

Die *common variant / common disease* Hypothese am Beispiel der Allergie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Ohly, Astrid
aus Frankfurt/Main

Gießen (2006)

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin

Leiter: Prof. G. Bein

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Bein

Gutachter: Prof. Dr. Neubauer

Tag der Disputation: 06.12.2006

1	Einleitung	1
1.1	Allergie	1
1.2	Atopie	2
1.2.1	atopie-assoziierte Erkrankungen	3
1.2.1.1	Asthma bronchiale	3
1.2.1.2	Neurodermitis	4
1.2.1.3	Rhinoconjunctivitis allergica	4
1.2.2	Pathophysiologie	5
1.2.3	IgE-Antikörper	8
1.3	Kandidatengene	10
1.3.1	Genomweite Kopplungsanalysen	11
1.3.2	Assoziationsstudien	14
1.4	Interleukin-4 und sein Rezeptor	18
1.4.1	IL-4	18
1.4.2	Der Interleukin-4 Rezeptor	19
1.5	<i>Conserved-Noncoding-Sequence-1</i>	20
1.6	Interleukin-13	21
1.7	Interferon-regulierender Faktor 1	23
1.8	Toll-like-Rezeptor-4	24
1.9	Interferon- γ	26
2	Fragestellung	29
3	Material und Methoden	31
3.1	Material	31
3.1.1	Geräte, Kleinmaterial und Reagenzien	31
3.1.1.1	Geräte	31
3.1.1.2	Kleinmaterial	31
3.1.1.3	Reagenzien	32
3.1.2	Kits	32
3.1.3	Computerprogramme	33
3.2	Methoden	33
3.2.1	Probanden	33
3.2.2	DNA-Isolierung	33
3.2.3	DNA-Konzentrationsbestimmung am Photometer	34
3.2.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
3.2.4.1	Genotypisierung mit sequenzspezifischen <i>Primern</i> (SSP-PCR)	35
3.2.4.2	Gel-Elektrophorese	36
3.2.4.3	Genotypisierung mit der <i>TaqMan-Technologie</i>	37
3.2.5	Mikrosatelliten-Analyse	38
3.2.6	Sequenzierung	39
3.2.6.1	Gel-Extraktion	40
3.2.6.2	Schätzung der Konzentration mit einem Gel	41
3.2.6.3	Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte	41

3.2.6.4 DNA-Fällung	41
3.2.7 Statistische Methoden	42
3.2.8 Messung der IgE-Serum-Spiegel bei Erwachsenen	42
3.2.9 Messung der IgE-Serum-Spiegel bei Neugeborenen	42
3.2.10 Messung der IgA-Serum-Spiegel bei Neugeborenen	43
4 Ergebnisse	44
4.1 Erwachsene	44
4.1.1 Prävalenz von Heuschnupfen oder Pollenallergie, Hausstauballergie, Asthma und Neurodermitis bei Blutspendern	44
4.1.2 Der IgE-Serum-Spiegel ist mit einer positiven Atopieanamnese assoziiert	46
4.1.3 Die IL4R-SNPs I50V, S411L, S487P und Q551R sind nicht mit einem Atopie-Phänotyp assoziiert	47
4.1.4 IL4 C-590T ist nicht mit einem Atopie-Phänotyp assoziiert	49
4.1.5 CNS-1 ist mit einer positiven Atopieanamnese assoziiert	50
4.1.6 IL13 C-1112T ist nicht mit einem Atopie-Phänotyp assoziiert	51
4.1.7 Die IRF-1-Varianten A-415C/G-410A, T4379C und G7311A sind nicht mit einem Atopie-Phänotyp assoziiert	52
4.1.8 TLR-4 D299G und T399I sind nicht mit einem Atopie-Phänotyp assoziiert	54
4.1.9 IFNG	56
4.1.9.1 Das IFNG-CA-Repeat ist nicht mit einem Atopie-Phänotyp assoziiert	56
4.1.9.2 Die IFNG-SNPs T-1615C, T874A und A5171G sind nicht mit einem Atopie-Phänotyp assoziiert	57
4.2 Neugeborene	59
4.2.1 6% der Neugeborenen zeigten erhöhte IgE-Serum-Spiegel	59
4.2.2 IL4R G-3223A und S478P sind nicht mit dem IgE-Spiegel assoziiert	60
4.2.3 IFNG	60
4.2.3.1 Das IFNG CA-Repeat bei Neugeborenen ist nicht mit dem IgE- Spiegel assoziiert	60
4.2.3.2 IFNG T874A ist nicht mit dem IgE-Spiegel bei Neugeborenen assoziiert	61
5 Diskussion	63
5.1 Der IgE-Spiegel als intermediärer Atopie-Phänotyp	63
5.2 Das Gen für die α -Kette des Interleukin-4-Rezeptors	64
5.3 Interleukin-4	64
5.4 CNS-1	65
5.5 Interleukin-13	65
5.6 Interferon-regulierender Faktor-1	66
5.7 Toll-like-Rezeptor-4	66
5.8 Interferon- γ	67

5.9 Untersuchungen an Neugeborenen	67
5.10 Zusammenfassung	68
5.11 Summary	69
Anhang	71
Literaturverzeichnis	81
Erklärung	94
Danksagung	95

1 Einleitung

1.1 Allergie

Der Begriff „Allergie“ wurde 1906 von *von Pirquet* eingeführt. Nach Coombs und Gell (Tab. 1) gibt es vier Typen der immunologischen Überempfindlichkeit, wobei man heute den Typ 1, bei dem präformierte Immunglobulin E (IgE)-Antikörper die Immunantwort vermitteln, und den Typ 4, bei dem spezifisch sensibilisierte T-Lymphozyten durch Lymphokinfreisetzung Makrophagen aktivieren, als Allergie bezeichnet.

Bei dem Typ 1 kommt es nach dem ersten Kontakt mit einem Antigen zur Internalisierung und Prozessierung des Antigens und zur Präsentation auf antigenpräsentierenden Zellen mit Hilfe von HLA-Klasse-II-Molekülen. Über den T-Zell-Rezeptor werden antigenspezifische T-Helferzellen aktiviert, es folgt die Freisetzung von Interleukin 4 und 13. Dies führt bei B-Lymphozyten zum Klassenwechsel von Immunglobulin M (IgM) nach IgE [1] und damit zur Bildung von spezifischen IgE-Antikörpern, die sich an den hochaffinen $Fc\epsilon$ -Rezeptor auf Mastzellen und basophilen Granulozyten binden.

Der Zweitkontakt mit dem Antigen löst durch das Vernetzen der auf der Mastzelle gebundenen IgE-Antikörper eine Degranulation der Mastzellen unter Ausschüttung von Histamin und verschiedenen anderen Mediatoren aus. Diese führen je nach Expositionsort unter anderem zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur in Darm, Bronchien und größeren Gefäßen, zu einer Dilatation von kleineren Gefäßen mit Hautrötung und Quaddelbildung und am Herzen zu einer Tachykardie.

Bei dem Typ 4 werden die Allergene von Langerhans-Zellen aufgenommen und T-Lymphozyten präsentiert. Es bilden sich Zellklone mit antigenspezifischem T-Zell-Rezeptor.

Nach einer Sensibilisierungsphase von mindestens 5 Tagen kann ein weiterer Kontakt mit dem Allergen zu einem Erythem, Ödem, zu Papulovesikeln und zu nässenden Erosionen führen. Im histologischen Bild finden sich durch Lymphokinfreisetzung angezogene Makrophagen und mononukleären Zellen.

Allergien spielen heute eine wichtige Rolle. In Deutschland betrug die Prävalenz für Asthma bei Kindern 7% (Lebenszeitprävalenz bis zum 18. Lebensjahr), bei Erwachsenen zwischen 20 und 44 Jahren 4,5% (Jahresprävalenz). Dabei zeigt sich ein ansteigender Trend international wie national [2]. Allein durch Asthmaerkrankungen gingen 1993 etwa 2,6 Mio. Arbeitstage durch Arbeitsunfähigkeit verloren. 1994 betragen die Kosten für Asthmapatienten 2,1 Mrd. DM. Dabei handelt es sich unter anderem um Ausgaben für die ambulante und stationäre Behandlung, Arzneimittel und Rehabilitation [3].

Tab. 1; die vier Typen der Überempfindlichkeit nach Coombs und Gell [4]

Typ	Mechanismus	Reaktionszeit	Klinisches Bild (Beispiele)
Frühtyp			
Typ I (Soforttyp)	unter Vermittlung zellständiger IgE-Antikörper kommt es zur Freisetzung von verschiedenen Mediatoren aus Basophilen und Mastzellen	Sekunden bis Minuten; evtl. zweite Reaktion nach 4 bis 6 Stunden	allerg. Asthma, allerg. Konjunktivitis, Rhinitis allergica, allerg. Urtikaria, anaphylaktischer Schock
Typ II (zytotoxischer Typ)	Bindung von Antikörpern vom IgG- evtl. auch IgM-Typ an zellmembranständige Antigene; durch Aktivierung von Komplement oder zytotoxischen Killerzellen kommt es zur Zytolyse körpereigener Zellen	Minuten bis Stunden	hämolytische Anämien, Thrombopenie, Transfusionszwischenfälle
Typ III (Immunkomplextyp)	Bildung gewebeständiger oder zirkulierender Immunkomplexe aus präzipitierten Antikörpern (IgG, IgM) und Antigenen; Aktivierung von Komplementfaktoren führt zur Phagozytose der Immunkomplexe durch Granulozyten unter Freisetzung gewebeschädigender Enzyme	6 bis 12 Stunden	Serumkrankheit, allerg. Vaskulitis, exogen-allerg. Alveolitis
Spättyp			
Typ IV (verzögerter Typ)	Freisetzung von Lymphokinen aus spezifisch sensibilisierten T-Lymphozyten bei erneutem Kontakt mit Antigenen, die zur Aktivierung bzw. Proliferation von Makrophagen und mononukleären Zellen sowie deren Wanderung an den Ort der Antigenexposition beitragen	12 bis 72 Stunden	allerg. Kontaktekzem, Tuberkulinreaktion, Arzneimittel-exantheme, Transplantatabstoßung, persistierende granulomatöse Reaktion

Daher ist es wichtig, die Pathogenese von Allergien besser verstehen zu lernen und auslösende Faktoren zu identifizieren, um durch präventive Maßnahmen bei gefährdeten Personen frühzeitig ein Auftreten von Krankheitssymptomen zu verhindern oder diese abzumildern.

1.2 Atopie

Die genetische Prädisposition, auf eine Vielzahl von Antigenen mit einer überschießender T-Helfer-2-Antwort mit konsekutiver Synthese von IgE-Antikörpern zu reagieren, nennt man Atopie. Zu den atopieassoziierten Erkrankungen zählen das allergische Asthma bronchiale, die Neurodermitis und die Rhinoconjunctivitis allergica.

Ein Hinweis auf ein höheres Risiko für Atopie liefert eine positive Familienanamnese. In der Literatur ist das Atopierisiko für ein Kind gesunder Eltern mit 5-15% beschrieben. Wenn ein Elternteil Atopiker ist, liegt das Risiko bei 20-40%, bei einem betroffenen Geschwisterkind bei 25-35%. Sind beide Eltern Atopiker, liegt das Risiko bei 60-80% [5]. Ein weiteres Kriterium für ein erhöhtes Risiko könnte in Zukunft auch eine genetische Analyse von atopieassoziierten Genen werden. Im Gegensatz zu monogenen Krankheitsbildern wie zum Beispiel zystischer Fibrose oder Chorea Huntington (Chorea major), bei denen eine Mutation an einem Gen zur Erkrankung führt, werden atopische Erkrankungen polygenetisch vererbt. Nicht eine Genvariante allein ist verantwortlich, sondern das Auftreten von Mutationen in verschiedenen Genen, die im Fall der Atopie zu einer Fehlsteuerung der physiologischen Immunantwort mit einem Ungleichgewicht zwischen Th-1- und Th2-Antwort führen.

1.2.1 Atopie-assoziierte Erkrankungen

1.2.1.1 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen. Sie betrifft ca. 4-5 % der Bevölkerung und ist gekennzeichnet durch das anfallsweise Auftreten von Atemnot infolge zunächst reversibler Bronchiokonstriktion durch Entzündung und Hyperreagibilität der Schleimhaut der Atemwege, Schleimhautschwellung und Dyskrie. Später bildet sich infolge von Umbauvorgängen (*Remodelling*) eine irreversible Bronchokonstriktion aus.

Man unterscheidet verschiedene Formen des Asthmas:

Beim allergischen, exogenen Asthma bronchiale führt die Inhalation des auslösenden Allergens zu einer typischerweise zweizeitigen Reaktion:

- IgE-vermittelte Sofortreaktion und Degranulation von Mastzellen,
- Spätreaktion durch protrahiert verlaufende Entzündungsreaktion mit eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten.

Wichtige Allergene sind Hausstaubmilben (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*), Pollen von Gräsern, Getreide, Bäumen und Sträuchern, Pilzsporen (insbesondere von *Alternaria tenuis* und *Cladosporium herbarum*) und Tierhaare von Katzen, Hunden, Pferden und Nagetieren.

Beim endogenen Asthma bronchiale kommen als auslösende Faktoren virale Infekte, Zigarettenrauch, körperliche Anstrengung und Medikamente (z.B. Acetylsalicylsäure) in Frage. Es finden sich auch Mischformen aus exogenem und endogenem Asthma bronchiale.

1.2.1.2 Neurodermitis (allergisches Ekzem, atopische Dermatitis)

Circa 1-3% aller Erwachsenen und 5-10% aller Kinder leiden unter Neurodermitis, wobei die Zahl der Erkrankten in den letzten Jahren zugenommen hat.

Neurodermitis äußert sich abhängig vom Lebensalter unterschiedlich:

Das atopische Säuglingsekzem beginnt meist mit dem 3. Lebensmonat. Es hat einen stark exsudativen Charakter und geht einher mit den Zeichen einer akuten Dermatitis mit Erythem, Mikrovesikeln, Erosionen und Krusten- und Schuppenbildung. Die Effloreszenzen beginnen an Wangen oder Scheitelbereich und bilden dort den sogenannten Milchschorf, der sich auch über den Rumpf und die Extremitäten ausbreiten kann.

Im Kindesalter finden sich die Läsionen vorzugsweise im Gesicht, am Hals und im oberen Brustbereich, besonders ausgeprägt auch in den großen Beugen. Der exsudative Charakter steht nicht mehr im Vordergrund, sondern entzündliche Gewebsinfiltrationen mit starkem Juckreiz.

Das Ekzem im Erwachsenenalter ist an der Stirn, dem Hals und den Beugeseiten der Extremitäten lokalisiert und neigt zu Lichenifikation.

Das Vorhandensein von Symptomen wie weißem Dermographismus oder starkem Juckreiz wird über veränderte Reaktivität der β -adrenergen und cholinergen Nervenfasern und durch eine überschießende neuropeptidinduzierte Mediatorfreisetzung erklärt.

1.2.1.3 Rhinoconjunctivitis allergica

Die Rhinokonjunktivitis allergica ist der Ausdruck einer IgE-vermittelten Typ-I-Sofortreaktion an den Konjunktiven der Augen und der Schleimhaut im Nasenrachenraum. Die Prävalenz im Jugend- und frühen Erwachsenenalter beträgt in Mitteleuropa etwa 15-20 % [6].

Man unterscheidet zwei Formen der Rhinokonjunktivitis:

- die saisonale allergische Rhinokonjunktivitis oder Pollinose und
- die perenniale allergische Rhinokonjunktivitis.

Häufigste Auslöser der ersten Form sind Pollen windbestäubender Pflanzen, deren jahreszeitlich abhängiger Pollenflug das Krankheitsbild bestimmt (Tab. 2).

Die zweite Form entsteht durch ganzjährigen Allergenkontakt mit Hausstaubmilben, Schimmelpilzen oder Tierepithelien (Tab. 2).

Tab. 2. häufigste Allergene der allergischen Rhinokonjunktivitis [6]

Saisonale allergische Rhinokonjunktivitis		
Frühjahr:	Januar- Februar	Hasel, Erle
	März- April	Birke, Esche
Frühsommer:	Mai- Juli	Roggen, Knäuelgras, Lieschgras, Wiesenrispengras, Lolch
Spätsommer:	Juli- September	Beifuß
Perenniale allergische Rhinokonjunktivitis		
ganzjährig:	Hausstaubmilben, Vorratsmilben, Schimmelpilze (<i>Alternaria alternata</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Penicillium notatum</i> , <i>Mucor racemosus</i>), Tierepithelien (Katze, Hund, Meerschweinchen, Ratte, Maus)	

Unabhängig vom Auslöser äußert sich die allergische Rhinitis als wässrige Nasensekretion, behinderte Nasenatmung, Nasenjucken und Niesattacken. Dazu kommen die Symptome einer Konjunktivitis in Form von Rötung, Juckreiz und Tränenfluss der Augen.

1.2.2 Pathophysiologie

Die Immunantwort lässt sich unterteilen in angeborene und erworbene Immunität. Die angeborene Immunität beinhaltet die unspezifische Immunität durch physikalische und biologische Schutzmechanismen (z.B. Säuremantel der Haut, sezernierte antimikrobiell wirksame Substanzen auf Schleimhäuten) und die Leih-Immunität durch diaplazentar übertragene Immunglobuline. Die erworbene Immunität unterteilt sich in eine humorale, durch spezifische Antikörper gewährleistete, und eine zellvermittelte, durch spezifisch sensibilisierte T-Lymphozyten, Makrophagen und andere immunkompetente Zellen hervorgerufene Immunität.

Am Anfang steht die Antigen-präsentierende Zelle, die ein Antigen internalisiert und prozessiert hat. Auf MHC-Klasse-II-Molekülen werden Peptidantigene CD4+-T-Lymphozyten über den T-Zell-Rezeptor (TCR) präsentiert. Kommt es zu einer Bindung von TCR und MHC-Peptid-Komplex, werden die T-Lymphozyten aktiviert. Diese können durch Freisetzung von Zytokinen B-Lymphozyten zur Differenzierung in Plasmazellen anregen. Je nach Differenzierung der T-Lymphozyten wird die Immunantwort auch als T-Helfer-2- oder T-Helfer-1-Antwort bezeichnet. Th1- und Th2-Zellen differenzieren sich aus naiven CD4+ T-Lymphozyten, Th1-Zellen durch Stimulation mit Interleukin 12 aus aktivierten Makrophagen, Th2-Zellen durch IL-4. Auch andere Zytokine beeinflussen die Differenzierung in Th1- und Th2-Zellen: IFN- γ , IL-10 und TGF- β hemmen die Bildung von Th2-Zellen, IL-4, IL-10 und TGF- β die Bildung von Th1-Zellen (Abb. 1). Am Ende

der Th1-Antwort stehen aktivierte Th1-Zellen und IgG1, bei der Th2-Antwort Mastzellen, eosinophile Granulozyten, IgE und IgG4 (b45).

Bei gesunden Personen stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen ein. Dieses Gleichgewicht ist bei Atopikern gestört. Nach Antigen-Kontakt kommt es zu einer überwiegenden Stimulation der Th2-Antwort, entweder durch eine höhere Produktion der verstärkenden Faktoren (z.B. Interleukin-4) oder eine reduzierte Produktion der hemmenden Faktoren (z.B. IFN- γ) (Abb. 1). Für Patienten mit atopischer Dermatitis und allergischem Asthma fanden sich unterschiedliche Zytokinprofile: Die atopische Dermatitis war mit einer neutralen IL-4-Produktion und einer verminderten IFN- γ -Produktion assoziiert, während Asthmapatienten verstärkt IL-4 produzierten und der IFN- γ -Spiegel keine Änderung aufwies [7].

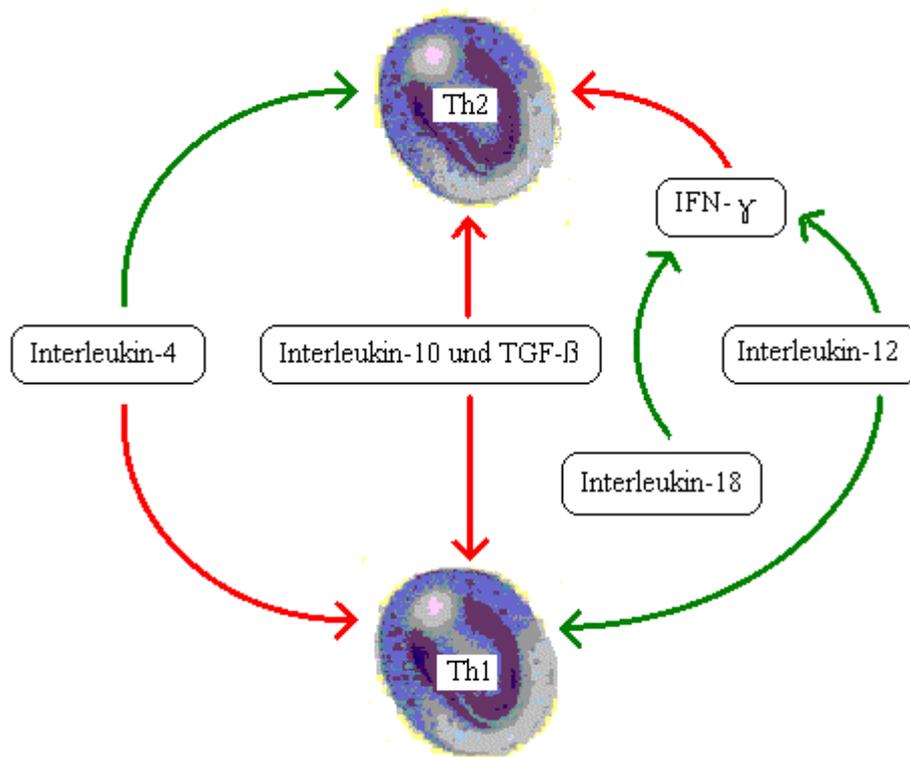


Abb. 1. Mediatoren, die die Immunantwort in Richtung Th1 oder Th2 beeinflussen. Mit rot sind hemmende Effekte gekennzeichnet, mit grün stimulierende [8].

Nicht nur genetische Faktoren bestimmen die Entwicklung einer Atopie. Auch die Umwelt des Patienten beeinflusst das Entstehen und Ausmaß der Erkrankung (Hygienehypothese). Durch Studien, die nach der Wiedervereinigung in Ost- und Westdeutschland durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Prävalenzen von Asthma und Heuschnupfen in Westdeutschland vor der Wiedervereinigung signifikant höher waren als in Ostdeutschland (5,9% versus 3,9%; OR = 1,5, $p < 0,0001$ und 8,6% versus 2,7%; OR = 3,4 $p < 0,0001$), nach der Wiedervereinigung die Prävalenzen in Ostdeutschland sich denen in

Westdeutschland anliegen [9]. Diesen Unterschied vor und den Anstieg der Prävalenzen nach der Wiedervereinigung in den genetisch vergleichbaren Populationen erklärt man sich durch die Übernahme des westlichen Lebensstils der Ostbevölkerung und dem damit einhergehenden geringeren Kontakt mit Antigenen, die in der Neonatelperiode Th1-Zellen stimulieren (Abb. 2).

Geringe Geschwisterzahlen sind mit einer höheren Erkrankungswahrscheinlichkeit assoziiert: Die Kinder haben während der ersten Lebensjahre weniger Kontakt zu Gleichaltrigen; virale Infektionen werden weniger häufig übertragen. Krämer et al. [10] konnte nachweisen, dass ein frühzeitiger Kontakt mit anderen Kindern, z.B. in Kinderkrippen, die Prävalenz der Atopie senkt.

Auch der frühe Kontakt mit Tieren scheint sich protektiv auf die Prävalenz von atopischen Erkrankungen auszuwirken. Kinder, die in Familien mit landwirtschaftlichen Betrieben aufwuchsen, zeigten geringere Prävalenzen von Asthma, Heuschnupfen und Atopie [11] als Stadtkinder. In Familien mit Haustieren, besonders Hunden, kamen seltener Patienten mit atopischer Dermatitis vor als bei Familien ohne Haustiere [12]. Remes et al. [13] konnte in einer finnischen Studie und von Linstow et al. für junge dänische Erwachsene [14] diese Ergebnisse reproduzieren.

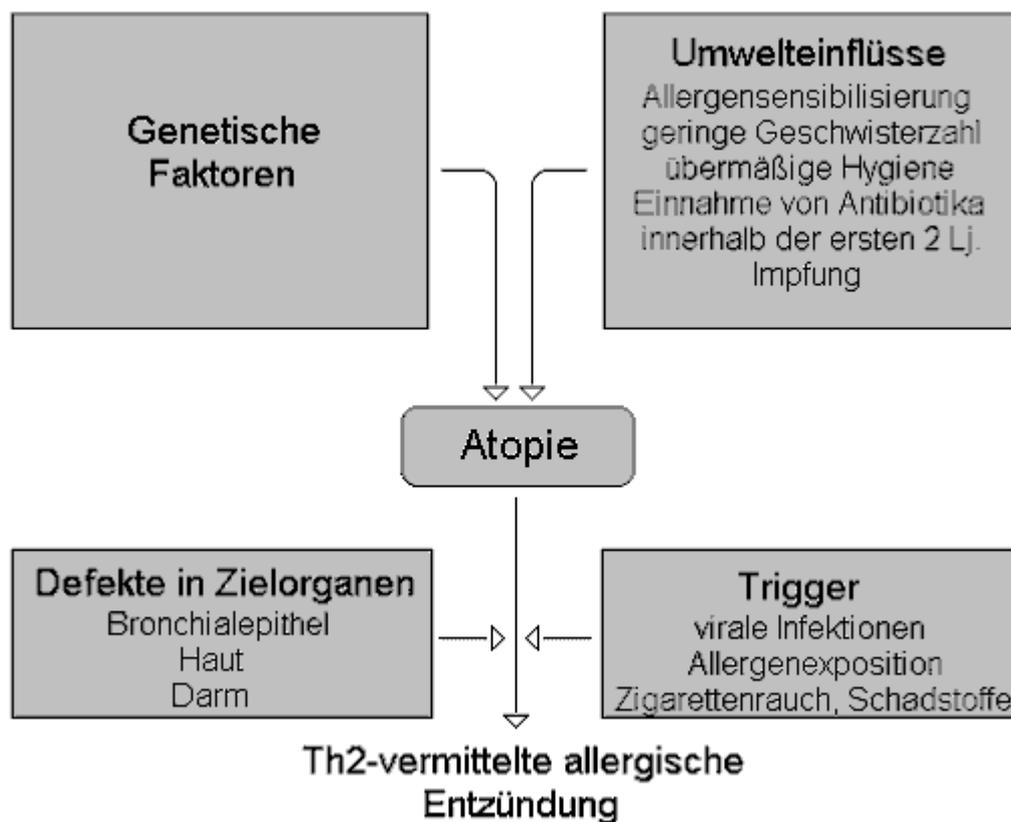


Abb. 2. beeinflussende Faktoren auf die Entwicklung von Atopie und Th2-vermittelter allergischer Entzündung [8]

1.2.3 IgE-Antikörper

IgE-Antikörper sind die Effektormoleküle der Typ-1-Überempfindlichkeitsreaktion nach Coombs und Gell. Sie bestehen aus zwei leichten Ketten (λ oder κ) und zwei schweren Ketten (ϵ) (Abb. 3) mit jeweils einer konstanten und einer variablen Region. Die Ketten sind untereinander über Disulfidbrücken verbunden. Der Serumspiegel liegt bei einem gesunden Erwachsenen bei < 100 kU/l.

Der Fetus beginnt mit der Produktion von IgE ab der 11. Gestationswoche [15]. Die Spiegel liegen am Anfang bei ca. 0,22 kU/l [16] und steigen in den nächsten 10 bis 14 Jahren. Dort findet sich der Maximalwert, während im weiteren Leben die IgE-Spiegel wieder sinken [17]. Der IgE-Wert im Nabelschnurblut zeigte in mehreren Studien einen positiven Zusammenhang zwischen erhöhten Werten und der Entwicklung atopischer Erkrankungen [18, 19, 20]. Bei 80,2% der Kinder mit erhöhten IgE-Spiegeln ($> 0,9$ kU/l) zeigten sich vor dem sechsten Lebensjahr die Symptome einer Atopie [19].

Ungebunden haben IgE-Antikörper im Serum

eine Halbwertszeit von zwei bis drei Tagen, zellgebunden wesentlich länger.

Initial bilden B-Lymphozyten nach Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen IgM-Antikörper. Nach einer weiteren Stimulierung der B-Zellen können diese den Isotyp der Antikörper unter Beibehaltung seiner Spezifität ändern. Es kommt zur Umlagerung und Splicen der DNA und damit zum Klassenwechsel. Im Falle des IgE werden zwei Signale benötigt: Interleukin-4 (IL-4) und die Aktivierung von CD40. Diese Signale kommen von CD4-positiven T-Lymphozyten, die sich nach Antigenkontakt und in Gegenwart von IL-4 zu Typ2-Helferzellen (Th2-Zellen) entwickeln [1].

IgE-Antikörper binden mit einer Domäne der konstanten Region an den hochaffinen $Fc\epsilon R1$ auf Mastzellen und basophilen Granulozyten. Der Kontakt mit dem Antigen löst eine Degranulation der Mastzellen aus (Abb. 4). Außerdem existiert ein niedrig affiner Rezeptor ($Fc\epsilon R2$ oder CD23) auf B-Lymphozyten und Eosinophilen [21], der bei der B-Lymphozyten-Differenzierung und der IgE-vermittelten Immunität als

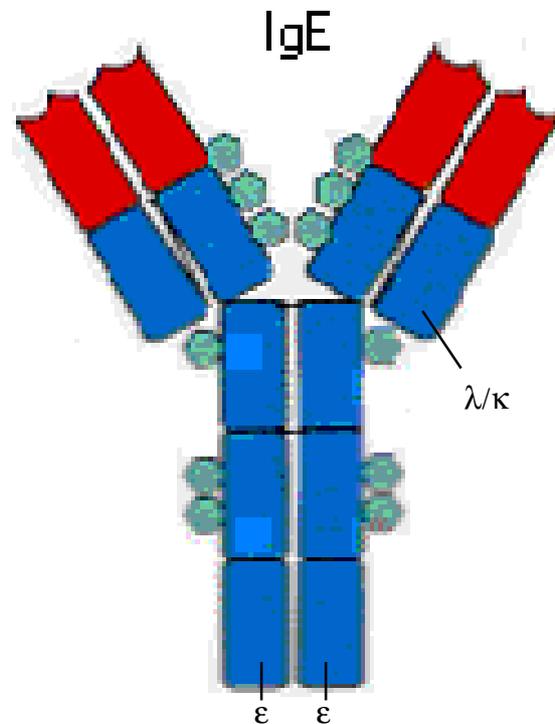


Abb. 3: Immunglobulin E, blau: konstante Region, rot: variable Region, grün: Kohlenhydratseitenketten

Regulator eine Rolle spielt [22, 23]. Die Aktivierung dieses Rezeptors durch IgE-Immunkomplexe führt zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie z.B. Histamin, Leukotrienen, Platelet-Activating-Factor und Tumor-Nekrose-Faktor- α [24, 25, 26].

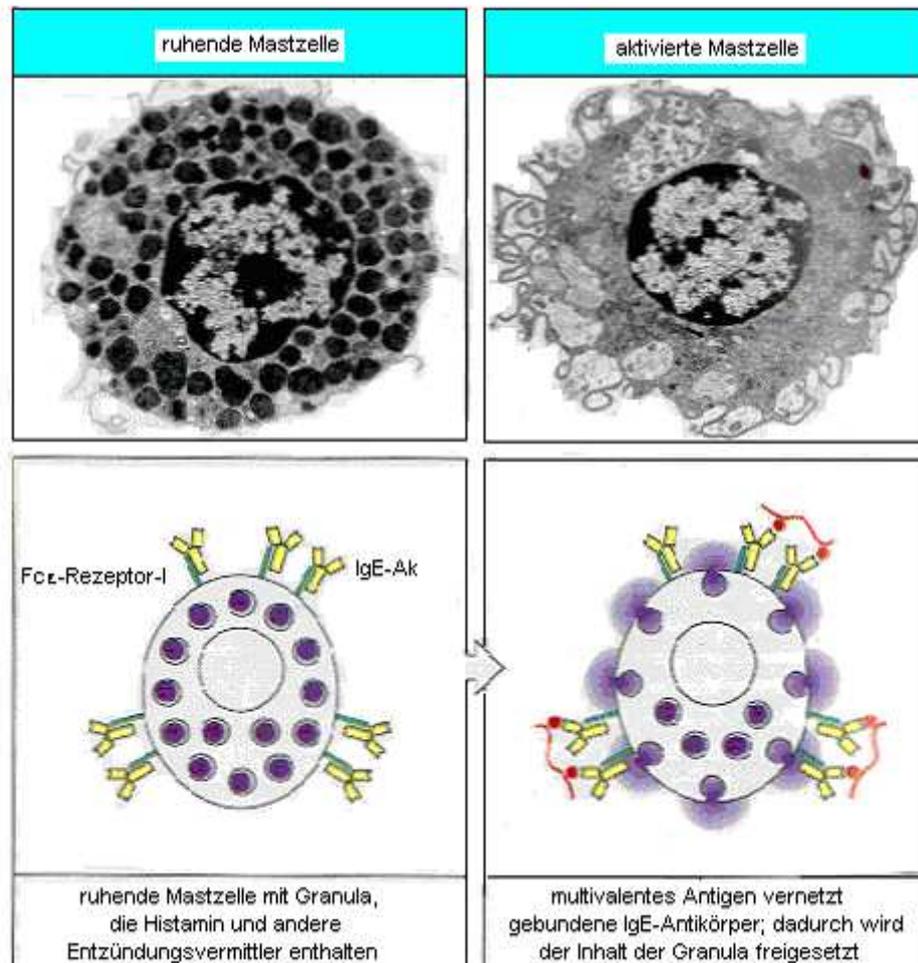


Abb. 4, oben links: ruhende Mastzelle, elektronenmikroskopisches Bild; oben rechts: aktivierte Mastzelle, elektronenmikroskopisches Bild; unten: schematische Darstellung [35]

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine starke Assoziation von spezifischen IgE-Antikörpern oder des Gesamt-IgEs im Serum mit Asthma vorliegt [27, 28, 29, 30, 31]. Das bedeutet, dass man den IgE-Spiegel nicht nur als Marker einer Atopie, sondern auch als Marker für Asthma verwenden kann. Im Gegensatz dazu konnte für die Rhinitis allergica keine Assoziation mit dem IgE-Spiegel festgestellt werden, jedoch mit der Hautreaktion auf häufige Aeroallergene [27].

