

**Die *Common Variant – Common Disease* Hypothese in der
Fehlsteuerung der Immunantwort**

**Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp am Beispiel
des Interleukin-4 Rezeptor und Tumor-Nekrose-Faktor
Gens**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von Franjkovic, Izolda
aus Kiel

Gießen 2006

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin

Leiter: Prof. Dr. G. Bein

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. G. Bein

Gutachter: Prof. Dr. J. Lohmeyer

Tag der Disputation: 10.10.2006

Inhaltsverzeichnis

Inhalt	Seite
1 SEPSIS.....	10
1.1 SEPSIS	10
1.1.1 Definition und Einführung des Begriffs Sepsis	10
1.1.2 Pathophysiologie der Sepsis.....	12
1.1.3 Sepsiskandidatengene.....	17
1.2 TNF UND SEPSIS	18
1.2.1 TNF- α Aufbau und Funktion.....	19
1.2.2 Genetische Varianten des TNF Gens	20
1.3 INTERLEUKIN-4 UND SEPSIS	22
1.3.1 Aufbau und Funktion von IL-4	22
1.4 INTERLEUKIN-4 REZEPTOR KOMPLEX.....	23
1.4.1 Interleukin-4 Rezeptor α Kette (IL-4R α)	24
1.5 SIGNALWEGE.....	25
1.5.1 JAK-STAT-Signaltransduktionsweg.....	25
1.5.2 IRS-1/ IRS-2- Signaltransduktionsweg.....	26
1.5.3 Funktionelle Regionen des IL-4 Rezeptors.....	29
1.6 GENETISCHE VARIANTEN DES IL4R GENS	30
1.7 ZIELSETZUNG	32
2 MATERIAL UND METHODEN	34
2.1 MATERIAL.....	34
2.1.1 Kleinmaterial.....	34
2.1.2 Reagenzien	34
2.1.3 Antikörper.....	36
2.1.4 Zelllinien.....	36
2.1.5 Humane IL4R Konstrukte.....	37
2.2 METHODEN	38
2.2.1 Nomenklatur.....	38
2.2.2 Transfektion.....	38
2.2.2.1 Transfektion von CTLL-2 Zellen.....	38
2.2.2.2 Elektroporation.....	39

2.2.2.3	Stabile Transfektion	39
2.2.2.4	Selektion der CTLL-2 Zellen	39
2.2.3	<i>Zellproliferation</i>	40
2.2.3.1	Proliferationstest durch Einbau von [³ H]-Thymidin	40
2.2.4	<i>Retroviraler Gentransfer mit 293-Phoenix (E) Zellen</i>	40
2.2.4.1	Produktion von Retroviren	40
2.2.4.2	Gewinnung retroviraler Überstände	41
2.2.4.3	Kryokonservierung retroviraler Überstände	42
2.2.4.4	Zellzahlbestimmung	42
2.2.4.5	Infektion von A20 Zellen mit Retroviren	42
2.2.5	<i>Durchflußzytometrische Analyse der Genexpression</i>	44
2.2.5.1	Prinzip der Durchflußzytometrie	44
2.2.5.2	Durchflußzytometrische Analyse der CD124 Expression in transfizierten T-Zelllinien	45
2.2.5.3	Durchflußzytometrische Analyse der CD124 Expression in transfizierten B-Zelllinien	45
2.2.5.4	IL-4 induzierte Expression von CD23 in huIL-4R transfizierten murinen B-Zelllinien	46
2.2.6	<i>Genetische Untersuchungsmethoden</i>	46
2.2.6.1	Probanden	46
2.2.6.2	DNA-Isolierung aus EDTA-Blut	47
2.2.6.3	Photometrische Bestimmung der DNA- Konzentration	48
2.2.6.4	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	48
2.2.6.5	Sequenzspezifische PCR (SSP-PCR)	49
2.2.6.6	Agarosegel-Elektrophorese	51
2.2.6.7	Genotypisierung mit der <i>TaqMan</i> ®PCR	52
2.2.6.8	Immunnephelometrische Bestimmung der Serum IgE-Spiegel	55
2.2.7	<i>Zusammenhang zwischen TNF Polymorphismen und dem klinischen Verlauf nach einem Polytrauma</i>	56
2.2.7.1	Studiendesign	56
2.2.7.2	Messung der TNF- α Plasmaspiegel	57
2.2.7.3	SSP-PCR zur Genotypisierung der TNF Sequenzvarianten -862C>A und -856C>T	57
2.2.7.4	Genotypisierung der TNF und LTA Sequenzvarianten mit <i>TaqMan</i> ®PCR	58

2.2.7.5	Genotypisierung der IL6 und IL10 Sequenzvarianten mit <i>TaqMan</i> ®PCR..	58
2.2.8	<i>Statistische Methoden</i>	59
2.2.8.1	IL4R Polymorphismen	59
2.2.8.2	TNF Polymorphismen	59
3	ERGEBNISSE	61
3.1	DER EINFLUSS VON IL4R GENPOLYMORPHISMEN AUF DIE IL-4 INDUZIERTE SIGNALTRANSDUKTION	61
3.1.1	<i>Herstellung verschiedener IL4R Genkonstrukte durch Einfügen von Punktmutationen mittels site-directed Mutagenese</i>	61
3.1.2	<i>Herstellung stabil transfizierter B Zelllinien, die den Wildtyp der IL-4Rα Kette oder die Variante I50V+Q551R exprimieren</i>	62
3.1.3	<i>Die Aminosäuresubstitution I50V in Kombination mit der Aminosäuresubstitution Q551R führt zu keiner Erhöhung der IL-4 induzierten CD23 Expression</i>	64
3.1.4	<i>Herstellung stabil transfizierter T Zelllinien, die entweder den Wildtyp der humanen IL-4Rα Kette oder die Variante S478P exprimieren</i>	65
3.1.5	<i>Die Aminosäuresubstitution S478P führt nach Stimulation mit humanem IL-4 zu keiner erhöhten IL-4 induzierten Zellproliferation</i>	67
3.2	GENETISCHE ASSOZIATIONSSTUDIEN	69
3.2.1	<i>Genvarianten in der kodierenden Region des humanen IL4R sind nicht assoziiert mit Serum-IgE Spiegeln</i>	69
3.2.2	<i>Haplotypen, die für die kodierende Region des humanen IL4R Gens geschätzt wurden, sind nicht mit dem Serum-IgE Spiegel assoziiert</i>	71
3.2.3	<i>Bestätigung der Ergebnisse der Assoziationsstudie in einer zweiten Kohorte</i> 72	
3.2.4	<i>Der IL4R Haplotyp V50+R551 ist nicht mit dem Phänotyp Serum-IgE Spiegel assoziiert</i>	73
3.3	GENETISCHE ASSOZIATIONSSTUDIEN AN POLYTRAUMATISIERTEN PATIENTEN	74
3.3.1	<i>Eigenschaften der eingeschlossenen Patienten</i>	74
3.3.2	<i>Ein einzelner TNF Haplotyp ist signifikant assoziiert mit erhöhtem TNF-α Plasmaspiegel nach einem Polytrauma</i>	76
3.3.3	<i>Ein TNF Haplotyp ist signifikant assoziiert mit der Inzidenz des Sepsis Syndroms nach einem Polytrauma</i>	78
3.3.4	<i>Ein TNF Haplotyp ist signifikant assoziiert mit der Prognose (outcome) nach einem Polytrauma</i>	80

4	DISKUSSION	82
4.1	VARIABILITÄT IM MENSCHLICHEN GENOM.....	82
4.2	FUNKTIONELLE STUDIEN AM IL4R GEN	84
4.2.1	<i>Funktionelle Untersuchung der kodierenden IL4R Variante S478P</i>	<i>84</i>
4.2.2	<i>Funktionelle Untersuchung der kodierenden IL4R Variante Q551R in Kombination mit I50V.....</i>	<i>86</i>
4.3	ASSOZIATIONSSTUDIEN	88
4.3.1	<i>Assoziation zwischen genetischen IL4R Varianten und dem Phänotyp Serum-IgE Spiegel.....</i>	<i>88</i>
4.3.2	<i>Studien zur genetischen Assoziation von TNF Varianten mit Sepsis zugehörigen Phänotypen.....</i>	<i>93</i>
4.3.3	<i>Kritische Betrachtung von genetischen Assoziationsstudien</i>	<i>98</i>
5	ZUSAMMENFASSUNG	102
5.1	SUMMARY	103
6	LITERATUR.....	105
7	ANHANG	122
7.1	IL4R PRIMER UND SONDEN	122
7.1.1	<i>IL4R Primer für die SSP-PCR.....</i>	<i>122</i>
7.1.2	<i>IL4R Primer und Sonden für die TaqMan®PCR.....</i>	<i>123</i>
7.2	TNF PRIMER UND SONDEN	124
7.2.1	<i>TNF Primer für die SSP-PCR</i>	<i>124</i>
7.2.2	<i>TNF Primer und Sonden für die TaqMan®PCR.....</i>	<i>125</i>
7.2.3	<i>LTA Primer und Sonden für die TaqMan®PCR</i>	<i>127</i>
7.3	ABKÜRZUNGEN	127
8	LEBENS LAUF	130
9	DANKSAGUNG	132

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Seite
Tabelle 1	Definitionen der verschiedenen Phasen der Sepsis nach Bone et al. 11
Tabelle 2	Mögliche Erweiterung der Sepsisdefinitionen nach Bone et al. 12
Tabelle 3	Polymorphismen im TNF Genlocus..... 20
Tabelle 4	Zusammenfassung bedeutender Regionen der IL-4R α Kette 29
Tabelle 5	Signalmoleküle der IL-4 Signaltransduktion und ihre Funktion..... 30
Tabelle 6	Punktmutationen im kodierenden Bereich des humanen IL4R Gens. 31
Tabelle 7	Monoklonale Antikörper gegen humane Zelloberflächenproteine 36
Tabelle 8	Monoklonale Antikörper gegen murine Zelloberflächenproteine..... 36
Tabelle 9	Versuchsablauf zur Gewinnung retroviraler Überstände 41
Tabelle 10	Reaktionsansatz der SSP-PCR zur Genotypisierung der IL4R Sequenzvarianten.. 50
Tabelle 11	Reaktionsbedingungen für die SSP-PCR zur Genotypisierung der IL4R Varianten 51
Tabelle 12	Reaktionsbedingungen für die TaqMan® PCR..... 55
Tabelle 13	Reaktionsbedingungen zur Genotypisierung der TNF Sequenzvarianten — 862C>A und -856C>T 58
Tabelle 14	Allelfrequenzen der untersuchten IL4R SNPs 70
Tabelle 15	Geschätzte sechs <i>locus</i> IL4R Haplotypen bei Blutspendern (n=300) 71
Tabelle 16	Geschätzte drei <i>locus</i> IL4R Haplotypen in einem erweiterten Kollektiv..... 72
Tabelle 17	Geschätzte zwei <i>locus</i> IL4R Haplotypen 73
Tabelle 18	Eigenschaften der Polytraumapatienten mit und ohne Sepsis..... 74
Tabelle 19	Assoziation geschätzter TNF Haplotypen (Frequenz>1%) mit dem quantitativen Phänotyp TNF- α Plasmaspiegel..... 78
Tabelle 20	Verteilung der TNF Genvarianten bei schwer verletzten Patienten mit und ohne Sepsis..... 79
Tabelle 21	Verteilung der TNF Genvarianten bei Patienten in Abhängigkeit der Prognose..... 81
Tabelle 22	Genetische Assoziationsstudien von kodierenden IL4R Varianten mit dem Phänotyp Serum-IgE Spiegel 91

Tabelle 23	Übersicht der wichtigsten TNF Assoziationsstudien über Sepsis assoziierte Phänotypen.....	94
Tabelle 24	IL4R Primersequenzen mit der Basenpaarlänge der amplifizierten Produkte	122
Tabelle 25	Primer für die Genotypisierung der IL4R SNPs I50V und Q551R.....	123
Tabelle 26	Sonden für die Genotypisierung der IL4R SNPs I50V und Q551R	123
Tabelle 27	TNF Primersequenzen mit der Basenpaarlänge der amplifizierten Produkte.	124
Tabelle 28	Primer für die Genotypisierung der TNF SNPs	125
Tabelle 29	Sonden für die Genotypisierung der TNF SNPs	126
Tabelle 30	Primer und Sonden für die Genotypisierung des SNPS LTA +252A>G.....	127

Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung</u>	<u>Seite</u>
Abbildung 1	Schematische Darstellung der Th1/Th2-Differenzierung 14
Abbildung 2	Schematische Darstellung der immunologischen und klinischen Folgen nach einer schweren Verletzung 17
Abbildung 3	Vereinfachte Darstellung des TNF Genlocus innerhalb der MHC –Region... 21
Abbildung 4	Aktivierung der Signaltransduktionswege über den IL4R..... 27
Abbildung 5	Schematische Darstellung der Organisation des humanen IL4R Gens..... 32
Abbildung 6	Schematische Darstellung des retroviralen Gentransfers..... 43
Abbildung 7	Schematische Darstellung der Struktur der TaqMan® MGB Sonden 53
Abbildung 8	Fluoreszenzmuster einer Genotypisierung mit der TaqMan® PCR 54
Abbildung 9	Schematische Darstellung der IL-4R alpha Kette und der hergestellten IL4R 62
Abbildung 10	Stabile Expression der humanen IL-4R α Kette in transfizierten B Zelllinien. 63
Abbildung 11	Die kombinierte Aminosäuresubstitution an Position 50 und 551 (V50+R551) der humanen IL-4R α Kette führt zu keiner Erhöhung der CD23 Expression in transfizierten Zellen nach IL-4 Stimulation 65
Abbildung 12	Stabile Expression der humanen IL-4R α Kette in transfizierten T Zelllinien. 66
Abbildung 13	Die Aminosäuresubstitution an Position 478 (S478P) der humanen IL-4R α Kette führt zu keiner Erhöhung der Zellproliferation nach IL-4 Stimulation .. 68
Abbildung 14	SSP-PCR Genotypisierung der IL4R Variante C406R..... 69
Abbildung 15	Bestimmung des Risikos (<i>odds ratio</i>) der IL4R SNP Genotypen mit dem Serum-IgE Spiegel 70
Abbildung 16	Struktur des TNF Gens, untersuchte SNPs und geschätzte Haplotypfrequenzen 75
Abbildung 17	TNF-alpha Plasmaspiegel bei Polytraumapatienten im Verlauf der 77
Abbildung 18	<i>Alignment</i> der I4R Region der humanen IL-4R α Kette mit Rezeptoren sechs weiterer Spezies..... 81

1 Sepsis

1.1 Sepsis

1.1.1 Definition und Einführung des Begriffs Sepsis

Bereits in der Antike wurde der Begriff „Sepsis“, der sich vom griechischen Wort *σηπω* ableitet, das übersetzt „faul machen“ bedeutet und daher lange Zeit als Bezeichnung für Wundfäule gewählt wurde, von Hippokrates (ca. 460-370 v. Chr.) eingeführt.

Die im weiteren Verlauf der Zeit von verschiedenen Wissenschaftlern aufgestellten pathophysiologischen Theorien führten zu einem Verständniswandel von Sepsis als Fäulnis zu Sepsis als einer bakteriellen Erkrankung. Vorangehend gab Schottmüller 1914 (1) eine moderne Sepsisdefinition, die besagt: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ Eine genauere Definition der Sepsis lieferte Roger C. Bone als die Invasion von Mikroorganismen und/ oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion (2). Im Rahmen des Krankheitsbildes lassen sich die Begriffe Infektion, Bakteriämie, SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*), Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock und MODS (*multiple organ dysfunction syndrome*) als verschiedene Phasen der Sepsis einordnen. Um die Verwirrung in Bezug auf die Termini einzuschränken, wurden diese auf einer Konsensuskonferenz des *American College of Chest Physicians (ACCP)* zusammen mit der *Society of Critical Care Medicine (SCCM)* einheitlich definiert (2;3). Die Definitionen der verschiedenen Phasen der Sepsis sind in Tabelle 1 aufgeführt, während Tabelle 2 Vorschläge zur Erweiterung der klinischen Definitionen darstellt.

Tabelle 1 **Definitionen der verschiedenen Phasen der Sepsis nach Bone et al. (4).**

Terminologie	Definition
Infektion	Inflammatorische Reaktion auf vorhandene Mikroorganismen oder auf die Invasion dieser Organismen in keimfreies Gewebe
Bakteriämie	Vorkommen lebensfähiger Bakterien im Blut
Systemisch entzündliche Reaktion (<i>systemic inflammatory response syndrome, SIRS</i>)	Systemisch entzündliche Reaktion verschiedener Ursachen (Infektion, Trauma, Verbrennung) mit mindestens zwei der folgenden Symptome: <ol style="list-style-type: none"> 1. Körpertemperatur >38 °C oder <36 °C 2. Tachykardie (Herzfrequenz >90/ min) 3. Tachypnoe (Atemfrequenz >24/ min) oder PaCO₂ <32 mm Hg 4. Leukozytose (>12x10⁹/l Leukozyten) oder Leukopenie (<4x10⁹/l Leukozyten) oder >10% unreife neutrophile Granulozyten
Sepsis	Gleiche Kriterien wie die systemisch entzündliche Reaktion, jedoch auf der Grundlage einer Infektion
Schwere Sepsis	Sepsis + Organversagen: Zeichen einer Organfunktionsstörung, Hypoperfusion oder Hypotension. Die Hypoperfusion kann sich als Hypoxämie, Oligurie, Laktazidose oder Verwirrtheit zeigen.
Septischer Schock	Schwere Sepsis mit anhaltender arterieller Hypotension. Eine Hypotension ist definiert als systolischer Blutdruck <90 mm Hg oder Abfall des systolischen Blutdrucks >40 mm Hg des Ausgangswertes
Multiples Organfunktionsstörungen Syndrom (<i>multiple organ dysfunction syndrome, MODS</i>)	Veränderte Organfunktionen bei akut erkrankten Personen, Aufrechterhalten der Homöostase ist ohne Intervention nicht möglich

Tabelle 2 Mögliche Erweiterung der Sepsisdefinitionen nach Bone et al. (4)

Terminologie	Definition
Kompensatorisch anti-entzündliche Reaktion (<i>compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS</i>)	HLA-DR auf Monozyten < 30% verminderte Fähigkeit der Monozyten, inflammatorische Zytokine wie TNF- α zu produzieren
Gemischte antagonistische Reaktion (<i>mixed antagonists response syndrome, MARS</i>)	Eigenschaften von SIRS bei einem Patienten mit CARS

Sepsis und ihre Folgeerscheinungen septischer Schock und septisches Organversagen bilden weltweit die führenden Todesursachen in der nicht-kardiologischen Intensivmedizin (4) mit einer Mortalitätsrate von 35% - 45% (5). Die Inzidenz der Sepsis hat in den letzten 20 Jahren kontinuierlich zugenommen (5) – mit weiter steigender Tendenz (6). Ein Grund für den Zuwachs liegt darin, dass vermehrt invasivere Methoden zur Behandlung von Grunderkrankungen eingesetzt werden und dass die Anzahl an immunsupprimierten Personen stetig zunimmt (6). Trotz Antibiotikatherapie und Verbesserung der intensivmedizinischen Betreuung weist die Sepsis eine hohe Sterblichkeit auf.

1.1.2 Pathophysiologie der Sepsis

Die Sepsis beschreibt ein komplexes Krankheitsbild, das nach der Konsensuskonferenz von 1992 (3) definiert wird als eine systemische Entzündungsreaktion, die durch eine Infektion verursacht wird. Für das Verständnis der pathogenen Mechanismen wurden Fortschritte sowohl in Bezug auf den Prozess der Sepsis als auch auf die Interaktionen zwischen Mikrobe und Wirt erreicht.

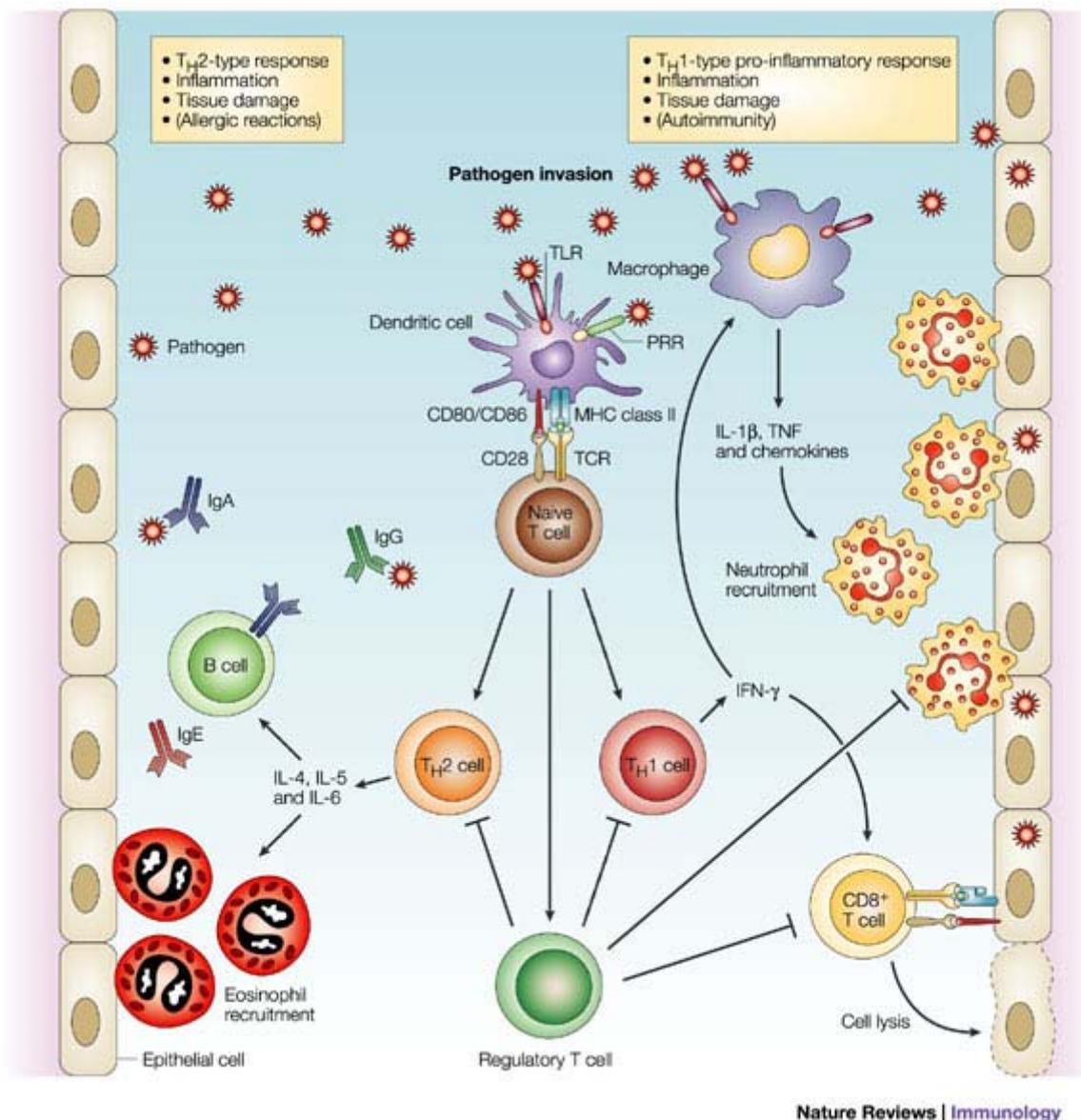
Zu Beginn der Wirt-Mikrobe Interaktion kommt es zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit dem Ziel, eine Abwehrreaktion unter Einbezug des adaptiven Immunsystems, das humorale und zelluläre Komponenten enthält, zu koordinieren (7).

Die Entzündungskaskade wird zunächst mit dem Eindringen von Mikroorganismen eröffnet, deren mikrobielle Komponenten als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*) von geeigneten Erkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*) wie z.B. Adapter-Protein- und *Toll-like*-Rezeptoren, die sich auf

Antigen-präsentierenden-Zellen (*antigen presenting cells*, APC) befinden, erkannt werden (8;9). Zu den mikrobiellen Komponenten, die vom angeborenen Immunsystem erkannt werden und es aktivieren, gehören das Lipopolysaccharid (Endotoxin) und das Peptidoglykan gramnegativer Bakterien (8), die Lipoteichonsäure und das Peptidoglykan grampositiver Bakterien (7), das Lipoarabinomannan der Mycobakterien (8), andere Zellwandbestandteile von Bakterien oder Pilzen sowie unmethylierte CpG-Sequenzen bakterieller und viraler DNA (7). Grampositive Zellen sind des weiteren in der Lage Exotoxine als Superantigene zu produzieren, von denen das Toxische Schock Syndrom Toxin-1 (TSST-1) des Bakterienstamms *Staphylococcus aureus* aber auch pyrogene Exotoxine von *Streptococcus pyogenes* im Zusammenhang mit dem septischen Schock von Bedeutung sind (7).

Nachdem APCs wie z.B. Makrophagen und dendritische Zellen Antigene prozessiert und als MHC Klasse II-Antigen-Peptid-Komplexe den naiven $CD4^+$ -Lymphozyten (Th0) präsentiert haben, setzen sie Zytokine wie IL-12, IL-4, $IFN\gamma$ und andere frei, um $CD4^+$ -Lymphozyten zu aktivieren. Die Entscheidung über eine Differenzierung der naiven $CD4^+$ -Lymphozyten in Th1- und Th2-Lymphozyten nach einer Antigenstimulation ist von verschiedenen Faktoren abhängig wie z.B. Antigen dosis, Zytokinmilieu und Typ der APCs (10;11). IL-12, welches nach dem Kontakt von Antigen-präsentierenden-Zellen mit mikrobiellen Komponenten produziert wird, ist das bedeutendste Th1-induzierende Zytokin (12), während IL-4 das wichtigste Th2-induzierende Zytokin ist (13;14). Th1-Lymphozyten aktivieren nach Sekretion der Zytokine IL-2, $TNF\alpha$, $LT\alpha$ und $IFN\gamma$ zytotoxische und phagozytische Funktionen von Makrophagen und NK-Zellen und bewirken dadurch eine zellvermittelte Immunantwort, während TH2-Lymphozyten IL-4, IL-5, IL-13 und IL-10 freisetzen und B-Lymphozyten aktivieren, die durch Produktion spezifischer Antikörper die humorale Antwort auslösen (15;16). Die folgende Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Th1/Th2-Differenzierung.

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Th1/Th2-Differenzierung (17)



Bei der frühen Antwort des Organismus auf eine Verletzung oder Infektion kommt es zunächst zu einer ausgedehnten Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit dem Ziel, eine Abwehrreaktion zu koordinieren (7;18). Die beginnende inflammatorische Reaktion ist durch die Synthese proinflammatorischer Mediatoren charakterisiert (9), die von antiinflammatorischen Zytokinen in Schach gehalten werden (4). Wenn die Homöostase zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren nicht wiederhergestellt wird, kann sich eine massive proinflammatorische Reaktion ergeben, die definiert ist als eine systemisch entzündliche Reaktion (SIRS) (4;18). Dabei werden als Prototypen der proinflammatorischen

Phase IL-1 und TNF- α und des weiteren IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 und andere ausgeschüttet (7). Neben Zytokinen werden auch andere Mediatoren freigesetzt wie z.B. C-reaktives Protein, Serum Amyloid A, Procalcitonin, C3-Komplement und Haptoglobin (18).

Bei einigen Patienten kann sich nach einer anfänglichen SIRS eine übermäßige anti-inflammatorische Antwort entwickeln, die als kompensatorische, anti-entzündliche Reaktion (CARS) definiert (4;18) wird. CARS wird assoziiert mit einer erhöhten Produktion der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-4, sowie mit der Entwicklung einer Immunsuppression (18). Ferner werden die anti-inflammatorischen Mediatoren löslicher TNF Rezeptor, IL-1 Rezeptor Antagonist, IL-1 Rezeptor vom Typ II und Inaktivatoren der Komplement Kaskade (7) gebildet.

In der Vergangenheit wurde SIRS auf Reaktionen des angeborenen Immunsystems und CARS auf eine Fehlsteuerung des adaptiven Immunsystems zurückgeführt, jedoch konnte für die Induktion beider Sepsisphasen gezeigt werden, dass Interaktionen zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem von Bedeutung sind (19). Die bedeutende Rolle der adaptiven Immunantwort bei der Kontrolle der angeborenen Immunantwort nach einer schweren Verletzung konnte in verschiedenen Tiermodellen dargestellt werden. Am Beispiel von Mäusen, denen das Rekombinase-aktivierende Gen 1 (Rag1) und somit das adaptive Immunsystem fehlt, wurde eine erhöhte TNF- α und IL-6 Produktion nach Stimulation mit LPS im Vergleich zu Kontrollmäusen beobachtet (18). Das weist auf eine Verstärkung des inflammatorischen Phänotyps in Abwesenheit des adaptiven Immunsystems hin (18).

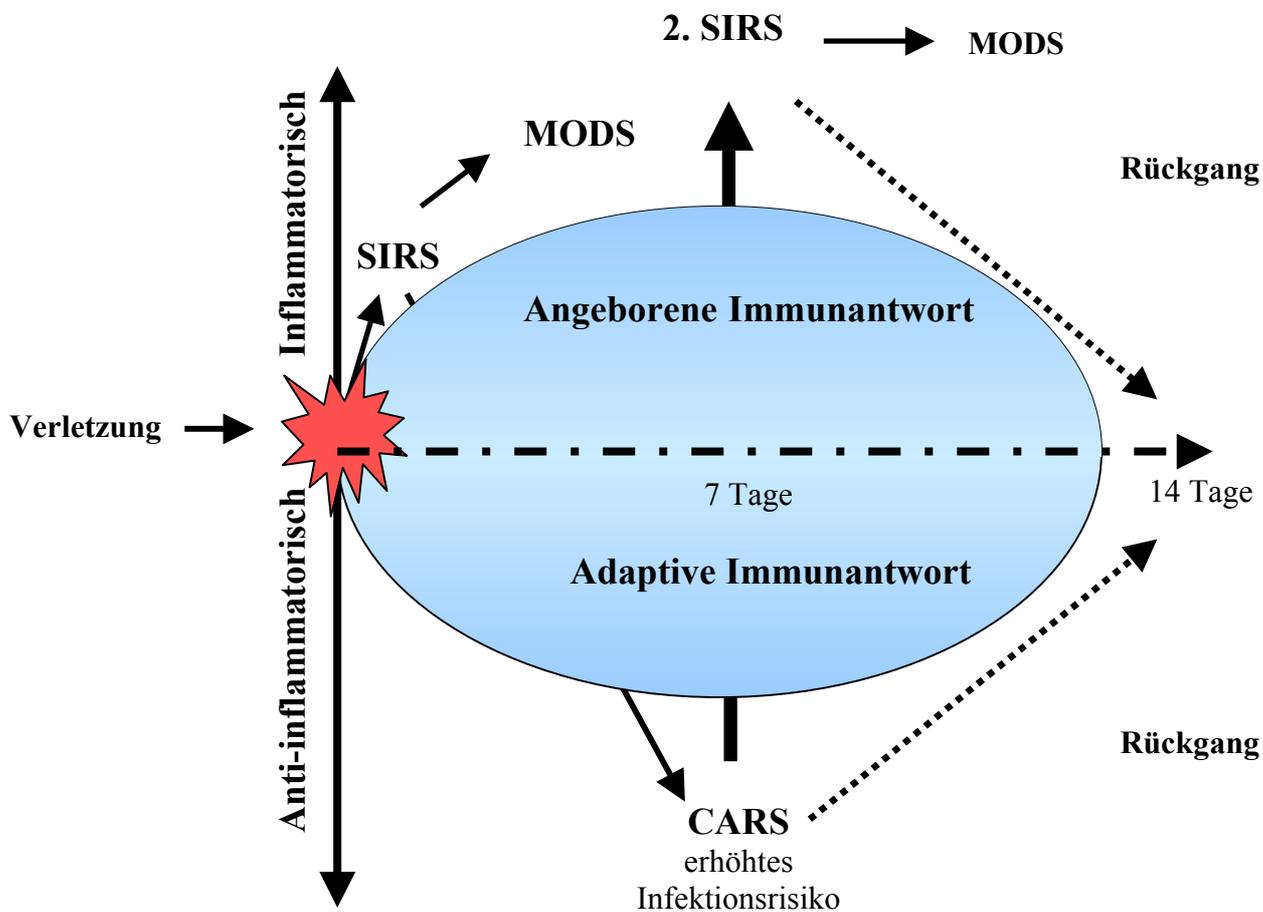
Frühe Untersuchungen über die Auswirkung einer Verletzung auf die adaptive Immunantwort bedienten sich der spezifischen Immunreaktion vom verzögerten Typ (*delayed-type hypersensitivity*, DTH). Die Ergebnisse der Studien zeigten bei schwerverletzten Patienten einen transienten Verlust der DTH Reaktionsfähigkeit nach Konfrontation mit standardisierten Antigenen (*recall antigens*) (20). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine verminderte DTH Reaktion mit einer Abnahme der Zellzahl von PBMCs einhergeht, die von einer verminderten IL-2 und IFN- γ Produktion und einer erhöhten Produktion der anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 begleitet wird (18;19). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Verletzungen einen phänotypischen Wechsel von der proinflammatorischen Th1 Zytokin Produktion zu einer Produktion inhibitorischer Th2 Zytokine induzieren (21). Weitere Tierexperimente zum Phänotyp-*Shift* (Phänotyp-Wechsel) zeigten eine verminderte Produktion des Th1-abhängigen Antikörper-Isotyps IgG_{2a} bei gleichbleibender Produktion

des Th2-abhängigen Antikörper-Isotyp IgG₁ (19). Die Infektanfälligkeit wird dadurch erhöht und begünstigt opportunistische Infektionen, die eine zweite SIRS hervorrufen können.

