

Aus der Hochschulambulanz für Neurodermitis und Päd. Allergologie  
Experimental and Clinical Research Center  
Charité – Universitätsmedizin Berlin und dem  
Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin (MDC)

DISSERTATION

Genetische Assoziationsstudie zur Untersuchung des Einflusses von  
Risiko-Genorten auf den Verlauf des atopischen Ekzems und den  
atopischen Marsch

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Till-Yong Mohr  
aus Berlin.

Datum der Promotion: 17.09.2021

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	2
Abbildungsverzeichnis .....	3
Tabellenverzeichnis .....	3
1. Abstract .....	4
2. Einleitung .....	6
2.1. Klinik und Epidemiologie des atopischen Ekzems .....	6
2.2. Verlaufsformen des atopischen Ekzems .....	8
2.3. Allergologische Grundlagen und mit dem AE assoziierte Erkrankungen .....	9
2.4. Immunologische Grundlagen der atopischen Erkrankungen .....	13
2.5. Genetik des atopischen Ekzems .....	17
2.6. Pathomechanismen des atopischen Ekzems .....	21
3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....	24
4. Methoden .....	25
4.1. Studienpopulation: ALSPAC .....	25
4.2. Auswahl der genetischen Varianten .....	25
4.3. Qualitätskontrolle der SNPs .....	26
4.4. Definition der Phänotypen .....	29
4.5. Statistische Analysen .....	34
5. Ergebnisse .....	37
5.1. Powerkalkulation der ALSPAC-Studie für den AE-Phänotyp .....	37
5.2. AE-Assoziationsanalyse und Qualitätskontrolle der ausgewählten SNPs .....	38
5.3. Korrelation des AE mit anderen atopischen Erkrankungen .....	40
5.4. Darstellung der untersuchten SNPs in Powerkalkulationsdiagramm .....	42
5.5. Assoziationsanalyse der Phänotypen für AE-Verlauf und -Persistenz .....	43
5.6. Assoziationsanalyse des kombinierten Phänotyps: AE + Atopie .....	45
5.7. Assoziationsanalyse des kombinierten Phänotyps: AE + AR .....	47
5.8. Assoziationsanalyse des kombinierten Phänotyps: AE + Asthma .....	49
5.9. Assoziationsanalyse des kombinierten Phänotyps: AE + Asthma + AR .....	51
5.10. Interaktionsanalyse der SNPs mit Berechnung des RERI .....	53
5.11. Signifikant assoziierte SNPs der Subphänotypenanalysen .....	55
6. Diskussion .....	56
6.1. Studienpopulation und Phänotypen .....	57
6.2. Einfluss auf den atopischen Marsch .....	59
6.3. Ursachen für nicht replizierte SNPs .....	59
6.4. Assoziierte SNPs und betroffene Genregionen .....	61
6.5. SNPs mit Wirkungen auf die Hautbarriere .....	61
6.6. SNPs mit Wirkungen auf das Immunsystem .....	65
6.7. SNP-SNP Interaktionsergebnisse .....	74
7. Zusammenfassung .....	82
8. Literaturverzeichnis .....	84
9. Eidesstattliche Versicherung .....	101

10. Lebenslauf.....	102
11. Danksagung.....	104

## Abkürzungsverzeichnis

AE	Atopisches Ekzem
AF	Allelfrequenz
ALSPAC	<i>Avon Longitudinal Study of Parents and Children</i>
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
AR	Allergische Rhinitis
<i>EMSY</i>	<i>BRCA2 interacting EMSY transcriptional repressor-Gen</i>
eQTL	<i>Expression quantitative trait locus</i>
<i>FLG</i>	Filaggrin-Gen
<i>GARP</i>	<i>Glycoprotein A repetitions predominant-Gen</i>
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
ILC	<i>Innate lymphoid cell</i>
<i>IL1RL1</i>	<i>Interleukin 1 receptor like 1-Gen</i>
<i>IL6R</i>	<i>Interleukin 6 receptor-Gen</i>
<i>IL18R1</i>	<i>Interleukin 18 receptor 1-Gen</i>
IFN- $\gamma$	Interferon-Gamma
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
KI	Konfidenzintervall
<i>KIF3A</i>	<i>Kinesin family member 3A-Gen</i>
LD	<i>Linkage disequilibrium</i>
<i>LRRC32</i>	<i>Leucine rich repeat containing 32-Gen</i>
MAS	Multizentrische Allergiestudie
OR	<i>Odds Ratio</i>
<i>OVOL1</i>	<i>Ovo like transcriptional repressor 1-Gen</i>
RA(F)	Risikoallel(-frequenz)
RERI	<i>Relative excess risk due to interaction</i>
RR	Relatives Risiko
<i>RTEL1</i>	<i>Regulator of telomere elongation helicase 1-Gen</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
T <sub>H</sub>	T-Helfer-Zelle
T <sub>naiv</sub>	Näive T-Zelle

$T_{Reg}$	Regulatorische T-Zelle
<i>TGF-<math>\beta</math></i>	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
<i>TNFRSF6B</i>	<i>TNF receptor superfamily member 6b-Gen</i>
<i>TSLP</i>	<i>Thymic stromal lymphopoetin</i>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. IgE-vermittelte allergische Reaktion schematisch dargestellt .....	11
Abbildung 2. <i>FLG</i> -Nullmutationen und Einfluss auf die Hautbarriere .....	21
Abbildung 3 Studienaufbau dieser Arbeit .....	24
Abbildung 4. Phänotypdefinitionen des AE und kombinierter Phänotypen .....	30
Abbildung 5. Phänotypdefinition für AE-Verlauf (Frühes, transientes und persistentes AE) ..	33
Abbildung 6. Powerkalkulation der ALSPAC-Studie für den AE-Phänotyp .....	37
Abbildung 7. Venn-Diagramm atopischer Erkrankungen in der ALSPAC-Kohorte.....	41
Abbildung 8. Darstellung der untersuchten SNPs in Powerkalkulationsdiagramm.....	42
Abbildung 9. Übersicht assoziierter SNPs aus Subphänotypenanalysen .....	55
Abbildung 10. rs479844 ( <i>OVOLI</i> ) - möglicher Einfluss .....	64
Abbildung 11. rs2228145 ( <i>IL6R</i> ) - möglicher Einfluss.....	66
Abbildung 12. rs2897442 ( <i>KIF3A</i> ) - möglicher Einfluss.....	69
Abbildung 13. rs2155219 ( <i>EMSY-LRRC32</i> ) - möglicher Einfluss .....	71
Abbildung 14. SNPxSNP Interaktion <i>FLG</i> x <i>IL18R1</i> – mögliche Wirkungen .....	77
Abbildung 15. SNP x SNP-Interaktion <i>KIF3A</i> x <i>FLG</i> - mögliche Wirkungen.....	78
Abbildung 16. SNP x SNP Interaktion <i>TNFRSF6B</i> x <i>IL18R1</i> – mögliche Wirkungen .....	80

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Korrelationsraten zwischen atopischen Erkrankungen .....	13
Tabelle 2. Übersicht von T-Zell-Subklassen.....	16
Tabelle 3. Übersicht der untersuchten SNPs .....	20
Tabelle 4. Untersuchte Studienpopulation .....	25
Tabelle 5. Charakterisierung untersuchter SNPs und Einschlusskriterien.....	28
Tabelle 6. Ausschlusskriterien für definierte Phänotypen .....	32
Tabelle 7. Assoziationsanalyse in ALSPAC und Vergleich mit GWAS-Referenz für AE .....	39
Tabelle 8. LD-Berechnungen ausgeschlossener SNPs.....	40
Tabelle 9. Korrelation der kombinierten Phänotypen atopischer Erkrankungen .....	41
Tabelle 10. Assoziationsanalyse des frühen AE und Subphänotypen transient/persistent .....	44
Tabelle 11. Assoziationsanalyse des kombinierten Phänotyps AE mit Atopie (AE+Atopie) .....	46
Tabelle 12. Assoziationsanalyse des kombinierten Phänotyps AE mit AR (AE+AR) .....	48
Tabelle 13. Assoziationsanalyse des kombinierten Phänotyps AE mit Asthma (AE+Asthma) ...	50
Tabelle 14. Assoziationsanalyse des kombinierten Phänotyps AE + Asthma + AR .....	52
Tabelle 15. SNP x SNP-Interaktionsergebnisse (RERI) .....	54

## 1. Abstract

Das atopische Ekzem (AE) ist die häufigste chronisch-entzündliche Hauterkrankung im Kindesalter mit deutlichem Prävalenzanstieg in den letzten Jahrzehnten.<sup>(1)</sup> 30-40% leiden an einer persistenten Verlaufsform, die bis in die Adoleszenz oder darüber hinaus andauert.<sup>(2)</sup> Obwohl hinsichtlich der Ausprägung des AE ein großer genetischer Einfluss feststeht, ist noch ein Großteil der zugrundeliegenden Mutationen bzw. spezifischen Genvarianten unklar. Seit dem Einsatz genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) wurden stetig neue Assoziationen von Einzelbasenpolymorphismen (*Single nucleotide polymorphisms*, SNPs) mit dem AE identifiziert. Allerdings ist bei den meisten SNPs der Einfluss auf den Krankheitsverlauf, die Größe des vermittelten Risikos für das Auftreten weiterer atopischer Erkrankungen sowie der spezifische Wirkmechanismus noch nicht hinreichend bekannt. Auch der Einfluss von Interaktionen verschiedener SNPs auf das Erkrankungsrisiko ist kaum erforscht.

Ziel dieser Dissertation ist, den Einfluss von bisher mit dem AE assoziierten Risiko-Genorten in einer großen longitudinalen Geburtskohorte genauer zu untersuchen: Erstens hinsichtlich ihrer Assoziation mit einer persistenten Verlaufsform, zweitens bzgl. einer Risikoerhöhung der Genorte für das kombinierte Auftreten von atopischen Erkrankungen und drittens im Hinblick auf mögliche Interaktionen zwischen den Genorten.

Für die genetische Assoziationsstudie dieser Arbeit wurden 27 durch GWAS (Europa und Asien) publizierte Genorte ausgewählt, die mit genomweiter Signifikanz mit dem AE assoziiert sind.<sup>(3,4,5,6,7,8,9,10)</sup> Die Testung erfolgte bei Kindern der großen englischen Geburtskohorte *Avon Longitudinal Study of Parents and Children* (ALSPAC) mittels der Softwaretools *PLINK* und *R* auf Grundlage von umfangreichen Daten der ca. 14000 Kinder.<sup>(11,12)</sup>

10 der 27 Risiko-Genorte zeigten signifikante Assoziationen mit dem AE. Fünf dieser Genorte waren signifikant mit einer persistenten Verlaufsform des AE assoziiert: Die Nullmutationen R501X und del2284 des Filaggrin-Gens (*FLG*),<sup>(3)</sup> rs2228145 des *Interleukin 6 receptor*-Gens (*IL6R*),<sup>(5)</sup> rs479844 des *Ovo like transcriptional repressor 1*-Gens (*OVOLI*)<sup>(10)</sup>, rs2897442 des *Kinesin family member 3A*-Gens (*KIF3A*)<sup>(10)</sup> und rs2155219 zwischen den Genen *Leucine rich repeat containing 32* (*LRRC32*) und *BRCA2 interacting EMSY transcriptional repressor* (*EMSY*)<sup>(7)</sup>. Für letztere beiden SNPs stellt die Assoziation mit dem persistenten AE eine neue Entdeckung dar. Hinsichtlich der Kombination des AE mit anderen atopischen Erkrankungen zeigten sich drei signifikante Assoziationen für die Genorte *FLG*, *EMSY-LRRC32* und *KIF3A*. Zusätzlich wurden drei signifikante SNP x SNP-Interaktionen (*FLG x KIF3A*, *FLG x Interleukin 18 receptor 1*-Gen (*IL18R1*) und *Regulator of telomere elongation helicase 1 - TNF receptor*

*superfamily member 6b-Gen (RTEL1-TNFRSF6B) x IL18R1*) durch Berechnung des *Relative excess risk due to interaction* (RERI) neu identifiziert.

Eczema (AE) is the most common chronic-inflammatory skin disease in children, with a rising prevalence over recent decades. 30-40% suffer from a persistent disease course lasting until adolescence or longer. Although a strong genetic component in eczema susceptibility is undisputed, the vast majority of the underlying mutations or genetic variants remain unknown. Since the use of genome-wide association studies (GWAS) a number of genetic associations of *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs) with eczema have been identified. However for most SNPs, their influence on the disease course, their attributable risk on the incidence of other atopic diseases as well as their specific, functional impact is not yet established. Moreover, the effect of interactions between SNPs on eczema risk is even less explored.

The goal of this thesis is to investigate eczema associated risk-loci in a large longitudinal birth cohort in order to understand their role in 1) the long term disease course, 2) the risk for comorbid allergic disorders and 3) possible interactions between the loci.

To this end, I selected 27 eczema loci that were identified by GWAS and investigated them in a large English birth cohort, the *Avon Longitudinal Study of Parents and Children* (ALSPAC) using the softwaretools *PLINK* and *R* on the basis of extensive data of the ca. 14000 children.

10 of 27 risk-loci showed significant associations with eczema. Five of those loci (and their genes) were significantly associated with a persistent course of eczema: Loss-of-function mutations R501X and del2284 in the *filaggrin* gene (*FLG*), rs2228145 in the *interleukin 6 receptor* gene (*IL6R*), rs479844 in the *ovo like transcriptional repressor 1* gene (*OVOL1*), rs2897442 in the *kinesin family member 3A* gene (*KIF3A*) and rs2155219 between the *leucine rich repeat containing 32* (*LRRC32*) and *BRCA2 interacting EMSY transcriptional repressor* genes (*EMSY*). Regarding the last two, the association with the persistent eczema is a new discovery. Concerning the combination of eczema with other atopic diseases there were three significant associations: *FLG*, *EMSY-LRRC32* and *KIF3A*. Furthermore, three significant SNP x SNP interactions (*FLG* x *KIF3A*, *FLG* x the *interleukin 18 receptor 1* gene (*IL18R1*) and *regulator of telomere elongation helicase 1* gene - *TNF receptor superfamily member 6b* gene (*RTEL1-TNFRSF6B*) x *IL18R1*) were identified by calculation of the *Relative excess risk due to interaction* (RERI).

## 2. Einleitung

Das atopische Ekzem (AE), auch bekannt als atopische Dermatitis oder Neurodermitis, ist die häufigste chronisch-entzündliche Hauterkrankung im Kindesalter mit starkem weltweiten Prävalenzanstieg in den letzten Jahrzehnten.<sup>(1)</sup> Bis dato sind die Gründe für diese starke Zunahme und auch die Ätiologie noch nicht abschließend geklärt. Durch technologische Neuerungen bei der Hochdurchsatzgenotypisierung konnten in den letzten Jahren eine Reihe von Risikovarianten für das AE identifiziert werden. Hier werden die bis zum Beginn meiner Arbeit bekannten Genvarianten, sogenannte Einzelbasenpaar-Polymorphismen (englisch: *Single nucleotide polymorphisms*, SNPs) untersucht, bei denen lediglich eine Nukleotidbase des Genoms verändert ist. Als Studienpopulation wurde die große englische Geburtskohorte ALSPAC (*Avon Longitudinal Study of Parents and Children*) verwendet, mit der Möglichkeit die populationsbasierten Daten von ca. 14000 Kindern über den Zeitraum von 14 Jahren zu nutzen, um Erkenntnisse bezüglich der Genese des AE zu gewinnen. Ein besonderer Fokus sollte dabei auf dem Risiko für die persistente Erkrankungsform sowie dem Risiko für die Kombination des AE mit anderen atopischen Erkrankungen liegen. Dazu wurden in dieser Arbeit Assoziationsberechnungen für SNPs mit dem AE und assoziierten atopischen Erkrankungen durchgeführt. Ein bisher noch wenig beleuchtetes, vielversprechendes Forschungsfeld stellt auch die Interaktion zwischen SNPs dar. Diesbezüglich wurden am Ende der Arbeit alle im Vorhinein signifikant assoziierten SNPs untersucht. Als Grundlage der Arbeit dienten die umfangreichen genetischen und klinischen Daten der ALSPAC-Kohorte.

### 2.1. Klinik und Epidemiologie des atopischen Ekzems

Das atopische Ekzem ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung, die einerseits durch akute Hautveränderungen, wie Erytheme und Schwellung, und andererseits durch chronische Veränderungen, wie Hautschuppung und -verdickung bis hin zur Lichenifizierung, charakterisiert ist. Es geht mit starkem Juckreiz einher, der durch das nachfolgende Kratzen zu typischen Exkorationen führt.

Im Säuglingsalter liegen die betroffenen Stellen zunächst meist im Wangenbereich, am Stamm und an den Streckseiten der Extremitäten. Im Verlauf geht das Ekzem auf die typischen Prädilektionsstellen (große Beugen, Hals, Augenlider) über. Charakteristisch für Patienten mit atopischem Ekzem ist eine Anfälligkeit für kutane Superinfektionen, die meist durch Bakterien, vorwiegend durch *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), verursacht werden. Es besteht außerdem eine Anfälligkeit für Infektionen durch Viren aus der Gruppe der Herpesviren z. B. als Eczema

herpeticatum.<sup>(2)</sup> Zusätzlich wird *Molluscum contagiosum* (Dellwarze), eine durch andere Viren verursachte Hauterkrankung, bei Kindern mit AE häufiger diagnostiziert als bei Kindern ohne AE.<sup>(13)</sup> Die Krankheit verläuft in Schüben, deshalb zeigen sich je nach Krankheitsphase unterschiedlich starke Ausprägungen der Hauterscheinungen. Einzelne Schübe können durch individuell unterschiedliche Faktoren ausgelöst werden, in erster Linie durch Allergene. Daher erfolgt eine Klassifizierung in die extrinsische Form mit nachgewiesener spezifischer Sensibilisierung, die bei ca. 2/3 der Patienten vorkommt, und die intrinsische Form ohne nachgewiesene Allergie. Es können auch physikalische Faktoren wie Hitze, Kälte oder Reizungen der Haut, z. B. durch Wolle schubverstärkend wirken. Hinzu kommen psychische Faktoren wie Stress durch schulische oder berufliche Belastung sowie belastende Lebenssituationen, die eine Beschwerdeprogredienz bewirken können.<sup>(14)</sup> Dies unterstreicht auch eine japanische Studie, in der gezeigt wurde, dass es nach einem großen Erdbeben in Kobe 1995 bei 38% der AE-Patienten zu einer Exazerbation, bzw. deutlichen Verschlechterung des Ekzems kam, demgegenüber nur bei 7% in einer Kontrollgruppe ohne örtliche Nähe zum Erdbeben.<sup>(15)</sup> Außerdem können zahlreiche Umwelttoxine, wie Abgase, Tabakrauch, flüchtige organische Verbindungen und weitere Chemikalien den Hautzustand bei Betroffenen verschlechtern oder sogar einen Beitrag zur Krankheitsausprägung leisten.<sup>(16)</sup>

### **Epidemiologie des atopischen Ekzems**

In Deutschland beträgt die Lebenszeitprävalenz für das AE bei Kindern 13,2% nach den Daten der populationsbasierten Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (KiGGS). Bei dieser Studie wurden in den Jahren 2003-2006 die Daten von 17641 Kindern/Jugendlichen im Alter von 0-17 Jahren erhoben. Bei Erwachsenen ist die Lebenszeitprävalenz des AE mit 3,5 % deutlich niedriger, wie aus der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1, 2008–2011) ersichtlich wurde. Ähnliche Werte fand die weltweite, populationsbasierte *International Study of Asthma and Allergy in Childhood* (ISAAC) in ihren Daten der Phase III (1999) für Deutschland: Die Lebenszeitprävalenz des AE wurde für die 6-7-Jährigen mit 14,7 % und für die 13-14-Jährigen mit 13,6 % angegeben.<sup>(17)</sup> Auf Grund des populationsbasierten Aufbaus der Studien mit retrospektiver Datenerhebung über Fragebögen ist bei den erhobenen Werten die Erinnerungsverzerrung (englisch: *Recall bias*) zu bedenken, der besonders bei der Befragung im Erwachsenenalter zum Tragen kommt. In diesem Fall also, dass die Probanden oder Eltern sich im Rückblick nicht immer korrekt an ein früher vorhandenes AE erinnern. Dies kann dazu führen, dass sich ein falsch-niedriger Wert für das AE ergibt. Daher sind



die Daten prospektiver Studien, wie z.B. der deutschen Multizentrischen Allergie Studie (MAS) wichtig. Die MAS ist eine der ersten und am längsten weiterverfolgten deutschen Geburtskohorten für Asthma und Allergien mit Beginn 1990 und Laufzeit bis zum Alter von 20 Jahren.<sup>(18)</sup> Dort zeigte sich eine Prävalenz von 21,5 % innerhalb der ersten 2 Lebensjahre<sup>(19)</sup> und nachfolgend eine Prävalenz von stets über 10 % im Schulkindalter mit ca. ein Drittel Rückgang im Alter von 20 Jahren.<sup>(18)</sup> Im Vereinigten Königreich wurden höhere Prävalenzen für das AE ermittelt: In den ISAAC-Daten betrug die Lebenszeitprävalenz für die 13-14-Jährigen 26,1 %.<sup>(17)</sup> Im Einklang damit wurden in der in dieser Arbeit untersuchten englischen ALSPAC-Geburtskohorte Punktprävalenzraten von 27 % im ersten Lebensjahr, um die 20 % bis zum 10. Lebensjahr und 7,5 % im Alter von 16,5 Jahren verzeichnet.<sup>(20)</sup>

National und international ist die Prävalenz der Erkrankung in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen.<sup>(21,22)</sup> In dem relativ kurzen Zeitraum der Jahre 1991 – 2003 der ISAAC-Studie wurde in einem Großteil der beteiligten Länder ein deutlicher Prävalenzanstieg des AE bei Kindern festgestellt mit deutlichen regionalen Unterschieden.<sup>(23)</sup>

Auf Grund der hohen Erkrankungsrate des AE in der Bevölkerung mit gleichzeitig sehr unterschiedlichen Ausprägungsgraden bzw. Verläufen, ist es sinnvoll zwischen klinischen Verlaufsformen des AE zu differenzieren, um mögliche zugrundeliegende genetische und immunologische Ursachen zielgerichteter untersuchen zu können.

## **2.2. Verlaufsformen des atopischen Ekzems**

Im Allgemeinen kann man drei Verlaufsformen des AE unterscheiden:

- 1.) Eine frühkindliche, transiente Form, die innerhalb der ersten 2 Lebensjahre beginnt, aber ca. bis zum Grundschulalter komplett remittiert.
- 2.) Eine frühkindliche, intermittierende Form, die innerhalb der ersten 2 Lebensjahre beginnt, aber erst verzögert bis ca. zum 16. Lebensjahr remittiert.
- 3.) Eine persistierende Form, die von früher Kindheit bis zum Erwachsenenalter bestehen bleibt.

Diese Einteilung ist angelehnt an den AE-Verlauf der Studie in der Geburtskohorte der Multizentrischen Allergiestudie (MAS) aus dem Jahr 2004.<sup>(19)</sup>

Eine Sonderform stellt die späte, sogenannte „late-onset“ Form dar, bei der das AE erst nach der Adoleszenz auftritt.<sup>(24)</sup>

Etwa 60% aller Fälle des AE beginnen während des ersten Lebensjahres. Bis zum 5. Lebensjahr sind etwa 85% aller Betroffenen erkrankt.<sup>(2)</sup> Bei ca. 60-70% aller Erkrankten kommt es zu einem deutlichen Rückgang der Symptome oder sogar zur Symptombefreiheit bis zur Pubertät<sup>(2)</sup> bzw. bis

zum Erwachsenenalter.<sup>(25)</sup> Beispielsweise wurde in der deutschen prospektiven Studie, *Study on Occupational Allergy Risks (SOLAR)* ein persistenter Typ des AE bei 34% aller in der Kindheit erkrankten Patienten festgestellt. Dieser hielt von der frühen Kindheit bis nach der Pubertät an.<sup>(26)</sup> Bekannte Risikofaktoren für eine persistente Verlaufsform des AE sind eine frühe allergische Sensibilisierung,<sup>(26)</sup> eine positive Familienanamnese atopischer Erkrankungen der Eltern<sup>(26)</sup>, Vorhandensein einer *FLG*-Nullmutation<sup>(27)</sup> und ein früher Beginn der Erkrankung.<sup>(28)</sup>

### **2.3. Allergologische Grundlagen und mit dem AE assoziierte Erkrankungen**

Zum besseren Verständnis der engen Verknüpfung atopischer Erkrankungen, folgt ein Überblick über allergologische Grundlagen und mit dem AE assoziierte Erkrankungen. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da in dieser Arbeit auch der Einfluss von Genorten auf den „atopischen Marsch“, also die Abfolge mehrerer atopischer Erkrankungen in charakteristischer Reihenfolge, untersucht werden soll. Diesbezüglich ist bekannt, dass ein frühes AE mit einem erhöhten Risiko für nachfolgende atopische Erkrankungen einhergeht.<sup>(25)</sup>

#### **Atopischer Marsch**

Das Auftreten mehrerer atopischer Erkrankungen in Folge wird auch als atopischer Marsch bezeichnet. Das häufigste Erkrankungsmuster ist dabei jenes, bei dem in den ersten Lebensjahren ein AE auftritt und bei dem sich später zusätzlich Asthma bronchiale und/oder die allergische Rhinitis (AR) manifestieren. Die sequenzielle Entwicklung wurde in einer großen Geburtskohortenstudie von 2009 im Vereinigten Königreich umfassend beschrieben, in der die ärztlichen Diagnosen von über 24000 Kindern im zeitlichen Verlauf bis zum 18. Lebensjahr ausgewertet wurden.<sup>(24)</sup> Bei 18% aller Kinder wurden mindestens zwei atopische Erkrankungen bis zum 18. Lebensjahr diagnostiziert. Innerhalb dieser Gruppe war mit Abstand die häufigste Sequenz die Diagnose eines AE mit nachfolgendem Asthma (38%). Die zweithäufigste Sequenz war die Diagnose eines AE mit späterer AR (22%). Erst als dritthäufigstes Muster mehrerer atopischer Erkrankungen wurde die Manifestation von Asthma vor einem AE gesehen (19%). Als häufigste Sequenz aller drei atopischen Erkrankungen wurde AE gefolgt von Asthma und späterer AR identifiziert.<sup>(24)</sup> Im Allgemeinen stellt also das AE den Beginn des atopischen Marschs dar. Dies wurde 2014 in einer schwedischen Geburtskohortenstudie bestätigt. Dort war konkret das frühe AE der ersten 2 Lebensjahre als starker Risikofaktor für AR und Asthma beschrieben worden. Über 35% aller Betroffenen mit frühem AE zeigten in der Folge mit 12 Jahren AR oder Asthma. Bei persistentem, schwerem frühem AE waren es sogar knapp 50%.<sup>(29)</sup> Ebenfalls wird dies durch eine prospektive amerikanische Studie von 2014 unterstrichen, bei der ein besonders

erhöhtes Risiko für spätere atopische Erkrankungen für die Untergruppen frühe AE, persistente AE und schwere AE identifiziert wurde.<sup>(30)</sup> Zusätzlich scheint AR im Vorschulalter ein Risikofaktor für ein späteres Asthma unabhängig vom AE zu sein. In der MAS-Studie zeigten 41% der 5-jährigen Kinder der Kohorte, die zu diesem Zeitpunkt AR hatten, im Verlauf bis zum Alter von 13 Jahren eine zusätzliche Manifestation von Asthma.<sup>(31)</sup>

Ebenfalls mit Hilfe von Daten der MAS-Kohorte wurde gezeigt, dass *FLG*-Nullmutationen nur bei den Kindern mit Asthma oder allergischer Rhinitis assoziiert waren, die zuvor auch an atopischem Ekzem erkrankt waren.<sup>(32)</sup> Daraus wurde abgeleitet, dass *FLG*-Nullmutationen das Risiko für das ekzemassoziierte Asthma darstellen und keinen unabhängigen Risikofaktor für Asthma per se. Diese Ergebnisse wiesen auf die inzwischen anerkannte, herausragende Rolle der Hautbarriere in der Pathogenese von atopischen Erkrankungen hin. Über den durch *FLG*-Nullmutationen verursachten Hautbarriere Defekt beim AE kommt es zur vermehrten Penetration von Allergenen durch die Epidermis, die erhöhte Raten an Sensibilisierungen bedingen, was zu vermehrten Allergien und den späteren atopischen Erkrankungen Asthma und AR führt. Unterstrichen wird dies durch die starke Assoziation des Nachweises von spezifischem IgE mit dem Auftreten von mehreren atopischen Erkrankungen.<sup>(33)</sup>

Allerdings scheint dies nur einen Teil der Verläufe des atopischen Marschs zu erklären, denn in einer großen europäischen prospektiven Kohortenstudie wurde gezeigt, dass nur 38% der Komorbiditäten zwischen atopischen Erkrankungen auf IgE-Sensibilisierungen zurückzuführen sind.<sup>(34)</sup> In diesem Zuge sind die Ergebnisse einer 2017 in *Nature Genetics* publizierten Studie aufschlussreich, die in einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS, siehe Kapitel 2.5) 136 gemeinsame genetische Risikovarianten zwischen atopischen Erkrankungen identifizierte von denen nur sechs signifikant stärkere Effekte für eine bestimmte der atopischen Erkrankungen zeigte.<sup>(35)</sup> Eine zusätzlich durchgeführte Analyse zur Heritabilität („Vererbbarkeit“) für diese 136 Varianten ergab, dass sie insgesamt ein Fünftel der Heritabilität für Asthma, ein Sechstel für die AR und ein Zehntel für das AE erklären. Zusammen stellen diese Erkenntnisse einen wichtigen Grund für das gehäufte gemeinsame Auftreten von atopischen Erkrankungen dar. Im Hinblick auf die Funktion der Varianten wurde gezeigt, dass sie zu einem großen Teil modulierend auf die Genexpression von Zellen des Immunsystems wirken.<sup>(35)</sup>

### **Allergie, Atopie und Hypersensitivitätsreaktionen**

Als Allergie wird eine immunologisch vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion bezeichnet, die infolge eines wiederholten Kontakts mit einem Allergen, bei sensibilisierten Menschen stattfindet. Die spezifische Sensibilisierung beschreibt die Bildung von Immunglobulin E (IgE)-Antikörpern

gegen ein bestimmtes Antigen, genannt Allergen, das einen normalerweise ungefährlichen Stoff (meist ein Protein) darstellt.

Atopie bezeichnet die erbliche Tendenz zur allergischen Sensibilisierung. Dies führt zur klinischen Manifestation von IgE-vermittelten allergischen Reaktionen, z. B. auf Pollen, Hausstaub oder Nahrungsmittel. Unter atopischen Erkrankungen werden das AE, Asthma bronchiale (Asthma), die allergische Rhinitis (AR) und Nahrungsmittelallergien zusammengefasst.

## Formen von Hypersensitivitätsreaktionen (nach Coombs und Gell)

### Typ I: IgE-Antikörper vermittelte Reaktion vom Soforttyp (siehe Abbildung 1)

Dieser Typ beschreibt die klassische, allergische Sofortreaktion. Typ-1-Reaktionen sind für diese Arbeit wichtig, denn sie kommen bei allen atopischen Erkrankungen vor.

Im ersten Schritt kommt es zur Sensibilisierung gegen ein Allergen nach Kontakt mit dem Immunsystem. Ein Allergen durchdringt die Schleimhautbarriere des Darms, der Lunge oder auch die Epithelschicht der Haut. Daraufhin erfolgt die Erkennung und Bindung an einen MHC-II-Rezeptor von dendritischen Zellen oder antigenpräsentierenden Zellen (APZ) im Gewebe. Der Kontakt des gebundenen Antigens mit naiven T-Zellen führt zu deren Aktivierung und Weiterentwicklung zur TH<sub>2</sub>-Zelle. Diese aktivieren über IL-4 B-Zellen. Aktivierte B-Zellen produzieren antigenspezifische IgE-Ak, welche an Mastzellen binden. So entstehen aktivierte

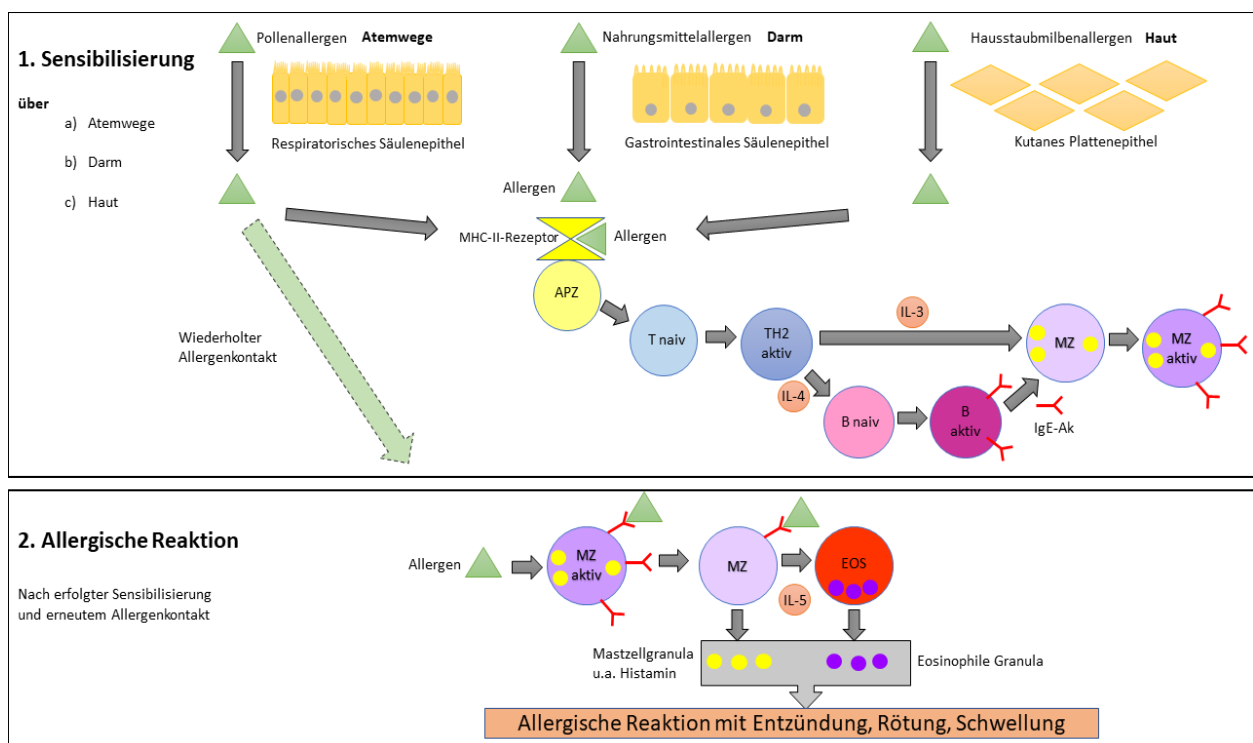


Abbildung 1. IgE-vermittelte allergische Reaktion schematisch dargestellt

1: Sensibilisierung bei Erstkontakt auf ein spezifisches Antigen/Allergen

2: Allergische Reaktion nach erneutem Kontakt und stattgefundener Sensibilisierung auf das Allergen. APZ = Antigenpräsentierende Zelle, Tnaiv = naive T-Zelle, Th2 = T-Helferzelle Typ 2, B naiv/aktiv = naive/aktive B-Zelle, MZ = Mastzelle, EOS = Eosinophiler Granulozyt

Mastzellen, die in der Lage sind, das spezifische Allergen zu erkennen und bei späterem Kontakt darauf reagieren. Nach erneutem Allergenkontakt bindet dieses an aktivierte Mastzellen. Daraufhin schütten die Mastzellen Entzündungsmediatoren aus (Degranulation) und wirken damit auf das umliegende Gewebe. Zum einen aktiviert IL-5 der Mastzellen Eosinophile Granulozyten, die daraufhin verschiedene zytotoxische Mediatoren wie Peroxidasen freisetzen. Zum anderen wirken Mastzellen über Histamin, Heparin, Prostaglandin D<sub>2</sub>, Proteasen und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) direkt auf das Gewebe ein und tragen zur allergischen Reaktion bei. Die hauptsächlichen Effektorsubstanzen sind Histamin und Leukotriene. Histamin bewirkt vor allem Juckreiz, Gefäßpermeabilität mit Hautrötung, Schwellung sowie Bronchospasmus. Weitere Wirkungen wie Schleimsekretion und die Aufrechterhaltung der Entzündung werden u.a. durch Leukotriene vermittelt.

#### Typ IV: T-Zell-vermittelte Reaktion vom Spättyp

Diese Reaktionen werden über T-Zellen vermittelt, die auf ein spezifisches Allergen reagieren. Nach Migration zum Ort der Allergenaufnahme, kommt es erst nach Stunden zur Entzündung durch Zytokinfreisetzung und weiterer Infiltration von Leukozyten. Beispiele sind das allergische Kontaktekzem und T-Zell-vermittelte arzneimittelinduzierte Hypersensitivitätsreaktionen.<sup>(36)</sup> In der chronischen Phase des AE spielen Typ IV-Reaktionen ebenfalls eine Rolle. Die Typen II und III sind für das AE nur von untergeordneter Bedeutung und werden daher nicht näher erläutert.

#### **Asthma bronchiale (Asthma)**

Bei Asthma handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege. Typisch ist eine rezidivierende Entzündungsreaktion mit reversibler Verengung der Bronchien durch die Kontraktion glatter Lungenmuskulatur, Entzündungszellinfiltration und verstärkter Schleimsekretion. Das Ausmaß der asthmatischen Beschwerden kann durch verschiedenste Reize wie Allergene, Atemwegsinfektionen, Kälte, Rauch, Medikamente oder körperliche Anstrengung zunehmen. Die Symptome des Asthmas sind Dyspnoe, Husten und Giemen. Asthma manifestiert sich im Vergleich zum AE meist später.

#### **Allergische Rhinitis / -Rhinokonjunktivitis (AR)**

Klinisch tritt bei der AR Niesen, Juckreiz und eine seröse Rhinitis auf. Zugrunde liegt eine allergische Schleimhautschwellung und -entzündung. Oftmals ist sie begleitet von einer Konjunktivitis mit geröteten, tränenden und juckenden Augen, dann bezeichnet als allergische Rhinokonjunktivitis. Unterteilt wird die Erkrankung in eine saisonale Form, mit Beschwerden während der Pollenflugzeit im Frühjahr und Sommer (Heuschnupfen) und eine perenniale Form bei Hausstaubmilbenallergie oder Tierhaarallergie, die auch in den Wintermonaten auftritt.

## Korrelationsraten zwischen atopischen Erkrankungen

In Prävalenzstudien zeigte sich die stärkste Korrelation zwischen AR und Asthma, allerdings ist die Streubreite der Prävalenzen groß und reicht von 46% in einer Auswertung von Daten der ISAAC-Studie bei Jugendlichen<sup>(37)</sup>, über 59% in einer französischen Studie bei asthmatischen Kindern im ambulanten Bereich,<sup>(38)</sup> bis zu max. 70% in einer multizentrischen, internationalen Studie bei jungen Erwachsenen.<sup>(39)</sup> Die Korrelationsrate zwischen AE und Asthma liegt den Daten eines großen Reviews von 13 prospektiven Studien nach zu urteilen bei 30-35%<sup>(40)</sup>. Für die Komorbidität vom AE und AR zeigt sich in einer populationsbasierten Kohortenstudie aus Schweden mit 33% ein ähnlicher Wert.<sup>(29)</sup> Demgegenüber fällt die Komorbiditätsrate vom AE und AR nach den Daten einer multizentrischen Studie aus Dänemark mit ca. 60% höher aus.<sup>(28)</sup>

Tabelle 1. Korrelationsraten zwischen atopischen Erkrankungen

	Asthma bronchiale	Allergische Rhinitis
Atopisches Ekzem	~30-35%	~33-60%
Allergische Rhinitis	~45-70%	

Um die Ursachen der sich überschneidenden Prävalenzen zwischen atopischen Erkrankungen näher zu beleuchten, ist daher ein Blick auf das Immunsystem und Ähnlichkeiten der immunologischen Prozesse bei diesen Erkrankungen sinnvoll.

## 2.4. Immunologische Grundlagen der atopischen Erkrankungen

Es folgt eine Übersicht zu den an der Immunreaktion beteiligten Zellen und Mechanismen, die in dieser Arbeit eine Rolle spielen, um das komplexe Zusammenspiel von Genen und Immunsystem bei atopischen Erkrankungen im Zuge der Diskussion der Ergebnisse später besser verstehen zu können.

### Übersicht wichtiger Zelltypen des Immunsystems

#### T-Lymphozyten

T-Lymphozyten oder kurz T-Zellen, sind eine Untergruppe der Leukozyten. Sie sind ein wichtiger Bestandteil des adaptiven, also erworbenen Immunsystems. Sie werden im Knochenmark als naive T-Zellen ( $T_{naiv}$ ) gebildet und reifen im Thymus aus. Dort werden T-Zellen selektioniert, die körpereigene Strukturen als Antigene erkennen und angreifen. Übrig bleiben diejenigen T-Zellen, die nur körperfremde Antigene nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ erkennen und bekämpfen. Unterteilt werden sie in T-Helferzellen ( $T_H$ ), zytotoxische T-Zellen ( $T_C$ ), regulatorische T-Zellen ( $T_{Reg}$ ), T-Gedächtniszellen, natürliche Killer T-Zellen (NK-T) und weitere erst kürzer bekannte

Typen ohne Relevanz für diese Arbeit. Die wichtigsten Zelltypen für atopische Erkrankungen werden nachfolgend genauer beschrieben.

