

Aus dem Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik für Pädiatrie
mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie der Medizinischen Fakultät der
Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Kandidatengenuntersuchungen und
pharmakogenetische Untersuchungen bei
Kindern der Multizentrischen Allergie Studie und
der Early Treatment of The Atopic Child
Population**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité-
Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Müller

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. R. Nickel
 2. Prof. Dr. med. R. Wauer
 3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Heinzmann

Datum der Promotion: 22.06.2007

Meinen Eltern

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Allergie.....	2
1.1.1	Zweizeitigkeit der allergischen Reaktion.....	4
1.2	Atopie	4
1.3	Der allergische Marsch.....	5
1.4	Interventionsstudien	6
1.5	Pathophysiologie der allergischen Reaktion	7
1.5.1	Bedeutung der T-Lymphozyten	7
1.5.1.1	Die Rolle von ITK bei der Aktivierung von T-Zellen	8
1.5.2	T-Helferzell-Differenzierung.....	9
1.5.2.1	T-Zell Immunglobulin- und Mucin-Domänen Moleküle (TIM).....	10
1.5.3	Histamin.....	11
1.5.3.1	Histamin-1-Rezeptor (HRH1)	12
1.6	Genetik allergischer Erkrankungen	13
1.7	Methodik genetischer Studien.....	14
1.7.1	Assoziationsstudien (Kandidatengenstudien).....	14
1.7.2	Der Transmissions-Disäquilibrium-Test (TDT).....	14
1.7.3	Die Gene <i>ITK</i> , <i>TIM1</i> und <i>TIM3</i>	15
1.7.3.1	<i>ITK</i> -Gen.....	16
1.7.3.2	<i>TIM</i> -Gene	16
1.7.3.3	Untersuchte Polymorphismen in der Region 5q31-33	16
1.7.4	Das <i>HNMT</i> -Gen.....	18
1.7.5	Das <i>Histamin-1-Rezeptor</i> -Gen	18
1.7.6	Pharmakogenetische Untersuchung.....	19

2	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	20
2.1	Kandidatengene auf Chromosom 5q31-33.....	20
2.2	<i>HNMT</i> und <i>HRH1</i>	20
3	GRUNDLAGEN	21
3.1	Allergische Erkrankungen	21
3.1.1	Atopische Dermatitis.....	21
3.1.1.1	Definition.....	21
3.1.1.2	Epidemiologie.....	21
3.1.1.3	Pathophysiologie.....	22
3.1.1.4	Klinik.....	22
3.1.2	Allergisches Asthma und bronchiale Hyperreagibilität.....	23
3.1.2.1	Definition.....	23
3.1.2.2	Epidemiologie.....	24
3.1.2.3	Pathophysiologie.....	24
3.1.2.4	Klinik.....	25
3.1.3	Allergische Rhinitis.....	26
3.1.3.1	Definition.....	26
3.1.3.2	Epidemiologie.....	26
3.1.3.3	Pathophysiologie.....	26
3.1.3.4	Klinik.....	27
3.1.4	Pharmakotherapie der Allergie.....	27
4	POPULATIONEN, MATERIALIEN UND METHODEN	29
4.1	Populationen	29
4.1.1	Multizentrische Allergie Studie (MAS).....	29
4.1.2	Early Treatment of the Atopic Child (ETAC).....	31
4.2	Materialien	33
4.2.1	Geräte.....	33
4.2.2	Chemikalien.....	34
4.2.3	Verbrauchsmaterialien.....	34

4.2.4	Puffer und Lösungen	34
4.2.5	PCR-Reagenzien.....	34
4.3	Methoden.....	35
4.3.1	Gewinnung der Blutproben/DNA Extraktion.....	35
4.3.1.1	MiniKit.....	35
4.3.1.2	MidiKit.....	35
4.3.1.3	Photometrische Messung der DNA-Konzentration	36
4.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
4.3.3	PCR-Konditionen/Programm	37
4.3.4	<i>TIMD4</i> und <i>TIM3</i>	37
4.3.5	<i>ITK -1793</i> und <i>TIM1</i>	38
4.3.6	<i>MGC 26988 (FAM 71B)</i> und <i>ITK -1678</i>	38
4.3.7	<i>Histamin-N-Methyltransferase</i> und <i>Histamin-1-Rezeptor</i>	39
4.3.8	Gelelektrophorese	39
4.3.9	Ligthcycler	40
4.4	Schmelzkurvenverläufe in der Lightcyclerauswertung.....	44
4.4.1	Statistik	45
5	ERGEBNISSE.....	46
5.1	Region 5q31-33	46
5.1.1	Allel- und Genotypfrequenzen	46
5.1.2	Phänotyp-Genotyp-Assoziationen in der MAS-Kohorte.....	47
5.1.3	Phänotyp-Genotyp-Assoziationen in der ETAC-Population.....	51
5.2	Der <i>HRH-1(C-17T)</i>-SNP und der <i>HNMT(C314T)</i>-SNP.....	54
5.2.1	Allel- und Genotypfrequenzen	54
6	DISKUSSION	57
6.1	Studienpopulationen.....	57
6.2	Untersuchte Gene der Region 5q31-33.....	58
6.2.1	<i>TIM1</i>	59
6.2.2	<i>TIM3</i>	61