Es zeigt sich, dass Männer im gesamten Lebenszeitraum von 6 bis 75 Jahren einen höheren IgE-Spiegel aufweisen als Frauen [32]. Neben dem Geschlecht haben auch die Rasse, Erkrankungen, Umweltfaktoren und das Alter Einfluss auf die Höhe des IgE-Spiegels.

In einer Studie mit Kindern filipinischer und kaukasischer Eltern mit gleichen Umweltbedingungen [33] hatten die filipinischen Kinder einen dreifach höheren IgE-Spiegel. Auch für atopische Erkrankungen konnte die Rasse als predisponierender Faktor bestätigt werden.

Für die Rheumatoide Arthritis konnte eine Tendenz zu erniedrigten IgE-Spiegeln gezeigt werden [34]. Höhere IgE-Werte finden sich dagegen bei Infektionen mit Parasiten, wobei in diesem Fall die IgE-Antikörper zur physiologischen Infektabwehr gehören.

Die Umweltfaktoren sind im Rahmen der Hygienehypothese zur Entstehung atopischer Erkrankungen schon beschrieben worden. Diese zeigen nicht nur auf die Prävalenz von Atopie einen Einfluss, sondern auch auf die Höhe des IgE-Spiegels. Ein Beispiel ist das Rauchen, das mit höheren IgE-Werten assoziiert ist.

1.3 Kandidatengene

Das Ziel dieser Studie war es, genetische Suszeptibilitätsloci für Atopie zu identifizieren. Dabei ist es wichtig, schrittweise vorzugehen [36, 37]: Der zu untersuchende Phänotyp muss definiert werden. Genomweite Kopplungsanalysen geben einen Hinweis auf eine Genregion. Weiter erfolgt eine Feinkartierung dieser Genregion mit Identifizierung der dort kartierten Gene. Die Struktur möglicher Kandidatengene wird identifiziert und auf Mutationen hin untersucht. Assoziationsanalysen zeigen einen statistischen Zusammenhang von Genotyp und Phänotyp.

Bei den untersuchten Varianten handelt es sich meist um Basenaustausche, sogenannte *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs). Sind diese in der 5'-Region oder im Promotor lokalisiert, können sie zu einem veränderten Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren führen. Auch für Varianten in den Introns konnte ein Einfluss auf die Genexpression festgestellt werden [38, 39]. Für SNPs in der 3'-Region konnte ein Zusammenhang mit der Stabilität der mRNA gefunden werden [40]. Polymorphismen in den Exons können zu einem Tausch einer Aminosäure führen. Durch die neue Aminosäuresequenz des Proteins kann es durch Potentialverschiebungen zu Konfigurationsänderungen kommen, die bei Zytokinen das Bindungsverhalten an Rezeptoren und bei Rezeptoren den Ablauf der Signalkaskade ändern können.

Neben SNPs gibt es noch andere Genvarianten, zum Beispiel Insertionen oder Deletion von Basen. Ein Sonderfall sind *Repeats*. Hierbei handelt es sich um eine Abfolge von Basen, die in dieser Kombination in variabler Länge vorliegen können. In einer Studie zum Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor [41] konnte der Einfluss eines Dinukleotid-*Repeats*

auf die Transkriptionsaktivität und die Expression von pre-mRNA in Abhängigkeit der Länge des *Repeats* gezeigt werden. Daneben funktionierte ein *GT-Repeat* im humanen Herz- $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -Exchanger-Gen (NCX1) als *Splicing*-Stimulator und war so in die Regulation der Expression dieses Gens einbezogen [42].

Lassen sich Assoziationen zu einem Phänotyp finden, ist nicht damit gesagt, dass genau diese Variante auch biologisch Ursache sein muss. Die untersuchte Variante kann mit dem biologisch relevanten Polymorphismus gekoppelt sein.

1.3.1 Genomweite Kopplungsanalysen

Genomweite Kopplungsanalysen dienen dazu, Kopplung zwischen genetischen Markern und Phänotypen, z.B. einer Asthmaerkrankung, festzustellen. Dabei überprüft man, ob der genetische Marker überzufällig häufig in Familien mit diesem Phänotyp co-segregiert. Je näher der Marker an der eigentlichen, den Phänotyp hervorrufenden DNA-Sequenz liegt, desto kleiner ist die Wahrscheinlichkeit der Trennung durch Rekombination während der Meiose [43]. Man sollte beachten, dass der genetische Marker nicht weiter als 1cM (centi-Morgan: Einheit für den Kartierungsabstand; entspricht einer Crossoverhäufigkeit von 1% oder ca. 750 kb) von dem Krankheitsgenort entfernt liegt, da bei größerem Abstand die Wahrscheinlichkeit der Trennung durch Crossover zunimmt. Genloci, die mehr als 50 cM auseinander liegen, kombinieren frei [43].

In mehreren genomweiten Untersuchungen zu atopie- und asthmarelevanten Genen [44 - 63] und Untersuchungen am Mausmodell [64] wurden unter anderem bei folgenden Genorten Kopplung beobachtet:

Zhang et al. (1999) [64] untersuchten die zweite Generation einer Kreuzung von BALB/c-Mäusen mit BP2-Mäusen. BP2-Mäuse zeigen auf bestimmte Reize das Bild eines menschlichen allergischen Asthmas mit Entzündung der Luftwege, Infiltration mit eosinophilen Leukozyten und eine unspezifische bronchiale Konstriktion auf Histamin oder Methacholin. Als messbare Phänotypen dienten der Atemwegswiderstand im Plethysmographen und die Anzahl der Eosinophilen in der Lunge.

Es fanden sich fünf chromosomale Regionen, die mit einer erhöhten Eosinophilenzahl oder mit einem erhöhten Atemwegswiderstand gekoppelt waren (Tab. 3).

Der erste humane genomweite Kopplungsanalyse für asthma-suszeptible Genregionen wurde 1996 durchgeführt. Daniels et al. [46] untersuchte 80 australische Familien mit insgesamt 203 Kindern. Als Phänotypen dienten der IgE-Spiegel, die Reaktion im Hauttest auf Hausstaub und Graspollen, die Anzahl eosinophiler Leukozyten im peripheren Blut und

die bronchiale Reaktion auf Methacholin, gemessen durch die FEV1 (forciertes expiratorische Volumen nach einer Sekunde). Sechs Genregionen wurden identifiziert: 4q35, 6p21.1-p23, 7p15.2, 11q13, 13q14.3-qter und 16q22.1-q11.2.

Tab. 3, Ergebnisse einer Mausmodell-Studie: Maus-Chromosom, gekoppelter Phänotyp, lod score und menschliche homologe Region mit Kandidatengenen

Maus-Chromosom	Phänotyp	lod score	menschliche homologe Region: Kandidatengene
9	Atemwegswiderstand ↑	2,5	Chromosom 11q23: IL10R
10	Atemwegswiderstand ↑	3,8	Chromosom 12q22-q24: IFNG
11	Eosinophile ↑	3,4	Chromosom 5q31: IL4
	Atemwegswiderstand ↑	3,65	Chromosom 17q12-q22: iNOS, Eotaxin
17	Atemwegswiderstand ↑	2,1	Chromosom 6p21: MHC, TNF

Die „Collaborative Study on the Genetics of Asthma“ (CSGA; 1997) [45] führte einen Vergleich ethnisch verschiedener Populationen durch. Es nahmen 43 afro-amerikanische Familien, 79 caucasische und 48 hispaniolische daran teil. FEV1, IgE-Spiegel und die Reaktion im Hauttest dienten als Phänotypen.

Für Afro-Amerikaner fanden sich zwei Genregionen (5p15, 17p11.1-q11.2), für Caucasier sieben (5q23-31, 6p21.3-23, 11p15, 12q14-24.2, 12q21.3-qter, 19q13) und für Hispanier drei (2q33, 12q14-24.2, 21q21). In weiteren Studien konnte Kopplung mit erhöhten IgE-Spiegeln bei Marker D4S1627 für Caucasier gefunden werden, für Afro-Amerikaner bei Marker D4S2431, D2S1270 und 11q21 und für Hispanier bei D1S2134, D14S611 und 1p32 [50, 51]. 2004 [53] kamen die Regionen 10p und 20p hinzu.

Bei Berücksichtigung der Belastung mit Zigarettenrauch wurden drei Regionen identifiziert: 1p bei 97 cM, 5q bei 135 cM und 9q bei 106 cM [52]; Kopplung zu Hausstauballergie zeigte sich für die Chromosomen 3 (D3S2409), 11 (D11S1984), 12 (D12S373), 13 (D13S787), 18 (ATA82B02), 19 (D19S591 und D19S1037) und 20 (D20S470), jedoch für die verschiedenen ethnischen Gruppen in unterschiedlichem Maße [54].

Die genomweite Kopplungsanalyse der Hutterer, einer deutschstämmigen Sekte in South Dakota mit einer geringen Anzahl von Vorfahren [47], ergab asthma-assoziierte Genloci auf Chromosom 3 (3p24.2-p22), 5 (5q23-q31), 12 (12q15-q24.1), 19 (19q13) und 21 (21q21). In weiteren Studien mit einer größeren Anzahl von Studienteilnehmern [49, 55] konnten die Ergebnisse bestätigt werden, außerdem zeigte sich bei vier weiteren Genloci (5p, 8p, 14q und 16q) Kopplung mit Asthma und bei drei Genregionen (1, 6 und 16) Kopplung mit positiven Hauttests auf Pollen.

Wjst et al (1999) [48] untersuchte 97 caucasische Familien (83 deutsche, 5 schwedische und 9 Familien mit anderen Nationalitäten) mit mindestens zwei an Asthma erkrankten Kindern. Das Ergebnis findet sich in Tab. 4: Es zeigten sich vier Genloci mit Kopplung zu bronchialer Hyperreaktion (BHR, bronchial hyperreactivity), Asthma, erhöhten IgE-Spiegeln, erhöhten Spiegel von spezifischen IgE (RAST) oder einer erhöhten Anzahl eosinophiler Leukozyten.

Tab.4. Wjst et al. (1999); gekoppelte Genloci, Marker und p-Werte für bronchiale Hyperreaktivität (BHR), Asthma, erhöhte Spiegel von Gesamt-IgE (IgE), spezifischen IgE (RAST) und Eosinophilen (EOS)

Chromosom	Marker	p-Werte				
		BHR	Asthma	IgE	RAST	EOS
2pter	D2S2298	0,0073	0,0074	0,0032	0,0009	
6p21.3	D6S291		0,0081	0,0020	0,0011	0,0015
9q31	D9S1784		0,0073	0,0098	0,0025	
12q13	D12S351		0,0103			

In einer französischen Studie (2000) [44] mit 107 Familien, in denen mindestens zwei Kindern an Asthma erkrankt waren, wurden sieben Genregionen identifiziert: 1p31, 11q13, 11p13, 12q24, 13q31 und 19q13, entweder gekoppelt mit erhöhten IgE-Spiegeln, erhöhten Eosinophilenzahlen, bronchialer Überreaktion oder mit Asthma, in einer späteren Studie [56] außerdem 8p23 und 12q14-q21.

Für ein finnisches Kollektiv [57] und ein isländisches Kollektiv [58], die sich aus Familien mit mindestens einem Asthmatiker zusammensetzten, konnten 7p14-p15 und 14q24 identifiziert werden. Für Dänen zeigten die Genregionen 1p36, 3q21-q22, 5q31 und 6p24-p22 Kopplung mit Atopie und dem IgE-Serum-Spiegel [59], für Holländer die Genregionen 2q, 6p, 7q und 13q mit dem IgE-Serum-Spiegel, spezifischem IgE gegen Milben und Pollen und Eosinophilenzahlen.

Untersuchungen mit Probanden asiatischer Herkunft ergaben für Chinesen Kopplung der Chromosomen 1 (D1S518), 2 (D2S1780), 4 (D4S1647), 10 (D10S1435), 16 (D16S412), 19 (D19S433) und 22 (D22S685) mit dem IgE-Serum-Spiegel, der FEV1 und Eosinophilenzahlen [63], für Japaner bei 4q35, 5q31-q33, 6p22-p21, 12q21-q23, 13q11 und 13q14 mit Asthma [61], 1p36, 4q13 und 9q34 mit saisonaler allergischer Rhinitis [62] und 3p24, 5q33, 12p13 und 12q24 mit dem IgE-Serum-Spiegel [62].

In Studien, die sich nur mit einer Genregion beschäftigten, zeigten unter anderem die Genregionen 5q31 [65, 66], 12q13-q23 [67] und 16p12 [68] Kopplung mit dem IgE-Spiegel oder Asthma und Atopie.

Ausführliche Zusammenfassungen der Kopplungsregionen finden sich bei Wjst (<http://cooke.gsf.de/asthmagen/main.cfm>, Asthma & Allergy Gene Database), [69] und [70]. In Tab. 5 sind die in dieser Studie relevanten Regionen und die dazugehörigen Literaturhinweise aufgezeigt.

Tab 5, Relevante Genregionen mit Literaturhinweisen

Genlocus	Studie
5q23-q31	[45, 47, 59, 61, 64, 65, 66]
9q31	[48]
12q14-q24	[44, 45, 47, 48, 56, 61, 62, 64, 67]
16q22.1-q11.2	[46, 68]

1.3.2 Assoziationsstudien

Assoziationsstudien sind ein weiterer Schritt bei der Identifizierung von Kandidatengenen. Assoziation liegt vor, wenn ein spezifischer Marker eines Gens in einer Population häufiger bei erkrankten als bei gesunden Personen vorkommt [43]. Assoziationsstudien werden dazu genutzt, um die bei den genomweiten Kopplungsanalysen gefunden Kopplungen in Genregionen einem oder mehreren Genen zuzuordnen.

In den oben genannten Regionen sind unter anderem auch die Gene wichtiger Botenstoffe und deren Rezeptoren gelegen, die in die Regulation der Immunantwort in Richtung Th1 oder Th2 eingreifen, z. B. Interleukin-4 (IL-4) und Interferon- γ (IFN- γ), oder in dem nachgeschalteten Ablauf eine Rolle spielen wie zum Beispiel die β -Kette des hochaffinen IgE-Rezeptors Fc ϵ R. Weitere Kandidatengene und deren Funktion sind in Tabelle 6 aufgezählt.

Tab. 6, Kandidatengene für Atopie und Asthma und ihre Funktion

Genort	Kandidatengen	Funktion
5q31	IL4	Differenzierung von naiven T-Lymphozyten zu Th2-Zellen, Induktion der IgG4- und IgE-Synthese in B-Lymphozyten
5q31	IL13	Induktion der IgG4- und IgE-Synthese in B-Lymphozyten
5q31	IRF1	Interferon Regulatory Factor 1, Transkriptionsaktivator von Interferon- β , Induktion von Apoptose
5q32	CD14	Rezeptor für LPS und bakterielle Endotoxine
6p21	HLA-DRB1	Histokompatibilitätsantigen auf B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen
11q13	FCGR1B	β -Kette des hochaffinen IgE-Rezeptors auf Mastzellen
12q13.3-q14.1	STAT6	signal transducer and activator of transcription 6, Teil des Signalweges von IL-4 und IL-13
12q14	IFNG	antivirale, antiproliferative, immunmodulatorische Wirkung über Genaktivierung und Induktion spezifischer Proteine
16p12	IL4R	α -Kette des Rezeptors für Interleukin-4

Zu den verschiedenen Kandidatengen wurden in der Vergangenheit zahlreiche Assoziationsstudien durchgeführt. Insgesamt waren die Ergebnisse nicht einheitlich: Assoziationen konnten teilweise in Replikationsuntersuchungen nicht reproduziert werden.

Interleukin-4:

Rosenwasser et al. [71] konnte eine Assoziation einer Mutation im Promotor von IL4 (C-590T) mit erhöhten IgE-Serum-Spiegeln feststellen ($p=0.003$). Diese Assoziation konnte in einer australischen Studie [72] für Heuschnupfen und in einer japanischen Studie mit asthmatischen Kindern [73] reproduziert werden. Außerdem zeigte das T-Allel Assoziation mit einer verminderten FEV₁ [74] und Neurodermitis in japanischen Familien [75]. He et al. [76] zeigte für Haplotypen von C-590T und dem IL13-Polymorphismus R130Q Assoziation mit Atopie ($p = 0,009$) und Neurodermitis ($p = 0,006$).

Jedoch nicht bei allen Studien zeigte sich für diesen Polymorphismus Assoziation mit Asthma, Atopie oder erhöhten IgE-Spiegeln [77, 78, 79].

Ein Dinukleotid-Repeat im zweiten Intron konnte für eine caucasische Population mit erhöhten IgE-Spiegeln [65] und für eine japanische Population mit erhöhten IgE-Spiegeln und Asthma [66] in Verbindung gebracht werden.

Interleukin-13:

Für eine IL13-Promotormutation an Position -1112 [80] zeigte sich Assoziation mit allergischem Asthma. In britischen und japanischen Kollektiven [81] konnte eine Assoziation mit Asthma, jedoch nicht mit erhöhten IgE-Spiegeln, für eine Mutation mit Basentausch (R130Q) in Exon 4 festgestellt werden. Graves et al. [82] wie auch Wang et al. [83] und Liu et al. [79] fanden für diese Mutation eine Assoziation mit dem Serum-IgE-Spiegel, He et al. [76] mit Atopie. Hakonarson et al. [78] stellte jedoch keine Assoziation für R130Q fest. Eine niederländische Studie [84] konnte die Ergebnisse für C-1112T reproduzieren (Asthma: $p = 0,005$; bronchialer Überreaktion: $p = 0,003$). Howard et al. [85] fand eine Gen-Gen-Interaktion für die IL13-Promotormutation -1112 mit einer Mutation im IL4-Rezeptor (S478P), die mit erhöhtem Risiko für die Entstehung von Asthma einherging.

IRF1:

Für ein GT-Repeat in Intron 7 konnte Nakao et al. [86] eine Assoziation mit Asthma aufzeigen. Besonders deutlich war es für Patienten, bei denen die Erkrankung vor dem 3. Lebensjahr aufgetreten war ($p = 0,0058$).

CD14:

Dubin et al. [87] fand in der bronchioalveolären Lavage von Asthmapatienten erhöhte Spiegel von löslichem CD14 (sCD14). In einer Studie [88], die die Auswirkungen von genetischen Varianten von CD14 auf die Th1-Th2-Balance untersuchte, wurde ein Basentausch von C zu T an Stelle -159 bp gefunden.

Dabei zeigte sich eine Assoziation des T-Allels mit erniedrigten IgE-Serum-Spiegeln, eine positive Korrelation von sCD14 mit IFN- γ und eine negative mit IL-4.

Eine Japanische Studie [89], die ein japanisches und ein britisches Kollektiv untersuchte, konnte weder für Asthma noch für Atopie eine Assoziation mit dem Polymorphismus finden, nur in einer Untergruppe des britischen Kollektivs konnte ein Effekt des T-Allels auf den IgE-Spiegel gesehen werden. Auch in einem isländischen Kollektiv [78] konnten die Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Bei niederländischen Asthmapatienten [90] zeigte sich für CC-Homozygote eine Assoziation mit einem gehäuften Auftreten von positiven Hauttests und erhöhten IgE-Serum-Spiegeln.

HLA:

Studien zum HLA-DRB1-Lokus zeigen Assoziation von HLA-DR3 mit spezifischen Antikörpern gegen *Blomia tropicalis*, einer tropischen Milbenart [91]. In Untersuchungen der CSGA [92] wurden für spezifisch gegen *Dermatophagoides pteronyssinus 1* wirksame IgE-Antikörper Kopplung in der HLA-D-Region gefunden. In weiterführenden Studien [93] wurden zwei Allele identifiziert, die mit einer spezifischen IgE-Antwort einhergingen.

FCER1B:

Zwei Polymorphismen waren von besonderem Interesse: I181L in Exon 6 und E237G in Exon 7. Für Ile181Leu zeigte sich in verschiedenen Studien Assoziationen mit Atopie [94] und bronchialer Hyperreagibilität [95]. Da im australischen Kollektiv [94] dieser Polymorphismus nicht sehr häufig war, suchte die Gruppe um Hill weitere Polymorphismen und fand in Exon 7 E237G, welcher mit einem erhöhten Risiko für Asthma (2,3; $p = 0,005$) einherging [96]. Das Ergebnis konnte für ein südafrikanisches Kollektiv [97] reproduziert werden, jedoch nicht in folgenden Studien für diesen und auch für andere Polymorphismen im Fc ϵ R1 β -Gen [78, 98, 99, 100, 101].

STAT6:

Heinzman et al. [102] konnte in der kodierenden Sequenz keine Polymorphismen identifizieren. Jedoch zeigte sich für ein GT-Repeat in Exon 1 für das Allel mit 15 Repeats eine höhere Allelfrequenz bei Kindern mit allergischen Krankheiten wie Asthma,

Neurodermitis oder Nahrungsmittelallergien [103] und für das Allel mit 16 *Repeats* einen Anstieg der Eosinophilenzahl [104]. Weitere Polymorphismen in der nichtkodierenden Sequenz zeigten Assoziation mit erhöhten IgE-Spiegeln [104].

INFG:

Hayden et al. [105] sah in IFNG ein mögliches Kandidatengen für Asthma. Er sequenzierte die Exons und die 5'-Region, konnte jedoch keine Mutation entdecken. In einer anderen Studie erwies sich ein *CA-Repeat* im ersten Intron, von dem berichtet wurde, das die *in-vitro*-Produktion von IFN- γ damit assoziiert sei [106], als Marker mit dem deutlichsten Hinweis von Kopplung mit Asthma ($p = 0,002$) [67], jedoch zeigte kein Allel Assoziation mit Asthma oder allergischer Rhinitis. Im Gegensatz dazu konnte Nieters et al. [107] für Personen, die homozygot für 13 *CA-Repeats* waren, ein erhöhtes Risiko für Allergien (odds ratio: 4,1), insbesondere für Heuschnupfen (odds ratio: 5,6), feststellen. Auch bei Nakao et al. [86] zeigte sich eine Assoziation mit Asthma: Das Allel mit 16 *CA-Repeats* war weniger häufig bei Patienten mit allergischem Asthma ($p = 0.0069$), während das Allel mit 18 *Repeats* häufiger in dieser Gruppe auftrat ($p = 0,034$).

IL4R:

Als erste Arbeitsgruppe fand Hershey et al. [108] für eine Mutation im Gen der α -Kette des Interleukin-4 Rezeptors (Q551R) eine Assoziation mit Atopie. Diese Ergebnisse konnten von Rosa-Rosa et al. [109] bestätigt werden. Außerdem ließ sich eine Assoziation des R551-Allels mit der Schwere einer bestehenden Asthmaerkrankung [109] erkennen. Dagegen zeigte sich bei Kruse et al. [110] eine Assoziation des R551-Allels mit erniedrigten IgE-Spiegeln, besonders bei gleichzeitiger Existenz des P478-Allels (S478P). Von anderen Gruppen konnte kein Zusammenhang mit dem IgE-Spiegel oder mit Asthma reproduziert werden [78, 107, 111, 112, 113, 114].

Für eine weitere Mutation (I50V) fand eine japanische Arbeitsgruppe [113] für das I50-Allel eine verstärkte Synthese von IgE, wogegen in einer chinesischen, einer malaiischen und einer indischen Population dies nicht bestätigt werden konnte [115].

Bei einer Haplotyp-Analyse [116], die die sieben häufigsten Polymorphismen im IL4RA-Gen einschloss (I50V, E375A, C406R, S411L, S478P, Q551R, S761P) fand sich kein Anhalt für Assoziation mit Atopie, jedoch ein Trend der mutierten Allele zu erniedrigten IgE-Spiegeln. Eine andere Haplotyp-Analyse [117] konnte zwar einen Einfluss auf die Asthma- und Atopiehäufigkeit feststellen, aber der stärkste Assoziation für die jeweils untersuchten Kollektive (Hutterer, Europäer, Afroamerikaner, Hispanier) fand sich bei unterschiedlichen Haplotypen. Der Trend zu erniedrigten IgE-Spiegeln für *Single*

Nucleotide Polymorphisms (SNPs) konnte für E375A, C406R und S478P bei Howard et al. [85] reproduziert werden (p : 0,0007- 0,02). Wie oben beschrieben fand die Arbeitsgruppe außerdem eine Gen-Gen-Interaktion des IL4RA-S478-Allels und einer Mutation im IL13-Promotor, die mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Asthma einherging (OR: 4,87, p = 0,004).

1.4 Interleukin-4 und sein Rezeptor

1.4.1 Interleukin-4 (IL-4)

IL-4 ist Protein, bestehend aus 153 Aminosäuren. Es ist auf dem langen Arm von Chromosom 5 (5q31) kodiert und wird hauptsächlich von aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten, und zwar von einer Untergruppe, den Th2-Zellen, produziert. Weitere Produzenten von IL-4 sind unter anderem basophile Granulozyten und Mastzellen, die durch Quervernetzung ihrer Fc ϵ - und Fc γ - Rezeptoren aktiviert wurden.

Die Effekte von IL-4 auf andere Zellen sind vielfältig [118, 119]: Das Wachstum von B-Lymphozyten wird angeregt. Außerdem kommt es zu einer Expression von MHC-Klasse-II Molekülen, CD23 und CD40. CD40 spielt zusammen mit seinem Liganden auf aktivierten T-Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten und der Produktion von IgE und IgG4 als Antwort auf IL-4.

IL-4 ist verantwortlich für die Differenzierung von naiven T-Lymphozyten zu Th2-Zellen, die die Produzenten von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 sind. Dagegen wird das Auftreten von IFN- γ -produzierenden T-Lymphozyten und auch die Produktion von IFN- γ durch T-Lymphozyten von IL-4 unterdrückt. Außerdem wird die spontane und die LPS-induzierte Produktion von verschiedenen Zytokinen, unter anderem IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- α , in Monozyten, blockiert.

Auf Fibroblasten wirkt IL-4 als chemotaktischer Faktor, auf Mastzellen und Endothelzellen als Proliferationsanreiz. Die Expression des Fc ϵ -Rezeptors auf Mastzellen wird induziert, bei Vernetzung der Rezeptoren durch ein Antigen kommt es unter IL-4-Wirkung zu einer verstärkten Ausschüttung von Histamin.

Die bekannteste Variante im Gen von IL-4 ist ein Basentausch in der 5'-Region (C-590T). Rosenwasser et al. [120] kam zu dem Ergebnis, dass Transkriptionsfaktoren durch diese Mutation eine höhere Bindungsaffinität besitzen und es deshalb zu einer gesteigerten IL-4-Aktivität und einem erhöhten IgE-Spiegel kommt.

In einigen Assoziationsstudien wurde versucht, einen Zusammenhang mit Erkrankungen wie akuter Herztransplantatabstoßung [121], COPD [122], Systemischem Lupus Erythematodes [123], juveniler idiopathischer Arthritis [124] und schwerer *Respiratory-Syncytial-Virus*(RSV)-Infektion [125] zu finden, was aber nur bei der RSV-Infektion gelang.

Daneben findet sich im zweiten Intron von IL-4 ein Dinukleotid-*Repeat*, für das Assoziationen in verschiedenen Populationen zu erhöhten IgE-Spiegeln [65, 66] und Asthma [66] gefunden werden konnten.

1.4.2 Der Interleukin-4 Rezeptor

Seine Wirkung vermittelt IL-4 durch den Interleukin-4-Rezeptor (IL-4R), einem Dimer aus einer 140 kDa schweren α -Kette (IL-4R α) und der 65 kDa schweren *common-gamma*-Kette (γ c), die auch anderen Zytokinrezeptoren, z. B. dem Interleukin-2-Rezeptor [119], als Komponente dient. Der IL-4R wird mit einer Kopienzahl von 100 bis 5000 pro Zelle auf vielen Zellen exprimiert, darunter auch auf hämatopoetischen Zellen, Epithelzellen, Muskelzellen, Fibroblasten, Hepatozyten und Hirngewebe.

Die IL-4R α -Kette, auch Teil des IL-13-Rezeptors, gehört zu der Superfamilie der Hämatopoetin-Rezeptoren, zu denen auch die Rezeptoren für IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21, Prolaktin, Wachstumshormon, Erythropoetin, GM-CSF und G-CSF gehören (Abb 5) [126, 127]. Charakteristisch für die extrazelluläre Domäne dieser Familie sind mehrere, meistens jedoch vier konservierte Cystein-Residuen, ein Trp-Ser-X-Trp-Ser-Motiv, das sich kurz oberhalb der transmembranären Region befindet und eine Domäne mit einer Ähnlichkeit mit Fibronectin Typ III [126].

Bindung von IL-4 löst eine Signalkaskade unter anderem über Mitglieder der Janus-Kinase-Familie (Jak-1, Jak-2 und Jak-3) und Insulin-Rezeptor-Substrat-1 und -2 oder über STAT-Moleküle (*signal transducers and activators of transcription*) aus [119].

Das Gen für die IL-4R α -Kette befindet sich an der Position 16p12 und kodiert für ein Glykoprotein mit 825 Aminosäuren, wobei 25 Aminosäuren ein Signalpeptid bilden, 207 Aminosäuren zur extrazellulären Domäne gehören, 24 Aminosäuren transmembranär liegen und 569 Aminosäuren die intrazelluläre Region bilden.

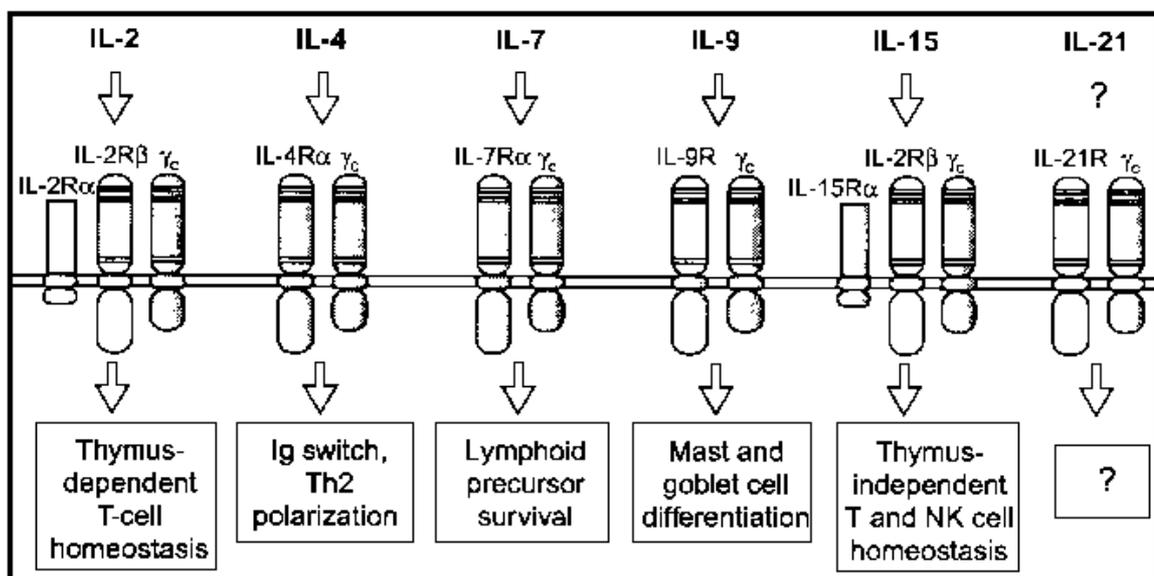
Das Gen wurde in zahlreichen Studien untersucht [128, 129, 130]. Dabei wurden mehrere häufige Genvarianten gefunden, die zu einem Aminosäureaustausch führten (Anmerkung: Die Bezeichnung der in der Literatur vorbeschriebenen Polymorphismen unterscheidet sich je nach Arbeitsgruppe durch die Aminosäuren des Signalpeptids.). Einige davon wurden in

Assoziation mit verschiedenen Krankheiten gebracht. Neben atopischen Erkrankungen [108 - 117, 131] (s.o.) gehörten unter anderem Studien zu Multiple Sklerose [132] und zu systemischem Lupus erythematoses [123] dazu, jeweils Krankheitsbilder, deren Pathogenese auf eine Fehlregulation des Immunsystems zurückgeführt und die wie Atopie mit verändertem Th1-Th2-Gleichgewicht in Verbindung gebracht werden.

Zur Überlebenszeit von Transplantatnieren existieren zwei Studien, jedoch mit unterschiedlichem Ergebnis: Während Hackstein et al. [133] für Patienten mit dem R551-Allel eine verminderte Überlebenszeit des Transplantats feststellen konnte, zeigte sich bei Hahn et al. [134] kein Effekt für Q551R, jedoch für eine Promotormutation im Gen für Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α).

Außer den schon beschriebenen Mutationen, die zu einem Basenaustausch führen, ist die Promotormutation C-3223T bekannt, wobei das T-3223-Allel mit einem signifikant niedrigerem löslichen IL-4-Rezeptor-Spiegel assoziiert ist [131]. Vom löslichen IL-4R ist bekannt, dass er die IL-4-induzierte Proliferation in murinen T-Zellen und die Produktion von IgG1 und IgE inhibiert [126].

Abb. 5, Zytokin-Rezeptor-Familie mit der *Common- γ* -Kette (γ_c) [127]



1.5 Conserved-Noncoding-Sequence-1 (CNS-1)

Als *Conserved-Noncoding-Sequences* werden Sequenzen klassifiziert, die sich durch eine hochgradige Konservierung unter Säugetieren auszeichnen. Bei einem Vergleich von humanen Sequenzen auf Chromosom 5q31, auf dem einige der wichtigsten Zytokine (IL-4, IL-13, IL-5) kodiert sind, und korrespondierenden Sequenzen auf dem Mausechromosom 11, wurden mehrere dieser hochkonservierten Sequenzen gefunden [135].

