

# 1 Einleitung

Allergische Erkrankungen stellen in den westlichen Industrienationen die häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter dar. Ca. 14% der 13- bis 14-jährigen Kinder in Deutschland haben Asthma, und die direkten und indirekten Gesundheitskosten, allein für Asthma bronchiale werden auf 3 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt [1]. Im Jahr 2003 verstarben 2422 Deutsche an Asthma [2].

Eine genetische Komponente bei der Entstehung von Allergien ist unumstritten. Lange ist bekannt, dass eine positive Familienanamnese hinsichtlich atopischer Erkrankungen einen bedeutenden Risikofaktor für die Allergieentwicklung darstellt. Bei Patienten mit einer genetischen Prädisposition für Atopie kann es durch überschießende Immunreaktionen auf Umweltallergene zur Ausbildung von atopischer Dermatitis (**AD**), Asthma bronchiale oder allergischer Rhinokonjunktivitis (**ARK**) kommen. Zahlreiche epidemiologische Studien, insbesondere Zwillingsstudien mit Vergleichen von mono- und dizygoten Zwillingspaaren, haben die Bedeutsamkeit der genetischen Komponente weiter unterstrichen. So schätzt eine dänische Zwillingsstudie (n=11.688) den Anteil genetischer Faktoren hinsichtlich der Suszeptibilität für Asthma bronchiale auf 73% [3].

In mehreren Kopplungsstudien konnte gezeigt werden, dass in der Region 5q31-33 (auf dem langen Arm von Chromosom 5) Gene lokalisiert sind, die mit Asthma und anderen allergischen Symptomen in Verbindung stehen [4-7]. Zahlreiche Studien weisen auf Assoziationen von Single Nucleotid Polymorphismen (**SNP**) in Kandidatengenen dieser Region und Atopie-assoziierten Phänotypen hin [8-17].

In letzter Zeit konnte eine Gruppe von Proteinen identifiziert werden, die bei Immunantworten und in der Regulation allergischer Erkrankungen eine große Rolle spielt. Hierbei handelt es sich um die T-Zell Immunglobulin Domänen und Muzin Domänen Proteine (**TIM**) und die IL-2 induzierbare T-Zell Kinase (**ITK**), die insbesondere in T-Helfer-Zellen exprimiert werden und die auf Chromosom 5 in der Region 5q33.3 kodiert werden [18; 19].

Ziel dieser Arbeit ist es, SNPs in eben diesen Genen auf eine Assoziation mit allergischen Phänotypen in zwei großen pädiatrischen Populationen zu untersuchen.

Weiterer Gegenstand dieser Arbeit sind pharmakogenetische Untersuchungen bei

Kindern, die 18 Monate mit dem Antihistaminikum Cetirizin behandelt wurden. Es bestehen große interindividuelle Unterschiede hinsichtlich des Ansprechens auf antiallergische Therapien. Diese interindividuellen Unterschiede können zumindest teilweise auf genetische Faktoren zurückgeführt werden [20].

Da Studien zum Einfluss von genetischen Varianten im Histaminstoffwechsel auf die Antihistaminikawirkung zur Zeit noch nicht vorliegen, werden hier SNPs im *Histamin-N-Methyltransferase*-Gen (**HNMT**) und im *Histamin-1-Rezeptor*-Gen (**HRH1**) in der **ETAC** Population (**E**arly **T**reatment of the **A**topic **C**hild) auf Assoziationen zu veränderter Cetirizin-Wirkung und zu allergischen Phänotypen untersucht.

## 1.1 Allergie

Der Begriff „Allergie“ wurde um 1900 von dem Wiener Pädiater Baron Clemens von Pirquet aus den griechischen Worten „allos“ (=anders) und „ergein“ (=handeln) hergeleitet [21-23]. Diese Bezeichnung soll ausdrücken, dass der Organismus anders als gewohnt auf äußere Reize reagiert.

Allergien gehören zu einer Gruppe von Immunreaktionen, die man als Überempfindlichkeit oder Hypersensibilität bezeichnet. Unter einer Allergie versteht man eine überschießende, krankmachende, spezifische Immunreaktion gegen exogene, normalerweise apathogene Substanzen (Allergene). Durch harmlose Antigene, die in keinerlei Zusammenhang mit den normalerweise zu bekämpfenden Krankheitserregern stehen, werden zum Teil lebensbedrohliche Symptome hervorgerufen. Coombs und Gell haben die hypersensiblen Reaktionen in vier Typen unterteilt (siehe Abbildung 1).

Häufig wird der Begriff Allergie mit der Hypersensibilitätsreaktion Typ I beziehungsweise mit der IgE vermittelten Überempfindlichkeit vom Soforttyp gleichgesetzt, so auch in dieser Arbeit.



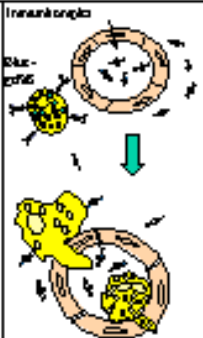
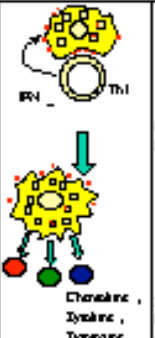


	Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV		
Antikörper - Kombination	IgE	IgG	IgG	Th1 - Zellen	Th2 - Zellen	zytotoxische T- Lympho- zyten
Antigen	lösliches Antigen	zell- oder matrix- assoziiertes Antigen	lösliches Antigen	lösliches Antigen	lösliches Antigen	zell- assoziiertes Antigen
Effektor - mechanismus	Mastzell - aktivierung	FcR - Zellen (Phagozyten, NK - Zellen)	FcR - Zellen Körperklasten - system	Makrophagen -aktivierung	Aktivierung von eosinophilen Zellen	Zytotoxizität
						

Abbildung 1: Die Typen I bis III werden durch Antikörper vermittelt und unterscheiden sich hinsichtlich der beteiligten Antigene und der Antikörperklassen. **Typ I Reaktionen** beruhen auf IgE vermittelter Mastzell-Degranulation. Bei **Typ II Reaktionen** löst das antigenbindende IgG entweder über FC-Rezeptoren vermittelte Reaktionen aus, oder es löst phagozytische Effektormechanismen aus. Typ II Reaktionen richten sich gegen Zelloberflächen- und Matrixantigene und haben zellspezifische Gewebeschäden zur Folge. **Typ III Reaktionen** sind gegen lösliche Antigene gerichtet. IgG bildet hier mit dem Allergen Immunkomplexe, deren Ablagerung zu Immunreaktionen mit Gewebeschäden führt. Die T-Zell-vermittelten **Typ IV Reaktionen** lassen sich in drei Gruppen einteilen. Bei der Ersten vermitteln Th1-Zellen eine Makrophagenaktivierung. Bei der zweiten Gruppe wird die Entzündungsreaktion von Th2-Zellen vermittelt. Es handelt sich um die von eosinophilen Granulozyten bestimmte Spätreaktion. Bei der dritten Gruppe werden die Schäden durch direkt zytotoxisch wirkende CD-8-positive zytotoxische T-Zellen vermittelt. Tabelle nach Janeway [24].

