = c("C C", "C T", "T T"))
```

### Effect of rs10830123\*rs17199659 on asthma



## Das gleiche Procedere auch noch für die zweite relevante Interaktion rechnen

### SNP umkodieren zu 0-1-2

```
Impudata$rs2609215_012[Impudata$rs2609215 == "T T"] <- 0
Impudata$rs2609215_012[Impudata$rs2609215 == "C T"] <- 1
Impudata$rs2609215_012[Impudata$rs2609215 == "C C"] <- 2
Impudata$rs2609215_012[Impudata$rs2609215 == "0 0"] <- NA

homoMinor4751440 <- Impudata[which(Impudata$rs4751440 == "C C"),
]
hetero4751440 <- Impudata[which(Impudata$rs4751440 == "C G"),
]
homoMajor4751440 <- Impudata[which(Impudata$rs4751440 == "G G"),
]

resminor2 <- summary(glm(asthma ~ rs2609215_012, family = binomial,
  data = homoMinor4751440))
reshet2 <- summary(glm(asthma ~ rs2609215_012, family = binomial,
  data = hetero4751440))
resmajor2 <- summary(glm(asthma ~ rs2609215_012, family = binomial,
  data = homoMajor4751440))
```

### Ausgabe der Schätzer ( $\beta$ -Werte)

```
resminor2$coef["rs2609215_012", "Estimate"]
## [1] 1.714798
reshet2$coef["rs2609215_012", "Estimate"]
## [1] 0.1885677
resmajor2$coef["rs2609215_012", "Estimate"]
## [1] -0.1642199
```

### Einfügen der Ergebnisse in eine Tabelle

```
Results <- data.frame(matrix(NA, 3, 6))
colnames(Results) <- c("Estimate", "StdErr", "OR", "L95", "U95",
  "P")
row.names(Results) <- c("rs4751440_min", "rs4751440_het", "rs4751440_maj")
Results[1, 1] <- resminor2$coef["rs2609215_012", "Estimate"]
Results[1, 2] <- resminor2$coef["rs2609215_012", "Std. Error"]
Results[1, 3] <- round(exp(resminor2$coef["rs2609215_012", "Estimate"]),
  4)
Results[1, 4] <- round(exp(resminor2$coef["rs2609215_012", "Estimate"] -
  1.96 * resminor2$coef["rs2609215_012", "Std. Error"]), 4)
Results[1, 5] <- round(exp(resminor2$coef["rs2609215_012", "Estimate"] +
  1.96 * resminor2$coef["rs2609215_012", "Std. Error"]), 4)
Results[1, 6] <- resminor2$coef["rs2609215_012", "Pr(>|z|)"]
Results[2, 1] <- reshet2$coef["rs2609215_012", "Estimate"]
Results[2, 2] <- reshet2$coef["rs2609215_012", "Std. Error"]
```

```
Results[2, 3] <- round(exp(reshet2$coef["rs2609215_012", "Estimate"]),
  4)
Results[2, 4] <- round(exp(reshet2$coef["rs2609215_012", "Estimate"] -
  1.96 * reshet2$coef["rs2609215_012", "Std. Error"]), 4)
Results[2, 5] <- round(exp(reshet2$coef["rs2609215_012", "Estimate"] +
  1.96 * reshet2$coef["rs2609215_012", "Std. Error"]), 4)
Results[2, 6] <- reshet2$coef["rs2609215_012", "Pr(>|z|)"]
Results[3, 1] <- resmajor2$coef["rs2609215_012", "Estimate"]
Results[3, 2] <- resmajor2$coef["rs2609215_012", "Std. Error"]
Results[3, 3] <- round(exp(resmajor2$coef["rs2609215_012", "Estimate"]),
  4)
Results[3, 4] <- round(exp(resmajor2$coef["rs2609215_012", "Estimate"] -
  1.96 * resmajor2$coef["rs2609215_012", "Std. Error"]), 4)
Results[3, 5] <- round(exp(resmajor2$coef["rs2609215_012", "Estimate"] +
  1.96 * resmajor2$coef["rs2609215_012", "Std. Error"]), 4)
Results[3, 6] <- resmajor2$coef["rs2609215_012", "Pr(>|z|)"]
```

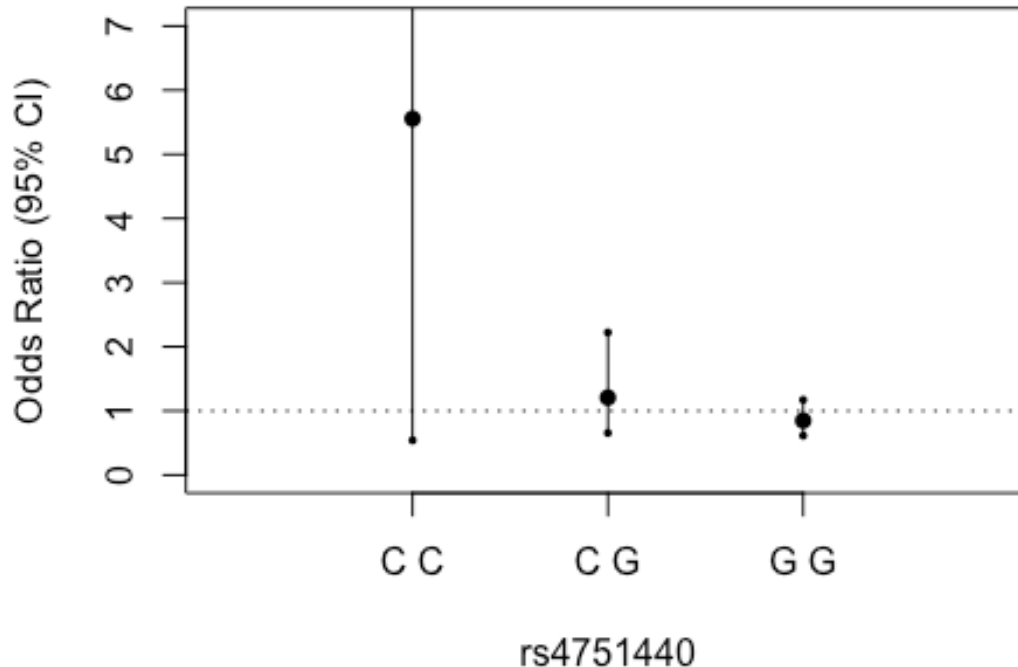
Results

##	Estimate	StdErr	OR	L95	U95	P
## rs4751440_min	1.7147984	1.1878860	5.5556	0.5415	57.0002	0.1488595
## rs4751440_het	0.1885677	0.3114265	1.2075	0.6558	2.2232	0.5448489
## rs4751440_maj	-0.1642199	0.1648268	0.8486	0.6143	1.1722	0.3190956

#### Plotten der Ergebnisse für rs2609215\*rs4751440

```
plot(Results$OR, pch = 16, main = "Effect of rs2609215*rs4751440 on asthma
",
  xlab = "rs4751440", xaxt = "n", xlim = c(0, 4), ylim = c(0,
  7), ylab = "Odds Ratio (95% CI)")
points(Results$L95, pch = 16, cex = 0.5)
points(Results$U95, pch = 16, cex = 0.5)
abline(h = 1, lty = 3) #suggestive line
segments(1, Results[1, "L95"], 1, Results[1, "U95"])
segments(2, Results[2, "L95"], 2, Results[2, "U95"])
segments(3, Results[3, "L95"], 3, Results[3, "U95"])
axis(1, at = 1:3, labels = c("C C", "C G", "G G"))
```

### Effect of rs2609215\*rs4751440 on asthma



## 5. MAFs from both cohorts for NPS\*NPSR1

Dies mache ich, um die Vergleichbarkeit der Datensätze auf einer genetischen Ebene zu demonstrieren

### Extrahieren der relevanten SNPs