### T-Helferzellen

Die T-Helferzellen ( $T_H$ ) sind auf dem Gebiet der atopischen Erkrankungen der wichtigste Zelltyp. Sie werden nochmals unterteilt in Subklassen: Aktuell werden verschiedene Subklassen mit vielfältigen Wirkungen auf das Immunsystem, wie  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H9$ <sup>(41)</sup>,  $T_H17$ <sup>(42)</sup> und  $T_H22$  Zellen unterschieden (siehe Tabelle 2). Diese Subklassen unterscheiden sich in ihrem gebildeten Zytokinmuster. Die Differenzierung der  $T_H$  erfolgt aus  $T_{naiv}$ . Eingeleitet wird dieser Vorgang durch die Bindung eines Antigens an den MHC Klasse II Rezeptor einer antigenpräsentierenden Zelle (APC), der wiederum an den T-Zell-Rezeptor (TCR) der  $T_{naiv}$  bindet, wodurch sie stimuliert wird. Entscheidend für den Vorgang der Differenzierung der  $T_{naiv}$  in eine  $T_H$ -Subklasse ist vor allem das lokal vorherrschende Zytokinmilieu.<sup>(43)</sup>

### T-Helferzellen Typ 1 ( $T_H1$ )

$T_H1$ -Zellen bilden als kennzeichnendes Zytokin Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Weiterhin werden in geringerem Maße Lymphotoxin, Interleukin- (IL-) 2, TNF- $\alpha$ , und TNF- $\beta$  von ihnen produziert.<sup>(44)</sup> Hauptaufgabe der  $T_H1$  ist die Abwehr von intrazellulären Erregern wie Bakterien oder Viren. Ein vom T-Zell-Rezeptor (TCR) unabhängiger Signalweg für die Bildung von IFN- $\gamma$  scheint über die Bindung des Interleukins IL-18 an  $T_H1$  aktiviert zu werden.<sup>(44)</sup>

### T-Helferzellen Typ 2 ( $T_H2$ )

$T_H2$ -Zellen haben eine Hauptrolle bei der Genese der Erkrankungen des atopischen Formenkreises. Die von  $T_H2$ -Zellen sezernierten und bestimmenden Interleukine sind IL-4, -5, -6, -10, -13 und -31. Diese werden daher Typ2-Zytokine genannt. Sie sind die entscheidenden Faktoren bei allergischen Reaktionen. So wurde z. B. gezeigt, dass bei Mäusen ohne  $T_H2$  keine allergischen Symptome trotz Stimulation mit hoch-allergenen Proteinen hervorgerufen wurden.<sup>(45)</sup>

### T-Helferzellen Typ 9 ( $T_H9$ )

$T_H9$ -Zellen werden durch die Sekretion von IL-9 definiert. IL-9 induziert das Mastzellwachstum, verhindert die Apoptose von *Innate lymphoid cells* (ILCs) und verstärkt den Klassenwechsel zur IgE-Produktion in B-Zellen. Insgesamt scheinen  $T_H9$  so eine wichtige Rolle in der Pathogenese der atopischen Erkrankungen zu spielen, insbesondere bei Asthma und AR,<sup>(46)</sup> was im Mausmodell mit Transfer von  $T_H9$  und anschließend erhöhter Produktion von Schleim und bronchialer Hyperreagibilität nach Stimulation mit Atemwegsallergenen gezeigt<sup>(47)</sup> und andersherum durch gedämpfte Effekte bei Neutralisation von IL-9 bestätigt wurde.

### T-Helferzellen Typ 17 (T<sub>H</sub>17)

Diese Subklasse produziert IL-17A als charakteristisches Zytokin.<sup>(44,48)</sup> Zusätzlich sind T<sub>H</sub>17-Zellen in der Lage weitere Zytokine zu bilden, die ihr Zytokinmuster komplettieren: IL-17F, IL-21, IL-22 und IL-10. Jedoch bilden nicht alle T<sub>H</sub>17 das gleiche Spektrum, sondern es scheint nach derzeitigem Stand noch zumindest zwei Unterklassen an T<sub>H</sub>17 mit unterschiedlichen Wirkungen auf das Immunsystem zu geben.<sup>(49,50)</sup>

### T-Helferzellen Typ 22 (T<sub>H</sub>22)

T<sub>H</sub>22-Zellen sind eine neuere (2009) und noch nicht endgültig erforschte Subklasse der T<sub>H</sub>-Zellen. Erschwerend für ihre Charakterisierung ist, dass ihr Hauptzytokin IL-22 auch von anderen Subklassen wie T<sub>H</sub>17 gebildet wird und ihre definierenden Transkriptionsfaktoren noch nicht eindeutig geklärt sind.<sup>(51)</sup> T<sub>H</sub>22 entwickeln sich in Abgrenzung zu T<sub>H</sub>17 in Abwesenheit von *Transforming growth factor β* (TGF-β) bei sonst ähnlichen Faktoren (IL-1β, IL-6, IL-23). IL-22 fördert die pathologische Verdickung der Epidermis (Akanthose) sowie die Produktion antimikrobieller Peptide und findet sich in deutlich vermehrten Mengen in der Haut von Patienten mit Psoriasis (Schuppenflechte) und AE.<sup>(52)</sup>

### T<sub>Reg</sub> (Regulatorische T-Zellen)

T<sub>Reg</sub> sind eine eigene Untergruppe der T-Lymphozyten, differenzieren sich allerdings wie T<sub>H</sub> auch aus T<sub>naiv</sub>. Die Funktion der T<sub>Reg</sub> ist die Begrenzung von Immunreaktionen, damit es nicht zu überschießenden Entzündungs- oder Autoimmunreaktionen kommt. T<sub>Reg</sub> bilden als prototypisches Zytokin IL-10, welches anti-inflammatorisch und immunsuppressiv wirkt. Es hemmt TNF-α, IFN-γ und IL-12, die im T<sub>H</sub>-1-Signalweg eine proinflammatorische Rolle spielen. Weiterhin hemmt es IL-1β und IL-6, die auch bei Entzündungsprozessen mitwirken.<sup>(53,54)</sup> Zudem haben T<sub>Reg</sub> herabregulierende Wirkungen auf Rezeptoren von Makrophagen und dendritischen Zellen sowie T-Zellen.<sup>(55)</sup> Veränderungen der Anzahl oder Funktion dieses Zelltyps haben Auswirkungen auf atopische Erkrankungen.<sup>(56)</sup>

### **Konzepte der T-Zell-Plastizität/Transdifferenzierung**

Nach Erkenntnissen der letzten Jahre scheinen T<sub>H</sub>22, wie auch T<sub>Reg</sub> und T<sub>H</sub>17, Eigenschaften zu besitzen, die eine Umwandlung dieser Zellen in andere T<sub>H</sub>-Subklassen ermöglichen (Transdifferenzierung) oder sie zumindest zur Imitation derer Zytokinmuster befähigt (Plastizität). Voraussetzung ist ein dominierendes Zytokinmilieu. Nach diesem Konzept führt z. B. eine IL-12/IFN-γ-Dominanz, wie bei einer Virusinfektion, zu einer Umwandlung von T<sub>H</sub>22 in IFN-γ-produzierende T<sub>H</sub>1, wohingegen eine IL-2/IL-4-Dominanz, wie bei einer Wurminfektion oder Allergie, zu einer verstärkten IL-13 Produktion führt, die sonst für T<sub>H</sub>2 charakteristisch ist.<sup>(51)</sup> T<sub>H</sub>17



hingegen scheinen sich unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  in T<sub>Reg</sub> transdifferenzieren zu können.<sup>(50)</sup> In diesem Sinne wären die genannten T<sub>H</sub> mit diesen Eigenschaften als eine Art „Joker“ des Immunsystems zu sehen, die die gerade notwendige Anpassung ermöglichen.

Tabelle 2. Übersicht von T-Zell-Subklassen

T-Subklasse	Differenzierung aus T <sub>naiv</sub> durch	Hauptzytokine
T <sub>H1</sub>	IL-12 (+ IFN- $\gamma$ )	IFN- $\gamma$ , IL-2
T <sub>H2</sub>	IL-4 + IL-2	IL-4, IL-5, IL-13
T <sub>H9</sub>	IL-4 + TGF- $\beta$	IL-9
T <sub>H17</sub>	(IL-6 + TGF- $\beta$ / IL-23 + IL1 $\beta$ )	IL-17A, (IL-17F)
T <sub>H22</sub>	(IL-6 + TNF- $\alpha$ , IL-21)	IL-22
T <sub>FH</sub>	IL-21 + IL-2?	IL-21, IL-4
T <sub>Reg</sub>	TGF- $\beta$ + IL-2	IL-10

## B-Lymphozyten

B-Lymphozyten (B-Zellen), sind aus dem Knochenmark stammende Leukozyten, die zusammen mit T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen das adaptive Immunsystem bilden. Die Hauptaufgabe der B-Zellen ist es Antikörper zu produzieren und sie sind der einzige Zelltyp, der dazu in der Lage ist. Die Differenzierung von naiven B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasma- oder Gedächtniszellen erfolgt nach Antigenkontakt und Stimulation über IL-4 und IL-21 durch bestimmte T-Helferzellen. B-Zellen sind generell in der Lage verschiedene Typen von Immunglobulinen zu produzieren. Immunglobulin E (IgE) ist das bei allergischen Reaktionen führende Immunglobulin. Naive B-Zellen werden zu IgE-produzierenden B-Zellen durch eine Aktivierung über IL-4 und gleichzeitigen Antigenkontakt. Das gebildete IgE wirkt anschließend als spezifischer Antikörper gegen dieses Antigen, bzw. Allergen, was z.B. Proteine von Würmern sein können, ebenso aber auch Proteine von Pollen, Nahrungsmitteln oder Hausstaubmilben. B-Zellen sind also direkt an der Ausprägung einer typischen allergischen Reaktion beteiligt. Allerdings wurde schon 1994 in einer Publikation im Nature gezeigt, dass auch in IgE-defizienten Mäusen eine anaphylaktische Antwort auf Allergenexposition hin auftrat.<sup>(57)</sup> Daher scheint es IgE- und somit B-Zell-unabhängige allergische Mechanismen zu geben. Dies ist neueren Erkenntnissen nach zu urteilen auch beim Menschen wahrscheinlich der Fall und auf IgG-vermittelte Signalwege, die Komplementkaskade und direkte Zellvermittlung über Makrophagen, Basophile und Neutrophile zurückzuführen.<sup>(58)</sup>

## Angeborene lymphoide Zellen (ILC)

Eine erst 2013 in einer Klassifikation zusammengefasste Gruppe von Zellen des Immunsystems, stellen die angeborenen lymphoiden Zellen dar (ILC). Sie gehören zum angeborenen Teil des

Immunsystems, da sie ein eigenes Rezeptorprofil exprimieren und werden als komplett eigene Gruppe von Immunzellen angesehen, unterteilt in drei Untergruppen.<sup>(59)</sup> Nur die Gruppe der ILC2 hat entscheidende Bedeutung für Erkrankungen des atopischen Formenkreises, da diese Zellen nahezu die gleichen Interleukine freisetzen wie  $T_H2$ .<sup>(60)</sup> Eine der Aufgaben der ILC2 im Immunsystem ist normalerweise z. B. die angeborene Abwehr von Wurm- und Viruserkrankungen.<sup>(61)</sup> Bei einigen Formen von atopischen Erkrankungen sind Anzahl und Funktionen der ILC2 jedoch fehlreguliert, sodass den ILC2 dort ein Anteil an der Asthma- und AE-Entwicklung zugesprochen wird.<sup>(60)</sup>

Es scheint eine hautspezifische Population der ILC2 zu geben, die sich in den Läsionen beim AE deutlich vermehrt zeigt und über *Thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) aktiviert wird.<sup>(62)</sup> Entsprechend sind auch erhöhte Mengen an TSLP in betroffener Haut beim AE nachweisbar, welches in erster Linie von Keratinozyten produziert wird.<sup>(63)</sup> Ein wichtiger Faktor für die Differenzierung von ILC2 aus Vorläuferzellen ist IL-33, welches über Bindung an den Rezeptor *Interleukin 1 receptor like 1* (IL1RL1) wirkt.<sup>(64)</sup>

## **2.5. Genetik des atopischen Ekzems**

Das AE ist eine sogenannte komplexe Erkrankung. Im Gegensatz zu einer Krankheit mit monogenem Vererbungsmodus ist die Ursache nicht ein bestimmtes Gen, sondern eine große Anzahl an Genen und Umwelteinflüssen sind an der Entstehung der Krankheit beteiligt.<sup>(65)</sup> An Hand von Zwillingsstudien wurde ersichtlich, dass die Genetik den größten Anteil an der Krankheitsursache hat. In einer niederländischen Zwillingsstudie wurden für das AE Konkordanzraten von ungefähr 84% bei monozygoten und ca. 30% bei dizygoten 5-jährigen Zwillingen einer Geburtskohorte mit Geburtsdaten zwischen 1986-1998 festgestellt.<sup>(66)</sup> In einer dänischen Zwillingsstudie zeigten sich vergleichbare Zahlen. Abschätzend wurde Genen ein Anteil von 82% der individuellen Suszeptibilität (Anfälligkeit) für das AE zugeschrieben und Umweltfaktoren ein Anteil von 18%.<sup>(67)</sup>

### **Genetische Assoziationsstudien / Genomweite Assoziationsstudien (GWAS)**

Genetische Assoziationsstudien stellen einen Zusammenhang zwischen einer genetischen Variante, z. B. einem SNP oder einer Mutation und einem Krankheitsphänotyp her. Ein SNP ist definiert als Veränderung einer einzelnen Nukleinbase an einer bestimmten Stelle im Genom. Schätzungen zu Folge tritt ein SNP alle 1000 Basenpaare im Genom auf.<sup>(68)</sup> Es gibt drei Arten von SNPs: 1) funktionelle SNPs, die durch Basenaustausch die Proteinsequenz eines Gens verändern, 2) regulatorische SNPs, die die Genexpression beeinflussen und 3) „stumme“ SNPs, die keinen

Effekt haben. Wenn ein SNP in einer kodierenden Sequenz für eine Aminosäure liegt, kann er eine funktionelle Veränderung bewirken indem die veränderte Base zu einem Austausch der Aminosäure führt. Je nach ausgetauschter Aminosäure, ergeben sich variable Auswirkungen. Andererseits kann ein SNP in einer nicht-kodierenden Sequenz des Genoms liegen, z. B. im Intron, der Promoter-Region, der 3'UTR (*Three prime untranslated region*) oder zwischen zwei Genen (intergenisch). An diesen Positionen können SNPs eine regulatorische Wirkung auf die Genexpression haben, z.B. über veränderte Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren mit Auswirkung auf das Zielprotein.

In genetischen Assoziationsstudien werden meist Fall-Kontroll-Studien von genotypisierten Kohorten untersucht. Man vergleicht das Auftreten der zu untersuchenden SNPs in der Fallgruppe (z. B. Phänotyp AE) mit dem Auftreten in der Kontrollgruppe. Kommt ein SNP signifikant häufiger in einer der Gruppen vor, spricht man von einer genetischen Assoziation. Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen ist es notwendig sie in anderen Kohorten zu replizieren.

Als genomweite Assoziationsstudie (GWAS) bezeichnet man Analysen, die genomweit verteilte SNPs auf eine Assoziation mit bestimmten Phänotypen (z. B. AE) untersuchen. Durch die Nutzung von DNA-Microarrays ist es möglich geworden eine enorme Menge an SNPs (je nach Hersteller, über 1 Mio. SNPs)<sup>(69)</sup> gleichzeitig zu analysieren. Dies stellte einen großen Fortschritt dar, da es seitdem kosteneffizient möglich ist, alle häufigen genetische Variationen unabhängig von ihrer Funktion zu untersuchen. Insbesondere, da nur ca. 12% der mit Erkrankungen assoziierten SNPs funktionelle SNPs darstellen, für die große Mehrheit der SNPs also aktuell keine funktionelle Auswirkung bekannt ist.<sup>(70)</sup> Für GWAS ist eine strikte Signifikanzgrenze mit einem p-Wert von  $5 \times 10^{-8}$  etabliert<sup>(71)</sup>, da Ergebnisse für multiple Testung korrigiert werden müssen. Dies führt dazu, dass für SNP x SNP Interaktionseffekte, bei denen eine noch höhere Korrektur notwendig ist, mittels GWAS bisher nur begrenzte Erfolge verzeichnet wurden.<sup>(72)</sup> Die erste GWAS für das AE wurde im Jahr 2009 durchgeführt und entdeckte einen signifikant assoziierten SNP auf Chromosom 11.<sup>(4)</sup> In den nächsten Jahren folgten weltweit weitere GWAS.

### **Bisher bekannte Genorte mit Assoziation zum AE**

Nach aktuellem Forschungsstand sticht das *FLG* aus allen inzwischen bekannten Risikogenen für das AE heraus, denn es stellt bis dato das Gen mit dem höchsten assoziierten Risiko für das AE dar.<sup>(73)</sup> *FLG*-Nullmutationen führen zu einem kompletten Expressionsverlust des Filaggrin-Proteins.<sup>(3)</sup> Die zwei in Europa häufigsten *FLG*-Nullmutationen, R501X und 2282del4, wurden in dieser Arbeit untersucht. Laut zweier Metaanalysen besitzen sie eine kombinierte AF von ca. 4 – 6%<sup>(73,74)</sup> in europäischen Populationen. Unter zusätzlicher Einbeziehung seltener *FLG*-Mutationen

kommt man auf eine AF von ca. 10%.<sup>(75)</sup> Das sogenannte *Odds ratio* (OR), welches als Maß für die Effektstärke einer Assoziation verwendet wird, beträgt für die bekannten *FLG*-Nullmutationen OR = 3,1 nach einer großen Metaanalyse.<sup>(73)</sup> Die OR aller anderen bisher entdeckten Assoziationen sind von deutlich geringerer Stärke und bewegen sich zwischen OR = 1,1 bis 1,4.<sup>(9,6)</sup> Bisher gefundene Assoziationen betreffen im Allgemeinen einerseits Gene, die die Struktur der Hautbarriere beeinflussen und andererseits Gene, die für das Immunsystem eine Rolle spielen. Bezüglich der Hautbarriere wurden z. B. Varianten in den Genen *Small proline rich protein 3*-Gen (*SPRR3*)<sup>(76)</sup>, *Collagen type VI alpha 5 chain*-Gen (*COL6A5*)<sup>(77)</sup> und *OVOLI*<sup>(10)</sup> beschrieben. Mit dem Immunsystem wurden z. B. Varianten assoziiert, die die Interleukine IL-4, IL-13<sup>(78)</sup> und das Gen *KIF3A*<sup>(10,79)</sup> betreffen, welche alle für eine T<sub>H</sub>-2-Immunreaktion bedeutsam sind. Jene Gene befinden sich in räumlicher Nähe auf dem q-Arm des Chromosoms 5. Allerdings wurden bisher nur etwas mehr als 20% des der Genetik zugeschriebenen Erkrankungsrisikos auf die zurzeit bekannten SNPs zurückgeführt.<sup>(80)</sup> Die fehlende Lücke der Heritabilität (Vererbbarkeit) aufzuklären, ist Teil aktueller genetischer Forschung und könnte auf noch nicht entdeckten Interaktionen, seltenen oder strukturellen Varianten beruhen.<sup>(72)</sup> Die wenigen, bisher bekannten Interaktionen aus GWAS mit signifikanten Effekten für das AE wurden zwischen SNPs des IgE-Rezeptors<sup>(81)</sup> sowie zwischen einem SNP des *Interleukin 4*-Gens (*IL4*) mit einem SNP des *Interleukin 4 receptor*-Gens (*IL4R*) festgestellt.<sup>(82)</sup> Bei beiden Interaktionen sind also Gene involviert, die im Immunsystem angesiedelt sind und dort sogar innerhalb einer Signalkaskade, denn IL-4 ist bekanntermaßen bedeutend an der Regulation der IgE-Produktion beteiligt.<sup>(83)</sup> Alle bis zum Jahr 2013 mit dem AE assoziierten SNPs und *FLG*-Nullmutationen wurden in dieser Arbeit verwendet und auf die genannten Fragestellungen hin untersucht:

Tabelle 3. Übersicht der untersuchten SNPs

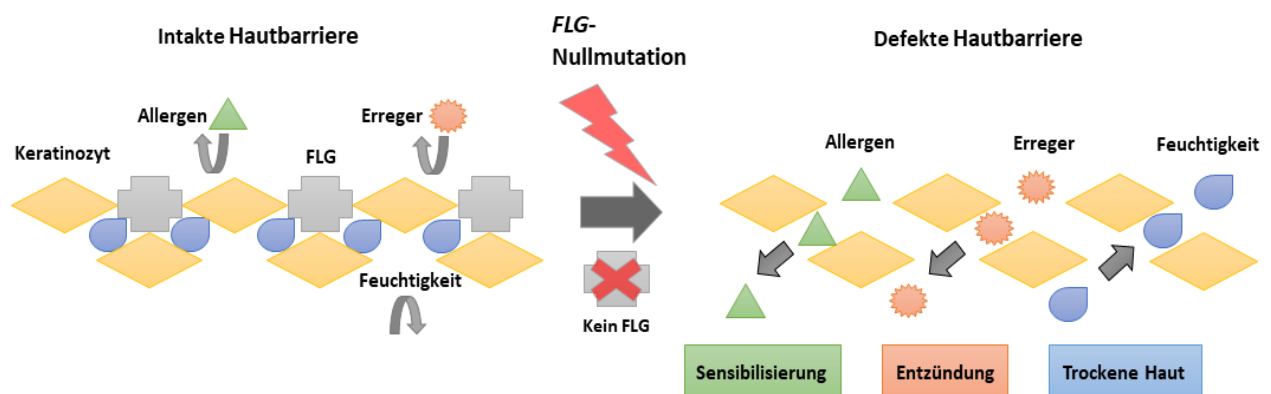
SNP/ Genort	Genort	Chromosom (p- / q-Arm)	Lage: Basentausch	Referenz (Population)	Genfunktion in RefSeq (Eintragsdatum)
rs10903122	<i>RUNX3</i>	1 p36.11	Intergenisch A → G	Esparza-Gordillo et al. 2013 (Europa) <sup>(5)</sup>	Transkriptionsfaktor, Tumorsuppressor (03/16)
R501X 2282del4	<i>FLG</i>	1 q21.3	kodierend:nonsense C → T Stop C → G Stop	Palmer et al. 2006 (Europa) <sup>(3)</sup>	Filamentprotein der Epidermis (12/09)
rs2228145	<i>IL6R</i>	1 q21.3	kodierend: missense A[Asp]→C[Ala]	Esparza-Gordillo et al. 2013 (Europa) <sup>(5)</sup>	Einfluss auf löslichen IL-6 Rezeptor (05/11)
rs3771180	<i>IL1RL1</i>	2 q12.1	Intron A→C	Ellinghaus et al. 2013 (Europa) <sup>(6)</sup>	<i>IL1RL1</i> : IL-1 Rezeptor 1, T-Zell- Immunreaktion. (07/08) <i>IL18RI</i> : IL18-Rezeptor 1(09/13)
rs13015714	<i>IL1RL1- IL18RI</i>	2 q12.1	Intergenisch G→T	Hirota et al. 2012 (Japan) <sup>(9)</sup>	
rs759382	<i>SLC9A4</i>	2 q12.1	Intron A→C	Ellinghaus et al. 2013 (Europa) <sup>(6)</sup>	<i>solute carrier family 9 member A4</i> . Keine Fkt. notiert (02/19).
rs6780220	<i>GLBI</i>	3 p22.3	Intron A→C	Hirota et al. 2012 (Japan) <sup>(9)</sup>	Kodiert β-Galactosidase (11/15)
rs12634229	<i>CCDC80</i>	3 q13.2	Intergenisch C→T	Hirota et al. 2012 (Japan) <sup>(9)</sup>	<i>coiled-coil domain containing 80</i> Keine Fkt. notiert (02/19).
rs17389644	<i>IL2-IL21</i>	4 q27	Intergenisch A→G	Ellinghaus et al. 2013 (Europa) <sup>(6)</sup>	<i>IL21</i> : Immunregulatorisch (12/11)
rs7701890	<i>TMEM232</i>	5 q22	Intron A→G	Sun et al. 2011 (China) <sup>(8)</sup>	Transmembrane protein 232 Keine Fkt. notiert (02/19)
rs2040704	<i>RAD50</i>	5 q31.1	Intron A→G	Esparza-Gordillo et al. 2013 (Europa) <sup>(5)</sup>	DNA-Doppelstrang-Reparatur (04/10)
rs848	<i>IL13</i>	5 q31.1	3'UTR A→C	Ellinghaus et al. 2013 (Europa) <sup>(6)</sup>	<i>IL13</i> : T <sub>H</sub> 2-Zytokin, B-Zell- Differenzierung (07/08)
rs2897442	<i>KIF3A</i>	5 q31.1	Intron C→T	Paternoster et al. 2012 (Meta) <sup>(10)</sup>	<i>kinesin family member 3A</i> Keine Fkt. beschrieben (02/19)
rs176095	<i>GPSM3</i>	6 p21.32	Intron A→G	Hirota et al. 2012 (Japan) <sup>(9)</sup>	<i>G protein signaling modulator3</i> Keine Fkt. notiert (02/19)
rs4722404	<i>CARD11</i>	7 p22.2	Intergenisch T→C	Hirota et al. 2012 (Japan) <sup>(9)</sup>	Interaktion mit Apoptose und NFκB-Signalweg (07/08)
rs10995251	<i>ZNF365</i>	10 q21.2	Intron C→T	Hirota et al. 2012 (Japan) <sup>(9)</sup>	Zink Finger-Protein 365. Variable Funktionen. (05/10)
rs878860	<i>OR10A3- NLRP10</i>	11 p15.4	Intergenisch C→T	Hirota et al. 2012 (Japan) <sup>(9)</sup>	<i>OR10A3</i> : Olfaktor. Rezeptorprot. <i>NLRP10</i> : Immunregulat. (07/08)
rs12295535	<i>PRR5L</i>	11 p13-p12	Intron C→T	Ellinghaus et al. 2013 (Europa) <sup>(6)</sup>	<i>proline rich 5 like-ptotein</i> Keine Fkt. notiert (02/19)
rs479844	<i>OVOL1</i>	11 q13.1	Intergenisch A→G	Paternoster et al. 2012 (Meta) <sup>(10)</sup>	Transkriptionsfaktor: Zellproliferation (08/11)
rs2155219	<i>EMSY- LRRC32</i>	11 q13.5	Intergenisch G→T	Weidinger et al. 2013 (Europa) <sup>(7)</sup>	<i>EMSY</i> : Transkriptionsfaktor, BRCA2-Interaktion. <i>LRRC32</i> : Membranprotein (07/08)
rs7927894		11 q13.5	Intergenisch C→T	Esparza-Gordillo et al. 2009 (Europa) <sup>(4)</sup>	
rs2292239	<i>ERBB3</i>	12 q13.2	Intron T→G	Esparza-Gordillo et al. 2013 (Europa) <sup>(5)</sup>	Wachstumsfaktor-Rezeptorprotein der Haut (07/08)
rs2041733	<i>CLEC16A</i>	16 p13.13	Intron T→C	Ellinghaus et al. 2013 (Europa) <sup>(6)</sup>	Assoziiert mit Diabetes, Rheuma (08/11)
rs16948048	<i>ZNF652</i>	17 q21.32	Intergenisch A→G	Ellinghaus et al. 2013 (Europa) <sup>(6)</sup>	Zink-Finger-Protein 652. Keine Fkt. notiert (02/19)
rs2164983	<i>ACTL9</i>	19: p13.2	Intergenisch C→A	Paternoster et al. 2012 (Meta) <sup>(10)</sup>	<i>actin like 9-Protein</i> . Keine Fkt. notiert (02/19)
rs16999165	<i>CYP24A1- PFDN4</i>	20 q13.2	Intergenisch A→G	Hirota et al. 2012 (Japan) <sup>(9)</sup>	<i>CYP24A1</i> : Vit.D-Regulation <i>PFDN4</i> : Chaperon (07/08)
rs6010620	<i>RTEL1- TNFRSF6B</i>	20 q13.33	Intron A→G	Sun et al. 2011 (China) <sup>(8)</sup>	<i>RTEL1</i> : regulator telomere elongation 1 <i>TNFRSF6B</i> : TNF-Rezeptorfamilie

Zusammengenommen kristallisieren sich mit der Hautbarriere und dem Immunsystem zwei einander bedingende Bereiche heraus, die unter anderem durch Genvarianten fehlreguliert werden können und so zur Genese des AE beitragen. Dies möchte ich im folgenden Abschnitt präzisieren.

## 2.6. Pathomechanismen des atopischen Ekzems

### Defekte Hautbarriere

Eine beeinträchtigte Funktion der Hautbarriere legt bei vielen Betroffenen den Grundstein für die Ausprägung des AE. Diese Barrierestörung ist bei vielen Patienten genetisch bedingt. Dazu tragen zu einem Hauptteil *FLG*-Nullmutationen bei, die zu einem Verlust der Stützfilamente der Keratinschicht führen. Filaggrinmonomere werden durch Spaltung des Vorläufers Profilaggrin generiert und sind essenzieller Bestandteil des Stratum corneum (Hornschicht). Diese vernetzte Schicht, fungiert als Hautbarriere des Körpers. Bei Verlust von *FLG* wird die Hautbarriere, unter anderem durch mangelnde Aggregation der Keratinstützmatrix, massiv gestört.<sup>(3)</sup> Dadurch ist der epidermale Wasserverlust der Haut erhöht und diese so äußerst trocken, rissig und verletzungsanfälliger, sodass Allergene, Erreger und andere Schadstoffe leichter durch die defekte Hautbarriere gelangen. Dies bietet die Grundlage für das bei dem AE bekanntermaßen erhöhte Risiko an Entzündungen und Superinfektionen der Haut und eine erhöhte Sensibilisierungsrate. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass der Ausgangspunkt des AE ein primärer Hautdefekt ist, wodurch Allergene eindringen können, die das Immunsystem frühzeitig beeinflussen und die Entstehung einer allergischen Erkrankung begünstigen oder sogar bedingen können.<sup>(84)</sup> Die daraus resultierenden Reaktionen können überschießen und in einen *circulus vitiosus* (Teufelskreis) der allergischen Reaktion bzw. akuten oder chronischen Hautreaktion übergehen, in Form des AE.



**Abbildung 2. *FLG*-Nullmutationen und ihr Einfluss auf die Hautbarriere**

Bei Trägern von *FLG*-Nullmutationen fehlt das für die Struktur der Epidermis maßgebliche Filaggrin, das in der obersten Schicht der Epidermis exprimiert wird. Erreger und Allergene gelangen leichter durch die defekte Hautbarriere mit der Folge von vermehrter Entzündung und Sensibilisierung. Feuchtigkeit wiederum kann schlechter in der Haut gespeichert werden mit der Folge von trockener Haut. (Abbildung schematisch im Wesentlichen nach Palmer et al. (2006).)

Auch andere SNPs und Mutationen, die einen Genkomplex zur Verhornung der Epidermis betreffen, der neben dem *FLG* noch andere Gene wie *Loricrin*, *Involucrin* und weitere beinhaltet, stehen im Verdacht zu einer defekten Hautbarriere und damit zu einer Prädisposition für das AE zu führen.<sup>(85)</sup>

### **Fehlregulation des Immunsystems**

Neben der gestörten Hautbarriere haben auch immunologische Veränderungen, die Auswirkungen auf die Reaktion des Körpers bei Eindringen von Allergenen haben, eine ursächliche Rolle bei atopischen Erkrankungen. Diese können z. B. durch Varianten in Genen, die für das Erkennen und die Reaktion auf eindringende Allergene zuständig sind, auftreten. Seit den 90er Jahren ist bekannt, dass bei dem AE ein Ungleichgewicht des Immunsystems zugunsten von T<sub>H</sub>2-Zellen und deren Zytokinen herrscht. In Bezug auf den Krankheitsverlauf wurde Mitte der 90er Jahre postuliert, dass dieses Ungleichgewicht bei der Chronifizierung des AE zu einer T<sub>H</sub>1-Aktivierung wechselt.<sup>(86)</sup> Mit der Entdeckung von T<sub>H</sub>9, T<sub>H</sub>17, T<sub>H</sub>22 sowie ILC wurden die Pathomechanismen konkretisiert und in Teilen sogar korrigiert, da es sich um viel komplexeres Zusammenspiel handelt, als damals angenommen. Weiterhin Konsens ist geblieben, dass die T<sub>H</sub>2-Aktivierung mit den zugehörigen Interleukinen den Hauptanteil an dem AE hat.<sup>(87)</sup> Dies zeigt sich deutlich durch die inzwischen sehr erfolgreichen Therapieergebnisse der 2017 im *Lancet* publizierten Phase III Studie des Medikaments Dupilumab, welches als Antikörper gegen eine Untereinheit des Rezeptors von IL4 wirkt und damit die Wirkungsvermittlung von IL-4 und IL-13 blockiert.<sup>(88)</sup> Zusätzlich spielen die erst 2009 entdeckten T<sub>H</sub>22-Zellen mit Ihrem definierenden IL-22 und proinflammatorischen Proteinen (S100A7, -8, -9) eine wichtige Rolle, was in Studien mit Biopsien der Haut von AE-Läsionen, verglichen mit nicht-entzündeter Haut von AE-Erkrankten und Kontrollpersonen gezeigt wurde.<sup>(89)</sup> Auch T<sub>H</sub>17-Zellen wird ein Einfluss auf das AE zugeschrieben, allerdings herrscht noch Unklarheit darüber in welchem Maße. Anscheinend zeigt sich vor allem in speziellen Patientengruppen des AE-Betroffenen eine erhöhte Aktivität an T<sub>H</sub>17-Zellen. Bei Kindern wurden im Vergleich zu Erwachsenen deutlich erhöhte Werte von T<sub>H</sub>17-Zytokinen in der akuten AE-Phase festgestellt, sogar auch in nicht betroffener Haut.<sup>(90)</sup> Bezüglich der immunologischen Vorgänge in der chronischen Phase des AE hat sich das vormals postulierte Bild durch die neu entdeckten Zelltypen ebenfalls deutlich gewandelt. Inzwischen geht man nicht mehr von einem Wechsel zu einer T<sub>H</sub>1-gesteuerten Entzündung aus, sondern einer progressiven Intensivierung der T<sub>H</sub>22- und T<sub>H</sub>2-Aktivierung, mit einem lediglich zusätzlichen T<sub>H</sub>1-Anteil und ebenfalls erhöhten T<sub>Reg</sub> bei eher mäßig veränderten T<sub>H</sub>17-Zytokinen.<sup>(89)</sup> Über T<sub>H</sub>2-Zellen werden auch Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert: Eosinophile (über IL-5), Mastzellen sowie

Basophile (über IL-3/-5). Sie tragen durch die Ausschüttung ihrer direkt oder indirekt entzündungsfördernder Zytokine und Chemokine wie Histamin, Peroxidasen, Proteasen und Prostaglandinen zur allergischen Reaktion bzw. zu Entzündungsprozessen von atopischen Erkrankungen bei.

Ein treibendes Element des AE ist der charakteristische Juckreiz. Dieser verstärkt durch das resultierende Kratzen den Hautbarrieredefekt und trägt durch Gewebsverletzungen zur Aktivierung des Immunsystems bei. Anders als bei z.B. AR ist für den Juckreiz des AE das zur T<sub>H</sub>2-Reaktion zugehörige IL-31 ein entscheidender Faktor.<sup>(91)</sup> Das Aufkratzen der Haut führt zur Freisetzung von IL-33 durch Epithelzellen. Dies ist ohne Prozessierung direkt aktiv und wird daher als eine Art „Alarmsignal“ des Körpers für Gewebsschädigungen vermutet.<sup>(92)</sup> Es bindet z. B. an ILC2 und führt zur zusätzlichen Freisetzung von T<sub>H</sub>2-Zytokinen in Haut und Atemwegen bei Atopie mit lokaler Entzündungsreaktion.<sup>(93)</sup>



### 3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, alle bis zum Jahr 2013 durch GWAS mit dem AE assoziierten Risiko-Genorte in der ALSPAC-Kohorte zu untersuchen. Ausgewertet und verwendet wurden GWAS mit Studienpopulationen aus mehreren europäischen Ländern, Japan und China.<sup>(9,6,10,4,5,8)</sup>

Die Signifikanzgrenze der GWAS ( $p = 4 \times 10^{-8}$ ) erreichten 27 Genorte in der Literatur. Im Zuge der Qualitätskontrolle wurde bei mehreren SNPs des gleichen Risiko-Genorts, die ein hohes LD zeigten, nur der in ALSPAC am stärksten mit dem AE assoziierte SNP selektiert.

Alle in ALSPAC signifikant mit dem AE assoziierten Genorte wurden anschließend mithilfe von Subphänotypen des AE weiter untersucht. Dadurch sollen Auswirkungen auf den Verlauf des AE oder auf das gleichzeitige Vorkommen mehrerer atopischen Erkrankungen als Hinweis für den atopischen Marsch festgestellt werden. Zuletzt wurde untersucht, ob Interaktionen zwischen SNPs einen signifikanten Einfluss auf die Assoziation mit dem AE haben.

Folgende Hypothesen werden für die untersuchten Risiko-Genorte aufgestellt:

1. Es zeigen sich signifikante Assoziationen mit einem persistenten Phänotyp des AE.
2. Es zeigen sich signifikante Assoziationen mit dem atopischen Marsch.
3. Es liegen signifikante SNP x SNP-Interaktionen vor, die das Risiko für das AE mehr als additiv steigern.

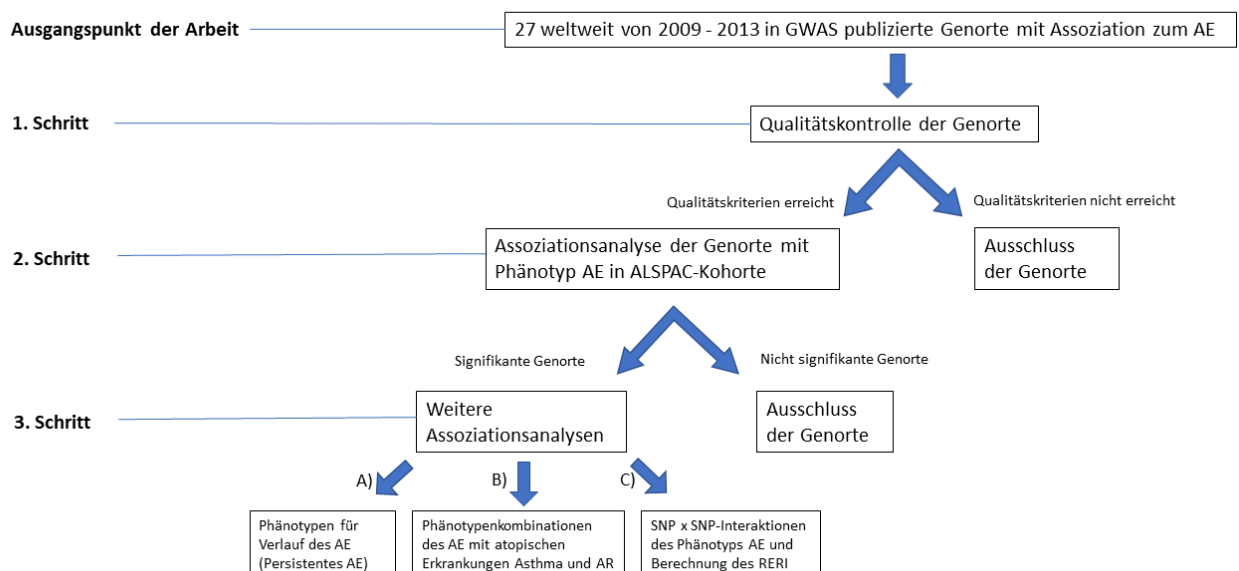


Abbildung 3 Studienaufbau dieser Arbeit

## 4. Methoden

### 4.1. Studienpopulation: ALSPAC

Die ALSPAC ist eine im Längsschnitt angelegte Geburtskohortenstudie. Insgesamt nahmen 14.541 schwangere Frauen aus Avon/Bristol in England teil. Von den 14.062 geborenen Kindern lebten nach einem Jahr noch 13.988. In der Studie wurden ab Geburt der Kinder detaillierte anamnestiche Daten der Kinder erhoben, inklusive der Zeit im Mutterleib. Alle teilnehmenden Kinder der Studie wurden zwischen dem 01.04.1991 und dem 31.12.1992 geboren.<sup>(11)</sup>

Die umfassenden anamnestiche Daten wurden mittels standardisierter Fragebogen, anhand vorhandener medizinischer Aufzeichnungen und durch körperliche Untersuchungen von Ärzten gewonnen. Alle Kinder wurden ab dem Alter von sieben Jahren regelmäßig zu Klinikbesuchen eingeladen. Für die Genetik wurde DNS aus den Blutproben der teilnehmenden Kinder bei mütterlichem Einverständnis isoliert. Insgesamt waren genetische Daten von ca. 85% der teilnehmenden Kinder verfügbar.<sup>(94)</sup>

Die ethische Zustimmung wurde vom ALSPAC *Law and Ethics committee* eingeholt. Alle teilnehmenden Eltern erklärten sich schriftlich mit der Teilnahme einverstanden.<sup>(11)</sup>

Tabelle 4. Untersuchte Studienpopulation

Name der Studienpopulation	ALSPAC
Herkunft	Großbritannien
Studientyp	Längsschnittstudie Geburtskohorte
Zeitraum der Geburt	04/1991 – 12/1992
Letzter verwendeter Befragungszeitpunkt	166 Monate = 13,8 Jahre
Gesamtzahl an Studienteilnehmern	13988
% männlich	52
Genotyp-Daten	7876
% männlich	51

### 4.2. Auswahl der genetischen Varianten

#### Auswahl der SNPs

Ausgewählt wurden alle SNPs, die in GWAS bis Juli 2013 eine Assoziation genomweiter Signifikanz mit dem AE erreicht hatten und deren genetische Daten verfügbar waren. Darunter waren sieben SNPs aus einer europäischen Studie, die den *ImmunoChip* benutzte<sup>(6)</sup>, acht SNPs einer japanischen GWAS<sup>(9)</sup>, drei SNPs aus einer GWAS-Metaanalyse<sup>(10)</sup>, vier SNPs aus einer

weiteren GWAS-Metaanalyse<sup>(5)</sup>, drei SNPs aus einer chinesischen GWAS<sup>(8)</sup> und ein SNP aus einer weiteren europäischen GWAS<sup>(95)</sup> (siehe Tabelle 3). Zur Verfügung gestellt wurden die Daten von ALSPAC. Alle mit den Daten von ALSPAC durchgeführten Berechnungen wurden im Jahr 2013 abgeschlossen.