### **1.1.1 Zweizeitigkeit der allergischen Reaktion**

Die Sofortreaktion beruht also auf der direkten Wirkung von durch Mastzellen freigesetztem Histamin und anderen schnell metabolisierten Effektoren. Sie beginnt schon Sekunden nach Mastzellaktivierung.

Ihr schließt sich nach mehreren Stunden eine Spätreaktion an. Die aktivierten Mastzellen synthetisieren Leukotriene, Chemokine, Zytokine und weitere Mediatoren, die eine vermehrte Einwanderung von Leukozyten in den Entzündungsherd hervorrufen. Eingewanderte, aktivierte Th2-Lymphozyten und eosinophile Granulozyten bewirken beispielsweise in den Bronchien eine zweite Kontraktionsphase der glatten Muskulatur und anhaltende Ödeme, die klinisch weniger ausgeprägt sind. Die Spätreaktion ist verantwortlich für die Entstehung langwieriger, schwerwiegender Verläufe. Wenn die Antigenexposition noch während der Spätreaktion vorliegt, werden zusätzlich zur weiterhin bestehenden Mastzellaktivierung eingewanderte Th2-Zellen stimuliert, was zu verstärkter Mediatorausschüttung, zu vermehrter Eosinophilie und weiterer IgE-Produktion führt. Es bildet sich ein Circulus vitiosus, wobei die allergische Reaktion von der Vielzahl aktivierter und stimulierender Entzündungszellen aufrechterhalten wird.

## **1.2 Atopie**

Atopie ist eine zusammenfassende Bezeichnung für die vererbte Neigung zu allergischen Reaktionen vom Soforttyp mit klinischer Ausprägung als Asthma bronchiale, AD und ARK.

Eine der ältesten dokumentierten atopischen Familienanamnesen führt ca. 2000 Jahre zurück in das julisch-claudische Kaiserhaus [25]. In diesem waren mindestens drei miteinander verwandte Familienmitglieder Atopiker, der bekannteste von ihnen war Kaiser Augustus. Den Aufzeichnungen über Kaiser Augustus ist zu entnehmen, dass er gleichzeitig an einer ARK, allergischem Asthma bronchiale und einer AD litt.

### 1.3 Der allergische Marsch

Der Begriff „allergischer Marsch“ beschreibt den typischen Krankheitsverlauf atopischer Manifestationen.

Typischerweise beginnt die „Atopikerkarriere“ mit der Ausbildung einer AD und Nahrungsmittelallergie im Säuglings- oder frühen Kleinkindalter, gefolgt von ARK und Asthma bronchiale im Schulalter. Oft ist eine transiente Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelallergene, besonders gegen Ei und Milch, in den ersten drei Lebensjahren nachweisbar, wohingegen später eine Sensibilisierung gegen inhalative Allergene überwiegt.

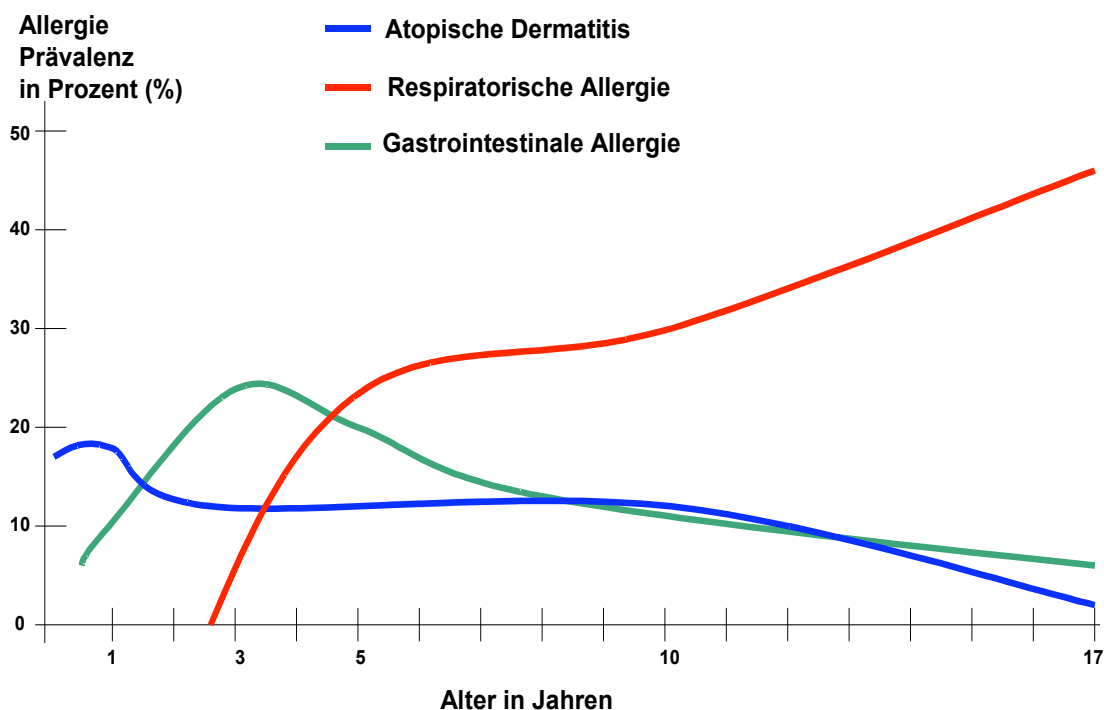


Abbildung 2: Nach Wahn U. [26]

Der Übergang von Ekzemen zu allergischem Asthma findet bei ca. 40% der Patienten statt. Diese Patienten zu erkennen und Präventivmaßnahmen zu entwickeln, die diese Entwicklung verhindern, ist Ziel vieler klinischer Studien.

In der deutschen **Multizenter Atopie Studie (MAS)** konnte der Krankheitsverlauf bei 1314 Kindern seit 1990 verfolgt werden. In der MAS Population entwickelten von den Kindern mit positiver Familienanamnese und früher AD 50% ein allergisches Asthma. Im Gegensatz dazu entwickelten diejenigen ohne frühe AD und ohne familiäre Vorbelastung in nur 12% der Fälle ein allergisches Asthma bis zum Alter von 5 Jahren.