```
BAMSEasthma <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/RORAxNPSR1/results/Replication/Replication_BAMSE/asthma.MAP",  
  header = F, sep = "\t")  
write.table(BAMSEasthma$V2, "/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/NPSxNPSR1/ExtractSNPs4MAFcalculation_170216.txt",  
  quote = F, row.names = F, col.names = T, sep = "\t")
```

### Berechnung der MAF in BAMSE und im gesamten MAGIC/ISAAC-Datensatz, sowie in ISAAC alleine

```
# ./plink --file  
# /Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/BAMSEdata_ALLSNPs4Calculation  
# --map3 --allow-no-sex --freq --out  
# /Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/NPSxNPSR1/NPSandNPSR1_MAF_BAMSE  
# --noweb
```

*Einfluss genetischer Interaktionen auf das Auftreten von Asthma und nächtlichem Asthma*  
(Doktorarbeit zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin)  
Vincent D. Gaertner, B.Sc.

```
# ./plink --noweb --file
# /Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/NPSxNPSR1/Data/GWAS_Impudata_SN
Pextract_NPSandNPSR1
# --freq --out
# /Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/NPSxNPSR1/NPSandNPSR1_MAF_Imput
Data

# ./plink --noweb --file
# /Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/NPSxNPSR1/Data/GWAS_Impudata_SN
Pextract_NPSandNPSR1
# --freq --keep
# /Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/NPSxNPSR1/NPSxNPSR1_MAFcalc_ISA
AC2keep.txt
# --out
# /Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/NPSxNPSR1/NPSandNPSR1_MAF_Imput
Data_ISAAConly
```

## 7.5 Aufrufe Berechnungen Publikation 2 (*RORA*\**NPSR1*)

### Anhang: RORAxNPSR1 Analysen

```
knitr::opts_chunk$set(echo = TRUE)
library(knitr)
opts_chunk$set(tidy.opts=list(width.cutoff=60),tidy=TRUE)
```

#### Analyses for the RORAxNPSR1 epistasis:

#### 1. Definition und Vorbereitung der Phänotypen

#### 2. Extraktion der SNPs

2.1 Extraktion der SNPs aus Acevedo et al

2.2 Extraktion von weiteren Asthma-assoziierten SNPs (aus Literatursuche)

2.3 Verbindung der Files

#### 3. 1000 Genomes Imputation

#### 4. LD Plots

#### 5. Assoziationsanalysen

5.1 Asthma

5.2 Nocturnal Symptoms

#### 6. Interaktionsanalysen

6.1 Asthma

6.2 Nocturnal Symptoms

6.3 Asthma ohne nächtliche Symptome

#### 7. Analysen zu Schweregrad des Asthma

7.1 Extraktion der relevanten Variablen

7.2 Erstellung der Variable AsthmaSeverity

7.3 Epistasis auf den Phänotyp "AsthmaSeverity"

#### 8. BAMSE

8.1 Datenaufbereitung

8.2 Assoziationsanalysen

8.3 Interaktionsanalysen

8.4 Berechnung der Konfidenzintervalle

#### 9. Plots

+++

## 1. Definition und Vorbereitung der Phänotypen

### Einlesen der vorhandenen Datensätze

```
pheno <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20140228.dat",  
  header = T, sep = "\t")
```

```
load("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/GWAS_allPhenoandGeno/Isaac_MDLrecode.RData")
```

```
magics <- read.csv("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/GWAS_allPhenoandGeno/magics_111114_nm.csv")
```

### Extraktion der Variable Anzahl nächtlicher Symptome

```
pheno_isa <- merge(pheno, Isaac_MDLrecode[, c("LABNR", "KEUAUF12")],  
  by.x = "GENID", by.y = "LABNR")  
phenoMagics <- merge(pheno, magics[, c("ID_num", "A05")], by.x = "GENID",  
  by.y = "ID_num")
```

```
phenoMagics$NocturnalSymptoms <- phenoMagics$A05  
pheno_isa$NocturnalSymptoms <- pheno_isa$KEUAUF12  
phenoMagics$A05 <- NULL  
pheno_isa$KEUAUF12 <- NULL
```

```
phenoAll <- rbind(phenoMagics, pheno_isa)
```

### neue Variable für den gesamten Datensatz erstellen

```
phenoAll$NocturnalSymptoms_yesno <- ifelse(phenoAll$NocturnalSymptoms >  
  1, 1, NA)  
phenoAll$NocturnalSymptoms_yesno <- ifelse(phenoAll$NocturnalSymptoms ==  
  1, 0, phenoAll$NocturnalSymptoms_yesno)
```

```
nrow(phenoAll[which(phenoAll$NocturnalSymptoms_yesno == 1), ])  
nrow(phenoAll[which(phenoAll$NocturnalSymptoms_yesno == 0), ])  
# zahlen stimmen mit vorher gefundenen überein => variable  
# erfolgreich erstellt.
```

```
phenoAllsorted <- phenoAll[, c(2, 3, 1, 4:30)]  
write.table(phenoAllsorted, "/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20150625.dat",  
  row.names = FALSE, quote = FALSE, col.names = TRUE, sep = "\t")
```

```
AsthmaExclude <- phenoAll[which(phenoAll$NocturnalSymptoms_yesno ==  
  1 & phenoAll$asthma == 1), c("FID", "IID")]
```

```
write.table(AsthmaExclude, "/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/RORAxNPSR1/Data/IsaacAsthmatics2Exclude.txt",  
           quote = F, row.names = F, col.names = F, sep = "\t")
```

## Überprüfung und Erweiterung der Phänotypen

```
pheno <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20150625.dat",  
                  header = T, sep = "\t")
```

```
# Anzahl Nocturnal Asthmatics
```

```
nrow(pheno[which(pheno$NocturnalSymptoms_yesno == 1), ])
```

```
# Anzahl Patienten ohne nächtliche Symptome, aber mit Asthma:
```

```
nrow(pheno[which(pheno$NocturnalSymptoms_yesno == 0 & pheno$asthma ==  
                2), ])
```

```
pheno$NAvsAsth <- NA
```

```
pheno$NAvsAsth[which(pheno$NocturnalSymptoms_yesno == 1)] <- 1
```

```
pheno$NAvsAsth[which(pheno$NocturnalSymptoms_yesno == 0 & pheno$asthma ==  
                    2)] <- 0
```

```
write.table(pheno, "/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20150823.dat",  
           sep = "\t", row.names = F, quote = F, col.names = T)
```

## 2. Extraktion der relevanten SNPs

### 2.1 Extraktion der SNPs aus Acevedo et al

Unter Ausschluss derjenigen Probanden mit nächtlichen Symptomen, aber ohne Asthma-Diagnose NB: außer HWE keine weitere QC nötig

```
# plink.exe --bfile  
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/GWAS_ALLRegeno_130319 --hwe  
# 0.0001 --remove  
# /.../RORAxNPSR1/Data/IsaacAsthmatics2Exclude.txt --extract  
# /.../RORAxNPSR1/RORAxNPSR1_SNPs2extract_Acevedo_RegularAndImput.txt  
# --recode --out  
# /.../RORAxNPSR1/Data/GWASdata_ohneISAACNoct_RORAandNPSR1_AcevedoSNPsextract  
# --tab --noweb
```

17 von 43 SNPs extrahiert

Das gleiche im Imputations-Datensatz:



```
# ./plink --bfile
# /srv/Data/imputation_HM2/MAGIC_ISAAC_HM2imputation --hwe
# 0.0001 --remove
# /.../ROrAxNPSR1/Data/IsaacAsthmatics2Exclude.txt --extract
# /.../ROrAxNPSR1/ROrAxNPSR1_SNPs2extract_Acevedo_RegularAndImput.txt
# --recode --tab --out
# /.../ROrAxNPSR1/Data/GWAS_Imputata_SNPextract_AcevedoALL
# --noweb
```

restliche SNPs hierüber

## 2.2 Extraktion von weiteren Asthma-assoziierten SNPs (aus Literatursuche)

paper von: Kormann / Melen / Blakey / Hersh / Castro-Giner

Original- und Imputationsdatensatz

```
# plink.exe --bfile
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/GWAS_ALLRegeno_130319 --hwe
# 0.0001 --remove
# /.../ROrAxNPSR1/Data/IsaacAsthmatics2Exclude.txt --extract
# /.../ROrAxNPSR1/ROrAxNPSR1_SNPs2extract_NPSR1Asthma_fromLiterature.txt
# --recode --out
# /.../ROrAxNPSR1/Data/GWASdata_NPSR1AsthmaSNPs_oISA_SNPextract
# --tab --noweb

# ./plink --bfile
# /srv/Data/imputation_HM2/MAGIC_ISAAC_HM2imputation --hwe
# 0.0001 --remove
# /.../ROrAxNPSR1/Data/IsaacAsthmatics2Exclude.txt --extract
# /.../ROrAxNPSR1/ROrAxNPSR1_SNPs2extract_NPSR1Asthma_fromLiterature.txt
# --recode --tab --out
# /.../ROrAxNPSR1/Data/GWAS_Imputata_NPSR1AsthmaSNPs_oISA_SNPextract
# --noweb
```

=> alle relevanten SNPs extrahiert

## 2.3 Verbindung der Files

```
# plink.exe --file
# /.../ROrAxNPSR1/Data/GWASdata_ohneISAACNoct_ROrAandNPSR1_AcevedoSNPsextr
act
# --merge
# /.../ROrAxNPSR1/Data/GWASdata_NPSR1AsthmaSNPs_oISA_SNPextract.ped
# /.../ROrAxNPSR1/Data/GWASdata_NPSR1AsthmaSNPs_oISA_SNPextract.map
# --recode --out
# /.../ROrAxNPSR1/Data/GWASdata_ALLSNPs4Calculation_oISA
# --noweb 26 SNPs passt
```

```
# ./plink --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/GWAS_Impudata_SNPextract_AcevedoALL
# --merge
# /.../RORAxNPSR1/Data/GWAS_Impudata_NPSR1AsthmaSNPs_oISA_SNPextract.ped
# /.../RORAxNPSR1/Data/GWAS_Impudata_NPSR1AsthmaSNPs_oISA_SNPextract.map
# --recode --out
# /.../RORAxNPSR1/Data/GWASimputdata_ALLSNPs4Calculation_oISA
# --noweb
```

55 SNPs => passt

### 3. 1000 Genomes Imputation

#### 3.1 Transformation der Imputationsdaten in PLINK-Format

```
# cd /.../Arbeit/RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/

# chmod u+x ./dose2plink.pl

# ./dose2plink.pl -dose
# /.../Arbeit/AG_Kabesch/RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/Vinchr7_24
SNPs.dose
# -info
# //.../Arbeit/AG_Kabesch/RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/Vinchr7_2
4SNPs.mlinfo
# -out
# //.../Arbeit/AG_Kabesch/RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/Vinchr7_2
4SNPs_4PLink
# -gz 0

# cd /home/vincent/ p-link --noweb --dosage
# //.../Arbeit/AG_Kabesch/RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/Vinchr7_2
4SNPs_4PLink.pdat
# format=1 --fam
# //.../Arbeit/AG_Kabesch/RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/Vinchr7_2
4SNPs_4PLink.pfam
# --remove
# //.../Arbeit/AG_Kabesch/RORAxNPSR1/Data/IsaacAsthmatics2Exclude.txt
# --logistic --ci 0.95 --pheno
# //.../Arbeit/AG_Kabesch/GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20130
318.txt
# --pheno-name asthma --covar
# //.../Arbeit/AG_Kabesch/GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20130
318.txt
```

```
# --covar-name sex,age --hide-covar --out
# ../../Arbeit/AG_Kabesch/RORAxNPSR1/results/RORAandNPSR1_Chr7_1kGImputation_LogRegAsthma_CovarSexAge_ohneIsaacNoct
```

Direkte Assoziationsanalysen gehen, aber Epistasis-Analysen nicht

### GCTA (Version 1.24) als Möglichkeit, die Dosage Daten in ein Binary Format umzuwandeln

```
# cd /srv/Data/software/GCTA/GCTA124/

# ./gcta64 --dosage-mach
# ../../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/Vinchr7_24SNPs.mldose
# ../../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/Vinchr7_24SNPs.mlinfo
# --make-bed --out
# ../../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_Chr7

# ./gcta64 --dosage-mach
# ../../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/Vinchr15_35SNPs.mldose
# ../../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/Vinchr15_35SNPs.mlinfo
# --make-bed --out
# ../../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_Chr15
```

bed, bim und fam Files erstellt, aber in Fam nur BG\_ID, kein Geschlecht, kein Asthma-status, etc.

### Fam-File aktualisieren

```
# cd /home/mhh-kabesch/softw/plink-1.07-x86_64/

# ./plink --noweb --bfile
# ../../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_Chr7
# --bmerge
# ../../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_Chr15.bed
# ../../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_Chr15.bim
# ../../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_Chr15.fam
# --remove ../../RORAxNPSR1/Data/IsaacAsthmatics2Exclude.txt
# --make-bed --out
# ../../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_bothChromosomes_oISA

# ./plink --noweb --bfile
# ../../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_bothChromosomes_oISA
# --update-sex
# ../../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/GWAS_updateSex.txt
# --make-bed --out
# ../../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_bothChromosomes_oISA_updateSex
```

```
# ./plink --noweb --bfile
# /.../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_Chr7
# --bmerge
# /.../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_Chr15.bed
# /.../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_Chr15.bim
# /.../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_Chr15.fam
# --make-bed --out
# /.../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_bothChrom
osomes_mISA

# ./plink --noweb --bfile
# /.../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_bothChrom
osomes_mISA
# --update-sex
# /.../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/GWAS_updateSex.txt
# --make-bed --out
# /.../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_bothChrom
osomes_mISA_updateSex

# ./plink --noweb --bfile
# /.../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_bothChrom
osomes_oISA_updateSex
# --update-map
# /.../RORAxNPSR1/Data/UpdateMap_1kGImputation_bothChr.txt
# --make-bed --out
# /.../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_bothChrom
osomes_oISA_updateSexMap
```

#### **MAF anschauen zum Vergleich mit Originaldaten**

```
# ./plink --bfile
# /.../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_bothChrom
osomes_oISA_updateSex
# --freq --out
# /.../RORAxNPSR1/Results/RORAandNPSR1_MAF_1kGImputation
# --noweb

# plink.exe --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/GWASdata_ALLSNPs4Calculation_oISA
# --freq --out
# /.../RORAxNPSR1/Results/RORAandNPSR1_MAF_RegularData
# --noweb
```

1000 Genomes Datensatz mit allen relevanten SNPs erstellt. Dieser ist nun noch genauer als die vorher verwendeten Imputationsdaten

## 4. LD Plots

Ohne ausgeschlossene Patienten: Asthmatics/Patients without information on nocturnal symptoms

### Erstellung der Files für HaploView