### **Imputation**

Imputation ist eine Methode, mit der anhand genotypisierter SNPs die Genotypen dazwischenliegender, nicht genotypisierter SNPs, geschätzt werden. Durch die Genomsequenzierung wurden innerhalb verschiedener Populationen charakteristische Chromosomenabschnitte mit einer spezifischen Abfolge benachbarter SNPs, sogenannte Haplotypen, entdeckt, die normalerweise in unveränderter Weise weitervererbt werden. Diese Haplotypen wurden in großen Projekten, wie z.B. dem *HapMap*- oder *1000 Genomes Project*, beschrieben und zugänglich gemacht.<sup>(96)</sup> Die Genotypisierung in der ALSPAC-Kohorte wurde mit der Genotypisierungsplattform *Illumina HumanHap550 quad genome-wide SNP array* von der Firma *23 and Me* durchgeführt in Kooperation mit dem *Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK* und der *Laboratory Corporation of America, Burlington, NC, USA*.<sup>(97)</sup>

26 der 27 in dieser Arbeit verwendeten SNPs wurden imputiert, mit einer Konfidenz von mind. 92%, unter Verwendung von *MACH (Markov Chain Haplotyping software) 1.0.16*. Als Referenzset galten CEPH Individuen der Phase 2 des *HapMap*-Projekts (release 22).<sup>(97)</sup> Alle imputierten SNPs erreichten eine Imputationsqualität von mind. 92% und hatten eine *Minor allele frequency (MAF)* von >2%.

### **Kodierung eines kombinierten Genotyps aus *FLG*-Nullmutationen**

Die beiden häufigsten *FLG*-Nullmutationen, *FLG-R501X* und *FLG-del2284*, wurden in der ALSPAC-Kohorte genotypisiert. Da für beide Mutationen ein Funktionsverlust nachgewiesen worden war, wurden sie zu einem *FLG*-Nullallel zusammengefasst.

## **4.3. Qualitätskontrolle der SNPs**

Für die Qualitätskontrolle der SNPs wurden verschiedene Einschlusskriterien für die zu untersuchenden SNPs festgelegt und für jeden SNP überprüft.

### **Hardy-Weinberg-Gleichgewicht / Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE)**

Das HWE ist ein Modell zur Berechnung der Allelfrequenzen in einer idealen Population. Annahmen sind: Abwesenheit von Migration, keine Mutationen, eine große Population, keine natürliche Selektion und zufällige Paarung. Auch in den meisten, nicht idealen Populationen kann

man von einer Verteilung nahe dem HWE ausgehen. Daher ist eine Testung der untersuchten SNPs bezüglich des HWE sinnvoll, um Genotypisierungsfehler oder nicht repräsentative Stichproben auffindig zu machen.

Als Qualitätskriterium der SNPs wurde in dieser Arbeit das HWE berechnet, um SNPs auszuschließen, die mit ihrem Verteilungsmuster der Allelfrequenzen stark von den zu erwartenden Häufigkeiten abweichen. Die Formel für das HWE eines SNPs mit den Allelen A und a lautet:

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

(p = Häufigkeit des Allels A, q = Häufigkeit des Allels a,  $p^2$  = Häufigkeit der AA Homozygoten,  $q^2$  = Häufigkeit der aa Homozygoten, 2pq = Heterozygotenhäufigkeit)

Die Berechnung des HWE in dieser Arbeit erfolgte mittels der Funktion „-hardy“ von *PLINK*:

Es wurde ein p-Wert  $< 10^{-4}$  als Ausschlussgrenze in der Gesamtpopulation der Kohorte gewählt.

### **Linkage disequilibrium (LD)**

Das *Linkage disequilibrium* (LD) beschreibt eine nicht-zufällige Assoziation von Allelen an unterschiedlichen Genorten.<sup>(98)</sup> Nahe zusammen liegende SNPs werden in der Regel zusammen vererbt, wenn sie auf dem gleichen Haplotypblock liegen. Diese SNPs befinden sich dann in hohem LD, weil die betroffenen Allele der untersuchten SNPs eben nicht zufällig gemeinsam vererbt werden. Daraus kann sich eine sehr ähnliche Assoziation der untersuchten SNPs bezüglich einer bestimmten Erkrankung in einer getesteten Population ergeben. Je weiter zwei SNPs im Genom auseinander liegen, desto geringer ist durchschnittlich das LD der SNPs. Ursächlich ist, dass bei größerer Entfernung der SNPs die Wahrscheinlichkeit der Rekombination des betroffenen Chromosomenabschnitts bei der Vererbung steigt.<sup>(96)</sup> In einer genetischen Assoziationsstudie wie in dieser Arbeit berechnet man das LD der untersuchten SNPs, um die SNPs auszuschließen, die keinen zusätzlichen Informationsgehalt bringen. Konkret bedeutet dies, dass zwei SNPs in komplettem LD immer zusammen vererbt werden und daher bezüglich ihres Informationsgehalts austauschbar sind. In einem solchen Fall bezieht man in weitere Analysen nur den SNP mit der stärksten Assoziation mit dem untersuchten Phänotyp ein. Das LD zwischen zwei SNPs kann mithilfe der Allelhäufigkeit des Allels A des einen SNPs ( $p_A$ ), der Allelhäufigkeit des Allels B des anderen SNPs ( $p_B$ ), und der Häufigkeit des AB Haplotyps ( $p_{AB}$ ) als LD Koeffizient ( $D_{AB}$ ) berechnet werden:  $D_{AB} = p_{AB} - p_A p_B$

Wenn  $D = 0$  bedeutet dies, es besteht kein LD zwischen den SNPs. Sie werden also statistisch unabhängig voneinander vererbt. Bei  $D > 0$  werden die Haplotypen häufiger gemeinsam vererbt als bei zufälliger Anordnung statistisch erwartet. D ist allerdings ein relativer Koeffizient, dessen maximaler Wert von den jeweils untersuchten Allelfrequenzen abhängt. Besser und vergleichbarer

ist  $D'$ , welches das Ausmaß von LD relativ zu dem Spektrum, der durch die Allelfrequenzen möglichen D-Werte, zwischen 0 und 1 anzeigt. Das heißt, bei einem  $D' = 1$  wird einer der untersuchten Haplotypen immer gemeinsam mit einem anderen vererbt, es besteht also ein komplettes LD zwischen ihnen. Allerdings ist  $D'$  beim Vergleich von seltenen Allelfrequenzen nicht aussagekräftig, dafür wird zusätzlich der Korrelationskoeffizient  $r^2$  bestimmt, der einen Wert zwischen 0 und 1 annehmen kann, wobei 0 kein LD, also unabhängige Vererbung der SNPs und der Wert 1 ein komplettes LD anzeigt und dabei die Allelfrequenzen der untersuchten SNPs einbezieht.  $r^2$  kann also auch dann nahezu den Wert 1 erreichen, wenn eines der untersuchten Allele in geringer Frequenz auftritt, was bei  $D'$  nicht der Fall ist. Die Formel für  $r^2$  lautet:

$$r^2 = \frac{D^2}{p_A(1-p_A)p_B(1-p_B)}$$

Der Korrelationskoeffizient  $r^2$  wurde in dieser Arbeit neben  $D'$  bei allen SNP-Paaren berechnet, die auf einem Chromosom liegen. Ein  $r^2$  mit Tendenz zu 1 bedeutet, dass die beiden SNPs sich in LD befinden und austauschbar in ihrem Informationsgehalt sind. In diesem Fall wurde in dieser Assoziationsstudie der SNP mit kleinerem p-Wert ausgewählt und der andere SNP aussortiert. Für die paarweisen LD-Berechnungen wurde die Funktion -LD der Software *PLINK* verwendet.

### Einschlusskriterien der SNPs

Alle imputierten SNPs erreichten die vorgegebene Konfidenz der Imputation  $\geq 92\%$ . Weiterhin wurden nur SNPs mit einer AF von mind. 2% eingeschlossen, was bei allen 27 SNPs gegeben war. Alle SNPs lagen im erwarteten Bereich des HWE ( $p > 10^{-4}$ ). Allerdings zeigten sich zwei SNPs in paarweisen LD-Berechnungen in hohem LD mit einem anderen SNP und wurden somit von weiteren Assoziationsberechnungen ausgeschlossen (siehe Tabelle 5). Die diesbezüglichen Berechnungen werden im Ergebnisteil gezeigt (siehe Tabelle 8).

Tabelle 5. Charakterisierung untersuchter SNPs und Einschlusskriterien

<b>Genotypisierungsplattform</b>	<i>illumina HumanHap550 quad genome-wide SNP</i>
Gesamtzahl an SNPs	27
Zahl imputierter SNPs	26
Zahl genotypisierter SNPs	1 ( <i>FLG</i> )
<b>Einschlusskriterium</b>	<b>Wert (Anzahl ausgeschlossener SNPs)</b>
Konfidenz der Imputation	> 92% (0)
Allelfrequenz	> 2% (0)
<i>Hardy-Weinberg-Equilibrium</i>	$p > 10^{-4}$ (0)
<i>Linkage Disequilibrium</i>	$r^2 < 0.50$ (2)

## 4.4. Definition der Phänotypen

### Phänotyp: AE

Der Phänotyp des AE wurde in der ALSPAC-Kohorte anhand folgender zwei Fragen definiert (zur Veranschaulichung der Phänotypen anhand eines Zeitstrahls, siehe Abbildung 4):

1. „*Has the patient had a rash in the joints and creases of his body (e.g. behind the knees, under the arms)?* (Hatte der Patient einen Ausschlag in den Gelenken oder Hautfurchen seines Körpers?). Dies war die charakterisierende Frage für die ersten sieben Befragungszeitpunkte im Alter von 0 – 81 Monaten.
2. “*Did your child have eczema in the last 12 months?*” (Hatte ihr Kind ein atopisches Ekzem in den letzten 12 Monaten?). Diese Frage folgte für die nächsten fünf Befragungszeitpunkte im Alter von 81 – 166 Monaten.

Um die Kriterien des AE-Phänotyps zu erfüllen, musste an mind. drei der insgesamt 12 Befragungszeitpunkte eine der beiden Fragen positiv beantwortet sein und die Frage nach der AE-Diagnose eines Arztes durfte nicht widersprüchlich negativ beantwortet sein

### AE-Kontrollen

Voraussetzung für die Einteilung zu den Kontrollen der AE-Phänotypen war erstens, dass die AE-Fragen zu keinem Zeitpunkt positiv beantwortet waren. Zweitens musste die AE-Frage in zwei Zeitfenstern, 0-42 Monaten und 42-166 Monaten, negativ beantwortet worden sein. Zusätzlich durfte die Frage nach einer AE-Diagnose eines Arztes nie positiv beantwortet sein.

## Phänotypendefinitionen für AE, kombinierte atopische Phänotypen und Kontrollen

AE-Fragen: a) 6–69 Mon: „Did your child have rash in the creases or joints of the body?“ b) 81–166 Mon: „Did your child have eczema in the last 12 months?“

Atopie-Kriterium: 91 Mon: Hautpricktest gegen Ei, Gräser, Milben, Katze, Erdnuss, Nüsse

Asthma-Frage: 81-166 Mon: „Did your child have Asthma in the last 12 months?“

AR-Frage: 81-166 Mon: „Did your child have hay fever in the last 12 months?“

Arzt--Frage: 128+166 Mon: „Did a doctor diagnose Eczema at 128/166 months?“

Alter in Monaten		6	18	30	42	57	69	81	91	103	128	157	166		
Befragungs-Zeitpunkte		↓													
Alter in Jahren		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Atopisches Ekzem (AE)		( $\geq 3 / 12$ pos) AE						UND						(0 / 2) neg Arzt	
AE+Atopie	AE-Atopie	( $\geq 3 / 12$ pos) AE UND						( $\geq 1 / 6$ pos) Atopie			( $\geq 4 / 6$ neg) Atopie				
AE+Asthma	AE-Asthma							( $\geq 2 / 6$ pos) Asthma			( $\geq 4 / 6$ neg) Asthma				
AE+AR	AE-AR							( $\geq 2 / 6$ pos) AR			( $\geq 4 / 6$ neg) AR				
AE-Kontrollen		(0 / 12 pos) UND ( $\geq 1 / 4$ neg 0-42 Mon)						UND ( $\geq 1 / 8$ neg 57-122 Mon)						UND (0 / 2 pos) Arzt	
Atopie-Kontrollen		AE-Kontrollen UND						(0 / 6 pos)			UND ( $\geq 2 / 6$ neg) Atopie				
Asthma-Kontrollen								(0 / 6 pos)			UND ( $\geq 2 / 6$ neg) Asthma				
AR-Kontrollen								(0 / 6 pos)			UND ( $\geq 2 / 6$ neg) AR				

Abbildung 4. Phänotypendefinitionen des AE und kombinierter Phänotypen

Pfeile = Befragungszeitpunkte

Farben = Zugehörigkeit zum Phänotyp durch charakteristische Frage.

Lila Pfeil = Durchführung eines Pricktests als Atopiekriterium mit 6 Kategorien im Alter von 7,5 J.: Ei, Gräser, Milben, Katze, Nüsse, Erdnuss.

Pinke Pfeile = Befragungszeitpunkte für Diagnose durch einen Arzt („Did a doctor ever say that your child has eczema?“).

### **Phänotyp: Frühes AE**

Für die Untersuchung des Verlaufs des AE wurde ein Phänotyp „Frühes AE“ definiert. Einschlusskriterium waren mind. zwei positive Angaben bei AE-Fragen bis zum Alter von 30 Monaten. Davon ausgehend erfolgte die Aufteilung der Fälle in den Subphänotyp persistente AE mit wiederholt positiven AE-Antworten über den Studienverlauf hinweg und den Subphänotyp „transiente AE“ mit den Fällen, die die persistenten Kriterien nicht erfüllten (siehe Abbildung 5).

### **Subphänotyp des frühen AE: Persistentes AE**

Die AE-Fragen ab 30 Monaten wurden in 3 Zeitfenster eingeteilt. Bei mind. einer positiven Antwort in zwei von drei Zeitfenstern, wurden diese Kinder diesem Subphänotyp zugeteilt. Ausschlusskriterium war eine negative Diagnose eines Arztes. Dieser Phänotyp entspricht einer bleibenden Form des AE.

### **Subphänotyp des frühen AE: Transientes AE**

Hier wurden die Fälle des „Frühen AE“ zugeordnet, deren Angaben im Verlauf nicht die Kriterien des persistenten Typs erfüllten. Dies entspricht einem milderen, rückläufigen Verlauf des AE. Ein Ausschlusskriterium waren zu wenig Angaben für eine Beurteilung der Zeitfenster. Daher ergibt sich eine Falldifferenz von „Frühes AE“ zu den Subphänotypen.

### **Kombinierter Phänotyp: AE + Atopie**

Für die Definition der Atopie wurde mind. ein positives Hautpricktest-Resultat gefordert (Gräser, Hausstaubmilben, Katzenhaare, Ei, Erdnüsse und andere Nüsse). Dafür erfolgte im Alter von 7,5 Jahren ein Hautpricktest. Für den Einschluss in die Nicht-Atopie-Gruppe mussten mind. vier Hauttestergebnisse negativ sein, ein Ausschluss erfolgte bei mind. einem positivem Pricktest. Es wurden die kombinierten Subphänotypen „AE+Atopie“ sowie „AE-Atopie“ (AE mit/ohne Atopie) definiert. Die Kontrollen dieses Phänotyps durften zusätzlich zu den Kriterien für die AE-Kontrollen kein positives Ergebnis für eine Pricktestkategorie aufweisen und mussten mind. zwei der sechs Kategorien als negativ angegeben haben.

### **Kombinierter Phänotyp AE + Asthma**

Fälle des kombinierten Phänotyps „AE+Asthma“ mussten zusätzlich zu den AE-Kriterien die Asthma-Frage: „*Did your child have asthma in the last 12 months?*“ („Hatte ihr Kind Asthma in den letzten 12 Monaten?“) zweimal positiv beantwortet haben. Dem Nicht-Asthma-Phänotyp „AE-Asthma“ wurden Fälle zugeordnet, die neben den AE-Kriterien keine Asthma-Frage positiv beantwortet, zusätzlich mind. viermal negativ geantwortet sowie keine positive ärztliche Diagnose angegeben haben.



### **Kombinierter Phänotyp: AE + AR**

Fälle des kombinierten Subphänotyps AE+AR mussten zusätzlich zu den AE-Kriterien die AR-Frage: „*Did your child have hayfever in the last 12 months?*“ (Hatte ihr Kind Heuschnupfen in den letzten 12 Monaten?) zweimal positiv beantwortet haben. Dem Nicht-AR-Phänotyp „AE-AR“ wurden alle Kinder zugeordnet, die neben den AE-Kriterien keine AR-Frage positiv beantwortet und zusätzlich an mind. vier Zeitpunkten der AR-Frage negativ geantwortet haben.

### **Subphänotypenanalyse**

Um den Effekt eines kombinierten Phänotyps zu bestimmen erfolgten Subphänotypenanalysen. Hier wurden alle zugehörigen Fälle eines kombinierten Phänotyps (z. B. AE + Asthma) den Fällen gegenübergestellt, bei denen AE vorlag, jedoch der untersuchte zweite Phänotyp ausgeschlossen war (z.B AE ohne Asthma). So ließ sich prüfen, ob ein SNP signifikant häufiger in der Gruppe des kombinierten Phänotyps des AE mit einer weiteren atopischen Erkrankung vorlag, als in der Gruppe, in der die weitere Erkrankung ausgeschlossen war. Nur in dieser Subphänotypenanalyse signifikante p-Werte wurden als Assoziation gewertet, da sonst der Einfluss des SNPs allein auf das AE die Assoziation bewirkt haben könnte.

### **Klinische Daten der ALSPAC-Kohorte**

Ausgewählt und verwendet wurden die für die vorliegende Arbeit relevanten ALSPAC-Daten zu AE, Asthma, AR und Atopie. Dafür standen Daten von n=13868 Kindern zur Verfügung. Von den n = 7829 Kindern mit Genotypdaten waren für die einzelnen Phänotypen aufgrund von fehlenden Angaben jeweils eine unterschiedliche Anzahl an ausreichend prospektiven Daten verfügbar.

**Tabelle 6. Ausschlusskriterien für definierte Phänotypen**

<b>Phänotyp</b>	<b>Ausschlusskriterien bei n-fehlenden Angaben</b>	<b>n-hinreichende Kriterien</b>
Frühes AE	≥ 3x keine Angabe bei AE-Fragen für erste 30 Monate	7355
AE	≥ 10x keine Angabe bei AE-Fragen von 0-166 Monaten	7270
Persistentes AE	≥ 2 keine Angabe bei AE-Fragen in Fenstern von 42-166 Monaten	6525
Kein AE (Kontrollen)	= 4x keine Angabe bei AE-Fragen für erste 30 Monate oder ≥ 8x keine Angabe insgesamt	6853
Asthma	≥ 5x keine Angabe bei Asthma-Fragen von 69-166 Monaten	6021
Kein Asthma (Kontrollen)	≥ 3x keine Angabe bei Asthma-Fragen von 69-166 Monaten	5434
AR	≥ 5x keine Angabe bei AR-Fragen von 69-166 Monaten	6175
Keine AR (Kontrollen)	≥ 3x keine Angabe bei AR-Fragen von 69-166 Monaten	5218
Atopie, keine Atopie (Kontrollen)	≥ 6x keine Angabe bei Pricktestergebnis im Alter von 7,5 Jahren	4972

## Phänotypdefinitionen für AE-Verlauf und -Persistenz

AE-Fragen: a) 6–69 Mon: „Did your child have rash in the creases or joints of the body?“ b) 81–166 Mon: „Did your child have eczema in the last 12 months?“

Arzt-Frage: 128+166 Mon: „Did a doctor diagnose eczema at 128/166 months?“

Alter in Monaten	6	18	30	42	57	69	81	91	103	128	157	166		
Befragungs-Zeitpunkte	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
Alter in Jahren	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Aufteilung in Zeitfenster (Fenster = pos bei $\geq 1/3$ Antworten)	Früher Beginn			Fenster 1: Kleinkind			Fenster 2: Schulkind			Fenster 3: Jugend				
Frühes AE	$(\geq 1 / 3 \text{ pos}) \text{ AE}$			beliebig			beliebig			beliebig				
Teilt sich auf in	↓			↓			↓			↓				
oder														
Transientes AE	$(\geq 1 / 3 \text{ pos}) \text{ AE}$			$(\leq 1 / 3 \text{ Fenster pos}) \text{ AE}$										
Persistentes AE	$(\geq 1 / 3 \text{ pos}) \text{ AE}$			$(\geq 2 / 3 \text{ Fenster pos}) \text{ AE}$			$(\geq 2 / 3 \text{ Fenster pos}) \text{ AE}$			$(\geq 2 / 3 \text{ Fenster pos}) \text{ AE UND } (0 / 2) \text{ neg Arzt}$				

Abbildung 5. Phänotypdefinition für AE-Verlauf (Frühes, transientes und persistentes AE)

Pfeile = Befragungszeitpunkte

Grüne Pfeile für AE, Pinke Pfeile für Arzt diagnose

Zeitfenster á 3 Fragen, positiv gewertetes Fenster bei mind. 1 positiven Antwort pro Fenster

## 4.5. Statistische Analysen

### Assoziationsanalyse

In einer genetischen Assoziationsanalyse untersucht man eine Population hinsichtlich eines statistischen Zusammenhangs zwischen einer genetischen Variante und eines qualitativen oder quantitativen Merkmals.<sup>(99)</sup> Im vorliegenden Fall wurde die ALSPAC-Kohorte auf eine Assoziation zwischen SNPs mit verschiedenen klinischen Phänotypen untersucht. Dazu wurde die Häufigkeit des Vorkommens des untersuchenden SNPs in den Fällen mit der Häufigkeit in den Kontrollen mittels logistischer Regressionsanalyse verglichen.

### Logistische Regression und Odds Ratio (OR)

Die logistische Regression ist eine Berechnungsmethode des Verhältnisses Odds Ratio (OR) zwischen einer bestimmten Variable X (Einflussgröße) (z. B. SNP-Allel „C/T“) und einer dichotomen Variable Y (z. B. mit den Zuständen 1 = erkrankt und 0 = nicht erkrankt).<sup>(100)</sup>

Die mathematische Formel dafür lautet:  $f(Y) = \ln(P(Y = 1) / P(Y=0))$ .

In dieser Arbeit wurde beispielsweise der dichotome Zustand AE „ja“ oder „nein“, bei Vorhandensein der Variable Risikoallel (z. B. „C“ im Vergleich zu Allel „T“ eines SNPs) untersucht. Die resultierende Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des Zielereignisses „AE“ bei Vorhandensein des Risikoallels des betreffenden SNPs im Gegensatz zum Vorhandensein des Nicht-Risiko-Allels wird im sogenannten Odds Ratio als Zahl zwischen 0 (maximal protektiv) zu unendlich (maximales Risiko) geschätzt.<sup>(101)</sup> Der Wert 1 bedeutet gleiche Wahrscheinlichkeit der Risiken, was keiner Risikosteigerung entspricht.

Für die logistischen Regressionsberechnungen dieser Arbeit wurde das Programm *PLINK* (Version 1.07)<sup>(12)</sup> verwendet. Diese Statistiksoftware wurde speziell dafür entwickelt umfangreiche Genotyp/Phänotyp-Assoziationsanalysen durchzuführen.

### Relative excess risk due to interaction (RERI) – Methode für Interaktionsanalysen

Das relative Risiko (RR) gibt an, welches Erkrankungsrisiko, ein mit einem Risikofaktor exponiertes Individuum, relativ gesehen gegenüber einem, nicht mit diesem Risikofaktor exponierten Individuum, hat. In dieser Arbeit sind die Expositionsfaktoren Genotypen eines SNPs und ist die Erkrankung das AE. Das *Relative excess risk due to interaction* (RERI) gibt die Differenz zwischen dem berechneten additivem relativen Risiko von zwei Risikofaktoren RR(A) und RR(B) und dem tatsächlichen RR bei Vorhandensein der zwei Risikofaktoren an.<sup>(102)</sup>

$$RR = \frac{\text{Inzidenzrate bei Exponierten}}{\text{Inzidenzrate bei Nicht-Exponierten}} = \frac{a/(a+b)}{c/(c+d)} \quad (103)$$

Wenn man davon ausgeht, dass zwei Einflussfaktoren A und B, jeweils ein RR von RR(A) und RR(B) für eine Erkrankung mit sich bringen, ergibt sich ein additives RR von  $RR(AB) = RR(A) + RR(B)$ .

Subtrahiert man nun vom berechneten additiven RR  $RR(AB)$  die Summe der Einzelrisiken  $RR(A)$  und  $RR(B)$  und addiert 1 erhält man das RERI:

$$RERI(AB) = RR(AB) - (RR(A) + RR(B)) + 1$$

Bei fehlender Interaktion ergibt sich ein Wert von 0. Bei einem  $RERI > 0$  und signifikanten p-Werten, deutet dies auf eine Interaktion der einzelnen Faktoren mit überproportionaler Steigerung des Erkrankungsrisikos hin.

Zusammengefasst gibt das RERI die Differenz zwischen dem berechneten additiven RR und dem tatsächlichen RR bei Vorhandensein der zwei Risikofaktoren (zwei SNPs in Kombination) an.

Für die Interaktionsberechnungen der RERI in dieser Arbeit wurde das Statistikprogramm „R“ (Version 2.15.2.) verwendet. Zum Bearbeiten der mit „R“ programmierten Codes wurde das *Open-Source*-Programm „Tinn-R“ Version 2.4.1.5 benutzt.

Für die Interaktionsberechnungen mittels RERI wurden paarweise Berechnungen der RR zweier SNPs (SNP x SNP) durchgeführt. Für die Testung des RERI bei dem Phänotyp des persistenten AE wurden im ersten Schritt die Anzahlen der SNP-Risikoallelträger jeweils eines SNPs (bei Nicht-Risikoallel für den anderen SNP) sowie die Anzahl der SNP-Risikoallelträger beider SNPs bestimmt und die jeweiligen RR berechnet. Anschließend wurde das daraus resultierende RERI berechnet.

In die Interaktionsanalyse des RERI wurden alle SNPs eingeschlossen, die im Phänotyp für das AE eine Signifikanz von  $p \leq 0,05$  erreichten (siehe Tabelle 7). Es wurden alle SNP x SNP-Paare von den RERI-Berechnungen ausgeschlossen, die  $< 10$  Fälle in einer der SNP-Allelträger-Kombinationen aufwiesen. Alle Assoziationen wurden mit einem additiven Modell berechnet, da keine rezessiven oder dominanten Alleleinflüsse bekannt waren. Die resultierenden RERI für den Phänotyp der persistenten AE wurden mittels mehrerer Signifikanztestverfahren überprüft:

### ***Bootstrap-Verfahren***

Das *Bootstrap*-Verfahren ist eine Methode zur Schätzung der Verteilung von Parametern eines Modells. Dabei wird eine Stichprobe mit Hilfe des zu untersuchenden Modells aus beobachteten Daten gezogen, der entsprechende Wert berechnet und die Stichprobe zurückgelegt. Je nach gewünschter Zahl von *Bootstrap*-Stichproben wird dieser Vorgang n-mal wiederholt. Die Güte des Modells wird anhand der Verteilung der n-*Bootstrap* Stichproben geschätzt.<sup>(104)</sup> Das Verfahren ist auch dann anwendbar, wenn andere statistische Tests aufgrund von zu geringem

Stichprobenumfang und dadurch fragwürdigen asymptotischen Aussagen nicht angewendet werden können. In dieser Arbeit wurde das Verfahren benutzt, um ein geschätztes Konfidenzintervall für die Berechnung der RERI zu erhalten.

### **Permutationsverfahren**

Bei Permutationstests erzeugt und berechnet man unter der Nullhypothese die Verteilung einer zu untersuchenden Statistik durch wiederholtes, zufälliges Anordnen der Einflussgrößen.<sup>(105)</sup>

In dieser Arbeit wurde zur Berechnung des empirischen Signifikanzniveaus des RERI der Phänotyp  $y$  permutiert und  $q$  multiple (nicht assoziierte) Genotypen modelliert. Das empirische Signifikanzniveau ergibt sich aus dem Vergleich der *Likelihooddifferenz*, zwischen den Modellen ohne und mit Einschluss multipler SNPs/SNP-Haplotypen, des permutierten Modells und des originalen Modells in 1000 Simulationen.<sup>(106)</sup>

### **Vergleichbarkeit mit GWAS bei alternativem Allel oder komplementärem Strang**

Um die Validität der verwendeten ALSPAC-SNPs zu verifizieren wurden die SNP-Daten der Ursprungs-GWAS, die einen SNP erstmals entdeckt hat mit den SNP-Daten der ALSPAC-Kohorte verglichen. Dabei wurde auf das Risikoallel (RA), dessen AF und den publizierten Effekt ( $OR >$  oder  $<1$ ) geachtet. In einigen GWAS-Referenzpublikationen wurde das alternative Allel oder der komplementäre Strang des SNPs angegeben (siehe RA\* oder RA° in Tabelle 7). In diesen Fällen erfolgte die Umrechnung in Bezug auf das RA von ALSPAC für eine einfachere Vergleichbarkeit.

### **Powerkalkulation**

Die Power oder Teststärke gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine tatsächlich falsche Nullhypothese verworfen wird. In dieser Arbeit gibt sie die Wahrscheinlichkeit an, eine vorhandene Assoziation eines SNPs mit dem AE auch festzustellen. Die Power einer Studie hängt von der Effektstärke, der Stichprobengröße (Anzahl der Fälle/Kontrollen) und der Häufigkeit des Risikofaktors ab. Die Kalkulation der Power im Vorhinein einer Assoziationsstudie ist hilfreich, um abzuschätzen, wie wahrscheinlich mit der gegebenen Anzahl an Fällen und Kontrollen die erwarteten Ergebnisse für das zu untersuchende Merkmal (z.B. AF) eines Phänotyps (z. B. AE) assoziiert werden können. Die vorliegende Powerkalkulation in dieser Arbeit wurde mit dem *Genetic Power Calculator* durchgeführt, einem öffentlich zugänglichem Programm der *Harvard* Universität.<sup>(107)</sup> Dabei wurde ein Signifikanzniveau  $\alpha$  von 0,05 gewählt, die Anzahl der Fälle (1156) und Kontrollen (2118) aus dem definierten Phänotyp des AE entnommen. Es wurde bezugnehmend auf eine Publikation zur Prävalenz des AE in der ALSPAC für die ersten vier Lebensjahre<sup>(108)</sup> der dortige Prävalenzwert von 22,4% aufgrund bekanntermaßen abnehmender Prävalenz des AE bis zur Adoleszenz auf einen konservativeren Wert von 20,5% reduziert.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Powerkalkulation der ALSPAC-Studie für den AE-Phänotyp

Die Powerkalkulation wurde durchgeführt um den Bereich der Effektstärken (OR) der SNPs abzuschätzen, in dem sie mit ausreichender Verlässlichkeit mit dem AE assoziiert werden können. Das Diagramm zeigt die erwartete Power auf der Y-Achse für verschiedene AF von SNPs in Abhängigkeit zur Odds Ratio auf der X-Achse (siehe Abbildung 6). Als in der Literatur üblicher Wert für eine verlässliche Power wird im Allgemeinen 0,8 bzw. 80% verwendet (horizontale verstärkte Linie). In dieser Arbeit zeigt sich für den Phänotyp AE, dass für einen SNP mit einer AF von 10% ein  $OR \geq 1,18$  mit hinreichender Power vorhergesagt werden kann (grüne Kurve). Für einen SNP mit einer AF von 25% ist dies schon für ein  $OR > 1,12$  möglich. Die Wahrscheinlichkeit in dieser Studienpopulation eine Assoziation für SNPs mit einer  $OR < 1,11$  zu finden liegt unter 80%. Für solche Varianten ist die Power dieser Studienpopulation unzureichend. Für SNPs mit geringer AF von 3% (braune Kurve) wird erst ab einem relativ hohen  $OR > 1,3$  eine Power von 0,8 erreicht. Es zeigt sich also, dass durch die große Fallzahl der ALSPAC-Kohorte in dieser Arbeit auch relativ geringe Effektstärken von häufigen SNPs (hellblaue Kurve) ab einem OR von 1,15

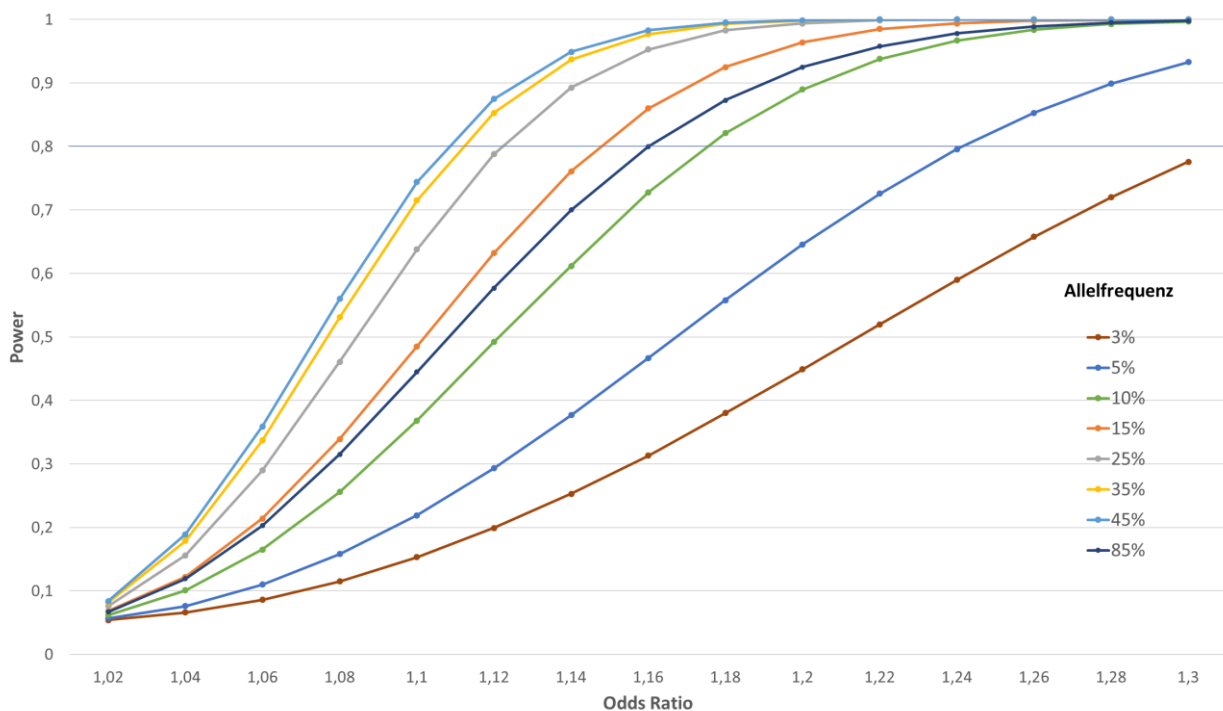


Abbildung 6. Powerkalkulation der ALSPAC-Studie für den AE-Phänotyp

X-Achse: OR im Bereich von 1,02 – 1,3. Y-Achse: Resultierende Power in Werten von 0 – 1 bei unterschiedlichen Allelfrequenzen. Farbige Darstellung unterschiedlicher AF. Signifikanzniveau  $\alpha$ : 0,05, angenommene AE-Prävalenz: 20,5 %, AE-Fälle: 1490, AE-Kontrollen 2672

noch mit ausreichender Wahrscheinlichkeit detektiert werden können und ab einem OR > 1,3 sogar seltene SNPs mit AF von 3%.

## 5.2. AE-Assoziationsanalyse und Qualitätskontrolle der ausgewählten SNPs

Die Ergebnisse der Assoziationsanalyse der 27 SNPs sind in Tabelle 7 im Vergleich zu den Referenz-GWAS-Publikationen der Erstbeschreibung der SNPs dargestellt. Für die Vergleichbarkeit wurde auf ein übereinstimmendes RA, die RAF und den OR-Wert geachtet. Die AF aller SNP aus europäischen GWAS und GWAS-Metastudien korrelierten sehr gut mit den AF-Werten der Referenz-GWAS mit maximaler Differenz von 4% bei rs2897442 und rs2040704. Die AF der SNPs aus asiatischen Populationen differierten jedoch teils deutlich (z. B. rs16999165 28%) und nur zwei der assoziierten SNPs stammen aus asiatischen Populationen, was im Diskussionsteil aufgegriffen wird (Kapitel 6.3 Ursachen für nicht-replizierte SNPs).

12 SNPs zeigten eine signifikante Assoziation zum AE mit p-Werten < 0,05 (grün markiert). Die OR der assoziierten SNPs lagen im Bereich von OR = 1,10 (rs2041733) bis OR = 1,35 (rs2164983). Wie aus der Referenz-GWAS bekannt zeigte nur *FLG* eine deutlich höhere OR von 2,73. Von den 12 assoziierten SNPs zeigten neun signifikante Werte von  $p < 10^{-3}$ .

Aufgrund der LD-Berechnung als Qualitätskontrolle und zwei dort auffälligen SNPs, wurden diese aus späteren Analysen ausgeschlossen (orange markiert in Tabelle 7). Die beiden betroffenen Genorte wurden trotzdem analysiert, weil ein jeweils anderer SNP von guter Qualität zur Verfügung stand (rs13015714 und rs2155219, siehe Tabelle 8).

Die 10 assoziierten SNP bzw. Nullmutationen (*FLG*) liegen in bzw. zwischen folgenden Genen: *FLG*, *IL6R*, *IL1RL1-IL18R1*, *KIF3A*, *OVOL1*, *EMSY-LRRC32*, *C-type lectin domain containing 16A*-Gen (*CLEC16A*), *Actin like 9*-Gen (*ACTL9*) und *RTEL1-TNFRSF6B*.

Diese SNPs werden nachfolgend in weiteren Assoziationsberechnungen bezüglich ihres Einflusses auf den Verlauf des AE, auf eine Kombination mit weiteren atopischen Erkrankungen und auf SNP x SNP-Interaktionen (RERI) untersucht (grün markiert in Tabelle 7).