Die führende Todesursache bei schwerverletzten Patienten ist jedoch nicht SIRS oder CARS, sondern das multiple Organversagen (*multiple organ dysfunction failure*, MODS), das im Falle eines Versagens von 4 oder 5 Organen eine Mortalität von über 90% aufweist (7). Die Entwicklung des MODS geschieht über eine massive inflammatorische Reaktion des Wirtes auf eine Infektion, wie sie bei einem ersten oder zweiten SIRS auftritt (18;19). Bakterien und deren Komponenten wie z.B. LPS haben eine schädigende Wirkung auf das Endothel. Dabei wird die Expression des *Tissue* Faktors auf Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen induziert, was konsekutiv eine Gerinnungskaskade zusammen mit einer Beschleunigung der Thrombinproduktion (7;22) auslöst. Des weiteren produzieren aktivierte Monozyten den *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), wodurch es zu einer Hemmung der Fibrinolyse kommt. Für die Gegenregulation werden Proteine, die anti-koagulative Eigenschaften aufweisen, wie z.B. Antithrombin III, Protein C/ Protein S System und der *tissue factor pathway inhibitor* verbraucht. Um eine ausreichende Konzentration an Protein C zu gewährleisten aktivieren das endotheliale Protein Thrombomodulin (nach Bindung von Thrombin) und der endotheliale Protein C Rezeptor (EPCR) das Protein C, das durch Hemmung des PAI-1 die Fibrinolyse fördert. Jedoch ist aufgrund der Endothelschädigung während der Sepsis die Expression von Thrombomodulin und EPCR beeinträchtigt (7). Gleichzeitig verstärkt die Endothelschädigung die Aktivierung von inflammatorischen Zytokinen und begünstigt die vaskuläre Endotheldysfunktion. Die Kaskade der Aktivierung proinflammatorischer Zytokine, des Gerinnungssystems sowie der Aktivierung und Hemmung der Fibrinolyse führt zu Mikrozirkulationsstörungen und einer sich verstärkenden Hypoxie, die in einer Organdysfunktion und letztendlich im Tod endet (7).

Die folgende Abbildung stellt die Beziehung zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort nach einer Verletzung dar.

Abbildung 2 Schematische Darstellung der immunologischen und klinischen Folgen nach einer schweren Verletzung [modifiziert nach (18)]



1.1.3 Sepsiskandidatengene

Epidemiologische Studien belegten bereits früh eine hereditäre Prädisposition für Infektionserkrankungen (23). 1988 führten Sorensen et al. eine retrospektive Studie an Adoptivkindern (n= 960) durch, die kurz nach der Geburt fern von ihren biologischen Eltern aufwuchsen. Die Studie konnte zeigen, dass der vorzeitige Tod eines biologischen Elternteils signifikant assoziiert ist mit dem vorzeitigen Tod des Adoptivkindes. Die genauere Untersuchung der Todesursachen ergab insbesondere die hereditäre Prädisposition für Infektionserkrankungen (23) bzw. in der Antwort des Wirtes auf Infektionserkrankungen wie z.B. Sepsis (24). Hervorzuheben ist die klinische Beobachtung, dass Polytraumapatienten mit zunächst gleichem Verletzungsmuster unterschiedliche Krankheitsverläufe zeigen. Während einige Patienten eine unkontrollierte, systemische Entzündungsreaktion entwickeln, die zur Sepsis, Multiorganversagen und letztlich zum Tod führen, findet bei anderen Patienten eine

Rekonstitution statt. Für diese unterschiedlichen Krankheitsverläufe werden vor allem Varianten an Genen des Immunsystems verantwortlich gemacht. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Assoziationsstudien zur Identifikation von Kandidatengenen bei Infektionserkrankungen (25) speziell bei Sepsis (26) durchgeführt. Unter der Annahme, dass unterschiedliche Ausprägungen (Allele) eines Kandidatengens die Synthese und Freisetzung der entsprechenden Proteine und folglich einzelne Krankheitsverläufe beeinflussen, war die Assoziation von Allelen mit verschiedenen Phänotypen in diesen Studien von Interesse. So beobachteten Menges et al. die Assoziation des *Plasminogen-activator-inhibitor-1* (PAI-1) Genotyps PAI1-675 4G/4G mit erhöhten PAI-1 Plasmaspiegeln, einer geringen fibrinolytischen Aktivität und einer schlechten Prognose bei polytraumatisierten Patienten (27;28).

1.2 TNF und Sepsis

Der Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α) ist ein pleiotropes Zytokin, das eine entscheidende Bedeutung in der natürlichen Immunabwehr aufweist. Besonders hervorzuheben ist seine Rolle als essentieller Mediator bei Entzündungs-, Autoimmun-, und Infektionserkrankungen (29), insbesondere als wesentlicher Trigger der unkontrollierten systemischen Entzündungsreaktion (SIRS). Seine Bedeutung für das Sepsis-Syndrom bleibt kontrovers.

Präklinische Studien am Tiermodell zeigten, dass eine Neutralisation von TNF- α zum einen vor dem Tod nach einem Endotoxin-Schock schützt (30) und zum anderen während einer Bakteriämie vor einem septischen Schock schützt (31). Die Verabreichung von rekombinatem TNF- α löste klinische Manifestationen des Sepsis Syndroms und des septischen Schocks wie z.B. Hypotension, Aktivierung des Gerinnungssystems sowie Multiorgan dysfunktion aus [für eine Übersicht siehe (32)]. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse im Tiermodell wurden mehrere klinische Studien mit monoklonalen Antikörpern zur Neutralisation von TNF- α unternommen, mit dem Ziel dem Multiorganversagen bei Sepsispatienten vorzubeugen. Bisher konnte aber keine dieser Studien die Überlebensrate von Patienten mit Sepsis oder septischen Schock verbessern (33).

Die diskrepanten Ergebnisse der präklinischen und klinische Interventionsstudien bezüglich des Sepsis Syndroms liegen unter anderem darin begründet, dass die meisten Patienten zu Beginn der Studien bereits fortgeschrittene Krankheitsverläufe zeigten und möglicherweise eine effektive anti-TNF- α Therapie zu spät einsetzte. Hinzu kommt die Tatsache, dass

Patienten ungeachtet ihres Grundleidens in Studien einbezogen wurden und dass dadurch der tatsächliche Effekt einer anti-TNF- α Therapie maskiert wurde.

Widersprüchliche Ergebnisse wurden auch in klinischen Beobachtungsstudien, vor allem bei genetisch-epidemiologischen Fall-Kontroll-Studien beobachtet, die den Einfluss von TNF- α und von TNF Genvarianten auf das Sepsis-Syndrom untersucht haben. Während in einigen Studien die Assoziation von TNF und Lymphotoxin- α (LTA) Genvarianten mit der Inzidenz von Sepsis, septischem Schock und fataler Prognose berichtet wurde (34-44) konnte in anderen Studien keine Assoziation nachgewiesen werden (37;39;42;45-47). Ein möglicher Grund besteht darin, dass auch in den klinischen Beobachtungsstudien Patienten mit einer bereits entwickelten Sepsis, schweren Sepsis oder septischen Schock unabhängig von einer Grunderkrankung einbezogen wurden (34;38;40;42;43;45-48). Dabei ist eine prospektive Feststellung von Suszeptibilitätsfaktoren zur Entstehung von Sepsis vom Studiendesign her nicht möglich.

1.2.1 TNF- α Aufbau und Funktion

Im Jahr 1975 wurde in Mäusen nach Infektion mit Calmette-Guérin Bakterien (BCG) ein Endotoxin-induzierter Faktor isoliert, der die Fähigkeit hatte, in bestimmten Tumoren *in vivo* Nekrose zu induzieren (49). Aufgrund dieser Eigenschaft wurde der Faktor als Tumor-Nekrose-Faktor bezeichnet (49).

Neun Jahre später erfolgte die Isolierung und Analyse der zugehörigen cDNA aus aktivierten Makrophagen (50). Die Freisetzung von TNF- α erfolgt neben Makrophagen aus einer Vielzahl an hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen wie CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK (*natural killer*) Zellen, Endothelzellen, Astrozyten und anderen (50) als Antwort auf Entzündung, Verletzung und Infektion (51).

Neben TNF- α enthält die TNF-Ligandenfamilie weitere Typ-II-Transmembranproteine wie z.B. LT- β , Fas-L, CD40-L, LIGHT sowie das Glycoprotein Lymphotoxin alpha (LT- α) (52). Der TNF Genlocus ist innerhalb des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) der Klasse III auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 im Bereich der Bande 21.3 in 3' Region zum LTA Gen lokalisiert. (53;54). Die cDNA (2,7 kb) kodiert für das aus 233 Aminosäuren (AS) zusammengesetzte TNF- α Protein und hat 4 Exons unterbrochen von 3 Introns (50;54). Das membranständige TNF- α (26 kD) kann durch Metalloproteinasen zum löslichen Zytokin von 17 kD (17 kD) gespalten werden (55). TNF-

α sowie LT- α vermitteln ihre Wirkung, indem sie mit zwei Membranrezeptoren (TNF-RI mit einem MG von 55-60 kD und TNF-RII mit einem MG von 75-80 kD) interagieren (52).

Sequenzanalysen des TNF Genlocus (TNF und LTA) deuten darauf hin, dass diese Genregion hoch polymorph ist. Die Beobachtung von interindividuellen Schwankungen in der TNF- α Produktion (*high and low producer phenotype*) weist auf die Existenz funktionell verschiedener TNF Allele hin, die für die Regulation der Transkription und Produktion (29;56;57), sowie potentiell bei der Pathogenese verschiedener Infektions- und Autoimmunerkrankungen von Bedeutung sind (53).

1.2.2 Genetische Varianten des TNF Gens

Durch Mutations-Screenings konnten bisher 22 SNPs im TNF Gen identifiziert werden, von denen dreizehn SNPs in der Promotorregion lokalisiert sind (58;59). Ferner wurden im LTA Gen 8 SNPs und ein *tandem repeat* Polymorphismus entdeckt (58). Die folgende Tabelle zeigt die beschriebenen Polymorphismen im TNF und LTA Gen mit einer Frequenz von mindestens 1% des seltenen Allels in der kaukasischen Bevölkerung.

Tabelle 3 Polymorphismen im TNF Genlocus

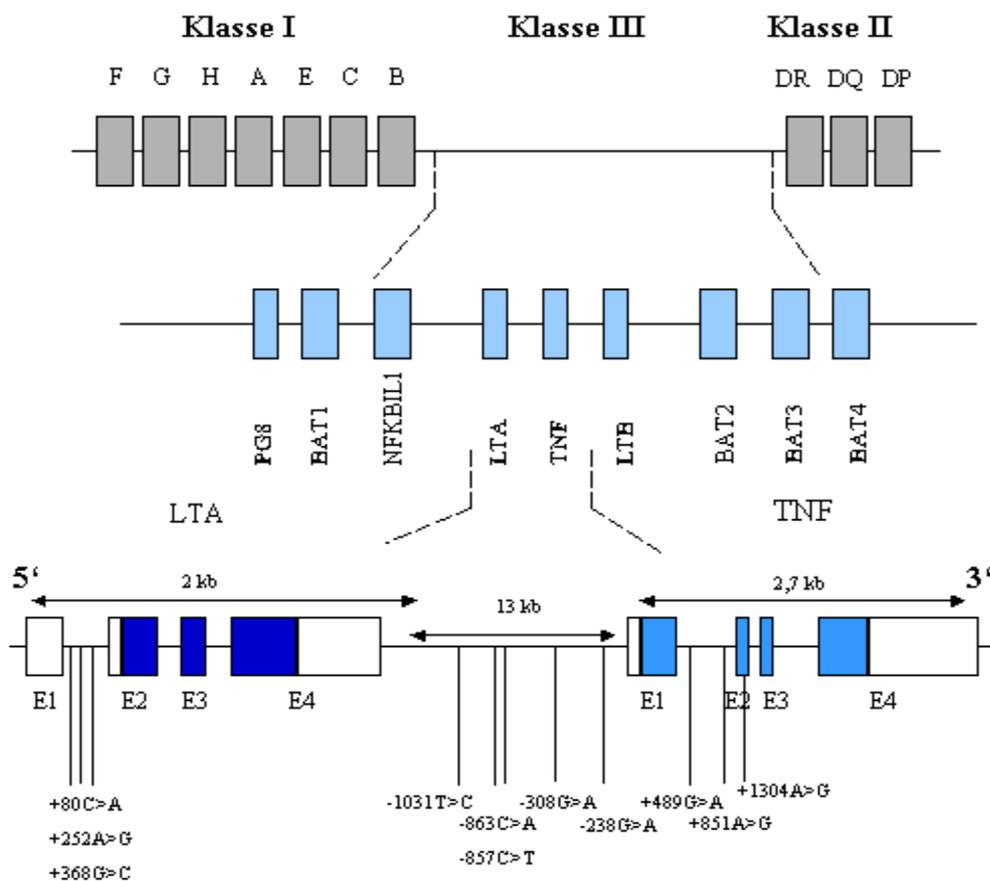
TNF SNP	Frequenz des seltenen Allels (%) ^a	LTA SNP	Frequenz des seltenen Allels (%) ^a
-238G>A	6	-294C>T	15,4
-308G>A	17,3	-293G>A	42,3
-376G>A	2,2	+10G>A	26,9
-857C>T	9	+80C>A	46,1
-863C>A	15,4	+252A>G	26,9
-1031T>C	23,1	+368G>C	46,1
+69G>C	0,6	+438(TC _n)	26,9
+70(C Insertion)	2	+495T>C	26,9
+489G>A	5	+723C>A	26,9
+691(G Deletion)	4,7		
+851A>G	8		

^aDie Frequenzen sind den Studien von Knight et al. und Simmonds et al. entnommen (58;59).

In der folgenden Abbildung wird schematisch der TNF Genlocus mit den häufigsten Polymorphismen innerhalb des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse III dargestellt.

Abbildung 3 Vereinfachte Darstellung des TNF Genlocus innerhalb der MHC –Region auf Chromosom 6q21.

Die Abbildung zeigt die Genorganisation von LTA und TNF mit den identifizierten SNPs mit einer Frequenz von >5% des seltenen Allels. Kodierende Exons (E= Exon) sind als farbige Balken dargestellt, während die 5' und die 3' untranslatierte Region (UTR= *untranslated region*) als weiße Balken präsentiert werden.



1.3 Interleukin-4 und Sepsis

Interleukin-4 ist ein zentraler Mediator der adaptiven Immunantwort und hat einen entscheidenden Einfluss auf die Pathogenese von Erkrankungen mit einer Dysregulation der Immunantwort (kompensatorisch nicht-entzündliche Reaktionen, Allergien, Asthma, Autoimmunerkrankungen) (9;60;61). Zu Beginn der Antwort des Organismus nach einer Infektion, einem Trauma, Schock oder einer Verbrennung kann es zu einer unkontrollierten Immunreaktion kommen, an der sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem beteiligt sind. Zunächst kommt es zur Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren, deren Wirkung durch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-10 kompensiert wird (9). Herrscht ein Überangebot an proinflammatorischen Zytokinen, kann die Reaktion von anti-inflammatorische Zytokinen nicht ausreichend kompensiert werden. Folglich entsteht ein SIRS, das sich anschließend durch ein Überangebot an anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-4, IL-10) in ein CARS entwickelt (18). Eine Besonderheit der CARS Antwort auf eine Verletzung stellt folglich der Th1/Th2-*switch* dar, an dem insbesondere IL-4 beteiligt ist (4). Als Schlüsselzytokin der IgE-Synthese wird die Bedeutung des IL-4 beim Sepsis-Syndrom durch die Beobachtung erhöhter Serum-IgE Spiegel bei Patienten nach Mehrfachverletzung verstärkt (62).

1.3.1 Aufbau und Funktion von IL-4

1982 erfolgte die Identifizierung des Interleukin-4 (IL-4) Proteins (13), das aufgrund seiner Bedeutung bei der B-Lymphozytenproliferation und Differenzierung als *B cell growth factor-1* bezeichnet wurde (63). Das humane IL-4 Gen, bestehend aus vier Exons und drei Introns ist auf dem langen Arm von Chromosom 5 (q23-31) lokalisiert (13). Die zugehörige cDNA (614 bp) des IL-4 Gens kodiert für das aus 153 Aminosäuren bestehende Protein (13). Das pleiotrope Zytokin IL-4 wird von aktivierten T-Lymphozyten (Th0 und Th2, jedoch nicht Th1), Mastzellen und Basophilen produziert. IL-4 reguliert eine große Anzahl von Zellfunktionen in B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und anderen hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen (13). Eine zentrale Rolle dieses Zytokins ist die Steuerung der Differenzierung und Proliferation von aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten (61), insbesondere die Förderung der Th2-Lymphozyten Differenzierung und

Hemmung der Differenzierung von IFN- γ produzierenden CD4⁺ T-Lymphozyten (64). IL-4 reguliert zudem den Immunglobulin Klassenwechsel nach IgE (65) und IgG4 (64) und steigert die Expression von MHC Klasse II Molekülen (66), CD23 (67) und des IL-4 Rezeptors (68) auf B-Lymphozyten. Zusammen mit TNF stimuliert IL-4 die Expression von VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) auf Endothelzellen und beeinflusst so Adhäsionsmechanismen von Leukozyten bei Entzündungen (69).

1.4 Interleukin-4 Rezeptor Komplex

IL-4 übt seine biologische Aktivität aus, indem es mit hoher Affinität an den Interleukin-4 Rezeptor (IL-4R) Komplex (Kd= 20-300 pM) bindet, der in geringer Zahl (100-5000) von verschiedenen hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen, wie T- und B-Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen, exprimiert wird (70;71).

Der Interleukin-4 Rezeptor ist ein Heterodimer bestehend aus zwei verschiedenen Proteinen, einer IL-4R α Kette (CD124) von 140 kDa, die IL-4 mit hoher Spezifität bindet und für die Signaltransduktion notwendig ist, und einer 65 kDa schweren *common* γ Kette (CD132), die eine essentielle Komponente verschiedener Rezeptorkomplexe für IL-2, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 bildet (70). Die *common* γ Kette ist allein nicht zur Signaltransduktion fähig, jedoch verstärkt sie die Signale der α -Kette (72), indem sie in lymphoiden Zellen die Affinität der IL-4R α Kette zum IL-4 um das 2-3fache erhöht (73).

Die Beobachtung, dass IL-4 Effekte auf Zellen ausübt, die die IL-4R α Kette, jedoch nicht die *common* γ Kette exprimieren, führte zu dem Schluss, dass zwei Klassen von IL-4 Rezeptorkomplexen existieren (70). Während der Typ I Komplex aus der IL-4R α Kette und der *common* γ Kette besteht, setzt sich der Typ II Komplex, der auf nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, aus der IL-4R α Kette und einem niedrig affinen IL-13 bindenden Protein (IL-13R α 1) zusammen (74;75). Mit dieser Kombination kann der Typ II Komplex sowohl IL-4 als auch IL-13 binden (60).

Neben der membrangebundenen Form der IL-4R α Kette existieren noch lösliche Rezeptorformen (shIL-4R α), die entweder durch limitierte Proteolyse (76) oder durch alternatives Spleißen des Exons 8 (77) entstehen. Die funktionelle Bedeutung von sIL-4R ist noch nicht genau geklärt. Möglicherweise verstärkt sIL-4R die IL-4 Bioaktivität oder inhibiert

die Interaktion von IL-4 mit dem membrangebunden IL-4R und führen dadurch zu einer Abnahme der Aktivität (70;78).

1.4.1 Interleukin-4 Rezeptor α Kette (IL-4R α)

Das zentrale Element des IL-4R Komplexes stellt die IL-4R α Kette dar, die für die Signaltransduktion von IL-4 und IL-13 ausschlaggebend ist. Strukturell lässt sich der IL-4R Komplex den Klasse I-Zytokin-Rezeptoren zuordnen, die durch zwei hochkonservierte extrazelluläre und aminoterminal gelegene Cystein-Paare und ein tryptophan- und serinreiches WSxWS-Motiv (W= Tryptophan, S= Serin, x= variabel) gekennzeichnet sind (13). Beide Merkmale scheinen für die Konformation des Rezeptors von Bedeutung zu sein (79).

1990 gelang die Klonierung der cDNA, die für das humane IL4R Gen kodiert (72;80). Das humane IL4R Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 16 im Bereich der Bande 12.1 lokalisiert. Die 3.6 kb cDNA kodiert für das IL-4R α Protein, das sich aus 825 Aminosäuren (AS) bzw. als reifes Protein aus 800 AS zusammensetzt. Es besteht aus einer extrazellulären Domäne von 207 AS, die über eine kurze Transmembranregion von 24 AS mit der intrazellulären Region, bestehend aus 569 AS, verbunden ist (72). Charakteristisch für die zytoplasmatische Region des IL-4R sind einige Motive, die sich in verschiedenen Studien als essentiell für die IL-4 induzierte Signaltransduktion erwiesen haben. Dazu gehört das Box1 Motiv, ein kurzes prolinreiches Motiv, das im Bereich der Aminosäuren 262-267 lokalisiert ist. Ungefähr 100 AS carboxyterminal befindet sich eine glutaminsäurereiche Region, die ID-1 Region. Ein distal zur Membran gelegenes Motiv ist das Insulin-Interleukin-4-Rezeptor (I4R) Motiv, dessen Nukleinsäuresequenz eine hohe Homologie mit einem Motiv der Rezeptoren für Insulin und den insulinähnlichen Wachstumsfaktor-1 (*insulin-like growth factor 1*, IGF-1) zeigt (81). Es enthält einen Tyrosinrest Y1 an Position 497. In der weiteren distalen Region der IL-4R α Kette befinden sich noch Tyrosinreste an Position 575, 603, 631 und 713 (Y2, Y3, Y4, Y5). Diese und wahrscheinlich noch andere bisher nicht identifizierte Regionen nehmen in der Übermittlung des IL-4 Signals durch den IL-4R einen bedeutenden Platz ein.

1.5 Signalwege

Das Auslösen der Signalkaskade erfolgt nach Bindung des Liganden an den IL-4R Komplex mit anschließender Dimerisation des Komplexes. Dies resultiert in der Aktivierung von Proteinkinasen, die intrazelluläre Substrate phosphorylieren und dadurch eine Signalkaskade initiieren.

Im folgenden Abschnitt werden die beiden bekanntesten Signaltransduktionswege des IL-4, die bis zur Genexpression und Zellproliferation führen, vereinfacht vorgestellt.

1.5.1 JAK-STAT-Signaltransduktionsweg

Ein wichtiger Signaltransduktionsweg, der durch Zytokine induziert wird und der direkt Signale von der Zellmembran zum Zellkern transferiert, ist der JAK (Janus Kinase) –STAT (*signal transducer and activator of transcription*) –Weg (siehe *review* (34) und (41)).

Die Tyrosin-Kinasen der Janus-Familie sind entscheidend für den Beginn der Signalkaskade bei hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Rezeptoren. Die Familie der daran beteiligten JAK-Kinasen besteht aus den Mitgliedern JAK1, JAK2, JAK3 und Tyk2. Diese sind bekannte Tyrosin-Kinasen, die nach einer IL-4 abhängigen Stimulierung des IL-4R im Bereich der Box1 phosphoryliert und somit aktiviert werden (82). Die Aktivierung von JAK1 und JAK3 kommt in verschiedenen hämatopoetischen Zelltypen wie B- und T-Lymphozyten sowie Monozyten vor (83), während in nicht hämatopoetischen Zellen die Bindung von IL-4 zur Phosphorylierung und Aktivierung von JAK1 und Tyk2 führt (82). Eine JAK2 Aktivierung ist lediglich in humanen Kolonkarzinomzellen beschrieben worden (70).

Die Aktivierung der JAK-Kinasen resultiert in der Phosphorylierung von spezifischen Tyrosinresten in der zytoplasmatischen Domäne der IL-4R α Kette mit nachfolgender Rekrutierung sowie Aktivierung der Zytoplasmaproteine STAT-6 (70). STAT-6, dessen Gen beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 12 im Bereich der Bande 13-14 lokalisiert ist (84), bindet über eine *Src* homologe SH2-Domäne an die phosphorylierten Tyrosin-Reste Y2, Y3 und Y4 (Y575, Y603, Y631) (64;65). Die aktivierten Kinasen ermöglichen dann die Phosphorylierung des STAT-6 am C-terminalen Tyrosin-Rest (85). Nach der Phosphorylierung löst sich STAT-6 von der IL-4R α Kette und bildet Homodimere durch die Interaktion seiner SH2-Domäne mit dem C-terminalen Phosphotyrosin-Rest eines

zweiten STAT-6 Moleküls. Der dimerisierte STAT-6 Komplex gelangt zum Zellkern, wo er dort an spezifische DNA Bindungsstellen (*GAS-like sequences*) mit der Sequenz TTC-N₄-GAA in der Promoter Region von IL-4 induzierbaren Genen (CD23, MHC II, IL4R) bindet und so die Transkription dieser Gene aktiviert (86).

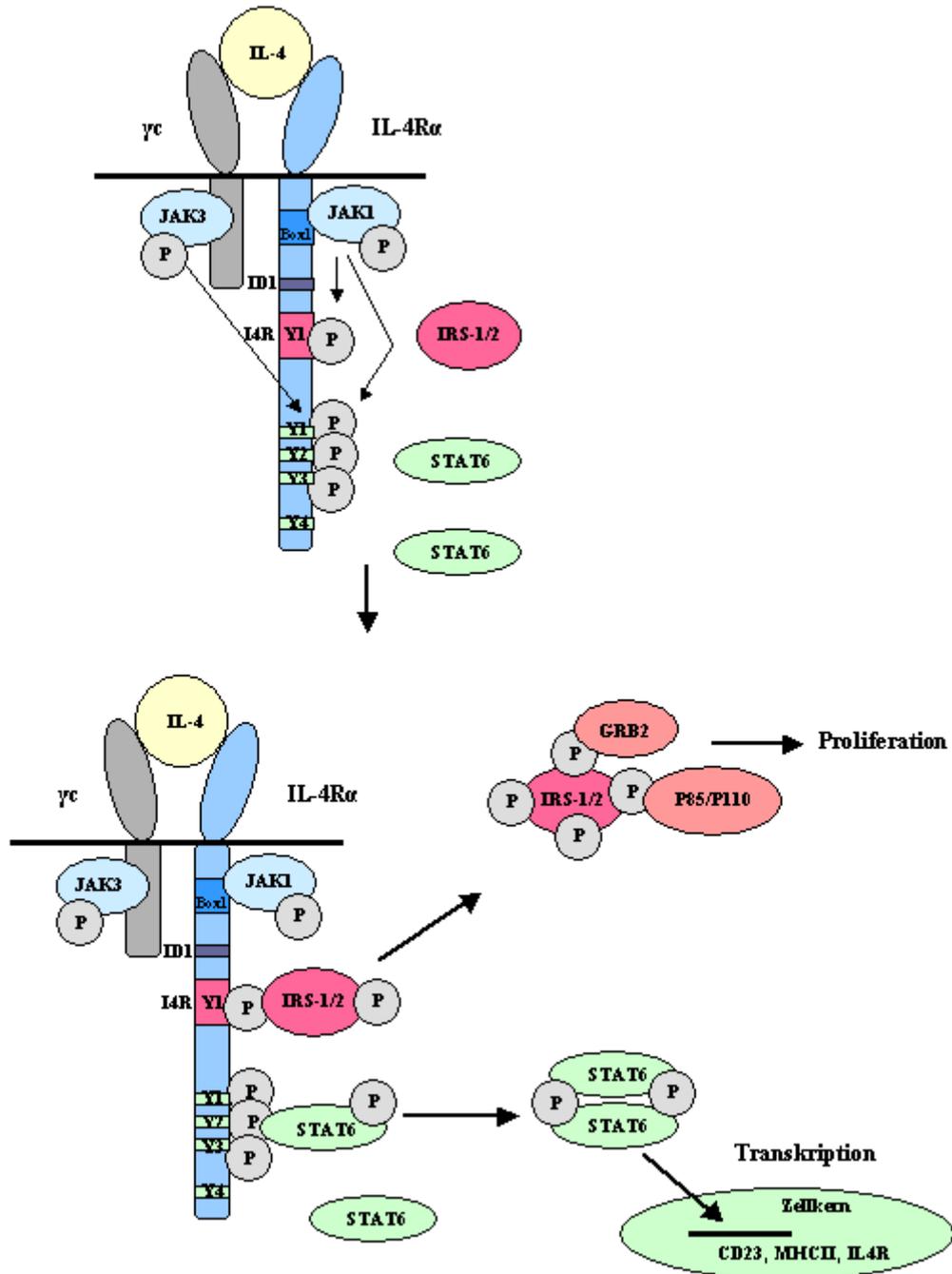
1.5.2 IRS-1/ IRS-2- Signaltransduktionsweg

Während die STAT-6 Aktivierung notwendig für die Expression von IL-4 induzierten Genen ist, spielt das Insulin-Rezeptor-Substrat Molekül (IRS) eine wichtige Rolle bei der IL-4 und IL-13 induzierten Zellproliferation (64). IL-4 induziert eine Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine unter anderem eines 170 kDa Proteins, das zuerst als 4PS (*4-phosphotyrosine substrate*) oder p170 bezeichnet wurde (82). Da das Protein 4PS strukturell große Ähnlichkeiten mit dem Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS-1) aufwies, wurde es als IRS-2 benannt (64). In peripheren humanen T-Lymphozyten werden sowohl IRS-1 als auch IRS-2 Moleküle nach IL-4 Stimulation exprimiert. Indessen stellt das IRS-2 in hämatopoetischen T- und B- Lymphozyten das Hauptsubstrat dar, das von IL-4 aktiviert wird (60).

Für die Aktivierung der IRS-1/2 Proteine werden diese zunächst an den ersten zytoplasmatischen Tyrosinrest Y1 (Y497) der IL-4R α Kette rekrutiert. Durch eine vorangehende Interaktion von JAK1 mit der Membran-proximalen Domäne der IL-4R α Kette ist der Tyrosinrest Y1, der in der funktionellen Domäne des Insulin IL-4 Rezeptor Motivs (I4R) liegt, bereits phosphoryliert. Die IRS-1/2 Proteine binden anschließend über ihre charakteristischen PTB (*phosphotyrosine –binding domain*) – Domänen an den Phosphotyrosinrest Y1 und werden dadurch selbst phosphoryliert und aktiviert (60;82). Aktivierte IRS-1/2 Proteine fungieren über SH2-Domänen als Ankerproteine für andere Signalmoleküle, wodurch die Signaltransduktion weitergeleitet wird. Zu diesen Molekülen gehört eine Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase und das Adaptermolekül Grb-2. Interaktionen mit diesen Molekülen führen zu der Aktivierung des PI-3-Kinase (Phosphatidylinositol 3-Kinase) - und des Ras/MAPK (*mitogen activated protein kinase*) – Signalweges (87).

Abbildung 4 Aktivierung der Signaltransduktionswege über den IL4R

Nach Aktivierung der Januskinasen kommt es zur Phosphorylierung der Tyrosinreste der alpha-Kette des IL-4R. An dem phosphorylierten Tyrosinrest Y1 im I4R Motiv kann IRS-1/2 binden, das anschließend nach Phosphorylierung durch die Januskinasen andere Signalmoleküle binden kann und über bisher noch ungeklärte Mechanismen zur Proliferation der Zelle führt. Die durch Januskinasen phosphorylierten Tyrosinreste im C-terminalen Bereich des IL-4R bilden Bindungsstellen für STAT6, das nach einer Phosphorylierung mit einem weiteren STAT6 Molekül dimerisiert und als Homodimer zum Zellkern transloziert. Dort bindet es an spezifische Bindungsstellen der Promotoren von IL-4 induzierbaren Genen und aktiviert die Genexpression.



Um eine ungehemmte Stimulation des IL4R Komplexes zu verhindern, gibt es einige nur wenig bekannte Gegenregulatoren zur Inaktivierung der Signaltransduktionswege wie z.B. die Tyrosinphosphatase SHP-1 (*SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 1*), die Phosphatase SHIP (*SH-2 containing inositol-5-phosphatase*) (88) und die SOCS (*suppressor of cytokine signalling*) – Proteine (82).

1.5.3 Funktionelle Regionen des IL-4 Rezeptors

Die hier dargestellten Signaltransduktionswege, die entweder durch die Aktivierung der IRS-1/2 Moleküle zur Proliferation der Zelle oder durch die Aktivierung von STAT6 zur Expression verschiedener Gene führen, geben nur die bisher bekanntesten Abläufe und wahrscheinlich auch nur einen kleinen Teil der Signaltransduktion wieder. Zahlreiche Studien (61;65;89-96), die funktionell die Vorgänge der IL-4 induzierten Zellproliferation und Genexpression untersucht haben, zeigen widersprüchliche Ergebnisse (siehe Kapitel 4).

Dennoch zeigten sich in vielen Untersuchungen übereinstimmend essentielle Regionen der IL-4R α Kette und Signalmoleküle für die IL-4 induzierte Signaltransduktion. Die zwei nachfolgenden Tabellen fassen die wichtigsten Regionen der zytoplasmatischen IL-4R α Kette mitsamt den Signalmolekülen und ihren Funktionen zusammen.

Tabelle 4 Zusammenfassung bedeutender Regionen der IL-4R α Kette [in Anlehnung an (97)]

Region	AS-Bereich	Funktion
Box 1	262-267	Aktivierung von JAK1 und JAK3
ID-1	328-368	Zellproliferation, Aktivierung von STAT-6
I4R	437-557	Aktivierung von JAK3 und STAT-6, Tyrosinphosphorylierung von IRS-1/2, Zellproliferation
Y497	497	Zellproliferation, Tyrosinphosphorylierung von IRS-1/2
Y575, Y603, Y631	575, 603, 631	STAT-6 Aktivierung, Genexpression

Tabelle 5 **Signalmoleküle der IL-4 Signaltransduktion und ihre Funktion**
 [in Anlehnung an (97)]

Signalmolekül	Zellfunktion
JAK1, JAK3,	Beginn der Signaltransduktion durch Auslösen der Phosphorylierung der Signalmoleküle
STAT-6	Aktivierung der Transkription
IRS-1/2	Zellproliferation, Adaptermolekül für Signalmoleküle
PI-3-Kinase	Regulation der Bildung von Phosphoinositiden

1.6 Genetische Varianten des IL4R Gens

Da IL-4 seinen immunregulatorischen Einfluss über den IL-4R vermittelt, stellt das IL4R Gen ein wichtiges Kandidatengen für Erkrankungen dar, die mit einer Dysregulation der Immunantwort einhergehen.