```
pheno <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20170617.txt",
  header = T, sep = "\t")

write.table(pheno[!is.na(pheno$NocturnalSymptoms_yesno), 1:2],
  file = "/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/KeepPatients_wNAS.txt",
  row.names = F, col.names = F, sep = "\t", quote = F)

# plink.exe --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/GWASdata_ALLSNPs4Calculation_oISA
# --chr 7 --recodeHV --out
# /.../RORAxNPSR1/Data/GWASData4Haploview_NPSR1 --noweb

# plink.exe --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/GWASdata_ALLSNPs4Calculation_oISA
# --chr 15 --recodeHV --out
# /.../RORAxNPSR1/Data/GWASData4Haploview_RORA --noweb

# ./plink --bfile
# /.../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_bothChromosomes_oISA_updateSexMap
# --extract /.../RORAxNPSR1/Data/SNPs4Calc_NPSR1.txt
# --recodeHV --keep
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/KeepPatients_AsthmaNAS.txt
# --out
# /.../RORAxNPSR1/Data/Imputationdata_1kG_4Haploview_NPSR1_AsthmaNAS
# --noweb

# ./plink --bfile
# /.../RORAxNPSR1/Data/DosageData_1000Genomes/ImputationData_1kG_bothChromosomes_oISA_updateSexMap
# --extract /.../RORAxNPSR1/Data/SNPs4Calc_RORA.txt
# --recodeHV --keep
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/KeepPatients_AsthmaNAS.txt
# --out
```

```
# ../../RORAxNPSR1/Data/Imputationdata_1kG_4HapLoview_RORA_AsthmaNAS  
# --noweb
```

## 5. Assoziationsanalysen

### 5.1 Asthma

```
# ./plink --noweb --file  
# ../../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASdata_ALLSNPs4Calculation_oISA  
# --logistic --ci 0.95 --covar  
# ../../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat  
# --covar-name sex,age --hide-covar --out  
# ../../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/LogRegAsthma_MagIsa_143  
2  
  
# ./plink --noweb --file  
# ../../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASimputdata_ALLSNPs4Calculation_oISA  
A  
# --logistic --ci 0.95 --covar  
# ../../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat  
# --covar-name sex,age --hide-covar --out  
# ../../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/LogRegAsthma_MagIsaImpu  
t_1289  
  
# ./plink --noweb --bfile  
# ../../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/ImputationData_1kG_bothChromosomes_oI  
SA_updateSexMap  
# --logistic --ci 0.95 --pheno  
# ../../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat  
# --pheno-name asthma --covar  
# ../../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat  
# --covar-name sex,age --hide-covar --out  
# ../../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/LogRegAsthma_MagIsa1KG_  
1289
```

### 5.2 nocturnal symptoms

```
# ./plink --noweb --file  
# ../../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASdata_ALLSNPs4Calculation_oISA  
# --logistic --ci 0.95 --pheno  
# ../../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat  
# --pheno-name NAvsSuper --1 --covar  
# ../../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat  
# --covar-name sex,age --hide-covar --out  
# ../../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/LogRegNocturnalvsSuper_  
MagIsa_852
```

```
# ./plink --noweb --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASimputdata_ALLSNPs4Calculation_oISA
# --logistic --ci 0.95 --pheno
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat
# --pheno-name NAvsSuper --1 --covar
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat
# --covar-name sex,age --hide-covar --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/LogRegNocturnalvsSuper_
MagIsaImput_794

# ./plink --noweb --bfile
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/ImputationData_1kG_bothChromosomes_oISA
SA_updateSexMap
# --logistic --ci 0.95 --pheno
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat
# --pheno-name NAvsSuper --1 --covar
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat
# --covar-name sex,age --hide-covar --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/LogRegNocturnalvsSuper_
MagIsa1KG_794
```

## 6. Interaktionsanalysen

### 6.1 Asthma

#### ## Regulärer Datensatz

```
# ./plink --noweb --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASdata_ALLSNPs4Calculation_oISA
# --epistasis --epi1 .10 --epi2 .05 --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthma_MagIsa_
1432_sigRes
```

```
# ./plink --noweb --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASdata_ALLSNPs4Calculation_oISA
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .05 --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthma_MagIsa_
1432_allRes
```

#### ## Imputations-Datensatz

```
# ./plink --noweb --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASimputdata_ALLSNPs4Calculation_oISA
```



```
A
# --epistasis --epi1 .10 --epi2 .05 --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthma_MagIsaI
mput_1289_sigRes

# ./plink --noweb --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASimputdata_ALLSNPs4Calculation_oIS
A
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .05 --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthma_MagIsaI
mput_1289_allRes

## 1000 Genomes Imputation

# ./plink --noweb --bfile
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/ImputationData_1kG_bothChromosomes_oI
SA_updateSexMap
# --epistasis --epi1 .10 --epi2 .05 --pheno
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat
# --pheno-name asthma --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthma_MagIsa1
KG_1432_sigRes

# ./plink --noweb --bfile
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/ImputationData_1kG_bothChromosomes_oI
SA_updateSexMap
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .05 --pheno
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat
# --pheno-name asthma --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthma_MagIsa1
KG_1432_allRes
```

Das sind jeweils alle Interaktionsanalysen (einmal nur signifikante Ergebnisse, einmal für die Erstellung des kompletten Überblicks alle Ergebnisse)

## 6.2 Nächtliches Asthma

### ## Regulärer Datensatz

```
# ./plink --noweb --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASdata_ALLSNPs4Calculation_oISA
# --epistasis --epi1 .10 --epi2 .05 --pheno
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat
# --pheno-name NAVsSuper --1 --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisNocturnalvsSup
```



```
er_MagIsa_852_sigRes
```

```
# ./plink --noweb --file  
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASdata_ALLSNPs4Calculation_oISA  
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .05 --pheno  
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat  
# --pheno-name NAVsSuper --1 --out  
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisNocturnalvsSuper_MagIsa_852_allRes
```

```
## Imputations-Datensatz
```

```
# ./plink --noweb --file  
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASimputdata_ALLSNPs4Calculation_oISA  
# --epistasis --epi1 .10 --epi2 .05 --pheno  
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat  
# --pheno-name NAVsSuper --1 --out  
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisNocturnalvsSuper_MagIsaImput_794_sigRes
```

```
# ./plink --noweb --file  
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASimputdata_ALLSNPs4Calculation_oISA  
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .05 --pheno  
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat  
# --pheno-name NAVsSuper --1 --out  
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisNocturnalvsSuper_MagIsaImput_794_allRes
```

```
## 1000 Genomes Imputation
```

```
# ./plink --noweb --bfile  
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/ImputationData_1kG_bothChromosomes_oISA_updateSexMap  
# --epistasis --epi1 .10 --epi2 .05 --pheno  
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat  
# --pheno-name NAVsSuper --1 --out  
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisNocturnalvsSuper_MagIsa1KG_794_sigRes
```

```
# ./plink --noweb --bfile  
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/ImputationData_1kG_bothChromosomes_oI
```

```
SA_updateSexMap
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .05 --pheno
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat
# --pheno-name NAVsSuper --1 --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisNocturnalvsSuper_MagIsa1KG_794_allRes
```

### 6.3 Asthma ohne nächtliche Symptome vs Kontrollen

#### ## Regulärer Datensatz

```
# ./plink --noweb --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASdata_ALLSNPs4Calculation_oISA
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .05 --pheno
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat
# --pheno-name AsthvsSuper --1 --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthmavsSuper_MagIsa_852_allRes
```

#### ## Imputations-Datensatz