#### **1.4 Interventionsstudien**

Mehrere epidemiologische Studien, wie die MAS-Studie, haben sich mit der Identifizierung von Risikofaktoren für die Entwicklung kindlichen Asthmas beschäftigt. Es konnten dabei Risikofaktoren beschrieben und bestätigt werden, die als Einschlusskriterien für präventive Interventionsstudien Verwendung finden. Zahlreiche präventive Interventionsstudien wurden durchgeführt, um Asthma bei Kindern zu verhindern [27].

Einen weiteren Ansatz stellen pharmakologische Präventivstudien zur Verringerung der Allergieinzidenz dar. So wurde bereits 1992 in einer Studie an 121 japanischen Kindern mit AD ein präventiver Effekt eines Antihistaminikums auf die Entwicklung von Asthma postuliert. Dabei konnte im Vergleich mit der Placebo-Gruppe eine deutlich erniedrigte Asthma-Inzidenz in der Behandlungsgruppe gezeigt werden [28]. In einer 100 Kleinkinder umfassenden Population untersuchten Bustos *et al.* placebokontrolliert den präventiven Effekt einer über 3 Jahre andauernden Antihistaminikum-Gabe, auf die Entwicklung von allergischem Asthma. Auch hier konnte eine signifikant erniedrigte Asthmainzidenz in der Behandlungsgruppe gezeigt werden. Allerdings wurden die Patienten nur über den Zeitraum von einem Jahr, in einigen Zentren über zwei Jahre nachverfolgt.

Mit der **Early Treatment of the Atopic Child (ETAC)** Studie ist der präventive Effekt des Antihistaminikums Cetirizin auf eine Asthmaentwicklung bei Kindern mit früher AD und positiver Familienanamnese für Asthma untersucht worden (n=795). Für die Gesamtheit der Studienpopulation konnte kein präventiver Effekt gezeigt werden. Jedoch zeigte sich, dass die Gruppe der früh gegen Gras-Pollen und Hausstaubmilben sensibilisierten Probanden durch eine Cetirizin-Gabe ein geringeres Risiko der Asthmaentwicklung trägt [29; 30].

## 1.5 Pathophysiologie der allergischen Reaktion

Bei einem ersten Kontakt mit einem Allergen kann es, wie oben beschrieben, zu einer Sensibilisierung des Immunsystems und zur Produktion spezifischer IgE-Antikörper kommen, anfänglich jedoch ohne klinische Symptome. Erst bei wiederholter Exposition mit der gleichen Substanz tritt eine Immunantwort, beziehungsweise eine Entzündung auf. Die eigentlich apathogene Substanz ist für den Körper durch Sensibilisierung zu einem Allergen geworden. Allergene können schon in geringen Dosen reproduzierbare IgE-Reaktionen auslösen.

### 1.5.1 Bedeutung der T-Lymphozyten

Die im Thymus gebildeten T-Lymphozyten pendeln zwischen Blutkreislauf und peripheren Lymphorganen, bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Noch nicht mit einem Antigen in Berührung getretene T-Zellen werden als naive T-Zellen bezeichnet. Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen sind in der Lage, für die klonale Vermehrung naiver T-Zellen und ihre Differenzierung zu Effektorzellen zu sorgen. Dieser Vorgang wird oft als Priming bezeichnet. T-Effektorzellen bilden zwei funktionelle Gruppen:

- CD8-positive T-Zellen (CD: cluster of differentiation) erkennen Peptide von intrazellulären Pathogenen, die sich im Zytoplasma körpereigener Zellen vermehren und von den betroffenen Zellen auf MHC-Klasse I Molekülen präsentiert werden. Diese differenzieren daraufhin zu zytotoxischen T-Zellen, welche in den Zielzellen Apoptose einleiten können. Dieser Mechanismus gilt vor allem dem Schutz gegen virale Infektionen.
- Die CD4-positiven-T-Zellen erkennen Antigene, die ihnen von phagozytierenden Zellen präsentiert werden. Nach Phagozytose extrazellulärer Erreger werden, zum Beispiel durch Makrophagen Antigene an die Zelloberfläche transportiert und dort mit Hilfe von MHC-Klasse II Molekülen präsentiert.

T-Helferzellen können aus einer undifferenzierten ausgereiften T-Zelle (Th0) in zwei Effektor-Untergruppen ausdifferenzieren: CD4-positive T-Helfer-1-Zellen (Th1-Zellen) und CD4-positive T-Helfer-2-Zellen (Th2-Zellen). Diese unterscheiden sich maßgeblich in ihren Zytokinmustern und in ihren Funktionen.

**Th1-Zellen** sezernieren hauptsächlich Interferon- $\gamma$ , TNF- $\beta$  und Interleukin-2 (IL-2). Sie sind ausschlaggebend für die Makrophagenaktivierung und stimulieren die IgG-Antikörper-Produktion in B-Zellen.

**Th2-Zellen** werden eher durch Präsentation parasitärer Antigene stimuliert. Sie sezernieren vornehmlich IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13. Dadurch regen sie speziell bei Primärreaktionen höchst effektiv antigenspezifische B-Zellen zur Produktion von IgM-, IgA- und IgE-Antikörpern an, sorgen für eine Eosinophilie und inhibieren die Makrophagenantwort [31].

Zusammenfassend sind Th1-Zellen also für die zelluläre Immunantwort bei bakteriellen Infektionen unabdingbar, wohingegen Th2-Zellen bei der humoralen Abwehr parasitärer Infekte und in der allergischen Immunreaktion eine besonders wichtige Rolle spielen.

#### *1.5.1.1 Die Rolle von ITK bei der Aktivierung von T-Zellen*

ITK (IL-2 induzierbare T-Zell spezifische Tyrosinkinase) gehört zu der Tec Familie, einer Gruppe von Tyrosin-Kinasen, zu denen TEC, BTK, BMX, RLK und ITK gehören [32]. Tec-Kinasen sind wichtige Mediatoren in der Lymphozyten-Aktivierung (siehe Abb. 3). ITK und RLK werden hauptsächlich in T-Helferzellen exprimiert.

Welche Bedeutung die Tec-Kinasen für Lymphozyten haben, lässt sich an Erbkrankheiten, wie der menschlichen X-gekoppelten Agammaglobulinämie erkennen, bei der B-Zellen durch eine Mutation in BTK, der B-Zell spezifischen Tyrosinkinase, nicht ausreifen können [33].