Tabelle 7. Assoziationsanalyse in ALSPAC und Vergleich mit GWAS-Referenz für AE

ALSPAC. Phänotyp: AE - Fälle: 1490 (1439)   Kontrollen: 2672 (2671)								GWAS-Referenz <sup>c</sup>			
SNP ID	Genort	Chr: Position <sup>a</sup>	RA	RAF	OR	95%KI <sup>b</sup>	P-Wert	RA	RAF	OR	Pop <sup>d</sup>
rs10903122	<i>RUNX3</i>	1: 24977085	G	0,49	1,08	0,99-1,19	0,082	G	0,52	1,19	E <sup>(5)</sup>
R501X + 2282del4	<i>FLG</i>	1: 150552485	G	0,04	2,73	2,20-3,38	$6 \times 10^{-20}$	G	0,04	3,12	E <sup>(3)</sup>
rs2228145	<i>IL6R</i>	1: 154454494	C	0,41	1,15	1,05-1,25	$3 \times 10^{-3}$	C	0,41	1,15	E <sup>(5)</sup>
rs3771180	<i>IL1RL1</i>	2: 102337157	G	0,86	1,23	1,08-1,41	$2 \times 10^{-3}$	G*	0,86*	1,26*	E <sup>(6)</sup>
rs13015714	<i>IL1RL1- IL18R1</i>	2: 102355405	G	0,23	1,16	1,05-1,29	$5 \times 10^{-3}$	G	0,41	1,28	A <sup>(9)</sup>
rs759382	<i>SLC9A4</i>	2: 102477754	G	0,23	1,11	1,00-1,24	0,043	C°	0,24	1,22	E <sup>(6)</sup>
rs6780220	<i>GLB1</i>	3: 33045708	A	0,85	1,04	0,92-1,18	0,545	A*	0,46*	0,84*	A <sup>(9)</sup>
rs12634229	<i>CCDC80</i>	3: 112657461	T	0,93	1,11	0,92-1,33	0,272	A*°	0,67*	0,80*	A <sup>(9)</sup>
rs17389644	<i>IL2-IL21</i>	4: 122576542	A	0,23	1,10	0,98-1,22	0,096	A	0,23	1,19	E <sup>(6)</sup>
rs7701890	<i>TMEM232</i>	5: 110523120	A	0,94	1,07	0,88-1,30	0,481	A*	0,88*	0,71*	A <sup>(8)</sup>
rs2040704	<i>RAD50</i>	5: 132637485	G	0,19	1,10	0,98-1,23	0,093	G	0,23	1,22	E <sup>(5)</sup>
rs848	<i>IL13</i>	5: 132660808	A	0,19	1,11	0,99-1,24	0,078	T°	0,21	1,36	E <sup>(6)</sup>
rs2897442	<i>KIF3A</i>	5: 132713335	C	0,25	1,13	1,02-1,25	0,022	C	0,29	1,12	m <sup>(10)</sup>
rs176095	<i>GPSM3</i>	6: 32190542	A	0,75	1,08	0,97-1,19	0,156	T°	0,81	1,40	A <sup>(9)</sup>
rs4722404	<i>CARD11</i>	7: 3089155	T	0,56	1,07	0,97-1,17	0,168	T*°	0,67*	0,85*	A <sup>(9)</sup>
rs10995251	<i>ZNF365</i>	10: 62638706	C	0,63	1,04	0,95-1,14	0,392	C	0,52	1,22	A <sup>(9)</sup>
rs878860	<i>OR10A3- NLRP10</i>	11: 7946812	C	0,60	1,04	0,95-1,14	0,418	G°	0,54	1,30	A <sup>(9)</sup>
rs12295535	<i>PRR5L</i>	11: 36410474	T	0,03	1,23	0,95-1,58	0,114	A°	0,02	1,68	E <sup>(6)</sup>
rs479844	<i>OVOL1</i>	11: 65784486	G	0,56	1,21	1,10-1,33	$5 \times 10^{-5}$	G*	0,56*	1,12*	m <sup>(10)</sup>
rs7927894	<i>EMSY- LRRC32</i>	11: 76590272	T	0,38	1,19	1,09-1,29	$5 \times 10^{-5}$	T	0,41	1,22	E <sup>(4)</sup>
rs2155219	<i>EMSY- LRRC32</i>	11: 76588150	T	0,49	1,21	1,11-1,32	$2 \times 10^{-5}$	T	0,47	1,32	E <sup>(7)</sup>
rs2292239	<i>ERBB3</i>	12: 56088396	T	0,33	1,08	0,99-1,19	0,097	A°	0,34	1,13	E <sup>(5)</sup>
rs2041733	<i>CLEC16A</i>	16: 11135732	T	0,43	1,10	1,01-1,21	0,037	A°	0,44	1,23	E <sup>(6)</sup>
rs16948048	<i>ZNF652</i>	17: 49363104	A	0,62	1,02	0,93-1,12	0,693	A*	0,62*	0,85*	E <sup>(6)</sup>
rs2164983	<i>ACTL9</i>	19: 8679120	A	0,16	1,35	1,19-1,52	$1 \times 10^{-6}$	A	0,15	1,22	m <sup>(10)</sup>
rs16999165	<i>CYP24A1- PFDN4</i>	20: 54190682	G	0,03	1,25	0,97-1,60	0,08	G*°	0,31*	0,83	A <sup>(9)</sup>
rs6010620	<i>RTEL1- TNFRSF6B</i>	20: 63678486	G	0,76	1,17	1,05-1,30	$3 \times 10^{-3}$	A*	0,27	1,27	A <sup>(8)</sup>

a Basenposition laut Datenbank dbSNP (build 106). b 95%-KI des OR. c Referenz (GWAS-)Publikation mit SNP-Erstbeschreibung. d Herkunft der Population der Referenz, A=Asien, E=Europa, m=Metastudie (mehrere Kontinente) \*Studie mit alternativem Allel, daher OR reziprok (1/OR) und AF subtraktiv (1-AF) berechnet. °komplementärer Strang in Vergleichsstudie => komplementäres Allel verwendet. Orange: Ausschluss wegen hohem LD mit einem anderen SNP ( $r^2 > 0,5$ ). Grün:  $p < 0,05$ , signifikant assoziiert. Werte in Klammern = Fallzahlen nur für FLG-Genotyp



## Qualitätskontrolle der SNPs

Die RAF aller untersuchten SNPs betrug  $> 2\%$  (siehe Tabelle 7). Keiner der SNPs überschritt in der zusätzlichen Qualitätskontrolle den Grenzwert  $p < 10^{-4}$  für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Allerdings überschritten zwei der 27 ausgewählten SNPs den LD-Grenzwert von  $r^2 = 0,5$  in paarweisen Analysen. Zwei SNP-Paare auf Chromosom 11 und Chromosom 2 waren in hohem LD. Daher wurden nur die SNPs mit dem jeweils besseren p-Wert in der Analyse belassen (siehe Tabellen 7 und 8).

Tabelle 8. LD-Berechnungen ausgeschlossener SNPs

SNP-Paar (Genort)	Chromosom Position	Haplotyp	Erwartete Frequenz bei LD = 0	Errechnete Frequenz	$r^2$	$D'$	p-Wert	OR
rs13015714 ( <i>IL18R1-IL1RL1</i> )	2: 102477754	GG	0,052	0,197	<b>0,68</b>	<b>0,84</b>	$5 \times 10^{-3}$	1,16
		TG	0,178	0,033				
rs759382 ( <i>SLC9A4</i> )	2: 102355405	GT	0,173	0,028			0,043	1,11
		TT	0,596	0,742				
rs2155219 ( <i>EMSY-LRRC32</i> )	11: 76588150	TT	0,192	0,394	<b>0,67</b>	<b>0,98</b>	$2 \times 10^{-5}$	1,21
		CT	0,296	0,093				
rs7927894 ( <i>EMSY-LRRC32</i> )	11: 76590272	TG	0,202	0,004			5x10 <sup>-5</sup>	1,19
		CG	0,311	0,508				

Rot markiert: In PLINK berechnete Werte für  $r^2$  und  $D'$  über Grenzwert der Qualitätskriterien ( $r^2 < 0,5$ ,  $D' < 0,8$ ). Grüne Füllung: Im paarweisen Vergleich ausgewählter SNP aufgrund im Vergleich niedrigerem p-Wert und höherem OR. Orange Füllung: Aufgrund von hohem LD ausgeschlossene SNPs.

## 5.3. Korrelation des AE mit anderen atopischen Erkrankungen

Durch die Analyse der kombinierten Phänotypen (siehe Definitionen 4.3) Definition der Phänotypen wurde die Korrelationsrate zwischen dem AE mit AR, Asthma und Atopie für die ALSPAC dargestellt. Jeweils knapp 30% der Kinder mit AE erfüllten zusätzlich die Definitionskriterien für AR, Asthma oder Atopie (siehe Tabelle 9). Gleichzeitig an den drei atopischen Erkrankungen AE, Asthma und AR litten 15% aller Fälle mit AE. Es wurde ein Überwiegen von 2,3% für Kinder mit zusätzlicher Atopie bei der Kombination AE+AR (16,4%) im Vergleich zu Atopie bei AE+Asthma (14,1%) verzeichnet. Bei ca. jedem 10. Kind aller AE-Fälle wurde die Kombination aller vier Phänotypen festgestellt, also mind. ein positives Pricktestergebnis zusätzlich zu allen drei atopischen Erkrankungen.

Tabelle 9. Korrelation der kombinierten Phänotypen atopischer Erkrankungen

Phänotyp	AE (gesamt)	AE+ AR	AE+ Asthma	AE+ Atopie	AE+ AR+ Asthma	AE+ AR+ Atopie	AE+ Asthma+ Atopie	AE+ AR+ Asthma+ Atopie
Fälle	1490	434	433	417	223	245	210	138
% von AE gesamt		29,1	29,1	28,0	15,0	16,4	14,1	9,3

Das Venn-Diagramm veranschaulicht die Überlappung der Erkrankungen des atopischen Formenkreises in der ALSPAC-Kohorte:

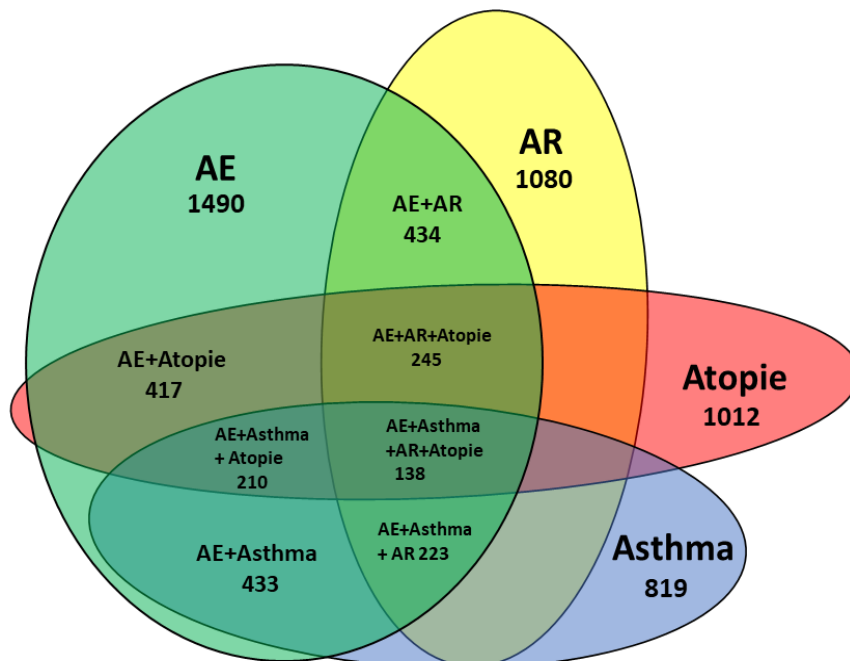


Abbildung 7. Venn-Diagramm atopischer Erkrankungen in der ALSPAC-Kohorte  
Zahlen geben Anzahl der Fälle des jeweiligen Phänotyps an.

## 5.4. Darstellung der untersuchten SNPs in Powerkalkulationsdiagramm

Zur Veranschaulichung wurden die OR-Ergebnisse und AF der SNPs aus der Assoziationsanalyse (siehe Tabelle 7) in das Koordinatensystem der Powerkalkulation (siehe Abbildung 6) eingezeichnet. Es zeigt sich, dass alle in der Analyse signifikant assoziierten SNPs eine Power von 80% überschreiten mit Ausnahme von rs2041733 des Gens *CLEC16A*, das in den Assoziationsanalysen einen signifikanten p-Wert (0,037) erreichte, jedoch in der Powerkalkulation nur eine Power von 73% erreicht. Alle getesteten SNPs mit OR > 1,12 haben eine kalkulierte Power von über 80%, außer die SNPs *PRR5L* und *CYP24A1-PFDN4*, die trotz relativ hoher OR von 1,23, bzw. 1,25 wegen ihrer niedrigen AF von 0,03% deutlich unter der Powergrenze von 80% bleiben (siehe braune Kurve). *FLG* jedoch erreicht mit gleich niedriger AF einen maximalen Powerwert von 99,9%, da die vermittelte OR 2,73 sehr hoch ist. *ACTL9* mit einer OR von 1,35 und *EMSY-LRRC32* mit OR von 1,21 zeigen ebenfalls maximale Powerwerte. *KIF3A* ist der SNP mit dem geringsten OR von 1,13, der noch eine Power von über 80% erreicht. In meiner Studie wurden somit alle SNPs mit kalkulierter Power >80% assoziiert und darüber hinaus sogar ein SNP unter der Grenze von 80% (rs2041733 *CLEC16A* mit OR = 1,10, p = 0,037), für den nur eine Power von 73% kalkuliert war.

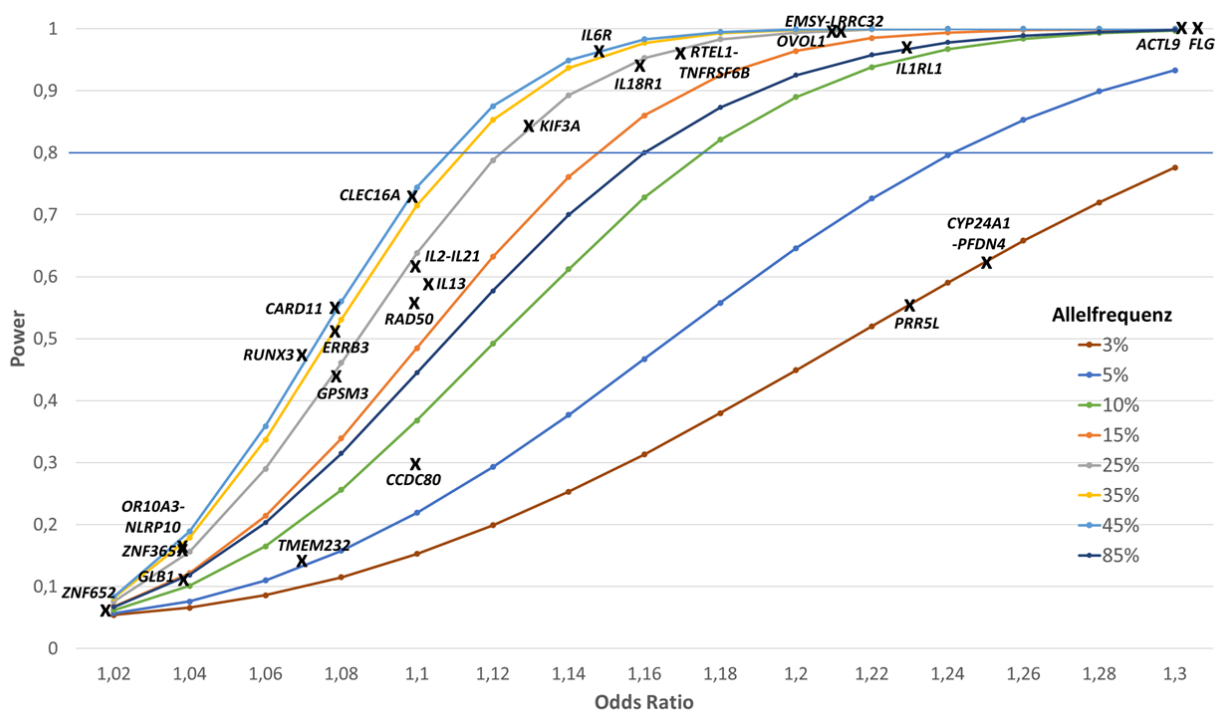


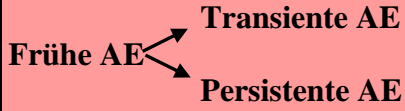
Abbildung 8. Darstellung der untersuchten SNPs im Powerkalkulationsdiagramm

X-Achse: OR im Bereich von 1,02 – 1,3. Y-Achse: Resultierende Power in Werten von 0 – 1 bei unterschiedlichen Allelfrequenzen. Farbige Darstellung unterschiedlicher AF. Signifikanzniveau  $\alpha$ : 0,05, angenommene AE-Prävalenz: 20,5 %, AE-Fälle: 1490, AE-Kontrollen 2672. SNPs mit errechneten Werten für OR und AF integriert.

## 5.5. Assoziationsanalyse der Phänotypen für AE-Verlauf und -Persistenz

Es wurden 658 Fälle für den Phänotyp des persistenten AE als Subkategorie des frühen AE ermittelt. Bei einer Gesamtzahl von 1562 Fällen im Phänotyp des frühen AE, ergibt das eine Prävalenz von 42,1% von Kindern, bei denen sich eine bleibende Form aus dem frühen AE entwickelte. Bei der Untersuchung der 10 signifikant mit AE assoziierten SNPs nach ihrem Einfluss auf die Ausprägung eines persistierenden AE-Typs wurde für fünf der 10 SNPs eine signifikante Assoziation im Hinblick auf einen persistenten Verlauf gezeigt ( $p \leq 0,05$ ). So zeigten schlussendlich signifikante Werte: Die *FLG*-Nullmutationen, rs2228145 im Gen *IL6R*, rs2897442 im Intron des Gens *KIF3A* sowie rs479844 im Gen *OVOLI* und ein weiterer SNP auf Chromosom 11 zwischen den Genen *EMSY* und *LRRC32*. Mit Abstand den höchsten OR zeigten die *FLG*-Mutationen mit OR von 3,13. Alle signifikant assoziierten SNPs des persistenten Phänotyps zeigten ein höheres OR als im weniger spezifischen Phänotyp des AE.

Tabelle 10. Assoziationsanalyse des frühen AE und Subphänotypen transient/persistent

Subphänotypen für AE-Verlauf:					Frühe AE			Transiente AE			Persistente AE			Subphänotypenanalyse		
					Fälle: 1562 (1527)			Fälle: 742 (730)			Fälle: 658 (616)			Fälle: 658 (616) (persistente AE)		
					Kontrollen: 2672 (2671)			Kontrollen: 2672 (2671)			Kontrollen: 2672 (2671)			Kontrollen: 742 (730) (transiente AE)		
SNP	Genort	Chr	RA	RAF	OR	95%KI	p-Wert	OR	95%KI	p-Wert	OR	95%KI	p-Wert	OR	95%KI	p-Wert
R501X+ 2282del4	<i>FLG</i>	1	G	0,04	2,70	2,18-3,34	6x10 <sup>-20</sup>	2,28	1,74-2,99	3x10 <sup>-9</sup>	3,13	2,41-4,06	9x10 <sup>-18</sup>	1,41	1,05-1,90	0,022
rs2228145	<i>IL6R</i>	1	C	0,41	1,10	1,01-1,20	0,033	1,02	0,91-1,14	0,762	1,23	1,09-1,39	8x10 <sup>-4</sup>	1,20	1,04-1,39	0,014
rs3771180	<i>IL1RL1</i>	2	G	0,86	1,06	0,94-1,21	0,350	1,01	0,86-1,19	0,896	1,17	0,98-1,41	0,083	1,16	0,93-1,44	0,186
rs13015714	<i>IL18R1</i>	2	G	0,23	1,08	0,97-1,20	0,166	1,04	0,90-1,19	0,593	1,12	0,97-1,29	0,124	1,08	0,90-1,28	0,415
rs2897442	<i>KIF3A</i>	5	C	0,25	1,07	0,97-1,19	0,191	0,96	0,84-1,10	0,525	1,21	1,05-1,38	7x10 <sup>-3</sup>	1,26	1,06-1,49	8x10 <sup>-3</sup>
rs479844	<i>OVOLI</i>	11	G	0,56	1,21	1,11-1,33	3x10 <sup>-5</sup>	1,11	0,99-1,25	0,072	1,36	1,20-1,54	1x10 <sup>-6</sup>	1,22	1,05-1,42	0,011
rs2155219	<i>EMSY- LRRC32</i>	11	T	0,49	1,13	1,03-1,23	7x10 <sup>-3</sup>	0,99	0,89-1,11	0,902	1,25	1,11-1,41	2x10 <sup>-4</sup>	1,27	1,10-1,47	2x10 <sup>-3</sup>
rs2041733	<i>CLEC16A</i>	16	T	0,43	1,06	0,97-1,16	0,226	1,07	0,96-1,21	0,226	1,09	0,97-1,23	0,156	1,02	0,88-1,18	0,833
rs2164983	<i>ACTL9</i>	19	A	0,16	1,33	1,18-1,50	2x10 <sup>-6</sup>	1,21	1,04-1,42	0,016	1,46	1,25-1,71	3x10 <sup>-6</sup>	1,20	0,99-1,45	0,066
rs6010620	<i>RTEL1- TNFRSF6B</i>	20	G	0,76	1,16	1,05-1,29	5x10 <sup>-3</sup>	1,08	0,95-1,24	0,251	1,22	1,06-1,41	7x10 <sup>-3</sup>	1,13	0,95-1,35	0,178

Grün markiert = p-Werte <0,05. SNP ebenfalls grün markiert, wenn p-Wert im Fallvergleichsphänotyp < 0,05, Werte in Klammern = Fallzahlen nur für *FLG*-Genotyp

## 5.6. Assoziationsanalyse des kombinierten Phänotyps: AE + Atopie

Es erfüllten 417 Fälle die Kriterien des AE, bei denen zusätzlich zum Phänotyp des AE durch ein oder mehr positive Pricktestergebnisse eine Sensibilisierung festgestellt wurde. Demgegenüber wurden 633 Fälle gefunden, die zwar ein AE, jedoch keinen Hinweis für eine Atopie zeigten. Alle bis auf drei SNPs zeigten eine Signifikanz für den kombinierten AE+Atopie-Phänotyp. Da jedoch auch viele der SNPs assoziiert zum Phänotyp des AE ohne Atopie waren, ergaben sich in der Subphänotypenanalyse mit gleichzeitiger AE und Atopie gegenüber zu AE und keiner Atopie nur noch für zwei der 10 SNPs signifikante Ergebnisse. Erstens für die *FLG*-Nullmutationen ( $p=0,002$ ) und für den SNP des Gens *KIF3A* auf Chromosom 5 ( $p = 9 \times 10^{-3}$ ). Im AE+Atopie-Phänotyp zeigte sich für den SNP im Gen *KIF3A* ein OR von 1,41 und *FLG*-Nullmutationen ein hoher OR von 3,61 (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11. Assoziationsanalyse des kombinierten Phänotyps AE mit Atopie (AE+Atopie)

Phänotyp: AE mit Atopie (AE+Atopie)					AE+Atopie Fälle: 417 (385) (AE+Atopie) Kontrollen: 1554 (1602) (≠AE≠Atopie)			AE-Atopie Fälle: 633 (587) (AE≠Atopie) Kontrollen: 1554 (1602) (≠AE≠Atopie)			Subphänotypenanalyse Fälle: 417 (385) (AE+Atopie) Kontrollen: 633 (587) (AE≠Atopie)		
SNP	Genort	Chr	RA	RAF	OR	95%KI	p-Wert	OR	95%KI	p-Wert	OR	95%KI	p-Wert
R501X+2282del4	<i>FLG</i>	1	G	0,04	3,61	2,61-4,99	8x10 <sup>-15</sup>	2,08	1,51-2,88	9x10 <sup>-6</sup>	1,72	1,22-2,43	2x10 <sup>-3</sup>
rs2228145	<i>IL6R</i>	1	C	0,41	1,21	1,04-1,42	0,014	1,11	0,99-1,27	0,131	1,09	0,92-1,30	0,318
rs3771180	<i>IL1RL1</i>	2	G	0,86	1,42	1,11-1,80	5x10 <sup>-3</sup>	1,24	1,02-1,50	0,033	1,14	0,86-1,50	0,364
rs13015714	<i>IL18R1</i>	2	G	0,23	1,25	1,05-1,50	0,013	1,24	1,07-1,45	6x10 <sup>-3</sup>	1,01	0,83-1,23	0,911
rs2897442	<i>KIF3A</i>	5	C	0,25	1,41	1,18-1,67	1x10 <sup>-4</sup>	1,08	0,92-1,26	0,336	1,31	1,07-1,60	9x10 <sup>-3</sup>
rs479844	<i>OVOL1</i>	11	G	0,56	1,22	1,05-1,43	0,011	1,20	1,05-1,37	8x10 <sup>-3</sup>	1,02	0,86-1,22	0,792
rs2155219	<i>EMSY-LRRC32</i>	11	T	0,49	1,18	1,01-1,38	0,032	1,19	1,04-1,35	9x10 <sup>-3</sup>	0,99	0,84-1,18	0,948
rs2041733	<i>CLEC16A</i>	16	T	0,43	1,07	0,92-1,25	0,394	1,11	0,97-1,26	0,131	0,97	0,81-1,15	0,697
rs2164983	<i>ACTL9</i>	19	A	0,16	1,18	0,97-1,45	0,103	1,27	1,07-1,51	7x10 <sup>-3</sup>	0,93	0,74-1,17	0,541
rs6010620	<i>RTEL-TNFRSF6B</i>	20	G	0,76	1,30	1,08-1,56	6x10 <sup>-3</sup>	1,16	0,99-1,35	0,063	1,12	0,91-1,39	0,287

Grün markiert = p-Werte <0,05. SNP ebenfalls grün markiert, wenn p-Wert im Fallvergleichsphänotyp < 0,05. Werte in Klammern = Fallzahlen nur für *FLG*-Genotyp

### **5.7. Assoziationsanalyse des kombinierten Phänotyps: AE + AR**

434 Fälle erfüllten die Kriterien für den kombinierten Phänotyp AE mit AR (siehe Tabelle 12). 644 Fälle mit AE und ohne AR wurden demgegenüber ermittelt (AE-AR). Zwei der 10 getesteten Risiko-Genorte zeigten eine signifikante Assoziation zu dem kombinierten Subphänotyp AE+AR, die also signifikant häufiger in der Gruppe mit gleichzeitiger Ausprägung von AE und AR vertreten waren (grün markiert).

Es handelt sich dabei um die *FLG*-Nullmutationen ( $p = 0,035$ ) und *EMSY-LRRC32* ( $p = 0,016$ ). Die OR der signifikanten SNPs betragen 1,34 für *EMSY-LRRC32* und 2,93 für die *FLG*-Nullmutationen.



Tabelle 12. Assoziationsanalyse des kombinierten Phänotyps AE mit AR (AE+AR)

Phänotyp: AE mit AR					AE+AR Fälle: 434 (411) (AE+AR) Kontrollen: 1555 (≠AE≠AR)			AE-AR Fälle: 644 (601) (AE≠AR) Kontrollen: 1555 (≠AE≠AR)			Subphänotypenanalyse Fälle: 443 (411) (AE+AR) Kontrollen: 644 (601) (AE≠AR)		
SNP	Genort	Chr	RA	RAF	OR	95%KI	p-Wert	OR	95%KI	p-Wert	OR	95%KI	p-Wert
R501X+2282del4	<i>FLG</i>	1	G	0,04	2,93	2,13 - 4,02	4x10 <sup>-11</sup>	2,00	1,46 - 2,72	1x10 <sup>-5</sup>	1,46	1,03 - 2,06	0,035
rs2228145	<i>IL6R</i>	1	C	0,41	1,27	1,09 - 1,47	1x10 <sup>-3</sup>	1,10	0,97 - 1,25	0,152	1,15	0,97 - 1,36	0,118
rs3771180	<i>IL1RL1</i>	2	G	0,86	1,33	1,06 - 1,67	0,015	1,23	1,02 - 1,49	0,032	1,08	0,82 - 1,42	0,576
rs13015714	<i>IL18R1</i>	2	G	0,23	1,08	0,91 - 1,28	0,393	1,11	0,96 - 1,29	0,156	0,97	0,80 - 1,18	0,768
rs2897442	<i>KIF3A</i>	5	C	0,25	1,24	1,05 - 1,46	0,012	1,13	0,98 - 1,31	0,095	1,10	0,90 - 1,34	0,351
rs479844	<i>OVOL1</i>	11	G	0,56	1,25	1,07 - 1,45	4x10 <sup>-3</sup>	1,23	1,08 - 1,40	2x10 <sup>-3</sup>	1,02	0,86 - 1,22	0,807
rs2155219	<i>EMSY-LRRC32</i>	11	T	0,49	1,34	1,16 - 1,54	8x10 <sup>-5</sup>	1,09	0,97 - 1,24	0,160	1,24	1,04 - 1,47	0,016
rs2041733	<i>CLEC16A</i>	16	T	0,43	1,14	0,98 - 1,32	0,086	1,07	0,94 - 1,21	0,317	1,07	0,90 - 1,27	0,461
rs2164983	<i>ACTL9</i>	19	A	0,16	1,37	1,13 - 1,66	1x10 <sup>-3</sup>	1,19	1,00 - 1,41	0,049	1,16	0,93 - 1,44	0,196
rs6010620	<i>RTEL-TNFRSF6B</i>	20	G	0,76	1,22	1,02 - 1,45	0,029	1,15	0,99 - 1,33	0,070	1,06	0,86 - 1,31	0,564

Grün markiert = p-Werte <0,05. SNP auch grün, wenn p-Wert im Fallvergleichsphänotyp <0,05, Werte in Klammern = Fallzahlen nur für *FLG*-Genotyp

## 5.8. Assoziationsanalyse des kombinierten Phänotyps: AE + Asthma

Die Kombination der Phänotypen AE und Asthma wurde bei 434 Fällen festgestellt (siehe Tabelle 13). Im Vergleich dazu wurden 644 Kinder identifiziert, die ein AE, aber kein Asthma haben. Es zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie im Subphänotyp AE+Atopie. In der Subphänotypenanalyse zeigten allerdings lediglich die *FLG*-Nullmutationen signifikante Ergebnisse ( $p = 0,025$ ) mit einem OR von 3,066.

Für die zwei SNPs für die Gene *KIF3A* ( $p = 0,08$ ) und *EMSY-LRRC32* ( $p = 0,07$ ) war keine Signifikanz, sondern nur eine mögliche Tendenz erkennbar.

Tabelle 13. Assoziationsanalyse des kombinierten Phänotyps AE mit Asthma (AE+Asthma)

Phänotyp: AE + Asthma					AE+Asthma			AE-Asthma			Subphänotypenanalyse		
					Fälle: 433 (421)			Fälle: 569 (534)			Fälle: 433 (421) (AE+Asthma)		
					Kontrollen: 2221 (2235) (≠AE≠Asthma)			Kontrollen: 2221 (2235) (≠AE≠Asthma)			Kontrollen: 569 (534) (AE-Asthma)		
SNP	Genort	Chr	RA	RAF	OR	95%KI	p-Wert	OR	95%KI	p-Wert	OR	95%KI	p-Wert
R501X+2282del4	<i>FLG</i>	1	G	0,04	3,066	2,24-4,20	3x10 <sup>-12</sup>	2,005	1,45-2,76	2x10 <sup>-5</sup>	1,502	1,05-2,15	0,025
rs2228145	<i>IL6R</i>	1	C	0,41	1,109	0,96-1,29	0,169	1,181	1,04-1,35	0,014	0,941	0,79-1,12	0,497
rs3771180	<i>IL1RL1</i>	2	G	0,86	1,356	1,08-1,70	8x10 <sup>-3</sup>	1,418	1,16-1,74	1x10 <sup>-3</sup>	0,959	0,72-1,27	0,769
rs13015714	<i>IL18R1</i>	2	G	0,23	1,154	0,97-1,38	0,107	1,188	1,01-1,39	0,033	0,977	0,79-1,20	0,821
rs2897442	<i>KIF3A</i>	5	C	0,25	1,257	1,07-1,48	7x10 <sup>-3</sup>	1,054	1,03-1,42	0,498	1,197	0,98-1,46	0,081
rs479844	<i>OVOL1</i>	11	G	0,56	1,173	1,01-1,37	0,040	1,276	0,98-1,28	6x10 <sup>-4</sup>	0,924	0,77-1,11	0,395
rs2155219	<i>EMSY-LRRC32</i>	11	T	0,49	1,310	1,13-1,51	3x10 <sup>-4</sup>	1,121	0,96-1,27	0,085	1,177	0,99-1,40	0,070
rs2041733	<i>CLEC16A</i>	16	T	0,43	0,969	0,83-1,13	0,678	1,065	1,05-1,50	0,354	0,908	0,76-1,09	0,293
rs2164983	<i>ACTL9</i>	19	A	0,16	1,336	1,10-1,62	4x10 <sup>-3</sup>	1,252	1,05-1,50	0,014	1,067	0,85-1,34	0,579
rs6010620	<i>RTEL-TNFRSF6B</i>	20	G	0,76	1,109	0,93-1,32	0,247	1,207	1,11-1,47	0,021	0,918	0,74-1,14	0,432

Grün markiert = p-Werte < 0,05. SNP auch grün markiert, wenn p-Wert Fallvergleichsphänotyp ebenfalls < 0,05, Werte in Klammern = Fallzahlen nur für *FLG*-Genotyp

## 5.9. Assoziationsanalyse des kombinierten Phänotyps: AE + Asthma + AR

Es ergaben sich 223 Fälle, die die Definitionskriterien für alle drei atopischen Erkrankungen erfüllten (siehe Tabelle 14). Trotz der geringen Fallzahl dieses kombinierten Phänotyps wurden zwei signifikante Assoziationen identifiziert:

1. Die *FLG*-Nullmutationen zeigten sich auch hier signifikant mit einem OR von 3,379.
2. SNP rs2155219 zwischen den Genen *EMSY-LRRC32* mit einem OR von 1,395

Für den letzteren SNP zeigt sich in diesem Phänotyp im Vergleich zu den anderen Phänotypen die höchste Effektstärke.

Im Phänotyp des AE mit Ausschluss von Asthma und AR (AE-Asthma-AR) zeigte sich auffälliger Weise der SNP rs479844 des Gens *OVOLI* signifikant ( $p = 4 \times 10^{-3}$ ) mit deutlich höherem OR als im AE+Asthma+AR-Phänotyp (OR = 1,139).

Tabelle 14. Assoziationsanalyse des kombinierten Phänotyps AE + Asthma + AR

Phänotyp: AE + Asthma + AR					AE+Asthma+AR			AE-Asthma-AR			Subphänotypenanalyse		
					Fälle: 223 (212)			Fälle: 390 (352)			Fälle: 223 (212) (AE+Asthma+AR)		
					Kontrollen: 1646 (1622) (≠AE≠Asthma≠AR)			Kontrollen: 1646 (1622) (≠AE≠Asthma≠AR)			Kontrollen: 390 (352) (AE-Asthma-AR)		
SNP	Genort	Chr	RA	RAF	OR	95%KI	p-Wert	OR	95%KI	p-Wert	OR	95%KI	p-Wert
R501X+2282del4	<i>FLG</i>	1	G	0,04	3,379	2,28-5,01	1x10 <sup>-9</sup>	1,804	1,23-2,65	3x10 <sup>-3</sup>	1,794	1,14-2,84	0,012
rs2228145	<i>IL6R</i>	1	C	0,41	1,255	1,03-1,53	0,026	1,150	0,98-1,35	0,08	1,091	0,86-1,38	0,467
rs3771180	<i>IL1RL1</i>	2	G	0,86	1,263	0,94-1,70	0,126	1,301	1,03-1,65	0,03	0,973	0,68-1,40	0,883
rs13015714	<i>IL18R1</i>	2	G	0,23	1,063	0,84-1,35	0,609	1,136	0,94-1,37	0,18	0,941	0,72-1,23	0,658
rs2897442	<i>KIF3A</i>	5	C	0,25	1,304	1,05-1,62	0,017	1,063	0,89-1,27	0,51	1,231	0,95-1,60	0,118
rs479844	<i>OVOL1</i>	11	G	0,56	1,139	0,93-1,40	0,208	1,274	1,08-1,50	4x10 <sup>-3</sup>	0,899	0,71-1,14	0,384
rs2155219	<i>EMSY-LRRC32</i>	11	T	0,49	1,395	1,15-1,69	8x10 <sup>-4</sup>	1,06	0,91-1,24	0,45	1,337	1,06-1,69	0,015
rs2041733	<i>CLEC16A</i>	16	T	0,43	0,985	0,81-1,20	0,880	1,056	0,90-1,23	0,50	0,932	0,74-1,18	0,556
rs2164983	<i>ACTL9</i>	19	A	0,16	1,19	0,91-1,55	0,197	1,141	0,92-1,41	0,23	1,045	0,77-1,42	0,778
rs6010620	<i>RTEL-TNFRSF6B</i>	20	G	0,76	1,207	0,95-1,54	0,215	1,349	0,95-1,39	0,14	1,050	0,79-1,40	0,737

Grün markiert = p-Werte < 0,05. SNP auch grün markiert, wenn p-Wert Fallvergleichsphänotyp ebenfalls < 0,05, Werte in Klammern = Fallzahlen nur für *FLG*-Genotyp

## 5.10. Interaktionsanalyse der SNPs mit Berechnung des RERI

In den vorherigen Assoziationsanalysen wurde jeweils getestet, ob jeweils einer der SNPs allein das Risiko für die Ausprägung des AE-Phänotyps, einer persistenten Verlaufsform oder einer Kombination mehrerer atopischer Erkrankungen erhöht.

Ziel der Interaktionsanalyse war es festzustellen, ob das Vorhandensein zweier SNPs in Kombination das Risiko für die Ausprägung eines persistenten AE-Phänotyps überproportional erhöht, also ob möglicherweise eine Interaktion zwischen den SNPs stattfindet. Als Maß für diese Interaktion wurde das RERI verwendet (siehe statistische Analysen 4.4).

Es wurden in der ALSPAC mehrere SNP x SNP-Kombinationen mit positiven RERI und signifikanten p-Werten für den Phänotyp des persistenten AE identifiziert: Im Permutationstest für der empirischen p-Wert (p-emp) zeigten sich sechs SNP x SNP-Kombinationen signifikant (siehe Tabelle 15). Folgende drei dieser sechs Paare erreichten zusätzlich signifikante Werte für das 95%-KI im Bootstrap-Testverfahren.

1. *FLG x KIF3A*. (RERI: 1,13, p-emp:  $5 \times 10^{-3}$ , Bootstrap 95%-KI: [0,05; 1,53])
2. *FLG x IL18RL1*. (RERI: 0,79, p-emp:  $1 \times 10^{-4}$ , Bootstrap 95%-KI: [0,43; 1,90])
3. *IL18RI x RTEL1-TNFRSF6B*. (RERI: 0,55, p-emp: 0,013, Bootstrap 95%-KI: [0,04; 0,87])

In jeder der Interaktionsanalysen des SNPs rs3771180 (*IL1RL1*) hatte mind. eine Kombination mit einem anderen SNP < 10 Fälle. Daher wurden die Kombinationen dieses SNPs nicht in die Ergebnistabelle aufgenommen. Ebenso wurden die RERI für einzelne SNP x SNP-Kombinationen zwischen dem SNP des Genorts *RTEL1-TNFRSF6B* und den Genen *FLG*, *OVOL1* und *CLEC16A* nicht berechnet, da hier ebenfalls Kombinationen mit weniger als 10 Fällen auftraten (siehe gelb markierte Zellen in Tabelle 15).

Tabelle 15. SNP x SNP-Interaktionsergebnisse (RERI)

SNP x SNP-Interaktion Phänotyp: Persistente AE	n -/-	n +/-	n -/+	n +/+	RR +/-	RR -/+	RR +/+	RERI	p- emp	Bootstrap 95%-KI
<i>FLG x IL18R1</i>	261	42	162	39	1,80	0,99	2,58	0,79	5x10 <sup>-3*</sup>	[0,05;1,53]
<i>FLG x KIF3A</i>	223	36	200	45	1,70	1,11	2,93	1,13	1x10 <sup>-4**</sup>	[0,43;1,90]
<i>FLG x IL6R</i>	141	19	282	62	1,78	1,16	2,56	0,63	0,014	[-0,24;1,47]
<i>FLG x RTEL1-TNFRSF6B</i>	21	4	402	77	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
<i>FLG x OVOL1</i>	70	14	353	67	2,35	1,29	2,67	0,03	0,492	n. b.
<i>FLG x CLEC16A</i>	127	22	296	59	2,36	1,13	2,28	-0,21	0,707	n. b.
<i>FLG x ACTL9</i>	276	51	147	30	2,05	1,34	2,98	0,60	0,041	[-0,29;1,54]
<i>FLG x EMSY-LRRC32</i>	106	19	317	62	2,08	1,18	2,50	0,24	0,244	n. b.
<i>IL6R x IL18R1</i>	127	265	79	188	1,14	0,98	1,25	0,13	0,217	n. b.
<i>IL6R x KIF3A</i>	106	231	105	216	1,26	1,29	1,42	-0,12	0,800	n. b.
<i>IL6R x RTEL1-TNFRSF6B</i>	13	19	198	428	1,01	1,18	1,41	0,22	0,230	n. b.
<i>IL6R x OVOL1</i>	35	67	176	380	1,06	1,21	1,47	0,20	0,127	n. b.
<i>IL6R x CLEC16A</i>	64	139	147	308	1,27	1,17	1,34	-0,10	0,726	n. b.
<i>IL6R x ACTL9</i>	136	285	75	162	1,16	1,33	1,66	0,18	0,134	n. b.
<i>IL6R x EMSY-LRRC32</i>	48	115	163	332	1,37	1,42	1,60	-0,19	0,856	n. b.
<i>IL18R1 x KIF3A</i>	197	140	195	126	1,06	1,19	1,25	0,00	0,502	n. b.
<i>IL18R1 x RTEL1-TNFRSF6B</i>	22	10	370	256	0,55	1,01	1,11	0,55	0,013	[0,04;0,87]
<i>IL18R1 x OVOL1</i>	63	39	329	227	1,02	1,30	1,38	0,06	0,376	n. b.
<i>IL18R1 x CLEC16A</i>	118	85	274	181	1,15	1,15	1,16	-0,14	0,81	n. b.
<i>IL18R1 x ACTL9</i>	244	177	148	89	1,08	1,41	1,49	0,01	0,479	n. b.
<i>IL18R1 x EMSY-LRRC32</i>	97	66	295	200	1,01	1,21	1,30	0,08	0,323	n. b.
<i>KIF3A x RTEL1-TNFRSF6B</i>	14	18	323	303	1,35	1,44	1,69	-0,10	0,621	n. b.
<i>KIF3A x OVOL1</i>	49	53	288	268	1,21	1,35	1,59	0,03	0,42	n. b.
<i>KIF3A x EMSY-LRRC32</i>	87	76	250	245	1,12	1,20	1,44	0,11	0,227	n. b.
<i>KIF3A x CLEC16A</i>	104	99	233	222	1,16	1,08	1,28	0,05	0,38	n. b.
<i>KIF3A x ACTL9</i>	218	203	119	118	1,21	1,45	1,60	-0,06	0,61	n. b.
<i>RTEL1-TNFRSF6B x OVOL1</i>	4	98	28	528	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
<i>RTEL1-TNFRSF6B x LRRC32</i>	12	151	20	475	0,89	0,73	1,14	0,53	0,015	[-0,16;0,84]
<i>RTEL1-TNFRSF6B x CLEC16A</i>	9	194	23	432	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
<i>RTEL1-TNFRSF6B x ACTL9</i>	19	402	13	224	1,48	1,89	2,03	-0,34	0,821	n. b.
<i>EMSY-LRRC32 x CLEC16A</i>	50	153	113	342	1,35	1,19	1,42	-0,12	0,755	n. b.
<i>EMSY-LRRC32 x OVOL1</i>	25	77	138	418	1,14	1,23	1,56	0,19	0,163	n. b.
<i>EMSY-LRRC32 x ACTL9</i>	107	314	56	181	1,21	1,32	1,72	0,19	0,136	n. b.
<i>CLEC16A x OVOL1</i>	35	67	168	388	0,91	1,14	1,29	0,25	0,089	[-0,24;0,55]
<i>CLEC16A x ACTL9</i>	125	296	78	159	1,16	1,58	1,53	-0,22	0,884	n. b.
<i>ACTL9 x OVOL1</i>	59	362	43	194	1,47	1,72	1,97	-0,23	0,850	n. b.