Die längste Sequenz mit 401 bp, CNS-1, liegt innerhalb der 13 kb messenden Region zwischen den Genen für IL-4 und IL-13, und zwar ca. 3 kb von IL-13 und 10 kb von IL-4 entfernt. Die Übereinstimmung der Sequenzen von verschiedenen Säugetierarten mit der humanen Sequenz liegt bei 80% (*Bos domesticus*: 86%, *Canis familiaris*: 80%, *Lepus europaeus*: 72%, *Rattus rattus*: 75%, *Mus musculus*: 76%).

In der Sequenz von CNS-1 konnten einige Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren identifiziert werden [136]: für NFAT, c-Myb, AP-1, *Activation Transcription Factor* und Ikaros. Außerdem konnte gezeigt werden, dass zwei Th2-Zell-spezifische DNase I hypersensitive Motive, HSS1 und HSS2 [137], innerhalb des murinen CNS-1 liegen.

CNS-1 steht im Verdacht, zu den *Locus Control Regions* (LCRs) zu gehören, die auf weite Entfernung auf der Basis von Chromatinumgestaltung die Expression von Genen steuern können [138, 139, 140]. Neben einer artübergreifenden Konservierung der LCR angrenzenden Sequenzen zeichnen sich LCRs durch das Vorhandensein DNase I sensitiver Motive aus [138], wie es bei CNS-1 der Fall ist.

Für einige Gene sind LCRs charakterisiert worden. Dazu gehören die *Beta-Like Globin*-Gene mit der beta-Kette des Hämoglobins [141] und die Gene für die alpha-Kette des Hämoglobins [142]. Agarwal et al. [140] wie auch schon vorher Dolganov et al. [143] halten für die Genregion um IL-4, IL-13 und IL-5 eine gemeinsame Steuerung wegen der physikalischen und funktionellen Verbindung der Zytokine für möglich.

Diese Vermutungen konnten tierexperimentell belegt werden. Kelly [144] konnte die Koregulation von IL-4, IL-13 und IL-5 in T-Zell-Klonen nachweisen. Bei Versuchen mit CNS-1-negativen Th2-Zellen von transgenen Mäusen [135] zeigte sich eine geringere Produktion von IL-4, IL-13 und IL-5 im Vergleich mit CNS-1-positiven Zellen. Dies konnte von Mohrs et al. [145] bestätigt werden. Auch die IgE-Konzentration zeigte eine Abhängigkeit von CNS-1. Bei CNS-1^{-/-}-Mäuse fanden sich sechs Wochen nach Infektion mit *Leishmania major* im Gegensatz zu CNS-1^{+/+}-Mäusen deutlich reduzierte IgE-Spiegel [145].

CNS-1 ist hochkonserviert: zwei Studien konnten keine Mutationen in der humanen CNS-1-Region entdecken [146, 147].

1.6 Interleukin-13

IL-13 wurde 1993 von Minty et al. [148] entdeckt. Das Gen befindet sich auf Chromosom 5q31 in direkter Nähe zu IL-4, mit dem es einige Wirkungen gemeinsam hat.

So stimuliert IL-13 wie IL-4 die Synthese von IgG4 und IgE und induziert die Expression von MHC-Klasse-II Molekülen und CD23 (niedrig-affiner Rezeptor für IgE (FcεRII)) [149, 150].

In experimentellen Asthmastudien mit Mäusen konnte durch Gabe von IL-13 der Asthmaphänotyp mit Atemwegshyperreagibilität, Eosinophilenzahlerhöhung und Überproduktion von Schleim durch Becherzellen induziert werden [151], und zwar unabhängig von IgE und eosinophilen Leukozyten [152]. Mäuse ohne das Gen für IL-13 (IL-13^{-/-}) zeigen eine reduzierte Produktion von IL-4, IL-5 und IgE [153], während bei Überexpression von IL-13 der IgE-Spiegel gegenüber normalen Mäusen um 10 bis 100 mal erhöht war [154].

Außerdem zeigten IL13^{-/-}-Mäuse nach Allergenapplikation keine Atemwegshyperreagibilität [155]. Auch die Schleimproduktion war vermindert. Diesen Effekt konnte man durch Blockade von IL-13 durch Antikörper reproduzieren [156]. Die exogene Zufuhr von IL-13 erzielte das gegenteilige Ergebnis.

Auch bei der Abwehr von parasitären Infektionen zeigten sich IL13^{-/-}-Mäuse benachteiligt. Die Tiere versagten bei der effektiven Beseitigung von *N. brasiliensis*; die Becherzellhyperplasie, die normalerweise bei Wurminfektionen auftrat, blieb aus [157].

IL-13 wird von aktivierten Th2-Zellen, Mastzellen und basophilen Leukozyten produziert [158]. Der Auslöser für die Sekretion besteht in der Aktivierung des hochaffinen Rezeptors für IgE-Antikörper, die durch die Vernetzung dieser an dem Rezeptor gebundenen Antikörper durch ein Antigen ausgelöst wird. Der Rezeptor besteht aus zwei Komponenten: der IL-4Rα-Kette des IL-4-Rezeptors und der IL-13Rα1-Kette [158, 159]. Eine IL-13Rα2-Kette, an die sich IL-13 mit einer höheren Affinität bindet, scheint kein Signal weiterzuleiten [158]. Rezeptoren für IL-13 wurden neben B-Lymphozyten auch auf Bronchialepithel und glatten Muskelzellen bei Asthmapatienten gefunden [81]. Die Signaltransduktion läuft unter anderem über STAT6 [156, 158], JAK1 und Tyrosin-Kinase 2 (TYK2) [159].

Für die beiden oben genannten Varianten, C-1112T und R130Q, zeigte sich kein Anhalt für Assoziation mit M. Basedow in einer polnischen Studie [160]. Jedoch konnte Heinzmann et al. [161] aufzeigen, dass das Q130-Allel seltener in Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis auftrat als in Patienten mit Asthma. Für das T-1112-Allel wurde eine Assoziation mit COPD gefunden [122].

1.7 Interferon-regulierender Faktor 1 (IRF-1, *interferon-regulatory-factor-1*)

Der Interferon-regulierende Faktor 1 wurde 1988 bei Studien zur Regulation von Interferon- β [162] entdeckt. Im Laufe der Zeit konnten weitere zur IRF-Familie gehörende Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Zur Zeit umfasst sie neun Faktoren: IRF-1, IRF-2, IRF-3, IRF-4, IRF-5, IRF-6, IRF-7, IFN-*consensus-sequence-binding* Protein (ICSBP oder IRF-8) und p48 (oder IRF-9) [163]. Die Faktoren zeichnen sich durch einen Tryptophan-Cluster in der DNA-bindenden Domäne am N-terminalen Ende aus [164].

Die Induktion der IRFs erfolgt über IFN- α , IFN- β und IFN- γ , wobei IFN- γ besonders IRF-1, IRF-2, ICSBP und p48 [164, 165] stimuliert. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass IRF-1 [162] und IRF-2 [166] direkt durch Viren induzierbar sind, wie auch IRF-1 durch andere Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6 [167].

Zwischen IRF-1 und IRF-2 besteht ein enger Zusammenhang. Beide Faktoren binden durch die hohe Strukturgleichheit der Aminosäuren 1-113, die die DNA-Bindungsdomäne darstellen [162], an die selben *Cis*-Elemente in den Promotoren von IFN- α , IFN- β [168] und vielen durch IFN-induzierbaren Genen [169].

Jedoch wirken die Faktoren dort in verschiedene Richtungen, IRF-1 als Transkriptionsaktivator und IRF-2 als Transkriptionsrepressor [170], auch untereinander, da jeweils beide Gene in ihren Promotorregionen Bindungsstellen für IRF-1 und IRF-2 besitzen. IRF-1 induziert die Expression des eigenen Repressors IRF-2 [167].

IRF-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen: erstens durch die autokrine Stimulation der Synthese von IFN- α und IFN- β z.B. bei Virusinfektionen [169], zweitens als Mediator der IFN- γ -induzierten Abwehr über iNOS, 2-5A Synthetase, aktivierte Proteinkinase (PKR, siehe 1.9) oder GBP (Guanylat-bindendes Protein) [164, 165, 171].

In Studien mit IRF-1^{-/-}-defizienten Mäusen konnte eine Minderproduktion von iNOS und GBP [171] nachgewiesen werden. Außerdem waren diese Mäuse anfälliger für Infektionen mit *Brucella abortus*, einem fakultativ intrazellulären Bakterium [164], *Mycobacterium bovis* [172], *Leishmania major* [173] und *Toxoplasma gondii* [174]. Bei 5q-assoziierten Leukämien war die PKR reduziert [175].

Jedoch nicht für alle Viren wird IRF-1 zur Immunabwehr benötigt. Z.B. bei Newcastle-Disease-Virus-infizierten embryonalen Fibroblasten von IRF-1^{-/-}-defizienten und Wildtyp-Mäusen konnte kein Unterschied in der mRNA-Kopienzahl für IFN- α und IFN- β festgestellt werden [166].

IRF-1 ist der Mediator der Interferonwirkung auf das Zellwachstum und die Induktion maligner Tumoren. IFNs werden als negative Zellwachstumsfaktoren [166] angesehen. Mit IRF-1-defizienten und Wildtyp-Mäusen konnte die Wirkung von IRF-1 auf Apoptose gezeigt werden: während die embryonalen Fibroblasten des Wildtyps nach Aktivierung eines Onkogens und DNA-Schädigung Apoptose begehen, zeigen IRF-1-defiziente Zellen eine Transformation [176].

Auch in dieser Funktion besteht ein Antagonismus zwischen IRF-1 und IRF-2: IRF-1 wirkt auf Zellen antionkogenetisch, IRF-2 zeigt onkogenetische Aktivitäten [167]. Dabei scheint das Verhältnis von IRF-1 zu IRF-2 der ausschlaggebende Faktor zu sein. Während der G1-Phase des Zellzyklus erreicht die IRF-1-mRNA einen Höhepunkt und fällt bei Beginn der DNA-Synthese ab, die IRF-2-mRNA bleibt den Zellzyklus über weitgehend konstant [166].

Bei akuter myeloische Leukämie fand sich ein erniedrigtes IRF-1/IRF-2-Verhältnis [177]. Auch bei Myelodysplastischen Syndromen zeigt die Genregion von IRF-1, 5q31, Veränderungen, zum Teil durch Deletion [166], aber auch durch alternative *Splice*-Vorgänge, die zu einem funktionslosen Produkt führen [178]. In einem Fall von einem Magenkarzinom fand man eine Punktmutation im Exon 2, die zu einem Aminosäureaustausch und zu einem inaktiven Protein führte [179].

Das Gen für IRF-1 liegt auf Chromosom 5q31 in Nachbarschaft zu IL4, IL13, IL5 und IL3. Es besteht aus 10 Exons und kodiert für ein Protein mit 325 Aminosäuren. Die Genregion zeigt unter anderem Kopplung mit M. Crohn [180], aber auch mit dem IgE-Spiegel ($p=0,0007$) [65] und Asthma ($p=0,0002$) [181]. Eine Variante in der 3'-Region zeigte Assoziation mit juveniler idiopathischer Arthritis ($p=0,002$) [124], jedoch nicht mit Zöliakie [182]. Für ein *GT-Repeat* in Intron 7 konnte für Multiple Sklerose keine Assoziation nachgewiesen werden [183].

1.8 Toll-like-Rezeptor-4 (TLR-4)

Die Familie der Toll-like-Rezeptoren zeigt eine Homologie mit dem Toll-Protein von *Drosophila* (Taufliegen), einem transmembranären Rezeptor, der für die korrekte Längsausrichtung des Achsenskeletts der Embryogenese dieser Fliegenart verantwortlich ist [184] und im adulten Tier in die Abwehr von Pilzinfektionen einbezogen ist [185].

Der Toll-like-Rezeptor-4 wurde auf der Suche nach dem Rezeptor, der die Antwort auf Lipopolysaccharid (LPS) gram-negativer Bakterien in die Zelle überträgt, gefunden. Einige Mausstämme zeigten eine genetische Resistenz gegen LPS und waren damit höchst anfällig

für gram-negative Infektionen [186]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Mäuse eine Mutation im Gen für Tlr-4 oder eine Deletion des gesamten Gens hatten, welche für die Resistenz verantwortlich waren.

Im Säugetier-Genom wurden 10 homologe Sequenzen gefunden. Der TLR-4, ein 841 aminosäurenlanges Protein, weist die charakteristischen Toll-Motive auf: eine extrazelluläre Leucin-reiche Domäne und eine zytoplasmatische Homologie mit dem Interleukin-1-Rezeptor, einem weiteren Vertreter der TLR-Familie [186].

Der TLR-4 ist eine Untereinheit des Lipopolysaccharidrezeptorkomplexes. Lipopolysaccharid (LPS) oder auch Endotoxin, Membranbestandteil gram-negativer Bakterien, bindet zusammen mit dem LPS-bindenden Protein an CD14, einem glykosylphosphatidylinositol-verankerten Protein auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen und polymorphkernigen Neutrophilen [90]. Zusammen bilden sie den Liganden für TLR-4 [187]. Über Einbeziehung des Adapterproteins MyD88 und der Serin-Kinase IRAK (IL-1R-assoziierte Kinase) kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, NF- κ B (nuklearer Faktor κ B) und AP-1 (Aktivator-Protein 1) [188, 189], die die Zytokinproduktion von TNF, IL-1, IL-6 steuern und deren Ausschüttung [186, 189] veranlassen (Abb. 6). Jedoch konnte gezeigt werden, dass auch andere Gene in der LPS-Antwort eine Rolle spielen [190] und das TLR-4 auch für andere Liganden, wie z.B. Lipoteichonsäure gram-positiver Bakterien und Proteine des Respiratory Syncytial Virus (RSV), als Rezeptor fungiert [191].

Genort des TLR-4 ist der lange Arm von Chromosom 9 (9q32-q33) [192]. Das Gen besteht aus drei Exons [185]; ein zusätzliches Exon zwischen Exon 1 und 2, das zu einer Verkürzung des Proteins führt, wurde beschrieben [192]. Exprimiert wird TLR-4 auf Makrophagen, Kardiomyozyten, Atemwegsepithel, glatten Muskelzellen und in geringer Anzahl auf den meisten Geweben [191].

Es sind einige Genvarianten, auch mit Aminosäureaustausch, beschrieben [193]. Hauptsächlich befinden sie sich im dritten Exon, das für die extrazelluläre Domäne kodiert. Für zwei der Varianten, D299G und T399I, konnte eine Assoziation mit Endotoxin-Hyporesponsibilität nach LPS-Inhalation gezeigt werden [194]. In Transfektionsstudien konnten diese Ergebnisse für D299G in Atemwegsepithelzellen und Alveolarmakrophagen [194] und für Monozyten [195] bestätigt werden. Zellen mit T399I zeigten eine intermediäre Antwort auf LPS [194]. Weiter fanden Kiechl et al. [191] für Atherosklerose und Lorenz et al. [196] und Agnese et al. [197] für Septischem Schock Assoziationen mit dem G299-Allels. Jedoch für Asthma oder Atopie [198] konnte kein Zusammenhang mit

D299G und T399I festgestellt werden, wie auch für Multiple Sklerose [199] und Sepsis [200]. Smirnova et al. [201] fanden eine Assoziation mit Meningokokkensepsis, jedoch nicht mit den häufigeren Varianten D299G und T399I, sondern mit seltenen Mutationen.

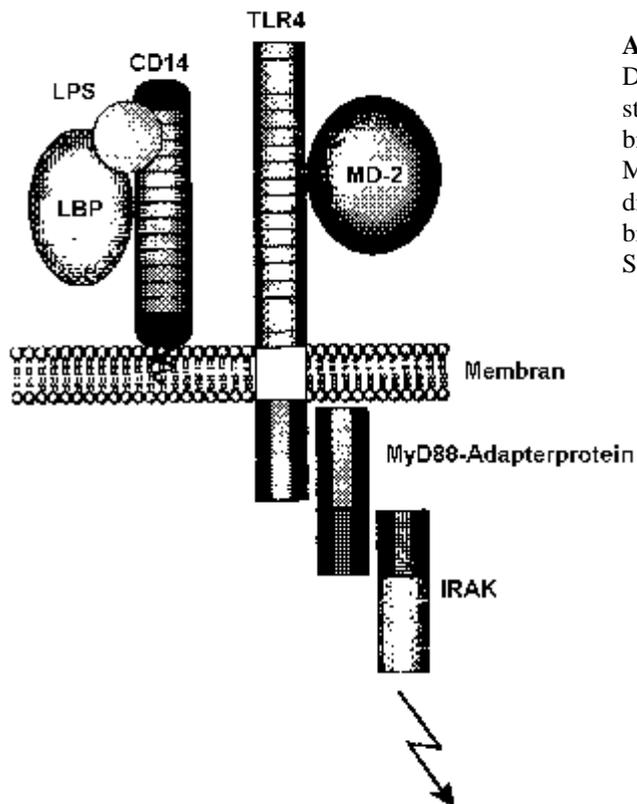


Abb. 6,

Der TLR4-Rezeptor-Komplex bestehend aus TLR4, LPS und LPS-bindendem Protein (LBP) MD-2 ist ein sezerniertes Protein, das an die extrazelluläre Domäne von TLR4 bindet und wichtig für die Signaltransduktion ist [188].

1.9 Interferon- γ (IFN- γ)

Interferone (IFN) wurden erstmals entdeckt durch ihre antivirale Aktivität. Es lassen sich zwei Familien abgrenzen: Typ I Interferone mit den Vertretern IFN- α und IFN- β und Typ II Interferon mit IFN- γ , wobei Typ II Interferone von über 20 Genen kodiert werden, IFN- γ jedoch nur von einem [202].

IFN- γ ist ein Glykoprotein aus 146 Aminosäuren, das in aktiver Form als Homodimer vorliegt [165]. Das Gen ist auf Chromosom 12q14 lokalisiert und besteht aus vier Exons und drei Introns.

Gebildet wird IFN- γ von aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten, und zwar Th1-Zellen, die unter Einfluss von Interleukin-12 (IL-12) aus naiven T-Lymphozyten hervorgegangen sind, und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). In T-Lymphozyten spielt als Auslöser der IFN- γ -Freisetzung die Quervernetzung des T-Zell-Rezeptors eine Rolle [203], in NK-Zellen sind es Zytokine, ausgeschüttet von Makrophagen, wie z.B. TNF- α und IL-12 [204]. Außerdem wird die IFN- γ -Produktion in NK-Zellen von IFN- γ autokrin stimuliert [205].

IFN- γ spielt eine wichtige Rolle in der Immunmodulation und in der Regulation von über 200 Genen. Signalübermittler ist ein auf allen kernhaltigen Zellen vorkommender Rezeptor [206], bestehend aus zwei Untereinheiten: einer α -Kette und einer β -Kette. Über JAK- und STAT-Aktivierung setzt sich das Signal in die Zelle fort. Es kommt zur Bildung eines STAT1 α -Homodimers, auch *Gamma-Interferon-Activation-Factor* (GAF) [207] genannt, der als Transkriptionsfaktor an *Gamma-Activation-Sites* (GAS) bindet, und unter anderem die Transkription der primären Antwort wie den Mitgliedern der *Interferon-Regulatory-Factor-Familie* (IRF), IRF-1, IRF-2, p48 und ICSBP, induziert. Diese spielen eine komplexe Rolle als Regulatoren der sekundären Antwort, indem sie an Promotoren mit IRSE-Motiven binden und dort als sekundäre Transkriptionsfaktoren wirken.

Wie in Abb. 1 zu sehen ist, wirkt IFN- γ auf Th2-Zellen hemmend, und zwar auf das Wachstum [208] und die Zelldifferenzierung [209].

Auf B-Lymphozyten wirkt IFN- γ als Differenzierungsfaktor, außerdem wird die IgG2- und die IgG3-Synthese gefördert und die IgE-Synthese gehemmt. In Mäusen mit einem genetisch veränderten IFN- γ -Rezeptor, der nur noch aus der extrazellulären Domäne bestand, konnte gezeigt werden, dass die IgG2- und IgG3-Spiegel im Serum reduziert waren [210]. Die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf allen Zellen wird durch IFN- γ gesteigert [211], wie auch die Expression von Klasse-II-Moleküle auf B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und aktivierten Makrophagen [165].

Antiviral wirkt IFN- γ durch Induktion verschiedener Proteine: einer durch Doppelstrang-RNA (dsRNA) aktivierte Proteinkinase (PKR), einer 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (2-5A-Synthetase) und einer dsRNA spezifischen Adenosin-Deaminase (dsRAD) [165], die über unterschiedliche Mechanismen die Virusreplikation hemmen.

Auch der „*Oxidative Burst*“ zur Abwehr von phagozytierten Pathogenen in neutrophilen Leukozyten und Makrophagen wird durch IFN- γ beeinflusst. Es kommt zu einer Induktion der Transkription der induzierbaren Stickoxid-Synthetase (iNOS) [212] über IRF-1 und Komponenten der O₂⁻ produzierenden NADPH-Oxidase [213].

Im Gen für IFN- γ sind einige Genvarianten bekannt, wobei jedoch die kodierenden Sequenzen und die 5'-Region hochkonserviert erscheinen [105, 214, 215]. Der am bestuntersuchtete Polymorphismus ist ein *CA-Repeat* im ersten Intron. Er wurde unter anderem mit Erkrankungen wie Multipler Sklerose [215, 216], insulinabhängigem Diabetes mellitus (IDDM) [217 - 219], Rheumatoider Arthritis (RA) [220], juveniler chronische Arthritis (jCA) [124] und systemischem Lupus erythematodes (SLE) [221] in Verbindung gebracht. Für Multiple Sklerose und jCA ließen sich keine Assoziationen finden. Zwei der

Studien zu IDDM [217, 219] hatten ein positives Ergebnis, auch für SLE und RA zeigten sich Unterschiede in der Schwere der Erkrankungen.

Für IFN- γ fand sich bei *in vitro*-Versuchen für das *CA-Repeat* ein Anhalt für Effekte auf die Expression des Proteins: Die Produktion von IFN- γ war erhöht bei Probanden mit 12 *Repeats* [106]. Auch bei Lee et al. [221] zeigten Personen, die homozygot für das Allel mit 12 *CA-Repeats* waren, höhere IFN- γ -Spiegel als Personen mit zwei Allelen mit 13 *CA-Repeats* [221]. Doch weitere Studien [216, 222] konnten diese Ergebnisse nicht reproduzieren.

Für eine direkt vor dem *CA-Repeat* gelegene Genvariante [223] konnte, entgegen den Ergebnissen für das *CA-Repeat* selbst [224], keine Assoziation mit der Überlebenszeit von Transplantatnieren festgestellt werden [134].

2 Fragestellung

Das Ziel dieser Untersuchung war es, Genvarianten zu identifizieren, die eine Assoziation mit Phänotypen der Allergie zeigen. Grundlage für die Untersuchung war die *common variant/common disease*-Hypothese [225]. Die Hypothese postuliert, dass das Zusammentreffen von häufig vorkommenden Genvarianten in einer Population unter bestimmten Umweltbedingungen zu häufigen, polygenen Erkrankungen wie z.B. Schizophrenie, Multiple Sklerose oder allergischen Erkrankungen führt.

Die Wahl der untersuchten Kandidatengene erfolgte nach verschiedenen Kriterien, die alle erfüllt sein sollten:

1. Das Gen liegt in einer der bekannten Kopplungsregionen.
2. In bisher publizierten Studien gibt es für das Gen Hinweise auf Assoziation mit Phänotypen der Allergie.
3. Das Genprodukt reguliert die Immunantwort zugunsten einer Th1- oder Th2-Differenzierung.

Im Rahmen einer genetischen Assoziationsstudie an 306 erwachsenen Probanden wurden folgende Gene in dieser Arbeit untersucht: IL4, CNS1, IL13, IRF1, TLR4, IFNG und IL4R. IL4, CNS1, IL13 und IRF1 liegen auf Chromosom 5 in der Region 5q31, die in mehreren genomweiten Studien Kopplung mit allergischen Phänotypen zeigte. Distale Allergie-Phänotypen wurden durch eine Anamnese mit einem standardisierten Fragebogen festgestellt. Als intermediärer, quantitativer Allergie-Phänotyp wurde der Serum-IgE-Spiegel herangezogen.

Um die mögliche Beeinflussung des intermediären Phänotyps Serum-IgE-Spiegel durch Umwelteinflüsse weitgehend auszuschließen, wurde neben dem Kollektiv erwachsener Probanden auch ein Kollektiv von Neugeborenen untersucht. Die Hypothese war, dass der Serum-IgE-Spiegel von Neugeborenen im wesentlichen genetisch bedingt ist und weniger durch die extrauterine Umwelt beeinflusst wird.

Die untersuchten Gene wurden gegebenenfalls sequenziert und auf Polymorphismen untersucht. Neue und bereits bekannte Varianten wurden genotypisiert. Anschließend erfolgte die Auswertung mit genetisch-epidemiologischen Verfahren.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Gibt es Varianten im untersuchten Genabschnitt?
2. Gibt es Assoziation zwischen den untersuchten Genvarianten und den Allergie-Phänotypen?
3. Trifft die *common variant/common disease*-Hypothese für die untersuchten Genvarianten zu?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte, Kleinmaterial und Reagenzien

3.1.1.1 Geräte

Analysewaage:	
Brutschrank:	Sartorius, Göttingen
Digital video documentation for gels:	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammer:	Intas, Göttingen
Feinwaage:	Keutz, Reiskirchen
8-Kanal-Pipette - 10 µl:	Mettler AE 100, Giessen
8-Kanal Pipette - 20 µl:	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer:	Eppendorf, Hamburg
Photometer:	Ikamag RET, Janke & Kunkel, Staufen
Pipette 0,5- 10 µl:	Spekol UV VIS, Zeiss, Oberkochen
Pipette 10- 100 µl:	Eppendorf, Hamburg
Pipette 100- 1000 µl:	Eppendorf, Hamburg
Sequenziergerät:	Eppendorf, Hamburg ABI-PRISM™310 Genetic Analyser, Perkin Elmer
Sofortbildkamera:	IBI, New Haven, Connecticut, USA
Spannungsquelle:	Consort E863, E 835, E452, Keutz, Reiskirchen
Thermoblock:	TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen
Thermocycler:	Gene Amp PCR System 2400 und 9600, Perkin Elmer
UV-Schirm:	IBI Kodak
Vakuumpumpe VacuGene Pump:	Pharmacia LKB Biotechnology, Heidelberg
Vortex:	Heidolph REAX 2000, Deutschland
Zentrifugen:	Biofuge A, Heraeus, Hanau ROTIXA/A, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen Mikro 20, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen LaboFuge ^{GL} , Heraeus Christ, Hanau

3.1.1.2 Kleinmaterial

AutoSeq96 Platten:	Amersham Pharmacia biotech, Freiberg
Blue caps (15 ml und 50 ml):	Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedax, France
EDTA-Monovette:	Sarstedt, Nümbrecht
Einfrierampullen (1,8 ml):	Fa.Nunc Intermed, Dänemark
Glaswaren:	Braun, Melsungen
Parafilm:	American Can, Greenwich, USA
PCR-Tubes:	Strip-ease-8, 0,2 ml; Robbins Scientific, USA
Pipettenspitzen:	Roth, Karlsruhe Filtertips 10 µl, 100 µl, 1000 µl, ART Molecular BIO-Products INC., San Diego, USA

Reaktionsgefäße:	Safe Seal Microcentrifuge Tubes 0,65 und 1,7 ml, Bioscience, Salt Lake City, Utah USA
Screen Mates (96):	Matrix Technologies Corp., Hudson, NH, USA
Sequenziergefäße:	0,5 ml; ABI PRISM, Genetic Analyser, Perkin Elmer, Langen
Serumröhrchen:	Greiner, Frickenhausen
Skalpell:	steril, pfm, Köln, Deutschland
Thermopapier:	Mitsubishi K61B-ce

3.1.1.3 Reagenzien

Agarose:	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden
Anti IgE FEIA ImmunoCAP neonatal:	Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Schweden
Aqua dest.:	Schweden
Bromphenolblau:	Braun, Melsungen Sigma, Deishofen
CAP RAST RIA/FEIA, Standards:	Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Schweden
CAP IgE FEIA, Fluoro-Immuno-Reagenz:	Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Schweden
100 bp DNA-Leiter:	New England BioLabs Inc., Frankfurt
EDTA:	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut:	Riedelde Haen, Seelze
Ethidiumbromid:	Dianova, Hamburg
ExoSap-IT™:	USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA
Formamid:	Gibco/BRL, Eggenstein
Genescan-350 ROX:	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
Isopropanol:	Riedelde Haen, Seelze
Natrium-Acetat:	Merck, Darmstadt
Nukleotide:	dNTP Set, Amersham Pharmacia Biotech
Performance Optimized Polymer 4:	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
Performance Optimized Polymer 6:	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
Polymerase:	AmpliQa Gold™, Perkin Elmer, Vaterstetten, Deutschland
SeaKem GTG Agarose:	FMC Bioproducts, Rockland, Maine, USA
Template Suppression Reagent:	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan:	Roth, Karlsruhe

3.1.2 Kits

DNA-Isolationskit:	Puregene DNA isolation kit, Gentra Systems, Minneapolis, Minn., USA
Gelextraktionskit:	QIAquick Gel Extaction Kit, Qiagen, Deutschland
Sequenzierungskits:	ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit; Perkin Elmer, Langen

3.1.3 Computerprogramme

Arlequin 2.000 (<http://lgb.unige.ch/arlequin>)

310 Genetic Analyzer, Data Collection

Genscan 2.1

Oligo 4.0

Sequencing Analysis 3.0

SPSS 9.0

3.2 Methoden

3.2.1 Probanden

Die Probanden dieser Studie setzten sich aus 306 Blutspendern zusammen. Nach einer mündlichen Aufklärung über das Ziel der Studie wurde den Teilnehmern ein Fragebogen über das Auftreten von Heuschnupfen, Pollenallergie, allergisches Asthma bronchiale und Neurodermitis, und über die Ergebnisse eines möglicherweise früher durchgeführten Allergietests und eine Einverständniserklärung nach dem Votum der Ethikkommission ausgehändigt (Abb. 7, 8, Anhang), die sie ausgefüllt und unterschrieben zurückgaben.

Für die genetischen und laborchemischen Untersuchungen wurden den Probanden zwei Röhrchen Blut, ein 10 ml EDTA-Röhrchen und ein Serumröhrchen, abgenommen und zur Anonymisierung mit einer Nummer versehen. Das EDTA-Blut wurde spätestens nach drei Tagen Lagerung bei 4°C der DNA-Isolierung zugeführt, die Serumröhrchen wurden sofort zentrifugiert, das Serum abpipettiert, in Kryoröhrchen überführt und bei -20°C eingefroren. Außerdem wurde ein Kollektiv von 113 Neugeborenen untersucht, die in einem Zeitraum vom 13.03.01 bis zum 21.05.01 in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe im Klinikum der Justus-Liebig-Universität zur Welt gekommen waren. Das Material bestand aus anonymisierten Resten des zur Blutgruppendiagnostik abgenommenen Nabelschnurbluts. Plasma wurde für die IgE-Bestimmung (siehe 3.2.9) in Kryoröhrchen bei -20°C eingefroren, das restliche Blut zur Gewinnung von DNA verwendet.

3.2.2 DNA-Isolierung

Für die DNA-Isolierung wurden die peripheren Blut-Leukozyten verwendet. Die kernlosen Erythrozyten wurden lysiert und als Überstand nach Zentrifugation dekantiert. Übrig blieb ein Pellet der festen Bestandteile, darunter auch die Leukozyten.

RNA und Proteine wurden nach Lyse der Leukozyten durch Zugabe von RNasen und Proteinasen und anschließender Salzfällung entfernt. Die gewonnene DNA wurde mit

Isopropanol und Ethanol gefällt, danach getrocknet und zuletzt mit einer Pufferlösung mit DNA-Stabilisatoren rehydriert.

3.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung am Photometer

Die DNA-Konzentrationsbestimmung am Photometer basiert auf Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge, bei der die zu untersuchende Substanz ihr Absorptionsmaximum hat. Die Konzentration wird dabei mit dem Lambert-Beer-Gesetz:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

berechnet, wobei die gemessene Extinktion E proportional zu dem bekannten molaren Extinktionskoeffizienten ε , der Konzentration c und der Schichtdicke d ist.

Das Absorptionsmaximum für DNA lag bei 260 nm. Außerdem wurde die Extinktion bei 280 nm zur Konzentrationsbestimmung der in der Lösung enthaltenen Proteine gemessen, jeweils zu einem Leerwert aus H_2O . Der Quotient der Extinktion bei 260 nm dividiert durch den Quotienten bei 280 nm war ein Maß für die Reinheit der gemessenen DNA-Probe. Er sollte 1,6 - 2,0 betragen.

Nachdem für alle DNA-Proben die Konzentration bestimmt worden war, wurde eine Arbeitslösung mit 10 ng/ μ l hergestellt und die DNA-Stocklösung bei -20°C eingefroren.

3.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur exponentiellen *in vitro* Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte. Der Reaktionsansatz enthält neben zwei synthetisch hergestellten Oligonukleotiden (den *upstream* und den *downstream* Primern), die die Grenzen des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts flankieren, eine in dem Bakterium *Thermus aquaticus* gefundene, heute gentechnisch hergestellte thermostabile DNA-Polymerase, freie Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs) und Reaktionspuffer. Eine Denaturierungsphase, eine Primer-Anlagerungs-Phase (*Annealing*) und eine Elongationsphase bilden einen Zyklus, der je nach DNA-Ausgangskonzentration und Primer-Bedingungen bis zu 40 mal wiederholt wird.

Die Denaturierung wurde durch Erhitzen auf 95°C erreicht. Dabei wurde der doppelsträngige DNA-Strang in Einzelstränge aufgespalten. In Abhängigkeit ihres mittleren Schmelzwertes (T_m -Wert) banden die im Reaktionsansatz enthaltenen Oligonukleotide an die jeweils komplementäre Sequenz des zu kopierenden DNA-Einzelstrangs und waren der Ausgangspunkt für die DNA-Synthese. In der Elongationsphase

setzte die hitzestabile Polymerase bei 72°C freie komplementäre Nukleotide an die Primer in 5'-3'-Richtung an.

