

4 Populationen, Materialien und Methoden

4.1 Populationen

4.1.1 Multizentrische Allergie Studie (MAS)

In der Multizentrischen Allergie Studie (MAS-90) wurde der Voraussagewert verschiedener klinischer und immunologischer Parameter und der Einfluss von Umweltfaktoren auf die Entwicklung von allergischen Erkrankungen in der Kindheit untersucht. Die MAS Studie ist eine prospektive Kohortenstudie, für die in fünf deutschen Städten (Berlin, Düsseldorf, Freiburg, Mainz und München) Neugeborene rekrutiert wurden. Von 7609 Neugeborenen, die zwischen dem 01.01.1990 und dem 31.12.1990 geboren wurden, wurden 1314 Neugeborene für die Geburtskohorte gewonnen. Die in die Studie aufgenommenen Kinder wurden von Geburt an bis heute, mittlerweile bis zum 16. Lebensjahr betreut. Sie kamen regelmäßig mit ihren Eltern zur Nachuntersuchung, und zwar im Alter von 1-, 3-, 6-, 12-, 18- und 24 Monaten und von da an jährlich. Zu diesen Terminen wurden sowohl standardisierte Anamnesen durchgeführt, als auch körperliche Untersuchungen vorgenommen. Blutentnahmen fanden, ein Einverständnis der Eltern vorausgesetzt, im Alter von 1-, 2-, 3-, 5-, 7-, und 10 Jahren statt. Im Blut wurde spezifisches IgE gegen die üblichen inhalativen als auch Nahrungsmittelallergene (Kuhmilch, Ei, Sojabohnen, Weizen, Gras, Birke, Hausstaubmilben und Katzenhaare) bestimmt (569-802 Kinder zu den jeweiligen Zeitpunkten). Unsere Untersuchungen beziehen sich auf die Daten, die zu Untersuchungen bis zum siebten Lebensjahr vorlagen.

Lungenfunktionstests (800 Teilnehmer) und Histamin Provokationstests (645 Kinder) wurden mit schriftlichem Einverständnis der Eltern im Alter von sieben Jahren durchgeführt. Die Studie wurde von den lokalen Ethikkommissionen genehmigt.

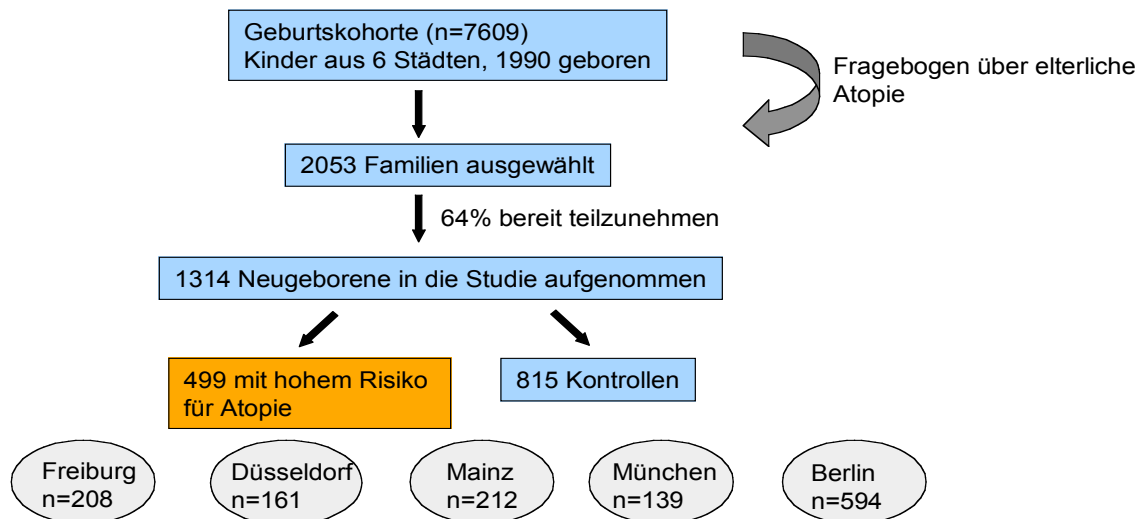


Abbildung 7: Schematische Darstellung zu Studiendesign und zur Auswahl der Neugeborenen in der Multizentrischen Allergie Studie

Die Phänotypen der allergischen Erkrankungen wurden wie folgt definiert:

- AD: Kombination von mindestens drei typischen Hautveränderungen an drei typischen Körperstellen [98].
- ARK: Niesattacken und/oder eine laufende, verstopfte, juckende Nase ohne Erkältung (im Zeitraum 12 Monate vor siebtem Geburtstag) bei gleichzeitigem Vorliegen von spezifischem IgE ($\geq 0,7$ kU/l) gegen Gras- und oder Birkenpollen.
- Asthma: mindestens zwei Episoden von pfeifender Atmung mit Luftnot.
- Sensibilisierung: spezifisches IgE $\geq 0,7$ kU/l gegen mindestens ein Allergen (Kuhmilch, Ei, Sojabohnen, Gras, Birke, Weizen, Hausstaubmilben, und Katzenhaare).
- Polysensibilisierungen gegen mehr als drei Allergene (im Alter von 7 Jahren).
- Gesamt IgE < 15 . Kohorten Perzentile.
- Gesamt IgE > 85 . Kohorten Perzentile.
- Forciertes expiratorisches Volumen (FEV₁) in Prozent vom Sollwert.
- PC₂₀FEV₁ Quartilen bei Asthmatikern und Kontrollen.