6.2.3	<i>ITK</i>	64
6.2.4	<i>MGC 26988</i> und <i>TIMD4</i>	67
6.3	Pharmakogenetische Untersuchung	67
6.3.1	<i>HNMT(C314T)</i> -SNP.....	67
6.3.2	<i>Histamin-1-Rezeptor (-17C/T)</i> -SNP	70
6.4	Kritische Anmerkungen	71
6.4.1	Umweltfaktoren.....	71
6.4.2	Phänotyp	72
6.4.3	Ethnizität.....	72
6.4.4	Funktionalität, Haplotyp-Analysen, Gen-Gen-Interaktionen.....	73
6.4.5	Multipl. Testen/Statistik.....	74
6.5	Schlussfolgerung	74
7	ZUSAMMENFASSUNG	75
8	LITERATURVERZEICHNIS	77
9	DANKSAGUNG	84
10	LEBENS LAUF	85
11	ERKLÄRUNG	87

Abkürzungsverzeichnis

AD	Atopische Dermatitis
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ARK	allergische Rhinokonjunktivitis
BHR	bronchiale Hyperreagibilität
bp	Basenpaare
CD	Cluster of Differentiation (Nomenklatur zellulärer Oberflächenantigene)
cDNA	komplementäre DNA
cM	centiMorgan
CRHR1	Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure (acid)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETAC	Early Treatment of The Atopic Child
FEV ₁	forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde
FRET	fluorescence resonance energy transfer
g	Einheit für Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
HNMT	Histamin-N-Methyltransferase
HRH1	Histamin 1 Rezeptor
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
ITK	IL-2 induzierbare T-Zell spezifische Tyrosinkinase
LD	Linkage disequilibrium
MAS	Multizentrische Allergie Studie
MHC	Major Histocompatibility Complex
OD	Optical Density
OR	Odds Ratio
PC ₂₀ FEV ₁	Konzentration (Histamin), die zu 20%-igem Abfall des FEV ₁ führt
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
rpm	rotations per minute
SCORAD	Scoring Atopic Dermatitis Index
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TDT	Transmissions Disäquilibrium Test
Th-Zelle	T-Helfer Zelle
TIM	T-Zell-Immunglobulin- und Muzindomänen enthaltendes Protein

Weniger häufige Abkürzungen werden an der entsprechenden Textstelle erläutert.

Kursiv gedruckte Abkürzungen bezeichnen jeweils das kodierende Gen.

9 Danksagung

Mit mehr als nur finanzieller Unterstützung förderten mich meine Eltern während des Studiums und haben mir damit diese Arbeit erst ermöglicht. Meine Freundin Antje Haller hat mich beim Schreiben der Dissertation geduldig beraten.

Meiner Doktormutter PD Dr. Renate Nickel möchte ich für die Vergabe des Dissertationsthemas danken. Sie hat viel Vertrauen in mich gesetzt, hat mich zu selbständigem Arbeiten angeleitet und mir durch ihre intensive Betreuung ermöglicht, produktives wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen. In ihrer Arbeitsgruppe habe ich mich stets außerordentlich wohl gefühlt. Ihr angenehmer Führungsstil und ihre freundschaftlich-menschliche Art werden mir Vorbild bleiben.

Frau Dr. Claudia Sengler hat mich bei dieser Arbeit sehr unterstützt und mich mit ihrer Gewissenhaftigkeit und ihrem hohen Anspruch an die Reproduzierbarkeit unserer Daten beeindruckt. Ihre Art wissenschaftlich zu arbeiten wird wohl noch viele Jahre mein „Goldstandard“ bleiben.

Dr. Heiko Witt, Dr. Philipp Deindl, Anja Kubinski, Merra Abera-Lemu, Sebastian Oberreit, Gabriele Schulz und Claudia Güldner haben für eine fröhliche und angenehme Atmosphäre im Labor gesorgt, sodass ich viel Freude bei der Arbeit hatte.

Mein Dank gilt den ETAC-Mitarbeitern, insbesondere Frau Prof. Dr. Young-Ae Lee und ihrer Arbeitsgruppe.

Des Weiteren möchte ich allen MAS-Mitarbeitern danken, sowie Margret Oberreit, Petra Ellenson, Theresa Jura, Margarita Strozynski und Petra Wagner.

Franz Rüschenhof und Sabina Illi ermöglichten die statistische Auswertung der Daten. Olfert Landt von TIB MOLBIOL übernahm das Design der Primer und Sonden und half mir zusammen mit Dr. Heiko Witt bei technischen Fragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt den an den Studien teilnehmenden Kindern und Eltern, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

11 Erklärung

„Ich, Sebastian Müller, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *„Kandidatengenuntersuchungen und pharmakogenetische Untersuchungen bei Kindern der Multizentrischen Allergie Studie und der Early Treatment of The Atopic Child Population“* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 20.11.06

Sebastian Müller