Nach jedem Durchlauf dieser drei Schritte wurde jeweils eine Kopie der zu vervielfältigenden DNA hergestellt, nach 30 bis 40 Zyklen konnte die Kopienzahl bei bis zu 10^9 - 10^{12} Kopien liegen. Die hergestellten Amplifikate konnten nun mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

3.2.4.1 Genotypisierung mit sequenzspezifischen Primern (SSP-PCR)

Für die Typisierung von *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) wurden sequenzspezifische Primer (Tab. 7, Anhang) verwendet. Insgesamt kamen vier verschiedene Primer zur Anwendung: ein Wildtyp-Primer, dessen 3'-Ende an dem nachzuweisenden Basenaustausch lagt. Der zweite Primer unterschied sich vom ersten nur an der Stelle des Basenaustauschs. Die Länge des Amplifikats wurde durch den *Common-Primer* bestimmt. Sie sollte etwa 200 bp betragen. Zum Ausschluss von falsch-negativen Ergebnissen wurden Kontroll-Primer (CRP) verwendet, die eine hochkonservierte Sequenz im humanen Genom amplifizierten und dessen Produkt sich in der Länge von dem der sequenzspezifischen Primer deutlich unterschied.

Für jeden SNP wurden zwei Reaktionen durchgeführt: einen PCR-Ansatz mit dem Wildtyp-Primer, der bei einer spezifischen Bande das Vorliegen eines oder zweier Allele mit der Wildtyp-Sequenz anzeigte, und einen PCR-Ansatz mit dem Primer für den mutierten Typ, bei dem das Vorliegen einer spezifischen Bande auf ein oder zwei Allele mit der mutierten Sequenz deutet. Waren in beiden Reaktionen sequenzspezifische Banden vorhanden, besaß der Proband beide möglichen Allele, das heißt, er war heterozygot für diese Mutation.

Kontaminationen mit DNA-Fragmenten aus vorangegangenen Versuchen wurden durch strikte Trennung von Prä-PCR- und Post-PCR-Räumen und Geräten ausgeschlossen, außerdem wurde durch das Mitführen einer Wasserkontrolle in der PCR das saubere Arbeiten dokumentiert. Positiv- und Negativkontrollen von sequenzierten DNA-Proben stellten die Richtigkeit des Versuches dar.

Die Typisierung der verschiedenen Polymorphismen erfolgte mit einem Reaktionsgemisch aus 50 ng genomischer DNA, 1x Taq Puffer, je 0,2 mmol/l von dATP, dGTP, dTTP und dCTP, 0,4 - 0,9 μ mol/l interne Kontroll-Primer (CRP), 0,1 - 0,2 μ mol/l sequenzspezifische Primer (Tab. 8) und 0,5 IU AmpliTaq Gold™. Das Reaktionsgemisch wurde bis zu einem Gesamtvolumen von 20 μ l mit Aqua dest. aufgefüllt.

Die verschiedenen PCR-Protokolle finden sich im Anhang (Tab. 9).

Tab. 8, Eingesetztes Volumen für die interne Kontrolle und die spezifische Primer für jeden Polymorphismus

Polymorphismus	interne Kontrolle (CRP; in $\mu\text{mol/l}$)	sequenzspezifische Primer (in $\mu\text{mol/l}$)
IL4RA I50V	0,4	0,2
IL4RA S411L	0,4	0,1
IL4RA S478P	0,6	0,2
IL4RA Q551R	0,9	0,1
IL4RA G-3323A	0,3	0,2
IFNG T-1615C	0,5	0,1
IFNG T874A	0,4	0,2
IFNG A5171G	0,5	1,0
IL4 C-590T	0,4	1,0
CNS1	0,4	2,0
IL13 C-1112T	0,4	1,0
TLR4 D299G	0,6	1,0
TLR4 T399I	0,6	1,0

3.2.4.2 Gel-Elektrophorese

Die Elektrophorese ist ein Verfahren, bei dem Moleküle, z.B. PCR-Produkte, in einem elektrischen Feld bei angelegter Gleichspannung nach Größe und Ladung getrennt werden. Als Träger dient Agarose, ein langkettiges Galaktosepolymer. Je nach Konzentration der Agarose bilden sich unterschiedlich große Poren: je höher die Konzentration, desto kleiner werden sie und desto langsamer wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld.

Bei einer durchschnittlichen Länge der Fragmente von ca. 200 Basenpaaren wurde ein 2%iges Agarose-Gel benutzt. Die Agarose wurde in 1 % TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure und 2 mM EDTA) gelöst, unter ständigem Rühren zum Kochen gebracht und nach kurzer Abkühlung mit einem Anteil von 0,01% Ethidiumbromid versetzt, bevor die Mischung in den Gelschlitten gegossen wurde.

Im Anschluß an die Polymerisation des Agarose-Gels wurden 10 μl eines Gemisches aus 20 μl PCR-Produkt und 1 μl Probenpuffer (4 g Saccharose und 25 mg Bromphenolblau gelöst in 9 ml Aqua dest., 100 μl 0,5M EDTA pH 8 pro 900 μl Aqua dest.) auf das Gel aufgetragen. Der Probenpuffer erhöhte die Dichte der Probe, so dass sie besser in die Geltaschen sinken konnte. Außerdem wurde dazu ein DNA-Molekulargewichtsstandard, bestehend aus 1 μl DNA mit Fragmenten der Länge 100, 200, 300, 400, 500, 517, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 und 1517 bp, 1 μl Probenpuffer und 8 μl Aqua dest., in einer Spur pro Gel mitgeführt.

Die gel-elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit einer Spannung von 100- 120 Volt für 30 min. Die DNA-Banden wurden mittels UV-Licht der Wellenlänge 322 nm sichtbar gemacht und fotografiert, das Foto zur Dokumentation auf Thermopapier ausgedruckt.

3.2.4.3 Genotypisierung mit der *TaqMan*-Technologie

Bei der Genotypisierung mit der *TaqMan*-Technologie werden SNPs mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen untersucht. In einem ersten Schritt wird eine Sequenz durch ein Primerpaar amplifiziert, die den Polymorphismus einschließt. Zwei Sonden werden dem Reaktionsgemisch beigelegt. Sie unterscheiden sich in der Basenabfolge durch den zu untersuchenden Basenaustausch und sind außerdem mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Sie hybridisieren an die Sequenz, wobei die Bindung einer Sonde mit dem Wildtyp an einer Sequenz mit der Mutation schwächer ist als die Bindung an der Wildtypsequenz.

Bei Übereinstimmung der Sonde und der DNA-Sequenz wird die Sonde durch eine Polymerase mit 5'-3'-Exonukleaseaktivität in Folge der stärkeren Bindung in Nukleotide zerlegt und der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt. Nur in ungebundenem Zustand ist der Farbstoff fluoreszierend und einer Messung zugänglich. Ein sogenannter „Quencher“ unterdrückt die Fluoreszenz, durch die Polymerase kommt es zu einer Trennung von Fluoreszenzfarbstoff und Quencher. Bei Nichtübereinstimmen ist die Bindung zwischen Sonde und Sequenz zu schwach. Die Sonde diffundiert in intaktem Zustand ab, es wird keine Fluoreszenz freigesetzt.

Eine Person mit zwei Wildtyp-Allelen wird nur Fluoreszenz des einen Farbstoffes zeigen, eine Person mit zwei mutierten Allelen Fluoreszenz des zweiten Farbstoffs. Heterozygote Personen haben beide Fluoreszenzmuster (Abb. 9).

Der Reaktionsansatz beinhaltete 7,5 µl *MasterMix*Puffer, bestehend aus Puffer, dNTPs und AmpliTaq Gold[®] Polymerase, 0,25 µl *Test-Kit* (Sonden und Primer-Stammlösung), 5,25 µl Aqua dest. und 2 µl DNA (10ng/µl). Die Sequenzen der Primer und Sonden befinden sich in Tab. 10. Die PCR-Bedingungen setzten sich aus einem Zyklus mit 50°C für 2 min und 95°C für 10 min zusammen. Anschließend folgten 40 Zyklen mit 95°C für 50 sec und 60°C für 1 min. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei 60°C.

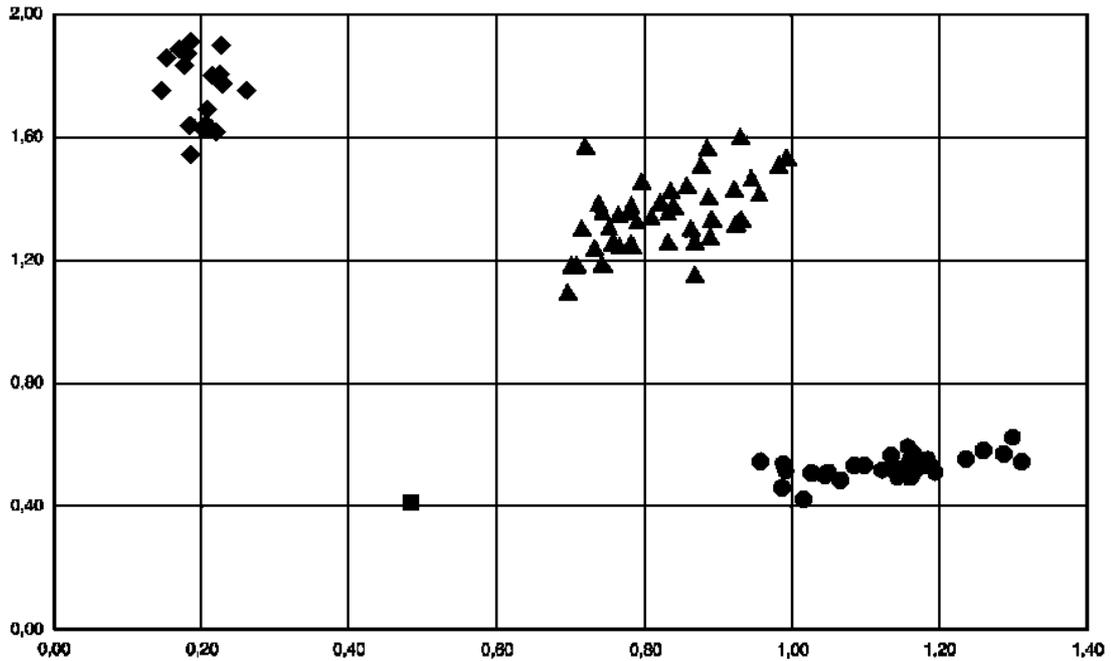


Abb. 9, Ergebnisdarstellung der Genotypisierung mit der *TaqMan*-Technologie;
 X-Achse: arbiträre Fluoreszenz-Intensität VIC;
 Y-Achse: arbiträre Fluoreszenz-Intensität FAM;
 • homozygot Wildtyp
 ◆ homozygot mutiert
 △ heterozygot
 ■ Kontrolle (Wasser)

Tab. 10, Primer und Sonden für die Typisierung der Polymorphismen in der IRF-1-Sequenz

Polymorphismus			Sequenz 5´- 3´
A-415C/G-410A	Primer	IRF1-5up	GGA GAG GGC GGC AAG TG
		IRF1-5down	GGC CAT CTT TTC ACC CTC CTG
	Sonde	AG-Allel	VIC-ATC ACC TCG CCT GCG
		CA-Allel	FAM-TCC CCT CAC CTG CG
T4379C	Primer	IRF1-I6up	GCA AAC TAA GAA AGC ACA CAA CCT T
		IRF1-I6down	ACA GCA CAT GGC GAC AGT
	Sonde	T-Allel	VIC-CTT CTG CTG TTC CCC AG
		C-Allel	FAM-CTT CTG CTG TCC CCC AG
G7311A	Primer	IRF1-3up	AAG CCA GTG AAT GTG AAG GAA AC
		IRF1-3down	AAA GCA GGG AGC AGG GTA GA
	Sonde	G-Allel	VIC-AGC ATT GCC CCG AAG
		A-Allel	FAM-AGC ATC GCC CCG AA

3.2.5 Mikrosatelliten-Analyse

Die Grundlage der Längenmessung eines DNA-*Repeats*, bei dem eine Basenabfolge in einer variablen Anzahl von Wiederholungen vorliegen kann, basiert auf dem Vergleich der Länge eines zuvor mit fluoreszierenden Primern amplifizierten PCR-Produkts mit der eines ebenfalls fluoreszierenden internen Standards (GeneScan 350 ROX).

Die verwendeten Primer finden sich in Tabelle 11. Das Reaktionsgemisch bestand aus 20 ng genomischer DNA, 1x Taq Puffer, 0,2 mmol/l je dNTP, 0,1 μ mol/l je Primer aufgefüllt auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l mit Aqua dest..

Das PCR-Protokoll beinhaltete einen Aktivierungsschritt von 95°C für 10 min, gefolgt von 28 Zyklen mit einer Denaturierungsphase (95°C, 40 sec), einer Anlagerungsphase (59°C, 1 min) und einer Synthesephase (72°C, 1 min). Bevor das Reaktionsgemisch auf 4°C abgekühlt wurde, folgte ein Schritt mit 60°C für 45 min, um möglichst alle PCR-Produkte in vollständiger Länge zu gewinnen.

1,0 μ l des PCR-Produkts, 24,5 μ l Formamid und 1 μ l GeneScan 350 ROX wurden für die Untersuchung in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Die Fragmentlänge wurde nach einer Denaturierung in zwei Schritten (95°C für 3 min, 0°C für 5 min) im Sequenziergerät mit der Kapillarelektrophorese gemessen und das Ergebnis mit der *Genescan Software 2.1* analysiert.

Tab. 11. Primernamen und -sequenzen für die CA-Repeatlängenmessung

Primer	Sequenz 5´- 3´	Produktlänge
IFNG-CA FAM up	FAM -AGA CAT TCA CAA TTG ATT TTA TTC TTA C	bei 12 CA-Repeats:
IFNG-CA do	CCT TCC TGT AGG GTA TTA TTA TAC G	126 bp

3.2.6 Sequenzierung

Zur DNA-Sequenzierung wurde die Methode des enzymatischen Ketten-Abbruchs nach Sanger (ABI Prism® *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*, Perkin Elmer, Langen) eingesetzt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip des Kettenabbruchs durch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs). Durch den Einbau von ddNTPs wird das Kettenwachstum beendet, da keine freien 3´-OH-Gruppen für die Polymerisation vorhanden sind. Der Abbruch erfolgt statistisch an jeder beliebigen Position. Die ddNTPs liegen in einer geringeren Konzentration vor als die für die Polymerisation benötigten dNTPs, so dass auch längere Fragmente amplifiziert werden.

Die unterschiedlich langen, an ihrer letzten Base mit basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Fragmente können jetzt in einer mit Polymer gefüllten Kapillare des Sequenziergeräts (ABI Prism 3100) aufgetrennt werden. Die graphische Darstellung der Sequenz erfolgt mit Hilfe des Sequenziergeräts und der *Sequencing Analysis Software*.

Vor der eigentlichen Sequenzierung waren einige vorbereitende Schritte notwendig:

- a) eine PCR zur Vervielfältigung der zu sequenzierenden DNA,
- b) die Aufarbeitung und Reinigung der PCR-Produkte,

- c) ein Schätzzel, um die Konzentration des PCR-Produktes zu bestimmen,
- d) eine Sequenzier-PCR (siehe oben) und
- e) eine DNA-Fällung.

Der PCR-Ansatz enthielt 50 ng genomische DNA, 0,2 $\mu\text{mol/l}$ je dNTP, 0,1 $\mu\text{mol/l}$ der Sequenzier-Primer (Tab. 12) in 20 μl Aqua dest. für alle durchgeführten Sequenzierungen.

Die verschiedenen PCR-Protokolle finden sich in Tab. 13.

Tab. 12, Sequenzen und Produktlänge der Sequenzier-Primer für IFNG-CA, CNS1, TLR4, IFNG T-1615C, IFNG A5171G

Genort	Primer 5' - 3'	Produktlänge
IFNG CA-Repeat	up: ACT GGG ATT TTG GAA GAA T down: CAT CTA CTG TGC CTT CCT G	313 bp
CNS-1	up: AGG GAG TTG TGG ACT GTG TG down: CCT ATC TGG CCT TTC TAG GG	560 bp
TLR-4 D299G/ T399I	up: TCT AGA GGG CCT GTG CAA TT down: TGA AAA CTC ACT CAT TTG TTT CAA	496 bp
IFNG T-1615C	up: CAA ACC CAC TTT GCA TTT CTA down: CAA CTG AAG CAT GGA AGA AGA	248 bp
IFNG A5171G	up: AAT TCA GAG GTT CTG CTA TGG down: TTC TTT TTC AGA CAA TAA AGC TG	277 bp

Tab. 13, PCR-Protokolle für die Sequenzierung von IFNG-CA, CNS1, TLR4, IFNG T-1615C, IFNG A5171G

Genort	Denaturierung	34 Zyklen mit
IFNG-CA	95°C für 10 min	95°C für 30 sec, 56°C für 45 sec und 72°C für 40 sec
CNS-1	95°C für 10 min	95°C für 30 sec, 61°C für 45 sec und 72°C für 40 sec
TLR-4	95°C für 10 min	95°C für 30 sec, 56°C für 45 sec und 72°C für 40 sec
IFNG T-1615C	95°C für 10 min	95°C für 30 sec, 61°C für 45 sec und 72°C für 40 sec
IFNG A5171G	95°C für 10 min	95°C für 30 sec, 61°C für 45 sec und 72°C für 40 sec

3.2.6.1 Gel-Extraktion

Die Gel-Extraktion ist eine Methode zur Aufarbeitung und Reinigung von PCR-Produkten von freien dNTP und unspezifischen Produkten. Verwendet wurde das *Qiaquick Gel Extraction Kit*.

Dabei wurde das PCR-Produkt mit 1 μl Probenpuffer versetzt und auf ein 1,5%iges Seakem-Gel aufgetragen und im Gelschlitten aufgetrennt. Die unter UV-Licht ausgeschnittenen Banden wurden gewogen und mit der dreifachen Menge QG Puffer für 10 min in einem 50 °C-warmen Wasserbad inkubiert, bis sich die Gelstücke vollständig im Puffer gelöst hatten.

Danach wurde die Mischung mit einem Gel-Volumen Isopropanol versetzt und danach auf die Filter in die Säulen der Vakuumpumpe pipettiert. Im Anschluss wurden die in der Säule festgehaltenen PCR-Produkte in zwei Schritten durch Zugabe von 500 μl QG-Puffer und

750 μl PE-Puffer unter Vakuum von den letzten Agaroseteilchen gereinigt. Durch Zentrifugation der Filtersäulen mit 13000 U/min für 1 min wurde der restliche PE-Puffer entfernt.

Um die gereinigten PCR-Produkte aus dem Filter zu lösen, wurden nun 30 μl Aqua dest. in die Säulen pipettiert, 1 min inkubiert und unter Zentrifugation mit 13000 U/min für 1 min in einem Reaktionsgefäß aufgefangen.

3.2.6.2 Schätzung der Konzentration mit einem Gel

Um die richtige Menge an PCR-Produkt für die weiterführenden Arbeiten zu kennen, wurde anschließend eine Schätzung der DNA-Konzentration mit Hilfe eines DNA-Längenstandards, bei dem Fragmentlängen und die jeweilige Konzentration bekannt waren, vorgenommen.

Dabei wurde ein Mix aus 1 μl Standard-DNA, 1 μl Probenpuffer und 5 μl Aqua dest. gegen 3 μl PCR-Produkt, 1 μl Probenpuffer und 3 μl Aqua dest. auf ein 2 %iges Agarose-Gel aufgetragen. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde die Intensität der Banden der Proben mit denen des Standards verglichen und auf diese Weise die Konzentration abgeschätzt.

3.2.6.3 Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte

20 μl Reaktionsgemisch für die Sequenzier-PCR setzten sich aus 30 ng PCR-Produkt, 4 μl *Ready Reaction Mix*, 1 μl Primer und der fehlenden Menge Aqua dest. zusammen. Die Bedingungen für die PCR beinhalten 25 Zyklen mit jeweils 96°C für 10 sec, 50°C für 5 sec und 60°C für 4 min.

3.2.6.4 DNA-Fällung

Die Produkte aus der Sequenzier-PCR wurde durch eine Fällung in mehreren Schritten mit Natriumacetat und Ethanol aufgereinigt:

- Vorlegen von 80 μl H₂O und 250 μl Ethanol in Reaktionsgefäße
- Zugabe von 10 μl Natriumacetat zu den PCR-Produkten und Überführung des Volumens in die Reaktionsgefäße
- Zentrifugation bei 1300 U/min für 25 min, danach Absaugen des Überstands
- Zugabe von 250 μl 70% Ethanol
- Zentrifugation bei 1300 U/min für 10 min, danach Absaugen des Überstands

- Trocknen des Pellets in der Speed Vac
- Zugabe von 25 μ l TSR-Puffer

Bevor der Ansatz zur Analyse in das Sequenziergerät gestellt wurde, erfolgte eine Denaturierung mit 90°C für 2 min und 0°C für 5 min.

3.2.7 Statistische Methoden

Die Auswertung des Fragebogens erfolgte mit der χ^2 -Analyse nach Pearson, dem Mann-Whitney-Test oder einem zweiseitigen T-Test mit Hilfe der SPSS® Software 9.0. Abweichung der einzelnen Polymorphismen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium wurden mit der χ^2 -Analyse nach Pearson unter <http://ihg.gsf.de> berechnet, außerdem erfolgte nach Dichotomisierung des IgE-Spiegels (IgE < oder \geq 100 kU/l) unter der oben angegebenen Internet-Adresse die Assoziationsanalysen mit dem IgE-Spiegel und der Atopieanamnese mit Angabe der Odds Ratio und des 95%-Konfidenzintervalls.

3.2.8 Messung der IgE-Serum-Spiegel bei Erwachsenen

Zur Messung des IgE-Serum-Spiegels wurde ein Behring-Nephelometer-System benutzt. Das Prinzip der Methode basiert auf der Messung der Intensität von Streulicht. Das Streulicht entsteht dadurch, dass ein Primärstrahl auf einen Immunkomplex, bestehend aus mit spezifischen Antikörpern gegen Human-IgE beladenen Polystyrol-Partikeln und den in der zu messenden Serumprobe befindlichen IgE-Antikörpern, trifft und abgelenkt wird. Die Intensität ist dabei innerhalb eines Konzentrationsbereichs proportional zu der Zahl der Teilchen.

Die IgE-Konzentration der Proben wurde mit Hilfe von Verdünnungen eines Standards mit bekannter IgE-Konzentration ermittelt.

Die Referenzwerte bei dieser Methode liegen für Erwachsene definitionsgemäß bei < 100 IU/ml, ab 100 IU/ml dürfen die Werte als erhöht betrachtet werden.

3.2.9 Messung der IgE-Serum-Spiegel bei Neugeborenen

Da die Referenzwerte für IgE-Konzentrationen bei Neugeborenen unter der Nachweisgrenze des oben beschriebenen Verfahrens (3.2.8) liegen, wurde ein spezieller Test (Sandwich-ELISA) zur Bestimmung von IgE verwendet.

Dabei binden die IgE-Antikörper in den Seren der Neugeborenen an gegen IgE-gerichtete Antikörper, die kovalent an ein spezielles Reaktionsgefäß (*ImmunoCAP*) gebunden sind.

Nach einer Waschung werden Enzym-markierte Antikörper gegen IgE hinzugefügt und inkubiert. Danach wird ungebundenes Enzym-Anti-IgE abgewaschen und der gebundene Komplex aus IgE und Enzym-Anti-IgE mit einer Entwicklungslösung (4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactoside) inkubiert. Nach der Inkubation wird die Entwicklung mit Stopplösung (Natriumkarbonat) beendet und die Fluoreszenz im FluoroCount 96 gemessen.

Je höher der Fluoreszenz-Wert, desto höher ist die in der Probe vorhandene Konzentration von IgE. Um das Testergebnis auszuwerten, wird die Fluoreszenz der Probe mit den parallel gemessenen Standards verglichen. Die Nachweisgrenze liegt hierbei bei 0,35 IU/ml.

3.2.10 Messung der IgA-Serum-Spiegel bei Neugeborenen

Um Kontamination mit maternalem Blut auszuschließen, wurde zur Kontrolle der IgA-Spiegel in den Neugeborenen gemessen.

Dabei wurde die Serumprobe zuerst mit Puffer versetzt. Die Reaktion startete mit der Zugabe von Anti-Human-IgA-Antikörpern von der Ziege. Diese bildeten mit den im Serum vorhandenen IgA-Antikörper einen Antigen-Antikörper-Komplex, deren Extinktion nach Agglutination turbidimetrisch (Turbidimetrie: Trübungsmessung; Form der Photometrie) gemessen und anhand einer Standardkurve berechnet wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Erwachsene

4.1.1 Prävalenz von Heuschnupfen oder Pollenallergie, Hausstauballergie, Asthma und Neurodermitis bei Blutspendern

Insgesamt wurden 306 Personen in die Untersuchung eingeschlossen. Dabei handelte es sich bei den ersten 160 Probanden um ein bereits untersuchtes Kollektiv, 146 Personen wurden neu rekrutiert. Insgesamt waren es 140 Frauen (45,8%) und 166 Männer (54,2%). Das Durchschnittsalter lag bei 32,3 Jahren, wobei sich nur geringfügige Unterschiede zwischen Männern und Frauen zeigten (Tab. 14).

Tab. 14, Geschlechts- und Altersverteilung des Blutspenderkollektivs

Geschlecht	Anzahl	Alter (Jahre)
männlich	166	33,12
weiblich	140	31,38
gesamt	306	32,32

Die Auswertung des Fragebogens (Abb. 7), den 304 Personen ausfüllten, ergab, dass 72 Personen (23,7%) die Frage nach Heuschnupfen oder Pollenallergie mit „ja“ beantworteten, für Hausstauballergie waren es 35 (11,5%), für Asthma 16 (5,3%) und für Neurodermitis 21 Personen (6,9%). Von den 21 Personen mit Neurodermitis waren 16 (76,2%) Frauen ($p = 0,002$; chi-Quadrat nach Pearson), für die anderen Erkrankungen konnte kein Geschlechtsunterschied festgestellt werden ($p \geq 0,207$).

Insgesamt antworteten 94 Personen auf eine oder mehrere dieser vier Fragen mit „ja“. Diese 94 Personen wurden in die Gruppe („positive Atopieanamnese“) zusammengefasst. Eine genaue Aufstellung dieser Daten finden sich in Tab. 15 und 16.

Tab. 15, Aufschlüsselung der in der Gruppe „positive Atopieanamnese“ zusammengefassten Personen nach Geschlecht und Anzahl der mit „ja“ beantworteten Fragen

Anzahl der Fragen mit „ja“	gesamt	Männer	Frauen	p-Wert
1	61	36	25	
2	19	10	9	
3	11	7	4	
4	3	0	3	0,291 ^a

^a chi-Quadrat-Analyse nach Pearson

Tab. 16, Signifikanter Unterschied in der Prävalenz von Neurodermitis bei Männern und Frauen

		gesamt (N=304)	Männer (N=165)	Frauen (N=139)	p-Wert
Heuschnupfen oder Pollenallergie	ja	72	45	27	0,207 ^a
	nein	222	116	106	
	weiß nicht	10	4	6	
Hausstauballergie	ja	35	19	16	0,997 ^a
	nein	254	138	116	
	weiß nicht	15	8	7	
Asthma	ja	16	8	8	0,812 ^b
	nein	284	155	129	
	weiß nicht	4	2	2	
Neurodermitis	ja	21	5	16	0,002 ^a
	nein	270	156	114	
	weiß nicht	13	4	9	
„positive Atopie- anamnese“	ja	94	53	41	0,622 ^a
	nein	212	113	99	

^a zweiseitige chi-Quadrat-Analyse nach Pearson

^b Mann-Whitney-Test (>33% der Zellen hatten eine erwartete Häufigkeit < 5 in der chi-Quadrat-Analyse nach Pearson)

136 Personen bejahten die Frage nach einem in der Vergangenheit durchgeführten Allergietest. Bei einem positiven Testergebnis reichte die Spanne der Substanzen von Birken-, Haselnuss-, Gräserpollen, Tierhaaren über Hausstaub, Schimmelpilze und Penicillin. Viele Personen waren nicht nur gegen eine Substanz allergisch, Aufzählungen wie zum Beispiel „Birke, Haselnuss, Gräser, Hausstaub“ waren häufig. 45,1% der Atopiker gaben an, gegen ihre Allergie Medikamente einzunehmen oder eingenommen zu haben.

Bei 112 der befragten Probanden (37,0%) gab es in der Familie (leibliche Eltern und Geschwister) ein Familienmitglied, bei dem eine oder mehrere der unter 1-4 im Fragebogen angegebenen Erkrankungen bekannt war. Dabei hatten Probanden mit einer positiven Atopieanamnese in 47,9% eine positive Familienanamnese, in der Gruppe der Nicht-Atopiker waren es nur 32,1% ($p = 0.009$, chi-Quadrat-Analyse nach Pearson) (Tab. 17).

Tab. 17, Eine positive Atopieanamnese ist mit einer positiven Familienanamnese assoziiert

	positive Familien- anamnese (N=112)	negative Familien- anamnese (N=162)	nicht bekannt (N=29)	p-Wert
positive Atopieanamnese (N=94)	47,9%	40,4%	11,7%	0,009 ^a
negative Atopieanamnese (N=209)	32,1%	59,3%	8,6%	
gesamt (N=303)	37,0%	53,5%	9,6%	

^a chi-Quadrat-Analyse nach Pearson

Auf die Frage nach den Rauchgewohnheiten gaben 104 Personen (34,2%) an, dass sie rauchen, 36 (11,8%), dass sie früher geraucht haben und 164 (54,0%), dass sie Nichtraucher seien. Es lassen sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Rauchen und einer Atopieanamnese feststellen (Tab. 18).

Tab. 18, Unterteilung der Raucher, Exraucher, Nichtraucher in Atopiker und Nicht-Atopiker

Atopie	Raucher	Exraucher	Nichtraucher	gesamt
ja	24 (25,5%)	13 (13,8%)	57 (60,6%)	94
nein	80 (38,1%)	23 (11,0%)	107 (51,0%)	209
gesamt	104 (34,2%)	36 (11,8%)	164 (53,9%)	304

4.1.2 Der IgE-Serum-Spiegel ist mit einer positiven Atopieanamnese assoziiert

79 Personen hatten einen Wert ≥ 100 kU/l, davon waren 43 (45,7%) Atopiker und 36 (17,1%) Nicht-Atopiker. Aus Tab. 19 lässt sich ersehen, dass der Phänotyp „positive Atopieanamnese“ signifikant mit erhöhten IgE-Werten assoziiert ist ($p < 0,001$; chi-Quadrat-Analyse nach Pearson). Die Rauchgewohnheiten der Probanden hatten in diesem Kollektiv keinen Einfluss auf den IgE-Spiegel: 26,0% der Raucher hatten einen IgE-Spiegel ≥ 100 kU/l, bei den Nichtrauchern waren es 25,0% ($p = 0,789$; chi-Quadrat nach Pearson).

Die Messung des IgE-Spiegels bei den 304 Blutspendern ergab einen Minimalwert von 2,0 kU/l, einem Maximalwert von 1672,0 kU/l und einen Median von 39,7 kU/l, wobei sich ein deutlicher Unterschied zwischen Männern und Frauen zeigte (Median Männer: 45,2 kU/l, Frauen: 32,3 kU/l ($p = 0,021$; Mann-Whitney-Test)).

Tab. 19, Der IgE-Serum-Spiegel ist mit einer positiven Atopieanamnese assoziiert

	<u>positive Atopieanamnese</u>			p-Wert
	gesamt (N=304)	ja (N=94)	nein (N=210)	
% erhöhter IgE-Werte (≥ 100 kU/l)	26,0	45,7	17,1	$< 0,001$ ^a
Median Serum-IgE (in kU/l)	39,7	83,15	31,6	$< 0,001$ ^b
geometrischer Mittelwert logIgE	1,7008	1,9402	1,5937	$< 0,001$ ^c

^a zweiseitige chi-Quadrat-Analyse nach Pearson

^b Mann-Whitney-Test

^c zweiseitiger T-Test

4.1.3 Die IL4R-SNPs I50V, S411L, S487P und Q551R sind nicht mit einem Atopie-Phänotyp assoziiert

Die Untersuchung bei 146 Personen war eine Replikationsstudie zu [116] (Abb. 10, Anhang). Die Genotypfrequenzen und die Allelfrequenzen für das Vergleichskollektiv K1 (Blutspender 161-306), das Kollektiv K2 (Blutspender 1-160, [116]) und beide zusammen finden sich in Tab. 20. Die Kollektive unterscheiden sich in der Verteilung der Genotyp- und Allelfrequenzen nicht voneinander ($p \geq 0,084$; chi-Quadrat nach Pearson).

Tab. 20. Genotyp- und Allelfrequenzen für die Polymorphismen IL4R I50V, S411L, S487P und Q551R

Polymorphismus		Häufigkeit (%)			Allele	Allelfrequenz (%)		
		K1	K2	gesamt		K1	K2	gesamt
I50V	II	33,6	30,6	32,0	I-Allel	53,4	56,3	54,9
	IV	39,7	51,3	45,8	V-Allel	46,6	43,8	45,1
	VV	26,7	18,1	22,2				
S411L	SS	92,5	95,6	94,1	S-Allel	96,2	97,5	96,9
	SL	7,5	3,8	5,6	L-Allel	3,8	2,5	3,1
	LL	0,0	0,6	0,3				
S478P	SS	67,1	71,3	69,3	S-Allel	82,9	84,7	83,8
	SP	31,5	26,9	29,1	P-Allel	17,1	15,3	16,2
	PP	1,4	1,9	1,6				
Q551R	QQ	60,3	69,4	65,0	Q-Allel	78,8	83,1	81,0
	QR	37,0	27,5	32,0	R-Allel	21,2	16,9	19,0
	RR	2,7	3,1	2,9				

K1: Blutspender-Kollektiv 1 (161-306)

K2: Blutspender-Kollektiv 2 (1-160; [116])

Vergleich K1 ↔ K2: I50V $p = 0,084$ (chi-Quadrat nach Pearson)
 S411L $p = 0,227$ (chi-Quadrat nach Pearson)
 S478P $p = 0,647$ (chi-Quadrat nach Pearson)
 Q551R $p = 0,206$ (chi-Quadrat nach Pearson)

Die nach dem Hardy-Weinberg-Equilibrium berechneten Prozente für Genotypfrequenzen stimmten für I50V, S411L, S487P und Q551R mit den gefundenen Ergebnissen überein ($p \geq 0,15$; chi-Quadrat nach Pearson).