Die Kontrollgruppe bildeten folgende Kinder der MAS-Kohorte:

- Niemals Symptome eines Asthma oder einer ARK.
- Niemals Diagnose einer AD.
- IgE gegen jegliche getestete Allergene (siehe oben) $< 0,35$ kU/L.

Für die PCR stand DNA von insgesamt 872 Kindern zur Verfügung.

4.1.2 Early Treatment of the Atopic Child (ETAC)

Ziel der multinationalen, multizentrischen, randomisierten, plazebokontrollierten Doppelblindstudie ETAC war es, herauszufinden, ob die Behandlung mit dem oralen H1-Antagonist Cetirizin eine präventive oder verzögernde Wirkung auf die Ausbildung von Asthma bei Kleinkindern mit AD hat.

Der Histaminrezeptorantagonist Cetirizin wurde nicht nur aufgrund seiner antihistaminischen Wirkung und einer geringen sedativen Wirkung (zum Beispiel im Vergleich mit Ketotifen) ausgewählt. Es konnte gezeigt werden, dass Cetirizin eine Allergen induzierte Einwanderung eosinophiler Granulozyten in Gewebe unterdrückt. Somit hat dieses Medikament zusätzlich Potential, die Entwicklung einer eosinophilen Inflammation zu verhindern. Das bedeutet, dass die durch Chemotaxis hervorgerufene, oben beschriebene und für die Chronifizierung entscheidende Spätreaktion, unterdrückt werden könnte. Dadurch wäre auch ein Behandlungserfolg über das Ende der Medikamenteneinnahme hinaus vorstellbar.

In keiner vorherigen Untersuchung wurde, so wie in der ETAC-Population, das Behandlungsergebnis nach Absetzen der Medikation verfolgt. Also konnte hier erstmals eine Aussage getroffen werden, ob ein asthmaverzögernder Effekt von Histaminrezeptorantagonisten nur kurzweilig ist oder aber eine weitreichende Verzögerung beziehungsweise sogar Prävention von Asthma zur Folge hat.

Die ETAC Studie ist eine prospektive, randomisierte, doppelblind, Plazebo kontrollierte Studie in die 795 junge Kinder in 12 europäischen Ländern und Kanada eingeschlossen wurden.

In einem Zeitraum von zwei Jahren wurden Kinder nach den folgenden Kriterien ausgewählt:

- Patienten zwischen erstem und zweitem Lebensjahr.
- Floride Symptome einer seit mindestens einem Monat andauernden AD.
- Positive Familienanamnese für Asthma.
- Ausgeschlossen wurden Kinder mit schon bestehendem Asthma, einem länger bestehenden nächtlichen Husten oder obstruktiven Symptomen.

Cetirizin (0,25 mg/kg p.o.) wurde 398 Kindern zweimal pro Tag über 18 Monate verabreicht. 397 Kinder erhielten über 18 Monate zweimal täglich p.o. einen Plazebo. Einen Monat nach Behandlung und dann alle drei Monate kamen die Patienten mit

ihren Eltern zu Nachuntersuchungen, bis zum 18. Monat nach Rekrutierung. 6, 12 und 18 Monate nach Behandlungsende wurden die Patienten zu Nachuntersuchungen einbestellt. Zum Zeitpunkt 0, 3, 12, und 18 Monate wurden Gesamt-IgE-Spiegel und spezifische IgE-Spiegel gegen Kuhmilch, Ei, Gras, Birke, Hausstaubmilben und Katzen bestimmt. Bei jeder Wiedervorstellung wurden Atopiestatus, bestehende Krankheiten und bestehende Medikationen dokumentiert. Die Cetirizin Dosis wurde dem Körpergewicht der Patienten angepasst.

Die Compliance wurde durch Abwiegen der Medikamentenbehälter am Ende des Behandlungszeitraums kontrolliert. Blutproben wurden zu Beginn und nach 3, 12, 18, 24 und 36 Monaten entnommen. Die Studie wurde in zwei Phasen, eine Behandlungsphase und eine Postbehandlungsphase (Nachuntersuchungsphase) unterteilt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Entwicklung der ETAC-Population über den Verlauf von 36 Monaten. Nur Kinder aus Zentren, die 10 oder mehr Patienten rekrutiert hatten, verblieben nach 24 Monaten in der Untersuchung (daher die relativ hohe Verringerung des Gesamtkollektivs zwischen 24 und 30 Monaten)

	18 Monate Behandlung				18 Monate Kontrolle		
Zeitpunkt	0	6	12	18	24	30	36
Plazebo-Population	397	378	357	348	343	279	275
Gesamt-Population	795	751	719	703	695	555	549
Cetirizine-Population	398	373	362	355	352	276	274

Für die DNA-Analysen stand Blut von 496 Kindern und von 488 Eltern zur Verfügung.

Die Phänotypen wurden folgendermaßen definiert:

- Der Asthmabeginn wurde nach drei, in mindestens einer Woche Abstand auftretenden, Episoden, entweder von nächtlichem Husten oder von pfeifenden Atemgeräuschen mit Schlafeinschränkungen, festgestellt. Es wurden die Gruppen Asthma ja/nein nach 18 Monaten (im Alter von zweieinhalb bis dreieinhalb Jahren) und Asthma ja/nein nach 36 Monaten (Alter zwischen vier und fünf Jahren) gebildet.
- Für die pharmakogenetische Untersuchung wurden die Asthma und nicht Asthma Gruppen

jeweils in Plazebo- und Behandlungsgruppe aufgeteilt und die Zeitpunkte T18 und T36 verglichen (Behandlungsende versus Beobachtungsende).