+ = Risikoallel. - = Nicht-Risikoallel. p-emp = empirisch ermittelter p-Wert durch Permutations-Test mit 1000 bzw. \*10000 \*\*100000 Permutationen. Bootstrap 95%-KI = Bootstrap-Testverfahren mit 95%-Konfidenzintervall; dunkelgrün markiert: p < 0,05 und Bootstrap-95%-KI > 0. Gelb markiert: < 10 Fälle in einer Kombination, n. b. = nicht berechnet.

## 5.11. Signifikant assoziierte SNPs der Subphänotypenanalysen

Es waren insgesamt fünf SNPs in mind. einer der Subphänotypenanalysen signifikant assoziiert. Hervorzuheben sind die *FLG*-Nullmutationen, die sich mit allen Subphänotypen assoziiert zeigten und in beiden Interaktionskombinationen vertreten waren. SNP rs2897442 des Gens *KIF3A* wurde signifikant mit dem Phänotyp AE + Atopie und dem persistenten Phänotyp assoziiert. Außerdem zeigte sich in der Interaktionsanalyse ein signifikanter RERI für die Kombination mit *FLG*-Nullmutationen. Der einzige weitere SNP mit mehr als einer signifikanten Assoziation zu anderen Subphänotypen war der SNP rs2155219 zwischen den Genen *EMSY-LRRC32*, der sich neben der Assoziation zum persistenten Phänotyp noch signifikant für die Kombination der Phänotypen AE+AR und AE+Asthma+AR zeigte. Für die SNPs der Gene *IL6R* und *OVOL1* wurde jeweils eine Assoziation mit dem persistenten AE festgestellt. Die SNPs der Gene *IL18R1* und *RTEL1-TNFRSF6B* waren in der SNP x SNP-Interaktionsanalyse in Kombination miteinander und *IL18R1* zusätzlich in Kombination mit *FLG*-Nullmutationen signifikant mit dem AE assoziiert.

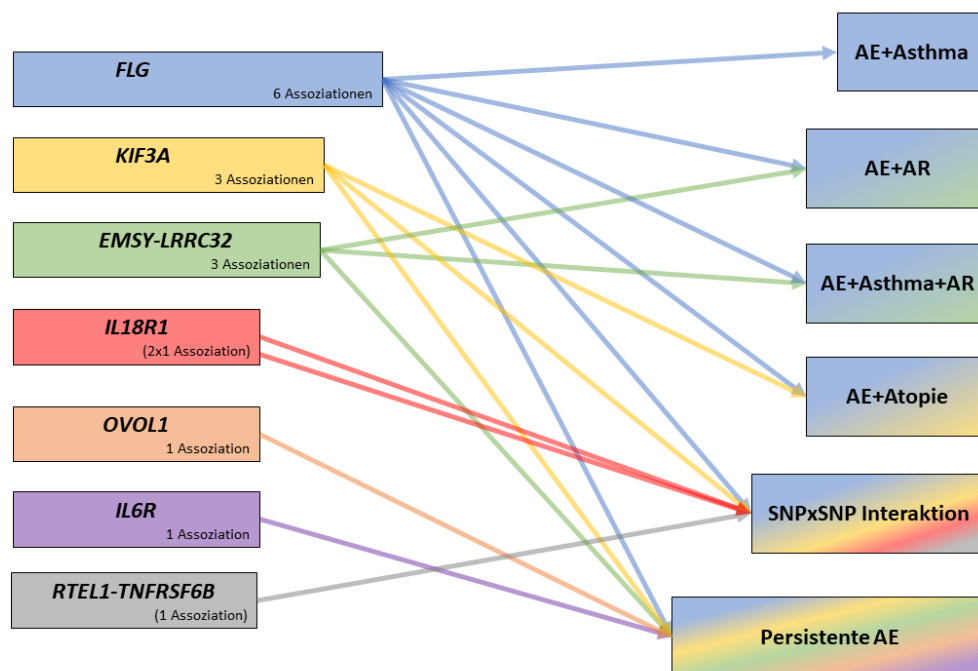


Abbildung 9. Übersicht assoziierter SNPs aus Subphänotypenanalysen

Pfeile kennzeichnen signifikante Assoziationen.



## 6. Diskussion

Ich habe in dieser Arbeit alle 27 bis zum Juli 2013 durch GWAS entdeckten Risiko-Genorte für das AE in der longitudinalen ALSPAC-Kohorte untersucht. Nur durch die große Fallzahl dieser Geburtskohorte und die Nachverfolgung über den langen Zeitraum von 14 Jahren im Rahmen des prospektiven Ansatzes war es möglich die SNPs auf ihren Einfluss bezüglich der Persistenz der Erkrankung, Kombinationen von atopischen Erkrankungen und auf SNP x SNP-Interaktionen zu untersuchen. Dies ist insofern interessant, als dass den SNP x SNP-Interaktionen, ein Anteil an der noch fehlenden Heritabilität für komplexe Erkrankungen wie dem AE zugeschrieben wird.<sup>(72)</sup> Allerdings wurden aufgrund der häufig mangelnden Power erst wenige signifikante Ergebnisse diesbezüglich entdeckt.<sup>(109)</sup>

Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse dieser Studie anhand aktueller Literaturlage kritisch diskutiert werden, wobei auch auf mögliche immunologische Wirkmechanismen und Signalwege involvierter Gene eingegangen wird. Es erfolgt eine Prüfung der assoziierten SNPs hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit einer klinischen Signifikanz der Variante. Dies beinhaltet die Einschätzung der funktionellen Auswirkung des Basenaustausches, also die Fragen, ob der SNP in einer kodierenden Genregion liegt, wenn ja, ob die Aminosäuresequenz verändert wird (siehe 6.6 rs2228145-*IL6R*) oder sogar ein Stopp-Codon bzw. Nullmutation die Folge ist (siehe 6.5 *FLG*-Nullmutation). Sehr viel häufiger jedoch liegen SNPs die mit komplexen Erkrankungen, wie dem AE, assoziiert sind in einer nicht-kodierenden Sequenz im Genom<sup>(110)</sup>, z.B. im Intron oder intergenisch. In diesen Fällen liegen möglicherweise genregulierende Funktionen vor<sup>(110)</sup> und daher werden die angrenzenden Gene hinsichtlich ihrer Funktion und Genexpressionsraten analysiert, die SNP-spezifisch variieren können. Um die am wahrscheinlichsten durch die jeweiligen SNPs beeinflussten Gene zu identifizieren, werden sogenannte *Expression quantitative trait locus* (eQTL)<sup>(111)</sup>-Daten der SNPs zu Hilfe genommen und dargestellt. Diese Daten zeigen die Assoziation der Genexpression in Zusammenhang mit Vorhandensein eines bestimmten SNPs in einem bestimmten Gewebe an und dabei wird auch die Signifikanz, Höhe und Richtung der Genexpression berechnet. Nützlich ist dies z.B. bei intergenischen SNPs, da man so die Assoziation des Vorhandenseins eines bestimmten SNPs mit der Genexpression der angrenzenden Gene in einem bestimmten Gewebe vergleichen kann. So ergibt sich ein Hinweis darauf, auf welches der angrenzenden Gene die SNPs einen Einfluss haben und zusätzlich, ob der Effekt eine verminderte Expression oder eine erhöhte Expression des Gens ist. Wenn die Genfunktion bekannt ist, lässt sich daraus ableiten, ob der abgeschätzte Effekt kongruent ist mit einem vermuteten krankheitsverstärkenden Signalweg. Die eQTL-Daten sind auch bei einem Satz vieler

nahegelegener SNPs in LD von Nutzen, um mögliche kausale Varianten herauszufiltern.<sup>(112)</sup> Außerdem gibt die Gewebespezifität der eQTL einen weiteren Anhaltspunkt auf die Wirkweise der SNPs. So wird man z.B. bei einem SNP, bei dem man eine Assoziation mit dem AE festgestellt hat und einen Einfluss auf die Hautbarriere vermutet eine signifikante eQTL-Assoziation mit einer Genexpression eines Gens in einer Hautprobe erwarten und dort in einer Weise die z.B. eine Verminderung eines Hautbarriereproteins verursacht. Andersherum wird man bei einem SNP der vermeintlich eine proinflammatorische Wirkung auf das AE hat eine erhöhte Genexpression in eQTL-Daten von Zellen des Immunsystems wie Lymphozyten erwarten und dort am ehesten in einem Gen, was eine Stimulation des Immunsystems bewirkt. In Fällen, in denen noch jeglicher Anhalt für die Funktion von SNPs fehlt, sind die Daten auch insofern eine Hilfe, als dass eine eQTL-Assoziation zu einem bestimmten Gen in einem bestimmten Gewebe einen Hinweis auf mögliche näher zu betrachtende Signalwege gibt. Trotz der Qualitäts- und funktionellen Prüfung der SNPs lässt sich nicht immer die ursächliche Variante mit letzter Sicherheit bestimmen, sodass auch die gefundenen Assoziationen meiner Arbeit unter diesem Gesichtspunkt zu sehen sind.

## **6.1. Studienpopulation und Phänotypen**

Die untersuchte, englische ALSPAC-Kohorte ist als große longitudinale, bevölkerungsbasierte Geburtskohorte sehr gut geeignet, um den Langzeitverlauf des AE zu untersuchen. Aufgrund der langen Dauer der Studie konnten viele individuelle Verlaufsdaten erhoben werden. Auch die Auswahl einer großen Kontrollgruppe war durch die longitudinale Studienform und den langen Nachverfolgungszeitraum von 14 Jahren gut möglich. Da das AE schubförmig verläuft kann die Auswahl einer validen Kontrollgruppe in anderen Studientypen Schwierigkeiten bereiten, die hier nicht gegeben sind. Durch die große Zahl an teilnehmenden Kindern sind auch Aussagen zu SNPs mit geringer AF des Risikoallels noch möglich wie z. B. rs16999165 (AF von 3%). Ebenfalls ergab sich so zu spezifischen Phänotypkombinationen wie AE+Asthma noch eine hinreichende Anzahl an Fällen (433) und etwas eingeschränkt sogar noch zu der Kombination aller drei atopischen Erkrankungen AE+Asthma+AR (234 Fälle). Auch Interaktionsberechnungen wurden durch die große Studienpopulation ermöglicht. Allerdings wurden für einige SNP x SNP-Kombinationen die Fallzahlen sogar in dieser großen Kohorte schon zu klein für aussagekräftige Ergebnisse (siehe Tabelle 14). Eine klare Stärke ist, dass die Daten prospektiv erhoben wurden. Der Aufbau mittels Fragebögen hat dagegen Vor- und Nachteile. Der Vorteil ist die große Anzahl an Daten, die mittels Interviewverfahren oder Arzt-Konsultationen nicht bzw. nur mit beträchtlichem Aufwand an Zeit und Personal möglich gewesen wäre. Um möglichen Fehleinschätzungen der Eltern

entgegenzuwirken, wurde eine zweite Frage „Did your child have eczema in the last 12 months?“ mit der konkreten Frage nach AE mit als Einschlusskriterium für den AE-Phänotyp einbezogen und es wurden drei positive Antworten zu unterschiedlichen Befragungszeitpunkten gefordert. Eine höhere Spezifität hätte ggf. durch die Forderung nach einer positiven Diagnose eines Arztes erreicht werden können. Es erfolgte zumindest der Ausschluss von Kindern, bei denen eine negative Diagnose eines Arztes erfolgt war im Studienverlauf. Eine mögliche Fehlerquelle bezüglich des Asthma-Phänotyps ist, dass infektbedingte, frühkindliche obstruktive Bronchitiden des Säuglings- und frühen Kleinkindalters vom Asthma abzugrenzen sind, die zwar ähnliche klinische Symptome zeigen können, jedoch nicht regelhaft in ein Asthma übergehen. Um diese Fälle möglichst auszuschließen, wurden die Fragebogendaten erst ab dem Alter von 6 Jahren berücksichtigt.

Auf den ersten Blick verwundert die relativ hohe Zahl von 658 persistenten und damit meist auch schwereren Fällen, die sich aus den 1562 Fällen des frühen AE nach den in dieser Arbeit verwendeten Definitionskriterien ergibt, was 42,1% entspricht. In den Daten der MAS-Studie aus dem Jahr 2004 wurde lediglich bei 18,9% der Kinder ein persistenter Phänotyp des AE festgestellt. Allerdings wurde dort die Definition enger gefasst und Kinder wurden nur in die persistente Gruppe eingeordnet, wenn sie in allen jährlichen Kontrollen ein AE zeigten.<sup>(19)</sup> Wenn ein Kind also in einem der sieben jährlichen Testzeitpunkte kein AE hatte, wurde die Erkrankung als „intermittierend“ gewertet. Von den 38% der Kinder, die dort als intermittierenden AE-Typen waren, wären also nach der in meiner Arbeit verwendeten Definition noch eine große Anzahl als persistent gewertet worden. Im Vergleich zur besagten Studie beschreibt der transiente Typ meiner Arbeit eine schwächere Form als die intermittierende Form der MAS-Studie und deren persistenter Typ beschreibt dafür eine schwerere Verlaufsform des AE als der persistente Typ meiner Arbeit. Außerdem sind deutlich höhere Prävalenzraten des AE im Vereinigten Königreich im Vergleich zu Deutschland in der ISAAC Studie beschrieben worden (siehe Kapitel 2.1). Eine Studie, die sich auf deutsche Daten der ISAAC Studie Phase II (1996-1997)<sup>(113)</sup> und deren Nachfolgestudie SOLAR (Beginn 2002)<sup>(114)</sup> bezieht, hat eine Persistenzrate von 49% bei Jugendlichen festgestellt, die vor dem Start der Studie als Kinder schon ein AE hatten. Gefordert war dort eine ärztliche Diagnose eines AE vor der Studie und Symptome im Verlauf bis zu einer bestätigten Diagnose am Studienende nach dem Beobachtungszeitraum von über 10 Jahren.<sup>(26)</sup> Diese Ergebnisse unterstreichen die in meiner Arbeit dargestellten Ergebnisse zu den Persistenzraten des AE und bekräftigen die hier als Grundlage gewählten Definitionskriterien.

## 6.2. Einfluss auf den atopischen Marsch

Die *FLG*-Nullmutationen zeigten in allen kombinierten Phänotypen AE+AR, AE+Asthma, AE+Atopie und AE+Asthma+AR signifikante Ergebnisse. Der SNP rs2155219 des Genorts *EMSY-LRRC32* war signifikant mit dem AE+AR-Phänotyp assoziiert und zusätzlich mit dem Kombinationsphänotyp aller drei atopischen Erkrankungen AE+Asthma+AR. Für die Phänotypen AE+Atopie zeigte dieser SNP jedoch keine Signifikanz und im AE+Asthma Phänotyp wurde mit einem p-Wert von 0,07 lediglich eine Tendenz festgestellt. Als Grund kommt eine mangelnde Power in Frage, da nur noch weniger als ein Drittel der Fälle des AE-Phänotyps also um die 420-Fälle bei den kombinierten Phänotypen vorlagen. Der Genort bei *KIF3A* zeigte in der Kombination AE+Atopie ein signifikantes Ergebnis und zeigte wahrscheinlich auf Grund von fehlender Power keine Signifikanz für AE+Asthma. Diese Daten sprechen also dafür, dass sowohl das Vorliegen des SNPs im Genort *EMSY-LRRC32*, *KIF3A*, als auch im *FLG*, die Ausprägung eines Krankheitstyps des AE mit IgE-Erhöhung begünstigen. Dies wird auch durch die vielen seither publizierten Assoziationen dieser Genorte mit Phänotypen verschiedener atopischer Erkrankungen bestätigt. Genauer wird darauf bei der Diskussion der einzelnen SNPs eingegangen (siehe Kapitel 6.6). Für *FLG*-Nullmutationen ist ein positiver Einfluss auf die Ausbildung von Asthma und Heuschnupfen im weiteren Verlauf nach einem AE als Ersterkrankung schon 2006 beschrieben worden.<sup>(32)</sup> So kann auch für diese Arbeit konstatiert werden, dass *FLG*-Nullmutationen Erkrankungen des atopischen Formenkreises in Kombination mit AE begünstigen.

Einige der untersuchten SNPs dieser Arbeit wie rs479884 (*OVOLI*) oder rs2228145 (*IL6R*) zeigen lediglich eine Assoziation mit dem Phänotyp der persistenten AE und scheinen also nur das Risiko für eine chronische AE zu steigern ohne signifikanten Einfluss auf andere atopische Erkrankungen. Dies spricht dafür, dass es neben den oben beschriebenen SNPs mit Hinweisen für einen Einfluss auf einen atopischen Marsch, auch SNPs gibt, die eine Form des AE begünstigen, die unabhängig von anderen atopischen Erkrankungen besteht.

## 6.3. Ursachen für nicht replizierte SNPs

Wie in Tabelle 7 des Ergebnisteils dargestellt, zeigten 10 der 27 untersuchten SNPs eine nominell signifikante Assoziation zum AE-Phänotyp dieser Arbeit. Das sind deutlich mehr, als bei einer zufälligen Auswahl an SNPs zu erwarten gewesen wäre: Bei einem nominellen Signifikanzniveau von 5% hätten nur 1,35, also 1-2 SNPs, eine signifikante Assoziation gezeigt. Darüber hinaus bestätigten alle 10 der 10 SNPs eine Assoziation mit demselben Risikoallel und derselben Effektrichtung.

Wie ebenfalls in der Tabelle ersichtlich war die Studienpopulation bei acht der 13 SNPs, die keine Signifikanz zeigten aus Asien. Umgekehrt wurden nur zwei der insgesamt 10 SNPs aus asiatischen Populationen in der hier untersuchten europäischen ALSPAC-Kohorte repliziert. Genauer betrachtet sieht man bei jenen SNPs in vielen Fällen auch einen deutlichen Unterschied in den AF gegenüber den AF in der ALSPAC. Im Gegensatz dazu zeigen die AF der europäischen GWAS und der Metastudien-GWAS im Vergleich zu dieser Arbeit, wie erwartet, sehr ähnliche AF. Dies könnte für eine begrenzte Vergleichbarkeit der SNPs in Populationen unterschiedlicher Ethnie sprechen. Eine Studie mit dieser Fragestellung, die weltweite GWAS-Ergebnisse analysierte und verglich ergab, dass bis zum Jahr 2009 rund 96% aller GWAS und bis zu Jahr 2017 noch ca. 80% in europäischen Populationen durchgeführt wurden.<sup>(115)</sup> Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Übertragbarkeit von SNP-vermittelten Risiken zwischen GWAS unterschiedlicher Ethnien begrenzt ist und eher vermieden werden sollte.<sup>(115)</sup> Eine große Studie des *New England Journal of Medicine* von 2016<sup>(116)</sup> zur Untersuchung des Einflusses von fraglich pathogenen SNPs auf die Diagnose einer hypertrophen Kardiomyopathie in der amerikanischen Bevölkerung unterstreicht die Problematik: Dort wurde gezeigt, dass bei den Entdeckungstudien, die zur Klassifikation der vermeintlichen Pathogenität der damals wichtigsten SNPs führten, relativ kleine Studienpopulationen mit fehlender oder geringer Zahl an Menschen afrikanischer Herkunft verwendet wurden. So kam es Aufgrund genetischer Testung mit Feststellung von scheinbar pathogenen SNPs zur Fehldiagnose bei Amerikanern mit schwarzer Hautfarbe. Nicht berücksichtigt war, dass jene SNPs in dieser Bevölkerungsgruppe deutlich häufiger vorkommen als bei weißen Amerikanern (AF 3-27% gegenüber AF 0,02-3%) und darüber hinaus als nicht pathogen zu betrachten sind. Dies zeigt auch die inzwischen erfolgte Reklassifizierung zweier der auf die Fehldiagnosen-Fälle hinleitenden SNPs von pathogen auf nicht-pathogen. Dies hätte laut der Studie bereits durch den Einschluss von 10 % Teilnehmern afrikanischer Ethnie in die Kontrollgruppe festgestellt werden können.<sup>(116)</sup>

Auf diese Arbeit bezogen kann es also sein, dass SNPs, die in der asiatischen Bevölkerung mit AE assoziiert sind, nicht zwangsweise in der europäischen Bevölkerung eine Rolle spielen. Ein Grund für ein unterschiedliches Vorkommen oder auch unterschiedliche Funktionalität einzelner SNPs, könnte der im Laufe menschlichen Evolutions- und Weltbesiedlungsprozesses erfolgte Gendrift aufgrund von äußeren Selektionsfaktoren wie das Klima sein. Ein Beispiel hierfür ist eine Studie von 2015,<sup>(117)</sup> in der beschrieben wurde, dass ein SNP, der signifikant mit einer Anpassung im Omega-3-Fettsäure-Stoffwechsel sowie signifikant mit der Körpergröße assoziiert ist in der Population der Inuit mit einer AF von 98% vorkommt. Im Gegensatz dazu, hat dieser SNP einer AF von 0,02% in Menschen europäischer Herkunft und ist dennoch ebenfalls positiv mit der

Körpergröße assoziiert. Der SNP war für die Körpergröße noch nicht bekannt in europäischen Populationen, weil die AF wahrscheinlich zu gering war, um den SNP mit GWAS zu identifizieren. Dieses Beispiel zeigt umgekehrt, dass die Funktion einiger SNPs in verschiedenen Populationen gleich, ihre Rolle am Gesamterkrankungsrisiko aber variabel sein kann, weil sich ihre Häufigkeit in unterschiedlichen Populationen teilweise deutlich unterscheiden. Bei den hier untersuchten SNPs trifft das beispielsweise für den SNP rs16999165 (*CYP24A1-PFDN4*) zu, der in einer japanischen Kohorte entdeckt wurde und dort eine AF von 0,31 hatte. Demgegenüber hat der SNP in der ALSPAC-Kohorte lediglich eine AF von 0,03. Mit dem errechneten p-Wert von 0,08 zeigte er keine signifikante Assoziation. Wie in den Powerkalkulationsgrafiken (siehe Abbildungen 6 und 8) dargestellt, wäre mind. eine OR von 1,3 notwendig gewesen für die Identifizierung eines signifikanten Effekts bei dieser geringen AF. Der SNP des Gens *CYP24A1-PFDN4* erreichte mit einer OR von 1,25 diesen Wert jedoch nicht. Ähnliches gilt für rs12295535 (*PRR5L*), der in der ALSPAC ebenfalls eine AF von lediglich 0,03 hat.

Die restlichen sieben SNPs, die keine Signifikanz zeigten, waren aus europäischen GWAS. Sechs von diesen SNPs der Gene *ZNF652*, *RUNX3*, *ERBB3*, *IL2-IL21*, *RAD50*, *IL13* waren häufige SNPs. Für die fünf letztgenannten SNPs wurden p-Werte zwischen 0,05 und 0,1 berechnet. Andere SNPs dieser Kohorte mit minimal höheren OR oder AF wurden signifikant assoziiert. Es scheint also, dass bei den genannten SNPs wahrscheinlich eine geringfügig größere Power durch eine etwas größere Kohorte bzw. Fallzahl notwendig gewesen wäre, um einen Effekt festzustellen.

#### **6.4. Assoziierte SNPs und betroffene Genregionen**

In folgendem Abschnitt werden die SNPs diskutiert, die in den vorliegenden Assoziationsanalysen der Verlaufs- und kombinierten Phänotypen das 5%-Signifikanzniveau erreichten. Ihr möglicher pathogenetischer Einfluss auf das AE wird anhand der aktuellen Studienlage diskutiert. Unterteilt und diskutiert werden die SNPs in zwei Gruppen:

SNPs, dessen nahegelegenstes Gen die Hautbarriere beeinflusst und SNPs, dessen zugehöriges Gen sich auf das Immunsystem auswirkt.

#### **6.5. SNPs mit Wirkungen auf die Hautbarriere**

Die Haut ist bei dem AE in charakteristischer Weise betroffen. Im Folgenden werden die Assoziationen der kombinierten *FLG*-Nullmutationen und des SNP rs479844 des Gens *OVOLI* diskutiert, die jeweils an unterschiedlicher Stelle die Bildung einer intakten Hautschicht beeinträchtigen.

### ***FLG*-Nullmutationen R501X und 2282del4**

*FLG* ist das am besten replizierte und am stärksten mit dem AE assoziierte Gen.<sup>(73)</sup> Der kombinierte Genotyp der beiden *FLG*-Nullmutationen ist in der ALSPAC-Kohorte sowohl mit allen untersuchten kombinierten AE-Subphänotypen signifikant (AE+Asthma, AE+AR, AE+Asthma+AR, AE+Atopie), als auch mit dem persistenten AE, jeweils mit hohen Effektstärken. Dies stimmt mit den publizierten Studienergebnissen überein, die Assoziationen mit kleineren Studien zu diesen Phänotypen schon beschrieben haben<sup>(3,32,118)</sup>.

Beide in dieser Arbeit untersuchten *FLG*-Nullmutationen betreffen Exon 3 des *FLG* auf Chromosom 1. R501X bedingt durch die Veränderung der Nukleinbase Cytosin zu Thymin die Formation eines Stoppcodons, statt der Bildung der Aminosäure Arginin. 2282del4 führt zu einer Deletion von vier Basenpaaren und damit zu einer Leserasterverschiebung. In der Folge beider *FLG*-Nullmutationen entsteht ein gekürztes Profilaggrin, was nicht zum funktionsfähigen Filaggrin prozessiert werden kann. Der resultierende Hautbarrieredefekt führt zu einem verstärkten Allergenkontakt über die geschädigte Haut und vermehrten Sensibilisierungen, die über verstärkte Produktion von spezifischem IgE zu allergischen Reaktionen führen können (siehe Abbildung 2). Im Mausmodell wurde gezeigt, dass eine Sensibilisierung über die Haut neben einer Lokalreaktion in der Haut auch eine Reaktion in der Lunge und Nase verursachte.<sup>(119)</sup> Dies bekräftigt den Mechanismus der epikutanen Sensibilisierung für Allergene, da Filaggrin nicht im respiratorischen Epithel der Lunge exprimiert wird<sup>(120)</sup> und somit dort bei Fehlen nicht die Hautbarrierefunktion beeinträchtigt. Dies könnte erklären, warum eine *FLG*-Nullmutation ohne AE keinen signifikanten Effekt auf den Asthma-Phänotyp hat. Es scheint, dass erst die typisch entzündlich veränderte Haut bei AE, in Verbindung mit der durch *FLG*-Nullmutationen verstärkten Barrierefunktionsstörung, die signifikante Risikoerhöhung für die atopischen Begleiterkrankungen mit sich bringt oder dass das AE-assoziierte Asthma als Subform des Asthmas anzusehen ist. 30,8% (209 von 678) der *FLG*-Nullmutations-Träger der ALSPAC wurden nach den Kriterien dieser Arbeit dem AE zugeordnet, wohingegen 23,2% der Träger (157 von 678) unter den Kontrollen waren. Die restlichen 46% erfüllten weder die Kriterien des einen noch des anderen Phänotyps. Im Literaturvergleich einer Metaanalyse von Fall/Kontroll- und Familienstudien aus dem Jahr 2007 liegen die Träger-AF dieser zwei häufigsten *FLG*-Nullmutationen durchschnittlich niedriger in beiden Gruppen (22,9% mit AE und 8,2% *FLG*-Nullmutationen in Kontrollen).<sup>(74)</sup> Allerdings wurde in der Metaanalyse auch festgestellt, dass die Trägerraten bei AE-Patienten im Vereinigten Königreich deutlich höher lagen, als in Kontinentaleuropa und die *FLG*-Allelträgerfrequenzen dort zwischen 25-45% betragen.<sup>(118)</sup> Insofern liegen meine Ergebnisse in diesem Rahmen. Nachfolgend wurde im Jahr 2009 in einem

*FLG Knockout* Mausmodell gezeigt, dass homozygote *FLG Knockout* Tiere eine verstärkte T<sub>H</sub>2-dominierte, aber T<sub>H</sub>17 und T<sub>H</sub>1 gestützte, Immunreaktion als Folge auf eine Allergenexposition mit Ovalbumin über die Haut zeigten.<sup>(121)</sup> Mastzellen, Eosinophile und T-Zellen waren signifikant vermehrt nachweisbar. Diese Reaktion wurde auf nicht sichtbar entzündeter Haut ausgelöst und war bei heterozygoten- oder Wildtyp-*FLG*-Mäusen nicht feststellbar. Außerdem kam es bei den Mäusen mit *FLG*-Nullmutation zu keiner AE-vergleichbaren Hautentzündung unter allergenfreien Bedingungen. Somit wurde bestätigt, dass eine Filaggrin-defekte Hautbarriere die Penetration von Allergenen bedingt, die dann verstärkte Immunreaktionen mit T<sub>H</sub>2-Anteil verursachen können. Dies implizierte auch, dass zu dem Hautbarriere-defekt noch Umwelt- oder andere entzündungsfördernde Faktoren hinzukommen, um an der Pathogenese des AE mitzuwirken.

#### **rs479844 - *OVOL1***

Der SNP zeigte eine signifikante Assoziation mit dem AE-Persistenz-Subphänotyp (OR = 1,36, p = 0,01). In den letzten Jahren wurde der SNP in GWAS aus den Jahren 2015<sup>(122)</sup>, 2017<sup>(35)</sup> und 2019<sup>(123)</sup> mit genomweiter Signifikanz für den Phänotyp des AE repliziert sowie 2015<sup>(124)</sup> für einen Phänotyp des atopischen Marsches. In kleineren Fall-Kontrollstudien mit n = 435 aus China<sup>(125)</sup> und n=1137 aus Italien<sup>(79)</sup> wurde der gleiche SNP untersucht und in der chinesischen Kohorte ebenfalls signifikant mit dem AE assoziiert. In der italienischen Kohorte zeigte sich jedoch keine Signifikanz. Die italienischen Autoren erwägen neben einer relativ geringen Power der Studie auch eine Populationsheterogenität als Ursache.<sup>(79)</sup> In einer neuen Studie aus dem Jahr 2018 wurde für SNPs des Genorts ebenfalls eine signifikante Assoziation für einen persistenten Phänotyp gezeigt.<sup>(20)</sup> In den Phänotypenkombinationen des AE mit anderen atopischen Erkrankungen zeigte sich in dieser Arbeit keine zusätzliche Signifikanz im Vergleich zu dem AE-Phänotyp allein. Dies ist deckend mit den Ergebnissen der GWAS-Metaanalyse aus dem Jahr 2015, die durch größere Power eine Assoziation des SNPs mit dem Phänotyp frühes AE + Asthma mit genomweiter Signifikanz gezeigt hat, jedoch ebenfalls keine zusätzliche Signifikanz des kombinierten Phänotyps gegenüber dem AE-Phänotyp allein feststellte.<sup>(124)</sup> Zusammenfassend bekräftigen die Replikationen des SNPs in vielen GWAS die Assoziationsergebnisse meiner Arbeit.

Der untersuchte SNP liegt zwischen den Genen *AP5B1* (*Adaptor Related Protein Complex-5 Subunit Beta 1*) und *OVOL1*. In einer GWAS aus dem Jahr 2017 wurde die stärkste Assoziation dieses SNPs mit der Expression von *OVOL1* in lymphoblastoiden Zelllinien festgestellt.<sup>(35)</sup> Zusätzlich verweist eine GWAS aus dem Jahr 2015 auf ein *OVOL1* Knockout Mausmodell, das eine verzögerte Entwicklung der Hautbarriere zeigte.<sup>(122)</sup> Diese Daten sind ein starker Hinweis für einen funktionellen Zusammenhang des *OVOL1*-Genorts mit der Hautbarriere und mit der



Lymphozytenfunktion beim AE. Das OVOL1-Protein nimmt Einfluss auf die Regulation, die Entwicklung sowie die Differenzierung von epithelialen Geweben. Die Proteine OVOL1 und OVOL2 sind als Gegenspieler involviert in die Regulierung der Zellproliferation menschlicher Keratinozyten der Haut. Sie halten sich gegenseitig und damit das Keratinozytenwachstum im Gleichgewicht. OVOL2 fördert die Zellproliferation und wird durch OVOL1 gehemmt. Zusätzlich wirkt *OVOL1* als Repressor des zellproliferationssteigernden c-Myc-Signalwegs in Keratinozyten. Fällt die Funktion von OVOL1 aus oder wird es vermindert exprimiert, möglicherweise durch den vorliegenden SNP, so kommt das System aus dem Gleichgewicht zugunsten von Hyperproliferation und Verhornung der Keratinozyten. Unterstreichend wurde im Mausmodell mit ausgeschaltetem (=Knockout) *OVOL-1*-Gen eine epidermale Hyperproliferation und Haarschaftveränderungen gesehen.<sup>(9,10)</sup> Bei Menschen mit AE könnte dieser Mechanismus zum klinisch-histologischem Korrelat der Akanthose, also verbreitertem *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) der Epidermis, über mangelnde Differenzierung und Hyperproliferation von Keratinozyten mit trockener, unregelmäßig verhornter Haut und einer gestörten Hautbarriere beitragen (siehe Abbildung 10).<sup>(126)</sup>

Ein weiterer Aspekt ist, dass eine verminderte Expression von Involucrin und *FLG* in *OVOL1*-Knockout-Mäusen gezeigt wurde.<sup>(127)</sup> Der Verlust dieser Stützproteine der Epidermis führt ähnlich wie bei *FLG*-Nullmutationen zu einer gestörten Barrierefunktion der Haut. In einer 2017

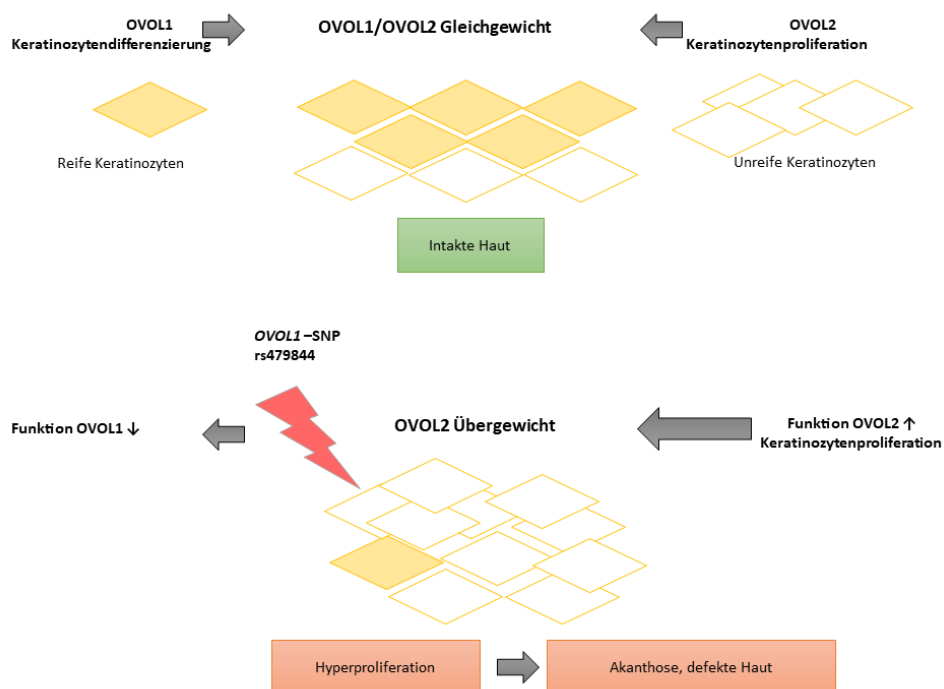


Abbildung 10. rs479844 (*OVOL1*) - möglicher Einfluss

Funktionseinschränkung des *OVOL1*-Gens => Übergewicht zugunsten OVOL2 => Hyperproliferation und mangelnde Differenzierung der Keratinozyten => Akanthose der Epidermis mit Funktions- und Strukturverlust. (Abbildung schematisch im Wesentlichen nach Tsuji et al. (2013).)

veröffentlichten japanischen Studie<sup>(128)</sup> an humanen Keratinozyten wurde ein Mechanismus entdeckt, der *FLG* und *OVOLI* verbindet. *OVOLI* ist demnach an der *FLG*-Expression beteiligt. Bei Aktivierung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AHR) durch bestimmte Liganden kann *OVOLI* direkt die Expression von *FLG* steigern.<sup>(128)</sup> Der vorliegende *OVOLI*-SNP könnte also zusätzlich eine verminderte Expression von *FLG* und konsekutive Hautbarrieredefekte zur Folge haben. Beide erläuterten Funktionen des Gens bieten plausible Erklärungsansätze für die in dieser Arbeit gefundenen Assoziationen mit einem persistenten AE, da Hinweise für einen genetisch bedingten Hautdefekt der Epidermis bestehen.

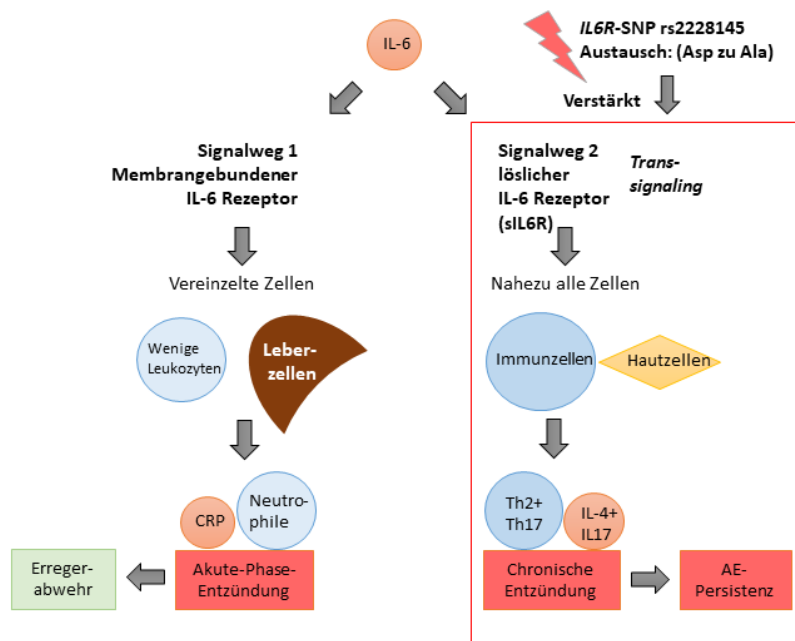
## 6.6. SNPs mit Wirkungen auf das Immunsystem

Im Folgenden werden die Ergebnisse der SNPs diskutiert, deren nahegelegenste Gene Wirkungen auf das Immunsystem haben. Zudem erfolgt eine Funktionsbeschreibung der spezifischen Signalwege des nahegelegensten Gens des SNPs in Bezug auf die entzündlich veränderte Haut bei AE. Dabei werden mögliche relevante Funktionsänderungen diskutiert, die eine Risikoerhöhung des jeweiligen SNPs auf die Ausprägung einer persistenten AE oder mit anderen atopischen Erkrankungen kombinierte AE erklären.