```
# ./plink --noweb --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASimputdata_ALLSNPs4Calculation_oISA
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .05 --pheno
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat
# --pheno-name AsthvsSuper --1 --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthmavsSuper_MagIsaImput_794_allRes
```

#### ## 1000 Genomes Imputation

```
# ./plink --noweb --bfile
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/ImputationData_1kG_bothChromosomes_oISA_updateSexMap
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .05 --pheno
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat
# --pheno-name AsthvsSuper --1 --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthmavsSuper_MagIsa1KG_794_allRes
```

### 6.4 Berechnung der Konfidenzintervalle

#### Einlesen der PLINK-Outputs

```
Epistasis_1kG <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthma_MagIsa1KG_1432_all
```

```
Res.epi.cc",
  header = T)
Epistasis_Regular <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/
RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthma_MagIsa_1432_a
llRes.epi.cc",
  header = T)

Epistasis_1kG_noct <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch
/RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisNocturnalvsSuper_Mag
Isa1KG_794_allRes.epi.cc",
  header = T)
Epistasis_Regular_noct <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kab
esch/RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisNocturnalvsSuper
_MagIsa_852_allRes.epi.cc",
  header = T)
```

### Erstellen einer Funktion

```
orci <- function(or) {
  or$beta <- log(or$OR)
  or$se <- abs(or$beta/sqrt(or$STAT))
  or$lower <- or$beta - 1.96 * or$se
  or$upper <- or$beta + 1.96 * or$se
  or$LOWER <- exp(or$lower)
  or$UPPER <- exp(or$upper)
  or$res <- paste(round(or$OR, 2), " (", round(or$LOWER, 2),
    "-", round(or$UPPER, 2), ") ", round(or$P, 4), sep = "")
  return(or)
}
```

### Berechnung CI und Output

```
or <- Epistasis_1kG
Epistasis_1kG_CI <- orci(or)

or <- Epistasis_Regular
Epistasis_Regular_CI <- orci(or)

or <- Epistasis_1kG_noct
Epistasis_1kG_noct_CI <- orci(or)

or <- Epistasis_Regular_noct
Epistasis_Regular_noct_CI <- orci(or)

write.table(Epistasis_1kG_CI, "/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/RO
RAXNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthma_MagIsa1KG_1432_a
llRes_inclCI.txt",
  quote = F, row.names = F, col.names = T, sep = "\t")
```

```
write.table(Epistasis_Regular_CI, "/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthma_MagIsa_1432_allRes_inclCI.txt",
  quote = F, row.names = F, col.names = T, sep = "\t")
write.table(Epistasis_1kG_noct_CI, "/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisNocturnalvsSuper_MagIsa1KG_794_allRes_inclCI.txt",
  quote = F, row.names = F, col.names = T, sep = "\t")
write.table(Epistasis_Regular_noct_CI, "/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisNocturnalvsSuper_MagIsa_852_allRes_inclCI.txt",
  quote = F, row.names = F, col.names = T, sep = "\t")
```

## 7. Analysen zu Schweregrad des Asthma

Fragestellung: Ist der Effekt hauptsächlich getriggert durch den Schweregrad des Asthma oder unabhängig davon?

### 7.1 Extraktion der relevanten Variablen

```
load("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/GWAS_allPhenoandGeno/Isaac_MDLrecode.RData")
magics <- read.csv("/Users/vincent/Documents/Work/AG_KABESCH/GWAS_allPhenoandGeno/magics_111114_nm.csv")

pheno <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20160105.dat",
  header = T, sep = "\t")

pheno2 <- merge(pheno, magics[, c("ID_num", "B03", "B04", "B05", "B06")], by.x = "GENID", by.y = "ID_num", all.x = T)

pheno3 <- merge(pheno2, Isaac_MDLrecode[, c("LABNR", "NOTDR", "NOTDROFT", "NOTAMB", "NOTKH")], by.x = "GENID", by.y = "LABNR", all.x = T)
```

### 7.2 Erstellung der Variable AsthmaSeverity

```
pheno3$B03_rec <- (pheno3$B03 - 1)
pheno3$B04_rec <- (pheno3$B04 - 1)
pheno3$B05_rec <- (pheno3$B05 - 1)
pheno3$B06_rec <- (pheno3$B06 - 1)

pheno3$NOTDROFT_rec <- (pheno3$NOTDROFT - 1)
pheno3$NOTAMB_rec <- (pheno3$NOTAMB - 1)
```

```
pheno3$NOTKH_rec <- (pheno3$NOTKH - 1)

pheno3$DrVisits_asthma_magics <- (pheno3$B03_rec + pheno3$B04_rec +
  pheno3$B05_rec)/3
pheno3$AsthmaSev_inclHosp_magics <- (pheno3$B03_rec + pheno3$B04_rec +
  pheno3$B05_rec + pheno3$B06_rec)/4

pheno3$NOTDR_rec <- ifelse(pheno3$NOTDR == 2, 0, pheno3$NOTDROFT_rec)
pheno3$DrVisits_asthma_isaac <- (pheno3$NOTDR_rec + pheno3$NOTAMB_rec)/2
pheno3$AsthmaSev_inclHosp_isaac <- (pheno3$NOTDR_rec + pheno3$NOTAMB_rec +
  pheno3$NOTKH_rec)/3

pheno3$Notfallbesuche_Asthma <- NA
pheno3$Notfall_Asthma <- ifelse(pheno3$study == "magic", pheno3$DrVisits_a
sthma_magics,
  pheno3$DrVisits_asthma_isaac)

pheno3$AsthmaSev_inclHosp <- ifelse(pheno3$study == "magic",
  pheno3$AsthmaSev_inclHosp_magics, pheno3$AsthmaSev_inclHosp_isaac)

pheno3$DrVisits_asthma_magics2 <- pheno3$B03_rec + pheno3$B05_rec
pheno3$AsthmaSev_inclHosp_magics2 <- pheno3$B03_rec + pheno3$B05_rec +
  pheno3$B06_rec

pheno3$DrVisits_asthma_isaac2 <- pheno3$NOTDR_rec + pheno3$NOTAMB_rec
pheno3$AsthmaSev_inclHosp_isaac2 <- pheno3$NOTDR_rec + pheno3$NOTAMB_rec +
  pheno3$NOTKH_rec

pheno3$DrVisits2 <- ifelse(pheno3$study == "magic", pheno3$DrVisits_asthma
_magics2,
  pheno3$DrVisits_asthma_isaac2)

pheno3$AsthmaSev2 <- ifelse(pheno3$study == "magic", pheno3$AsthmaSev_incl
Hosp_magics2,
  pheno3$AsthmaSev_inclHosp_isaac2)

write.table(pheno3[, c(2, 3, 1, 4:33, 55, 56, 61, 62)], file = "/Users/vin
cent/Documents/Work/AG_Kabesch/GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint
```

```
20170617.txt",  
  sep = "\t", col.names = T, row.names = F, quote = F)
```

### 7.3 Epistasis auf den Phänotyp "AsthmaSeverity"

```
# ./plink --noweb --file  
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASdata_ALLSNPs4Calculation_oISA  
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .05 --pheno  
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20170617.txt  
# --pheno-name AsthmaSev_inclHosp --out  
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthmaSeverity  
_MagIsa_852_allRes  
  
# ./plink --noweb --bfile  
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/ImputationData_1kG_bothChromosomes_oI  
SA_updateSexMap  
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .05 --pheno  
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20170617.txt  
# --pheno-name AsthmaSev_inclHosp --out  
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthmaSeverity  
_MagIsa1KG_794_allRes  
  