- Die Gesamt-IgE-Spiegel, spezifischen-IgE-Spiegel und Eosinophilenzahl/Liter wurden quantitativ zu jedem Untersuchungszeitraum aufgetragen.
- Der Schweregrad der AD wurde mit Hilfe des SCORAD-Index (erklärt unter atopischer Dermatitis) quantifiziert. Dieser wurde bis T18 (Alter ca. dreieinhalb Jahre) quantitativ nach den einzelnen Genotypen aufgetragen.
- Für die pharmakogenetischen Untersuchungen wurden die quantitativ erhobenen Parameter jeweils nach Behandlungsgruppe und Plazebogruppe getrennt erfasst.

4.2 Materialien

4.2.1 Geräte

Pipetten	Eppendorf Multipette plus, Eppendorf AG Hamburg Eppendorf Research Pipetten 0,5-10 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl; Eppendorf AG Hamburg Multichannel Finnpipette 5-50 ul, Thermo Labsystems, Egelsbach
Photometer	Biophotometer, Eppendorf AG, Hamburg
PCR Maschinen	Tpersonal, Biometra GmbH, Göttingen T3 Thermocycler, Biometra GmbH, Göttingen
Mikrowellenherd	MW-715 m 1200 W, Clatronic GmbH, Kempen
Magnetrührer	Ikamag Ret, IKA-Labortechnik, Staufen
Gelkammern	Sub-Cell GT Mini/Wide Gel Electrophoresis System, Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA
Spannungsquelle	PowerPac 300, Bio-Rad Laboratories California, USA
UV-Transilluminator	TI 1, Biometra GmbH, Göttingen
Digital Sofortbildkamera	MWG Biotech, Ann Arbor, MI, USA
Drucker	Digital Grafic Printer UP-D860E, Sony Corp., Tokyo, Japan
LightCycler	LightCycler II, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Kapillarzentrifuge	LC Carousel Centrifuge, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler Software	Version 3.5, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Vortexer	Minishaker MS1, IKA-works Inc., Wilmington, NC, U.S.A.
Wasserbad	GFL 1086, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge	Varifuge RF, Heraeus Sepatech, Hanau Centrifuge 5415D, Eppendorf AG, Hamburg

Waage Mettler PE3000, Mettler Waagen GmbH, Gießen,
Schweiz

4.2.2 Chemikalien

Ethanol, absolut (100%) Merck KgaA, 64271 Darmstadt
Steriles Wasser Aqua ad iniectabilia, Braun, 34209 Melsungen
Agarose Agarose Ultraoure, GibcoBRL, Life Technologies, Paisly Scotland
PCR-Öl Bayol F, Serva, Heidelberg

4.2.3 Verbrauchsmaterialien

Blutentnahmeröhrchen EDTA Monovette, Sastedt AG & Co., Nürnberg
DNA-Aufreinigungs-Kit QIAamp DNA Mini Kit, Quiagen GmbH, Hilden
Reaktionsgefäße Safe-Lock Microcentrifuge Tubes 2ml, Eppendorf AG, Hamburg
Safe-Lock Microcentrifuge Tubes 1,5ml, Eppendorf AG, Hamburg
PCR-Tubes ultradünn 0,2 ml Strips, 8 Tubes and 8 Caps, Biozym
Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf
Ansatzgefäße Falcon 15 ml u. 50 ml, Bexton Dickinson Labware, Meylan Cedex,
Frankreich
LightCycler Kapillaren Capillaries, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Parafilm American National Can, Menaska, WI, USA
UV-Einmalküvetten Kuvette 220-1600 nm, Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotiterplatte Nunc, Rodkilde, Dänemark

4.2.4 Puffer und Lösungen

Puffer TBE 10x Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH 8,3 Merck KgaA,
Darmstadt
Probenauftragspuffer 10x DNA Probenpuffer:
200 mM EDTA (pH 8,2), Sigma, Steinheim
50 Vol. % Glycerin (87 %), Carl-Roth GmbH & Co., Karlsruhe
0,25 % Bromphenolblau, Carl-Roth GmbH & Co., Karlsruhe
0,25 % Xylencyanol FF, Sigma Chemical Inc., Steinheim
Ethidiumbromid 1 % Carl-Roth GmbH & Co., Karlsruhe

4.2.5 PCR-Reagenzien

PCR Puffer 10x PCR Puffer mit MgCl₂, Applied Biosystems, Roche, Mannheim
dNTPs GeneAmp dNTPs, je 2,5 mM, Applied Biosystems, Roche, Mannheim
DNA-Leiter 100 base pair DANN-ladder, 0,1 µg/µl, Invitrogene GmbH, Karlsruhe
Primer 10 µM, TIBMOLBIOL, Berlin
Sonden 5 µM, TIBMOLBIOL, Berlin

4.3 Methoden

4.3.1 Gewinnung der Blutproben/DNA Extraktion

Zur Aufreinigung der DNA aus Vollblut wurden der QIAamp Mini Kit und der QIAamp DNA Midi Kit verwendet, wobei die in der ETAC Population eingeschlossenen Kinder mit dem Midi Kit aufgereinigt wurden und die restlichen Familienmitglieder mit dem Mini Kit.

In diesen Kits wird die Ladung der DNA genutzt; um sie an eine Anionenaustauschmembran zu binden und sie von sonstigen Blutbestandteilen zu waschen. Da die Stärke der Bindung von DNA, RNA und Proteinen an die Membranen pH-abhängig ist und damit jeweils abhängig von Puffer- und Ionenstärke, sind diese Säulen zur Extraktion von DNA aus Vollblut sehr geeignet.