### rs2228145 – *IL6R*

Der SNP im IL-6-Rezeptor-Gen wurde in der vorliegenden Untersuchung als Risiko-Genort für das AE bestätigt und zeigte weitergehend eine signifikante Assoziation zum Phänotyp der persistenten Form des AE (OR 1,231, KI 1,09-1,39,  $p=0,014$ ). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der Studie, die den SNP als Risiko-Genort für das AE entdeckte und auch schon eine Verbindung zum persistenten Typ herstellte.<sup>(5)</sup> In der Literatur wurde der SNP in mehreren großen GWAS zum AE repliziert,<sup>(122,124,35)</sup> zusätzlich zu den drei schon zuvor genannten auch in einer neueren GWAS aus dem Jahr 2019<sup>(123)</sup> für den Phänotyp „AE und/oder AR“. Der SNP führt zu einem Aminosäuren-Austausch von Asparagin zu Alanin und stellt somit einen funktionellen SNP dar.<sup>(5)</sup> Die Folge ist eine verstärkte Spaltung des IL-6 Rezeptors und resultierend eine Erhöhung der löslichen Form des IL-6 Rezeptors im Serum (sIL6R, englisch: *Soluble interleukin-6-receptor*) um das 2-fache<sup>(129)</sup>, bei gleichzeitiger Reduktion des membranständigen Rezeptors. Bei am AE leidenden Menschen wurden signifikant höhere Werte des sIL6R gemessen. Durch die lösliche Form des Rezeptors kann IL-6 im Gegensatz zum Signalweg über den membranständigen Rezeptor IL6R, der ist auf Hepatozyten und wenige Leukozyten-Subgruppen limitiert ist, in weiteren Zelltypen/Geweben des Körpers durch sogenanntes „*Trans-signaling*“ wirken (siehe Abbildung 11). Über den membranständigen Signalweg werden vor allem akute-Phase-

Reaktionen vermittelt, mit Bildung von CRP (C-reaktives Protein) in Leberzellen und Stimulation des angeborenen Immunsystems mit vorwiegend Neutrophilen zur Erregerabwehr. Vermutet wird, dass der IL-6 *Trans-signaling*-Signalweg über den sIL6R dagegen bedeutsam in der Überleitung eines Entzündungsprozesses von akuter zu chronischer Entzündung ist.<sup>(130)</sup> Eine Erklärung ist eine Wirkungsvermittlung durch Stimulation des erworbenen Immunsystems über T-Zellen, die den membranständigen Rezeptor nicht exprimieren und daher durch das *Trans-signaling* über den sIL6R nur bei Vorkommen des SNPs aktiviert werden (siehe Abbildung 11, rechter Signalweg).<sup>(131)</sup> Die Verstärkung dieses Signalwegs durch den *IL6R*-SNP könnte so zur Verschiebung der Immunreaktion zu einer persistenten Entzündung wie bei dem AE beitragen, passend zur Assoziation des SNPs im persistenten AE-Phänotyp (siehe Tabelle 10). In einem Mausmodell wurde durch die Provokation mit Kakerlaken-Antigen eine Erhöhung von sIL6R bewirkt, die eine vorwiegend  $T_H17$  dominierte, asthmatische Immunreaktion nach sich zog.<sup>(132)</sup> Eine andere Studie zeigte, dass IL-6 stimulierte Mäuse bei erhöhten sIL6R-Werten abhängig von einem Transkriptionsfaktor das entscheidende  $T_H2$ -Interleukin IL-4 und zusätzlich IL-21 produzierten.<sup>(133)</sup> Diese Studien weisen darauf hin, dass das erhöhte *Trans-signaling* von sIL6R möglicherweise zu einer  $T_H2$  und  $T_H17$  gesteuerten, entzündungsfördernden Wirkung beiträgt und gleichzeitig  $T_H1$  und anti-inflammatorische  $T_{Reg}$  hemmt.<sup>(134)</sup> Den erst 2005 entdeckten  $T_H17$  und dem durch sie produzierten IL-17 werden zwar entscheidende autoinflammatorische Wirkungen zugeschrieben, vorwiegend aber für Erkrankungen wie Psoriasis und rheumatoide Arthritis.<sup>(135)</sup>



**Abbildung 11. rs2228145 (*IL6R*) - möglicher Einfluss**

SNP erhöht die Abspaltung des löslichen IL-6 Rezeptors von der membranständigen Form und ermöglicht verstärktes trans-signaling an Immun- und Hautzellen. Immunreaktion über  $T_H2+T_H17$ -Zell-Aktivierung zu chronischer Entzündung verschoben. (Abbildung schematisch nach Ergebnissen der Autoren/Studien des zugehörigen Abschnitts.)

Dies spiegelt sich auch in der inzwischen etablierten Therapie des Anti-IL6R-Antikörpers *Tocilizumab* bei der rheumatoiden Arthritis wider, das insgesamt ähnlich gute und in der Monotherapie sogar bessere Wirksamkeit, als die Antikörpertherapien mit TNF- $\alpha$ -Antikörpern zeigt.<sup>(136)</sup> Ein Ansatz für die Wirkung von T<sub>H</sub>-17 beim AE ist nach einem Mausmodell eine T<sub>H</sub>2 differenzierungsverstärkende Rolle von T<sub>H</sub>17 in einem schon T<sub>H</sub>2 dominiertem Zytokinmilieu, welches beim AE im Allgemeinen vorliegt.<sup>(137)</sup> Bisher liegen keine Zulassungen von IL6R-Antikörpern für die Therapie des AE vor. In einer kleinen Fallstudie bei drei Patienten mit schwerer AE konnte zwar bei der Therapie mit IL6R-Antikörpern eine Hautverbesserung gesehen werden, allerdings wurde die Therapie auf Grund bakterieller Superinfektionen als wahrscheinliche Nebenwirkung bei zwei von drei Patienten abgebrochen.<sup>(138)</sup>

Zusammengefasst könnte der SNP rs2221845 über die nachgewiesene Erhöhung des löslichen IL6-Rezeptors und die Verstärkung des damit verbundenen trans-Signalwegs von IL-6 zur Chronifizierung des AE beitragen.

#### **rs2897442 – *KIF3A***

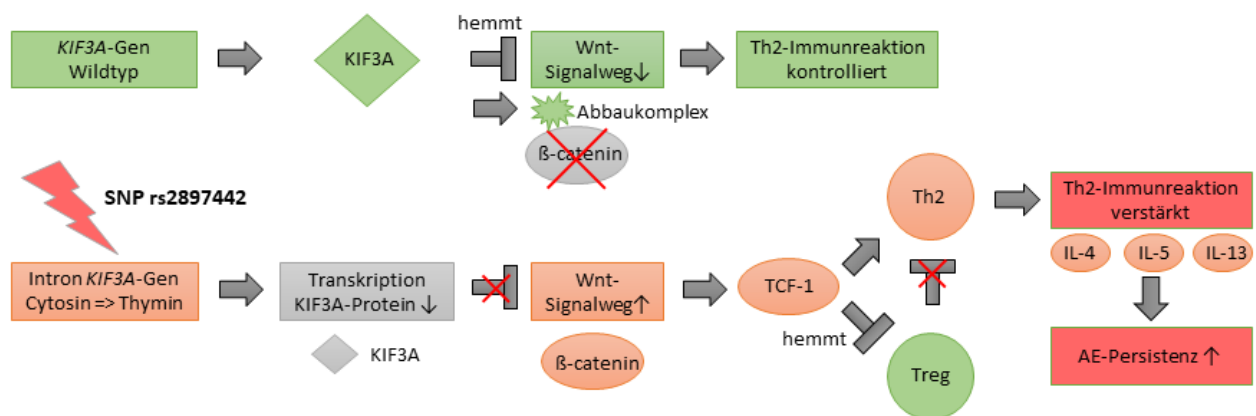
Den Ergebnissen dieser Arbeit nach zu urteilen, kommt diesem SNP eine besondere Bedeutung zu, denn er zeigte sowohl mit dem Subphänotyp des persistenten AE (OR = 1,23, p = 0,014, siehe Tabelle 10), als auch mit dem Phänotyp AE+Atopie (OR = 1,4, p = 9 x 10<sup>-3</sup>, siehe Tabelle 11) eine signifikante Assoziation. Außerdem wurde erstmals eine SNP x SNP-Interaktion für rs2897442 nachgewiesen. Der in dieser Arbeit gezeigte Einfluss auf die persistente Verlaufsform stellt ebenfalls eine neue Erkenntnis dar. In zwei Kohortenstudien in Italien und China wurde der SNP mit dem Phänotyp des AE repliziert.<sup>(79,125)</sup> Eine Replikation des SNPs ist seit Entdeckung auch schon in mehreren GWAS zu atopischen Erkrankungen erfolgt: In GWAS aus dem Jahr 2015<sup>(122)</sup> und 2019<sup>(123)</sup> mit dem Phänotyp des AE und in der GWAS-Metaanalyse aus dem Jahr 2015<sup>(124)</sup> für einen kombinierten Phänotyp frühes AE + Asthma. In letzterer erfolgte die Replikation mit einem SNP (rs17690965) in kompletten LD mit dem hier untersuchten SNP (r<sup>2</sup>=1,0, D'=1,0), der also das gleiche Assoziationssignal darstellt. Ebenfalls mit dem Phänotyp Asthma + AE wurde ein weiterer SNP (rs2023823) des Genorts in komplettem LD (r<sup>2</sup>=1,0, D'=1,0) mit dem in dieser Arbeit untersuchten SNP in einer amerikanischen Studie aus dem Jahr 2017 assoziiert.<sup>(139)</sup> Für den vergleichbaren Phänotyp wurde in dieser Arbeit zwar ebenfalls ein Effekt gesehen mit OR = 1,26, p = 7 x 10<sup>-3</sup>. In meiner Arbeit habe ich jedoch SNPs nur als signifikant assoziiert bewertet, wenn der assoziierte Phänotyp auch im Vergleich mit den AE-Fällen einen signifikanten p-Wert hatte. In dieser Analyse zeigte der Phänotyp AE + Asthma gegenüber dem AE-Phänotyp als Kontrollen lediglich eine Tendenz mit OR = 1,20, p = 0,08, jedoch keine Signifikanz (siehe Tabelle 13).

rs2897442 befindet sich in einem Intron des Gens für *KIF3A* und liegt in unmittelbarer Nähe zum Interleukin-Gencluster auf Chromosom 5 (5q31), in dem unter anderem die Gene für IL-4, IL-5 und IL-13 liegen. In der GWAS die den SNP entdeckte, zeigten sich keine Assoziationen des Genorts in untersuchten Haut-eQTL-Daten, jedoch ergab die Analyse von Lymphozyten eQTL-Daten eine mäßige Assoziation mit IL-13-mRNA-Spiegeln ( $p=2.7 \times 10^{-3}$ ).<sup>(10)</sup> In den weiteren erwähnten Studien, die den SNP repliziert haben, waren keine eQTL-Daten verfügbar. Viele der SNPs dieses Risiko-Genorts befinden sich in hohem LD, sodass nicht immer ersichtlich ist, welcher der SNPs der Region eine wirksame Variante darstellt und welches der angrenzenden Gene betroffen ist. Auch die Ergebnisse des hier untersuchten SNPs sind unter diesem Hintergrund zu sehen. Inzwischen wurden Funktionen des Gens *KIF3A* entschlüsselt, die die assoziierten SNP-Phänotypen der bisher veröffentlichten Assoziationsstudien plausibel erklären und *KIF3A* somit als mögliches beeinflusstes Gen in den Vordergrund rücken. Das Gen *KIF3A* kodiert eine Subeinheit des Kinesin-II Komplexes. Dieser Motorkomplex ist wichtig für die Funktion von Mikrotubuli und beteiligt an der Formation von Zilien (Flimmerzellen) sowie ihrem Proteintransport.<sup>(140)</sup> Neben aktiv-beweglichen Zilien in Schleimhäuten (Atemwege, Drüsen), existieren primäre, vorwiegend nicht-bewegliche Zilien in nahezu allen Zellen des Körpers. Zusätzlich zur strukturellen Funktion, ist *KIF3A* ein wichtiger Bestandteil des Wnt-Signalwegs (*Wingless/Int1*) im Immunsystem. Anhand einer Mausstudie mit gewebsspezifischem *KIF3A-Knockout* in der Lunge wurde auf eine Reihe von Genwirkungen bezüglich atopischer Erkrankungen geschlossen.<sup>(141)</sup> Die Mäuse zeigten eine zerstörte Zilienstruktur im Lungenepithel mit gestörter mukoziliärer Clearance, beeinträchtigten Reparaturmechanismen der Epithelzellen und eine verstärkte  $T_H2$ -Reaktion mit Atemwegshyperreagibilität auf Kontakt mit Aeroallergenen (Hausstaubmilben u.a.). *KIF3A-Knockout*-Mäuse entwickelten also einen Asthma-ähnlichen Phänotyp bei Allergenkontakt. Die entzündlichen Interleukine IL-4, -13, -17a sowie Eotaxin zeigten sich erhöht, wie auch die korrelierenden Zelltypen ( $T_H2$ - und  $T_H17$  und Eosinophile). Die Reaktion wurde im Vergleich bei *Knockout*-Mäusen für ein ähnliches Zilienprotein nicht festgestellt, sodass neben der mechanischen Funktion für Zilien, auf eine zusätzliche, das Immunsystem betreffende Wirkung geschlossen wurde. So scheint *KIF3A* bei Allergenkontakt normalerweise eine Kontrollfunktion auf die Typ-2-Immunreaktion und  $T_H17$ -Zellen zu haben. Dies lässt sich mit der Rolle des *KIF3A* im proinflammatorischen Wnt-Signalweg erklären: Normalerweise hemmt *KIF3A* diesen Signalweg über Abbau von  $\beta$ -Catenin. *KIF3A* schützt ein entscheidendes Protein des  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplexes<sup>(142)</sup> und bindet ein anderes Protein, welches bei Freisetzung sonst den  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplexes inaktiviert.<sup>(143)</sup> *KIF3A* fördert also im Wildtyp den Abbau von  $\beta$ -Catenin, welches über mehrere Wege proinflammatorisch wirkt.

Zum einen über gesteigerte Expression des *T-cell factor-1* (TCF-1),<sup>(144)</sup> der die Differenzierung von T<sub>naiv</sub> zu T<sub>H2</sub> über Aktivierung ihres Haupttranskriptionsfaktors GATA-3 fördert. Dieses stimuliert die Bildung von IL-4 nach TCF-1-Einfluss.<sup>(145)</sup> Zum anderen hemmt TCF-1 den Haupttranskriptionsfaktor Foxp3 der T<sub>reg</sub>.<sup>(146)</sup> und beeinträchtigt so die auf die T<sub>H2</sub>-Immunreaktion dämpfende Wirkung der T<sub>reg</sub>.

Anhand dieser Erkenntnisse lassen sich die gefundenen Assoziationen des SNPs für den Phänotyp AE+Atopie mit verstärkter Allergenantwort und das persistente AE mit verstärkter T<sub>H2</sub>-Immunreaktion erklären. Eine Vermutung ist, dass der SNP zu einer verminderten Funktion bzw. Expression von *KIF3A* führt und darüber die regulierenden Funktionen des Proteins abgeschwächt werden. Dies wäre im Einklang damit, dass auch in heterozygoten *KIF3A-Knockout*-Mäusen die beschriebenen Effekte zu sehen waren. Zusammengefasst fördert ein eingeschränkt wirksames *KIF3A* die Aktivierung des Wnt-Signalwegs mit erhöhten Spiegeln von  $\beta$ -Catenin, TCF-1, GATA-3 und Senkung von Foxp3. Dies führt zu erhöhter Anzahl von pro-inflammatorischen T<sub>H2</sub>, und T<sub>H17</sub> sowie verringerter Anzahl anti-inflammatorischer T<sub>Reg</sub>. Beides bedingt eine T<sub>H2</sub> und T<sub>H17</sub>-Antwort mit Bildung von IL-4, -5, -13 und -17 sowie dadurch stimulierte Entzündungszellen wie Eosinophile und Basophile, aktivierte B- und Mastzellen mit Entzündungsmediatoren wie Histamin und Leukotrienen mit Begünstigung atopischer Erkrankungen. Der mögliche Einfluss des SNPs über die beschriebenen Signalwege ist zur Veranschaulichung schematisch in Abbildung 12 dargestellt.

### rs2155219 – *EMSY-LRRC32*



**Abbildung 12. rs2897442 (*KIF3A*) - möglicher Einfluss**

Verminderte Transkription von *KIF3A* führt zu fehlender Hemmung des Wnt-Signalwegs.  $\beta$ -Catenin wird nicht abgebaut und aktiviert TCF-1, das die Th2-Immunreaktion stimuliert und dadurch die Ausprägung des persistenten AE begünstigt. (Abbildung schematisch nach Ergebnissen der Autoren/Studien des zugehörigen Abschnitts.)

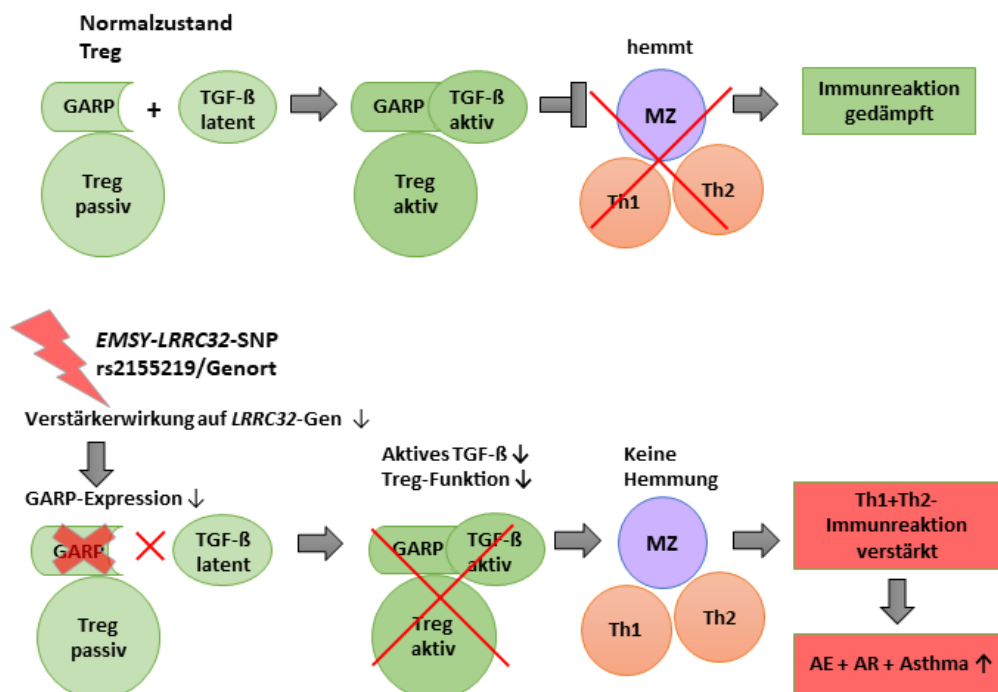
Der SNP war signifikant mit dem Phänotyp des persistenten AE (OR = 1,27, p = 0,002) und des kombinierten Subphänotyps AE+AR (OR = 1,24, p = 0,016) assoziiert (siehe Tabelle 10).

Der untersuchte SNP liegt auf Chromosom 11 zwischen dem Gen *EMSY* und dem Gen *LRRC32*. Dieser Risikogenort wurde 2009 in der ersten GWAS für das AE<sup>(4)</sup> identifiziert (rs7927894, LD:  $r^2=0,67$ ,  $D'=0,98$ , siehe Tabellen 3 und 8). Es handelt bei beiden SNPs entsprechend um das gleiche Assoziationssignal und der verwendete SNP wurde lediglich auf Grund eines geringfügig besseren p- und OR-Werts ausgewählt (siehe Tabelle 7). In einer 2011 publizierten Studie<sup>(147)</sup> wurde erstmals die Assoziation dieser Genregion mit Asthma bronchiale und allergischer Rhinitis in der ALSPAC-Kohorte publiziert. Die größten Effekte wurden dort für die kombinierten Phänotypen Asthma+AE und AR+AE gefunden. 2011 wurde der in meiner Arbeit verwendete SNP rs2155219 in einer GWAS mit AR assoziiert<sup>(95)</sup> und 2013 wurde er in einer europäischen GWAS für das AE beschrieben.<sup>(7)</sup> Seitdem wurde der gleiche SNP in einer GWAS im Jahr 2019<sup>(123)</sup> für das AE repliziert und in einer GWAS-Metaanalyse von 2015<sup>(124)</sup> wurde eine Assoziation zum Phänotyp AE+Asthma gezeigt. Zusätzlich wurden zwei Assoziationen des SNPs mit Phänotypen einer allergischen Sensibilisierung publiziert, 2013 in einer GWAS<sup>(148)</sup> als Sensibilisierung gegen mind. ein Allergen und 2015 als Phänotyp einer Polysensibilisierung gegen mind. 4 Aeroallergene in einer Kohortenstudie.<sup>(149)</sup> Vergleichbar zeigte sich in meiner Studie ebenfalls ein signifikanter p-Wert (p = 0,032, OR = 1,18) für den Phänotyp AE+Atopie (siehe Tabelle 11, linker Phänotyp), definiert als AE mit mind. einem positiven Pricktest. Nach Adjustierung bezüglich des Effekts des AE zeigte sich keine Signifikanz (siehe Tabelle 11, rechter Phänotyp), sodass der SNP in meiner Arbeit insgesamt als nicht signifikant assoziiert mit dem Phänotyp AE+Atopie gewertet wurde. Eine Untersuchung eines reinen Atopie-Phänotyps ohne AE ist in meiner Arbeit nicht erfolgt auf Grund des Fokus meiner Arbeit auf das AE. Eine Polysensibilisierung von mind. 4 Aeroallergenen war bei den vorliegenden Pricktestdaten in meiner Arbeit nicht evaluierbar.

Zwei SNPs des gleichen Genorts in hohem LD mit dem SNP meiner Arbeit wurden in GWAS aus den Jahren 2015 (rs2212434,  $r^2=0,82$ )<sup>(122)</sup> und 2017 (rs7936323,  $r^2 = 0,90$ )<sup>(35)</sup> repliziert. Bei erstgenannter GWAS als Assoziation mit dem Phänotyp des AE, bei letzterer mit einem weiter definierten Phänotyp AE und/oder AR und/oder Asthma.

Zusammenfassend und im Einklang mit den Ergebnissen meiner Arbeit, besteht eine konsistente und starke Assoziation dieses Genorts mit allen allergischen Erkrankungen und der allergischen Sensibilisierung. Darüber hinaus ist dieser Genort mit zahlreichen anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie *Colitis ulcerosa*<sup>(150)</sup>, *Morbus Crohn*<sup>(151)</sup> und Autoimmunerkrankungen wie z.B. *Alopecia areata*<sup>(152)</sup> assoziiert. Lange war das relevante Gen an

diesem Genort und sein funktioneller Mechanismus bei der Entstehung allergischer Erkrankungen ungeklärt. Der in dieser Arbeit untersuchte SNP liegt zwischen den Genen *EMSY* und *LRRC32*. In einer eQTL-Analyse aus dem Jahr 2013 wurde eine signifikante Assoziation des SNPs rs2155219 mit reduzierter Genexpression der beiden angrenzenden Gene *EMSY* ( $p = 4 \times 10^{-27}$ ) und *LRRC32* ( $p = 7 \times 10^{-6}$ ) in Leukozyten gezeigt.<sup>(148)</sup> *LRRC32* kodiert das Membranprotein *Glycoprotein A repetitions predominant* (GARP), welches einen Rezeptor auf T<sub>reg</sub> darstellt. Erst neueste Forschungsergebnisse einer Studie aus dem Jahr 2020 liefern klare Hinweise auf das Wirken des Genorts auf einen distalen Verstärker des Gens *LRRC32*.<sup>(153)</sup> Sie zeigen an Hand des SNPs rs11236797, der in komplettem LD mit dem in dieser Arbeit untersuchten SNP rs2155219 ist ( $D' = 1,0$ ;  $r^2 = 0,89$ )<sup>(154)</sup> und experimentellen Daten im Mausmodell, dass Träger von bestimmten SNPs des Genorts eine verminderte Genexpression von GARP aufweisen, die zu einer reduzierten Funktion von T<sub>reg</sub> führt. Als Folge wird beschrieben, dass diese T<sub>reg</sub> nicht fähig sind die Entzündungsreaktion der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung *Colitis ulcerosa* in einem Mausmodell zu kontrollieren. *Colitis ulcerosa* und AE weisen nach einer Metastudie von 2020 eine signifikante Komorbidität auf,<sup>(155)</sup> weshalb die Entschlüsselung eines möglichen gemeinsamen immunologischen Signalwegs nicht unerwartet ist. Von den Autoren der erwähnten Studie wird im Detail gezeigt, dass SNPs dieses Genorts mit einer Reduzierung der Histon-



**Abbildung 13. rs2155219 (*EMSY-LRRC32*) - möglicher Einfluss**

Genort des SNPs führt zu verringerter Verstärkerwirkung auf *LRRC32*-Gen. Dies bewirkt eine verringerte Expression von GARP-Rezeptor auf Treg. Dadurch wird die Treg-Funktion vermindert, da das latente TGF-β nicht aktiviert wird. Folglich werden Th2-Zellen und Mastzellen sowie Th1 nicht gehemmt, was die atopische Entzündung bei AE + Asthma + AR verstärkt. (Abbildung schematisch im Wesentlichen nach Nasrallah et al. (2020), Cuende et al. (2015) und Ndaw et al. (2017).)



Acetylierung und Konformitätsänderung in  $T_{reg}$  einhergehen und so die Interaktion mit dem Promoter des Gens *LRRC32* verändern, was letztendlich eine verminderte GARP-Expression bewirkt. Zusätzlich zeigen sie, dass dies höchstwahrscheinlich über eine Beeinträchtigung der Bindung des Transkriptionsfaktors STAT-5 (*Signal transducers and activators of transcription*) und in geringerem Maße von NF- $\kappa$ B an die Verstärkerregion verursacht wird, denn Antikörper gegen diese Faktoren verhinderten ebenfalls die GARP-Expression in  $T_{reg}$ , trotz Stimulation durch IL-2. Die Implikationen der erwähnten Studie decken sich mit den Ergebnissen früherer Studien an humanen  $T_{reg}$  in Bezug auf Wirkmechanismen des Gens: Andere Autoren zeigten schon im Jahr 2015, dass GARP latentes TGF- $\beta$  bindet und zur Aktivierung von TGF- $\beta$  beiträgt.<sup>(156)</sup> Erst über aktives TGF- $\beta$  vermitteln  $T_{reg}$  ihre immunsuppressiven Funktionen, die in der Studie durch die GARP-Antikörper bei humanen  $T_{reg}$  geblockt wurden. Außerdem wurden im Jahr 2016 bei AE-Patienten dieses Genorts sechs seltene SNPs in dem Gen *LRRC32* als *Missense*-Mutationen identifiziert.<sup>(157)</sup> Es wurde gezeigt, dass bei Vorhandensein einer *Missense*-Mutation des Gens *LRRC32*, die Expression von GARP auf der Zelloberfläche von  $T_{reg}$ -Zellen verringert war und ebenfalls eine abgeschwächte Funktion der  $T_{reg}$  nach Stimulation nachweisbar war. Ein Mangel an GARP und damit verminderte Funktion von  $T_{reg}$  hat zur Folge, dass TGF- $\beta$ 1 weniger aktiv ist und damit Mastzellen sowie  $T_{H1}$  und  $T_{H2}$ -Zellen mit ihren zugehörigen Entzündungsmediatoren wie Histamin, IL-4, IL-13, IL-33, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  weniger unterdrückt bzw. kontrolliert werden.<sup>(158)</sup> Zusammenfassend ist eine verminderte GARP-Oberflächenexpression auf  $T_{reg}$  mit dadurch eingeschränkter Interaktion und reduziertem aktivem TGF- $\beta$  mit folglich verringerter Kontrollfunktion der  $T_{reg}$  auf entzündliche Prozesse als eine wahrscheinliche Ursache für die Assoziation des Genorts nahe dem *LRRC32*-Gen mit dem AE und anderen atopischen Erkrankungen zu sehen. Dies bietet somit einen möglichen Erklärungsansatz für die Assoziationen dieses SNPs mit dem persistenten AE, den kombinierten Phänotypen AE+AR und AE+Asthma+AR in meinen Analysen und Assoziationen zu weiteren atopischen Phänotypen der dargestellten GWAS und Kohortenstudien, da eine verminderte Funktion von  $T_{reg}$  einen verstärkenden Einfluss auf alle atopischen Erkrankungen hat (siehe Abbildung 13).

### **rs13015714 – *IL18R1***

Dieser SNP zeigte eine signifikante Assoziation in der Interaktionsanalyse. Dort zeigte der SNP einen deutlichen Effekt zusammen mit *FLG*, worauf in Kapitel 6.7 näher eingegangen wird. Bei den anderen Phänotypen zeigte sich keine Signifikanz. Der SNP wurde nach seiner Entdeckung im Jahr 2012 in einer japanischen GWAS<sup>(9)</sup> in weiteren GWAS für den Phänotyp AE repliziert, auch in europäischen Populationen in den Jahren 2013,<sup>(6)</sup> 2015,<sup>(122)</sup> und 2019<sup>(123)</sup>. Andere SNPs

des gleichen Gens *IL18RI* wurden in bisherigen GWAS mit dem Phänotyp Asthma assoziiert, erstmals im Jahr 2010<sup>(159)</sup> und später mehrfach repliziert u.a. im Jahr 2019<sup>(123)</sup>. Allerdings liegt der höchste LD-Wert dieser SNPs mit dem hier untersuchten SNP bei  $r^2 = 0,26$  (rs3771166)<sup>(159)</sup> und somit stellen die SNPs möglicherweise ein anderes Assoziationssignal dar.

Der SNP rs13015714 liegt intergenisch zwischen den Genen *IL1RL1* und *IL18RI*, deutlich näher jedoch am Gen *IL18RI* mit unter 400 Basen Entfernung, im Gegensatz zu 3000 Basen zu *IL1RL1*. Es liegen eQTL-Daten aus einer GWAS-Metaanalyse aus dem Jahr 2015 vor, die zeigen, dass 18 SNPs des gleichen Genort in hohem LD ( $r^2 > 90\%$ ) mit der in dieser Arbeit untersuchten Variante und gleichem Risikoallel eine signifikante Assoziation mit der gesteigerten Expression von *IL18RI* zeigen mit p-Werten in der von Haut  $5 \times 10^{-4}$  und Lymphozyten  $p = 1 \times 10^{-4}$  (*Supplementary table S19*).<sup>(122)</sup> Dies gibt einen Hinweis auf die Wirkung dieses Genorts auf eine höhere Expression des Gens *IL18RI*, daher wird dieses Gen und dessen mögliche Rolle auf das AE näher betrachtet: Der vom Gen *IL18RI* kodierte Rezeptor IL18R $\alpha$  ist die Bindungsstelle für IL-18. Der Rezeptor wird auf T<sub>H1</sub>, NK-Zellen, natürlichen Killer-T-Zellen (NK-T), Basophilen und Mastzellen exprimiert, nicht jedoch auf T<sub>H2</sub>.<sup>(160)</sup> IL-18 wird stets als inaktive Vorstufe pro-IL-18 produziert und wirkt erst nach Spaltung und Aktivierung über Proteasen. Aktives IL-18 bindet IL18R $\alpha$  und vermittelt seine Wirkung im Normalzustand zum Großteil über die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs. Dieser verursacht eine T<sub>H1</sub>-Entzündungsreaktionen via IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TSLP und TNF $\alpha$ .<sup>(161)</sup> Interferon- $\gamma$  ist neben IL-12 eines der Hauptzytokine von T<sub>H1</sub>. Entscheidend für das AE scheint ein antagonistischer Effekt von IL-18 je nach dominierendem Zytokinumfeld zu sein: In Studien wurde gezeigt, dass IL-18 in Abwesenheit von IL-12 zur Erhöhung von T<sub>H2</sub>-Zytokinen führt, die durch die Anwesenheit von IL-2 und/oder IL-4 weiter verstärkt wird. Direkt vermittelt durch IL-18 werden NK-T<sup>(162)</sup> und Basophile (geringer auch Mastzellen)<sup>(163)</sup> zur IL-4-Produktion angeregt mit gleichzeitiger Erhöhung von IL-13 und IFN- $\gamma$ . T<sub>H1</sub>-Zellen bilden in Abwesenheit von IL-12 ebenfalls das T<sub>H2</sub>-Zytokin IL-13 zusätzlich zum normalen Zytokinspektrum<sup>(164)</sup> und verstärkt werden die IL-13-Spiegel noch durch die Kombination mit IL-2 oder Allergenen.<sup>(165)</sup> Abhängig von IL-4 zeigte die Administration von IL-18 auch eine dosisabhängige IgE-Erhöhung.<sup>(166)</sup>

Zusammengenommen sind diese Effekte eine mögliche Erklärung, weshalb der *IL18RI*-SNP allein keine signifikante Assoziation im Phänotyp des persistenten AE zeigte, da IL-18 in einem T<sub>H1</sub>-dominierten Milieu oder in Homöostase keine T<sub>H2</sub>-Zytokinreaktion verursacht. Erst in T<sub>H2</sub>-dominiertem Milieu verstärkt IL-18 die T<sub>H2</sub>-Reaktion. Auf diesen Zusammenhang wird im kommenden Abschnitt 6.7 genauer eingegangen.

## 6.7. SNP-SNP Interaktionsergebnisse

Im Bereich der SNP x SNP-Interaktionen ist bislang wenig bekannt. Daher sind die Interaktionsergebnisse dieser Arbeit als interessanter Ansatz für weitergehende Forschung zu sehen: In den Interaktionsanalysen dieser Arbeit wurden drei zuvor noch nicht bekannte, mögliche SNP x SNP-Interaktionen identifiziert (siehe Tabelle 15). Eine signifikante Assoziation zeigte sich für die Interaktion von *FLG* mit rs2897442 (*KIF3A*). Die beiden anderen signifikanten Interaktionen waren *FLG* mit rs13015714 (*IL18RI*) und *IL18RI* mit rs6010620 (*RTELI-TNFRSF6B*). Interessanterweise scheint es plausible Signalwegverknüpfungen zu geben. Denn in je zwei Interaktionen sind *IL18RI* und *FLG* betroffen. Also war zweimal *FLG*, das potenteste Gen für einen Hautbarrieredefekt beteiligt, jeweils in Verbindung mit einem SNP, der in der Nähe zu einem auf das Immunsystem wirkenden Gen liegt. Dies weist auf eine sinnvolle Verbindung zwischen den Pathomechanismen des AE hin - dem Hautbarrieredefekt auf der einen Seite und der Dysregulation des Immunsystems auf der anderen Seite - und spricht für eine Plausibilität der Ergebnisse. Nachfolgend werden Ansätze für einen möglichen risikoverstärkenden Interaktionseffekt der SNPs bzw. zugehöriger Gene auf die persistente Form des AE diskutiert.

### **Interaktion *FLG*-Nullmutation x rs13015714 (*IL18RI*)**

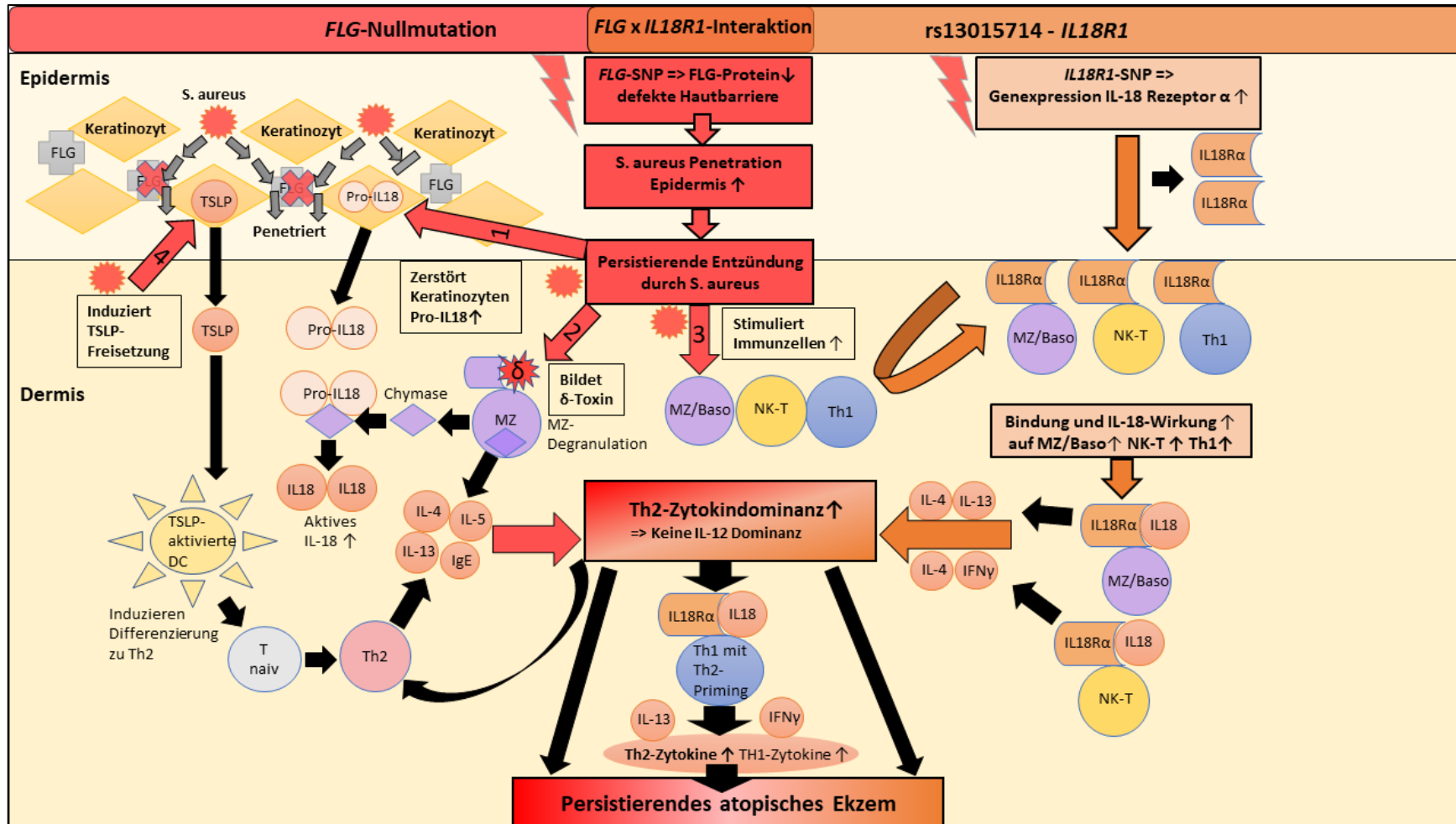
Der signifikante RERI (0,794) bei Trägern der SNP-Kombination *FLG* und *IL18RI* ( $p\text{-emp} = 5 \times 10^{-3}$ , KI-Bootstrap [0,05-1,53], siehe Tabelle 15) bedeutet ein deutlich gesteigertes RR im Gegensatz zu dem erwarteten additiven Risiko von AE bei Vorkommen beider SNPs. Die in dieser Arbeit gefundenen signifikanten, RERI des *FLG* mit dem SNP rs2897442 (*KIF3A*) sowie *FLG* + rs13015714 (*IL18RI*) stellen neue Erkenntnisse dar, die sich in das Bild einzelner aktueller Studienergebnisse fügen. So wurde 2016 in einer polnischen Kohorte ein Interaktionseffekt für *FLG* und einen SNP des *IL-18*-Gens auf das AE gezeigt.<sup>(167)</sup> Der SNP dort betrifft das IL-18 direkt, im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit untersuchten SNP, der für den Rezeptor IL18R $\alpha$  kodiert. Die in dieser Arbeit gefundene Interaktion des *FLG* mit dem Gen des Rezeptors *IL18RI* bekräftigt das Vorhandensein eines bedeutsamen, AE-verstärkenden Mechanismus zwischen den Signalwegen von *FLG* und IL-18. Der verknüpfende Faktor zwischen IL-18 bzw. seinem Rezeptor und *FLG*-Nullmutationen scheint das Bakterium *S. aureus* zu sein. Bemerkenswerterweise beträgt die Prävalenz einer Kolonisation mit *S. aureus* bei AE-Patienten auf entzündeten Hautläsionen 70% und 39% auf nicht-entzündeter Haut im Gegensatz zu einem geringen Prozentsatz in der Haut von Gesunden.<sup>(168)</sup> Bekräftigend wurde in einer longitudinalen Studie mit 150 Säuglingen bei einer signifikanten Anzahl der 36 Säuglinge mit späterer AE, eine vorausgehende Kolonisation der Haut mit *S. aureus* festgestellt.<sup>(169)</sup> Für die verstärkte Kolonisation der Haut mit *S. aureus* beim AE

spielen mehrere Effekte zusammen, die vor allem durch *FLG*-Nullmutationen bedingt sind und die gleichzeitig die Wirkung von IL-18 proinflammatorisch verstärken können:

*FLG*-Nullmutationen führen strukturell zu erhöhter Durchlässigkeit der Epidermis für Bakterien wie *S. aureus*. Dabei spielt die Adhäsionsstärke des *S. aureus* an Keratinozyten eine wichtige Rolle. Die Adhäsion ist bei reduzierten Spiegeln von *Natural moisturizing factor* (NFM) deutlich verbessert.<sup>(170)</sup> Da NFM aus Abbauprodukten des FLG gebildet wird, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen *FLG*- und NFM-Spiegeln. Dementsprechend ist NFM bei *FLG*-Nullmutationen erniedrigt und so die Adhäsion von *S. aureus* stark begünstigt. Ebenfalls in diese Richtung weisen entdeckte Wirkungen des *FLG*, die zeigen, dass intaktes *FLG* normalerweise über die Bildung von Sphingomyelinase die zytotoxischen Wirkungen des  $\alpha$ -Toxins von *S. aureus* hemmt und damit die Keratinozyten vor Zelltod schützt.<sup>(171)</sup> Bei Nullmutations-Trägern fällt diese Schutzfunktion weg und *S. aureus* verstärkt den Barrieredefekt und die Entzündungsreaktion durch eine Toxin-vermittelte Zerstörung von Keratinozyten. Zusätzlich sind für NFM proliferationshemmende Wirkungen gegenüber Staphylokokken bekannt, die bei Trägern von *FLG*-Nullmutationen fehlen.<sup>(172)</sup> Bedeutsame antimikrobielle Peptide (AMP), die gegen *S. aureus* wirksam sind, werden durch ein  $T_H2$ -Zytokinmilieu herunterreguliert.<sup>(173)</sup> In einem Mausmodell wurde bei *FLG-Knockout*-Mäusen gezeigt, dass durch das fehlende *FLG* eine *S. aureus* Penetration in die Dermis ermöglicht wird und dies eine verstärkte Expression der  $T_H2$ -Zytokine IL-4, IL-13, TSLP und IL-17a auslöst ohne Erhöhung der Interferone  $\alpha$  und  $\beta$ .<sup>(174)</sup> In der Haut von Patienten mit AE sind erhöhte Werte von IL-18 nachweisbar, die signifikant mit der Kolonisation der Haut mit *S. aureus* assoziiert sind und zusätzlich mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren.<sup>(175)</sup> Im Normalzustand liegt der überwiegende Teil von IL-18 als inaktives pro-IL-18 intrazellulär vor und wird erst nach Prozeption durch Proteasen aktiviert.<sup>(176)</sup> In einem Mausmodell wurde eine verstärkte IL-18 Sekretion bei defekter Hautbarriere nach Applikation von *S. aureus* Protein A auf der Haut gezeigt.<sup>(177)</sup> So führt die Hautinfektion mit *S. aureus* begünstigt durch den Barrieredefekt bei fehlendem *FLG* zur Freisetzung von pro-IL-18. Chymase, welches nach *S. aureus* Kontakt durch Mastzellen freigesetzt wird, ist wohl in der Lage das inaktive pro-IL-18 zu aktivieren.<sup>(178)</sup> Diesbezüglich wurde im Jahr 2013, in einer im *Nature* publizierten Studie, das *S. aureus* Toxin- $\delta$  als potenter, direkter Aktivator zur Degranulation von Mastzellen ausgemacht ohne Notwendigkeit einer IgE-Bindung. Als Folge wurde die Induktion einer  $T_H2$ -Reaktion beschrieben.<sup>(179)</sup> Den vorher erwähnten eQTL-Daten<sup>(122)</sup> (siehe Kapitel 6.6, S. 73) nach zu urteilen wird die Genexpression des Gens *IL18RI* in Lymphozyten und der Haut durch den Genort des hier untersuchten SNPs erhöht.<sup>(122)</sup> Im Folgenden stelle ich eine mögliche Theorie der Interaktion beider SNPs auf das persistierende AE dar, unter Einbeziehung der erläuterten Studienergebnisse:

Aus der erhöhten Genexpression von *IL18R1* als Folge des SNPs rs13015714 resultiert eine erhöhte Rezeptordichte von IL18R $\alpha$  auf Immunzellen, die diesen Rezeptor exprimieren, wie Mastzellen, T<sub>H</sub>1-Zellen NK-T und dadurch zu einer Wirkungsverstärkung von IL-18. Durch die Penetration und Entzündung von *S. aureus*, ermöglicht über den durch *FLG*-Nullmutationen verursachten Barrieredefekt, kommt es zur T<sub>H</sub>2-Reaktion und Steigerung von IL-18. *S. aureus* wirkt auf mehreren Wegen als zentraler Faktor für die Erhöhung von IL-18 und T<sub>H</sub>2-Zytokinen: Erstens zerstört es Keratinozyten, die inaktives pro-IL18 freisetzen. Zweitens kommt es durch die verursachte Entzündung zur Rekrutierung von Immunzellen wie Basophilen, Mastzellen, NK-T und T<sub>H</sub>. Drittens führt es über sein gebildetes  $\delta$ -Toxin zur Degranulation von Mastzellen und über ihre Mastzellchymase zur IL-18 Bildung aus pro-IL-18 sowie Ausschüttung von T<sub>H</sub>2-Zytokinen und Histamin. Außerdem bewirkt *S. aureus* die Bildung und Freisetzung von TSLP aus Keratinozyten, welches anschließend an dendritische Zellen (DC) bindet. TSLP-Bindung an DC führt zur Einleitung der Differenzierung von T<sub>naiv</sub> zu T<sub>H</sub>2 und nachfolgend zur Bildung von T<sub>H</sub>2-Zytokinen. Insgesamt wird durch die *FLG*-Nullmutationen und einhergehende *S. aureus* Kolonisation/Infektion also ein T<sub>H</sub>2 dominiertes Zytokinmilieu induziert. Wie zuvor im Abschnitt des SNPs rs13015714 beschrieben, verstärkt IL-18 in T<sub>H</sub>2 dominiertem Zytokinmilieu (bzw. schon allein in Abwesenheit von IL-12) die T<sub>H</sub>2-Reaktion. Diese wird direkt über NKT, Basophile und Mastzellen vermittelt und nachfolgend in T<sub>H</sub>2-Umfeld sogar über IL-13-Bildung durch T<sub>H</sub>1-Zellen verstärkt.