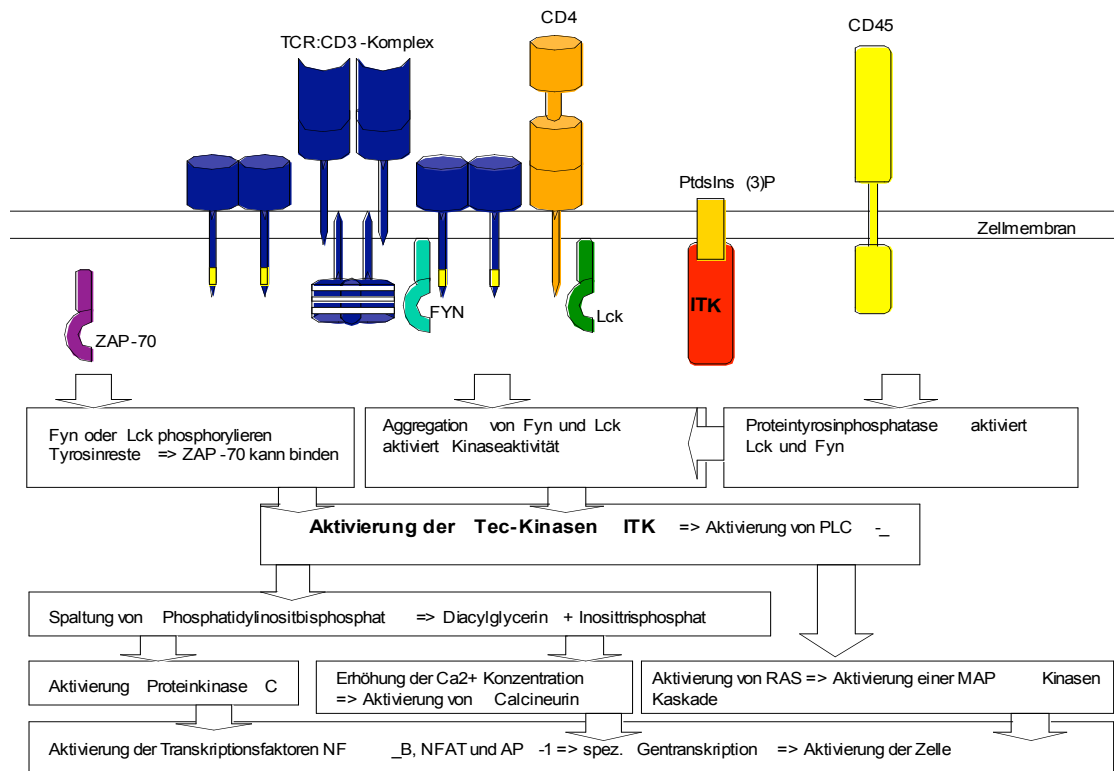


Abbildung 3: Schematische Darstellung der T-Zell-Aktivierung, mit der zentralen Rolle von ITK, frei nach Schwartzberg 2005[34]. Kommt es zu einer Aktivierung des T-Zell Rezeptors (TCR) auf der Zelloberfläche, scharen sich die Tyrosinkinase im Zellinneren um den aktivierten Rezeptor, wo sie dann phosphoryliert und aktiviert werden. Im aktivierten Zustand phosphorylieren und aktivieren sie Phospholipase-C- $\gamma$ , die Inositphospholipide (PtdIns(3)P) spaltet und so die intrazellulären Botenstoffe Diacylglycerin und Inositoltrisphosphat (IP3) bildet. IP3 erhöht die intrazelluläre Calciumkonzentration und aktiviert so die Phosphatase Calcineurin, die ihrerseits den Transkriptionsfaktor NFAT aktiviert. NFAT ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der spezifische Genexpression induziert, die zu einer Proliferation und Differenzierung der T-Zellen führen [34].

### 1.5.2 T-Helferzell-Differenzierung

Die Präsentation geringer Allergendosen kann eine Aktivierung von Th2-Zellen gegenüber Th1-Zellen begünstigen. Die ausgereiften T-Zellen, deren Aufgabe es ist, zwischen harmlosen und gefährlichen Antigenen zu unterscheiden, reagieren nun auf harmlose Umweltantigene wie Tierhaare und Pollen. Th2-Zellen scheinen dabei eine Schlüsselrolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen zu spielen. Allerdings sind die Mechanismen der vermehrten Neigung von Atopikern mit Th2-Antworten zu reagieren noch nicht ganz aufgedeckt. Mit der Entdeckung der T-Zell Immunglobulin Domänen und Muzin Domänen Proteine (TIM) wurde eine Gruppe von zellwandständigen T-Helferzell-Glykoproteinen gefunden, die entscheidenden Anteil an der T-Helfer-Zell-Selektion haben [35].

### 1.5.2.1 T-Zell Immunglobulin- und Mucin-Domänen Moleküle (TIM)

Diese zellwandständigen Glykoproteine besitzen ein Signalpeptid, eine Immunglobulin-Domäne, eine Mucin-Domäne, eine Transmembran-Region und einen intrazellulären Anteil mit Phosphorylierungsstellen. Nach ihrer Struktur wurden diese Proteine TIM (T-cell immunglobulin domain and mucin domain proteins) genannt.

- TIM1 ist ein Glykoprotein, welches vornehmlich auf aktivierten Th2-Zellen exprimiert wird. Es ist involviert in Entwicklung und Regulierung Th2 dominierter Immunantworten. Zudem ist dieses Protein verantwortlich für die Internalisierung des Hepatitis A Virus, weshalb es auch zellulärer Rezeptor für Hepatitis A (HAVcr-1) genannt wird [36]. Es wird diskutiert, ob dieses Protein den protektiven Effekt vorangegangener Hepatitis A Infektionen auf die Entwicklung von Atopie vermittelt. Denn in einer retrospektiven Studie an 1659 italienischen Männern hatten Matricardi *et al.* eine inverse Korrelation von Atopie und Hepatitis A Seropositivität festgestellt [37]. Diese Korrelation konnte bei einer Untersuchung an 33994 Einwohnern der USA bestätigt werden [38]. Es wird diskutiert, ob der Rückgang der Hepatitis A Infektionen in den industrialisierten Ländern zum Teil für den starken Anstieg der Asthma Prävalenz in diesen Ländern während der letzten 20 Jahre verantwortlich sein könnte [39-41]. Bei der Vermittlung dieses präventiven Effektes würde der Hepatitis A Virus Rezeptor, TIM1, eine zentrale Rolle spielen. Einen Beleg dafür stellen die Ergebnisse einer Arbeit von McIntire *et al.* dar, die zeigten, dass eine Hepatitis A Infektion vor der Entwicklung von Atopie schützen kann, wenn die Infizierten Träger bestimmter *TIM1*-Varianten sind [41].
- TIM3 ist ein Th1-spezifisches Oberflächenprotein. Flow-zytometrische Untersuchungen mit Anti-TIM3 Antikörpern zeigten, dass sich TIM3 weder auf naiven T-Zellen und B-Zellen, noch auf Makrophagen oder dendritischen Zellen nachweisen lässt [42]. Zusätzlich zu ihren Rollen in der Immunabwehr, regulieren Th1 und Th2 Zellen gegenseitig ihre Funktion und Expression. Eine verstärkte Induktion von Th1-Zellen kann die Ausbildung von Asthma und Atopie vermindern [43; 44]. Eine Aufhebung der Interaktion von TIM3 mit seinem Liganden führte im Mausmodell zu einer Verstärkung der Th1-Antwort, was eine potentielle Bedeutung von TIM3 für allergische Erkrankungen verdeutlichte [45].