4.3.1.1 MiniKit

40 µl Protease wurden zusammen mit 400 µl Blut und 400 µl Puffer AL in ein 2 ml Microcentrifuge Tube gegeben, gut gemischt, und anschließend bei 56°C für 10 Minuten inkubiert. Zum Reaktions-Stop wurden nun 400 µl Ethanol (100%) dazugegeben, gut gemischt, in zwei Arbeitsschritten auf eine Quiagen Säule übertragen und für eine Minute bei 8000 rpm. (ca. 6000 x G) zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Anschließend wurde die Säule mit Puffer AW1 beladen und bei 8000 rpm (ca. 6000 x G) für eine Minute zentrifugiert. Nun wurde die Säule mit 500 µl Puffer AW2 beladen und bei 14.000 rpm (ca. 20.000 x G) für 3 Minuten zentrifugiert. Die Anionenaustauschmembran war von Protein- und RNA-Resten möglichst rein gewaschen. Die DNA wurde danach in ein Mikrozentrifugationsröhrchen eluiert, indem die Säule mit 400 µl Aquadest beladen und bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert wurde.

4.3.1.2 MidiKit

2 ml EDTA-Blut wurden in ein Reagenzgefäß überführt, mit 3 ml Puffer AI und 200 µl Quiagen Proteaselösung gemischt, um dann für 20 Min. bei 70°C in einem Wasserbad inkubiert zu werden. Nach dem Hinzufügen von 2 ml Ethanol (100%) wurde das Gemisch über eine QIAamp Midi Säule für drei Minuten bei 3000 rpm (ca. 1850 G) in zwei Arbeitsschritten zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, die Säule aber wurde mit 2 ml Puffer AW1 beladen und für eine Minute bei 5000 rpm zentrifugiert. Wieder

wurde das Filtrat verworfen und die Säule mit 2 ml AW2 beladen und 15 Minuten zentrifugiert. Mit 300 µl Puffer AE wurde anschließend die an die Membran gebundene DNA durch 5-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm in ein Reaktionsgefäß eluiert.

4.3.1.3 Photometrische Messung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde durch Messung der optischen Dichte mit einem UV-Photometer bestimmt. Dafür wurden 5 µl Eluat und 75 µl Aquadest (Verdünnung 1/159) in eine Küvette gegeben und die Absorption wurde im Vergleich zu 80 µl Aquadest. (bzw. Midi Kit Aufreinigung 75 µl Aquadest und 5 µl Puffer AE) gemessen. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der optischen Dichte (OD) bei 260 nm, der Verdünnung und einem DNA spezifischen Multiplikationsfaktor.

$$\text{Konzentration: } c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = \text{OD}_{260} \times V \times F \quad \text{Konzentration: } c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

c = Konzentration der Ausgangslösung

OD_{260} = Absorption bei 260 nm

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor (bei Doppelstrang DNA
= 50)

Zusätzlich kann man über das Verhältnis der OD 260 zu OD 280 eine Aussage über die Proteinkonzentration und damit die Reinheit der DNA treffen. Um für die folgenden Versuche eine definierte Ausgangskonzentration zu erhalten wurde aus den Ergebnissen der OD Messung ein Verdünnungsschema erstellt. Die DNA Proben wurden mit 1:10 verdünntem Puffer AE auf einheitliche 20 ng/ µl verdünnt.

4.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Seit sie 1985 von Saiki *et al.* entwickelt wurde, ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur wichtigsten Methode der Molekularbiologie geworden. Ihre Funktion wird deshalb hier als weitgehend bekannt vorausgesetzt [99].

Die PCR wurde, den unterschiedlichen Schmelztemperaturen der Primer entsprechend, unter verschiedenen Konditionen durchgeführt. Folgende Protokolle wurden verwendet:

4.3.3 PCR-Konditionen/Programm

Bei allen PCRs wurden folgende Zyklen verwendet:

1. Denaturierung	95° C	10 min
2. Denaturierung	95° C	10 sec
3. Anlagerung	58° C	30 sec
4. Elongation	72° C	40 sec (49 mal von Stufe 2)
5. Reparatur	72° C	2 min
6. Pause	4° C	

4.3.4 TIMD4 und TIM3

PCR-Protokoll mit Primersequenzen:

H ₂ O	19,90 µl
DNA Puffer (10x) mit MgCl ₂	2,50 µl (1,5mM MgCl ₂)
dNTP	1,00 µl (0,10 mM)
TIMD4 F 5'AACTgATTAAAATgTgTAgAgCAT3'	0,50 µl (0,2 µM)
TIMD4 R 5'CATCTCTCAgCTTTgACATTATCA 3'	0,50 µl (0,2 µM)
TIM3 F 5'gTTTggAAgCTgAgggTgTA 3'	0,25 µl (0,1 µM)
TIM3 R 5'CCATgTCCCCTggTggTAA 3'	0,25 µl (0,1 µM)
Taq	0,10 µl (0,50U)
DNA	2,00µl

4.3.5 *ITK -1793 und TIM1*

PCR-Protokoll mit Primersequenzen:

H ₂ O	19,40 µl
DNA Puffer (10x) mit MgCl ₂	2,50 µl (1,5mM MgCl ₂)
dNTP	1,00 µl (0,10 mM)
ITK S 5'ATgATATTTTgTTTTCCCggAT 3'	0,75 µl (0,3 µM)
ITK A 5'CATgCCAgCCCTggAT 3'	0,75 µl (0,3 µM)
TIM1 F 5'gAgAAAACATAACATCTCAgCAA 3'	0,25 µl (0,1 µM)
TIM1 R 5'gTTCAgTAgCCTATCAgAAggAT 3'	0,25 µl (0,1 µM)
Taq	0,10 µl (0,50 U)
DNA	2,00 µl