# ./plink --noweb --file  
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASimputdata_ALLSNPs4Calculation_oIS  
A  
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .05 --pheno  
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20170617.txt  
# --pheno-name AsthmaSev_inclHosp --out  
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthmaSeverity  
_MagIsaImput_794_allRes
```

#### Wiederholung der Analysen in der Supgruppe der Asthmatiker

```
pheno <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/GWAS_allPhen  
oandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20170617.txt",  
  header = T, sep = "\t")  
  
write.table(pheno[which(pheno$asthma == 2), 1:2], file = "/Users/vincent/D  
ocuments/Work/AG_Kabesch/RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/KeepCases.txt",  
  row.names = F, col.names = F, sep = "\t", quote = F)  
  
# ./plink --noweb --file  
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASdata_ALLSNPs4Calculation_oISA  
# --keep /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/KeepCases.txt  
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .05 --pheno  
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20170617.txt
```

```
# --pheno-name AsthmaSev_inclHosp --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthmaSeverity
_MagIsa_852_allRes_CaseOnly

# ./plink --noweb --bfile
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/ImputationData_1kG_bothChromosomes_oI
SA_updateSexMap
# --keep /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/KeepCases.txt
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .05 --pheno
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20170617.txt
# --pheno-name AsthmaSev_inclHosp --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthmaSeverity
_MagIsa1KG_794_allRes_CaseOnly

# ./plink --noweb --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/GWASimputdata_ALLSNPs4Calculation_oIS
A
# --keep /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/KeepCases.txt
# --epistasis --epi1 1 --epi2 .05 --pheno
# /.../GWAS_allPhenoandGeno/Pheno_allInUse_toPrint20170617.txt
# --pheno-name AsthmaSev_inclHosp --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_MAGICSISAAC/EpistasisAsthmaSeverity
_MagIsaImput_794_allRes_CaseOnly
```

## 8. BAMSE

Wiederholung aller Analysen im BAMSE-Datensatz zur Replikation

### 8.1 Datenaufbereitung

```
BAMSEasthma <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/RORAxN
PSR1/results/Replication/Replication_BAMSE/asthma.PED",
  header = F, sep = "\t")
BAMSEsleep <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/RORAxNP
SR1/results/Replication/Replication_BAMSE/sleep.PED",
  header = F, sep = "\t")

BAMSEcomp1 <- merge(BAMSEasthma[, c("V1", "V2", "V6")], BAMSEsleep[,
  c("V1", "V2", "V6")], by = c("V1", "V2"))
nrow(BAMSEcomp1[which(BAMSEcomp1$V6.x == 2), ])
nrow(BAMSEcomp1[which(BAMSEcomp1$V6.x == 1), ])
nrow(BAMSEcomp1[which(BAMSEcomp1$V6.y == 2), ])
nrow(BAMSEcomp1[which(BAMSEcomp1$V6.y == 1), ])
```



```
nrow(BAMSEcompl[which(BAMSEcompl$V6.x == 0), ])
```

### Probanden ohne Asthma aber mit nächtlichen Symptomen

```
nrow(BAMSEcompl[which(BAMSEcompl$V6.y == 2 & BAMSEcompl$V6.x ==  
1), ])
```

die müssen ausgeschlossen werden

```
BAMSEfinal <- BAMSEcompl[-which((BAMSEcompl$V6.y == 2 & BAMSEcompl$V6.x ==  
1) | BAMSEcompl$V6.x == 0), ]
```

```
nrow(BAMSEfinal)
```

```
## [1] 1646
```

```
BAMSEfinal$AsthmaFinal <- NA
```

```
BAMSEfinal[which(BAMSEfinal$V6.x == 1), "AsthmaFinal"] <- 1
```

```
BAMSEfinal[which(BAMSEfinal$V6.x == 2), "AsthmaFinal"] <- 2
```

```
BAMSEfinal$NAvsSuper <- NA
```

```
BAMSEfinal[which(BAMSEfinal$V6.x == 1), "NAvsSuper"] <- 1
```

```
BAMSEfinal[which(BAMSEfinal$V6.x == 2 & BAMSEfinal$V6.y == 2),  
"NAvsSuper"] <- 2
```

```
BAMSEfinal[is.na(BAMSEfinal$NAvsSuper), "NAvsSuper"] <- -9
```

```
BAMSEfinal$AsthvsSuper <- NA
```

```
BAMSEfinal[which(BAMSEfinal$V6.x == 1), "AsthvsSuper"] <- 1
```

```
BAMSEfinal[which(BAMSEfinal$V6.x == 2 & BAMSEfinal$V6.y == 1),  
"AsthvsSuper"] <- 2
```

```
BAMSEfinal[is.na(BAMSEfinal$AsthvsSuper), "AsthvsSuper"] <- -9
```

```
colnames(BAMSEfinal) <- c("FID", "IID", "asth", "nas", "AsthmaFinal",  
"NAvsSuper", "AsthvsSuper")
```

```
write.table(BAMSEfinal, "/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabesch/RORAxNPS  
R1/Data/Data4Analysis/PhenoBAMSE_allPheno.txt",  
quote = F, row.names = F, col.names = T, sep = "\t")
```

## 8.2 Assoziationsanalysen

```
# ./plink --file
```

```
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/BAMSEdata_ALLSNPs4Calculation
```

```
# --map3 --allow-no-sex --logistic --ci 0.95 --pheno
```

```
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/PhenoBAMSE_allPheno.txt
```

```
# --pheno-name AsthmaFinal --noweb --out
```

```
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_BAMSE/LogisticAsthma_BAMSE
```



```
# ./plink --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/BAMSEdata_ALLSNPs4Calculation
# --map3 --allow-no-sex --logistic --ci 0.95 --pheno
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/PhenoBAMSE_allPheno.txt
# --pheno-name NAVsSuper --noweb --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_BAMSE/LogisticNocturnalvsSuper_BAMSE_completeRes
```

### 8.3 Interaktionsanalysen

```
# ./plink --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/BAMSEdata_ALLSNPs4Calculation
# --map3 --allow-no-sex --epistasis --epi1 1 --epi2 0.05
# --pheno
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/PhenoBAMSE_allPheno.txt
# --pheno-name AsthmaFinal --noweb --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_BAMSE/EpistasisAsthma_BAMSE_completeRes
```

```
# ./plink --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/BAMSEdata_ALLSNPs4Calculation
# --map3 --allow-no-sex --epistasis --epi1 1 --epi2 0.05
# --pheno
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/PhenoBAMSE_allPheno.txt
# --pheno-name NAVsSuper --noweb --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_BAMSE/EpistasisNocturnalvsSuper_BAMSE_completeRes
```

```
# ./plink --file
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/BAMSEdata_ALLSNPs4Calculation
# --map3 --allow-no-sex --epistasis --epi1 1 --epi2 0.05
# --pheno
# /.../RORAxNPSR1/Data/Data4Analysis/PhenoBAMSE_allPheno.txt
# --pheno-name AsthvsSuper --noweb --out
# /.../RORAxNPSR1/results/FinalResults_BAMSE/EpistasisAsthmavsSuper_BAMSE_completeRes
```

### 8.4 Berechnung der Konfidenzintervalle

#### Nocturnal Asthma

```
Epistasis_BAMSE_sleep <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Kabsch/RORAxNPSR1/results/Replication/Replication_BAMSE/FinalResults_BAMSE/EpistasisNocturnalvsSuper_BAMSE_completeRes.epi.cc",
  header = T)
```