Die Proteine der Immunglobulinsuperfamilie TIM sind also wichtige Mediatoren der T-Helferzell-Subpopulation-Regulierung.

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Polymorphismen der für die TIM-Proteine kodierenden Gene bei Mäusen Einfluss auf die Th1 und Th2 Differenzierung haben und mit vermehrter bronchialer Hyperreagibilität einhergehen [40].

### 1.5.3 Histamin

Histamin, ein kurzlebiges vasoaktives Amin, ist wichtiger Mediator der allergischen Reaktion. Histamin kann durch verschiedene Stimuli, zum Beispiel physikalische, immunologische und nicht-immunologische Reize aus den Mastzellen und eosinophilen Granulozyten, in denen es gespeichert ist, freigesetzt werden. Nach Allergenkontakt und Allergenbindung an oberflächenständige IgE Antikörper und Kreuzvernetzung folgt die Histaminausschüttung.

Die klassischen Effekte von Histamin werden über mindestens drei G-Protein gekoppelte Histaminrezeptoren vermittelt (H1-, H2- und H3-Rezeptor) [46]. Die Interaktion mit dem Histamin-1-Rezeptor (H1-Rezeptor) führt zu sofortiger Erhöhung der lokalen Durchblutung, vermehrter Gefäßdurchlässigkeit, Kontraktion der glatten Muskulatur, Vasodilatation, Pruritus und an den Schleimhäuten zu Schleimsekretion, somit zu den typischen Symptomen einer allergischen Erkrankung: Niesreiz und Sekretion, nasale Obstruktion, Bronchokonstriktion sowie Juckreiz bei Urtikaria [47].

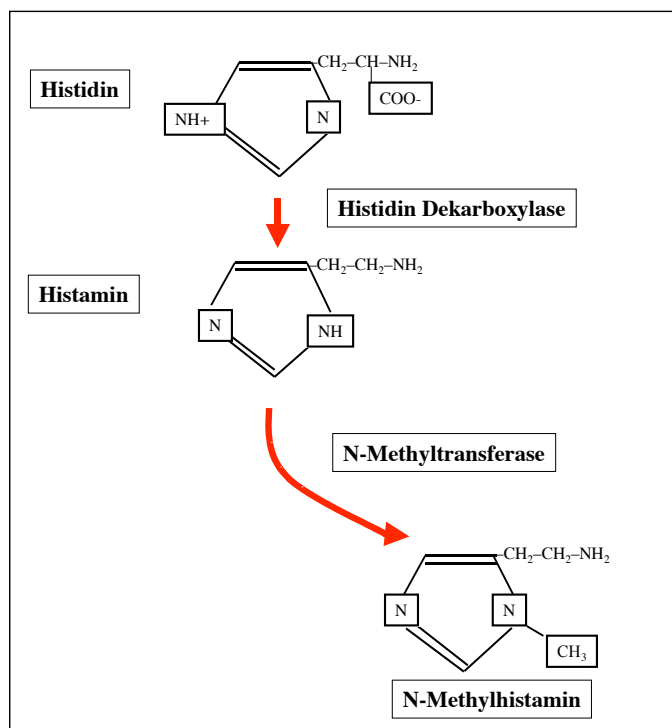


Abbildung 4: Histaminmetabolismus durch die Histamin-N-Methyltransferase (HNMT)

Über den Histamin-2-Rezeptor (H2-Rezeptor) entfaltet Histamin weiterhin Wirkungen auf die Schleimsekretion und den bronchialen Atemwegswiderstand [48]. Histamin-3-Rezeptoren (H3-Rezeptoren) sind an der Regulation der Histaminsynthese und seiner Freisetzung aus nervalen Elementen beteiligt. Wahrscheinlich vermitteln sie auch in postganglionären cholinergen Nerven des menschlichen Bronchus eine Protektion vor einer übersteigerten Bronchokonstriktion [49]. Weiterhin hat Histamin eine wichtige Funktion als Neurotransmitter im ZNS [50].

Die **Histamin-N-Methyltransferase (HNMT)** ist ein zytosolisches Enzym, das Histamin durch Transmethylierung umsetzt. Es handelt sich um ein aus 229 Aminosäuren bestehendes Enzym, das, wie Horton *et al.* zeigen konnten, in einer zwei Domänen-Struktur vorliegt [51]. Zusammen mit der Diaminoxidase ist HNMT für den Abbau freigesetzten Histamins verantwortlich. Die N-Methylierung durch HNMT stellt den Hauptstoffwechselweg in der Bronchialschleimhaut dar [52].

#### 1.5.3.1 Histamin-1-Rezeptor (HRH1)

HRH1 ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der die proinflammatorische Wirkung von Histamin vermittelt [53; 54].

Der Histamin-1-Rezeptor vermittelt folgende Wirkungen:

- die konstriktorischen Wirkungen von Histamin an der glatten Muskulatur der Bronchien
- die konstriktorischen Wirkungen an der glatten Muskulatur des Darms
- die permeabilitätserhöhende Wirkung auf die Gefäßwände
- die erleichterte Leukozytenmigration
- die zum Juckreiz führende neuronale Reizung

Die Interaktion von Histamin mit dem G-Protein gekoppelten Histaminrezeptor führt also zu den typischen Symptomen allergischer Erkrankungen [47; 55]. Den Histamin-1-Rezeptor blockieren die H-1-Rezeptorantagonisten (Antihistaminika), um die Wirkungen freigesetzten Histamins zu unterdrücken und allergische Symptome zu lindern.