Assoziationen zwischen bestimmten Allelen oder Genotypen und erhöhten IgE-Spiegeln (≥ 100 kU/l) oder zu einer positiven Atopieanamnese konnten auf das gesamte Vergleichskollektiv bezogen für keine der vier Mutationen gefunden werden (Tab. 21 und 22). In [116] war eine Assoziation bei S478P mit erniedrigten IgE-Spiegeln gesehen worden, die sich jedoch für K1 und das Gesamtkollektiv nicht reproduzieren ließ ($p \geq 0,101$, Daten nicht gezeigt).

Tab. 21. IL4R I50V, S411L, S487P und Q551R im Vergleichskollektiv K1 sind nicht mit einer positiven Atopieanamnese assoziiert

		Atopie				OR	95% KI	p-Wert
		negative Atopieanamnese		positive Atopieanamnese				
		N	%	N	%			
I50V	II	33	34,7	16	31,4			
	IV	42	44,2	16	31,4	0,79	0,34-1,80	0,57
	VV	20	21,1	19	37,3	1,96	0,82-4,66	0,13
S411L	SS	89	93,7	46	90,2			
	SL	6	6,3	5	9,8	1,61	0,47-5,57	0,47
	LL	-	-	-	-	-	-	-
S478P	SS	63	66,3	35	68,6			
	SP	30	31,6	16	31,4	0,96	0,46-2,00	0,91
	PP	2	2,1	-	-	0,36	0,02-7,66	0,29
Q551R	QQ	57	60,0	31	60,8			
	QR	35	36,8	19	37,3	1,00	0,49-2,03	1,00
	RR	3	3,2	1	2,0	0,61	0,06-6,14	0,67
I50V	II	33	34,7	16	31,4			
	IV + VV	62	65,3	35	68,6	1,16	0,56-2,41	0,68
S411L	SS	89	93,7	46	90,2			
	SL + LL	6	6,3	5	9,8	1,61	0,47-5,57	0,45
S478P	SS	63	66,3	35	68,6			
	SP + PP	32	33,7	16	31,4	0,9,	0,43-1,87	0,78
Q551R	QQ	57	60,0	31	60,8			
	QR + RR	38	40,0	20	39,2	0,97	0,48-1,94	0,93
I50V	II + IV	75	78,9	32	62,7			
	VV	20	21,1	19	37,3	2,23	1,05-4,72	0,03
S411L	SS + SL	95	100,0	51	100,0			
	LL	-	-	-	-	-	-	-
S478P	SS + SP	93	97,9	51	100,0			
	PP	2	2,1	-	-	0,36	0,02-7,71	0,30
Q551R	QQ + QR	92	96,8	50	98,0			
	RR	3	3,2	1	2,0	0,61	0,06-6,05	0,67

Tab. 22. IL4R I50V, S411L, S487P und Q551R im Vergleichskollektiv K1 sind nicht mit dem IgE-Spiegel assoziiert

		IgE				OR	95% KI	p-Wert
		< 100 kU/l		≥ 100 kU/l				
		N	%	N	%			
I50V	II	34	30,9	15	41,7			
	IV	48	43,6	10	27,8	0,47	0,19-1,18	0,10
	VV	28	25,5	11	30,6	0,89	0,35-2,25	0,81
S411L	SS	103	93,6	32	88,9			
	SL	7	6,4	4	11,1	1,84	0,51-6,69	0,35
	LL	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 22, Fortsetzung

S478P	SS	74	67,3	24	66,7			
	SP	34	30,9	12	33,3	1,09	0,49-2,43	0,84
	PP	2	1,8	-	-	0,61	0,03-13,11	0,42
Q551R	QQ	68	61,8	20	55,6			
	QR	38	34,5	16	44,4	1,43	0,66-3,09	0,36
	RR	4	3,6	-	-	0,37	0,02-7,19	0,28
I50V	II	34	30,9	15	41,7			
	IV + VV	76	69,1	21	58,3	0,63	0,29-1,36	0,24
S411L	SS	103	93,6	32	88,9			
	SL + LL	7	6,4	4	11,1	1,84	0,51-6,69	0,35
S478P	SS	74	67,3	24	66,7			
	SP + PP	36	32,7	12	33,3	1,03	0,46-2,29	0,95
Q551R	QQ	68	61,8	20	55,6			
	QR + RR	42	38,2	16	44,4	1,30	0,61-2,77	0,51
I50V	II + IV	82	74,5	25	69,4			
	VV	28	25,5	11	30,6	1,29	0,56-2,95	0,55
S411L	SS + SL	110	100,0	36	100,0			
	LL	-	-	-	-	-	-	-
S478P	SS + SP	108	98,2	36	100,0			
	PP	2	1,8	-	-	0,60	0,03-12,67	0,42
Q551R	QQ + QR	106	96,4	36	100,0			
	RR	4	3,6	-	-	0,32	0,02-6,17	0,25

4.1.4 IL4 C-590T ist nicht mit einem Atopie-Phänotyp assoziiert

Die Typisierung eines in der 5'-Region von IL4 gelegenen Polymorphismus (Austausch eines C zu T an Position 582, M23442), 590 Basenpaare in 5'-Richtung vom ersten Exon entfernt, ergab für das C-Allel eine Allelfrequenz von 86,3% und für das T-Allel von 13,8% (Tab. 23). Die Homozygoten- und Heterozygotenraten stimmten mit dem Hardy-Weinberg-Equilibrium überein ($p = 0,99$; chi-Quadrat nach Pearson).

Die Variante war nicht mit einer positiven Atopieanamnese und dem dichotomisierten IgE-Spiegel (≥ 100 kU/l) assoziiert (Atopie: $p = 0,11$; IgE-Spiegel: 0,44; Tab. 24 und 25). Die geschlechtsgetrennte Untersuchung zeigte kein anderes Ergebnis (Männer: Atopie: $p = 0,48$; IgE-Spiegel: $p = 0,77$; Frauen: Atopie: $p = 0,10$; IgE-Spiegel: $p = 0,38$). Ebenfalls keine Assoziation zeigte sich zwischen dem SNP IL4 C-590T und dem quantitativen Phänotyp Serum-IgE-Spiegel (Daten nicht gezeigt).

Tab. 23, Genotyp- und Allelfrequenzen für den Polymorphismus IL4 C-590T

Polymorphismus	Genotyp	Häufigkeit (%)	Allele	Allelfrequenz (%)
C-590T	CC	74,4	C-Allel	86,3
	CT	23,8	T-Allel	13,8
	TT	1,9		

Tab. 24, IL4 C-590T ist nicht mit einer positiven Atopieanamnese assoziiert

		Atopie				OR	95% KI	p-Wert
		negative		positive				
		Atopieanamnese		Atopieanamnese				
		N	%	N	%			
C-590T	CC	82	71,3	36	83,7			
	CT	30	26,1	7	16,3	0,53	0,21-1,32	0,17
	TT	3	2,6	-	-	0,32	0,02-6,41	0,25
C-590T	CC	82	71,3	36	83,7			
	CT + TT	33	28,7	7	16,3	0,48	0,20-1,19	0,11
C-590T	CC + CT	112	97,4	43	100,0			
	TT	3	2,6	-	-	0,37	0,02-7,30	0,28

Tab. 25, IL4 C-590T ist nicht mit dem IgE-Spiegel (< und ≥ 100 kU/l) assoziiert

		IgE				OR	95% KI	p-Wert
		< 100 kU/l		≥ 100 kU/l				
		N	%	N	%			
C-590T	CC	84	73,0	34	79,1			
	CT	28	24,3	9	20,9	0,79	0,34-1,86	0,59
	TT	3	2,6	-	-	0,35	0,02-6,96	0,27
C-590T	CC	84	73,0	34	79,1			
	CT + TT	31	27,0	9	20,9	0,72	0,31-1,67	0,44
C-590T	CC + CT	112	97,4	43	100,0			
	TT	3	2,6	-	-	0,37	0,02-7,30	0,28

4.1.5 CNS-1 ist mit einer positiven Atopieanamnese assoziiert

Bei der Sequenzierung eines 560 bp langen Abschnitts, welches die Sequenz der *Conserved-Noncoding-Sequence-1* (CNS-1) einschließt, fand sich bei vier Personen von insgesamt 32 sequenzierten Proben ein Basenaustausch an der Position 42333 (Accession number: AC004039, CNS-1 von Position 42292 bis 42703) von C nach G (Abb. 11b, Anhang).

Die nachfolgende SSP-PCR ergab, dass 293 Personen homozygot CC und 14 Personen heterozygot CG waren (Abb. 11a, Anhang). Die Allelfrequenzen betragen für das C-Allel 97,7% und für das G-Allel 2,3% (Tab. 26). Die Homozygoten- und Heterozygotenraten stimmten mit dem Hardy-Weinberg-Equilibrium überein ($p = 0,68$; chi-Quadrat nach Pearson).

Das CNS-1 G-Allel war assoziiert mit einer positiven Atopieanamnese (OR 3,16, 95% KI 1,07-9,39, $p = 0,03$). Dagegen zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem SNP und dem dichotomisierten IgE-Spiegel (Tab. 28). Auch im Vergleich mit dem quantitativen IgE-Spiegel fand sich keine Assoziation mit dem SNP (Daten nicht gezeigt).

Tab. 26, Genotyp- und Allelfrequenzen für den Polymorphismus CNS-1

Polymorphismus	Genotyp	Häufigkeit (%)	Allele	Allelfrequenz (%)
CNS-1	CC	95,4	C-Allel	97,7
	CG	4,6	G-Allel	2,3
	GG	0,0		

Tab. 27, CNS-1 ist mit einer positiven Atopieanamnese assoziiert

		Atopie				OR	95% KI	p-Wert
		negative Atopieanamnese		positive Atopieanamnese				
		N	%	N	%			
CNS-1	CC	204	97,1	86	91,5	3,16	1,07-9,39	0,03
	CG	6	2,9	8	8,5			
	GG	-	-	-	-			
CNS-1	CC	204	97,1	86	91,5	3,16	1,07-9,39	0,03
	CG + GG	6	2,9	8	8,5			

Tab. 28, CNS-1 ist nicht mit dem IgE-Spiegel (< und \geq 100 kU/l) assoziiert

		IgE				OR	95% KI	p-Wert
		< 100 kU/l		\geq 100 kU/l				
		N	%	N	%			
CNS-1	CC	217	96,4	73	92,4	2,23	0,75-6,64	0,14
	CG	8	3,6	6	7,6			
	GG	-	-	-	-			
CNS-1	CC	217	96,4	73	92,4	2,23	0,75-6,64	0,14
	CG + GG	8	3,6	6	7,6			

4.1.6 IL13 C-1112T ist nicht mit einem Atopie-Phänotyp assoziiert

Die untersuchte Variante befindet sich im IL13-Promoter (Austausch eines C zu T an Position 31, AF172149), 1112 Basenpaare in 5'-Richtung vom Anfang des Transkriptionsstarts entfernt. Die Typisierung ergab eine Allelfrequenz für das C-Allel von 78,1% und für das T-Allel von 21,9% (Tab. 29). Die Homozygoten- und Heterozygotenraten stimmten mit dem Hardy-Weinberg-Equilibrium überein ($p = 0,87$; chi-Quadrat nach Pearson).

Tab. 30 und Tab. 31 zeigen die Darstellung von C-1112T, aufgegliedert nach negativer und positiver Atopieanamnese und dem dichotomisierten IgE-Spiegel. Es zeigen sich keine Assoziationen.

Tab. 29, Genotyp- und Allelfrequenzen für den Polymorphismus IL13 C-1112T

Polymorphismus	Genotyp	Häufigkeit (%)	Allele	Allelfrequenz (%)
C-1112T	CC	61,3	C-Allel	78,1
	CT	33,8	T-Allel	21,9
	TT	5,0		

Tab. 30, IL13 C-1112T ist nicht mit einer positiven Atopieanamnese assoziiert

gesamt		Atopie				OR	95% KI	p-Wert
		negative		positive				
		Atopieanamnese	Atopieanamnese	Atopieanamnese	Atopieanamnese			
		N	%	N	%			
C-1112T	CC	66	57,4	31	72,1			
	CT	41	35,7	12	27,9	0,62	0,29-1,35	0,23
	TT	8	7,0	-	-	0,12	0,01-2,22	0,06
C-1112T	CC	66	57,4	31	72,1			
	CT + TT	49	42,6	12	27,9	0,52	0,24-1,12	0,09
C-1112T	CC + CT	107	93,0	43	100,0			
	TT	8	7,0	-	-	0,15	0,01-2,57	0,08

Tab. 31, IL13 C-1112T ist nicht mit dem IgE-Spiegel (< und \geq 100 kU/l) assoziiert

		IgE				OR	95% KI	p-Wert
		< 100 kU/l		\geq 100 kU/l				
		N	%	N	%			
C-1112T	CC	71	61,7	26	60,5			
	CT	37	32,2	16	37,2	1,18	0,56-2,47	0,66
	TT	7	6,1	1	2,3	0,39	0,05-3,33	0,37
C-1112T	CC	71	61,7	26	60,5			
	CT + TT	44	38,3	17	39,5	1,06	0,52-2,16	0,88
C-1112T	CC + CT	108	93,9	42	97,7			
	TT	7	6,1	1	2,3	0,37	0,04-3,08	0,34

4.1.7 Die IRF-1-Varianten A-415C/G-410A, T4379C und G7311A sind nicht mit einem Atopie-Phänotyp assoziiert

Die Typisierung von drei Varianten in der Sequenz von IRF-1 ergab für die Variante in der 5'-Region (A-415C/G-410A; gekoppelter Basenaustausch von AcctcG nach CcctcA an Position 81 und 86, X53095) Allelfrequenzen von 66,0% für das AG-Allel und 34,0% für das CA-Allel, für die Variante im sechsten Intron (T4379C; Basenaustausch von T nach C an Position 4379, L05072) Allelfrequenzen von 66,4% für das T-Allel und 33,6% für das C-Allel und für die Variante in der 3'-Region (G7311A; Basenaustausch von G nach A an Position 7311, L05072) Allelfrequenzen von 66,6% für das G-Allel und 33,3% für das A-Allel (Tab. 32). Dabei befinden sich die Varianten im Hardy-Weinberg-Equilibrium ($p \geq 0,42$; chi-Quadrat nach Pearson).

Assoziationen mit einer positiven Atopieanamnese oder IgE-Serum-Werten über 100 kU/l ließen sich nicht finden. So war das allgemeine Risiko für Atopie für das CcctcA-Allel von A-415C/G-410A OR = 1,11 ($p = 0,72$), für das C-Allel von T4379C OR = 1,11 ($p = 0,74$)

und für das A-Allel von G7311A OR = 1,07 (p = 0,83). Tab.33 und 34 zeigen die ausführliche Darstellung der Assoziationen.

Tab. 32, Genotyp- und Allelfrequenzen für die Polymorphismen A-415C/G-410A, T4379C und G7311A

Polymorphismus	Genotyp	Häufigkeit (%)	Allele	Allelfrequenz (%)
A-415C/G-410A	AG/AG	44,2	AG-Allel	66,0
	AG/CA	43,5	CA-Allel	34,0
	CA/CA	12,2		
T4379C	TT	45,1	T-Allel	66,4
	TC	42,8	C-Allel	33,6
	CC	12,2		
G7311A	GG	45,5	G-Allel	66,6
	GA	42,2	A-Allel	33,3
	AA	12,2		

Tab. 33, A-415C/G-410A, T4379C und G7311A sind nicht mit einer positiven Atopieanamnese assoziiert

		Atopie				OR	95% KI	p-Wert
		negative		positive				
		Atopieanamnese		Atopieanamnese				
		N	%	N	%			
A-415C/ G-410A	AG/AG	91	44,6	40	45,5	0,88	0,51-1,50	0,63
	AG/CA	91	44,6	35	39,8			
	CA/CA	22	10,8	13	14,8			
T4379C	TT	93	44,5	43	46,2	0,83	0,49-1,40	0,48
	TC	94	45,0	36	38,7			
	CC	22	10,5	14	15,1			
G7311A	GG	95	45,5	43	46,7	0,87	0,52-1,48	0,62
	GA	91	43,5	36	39,1			
	AA	23	11,0	13	14,1			
A-415C/ G-410A	AG/AG	91	44,6	40	45,5	0,97	0,59-1,60	0,89
	AG/CA + CA/CA	113	55,4	48	54,5			
	T4379C	TT	93	44,5	43			
TC + CC	116	55,5	50	53,8				
G7311A	GG	95	45,5	43	46,7	0,95	0,58-1,55	0,84
	GA + AA	114	54,5	49	53,3			
A-415C/ G-410A	AG/AG + AG/CA	182	89,2	75	85,2	1,43	0,69-3,00	0,34
	CA/CA	22	10,8	13	14,8			
	T4379C	TT + TC	187	89,5	79			
CC	22	10,5	14	15,1				
G7311A	GG + GA	186	89,0	79	85,9	1,33	0,64-2,76	0,44
	AA	23	11,0	13	14,1			

Tab. 34. A-415C/G-410A, T4379C und G7311A sind nicht mit dem IgE-Spiegel (< und \geq 100 kU/l) assoziiert

		IgE				OR	95% KI	p-Wert
		< 100 kU/l		\geq 100 kU/l				
		N	%	N	%			
A-415C/ G-410A	AG/AG	100	45,9	31	41,9			
	AG/CA	93	42,7	33	44,6	1,15	0,65-2,02	0,64
	CA/CA	25	11,5	10	13,5	1,29	0,56-2,98	0,55
T4379C	TT	104	46,4	32	41,0			
	TC	95	42,4	35	44,9	1,20	0,69-2,08	0,52
	CC	25	11,2	11	14,1	1,43	0,64-3,22	0,39
G7311A	GG	105	46,9	33	42,9			
	GA	94	42,0	33	42,9	1,12	0,64-1,95	0,70
	AA	25	11,2	11	14,3	1,40	0,62-3,15	0,41
A-415C/ G-410A	AG/AG + AG/CA CA/CA	100 118	45,9 54,1	31 43	41,9 58,1	1,18	0,69-2,00	0,55
T4379C	TT TC + CC	104 120	46,4 53,6	32 46	41,0 59,0	1,25	0,74-2,10	0,41
G7311A	GG GA + AA	105 119	46,9 53,1	33 44	42,9 57,1	1,18	0,70-1,98	0,54
A-415C/ G-410A	AG/AG + AG/CA CA/CA	193 25	88,5 11,5	64 10	86,5 13,5	1,21	0,55-2,65	0,64
T4379C	TT + TC CC	199 25	88,8 11,2	67 11	85,9 14,1	1,31	0,61-2,80	0,49
G7311A	GG + GA AA	199 25	88,8 11,2	66 11	85,7 14,3	1,33	0,62-2,84	0,47

4.1.8 TLR-4 D299G und T399I sind nicht mit einem Atopie-Phänotyp assoziiert

Die Typisierung der bekannten, im dritten Exon gelegenen Mutationen D299G und T399I [194], bei denen eine Punktmutation von A nach G an Position 2326 und von C nach T an Position 2626 (Accession number: AF172171) zu einem Austausch von Aminosäuren in der extrazellulären Region des Proteins führt, ergab eine zu 100 Prozent übereinstimmende Kopplung der beiden Polymorphismen (Tab. 38).

Dabei waren 285 Personen (92,8%) homozygot DD (TT), 20 Personen (6,5%) heterozygot DG (TI) und 2 Personen (0,7%) homozygot GG (II) (Tab. 35). Die Ergebnisse der Typisierung wurden durch Sequenzierung von 40 Personen mit verschiedenen Genotypen überprüft und zeigten eine 100% Übereinstimmung (Abb. 12, Anhang). Beide Polymorphismen befanden sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium ($p=0,07$; Exakt-Test nach Fisher).

Es ließ sich keine Assoziation mit dem IgE-Spiegel oder einer positiven Atopieanamnese finden, auch nicht bei der getrennten Untersuchung von Männern und Frauen (Tab. 36 und Tab. 37).

Tab. 35, Genotyp- und Allelfrequenzen für die Polymorphismen D299G und T399I

Polymorphismus	Genotyp	Häufigkeit (%)	Allele	Allelfrequenz (%)
D299G	DD	92,8	D-Allel	96,1
	DG	6,5	G-Allel	3,9
	GG	0,7		
T399I	TT	92,8	T-Allel	96,1
	TI	6,5	I-Allel	3,9
	II	0,7		

Tab. 36, D299G und T399I sind nicht mit einer positiven Atopieanamnese assoziiert

		Atopie				OR	95% KI	p-Wert
		negative Atopieanamnese		positive Atopieanamnese				
		N	%	N	%			
D299G	DD	195	92,9	87	92,6	0,96	0,36-2,58	0,94
	DG	14	6,7	6	6,4			
	GG	1	0,5	1	1,1			
T399I	TT	195	92,9	87	92,6	0,96	0,36-2,58	0,94
	TI	14	6,7	6	6,4			
	II	1	0,5	1	1,1			
<hr/>								
D299G	DD	195	92,9	87	92,6	1,05	0,41-2,66	0,92
	DG + GG	15	7,1	7	7,4			
T399I	TT	195	92,9	87	92,6	1,05	0,41-2,66	0,92
	TI + II	15	7,1	7	7,4			
<hr/>								
D299G	DD + DG	209	99,5	93	98,9	2,25	0,14-36,32	0,56
	GG	1	0,5	1	1,1			
T399I	TT + TI	209	99,5	93	98,9	2,25	0,14-36,32	0,56
	II	1	0,5	1	1,1			

Tab. 37, D299G und T399I sind nicht mit dem IgE-Spiegel (< und \geq 100 kU/l) assoziiert

		IgE				OR	95% KI	p-Wert
		< 100 kU/l		\geq 100 kU/l				
		N	%	N	%			
D299G	DD	210	93,3	72	91,1	1,25	0,46-3,38	0,66
	DG	14	6,2	6	7,6			
	GG	1	0,4	1	1,3			
T399I	TT	210	93,3	72	91,1	1,25	0,46-3,38	0,66
	TI	14	6,2	6	7,6			
	II	1	0,4	1	1,3			
<hr/>								
D299G	DD	210	93,3	72	91,1	1,36	0,53-3,47	0,52
	DG + GG	15	6,7	7	8,9			
T399I	TT	210	93,3	72	91,1	1,36	0,53-3,47	0,52
	TI + II	15	6,7	7	8,9			

Tab. 37, Fortsetzung

D299G	DD + DG	224	99,6	78	98,7	2,87	0,18-46,47	0,44
	GG	1	0,4	1	1,3			
T399I	TT + TI	224	99,6	78	98,7	2,87	0,18-46,47	0,44
	II	1	0,4	1	1,3			

Tab. 38, Die TLR-4-Polymorphismen D299G und T399I sind zu 100% gekoppelt

		D299G			
		DD	DG	GG	gesamt
T399I	TT	285			285
	TI		20		20
	II			2	2
	gesamt	285	20	2	307

4.1.9 IFNG

4.1.9.1 Das IFNG-CA-Repeat ist nicht mit einem Atopie-Phänotyp assoziiert

Im ersten Intron der Sequenz von IFNG befindet sich an Position 2568 (Accession number: AF375790) ein CA-Repeat mit einer variablen Länge von 11 bis 18 Wiederholungen von CAs. Tab. 39 (Anhang) gibt eine Aufstellung von Allel- und Genotypfrequenzen von Blutspendern, Neugeborenen und in der Literatur [86, 106, 107] gefundenen Werten wieder, Abb. 13 (Anhang) zeigt eine Auswahl möglicher Genotypen, die durch Sequenzierung bestätigt wurden. Die Verteilung der Allelkombinationen des CA-Repeats befindet sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium ($p = 0,95$; Exakt-Test).

Es zeigte sich kein Unterschied bei Positivität eines Alles mit dem IgE-Spiegel oder einer positiven Atopieanamnese (Atopie: $p \geq 0,33$; Fisher's Exakt-Test; IgE $<$ oder ≥ 100 kU/l: $p \geq 0,21$; Fisher's Exakt-Test).

Tab. 40, Das CA-Repeat ist nicht mit einer positiven Atopieanamnese assoziiert

Anzahl der CA- Repeats (Allelpositivität)	N	(%)	Atopie				p-Wert
			negative Atopieanamnese		positive Atopieanamnese		
			N	(%)	N	(%)	
12	203	(66,8)	143	(68,1)	60	(63,8)	0,51 ^a
13	229	(75,3)	158	(75,2)	71	(75,5)	1,00 ^a
14	35	(11,5)	27	(12,9)	8	(8,5)	0,33 ^a
15	22	(7,2)	13	(6,2)	9	(9,6)	0,34 ^a
gesamt	304		210		94		

^a Fisher's Exakt-Test

Tab. 41, Das CA-Repeat ist nicht mit dem IgE-Spiegel (< und \geq 100 kU/l) assoziiert

Anzahl der CA- <i>Repeats</i> (Allelpositivität)	N		IgE-Spiegel		IgE-Spiegel		p-Wert
			< 100 kU/l		\geq 100 kU/l		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
12	203	(66,8)	150	(66,7)	53	(67,1)	1,00 ^a
13	229	(75,3)	165	(73,3)	64	(81,0)	0,22 ^a
14	35	(11,5)	29	(12,9)	6	(7,6)	0,30 ^a
15	22	(7,2)	19	(8,4)	3	(3,8)	0,21 ^a
gesamt	304		225		79		

^a Fisher's Exakt-Test

4.1.9.2 Die IFNG-SNPs T-1615C, T874A und A5171G sind nicht mit einem Atopie-Phänotyp assoziiert

In der Sequenz von IFNG sind mehrere Polymorphismen bekannt. Dabei waren die Punktmutationen in der 5'-Region an Position 78 (T zu C), im ersten Intron an Position 2567 (T zu A) [223] und in der 3'-Region an Position 6864 (A zu G) (Accession number: AF375790) bei dieser Untersuchung von besonderem Interesse. Abb.14 (Anhang) zeigt Beispiele für alle gefundenen Genotypen.

Genotyp- und Allelfrequenzen der drei Polymorphismen finden sich in Tab. 42. Alle Varianten befinden sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium ($p \geq 0,07$; Chi-Quadrat nach Pearson).

Tab. 42, Genotyp- und Allelfrequenzen für die Polymorphismen IFNG T-1615C, T874A und A5171G

Polymorphismus	Genotyp	Häufigkeit (%)	Allele	Allelfrequenz (%)
T-1615C	TT	37,7	T-Allel	63,25
	TC	51,0	C-Allel	36,75
	CC	11,3		
T874A	TT	16,3	T-Allel	42,18
	TA	51,8	A-Allel	57,82
	AA	31,9		
A5171G	AA	36,3	A-Allel	60,3
	AG	47,9	G-Allel	39,7
	GG	15,8		

Bei der Analyse der Varianten zeigt sich kein Anhalt für Assoziation mit dem IgE-Spiegel (< oder \geq 100 kU/l) wie auch mit der Atopieanamnese (Tab. 43 und Tab. 44). Auch in der getrennten Untersuchung zeigt sich weder für Frauen noch für Männer ein Unterschied in der Verteilung von Homozygoten und Heterozygoten.

Die in der Literatur [223] beschriebene 100%ige Kopplung des T-Allels von T874A mit 12 CA-*Repeats* konnte nicht bestätigt werden: Bei sechs Probanden (1,95%) war das T-Allel

mit anderen Allelen gekoppelt (siehe auch 4.2.4.2). Die Einzelfälle sind in Tab. 45 dargestellt.

Tab. 43, T-1615C, T874A und A5171G sind nicht mit einer positiven Atopieanamnese assoziiert

		Atopie				OR	95% KI	p-Wert
		negative Atopieanamnese		positive Atopieanamnese				
		N	%	N	%			
T-1615C	TT	76	36,7	37	40,2			
	TC	113	54,6	40	43,5	0,73	0,43-1,24	0,24
	CC	18	8,7	15	16,3	1,71	0,78-3,77	0,18
T874A	TT	33	15,7	17	18,1			
	TA	115	54,8	43	45,7	0,73	0,37-1,44	0,36
	AA	62	29,5	34	36,2	1,07	0,52-2,19	0,86
A5171G	AA	42	38,2	21	36,8			
	AG	53	48,2	25	43,9	0,94	0,47-1,91	0,87
	GG	15	13,6	11	19,3	1,47	0,57-3,75	0,42
T-1615C	TT	76	36,7	37	40,2			
	TC + CC	131	63,3	55	59,8	0,86	0,52-1,43	0,56
T874A	TT	33	15,7	17	18,1			
	TA + AA	177	84,3	77	81,9	0,84	0,44-1,61	0,60
A5171G	AA	42	38,2	21	36,8			
	AG + GG	68	61,8	36	63,2	1,06	0,55-2,05	0,87
T-1615C	TT + TC	189	91,3	77	83,7			
	CC	18	8,7	15	16,3	2,05	0,98-4,26	0,05
T874A	TT + TA	148	70,5	60	63,8			
	AA	62	29,5	34	36,2	1,35	0,81-2,26	0,25
A5171G	AA + AG	95	86,4	46	80,7			
	GG	15	13,6	11	19,3	1,51	0,65-3,56	0,34

Tab. 44, T-1615C, T874A und A5171G sind nicht mit dem IgE-Spiegel (< und \geq 100 kU/l) assoziiert

		IgE				OR	95% KI	p-Wert
		< 100 kU/l		\geq 100 kU/l				
		N	%	N	%			
T-1615C	TT	87	39,5	26	32,9			
	TC	106	48,2	47	59,5	1,48	0,85-2,59	0,16
	CC	27	12,3	6	7,6	0,74	0,28-2,00	0,56
T874A	TT	38	16,9	12	15,2			
	TA	114	50,7	44	55,7	1,22	0,59-2,55	0,59
	AA	73	32,4	23	29,1	1,00	0,45-2,22	1,00
A5171G	AA	47	37,9	16	37,2			
	AG	58	46,8	20	46,5	1,01	0,47-2,17	0,97
	GG	19	15,3	7	16,3	1,08	0,38-3,05	0,88

Tab. 44, Fortsetzung

T-1615C	TT	87	39,5	26	32,9	1,33	0,78-2,29	0,30
	TC + CC	133	60,5	53	67,1			
T874A	TT	38	16,9	12	15,2	1,14	0,56-2,30	0,73
	TA + AA	187	83,1	67	84,8			
A5171G	AA	47	37,9	16	37,2	1,03	0,50-2,11	0,94
	AG + GG	77	62,1	27	62,8			
T-1615C	TT + TC	193	87,7	73	92,4	0,59	0,23-1,48	0,26
	CC	27	12,3	6	7,6			
T874A	TT + TA	152	67,6	56	70,9	0,86	0,49-1,50	0,58
	AA	73	32,4	23	29,1			
A5171G	AA + AG	105	84,7	36	83,7	1,08	0,42-2,77	0,88
	GG	19	15,3	7	16,3			

Tab. 45, Ausnahmen der Kopplung zwischen IFNG T874A und der Anzahl der CA-Repeats bei Blutspendern

Anzahl der CA-Repeats	Typisierung T874A	Anzahl der Fälle
(CA) ₁₂ /(CA) ₁₃	T/T	1
(CA) ₁₃ /(CA) ₁₃	T/A	4
(CA) ₁₃ /(CA) ₁₄	T/A	1

4.2 Neugeborene

Das Kollektiv wurde unter der Annahme untersucht, dass bei Neugeborenen durch den weitgehenden Ausschluss von Einwirkungen extrateriner Umweltfaktoren die Höhe des IgE-Spiegels wesentlich durch genetische Faktoren beeinflusst sein müsste.

Von den insgesamt 113 untersuchten Nabelschnurblutproben mussten vier ausgeschlossen werden, da es sich um Zwillingsgeburten handelte. Bei vier weiteren Proben lag der IgA-Wert, der zum Ausschluss einer Kontamination mit mütterlichem Blut gemessen wurde, über der zulässigen Grenze. Bei fünf weiteren Proben war die DNA-Konzentrationen so gering, dass damit keine Ergebnisse zu erzielen waren. Somit wurden 100 Neugeborene eingeschlossen.

Von diesen 100 Neugeborenen waren 28 (28,0%) männlich, 32 (32,0%) weiblich, bei 40 (40,0%) war das Geschlecht nicht bekannt.

4.2.1 6% der Neugeborenen zeigten erhöhte IgE-Serum-Spiegel

Bei der Messung des IgE-Spiegels lagen 79% der Werte unter der Nachweisgrenze von 0,35 kU/l. Der Maximalwert betrug 4,48 kU/l. Über dem in der Literatur als Ausgangspunkt für erhöhte IgE-Spiegel bei Neugeborenen angegeben Wert von 0,9 kU/l [15, 19, 226] wurden sechs Proben gemessen (6 %).

4.2.2 IL4R G-3223A und S478P sind nicht mit dem IgE-Spiegel assoziiert

Beide IL4R-Polymorphismen befanden sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium (S487P: $p = 0,38$; G-3223A: $p = 0,47$; chi-Quadrat nach Pearson).

Assoziationen mit dem IgE-Spiegel ließen sich weder für S487P noch für G-3223A zeigen (Tab. 46). Auch die getrennte Untersuchung nach Geschlecht erbrachte kein anderes Ergebnis.

Tab. 46. S478P und G-3223A sind nicht mit dem IgE-Spiegel (IgE kleiner oder größer 0,9 kU/l) bei Neugeborenen assoziiert

		IgE				OR	95% KI	p-Wert
		< 0,9 kU/l		≥ 0,9 kU/l				
		N	%	N	%			
S478P	SS	62	66,7	4	66,7			
	SP	28	30,1	1	16,7	0,55	0,06-5,18	0,60
	PP	3	3,2	1	16,7	5,17	0,43-61,62	0,15
G-3223A	GG	34	41,0	1	20,0			
	GA	35	42,2	3	60,0	2,91	0,29-29,41	0,34
	AA	14	16,9	1	20,0	2,43	0,14-41,60	0,53
S478P	SS	62	66,7	4	66,7			
	SP + PP	31	33,3	2	33,3	1,00	0,17-5,76	1,00
G-3223A	GG	34	41,0	1	20,0			
	GA + AA	49	59,0	4	80,0	2,78	0,30-25,93	0,35
S478P	SS + SP	90	96,8	5	83,7			
	PP	3	3,2	1	16,7	6,00	0,53-68,55	0,11
G-3223A	GG + GA	69	83,1	4	80,0			
	AA	14	16,9	1	20,0	1,23	0,13-11,87	0,86

4.2.3 IFNG

4.2.3.1 Das IFNG CA-Repeat bei Neugeborenen ist nicht mit dem IgE-Spiegel assoziiert

Die Allel- und Genotypfrequenzen befinden sich in Tab. 39 im Anhang. Dabei bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Blutspendern, den Neugeborenen, [106] und [107] bis auf das Auftreten des bis dahin nicht bekannten Allels mit 18 CA-Repeats im Neugeborenenkollektiv. Die Verteilung der Allelkombinationen des CA-Repeats befindet sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium ($p = 0,15$; Exakt-Test).