Zusammengefasst könnte die Interaktion der SNPs also darin bestehen, dass der Barrieredefekt durch *FLG*-Nullmutationen über eine verstärkte Kolonisation und Infektion durch *S. aureus* eine T<sub>H</sub>2-Zytokindominanz begünstigt sowie die IL-18 Freisetzung erhöht. Die erhöhte Genexpression von *IL18R1* durch rs13015714 verstärkt die IL-18 Wirkung auf NK-T, Basophilen, Mastzellen und T<sub>H</sub>1, welches auf Grund der vorliegenden T<sub>H</sub>2-Zytokindominanz zu einer weiteren Verstärkung der T<sub>H</sub>2-Zytokinreaktion sowie IgE-Produktion und damit zu einer potenzierten Hautentzündung im Sinne eines persistierenden AE führt (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14. SNPxSNP Interaktion *FLG* x *IL18R1* – mögliche Wirkungen**

***FLG*-Nullmutation:** Verursacht Hautbarrieredefekt. *S. aureus* penetriert Epidermis + Hautentzündung. 1) Zerstörte Keratinozyten setzen pro-IL-18 frei. 2) Bildung  $\delta$ -Toxin führt zu Mastzell-(MZ-) Degranulation und freigewordene Chymase spaltet Pro-IL-18 zu aktivem IL-18, zusätzlich werden Th2-Zytokine frei 3) Zellstimulation: Basophile (Baso), MZ, natürliche Killer-T-Zellen (NK-T), Th1-Zellen 4) TSLP-Freisetzung aus Keratinozyten wird induziert. Dadurch werden dendritische Zellen (DC) Th2-spezifisch aktiviert. Das Priming von naiven T-Zellen (Tnaiv) zu T-Helferzellen Typ2 (Th2) wird begünstigt und Th2-Zytokine gebildet, nachfolgend über B-Zellstimulation auch IgE)

***IL18R1*-SNP:** Erhöht die Genexpression für IL18-Rezeptor  $\alpha$ . Resultierend: Mehr Bindungsstellen für IL-18 auf MZ, Baso, NK-T, Th1. NK-T und MZ+Baso produzieren Th2-Zytokine bei IL-18 Bindung und verstärken die Th2-Dominanz. Th1 produzieren bei IL-18-Bindung an IL-18 $\alpha$  bei Th2-Dominanz Th2-Zytokine wie IL-13, zusätzlich zu Th1-Zytokinen wie Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). So kommt es zur gegenseitigen Wirkungsverstärkung der SNPs, welche ein persistentes AE verstärken (Abbildung schematisch nach Ergebnissen aller Autoren/Studien der zugehörigen Abschnitte).

## Interaktion *FLG*-Nullmutation x rs2897442 (*KIF3A*)

Es zeigte sich in den Interaktionsberechnungen ein hochsignifikanter und hoher RERI für *FLG*-Nullmutationen in paarweiser Analyse mit rs2897442-*KIF3A* (RERI = 1,13, KI = 0,43-1,90,  $p = 1 \times 10^{-4}$ , siehe Tabelle 15). Das Vorkommen beider Varianten bewirkt demnach ein potenziertes Risiko für AE im Gegensatz zum erwarteten additiven Effekt der einzelnen Varianten. Dieses stellt eine bisher noch nicht bekannte Entdeckung dar. Lediglich für einen SNP im Intron des IL-4-Rezeptor-Gens auf Chromosom 16 wurde 2018 eine signifikante Interaktion bezüglich allergischer Sensibilisierung und *FLG* in der Analyse zweier Geburtskohorten identifiziert.<sup>(180)</sup> Diese ist eventuell auf einen ähnlichen Wirkungsweg zurückzuführen, da die Gene *KIF3A* und *IL4R* möglicherweise beide über IL-4-Signalwege einen Einfluss auf die T<sub>H</sub>2-Immunreaktion haben. IL-4 stellt ein zentrales Interleukin in der Typ-2-Immunreaktion dar und kann durch eine beeinträchtigte *KIF3A*-Kontrollwirkung, über mehrere Wege gesteigert werden. Daraus ergeben sich viele Möglichkeiten für synergistische Interaktionseffekte mit *FLG* in Bezug auf eine Risikoerhöhung des AE. Der zentrale gemeinsame Signalweg scheint hierbei der JAK1-STAT6-Signalweg (JAK = Januskinase) zu sein. Eine erste plausible Erklärung bietet eine 2008 publizierte Studie im Mausmodell, da hier eine direkte Verbindung zwischen dem IL4/IL13-Genort und *FLG*

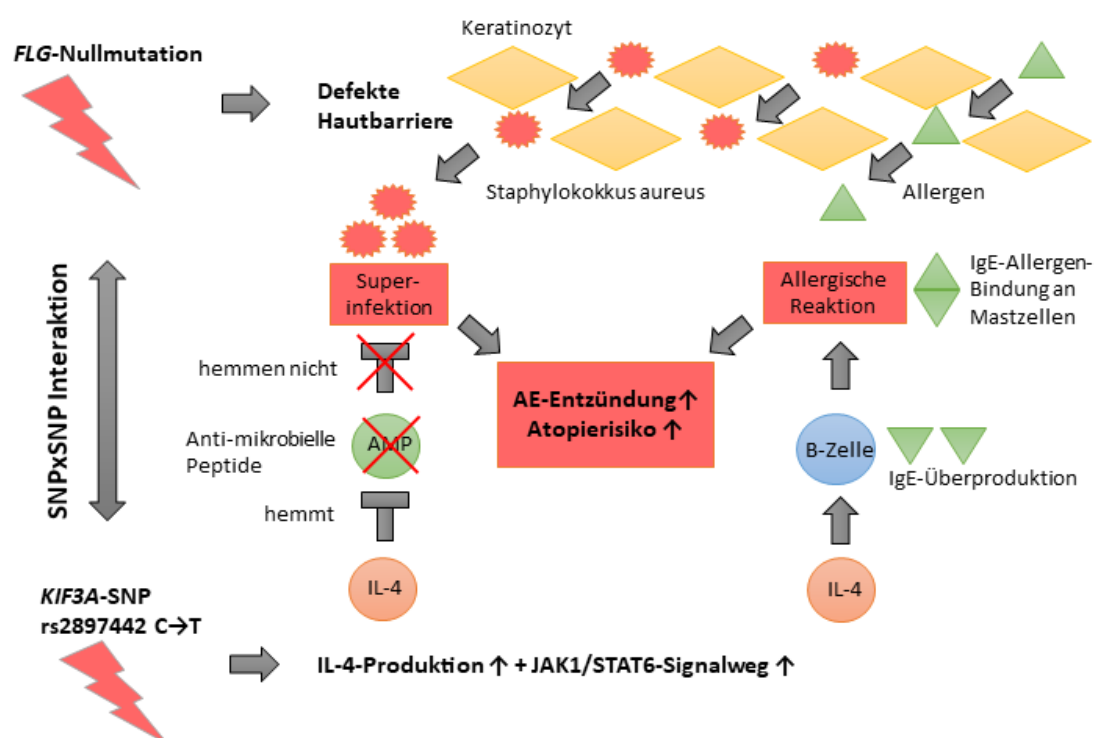


Abbildung 15. SNP x SNP-Interaktion *KIF3A* x *FLG* - mögliche Wirkungen

*FLG*-Nullmutationen bedingen Eindringen von Erregern und Allergenen durch die defekte Hautbarriere

*KIF3A*-SNP bedingt Überproduktion von IL-4, das anti-mikrobielle Peptide hemmt und zu Superinfektionen führt. B-Zellen bilden nach IL-4-Aktivierung vermehrt spezifisches IgE, das an Mastzellen und Basophile vermehrt Allergene bindet und eine allergische Reaktion auslöst.

*FLG*-Nullmutationen und *KIF3A* in Kombination verstärken so möglicherweise AE- und Atopie-Risiko. (Abbildung schematisch nach den Ergebnissen der Autoren/Studien der zugehörigen Abschnitte.)

aufgezeigt wurde.<sup>(181)</sup> Die Studie wies eine Herabregulierung von Keratinstützproteinen wie Involucrin und Loricrin via IL-4 und IL-13 über den JAK1-STAT6-Signalweg.<sup>(181)</sup> So könnte bei Trägern von *FLG*-Nullmutationen die schon gestörte Schutzfunktion der Haut zusätzlich noch durch die vom *KIF3A*-SNP getriggerte verminderte Produktion anderer Stützproteine wie Loricrin und Involucrin beeinträchtigt werden.<sup>(181)</sup> Eine noch stärker geschädigte Epidermis wäre die Folge, welche auch eine persistente Form des AE begünstigen würde. An anderer Stelle wurde gezeigt, dass erhöhtes IL-4 ebenfalls über den gleichen JAK1/STAT-6 Signalweg, die Bildung antimikrobieller Peptide hemmt.<sup>(182)</sup> Daraus folgt eine Anfälligkeit für Hautinfektionen, die sich durch eine gestörte Hautbarriere entsprechend potenziert, da so die Grundlage für das Eindringen und Ausbreiten von Erregern und Allergenen gegeben wird, wie auch schon im vorherigen Abschnitt bei der Interaktion von *FLG* x *IL18R1* erläutert. Die in der Einleitung erwähnte, deutlich erhöhte Rate an Superinfektionen der Haut mit *S. aureus* als *Impetigo contagiosa* bei AE-Patienten ließe sich durch beide Interaktionen erklären. Eine Untersuchung dieses Subphänotyps wäre von besonderem Interesse. Allerdings lagen in der ALSPAC-Kohorte keine klinischen Daten über kutane Infektionen mit Staphylokokken vor.

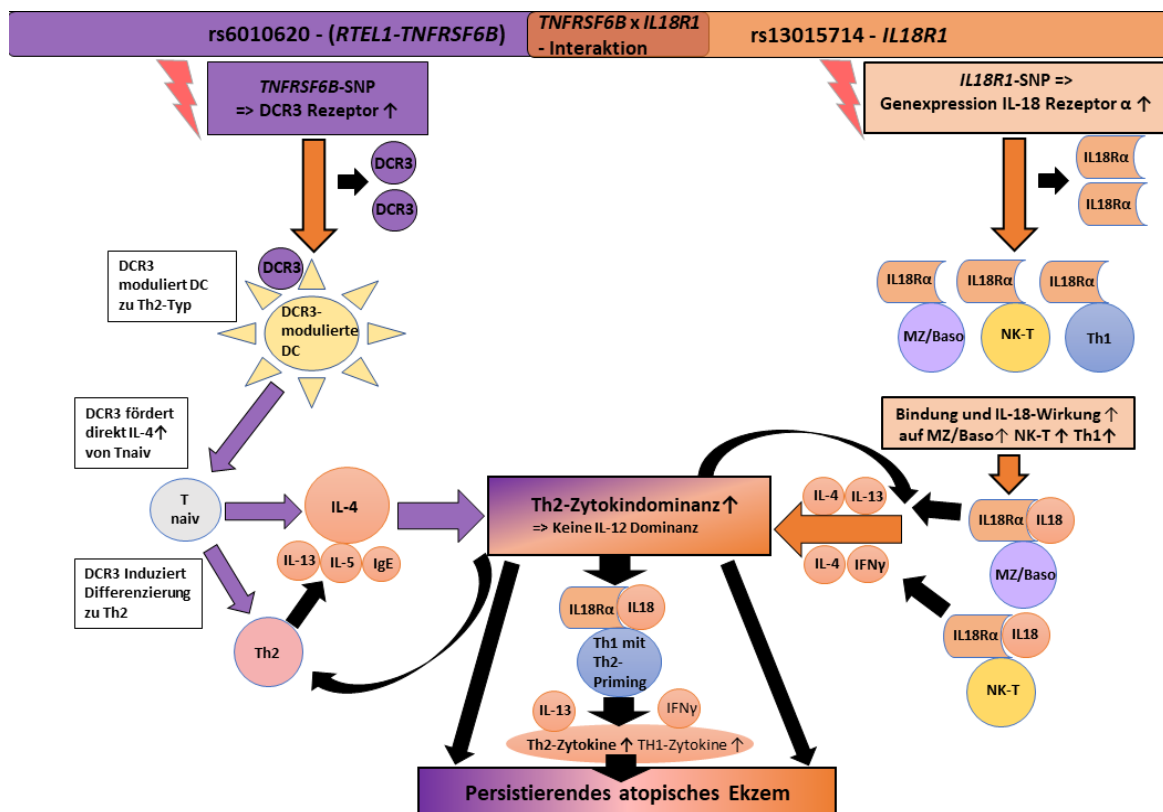
Ein weiterer Interaktionseffekt der beiden SNPs könnte sich über den vermehrten Allergenkontakt bei gestörter Hautbarriere durch *FLG*-Nullmutationen und eine verstärkte Reaktion des Immunsystems im Sinne einer Allergie wegen eines beeinträchtigten *KIF3A*-Proteins ergeben: Ein durch fehlende *KIF3A*-Kontrolle gesteigertes IL-4 stimuliert B-Zellen zur Produktion von IgE in übermäßigem Maße als Reaktion auf die durch *FLG*-Nullmutationen bedingte, vermehrte Allergenexposition in der Dermis.<sup>(182)</sup> IgE bindet und aktiviert Mastzellen daraufhin in pathologischem Maße und führt bei erneutem Allergenkontakt zur allergischen Reaktion (siehe Abbildungen 1 und 5).

### **Interaktion rs13015714 (*IL18R1*) x rs6010620 (*RTEL1-TNFRSF6B*)**

In der Interaktionsberechnung (siehe Tabelle 15) zeigte sich eine signifikante Assoziation der beiden SNPs (RERI = 0,55, P = 0,013, Bootstrap-KI = 0,04 – 0,87). Der SNP rs6010620 ist eine Intronvariante des Gens *RTEL1* und stellt eine Variante dar, die auch mit einer veränderten Transkription in das benachbarte Gen *TNFRSF6B* verbunden wird (RefSeq, Sep 2013). Die Genregion von 200 kb in direkter Umgebung des SNPs enthält acht verschiedene Gene in geringem Abstand, daher ist bisher unklar, welches der Gene ursächlich mit dem Ekzemrisiko assoziiert ist. Der gleiche SNP wurde in mehreren GWAS für das AE repliziert.<sup>(10,122,123)</sup> 2015 wurde für den SNP eine Assoziation mit einer signifikant erhöhten Expression von *TNFRSF6B* in Haut-eQTL-Daten gezeigt ( $p = 6,8 \times 10^{-4}$ , *Supplementary table S19*).<sup>(122)</sup> Darüber hinaus wurden



*TNFRSF6B*-SNPs des gleichen Genorts in einer GWAS schon im Jahr 2008 mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert und interessanterweise zeigte sich dort eine signifikant erhöhte Serumkonzentration des über *TNFRSF6B* kodierten Rezeptors *Decoy receptor 3* (DCR3) in den Individuen mit *TNFRSF6B*-SNP.<sup>(183)</sup> Es deuten also mehrere Hinweise darauf, dass der untersuchte SNP rs6010620 über eine erhöhte Genexpression des Gens *TNFRSF6B* und daraus resultierende erhöhte Konzentration des kodierten Rezeptors DCR3 wirkt. Es wurde für erhöhte Konzentrationen von DCR3 gezeigt, dass sich dendritische Zellen dadurch zu einem entzündlichen Th<sub>2</sub>-induzierenden Typ entwickeln und eine deutlich gesteigerte IL-4 Produktion durch T<sub>naiv</sub> folgt.<sup>(184)</sup> Unter diesem Hintergrund lässt sich ein plausibler Interaktionsmechanismus für die in meiner Arbeit berechnete signifikante Interaktion mit dem *IL18R1*-SNP ableiten: Wie schon in der Interaktion des *IL18R1*-SNPs mit *FLG* beschrieben (siehe Abbildung 14), beruht der von mir vermutete Hauptwirkmechanismus des *IL18R1*-SNPs auf das AE darauf, dass die IL-18



**Abbildung 16. SNP x SNP Interaktion TNFRSF6B x IL18R1 – mögliche Wirkungen**

***RTEL1-TNFRSF6B*-SNP:** Erhöht die Decoy receptor 3 (DCR3) Expression. DCR3 modulierte dendritische Zellen (DC) induzieren daraufhin die Th<sub>2</sub>-Differenzierung und IL-4-Produktion von naiven T-Zellen (T<sub>naiv</sub>), was eine Th<sub>2</sub>-Zytokindominanz zur Folge hat. Dies verändert die Wirkung des IL-18 SNPs in Richtung einer Th<sub>2</sub>-Reaktion.

***IL18R1*-SNP:** Erhöht die Genexpression für den IL18-Rezeptor α (IL18Rα). Daraus resultieren mehr Bindungsstellen für IL-18 auf Mastzellen (MZ), Basophilen (Baso), natürlichen Killer-T-Zellen (NK-T) und T<sub>1</sub>-Helferzellen (Th<sub>1</sub>). NK-T und MZ+Baso produzieren bei IL-18 Bindung Th<sub>2</sub>-Zytokine und verstärken die Th<sub>2</sub>-Dominanz. Th<sub>1</sub> produzieren bei IL-18-Bindung an IL-18Rα und bei vorliegender Th<sub>2</sub>-Dominanz ebenfalls Th<sub>2</sub>-Zytokine wie IL-13, zusätzlich zu den normalerweise produzierten Th<sub>1</sub>-Zytokinen wie Interferon-γ (IFNγ).

So interagieren und verstärken sich beide SNPs in ihrer Wirkung auf ein persistentes AE (Abbildung schematisch nach den Ergebnissen der Autoren/Studien der zugehörigen Abschnitte.)

Wirkung verstärkt wird und IL-18 dann erst in einem T<sub>H</sub>2-dominierten Zytokinumfeld ebenfalls T<sub>H</sub>2-proinflammatorisch wirkt. Der vermutlich über den SNP rs6010620 verstärkt kodierte DCR3 bewirkt über die Modulation dendritischer Zellen, die in der Folge einerseits T<sub>naiv</sub> zu T<sub>H</sub>2-Zellen primen und andererseits direkt die IL-4 Produktion von T<sub>naiv</sub> erhöhen, die Förderung einer T<sub>H</sub>2-Dominanz, die anschließend über die veränderte IL-18-Wirkung verstärkt wird. So wird über diese Interaktion beider SNPs möglicherweise eine verstärkte T<sub>H</sub>2-Wirkung vermittelt, die eine persistente Form des AE zur Folge hat. Trotz des in der Theorie plausibel erscheinendem Mechanismus, bleibt auf Grund des p-Werts von 0,013, der keine so hohe Signifikanz wie die anderen gefunden Interaktionen ( $p = 1 \times 10^{-4}$  und  $p = 5 \times 10^{-3}$ ) zeigt, eine zufällige falsch-positive Assoziation nicht auszuschließen. Daher sollte diese mögliche Interaktion in nachfolgenden, größeren Studien geprüft werden.

## 7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit stellt eine genetische Assoziationsstudie dar, in der es gelungen ist, den Einfluss vieler der bisher durch GWAS bekannt gewordenen SNPs mit Assoziation zum AE anhand der großen longitudinalen ALSPAC-Geburtskohorte näher zu beleuchten und einige noch unbekannte Assoziationen hinsichtlich der Ekzempersistenz, des atopischen Marschs und der Interaktion zwischen SNPs zu identifizieren. Ein Großteil der untersuchten, assoziierten Genorte wurde innerhalb der letzten 10 Jahre publiziert und in vielen Fällen waren damals das Risiko für weitere atopische Erkrankungen und der Einfluss auf den Krankheitsverlauf des AE noch nicht bekannt.

Um diese Aspekte zu untersuchen, wurden alle in der ALSPAC signifikant replizierten SNPs in eigens definierten, kombinierten Phänotypen des AE mit anderen atopischen Erkrankungen (Asthma, AR, Atopie) sowie Phänotypen des AE-Verlaufs analysiert. Die erste aufgestellte Hypothese, dass bestimmte SNPs das Risiko für eine persistente Verlaufsform des AE erhöhen, wurde bestätigt.

Es wurden fünf SNPs signifikant mit einem persistenten Verlauf des AE assoziiert. Für die SNPs der Gene *FLG*, *IL6R* und kürzlich auch *OVOLI* ist dies schon berichtet worden, für die restlichen zwei SNPs der Gene *KIF3A* und *EMSY-LRRC32* stellt dies eine neue Erkenntnis dar.

Die zwei Risiko-Genorte *FLG* und SNP rs2155219 *EMSY-LRRC32* zeigten sich signifikant mit dem Phänotyp AE+Asthma+AR assoziiert, der als spezifischster Phänotyp auf den Endpunkt des Phänotyps des atopischen Marschs hinweist. Zusätzlich war *FLG* in allen anderen kombinierten Phänotypen signifikant assoziiert und rs2155219 im Phänotyp AE+AR. Diese zwei Genorte scheinen den atopischen Marsch zu begünstigen und somit die diesbezügliche Hypothese der Arbeit zu bestätigen. Der SNP rs2897442 des Gens *KIF3A* zeigte allein nur eine signifikante Assoziation für AE+Atopie und nicht für die Kombinationsphänotypen mit AR und/oder Asthma. Daher kann für ihn ein erhöhtes Risiko für den atopischen Marsch bei alleinigem Vorkommen nicht sicher festgestellt werden.

Allerdings bestätigte unter anderem dieser SNPs die letzte Hypothese bezüglich des Auftretens von SNP x SNP-Interaktionen, die das AE-Risiko überproportional verstärken. Denn in Verbindung mit *FLG*-Nullmutationen wurde für den SNP rs2897442 des Gens *KIF3A* eine starke, signifikante Interaktion identifiziert, die auf eine synergistische Verstärkung der Einzelrisiken und zugehöriger Signalwege der beteiligten Gene hinweist. Dies stellt eine neue Entdeckung dar. Des Weiteren zeigten die Kombinationen des SNPs rs13015714 mit *FLG* (*IL18R1* x *FLG*) sowie mit SNP rs6010620 (*IL18R1* x *RTEL-TNFRSF6B*) ebenfalls signifikante Interaktionseffekte und damit

neue Erkenntnisse auf. Diese Ergebnisse weisen auf noch unbekannte Ansatzpunkte hinsichtlich der Entschlüsselung der Pathomechanismen des AE hin und bestätigen Interaktionen als eine Ursache für die noch fehlende Lücke in der Heritabilität der Erkrankung.

In der Recherche aktueller Studienergebnisse zu den einzelnen SNPs und möglicher Interaktionen ihrer Signalwege, wurden plausible und somit vielversprechende Ansätze für mögliche wirkende Mechanismen gefunden und diskutiert. Dabei wurden auch eQTL-Daten der SNPs berücksichtigt. Mit weiterführenden Studien könnte an dieser Stelle die Forschung ansetzen, um nach Aufklärung bzw. Bestätigung der zu Grunde liegenden Mechanismen gegebenenfalls neue Medikamente mit Angriffspunkten in diesen interagierenden Signalwegen zu entwickeln, die das Risiko oder die Ausprägung des AE in Zukunft verringern könnten.

## 8. Literaturverzeichnis

- 1 Weidinger S and Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet* 2016;387:1109-1122.
- 2 Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2008;358:1483-1494.
- 3 Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El HB, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S and McLean WH. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006;38:441-446.
- 4 Esparza-Gordillo J, Weidinger S, Folster-Holst R, Bauerfeind A, Ruschendorf F, Patone G, Rohde K, Marenholz I, Schulz F, Kerscher T, Hubner N, Wahn U, Schreiber S, Franke A, Vogler R, Heath S, Baurecht H, Novak N, Rodriguez E, Illig T, Lee-Kirsch MA, Ciechanowicz A, Kurek M, Piskackova T, Macek M, Lee YA and Ruether A. A common variant on chromosome 11q13 is associated with atopic dermatitis. *Nat Genet* 2009;41:596-601.
- 5 Esparza-Gordillo J, Schaarschmidt H, Liang L, Cookson W, Bauerfeind A, Lee-Kirsch MA, Nemat K, Henderson J, Paternoster L, Harper JL, Mangold E, Nothen MM, Ruschendorf F, Kerscher T, Marenholz I, Matanovic A, Lau S, Keil T, Bauer CP, Kurek M, Ciechanowicz A, Macek M, Franke A, Kabesch M, Hubner N, Abecasis G, Weidinger S, Moffatt M and Lee YA. A functional IL-6 receptor (IL6R) variant is a risk factor for persistent atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2013
- 6 Ellinghaus D, Baurecht H, Esparza-Gordillo J, Rodriguez E, Matanovic A, Marenholz I, Hubner N, Schaarschmidt H, Novak N, Michel S, Maintz L, Werfel T, Meyer-Hoffert U, Hotze M, Prokisch H, Heim K, Herder C, Hirota T, Tamari M, Kubo M, Takahashi A, Nakamura Y, Tsoi LC, Stuart P, Elder JT, Sun L, Zuo X, Yang S, Zhang X, Hoffmann P, Nothen MM, Folster-Holst R, Winkelmann J, Illig T, Boehm BO, Duerr RH, Buning C, Brand S, Glas J, McAleer MA, Fahy CM, Kabesch M, Brown S, McLean WH, Irvine AD, Schreiber S, Lee YA, Franke A and Weidinger S. High-density genotyping study identifies four new susceptibility loci for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2013;45:808-812.
- 7 Weidinger S, Willis-Owen SA, Kamatani Y, Baurecht H, Morar N, Liang L, Edser P, Street T, Rodriguez E, O'Regan GM, Beattie P, Folster-Holst R, Franke A, Novak N, Fahy CM, Winge MC, Kabesch M, Illig T, Heath S, Soderhall C, Melen E, Pershagen G, Kere J, Bradley M, Lieden A, Nordenskjold M, Harper JI, McLean WH, Brown SJ, Cookson WO, Lathrop GM, Irvine AD and Moffatt MF. A genome-wide association study of atopic dermatitis identifies loci with overlapping effects on asthma and psoriasis. *Hum Mol Genet* 2013;22:4841-4856.
- 8 Sun LD, Xiao FL, Li Y, Zhou WM, Tang HY, Tang XF, Zhang H, Schaarschmidt H, Zuo XB, Foelster-Holst R, He SM, Shi M, Liu Q, Lv YM, Chen XL, Zhu KJ, Guo YF, Hu DY, Li M, Li M, Zhang YH, Zhang X, Tang JP, Guo BR, Wang H, Liu Y, Zou XY, Zhou FS, Liu XY, Chen G, Ma L, Zhang SM, Jiang AP, Zheng XD, Gao XH, Li P, Tu CX, Yin XY, Han XP, Ren YQ, Song SP, Lu ZY, Zhang XL, Cui Y, Chang J, Gao M, Luo XY, Wang PG, Dai X, Su W, Li H, Shen CP, Liu SX, Feng XB, Yang CJ, Lin GS, Wang ZX, Huang JQ, Fan X, Wang Y, Bao YX, Yang S, Liu JJ, Franke A, Weidinger S, Yao ZR and Zhang XJ. Genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Chinese Han population. *Nat Genet* 2011;43:690-694.

9 Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y and Tamari M. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet* 2012;44:1222-1226.

10 Paternoster L, Standl M, Chen CM, Ramasamy A, Bonnelykke K, Duijts L, Ferreira MA, Alves AC, Thyssen JP, Albrecht E, Baurecht H, Feenstra B, Sleiman PM, Hysi P, Warrington NM, Curjuric I, Myhre R, Curtin JA, Groen-Blokhuis MM, Kerkhof M, Saaf A, Franke A, Ellinghaus D, Folster-Holst R, Dermitzakis E, Montgomery SB, Prokisch H, Heim K, Hartikainen AL, Pouta A, Pekkanen J, Blakemore AI, Buxton JL, Kaakinen M, Duffy DL, Madden PA, Heath AC, Montgomery GW, Thompson PJ, Matheson MC, Le SP, St PB, Smith GD, Henderson J, Kemp JP, Timpson NJ, Deloukas P, Ring SM, Wichmann HE, Muller-Nurasyid M, Novak N, Klopp N, Rodriguez E, McArdle W, Linneberg A, Menne T, Nohr EA, Hofman A, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Rivadeneira F, de Jongste JC, van der Valk RJ, Wjst M, Jogi R, Geller F, Boyd HA, Murray JC, Kim C, Mentch F, March M, Mangino M, Spector TD, Bataille V, Pennell CE, Holt PG, Sly P, Tiesler CM, Thiering E, Illig T, Imboden M, Nystad W, Simpson A, Hottenga JJ, Postma D, Koppelman GH, Smit HA, Soderhall C, Chawes B, Kreiner-Moller E, Bisgaard H, Melen E, Boomsma DI, Custovic A, Jacobsson B, Probst-Hensch NM, Palmer LJ, Glass D, Hakonarson H, Melbye M, Jarvis DL, Jaddoe VW, Gieger C, Strachan DP, Martin NG, Jarvelin MR, Heinrich J, Evans DM and Weidinger S. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies three new risk loci for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2012;44:187-192.

11 Golding J, Pembrey M and Jones R. ALSPAC--the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. I. Study methodology. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2001;15:74-87.

12 Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ and Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81:559-575.

13 Olsen JR, Gallacher J, Piguet V and Francis NA. Epidemiology of molluscum contagiosum in children: a systematic review. *Fam Pract* 2014;31:130-136.

14 Kilpelainen M, Koskenvuo M, Helenius H and Terho EO. Stressful life events promote the manifestation of asthma and atopic diseases. *Clin Exp Allergy* 2002;32:256-263.

15 Kodama A, Horikawa T, Suzuki T, Ajiki W, Takashima T, Harada S and Ichihashi M. Effect of stress on atopic dermatitis: investigation in patients after the great hanshin earthquake. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:173-176.

16 Kantor R and Silverberg JI. Environmental risk factors and their role in the management of atopic dermatitis. *Expert Rev Clin Immunol* 2017;13:15-26.

17 Odhiambo JA, Williams HC, Clayton TO, Robertson CF and Asher MI. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1251-1258.

18 Lau S, Matricardi PM, Wahn U, Lee YA and Keil T. Allergy and atopy from infancy to adulthood: Messages from the German birth cohort MAS. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2019;122:25-32.

- 19 Illi S, von ME, Lau S, Nickel R, Gruber C, Niggemann B and Wahn U. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:925-931.
- 20 Paternoster L, Savenije OEM, Heron J, Evans DM, Vonk JM, Brunekreef B, Wijga AH, Henderson AJ, Koppelman GH and Brown SJ. Identification of atopic dermatitis subgroups in children from 2 longitudinal birth cohorts. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:964-971.
- 21 Taylor B, Wadsworth J, Wadsworth M and Peckham C. Changes in the reported prevalence of childhood eczema since the 1939-45 war. *Lancet* 1984;2:1255-1257.
- 22 Schultz LF and Hanifin JM. Secular change in the occurrence of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1992;176:7-12.
- 23 Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK and Williams H. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 2006;368:733-743.
- 24 Punekar YS and Sheikh A. Establishing the sequential progression of multiple allergic diagnoses in a UK birth cohort using the General Practice Research Database. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1889-1895.
- 25 Bantz SK, Zhu Z and Zheng T. The Atopic March: Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma. *J Clin Cell Immunol* 2014;5:
- 26 Peters AS, Kellberger J, Vogelberg C, Dressel H, Windstetter D, Weinmayr G, Genuneit J, Nowak D, von ME and Radon K. Prediction of the incidence, recurrence, and persistence of atopic dermatitis in adolescence: a prospective cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:590-595.
- 27 Margolis DJ, Apter AJ, Gupta J, Hoffstad O, Papadopoulos M, Campbell LE, Sandilands A, McLean WH, Rebbeck TR and Mitra N. The persistence of atopic dermatitis and filaggrin (FLG) mutations in a US longitudinal cohort. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:912-917.
- 28 Mortz CG, Andersen KE, Dellgren C, Barington T and Bindslev-Jensen C. Atopic dermatitis from adolescence to adulthood in the TOACS cohort: prevalence, persistence and comorbidities. *Allergy* 2015;70:836-845.
- 29 Ballardini N, Bergstrom A, Bohme M, van HM, Hallner E, Johansson E, Soderhall C, Kull I, Wickman M and Wahlgren CF. Infantile eczema: Prognosis and risk of asthma and rhinitis in preadolescence. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:594-596.
- 30 von Kobyletzki LB, Bornehag CG, Hasselgren M, Larsson M, Lindstrom CB and Svensson A. Eczema in early childhood is strongly associated with the development of asthma and rhinitis in a prospective cohort. *BMC Dermatol* 2012;12:11-
- 31 Rochat MK, Illi S, Ege MJ, Lau S, Keil T, Wahn U and von ME. Allergic rhinitis as a predictor for wheezing onset in school-aged children. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:1170-1175.

- 32 Marenholz I, Nickel R, Ruschendorf F, Schulz F, Esparza-Gordillo J, Kerscher T, Gruber C, Lau S, Worm M, Keil T, Kurek M, Zaluga E, Wahn U and Lee YA. Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:866-871.
- 33 Ballardini N, Bergstrom A, Wahlgren CF, van HM, Hallner E, Kull I, Melen E, Anto JM, Bousquet J and Wickman M. IgE antibodies in relation to prevalence and multimorbidity of eczema, asthma, and rhinitis from birth to adolescence. *Allergy* 2016;71:342-349.
- 34 Pinart M, Benet M, Annesi-Maesano I, von BA, Berdel D, Carlsen KC, Carlsen KH, Bindsvlev-Jensen C, Eller E, Fantini MP, Lenzi J, Gehring U, Heinrich J, Hohmann C, Just J, Keil T, Kerkhof M, Kogevinas M, Koletzko S, Koppelman GH, Kull I, Lau S, Melen E, Momas I, Porta D, Postma DS, Ranciere F, Smit HA, Stein RT, Tischer CG, Torrent M, Wickman M, Wijga AH, Bousquet J, Sunyer J, Basagana X, Guerra S, Garcia-Aymerich J and Anto JM. Comorbidity of eczema, rhinitis, and asthma in IgE-sensitised and non-IgE-sensitised children in MeDALL: a population-based cohort study. *Lancet Respir Med* 2014;2:131-140.
- 35 Ferreira MA, Vonk JM, Baurecht H, Marenholz I, Tian C, Hoffman JD, Helmer Q, Tillander A, Ulleamar V, van DJ, Lu Y, Ruschendorf F, Esparza-Gordillo J, Medway CW, Mountjoy E, Burrows K, Hummel O, Grosche S, Brumpton BM, Witte JS, Hottenga JJ, Willemsen G, Zheng J, Rodriguez E, Hotze M, Franke A, Revez JA, Beesley J, Matheson MC, Dharmage SC, Bain LM, Fritsche LG, Gabrielsen ME, Balliu B, Nielsen JB, Zhou W, Hveem K, Langhammer A, Holmen OL, Loset M, Abecasis GR, Willer CJ, Arnold A, Homuth G, Schmidt CO, Thompson PJ, Martin NG, Duffy DL, Novak N, Schulz H, Karrasch S, Gieger C, Strauch K, Melles RB, Hinds DA, Hubner N, Weidinger S, Magnusson PKE, Jansen R, Jorgenson E, Lee YA, Boomsma DI, Almqvist C, Karlsson R, Koppelman GH and Paternoster L. Shared genetic origin of asthma, hay fever and eczema elucidates allergic disease biology. *Nat Genet* 2017;49:1752-1757.
- 36 Pavlos R, Mallal S, Ostrov D, Buus S, Metushi I, Peters B and Phillips E. T cell-mediated hypersensitivity reactions to drugs. *Annu Rev Med* 2015;66:439-454.
- 37 de Andrade CR, da C, I, Goncalves AC, Fernandes Fontes MJ, de Lima Belizario Facury Lasmar LM and Moreira Camargos PA. Asthma and allergic rhinitis co-morbidity: a cross-sectional questionnaire study on adolescents aged 13-14 years. *Prim Care Respir J* 2008;17:222-225.
- 38 Hamouda S, Karila C, Connault T, Scheinmann P and de BJ. Allergic rhinitis in children with asthma: a questionnaire-based study. *Clin Exp Allergy* 2008;38:761-766.
- 39 Leynaert B, Neukirch C, Kony S, Guenegou A, Bousquet J, Aubier M and Neukirch F. Association between asthma and rhinitis according to atopic sensitization in a population-based study. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:86-93.
- 40 van der Hulst AE, Klip H and Brand PL. Risk of developing asthma in young children with atopic eczema: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:565-569.
- 41 Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC, Houry S, Oukka M and Kuchroo VK. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 2008;9:1347-1355.



- 42 Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM and Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123-1132.
- 43 Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL and Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 2003;21:713-758.
- 44 Zhu J, Yamane H and Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol* 2010;28:445-489.
- 45 Komai M, Tanaka H, Masuda T, Nagao K, Ishizaki M, Sawada M and Nagai H. Role of Th2 responses in the development of allergen-induced airway remodelling in a murine model of allergic asthma. *Br J Pharmacol* 2003;138:912-920.
- 46 Kaplan MH, Hufford MM and Olson MR. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol* 2015;15:295-307.
- 47 Yao W, Zhang Y, Jabeen R, Nguyen ET, Wilkes DS, Tepper RS, Kaplan MH and Zhou B. Interleukin-9 is required for allergic airway inflammation mediated by the cytokine TSLP. *Immunity* 2013;38:360-372.
- 48 Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, Ahlfors H, Wilhelm C, Tolaini M, Menzel U, Garefalaki A, Potocnik AJ and Stockinger B. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* 2011;12:255-263.
- 49 Burkett PR, Meyer zu HG and Kuchroo VK. Pouring fuel on the fire: Th17 cells, the environment, and autoimmunity. *J Clin Invest* 2015;125:2211-2219.
- 50 Gagliani N, Vesely MC, Iseppon A, Brockmann L, Xu H, Palm NW, de Zoete MR, Licona-Limon P, Paiva RS, Ching T, Weaver C, Zi X, Pan X, Fan R, Garmire LX, Cotton MJ, Drier Y, Bernstein B, Geginat J, Stockinger B, Esplugues E, Huber S and Flavell RA. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* 2015
- 51 Plank MW, Kaiko GE, Maltby S, Weaver J, Tay HL, Shen W, Wilson MS, Durum SK and Foster PS. Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity. *J Immunol* 2017;198:2182-2190.
- 52 Fujita H. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *J Dermatol Sci* 2013;72:3-8.
- 53 Manzanillo P, Eidenschenk C and Ouyang W. Deciphering the crosstalk among IL-1 and IL-10 family cytokines in intestinal immunity. *Trends Immunol* 2015;36:471-478.
- 54 Hutchins AP, Diez D and Miranda-Saavedra D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Brief Funct Genomics* 2013;12:489-498.
- 55 Plitas G and Rudensky AY. Regulatory T Cells: Differentiation and Function. *Cancer Immunol Res* 2016;4:721-725.
- 56 Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM and Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:490-500.