Nach einem Mutationsscreening im kodierenden Teil des Gens wurden fünfzehn Punktmutationen (*single-nucleotide polymorphisms*, SNPs) identifiziert, von denen neun zu einem Aminosäureaustausch führen (91;98;99). Elf dieser SNPs befinden sich im Exon 9, das für mehr als zwei Drittel des reifen Proteins kodiert. Die folgende Tabelle zeigt die bisher beschriebenen Polymorphismen im IL4R Gen.

Tabelle 6 Punktmutationen im kodierenden Bereich des humanen IL4R Gens.

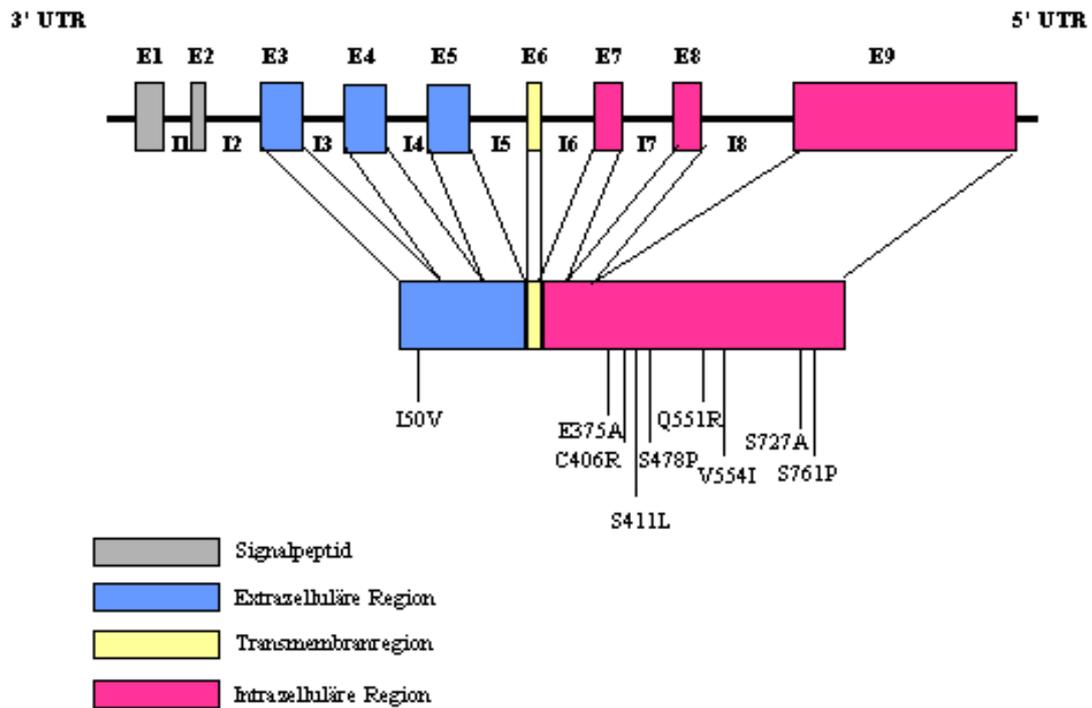
Die cDNA-Positionen korrespondieren mit der cDNA Sequenz von Idzerda (72).

cDNA- Position	Wildtyp	Mutation	AS-Polymorphismus	Frequenz des seltenen Allels (%)^a
398	ATC	GTC	I50V	43,99
676	AAC	AAT	N142N	
997	CTC	CTG	L249L	
1114	TTT	TTC	F288F	
1373	GAG	GCG	E375A	10,76
1417	CTG	CTT	L389L	n
1466	TGC	CGC	C406R	10,76
1468	TGC	TGT	C406C	
1474	CTT	CTC	L408L	
1481	TCG	TTG	S411L	2,53
1682	TCC	CCC	S478P	15,51
1901	CAG	CGG	Q551R	17,1
1904	GTA	ATA	V554I	
2429	TCC	GCC	S727A	
2531	TCA	CCA	S761P	

^a Die Frequenzen sind einer Studie von Hackstein et al. entnommen (100).

In der folgenden Abbildung wird schematisch die Genorganisation des IL4R Gens mit den dazugehörigen SNPs gezeigt. Das Signalpeptid wird von zwei Exons kodiert (E1, E2), die extrazelluläre Region des IL4R wird von drei Exons kodiert (E 3-5), die Transmembranregion (TM) von einem Exon (Exon 6) sowie die intrazelluläre Region von drei Exons (Exon 7-9).

Abbildung 5 Schematische Darstellung der Organisation des humanen IL4R Gens

E: Exon, I: Intron, UTR: *untranslated region*

1.7 Zielsetzung

1988 konnte die Arbeitsgruppe Sorensen et al. in epidemiologischen Studien eine hereditäre Prädisposition für Infektionserkrankungen belegen. In einer retrospektiven Studie an Adoptivkindern, die nach der Geburt fern von ihren biologischen Eltern aufwuchsen, konnten sie zeigen, dass ein vorzeitiger Tod eines biologischen Elternteils signifikant assoziiert ist mit dem vorzeitigen Tod des Adoptivkindes (23). Eine genaue Untersuchung der Todesursachen ergab insbesondere die hereditäre Prädisposition für Infektionserkrankungen. Dieses erklärt möglicherweise die klinische Beobachtung, dass Patienten mit zunächst gleicher Verletzungsschwere nach einem Polytrauma unterschiedliche Krankheitsverläufe zeigen. Während einige Patienten eine unkontrollierte, systemische Entzündungsreaktion entwickeln,

die zu einem Multiorganversagen und zum Tod führt, findet bei anderen Patienten eine Rekonstitution statt. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung und Identifikation genetischer Varianten, die auf die Regulation der Immunantwort Einfluss haben.

Zur Untersuchung der *Common Variant- Common Disease* Hypothese wurde als ein Schlüsselgen der adaptiven Immunantwort das IL4R Gen gewählt. Dabei sollte untersucht werden, welche Auswirkung natürlich vorkommende IL4R Genvarianten, die durch den Austausch einer Aminosäure zu einer Änderung des Rezeptorproteins führen, auf die Weiterleitung des Signals in die Zelle haben.

Hierzu sollten stabil transfizierte T und B-Zelllinien, die den Wildtyp der IL-4R α Kette oder eine Genvariante (S478P, I50V+Q551R) exprimieren, hergestellt werden und anschließend durch Bestimmung der intermediären Phänotypen Zellproliferation und IL-4 induzierte CD23 Expression auf ihre Funktion in der Signalweiterleitung untersucht werden. Des weiteren sollte für alle bekannten kodierenden IL4R Varianten die Assoziation mit dem proximalen Phänotyp Serum-IgE Spiegel *in vivo* geprüft werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob genetische Varianten am TNF Promotor mit der Entstehung eines Sepsis-Syndroms assoziiert sind. In einer prospektiven Kohortenstudie, die nach den Kriterien der modernen genetisch-epidemiologischen Methodik durchgeführt wird, sollte festgestellt werden, welche Auswirkungen nicht kodierende TNF Genvarianten auf den klinischen Verlauf nach einem Polytrauma haben. Dabei stehen drei Fragen im Mittelpunkt dieser Untersuchung:

1. Besteht ein Zusammenhang zwischen einem TNF-Genotyp und dem TNF- α Plasmaspiegel?
2. Besteht eine Assoziation zwischen einem TNF-Genotyp und der Entstehung einer Sepsis?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen einem TNF-Genotyp und der Prognose nach einem Polytrauma?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Kleinmaterial

<i>Blue-cap-tubes</i> 15 ml	Fa. Falcon, Heidelberg
<i>Blue-cap-tubes</i> 50 ml	Fa. Falcon, Heidelberg
Einfrierampullen <i>cryo tubes</i>	Fa. Nunc Intermed, Dänemark
Meßküvette	Helma Mikro Typ 105, Fa. Kalensee, Giessen
Neubauer Zählkammer	Fa. Kalensee, Giessen
Pasteurpipette 3 ml	Fa. Falcon, Heidelberg
PCR-Mikrotiterplatten	Fa. Applied Biosystems, Darmstadt
Petrischale 5 ml	Fa. Falcon, Heidelberg
Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Ahrensburg
Polaroidfilm	Sofortbildfilm I, p667, Fa. Polaroid
Racks Potilabo-Reaktionsgefäßständer	Fa. Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,7 ml	Fa. Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten 1/2/5/10/25 ml	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen 5/ 25 ml	Fa. Braun, Melsungen
Sterilfilter Minisart	Fa. Sartorius, Göttingen
Zellkulturflaschen 40 ml	Fa. Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten 96/24/6-Loch	Fa. Greiner, Nürtingen

2.1.2 Reagenzien

Aqua dest.	Fa. Braun, Melsungen
Agarose	Fa. Gibco/BRL, Eggenstein
Amplitaq® Gold Polymerase	Fa. Perkin Elmer, New Jersey, USA
BSA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Fa. Sigma, Deisenhofen

CellFix	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
<i>Cellwash</i>	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Desoxynukleotide	Fa. Boehringer Mannheim, Mannheim
DMEM	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
DNA-Molekulargewichtsstandard	Fa. New England Biolabs
Essigsäure	Fa. Roth, Karlsruhe
Ethanol 70%	Riedel-de Haen®, Seelze
Ethidiumbromid	Fa. Dianova, Hamburg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fa. Pharmacia, Freiburg
FBS	PAN Systems GmbH, Aidenbach
FCS	Fa. PAA Laboratories, Linz, Austria
Genomic DNA Purification Kit	Puregene® Genra Systems, Minnesota, USA
G418	Fa. PAA Laboratories, Linz, Austria
L-Glutamin	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Interleukin-4	Fa. PromoCell, Heidelberg
Interleukin-2	Fa. Boehringer Mannheim, Mannheim
Isopropanol	Riedel-de Haen®, Seelze
Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersbach
PBS	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Fa. PAA Laboratories, Linz, Austria
Polybren	Fa. Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Saccharose	Fa. Merck, Darmstadt
TaqMan® Oligonukleotide	Applied Biosystems, Darmstadt
TaqMan® Sonden	Applied Biosystems, Darmstadt
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq-Puffer 10 x	Fa. Perkin Elmer, USA
Trypanblau	Fa. PAA Laboratories, Linz, Austria

2.1.3 Antikörper

Primäre Antikörper, die in den einzelnen Versuchen eingesetzt wurden, sind in Tabelle 7 und 8 erfasst. Die eingesetzten Konzentrationen der Antikörper sind in den Versuchsbeschreibungen angegeben.

Tabelle 7 Monoklonale Antikörper gegen humane Zelloberflächenproteine

Antikörper	Markierung	Klon	Wirtsspezies	Isotyp	Hersteller	Referenz
CD19	PE	J4.119	Maus	Maus IgG ₁	Immunotech ^a	(101)
CD23	FITC	9P25	Maus	Maus IgG ₁	Immunotech ^a	(102)
CD124	PE	S4-56C9	Maus	Maus IgG ₁	Immunotech ^a	(72)

^aImmunotech (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)

Tabelle 8 Monoklonale Antikörper gegen murine Zelloberflächenproteine

Antikörper	Markierung	Klon	Wirtsspezies	Isotyp	Hersteller	Referenz
CD 23	PE	B3B4	Ratte	Ratte IgG2a	Caltag ^a	(103)
CD 45R (B220)	FITC	RA3-6B2	Ratte	Ratte IgG2a	Caltag ^a	(104)

^aCaltag Laboratories (Hamburg, Deutschland)

2.1.4 Zelllinien

Die murine A20 Zelllinie ist eine BALB/c B- Lymphomlinie, die ihren Ursprung im Stamm BALB/cAnN hat (105). Die Kultivierung der A20 Zellen erfolgte im *Rosewell Park Memorial Institute Medium* (RPMI) 1640 (Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland), ergänzt durch die Zugabe von 2mM L-Glutamin (Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und fetalem Kälberserum (FCS, 10%) (PAA Laboratories, Linz, Austria). Bei den CTLL-2 Zellen handelt es sich um murine Zellen, die von cytotoxischen T-Lymphozyten einer C57BL/6 Maus stammen (105). CTLL-2 Zellen werden in RPMI 1640, dem 2mM der essentiellen Aminosäure L-Glutamin, 10-20 IU/ml murines rekombinantes Interleukin 2 (IL-

2) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) und 10% fetales Rinderserum (FBS) (PAN Systems GmbH, Aidenbach, Deutschland) zugesetzt wurden, kultiviert. Eine weitere eingesetzte Zelllinie ist die ecotrope Verpackungszelllinie Phoenix, die zur Herstellung ecotroper Retroviren genutzt wird. Sie hat ihren Ursprung in der 293 T-Zelllinie, einer humanen embryonalen Nierenzelllinie, die mit dem Adenovirus E1a transformiert wurde (106). Phoenix Zellen werden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland), das mit FCS (10%), Penicillin-Streptomycin (1%) (PAA Laboratories, Linz, Austria) und L-Glutamin (1%) angereichert wurde, kultiviert. Die ecotrope Verpackungszelllinie Phoenix wurde freundlicherweise von Dr. Slany, Lehrstuhl für Genetik der Naturwissenschaftlichen Fakultät (Universität Erlangen), zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Humane IL4R Konstrukte

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen IL4R Konstrukte wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit erstellt. Die Diplomarbeit mit dem Titel „Klonierung und Mutagenese des humanen Interleukin-4 Rezeptor- Gens“ wurde im Studiengang Ernährungswissenschaften am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Giessen, angefertigt.

Bei den IL4R Konstrukten handelt es sich um folgende:

1. IL4R Wildtyp
2. IL4R Variante S478P
3. IL4R Variante I50V + Q551R

Alle Konstrukte liegen im Expressionsvektor pM5neo (107), der freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. Gessner aus dem Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universität Erlangen, zur Verfügung gestellt wurde.

2.2 Methoden

2.2.1 Nomenklatur

In der vorliegenden Arbeit wird die Empfehlung der *Gene Nomenclature Working Group* verwendet (108-110). Die hier beschriebenen Nummern der IL-4R α Ketten *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) korrespondieren mit dem reifen IL-4R α Protein (CD124), wie es bei Idzerda et al. (72) beschrieben ist. Die für die IL-4R α Kette kodierende Sequenz von Idzerda et al. (72) wurde als Wildtyp definiert und Abweichungen als Mutation bezeichnet. Die Sequenzdaten des humanen IL4R und des humanen TNF, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden, wurden der Datenbank *GenBank* am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) unter den Zugangsnummern AC004525 (IL4R), AY214167 (TNF) und AY216498 (LTA) entnommen. Die Bezeichnung Haplotyp wurde verwendet, um bestimmte Kombinationen von SNPs, die gemeinsam an demselben Chromosom auftreten, zu beschreiben.

2.2.2 Transfektion

2.2.2.1 Transfektion von CTLL-2 Zellen

Für die Transfektion wurden murine zytotoxische T-Zellen der Zelllinie CTLL-2 verwendet. CTLL-2 Zellen exprimieren die murine *common γ* Kette, die mit der α Kette des humanen IL-4R heterodimerisieren kann (72;89;111;112).

Mittels Elektroporation wurden CTLL-2 Zellen mit zwei der IL4R Konstrukte transfiziert. Bei den IL4R Konstrukten handelt es sich um folgende:

1. IL4R Wildtyp
2. IL4R Variante S478P

2.2.2.2 Elektroporation

Bei der Elektroporation wird durch einen kurzen elektrischen Impuls die Zellmembran der CTLL-2 Zellen kurzfristig permeabilisiert. Dadurch kann die Plasmid DNA aus der Lösung in die Zelle gelangen. Für die Transfektion wurden 1×10^7 CTLL-2 Zellen in einer Küvette bei 0°C und einer Feldstärke von 2 kV/cm mit $20\ \mu\text{g}$ Plasmid DNA der IL4R Konstrukte elektroporiert. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen im nichtselektiven Medium bestehend aus RPMI 1640, 10% FBS und 50 U/ml IL-2 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland). Nach 24 h wurden die Zellen auf ein selektives Medium umgestellt, in dem nur Zellen überleben, die DNA aufgenommen haben. Von ihnen überlebten die nächsten Wochen nur diejenigen, die transfizierte DNA ins Genom integriert hatten und dessen Gene exprimierten. Diese Zellen konnten dann geerntet und weiterverarbeitet werden.

2.2.2.3 Stabile Transfektion

Bei einer stabilen Transfektion wird die DNA in das Genom der Zelle integriert und ist dort vor dem Abbau geschützt. Wenn das DNA-Konstrukt einen Selektionsmarker enthält, ist es möglich, auf stabil transfizierte Zellen zu selektionieren. Die Selektion stabil transfizierter Zellen erfolgt prinzipiell auf zwei Wegen: durch Komplementation oder durch dominante Marker. Hier wurde die Selektion über dominante Marker angewendet. Dabei werden die Zellen mit einem dominanten Reportergen, meist einem Resistenzgen, kotransfiziert. Die selektiven Bedingungen erhält man durch Zugabe einer zytotoxischen Substanz in das Medium, die durch das Produkt des Resistenzgens abgebaut wird.

2.2.2.4 Selektion der CTLL-2 Zellen

Die Plasmide, mit denen die CTLL-2 Zellen transfiziert wurden, beinhalten außer einem Ampicillin-Resistenzgen noch das Neomycinresistenzgen, das für die Aminoglykosid-Phosphotransferase (APH, *neo*; Neomycin/G418 Resistenz) kodiert. Daher wurde dem Selektionsmedium zusätzlich zu den Komponenten des Vollmediums noch 1 mg/ml G418 (PAA Laboratories, Linz, Austria) zugesetzt.

2.2.3 Zellproliferation

2.2.3.1 Proliferationstest durch Einbau von [³H]-Thymidin

Als Maß für die Proliferation von Zellen diente der Einbau von Tritium [³H]-markiertem Thymidin in neu synthetisierte DNA. CTLL-2 Zellen wurden nach Waschen mit saurem Medium zu jeweils 1×10^4 Zellen pro *well* in 96-well Flachboden-Mikrotiterplatten (Fa. Greiner, Nürtingen) ausgesät. Anschließend wurde rekombinantes humanes IL-4 (Titration 40 ng/ml bis 0.15 ng/ml in 2er Verdünnungsstufen, PromoCell, Heidelberg) sowie rekombinantes murines IL-2 als Positivkontrolle und Medium ohne Wachstumsfaktoren als Negativkontrolle in Triplikaten in einem Gesamtvolumen von 200 μ l pro *well* zugegeben. Nach 48 h Proliferation im Brutschrank wurden die Zellen für weitere 24 h mit [³H]-Thymidin (finale Konzentration 0.5 μ Ci/ *well* in 50 μ l Medium) inkubiert. Mit Hilfe eines Zellerntegerätes (PHD Cell Harvester, Dunn Labortechnik, Asbach, Deutschland) wurden die Zellen auf Filterplättchen transferiert und ihre Radioaktivität mit einem β -Counter (LS 1801 Szintillationszähler, Beckmann, München, Deutschland) gemessen. Als Maß für die Proliferation gelten die gezählten Ereignisse pro Minute (*counts per minute, cpm*).

2.2.4 Retroviraler Gentransfer mit 293-Phoenix (E) Zellen

2.2.4.1 Produktion von Retroviren

Die Produktion von Retroviren erfordert zwei Komponenten, zum einen eine Verpackungszelllinie und zum anderen einen retroviralen Vektor (Abb. 6). Der retrovirale Vektor kodiert nicht für retrovirale Proteine, sondern verfügt nur über das Verpackungssignal ψ und die retroviralen 5'- und 3' *long terminal repeats* (LTR), die eine Insertionsstelle für das zu übertragende Gen, in diesem Fall das IL4R Gen, sowie einen Selektionsmarker flankieren. Die Verpackungszelllinie stellt die retroviralen Proteine zur Verfügung, die für die Verpackung der Vektor-RNA und somit für die Erzeugung retroviraler Partikel notwendig sind. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Generierung viraler Überstände ecotrope 293-Phoenix (E) Verpackungszellen verwendet, die transient mit dem retroviralen Vektor pM5neo, einem Plasmid, kotransfiziert wurden. Der pM5neo Vektor hat seinen Ursprung im

myeloproliferativen Sarkoma Virus (MPSV), einem Abkömmling des Moloney-Maus-Leukämie Virus (107). Er enthält 3000 Basenpaare (bp) und besitzt als Selektionsmarker das Neomycinresistenzgen (neo^R), das eine Selektion mit G418 erlaubt (107).

Zum Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen, die in der Zellkultur gehalten werden, existieren unterschiedliche Methoden. In der vorliegenden Arbeit wurden über eine Standard Calcium-Phosphat Transfektion ecotrope 293-Phoenix (E) Verpackungszellen zum einen mit dem IL4R Konstrukt I50+Q551 (Wildtyp) und zum anderen mit dem IL4R Konstrukt V50+R551 (Variante) transfiziert. Bei der Transfektion des pM5neo Vektors, welcher das gewünschte IL4R Konstrukt enthält, in die Zelle wird die ungespleißte mRNA des retroviralen Vektors als virale mRNA verpackt. Auf diese Weise entstehen infektiöse virale Partikel, die in den Zellüberstand abgegeben werden (Abb. 6). Das verwendete Protokoll für die Retrovirusproduktion ist in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9 **Versuchsablauf zur Gewinnung retroviraler Überstände**

Tag 1		Aussaat von 1×10^6 293-Phoenix (E) Zellen in 10 ml Medium in eine 10 cm Kulturschale
Tag 2	nach 1 h	Mediumwechsel Standard Calcium-Phosphat-Transfektion mit den IL4R Konstrukten im Vektor pM5neo nach Angaben von Schreiner et al. ((113))
	nach 6-10 h	Mediumwechsel
Tag 3	nach 16-18 h	Mediumwechsel mit 5 ml frischem Medium
Tag 4	nach 24 h	Ernte des Retrovirusüberstandes, Mediumwechsel mit 5 ml frischem Medium
Tag 5	nach 24 h	Erneutes Ernten des Retrovirusüberstandes

2.2.4.2 Gewinnung retroviraler Überstände

Zur weiteren Verwendung werden die retroviralen Überstände, die am Tag 4 und Tag 5 gewonnen wurden, in einem 50 ml *blue cap* (Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, France) vereinigt. Anschließend werden virusproduzierende Zellen und Zellreste durch

Zentrifugation bei 1200 x g für 5 min entfernt. Der Überstand wurde direkt für eine Transduktion verwendet oder kryokonserviert.

2.2.4.3 Kryokonservierung retroviraler Überstände

Für eine spätere Verwendung wurden retrovirale Überstände bei -70 °C kryokonserviert. Die zentrifugierten Überstände wurden in einem Volumen von 1,8 ml in *cryotubes* (Fa.Nunc Intermed, Dänemark) aliquotiert und sofort bei -70 °C gelagert.

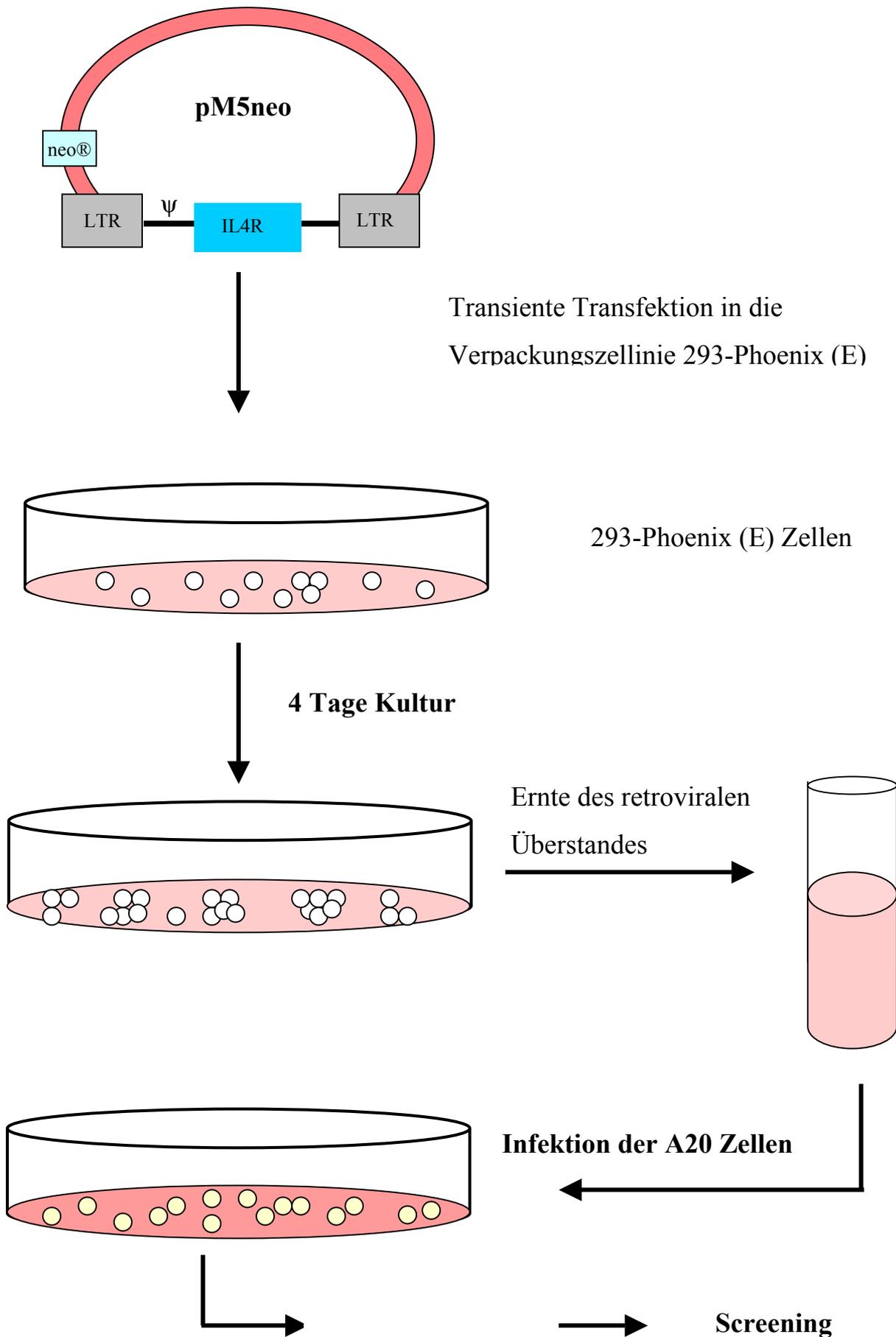
2.2.4.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Kalensee, Giessen, Deutschland). Zur Einstellung der Zellzahl wurde ein Aliquot einer Zellsuspension mit Trypanblau (Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 1:10 verdünnt und in der Neubauer Zählkammer gezählt. Da Trypanblau ein Vitalfarbstoff ist und nur von toten Zellen aufgenommen wird, war es möglich lebende Zellen von toten zu unterscheiden. Zur Zellzahlbestimmung pro ml wurden alle vier Quadranten ausgezählt, anschließend der Mittelwert gebildet und mit dem Faktor 10^4 und der Verdünnung multipliziert.

2.2.4.5 Infektion von A20 Zellen mit Retroviren

1,8 ml des gewünschten Virusüberstandes (IL4R Konstrukt I50+Q551 oder IL4R Konstrukt V50+R551), $0,5 \times 10^6$ A20 Zellen und 2 μl Polybren (Stocklösung 4 mg/ml, Sigma Aldrich, Deutschland) werden zusammen in einem 15 ml *blue cap* (Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, France) bei 2500 x g und 37 °C für 3,5 h zentrifugiert. Polybren ist ein langkettiges Polykation, das sowohl an Virus als auch an Zellproteinen haftet und dadurch eine Infektion erleichtert. Nach Infektion wurde das Zellpellet in 20 ml RPMI 1640 Medium, ergänzt durch die Zugabe von 10% FCS, aufgenommen. Nach 24 h erfolgte die Selektion mit 1mg/ml G418 für 12-21 Tage. Anschließend wurden stabile Transfektanten selektiert und die Expression des humanen IL4R durchflusszytometrisch nachgewiesen (Abb. 6).

Abbildung 6 Schematische Darstellung des retroviralen Gentransfers mit 293-Phoenix (E) Zellen



2.2.5 Durchflußzytometrische Analyse der Genexpression

2.2.5.1 Prinzip der Durchflußzytometrie

Die Grundlagen für die Durchflußzytometrie wurden 1949 von Wallace Coulter gelegt. Er beantragte ein Patent zur Zählung von gelösten Partikeln und erleichterte damit die Leukozytenzählung bei der Blutanalyse.

Heute besteht die häufigste Anwendung der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse [FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)-Analyse] darin, bestimmte Eigenschaften von Zellen, wie z.B. die Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen, auf Einzelzellebene zu untersuchen. Als Grundlage dient die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit fluoreszierenden Antikörpern, welche gegen spezifische Oberflächenmarker (CD, *cluster of differentiation*) gerichtet sind, durchgeführt wird. Die gefärbten Zellen, die in einer Suspension vorliegen, werden in einem Flüssigkeitsstrom durch hydrodynamische Fokussierung an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Dabei werden zum einen geeignete Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt und zum anderen streuen die Zellen, abhängig von Größe und Granularität das auftreffende Licht. Das Durchflußzytometer kann dann simultan mehrere Parameter für jede einzelne Zelle messen:

1. Die Vorwärtstreuung (*forward scatter*) ist proportional zur Zelloberfläche (Zellgröße) und wird entlang der Achse des einfallenden Lichts gemessen.
2. Das 90°- Streulicht (*side scatter*) ist proportional zur Zellgranularität und wird im 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen.
3. Die Fluoreszenzen sind proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle und werden im 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen.

Die durchflußzytometrische Analyse wurde im FACSCalibur™ (Becton Dickinson) durchgeführt. Das Gerät ist mit einem Argonlaser (488 nm) ausgestattet und ermöglicht die gleichzeitige Analyse von 3 Farben. Als Fluorochrome wurden Fluoreszein, das in seiner reaktiven Form als Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) bezeichnet wird, und Phycoerythrin (PE) verwendet. Bei der Analyse wurden meist Daten von 10000 Zellen pro Probe aufgenommen. Anschließend erfolgte die Auswertung mit Hilfe der *Cellquest Research Software* (Becton Dickinson) und zur weiteren Bearbeitung mit der frei zugänglichen Software WinMDI Version 2.8. Die Daten wurden als eindimensionale Histogramme und zweidimensionale

Dot-Plots dargestellt. Mit Hilfe von Analysenfenstern konnten Zellpopulationen selektiv analysiert werden.

2.2.5.2 Durchflußzytometrische Analyse der CD124 Expression in transfizierten T-Zelllinien

Zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion der humanen IL4R Konstrukte (Wildtyp, S478P) in die murine T-Zelllinie CTLL-2, wurden stabile Transfektanten auf ihre CD124 (humaner IL-4R) Expression mittels FACS untersucht.

Es wurden je Transfektant 1×10^6 Zellen und als Kontrolle untransfizierte CTLL-2 Zellen für 5 min bei 522 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet resuspendiert und zweimal mit PBS (PAA Laboratories, Linz, Austria) gewaschen (1. 10 min bei 103 x g; 2. 5 min bei 522 x g). Anschließend wurden die Zellen in 200 µl *Cellwash* (Becton Dickinson Heidelberg), das 0,5% bovines Serumalbumin (BSA, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) enthielt, aufgenommen. Danach wurden die Zellen mit monoklonalen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Als Fluoreszenzfarbstoff diente Phycoerythrin (PE). Zur spezifischen Färbung wurden jeweils 15 µl des PE-konjugierten monoklonalen anti-human IL-4R α -Antikörper (anti-CD124, Immunotech, Krefeld, Deutschland) und als Isotypkontrollantikörper anti-Maus IgG1-PE verwendet. Nach der Inkubation wurden überschüssige Antikörper durch zweimaliges Waschen mit PBS bei 522 x g für 5 min entfernt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 400 µl CellFix (Becton Dickinson, 1:10 verdünnt) aufgenommen und konnten anschließend im Durchflußzytometer gemessen und analysiert werden.

2.2.5.3 Durchflußzytometrische Analyse der CD124 Expression in transfizierten B-Zelllinien

Der Nachweis der Transfektion der IL4R Konstrukte (I50 + Q551, V50 + R551) in die murine B-Zelllinie A20 entsprach der obengenannten Vorgehensweise (siehe 2.2.5.2). Als Kontrolle dienten zusätzlich zu den Isotypkontrollen nicht transfizierte A20 Zellen.

2.2.5.4 IL-4 induzierte Expression von CD23 in huIL-4R transfizierten murinen

B-Zelllinien

Um standardisierte Kulturbedingungen zu gewährleisten, wurden transfizierte A20 Zellen auf 1×10^6 Zellen pro ml RPMI Medium komplett eingestellt. Anschließend wurden 1×10^6 Zellen pro *well* in einer 24-*well*-Flachbodenplatte mit 6 unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 ng; 0,6 ng; 1 ng; 5 ng, 10 ng, 50 ng) an rekombinantem, humanen IL-4 für 48 h kultiviert. Danach wurden die transfizierten Zellen mit monoklonalen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern 30 min auf Eis inkubiert. Zur Färbung der transfizierten A20 Zellen wurde ein Antikörpergemisch von jeweils 15 μ l PE-konjugiertem anti-Maus CD23 (Fc ϵ R2) und 15 μ l FITC-konjugiertem anti-Maus CD45R (beide Caltag Laboratories, Hamburg, Deutschland) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden die entsprechenden Isotypkontrollantikörper, anti-Maus IgG2a (Caltag Laboratories, Hamburg, Deutschland), verwendet. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Dabei wurden zunächst CD45R positive Zellen eingegrenzt und diese dann hinsichtlich der CD23 Expression analysiert.

2.2.6 Genetische Untersuchungsmethoden

2.2.6.1 Probanden

In diese Studie wurden 689 zufällig ausgesuchte, gesunde Blutspender aus der Region Giessen eingeschlossen, nachdem sie ihre Einwilligung gegeben hatten. Die Durchführung der Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt.

Für genetische und laborchemische Untersuchungen wurde den Probanden 10 ml EDTA- Blut entnommen und zur Anonymisierung mit einer Nummer versehen. Für eine spätere IgE-Bestimmung wurde das Plasma abpipettiert und in *cryotubes* (Fa.Nunc Intermed, Dänemark) bei -20°C eingefroren. Das restliche Blut diente zur Gewinnung genomischer DNA.