4.3.6 *MGC 26988 (FAM 71B) und ITK -1678*

PCR-Protokoll mit Primersequenzen:

H ₂ O	20,40 µl
DANN Puffer (10x) mit MgCl ₂	2,50 µl (1,5mM MgCl ₂)
dNTP	1,00 µl (0,10 mM)
MGC 26988 S 5'gggCCACTCCTggTTCAA 3'	0,25 µl (0,1 µM)
MGC 26988 R 5'gATCCCTgggCggTTgTA 3'	0,25 µl (0,1 µM)
ITK S 5'ATgATATTTTgTTTTCCCggAT 3'	0,25 µl (0,1 µM)
ITK R 5'TgAggTggAAATgAATgTTg 3'	0,25 µl (0,1 µM)
Taq	0,10 µl (0,50 U)
DNA	2,00 µl

4.3.7 Histamin-N-Methyltransferase und Histamin-1-Rezeptor

PCR-Protokoll mit Primersequenzen:

H ₂ O	19,40µl
DNA Puffer (10x) mit MgCl ₂	2,50 µl (1,5 mM MgCl ₂)
dNTP	1,00 µl (0,10 mM)
HNMT F 5'CAATTAAAATTgATggTgTgTCA 3'	0,75 µl (0,3 µM)
HNMT R 5'TTTCTCCAACATTCTACTTTggTA 3'	0,75 µl (0,3 µM)
HRH1 F 5'TCATCACCCAAgTCTCTgACC 3'	0,25 µl (0,1 µM)
HRH1 R 5'gCTCgggTCTTggTACgAT 3'	0,25 µl (0,1 µM)
Taq	0,10 µl (0,50 U)
DANN	2,00 µl

4.3.8 Gelelektrophorese

Um die Amplifikation beider Fragmente einer Duplex-PCR zu überprüfen, wurde eine Gelelektrophorese eingesetzt.

Hierbei wird das PCR-Produkt mit 1,5 µl Probenauftragspuffer gemischt und in die Taschen eines 3%-Agarosegels pipettiert. Bei 90 V und 400 mA lief die DNA ca. 60 Minuten. Das PCR-Produkt wurde von einer 100 bp-DNA-Leiter flankiert. Anschließend wird das Gel beziehungsweise die DNA mit Ethidiumbromidlösung (1 µl/ml) ca. sieben Minuten angefärbt und ca. 15 Minuten in einem Wasserbad entfärbt. Auf einem UV-Transilluminator mit 312 nm Wellenlänge können die aufgetrennten angefärbten Banden nun sichtbar gemacht und fotografiert werden (exemplarisch siehe Abbildung 8).

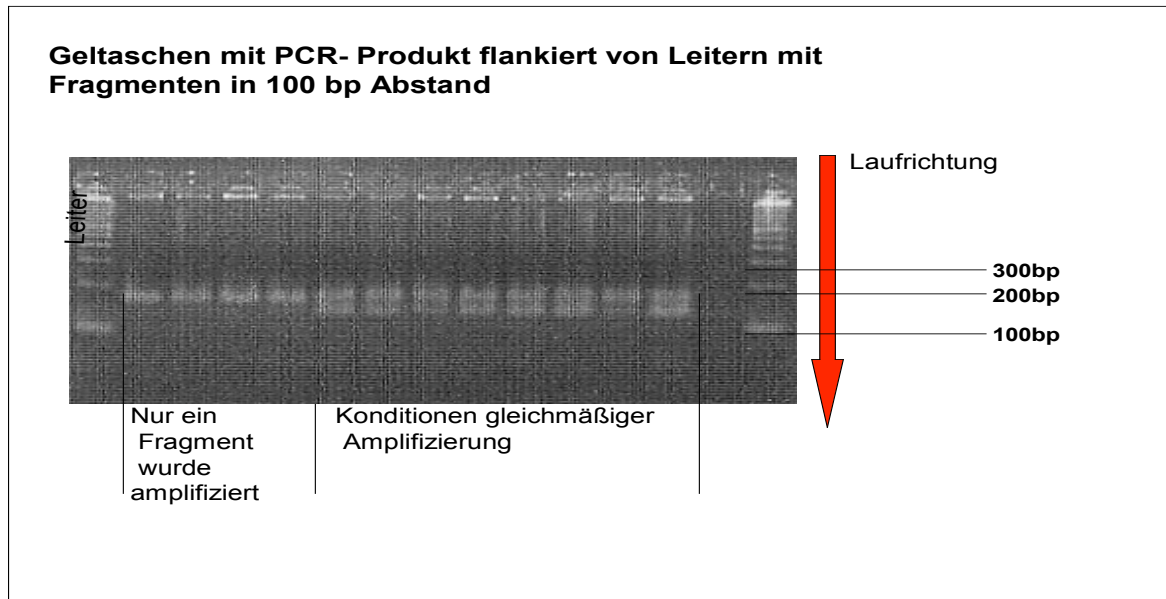


Abbildung 8: Gelelektrophorese einer Duplex-PCR unter verschiedenen Konditionen, zur Optimierung der Amplifizierung.

4.3.9 *Ligthcycler*

Um SNPs nachzuweisen, wurde ein Lightcycler verwendet. Mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Oligonukleotidsonden werden sequenzspezifische Fluoreszenzen gemessen und aufgezeichnet. Der Lightcycler besteht aus einem Thermoelement und einer Fluoreszenz-Messeinheit. Mit einer Hochleistungsdiode wird blaues Licht mit einer Wellenlänge von 470 nm emittiert, wodurch die Sonden angeregt werden.