Es zeigte sich keine Assoziation eines Allels mit dem IgE-Spiegel (IgE kleiner oder größer 0,9 kU/l; $p \geq 0,40$; Fisher's Exakt-Test; Tab. 47).

Tab. 47, Das IFNG-CA-Repeat ist nicht mit dem IgE-Spiegel (IgE kleiner oder größer 0,9 kU/l) bei Neugeborenen assoziiert

Anzahl der CA- Repeats (Allelpositivität)			IgE-Spiegel				p-Wert
	N	(%)	< 0,9 kU/l		> 0,9 kU/l		
			N	(%)	N	(%)	
11	1	(1,0)	1	(1,1)	0	(0,0)	1,00 ^a
12	74	(74,0)	70	(74,5)	4	(66,7)	0,65 ^a
13	70	(70,0)	66	(70,2)	4	(66,7)	1,00 ^a
14	8	(8,0)	7	(7,4)	1	(16,5)	0,40 ^a
15	7	(7,0)	7	(7,4)	0	(0,0)	1,00 ^a
18	1	(1,0)	1	(1,1)	0	(0,0)	1,00 ^a
gesamt	100		94		6		

^a Fisher's Exakt-Test

4.2.3.2 IFNG T874A ist nicht mit dem IgE-Spiegel bei Neugeborenen assoziiert

Die Typisierung der Punktmutation, die sich direkt vor dem oben beschriebenen CA-Repeat befindet, ergab eine Allelfrequenz für das T-Allel von T874A von 46,8%, für A874 von 53,2%. Die Variante befand sich auch bei den Neugeborenen im Hardy-Weinberg-Equilibrium ($p = 0,51$; chi-Quadrat-Analyse nach Pearson).

Auch bei den Neugeborenen konnte die in der Literatur [223] beschriebene 100%ige Kopplung des T-Allels mit 12 CA-Repeats nicht bestätigt werden: Bei vier Neugeborenen (4,0%) stimmte das Ergebnis der Typisierung nicht mit der Anzahl der Repeats überein. Die genaue Aufstellung ist in Tab. 48 dargestellt.

Auch hier lässt sich kein Zusammenhang zwischen IgE-Spiegel und der Variante T874A herstellen (Tab. 49). Auch die getrennte Untersuchung nach Geschlecht erbrachte kein anderes Ergebnis.

Tab. 48, Ausnahmen der Kopplung zwischen T874A und der Anzahl der CA-Repeats bei Neugeborenen

Anzahl der CA-Repeats	T/A	Anzahl der Fälle
(CA) ₁₂ /(CA) ₁₂	T/A	1
(CA) ₁₂ /(CA) ₁₃	T/A	1
(CA) ₁₂ /(CA) ₁₃	T/T	1
(CA) ₁₃ /(CA) ₁₃	A/A	1

Tab. 49, T874A ist nicht mit dem IgE-Spiegel (IgE kleiner oder größer 0,9 kU/l) bei Neugeborenen assoziiert

		IgE				OR	95% KI	p-Wert
		< 0,9 kU/l		≥ 0,9 kU/l				
		N	%	N	%			
T874A	TT	18	20,2	1	20,0			
	TA	46	51,7	3	60,0	1,17	0,11-12,04	0,89
	AA	25	28,1	1	20,0	0,72	0,04-12,29	0,82
T874A	TT	18	20,2	1	20,0			
	TA + AA	71	79,8	4	80,0	1,01	0,11-9,64	0,99
T874A	TT + TA	64	71,9	4	80,0			
	AA	25	28,1	1	20,0	0,64	0,07-6,01	0,69

5 Diskussion

5.1 Der IgE-Spiegel als intermediärer Atopie-Phänotyp

Der IgE-Serum-Spiegel wurde als ein Marker für Atopie herangezogen. In Tab. 19 ist zu sehen, dass sich der IgE-Spiegel bei den Probanden gut als Indikator für Atopie eignet. Eine positive Atopie-Anamnese ist signifikant mit erhöhten IgE-Werten assoziiert ($p < 0,001$; chi-Quadrat nach Pearson).

Die Auswertung des Fragebogens ergab neben der positiven Assoziation von eigener Atopieanamnese und Familienanamnese einen höheren Anteil von Frauen bei Personen mit Neurodermitis ($p = 0,002$; chi-Quadrat nach Pearson). Studien zeigen, dass im Alter von 6 bis 12 Jahren Jungen häufiger von Neurodermitis betroffen sind, während in der Gruppe der 16jährigen Mädchen stärker vertreten sind [227, 228]. In wie weit sich diese Ergebnisse auf Erwachsene übertragen lassen, ist unklar. Muto et al. [229] konnte für japanische Erwachsene keinen Geschlechtsunterschied in der Prävalenz von Neurodermitis feststellen.

Weiter zeigt sich, dass Männer höhere IgE-Spiegel aufweisen als Frauen ($p = 0,021$; Mann-Whitney-Test). Auch bei Marsh et al. [65] findet sich diese Beobachtung, bei Kimpen et al. [230] auch für IgE-Spiegel aus Nabelschnurblut. In dem hier vorliegenden Neugeborenenkollektiv lagen 79% der Werte für den IgE-Spiegel unterhalb der Nachweisgrenze, weswegen hierzu keine Aussage getroffen werden konnte. Es zeigte sich, dass Männer im gesamten Lebenszeitraum von 6 bis 75 Jahren einen höheren IgE-Spiegel aufweisen als Frauen [32].

Rauchen als Umweltfaktor war in anderen Studien mit erhöhten IgE-Werten assoziiert. Bei den Probanden der vorliegenden Studie konnte Rauchen als Kofaktor jedoch ausgeschlossen werden. Bei Rauchern und Nichtrauchern fanden sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,789$; chi-Quadrat nach Pearson).

Der IgE-Wert im Nabelschnurblut zeigte in mehreren Studien einen positiven Zusammenhang zwischen erhöhten Werten und der Entwicklung atopischer Erkrankungen [18, 19, 20]. Bei 80,2% der Kinder mit erhöhten IgE-Spiegeln ($> 0,9$ kU/l) zeigten sich vor dem sechsten Lebensjahr die Symptome einer Atopie [19]. In dieser Studie hatten 6,0% der Neugeborenen einen IgE-Spiegel über 0,9 kU/l. In der Literatur finden sich Werte von 9,0% [231] und 12,6% [19].

Die vorliegenden Daten lassen den Schluss zu, dass der IgE-Spiegel einen geeigneten intermediären Phänotyp für Atopie darstellt.

5.2 Das Gen für die α -Kette des Interleukin-4-Rezeptors

Zahlreiche Studien zur Assoziation von Genvarianten am IL4R-Gen mit Atopie-Phänotypen sind mit widersprüchlichen Ergebnissen publiziert worden. Bei Kruse et al. [110] fand sich eine Assoziation für die IL4R-Genvariante Q551R mit erniedrigten IgE-Spiegeln, bei Hershey et al. [108] und Rosa-Rosa et al. [109] wiederum war das R551-Allel mit Atopie und Asthma assoziiert.

Auch für den IL4R-SNP I50V sind die Ergebnisse widersprüchlich. Ober et al. [117] konnte für das Allel V50 eine Assoziation mit Atopie herstellen. Bei Mitsuyasu et al. [113] fand sich für das I50-Allel Assoziation mit erhöhten IgE-Spiegeln und Asthma. Dagegen sind die Ergebnisse für S478P einheitlicher: drei Studien [85, 110, 116] zeigen für das P478-Allel eine Assoziation mit verminderten IgE-Spiegeln.

In dieser Studie zeigten sich keine Unterschiede zwischen dem ursprünglich untersuchtem Kollektiv [116] und dem Replikationskollektiv in der Verteilung der Homozygoten und Heterozygoten. Die Assoziation der untersuchten IL4R-SNPs mit IgE-Spiegeln bei Nichtatopikern, die in [116] gefunden wurde, ließ sich weder für das Vergleichskollektiv noch für das Gesamtkollektiv für keinen der vier Polymorphismen reproduzieren ($p \geq 0,101$).

Es ist unwahrscheinlich, dass die bekannten Varianten des Interleukin-4-Rezeptors eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atopie spielen. Auch in vielen anderen Studien [111] [78, 107, 112, 114] konnte in jüngerer Zeit kein Zusammenhang einer IL4R-Genvariante mit einem Atopie-Phänotyp gefunden werden.

5.3 Interleukin-4

Das Gen für IL-4 liegt in der Region 5q31, die mit Asthma und Atopie gekoppelt ist. Ein Dinukleotid-Repeat im zweiten Intron war in verschiedenen Populationen mit erhöhten IgE-Spiegeln [65, 66] und Asthma [66] assoziiert.

Rosenwasser et al. [71] konnte für eine Variante in der 5'-Region (C-590T) eine Assoziation mit erhöhten IgE-Serum-Spiegeln feststellen ($p=0.003$). In späteren Studien [120] konnte er zeigen, dass es durch den Basenaustausch zu einer höheren Bindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren, einer gesteigerten IL-4-Aktivität und einem erhöhten IgE-Spiegel kommt. Außerdem fanden sich Assoziationen zu Heuschnupfen [72], Asthma [73], Neurodermitis [75, 76] und Atopie [76] in australischen, kanadischen und japanischen Studien.

In dieser Studie jedoch zeigte sich keine Assoziation, weder mit erhöhten IgE-Spiegeln, noch mit Atopie oder Heuschnupfen, Asthma und Neurodermitis. Auch Dizier et al. [77], Hakonarson et al. [78] und Liu et al. [79] konnten diesen Zusammenhang nicht bestätigen.

5.4 CNS-1

Die *Conserved-Noncoding-Sequence-1* liegt zwischen den Genen für IL4 und IL13 in der asthma- und atopiegekoppelten Region 5q31. Es wird die Möglichkeit diskutiert, dass CNS1 zu den sogenannten *Locus Control Regions* gehört. Für transgene Mäuse konnte ein Einfluss der Sequenz auf die Konzentration von IL-4, IL-13 und IL-5 gezeigt werden [144]. Für den hier erstmals beschriebenen Polymorphismus zeigt sich eine Assoziation mit dem untersuchten Phänotyp positive Atopieanamnese. Jedoch favorisieren wir die Möglichkeit, dass es sich hier um ein falsch positives Ergebnis handelt, da sich keine Assoziation der Variante mit dem IgE-Spiegel fand .

5.5 Interleukin-13

Das IL13-Gen liegt zusammen mit IL4 und IL5 auf Chromosom 5q31. In tierexperimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass sich durch Änderung des IL-13-Spiegels ein Asthmaphänotyp mit Atemwegshyperreagibilität, Erhöhung der eosinophilen Leukozyten im Bronchialgewebe und eine Überproduktion von Schleim induzieren ließ [151]. Auch zeigte der IgE-Spiegel eine Abhängigkeit von IL-13 [153, 154, 156]: In Mausmodellen kam es auch unter Abwesenheit von Il-4 zu einer Expression von IgE nach Stimulation mit Il-13.

In der Literatur finden sich Assoziationen des T-1112-Allels mit Asthma [80, 84] und bronchialer Überreaktion [84]. Außerdem stellte van der Pouw Kraan et al. [80] bei TT-Homozygoten eine veränderte Regulation der IL-13-Produktion und eine erhöhte Bindung von Transkriptionsfaktoren fest. Er kam zu dem Ergebnis, dass das T-Allel mit einer Prädisposition zu allergischem Asthma assoziiert ist.

Im Gegensatz zu diesem Ergebnis zeigte die IL-13-Variante C-1112T in dieser Studie keine Assoziation mit einem Atopie-Phänotyp. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind wahrscheinlich nicht auf genetisch verschiedene Populationen zurückzuführen. Die Studien [80] und [84] wurden mit niederländischen Probanden durchgeführt. Auch in den Genotypfrequenzen findet sich kein Unterschied (CC: 63,4%, CT: 32,1%, TT: 4,5%, [84]). Es existieren weitere Studien, die keinen Zusammenhang zwischen dieser Variante und

einem Atopie-Phänotyp feststellen konnten. Hakonarson et al. [78] gelang es nicht, eine Assoziation mit Asthma nachzuweisen. Somit ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass der untersuchte IL-13-Polymorphismus für die Kopplung der Genregion 5q31 mit Atopie verantwortlich ist.

5.6 Interferon-regulierender-Faktor-1

IRF1 gehört ebenfalls zu den Genen, die in der Region 5q31 lokalisiert sind. In der Literatur fand sich Kopplung von IRF-1-Markern mit M. Crohn [84], IgE-Spiegel [65] und Asthma [181].

Assoziation mit juveniler idiopathischer Arthritis (JIA) zeigte eine Variante in der 3'-Region (G7311A) von IRF-1 [124]. Dabei waren die Genotypfrequenzen für 7311AA-Homozygote in der Gruppe der Patienten geringer als in den Kontrollen ($p = 0,0002$). Geht man von einer verstärkten Th1-Antwort bei der JIA als pathophysiologische Grundlage aus, so sollte bei Vorliegen einer Homozygotie für das 7311A-Allel und somit einer verstärkten Th2-Antwort erhöhte IgE-Konzentrationen und erhöhte Atopie-Prävalenzen finden lassen.

Bei keinem der untersuchten Atopie-Phänotypen zeigt sich in dieser Studie eine Assoziation mit einer IRF1-Genvariante. Damit sind auch die untersuchten IRF-1-SNPs als Ursache für die beobachtete Kopplung in der Genregion wenig wahrscheinlich.

5.7 Toll-like-Rezeptor-4

TLR-4 bildet gemeinsam mit CD14 den Rezeptor für LPS [187] und ist somit ein wichtiges Glied in der Kette der Th1-Antwort.

Beim Menschen zeigten zwei Varianten in der extrazellulären Domäne, D299G und T399I, eine Hyporesponsibilität auf LPS nach LPS-Inhalation [194]. Im Gegensatz zu [194] und [199] waren hier beide Polymorphismen zu 100% miteinander gekoppelt, wie auch bei [197].

Die Hygienehypothese geht von einem protektiven Schutz vor Atopie bei einem frühen Kontakt mit LPS aus. Da für die Allelvarianten G299 und I399 eine verminderte Reaktion auf LPS gefunden wurde, müssten Personen mit diesen Mutationen eine verstärkte Neigung zu Atopie zeigen. In dieser Studie konnte kein Zusammenhang zwischen G299 und I399 mit der Atopieanamnese oder dem IgE-Spiegel gefunden werden. Auch Raby et al. [198] konnte für Varianten im Gen für TLR4, darunter auch D299G und T399I, keine

Assoziation mit Atopie herzustellen, wie auch Reindl et al. [199] für Multiple Skleose und Feterowski et al. [200] für Sepsis.

5.8 Interferon- γ

IFN- γ ist eines der wichtigsten Zykokine, die die Th1-Antwort steuern. Die kodierenden Abschnitte des Gens sind hochgradig konserviert. Drei Arbeitsgruppen [105, 214, 215] konnten keine Mutationen im kodierenden Abschnitt nachweisen. In den Introns dagegen sind eine Vielzahl von Varianten bekannt, unter anderem ein *CA-Repeat* im ersten Intron.

In der Literatur wurden Assoziationen des 12-CA-Allels mit höheren IFN- γ -Spiegel als bei Allelen mit 13, 14 oder 15 *CA-Repeats* [106, 221] beschrieben. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass Personen mit 12 *CA-Repeats* ein geringeres Risiko für Atopie und erhöhte IgE-Spiegel besitzen. Andersherum sollten Th1-geprägte Erkrankungen wie z.B. Rheumatoide Arthritis (RA) oder Insulin-abhängiger Diabetes mellitus (IDDM) gehäuft auftreten. Bei Studien zu IDDM wurde das Allel mit 12 *CA-Repeats* mit einer erhöhten IDDM-Prävalenz in Verbindung gebracht [219]. In einer anderen Studie [107] hatten Personen mit zwei 13-*CA-Repeat*-Allelen ein erhöhtes Risiko für Heuschnupfen.

Die Ergebnisse einer japanische Studie [86], eine Assoziation des Allels mit 16 *CA-Repeats* zu einem erniedrigten Risiko und das Allels mit 18 *CA-Repeat* zu einem erhöhten Risiko für Asthma, lassen sich wahrscheinlich nicht auf Personen europäischer Herkunft übertragen. Während in europäischen Studien das Allel mit 12 *CA-Repeats* eines der häufigsten war (41,2-48,0%), hatten nur 9,2% der Japaner dieses Allel.

In der vorliegenden Studie fanden sich keine Hinweise für die Hypothese, dass Personen mit 12 *CA-Repeats* niedrigere IgE-Spiegel haben. Auch die Aussage, Personen mit dem Allel mit 14 *Repeats* würden eine geringere Prävalenz von Atopie aufweisen, konnte nicht belegt werden. Auch konnten Cartwright et al. [222] und Dai et al. [216] die Assoziation zwischen IFNG-*CA-Repeat*-Allelen mit erhöhten IFN- γ -Spiegeln nicht reproduzieren.

Die Ergebnisse der Genotypisierung der IFNG-SNPs T-1615C, T874A und A5171G geben keine Hinweise darauf, dass Varianten im Gen für IFNG mit Atopie-Phänotypen assoziiert sind.

5.9 Untersuchungen an Neugeborenen

Der Hintergrund für die Untersuchung von Neugeborenen war, eine genetische Assoziationsstudie durchzuführen, die unabhängig von Umweltfaktoren war.

Umweltfaktoren, die sonst auf das Individuum einwirken und die auch die Ausprägung von Atopie und die Höhe des IgE-Spiegels beeinflussten, sollten bei der Untersuchung von Neugeborenen weitgehend ausgeschaltet werden. Die Produktion von IgE-Antikörpern, die mit der 11. Gestationswoche beginnt [15], sollte dann idealerweise vorwiegend von genetischen Faktoren abhängen.

Die Höhe des IgE-Spiegels von Neugeborenen zeigt in mehreren Studien eine Korrelation zwischen erhöhten Werten und der späteren Entwicklung atopischer Erkrankungen [18] [19, 20]. Bei 80,2% der Kinder mit erhöhten IgE-Spiegeln ($> 0,9$ kU/l) zeigten sich vor dem sechsten Lebensjahr die Symptome einer Atopie [19].

Der Prozentsatz der Kinder mit erhöhten IgE-Spiegeln war in dieser Studie jedoch zu gering, um Aussagen über Assoziationen des IgE-Spiegels mit den Varianten in den Genen von IL-4 und IFN- γ zu machen. Nur 6% lagen über dem in der Literatur angegebenen Grenzwert für erhöhte IgE-Spiegel.

5.10 Zusammenfassung

Die Genregionen 5q31, 9q31, 12q14 und 16p12 wurden in mehreren genomweiten Kopplungsanalysen als Genorte für allergische Erkrankungen identifiziert. In diesen Regionen liegen unter anderem die in dieser Studie untersuchten Gene IL4, CNS1, IL13, IRF1, TLR4, IFNG und IL4R. Für einige dieser Gene wurden von anderen Autoren Assoziationen zwischen Polymorphismen und Allergie-Phänotypen festgestellt. Die Ergebnisse der publizierten Assoziationsstudien sind jedoch widersprüchlich.

In dieser Studie war keine der untersuchten Genvarianten mit einem intermediären oder distalem Allergie-Phänotyp assoziiert.

Die in der Literatur zuvor beschriebenen Assoziationen konnten alle in mindestens einer weiteren Studie nicht repliziert werden, oder die Autoren kamen zu einem gegensätzlichen Ergebnis. Der wichtigste Grund für widersprüchliche Ergebnisse genetischer Assoziationsstudien ist das zufällige Auftreten falsch-positiver Ergebnisse (Typ I Fehler). Ein weiterer wichtiger Grund ist die *a posteriori* Untersuchung von Subgruppen ohne die notwendige Bonferroni-Korrektur für multiples Testen [232, 233].

Als Ergebnis dieser Untersuchung zeigt sich, dass sich die *common variant/common disease*-Hypothese für die untersuchten Gene nicht bestätigen lässt. Ob die Gegenhypothese *rare mutation/common disease*“ [201] zutrifft, müsste in weiteren, jedoch sehr aufwendigen Studien untersucht werden, die eine Resequenzierung der implizierten Genabschnitte bei den Probanden einschließt.

Abschließend lässt sich feststellen:

1. Es konnten in dieser Studie keine Hinweise dafür gefunden werden, dass die untersuchten Genvarianten mit einem Allergie-Phänotyp assoziiert sind. Die *common variant/common disease*-Hypothese ließ sich nicht bestätigen.
2. Viele Assoziationsstudien zur genetischen Grundlage der Allergie und anderer polygener Erkrankungen sind mit falsch-positiven Ergebnissen (Typ I Fehler) publiziert worden.
3. Künftig sollten genetische Assoziationsstudien nur publiziert werden, wenn die Ergebnisse durch Replikation der Untersuchung an einer unabhängigen Kohorte bestätigt worden sind.

5.11 Summary

The gene regions 5q31, 9q31, 12q14 und 16p12 were identified in many genome wide studies as gene regions in linkage with allergic phenotypes. In these regions the genes for IL4, CNS1, IL13, IRF1, TLR4, IFNG, and IL4R are located which were analysed in this study. Some authors described association between polymorphisms and allergic phenotypes but the results were contradictory to each other.

In this study no association was found between the analysed gene polymorphisms and intermediate or a distant allergic phenotypes.

Previously described associations were not reproduced in at least one further study, or contrasting results were obtained. The most important factor for non-replication are false positive results by chance (type 1 error). Another important reason is that analysis of subgroups are performed *a posteriori* without Bonferroni correction for multiple testing [232, 233].

In conclusion, we did not confirm the *common variant / common disease* hypothesis for the analysed genes. Further studies might prove the *rare mutation / common disease* hypothesis [201]. Prove of this hypothesis will require extensive resequencing of patients and controls.

The final conclusion is:

1. We did not find association of the analysed gene variants and allergic phenotypes. The *common variant / common disease* hypothesis must be rejected.
2. Previously published association studies for the genetic basics of allergic phenotypes were not replicated (type 1 error).
3. Genetic association studies should only be published after validation in an external replication sample.

Standardfragebogen Atopie

Name und Vorname: _____

Geburtsdatum: _____

Bestehen oder bestanden in der Vergangenheit bei Ihnen eine oder mehrere der unten aufgeführten Gesundheitsstörungen ?

1. Heuschnupfen oder Pollenallergie ? ja nein weiß nicht
2. Hausstauballergie ? ja nein weiß nicht
3. Allergisches Asthma bronchiale ? ja nein weiß nicht
4. Allergisches Hautekzem oder Neurodermitis? ja nein weiß nicht
-

5. Ist bei Ihnen in der Vergangenheit ein Allergietest durchgeführt worden ? ja nein weiß nicht

a) Falls der Allergietest positiv ausgefallen ist – gegen welche Substanzen reagieren Sie allergisch ? _____

6. Müssen oder mussten Sie wegen einer der oben aufgeführten allergischen Erkrankungen gelegentlich oder regelmäßig Medikamente einnehmen (z.B. Augentropfen, Nasensprays, Dosieraerosole für die Lunge, Tabletten, Salben) ? ja nein weiß nicht

7. Sind bei Ihren leiblichen Eltern oder bei Ihren leiblichen Geschwistern eine oder mehrere der unter 1–4 aufgeführten allergischen Erkrankungen bekannt ? ja nein weiß nicht

8. Sind Sie Raucher(-in), Exraucher(-in) oder Nichtraucher(-in) ?
 Raucher(-in) Exraucher(-in) Nichtraucher(-in)

Vielen Dank für Ihre Mitarbeit !

Abb. 7, Fragebogen mit Fragen nach Heuschnupfen, Pollenallergie, Hausstauballergie, allergisches Asthma bronchiale, allergisches Hautekzem und Neurodermitis. Der Fragebogen wurde von den Teilnehmern der Studie ausgefüllt zurückgegeben.

**Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie:
Die Häufigkeit und Rolle von Interleukin-4-Rezeptor-Mutationen bei
Blutspendern**

Name:.....

Aufkleber

Ich bin einverstanden, dass mir im Rahmen o.g. Studie 20 ml Blut entnommen werden. Ich habe keine weiteren Fragen mehr und willige hiermit in die o.g. Untersuchung ein.

Giessen, den.....

Unterschrift des Teilnehmers.....

Unterschrift des aufklärenden
Arztes / Doktoranden

.....

Abb. 8, Einverständniserklärung für die Teilnahme an dieser Studie.**Tab. 7**, Primernamen, Primersequenzen und Produktlängen der einzelnen untersuchten Polymorphismen

Polymorphismus	Primer	Sequenz 5' - 3'	Produkt
IL4R			
I50V	Ile50-up	CTG CAG AGC CCA CAC GTG TA	150 bp
	Val50-up	TGC AGA GCC CAC ACG TGT G	149 bp
	50-common-do	CTG GGC TTG AAG GAG CCC TTC	
S411L	Ser411-do	TGA GCA CTC GTA CTT CCC G	248 bp
	Leu411-do	TGA GCA CTC GTA CTT CCC A	248 bp
	411-commom-up	CGA TGT GTG GAG TTG TTT GAG	
S478P	Ser478-up	TTA CCG CAG CTT CAG CAA CT	163 bp
	Pro478-up	TAC CGC AGC TTC AGC AAC C	162 bp
	478-common-do	CCA GGT TTC TGG CTC AGG TT	
Q551R	Gln551-lo	CAC CGC ATG TAC AAA CTC CT	143 bp
	Arg551-lo	CAC CGC ATG TAC AAA CTC CC	143 bp
	551-common-up	AGC TCT CTG AGC CAA CCA C	
G-3223A	2Pro 887 wild	CTT TAT CTG TGA CTG CTC CG	150 bp
	2Pro 887 mut	ACT TTA TCT GTG ACT GCT CCA	151 bp
	3Pro 887 com	AGG GAT GTA TGG GAA CTC TC	

Tab. 7 (Fortsetzung), Primernamen, Primersequenzen und Produktlängen der einzelnen untersuchten Polymorphismen

Polymorphismus	Primer	Sequenz 5'-3'	Produkt
IFNG			
T874A	IFN 874-T	TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCT	262 bp
	IFN 874-A	TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCA	262 bp
	IFN 874-com	TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA	
T-1615C	3IFNG 5wild	ATC TAG CTA TAT GAT TGT GAG TTA G	200 bp
	3IFNG 5mut	ATC TAG CTA TAT GAT TGT GAG TTA A	200 bp
	3IFNG 5com	AAT GTG CAA AAA TAA TAA TAA AC	
A5171G	IFNG 3a	CCT TCC TAT TTC CTC CTT CA	284 bp
	IFNG 3g	CCT TCC TAT TTC CTC CTT CG	284 bp
	IFNG 3com	AGG CAT GTA GTA GGT ACT CCA	
CNS-1			
	CNS-wild	GGG GAA ATG GTG TCC AGC	192 bp
	CNS-mut	GGG GAA ATG GTG TCC AGG	192 bp
	CNS-com	CCT TTT CTT GGG GAA AGT GA	
TLR4			
TLR4 299	2TLR4 299 wild	CTT AGA CTA CTA CCT CGA TGA	191 bp
	2TLR4 299 mut	CTT AGA CTA CTA CCT CGA TGG	191 bp
	TLR4 com	GCC TTT TGA GAG ATT TGA GT	
TLR4 399	2TLR4 399 wild	TCA AAG TGA TTT TGG GAC AAC	204 bp
	2TLR4 399 mut	TCA AAG TGA TTT TGG GAC AAT	204 bp
	TLR4 399 com	CTG GTG TGA GTA TGA GAA ATG	
IL-4			
IL-4C-590T	C-590T wild	AAA CTT GGG AGA ACA TTG TC	211 bp
	C-590T mutiert	AAA CTT GGG AGA ACA TTG TT	211 bp
	C-590T com	TTG TAA TGC AGT CCT CCT GG	
IL-13			
IL-13C-1112T	C-1112T wild	TGG AGG ACT TCT AGG AAA AC	194 bp
	C-1112T wild	TGG AGG ACT TCT AGG AAA AT	194 bp
	C-1112T wild	TAA GTG TTC CTA GTG CCA CTG G	
interne Kontrolle			
CRP	CRP 1	CCA GCC TCT CTC ATG CTT TTG GCC AGA CAG	440 bp
	CRP 2	GGG TCG AGG ACA GTT CCG TGT AGA AGT GGA	

Tab. 9, PCR-Protokolle der verschiedenen Polymorphismen

IL4R-Polymorphismen I50V, S411L, S478P, Q551R, G-3223A			
	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	10 min	
1. Lauf	95°C	30sec	10 x
	65°C	1 min	
2. Lauf	95°C	30 sec	23 x
	61°C	50 sec	
	72°C	40 sec	
Stop	4°C	8	
IFNG-Polymorphismus T-1615C			
	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	10 min	
1. Lauf	95°C	20 sec	10 x
	60°C	40 sec	
	72°C	30 sec	
2.Lauf	95°C	20 sec	22 x
	57°C	40 sec	
	72°C	30 sec	
Stop	4°C	8	
IFNG-Polymorphismus T874A			
	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	10 min	
1. Lauf	95°C	20 sec	10 x
	60°C	50 sec	
	72°C	40 sec	
2.Lauf	95°C	20 sec	23 x
	56°C	50 sec	
	72°C	50 sec	
Stop	4°C	8	
IFNG-Polymorphismus A5171G			
	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	10 min	
1. Lauf	95°C	20 sec	10 x
	61°C	40 sec	
	72°C	30 sec	
2.Lauf	95°C	20 sec	22 x
	58°C	40 sec	
	72°C	30 sec	
Stop	4°C	8	

Tab. 9 (Fortsetzung), PCR-Protokolle der verschiedenen Polymorphismen

Polymorphismus CNS-1			
	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	10 min	
1. Lauf	95°C	30 sec	10 x
	63°C	1 min	
2. Lauf	95°C	30 sec	23 x
	59°C	50 sec	
	72°C	40 sec	
Stop	4°C	8	
Polymorphismus IL-4			
	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	10 min	
1. Lauf	95°C	20 sec	10 x
	60°C	50 sec	
	72°C	40 sec	
2.Lauf	95°C	20 sec	23 x
	58°C	40 sec	
	72°C	40 sec	
Stop	4°C	8	
Polymorphismus IL-13			
	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	10 min	
1. Lauf	95°C	20 sec	10 x
	60°C	50 sec	
	72°C	40 sec	
2.Lauf	95°C	20 sec	23 x
	58°C	50 sec	
	72°C	40 sec	
Stop	4°C	8	
Polymorphismus TLR4 299, TLR4 399			
	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	10 min	
1. Lauf	95°C	20 sec	10 x
	61°C	50 sec	
	72°C	40 sec	
2.Lauf	95°C	20 sec	23 x
	57°C	50 sec	
	72°C	40 sec	
Stop	4°C	8	

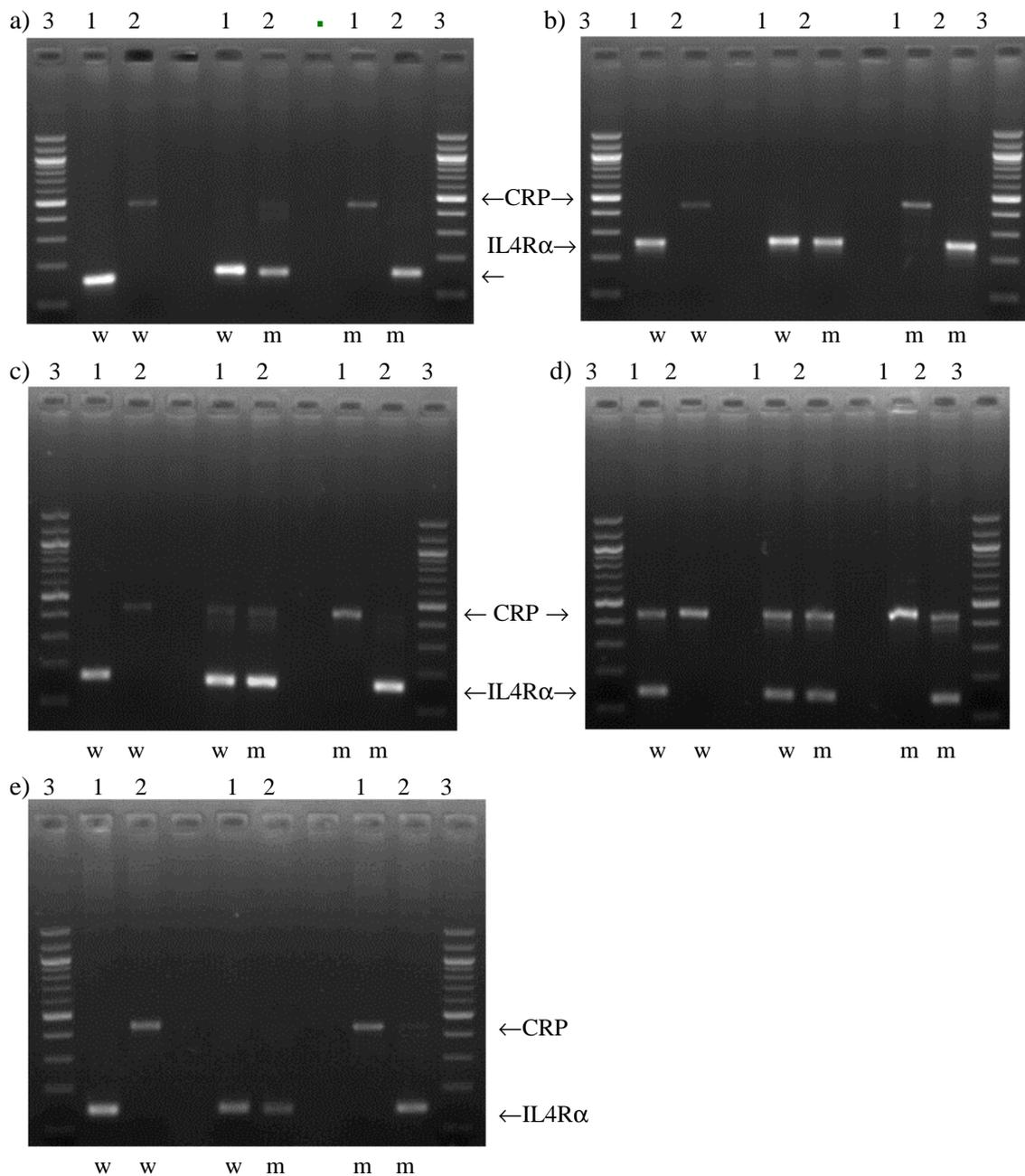


Abb. 10, Ergebnisse der SSP-PCR für alle möglichen Genotypen der IL-4R α -Polymorphismen I50V, S411L, S478P, Q551R und C-3223T. In der mit 1 bezeichneten Bahn ist jeweils das Ergebnis für das Primerpaar des Wild-Typ-Allels, in Bahn 2 das für das Primerpaar des mutierten Allels gezeigt. In Bahn 3 befindet sich eine 100bp Leiter. ww bedeutet Homozygotie für das Wild-Typ-Allel, wm Heterozygotie und mm Homozygotie für das mutierte Allel. a) I50V, b) S411L, c) S478P, d) Q551R und e) C-3223T