```
orci <- function(or) {  
  or$beta <- log(or$OR)  
  or$se <- abs(or$beta/sqrt(or$STAT))  
  or$lower <- or$beta - 1.96 * or$se  
  or$upper <- or$beta + 1.96 * or$se  
  or$LOWER <- exp(or$lower)  
  or$UPPER <- exp(or$upper)  
  or$res <- paste(round(or$OR, 2), " (", round(or$LOWER, 2),  
    "-", round(or$UPPER, 2), ") ", round(or$p, 4), sep = "")  
  return(or)  
}
```

```
or <- Epistasis_BAMSE_sleep  
Epistasis_BAMSE_sleep_CI <- orci(or)
```

```
write.table(Epistasis_BAMSE_sleep_CI, "/Users/vincent/Documents/Work/AG_Ka  
besch/RORAxNPSR1/results/Replication/Replication_BAMSE/FinalResults_BAMSE/  
EpistasisNocturnalvsSuper_BAMSE_completeRes_inclCI.txt",  
  quote = F, row.names = F, col.names = T, sep = "\t")
```

## Asthma

```
Epistasis_BAMSE_asthma <- read.table("/Users/vincent/Documents/Work/AG_Ka  
besch/RORAxNPSR1/results/Replication/Replication_BAMSE/FinalResults_BAMSE/  
EpistasisAsthma_BAMSE_completeRes.epi.cc",  
  header = T)
```

```
orci <- function(or) {  
  or$beta <- log(or$OR)  
  or$se <- abs(or$beta/sqrt(or$STAT))  
  or$lower <- or$beta - 1.96 * or$se  
  or$upper <- or$beta + 1.96 * or$se  
  or$LOWER <- exp(or$lower)  
  or$UPPER <- exp(or$upper)  
  or$res <- paste(round(or$OR, 2), " (", round(or$LOWER, 2),  
    "-", round(or$UPPER, 2), ") ", round(or$p, 4), sep = "")  
  return(or)  
}
```

```
or <- Epistasis_BAMSE_asthma  
Epistasis_BAMSE_asthma_CI <- orci(or)
```

```
write.table(Epistasis_BAMSE_asthma_CI, "/Users/vincent/Documents/Work/AG_K  
abesch/RORAxNPSR1/results/Replication/Replication_BAMSE/FinalResults_BAMSE
```

```
/EpistasisAsthma_BAMSE_completeRes_inclCI.txt",  
quote = F, row.names = F, col.names = T, sep = "\t")
```

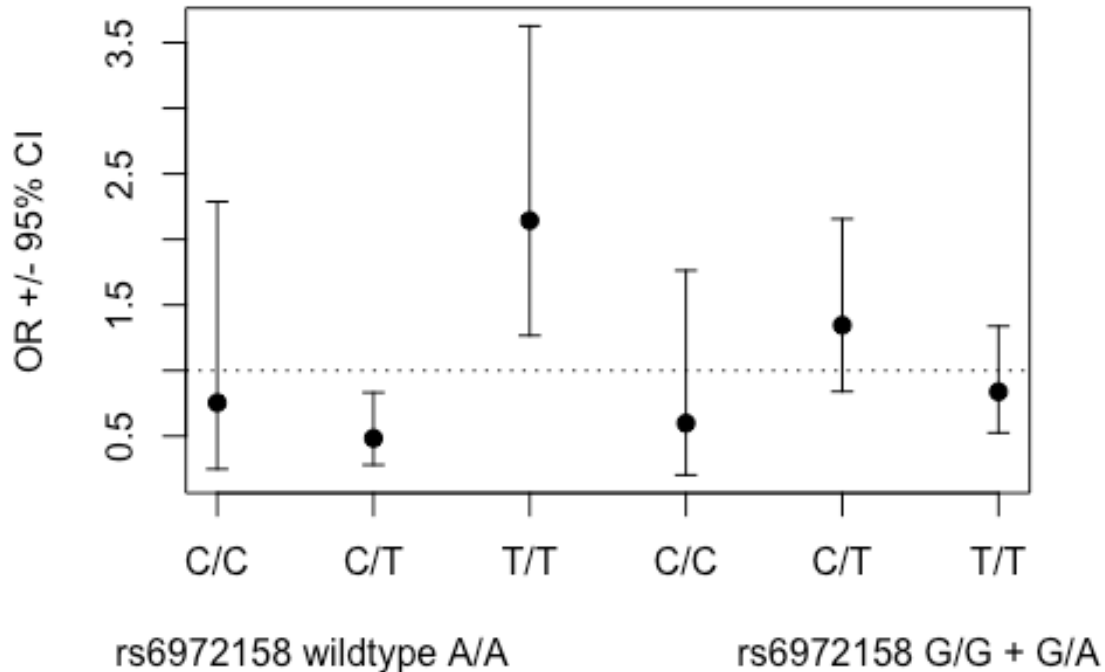
## 9. Plots

Erstellung einiger Plots zum besseren Verständnis der Interaktionen

### rs341382\*rs6972158 (Nächtliches Asthma)

```
TwoLocus <- as.data.frame(matrix(data = NA, nrow = 6, ncol = 3))  
TwoLocus$V1 <- c(0.7544, 0.4837, 2.1435, 0.5989, 1.3457, 0.8385)  
TwoLocus$V2 <- c(0.2488, 0.2809, 1.2669, 0.2035, 0.8399, 0.5254)  
TwoLocus$V3 <- c(2.2878, 0.8327, 3.6266, 1.7629, 2.1559, 1.3382)  
colnames(TwoLocus) <- c("OR", "L95", "U95")  
  
plot(TwoLocus$OR, main = "Effect of rs341382*s6972158 on nocturnal asthma"  
,  
      xlab = "rs6972158 wildtype A/A                               rs6972158 G/G + G/  
A",  
      ylab = "OR +/- 95% CI", ylim = range(c(TwoLocus$L95, TwoLocus$U95)),  
      pch = 19, xaxt = "n")  
axis(1, at = 1:6, labels = c("C/C", "C/T", "T/T", "C/C", "C/T",  
                             "T/T"))  
arrows(c(1:6), TwoLocus$L95, c(1:6), TwoLocus$U95, length = 0.05,  
       angle = 90, code = 3)  
abline(h = 1, lty = 3)
```

## Effect of rs341382\*s6972158 on nocturnal asthma

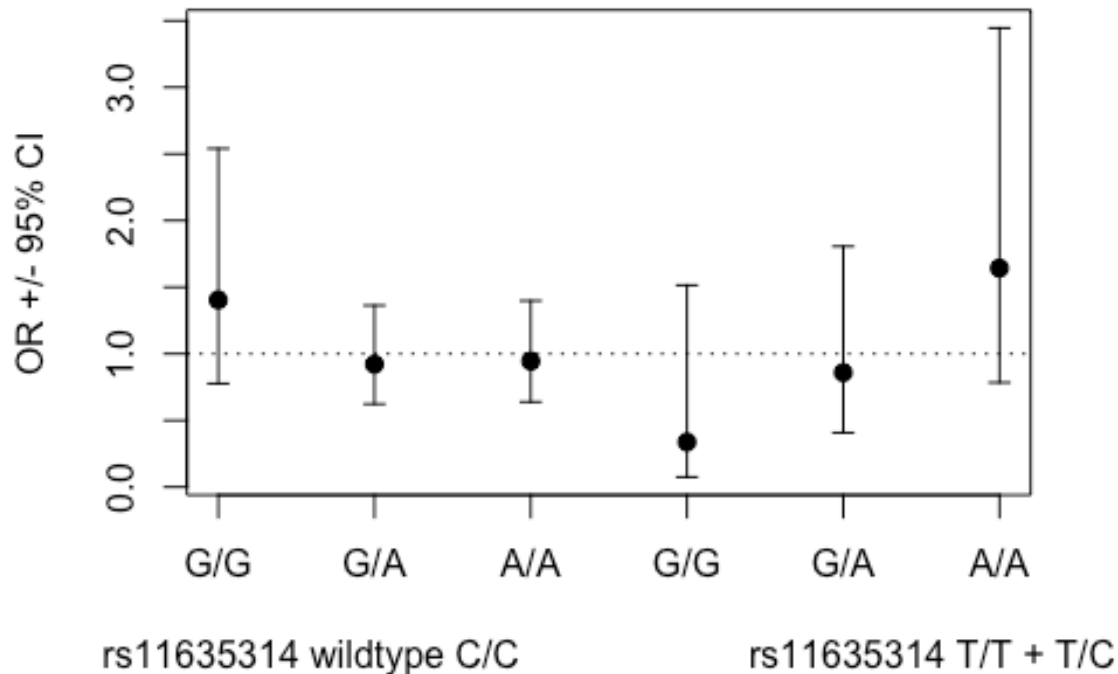


### rs1419779\*rs11635314 (Nächtliches Asthma)