Die Sonden werden so hergestellt, dass sie komplementär zur zu untersuchenden Sequenz und entweder mutations-, oder wildtypspezifisch sind. Es werden jeweils zwei Sonden eingesetzt: ein Anchor und ein Sensor. Der Sensor bindet an dem 5' Abschnitt der zu untersuchenden Region, wobei er an seinem eigenen 3' Ende mit Fluorophor-Fluoreszin gekoppelt ist. Der Anchor ist an seinem eigenen 5' Ende mit einem Farbstoff markiert und bindet an das 3' Ende des Untersuchungsproduktes. Binden Sensor und Anchor zusammen an die zu untersuchende Region des PCR-Produktes, liegen Farbstoff und Fluoreszin aneinander. Wird nun das Fluoreszin des Sensors durch das Licht der Lightcyclerdiode angeregt, gibt das Fluoreszin die aufgenommene Energie an den Anchor-Farbstoff weiter. Der so angeregte Anchorfarbstoff gibt wiederum Licht

einer anderen Fluoreszenz ab, die von der Fluoreszenzmesseinheit detektiert wird. Dieser Effekt wird Fluorescence-resonance-energy-transfer (FRET) genannt und tritt nur dann auf, wenn Sensor und Anchor an die zu untersuchende Zielsequenz binden.

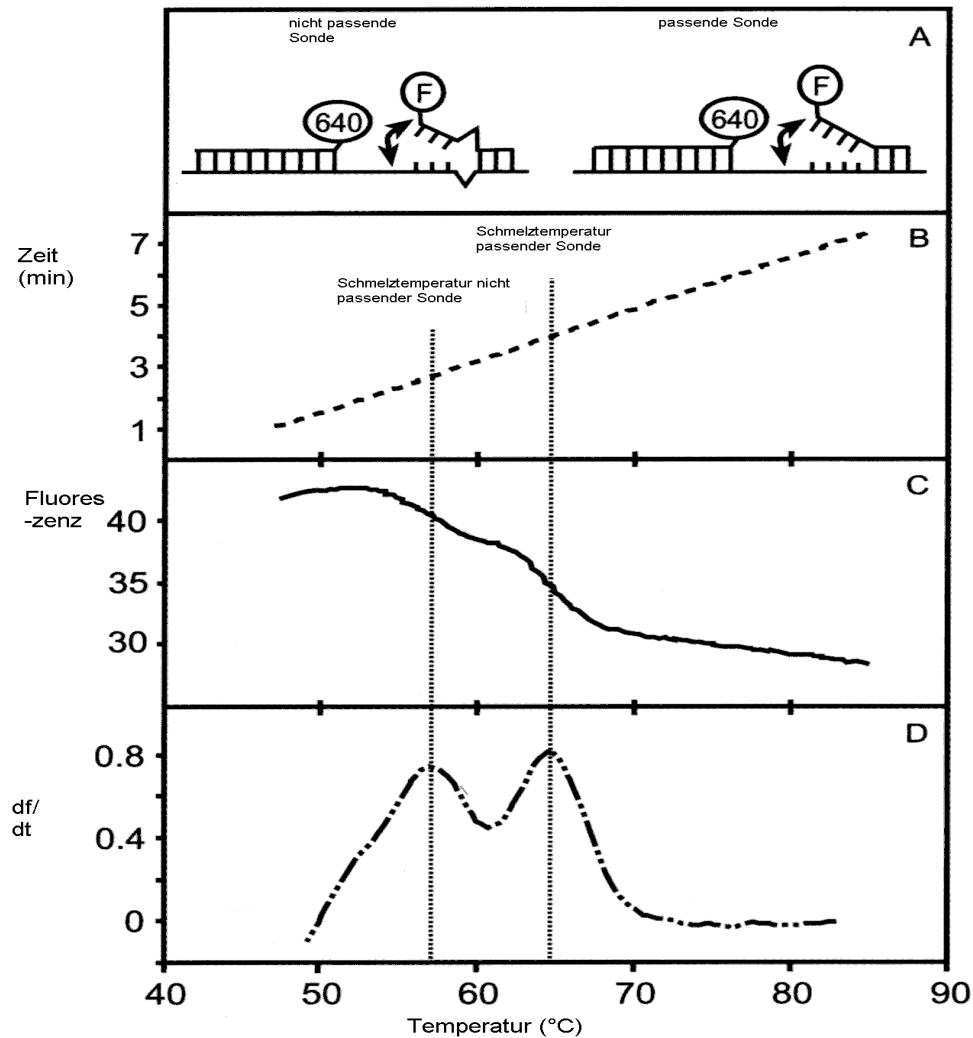


Abbildung 9: aus Lightcycler Manual (Roche)

A) Anlagerung der komplementären Sonden

B) kontinuierlicher Temperaturanstieg im Verlauf der Zeit

C) Fluoreszenzabfall bei ansteigender Temperatur (verstärkter Abfall bei Abschmelzen der nicht passenden Sonde und dann erst ca. 2 min. später beim Abschmelzen der „passenden Sonde“)

D) Veränderung der Fluoreszenz über Veränderung der Zeit bei ansteigender Temperatur

Nach initialer Denaturierung bei 95°C wird das Reaktionsgemisch auf 45°C abgekühlt. Das Reaktionsgemisch wird nun gleichmäßig erwärmt, wobei zeitgleich die Fluoreszenz gemessen wird. Es findet zuerst ein annealing der Sonden mit einem deutlich sichtbaren Fluoreszenzanstieg statt. Da die Proben weiter erwärmt werden folgt ein

Wieder-Abschmelzen der Sonden vom PCR-Produkt, mit gleichzeitigem starken Fluoreszenzabfall. So wird eine Schmelzkurve aufgezeichnet, die nach Integration der Fluoreszenzänderung nach der Zeit ein Bild wie in Abbildung 9 dargestellt ergibt.