2.2.6.2 DNA-Isolierung aus EDTA-Blut

Die DNA-Isolierung aus EDTA-Blut erfolgte mit dem *Genomic DNA Purification Kit* (Puregene®, Genra Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) gemäß den Herstellerangaben. Die Blutproben wurden zunächst bei 800 x g für 10 min zentrifugiert. Zwischen der oberen Plasma Schicht und der unteren Erythrozyten Schicht lag eine dünne Schicht (*buffy coat*), die kernhaltige Leukozyten enthielt und zur Gewinnung von DNA verwendet wurde.

Zur Entfernung noch vorhandener Erythrozyten wurden zunächst 3 ml *buffy coat* mit 9 ml *RBC Lysis Solution* gemischt und bei RT für 10 min inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das *blue cap* (Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, France) regelmäßig gewendet. Die Lösung wurde bei 2000 x g 10 min zentrifugiert und danach der Überstand bis auf 100 µl verworfen. Das verbliebene weiße Leukozyten Pellet wurde vorsichtig resuspendiert und mit 3 ml *Cell Lysis Solution* versetzt. Um die Zellyse zu unterstützen wurde die Lösung mehrmals mit einer Pipette resuspendiert. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 15 µl *RNase A Solution*. Nachdem die Probe gemischt wurde, folgte eine Inkubationszeit von 15 min bei 37 °C.

Für die darauf folgende Proteinpräzipitation wurde die Probe auf RT abgekühlt und dann mit 1 ml *Protein Precipitation Solution* versehen. Anschließend wurde die Probe mit Hilfe eines Vortexers (VF 2, Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland) homogenisiert und erneut bei 2000 x g für 10 min zentrifugiert. Für die DNA-Präzipitation wurde der Überstand langsam in ein neues *blue cap*, das mit 3 ml kaltem Isopropanol (Riedel-de Haen®, Seelze, Deutschland) gefüllt war, dazugegeben mehrmals geschwenkt. Nun wurde die DNA bei einem Zentrifugationsschritt von 3min bei 2000 x g gefällt, danach der Überstand verworfen und das *blue cap* zum Trocknen kurz auf Saugpapier gestellt. Zum Waschen der DNA wurden 3 ml 70% Ethanol (Riedel-de Haen®, Seelze, Deutschland) zugegeben und das *blue cap* mehrmals gewendet. Nach einer Zentrifugation von 1 min bei 2000 x g wurde der Alkohol quantitativ verworfen und das *blue cap* wieder kurz auf Saugpapier gestellt. Zum vollständigen Verdunsten des Ethanols wurde das *blue cap* für 15 min bei RT stehen gelassen.

Für die darauf folgende DNA-Hydratation wurde die getrocknete DNA mit 250 µl *DNA Hydratation Solution* versetzt. Anschließend sollte die gelöste DNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt werden und danach über Nacht bei RT rehydrieren.

Die isolierte genomische DNA wurde bei 4 °C aufbewahrt oder für eine spätere Verwendung bei -70 °C eingefroren.

2.2.6.3 Photometrische Bestimmung der DNA- Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) mit einem Photometer (Spekol UV VIS, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Extinktion von 1 bei einer Schichtdicke der Meßküvette (Helma Mikro Typ 105, Kalensee, Giessen, Deutschland) von 1 cm entsprach einem Gehalt von 50 µg/ ml doppelsträngiger DNA. Das Maß für die Proteinverunreinigungen ergab sich aus dem Quotienten der OD_{260nm} zu der OD_{280 nm}. Bei einer reinen DNA- Lösung liegt der Quotient der beiden Extinktionen OD_{260nm}/OD_{280nm} bei 1.8. Geringere Werte weisen auf Proteinkontaminationen hin.

2.2.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Mit Hilfe der PCR-Methode, die 1985 von Mullis et al und Saiki et al. entdeckt wurde (114;115), wird die selektive Vervielfältigung beliebiger DNA-Abschnitte *in vitro* ermöglicht. Voraussetzung für den Start einer PCR ist, dass die Sequenzen am 5'- und am 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts bekannt sind, da während des Reaktionszyklus zwei Oligonucleotide mit dem DNA-Abschnitt hybridisieren müssen. Diese Oligonucleotide dienen als Primer für die DNA-Synthesereaktion und begrenzen den vervielfältigten Abschnitt.

Das PCR-Prinzip beruht auf drei Schritten:

Denaturierung, *Annealing* (Anlagerung) und Elongation (Verlängerung). Im ersten Schritt trennen sich die beiden DNA-Stränge, um für den nächsten Schritt als Matrize zu dienen. Im zweiten Schritt wird die Temperatur abgesenkt, um den Primern Gelegenheit zu geben, an die DNA zu hybridisieren (*annealing*). Die *Annealingtemperatur* hängt unter anderem von der Länge und der Nucleotidabfolge der verwendeten *Primer* ab und muss daher für jeden *Primer* neu bestimmt werden. Im Elongationsschritt wird die Temperatur auf die optimale Temperatur der DNA-Polymerase, die bei 72 °C liegt, erhöht, um eine Zweistrangsynthese zu ermöglichen. Nach jedem Zyklus von Denaturierung, *Annealing* und Synthese wird der gewünschte DNA-Abschnitt verdoppelt.

Der Reaktionsansatz enthält neben einer geringen Menge DNA und zwei synthetisch

hergestellten Oligonucleotidprimern (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) die Desoxyribonucleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) und eine stabile DNA-Polymerase. Für die meisten Experimente wurde die Amplitaq® Gold Polymerase (Perkin Elmer, New Jersey, USA), die aus dem hitzestabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* isoliert wurde, verwendet. Des Weiteren ist im Reaktionsansatz Magnesium enthalten. Mg^{2+} -Ionen beeinflussen unter anderem das *Primerannealing*, Trennung der Stränge bei der Denaturierung, und sie aktivieren die DNA-Polymerase. Der Zyklus aus Denaturieren, Hybridisieren und Synthese wird in der Regel 25- bis 30mal wiederholt.

Für den PCR-Ansatz werden die einzelnen Komponenten in der optimalen Konzentration in einem Puffer zusammengefügt. Die Reaktion wird anschließend in einem *Thermocycler* gestartet. Allgemein wird zunächst die Denaturierung für 1 min bei 94 °C initiiert. Nach 25-30 Zyklen wird die Temperatur 10 min auf 72 °C gehalten, um überhängende Enden aufzufüllen und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Kurzfristig werden die PCR-Produkte bei 4 °C gelagert, während bei einer längeren Lagerung eine Temperatur von -20 °C notwendig ist.

2.2.6.5 Sequenzspezifische PCR (SSP-PCR)

Die Genotypisierung der IL4R Sequenzvarianten E375A, C406R, S411L und S478P erfolgte anhand eines publizierten SSP-PCR Protokolls mit kleinen Modifikationen (100). Das Prinzip der SSP-PCR Analyse beruht darauf, dass eine Amplifikationsreaktion nur dann stattfindet, wenn das 3'-Ende eines PCR Primers komplementär zu der DNA-Matrize ist. Dies liegt in der fehlenden 3'-5'-Exonukleaseaktivität begründet, so dass ein Basen-*Mismatch* zwischen dem 3'-Ende des PCR Primers und der DNA-Matrize die Primerverlängerung durch die Taq-Polymerase verhindert. Die Unterscheidung der einzelnen Allele (wild, mutiert) geschieht somit über die Bildung Allel-spezifischer PCR-Produkte. Auf diese Weise kann mit zwei PCR-Reaktionen pro SNP jeder der drei möglichen Genotypen (homozygot wild, heterozygot, homozygot mutiert) festgestellt werden. In den PCR-Reaktionen kommen verschiedene Primer zur Anwendung: ein Primer für das wild Allel, dessen 3'-Ende an der Stelle der Mutation liegt und zum Nachweis für das mutierte Allel ein Primer, dessen 3' Base komplementär zu der Mutation ist. In beiden PCR-Reaktionen werden *common* Primer, die an die konservierte Sequenz binden, benötigt. Zum Ausschluss von falsch negativen Ergebnissen werden interne Kontroll-Primer (CRP) für ein konserviertes Gen verwendet, die in jedem

PCR-Ansatz ein DNA-Fragment erzeugen, dessen Länge (440 bp) sich von den spezifischen Fragmenten (139 bp-248 bp) unterscheidet und dann umso stärker erscheint, wenn die sequenzspezifischen Primer aufgrund fehlender Übereinstimmung nicht an die DNA binden kann. Zusätzlich werden zu jedem PCR-Ansatz eine durch Sequenzierung getestete positive und negative Kontrolle und zum Ausschluss von Kontaminationen eine Wasserkontrolle dazugegeben. In Tabelle 10 und 11 sind die Reaktionssätze und die Reaktionsbedingungen der Genotypisierung der obengenannten IL4R Sequenzvarianten dargestellt. Die in der sequenzspezifischen PCR eingesetzten Primer sind in Tabelle 24 im Anhang dargestellt.

Tabelle 10 Reaktionsansatz der SSP-PCR zur Genotypisierung der IL4R Sequenzvarianten E375A, C406R, S411L und S478P

Reagenz	Ansatz	Endkonzentration
10 x Taq buffer	1,5 µl	-
dNTPs	0,04 µl x 4	0,2 mmol/l je dNTP
CRP up	0,3 µl	10 pmol/µl
CRP down	0,3 µl	10 pmol/µl
Primer (wild/mutiert)	1 µl	10 pmol/µl
Primer (common)	1 µl	10 pmol/µl
MgCl ₂	2 µl	1,5 mmol/l
H ₂ O	3,74 µl	-
1 x Taq buffer	4,84 µl	-
Ampli-Taq Gold	0,16 µl	0,5 U
DNA	5 µl	10 ng/µl
Endvolumen	20 µl	-

Tabelle 11 **Reaktionsbedingungen für die SSP-PCR zur Genotypisierung der IL4R Varianten**

IL4R Sequenzvarianten	E375A	C406	R406	S411L	S478P
Vorlauf	95 °C 10 min				
Denaturierung	95 °C 30 s 65 °C 60 s 10 x				
Annealing					
Denaturierung	95 °C 30 s		95 °C 30 s	95 °C 30 s	
Annealing	61 °C 50 s	22 x	63 °C 40 s 23 x	61 °C 50 s	22 x
Polymerisation	72 °C 40 s		72 °C 45 s	72 °C 40 s	
Nachlauf	20 ∞				

Die Analyse der PCR- Produkte erfolgte in einem 1,5 % igem Agarose Gel bei einer angelegten Spannung von 90 Volt.

2.2.6.6 Agarosegel-Elektrophorese

Bei der Agarosegel-Elektrophorese handelt es sich um ein biochemisches Trennverfahren, bei dem DNA- Fragmente aufgrund ihrer Größe und negativen Ladung in einem elektrischen Feld getrennt und identifiziert werden.

Agarose wirkt aufgrund ihrer Proteinstruktur wie ein Molekularsieb, wobei die Porengröße durch die Konzentration der Agarose bestimmt wird. Je höher die Konzentration der Agarose ist, desto kleiner sind die Poren und desto langsamer wandern die DNA- Fragmente durch das Gel. Mit Agarosekonzentrationen von 2 %- 0,5 % erreicht man eine gute Fragmenttrennung zwischen 100 und 30000 Basen-Paaren (bp) Länge, wobei die optimale Agarosekonzentration von der Größe der aufzutrennenden Fragmente abhängt.

Für analytische Gele wurde *ultra pure* Agarose (Gibco/ BRL, Eggenstein) eingesetzt. Die Agarose wurde in 1x TAE-(Tris-Acetat-EDTA) Puffer (40 mM Tris, 0,12 % Essigsäure, 1 mM EDTA) als Elektrophoresepuffer durch Erhitzen in einem Mikrowellen-Gerät (Fa. Sharp) gelöst. Kurz vor der Polymerisation wurde Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) (Dianova,

Hamburg) zugesetzt, um die DNA- Fragmente später unter UV- Licht zu visualisieren. Anschließend wurde ein Gel mit der gewünschten Anzahl an Geltaschen in einen Schlitten (10 x 16 cm) gegossen, welches man nach Erkalten in die mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gibt. Vor dem Auftragen der DNA Proben in die Geltaschen wurden 9 µl des PCR- Produkts mit je 1 µl Probenpuffer (6 x; 0.25 % Bromphenolblau, 40 % Saccharose und 50 mM EDTA) versetzt. Der Probenpuffer erhöht die Dichte der DNA Probe, so dass die Lösung besser in die Geltasche sinken kann. Um den Verlauf der Elektrophorese zu kontrollieren wurde dem Probenpuffer Bromphenolblau zugesetzt. Zur Identifizierung der Größe und Bestimmung der Konzentration der einzelnen DNA- Fragmente wurde der Molekulargewichtsstandards (MG) 100 bp verwendet. Die Molekulargewichtsstandards stellen ein Gemisch aus DNA- Fragmenten definierter Längen dar.

MG 100 bp (New England Biolabs): 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300,
200, 100 bp

1 µl Molekulargewichtsstandard wurde mit 1 µl Probenpuffer und 8 µl a. dest. verdünnt. Die vorbereiteten Proben und der jeweilige Standard wurden in die Geltaschen pipettiert und nach ca. 30 min bei einer angelegten Spannung zwischen 80 und 120 Volt mit Hilfe des Transilluminators (Model UVT 400-M, IBI, New Haven, Connecticut, USA) unter UV- Licht (312 nm) betrachtet und mittels Sofortbildkamera (IBI, New Haven, Connecticut, USA) fotografiert.

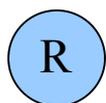
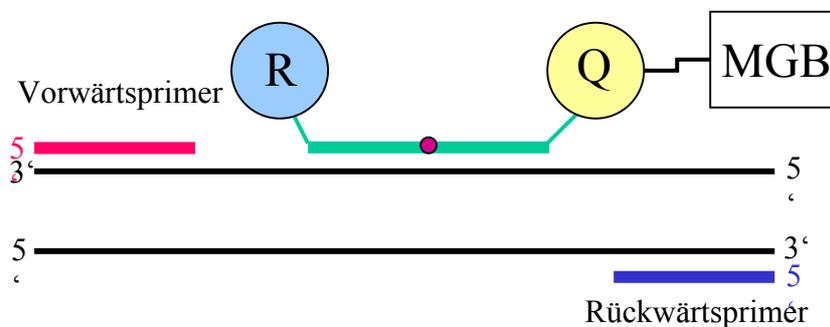
2.2.6.7 Genotypisierung mit der *TaqMan*®PCR

Die Genotypisierung der IL4R Sequenzvarianten I50V und Q551R wurden nach dem Verfahren der allelischen Diskriminierung mit der *TaqMan*®PCR durchgeführt. Je Sequenzvariante werden ein Primerpaar, das den Sequenzabschnitt mit der Variante amplifiziert, und zwei Sonden, die am 5'- Ende mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (VIC® und FAM®) und spezifisch für eine der beiden Allelvarianten waren, benötigt (Abb. 3). Am 3'-Ende jeder Sonde sind *minor groove binders* (MGB) gebunden, die die Bindung zwischen der Sonde und ihrer komplementären Sequenz durch Schmelztemperaturerhöhung stabilisiert (Abb. 3). Dies ermöglicht die Diskriminierung aufgrund der Differenz der Schmelzpunkttemperaturen der exakt komplementären und nicht komplementären Sonde. Vor den MGBs sind *quencher* (nicht-fluoreszierender *quencher*, NFQ) gebunden, welche die Fluoreszenz des gebundenen Farbstoffes durch Förster-Typ

Energie (116) schwächt. Wenn die Sonde exakt komplementär zu der Sequenz ist, wird der Fluoreszenzfarbstoff durch die 5'-3' Nuklease-Aktivität der Polymerase vom *quencher* freigesetzt und kann quantifiziert werden (ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Bei einer nicht exakt komplementäre Sonde wird kein Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt.

Das bedeutet, dass die Untersuchung von DNA bei zwei Wildtyp-Allelen die Fluoreszenz eines Farbstoffs zeigt, während bei einer Untersuchung der DNA mit zwei mutierten Allelen die Fluoreszenz des anderen Farbstoffs anzeigt. Heterozygote Personen tragen beide Fluoreszenzmuster (Abb. 8). Als Kontrollen wurden zu jedem PCR-Ansatz durch Sequenzierung getestete Proben von jedem Genotyp mitgeführt, sowie zum Ausschluss von Kontaminationen eine Wasserkontrolle.

Abbildung 7 Schematische Darstellung der Struktur der TaqMan® MGB Sonden



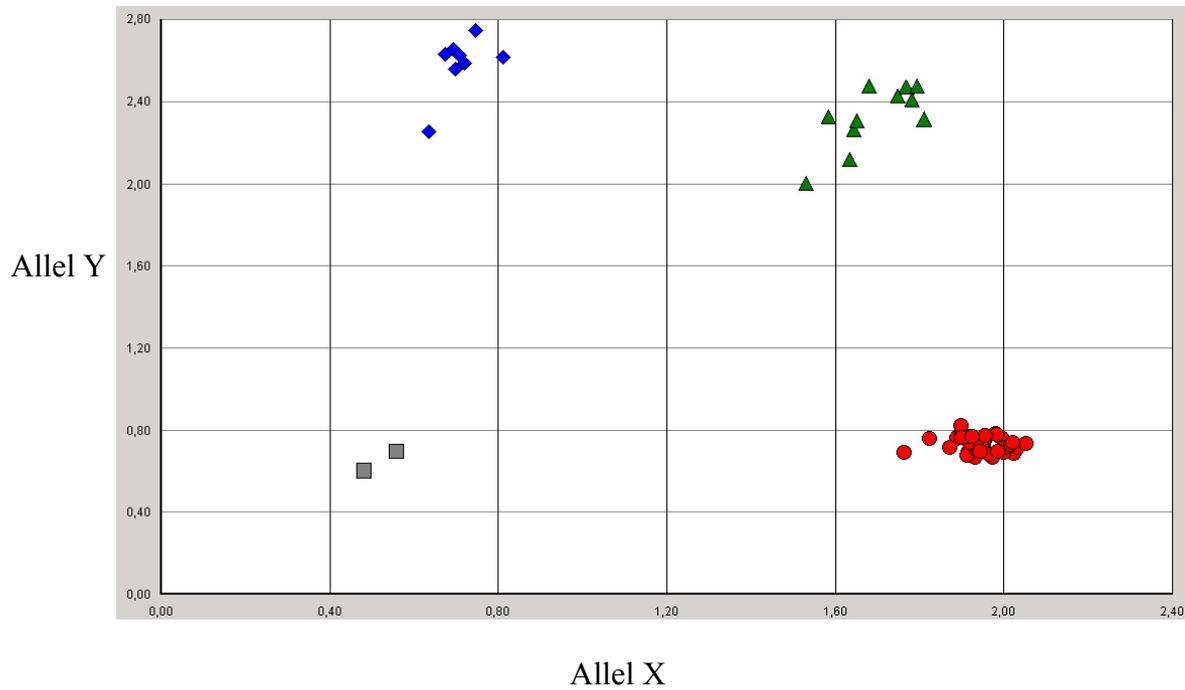
" Reporter" Farbstoff



nicht-fluoreszierender "Quencher "



" Minor Groove Binder"

Abbildung 8 Fluoreszenzmuster einer Genotypisierung mit der TaqMan® PCR

X-Achse: Fluoreszenzfarbstoff VIC

Y-Achse: Fluoreszenzfarbstoff FAM

- homozygot wild
- ◆ homozygot mutiert
- ▲ heterozygot
- Wasserkontrolle

Der Reaktionsansatz für die TaqMan®PCR hat für jede Probe ein Endvolumen von 15 µl, bestehend aus 7,5 µl MasterMix Puffer (Puffer + dNTPs + AmpliTaq Gold® Polymerase, TaqMan®Universal PCR MasterMix, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), 0,25 µl Test-Kit (Sonden und Primer, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), 5,25 µl a. dest. und 2 µl DNA (10 ng/µl). In Tabelle 12 sind die Reaktionsbedingungen für die Genotypisierung der obengenannten IL4R Sequenzvarianten I50V und Q551R dargestellt. Die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden sind in Tabelle 25 und 26 im Anhang (Kapitel 7) abgebildet.

Tabelle 12 Reaktionsbedingungen für die TaqMan® PCR

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Kontaminationsabbau	50 °C	2 min	
Vorlauf	95 °C	10 min	
Absolute Quantitation	95 °C	15 s	40
	60 °C	1 min	
Allelische Diskriminierung	60 °C	1 min	

2.2.6.8 Immunnephelometrische Bestimmung der Serum IgE-Spiegel

Die Bestimmung der Serum IgE-Spiegel der 689 Blutspender erfolgte immunnephelometrisch im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Justus-Liebig-Universität Giessen. Der Immunnephelometrie liegt das Prinzip der Lichtstreuung von Antigen-Antikörper-Komplexen zugrunde. Die Konzentration des Antigens, welches hier das IgE darstellt, wird im Bereich des Antikörperüberschusses, das heißt in einem Bereich, in dem Antigen-Antikörper-Komplexe noch in geringer Konzentration vorliegen, bestimmt. Dabei wird das Antigen mit einer konstanten Menge an Antikörpern in einer Küvette inkubiert. Anschließend wird ein Lichtstrahl eines Helium-Neon-Lasers durch die Küvette geschickt und das Ausmaß der Lichtstreuung mit Hilfe eines Detektors (Behring Nephelometer Analyzer II, Behring Diagnostics Inc. Westwood, MA, USA) bestimmt. Die Ermittlung der Antigenkonzentration erfolgt mittels einer Eichkurve, die durch Messung der Lichtstreuung in Antigen-Lösungen bekannter Konzentrationen aufgestellt wurde. Die Referenzwerte bei dieser Methode liegen für Erwachsene bei < 100 IU/ml, ab 100 IU/ml werden die Werte als erhöht betrachtet.

2.2.7 Zusammenhang zwischen TNF Polymorphismen und dem klinischen Verlauf nach einem Polytrauma

2.2.7.1 Studiendesign

Die Studie wurde unter Einhaltung moralischer, ethischer und wissenschaftlicher Grundsätze, wie sie in der Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki und den ICH-GCP-Empfehlungen dargelegt sind, nach Genehmigung durch die lokale Ethikkommission durchgeführt. In die Studie wurden in einem Zeitraum vom 1. März 1997 bis 28. Juni 2004 159 polytraumatisierte Patienten einbezogen (27). Die einbezogenen Patienten wurden während ihrer Behandlung und darüber hinaus bis zu 28 Tage nach dem Unfall in der Abteilung für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikums Giessen untersucht. Die Erfassung der Vitalparameter erfolgte ebenso in der Abteilung für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie mit Hilfe des EDV-gestützten Patienten-Daten-Management-Systems ICU-Data (27).

Folgende **Einschlusskriterien** wurden festgelegt:

- I. Vorliegen einer Einverständniserklärung
- II. Diagnose Polytrauma
- III. PTS-Wert ≥ 30 und/oder ISS-Wert ≥ 10
- IV. Alter ≥ 18 Jahre und ≤ 65 Jahre
- V. Aufnahme des Patienten auf die Operative Intensivstation ≤ 12 Stunden nach dem Trauma

Als **Ausschlusskriterien** galten:

- I. Schwere Einzelverletzungen wie Wirbelsäulenverletzungen und Beckenverletzungen (Barytraumen)
- II. Patienten mit anzunehmendem Hirntod und funktionierendem Kreislauf
- III. Massive ZNS-Schädigung (Patienten mit im Vordergrund stehendem operativ zu versorgendem Schädel-Hirn-Trauma, SHT II°-III°)
- IV. Reanimation nach Herzstillstand oder schwerer kardiogener Schock
- V. Verabreichung steroidaler und nicht steroidaler Antiphlogistika
- VI. Schwangere Frauen und Frauen in der Stillzeit

- VII. Gleichzeitige Teilnahme an einer anderen Studie
- VIII. Patienten mit Verbrennungen aller Stadien
- IX. Versterben des Patienten innerhalb der ersten drei Tage auf der Operativen Intensivstation
- X. Patienten mit vorbestehenden malignen, hämatologischen oder einer anderen, das Immunsystem schwer verändernden Grunderkrankung

2.2.7.2 Messung der TNF- α Plasmaspiegel

Die Plasmaspiegel des Zytokins TNF α wurden mit Hilfe des Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) 24-stündlich gemessen. Die Untersuchungen wurden in der Abteilung für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikums Giessen durchgeführt (27).

2.2.7.3 SSP-PCR zur Genotypisierung der TNF Sequenzvarianten –862C>A und –856C>T

Die Genotypisierung der TNF Sequenzvarianten –862C>A und –856C>T erfolgte anhand der sequenzspezifischen PCR (SSP-PCR). Das Prinzip der SSP-PCR und die Reaktionsansätze sind in Kapitel 2.2.6.5 beschrieben. In Tabelle 13 sind die Reaktionsbedingungen, die zur Genotypisierung der Varianten –862C>A und –856C>T notwendig sind, dargestellt. Die in der SSP-PCR eingesetzten Primer sind in Tabelle 27 im Anhang (Kapitel 7) aufgeführt.

Tabelle 13 Reaktionsbedingungen zur Genotypisierung der TNF Sequenzvarianten – 862C>A und -856C>T

TNF Sequenzvarianten	-862C>A	-856C>T
Vorlauf	95 °C 10 min	
Denaturierung	95 °C 30 s	95 °C 30 s
Annealing	61 °C 30 s	61,5 °C 30 s
	10 x	10 x
Denaturierung	95 °C 30 s	95 °C 30 s
Annealing	59 °C 35 s	59,5 °C 35 s
	25 x	25 x
Polymerisation	72 °C 40 s	72 °C 40 s
Nachlauf	20 °C ∞	

Die Analyse der PCR- Produkte erfolgte in einem 1,5 % igen Agarose Gel bei einer angelegten Spannung von 90 Volt.

2.2.7.4 Genotypisierung der TNF und LTA Sequenzvarianten mit *TaqMan*®PCR

Die Genotypisierung der TNF Sequenzvarianten –1031T>C, -308G>A, -237G>A, +491G>A, +859A>G und der LTA Sequenzvarianten +80C>A und +252A>G wurden nach dem Verfahren der allelischen Diskriminierung mit der *TaqMan*®PCR durchgeführt. Das Prinzip ist in Kapitel 2.2.6.7 beschrieben. Die Reaktionsansätze und Reaktionsbedingungen entsprechen den in Kapitel 2.2.6.7 dargestellten Tabellen 10 und 11.

2.2.7.5 Genotypisierung der IL6 und IL10 Sequenzvarianten mit *TaqMan*®PCR

Die Genotypisierung der IL6 Sequenzvariante –174C>G und der IL10 Sequenzvariante –1082G>A wurde ebenso nach dem Verfahren der allelischen Diskriminierung mit der *TaqMan*®PCR durchgeführt. Das Prinzip ist in Kapitel 2.2.6.7 beschrieben. Die Reaktionsansätze und Reaktionsbedingungen entsprechen den in Kapitel 2.2.6.7 dargestellten Tabellen 10 und 11.

2.2.8 Statistische Methoden

2.2.8.1 IL4R Polymorphismen

Um eine Abweichung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts bewerten zu können, wurden in dem Kollektiv von 689 Blutspendern über einen Monte-Carlo Simulationen basierten Anpassungstest (*Goodness-of-fit-test*) beobachtete und erwartete Genotypfrequenzen verglichen. Zudem wurden die Serum IgE-Spiegel dichotomisiert ($\text{IgE} > 100$ und $\text{IgE} \leq 100$), um mögliche Assoziationen zwischen Genotyp- und Haplotypfrequenzen zu untersuchen. Zum Vergleich der Genotypfrequenzen wurde der Cochran-Armitage –Trend-Test verwendet, bei dem angenommen wird, dass das Risiko von einem homozygoten Genotyp über den heterozygoten Genotyp zum anderen homozygoten Genotyp ansteigt (117). Zur Berechnung der Haplotypfrequenzen wurde der *Expectation-Maximization* Algorithmus herangezogen (118), anschließend wurden der Effekt der geschätzten Haplotypen (*estimated haplotypes*) in einem *Score Test* mit simulierten *P*-Werten von 10^6 Replikationen auf den Phänotyp Serum IgE-Spiegel analysiert. Für die Beurteilung der Stärke der Assoziation zwischen dem Phänotyp Serum IgE-Spiegel und einer bestimmten genetischen Variante wurde das Risiko (*odds ratio*, OR) berechnet. Ein Risiko von >1 deutet auf eine positive Assoziation hin (je größer die Zahl, umso vielfacher das Risiko), während ein Risiko <1 eine negative Assoziation zeigt. Bei einer OR=1 liegt keine Assoziation vor. Die Ergebnisse der funktionellen Studien am IL-4R wurden mittels *Mann-Whitney-U-test* analysiert. Dieser prüft bei nicht normalverteilten Werten Unterschiede zwischen zwei Stichproben. Für alle zweiseitigen (*two-tailed*) Tests wurde das Konfidenzintervall (CI) von 95 % berechnet. Die Berechnungen des *Mann-Whitney-U-test* und des Konfidenzintervalls erfolgten mit der SPSS® Software Version 11.0.

2.2.8.2 TNF Polymorphismen

Ebenso wurden in dem Kollektiv von 159 polytraumatisierten Patienten beobachtete und erwartete Genotypfrequenzen über einen Monte-Carlo Simulationen basierten Anpassungstest (*Goodness-of-fit-test*) verglichen. Des weiteren wurde ein *Expectation-Maximization* Algorithmus zur Berechnung der Haplotypfrequenzen herangezogen (118).

Der Einfluss einer TNF Mutation auf den TNF- α Plasma Spiegel, die Entwicklung einer Sepsis oder auf die Mortalität wurde mittels *Fisher's exact Test* und *Mann-Whitney-U-test*

untersucht (Univariate Analyse). Der Effekt der geschätzten Haplotypen (*estimated haplotypes*) wurde in einem *Score* Test mit simulierten *P*-Werten von 10^6 Replikationen auf den Phänotyp TNF- α Plasma Spiegel analysiert. Um den Einfluss möglicher *confounding factors* auf den TNF- α Plasma Spiegel, die Entwicklung einer Sepsis und auf die Mortalität zu kontrollieren, wurde die Methode der logistischen Regression angewendet (Multivariate Analyse). Dabei wurden als konstante (*continuous*) Kovariate Alter, Körpergewicht, Schwere des Traumas und der TNF- α Plasma Spiegel einbezogen, während als kategorische (*categorical*) Kovariate das Geschlecht und Sepsis betrachtet wurden. Für die Analyse der Assoziation zwischen einer konstanten Kovariaten und der abhängigen Variable wurde das Modell der fraktionellen Polynome (*fractional polynomials*) verwendet.

3 Ergebnisse

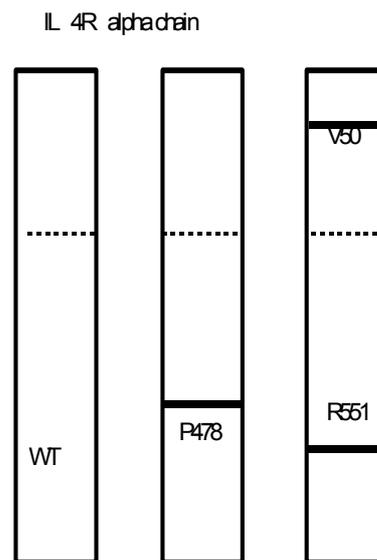
3.1 Der Einfluss von IL4R Genpolymorphismen auf die IL-4 induzierte Signaltransduktion

3.1.1 Herstellung verschiedener IL4R Genkonstrukte durch Einfügen von Punktmutationen mittels *site-directed* Mutagenese

Um den Einfluss von IL4R Sequenzvarianten, die zu einem Aminosäureaustausch führen, auf die Signaltransduktion durch den IL-4R Komplex zu untersuchen, wurden aus dem IL4R Wildtyp-Konstrukt durch Einfügen von Punktmutationen zwei mutierte IL4R Konstrukte hergestellt (119). Im ersten Ansatz wurde das Ausgangsplasmid (Wildtyp) an Position 1682 der cDNA des IL4R Gens von Thymin nach Cytidin mutiert, folglich wird an AS Position 478 Prolin anstatt Serin kodiert. In einem weiteren Ansatz wurde das IL4R Wildtyp-Konstrukt an cDNA Position 398 und 1902 von Adenin nach Guanin mutiert. Somit entstand ein Konstrukt, das an AS Position 50 Valin statt Isoleucin und an AS Position 551 Arginin anstatt Glutamin kodiert. Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Die entstandenen IL4R Konstrukte sind in Abbildung 9 dargestellt.

Abbildung 9 Schematische Darstellung der IL-4R alpha Kette und der hergestellten IL4R Konstrukte

Die waagerechten Linien in der extrazellulären (EC) und intrazellulären (IC) Domäne zeigen die Aminosäureaustausche im Vergleich zum Wildtyp (WT). Die gepunktete Linie zwischen der extrazellulären und der intrazellulären Domäne symbolisiert die Plasmamembran (PM).