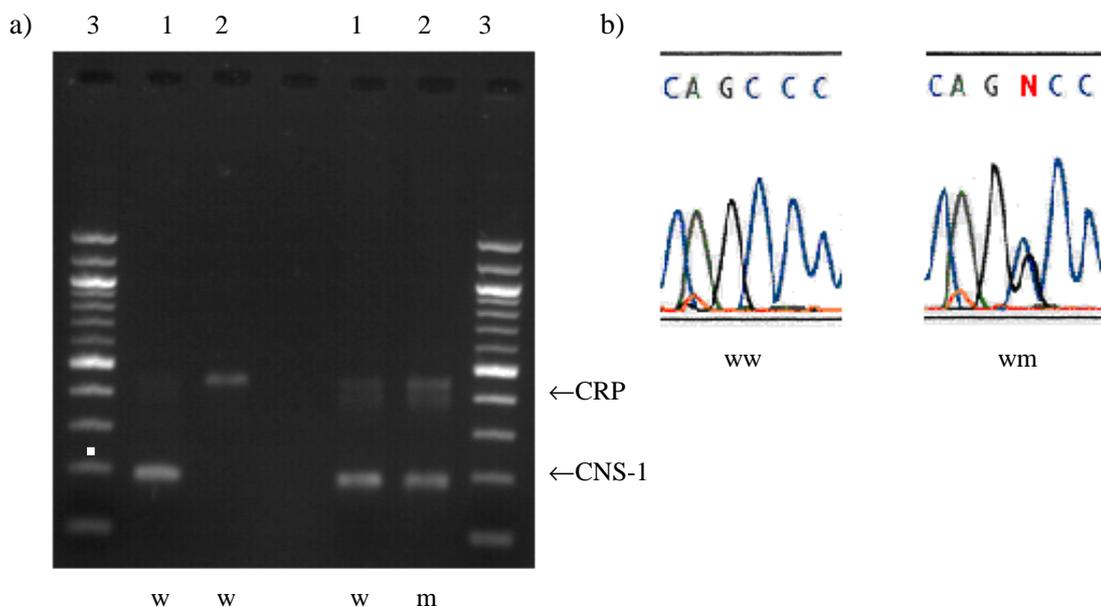


Abb. 11, CNS-1 a) Ergebnis der Typisierung mit SSP-PCR. In der mit 1 bezeichneten Bahn ist jeweils das Ergebnis für das Primerpaar des Wild-Typ-Allels, in Bahn 2 das für das Primerpaar des mutierten Allels gezeigt. In Bahn 3 befindet sich eine 100bp Leiter. ww bedeutet Homozygotie für das Wild-Typ-Allel, wm Heterozygotie. b) Ergebnis der Sequenzierung

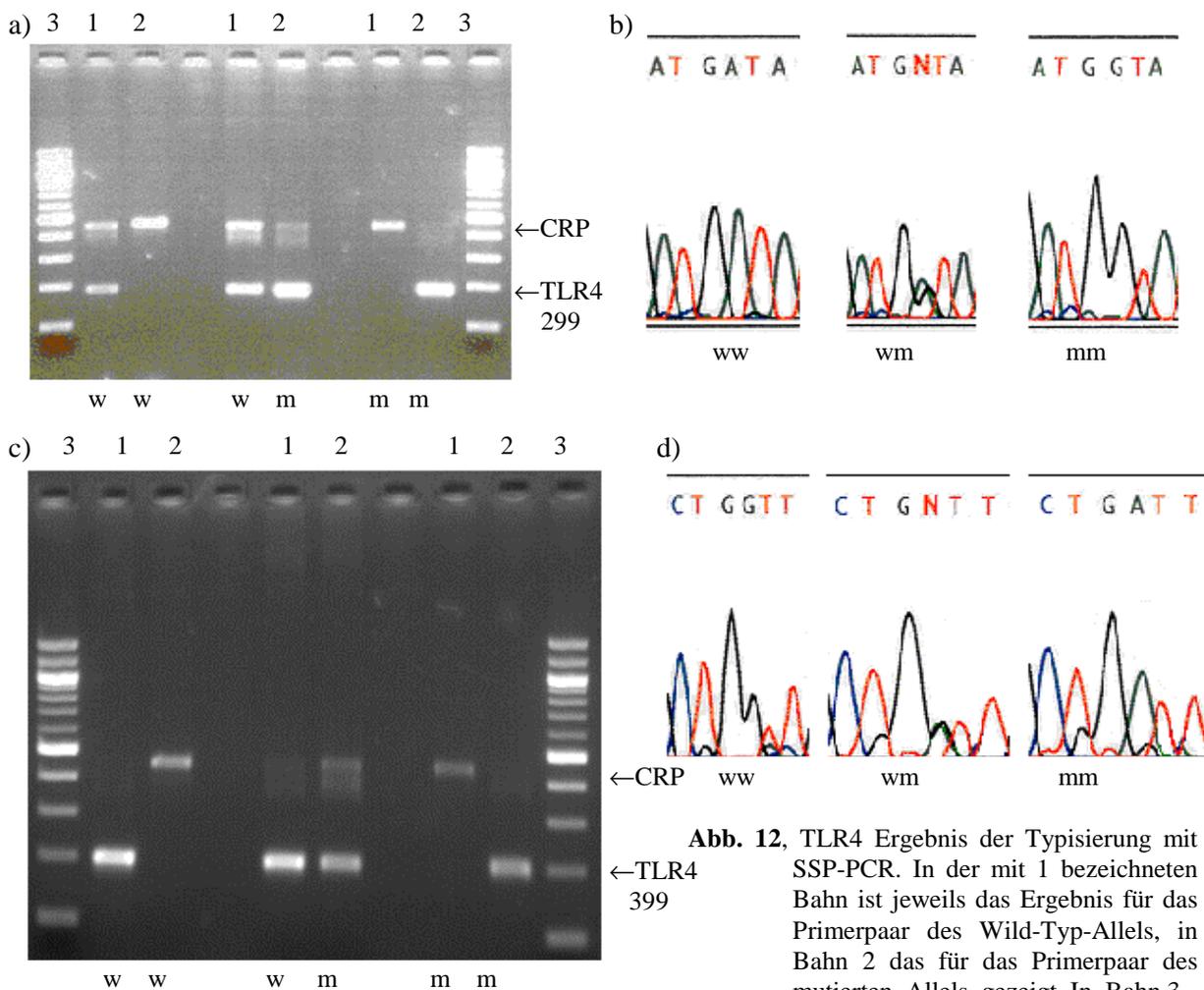
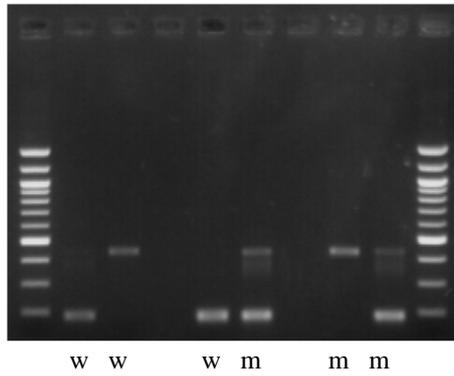


Abb. 12, TLR4 Ergebnis der Typisierung mit SSP-PCR. In der mit 1 bezeichneten Bahn ist jeweils das Ergebnis für das Primerpaar des Wild-Typ-Allels, in Bahn 2 das für das Primerpaar des mutierten Allels gezeigt. In Bahn 3 befindet sich eine 100bp Leiter. ww bedeutet Homozygotie für das Wild-Typ-Allel, wm Heterozygotie, mm Homozygotie für das mutierte Allel. a) TLR4299 SSP-PCR, b) TLR4299 Sequenzierung, c) TLR4399 SSP-PCR, d) TLR4399 Sequenzierung

Tab. 39, Allel- und Genotypfrequenzen von Blutspendern, Neugeborenen und Text 1 [106], Text 2 [107] und Text 3 [86]

Allele	Blutspender (n = 307) %	Neugeborene (n = 100) %	Text 1 [106] (n = 164) %	Text 2 [107] (n = 111) %	Text 3 [86] (n = 218) %
11	0,0	0,5	0	0,0	0,0
12	41,2	46,5	48	41,4	9,2
13	49,4	42,5	43	45,9	57,6
14	5,9	5,5	4	7,2	1,1
15	3,6	4,5	5	4,5	26,6
16	0,0	0,0		0,0	4,8
17	0,0	0,0	0	0,0	0,0
18	0,0	0,5	0	0,0	0,7
Allelkombi- nationen					
11/12	0,0	0,0	0,1	0,0	-
11/13	0,0	1,0	0,0	0,0	-
12/12	16,0	20,0	20,3	18,0	-
12/13	43,0	45,0	47,8	36,9	-
12/14	4,2	5,0	4,2	7,2	-
12/15	3,2	3,0	2,7	2,7	-
13/13	23,1	16,0	15,4	21,6	-
13/14	6,2	2,0	5,0	7,2	-
13/15	3,3	4,0	3,5	6,3	-
13/18	0,0	1,0	0,0	0,0	-
14/14	0,3	1,0	0,4	0,0	-
14/15	0,7	2,0	0,2	0,0	-
15/15	0,0	0,0	0,4	0,0	-

a) 3 1 2 1 2 1 2 3

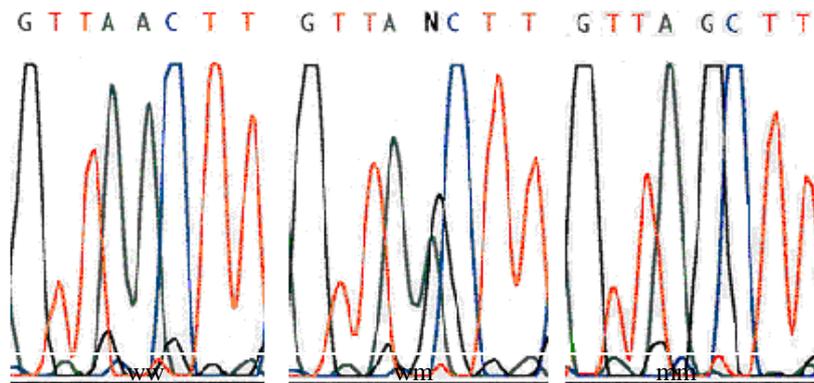


←CRP
← T-1615C

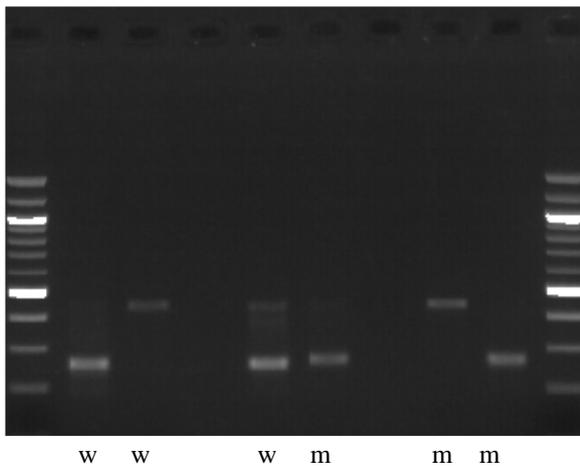
w w w m m m

Abb. 14, Ergebnisse der Typisierung der IFNG-SNPs T-1615C, T874A und A5171G. In der mit 1 bezeichneten Bahn ist jeweils das Ergebnis für das Primerpaar des Wild-Typ-Allels, in Bahn 2 das für das Primerpaar des mutierten Allels gezeigt. In Bahn 3 befindet sich eine 100bp Leiter. ww bedeutet Homozytogie für das Wild-Typ-Allel, wm Heterozytogie und mm Homozytogie für das mutierten Allel.
a) SSP-PCR T-1615C, b) Sequenzierung T-1615C, c) SSP-PCR T874A, d) Sequenzierung T874A, e) SSP-PCR A5171G, f) Sequenzierung A5171G

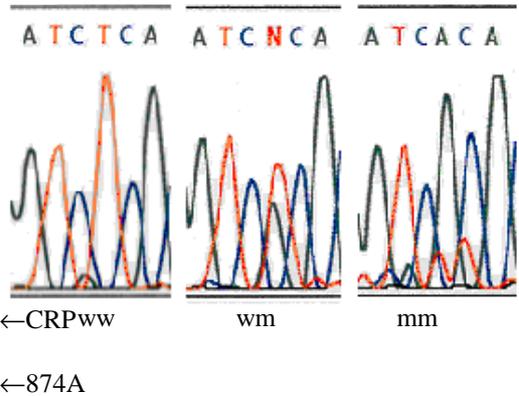
b)



c)



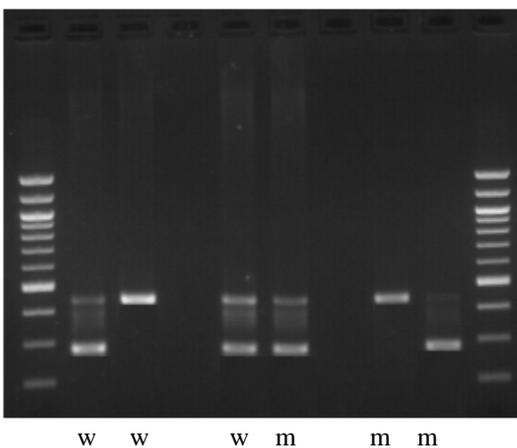
d)



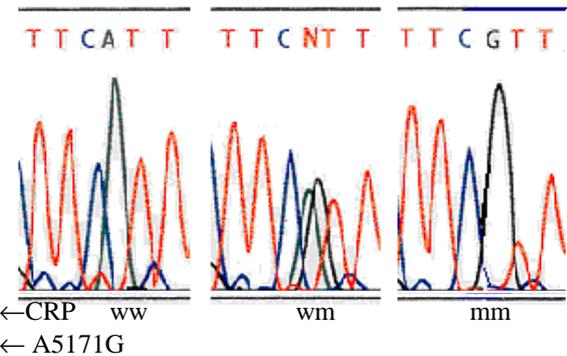
←CRPww
←874A

w w w m m m

e)



f)



←CRP ww
← A5171G

w w w m m m

Literatur

- [1] Oettgen HC.
Regulation of the IgE isotype switch: new insights on cytokine signals and the functions of ϵ germline transcripts. *Current Opinion in Immunology* (2000) 12: 618-623
- [2] Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Teil 4 Epidemiologie (2) [Spezialbericht Allergien, 2000], www.gbe-bund.de
- [3] Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Kapitel 5.17 Asthma [Gesundheitsbericht für Deutschland 1998], www.gbe-bund.de
- [4] Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch. (1998) 258. Auflage, Walter de Gruyter Verlag
- [5] Heppt W, Bachert C. Praktische Allergologie, Schwerpunkt HNO-Heilkunde. (1998) Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York
- [6] Heppt W, Renz H, Röcken M. Allergologie. (1998) Springer-Verlag
- [7] Poulsen LK.
Differential IgE regulation in atopic dermatitis and inhalant allergy. *ACI International* (1998) 10: 12-15
- [8] Mackay IR, Rosen FS.
Allergy and allergic diseases. *New England Journal of Medicine* (2001) 344: 30-37
- [9] von Mutius E, Martinez FD, Fritsch C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH.
Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (1994) 149: 358-364
- [10] Krämer U, Heinrich J, Wjst M, Wichmann HE.
Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *The Lancet* (1999) 353: 450-454
- [11] Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von Mutius E, ALEX (Allergy and Endotoxin) Study Team.
Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *The Lancet* (2001) 358: 1129-1133
- [12] Zirngibl A, Franke K, Gehring U, von Berg A, Berdel D, Bauer CP, Reinhardt D, Wichmann HE, Heinrich J.
Exposure to pets and atopic dermatitis during the first two years of life. A cohort study. *Pediatric Allergy and Immunology* (2002) 13: 394-401
- [13] Remes ST, Iivanainen K, Koskela H, Pekkanen J.
Which factors explain the lower prevalence of atopy amongst farmers' children? *Clinical and Experimental Allergy* (2003) 33: 427-434
- [14] von Linstow ML, Porsbjerg C, Ulrik CS, Nepper-Christensen S, Backer V.
Prevalence and predictors of atopy among young Danish adults. *Clinical and Experimental Allergy* (2002) 32: 520-525
- [15] Grass T, Günther S, Büttner-Götz P, Knöller I, König W, Wahn U.
Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit von Nabelschnur-IgE-Bestimmungen bei Atopie-Screening von Neugeborenen. *Allergologie* (1992) 8: 268-274
- [16] Kjellman NIM, Johansson SGO, Roth A.
Serum IgE levels in healthy children quantified by sandwich technique (PRIST). *Clinical Allergy* (1976) 6: 51-59
- [17] Marsh DG, Meyers DA, Bias WB.
The epidemiology and genetics of atopic allergy. *New England Journal of Medicine* (1981) 305: 1551-1559
- [18] Croner S, Kjellman NIM, Eriksson B, Roth A.
IgE screening in 1701 newborn infants and the development of atopic disease during infancy. *Archives of Disease in Childhood* (1982) 57: 364-368
- [19] Kjellman NIM, Croner S.
Cord blood IgE determination for allergy prediction - a follow-up to seven years of age in 1,651 children. *Annals of Allergy* (1984) 53: 167-171
- [20] Magnusson CGM.
Cord serum IgE in relation to family history and as predictor of atopic disease in early infancy. *Allergy* (1988) 43: 241-251
- [21] Platts-Mills TAE.
The role of Immunoglobulin E in allergy and asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2001) 164: 1-5

- [22] Yokota A, Kikutani H, Tnanka T, Sato R, Barsumian EL, Suemura M, Kishimoto T.
Two species of human Fc epsilon receptor II (Fc epsilon RII/CD23): tissue-specific and IL-4-specific regulation of gene expression. *Cell* (1988) 55: 611-618
- [23] Kleinau S, Martinsson P, Gustavsson S, Heyman B.
Importance of CD23 for collagen induced arthritis: delayed onset and reduced severity in CD23-deficient mice. *Journal of Immunology* (1999) 162: 4266-4270
- [24] Rouzer CA, Scott WA, Hamill AL, Cohn ZA.
Secretion of leukotriene C and other arachidonic acid metabolites by macrophages challenged with immunoglobulin E immune complexes. *Journal of Experimental Medicine* (1982) 156: 1077-1086
- [25] Borish L, Mascali JJ, Rosenwasser LJ.
IgE-dependent cytokine production by human peripheral blood mononuclear phagocytes. *Journal of Immunology* (1991) 146: 63-67
- [26] Joseph M, Tonnel AB, Torpier G, Capron A, Arnoux B, Benveniste.
Involvement of IgE in the secretory process of alveolar macrophages from asthmatic patients. *Journal of Clinical Investigation* (1983) 65: 416-426
- [27] Burrows B, Matrinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG.
Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *New England Journal of Medicine* (1989) 320: 271-277
- [28] Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TAE, Cogswell JJ.
Exposure to house-dust mite allergen (*Der p I*) and the development of asthma in childhood. *New England Journal of Medicine* (1990) 323: 502-507
- [29] Sears MR, Burrows B, Flannery EM, Herbison GP, Hewitt CJ, Holdaway MD.
Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *New England Journal of Medicine* (1991) 325: 1067-1071
- [30] Sporik R, Ingram JM, Price W, Sussman JH, Honsinger RW, Platts-Mills TAE.
Association of asthma with serum IgE and skin test reactivity to allergens among children living at high altitude. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (1995) 151: 1388-1392
- [31] Sunyer J, Anto JM, Sabria J, Roca J, Morell F, Rodriguez-Rosin R, Rodrigo MJ.
Relationship between serum IgE and airway responsiveness in adults with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (1995) 95: 699-706
- [32] Barbee R, Halonen M, Lebowitz M, Burrows B.
Distribution of IgE in a community population sample: correlation with age, sex, and allergen skin test reactivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (1981) 68: 106-111
- [33] Orgel HA, Lenoir MA, Bazaral M.
Serum IgG, IgA, IgM and IgE levels and allergy in Filipino children in the United States. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (1974) 53: 213-222
- [34] Hartung AD, Bohnert A, Hackstein H, Ohly A, Schmidt KL, Bein G.
Th2-mediated atopic disease protection in Th1-mediated rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* (2003) 21: 481-484
- [35] Janeway CA, Travers P. (1997). Immunologie. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag
- [36] Bleeker ER.
Mapping susceptibility genes for asthma and allergy. *Clinical and Experimental Allergy* (1998) 28 (S5): 6-12
- [37] Sandford AJ, Pare PD.
The Genetics of Asthma. The Important Questions. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2000) 161: 202-206
- [38] Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Sato H, Sato H, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T.
Functional SNPs in the lymphotoxin- α gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nature Genetics* (2002) 32: 650-654
- [39] Ghayor C, Herrouin JF, Chadjichristos C, Ala-Kokko L, Takigawa M, Pujol JP, Galera P.
Regulation of human COL2A1 gene expression in chondrocytes. Identification of C-Krox-responsive elements and modulation by phenotype alteration. *Journal of Biological Chemistry* (2000) 275: 27421-27438
- [40] Derrigo M, Cestelli A, Savettieri G, DiLiegro I.
RNA-protein interactions in the control of stability and localization of messenger RNA (Review). *International Journal of Molecular Medicine* (2000) 5: 111-123
- [41] Gebhardt F, Zaenker KS, Brandt B.
Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *Journal of Biological Chemistry* (1999) 274: 13176-13180

- [42] Gabellini N.
A polymorphic GT repeat from the human cardiac Na⁺Ca²⁺ exchanger intron 2 activates splicing. *European Journal of Biochemistry* (2001) 268: 1076-1083
- [43] Böddeker I, Ziegler A.
Assoziations- und Kopplungsstudien zur Analyse von Kandidatengenen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* (2000) 125: 810-815
- [44] Dizier MH, Besse-Schmittler C, Guilloud-Bataille M, Annesi-Maesano I, Boussaha M, Bousquet J, Charpin D, Degioanni A, Gormand F, Grimfeld A, Hochez J, Hyne G, Lockart A, Luillier-Lacombe M, Matran R, Meunier F, Neukirch F, Pacheco Y, Parent V, Paty E, Pin I, Pison C, Lathrop M, Demains F.
Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEA Study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2000) 162: 1812-1818
- [45] The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA).
A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. *Nature Genetics* (1997) 15: 389-392
- [46] Daniels SE, Bhattacharrya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, Faux JA, Ryan GF, leSouef PN, Lathrop GM, Musk AW, Cookson WO.
A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* (1996) 383: 247-250
- [47] Ober C, Cox NJ, Abney M, Di Rienzo A, Lander ES, Changyaleket B, Gidley H, Kurtz B, Lee J, Nance M, Petterson A, Prescott J, Richardson A, Schlenker E, Summerhill E, Willadsen S, Perry R and the Collaborative Study of Genetics of Asthma.
Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. *Human Molecular Genetics* (1998) 7: 1393-1398
- [48] Wjst M, Fischer G, Immervoll T, Jung M, Saar K, Rueschendorf F, Reis A, Ulbrecht M, Gomolka M, Weiss EH, Jaeger L, Nickel R, Richter K, Kjellman NIM, Griese M, von Berg A, Gappa M, Riedel F, Boehle M, van Konigsbruggen S, Schoberth P, Szczepanski R, Dorsch W, Silbermann M, Loesgen S, Scholz M, Bickeböller H, Wichmann HE.
A genome-wide search for linkage to asthma. *Genomics* (1999) 58: 1-8
- [49] Ober C, Tsalenko A, Parry R, Cox NJ.
A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *American Journal of Human Genetics* (2000) 67: 1154-1162
- [50] Mathias RA, Freidhoff LR, Blumenthal MN, Meyers DA, Lester L, King R, Xu JF, Solway J, Barnes KC, Pierce J, Stine OC, Toggias A, Oetting W, Marshik PL, Hetmanski JB, Huang SK, Ehrlich E, Dunston GM, Malveaux F, Banks-Schlegel S, Cox NJ, Bleeker E, Ober C, Beaty TH, Rich SS, and the CSGA.
Genome-wide linkage analyses of total serum IgE using variance components analysis in asthmatic families. *Genetic Epidemiology* (2001) 20: 340-355
- [51] Xu J, Meyers A, Ober C, Blumenthal MN, Mellen B, Barnes KC, King RA, Lester LA, Howard TD, Solway J, Langefeld CD, Beaty TH, Rich SS, Bleeker ER, Cox NJ, and the Collaborative Study on the Genetics of Asthma.
Genomewide screen and identification of gene-gene interactions for asthma-susceptibility loci in three US populations: Collaborative Study on the Genetics of Asthma. *American Journal of Human Genetics* (2001) 68: 1437-1446
- [52] Colilla S, Nicolae D, Pluzhnikov A, Blumenthal MN, Beaty TH, Bleeker ER, Lange EM, Rich SS, Meyer DA, Ober C, Cox NJ, Collaborative Study on the Genetics of Asthma.
Evidence for gene-environment interactions in a linkage study of asthma and smoking exposure. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2003) 111: 840-846
- [53] Blumenthal MN, Langefeld CD, Beaty TH, Bleeker ER, Ober C, Lester L, Lange E, Barnes KC, Wolf R, King RA, Solway J, Oetting W, Meyers DA, Rich SS.
A genome-wide search for allergic response (atopy) genes in three ethnic groups: Collaborative Study on the Genetics of Asthma. *Human Genetics* (2004) 114: 157-164
- [54] Blumenthal MN, Ober C, Beaty TH, Bleeker ER, Langefeld CD, King RA, Lester L, Cox N, Barnes K, Toggias A, Mathias R, Meyers DA, Oetting W, Rich SS, Collaborative Study on the Genetics of Asthma.
Genome scan for loci linked to mit sensitivity: Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *Genes and Immunity* (2004) 5: 226-231
- [55] Ober C, Tsalenko A, Willadsen S, Newman D, Daniel R, Wu X, Andal J, Hoki D, Schneider G, True K, Schou C, Parry R, Cox N.
Genome-wide screen for atopy susceptibility alleles in the Hutteries. *Clinical and Experimental Allergy* (1999) 29: 11-15

- [56] Dizier MH, Quesneville H, Besse-Schmittler C, Guilloud-Bataille M, Selinger-Leneman H, Clerget-Darpoux F, Demenais F.
Indication of linkage and genetic heterogeneity for asthma and atopy on chromosome 8p and 12q in 107 French EGEA families. *European Journal of Human Genetics* (2003) 11: 590-596
- [57] Laitinen T, Daly MJ, Rioux JD, Kauppi P, Petays T, Green T, Cargill M, Haahtela T, Lander ES, Laitinen LA, Hudson TJ, Kere J.
A susceptibility locus for asthma-related traits on chromosome 7 revealed by genome-wide scan in a founder population. *Nature Genetics* (2001) 28: 87-91
- [58] Hakonarson H, Bjornsdottir US, Halapi E, Palsson S, Adalsteinsdottir E, Gislason D, Finnbogason G, Gislason T, Kristjansson K, Arnson T, Birkisson I, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K.
A major susceptibility gene for asthma maps to chromosome 14q24. *American Journal of Human Genetics* (2002) 71: 483-491
- [59] Haagerup A, Bjerke T, Schiøtz PO, Binderup HG, Dahl R, Kruse TA.
Asthma and atopy - a total genome scan for susceptibility genes. *Allergy* (2002) 57: 680-686
- [60] Koppelman GH, Stine OC, Xu J, Howard TD, Zheng SL, Kauffman HF, Bleecker ER, Meyers DA, Postma DS.
Genome-wide search for atopy susceptibility genes in Dutch families with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2002) 109: 498-506
- [61] Yokouchi Y, Nukaga Y, Shibasaki M, Noguchi E, Kimura K, Ito S, Nishihara M, Yamakawa-Kobayashi T, Takeda K, Imoto N, Ichikawa K, Matsui A, Hamaguchi H, Arinami T.
Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31-q33 near the interleukin 12 B locus by genome-wide search in Japanese families. *Genomics* (2000) 66: 152-160
- [62] Yokouchi Y, Shibasaki M, Noguchi E, Nakayama J, Ohtsuki T, Kamioka M, Yamakawa-Kobayashi K, Ito S, Takeda K, Ichikawa K, Nukaga Y, Matsui A, Hamaguchi H, Arinami T.
A genome-wide linkage analysis of orchard grass-sensitive childhood seasonal allergic rhinitis in Japanese families. *Genes and Immunity* (2002) 3: 9-13
- [63] Xu X, Fang Z, Wang B, Chen C, Guang W, Jin Y, Yang J, Lewitzky S, Aelony A, Parker A, Meyer J, Weiss ST, Xu X.
A genome wide search for quantitative-trait loci underlying asthma. *American Journal of Human Genetics* (2001) 69: 1271-1277
- [64] Zhang Y, Lefoert J, Kearsey V, Lapa e Silva JR, Cookson WO, Vargaftig BB.
A genome-wide screen for asthma-associated quantitative trait loci in a mouse model of allergic asthma. *Human Molecular Genetics* (1999) 8: 601-605
- [65] Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH.
Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum Immunoglobulin E concentrations. *Science* (1994) 264: 1152-1156
- [66] Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Maki T, Miamoto T, Kawashima T, Kobayashi K, Hamaguchi H.
Evidence for linkage between asthma/atopy in childhood and chromosome 5q31-q33 in a Japanese population. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (1997) 156: 1390-1393
- [67] Barnes K, Freidhoff LR, Nickel R, Chiu YF, Juo SH, Hizawa N, Naidu RP, Ehrlich E, Duffy DL, Schou C, Levett PN, Marsh DG, Beaty TH.
Dense mapping of chromosome 12q13.12-q23.3 and linkage to asthma and atopy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (1999) 104: 485-491
- [68] Deichmann KA, Heinzmann A, Forster J, Dischinger S, Mehl C, Brueggenolte E, Hildebrandt F, Moseler M, Kuehr J.
Linkage and allelic association of atopy and markers flanking the IL4-receptor gene. *Clinical and Experimental Allergy* (1998) 28: 151-155
- [69] Barnes KC.
Atopy and asthma genes -where do we stand? *Allergy* (2000) 55: 803-817
- [70] Wills-Karp M, Ewart SL.
Time to draw breath: asthma-susceptibility genes are identified. *Nature Reviews* (2004) 5: 376-387
- [71] Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK.
Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clinical and Experimental Allergy* (1995) 25: 74-78
- [72] Walley AJ, Cookson WO.
Investigation of an Interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy. *J Med Genet* (1996) 33: 689-692

- [73] Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T.
Association of asthma and the Interleukin-4 promoter gene in Japanese. *Clinical and Experimental Allergy* (1998) 28: 449-453
- [74] Burchard EG, Silverman EK, Rosenwasser LJ.
Association between a sequence variant in the IL-4 gene promoter and FEV1 in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (1999) 160: 919-922
- [75] Kawashima T, Noguchi E, Arinami T.
Linkage and association of an Interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. *J Med Genet* (1998) 35: 502-504
- [76] He JQ, Chan-Yeung M, Becker AB, Dimich-Ward H, Ferguson AC, Manfreda J, Watson WT, Sandford AJ.
Genetic variants of the IL13 and IL4 genes and atopic diseases in at-risk children. *Genes and Immunity* (2003) 4: 385-389
- [77] Dizier MH, Sandford A, Waaley A, Philippi A, Cookson W, Demenais F.
Indication of linkage of serum IgE levels to the interleukin-4 gene and exclusion of the contribution of the (-590 C to T) interleukin-4 promoter polymorphism to IgE variation. *Genetic Epidemiology* (1999) 16: 84-94
- [78] Hakonarson H, Bjornsdottir US, Ostermann E, Arnason T, Adalsteinsdottir AE, Halapi E, Shkolny D, Kristjansson K, Gudnadottir SA, Frigge ML, Gislason D, Gislason T, Kong A, Gulcher J, Stefansson K.
Allelic frequencies and pattern of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for asthma and atopy in Iceland. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2001) 164: 2036-2044
- [79] Liu X, Beaty TH, Deindl P, Huang SK, Lau S, Sommerfeld C, Fallin MD, Kao WHL, Wahn U, Nickel R.
Associations between total serum IgE levels and the 6 potentially functional variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: The German Multicenter Atopy Study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2003) 112: 382-388
- [80] Van der Pouw Kraan TCTM, van Veen A, Boeije LCM, van Tuyl SAP, de Groot ER, Stapel SO, Bakker A, Verweij CL, Aarden LA, van der Zee JS.
An IL13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma. *Genes and Immunity* (1999) 1: 61-65
- [81] Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, Umeshita R, Abe Y, Braun S, Yamashita T, Roberts MH, Sugimoto R, Arima K, Arinobu Y, Yu B, Kruse S, Enomoto T, Dake Y, Kawai M, Shimazu S, Sasaki S, Adra CN, Kitaichi M, Inoue H, Yamauchi K, Tomichi N, Kurimoto F, Hamasaki N, Hopkin JM, Izuhara K, Shirakawa T, Deichmann KA.
Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Human Molecular Genetics* (2000) 9: 549-59
- [82] Graves PE, Kabesch M, Halonen M, Holberg CJ, Baldini M, Fritsch C, Weiland SK, Erickson RP, von Mutius E, Martinez FD.
A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2000) 105: 506-513
- [83] Wang M, Xing ZM, Lu C, Ma YX, Yu DL, Yan Z, Wang SW, Yu LS.
A common IL-13 Arg130Gln single nucleotide polymorphism among Chinese atopy patients with allergic rhinitis. *Human Genetics* (2003) 113: 387-390
- [84] Howard TD, Whittaker PA, Zaiman AL, Koppelman GH, Xu J, Hanley MT, Meyers DA, Postma DS, Bleeker ER.
Identification and association of polymorphisms in the Interleukin-13 gene with asthma and atopy in a Dutch population. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (2001) 25: 377-84
- [85] Howard TD, Koppelman GH, Xu J, Zheng SL, Postma DS, Meyers DA, Bleeker ER.
Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma. *American Journal of Human Genetics* (2002) 70: 230-6
- [86] Nakao F, Ihara K, Kusuhara K, Sasaki Y, Kinukawa N, Takabayashi A, Nishima S, Hara T.
Association of IFN- γ and IFN regulatory factor 1 polymorphisms with childhood atopic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2001) 107: 499-504
- [87] Dubin WMT, Sloveland P, Leturcq DJ.
Asthma and endotoxin: lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 in bronchoalveolar compartment. *American Journal of Physiology* (1996) 270: 736-744