Liegt nun allerdings eine Punktmutation in dem vom Sensor belegten Genabschnitt vor, so schmilzt dieser früher ab, die Fluoreszenz sinkt früher und der melting peak liegt dementsprechend auch einige Grad früher vor. So kann man auch Sonden entwerfen, die spezifisch für die mutierte Sequenz sind, wobei die früh abschmelzenden Proben hier dem Wildtyp und die spät Abschmelzenden der homozygoten Mutante entsprechen. Bei Heterozygoten entstehen nun zwei melting peaks, da hier zu gleichen Teilen spezifisch und unspezifisch bindende Sonden vorliegen.

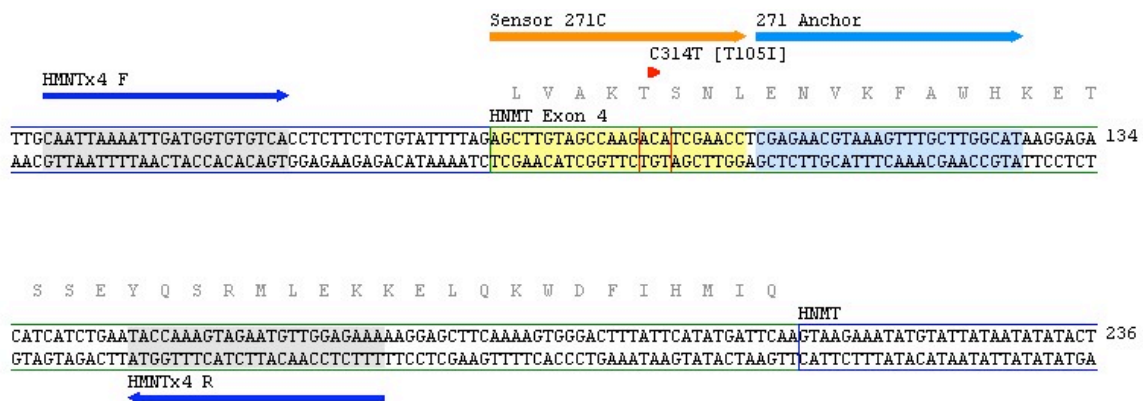


Abbildung 10: Schematische Zeichnung eines Teils des für HNMT kodierenden Exons mit Primern (blau) und der über dem SNP liegenden Sonde (orange) und dem fluoreszenzmarkierten Marker (Anchor, hell blau) (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von TIB Molbiol)

Für die Genotypisierung verwendete Oligonukleotid-Sondensequenzen:

<i>HNMT</i>	Sensor	5' AgCTTgTAgCCAAGACATCgAACC 3'
	Anchor	5' CgAgAACgTAAgTTTgCTTggCAT 3'
<i>HRH1</i>	Sensor	5' CAAgAgCAgCCACCAgTT 3'
	Anchor	5' TggCTCACTCCCTgggAgAAAAgAgA 3'
<i>TIMD4</i>	Sensor	5' TATCAAgAgCTACATAAAAgTTggTgTC 3'
	Anchor	5' gAAAggTACTCCTAAATgAAgCCAAAgAT 3'
<i>TIM3</i>	Sensor	5' TgCACCGACTCTgCAGAgAgAC 3'
	Anchor	5' TCACTgCAGCCTTTCCAAGgATgC 3'
<i>TIM1</i>	Sensor	5' CCAgTATCTCAAC TTCATTAATgTTTggT 3'
	Anchor	5' TgCAggACCCAAACAAGCCATTTAC 3'
<i>ITK -1793</i>	Sensor	5' AgAgTTATAgACTTCACAAAgTgTTCT 3'
	Anchor	5' CATTTTACACCTgCTTggTTCAGATgA 3'
<i>ITK -1678</i>	Sensor	5' CAgTTATTTTgAggTTTCTgTCACT 3'
	Anchor	5' CCAgCAAACCTAgATAATACAgTgCTA 3'
<i>MGC 26988</i> <i>(FAM 71B)</i>	Sensor	5' TgCTTCTCCACCATCTTAgCC 3'
	Anchor	5' CgATATCTACCTCTCTgTCATgTgATgTgATgTgA 3'

In rot markiert der jeweilige SNP, wobei alle Sonden mutationsspezifisch sind, bis auf *HNMT* und *MGC 26988 (FAM 71B)*, dort sind die Sonden wildtypspezifisch.

LightCycler Sondenansatz

Aqua ad inj.	7,10 µl
Sensor 1	0,20 µl
Anchor 1	0,25 µl
Sensor 2	0,20 µl
Anchor 2	0,25 µl
<i>gesamt</i>	8,00 µl

Zu je 8 µl des PCR-Produktes wurden 8 µl des Sondenansatzes hinzupipetiert. Der Ansatz wurde in den Kapillaren gemischt und für 30 Sekunden bei 3000 rpm auf den Boden der Kapillaren zentrifugiert.