- 57 Oettgen HC, Martin TR, Wynshaw-Boris A, Deng C, Drazen JM and Leder P. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature* 1994;370:367-370.
- 58 Finkelman FD, Khodoun MV and Strait R. Human IgE-independent systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:1674-1680.
- 59 Roediger B, Kyle R, Yip KH, Sumaria N, Guy TV, Kim BS, Mitchell AJ, Tay SS, Jain R, Forbes-Blom E, Chen X, Tong PL, Bolton HA, Artis D, Paul WE, Fazekas de St GB, Grimbaldston MA, Le GG and Weninger W. Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2013;14:564-573.
- 60 Licona-Limon P, Kim LK, Palm NW and Flavell RA. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2013;14:536-542.
- 61 Price AE, Liang HE, Sullivan BM, Reinhardt RL, Eisley CJ, Erle DJ and Locksley RM. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:11489-11494.
- 62 Kim BS, Siracusa MC, Saenz SA, Noti M, Monticelli LA, Sonnenberg GF, Hepworth MR, Van Voorhees AS, Comeau MR and Artis D. TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. *Sci Transl Med* 2013;5:170ra16-
- 63 Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Menon S, McClanahan T, de Waal-Malefyt RR, Bazan F, Kastelein RA and Liu YJ. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002;3:673-680.
- 64 Stier MT, Zhang J, Goleniewska K, Cephys JY, Rusznak M, Wu L, Van KL, Zhou B, Newcomb DC and Peebles RS, Jr. IL-33 promotes the egress of group 2 innate lymphoid cells from the bone marrow. *J Exp Med* 2018;215:263-281.
- 65 Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 1999;402:B5-11.
- 66 van Beijsterveldt CE and Boomsma DI. Genetics of parentally reported asthma, eczema and rhinitis in 5-yr-old twins. *Eur Respir J* 2007;29:516-521.
- 67 Thomsen SF, Ulrik CS, Kyvik KO, Hjelmberg J, Skadhauge LR, Steffensen I and Backer V. Importance of genetic factors in the etiology of atopic dermatitis: a twin study. *Allergy Asthma Proc* 2007;28:535-539.
- 68 Help Me Understand Genetics page. National Library of Medicine (US). Genetics Home Reference [Internet]. Bethesda (MD): The Library; 2013 Sep 16.; (Accessed 10-7-2020, at: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genomicresearch/snp>.)
- 69 Tak YG and Farnham PJ. Making sense of GWAS: using epigenomics and genome engineering to understand the functional relevance of SNPs in non-coding regions of the human genome. *Epigenetics Chromatin* 2015;8:57-
- 70 Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 2010;363:166-176.

- 71 Fadista J, Manning AK, Florez JC and Groop L. The (in)famous GWAS P-value threshold revisited and updated for low-frequency variants. *Eur J Hum Genet* 2016;24:1202-1205.
- 72 Sadee W, Hartmann K, Seweryn M, Pietrzak M, Handelman SK and Rempala GA. Missing heritability of common diseases and treatments outside the protein-coding exome. *Hum Genet* 2014;133:1199-1215.
- 73 Rodriguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, Irvine AD and Weidinger S. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1361-1370.
- 74 Baurecht H, Irvine AD, Novak N, Illig T, Buhler B, Ring J, Wagenpfeil S and Weidinger S. Toward a major risk factor for atopic eczema: meta-analysis of filaggrin polymorphism data. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:1406-1412.
- 75 Brown SJ and McLean WH. One remarkable molecule: filaggrin. *J Invest Dermatol* 2012;132:751-762.
- 76 Marenholz I, Rivera VA, Esparza-Gordillo J, Bauerfeind A, Lee-Kirsch MA, Ciechanowicz A, Kurek M, Piskackova T, Macek M and Lee YA. Association screening in the Epidermal Differentiation Complex (EDC) identifies an SPRR3 repeat number variant as a risk factor for eczema. *J Invest Dermatol* 2011;131:1644-1649.
- 77 Soderhall C, Marenholz I, Kerscher T, Ruschendorf F, Esparza-Gordillo J, Worm M, Gruber C, Mayr G, Albrecht M, Rohde K, Schulz H, Wahn U, Hubner N and Lee YA. Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS Biol* 2007;5:e242-
- 78 He JQ, Chan-Yeung M, Becker AB, Dimich-Ward H, Ferguson AC, Manfreda J, Watson WT and Sandford AJ. Genetic variants of the IL13 and IL4 genes and atopic diseases in at-risk children. *Genes Immun* 2003;4:385-389.
- 79 Lepre T, Cascella R, Ragazzo M, Galli E, Novelli G and Giardina E. Association of KIF3A, but not OVOL1 and ACTL9, with atopic eczema in Italian patients. *Br J Dermatol* 2013;168:1106-1108.
- 80 Schaarschmidt H, Ellinghaus D, Rodriguez E, Kretschmer A, Baurecht H, Lipinski S, Meyer-Hoffert U, Harder J, Lieb W, Novak N, Folster-Holst R, Esparza-Gordillo J, Marenholz I, Ruschendorf F, Hubner N, Reischl E, Waldenberger M, Gieger C, Illig T, Kabesch M, Zhang XJ, Xiao FL, Lee YA, Franke A and Weidinger S. A genome-wide association study reveals 2 new susceptibility loci for atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:802-806.
- 81 Mahachie John JM, Baurecht H, Rodriguez E, Naumann A, Wagenpfeil S, Klopp N, Mempel M, Novak N, Bieber T, Wichmann HE, Ring J, Illig T, Cattaert T, Van SK and Weidinger S. Analysis of the high affinity IgE receptor genes reveals epistatic effects of FCER1A variants on eczema risk. *Allergy* 2010;65:875-882.
- 82 Hussein YM, Shalaby SM, Nassar A, Alzahrani SS, Alharbi AS and Nouh M. Association between genes encoding components of the IL-4/IL-4 receptor pathway and dermatitis in children. *Gene* 2014;545:276-281.

- 83 Punnonen J, Yssel H and de Vries JE. The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:792-801.
- 84 Ring J. Pathophysiologie des atopischen Ekzems. In: Ring J, Hrsg. *Neurodermitis - Atopisches Ekzem*. 1.Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012:67-98.
- 85 Peng W and Novak N. Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2015;45:566-574.
- 86 Thepen T, Langeveld-Wildschut EG, Bihari IC, van Wichen DF, van Reijssen FC, Mudde GC and Bruijnzeel-Koomen CA. Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from an initial TH2 response to a TH1 response in situ: an immunocytochemical study. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:828-837.
- 87 Brunner PM, Guttman-Yassky E and Leung DY. The immunology of atopic dermatitis and its reversibility with broad-spectrum and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139:S65-S76.
- 88 Blauvelt A, de Bruin-Weller M, Gooderham M, Cather JC, Weisman J, Pariser D, Simpson EL, Papp KA, Hong HC, Rubel D, Foley P, Prens E, Griffiths CEM, Etoh T, Pinto PH, Pujol RM, Szepietowski JC, Ettler K, Kemeny L, Zhu X, Akinlade B, Hultsch T, Mastey V, Gadkari A, Eckert L, Amin N, Graham NMH, Pirozzi G, Stahl N, Yancopoulos GD and Shumel B. Long-term management of moderate-to-severe atopic dermatitis with dupilumab and concomitant topical corticosteroids (LIBERTY AD CHRONOS): a 1-year, randomised, double-blinded, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017;389:2287-2303.
- 89 Gittler JK, Shemer A, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQ, Mitsui H, Cardinale I, de Guzman SC, Krueger JG and Guttman-Yassky E. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:1344-1354.
- 90 Esaki H, Brunner PM, Renert-Yuval Y, Czarnowicki T, Huynh T, Tran G, Lyon S, Rodriguez G, Immaneni S, Johnson DB, Bauer B, Fuentes-Duculan J, Zheng X, Peng X, Estrada YD, Xu H, de Guzman SC, Suarez-Farinas M, Krueger JG, Paller AS and Guttman-Yassky E. Early-onset pediatric atopic dermatitis is TH2 but also TH17 polarized in skin. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:1639-1651.
- 91 Sonkoly E, Muller A, Lauerma AI, Pivarcsi A, Soto H, Kemeny L, Alenius H, Dieu-Nosjean MC, Meller S, Rieker J, Steinhoff M, Hoffmann TK, Ruzicka T, Zlotnik A and Homey B. IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:411-417.
- 92 Cayrol C and Girard JP. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr Opin Immunol* 2014;31:31-37.
- 93 Barlow JL, Peel S, Fox J, Panova V, Hardman CS, Camelo A, Bucks C, Wu X, Kane CM, Neill DR, Flynn RJ, Sayers I, Hall IP and McKenzie AN. IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13-producing nuocytes (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:933-941.

- 94 Jones RW, Ring S, Tyfield L, Hamvas R, Simmons H, Pembrey M and Golding J. A new human genetic resource: a DNA bank established as part of the Avon longitudinal study of pregnancy and childhood (ALSPAC). *Eur J Hum Genet* 2000;8:653-660.
- 95 Ramasamy A, Curjuric I, Coin LJ, Kumar A, McArdle WL, Imboden M, Leynaert B, Kogevinas M, Schmid-Grendelmeier P, Pekkanen J, Wjst M, Bircher AJ, Sovio U, Rochat T, Hartikainen AL, Balding DJ, Jarvelin MR, Probst-Hensch N, Strachan DP and Jarvis DL. A genome-wide meta-analysis of genetic variants associated with allergic rhinitis and grass sensitization and their interaction with birth order. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:996-1005.
- 96 International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003;426:789-796.
- 97 Paternoster L, Howe LD, Tilling K, Weedon MN, Freathy RM, Frayling TM, Kemp JP, Smith GD, Timpson NJ, Ring SM, Evans DM and Lawlor DA. Adult height variants affect birth length and growth rate in children. *Hum Mol Genet* 2011;20:4069-4075.
- 98 Slatkin M. Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet* 2008;9:477-485.
- 99 Bickeböller H, Fischer C. Assoziationsanalyse. In: Bickeböller H, Fischer C, Hrsg. *Einführung in die Genetische Epidemiologie*. 1.Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2007:231-231.
- 100 Bärlocher F. Epidemiologie. In: Bärlocher F, Hrsg. *Biostatistik*. 2.Aufl. Stuttgart: Thieme; 2008:172-172.
- 101 Weiß C and Rzany B. Tests zum Vergleich von Häufigkeiten. In: *Basiswissen Medizinische Statistik*. 6.Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013:215-216.
- 102 Hosmer DW and Lemeshow S. Confidence interval estimation of interaction. *Epidemiology* 1992;3:452-456.
- 103 Sachs L, Hedderich J. Die Analyse von Häufigkeiten. In: Sachs L, Hedderich J, Hrsg. *Angewandte Statistik*. 12.Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2006:479-488.
- 104 Davison, A. C. Recent Developments in Bootstrap Methodology. In: *Statistical Science*. 2003:141-157.
- 105 Good, P. *Permutation Tests: a practical Guide to Resampling Methods for Testing Hypotheses*. New York: Springer, 1995.
- 106 Bauerfeind A. Einfluss genetischer Varianten auf den Cholesterinstoffwechsel in einer mitteleuropäischen Bevölkerungsstichprobe.: *Charité Universitätsmedizin Berlin* 2006:30-30.
- 107 Purcell S, Cherny SS and Sham PC. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 2003;19:149-150.
- 108 Wadonda-Kabondo N, Sterne JA, Golding J, Kennedy CT, Archer CB and Dunnill MG. A prospective study of the prevalence and incidence of atopic dermatitis in children aged 0-42 months. *Br J Dermatol* 2003;149:1023-1028.

- 109 Barnes KC. An update on the genetics of atopic dermatitis: scratching the surface in 2009. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:16-29.
- 110 Grundberg E, Small KS, Hedman AK, Nica AC, Buil A, Keildson S, Bell JT, Yang TP, Meduri E, Barrett A, Nisbett J, Sekowska M, Wilk A, Shin SY, Glass D, Travers M, Min JL, Ring S, Ho K, Thorleifsson G, Kong A, Thorsteindottir U, Ainali C, Dimas AS, Hassanali N, Ingle C, Knowles D, Krestyaninova M, Lowe CE, Di MP, Montgomery SB, Parts L, Potter S, Surdulescu G, Tsaprouni L, Tsoka S, Bataille V, Durbin R, Nestle FO, O'Rahilly S, Soranzo N, Lindgren CM, Zondervan KT, Ahmadi KR, Schadt EE, Stefansson K, Smith GD, McCarthy MI, Deloukas P, Dermitzakis ET and Spector TD. Mapping cis- and trans-regulatory effects across multiple tissues in twins. *Nat Genet* 2012;44:1084-1089.
- 111 Nicolae DL, Gamazon E, Zhang W, Duan S, Dolan ME and Cox NJ. Trait-associated SNPs are more likely to be eQTLs: annotation to enhance discovery from GWAS. *PLoS Genet* 2010;6:e1000888-
- 112 Battle A and Montgomery SB. Determining causality and consequence of expression quantitative trait loci. *Hum Genet* 2014;133:727-735.
- 113 Weiland SK, Bjorksten B, Brunekreef B, Cookson WO, von ME and Strachan DP. Phase II of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC II): rationale and methods. *Eur Respir J* 2004;24:406-412.
- 114 Heinrich S, Peters A, Kellberger J, Ellenberg D, Genuneit J, Nowak D, Vogelberg C, von ME, Weinmayr G and Radon K. Study on occupational allergy risks (SOLAR II) in Germany: design and methods. *BMC Public Health* 2011;11:298-
- 115 Martin AR, Gignoux CR, Walters RK, Wojcik GL, Neale BM, Gravel S, Daly MJ, Bustamante CD and Kenny EE. Human Demographic History Impacts Genetic Risk Prediction across Diverse Populations. *Am J Hum Genet* 2017;100:635-649.
- 116 Manrai AK, Funke BH, Rehm HL, Olesen MS, Maron BA, Szolovits P, Margulies DM, Loscalzo J and Kohane IS. Genetic Misdiagnoses and the Potential for Health Disparities. *N Engl J Med* 2016;375:655-665.
- 117 Fumagalli M, Moltke I, Grarup N, Racimo F, Bjerregaard P, Jorgensen ME, Korneliussen TS, Gerbault P, Skotte L, Linneberg A, Christensen C, Brandslund I, Jorgensen T, Huerta-Sanchez E, Schmidt EB, Pedersen O, Hansen T, Albrechtsen A and Nielsen R. Greenlandic Inuit show genetic signatures of diet and climate adaptation. *Science* 2015;349:1343-1347.
- 118 Barker JN, Palmer CN, Zhao Y, Liao H, Hull PR, Lee SP, Allen MH, Meggitt SJ, Reynolds NJ, Trembath RC and McLean WH. Null mutations in the filaggrin gene (FLG) determine major susceptibility to early-onset atopic dermatitis that persists into adulthood. *J Invest Dermatol* 2007;127:564-567.
- 119 Spergel JM, Mizoguchi E, Brewer JP, Martin TR, Bhan AK and Geha RS. Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J Clin Invest* 1998;101:1614-1622.
- 120 Ying S, Meng Q, Corrigan CJ and Lee TH. Lack of filaggrin expression in the human bronchial mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:1386-1388.

121 Fallon PG, Sasaki T, Sandilands A, Campbell LE, Saunders SP, Mangan NE, Callanan JJ, Kawasaki H, Shiohama A, Kubo A, Sundberg JP, Presland RB, Fleckman P, Shimizu N, Kudoh J, Irvine AD, Amagai M and McLean WH. A homozygous frameshift mutation in the mouse Flg gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nat Genet* 2009;41:602-608.

122 Paternoster L, Standl M, Waage J, Baurecht H, Hotze M, Strachan DP, Curtin JA, Bonnelykke K, Tian C, Takahashi A, Esparza-Gordillo J, Alves AC, Thyssen JP, den Dekker HT, Ferreira MA, Altmaier E, Sleiman PM, Xiao FL, Gonzalez JR, Marenholz I, Kalb B, Yanes MP, Xu CJ, Carstensen L, Groen-Blokhuis MM, Venturini C, Pennell CE, Barton SJ, Levin AM, Curjuric I, Bustamante M, Kreiner-Moller E, Lockett GA, Bacelis J, Bunyavanich S, Myers RA, Matanovic A, Kumar A, Tung JY, Hirota T, Kubo M, McArdle WL, Henderson AJ, Kemp JP, Zheng J, Smith GD, Ruschendorf F, Bauerfeind A, Lee-Kirsch MA, Arnold A, Homuth G, Schmidt CO, Mangold E, Cichon S, Keil T, Rodriguez E, Peters A, Franke A, Lieb W, Novak N, Folster-Holst R, Horikoshi M, Pekkanen J, Sebirt S, Husemoen LL, Grarup N, de Jongste JC, Rivadeneira F, Hofman A, Jaddoe VW, Pasmans SG, Elbert NJ, Uitterlinden AG, Marks GB, Thompson PJ, Matheson MC, Robertson CF, Ried JS, Li J, Zuo XB, Zheng XD, Yin XY, Sun LD, McAleer MA, O'Regan GM, Fahy CM, Campbell LE, Macek M, Kurek M, Hu D, Eng C, Postma DS, Feenstra B, Geller F, Hottenga JJ, Middeldorp CM, Hysi P, Bataille V, Spector T, Tiesler CM, Thiering E, Pahukasahasram B, Yang JJ, Imboden M, Huntsman S, Vilor-Tejedor N, Relton CL, Myhre R, Nystad W, Custovic A, Weiss ST, Meyers DA, Soderhall C, Melen E, Ober C, Raby BA, Simpson A, Jacobsson B, Holloway JW, Bisgaard H, Sunyer J, Hensch NMP, Williams LK, Godfrey KM, Wang CA, Boomsma DI, Melbye M, Koppelman GH, Jarvis D, McLean WI, Irvine AD, Zhang XJ, Hakonarson H, Gieger C, Burchard EG, Martin NG, Duijts L, Linneberg A, Jarvelin MR, Nothen MM, Lau S, Hubner N, Lee YA, Tamari M, Hinds DA, Glass D, Brown SJ, Heinrich J, Evans DM and Weidinger S. Multi-ancestry genome-wide association study of 21,000 cases and 95,000 controls identifies new risk loci for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2015;47:1449-1456.

123 Johansson A, Rask-Andersen M, Karlsson T and Ek WE. Genome-wide association analysis of 350 000 Caucasians from the UK Biobank identifies novel loci for asthma, hay fever and eczema. *Hum Mol Genet* 2019;28:4022-4041.

124 Marenholz I, Esparza-Gordillo J, Ruschendorf F, Bauerfeind A, Strachan DP, Spycher BD, Baurecht H, Margaritte-Jeannin P, Saaf A, Kerkhof M, Ege M, Baltic S, Matheson MC, Li J, Michel S, Ang WQ, McArdle W, Arnold A, Homuth G, Demenais F, Bouzigon E, Soderhall C, Pershagen G, de Jongste JC, Postma DS, Braun-Fahrlander C, Horak E, Ogorodova LM, Puzryev VP, Bragina EY, Hudson TJ, Morin C, Duffy DL, Marks GB, Robertson CF, Montgomery GW, Musk B, Thompson PJ, Martin NG, James A, Sleiman P, Toskala E, Rodriguez E, Folster-Holst R, Franke A, Lieb W, Gieger C, Heinzmann A, Rietschel E, Keil T, Cichon S, Nothen MM, Pennell CE, Sly PD, Schmidt CO, Matanovic A, Schneider V, Heinig M, Hubner N, Holt PG, Lau S, Kabesch M, Weidinger S, Hakonarson H, Ferreira MAR, Laprise C, Freidin MB, Genuneit J, Koppelman GH, Melen E, Dizier MH, Henderson AJ and Lee YA. Meta-analysis identifies seven susceptibility loci involved in the atopic march. *Nat Commun* 2015;6:8804-

125 Kang Z, Li Q, Fu P, Yan S, Guan M, Xu J and Xu F. Correlation of KIF3A and OVOL1, but not ACTL9, with atopic dermatitis in Chinese pediatric patients. *Gene* 2015;571:249-251.

126 Tsuji G, Ito T, Chiba T, Mitoma C, Nakahara T, Uchi H and Furue M. The role of the OVOL1-OVOL2 axis in normal and diseased human skin. *J Dermatol Sci* 2018

- 127 Lee B, Villarreal-Ponce A, Fallahi M, Ovadia J, Sun P, Yu QC, Ito S, Sinha S, Nie Q and Dai X. Transcriptional mechanisms link epithelial plasticity to adhesion and differentiation of epidermal progenitor cells. *Dev Cell* 2014;29:47-58.
- 128 Tsuji G, Hashimoto-Hachiya A, Kiyomatsu-Oda M, Takemura M, Ohno F, Ito T, Morino-Koga S, Mitoma C, Nakahara T, Uchi H and Furue M. Aryl hydrocarbon receptor activation restores filaggrin expression via OVOL1 in atopic dermatitis. *Cell Death Dis* 2017;8:e2931-
- 129 Garbers C, Monhasery N, Aparicio-Siegmund S, Lokau J, Baran P, Nowell MA, Jones SA, Rose-John S and Scheller J. The interleukin-6 receptor Asp358Ala single nucleotide polymorphism rs2228145 confers increased proteolytic conversion rates by ADAM proteases. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:1485-1494.
- 130 Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 2005;175:3463-3468.
- 131 Galicia JC, Tai H, Komatsu Y, Shimada Y, Akazawa K and Yoshie H. Polymorphisms in the IL-6 receptor (IL-6R) gene: strong evidence that serum levels of soluble IL-6R are genetically influenced. *Genes Immun* 2004;5:513-516.
- 132 Ullah MA, Revez JA, Loh Z, Simpson J, Zhang V, Bain L, Varelias A, Rose-John S, Blumenthal A, Smyth MJ, Hill GR, Sukkar MB, Ferreira MA and Phipps S. Allergen-induced IL-6 trans-signaling activates gammadelta T cells to promote type 2 and type 17 airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:1065-1073.
- 133 Tsukamoto H, Senju S, Matsumura K, Swain SL and Nishimura Y. IL-6-mediated environmental conditioning of defective Th1 differentiation dampens antitumour immune responses in old age. *Nat Commun* 2015;6:6702-
- 134 Goodman WA, Levine AD, Massari JV, Sugiyama H, McCormick TS and Cooper KD. IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells. *J Immunol* 2009;183:3170-3176.
- 135 Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S and Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008;223:87-113.
- 136 Tanaka T, Hishitani Y and Ogata A. Monoclonal antibodies in rheumatoid arthritis: comparative effectiveness of tocilizumab with tumor necrosis factor inhibitors. *Biologics* 2014;8:141-153.
- 137 Nakajima S, Kitoh A, Egawa G, Natsuaki Y, Nakamizo S, Moniaga CS, Otsuka A, Honda T, Hanakawa S, Amano W, Iwakura Y, Nakae S, Kubo M, Miyachi Y and Kabashima K. IL-17A as an inducer for Th2 immune responses in murine atopic dermatitis models. *J Invest Dermatol* 2014;134:2122-2130.
- 138 Navarini AA, French LE and Hofbauer GF. Interrupting IL-6-receptor signaling improves atopic dermatitis but associates with bacterial superinfection. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:1128-1130.
- 139 Johansson E, Biagini Myers JM, Martin LJ, He H, Pilipenko V, Mersha T, Weirauch M, Salomonis N, Ryan P, LeMasters GK, Bernstein DI, Lockey J and Khurana Hershey



GK. KIF3A genetic variation is associated with pediatric asthma in the presence of eczema independent of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:595-598.

140 Hirokawa N. Stirring up development with the heterotrimeric kinesin KIF3. *Traffic* 2000;1:29-34.

141 Giridhar PV, Bell SM, Sridharan A, Rajavelu P, Kitzmiller JA, Na CL, Kofron M, Brandt EB, Ericksen M, Naren AP, Moon C, Khurana Hershey GK and Whitsett JA. Airway Epithelial KIF3A Regulates Th2 Responses to Aeroallergens. *J Immunol* 2016;197:4228-4239.

142 Corbit KC, Shyer AE, Dowdle WE, Gaulden J, Singla V, Chen MH, Chuang PT and Reiter JF. Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms. *Nat Cell Biol* 2008;10:70-76.

143 Kim M, Suh YA, Oh JH, Lee BR, Kim J and Jang SJ. KIF3A binds to beta-arrestin for suppressing Wnt/beta-catenin signalling independently of primary cilia in lung cancer. *Sci Rep* 2016;6:32770-

144 Pala R, Alomari N and Nauli SM. Primary Cilium-Dependent Signaling Mechanisms. *Int J Mol Sci* 2017;18:

145 Ma J, Wang R, Fang X and Sun Z. beta-catenin/TCF-1 pathway in T cell development and differentiation. *J Neuroimmune Pharmacol* 2012;7:750-762.

146 van LJ, Fleskens V, Tiemessen MM, Mokry M, van BR, Meerding J, Pals CE, Kurek D, Baert MR, Delemarre EM, Grone A, Koerkamp MJ, Sijts AJ, Nieuwenhuis EE, Maurice MM, van Es JH, Ten BD, Holstege FC, Staal FJ, Zaiss DM, Prakken BJ and Coffey PJ. Canonical Wnt signaling negatively modulates regulatory T cell function. *Immunity* 2013;39:298-310.

147 Marenholz I, Bauerfeind A, Esparza-Gordillo J, Kerscher T, Granell R, Nickel R, Lau S, Henderson J and Lee YA. The eczema risk variant on chromosome 11q13 (rs7927894) in the population-based ALSPAC cohort: a novel susceptibility factor for asthma and hay fever. *Hum Mol Genet* 2011;20:2443-2449.

148 Bonnelykke K, Matheson MC, Pers TH, Granell R, Strachan DP, Alves AC, Linneberg A, Curtin JA, Warrington NM, Standl M, Kerkhof M, Jonsdottir I, Bukvic BK, Kaakinen M, Sleimann P, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Schramm K, Baltic S, Kreiner-Moller E, Simpson A, St PB, Coin L, Hui J, Walters EH, Tiesler CMT, Duffy DL, Jones G, Ring SM, McArdle WL, Price L, Robertson CF, Pekkanen J, Tang CS, Thiering E, Montgomery GW, Hartikainen AL, Dharmage SC, Husemoen LL, Herder C, Kemp JP, Elliot P, James A, Waldenberger M, Abramson MJ, Fairfax BP, Knight JC, Gupta R, Thompson PJ, Holt P, Sly P, Hirschhorn JN, Blekic M, Weidinger S, Hakonarsson H, Stefansson K, Heinrich J, Postma DS, Custovic A, Pennell CE, Jarvelin MR, Koppelman GH, Timpson N, Ferreira MA, Bisgaard H and Henderson AJ. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies ten loci influencing allergic sensitization. *Nat Genet* 2013;45:902-906.

149 Amaral AF, Minelli C, Guerra S, Wjst M, Probst-Hensch N, Pin I, Svanes C, Janson C, Heinrich J and Jarvis DL. The locus C11orf30 increases susceptibility to poly-sensitization. *Allergy* 2015;70:328-333.

150 Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, Lee JC, Goyette P, Imielinski M, Latiano A, Lagace C, Scott R, Amininejad L, Bumpstead S, Baidoo L,

Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Buning C, Colombel JF, Denson LA, De VM, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Fehrmann RS, Floyd JA, Florin T, Franchimont D, Franke L, Georges M, Glas J, Glazer NL, Guthery SL, Haritunians T, Hayward NK, Hugot JP, Jobin G, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, McGovern DP, Milla M, Montgomery GW, Morley KI, Mowat C, Ng A, Newman W, Ophoff RA, Papi L, Palmieri O, Peyrin-Biroulet L, Panes J, Phillips A, Prescott NJ, Proctor DD, Roberts R, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Schumm P, Seibold F, Sharma Y, Simms LA, Seielstad M, Steinhart AH, Targan SR, van den Berg LH, Vatn M, Verspaget H, Walters T, Wijmenga C, Wilson DC, Westra HJ, Xavier RJ, Zhao ZZ, Ponsioen CY, Andersen V, Torkvist L, Gazouli M, Anagnou NP, Karlsen TH, Kupcinskis L, Sventoraityte J, Mansfield JC, Kugathasan S, Silverberg MS, Halfvarson J, Rotter JI, Mathew CG, Griffiths AM, Gearry R, Ahmad T, Brant SR, Chamaillard M, Satsangi J, Cho JH, Schreiber S, Daly MJ, Barrett JC, Parkes M, Annese V, Hakonarson H, Radford-Smith G, Duerr RH, Vermeire S, Weersma RK and Rioux JD. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 2011;43:246-252.

151 Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA, Essers J, Mitrovic M, Ning K, Cleynen I, Theatre E, Spain SL, Raychaudhuri S, Goyette P, Wei Z, Abraham C, Achkar JP, Ahmad T, Amininejad L, Ananthakrishnan AN, Andersen V, Andrews JM, Baidoo L, Balschun T, Bampton PA, Bitton A, Boucher G, Brand S, Buning C, Cohain A, Cichon S, D'Amato M, De JD, Devaney KL, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Ferguson LR, Franchimont D, Fransen K, Gearry R, Georges M, Gieger C, Glas J, Haritunians T, Hart A, Hawkey C, Hedl M, Hu X, Karlsen TH, Kupcinskis L, Kugathasan S, Latiano A, Laukens D, Lawrance IC, Lees CW, Louis E, Mahy G, Mansfield J, Morgan AR, Mowat C, Newman W, Palmieri O, Ponsioen CY, Potocnik U, Prescott NJ, Regueiro M, Rotter JI, Russell RK, Sanderson JD, Sans M, Satsangi J, Schreiber S, Simms LA, Sventoraityte J, Targan SR, Taylor KD, Tremelling M, Verspaget HW, De VM, Wijmenga C, Wilson DC, Winkelmann J, Xavier RJ, Zeissig S, Zhang B, Zhang CK, Zhao H, Silverberg MS, Annese V, Hakonarson H, Brant SR, Radford-Smith G, Mathew CG, Rioux JD, Schadt EE, Daly MJ, Franke A, Parkes M, Vermeire S, Barrett JC and Cho JH. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012;491:119-124.

152 Betz RC, Petukhova L, Ripke S, Huang H, Menelaou A, Redler S, Becker T, Heilmann S, Yamany T, Duvic M, Hordinsky M, Norris D, Price VH, Mackay-Wiggan J, de JA, DeStefano GM, Moebus S, Bohm M, Blume-Peytavi U, Wolff H, Lutz G, Kruse R, Bian L, Amos CI, Lee A, Gregersen PK, Blaumeiser B, Altshuler D, Clynes R, de Bakker PIW, Nothen MM, Daly MJ and Christiano AM. Genome-wide meta-analysis in alopecia areata resolves HLA associations and reveals two new susceptibility loci. *Nat Commun* 2015;6:5966-

153 Nasrallah R, Imianowski CJ, Bossini-Castillo L, Grant FM, Dogan M, Placek L, Kozhaya L, Kuo P, Sadiyah F, Whiteside SK, Mumbach MR, Glinos D, Vardaka P, Whyte CE, Lozano T, Fujita T, Fujii H, Liston A, Andrews S, Cozzani A, Yang J, Mitra S, Lugli E, Chang HY, Unutmaz D, Trynka G and Roychoudhuri R. A distal enhancer at risk locus 11q13.5 promotes suppression of colitis by Treg cells. *Nature* 2020

154 Machiela MJ and Chanock SJ. LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics* 2015;31:3555-3557.

- 155 Shi X, Chen Q and Wang F. The Bidirectional Association between Inflammatory Bowel Disease and Atopic Dermatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dermatology* 2020;1-8.
- 156 Cuende J, Lienart S, Dedobbeleer O, van der Woning B, De BG, Stockis J, Huygens C, Colau D, Somja J, Delvenne P, Hannon M, Baron F, Dumoutier L, Renauld JC, De HH, Saunders M, Coulie PG and Lucas S. Monoclonal antibodies against GARP/TGF-beta1 complexes inhibit the immunosuppressive activity of human regulatory T cells in vivo. *Sci Transl Med* 2015;7:284ra56-
- 157 Manz J, Rodriguez E, ElSharawy A, Oesau EM, Petersen BS, Baurecht H, Mayr G, Weber S, Harder J, Reischl E, Schwarz A, Novak N, Franke A and Weidinger S. Targeted Resequencing and Functional Testing Identifies Low-Frequency Missense Variants in the Gene Encoding GARP as Significant Contributors to Atopic Dermatitis Risk. *J Invest Dermatol* 2016;136:2380-2386.
- 158 Ndaw VS, Ababayehu D, Spence AJ, Paez PA, Kolawole EM, Taruselli MT, Caslin HL, Chumanevich AP, Paranjape A, Baker B, Barnstein BO, Haque TT, Kiwanuka KN, Oskeritizian CA and Ryan JJ. TGF-beta1 Suppresses IL-33-Induced Mast Cell Function. *J Immunol* 2017;199:866-873.
- 159 Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, von ME, Farrall M, Lathrop M and Cookson WO. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med* 2010;363:1211-1221.
- 160 Xu D, Chan WL, Leung BP, Hunter D, Schulz K, Carter RW, McInnes IB, Robinson JH and Liew FY. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med* 1998;188:1485-1492.
- 161 Nold-Petry CA, Lo CY, Rudloff I, Elgass KD, Li S, Gantier MP, Lotz-Havla AS, Gersting SW, Cho SX, Lao JC, Ellisdon AM, Rotter B, Azam T, Mangan NE, Rossello FJ, Whisstock JC, Bufler P, Garlanda C, Mantovani A, Dinarello CA and Nold MF. IL-37 requires the receptors IL-18Ralpha and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction. *Nat Immunol* 2015;16:354-365.
- 162 Leite-de-Moraes MC, Hameg A, Pacilio M, Koezuka Y, Taniguchi M, Van KL, Schneider E, Dy M and Herbelin A. IL-18 enhances IL-4 production by ligand-activated NKT lymphocytes: a pro-Th2 effect of IL-18 exerted through NKT cells. *J Immunol* 2001;166:945-951.
- 163 Yoshimoto T, Tsutsui H, Tominaga K, Hoshino K, Okamura H, Akira S, Paul WE and Nakanishi K. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13962-13966.
- 164 Sugimoto T, Ishikawa Y, Yoshimoto T, Hayashi N, Fujimoto J and Nakanishi K. Interleukin 18 acts on memory T helper cells type 1 to induce airway inflammation and hyperresponsiveness in a naive host mouse. *J Exp Med* 2004;199:535-545.
- 165 Nakanishi K, Tsutsui H and Yoshimoto T. Importance of IL-18-induced super Th1 cells for the development of allergic inflammation. *Allergol Int* 2010;59:137-141.

- 166 Yoshimoto T, Mizutani H, Tsutsui H, Noben-Trauth N, Yamanaka K, Tanaka M, Izumi S, Okamura H, Paul WE and Nakanishi K. IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. *Nat Immunol* 2000;1:132-137.
- 167 Trzeciak M, Glen J, Rebala K, Bandurski T, Sikorska M and Nowicki R. Coexistence of 2282del4 FLG gene mutation and IL-18 -137G/C gene polymorphism enhances the risk of atopic dermatitis. *Postepy Dermatol Alergol* 2016;33:57-62.
- 168 Totte JE, van der Feltz WT, Hennekam M, van BA, van Zuuren EJ and Pasmans SG. Prevalence and odds of *Staphylococcus aureus* carriage in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol* 2016;175:687-695.
- 169 Meylan P, Lang C, Mermoud S, Johannsen A, Norrenberg S, Hohl D, Vial Y, Prod'hom G, Greub G, Kypriotou M and Christen-Zaech S. Skin Colonization by *Staphylococcus aureus* Precedes the Clinical Diagnosis of Atopic Dermatitis in Infancy. *J Invest Dermatol* 2017;137:2497-2504.
- 170 Feuillie C, Vitry P, McAleer MA, Kezic S, Irvine AD, Geoghegan JA and Dufrene YF. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to Corneocytes from Atopic Dermatitis Patients Is Controlled by Natural Moisturizing Factor Levels. *MBio* 2018;9:
- 171 Brauweiler AM, Bin L, Kim BE, Oyoshi MK, Geha RS, Goleva E and Leung DY. Filaggrin-dependent secretion of sphingomyelinase protects against staphylococcal alpha-toxin-induced keratinocyte death. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:421-427.
- 172 Miajlovic H, Fallon PG, Irvine AD and Foster TJ. Effect of filaggrin breakdown products on growth of and protein expression by *Staphylococcus aureus*. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:1184-1190.
- 173 Howell MD, Boguniewicz M, Pastore S, Novak N, Bieber T, Girolomoni G and Leung DY. Mechanism of HBD-3 deficiency in atopic dermatitis. *Clin Immunol* 2006;121:332-338.
- 174 Nakatsuji T, Chen TH, Two AM, Chun KA, Narala S, Geha RS, Hata TR and Gallo RL. *Staphylococcus aureus* Exploits Epidermal Barrier Defects in Atopic Dermatitis to Trigger Cytokine Expression. *J Invest Dermatol* 2016;136:2192-2200.
- 175 Inoue Y, Aihara M, Kirino M, Harada I, Komori-Yamaguchi J, Yamaguchi Y, Nagashima Y and Ikezawa Z. Interleukin-18 is elevated in the horny layer in patients with atopic dermatitis and is associated with *Staphylococcus aureus* colonization. *Br J Dermatol* 2011;164:560-567.
- 176 Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, Butler D, Herzog L, Carter A, Quintal L, Sekut L, Talanian R, Paskind M, Wong W, Kamen R, Tracey D and Allen H. Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* 1997;386:619-623.
- 177 Terada M, Tsutsui H, Imai Y, Yasuda K, Mizutani H, Yamanishi K, Kubo M, Matsui K, Sano H and Nakanishi K. Contribution of IL-18 to atopic-dermatitis-like skin inflammation induced by *Staphylococcus aureus* product in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8816-8821.

- 178 Lee JH, Cho DH and Park HJ. IL-18 and Cutaneous Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci* 2015;16:29357-29369.
- 179 Nakamura Y, Oscherwitz J, Cease KB, Chan SM, Munoz-Planillo R, Hasegawa M, Villaruz AE, Cheung GY, McGavin MJ, Travers JB, Otto M, Inohara N and Nunez G. Staphylococcus delta-toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature* 2013;503:397-401.
- 180 Ziyab AH, Hankinson J, Ewart S, Schauburger E, Kopec-Harding K, Zhang H, Custovic A, Arshad H, Simpson A and Karmaus WJ. Epistasis between FLG and IL4R Genes on the Risk of Allergic Sensitization: Results from Two Population-Based Birth Cohort Studies. *Sci Rep* 2018;8:3221-
- 181 Kim BE, Leung DY, Boguniewicz M and Howell MD. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin Immunol* 2008;126:332-337.
- 182 Bao L, Zhang H and Chan LS. The involvement of the JAK-STAT signaling pathway in chronic inflammatory skin disease atopic dermatitis. *JAKSTAT* 2013;2:e24137-
- 183 Kugathasan S, Baldassano RN, Bradfield JP, Sleiman PM, Imielinski M, Guthery SL, Cucchiara S, Kim CE, Frackelton EC, Annaiah K, Glessner JT, Santa E, Willson T, Eckert AW, Bonkowski E, Shaner JL, Smith RM, Otieno FG, Peterson N, Abrams DJ, Chiavacci RM, Grundmeier R, Mamula P, Tomer G, Piccoli DA, Monos DS, Annese V, Denson LA, Grant SF and Hakonarson H. Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2008;40:1211-1215.
- 184 Hsu TL, Chang YC, Chen SJ, Liu YJ, Chiu AW, Chio CC, Chen L and Hsieh SL. Modulation of dendritic cell differentiation and maturation by decoy receptor 3. *J Immunol* 2002;168:4846-4853.

## 9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Till-Yong Mohr, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Genetische Assoziationsstudie zur Untersuchung des Einflusses von Risiko-Genorten auf den Verlauf des atopischen Ekzems und den atopischen Marsch.“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **10. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.





## 11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Young-Ae Lee für die umfassende Betreuung mit stets kompetentem Rat und wissenschaftlicher Expertise, die diese Dissertation überhaupt erst möglich gemacht hat.

Herzlich danken möchte ich außerdem Herrn Dr. Jorge Esparza-Gordillo für die Einführung in genetische Assoziationsanalysen mit dem Toolset *PLINK*, Herrn Dr. Ingo Marenholz für viel konstruktive Kritik, Frau Dr. Anja Bauerfeind für die Einführung in das statistische Analyseprogramm R und RERI-Berechnungen. Vielen Dank auch an Frau Christina Flachmeier und Frau Dr. Anja Matanovic sowie an die weiteren Mitglieder der Arbeitsgruppen Lee und Hübner für die angenehme Arbeitsatmosphäre und freundlichen Gespräche im Forschungszentrum.

Ein großer Dank gebührt auch den teilnehmenden Familien und dem Team der ALSPAC-Kohorte für die Bereitstellung der Daten, die die Grundlage zum Gelingen dieser Arbeit geliefert haben.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere bei meinen Eltern und meiner Freundin Anne von Herzen für das aufgebrachte Verständnis und die bedingungslose Unterstützung bedanken.