Der H1R ist weitaus stärker auf Th1-Zellen exprimiert als auf Th2-Zellen. Es besteht eine höhere H1R Messenger-RNA Konzentration in Th1-Zellen und spezifische H1R-Inhibitoren wie Tripelenamin inhibieren ausschließlich die Histaminbindung an Th1, nicht aber an Th2 –Zellen. Hingegen verändern spezifische H2R und H3R Antagonisten die Histamin Wirkung auf Th1-Zellen nicht. Somit muss man Histamin auch zu den

Immunmodulatoren zählen, da es über einen negativen Feedback, für eine Aktivierung der Th1-Zellen (vermittelt durch H1R), negative Regulation der Th2 Antwort (vermittelt durch H2R) und Interferon- $\gamma$  Freisetzung verantwortlich ist.

## 1.6 Genetik allergischer Erkrankungen

Die Hypothese, dass für die Entstehung allergischer Entzündungen die Vererbung eine wichtige Rolle spielt, wurde vor fast 100 Jahren aufgestellt. Schon damals wurde bemerkt, dass bei allergischen Individuen eine deutlich höhere Prävalenz positiver Familienanamnesen besteht als in Kontrollgruppen [56; 57]. Da allerdings lange Zeit Uneinigkeit über den Weg der Vererbung allergischer Symptome bestand, wurde die gesamte Hypothese zwischenzeitlich in Frage gestellt. Hopp *et al.* konnten 1984 mit Hilfe einer Zwillingsstudie einen genetischen Einfluss auf allergische Phänotypen mit ungefähr 50% beziffern. Von anderen Autoren wird dieser Einfluss auf bis zu 75% geschätzt [58].

Atopie-assoziierte Erkrankungen sind komplexe genetische Merkmale, die nicht einem Mendelschen Erbgang zugeordnet werden können. Folgende Phänomene erschweren die Analysen [59]:

- Polygene Vererbung: Es müssen Mutationen in mehreren verschiedenen Genen gleichzeitig vorliegen, um das Merkmal, also die Erkrankung auszulösen.
- Genetische Heterogenität: Der gleiche Phänotyp (die gleiche Krankheit) kann durch Mutationen in unterschiedlichen Genen hervorgerufen werden.
- Phänokopie: Bei einigen Erkrankten liegen keine prädisponierenden Allele vor, die Krankheit ist durch Umwelteinflüsse ausgelöst.
- Inkomplette Penetranz: Einige Individuen, bei denen eine Mutation vorliegt, die für die Erkrankung prädisponierend ist, entwickeln diese nicht. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Erkrankung (Penetranz), bei einem prädisponierenden Genotyp, kann von Umwelteinflüssen, Alter und anderen Faktoren abhängig sein.

## 1.7 Methodik genetischer Studien

### 1.7.1 Assoziationsstudien (Kandidatengenstudien)

Als Kandidatengene werden Gene bezeichnet, deren Proteinprodukt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Erkrankung spielen. Die DNA-Sequenz der jeweiligen Gene und ihrer regulatorischen Elemente wird auf funktionelle Varianten durchsucht. Diese können, wie in der vorliegenden Arbeit, in Fall-Kontrollstudien auf eine Assoziation zu definierten Phänotypen untersucht werden.

### 1.7.2 Der Transmissions-Disäquilibrium-Test (TDT)

Mit Hilfe des **Transmissions-Disäquilibrium-Tests (TDT)** kann untersucht werden, ob bestimmte väterliche oder mütterliche Allele mit einer höheren Wahrscheinlichkeit als 50% an kranke Nachkommen vererbt werden. Dabei wird erhoben, wie oft in Familien mit einem erkrankten Kind ein Marker-Allel von den Eltern auf das erkrankte Kind übertragen wird. Wird nämlich von heterozygoten Eltern ein Marker deutlich häufiger als 50% auf ein krankes Kind übertragen, so ist davon auszugehen, dass dieser Marker in der Nähe des krankheitsverursachenden Gens, beziehungsweise im krankheitsverursachenden Gen selbst, liegt.

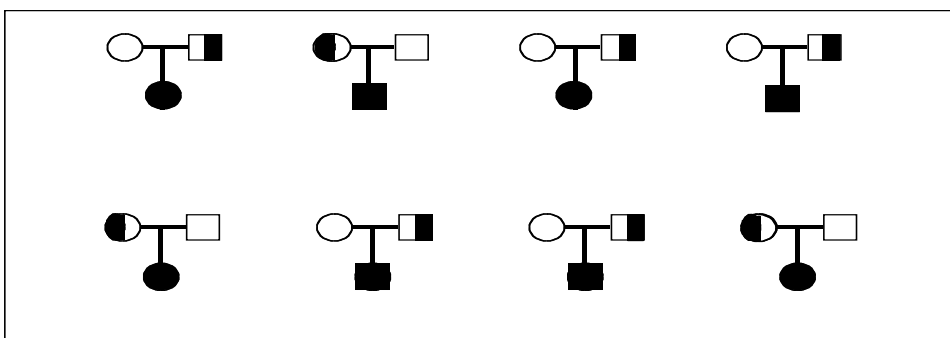


Abbildung 5: Transmissions-Disäquilibrium-Test: Phänotypisch symptomtragende Kinder und deren Eltern werden genotypisiert. Wird ein Allel von heterozygoten Eltern signifikant häufiger als 50% an betroffene Kinder vererbt, deutet dies auf einen Zusammenhang zwischen diesem Allel und dem Phänotyp hin.

Sind bereits Kandidaten-Gene bekannt, also Gene bei denen der Verdacht auf einen kausalen Zusammenhang mit der Krankheit besteht, kann mit dem TDT deren Beteiligung an der Krankheit nachgewiesen werden.

### 1.7.3 Die Gene *ITK*, *TIM1* und *TIM3*

Die oben beschriebenen Proteine, *ITK*, *TIM1* und *TIM3* werden von Genen in der Region 5q31-33 kodiert.

Wiederholt konnten Hinweise auf eine Kopplung von Atopie, Asthma und Allergie-assoziierten Merkmalen mit der Region 5q31-33 gefunden werden [8; 60-64].

Zwei Arbeitsgruppen fanden schon 1994 Evidenz für eine Kopplung erhöhter IgE-Spiegel und genetischer Marker auf Chromosom 5q 31-33 [60; 62].

Postma *et al.* konnten dann 1995 in einer Studie an 303 Kindern und Enkelkindern von Patienten mit Asthma, mit Hilfe von Geschwisterpaar-Analysen eine Kopplung bronchialer Hyperreagibilität mit verschiedenen genetischen Markern auf Chromosom 5q nachweisen [8].