4.4 Schmelzkurvenverläufe in der Lightcyclerauswertung

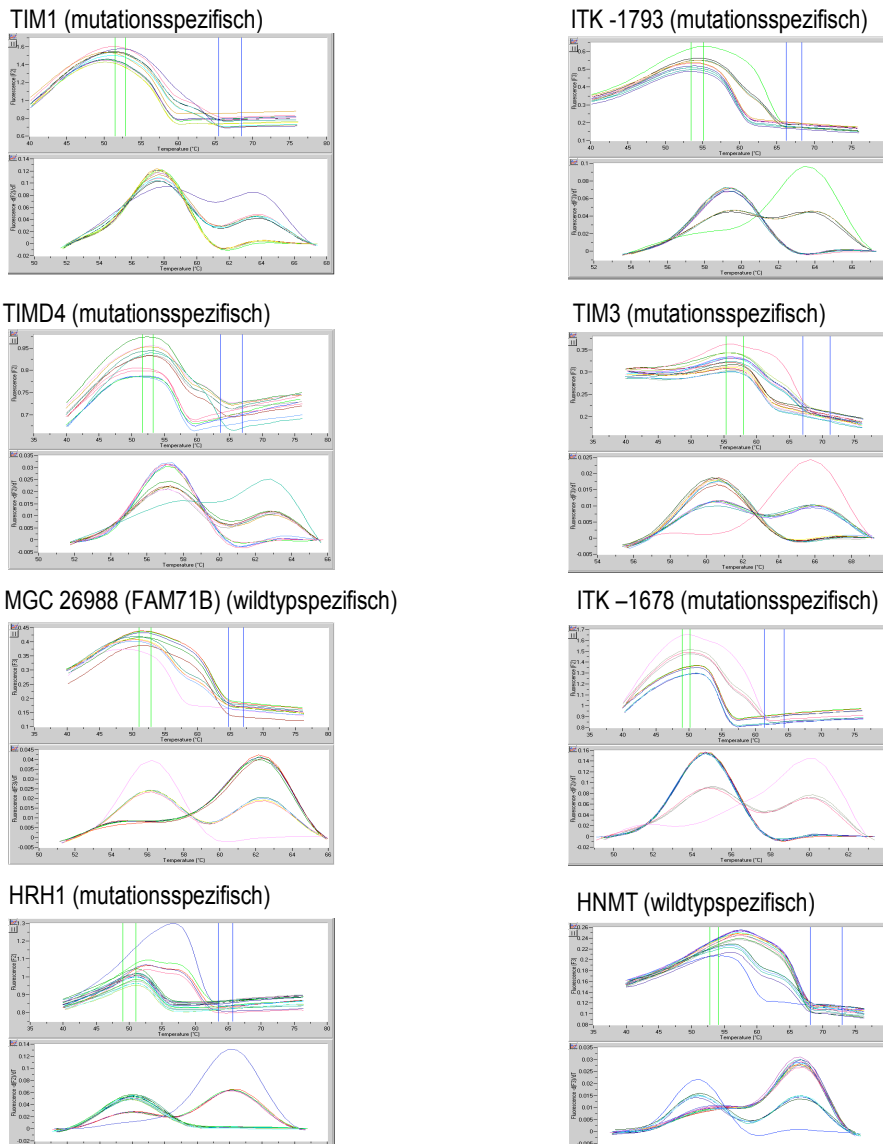


Abbildung 11: Die obere Abbildung zeigt jeweils die Abnahmen der Fluoreszenz (beim Abschmelzen der Sonden) mit Steigerung der Temperatur, die Untere die Änderung der Fluoreszenz (beim Temperaturanstieg) während der Steigerung der Temperatur. Eine Farbkurve repräsentiert hier jeweils ein Individuum. Die unteren Kurven ($dF/dT/dT$) wurden zur Auswertung herangezogen. Hier entsprechen die Kurven mit zwei Gipfeln den Heterozygoten, die jeweils Eingipfligen den Homozygoten. Je nachdem, ob die Sonde spezifisch für die Sequenz des Polymorphismus oder für die Sequenz des Wildtyp ist (s.o.), entsprechen die Gipfel bei hoher Abschmelztemperatur dem Wildtyp oder dem Polymorphismus.

4.4.1 Statistik

Die Allelfrequenzen zu jedem Polymorphismus wurden errechnet. Der χ^2 -Test wurde angewendet, um Abweichungen der Genotypfrequenzen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu bestimmen. Die Allelfrequenzen wurden nach folgender Formel errechnet: $(2 \times n\text{-Polymorphismus-homozygot} + 1 \times n\text{-Polymorphismus-heterozygot}) / 2 \times n\text{-Genotypisierte}$. Zum Errechnen von Assoziationen wurden Vierfeldertafeln erstellt und mit dem χ^2 -Test ausgewertet: Fälle versus Kontrollen, im dominanten Modell (homozygot- + heterozygot-Polymorphismus zu Wildtyp) und im rezessiven Modell (homozygot-Polymorphismus zu heterozygot-Polymorphismus + Wildtyp). Die entsprechenden p-Werte wurden aus den χ^2 -Werten abgeleitet. In der MAS-Kohorte wurden zusätzlich der Mantel-Haenszel-Test für Trends und Fishers exakter Test zur Berechnung signifikanter Unterschiede in kleinen Untergruppen angewendet. Der Wilcoxon-Test wurde für die quantitative Auswertung der Assoziation mit PC_{20} FEV_1 – Werten genutzt (nicht-parametrischer Test).

Da nur geringgradige Assoziationen gefunden wurden, wurde auf eine aufwendige Korrektur für multiples Testen bei teilweise abhängigen Variablen verzichtet und die Signifikanz lediglich mittels der Bonferroni-Korrektur ($p \times$ Anzahl der Tests) eingeordnet.

Für den TDT wurden wie unter 1.7.2 beschrieben Trios gebildet und es wurden die Programme Genehunter und Aspex zur Auswertung verwendet.

Die Phänotypen wurden mit Hilfe der Programme SAS (Version 8.2) und Excel verwaltet.