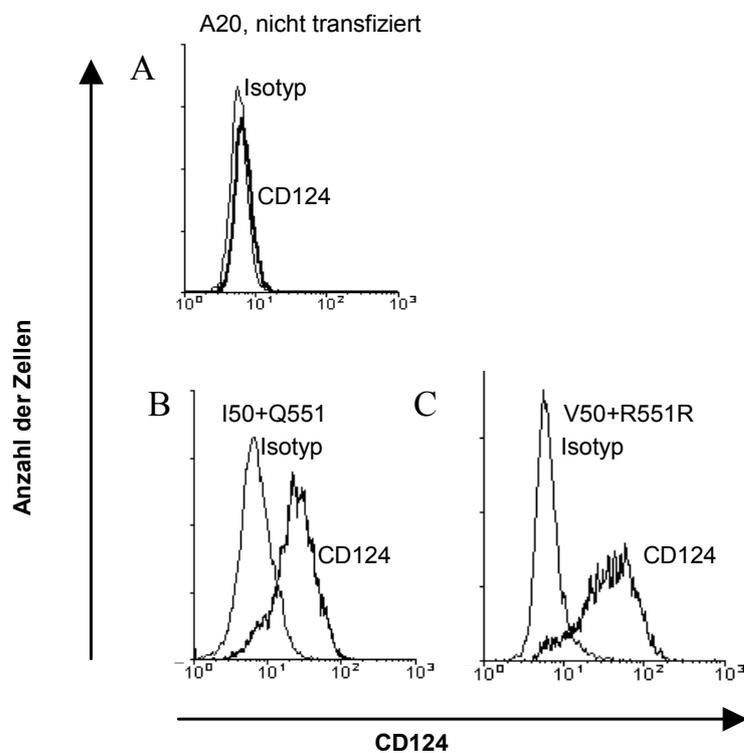


3.1.2 Herstellung stabil transfizierter B Zelllinien, die den Wildtyp der IL-4R α Kette oder die Variante I50V+Q551R exprimieren

Für die Untersuchung der kombinierten Aminosäuresubstitutionen an Aminosäure Position 50 und Position 551 der IL-4R α Kette auf die IL-4 induzierte Signaltransduktion wurden das IL4R Wildtyp-Konstrukt und das Konstrukt I50V+Q551R in die murine B Zelllinie A20 transfiziert. Die Transfektion der Konstrukte in die A20 Zelllinie erfolgte mit den retroviralen Überständen der IL4R Konstrukte (Wildtyp, I50V+Q551R). Nach erfolgreicher Transfektion wurde der Expressionsnachweis der rekombinanten IL-4R Proteine durchflußzytometrisch durchgeführt. Zum Expressionsnachweis wurden monoklonale PE-konjugierte anti-humane CD124 (IL-4R) Antikörper verwendet. Die erfolgreiche Expression der rekombinanten IL-4R Proteine ist in Abbildung 10 dargestellt.

Abbildung 10 Stabile Expression der humanen IL-4R α Kette in transfizierten B Zelllinien

Murine A20 Zellen wurden mit IL4R Wildtyp-Konstrukt I50+Q551 (A) oder mit dem IL4R Konstrukt, das für die Aminosäuresubstitution V50 in Kombination mit der Aminosäuresubstitution R551 (V50+R551) kodiert, transfiziert. Nach Selektion der stabilen Klone wurde der Expressionsnachweis der IL-4R α Kette durchflußzytometrisch mit PE-konjugierten anti-humanen CD124 Antikörpern bestimmt. Als Kontrolle dienen zusätzlich zu den Isotypkontrollen untransfizierte A20 Zellen.



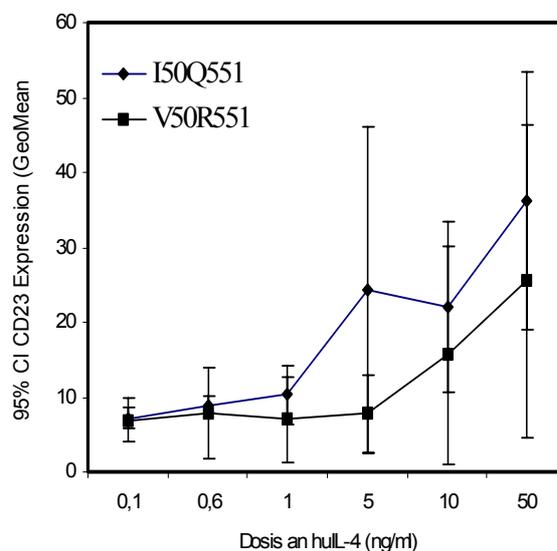
3.1.3 Die Aminosäuresubstitution I50V in Kombination mit der Aminosäuresubstitution Q551R führt zu keiner Erhöhung der IL-4 induzierten CD23 Expression

Transfizierte B Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (0,1 ng; 0,6 ng; 1 ng; 5 ng, 10 ng, 50 ng) an rekombinantem, humanen IL-4 für 48 h kultiviert. Anschließend wurde die murine CD23 Expression durchflußzytometrisch bestimmt. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte A20 Zellen, da sie nicht in der Lage sind, auf humanes IL-4 anzusprechen. Jede Messung der CD23 Expression wurde dreimal durchgeführt und das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität berechnet. Anschließend wurde der Mittelwert und das 95 % Konfidenzintervall für jedes Experiment bestimmt.

Nach 48 h Inkubation mit humanen IL-4 zeigten sowohl Zellen, die den Wildtyp der humanen IL-4R α Kette (I50+Q551) als auch Zellen, welche die Variante der IL-4R α Kette (V50+R551) exprimierten, einen dosisabhängigen Anstieg der CD23 Expression. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden transfizierten Zelllinien konnte in Bezug auf die IL-4 induzierte CD23 Expression nicht gezeigt werden ($p= 0,26$; Mann-Whitney-U-Test) (Abb.11).

Abbildung 11 Die kombinierte Aminosäuresubstitution an Position 50 und 551 (V50+R551) der humanen IL-4R α Kette führt zu keiner Erhöhung der CD23 Expression in transfizierten Zellen nach IL-4 Stimulation

Transfizierte A20 Zellen, die entweder den Wildtyp der humanen IL-4R α Kette (I50+Q551) oder die Variante (V50+R551) exprimierten, wurden mit zunehmenden Dosen an humanem IL-4 für 48 h inkubiert. Anschließend wurde mittels Durchflußzytometrie die Expression des murinen CD23 bestimmt. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen an humanem IL-4 angegeben, während die Ordinate den Mittelwert als geometrisches Mittel der Fluoreszenzintensität und das 95 % Konfidenzintervall von je drei Experimenten darstellt.



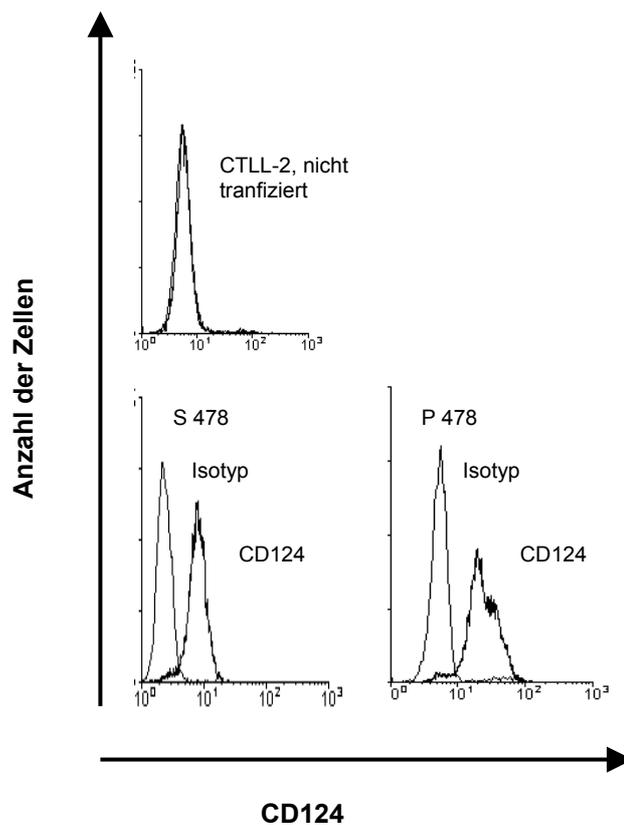
3.1.4 Herstellung stabil transfizierter T Zelllinien, die entweder den Wildtyp der humanen IL-4R α Kette oder die Variante S478P exprimieren

Für die Untersuchung der Proliferation von stabil transfizierten T Zelllinien nach IL-4 Stimulation wurden humane IL4R cDNA Konstrukte, die entweder für den Wildtyp (S478) oder die Variante (P478) der humanen IL-4R α Kette kodieren, in die murine T Zelllinie CTLL-2 transfiziert (Kapitel 2.2.2.1). Der Nachweis einer erfolgreichen Transfektion wurde

durchflußzytometrisch mit PE-konjugierten anti-humanen CD124 (IL-4R) Antikörpern durchgeführt. Abbildung 12 zeigt die erfolgreiche Expression der unterschiedlichen rekombinanten IL-4R Proteine.

Abbildung 12 Stabile Expression der humanen IL-4R α Kette in transfizierten T Zelllinien

Murine CTLL-2 Zellen wurden mit dem IL4R Wildtyp Konstrukt S478 oder mit dem IL4R Konstrukt P478 transfiziert. Nach der Selektion stabiler Transfektanten wurde die Expression der IL-4R α Kette mit PE-konjugierten anti-humanen CD124 Antikörpern durchflußzytometrisch nachgewiesen. Zusätzlich zu den Isotypkontrollen dienten nicht transfizierte murine CTLL-2 Zellen als Kontrollen.

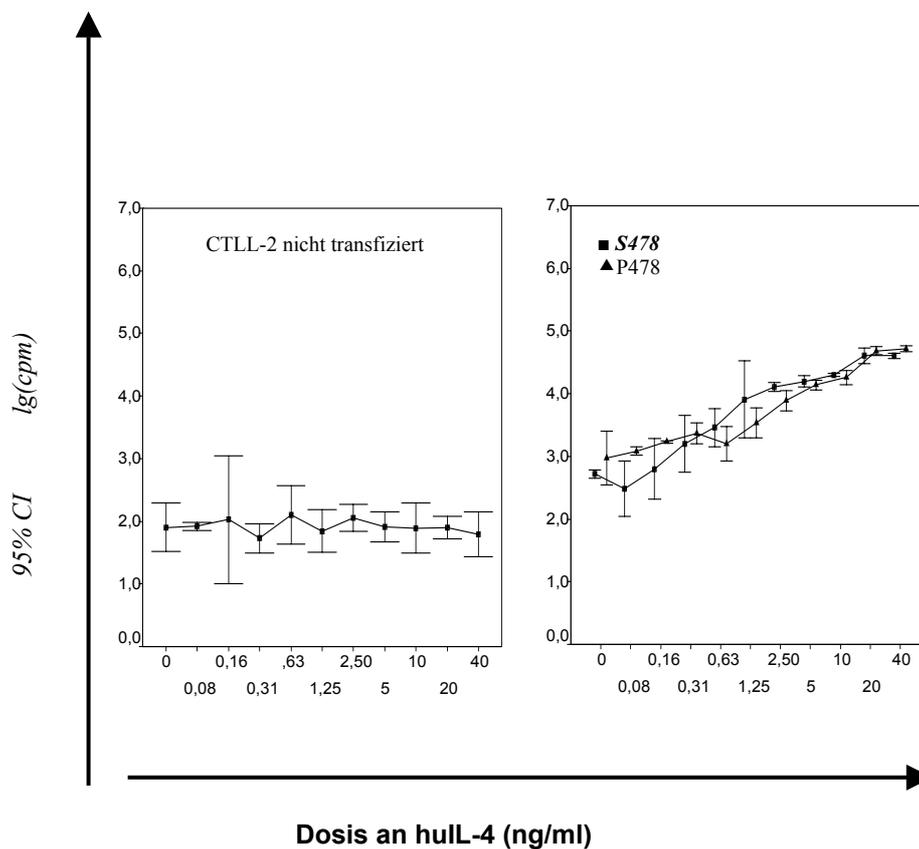


3.1.5 Die Aminosäuresubstitution S478P führt nach Stimulation mit humanem IL-4 zu keiner erhöhten IL-4 induzierten Zellproliferation

Stabile murine CTLL-2 Zellen, die den Wildtyp der IL-4R α Kette (S478) oder die Variante (P478) exprimierten, wurden mit steigenden Konzentrationen an rekombinantem humanem IL-4 (0 ng/ml IL-4 bis 40 ng/ml) für 48 h inkubiert. Anschließend wurde die Proliferation der CTLL-2 Zellen durch die Messung des eingebauten Tritium [^3H]-markierten Thymidins bestimmt. Nicht transfizierte murine CTLL-2 Zellen wurden als Negativkontrolle eingesetzt, da sie nicht auf humanes IL-4 ansprechen (72;89). Die Messergebnisse zeigten sowohl in Zellen, die den Wildtyp der IL-4R α Kette exprimierten als auch in Zellen mit der Expression der mutierten Variante (P478), eine dosisabhängige Zellproliferation als Antwort auf humanes IL-4. Ein Unterschied in der Zellproliferation konnte zwischen Zellen mit der IL-4R α Ketten Aminosäuresubstitution S478P und Zellen, die den Wildtyp der IL-4R α Kette exprimierten, nicht beobachtet werden ($p=0,28$; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 13).

Abbildung 13 Die Aminosäuresubstitution an Position 478 (S478P) der humanen IL-4R α Kette führt zu keiner Erhöhung der Zellproliferation nach IL-4 Stimulation

Als Kontrolle dienten nicht transfizierte CTLL-2 Zellen. Transfizierte CTLL-2 Zellen, die den Wildtyp der IL-4R α Kette (S478) oder die Variante (P478) exprimierten, wurden 48 h mit unterschiedlichen IL-4 Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde der Einbau von Tritium [^3H]-markiertem Thymidin gemessen. Die Ergebnisse von drei Experimenten je Konzentration sind als logarithmischer Mittelwert der *counts per minute* mit dem 95 % Konfidenzintervall dargestellt.



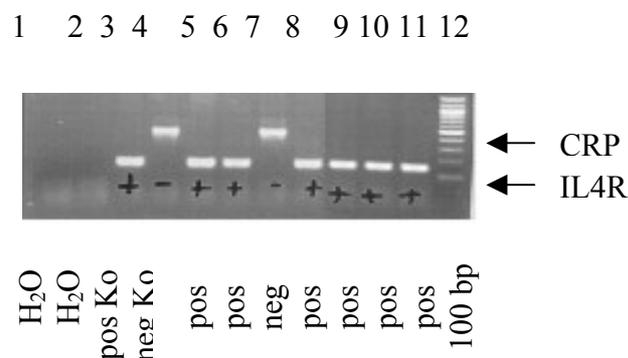
3.2 Genetische Assoziationsstudien

3.2.1 Genvarianten in der kodierenden Region des humanen IL4R sind nicht assoziiert mit Serum-IgE Spiegeln

Die Genotypisierung der insgesamt sechs kodierenden IL4R Genpolymorphismen in einem Kollektiv von 300 gesunden Blutspendern erfolgte zum einen mit der SSP-PCR (E375A, C406R, S411L, S478P) und zum anderen mit der TaqMan® PCR (I50V, Q551R). Abbildung 10 stellt exemplarisch ein Gel der SSP-PCR-Analyse dar.

Abbildung 14 SSP-PCR Genotypisierung der IL4R Variante C406R

Spur zwölf (rechts im Bild) stellt den Molekulargewichtsstandard 100 bp dar. Links daneben befinden sich die Typisierungsergebnisse einiger Probanden. Die Ergebnisse der Ansätze für das Wildtyp-Allel sind mit "pos" oder "neg" bezeichnet (Spur 5-11). Wenn keine spezifische IL4R Bande zu sehen war, musste als Interne Kontrolle die Bande für das CRP Gen (440 bp) sichtbar sein.



Zur Untersuchung der Populationshomogenität wurde das Hardy –Weinberg-Gleichgewicht bestimmt, das für alle IL4R SNPs bestätigt werden konnte. Tabelle 14 zeigt die Allelfrequenzen in einem Kollektiv von 300 kaukasischen Blutspendern.

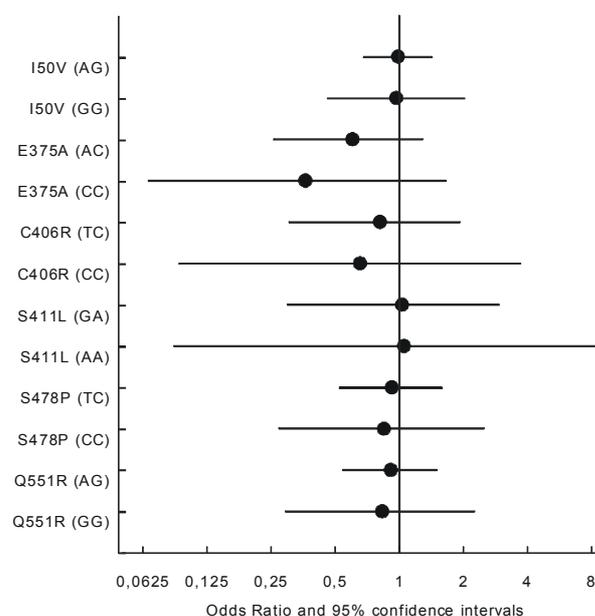
Tabelle 14 Allelfrequenzen der untersuchten IL4R SNPs

IL4R SNP	Allelfrequenz in % seltenes Allel
I50V	45
E375A	11,02
C406R	10,8
S411L	3,2
S478P	16,2
Q551R	19,0

Anschließend wurde das Risiko (*odds ratio*) der IL4R SNP Genotypen und dem quantitativen Phänotyp Serum-IgE Spiegel bestimmt. Keine statistisch signifikante Assoziation konnte zwischen den unterschiedlichen Genotypen und Serum-IgE Spiegeln entdeckt werden (Abb. 15).

Abbildung 15 Bestimmung des Risikos (*odds ratio*) der IL4R SNP Genotypen mit dem Serum-IgE Spiegel

Die Genotypisierung von sechs IL4R SNPs (I50V, E375A, C406R, S411L, S478P, Q551R) erfolgte in einem Kollektiv von 300 gesunden Blutspendern. Für die Untersuchung der Assoziation der IL4R SNP Genotypfrequenzen mit dem Serum IgE Spiegel wurde das Risiko (*odds ratio*) und das 95 % Konfidenzintervall kalkuliert.



3.2.2 Haplotypen, die für die kodierende Region des humanen IL4R Gens geschätzt wurden, sind nicht mit dem Serum-IgE Spiegel assoziiert

Zur Untersuchung der Assoziation von IL4R Haplotypen mit dem Phänotyp Serum-IgE Spiegel wurden Haplotypen mittels *Expectation-Maximization-Algorithm* aus den sechs kodierenden IL4R SNPs geschätzt. Haplotypen mit einer Frequenz von mindestens 1% wurden berücksichtigt. Anschließend wurden die Haplotypen mit dem quantitativen Serum-IgE Spiegel mit Hilfe des *Score-Test*, in dem simulierte p-Werte von 10^6 Replikationen einbezogen wurden, verglichen. Zur Veranschaulichung sind Daten von geschätzten IL4R Haplotypen mit einer Frequenz von mindestens 1% in Tabelle 15 dargestellt. Die Analyse zeigte keine Assoziation zwischen den geschätzten Haplotypen und dem Phänotyp Serum-IgE Spiegel. Eine Subanalyse zur geschlechtsspezifischen Assoziation zeigte erneut keine Assoziation der IL4R Haplotypen mit dem Phänotyp Serum-IgE.

Tabelle 15 Geschätzte sechs *locus* IL4R Haplotypen bei Blutspendern (n=300)

Haplotyp	I50V ^c	E375A ^c	C406R ^c	S411L ^c	S478P ^c	Q551R ^c	Hap-Freq (%) ^a	Hap-Score	Sim p-val ^b
IL4R*01	1	1	1	1	1	1	38.22	0.37	0.71
IL4R*02	2	1	1	1	1	1	26.79	0.41	0.70
IL4R*03	2	2	2	1	2	2	5.56	-0.97	0.34
IL4R*04	1	2	2	1	2	2	4,75	-1,14	0,23
IL4R*05	1	2	2	1	1	1	4,34	-0,28	0,79
IL4R*06	2	1	2	1	1	1	3,86	0,16	0,87
IL4R*07	2	2	2	1	1	1	3,47	-0,98	0,33
IL4R*08	1	1	2	1	1	1	3,40	-0,29	0,79
IL4R*09	2	1	1	2	2	2	1,77	-0,72	0,50
IL4R*10	1	1	1	1	1	2	1,46	-0,58	0,60
IL4R*11	2	1	1	1	2	2	1,22	0,46	0,68

^a Die Haplotyp –Frequenzen wurden mit dem *Expectation-Maximization-Algorithm* geschätzt.

^b Mit Hilfe des *Score-Tests*, der simulierte p-Werte von 10^6 Replikationen einbezieht, wurden die Serum-IgE Spiegel mit den geschätzten Haplotypen verglichen.

^c “1” korrespondiert mit dem Allel aus der Referenzsequenz des humanen Chromosom 16 BAC Klons CIT987SK-58J2 und das Allel “2” ist definiert als Sequenzvariation.

3.2.3 Bestätigung der Ergebnisse der Assoziationsstudie in einer zweiten Kohorte

Zunächst wurde eine *Linkage-Disequilibrium* Analyse der sechs kodierenden IL4R Varianten durchgeführt und dabei die informativsten kodierenden SNPs des humanen IL4R Gens identifiziert. Anschließend wurden die SNPs I50V, C406R und Q551R in einem zweiten Kollektiv von weiteren 689 Blutspendern genotypisiert und die häufigsten Haplotypen berechnet. Erneut konnte eine Assoziation zwischen den geschätzten Haplotypen und dem Phänotyp Serum-IgE Spiegel nicht festgestellt werden (Tab. 16). Auch geschlechtsspezifische Analysen konnten keine Assoziation der IL4R Haplotypen mit dem Phänotyp Serum-IgE Spiegel detektieren.

Tabelle 16 **Geschätzte drei locus IL4R Haplotypen in einem erweiterten Kollektiv von Blutspendern (n=689)**

Haplotyp	I50V ^c	C406R ^c	Q551R ^c	Hap-Freq (%) ^a	Hap-Score	Sim p-val ^b
IL4R*01	1	1	1	38.22	0.37	0.71
IL4R*02	2	1	1	26.79	0.41	0.70
IL4R*03	2	2	2	5.56	-0.97	0.34

^a Die Haplotyp –Frequenzen wurden mit dem *Expectation-Maximization-Algorithm* geschätzt.

^b Mit Hilfe des *Score-Tests*, der simulierte p-Werte von 10^6 Replikationen einbezieht, wurden Serum-IgE Spiegel mit den geschätzten Haplotypen verglichen.

^c “1” korrespondiert mit dem Allel aus der Referenzsequenz des humanen Chromosom 16 BAC Klons CIT987SK-58J2 und das Allel “2” ist definiert als Sequenzvariation.

3.2.4 Der IL4R Haplotyp V50+R551 ist nicht mit dem Phänotyp Serum-IgE Spiegel assoziiert

Nachdem Risma et al. die Assoziation des IL4R Haplotyps V50+R551 mit atopischen Phänotypen gezeigt hatten (94), wurden die Frequenzen des Haplotyps I50V+Q551R in dem erweiterten Kollektiv von 689 Blutspendern berechnet und mit dem Serum-IgE Spiegel mittels *Score*-Test verglichen. Das Ergebnis zeigte erneut keine Assoziation zwischen den vier geschätzten Haplotypen und dem Phänotyp Serum-IgE (Tab. 17). Die Beobachtung von Risma et al. konnte somit nicht bestätigt werden.

Tabelle 17 **Geschätzte zwei *locus* IL4R Haplotypen in einem Kollektiv von Blutspendern (n=689)**

Haplotyp	I50V ^c	Q551R ^c	Hap-Freq (%) ^a	Hap-Score	sim p-val ^b
IL4R*01	1	1	44.11	-0.24	0.82
IL4R*02	1	2	9.81	-0.38	0.82
IL4R*03	2	1	36.30	-0.01	0.99
IL4R*04	2	2	9.78	0.88	0.38

^a Die Haplotyp –Frequenzen wurden mit dem *Expectation-Maximization-Algorithm* geschätzt.

^b Mit Hilfe des *Score*-Tests, der simulierte p-Werte von 10⁶ Replikationen einbezieht, wurden der Serum-IgE Spiegel mit den geschätzten Haplotypen verglichen.

^c “1” korrespondiert mit dem Allel aus der Referenzsequenz des humanen Chromosom 16 BAC Klons CIT987SK-58J2 und das Allel “2” ist definiert als Sequenzvariation.

3.3 Genetische Assoziationsstudien an polytraumatisierten Patienten

3.3.1 Eigenschaften der eingeschlossenen Patienten

Die Eigenschaften der 159 eingeschlossenen schwerverletzten Patienten sind in Tabelle 18 dargestellt. 72 Patienten (45,3 %) erfüllten die Kriterien einer Sepsis 5 Tage (median, Bereich zwischen 3-9 Tage) nach dem schweren Trauma. Sowohl in der Gruppe der Patienten mit Sepsis als auch ohne Sepsis zeigte sich eine Überrepräsentation des männlichen Geschlechts, was auf eine häufigere Beteiligung von Männern an Autounfällen zurückzuführen ist. Die Mortalität betrug bei Patienten mit Sepsis 39 % (28 von 72) und bei Patienten, die keine Sepsis entwickelten 5 % (4 von 87) ($P < 0,0001$, Fisher's exact Test, zweiseitig).

Tabelle 18 Eigenschaften der Polytraumapatienten mit und ohne Sepsis

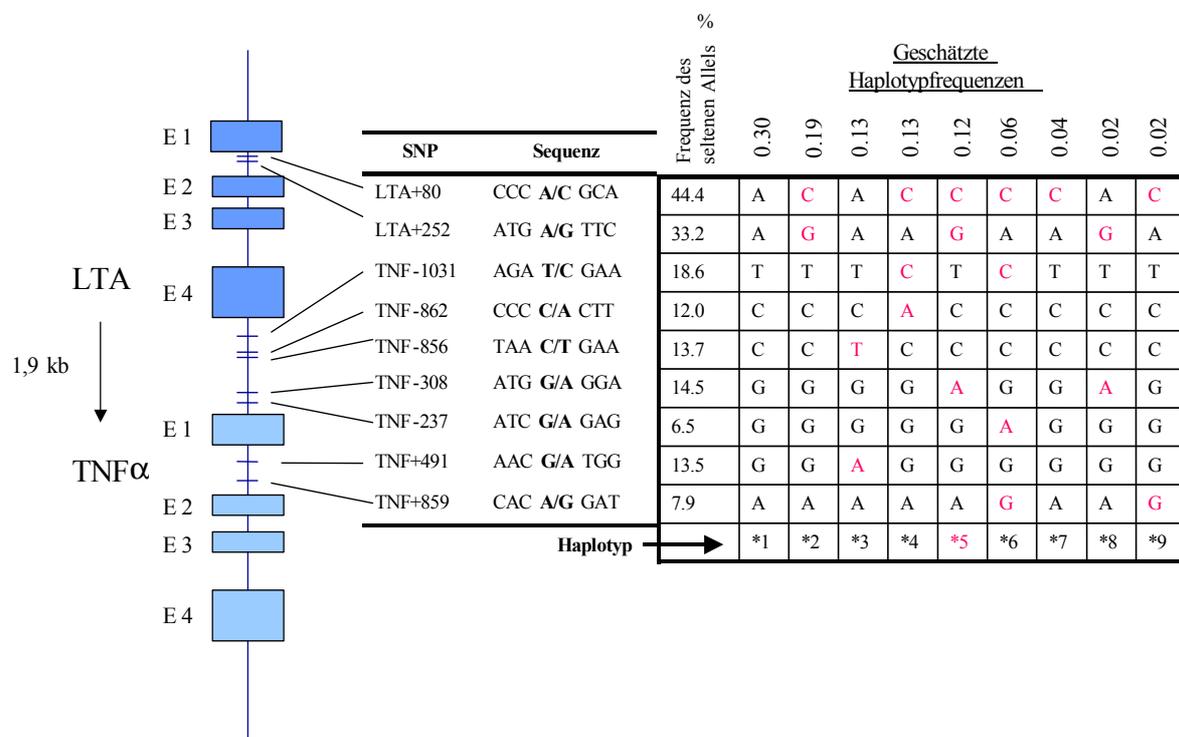
Charakteristika	Sepsis	
	nein (n=87)	ja (n=72)
Alter in Jahren		
Median	35	35
Bereich	18-80	18-76
Männer (%)	59,8	65,3
Körpergewicht (kg)		
Median	77	80
Bereich	50-130	50-120
<i>Injury severity score</i> (ISS)		
Median	17	18
Bereich	5-56	7-63
APACHE II <i>score</i>		
Median	9	11
Bereich	4-28	1-20
Tod innerhalb 20 Tage nach einer schweren Verletzung	4	28

Alle bekannten SNPs der untranslatierten 5' Region und des Intron 1 des TNF Gens, die eine Allelfrequenz von über 5 % des seltenen Allels in der kaukasischen Bevölkerung aufwiesen (TNF -1032A>G, TNF -863C>A, TNF -857C>T, TNF -308G>A, TNF-238G>A, TNF 488C>T, TNF 857A>G (120), wurden in einem Kollektiv von 159 Patienten mit Hilfe der TaqMan® PCR und der SSP-PCR genotypisiert. Zusätzlich erfolgte die Genotypisierung von zwei weiteren SNPs (LTA 80C>A, LTA 252A>G), die in der 5' Region und im Intron 1 des benachbarten Gens LTA (Lymphotoxin alpha) lokalisiert sind. Die genomische Anordnung der untersuchten SNPs ist in Abbildung 16 dargestellt.

Die Rate der homozygoten und heterozygoten Allelkombinationen war im Einklang mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Somit war eine Populationshomogenität des untersuchten Kollektivs gewährleistet.

Anschließend wurde eine *Linkage-Disequilibrium* Analyse durchgeführt, die wie erwartet zeigte, dass die komplette genetische Region einen Haplotyp Block bildet. Abbildung 16 zeigt die geschätzten Frequenzen aller Haplotypen mit einer Frequenz von mindestens 1 %.

Abbildung 16 Struktur des TNF Gens, untersuchte SNPs und geschätzte Haplotypfrequenzen



3.3.2 Ein einzelner TNF Haplotyp ist signifikant assoziiert mit erhöhtem TNF- α Plasmaspiegel nach einem Polytrauma

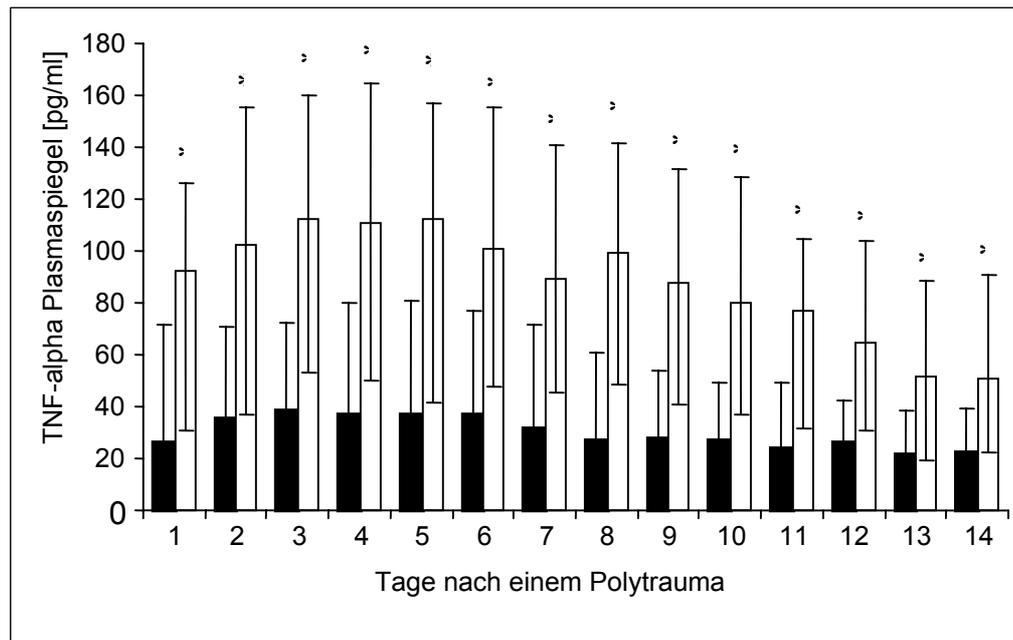
Nach Patienteneinschluss wurden in den ersten 14 Tagen täglich die TNF- α Plasmaspiegel mittels ELISA bestimmt. Zunächst wurde der Einfluss einer TNF Genvariante auf den TNF- α Plasmaspiegel am Tag 1 untersucht. Die Analyse zeigte in Anwesenheit von ein oder zwei Kopien des TNF -308A Allels erhöhte TNF- α Spiegel im Plasma schwer verletzter Patienten (Tag 1: Genotyp GA/AA, median TNF- α Spiegel 92,40 pg/ml; Genotyp GG, median TNF- α Spiegel 26,09 pg/ml) mit einem Signifikanzniveau von $P < 0,0001$ (*Mann-Whitney U-test*, zweiseitig). Die Ergebnisse der TNF- α Plasmaspiegel an den weiteren Tagen sind in Abhängigkeit des TNF Genotyps an Position -308 in Abbildung 17 dargestellt.

Weitere Analysen in der untersuchten Population fanden signifikant erhöhte TNF- α Plasmaspiegel am Tag 1 bei heterozygoten und homozygoten Trägern des LTA 252G Allels im Vergleich zu Patienten mit dem Genotyp AA (Tag 1: Genotyp AG/GG, median TNF- α Spiegel 64,60 pg/ml; Genotyp AA, median TNF- α Spiegel 25,90 pg/ml; $P = 0,0005$, *Mann-Whitney U-test*, zweiseitig). Eine signifikante Assoziation zwischen den anderen TNF Genpolymorphismen und dem TNF- α Plasmaspiegel konnte nicht beobachtet werden.

Mittellogistischer Regressionsanalyse wurde der Einfluss anderer Variablen (*confounding factors*) wie Alter, Geschlecht, Körpergewicht und ISS auf den TNF- α Plasmaspiegel am Tag 1 geprüft. Die Analyse ergab keine signifikanten Ergebnisse.

Abbildung 17 **TNF-alpha Plasmaspiegel bei Polytraumapatienten im Verlauf der Zeit.**

Die Abbildung zeigt TNF- α Plasmaspiegel von Patienten der Allelausprägung TNF-308AA und TNF-308AG (weiße Balken) im Vergleich zu Patienten mit der Allelausprägung TNF-308GG (schwarze Balken). Die Balken stellen die Mittelwerte der gemessenen TNF- α Plasmaspiegel mit Quartilabständen. * $p < 0.0001$, *Mann-Whitney U-test*, zweiseitig.



Des weiteren wurden alle TNF-LTA Haplotypen mit einer Mindestfrequenz von 1% geschätzt und anschließend mit Hilfe des *Score-Test* mit dem quantitativen TNF- α Plasmaspiegel von Tag1 verglichen. Ein LTA-TNF Haplotyp (Haplotyp 5) mit einer Allelfrequenz von 13 % zeigte eine positive Assoziation mit dem TNF- α Plasmaspiegel ($P = 0,015$, Monte Carlo, Tab. 19).