```
TwoLocus <- as.data.frame(matrix(data = NA, nrow = 6, ncol = 3))
TwoLocus$V1 <- c(1.4048, 0.9212, 0.9447, 0.3377, 0.8587, 1.643)
TwoLocus$V2 <- c(0.777, 0.623, 0.639, 0.075, 0.408, 0.784)
TwoLocus$V3 <- c(2.54, 1.363, 1.398, 1.515, 1.806, 3.445)
colnames(TwoLocus) <- c("OR", "L95", "U95")
```

```
plot(TwoLocus$OR, main = "Effect of rs1419779*rs11635314 on nocturnal asthma",
     xlab = "rs11635314 wildtype C/C          rs11635314 T/T + T/C",
     ylab = "OR +/- 95% CI", ylim = range(c(TwoLocus$L95, TwoLocus$U95)),
     pch = 19, xaxt = "n")
axis(1, at = 1:6, labels = c("G/G", "G/A", "A/A", "G/G", "G/A", "A/A"))
arrows(c(1:6), TwoLocus$L95, c(1:6), TwoLocus$U95, length = 0.05,
       angle = 90, code = 3)
abline(h = 1, lty = 3)
```

## Effect of rs1419779\*rs11635314 on nocturnal asthma

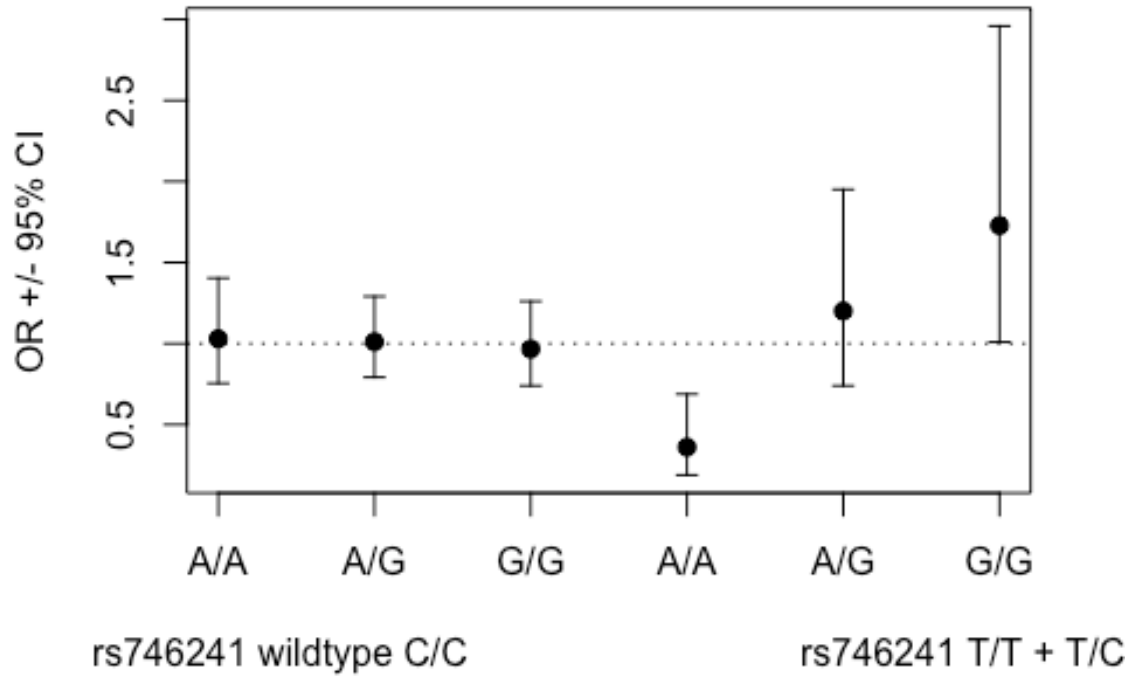


### rs963218\*rs746241 (Asthma)

```
TwoLocus <- as.data.frame(matrix(data = NA, nrow = 6, ncol = 3))
TwoLocus$V1 <- c(1.0297, 1.011, 0.9661, 0.3609, 1.2013, 1.7282)
TwoLocus$V2 <- c(0.755, 0.792, 0.74, 0.189, 0.74, 1.009)
TwoLocus$V3 <- c(1.404, 1.291, 1.261, 0.688, 1.951, 2.959)
colnames(TwoLocus) <- c("OR", "L95", "U95")

plot(TwoLocus$OR, main = "Effect of rs963218*rs746241 on asthma",
      xlab = "rs746241 wildtype C/C",
      xlab2 = "rs746241 T/T + T/C",
      ylab = "OR +/- 95% CI", ylim = range(c(TwoLocus$L95, TwoLocus$U95)),
      pch = 19, xaxt = "n")
axis(1, at = 1:6, labels = c("A/A", "A/G", "G/G", "A/A", "A/G",
                              "G/G"))
arrows(c(1:6), TwoLocus$L95, c(1:6), TwoLocus$U95, length = 0.05,
       angle = 90, code = 3)
abline(h = 1, lty = 3)
```

### Effect of rs963218\*rs746241 on asthma



## **8. Danksagung**

Diese Arbeit habe ich nur mit der Unterstützung einiger wichtiger Leute anfertigen können: Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Betreuer und Mentor, Prof. Michael Kabesch, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Er hat mich mit seiner positiven Einstellung, seiner sehr guten Betreuung und interessanten Anregungen stets zum kritischen Denken animiert und wissenschaftliches Arbeiten besser beigebracht. Die Qualität dieser Arbeit und meinen bisherigen Werdegang verdanke ich zu einem Großteil ihm.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen Kollegen und bioinformatischen Mentor Sven Michel erwähnen, der mir viel, wenn nicht fast alles, über Datenaufbereitung und –verarbeitung beigebracht hat. Sein Input für meine bisherigen Arbeiten ist unschätzbar groß. Ein großer Dank geht auch an Maximilian Schieck und Antoaneta Toncheva, die mir im Labor jederzeit eine große Hilfe waren und die mich im experimentellen Teil meiner Arbeit mit Rat und Tat unterstützt haben.

Zu guter Letzt geht ein großer Dank an meine Freundin Sophie Flemmer und an meine Familie, die nicht nur bei dieser Arbeit immer für mich da sind und mich in allen meinen Entscheidungen unterstützen.