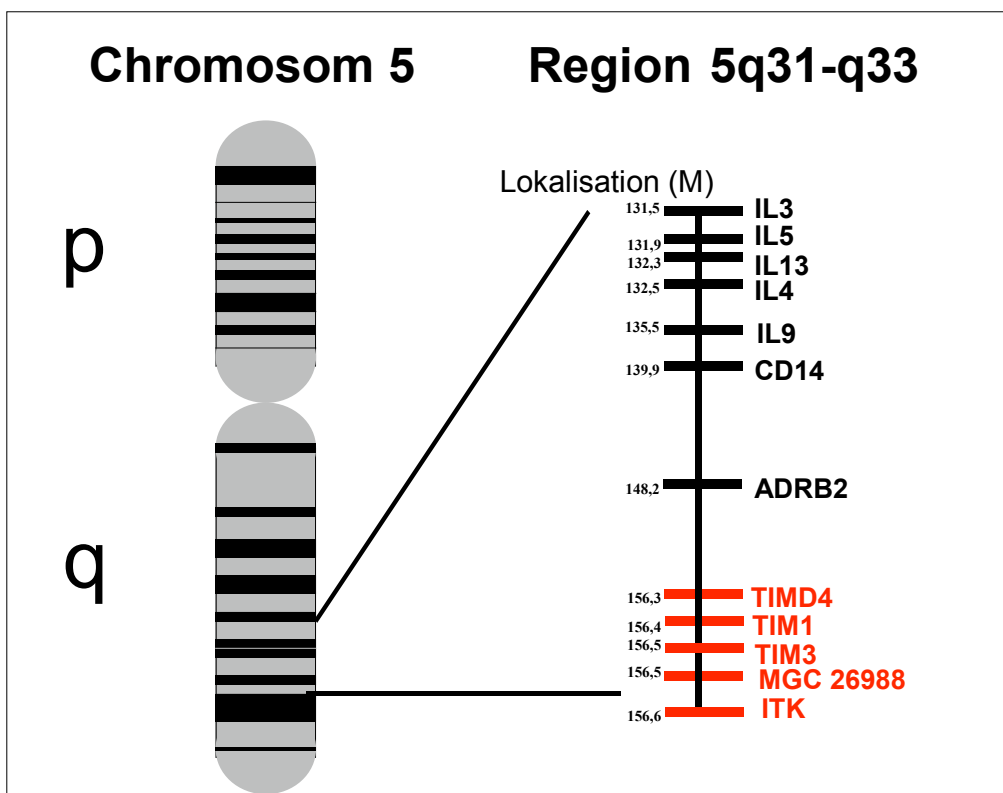


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Region 5q31-33. Der lange Arm des Chromosoms wird mit q bezeichnet der kurze Arm mit p. Die untersuchten Kandidatengene sind rot markiert. Die Zahlen entsprechen Banden, welche in der Metaphasenfärbung sichtbar sind (nicht maßstabsgetreu wiedergegeben, frei nach NCBI Map Viewer 2006).

In der Region 5q31-33 sind mehrere Gene lokalisiert, denen eine wichtige Bedeutung bei der allergischen Entzündung zugesprochen wird (siehe Abbildung 6), wie zum Beispiel die Th2-Zytokin-Gene *IL-4* und *IL-13*, oder *CD14* [9; 13; 60; 65-67].

#### 1.7.3.1 *ITK-Gen*

Mit Hilfe von Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung kartierten Gibson *et al.* *ITK* (auch *EMT*, expressed mainly in T-Cells, genannt), auf Chromosom 5q31-33 [68].

Das Verständnis der *ITK*-Funktion wurde vornehmlich durch die Entwicklung von *ITK*-defizienten Knockout (-/-) Mäusen geprägt. In diesen Mäusen war die Entwicklung CD4+ T-Zellen eingeschränkt, insbesondere die Differenzierung zu Th2-Zellen war nicht möglich [69].

Auch im humanen Genom konnten Polymorphismen im *ITK* kodierenden Gen identifiziert werden. *ITK* stellt ein vielversprechendes Kandidatengen für die Untersuchung von Assoziationen mit allergischen Phänotypen dar.

#### 1.7.3.2 *TIM-Gene*

Mit Hilfe einer kongenetischen Mäuselinie, somit Einflüsse genetischer Varianz ausschließend, untersuchten McIntire *et al.* die Asthma-Suszeptibilitätsgene einer dem Abschnitt 5q23-35 äquivalenten Region der Maus [19]. Sie skizzierten eine vor bronchialer Hyperreagibilität schützende Region und benannten diesen Locus Tapr (T-cell and Airway Phenotype Regulator). Innerhalb der Tapr Region kloneten sie eine Gen-Familie, die für Glykoproteine in T-Zellmembranen kodiert.

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Polymorphismen der Tapr-Region bei Mäusen Einfluss auf die Th1- und Th2-Differenzierung haben und mit vermehrter bronchialer Hyperreagibilität einhergehen [40].

#### 1.7.3.3 *Untersuchte Polymorphismen in der Region 5q31-33*

Wie oben beschrieben sind das *ITK*-Gen und die *TIM*-Gene interessante Kandidatengene für Assoziationsstudien in Populationen mit allergischen Phänotypen. Um die Rolle von Polymorphismen in der Tapr-Region bei der Entwicklung allergischer Erkrankungen besser einordnen zu können, untersuchten wir folgende Polymorphismen:



Tabelle 1: In dieser Arbeit untersuchte Polymorphismen der Region 5q31-33 mit einer Auflistung der bisherigen Untersuchungen auf Assoziationen mit allergischen Phänotypen.