Tabelle 19 Assoziation geschätzter TNF Haplotypen (Frequenz>1%) mit dem quantitativen Phänotyp TNF- α Plasmaspiegel an Tag 1.

Haplotyp ^a	Hap-Score	P ^b
LTA-TNF*01	-1,301	0,204
LTA-TNF*02	0,171	0,859
LTA-TNF*03	-0,132	0,892
LTA-TNF*04	-1,334	0,178
LTA-TNF*05	2,464	0,015
LTA-TNF*06	1,234	0,221
LTA-TNF*07	0,102	0,846

^aDie Haplotypen sind in Abbildung 1 genau dargestellt.

^bMit Hilfe des *Score*-Tests, der simulierte *P*-Werte von 10⁶ Replikationen einbezieht, wurden die TNF- α Plasmaspiegel mit den geschätzten Haplotypen verglichen.

3.3.3 Ein TNF Haplotyp ist signifikant assoziiert mit der Inzidenz des Sepsis Syndroms nach einem Polytrauma

Die Analyse der verschiedenen TNF und LTA Genotypen zeigte eine signifikante Assoziation mit der Inzidenz von Sepsis in Anwesenheit der TNF-308A und der LTA 252G Allele nach einem Polytrauma. Auf Basis der Genotypisierungsergebnisse ließ sich ein Risiko (*odds ratio*) für die Entwicklung einer Sepsis bei heterozygoten und homozygoten Trägern des TNF-308A Allels verglichen mit homozygoten Trägern des Allels TNF-308G von 7,14 berechnen (95 % CI, 3,10 bis 16,45; $P < 0,0001$). Bezogen auf die Variante LTA+252A<G betrug das Risiko (*odds ratio*) 1,96 (95 % CI, 1,02 bis 3,78; $P < 0,042$). Ein ähnliches Risiko für die Entwicklung des Sepsis Syndroms zeigten homozygote und heterozygote Träger des LTA+80A Allels (OR= 0,48; 95 % CI, 0,23 bis 1,00; $P = 0,0391$).

Ein statistisch signifikanter Einfluss anderer Variablen (*confounding factors*) wie Alter, Geschlecht, ISS oder Körpergewicht auf die Entwicklung von Sepsis konnte ausgeschlossen werden. Hinsichtlich des Risikos eine Sepsis zu entwickeln, fand sich ein signifikanter Unterschied bei der Patientengruppe, die bereits am ersten Tag nach Einschluss in die Studie hohe TNF- α Plasmaspiegelwerte lieferte, verglichen mit der Gruppe, die zum gleichen

Zeitpunkt niedrige TNF- α Spiegel im Plasma aufwiesen ($P < 0,0001$). Auch nach Korrektur dieser Variable über eine multivariate logistische Regressionsanalyse blieb die Assoziation der TNF Polymorphismen mit Sepsis erhalten (Tab. 20).

Tabelle 20 Verteilung der TNF Genvarianten bei schwer verletzten Patienten mit und ohne Sepsis.

Statistik: Risiko (*OR*) mit dem 95 % Konfidenzintervall (95 % CI); *Fisher's exact Test*, zweiseitig; zur Korrektur der Variable TNF- α Plasmaspiegel an Tag 1 wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt.

P	Genotyp	Sepsis				Univariate Analyse			Multivariate Analyse
		nein		ja		OR	95% CI	P Wert	P Wert
		n	%	n	%				
LTA 80	CC	21	25.3	29	41.4	0.479	0.227-1.005	0.0391	0.0015
	CA/AA	62	74.7	41	58.6				
LTA 252	AA	42	50.6	24	34.3	1.963	1.020-3.779	0,0416	0,0027
	AG / GG	41	49.4	46	65.7				
TNF -1032	AA	53	63.1	48	67.6	0.819	0.421-1.594	0,6135	
	AG / GG	31	36.9	23	32.4				
TNF -863	CC	62	73.8	54	77.1	0.835	0.398-1.750	0,7089	
	CA / AA	22	26.2	16	22.9				
TNF -857	CC	60	74.1	52	73.2	1.044	0.507-2.152	1,0000	
	CT / TT	21	25.9	19	26.8				
TNF -308	CC	74	89.2	38	53.5	7.140	3.100-16.447	<0.0001	<0.0001
	CT / TT	9	10.8	33	46.5				
TNF -238	GG	74	88.1	62	87.3	1.074	0.411-2.811	1,0000	
	GA / AA	10	11.9	9	12.7				
TNF 488	CC	63	75.0	52	73.2	1.096	0.533-2.255	0,8549	
	CT / TT	21	25.0	19	26.8				
TNF 857	AA	72	86.8	58	81.7	1.467	0.612-3.517	0,5045	
	AG / GG	11	13.2	13	18.3				

Um eine mögliche Assoziation der TNF Haplotypen mit dem Phänotyp Sepsis Syndrom aufzudecken, wurden unter einem linearen Regressionsmodell die Variablen TNF- α

Plasmaspiegel an Tag 1, Alter, Geschlecht, ISS, Körpergewicht und Interaktionen berücksichtigt. Allein der TNF- α Plasmaspiegel erscheint als wichtiger Faktor. Die genetische Untersuchung der Inzidenz des Sepsis Syndroms nach einem Polytrauma ergab ebenso eine signifikante Assoziation des LTA-TNF Haplotyps 5 (s.o.) mit dem Sepsis Syndrom, unabhängig vom TNF- α Plasmaspiegel an Tag 1 (Monte Carlo $P= 0,0019$, Daten nicht abgebildet).

3.3.4 Ein TNF Haplotyp ist signifikant assoziiert mit der Prognose (outcome) nach einem Polytrauma

In der untersuchten Population von 159 schwer verletzten Patienten wurde die Assoziation von TNF und LTA Polymorphismen mit der Prognose (*outcome*) untersucht. Die Untersuchung des Risikos (*odds ratio*) bezüglich des Todeseintritts bei Patienten mit dem Genotyp TNF-308A/A oder TNF-308A/G im Vergleich zu Patienten des Genotyps TNF-308G/G, ergab einen Wert von 7,65 (95 % CI, 3,27 bis 17,93; $P<0,0001$). Bezogen auf die LTA 252A<G Variante wurde ein Risiko von 5,58 (95 % CI, 2,02 bis 15,44; $P<0,0002$) bei Trägern einer oder zwei Kopien des LTA 252G Allels verglichen mit Nichtträgern dieser Allelkombinationen festgestellt. Um den Einfluss der Variablen Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Sepsis, ISS, TNF- α Plasmaspiegel von Tag 1 und Interaktionen zu untersuchen, wurde eine multivariate Analyse durchgeführt mit dem Ergebnis, dass der TNF- α Plasmaspiegel an Tag 1 und die Entwicklung einer Sepsis einen signifikanten Einfluss haben. Das bedeutet, dass bei Patienten mit einem hohen TNF- α Plasmaspiegel an Tag 1 und einer Sepsis ein höheres Sterberisiko vorliegt. Auch nach Berücksichtigung dieser Variablen in der multivariaten Analyse blieb die Assoziation der TNF-308A und LTA 252G Allele mit der Prognose bei Polytraumapatienten bestehen (Tab. 21).

Tabelle 21 Verteilung der TNF Genvarianten bei Patienten in Abhängigkeit der Prognose.

Statistik: Risiko (OR) mit dem 95 % Konfidenzintervall (95 % CI); *Fisher's exact* Test, zweiseitig; multivariate Analyse der Variablen Alter, Geschlecht, Körpergewicht, TNF- α Plasmaspiegel an Tag 1, ISS, Sepsis und Interaktionen. Über eine logistische Regressionsanalyse wurden die Variablen TNF- α Plasmaspiegel an Tag 1 und Sepsis korrigiert.

SNP	Genotyp	Überleben				Univariate Analyse			Multivariate Analyse
		nein		ja		OR	95% CI	P Wert	P Wert
		n	%	n	%				
LTA 80	CC	14	45.2	37	30.1	0.522	0.217-1.279	0.1358	
	CA/AA	17	54.8	86	69.9				
LTA 252	AA	5	15.6	62	50.8	5.580	2.016-15.445	0,0002	0,0075
	AG / GG	27	84.4	60	49.2				
TNF -1032	AA	21	65.6	80	64.5	0.952	0.421-2.156	1,0000	
	AG / GG	11	34.4	44	35.5				
TNF -863	CC	24	77.4	92	74.2	0.839	0.330-2.132	0,8195	
	CA / AA	7	22.6	32	25.8				
TNF -857	CC	24	75.0	89	73.6	0.927	0.378-2.272	1,0000	
	CT / TT	8	25.0	32	26.4				
TNF -308	CC	12	37.5	101	82.1	7.652	3.266-17.926	<0.0001	0,0097
	CT / TT	20	62.5	22	17.9				
TNF -238	GG	28	87.5	109	87.9	1.038	0.320-3.374	1,0000	
	GA / AA	4	12.5	15	12.1				
TNF 488	CC	24	75.0	92	74.2	0.958	0.391-2.347	1,0000	
	CT / TT	8	25.0	32	25.8				
TNF 857	AA	27	84.4	104	84.6	1.014	0.347-2.962	1,0000	
	AG / GG	5	15.6	19	15.4				

Zur Detektion einer Assoziation zwischen einem LTA-TNF Haplotyp und der Prognose nach einem Polytrauma, wurde erneut eine lineare Regressionsanalyse unter Einbezug der oben genannten Variablen durchgeführt. Auch hier zeigte die Analyse, dass der LTA-TNF Haplotyp 5 signifikant assoziiert ist mit einer fatalen Prognose unabhängig vom TNF- α Plasmaspiegel an Tag 1 und Sepsis.

4 Diskussion

Seit langem wird versucht, die pathophysiologischen Zusammenhänge der Folgen von Infektionen wie z.B. Sepsis und septischem Schock zu ergründen, um effektive kausale Therapiemöglichkeiten anwenden zu können. Der Nachweis einer hereditären Prädisposition für Infektionserkrankungen (23) und die Beobachtung unterschiedlicher Krankheitsverläufe bei Patienten nach zunächst gleicher Verletzungsschwere erhöhten das Interesse, genetische Varianten in Genen pro- und antiinflammatorischer Mediatoren zu ermitteln. Eine Reihe bisher publizierter genetischer Assoziationsstudien komplexer Erkrankungen wie Atopie/Asthma, Sepsis und Diabetes mellitus zeigen widersprüchliche Ergebnisse.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde an einem Schlüsselgen des adaptiven Immunsystems beispielhaft die *Common Variant – Common Disease (CV-CD)* Hypothese untersucht. Die *CV-CD* Hypothese postuliert, dass häufige Genvarianten (Frequenz >1%), die gewöhnlich in einer gesunden Population allein keine schädlichen Effekte oder klinischen Symptome hervorrufen, in der Lage sind, durch genetische Interaktionen und Umweltfaktoren ein Krankheitsbild auszulösen bzw. die Schwere einer Erkrankung zu beeinflussen (121;122). Zur Überprüfung der Hypothese wurde als Modell das IL4R Gen gewählt. Am Beispiel des IL4R Gens war es möglich, den Einfluss genetischer Varianten der kodierenden Region des IL4R auf intermediäre Phänotypen wie z.B. Proliferation von CTLL-2 Zellen und CD23-Expression auf A20 Zellen *in vitro*, sowie auf proximale Phänotypen wie IgE-Spiegel *in vivo* zu untersuchen.

Im zweiten Teil der Arbeit stand am Beispiel des TNF Gens die Replikation von Assoziationsstudien über den Einfluss nicht-kodierender genetischer Varianten auf den TNF- α Serum Spiegel, die Entstehung einer Sepsis und Prognose nach einem Polytrauma im Vordergrund. Zur Untersuchung der Fragestellungen wurden sowohl Einzel-SNP-Analysen als auch Haplotypanalysen in funktionellen und genetisch-epidemiologischen Studien einbezogen.

4.1 Variabilität im menschlichen Genom

In den letzten Jahrzehnten wurden eine Reihe von Anstrengungen unternommen, krankheitsrelevante Gene zu identifizieren und ihre DNA-Sequenzen mit ihren Varianten zu entschlüsseln. Eine wesentliche Grundlage zur systematischen Identifizierung von

krankheitsrelevanten Genen bildete das 1990 begonnene internationale Human-Genom-Projekt (HGP), das 2001 mit dem konkurrierenden Projekt der *Celera Genomics Corporation* nahezu alle DNA-Bausteine des menschlichen Genoms vollständig sequenziert hatte. Durch den Vergleich der Genome zwei beliebiger Individuen wurde die genetische Variabilität (123), die sich in zwei Klassen einteilen lässt, genomweit beschrieben: Insertionen und Deletionen (*inserts, deletions*) und Basenaustausche (*single nucleotide polymorphisms, SNP*). Polymorphismen bestehen zu einem Teil aus tandemartig wiederholten Sequenzen, den sogenannten STRs (*short tandem repeats*), mit einer Länge von 12-500 Basenpaaren (5). Diese liegen in der Regel in nicht-kodierenden Abschnitten des Genoms (5) und wirken sich in der Regel phänotypisch nicht aus (124). Zum anderen Teil gibt es auch einfache Basenaustausche (*single nucleotide polymorphisms, SNP*), von denen nach Schätzungen der *International SNP Map Working Group* ungefähr 11 Millionen existieren und deren seltenes Allel eine Frequenz von mindestens 1% in der Population aufweist (125). 10 Millionen dieser SNPs sind bereits bekannt (126).

Während der größte Teil der SNPs wahrscheinlich keine phänotypischen Auswirkungen hat, wirkt sich ein kleiner Teil im Hinblick auf Krankheitsdispositionen phänotypisch aus. SNPs, die in der kodierenden Genregion lokalisiert sind und eine Änderung der Aminosäuresequenz hervorrufen (*missense SNP*) (108), sind in der Lage, die Struktur und damit die Funktion des kodierten Proteins zu verändern. Die Änderung der Proteinfunktion stellt eine wichtige Ursache rezessiv oder dominant erblicher monogener Erkrankungen dar (124). Für die Ätiologie komplexer Erkrankungen ist die Identifizierung von kausalen genetischen Varianten komplizierter. Die meisten SNPs liegen in der nicht-kodierenden Region des Genoms, und haben sehr wahrscheinlich keinen Einfluss auf den Phänotyp.

Aufgrund der großen Anzahl der vorhandenen SNPs, ist es außerordentlich schwierig, diejenigen SNPs zu entschlüsseln, die ursächlich bestimmte Erkrankungen begünstigen (26). Zudem besteht der Hinweis, dass sowohl bekannte SNPs als auch seltene Varianten (*rare variants*) Einfluss auf Phänotypen haben (126). In einer kürzlich durchgeführten Studie identifizierten Hinds et al. innerhalb verschiedener Populationen einen Satz von 1,58 Millionen SNPs, die für genomweite Assoziationsstudien von hohem Informationswert sind (126). Als Kopplungsungleichgewicht wird das überzufällig häufig gemeinsame Auftreten von Allelen an einem genetischen Marker (SNP) und einem Krankheitsgenort, wenn sie eng miteinander verbunden sind (127).

4.2 Funktionelle Studien am IL4R Gen

Ausgehend von der Entdeckung zahlreicher SNPs in der kodierenden Region des humanen IL4R Gens, die zu einem Aminosäureaustausch führen (91;98;99), wurden insbesondere drei der identifizierten IL4R Varianten (I50V, S478P, Q551R) in zahlreichen *in vitro* Studien auf ihre Fähigkeit untersucht, die IL-4 induzierte Signaltransduktion und folglich Proliferation und Genexpression zu beeinflussen. Für die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse über die funktionellen Auswirkungen dieser Polymorphismen wurden bisher keine zufriedenstellenden Erklärungen gefunden.

In dieser Arbeit wurden die funktionellen Auswirkungen der kodierenden IL4R Varianten S478P allein und Q551R in Kombination mit I50V auf die Phänotypen IL-4 induzierte Proliferation und CD23-Expression vorgenommen. Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

4.2.1 Funktionelle Untersuchung der kodierenden IL4R Variante S478P

Die kodierende IL4R Variante S478P ist innerhalb des I4R Motivs lokalisiert, dem ein Einfluss auf die IL-4 induzierte Signaltransduktion zugeschrieben wird (87;128;129). Das Motiv enthält einen Tyrosinrest an Position 472 (Y1), der für die direkte Phosphorylierung von IRS-1/2 verantwortlich ist und folglich über die PI-3-Kinase oder MAP-Kinase Signalwege die IL-4 abhängige Zellproliferation initiiert (79). In Studien konnte gezeigt werden, dass bei Transfektanten, in denen das I4R Motiv deletiert ist oder aufgrund des Aminosäureaustausches an Position 472 von Tyrosin nach Phenylalanin (Y472F) inaktiviert ist, keine Proliferation mehr möglich war (87;88;97).

In einer kürzlich durchgeführten Studie konnte eine außer Kraft gesetzte IRS-Phosphorylierung mit verminderter Proliferation von CD4⁺T-Lymphozyten bei Mäusen, die eine Aminosäuresubstitution von Tyrosin nach Phenylalanin an Position 500 (Y1 des murinen IL-4R) aufwiesen, beobachtet werden (65). Zudem konnte *in vivo* bei transgenen murinen Trägern der Variante Y500F, eine erhöhte Allergen-induzierte IgE-Produktion festgestellt werden (65). Die Studien lassen vermuten, dass die humane Variante S478P, die nur sechs Aminosäuren vom Tyrosinrest Y1 entfernt ist, möglicherweise ebenfalls die Funktion des I4R Motivs beeinflusst und zu erhöhten IgE-Spiegeln führt (130).

Für die IL4R Variante S478P wurde bereits eine Beeinflussung der Signaltransduktion aufgrund von Konformationsänderungen von Kruse et al. postuliert (92). Die Substitution von

Serin durch Prolin, welches planar vorliegt, führt möglicherweise zu einer Einschränkung der Drehung der Proteinkette und beeinflusst auf diese Weise die Konformation des IL-4R, wodurch Signalmoleküle an ihre Bindungsstellen nicht mehr andocken können.

Um den Einfluss der IL4R Variante S478P auf die IL-4 induzierte Zellproliferation zu untersuchen, wurde als Zellsystem die murine cytotoxische T Zelllinie CTLL-2 gewählt und mit humanen IL4R cDNA Konstrukten, die entweder für den Wildtyp (S478) oder die Variante (P478) kodieren, transfiziert. Die humane IL-4R α Kette ist in der Lage, mit der common γ Kette des murine IL-4R einen funktionellen Komplex zu bilden und dadurch humanes IL-4, das für den humanen Rezeptorkomplex spezifisch ist, zu binden (72;89;112;131).

Nach IL-4 Stimulation wurde die Proliferation der transfizierten CTLL-2 Zellen mittels Messung des eingebauten Tritium [^3H]-markierten Thymidins bestimmt. In den durchgeführten Proliferationsstudien zeigten Zelllinien, die den Wildtyp der IL-4R α Kette exprimieren, ebenso wie Zellen mit der IL-4R α Kette Aminosäuresubstitution, eine dosisabhängige IL-4 induzierte Proliferation, die sich im Vergleich beider Zelllinien nicht unterschied. Die Beobachtung lässt vermuten, dass der Einfluss der Variante S478P auf die IL-4 induzierte Zellproliferation allein keine Bedeutung zu haben scheint.

Dafür spricht auch das Ergebnis des *Alignment* der humanen IL-4R α Ketten Aminosäuresequenz um den Tyrosinrest Y1 im I4R Motiv mit sechs weiteren Spezies (Abb. 18). Einige Aminosäuren, die in unmittelbarer Nähe zum Tyrosinrest Y1 liegen, bilden eine konservierte Kernsequenz im I4R Motiv. Die Aminosäure an Position 478 der humanen IL-4R α Kette liegt jedoch außerhalb der konservierten I4R Kernsequenz, eine funktionelle Rolle dieser Variante ist demnach sehr fraglich.

Die intrazelluläre IL4R Variante Q551R befindet sich in unmittelbarer Nähe zum Tyrosinrest Y2 (Y550), der einen der drei konservierten Tyrosinreste Y2, Y3, Y4 (Y550, Y578 und Y606) bildet und die zusammen Komponenten einer Genaktivierungsdomäne darstellen (64;132). Diese Region scheint als Bindungsstelle für die SH2-Domäne des Transkriptionsfaktors STAT6 sowie für die Phosphorylierung von SHP-1 und SHP-2 von Bedeutung zu sein. Nach Aktivierung von STAT6 translozieren dimerisierte STAT6 Komplexe in den Zellkern, wo sie über Bindung an Promotoren von IL-4 induzierbaren Genen deren Transkription auslösen.

Der Einfluss der humanen IL4R Variante Q551R auf die Aktivierung von STAT6 wurde bereits mehrfach untersucht. Hershey et al. beschrieben eine verminderte Bindungsfähigkeit der inhibitorisch wirkenden Phosphatase SHP-1 in Anwesenheit des Allels R551 verglichen mit dem IL4R Wildtyp Q551. Demzufolge wurde bei Trägern des R551 Allels im Vergleich zu Trägern des Wildtypallels Q551 eine erhöhte CD23 Expression auf B Zellen beobachtet (91). Dieses Ergebnis konnte in weiteren Studien, in denen eine Aminosäuresubstitution von Glutamin nach Arginin an Position 551 der humanen IL-4R α Kette durchgeführt wurde, nicht bestätigt werden (93;96;133).

In transfizierten murinen B Zelllinien zeigten Risma et al. kürzlich, dass die Variante Q551R allein keinen Einfluss auf die IL-4 induzierte CD23 Expression besitzt, jedoch in Kombination mit der extrazellulären Aminosäuresubstitution I50V der humanen IL-4R α Kette zu einer erhöhten Expression von CD23 führt (94). Den Einfluss des Allels I50 auf eine erhöhte IL-4 induzierte CD23 Expression stellten bereits Mitsuyasu et al. dar (93). In einer Studie am murinen IL-4R führte das I50 Allel bei Stimulationen mit IL-4 Konzentration unter 1 ng/ml unabhängig von der Allelkombination an Aminosäureposition 551 zu einer gesteigerten STAT6 abhängige Transkriptionsaktivität (95). Bei einer gesättigten IL-4 Konzentration waren Unterschiede bezüglich des Einflusses auf die STAT6 Induktion nicht feststellbar (95).

Die funktionelle Relevanz der kodierenden IL4R Variante Q551R in Kombination mit der extrazellulären Variante I50V konnten wir für die IL-4 induzierte CD23 Expression nicht feststellen. Eine mögliche Erklärung liegt in der redundanten Kapazität der IL-4R Tyrosinreste Y2, Y3 und Y4, als Bindungsstellen für STAT6 zu dienen und folglich für die STAT6 Aktivierung bzw. für die Expression von CD23 bedeutsam zu sein (132).

Das bedeutet, dass Mutationen an einem oder zwei Tyrosinresten keinen Effekt auf die IL-4 induzierte CD23 Expression aufweisen, nur im Falle von Mutationen an allen drei Tyrosinresten ist eine IL-4 induzierte CD23 Expression nicht mehr möglich (132). Andere

Autoren konnten in Transfektionsstudien zeigen, dass sogar IL-4R α Proteine, denen alle drei Tyrosinreste fehlten, in der Lage waren, STAT6 zu aktivieren und Genexpression zu induzieren (134). Bei Fehlen der Tyrosinreste wird möglicherweise eine ausreichende STAT6 Aktivierung gewährleistet, indem über eine Aktivierung des *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweges die mutierten IL-4 Rezeptoren so umprogrammiert werden, dass nukleäres phosphoryliertes STAT6 mobilisiert wird (61). Neben der Aktivierung des ERK MAPK Signalweges ist für eine erfolgreiche STAT6 Aktivierung eine intakte ID-1 Region, die charakterisiert ist durch eine Glutaminsäure- und Serinreiche Sequenz, notwendig (61).

4.3 Assoziationsstudien

4.3.1 Assoziation zwischen genetischen IL4R Varianten und dem Phänotyp Serum-IgE Spiegel

Erhöhte IgE-Spiegel und die Anwesenheit spezifischer IgE-Antikörper nach einer Exposition mit Allergenen stellen charakteristische Merkmale atopischer Erkrankungen dar. Mit Hilfe von genomweiten Kopplungsanalysen wurde eine Genregion auf Chromosom 16p12 entdeckt, die mit dem atopischen Phänotyp Serum-IgE-Spiegel in Zusammenhang steht (99;135). In vielen anderen Untersuchungen konnte diese Kopplung nicht repliziert werden (136-138), siehe auch die Übersicht von Wills-Karp et al. (139). Ein Kandidaten-Gen innerhalb dieser Region stellt das IL4R Gen dar, das für die alpha Kette des heterodimeren IL-4R Komplexes kodiert. Hershey et al. beschrieben 1997 in der amerikanischen Population eine signifikante Assoziation des R551 Allels mit dem Hyper-IgE-Syndrom (91). Basierend auf diesem Ergebnis wurden in den letzten Jahren zahlreiche Studien über die genetische Assoziation von kodierenden IL4R Varianten mit verschiedenen atopischen Phänotypen wie z.B. dem Serum-IgE Spiegel publiziert, die diskrepante Befunde darboten. Die meisten der Assoziationsstudien wurden mit einzelnen IL4R Varianten, insbesondere mit den IL4R Varianten Q551R und I50V, durchgeführt. Der Gegenstand aktueller Assoziationsstudien sind neben Einzel-SNP-Analysen auch Analysen von IL4R-Haplotypen.

Aufgrund der Feststellung früherer Arbeiten, dass ein Zusammenhang zwischen einer positiven Atopieanamnese und erhöhten Serum-IgE Spiegel vorliegt (100;140), wurde ein Serum-IgE Spiegel > 100 kU/l in der vorliegenden Arbeit als atopischer Phänotyp definiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, in der alle bekannten kodierenden IL4R Varianten (I50V, E375A, C406R, S411L, S478P und Q551R) in einem Kollektiv von Blutspendern untersucht wurden, lassen keine signifikante Assoziation der IL4R Varianten mit dem quantitativen Phänotyp Serum-IgE Spiegel erkennen. Auch unter Verwendung von IL4R Haplotypen, die aus den sechs kodierenden IL4R SNPs über einen *Expectation-Maximization* Algorithmus geschätzt wurden, ergab sich keine signifikante Assoziation mit dem quantitativen Phänotyp Serum-IgE Spiegel.

Basierend auf dem Postulat des *gain-of-function* Allels R551 (91) untersuchten Risma et al. eine mögliche Assoziation der Variante Q551R in Kombination mit der extrazellulären IL4R Variante I50V mit atopischen Phänotypen. Dabei konnte die Gruppe zeigen, dass die Kombination der Allele V50+R551 zu einer signifikanten Assoziation mit allergischem Asthma ($p=0,015$) führt (94). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der IL4R Haplotypen der Varianten I50V+Q551R brachte das Ergebnis, dass keiner der möglichen IL4R Haplotypen mit dem Phänotyp Serum-IgE Spiegel assoziiert war. Die Möglichkeit, dass es sich in der durchgeführten Studie um ein falsch negatives Ergebnis handelt, bleibt sehr gering. Unter Verwendung der publizierten Ergebnisse von Hackstein et al., die in einem vergleichbaren Kollektiv eine signifikante Assoziation zwischen den IL4R Varianten E375A, C406R und S478P und niedrigen Serum-IgE Spiegel nachgewiesen haben (100), wurde die *power* der Studie kalkuliert, die die berichteten Unterschiede bezüglich des Serum-IgE Spiegels zu entdecken vermag. Ausgehend von einem Signifikanzniveau von 0,001 lag die *power* in der vorliegenden Studie bei über 90%, um Effekte hinsichtlich des Serum-IgE Spiegels auffinden zu können.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Ergebnisse der durchgeführten *in vitro* Untersuchungen an den kodierenden IL4R Varianten I50V und Q551R mit den Resultaten der genetischen Assoziationsstudie übereinstimmen.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurden eine Reihe von Assoziationsstudien veröffentlicht, die über eine Assoziation von kodierenden IL4R Varianten mit dem Phänotyp Serum-IgE Spiegel berichtet haben (siehe Tab. 22). Einen Einfluss der IL4R Variante Q551R auf den atopischen Phänotyp Serum-IgE Spiegel konnte in vielen Studien verschiedener Populationen nicht bestätigt werden (93;100;137;138;141-148). Widersprüchliche Ergebnisse wurden auch bei Studien, die eine positive Assoziation der Variante Q551R mit dem Serum-

IgE Spiegel zeigen konnten, beobachtet. Während Hershey et al. eine Assoziation des R551 Allels mit erhöhten IgE Spiegeln postulierten (91), konnten Kruse et al. eine Assoziation des Allels mit erniedrigten IgE Spiegeln beobachten, insbesondere beim Auftreten der Variante in Kombination mit der Variante S478P (92).

Uneinheitliche Ergebnisse werden auch über die weiteren kodierenden Polymorphismen der IL-4R α Kette beschrieben (Tab.22). In der folgenden Tabelle ist eine Übersicht der Studien dargestellt, die einzelne IL4R Varianten, aber auch IL4R Haplotypen zur genetischen Assoziation mit dem Phänotyp Serum-IgE Spiegel untersucht haben.

Tabelle 22 Genetische Assoziationsstudien von kodierenden IL4R Varianten mit dem Phänotyp Serum-IgE Spiegel

Polymorphismus	Population	Probanden	Assoziation	p-Wert	Autor
Q551	Briten	525	ja	0,018	(149)
I50V, S478P, Q551R	Briten	300	nein		(141)
I50V/S478P I50V/Q551R	Briten	300	ja	0,01 0,05	(141)
R551	Chinesen	416	ja	<0,05	(150)
Q551R	Franzosen	225	nein		(142)
Q551R	Amerikaner	45	nein		(143)
IL4R Gen	Dänen	424	nein		(144)
E375A, C406R, S478P	Deutsche	158	ja	0,017; 0,017; 0,033	(100)
R551	Amerikaner	3	ja		(91)
E375, C406, S478	Holländer	200	ja	0,02; 0,01; 0,0007	(130)
C406R	Finnen	682	ja	0,010	(151)
P478, R551 P478/R551	Deutsche	181	ja	0,003; 0,002; 0,0008	(92)
R551	Italiener	851	nein		(145)
I50V, E375A, C406R, S478P, Q551R; IL4R Haplotyp	Italiener	823	nein		(146)
R551 I50	Japaner	480	nein ja	0,0001	(93)
Q551R	Japaner	361	nein		(137)
Q551R	Italiener	851	nein		(147)
V50/R551	Amerikaner	265	ja	0,015	(94)
R551	Polen	44	ja	0,05	(152)
I50 R551	Japaner	200	ja nein	0,044	(148)
V50	Inder	241	ja	0,05	(153)
I50V, E375A, C406R, S478P, Q551R	Deutsche, Schweden	415	nein		(138)

Mögliche Ursachen für die Diskrepanz der publizierten Assoziationsstudien liegen zum einen in der Durchführung der Studien und ihrer statistischen Bewertung. Die wesentlichen Kritikpunkte werden in Kapitel 4.3.3 diskutiert.

Da bisher eine allgemeingültige Assoziation zwischen den kodierenden IL4R Varianten und dem Phänotyp Serum-IgE Spiegel nicht nachgewiesen werden kann, ist es möglich, dass IL4R

Varianten der kodierende Region weder für die Funktion des IL-4R noch für die Assoziation von IL4R mit Atopie bedeutsam sind.

Basierend auf Ergebnissen von Kopplungsanalysen nahmen Ober et al. an, dass Varianten in der nicht-kodierenden Region des IL4R Gens, wie z.B. der 5'Promotorregion oder der 3' untranslatierten Region für die Gentranskription und Prädisposition von Erkrankungen verantwortlich sein könnten (99;154;155). So konnten Hackstein et al. zeigen, dass die Variante -3223C>T, die in der Promotorregion des IL4R lokalisiert ist, auch nach Bonferroni-Korrektur signifikant assoziiert ist mit niedrigen Spiegeln an löslichem IL4R (154). Da diese Variante im Kopplungsungleichgewicht mit der extrazellulären IL4R Variante I50V liegt, könnte die Kombination beider Varianten für atopische Phänotypen von Bedeutung sein (154). Auch Hosomi et al. haben Untersuchungen an der IL4R Promotorregion durchgeführt. Sie konnten weitere IL4R Promotorvarianten entdecken, von denen alle bis auf eine (-184A>G) signifikant assoziiert waren mit dem Phänotyp atopische Dermatitis (155).

Die Annahme, dass die relevanten Varianten außerhalb der kodierenden Region lokalisiert sind, führen folglich zu dem Schluss, dass Assoziationsstudien auch falsch negative Ergebnisse erbringen, da die funktionell wichtigen Varianten nicht berücksichtigt werden (156).

Wir verwerfen die *Common Variant-Common Disease* Hypothese in Bezug auf natürlich vorkommende kodierende Varianten des IL4R Gens. Eine alternative Hypothese stellt die *Rare Variant-Common Disease* Hypothese dar, die davon ausgeht, dass seltene Mutationen an der Prädisposition einer Erkrankung mitwirken (157). Die Gruppe um Bruce Beutler entdeckte bei 200 Patienten, die an einer schweren Meningokokken Erkrankung litten, mehrere seltene Mutationen im *Toll like receptor* (TLR) 4 Gen, jedoch nur eine Mutation in einer ethnisch abgestimmten Kontrollpopulation (158). Eine Untersuchung häufiger, kodierender Varianten des TLR4 Gens ergab keinen Unterschied zwischen der Gruppe der Erkrankten und der Kontrollgruppe (158). Eine allgemeine Gültigkeit dieses Befunds würde die Sequenzierung des gesamten IL4R Gens bei mehreren hundert Atopikern und Kontrollen erforderlich machen, um die Rolle seltener Varianten dieses Gens für die Atopie-Pathogenese zuverlässig zu verwerfen oder zu belegen.