- [88] Baldini M, Lohman C, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD.
A polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum Immunglobulin E. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (1999) 20: 976-983
- [89] Gao PS, Moa XQ, Baldini M, Roberts MH, Adra CN, Shirakawa T, Holt PG, Martinez FD, Hopkin JM.
Serum total IgE levels and the CD14 on chromosome 5q31. *Clinical Genetics* (1999) 56: 164-165
- [90] Koppelman GH, Reijmerink NE, Stine OC, Howard TD, Whittaker PA, Meyers DA, Postma DS, Bleecker ER.
Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2001) 163: 965-969
- [91] Caraballo LR, Hernandez M.
HLA haplotype segregation in families with allergic asthma. *Tissue Antigens* (1990) 35: 182-186
- [92] Hizawa N, Freidhoff LR, Chiu YF.
Genetic regulation of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p)-specific IgE responsiveness: a genome-wide multipoint linkage analysis in families recruited through two asthmatic sibs. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (1998) 102: 436-442
- [93] Hizawa N, Collins G, Rafnar T.
Linkage analysis of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p)-specific IgE responsiveness with polymorphic markers on chromosome 6p21 (HLA-D region) in Caucasian families by transmission/disequilibrium test (TDT). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (1998) 102: 442-448
- [94] Shirakawa T, Li A, Dubowitz M, Dekker JW, Shaw AE, Faux JA, Ra C, Cookson WO, Hopkin JM.
Association between atopy and variants of the beta subunit of high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nature Genetics* (1994) 7: 125-129
- [96] Hill MR, James AL, Faux JA, Ryan G, Hopkin JM, le Souef P, Musk AW, Cookson WO.
Fc(epsilon)RI-(beta) polymorphism and risk of atopy in a general population sample. *British Medical Journal* (1995) 311: 776-779
- [96] Hill MR, Cookson WO.
A new variant of the beta subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI-beta E237G): associations with measures of atopy and bronchial hyper-responsiveness. *Human Molecular Genetics* (1996) 5: 959-962
- [97] Green SL, Gaillard MC, Song E, Dewar JB, Halkas A.
Polymorphisms of the beta chain of high-affinity immunoglobulin E receptor (Fc epsilon RI-beta) in South African black and white asthmatic and nonasthmatic individuals. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (1998) 158: 1487-1492
- [98] Li A, Mackay GA, Hopkin JM.
Functional analysis of histamine release from basophils and mast cells in subjects with the Ile-181 → Leu variant of Fc epsilon RI-beta. *Clinical Science* (1997) 93: 279-286
- [99] Rohrbach M, Kraemer R, Liechi-Galletti S.
Screening of the Fc epsilon RI-beta-gene in a Swiss population of asthmatic children: no association with E237G and identification of new sequence variations. *Disease Markers* (1998) 14: 177-186
- [100] Deichmann KA, Starke B, Schlenker S, Heinzmann A, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J.
Linkage and association studies of atopy and the chromosome 11q13 region. *J Med Genet* (1999) 36: 379-382
- [101] Dickson PW, Wong ZY, Harrap SB, Abramson MJ, Walther EH.
Mutational analysis of the high affinity immunoglobulin E receptor beta subunit gene in asthma. *Thorax* (1999) 54: 409-412
- [102] Heinzmann A, Grotherr P, Jerkic SP, Lichtenberg A, Braun S, Kruse S, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA.
Studies on linkage and association of atopy with the chromosomal region 12q13-24. *Clinical and Experimental Allergy* (2000) 30: 1554-61
- [103] Tamura K, Arakawa H, Suzuki M, Kobayashi Y, Mochizuki H, Kato M, Tokuyama K, Morikawa A.
Novel dinucleotide repeat polymorphism in the first exon of the STAT-6 gene is associated with allergic diseases. *Clinical and Experimental Allergy* (2001) 31: 1509-14
- [104] Duetsch G, Illig T, Loesgen S, Rohde K, Klopp N, Herbon N, Gohlke H, Altmueller J, Wjst M.
STAT6 as an asthma candidate gene: polymorphism-screening, association and haplotype analysis in a Caucasian sib-pair study. *Human Molecular Genetics* (2002) 11: 613-621

- [105] Hayden C, Pereira E, Rye P, Palmer L, Gibson N, Palenque M, Hagel I, Lynch N, Goldblatt J, Lesouef P.
Mutation screening of interferon-gamma (IFNG) as a candidate gene for asthma. *Clinical and Experimental Allergy* (1997) 27: 1412-1416
- [106] Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV.
In vitro production of IFN- γ correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- γ gene. *European Journal of Immunogenetics* (1999) 26: 1-3
- [107] Nieters A, Brems S, Becker N.
Cross-sectional study on cytokine polymorphisms, cytokine production after T-cellstimulation and clinical parameters in a random sample of a German population. *Human Genetics* (2001) 108: 241-248
- [108] Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA.
The association of atopy with a gain-of-function mutation in the α subunit of the Interleukin-4 receptor. *New England Journal of Medicine* (1997) 337: 1720-1725
- [109] Rosa-Rosa L, Zimmermann N, Bernstein JA, Rothenberg ME, Hershey GK.
The R576 IL-4 receptor α allele correlates with asthma severity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (1999) 104: 1008-1014
- [110] Kruse S, Japha T, Tedner M, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA.
The polymorphisms S503P and Q576R in the Interleukin-4 receptor α gene are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology* (1999) 96: 365-371
- [111] Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kobayashi K, Imoto N, Nakahara S, Matsui A, Hamaguchi H.
Lack of association of atopy/ asthma and the interleukin-4 receptor α gene in Japanese. *Clinical and Experimental Allergy* (1999) 29: 228-233
- [112] Dupre D, Audrezet MP, Ferec C.
Atopy and a mutation in the Interleukin-4 receptor gene. *New England Journal of Medicine* (2000) 343: 69-70
- [113] Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Moa XQ, Gao PS, Arinobu Y, Ihara K, Takabayashi A, Hara T, Enomoto T, Shirakawa T, Hopkin JM, Izuhara K.
Cutting Edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 Receptor α -chain in IgE synthesis. *Journal of Immunology* (1999) 162: 1227-1231
- [114] Rogala B, Rymarczyk B, Moczulski D, Grzeszczak W.
The role of R576Q polymorphism of Interleukin-4 receptor alpha gene in atopy: results of a family-based study design. *Journal of Investigation of Allergology and Clinical Immunology* (2001) 11: 285-289
- [115] Tan EC, Lee BW, Chew FT, Shek L, Tay AWN, Tay AHN.
IL4R α gene Ile50Val polymorphism. *Allergy* (1999) 54: 1004-1013
- [116] Hackstein H, Hofmann H, Bohnert A, Bein G.
Definition of human Interleukin-4 receptor alpha chain haplotypes and allelic association with atopy markers. *Human Immunology* (1999) 60: 1119-1127
- [117] Ober C, Leavitt SA, Tsalenko A, Howard TD, Hoki DM, Daniel R, Newman DL, Wu X, Parry R, Lester LA, Solway J, Blumenthal M, King RA, Xu J, Meyers DA, Bleecker ER, Cox NJ.
Variation in the Interleukin 4-receptor α gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations. *American Journal of Human Genetics* (2000) 66: 517-526
- [118] Chomarot P, Banchereau J.
An update on Interleukin-4 and its receptor. *European Cytokine Network* (1997) 8: 333-344
- [119] Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE.
The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annual Review of Immunology* (1999) 17: 701-738
- [120] Rosenwasser LJ, Borish L.
Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10). *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (1997) 156: 152-155
- [121] Bijlsma FJ, van Kuik J, van Hoffen E, de Jonge N, Tilanus MG, Gmelig-Meyling FH, de Weger RA.
Acute cardiac transplant rejection is associated with low frequencies of Interleukin-4 producing helper T-lymphocytes rather than with Interleukin-promoter or splice variants. *Human Immunology* (2002) 63: 317-323
- [122] van der Pouw Kraan TC, Kucukaycan M, Bakker AM, Baggen JM, van der Zee JS, Dentener MA, Wouters EF.
Chronic obstructive pulmonary disease is associated with the -1055 IL-13 promoter polymorphism. *Genes and Immunity* (2002) 3: 436-439

- [123] Kanemitsu S, Takabayashi A, Sasaki Y, Kuromaru R, Ihara K, Kaku Y, Sakai K, Hara T. Association of Interleukin-4 receptor and Interleukin-4 promoter gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* (1999) 42: 1298-1300
- [124] Donn RP, Barrett JH, Farhan A, Stopford A, Pepper L, Shelley E, Davies N, Ollier WER, Thomson W, British Paediatric Rheumatology Study Group. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and Rheumatism* (2001) 44: 802-810
- [125] Choi EH, Lee HJ, Yoo T, Chanock SJ. A common haplotype of Interleukin-4 gene IL4 is associated with severe respiratory syncytial virus disease in Korean children. *Journal of Infectious Diseases* (2002) 186: 1207-1211
- [125] Beckmann MP, Cosman D, Fanslow W, Maliszewski CR, Lyman SD. The Interleukin-4 receptor: structure, function, and signal transduction. *Chemical Immunology* (1992) 51: 107-134
- [127] Vosshenrich CAJ, DiSanto JP. Cytokines: IL-21 joins the γ c-dependent network? *Current Biology* (2001) 11:175-177
- [128] Deichmann K, Bardutzky J, Forster J, Heinzmann A, Kuehr J. Common polymorphisms in the coding part of the IL4-receptor gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1997) 231: 696-697
- [129] Gessner A, Röllingshof M. Biologic functions and signaling of the Interleukin-4 receptor complexes. *Immunobiology* (2000) 201:285-307
- [130] Lozano F, Places L, Vila JM, Padilla O, Arman M, Gimferrer I, Suarez B, Lopez de la Iglesia A, Miserachs N Vives J. Identification of a novel single-nucleotide polymorphism (Val554Ile) and definition of eight common alleles for human IL4RA exon 11. *Tissue Antigens* (2001) 57: 216-220
- [131] Hackstein H, Hecker M, Kruse S, Bohnert A, Ober C, Deichmann KA, Bein G. A novel polymorphism in the 5' promoter region of the human Interleukin-4 receptor α -chain gene is associated with decreased soluble interleukin-4 receptor protein levels. *Immunogenetics* (2001) 53: 264-269
- [132] Hackstein H, Bitsch A, Bohnert A, Hofmann H, Weber F, Ohly A, Linington C, Mäurer M, Poser S, Rieckmann P, Bein G. Analysis of Interleukin-4 receptor α chain variants in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* (2001) 113: 240-248
- [133] Hackstein H, Klüter H, Fricke L, Hoyer J, Bein G. The IL-4 receptor α -chain variant Q576R is strongly associated with decreased kidney allograft survival. *Tissue Antigens* (1999) 54: 471-477
- [134] Hahn AB, Kasten-Jolly JC, Constantino DM, Graffunder E, Singh TP, Shen GK, Conti DJ. TNF- α , IL-6, IFN- γ , and IL-10 gene expression polymorphisms and the IL-4 receptor α -chain variant Q576R: effects on renal allograft outcome. *Transplantation* (2001) 72: 660-665
- [135] Loots GG, Locksley RM, Blankespoor CM, Wang ZE, Miller W, Rubin EM, Frazer KA. Identification of a coordinate regulator of Interleukin 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. *Science* (2000) 288: 136-140
- [136] Takemoto N, Kamogawa Y, Lee HJ, Kurata H, Arai KI, O'Garra A, Arai N, Miyatake S. Cutting Edge: chromatin remodelling at the IL-4/ IL-13 intergenic regulatory region for Th2-specific Cytokine gene cluster. *Journal of Immunology* (2000) 165: 6687-6691
- [137] Takemoto N, Koyano-Nakagawa N, Yokota T, Arai N, Miyatake S, Arai K. Th2-specific DNase I-hypersensitive sites in the murine IL-13 and IL-4 intergenic region. *International Immunology* (1998) 10: 1981-1985
- [138] Li Q, Harju S, Peterson K. Locus control regions coming of age at a decade plus. *Trends in Genetics* (1999) 15: 403-408
- [139] Kioussis D, Festenstein R. Locus control regions: overcoming heterochromatin-induced gene inactivation in mammals. *Current Opinion in Genetics and Development* (1997) 7: 614-619
- [140] Agarwal S, Rao A. Long-range transcriptional regulation of cytokine gene expression. *Current Opinion in Immunology* (1998) 10: 345-352
- [141] Tuan DY, Solomon WB, London IM, Lee DP. An erythroid-specific, developmental-stage-independent enhancer far upstream of the human „beta-like globin“ genes. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* (1989) 86:2554-2558

- [142] Hatton CS, Wilkie AO, Drysdale HC, Wood WG, Vickers MA, Sharpe J, Ayyub H, Pretorius IM, Buckle VJ, Higgs DR.
Alpha-thalassemia caused by a large (62 kb) deletion upstream of the human alpha globin gene cluster. *Blood* (1990) 76: 221-227
- [143] Dolganov G, Bort S, Lovett M, Burr J, Schubert L, Short D, McGurn M, Gibson C, Lewis DB.
Coexpression of the Interleukin-13 and Interleukin-4 genes correlates with their physical linkage in the cytokine gene cluster on human chromosome 5q23-q31. *Blood* (1996) 87: 3316-3326
- [144] Kelly BL, Locksley RM.
Coordinate regulation of the IL-4, IL-13, and IL-5 cytokine cluster in Th2 clones revealed by allelic expression patterns. *Journal of Immunology* (2000) 165: 2982-2986
- [145] Mohrs M, Blankespoor CM, Wang ZE, Loots GG, Afzal V, Hadeiba H, Shinkai K, Rubin EM, Locksley RM.
Deletion of a coordinate regulator of type 2 cytokine expression in mice. *Nature Immunology* (2001) 2: 842-847
- [146] Noguchi E, Nukaga-Nishio Y, Jian Z, Yokouchi Y, Kamioka M, Yamakawa-Kobayashi K, Hamaguchi H, Matsui A, Shibasaki M, Arinami T.
Haplotypes of the 5' region of the IL-4 gene and SNPs in the intergene sequence between the IL-4 and IL-13 genes are associated with atopic asthma. *Human Immunology* (2001) 62: 1251-1257
- [147] Elliott KS, Anney RJL, Fitzpatrick EB, Williamson R, Forrest SM.
Conservation of CNS1 and exclusion of its role in atopic eczema susceptibility. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2002) 109: 176-178
- [148] Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B, Minty C, Casellas P, Loison G, Lupker J, Shire D, Ferrara P, Caput D.
Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* (1993) 362: 248-250
- [149] Punnunen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie NJ, Menon S, Zurawski G, De Waal Malefyt R, De Vries JE.
Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* (1993) 90: 3730-3734
- [150] McKenzie ANJ, Culpepper JA, De Waal Malefyt R, Briere F, Aversa G, Sato A, Dang W, Cocks BG, Menon S, De Vries JE, Banchereau J, Zurawski G.
Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Immunology* (1993) 90: 3735-3739
- [151] Grünig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, Sheppard D, Mohrs M, Donaldson DD, Locksley RM, Correy DB.
Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* (1998) 282: 2261-2263
- [152] Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD.
Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* (1998) 282: 2258-2261
- [153] McKenzie GJ, Emson CL, Bell SE, Anderson S, Fallon P, Zurawski G, Murray R, Grecis R, McKenzie AN.
Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. *Immunity* (1998) 9: 423-432
- [154] Fallon PG, Emson CL, Smith P, McKenzie AN.
IL-13 overexpression predisposes to anaphylaxis following antigen sensitization. *Journal of Immunology* (2001) 166: 2712-2716
- [155] Walter DM, McIntire JJ, Berry G, McKenzie ANJ, Donaldson DD, DeKruyff RH, Umetsu DT.
Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Journal of Immunology* (2001) 167: 4668-4675
- [156] Kuperman DA, Huang X, Koth LL, Chang GH, Dolganov GM, Elias JA, Sheppard D, Erle DJ.
Direct effects of Interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nature Medicine* (2002) 8: 885-889
- [157] McKenzie GJ, Bancroft A, Grecis RK, McKenzie AN.
A distinct role for Interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses. *Current Biology* (1998) 12: 339-342
- [158] Kelly-Welch AE, Hanson EM, Boothby MR, Keegan AD.
Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling connections maps. *Science* (2003) 300: 1527-1528
- [159] Shirakawa T, Deichmann KA, Izuhara K, Mao XQ, Adra CN, Hopkin JM.
Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunology Today* (2000) 21: 60-64

- [160] Bednarczuk T, Placha G, Jazdzewski K, Kurylowicz A, Kloza M, Makowska U, Hiromatsu Y, Nauman J.
Interleukin-13 gene polymorphisms in patients with Graves' disease. *Clinical Endocrinology* (2003) 59: 519-525
- [161] Heinzmann A, Jerkic SP, Ganter K, Kurz T, Blattmann S, Schuchmann L, Gerhold K, Berner R, Deichmann KA.
Association study of the IL13 variant Arg110Gln in atopic diseases and juvenile idiopathic arthritis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2003) 112: 735-739
- [162] Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, Maruyama M, Harada H, Sudo Y, Miyata T, Taniguchi T.
Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that binds to IFN- β gene regulatory elements. *Cell* (1988) 54: 903-913
- [163] Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N.
IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual Review of Immunology* (2001) 19: 623-655
- [164] Ko J, Gendron-Fitzpatrick A, Splitter GA.
Susceptibility of IFN regulatory factor-1 and IFN consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis. *Journal of Immunology* (2002) 168: 2433-2440
- [165] Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC.
Cellular responses to Interferon- γ . *Annual Review of Immunology* (1997) 15: 749-795
- [166] Harada H, Taniguchi T, Tanaka N.
The role of interferon regulatory factors in the interferon system and cell growth control. *Biochimie* (1998) 80: 641-650
- [167] Harada H, Takahashi EI, Itoh S, Harada K, Hori TA, Taniguchi T.
Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system. *Molecular and Cellular Biology* (1994) 14: 1500-1509
- [168] Harada H, Willson K, Sakakibara J, Miyamoto M, Fujita T, Taniguchi T.
Absence of the type I IFN system in EC cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated. *Cell* (1990) 63: 303-312
- [169] Taniguchi T, Takaoka A.
The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Current Opinion Immunology* (2002) 14: 111-116
- [170] Harada H, Fujita T, Miyamoto M, Kimura Y, Maruyama M, Furia A, Miyata T, Taniguchi T.
Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* (1989) 58: 729-739
- [171] Kimura T, Nakayama K, Penninger J, Kitagawa M, Harada H, Matsuyama T, Tanaka N, Kamijo R, Vilcek J, Mak TW, Taniguchi T.
Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral responses to interferons. *Science* (1994) 264: 1921-1924
- [172] Kamijo R, Harada H, Matsuyama T, Bosland M, Gerecitano J, Shapiro D, Le J, Koh SI, Kimura T, Green SJ.
Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthetase induction in macrophages. *Science* (1994) 263: 1612-1615
- [173] Lohoff M, Ferrick D, Mittrucker HW, Duncan GS, Bischof S, Rollinghoff M, Mak TW.
Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vivo. *Immunity* (1997) 6: 681-689
- [174] Khan IA, Matsuura T, Fonseka S, Kasper LH.
Production of nitric oxide (NO) is not essential for protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in IRF-1^{-/-} mice. *Journal of Immunology* (1996) 156: 636-643
- [175] Beretta L, Gabbay M, Berger R, Hanash SM, Sonenberg N.
Expression of the protein kinase PKR is modulated by IRF-1 and is reduced in 5q-associated leukemias. *Oncogene* (1996) 12: 1593-1596
- [176] Tanaka N, Ishihara M, Kitagawa M, Harada H, Kimura T, Matsuyama T, Lamphier MS, Aizawa S, Mak TW, Taniguchi T.
Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1. *Cell* (1994) 77: 829-839
- [177] Preisler HD, Perambakam S, Li B, Hsu WT, Venugopal P, Creech S, Sivaraman S, Tanaka N.
Alteration in IRF1/IRF2 expression in acute myelogenous leukemia. *American Journal of Hematology* (2001) 68: 23-31

- [178] Harada H, Kondo T, Ogawa S, Tamura T, Kitagawa M, Tanaka N, Laphier MS, Hirai H, Taniguchi T. Accelerated exon skipping of IRF-1 mRNA in human myelodysplasia/leukemia; a possible mechanism of tumor suppressor inactivation. *Oncogene* (1994) 9: 3313-3320
- [179] Nozawa H, Oda E, Ueda S, Tamura G, Maesawa C, Muto T, Taniguchi T, Tanaka N. Functionally inactivating point mutation in the tumor-suppressor *IRF-1* gene identified in human gastric cancer. *International Journal of Cancer* (1998) 77: 522-527
- [180] Rioux JD, Daly MJ, Silvergerb MS, Lindblad K, Steinhart H, Cohen Z, Delmonte T, Kocher K, Miller K, Guschwan S, Kulbokas EJ, O'Leary S, Wichester E, Dewar K, Green T, Stone V, Chow C, Cohen A, Laglier D, Lapointe G, Gaudet D, Faith J, Branco N, Bull SB, McLeod RS, Griffiths AM, Bitton A, Greenberg GR, Lander ES, Siminovitch KA, Hudson TJ. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nature Genetics* (2001) 29: 223-228
- [181] Walley AJ, Wiltshire S, Ellis CM, Cookson WO. Linkage and allelic association of chromosome 5 cytokine cluster genetic markers with atopy and asthma associated traits. *Genomics* (2001) 72: 15-20
- [182] Seegers D, Borm MEA, van Belzen MJ, Mulder CJJ, Bailing J, Crusius JBA, Meijer JWR, Wijmenga C, Pena AS, Bouma G. IL12B and IRF1 gene polymorphisms and susceptibility to celiac disease. *European Journal of Immunogenetics* (2003) 30: 421-425
- [183] Vandenberg K, Hardt C, Louage J, Fiten P, Jaeckel S, Ronsse I, Epplen JT, Grimaldi LME, Olsson T, Marrosu MG, Billiau A, Opdenakker G. Lack of association between the interferon regulatory factor-1 (IRF-1) locus at 5q31.1 and multiple sclerosis in Germany, Northern Italy, Sardinia and Sweden. *Genes and Immunity* (2000) 1: 290-292
- [184] Beutler B. TLR4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Current Opinion in Immunology* (2000) 12: 20-26
- [185] Smirnova I, Poltorak A, Chan EKL, McBride C, Beutler B. Phylogenetic variation and polymorphism at the Toll-like receptor 4 locus (TLR4). *Genome Biology* (2000) 1: 1-10
- [186] Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Riccardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* (1998) 282: 2085-2088
- [187] Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* (1999) 274: 10689-10692
- [188] Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* (2000) 406: 782-787
- [189] Wright SD. Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. *Journal of Experimental Medicine* (1999) 189: 605-609
- [190] Schwartz DA. The genetics of innate immunity. *Chest* (2002) 121: 62-68
- [191] Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *New England Journal of Medicine* (2002) 347: 185-192
- [192] Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* (1998) 95: 588-593
- [193] Smirnova I, Hamblin MT, McBride C, Beutler B, Di Rienzo A. Excess of rare amino acid polymorphisms in the Toll-like receptor 4 in humans. *Genetics* (2001) 158: 1657-1664
- [194] Arbour NC, Lornz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyperresponsiveness in humans. *Nature Genetics* (2000) 25: 187-191
- [195] Schmitt C, Humeny A, Becker CM, Brune K, Pahl A. Polymorphisms of TLR4: rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles. *Clinical Chemistry* (2002) 48: 1661-1667

- [196] Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA.
Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Archives of Internal Medicine* (2002) 162: 1028-1032
- [197] Agnese DM, Calvano JE, Hahn SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF.
Human Toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infection. *Journal of Infectious Diseases* (2002) 186: 1522-1525
- [198] Raby BA, Klimecki WT, Laprise C, Renaud Y, Faith J, Lemire M, Greenwood C, Weiland KM, Lange C, Palmer LJ, Lazarus R, Vercelli D, Kwiatkowski DJ, Silverman EK, Martinez FD, Hudson TJ, Weiss ST.
Polymorphisms in Toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2002) 166: 1449-1456
- [199] Reindl M, Lutterotti A, Ingram J, Schanda K, C, Gassner, Deisenhammer F, Berger T, Lorenz E.
Mutations in the gene for Toll-like receptor 4 and multiple sclerosis. *Tissue Antigens* (2003) 61: 85-88
- [200] Feterowski C, Emmanuilidis K, Miethke T, Gerauer K, Rump M, Ulm K, Holzmann B, Weighardt H.
Effects of functional Toll-like receptor-4 mutations on the immune response to human and experimental sepsis. *Immunology* (2003) 109: 426-431
- [201] Smirnova I, Mann N, Dols A, Derkx HH, Hibberd ML, Levin M, Beutler B.
Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* (2003) 100: 6075-6080
- [202] Mueller U, Steinhoff U, Reis LFL, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M.
Functional role of type I and type II Interferons in antiviral defense. *Science* (1994) 264: 1918-1921
- [203] Ullman KS, Northrop JP, Verweij CL, Crabtree GR.
Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annual Review of Immunology* (1990) 8: 421-452
- [204] Trinchieri G.
Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual Review of Immunology* (1995) 13: 251-276
- [205] Hardy KJ, Sawada T.
Human γ -interferon strongly upregulates its own gene expression in peripheral blood lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* (1989) 170: 1021-1026
- [206] Valente G, Ozmen L, Novelli F, Guena M, Palestro G, Forni G, Garotta G.
Distribution of Interferon- γ receptor in human tissues. *European Journal of Immunology* (1992) 22: 2403-2412
- [207] Greenlund AC, Morales MO, Viviano BL, Yan H, Krolewski J, Schreiber RD.
STAT recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity* (1995) 2: 677-687
- [208] Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Ruggi FS, Carli M, Ricci M, Romagnani S.
Reciprocal regulatory effects of IFN- γ and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *Journal of Immunology* (1992) 148: 2142-2147
- [209] Wenner CA, Gueler ML, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM.
Roles of IFN- γ and IFN- α in IL-12-induced T helper cell-1 development. *Journal of Immunology* (1996) 156: 1442-1447
- [210] Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek J, Zinkernagel RM, Aguet M.
Immune response in mice that lack the interferon- γ receptor. *Science* (1993) 259: 1742-1745
- [211] Ting JPY, Baldwin AS.
Regulation of MHC gene expression. *Current Biology* (1993) 5: 8-16
- [212] Karupiah G, Xie QW, Buller RML, Nathan C, Duarte C, MacMicking JD.
Inhibition of viral replication by Interferon- γ -induced nitric oxide synthetase. *Science* (1993) 261: 1445-1448
- [213] Cassatella S, Trinchieri G, Rossi F.
Molecular basis of Interferon- γ and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. *Journal of Biological Chemistry* (1990) 265: 20241-20246
- [214] Bream JH, Carrington M, O'Toole S, Dean M, Gerrard B, Shin HD, Kosack D, Modi W, Young HA, Smith MW.
Polymorphisms of the human IFNG gene noncoding regions. *Immunogenetics* (2000) 51: 50-58

- [215] Giedraitis V, He B, Hillert J.
Mutation screening of the Interferon-gamma gene as a candidate gene for multiple sclerosis. *European Journal of Immunogenetics* (1999) 26: 257-259
- [216] Dai Y, Masterman T, Huang WX, Sandberg-Wollheim M, Laaksonen M, Harbo HF, Oturai A, Ryder LP, Soelberg-Sorensen P, Sveigaard A, Hillert J.
Analysis of an interferon- γ gene dinucleotide-repeat polymorphism in Nordic multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis* (2001) 7: 157-163
- [217] Awata T, Matsumoto C, Urakami T, Hagura R, Amemiya S, Kanazawa Y.
Association of polymorphism in the Interferon gamma gene with IDDM. *Diabetologia* (1994) 37: 1159-1162
- [218] Piciot F, Veijola R, Johannesen J, Hansen PM, Lorenzen T, Karlsen AE, Reijonen H, Knip M, Nerup J.
Analysis of an Interferon-gamma gene (IFNG) polymorphism in Danish and Finnish insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) patients and control subjects. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *Journal of Interferon and Cytokine Research* (1997) 17: 87-93
- [219] Jahromi M, Millward A, Demaine A.
A CA repeat polymorphism of the IFN-gamma gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes. *Journal of Interferon and Cytokine Research* (2000) 20: 187-190
- [220] Khani-Hanjani A, Lacaillie D, Hoar D, Chalmers A, Horsman D, Anderson M, Balshaw R, Keown PA.
Association between dinucleotide repeat in non-coding region of Interferon-gamma gene and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis. *The Lancet* (2000) 356: 820-825
- [221] Lee JY, Goldman D, Piliro LM, Petri M, Sullivan KE.
Interferon-gamma polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *Genes and Immunity* (2001) 2: 254-257
- [222] Cartwright N, Demaine A, Jahromi M, Sanders H, Kaminski ER.
A study of cytokine protein secretion, frequencies of cytokine expressing cells and IFN- γ gene polymorphisms in normal individuals. *Transplantation* (1999) 68: 1546-1552
- [223] Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV.
A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production. *Human Immunology* (2000) 61: 863-866
- [224] Asderakis A, Sankaran D, Dyer P, Johnson RW, Pravica V, Sinnott PJ, Roberts I, Hutchinson IV.
Association of polymorphisms in the human Interferon-gamma and Interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on transplantation. *Transplantation* (2001) 15: 674-677
- [225] Becker KG.
The common variants/multiple disease hypothesis of common complex genetic disorders. *Medical Hypotheses* (2004) 62: 309-317
- [226] Wahn U, Bergmann RL, Nickel R.
Early life markers of atopy and asthma. *Clinical and Experimental Allergy* (1998) 28: 20-21
- [227] Tay YK, Kong KH, Khoo L, Goh CL, Giam YC.
The prevalence and descriptive epidemiology of atopic dermatitis in Singapore school children. *British Journal of Dermatology* (2002) 146: 101-106
- [228] Mortz CG, Lauritsen JM, Bindslev-Jensen C, Andersen KE.
Prevalence of atopic dermatitis, asthma, allergic rhinitis, and hand and contact dermatitis in adolescents. The Odense Adolescence Cohort Study on Atopic Diseases and Dermatitis. *British Journal of Dermatology* (2001) 144: 523-532
- [229] Muto T, Hsieh SD, Sakurai Y, Yoshinaga H, Suto H, Okumura K.
Prevalence of atopic dermatitis in Japanese adults. *British Journal of Dermatology* (2003) 148: 117-121
- [230] Kimpen J, Callaert H, Embrechts P, Bosmans E.
Influence of sex and gestational age on cord blood IgE. *Acta Paediatrica Scandinavica* (1989) 78: 233-238
- [231] Wahn U, Lau S, Kropf-Herwig G.
Atopische Erkrankungen im Säuglings- und Kindesalter. Aspekte der Prävention und Therapie. *Allergologie* (1988) 11: 474-478
- [232] Colhoun HM, McKeigue PM, Davey SG.
Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* (2003) 361: 865-872
- [233] Wacholder S, Chanock S, Garcia-Closas M, El Ghormli L, Rothman N.
Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies. *Journal of the National Cancer Institute* (2004) 96: 434-442

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wortwörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündliche Auskünfte beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ich möchte mich herzlich für die wissenschaftliche Unterstützung bei Prof. Bein bedanken sowie die hervorragenden Betreuung durch Dr. A. Bohnert. Mein Dank gilt außerdem allen, die mir bei der praktischen Arbeit geholfen haben : Fr. Hailey und Fr. Schellenberg aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, dem Institut für klinische Chemie für die Messung des IgE- und IgA-Spiegels und der Klinik für Dermatologie für die Messung der IgE-Spiegel bei Neugeborenen sowie Fr. Dr. H. Hofmann für das Sammeln der ersten 160 DNA-Proben sowie die Durchführung der IL4R-Typisierung dieser Proben.

Name:	Astrid Ohly	
Geburtsdatum:	17.10.1977	
Geburtsort:	Frankfurt am Main	
Schulbildung:	1984-1988 1988-1997	Bergwinkelgrundschule, Schlüchtern Ulrich-von-Hutten-Gymnasium, Schlüchtern
Studium:	1997-2003 1999 2000 2002 2002-2003 2003	Studium der Medizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen Ärztliche Vorprüfung 1. Staatsexamen 2. Staatsexamen Praktisches Jahr am Klinikum der Justus-Liebig-Universität 3. Staatsexamen
Beruflicher Werdegang:	2004 2004	Ärztin im Praktikum in der Klinik für Innere Medizin am Städtischen Klinikum Dessau ab 01.10.04 Ärztin in Weiterbildung in der Klinik für Innere Medizin am Städtischen Klinikum Dessau