<i>GEN</i>	<i>SNP</i>	<i>Lokalisation</i>	<i>bereits untersuchte Assoziation</i>
<i>TIM1</i> (HAVCR-1)	rs2277025 A>G	Pos.: 24860 lokalisiert im Intron 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ keine Assoziation mit Asthma*</li> <li>▪ Assoziation mit Asthma#</li> </ul>
<i>TIM3</i> (HAVCR-2)	rs1036199 G>T	Pos.: 4259 lokalisiert im Exon 3 mit Aminosäure- Austausch Arginin=>Leuzin	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Assoziation mit Atopie und Ekzem*</li> <li>▪ keine Assoziation mit Asthma**</li> <li>▪ Haplotyp-Analysen zeigten für diesen SNP stärksten Einfluss unter 3 verschiedenen <i>TIM3</i> SNPs*</li> <li>▪ Assoziation mit ARK<sup>+</sup></li> <li>▪ signifikant unterschiedliche Allelfrequenzen zwischen verschiedenen Ethnien<sup>+</sup></li> </ul>
<i>TIMD4</i>	rs1345618 A>G,	Pos.: 38863 lokalisiert im Intron 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ keine Assoziation mit Asthma*</li> <li>▪ signifikant unterschiedliche Allelfrequenzen zwischen verschiedenen Ethnien*</li> </ul>
<i>MGC 26988</i> (FAM71B)	rs 31208 C>T	Pos.: 3595 lokalisiert im Exon 2 mit Aminosäureaustausch Methionin zu Threonin.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Assoziation mit Atopie und Ekzemen*</li> <li>▪ keine Assoziation mit Asthma*</li> </ul>
<i>ITK</i>	rs451494 G>A	Pos.: -1793 (Promotorregion von <i>ITK</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Assoziation mit Atopie und Ekzemen*</li> <li>▪ keine Assoziation mit Asthma*</li> </ul>
<i>ITK</i>	rs365171 C>T	Pos.: -1678 (Promotorregion von <i>ITK</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Assoziation mit Atopie*</li> <li>▪ keine Assoziation mit Asthma*</li> <li>▪ signifikant unterschiedliche Allelfrequenzen zwischen verschiedenen Ethnien*</li> </ul>

\* aus Graves *et al.* in 568 Amerikanern gemischter Ethnizität [10], # aus Gao *et al.* in 184 Afro Amerikanern [11], + aus Chae *et al.* in 74 Koreanern [17]

Aus Tabelle 1 wird ersichtlich, dass bisher kontroverse Ergebnisse zum Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf allergische Phänotypen bestehen. Die Bedeutung dieser Polymorphismen für die Entstehung von Allergien wurde bisher noch nicht in europäischen Populationen untersucht.

Über die Gene *TIMD4* und *MGC 26988* ist bisher wenig bekannt und die Bedeutung der von ihnen kodierten Proteine ist noch nicht abzuschätzen. Sie liegen in der Tapr-Region [19]. In einer vorangegangenen Untersuchung wurden ihre Polymorphismen bereits auf Assoziation zu allergischen Phänotypen untersucht [10].

#### **1.7.4 Das HNMT-Gen**

*HNMT* wurde mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von Yamauchi *et al.* auf Chromosom 1p32 kartiert [70]. Preuss *et al.* identifizierten einen SNP auf Chromosom 1p32 im Exon 4 des *HNMT*-Gens [71]. Bei diesem SNP besteht an Position 314 ein Austausch von Zytosin zu Thymin der im translatierten Enzym zu einem Aminosäure-Austausch von Threonin zu Isoleucin (an Position 105 des Proteins) führt. Dadurch kommt es zu einer Konformitätsänderung und zu einer signifikanten *HNMT*-Aktivitätsminderung [*HNMT* (Ile 105) hatte signifikant niedrigere Aktivität als *HNMT* (Thr 105)].

Höhere Histaminkonzentrationen in der Bronchialschleimhaut von Individuen mit diesem SNP könnten daher deren Anfälligkeit für Asthma beziehungsweise das Ausmaß der bronchialen Hyperreagibilität steigern. In einer Studie konnte bereits eine Assoziation von Asthma mit diesem SNP von Yan *et al.* in einer kaukasischen Population (n=192) gezeigt werden [72]. Deindl *et al.* konnten in einer vorangegangenen Untersuchung keine Assoziation dieses SNP mit allergischen Phänotypen finden [73].

#### **1.7.5 Das Histamin-1-Rezeptor-Gen**

Le Coniat *et al.* kartierten den humanen Histamin H1-Rezeptor auf Chromosom 3 in die Region 3p21-14 [74] einer Region von der Lee *et al.* zeigen konnten, dass sie in Kopplung mit AD steht [75].

Yuka Sasaki *et al.* fanden durch Sequenzierungen einen SNP im *HRH1*-Gen (-17 C/T) oberhalb des ersten ATG-Triplets [76]. Dieser befindet sich zwar in der

nichtkodierenden Region von Exon 2, durch seine unmittelbare Nähe zum ersten ATG-Triplett ist ein Einfluss auf die HRH1-Expression jedoch nicht unwahrscheinlich. Jutel *et al.* zeigten in Mäusen, dass eine Deletion von H1R zu einer Suppression von Interferon  $\gamma$  und damit einer positiven Selektion von Th2-Zellen führt [6; 77; 78].

Eine veränderte Expression des HRH-1-Rezeptors könnte somit an einer Prädisposition für allergische Erkrankungen Anteil haben. Sasaki *et al.* untersuchten eine Assoziation dieses Polymorphismus mit allergischem Asthma. In einer Population von 200 Kindern konnten sie jedoch keine Suszeptibilität finden.

### **1.7.6 Pharmakogenetische Untersuchung**

Erste Beobachtungen zum Einfluss genetischer Variationen bei Arzneimittelwirkungen reichen zurück in die fünfziger Jahre. Damals wurden Unterschiede in der Verstoffwechslung von Suxamethoniumchlorid (auch Succinylcholin, ein depolarisierendes, peripheres Muskelrelaxans) festgestellt. Einer von 3500 Kaukasiern hat eine weniger effiziente genetisch determinierte Variante des Enzyms Butyrylcholinesterase, die für den Suxamethoniumchlorid-Abbau verantwortlich ist. Dadurch kommt es zu einer verlängerten Wirkung dieses Muskelrelaxans [79; 80].

Es ist wahrscheinlich, dass genetische Varianten von Mediatoren allergischer Entzündungen Einfluss auf die Wirkung einer antiallergischen Pharmakotherapie haben. Tantisira *et al.* konnten zeigen, dass die Lungenfunktion asthmatischer Individuen mit Polymorphismen im **Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor 1 (CRHR1)** deutlich besser auf eine Therapie mit Glukokortikoiden anspricht, als die in Individuen ohne die untersuchten Polymorphismen [20]. Auch Unterschiede in der Wirksamkeit von  $\beta$ -Mimetika und von Leukotrienantagonisten in Abhängigkeit individueller Genotypen konnten nachgewiesen werden [81; 82]. So könnten auch Veränderungen im Histaminmetabolismus und in der Histaminrezeptorwirkung Einfluss auf die Wirkung von Antihistaminika haben. In der ETAC-Population wurden deshalb ein funktioneller Polymorphismus in der Histamin-N-Methyltransferase und ein SNP in der Promotorregion des Histamin-1-Rezeptors auf Assoziation zu einer verminderten präventiven oder verminderten antiallergischen Cetirizin-Wirkung untersucht.