4.3.2 Studien zur genetischen Assoziation von TNF Varianten mit Sepsis zugehörigen Phänotypen

In den letzten Jahren sind zahlreiche Studien über die genetische Assoziation der TNF Varianten TNF-308G>A (34;38-40) und LTA 252A>G (35-37;40-44) mit dem Auftreten von Sepsis, septischem Schock oder Tod bei Intensivpatienten publiziert worden. Im Widerspruch dazu stehen Studien, die keine signifikante Assoziation der beiden TNF Varianten mit Phänotypen, die mit dem Sepsis Syndrom in Beziehung stehen, zeigen konnten (37;39;42;45-48;159;160). Die Ursachen für die kontroversen Ergebnisse könnten darin begründet sein, dass zum einen die Anzahl der einbezogenen Studienteilnehmer sehr gering war oder dass zum anderen Variablen (*confounding factors*) die wahren Effekte der TNF Varianten auf Sepsis relevante Phänotypen maskiert haben. In Tabelle 23 sind die wichtigsten Studien über die Assoziation zwischen TNF-Genvarianten und Sepsis- Phänotypen dargestellt.

Tabelle 23 Übersicht der wichtigsten TNF Assoziationsstudien über Sepsis assoziierte Phänotypen

SNP	Einschlusskriterium	Probanden	Phänotyp	Assoziation	Autor
TNF-308A TNFB2	schwere Sepsis	80/153	schwere Sepsis Überleben	nein ja	(42)
TNFC1 TNFC1c2	schwere postoperative Sepsis	122/138	schwere Sepsis Prognose	ja ja	(161)
TNFB2	schwere Sepsis	40	Prognose TNF- α Spiegel	ja ja	(43)
TNF-308A	septischer Schock	89/87	septischer Schock Prognose	ja ja	(38)
TNFB2	schweres stumpfes Trauma	110	schwere Sepsis TNF- α Spiegel	ja ja	(36)
TNFB2	schwere Sepsis	93	Überleben	ja	(162)
TNF-308A	SIRS	112	septischer Schock TNF- α Spiegel	ja/nein ja/nein	(48)
TNF-308A LTA 250A	CAP	280	septischer Schock	ja/nein	(160)
TNF-308A	septischer Schock	37	Mortalität TNF- α Spiegel	ja ja	(34)
TNF-308 TNFB1	MODS	88/303	MODS MODS	ja ja	(40)
TNFB1/B1 TNFB2/B2 TNF-308A	schweres stumpfes Trauma	70	schwere Sepsis schwere Sepsis schwere Sepsis	ja ja nein	(37)
TNF-308A	ISS \geq 16	152	schwere Sepsis Tod	ja nein	(39)
LTA250A	CAP	343	septischer Schock	ja	(44)
TNF-308	Neugeborene mit Geburtsgew. <1501 g	33/35	Sepsis	nein	(47)
TNFB2	große abdominale Operation	172	Komplikationen	ja	(41)
TNF-308A TNFB2	SIRS	44	Sepsis, septischer Schock, Mortalität	nein	(45)
TNF-308	Neugeborene mit niedrigem Geburtsgew.	173	Sepsis Mortalität	nein ja	(159)
TNFB2	große gastrointestinale Operation	160	Mortalität aufgrund einer Sepsis	ja	(35)
LTA250A	postoperative Sepsis	85	schwere Sepsis, Schock, Tod	nein	(46)

In der vorliegenden Arbeit wurden alle bekannten SNPs des TNF Gens, die eine Frequenz des seltenen Allels von über 5% aufwiesen, und zwei SNPs des LTA Gens (LTA 80C>A, LTA

252A>G) in einem Kollektiv von 159 polytraumatisierten Patienten genotypisiert und anschließend einer univariaten und mittels logistischer Regression multivariaten Analyse in Bezug auf Sepsis-relevante Phänotypen unterzogen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Promotorvariante TNF-308G>A und die LTA Variante LTA 252A>G mit der Entwicklung einer Sepsis assoziiert sind. Verschiedene Studien konnten keine Assoziation zwischen den TNF Varianten und dem Phänotyp schwere Sepsis nachweisen (36;37;42;45;46). Die Arbeitsgruppe Majetschak et al. konnte in einem Kollektiv von traumatisierten Patienten keine Assoziation zwischen der TNF Variante – 308G>A und der Entwicklung einer schweren Sepsis finden (37). Eine Beziehung der LTA 252A>G Variante mit dem Phänotyp schwere Sepsis konnte dagegen bereits in einer früheren Studie der Arbeitsgruppe gezeigt werden (36). In einer folgenden Studie wurden jedoch widersprüchliche Ergebnisse publiziert. So wurde sowohl eine Assoziation zwischen dem LTA 252A Allel als auch dem LTA 252 G Allel und der Entwicklung einer schweren Sepsis festgestellt (37). Aufgrund der geringen Anzahl an Patienten (n=14), die einer schwere Sepsis entwickelten, sind diese Ergebnisse kritisch zu bewerten. Ebenso konnte in anderen Studien eine signifikante Assoziation zwischen der Variante TNF-308G>A und schwerer Sepsis oder Tod aufgrund schwerer Sepsis nicht nachgewiesen werden (42;45). Auch Assoziationen zwischen der Variante LTA 252G>A und der Entwicklung einer schweren Sepsis sind nicht festgestellt worden (45;46). Die Ergebnisse könnten ebenfalls dadurch erklärt werden, dass alle Studien in ihren Untersuchungen nur eine geringe Fallzahl P (n=44; n=80; n=85) hatten.

Die vorliegende Arbeit zeigt nicht nur eine Assoziation der Varianten TNF-308G>A und LTA 252A>G mit der Entwicklung einer schweren Sepsis, sondern auch mit dem Eintritt des Todes als Folge der schweren Sepsis. Die Arbeitsgruppe O’Keefe et al. untersuchten in einer Studie an 152 Patienten, die einen *Injury Severity Score* von mehr als 16 aufwiesen, den Zusammenhang zwischen der Variante TNF-308G>A und dem Risiko eine schwere Sepsis bis hin zum Tod zu entwickeln (39). Die Daten der prospektiven Studie stellten in Einklang mit den Ergebnissen dieser Studie eine signifikante Assoziation zwischen Trägern des TNF-308A Allels und dem Risiko eine schwere Sepsis zu entwickeln fest. Keine Assoziation der Variante TNF-308G>A zeigte sich mit dem Eintritt des Todes (39). Möglicherweise liegt der Grund für die nicht signifikante Assoziation des TNF-308A Allels mit Tod ($p=0,25$) in der geringen Anzahl an verstorbenen Patienten. Ein Effekt der TNF Varianten auf Sepsis bezogene Phänotypen ist auch in weiteren Studien nachweisbar. So berichteten Mira et al., dass Träger des A Allels an Position –308 des TNF α Gens ein erhöhtes Risiko haben, einen

septischen Schock zu erleiden (38). Nachdem die TNF α Promotorregion bei 89 Patienten mit septischen Schock und 87 gesunde Kontrollen sequenziert wurde, konnte festgestellt werden, dass insbesondere Träger des -308A Allels eine hohe Suszeptibilität für septischen Schock und Tod hatten ($p=0,008$) (38). Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Appoloni et al., die auch eine Assoziation zwischen dem -308A Allel und der Suszeptibilität für den Tod nach septischem Schock ($p=0,02$) zeigen konnten (34). Tang et al. dagegen berichteten, dass das -308A Allel nicht assoziiert ist mit septischen Schock, jedoch mit dem Tod bei Patienten, die einen septischen Schock bereits entwickelt hatten ($p<0,05$) (48). Eine Assoziation zwischen der Variante LTA 252A>G und einer schlechten Prognose oder dem Tod nach einer schweren Sepsis konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (35;43;162).

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der genotypischen Analyse der TNF Genregion nachgewiesen, dass Träger des TNF-308A Allels sowie Träger des LTA 252G Allels signifikant erhöhte Werte ($p<0,0001$; $p=0,0005$) für den Plasma TNF- α Spiegel sowohl einen Tag nach der Aufnahme als auch während der folgenden 14 Tage zeigten. Erhöhte TNF- α Spiegel wurden, bereits bevor die Diagnose Sepsis gestellt wurde, bei Trägern der Allele TNF-308A und LTA 252G beobachtet. Es ist anzunehmen, dass die Freisetzung großer Mengen an TNF- α nach einem Trauma zur Entwicklung einer hyperinflammatorischen Antwort des Organismus führt, die letztendlich die Entstehung einer Sepsis bei Trägern der beiden hier untersuchten Varianten begünstigt.

Von diesen Ergebnissen abweichende Daten liegen in anderen Studien hinsichtlich des Plasma TNF- α Spiegels vor. Erhöhte TNF- α Spiegel konnten Tang et al. nur bei Trägern des -308A Allels, die bereits einen septischen Schock entwickelt hatten, beobachten (48). Dieser Befund steht in Einklang mit den Daten von Appoloni et al.. Die Gruppe konnte bei Patienten, die zuvor mit septischen Schock aufgenommen wurden und den Genotyp TNF-308A trugen, in den ersten 24 Stunden nach Aufnahme erhöhte TNF- α Spiegel nachweisen (34). Im Widerspruch zu den vorangehenden Daten steht die Untersuchung von Majetschak et al. zur Assoziation der Variante TNF-308G>A mit dem Plasma TNF- α Spiegel. Einen Tag nach dem Trauma wurde bei Patienten eine Assoziation des TNF-308G Allels mit erhöhten Plasma TNF- α Spiegeln festgestellt (37).

Die Assoziation unterschiedlich hoher TNF- α Spiegel bei Patienten (*high and low producer*) weist darauf hin, dass genetische Variationen eine bedeutende Auswirkung auf die Regulation

der TNF Synthese und daher auch auf die Prognose der Erkrankung haben (163). Die funktionelle Variante, die sich ursächlich auf die Regulation der TNF Synthese auswirkt, ist nicht bekannt. Die Analyse der geschätzten TNF Haplotypen in dieser Arbeit zeigte, dass die Promotorvariante TNF-308G>A immer mit Variante LTA 252A>G gekoppelt ist. Aufgrund der fehlenden Rekombination der beiden Marker ist es in dieser Population nicht möglich, die kausale Variante innerhalb des Haplotyps zu bestimmen. In zahlreichen diskrepanten funktionellen Studien wurde untersucht, inwieweit die Promotorvariante TNF-308G>A die TNF Transkription *in vitro* moduliert und folglich die Regulation der TNF- α Produktion beeinflusst (29;57;164-166). Wilson et al. fanden heraus, dass in humanen B Zelllinien das TNF-308A Allel die Transkription des Gens im Vergleich zum Wildallel TNF-308G erhöht (166), während die Arbeitsgruppe Knight et al. in kürzlich durchgeführten *in vitro* Experimenten zeigten, dass die Variante TNF-308G>A in humanen B Zelllinien keinen Effekt auf die Transkription des TNF Gens ausübt (165). Einen möglichen Erklärungsansatz für die widersprüchlichen Ergebnisse der *in vitro* Experimente lieferte die Arbeitsgruppe Kroeger et al., die überzeugend darstellen konnten, dass der Einfluss des TNF-308G>A Polymorphismus auf die Transkription des TNF Gens abhängig ist vom Zelltyp und der Zelldifferenzierung (57). Untersuchungen am LTA Gen indessen zeigten, dass eine genetische Variation innerhalb dieses Gens die Transkription beeinflusst (165).

Die in dieser Studie bei Traumapatienten gezeigte Assoziation des Haplotyps TNF-308A, LTA 252G mit erhöhten TNF- α Plasma Spiegel lässt die Hypothese zu, dass die Variante TNF-308A die Transkription des TNF Gens in einem bisher noch nicht identifizierten Zelltyp beeinflussen könnte.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte genetische TNF-Assoziationsstudie unterscheidet sich in einigen wesentlichen Punkten von den meisten klinischen Beobachtungsstudien, die eine genetische Prädisposition in Bezug auf das Sepsis Syndrom untersuchen. Eine mögliche Grundlage für nicht übereinstimmende Ergebnisse der klinischen Beobachtungsstudien liefern unterschiedliche Einschlusskriterien in den jeweiligen Studien. In dieser Arbeit wurden in einer prospektiven Studie 159 Patienten mit dem Phänotyp schweres lebensbedrohliches Trauma aus der Region Giessen rekrutiert. Als Einschlusskriterien galten schwere Verletzungen in mindestens zwei Körperregionen oder drei große Frakturen, Alter zwischen 18 und 65 Jahren, zum Erfassen der Verletzungsschwere ein geschätzter *Injury-Severity-Score* (ISS) von 12 Punkten oder mehr und des weiteren eine Zeitspanne von weniger als 12 Stunden zwischen Unfall und Aufnahme. Es ist

herauszustellen, dass im Gegensatz zu den meisten klinischen Studien, die Patienten mit einer bereits entwickelten Sepsis, schweren Sepsis oder septischen Schock unabhängig von einer Grunderkrankung einbinden (retrospektive Studien), in der vorliegenden Studie, Patienten vor Manifestation einer Sepsis rekrutiert wurden (prospektive Studie). Die Entstehung einer Sepsis wurde prospektiv am Krankenbett erhoben und mit der allgemeingültigen Sepsisdefinition verglichen (3).

Rauchschwalbe et al. untersuchten Effekte der TNF-Genvarianten in einer Gruppe von Patienten (n=85), die nach einer gastrointestinalen Perforation oder arteriellen Verschlusskrankheit postoperativ eine Sepsis entwickelten. Unter diesem Gesichtspunkt besteht die Möglichkeit, dass aufgrund des Grundleidens andere Variablen (*confounding factors*) die Entwicklung einer Sepsis begünstigen und demzufolge die wahren Effekte der TNF-Genvarianten maskiert werden. Folglich lässt sich die Annahme, dass Genvarianten der TNF-Promotorregion für die Entwicklung einer Sepsis nach einem schweren Trauma prädiktiv sind, in retrospektiven Studien möglicherweise nicht nachweisen.

4.3.3 Kritische Betrachtung von genetischen Assoziationsstudien

Gegenstand aktueller wissenschaftlicher und klinischer Untersuchungen ist die Erfassung genetischer Grundlagen häufiger komplexer Erkrankungen. Im Mittelpunkt steht dabei die Identifikation von Genen und Genvarianten, die an der Ausprägung einer Krankheit involviert sind. Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen werden derzeit zwei Ansätze verfolgt, zum einen die Untersuchung von Kopplung (Segregationsstudien) und zum anderen die Untersuchung von Assoziation (121), die in der vorliegenden Arbeit verfolgt wurde. Genetische Assoziationsstudien vergleichen üblicherweise eine Gruppe von Individuen, die eine bestimmte Erkrankung vorweisen, mit einer gesunden Gruppe in der Art einer klassischen Fall-Kontrollstudie (127). Das Ziel liegt darin, herauszuarbeiten, ob eine spezielle genetische Variante überzufällig häufig in der Gruppe der betroffenen Individuen auftritt im Vergleich zu der Kontrollgruppe (121;127). Neben den Fall-Kontrollstudien werden auch prospektive Kohortenstudien durchgeführt. Diese vergleichen die Häufigkeit einer Erkrankung bei Trägern einer genetischen Variante *versus* Nichtträgern der genetischen Variante (167).

Den häufigsten Assoziationsstudien liegt die *Common Variant – Common Disease (CV-CD)* Hypothese zugrunde. Die *CV-CD* Hypothese besagt, dass häufige Allele (Frequenz >1%), die gewöhnlich in einer gesunden Population allein keine schädlichen Effekte oder klinischen Symptome hervorrufen, in der Lage sind, durch genetische Interaktionen und Umweltfaktoren ein Krankheitsbild auszulösen bzw. die Schwere einer Erkrankung zu beeinflussen (121;122). Trotz erfolgreicher Anwendungen werden klassische Assoziationsstudien kritisiert. Abweichende Ergebnisse, die in einer Vielzahl von veröffentlichten Assoziationsstudien beobachtet wurden, erfordern eine kritische Analyse (168). Die Gründe für eine falsch-positive Assoziation liegen zum einen in einer Heterogenität der untersuchten Bevölkerung (*population heterogeneity*), was durch eine unebenmäßige Verteilung von Allelfrequenzen in Subgruppen (*population stratification*) zu einer Scheinassoziation führen kann (122;127). Daneben muss eine gefundene Assoziation nicht darauf beruhen, dass die genetische Variante einen Risikofaktor für die Erkrankung darstellt, sondern kann durch Variablen (*confounding factors*) wie z.B. Rauchen, Körpergewicht usw. entstehen. Cardon et al. liefern weitere allgemein verbreitete Fehler bei der Durchführung von Assoziationsstudien wie z.B. fehlende Replikation einer Studie, kleine Untersuchungsgröße, schlecht ausgewählte Kontrollen, Überinterpretation von Ergebnissen usw. (168). Um eine kausale Assoziation zwischen einer genetischen Variante und einer Erkrankung anzuerkennen sind daher Richtlinien für die Durchführung von Assoziationsstudien notwendig (45;168). Zunächst sollte eine biologische Beziehung zwischen dem kodierten Protein und der Pathogenese der Erkrankung vorliegen. Für die biologische Relevanz sollte in funktionellen Studien das potentiell krankmachende Allel durch Veränderung des Proteins Effekte zeigen (169). Des Weiteren sollte die in der Assoziationsstudie untersuchte Gruppe homogen sein und eine ethnische Zugehörigkeit aufweisen. Idealerweise wird eine Assoziation sowohl in Familien- als auch in Populationsstudien untersucht und in einer unabhängigen Studie repliziert. Zusätzlich sollte eine Untersuchung des Kopplungsungleichgewichtes (*linkage disequilibrium*) einbezogen werden, da eine Assoziation auch dann vorliegen kann, wenn eine genetische Variante im Kopplungsungleichgewicht mit dem eigentlich krankheitsbeitragenden Allel steht (168). Ferner sollte das Risiko (*odds ratio*) hoch und der Signifikanzwert *P* klein sein (168).

Um die Reproduzierbarkeit einer Assoziationsstudie zu gewährleisten, sind neben dem Studiendesign strikte Kriterien zur statistischen Auswertung erforderlich (170-173). Die mangelnde Reproduzierbarkeit von Assoziationsstudien ist oft auch auf mangelnde statistische Methoden zurückzuführen. Ein für das Scheitern einer Replikation höchst wahrscheinlicher Grund liegt im Auftreten des Fehler Typ I (*type I error*) (170). Bei der

Fehlentscheidung Typ I wird die Null-Hypothese H_0 trotz Richtigkeit verworfen. Das bedeutet, dass ein Unterschied durch Zufall in der untersuchten Stichprobe nachgewiesen wurde, obwohl dieser in der Population tatsächlich nicht besteht. Zudem hat sich herausgestellt, dass eine Kontrolle des Fehler Typ I bei konventionellen Signifikanzniveaus ($P < 0,05$) nicht ohne weiteres die *false positive report probability* (FPRP) oder die *posterior error rate* (PER) kontrolliert und dementsprechend nicht vor falsch positiven Ergebnissen bei offensichtlich positiven Ergebnissen schützt (172-174). Um eine geringe Fehlerrate (PER) zu gewährleisten, ist ein Signifikanzwert P in der Größenordnung von 10^{-5} notwendig (170-173). Diese Notwendigkeit liegt ebenfalls in der Beobachtung begründet, dass signifikante P Werte häufig nach einer Bonferroni-Korrektur keine Signifikanz mehr aufwiesen wie z. B. in der Studie von Risma et al. (94) beobachtet. Zusätzlich zu einem niedrigen P Wert ist eine ausreichende statistische *power* erforderlich.

Im Mittelpunkt des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit stand die Replikation von genetischen Assoziationsstudien am Beispiel des TNF Gens. Um eine kausale Assoziation zwischen einer genetischen Variante und dem Sepsis-Syndrom zu replizieren, wurden die Auswirkungen von nicht kodierenden TNF-Genvarianten in Hinblick auf den TNF- α Plasmaspiegel, die Entstehung einer Sepsis und die Prognose untersucht. Aufgrund häufiger Kritikpunkte an genetischen Assoziationsstudien wurde die vorliegende Studie nach Kriterien der heutigen genetischen Epidemiologie konzipiert und durchgeführt. Grundlage für diese Studie bildete die Tatsache, dass eine biologische Beziehung zwischen dem TNF Protein und der Pathogenese verschiedener Infektions- und Autoimmunerkrankungen mehrfach publiziert wurde (53;59). Zudem wurde in zahlreichen *in vitro* Studien untersucht, inwieweit genetische TNF-Varianten funktionelle Auswirkungen auf die Regulation der TNF Transkription zur Konsequenz haben. So konnten *in vitro* Untersuchungen am TNF-308A Allel Hinweise für eine Modulation der TNF Transkription liefern (57;166). Die vorgestellte Studie, die mit dem Ziel durchgeführt wurde, eine genetische Prädisposition für Sepsis zu replizieren, erforderte ein Kollektiv, in dem septische Patienten mit nicht septischen adäquat vergleichbar waren. Daher erschien eine prospektive Kohortenstudie, in der innerhalb des Kollektivs an Polytraumapatienten die Häufigkeit der Entwicklung von Sepsis verbunden mit der Prognose bei Trägern einer genetischen Variante *versus* Nichtträgern verglichen wurden, als geeignet. Zu diesem Zeitpunkt umfasste die Studie mit 159 Polytraumapatienten, die nach Anwendung des Hardy-Weinberg-Gesetzes eine homogene Gruppe darstellte, die bisher größte Population, an der prospektiv eine Assoziation zwischen TNF-Genvarianten und dem Sepsis-Syndrom mit

den dazu relevanten Phänotypen untersucht worden war. Bei der Untersuchung der Einzelnukleotidpolymorphismen fand sich eine signifikante Assoziation der TNF Varianten TNF-308A und LTA+252G mit dem TNF- α Plasmaspiegel, der Entwicklung einer Sepsis und der Prognose ($p < 10^{-5}$). In der Untersuchung des Kopplungsungleichgewichts zeigte sich, dass diese beiden Varianten aneinander gekoppelt sind und folglich ein Haplotyp für die obengenannte Assoziation verantwortlich ist. Die weitere Analyse, bei der andere beeinflussende Variablen (*confounding factors*) wie ISS, Alter und Geschlecht ausgeschlossen wurden, lieferte bei Trägern des Haplotyps TNF-308A/LTA+252G hohe Werte mit Signifikanzniveaus von $p = 10^{-4}$ für das Risiko (OR) eine Sepsis zu entwickeln. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien kann eine Assoziation des Haplotyps TNF-308 LTA+252 mit dem TNF- α Plasmaspiegel, der Entwicklung einer Sepsis und der Prognose eindeutig belegt werden.

Genetische Assoziationsstudien sollten daher heute nur unter Beachtung der modernen genetisch-epidemiologischen Methodik (170-173) geplant, durchgeführt und publiziert werden.

5 Zusammenfassung

Der Krankheitsverlauf nach einem Polytrauma wird wesentlich von einer unkontrollierten Entzündungsreaktion des Organismus bestimmt, an dem sowohl Reaktionen des angeborenen als auch adaptiven Immunsystems beteiligt sind. Die Beobachtung, dass Patienten mit gleichem Verletzungsmuster unterschiedlich auf ein Polytrauma reagieren (Sepsis-Syndrom vs. non-Sepsis-Syndrom), lässt genetische Unterschiede vermuten, die folglich zu einem ungleichen Verhältnis von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen führen. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand das proinflammatorische TNF Gen, das einen wesentlichen Trigger der systemischen Entzündungsreaktion (SIRS) nach einem Polytrauma darstellt, sowie das anti-inflammatorische IL-4, das für den Th1/Th2 Wechsel während des Sepsis-Syndroms bedeutend ist. Die Wirkungen des IL-4 wurden am Beispiel seines Bindungspartners, dem IL-4R Komplex mit der IL-4R α Kette als Hauptkomponente untersucht. Der Einfluss einzelner genetischer Varianten auf das Sepsis Syndrom wurde bisher in zahlreichen genetischen Assoziationsstudien untersucht, die diskrepante Ergebnisse lieferten. Mögliche Ursachen liegen in der Planung und Durchführung von Studien.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden am Beispiel der hoch polymorphen IL-4R α Kette natürlich vorkommende kodierende IL4R Genvarianten, die zu einem Aminosäureaustausch am Rezeptorprotein führen, auf die *Common Variant- Common Disease* (CV-CD) Hypothese untersucht. Über Mutagenese und Transfektion der erstellten IL4R Konstrukte wurde in funktionellen Studien der Einfluss der verschiedenen IL4R Genvarianten auf die intermediären Phänotypen Zellproliferation und CD23 Expression untersucht. Ein Unterschied zwischen Zellen, die eine Aminosäuresubstitution exprimierten und Zellen, die den Wildtyp exprimierten, konnte in Bezug auf die beiden Phänotypen Zellproliferation und CD23 Expression nicht festgestellt werden. Im Anschluss bei der genetisch-epidemiologischen Analyse der bekannten IL4R Polymorphismen zeigte sich ebenso, dass weder ein IL4R Polymorphismus noch ein IL4R Haplotyp signifikant assoziiert war mit dem quantitativen Phänotyp Serum-IgE Spiegel. Folglich wurde die CD-CV Hypothese für die natürlich vorkommenden kodierenden IL4R Varianten verworfen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Assoziationsstudien bei einem Sepsis-Syndrom nach einem Polytrauma nach Kriterien der modernen genetisch-epidemiologischen Methodik repliziert. In einer prospektiven Kohortenstudie, die 159 Patienten mit einer

Mehrfachverletzung einschloss, wurde der Einfluss nicht kodierender TNF Genvarianten auf den TNF- α Plasmaspiegel, auf die Entstehung einer Sepsis sowie auf die Prognose untersucht. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden die TNF- α Plasmaspiegel der Patienten täglich erfasst. Zusätzlich wurde bei den Patienten eine Genotypisierung der wichtigsten TNF und LTA Polymorphismen vorgenommen. Bei der Analyse der Polymorphismen der TNF-Genregion wurde festgestellt, dass das TNF-308A Allel sowie das LTA+252G Allel signifikant assoziiert sind mit dem TNF- α Plasmaspiegel, mit der Entstehung von Sepsis und der Prognose nach einem Polytrauma ($p < 0,0001$). Die Assoziation geschätzter Haplotypen zeigt, dass insbesondere der Haplotyp TNF-308A/LTA+252G signifikant assoziiert ist mit den oben genannten Phänotypen. Die TNF Genotypisierung bietet daher künftig die Möglichkeit, Hochrisikopatienten zu erfassen und diesen eine gezielte präventive Therapie zukommen zu lassen.

5.1 Summary

The disease process in severely injured patients is basically determined by an unregulated inflammatory response of the host, which are often contributed to both, the innate and the adaptive immune system. Patients encountering similar injuries react in a different manner after a trauma (sepsis-syndrome vs. non-sepsis-syndrome). This may be due to genetic variation leading to imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines.

The signature cytokines of this thesis are the proinflammatory TNF gene, which is a pivotal trigger of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) after severe injury as well as the anti-inflammatory IL-4 gene, which promotes the Th1/ Th2 switch in sepsis syndrome. The effects of IL-4 were assessed on its binding partner, the IL4R complex with the IL-4R α chain as the main component. The impact of single gene variants on sepsis syndrome was examined in several association studies, which have led to controversial findings. The disparate results of these studies may be due to differences in undertaking association studies.

In the first part of this thesis we studied the Common Variant- Common Disease (CV-CD) hypothesis regarding common IL4R coding SNPs, which led to amino acid substitutions at the receptor protein. After mutagenesis and transfection of different IL-4R constructs we analyzed the functional impact of the IL-4R amino acid substitutions on the intermediate phenotypes, IL-4 induced cell proliferation and CD23 expression. However, the analysis of

responsiveness to IL-4 of transfectants carrying either the variant IL-4R α chain or the wild type IL-4R α chain did not reveal any difference in IL-4 induced cell proliferation and CD23 expression. Furthermore, the analysis of all known coding IL4R variants and common haplotypes in blood donors did not indicate a significant association with the phenotype total serum IgE level. Therefore, we rejected the CV-CD hypothesis regarding common coding variants of the IL4R gene.

The second part of the thesis comprised the replication of association studies on the role of TNF- α and TNF gene variants in sepsis syndrome including modern genetic epidemiological methods. After inclusion of 159 severely injured patients in a prospective cohort study, the association of non coding TNF gene variants with TNF- α production, the development of sepsis syndrome and the predictive value of these markers for outcome were assessed.

For this reason we genotyped most of all TNF and LTA gene variants. A significant association for the incidence of sepsis after multiple trauma was observed for the TNF-308A allele and the completely linked LTA+252G allele ($p < 0.0001$). Additionally, both alleles showed significant association with elevated TNF- α plasma levels and death after severe injury.

In conclusion, the presence of one or two copies of the TNF-308A/ LTA+252G haplotype is strongly predictive for the above mentioned phenotypes. Clinically, genotyping of TNF gene variants may help to identify patients, who are at risk to develop sepsis syndrome and to permit the initiation of preemptive anti-inflammatory therapy to reduce mortality.

6 Literatur

- (1) Budelmann G. [Hugo Schottmuller, 1867-1936. The problem of sepsis]. *Internist (Berl)* 1969; 10(3):92-101.
- (2) Balk RA, Bone RC. The septic syndrome. Definition and clinical implications. *Crit Care Clin* 1989; 5(1):1-8.
- (3) Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101(6):1644-1655.
- (4) Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997; 112(1):235-243.
- (5) Tabrizi AR, Zehnbauser BA, Freeman BD, Buchman TG. Genetic markers in sepsis. *J Am Coll Surg* 2001; 192(1):106-117.
- (6) Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348(16):1546-1554.
- (7) Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420(6917):885-891.
- (8) Beutler B, Ulevitch RJ. Genetic Analysis of Host Responses in Sepsis. *Curr Infect Dis Rep* 2001; 3(5):419-426.
- (9) Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348(2):138-150.
- (10) Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383(6603):787-793.
- (11) Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17(3):138-146.
- (12) Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:495-521.

- (13) Chomarat P, Banchereau J. An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur Cytokine Netw* 1997; 8(4):333-344.
- (14) Choi P, Reiser H. IL-4: role in disease and regulation of production. *Clin Exp Immunol* 1998; 113(3):317-319.
- (15) Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5(4):285-294.
- (16) Sasaki S, Nishikawa S, Miura T, Mizuki M, Yamada K, Madarame H et al. Interleukin-4 and interleukin-10 are involved in host resistance to *Staphylococcus aureus* infection through regulation of gamma interferon. *Infect Immun* 2000; 68(5):2424-2430.
- (17) Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 2004; 4(11):841-855.
- (18) Murphy TJ, Paterson HM, Mannick JA, Lederer JA. Injury, sepsis, and the regulation of Toll-like receptor responses. *J Leukoc Biol* 2004; 75(3):400-407.
- (19) Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* 2001; 193(3):237-244.
- (20) Christou NV, Meakins JL, Gordon J, Yee J, Hassan-Zahraee M, Nohr CW et al. The delayed hypersensitivity response and host resistance in surgical patients. 20 years later. *Ann Surg* 1995; 222(4):534-546.
- (21) O'Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, Chin DH, Mannick JA, Rodrick ML. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann Surg* 1995; 222(4):482-490.
- (22) Calandra T, Bochud PY, Heumann D. Cytokines in septic shock. *Curr Clin Top Infect Dis* 2002; 22:1-23.
- (23) Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 1988; 318(12):727-732.

- (24) Knight J. Polymorphisms in Tumor Necrosis Factor and Other Cytokines As Risks for Infectious Diseases and the Septic Syndrome. *Curr Infect Dis Rep* 2001; 3(5):427-439.
- (25) Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet* 2001; 2(12):967-977.
- (26) Lin MT, Albertson TE. Genomic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Med* 2004; 32(2):569-579.
- (27) Little SG. Implikation eines genomischen Polymorphismus für Diagnostik und Risikostratifizierung bei polytraumatisierten Patienten am Beispiel des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Promotor Genpolymorphismus. 2003.
- (28) Menges T, Hermans PW, Little SG, Langefeld T, Boning O, Engel J et al. Plasminogen-activator-inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism and prognosis of severely injured patients. *Lancet* 2001; 357(9262):1096-1097.
- (29) Bayley JP, Ottenhoff TH, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun* 2004; 5(5):315-329.
- (30) Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1985; 229(4716):869-871.
- (31) Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987; 330(6149):662-664.
- (32) Mannel DN, Echtenacher B, TNF in the inflammatory response. *Chem Immunol* 2000; 74: 141-61.
- (33) Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, Esposito C, Cui X, Banks SM et al. Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166(9):1197-1205.
- (34) Appoloni O, Dupont E, Vandercruys M, Andriens M, Duchateau J, Vincent JL. Association of tumor necrosis factor-2 allele with plasma tumor necrosis factor-alpha levels and mortality from septic shock. *Am J Med* 2001; 110(6):486-488.

- (35) Kahlke V, Schafmayer C, Schniewind B, Seegert D, Schreiber S, Schroder J. Are postoperative complications genetically determined by TNF-beta NcoI gene polymorphism? *Surgery* 2004; 135(4):365-373.
- (36) Majetschak M, Flohe S, Obertacke U, Schroder J, Staubach K, Nast-Kolb D et al. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. *Ann Surg* 1999; 230(2):207-214.
- (37) Majetschak M, Obertacke U, Schade FU, Bardenheuer M, Voggenreiter G, Bloemeke B et al. Tumor Necrosis Factor Gene Polymorphisms, Leukocyte Function, and Sepsis Susceptibility in Blunt Trauma Patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9(6):1205-1211.
- (38) Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999; 282(6):561-568.
- (39) O'Keefe GE, Hybki DL, Munford RS. The G-->A single nucleotide polymorphism at the -308 position in the tumor necrosis factor-alpha promoter increases the risk for severe sepsis after trauma. *J Trauma* 2002; 52(5):817-825.
- (40) Reid CL, Perrey C, Pravica V, Hutchinson IV, Campbell IT. Genetic variation in proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 2002; 30(10):2216-2221.
- (41) Riese J, Woerner K, Zimmermann P, Denzel C, Hohenberger W, Haupt W. Association of a TNFbeta gene polymorphism with complications after major abdominal operations. *Shock* 2003; 19(1):1-4.
- (42) Stuber F, Udalova IA, Book M, Drutskaya LN, Kuprash DV, Turetskaya RL et al. -308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. *J Inflamm* 1995; 46(1):42-50.
- (43) Stuber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1996; 24(3):381-384.

- (44) Waterer GW, ElBahlawan L, Quasney MW, Zhang Q, Kessler LA, Wunderink RG. Heat shock protein 70-2+1267 AA homozygotes have an increased risk of septic shock in adults with community-acquired pneumonia. *Crit Care Med* 2003; 31(5):1367-1372.
- (45) Calvano JE, Um JY, Agnese DM, Hahn SJ, Kumar A, Coyle SM et al. Influence of the TNF-alpha and TNF-beta polymorphisms upon infectious risk and outcome in surgical intensive care patients. *Surg Infect (Larchmt)* 2003; 4(2):163-169.
- (46) Rauchschalbe SK, Maseizik T, Mittelkotter U, Schluter B, Patzig C, Thiede A et al. Effect of the LT-alpha (+250 G/A) polymorphism on markers of inflammation and clinical outcome in critically ill patients. *J Trauma* 2004; 56(4):815-822.
- (47) Treszl A, Kocsis I, Szathmari M, Schuler A, Heninger E, Tulassay T et al. Genetic variants of TNF-[FC12]a, IL-1beta, IL-4 receptor [FC12]a-chain, IL-6 and IL-10 genes are not risk factors for sepsis in low-birth-weight infants. *Biol Neonate* 2003; 83(4):241-245.
- (48) Tang GJ, Huang SL, Yien HW, Chen WS, Chi CW, Wu CW et al. Tumor necrosis factor gene polymorphism and septic shock in surgical infection. *Crit Care Med* 2000; 28(8):2733-2736.
- (49) Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72(9):3666-3670.
- (50) Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000; 50(3):184-195.
- (51) Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001; 11(9):372-377.
- (52) Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14(3-4):185-191.
- (53) Bayley JP, de Rooij H, van den Elsen PJ, Huizinga TW, Verweij CL. Functional analysis of linker-scan mutants spanning the -376, -308, -244, and -238 polymorphic sites of the TNF-alpha promoter. *Cytokine* 2001; 14(6):316-323.

- (54) Belfer I, Buzas B, Hipp H, Dean M, Evans C, Lorincz I et al. Haplotype structure of inflammatory cytokines genes (IL1B, IL6 and TNF/LTA) in US Caucasians and African Americans. *Genes Immun* 2004; 5(6):505-512.
- (55) Smyth MJ, Johnstone RW. Role of TNF in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Microsc Res Tech* 2000; 50(3):196-208.
- (56) Baseggio L, Bartholin L, Chantome A, Charlot C, Rimokh R, Salles G. Allele-specific binding to the -308 single nucleotide polymorphism site in the tumour necrosis factor-alpha promoter. *Eur J Immunogenet* 2004; 31(1):15-19.
- (57) Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine* 2000; 12(2):110-119.
- (58) Knight JC, Keating BJ, Kwiatkowski DP. Allele-specific repression of lymphotoxin-alpha by activated B cell factor-1. *Nat Genet* 2004; 36(4):394-399.
- (59) Simmonds MJ, Heward JM, Howson JM, Foxall H, Nithiyananthan R, Franklyn JA et al. A systematic approach to the assessment of known TNF-alpha polymorphisms in Graves' disease. *Genes Immun* 2004; 5(4):267-273.
- (60) Kelly-Welch AE, Hanson EM, Boothby MR, Keegan AD. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science* 2003; 300(5625):1527-1528.
- (61) Mora AL, Stephenson LM, Enerson B, Youn J, Keegan AD, Boothby M. New programming of IL-4 receptor signal transduction in activated T cells: Stat6 induction and Th2 differentiation mediated by IL-4Ralpha lacking cytoplasmic tyrosines. *J Immunol* 2003; 171(4):1891-1900.
- (62) Navarro-Zorraquino M, Lozano R, Deus J, Pastor C, Larrad L, Tejero E et al. Determination of the immunoglobulin E postoperative variation as a measure of surgical injury. *World J Surg* 2001; 25(5):585-591.
- (63) Bullens DM, Kasran A, Peng X, Lorre K, Ceuppens JL. Effects of anti-IL-4 receptor monoclonal antibody on in vitro T cell cytokine levels: IL-4 production by T cells from non-atopic donors. *Clin Exp Immunol* 1998; 113(3):320-326.

- (64) Pan PY, Rothman P. IL-4 receptor mutations. *Curr Opin Immunol* 1999; 11(6):615-620.
- (65) Blaeser F, Bryce PJ, Ho N, Raman V, Dedeoglu F, Donaldson DD et al. Targeted inactivation of the IL-4 receptor alpha chain I4R motif promotes allergic airway inflammation. *J Exp Med* 2003; 198(8):1189-1200.
- (66) Noelle R, Krammer PH, Ohara J, Uhr JW, Vitetta ES. Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(19):6149-6153.
- (67) Defrance T, Aubry JP, Rousset F, Vanbervliet B, Bonnefoy JY, Arai N et al. Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J Exp Med* 1987; 165(6):1459-1467.
- (68) Ohara J, Paul WE. Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(21):8221-8225.
- (69) Youn J, Hwang SH, Cho CS, Min JK, Kim WU, Park SH et al. Association of the interleukin-4 receptor alpha variant Q576R with Th1/Th2 imbalance in connective tissue disease. *Immunogenetics* 2000; 51(8-9):743-746.
- (70) Gessner A, Rollinghoff M. Biologic functions and signaling of the interleukin-4 receptor complexes. *Immunobiology* 2000; 201(3-4):285-307.
- (71) Keegan AD, Nelms K, Wang LM, Pierce JH, Paul WE. Interleukin 4 receptor: signaling mechanisms. *Immunol Today* 1994; 15(9):423-432.
- (72) Idzerda RL, March CJ, Mosley B, Lyman SD, Vanden Bos T, Gimpel SD et al. Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily. *J Exp Med* 1990; 171(3):861-873.
- (73) Russell SM, Keegan AD, Harada N, Nakamura Y, Noguchi M, Leland P et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* 1993; 262(5141):1880-1883.
- (74) Jensen PL. The interleukin 13 receptor complex. *Stem Cells* 2000; 18(1):61-62.
- (75) Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:425-456.

- (76) Jung T, Schrader N, Hellwig M, Enssle KH, Neumann C. Soluble human interleukin-4 receptor is produced by activated T cells under the control of metalloproteinases. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119(1):23-30.
- (77) Kruse S, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA. Characterization of the membrane-bound and a soluble form of human IL-4 receptor alpha produced by alternative splicing. *Int Immunol* 1999; 11(12):1965-1970.
- (78) Fanslow WC, Clifford KN, Park LS, Rubin AS, Voice RF, Beckmann MP et al. Regulation of alloreactivity in vivo by IL-4 and the soluble IL-4 receptor. *J Immunol* 1991; 147(2):535-540.
- (79) Nelms K, Huang H, Ryan J, Keegan A, Paul WE. Interleukin-4 receptor signalling mechanisms and their biological significance. *Adv Exp Med Biol* 1998; 452:37-43.
- (80) Galizzi JP, Zuber CE, Harada N, Gorman DM, Djossou O, Kastelein R et al. Molecular cloning of a cDNA encoding the human interleukin 4 receptor. *Int Immunol* 1990; 2(7):669-675.
- (81) Ryan JJ, McReynolds LJ, Huang H, Nelms K, Paul WE. Characterization of a mobile Stat6 activation motif in the human IL-4 receptor. *J Immunol* 1998; 161(4):1811-1821.
- (82) Hershey GK. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(4):677-690.
- (83) Chomarat P, Banchereau J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol* 1998; 17(1-4):1-52.
- (84) Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ. The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* 2000; 19(21):2577-2584.
- (85) Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I, Mao I, Adra CN, Hopkin JM. Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunol Today* 2000; 21(2):60-64.
- (86) Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:701-738.

- (87) Keegan AD, Nelms K, White M, Wang LM, Pierce JH, Paul WE. An IL-4 receptor region containing an insulin receptor motif is important for IL-4-mediated IRS-1 phosphorylation and cell growth. *Cell* 1994; 76(5):811-820.
- (88) Zamorano J, Keegan AD. Regulation of apoptosis by tyrosine-containing domains of IL-4R alpha: Y497 and Y713, but not the STAT6-docking tyrosines, signal protection from apoptosis. *J Immunol* 1998; 161(2):859-867.
- (89) Harada N, Yang G, Miyajima A, Howard M. Identification of an essential region for growth signal transduction in the cytoplasmic domain of the human interleukin-4 receptor. *J Biol Chem* 1992; 267(32):22752-22758.
- (90) Harada N, Higuchi K, Wakao H, Hamasaki N, Izuhara K. Identification of the critical portions of the human IL-4 receptor alpha chain for activation of STAT6. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246(3):675-680.
- (91) Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med* 1997; 337(24):1720-1725.
- (92) Kruse S, Japha T, Tedner M, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J et al. The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology* 1999; 96(3):365-371.
- (93) Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Ihara K et al. Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis. *J Immunol* 1999; 162(3):1227-1231.
- (94) Risma KA, Wang N, Andrews RP, Cunningham CM, Ericksen MB, Bernstein JA et al. V75R576 IL-4 receptor alpha is associated with allergic asthma and enhanced IL-4 receptor function. *J Immunol* 2002; 169(3):1604-1610.
- (95) Stephenson L, Johns MH, Woodward E, Mora AL, Boothby M. An IL-4R {alpha} Allelic Variant, I50, Acts as a Gain-of-Function Variant Relative to V50 for Stat6, But Not Th2 Differentiation. *J Immunol* 2004; 173(7):4523-4528.

- (96) Wang HY, Shelburne CP, Zamorano J, Kelly AE, Ryan JJ, Keegan AD. Cutting edge: effects of an allergy-associated mutation in the human IL-4R alpha (Q576R) on human IL-4-induced signal transduction. *J Immunol* 1999; 162(8):4385-4389.
- (97) Jiang H, Harris MB, Rothman P. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(6 Pt 1):1063-1070.
- (98) Deichmann K, Bardutzky J, Forster J, Heinzmann A, Kuehr J. Common polymorphisms in the coding part of the IL4-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231(3):696-697.
- (99) Ober C, Leavitt SA, Tsalenko A, Howard TD, Hoki DM, Daniel R et al. Variation in the interleukin 4-receptor alpha gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations. *Am J Hum Genet* 2000; 66(2):517-526.
- (100) Hackstein H, Hofmann H, Bohnert A, Bein G. Definition of human interleukin-4 receptor alpha chain haplotypes and allelic association with atopy markers. *Hum Immunol* 1999; 60(11):1119-1127.
- (101) Tedder F, Isaacs CM, Penta A. Cloning and structure of CD19, a member of the immunoglobulin superfamily. Use of transfected cells to examine the workshop antibodies. Knapp et al., editor. *Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens*. 36-38. 1989. Oxford University Press.
- (102) Bonnefoy JY, Aubry JP, Peronne C, Wijdenes J, Banchereau J. Production and characterization of a monoclonal antibody specific for the human lymphocyte low affinity receptor for IgE: CD 23 is a low affinity receptor for IgE. *J Immunol* 1987; 138(9):2970-2978.
- (103) Rao M, Lee WT, Conrad DH. Characterization of a monoclonal antibody directed against the murine B lymphocyte receptor for IgE. *J Immunol* 1987; 138(6):1845-1851.
- (104) Coffman RL. Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *Immunol Rev* 1982; 69:5-23.
- (105) <http://www.atcc.org>
- (106) <http://www.stanford.edu/group/nolan>

- (107) Laker C, Stocking C, Bergholz U, Hess N, De Lamarter JF, Ostertag W. Autocrine stimulation after transfer of the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor gene and autonomous growth are distinct but interdependent steps in the oncogenic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(23):8458-8462.
- (108) den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 2001; 109(1):121-124.
- (109) den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 2000; 15(1):7-12.
- (110) Antonarakis SE. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat* 1998; 11(1):1-3.
- (111) Andrews RP, Rosa LR, Daines MO, Khurana Hershey GK. Reconstitution of a Functional Human Type II IL-4/IL-13 Receptor in Mouse B Cells: Demonstration of Species Specificity. *J Immunol* 2001; 166(3):1716-1722.
- (112) Lischke A, Kammer W, Friedrich K. Different human interleukin-4 mutants preferentially activate human or murine common receptor gamma chain. *Eur J Biochem* 1995; 234(1):100-107.
- (113) Schreiner S, Birke M, Garcia-Cuellar MP, Zilles O, Greil J, Slany RK. MLL-ENL causes a reversible and myc-dependent block of myelomonocytic cell differentiation. *Cancer Res* 2001; 61(17):6480-6486.
- (114) Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-350.
- (115) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732):1350-1354.
- (116) Foerster T. Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann.Phys.Leipzig* 2, 55-75. 1948.
- (117) Sasieni PD. From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 1997; 53(4):1253-1261.

- (118) Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am J Hum Genet* 2002; 70(2):425-434.
- (119) Franjkovic I. Klonierung und Mutagenese des humanen IL-4 Rezeptor-Gens. 2001.
- (120) Mora AL, Stephenson LM, Enerson B, Youn J, Keegan AD, Boothby M. New programming of IL-4 receptor signal transduction in activated T cells: Stat6 induction and Th2 differentiation mediated by IL-4Ralpha lacking cytoplasmic tyrosines. *J Immunol* 2005; 71(4):1881-1900.
- (121) Becker KG. The common variants/multiple disease hypothesis of common complex genetic disorders. *Med Hypotheses* 2004; 62(2):309-317.
- (122) Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002; 4(2):45-61.
- (123) Chakravarti A. *Nature Genet* 1999; 21:56-60.
- (124) Syvanen AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet* 2001; 2(12):930-942.
- (125) The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409(6822):928-933.
- (126) Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, Halperin E, Eskin E, Ballinger DG et al. Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science* 2005; 307(5712):1072-1079.
- (127) Boddeker I, Ziegler A. [Association and linkage studies for the analysis of candidate genes]. *Dtsch Med Wochenschr* 2000; 125(25-26):810-815.
- (128) Wang HY, Paul WE, Keegan AD. IL-4 function can be transferred to the IL-2 receptor by tyrosine containing sequences found in the IL-4 receptor alpha chain. *Immunity* 1996; 4(2):113-121.
- (129) Wurster AL, Withers DJ, Uchida T, White MF, Grusby MJ. Stat6 and IRS-2 cooperate in interleukin 4 (IL-4)-induced proliferation and differentiation but are

- dispensable for IL-4-dependent rescue from apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002; 22(1):117-126.
- (130) Howard TD, Koppelman GH, Xu J, Zheng SL, Postma DS, Meyers DA et al. Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma. *Am J Hum Genet* 2002; 70(1):230-236.
- (131) Andrews RP, Ericksen MB, Cunningham CM, Daines MO, Hershey GK. Analysis of the life cycle of stat6. Continuous cycling of STAT6 is required for IL-4 signaling. *J Biol Chem* 2002; 277(39):36563-36569.
- (132) Ryan JJ, McReynolds LJ, Keegan A, Wang LH, Garfein E, Rothman P et al. Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of the human IL-4 receptor. *Immunity* 1996; 4(2):123-132.
- (133) Izuhara K, Shirakawa T. Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy. *Int J Mol Med* 1999; 3(1):3-10.
- (134) Boothby M, Mora AL, Stephenson LM. Lymphokine-dependent proliferation of T-lymphoid cells: regulated responsiveness and role in vivo. *Crit Rev Immunol* 2001; 21(6):487-522.
- (135) Daniels SE, Bhattacharya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR et al. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 1996; 383(6597):247-250.
- (136) Cookson WO, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* 1989; 1(8650):1292-1295.
- (137) Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kobayashi K et al. Lack of association of atopy/asthma and the interleukin-4 receptor alpha gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* 1999; 29(2):228-233.
- (138) Wjst M, Kruse S, Illig T, Deichmann K. Asthma and IL-4 receptor alpha gene variants. *Eur J Immunogenet* 2002; 29(3):263-268.
- (139) Wills-Karp M, Ewart SL. Time to draw breath: asthma-susceptibility genes are identified. *Nat Rev Genet* 2004; 5(5):376-387.

- (140) Hecker M, Bohnert A, König IR, Bein G, Hackstein H. Novel genetic variation of human interleukin-21 receptor is associated with elevated IgE levels in females. *Genes Immun* 2003; 4(3):228-233.
- (141) Bottini N, Borgiani P, Otsu A, Saccucci P, Stefanini L, Greco E et al. IL-4 receptor alpha chain genetic polymorphism and total IgE levels in the English population: two-locus haplotypes are more informative than individual SNPs. *Clin Genet* 2002; 61(4):288-292.
- (142) Dupre D, Audrezet MP, Ferec C. Atopy and a mutation in the interleukin-4 receptor gene. *N Engl J Med* 2000; 343(1):69-70.
- (143) Grimbacher B, Holland SM, Puck JM. The interleukin-4 receptor variant Q576R in hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med* 1998; 338(15):1073-1074.
- (144) 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(8):680-686.
- (145) Malerba G, Trabetti E, Patuzzo C, Lauciello MC, Galavotti R, Pescolliderung L et al. Candidate genes and a genome-wide search in Italian families with atopic asthmatic children. *Clin Exp Allergy* 1999; 29 Suppl 4:27-30.
- (146) Migliaccio C, Patuzzo C, Malerba G, Trabetti E, Galavotti R, Pescolliderung L et al. No linkage or association of five polymorphisms in the interleukin-4 receptor alpha gene with atopic asthma in Italian families. *Eur J Immunogenet* 2003; 30(5):349-353.
- (147) Patuzzo C, Trabetti E, Malerba G, Martinati LC, Boner AL, Pescolliderung L et al. No linkage or association of the IL-4Ralpha gene Q576R mutation with atopic asthma in Italian families. *J Med Genet* 2000; 37(5):382-384.
- (148) Takabayashi A, Ihara K, Sasaki Y, Suzuki Y, Nishima S, Izuhara K et al. Childhood atopic asthma: positive association with a polymorphism of IL-4 receptor alpha gene but not with that of IL-4 promoter or Fc epsilon receptor I beta gene. *Exp Clin Immunogenet* 2000; 17(2):63-70.
- (149) Beghe B, Barton S, Rorke S, Peng Q, Sayers I, Gaunt T et al. Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha chain genes confer susceptibility to

- asthma and atopy in a Caucasian population. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(8):1111-1117.
- (150) Cui T, Wu J, Pan S, Xie J. Polymorphisms in the IL-4 and IL-4R [alpha] genes and allergic asthma. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(7):888-892.
- (151) Kauppi P, Lindblad-Toh K, Sevon P, Toivonen HT, Rioux JD, Villapakkam A et al. A second-generation association study of the 5q31 cytokine gene cluster and the interleukin-4 receptor in asthma. *Genomics* 2001; 77(1-2):35-42.
- (152) 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. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2001; 11(4):285-289.
- (153) Tan EC, Lee BW, Chew FT, Shek L, Tay AW, Tay AH. IL-4Ralpha gene Ile50Val polymorphism. *Allergy* 1999; 54(9):1005-1007.
- (154) Hackstein H, Hecker M, Kruse S, Bohnert A, Ober C, Deichmann KA et al. A novel polymorphism in the 5' promoter region of the human interleukin-4 receptor alpha-chain gene is associated with decreased soluble interleukin-4 receptor protein levels. *Immunogenetics* 2001; 53(4):264-269.
- (155) Hosomi N, Fukai K, Oiso N, Kato A, Ishii M, Kunimoto H et al. Polymorphisms in the promoter of the interleukin-4 receptor alpha chain gene are associated with atopic dermatitis in Japan. *J Invest Dermatol* 2004; 122(3):843-845.
- (156) Hakonarson H, Wjst M. Current concepts on the genetics of asthma. *Curr Opin Pediatr* 2001; 13(3):267-277.
- (157) Touchette N. Rare mutations linked to Meningitis. *Genome News Network* . 2003. 16-5-2003.
- (158) Smirnova I, Mann N, Dols A, Derkx HH, Hibberd ML, Levin M et al. Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(10):6075-6080.
- (159) Hedberg CL, Adcock K, Martin J, Loggins J, Kruger TE, Baier RJ. Tumor necrosis factor alpha -- 308 polymorphism associated with increased sepsis mortality in ventilated very low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23(5):424-428.

- (160) Waterer GW, Quasney MW, Cantor RM, Wunderink RG. Septic shock and respiratory failure in community-acquired pneumonia have different TNF polymorphism associations. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(7):1599-1604.
- (161) Shu Q, Fang X, Frank S. [Association of tumor necrosis factor microsatellites TNF with the susceptibility to and outcome of postoperative severe sepsis]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002; 82(13):903-906.
- (162) Fang XM, Schroder S, Hoeft A, Stuber F. Comparison of two polymorphisms of the interleukin-1 gene family: interleukin-1 receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis. *Crit Care Med* 1999; 27(7):1330-1334.
- (163) Westendorp RG, Hottenga JJ, Slagboom PE. Variation in plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and risk of meningococcal septic shock. *Lancet* 1999; 354(9178):561-563.
- (164) Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *J Inflamm* 1995; 46(1):32-41.
- (165) Knight JC, Keating BJ, Rockett KA, Kwiatkowski DP. In vivo characterization of regulatory polymorphisms by allele-specific quantification of RNA polymerase loading. *Nat Genet* 2003; 33(4):469-475.
- (166) Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(7):3195-3199.
- (167) Zondervan KT, Cardon LR. The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Rev Genet* 2004; 5(2):89-100.
- (168) Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001; 2(2):91-99.
- (169) Editorial. Editorial. *Nat Genet* 1999; 22(1):1-2.
- (170) Colhoun HM, McKeigue PM, Davey SG. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 2003; 361(9360):865-872.

- (171) Freimer N, Sabatti C. The use of pedigree, sib-pair and association studies of common diseases for genetic mapping and epidemiology. *Nat Genet* 2004; 36(10):1045-1051.
- (172) Thomas DC, Clayton DG. Betting odds and genetic associations. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(6):421-423.
- (173) 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. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(6):434-442.
- (174) Dahlman I, Eaves IA, Kosoy R, Morrison VA, Heward J, Gough SC et al. Parameters for reliable results in genetic association studies in common disease. *Nat Genet* 2002; 30(2):149-150.

7 Anhang

7.1 IL4R Primer und Sonden

7.1.1 IL4R Primer für die SSP-PCR

Tabelle 24 IL4R Primersequenzen mit der Basenpaarlänge der amplifizierten Produkte

IL4R SNP ^a	Primer ^b	Sequenz 5'-3'	Produkt (bp)
E375A	E375 V	ACTTCCAGGAGGGAAGGGA	176
	A375 V	ACTTCCAGGAGGGAAGGGC	
	375-common	CCCTGCACTTGGGAACTCAT	
C406R	C406 V	CAGGACATGGGGGAGTCAT	177
	R406 V	AGGACATGGGGGAGTCAC	
	406-common	AGTCAGGTTGTCTGGACTCTG	
S411L	S411 R	TGAGCACTCGTACTTCCCG	248
	L411 R	TGAGCACTCGTACTTCCCA	
	411-common	CGATGTGTGGAGTTGTTTGAG	
S478P	S478V	TTACCGCAGCTTCAGCAACT	163
	P478 V	TACCGCAGCTTCAGCAACC	162
	478-common	CCAGGTTTCTGGCTCAGGTT	
C-reaktives Protein	CRP V	CCAGCCTCTCTCATGCTTTTGGCCAGACA	440
	CRP R	GGGTCGAGGACAGTTCCGTGTAGAAGTG GA	

^a Diesen SNPs sind folgende NCBI Zugangsnummern zugewiesen: rs 1805011 (E375A), rs 1805012 (C406R), rs 1805013 (S411L) und rs 1805015 (S478P).

^b V = Vorwärtsprimer, R = Rückwärtsprimer

7.1.2 IL4R Primer und Sonden für die TaqMan®PCR

Tabelle 25 Primer für die Genotypisierung der IL4R SNPs I50V und Q551R

IL4R SNP	Orientierung	Sequenz (5'-3')
I50V	vorwärts	CGCGCCTCCGTTGTTC
I50V	rückwärts	ACCCAGCCCCTGTGTCT
Q551R	vorwärts	TGCTCCACCGCATGTACAA
Q551R	rückwärts	GCCGAAATGTCCTCCAGCAT

Tabelle 26 Sonden für die Genotypisierung der IL4R SNPs I50V und Q551R

NCBI SNP Cluster ID ^a	SNP	Sonden
rs1805010	IL4R I50V VIC	ACACGTGTATCCCTG
rs1805010	IL4R I50V FAM	CACGTGTGTCCCTG
rs1801275	IL4R Q551R VIC	CAGTGGCTATCAGGAGT
rs1801275	IL4R Q551R FAM	CAGTGGCTATCGGGAGT

^aDiesen SNPs sind folgende Zugangsnummern zugewiesen: rs1805010 (I50V), rs1801275 (Q551R).

7.2 TNF Primer und Sonden

7.2.1 TNF Primer für die SSP-PCR

Tabelle 27 TNF Primersequenzen mit der Basenpaarlänge der amplifizierten Produkte.

TNF SNP ^a	Primer ^b	Sequenz 5'-3'	Produkt (bp)
-862C>A	-862C R	GGCCCTGTCTTCGTTAAGG	153
	-862A R	TGGCCCTGTCTTCGTTAAGT	
	-862-common	AGGGAGCTCCTGGGAGATA	
-856C>T	-856C R	CTACATGGCCCTGTCTTCG	157
	-856T R	TCTACATGGCCCTGTCTTCA	
	-856-common	GGAGCTCCTGGGAGATATG	
C-reaktives Protein	CRP V	CCAGCCTCTCTCATGCTTTTGGCCAGACA	440
	CRP R	G GGGTCGAGGACAGTTCCGTGTAGAAGTG GA	

^a Diesen SNPs sind folgende NCBI Zugangsnummern zugewiesen: rs 1800630 (-862C>A) und rs 1799724 (-856C>T).

^b V = Vorwärtsprimer, R = Rückwärtsprimer

7.2.2 TNF Primer und Sonden für die TaqMan®PCR

Tabelle 28 Primer für die Genotypisierung der TNF SNPs

TNF SNP	Orientierung	Sequenz (5'-3')
-1031T>C	vorwärts	GTGAGGCCGCCAGACT
-1031T>C	rückwärts	GCCCCTCCAGACCCTGA
-308G>A	vorwärts	GTAGGACCCTGGAGGCTGAAC
-308G>A	rückwärts	GAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAG
-237G>A	vorwärts	CAGTCAGTGGCCCAGAAGAC
-237G>A	rückwärts	CCCTCACACTCCCCATCCT
+491G>A	vorwärts	CTGATAGGGAGGGATGGAGAGAA
+491G>A	rückwärts	TCTTGCCACATCTCTTTCTGCAT
+859A>G	vorwärts	AAGAGCTGTTGAATGCCTGGAA
+859A>G	rückwärts	CTGAGGTGTCTGGTTTTCTCTCT

Tabelle 29 Sonden für die Genotypisierung der TNF SNPs

NCBI SNP Cluster ID ^a	SNP	Sonden
rs1799964	-1031T>C VIC	CTTTTCCTTCATCTTCTC
rs1799964	-1031T>C FAM	TTTTCCTTCGTCTTCTC
rs1800629	-308G>A VIC	CCGTCCCCATGCC
rs1800629	-308G>A FAM	CCGTCCTCATGCC
rs361525	-237G>A VIC	CTCGGAATCGGAGCAG
rs361525	-237G>A FAM	CTCGGAATCAGAGCAG
rs1800610	+491G>A VIC	TCTTTCTCCACGTTTTT
rs1800610	+491G>A FAM	TCTTTCTCCATGTTTTT
rs3093662	+859A>G VIC	TGAATACACAGATGAATG
rs3093662	+859A>G FAM	AATACACGGATGAATG

^aDiesen SNPs sind folgende Zugangsnummern zugewiesen: rs1799964 (-1031T>C), rs1800629 (-308G>A), rs361525 (-237G>A), rs1800610 (+491G>A) und rs3093662(+859A>G).

7.2.3 LTA Primer und Sonden für die TaqMan®PCR

Tabelle 30 Primer und Sonden für die Genotypisierung des SNPS LTA +252A>G

Polymorphismus ^a		Sequenz 5'-3'	
LTA +80A>C	Primer	+80A>C vorwärts	CGTGCTTCGTGCTTTGGACTA
		+80A>C rückwärts	GAGGCCCCAGGCAGAGG
	Sonde	+80A>C VIC	CCGCCCCGCAGTGT
		+80A>C FAM	CCGCCCCAGCAGTGT
LTA +252A>G	Primer	+252A>G vorwärts	CAGTCTCATTGTCTCTGTCCACACAT
		+252A>G rückwärts	AGAGAGAGACAGGAAGGGAACAG
	Sonde	+252A>G VIC	CTGCCATGATTCCT
		+252A>G FAM	CTGCCATGGTTCCT

^aDiesen SNPs sind folgende Zugangsnummern zugeordnet: rs2239704 (LTA+80A>C) und rs909253 (LTA+252A>G).

7.3 Abkürzungen

APACHE	Acute physiology, age and chronic health evaluation
APC	antigen presenting cells
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CD	cluster of differentiation
CI	Konfidenzintervall
CTLL	cytotoxische T-Lymphozyten
CV-CD	common variant-common disease
DTH	delayed type hypersensitivity
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	extracellular signal regulated kinase
FBS	fetale bovine serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat

FPRP	false positive report probability
GCP	Good clinical practice
ICH	International Conference on Harmonisation
ICU	Intensive Care Unit
IL	Interleukin
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
ISS	Injury Severity Score
I4R	Insulin-Interleukin-4-Rezeptor
JAK	Janus kinase
LD	Linkage disequilibrium
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lymphotoxin-alpha
LTR	long terminal repeats
MAPK	mitogen activated protein kinase
MARS	mixed antagonists response syndrome
MG	Molekulargewicht
MGB	minor groove binder
MODS	multiple organ dysfunction syndrome
NK	natural killer
OR	odds ratio
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PER	posterior error rate
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-kinase
4PS	4-Phosphotyrosin-Substrat
PTB	phosphotyrosine-binding-domain
PTS	Polytraumaschlüssel
Rag 1	Rekombinase-aktivierendes Gen 1
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SHIP	SH2 containing inositol-5-phosphatase
SHP-1	SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 1
SHT	Schädel-Hirn-Trauma

SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SNP	single nucleotide polymorphism
SOCS	suppressor of cytokine signalling
SPSS	Scientific package for the social sciences
STAT	signal transducer and activator of transcription
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TSST-1	Toxisches Schock-Syndrom Toxin-1
UTR	untranslated region
VNTRs	variable number tandem repeats
ZNS	Zentralnervensystem

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am 10.02.1974 in Kiel
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig

Schulbildung

1980-1984 Freiligrath Grundschule, Krefeld
1984-1993 Arndt-Gymnasium, Krefeld
Abschluss: Abitur

Studium

1993-1996 Studium der Chemie an der Ruprecht-Karls-Universität
in Heidelberg
1996-2001 Studium der Ernährungswissenschaften an der
Justus-Liebig-Universität in Gießen
Abschluss: Diplom-Oecotrophologin
2000-2001 Diplomarbeit: Klonierung und Mutagenese des
humanen IL-4 Rezeptor Gens am Institut der klinischen
Immunologie und Transfusionsmedizin am
Universitätsklinikum Gießen (Leiter: Prof. Dr. G. Bein)

Berufstätigkeit

Nov 2001-Dez 2004 Wissenschaftliche Angestellte am Institut der klinischen
Immunologie und Transfusionsmedizin am
Universitätsklinikum Gießen (Leiter: Prof. Dr. G. Bein)
Seit Jul 2005 Clinical Research Associate im Bereich Immunologie bei
Abbott GmbH & Co. KG in Wiesbaden

Eigenständige Projekte

2001	Aufbau und Etablierung der Anlage lymphoblastoider B-Zelllinien zum Einsatz in die tägliche Routine
2002	Re-Sequenzierung des Adaptorproteins MYD 88
2002-2003	Aufbau der Anlage somatischer Mensch-Maus Hybridzelllinien zur Aufklärung der Haplotypstruktur in Genen
2002-2004	Klonierung lymphoblastoider B-Zelllinien

Originalarbeiten

I. Franjkovic, A. Gessner, I. König, K. Kissel, A. Bohnert, A. Hartung, A. Ohly, A. Ziegler, H. Hackstein, G. Bein:
Effects of common atopy-associated amino acid substitutions in the IL-4 receptor alpha chain on IL-4 induced phenotypes
Immunogenetics (2005) 56: 808-817

Wissenschaftliche Vorträge

10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immungenetik, Kiel 2002
17th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Baden-Baden 2003
34th Annual Meeting of the German Society of Immunology, Berlin 2003
1st International Symposium “ Functional Genomics of Infectious Diseases and Inflammation, Tübingen 2003
Vortragsreihe “Giessen Research in Infectious Diseases, Giessen 2003

9 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt folgenden Personen:

Herrn Prof. Dr. G. Bein für die Überlassung des Themas, die engagierte und fachkundige Betreuung dieser Arbeit, die interessanten und motivierenden Gespräche sowie die Möglichkeit auch über den Tellerrand zu schauen. Ganz besonders möchte ich mich für die jederzeit geduldige Unterstützung beim Erstellen der Publikation als auch dieser Arbeit bedanken.

Herrn PD Dr. H. Hackstein, Frau Dr. A. Bohnert, Frau Dr. K. Heidinger und Frau Dr. K. Kissel für Ihre Hilfsbereitschaft und Beratung, sowie die äußerst netten Gespräche.

Frau A. Nockher, die mir bei der Organisation und Durchführung der Experimente jederzeit mit Rat und Tat und über das Berufliche hinaus jederzeit freundschaftlich zur Seite stand.

Frau G. Haley, Frau U. Schellenberg, Frau C. Lang für die großzügige Unterstützung im Labor und die freundschaftliche Zusammenarbeit. An dieser Stelle sei auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin gedankt.

Prof. Dr. Dr. A. Gessner (Institut für Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Universität Erlangen) und PD Dr. T. Menges (Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum Giessen) für die kollegiale und produktive Zusammenarbeit.

Dr. I. König (Institut für Statistik, Universität Lübeck) für die Unterstützung bei der Durchführung der statistischen Verfahren zur Analyse der klinischen und experimentellen Daten.

Meinem Freund Michael, der mich fortwährend in vielerlei Hinsicht unterstützt und motiviert.

Von ganzem Herzen meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, ohne deren Unterstützung und Anteilnahme ich nicht da wäre, wo ich jetzt bin und meiner Schwester, die immer ein offenes Ohr für mich hatte.

„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 wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften 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.“