

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Effekt von sechs potentiell funktionellen Varianten in „Innate Immunity“-Genen (*TIM1*, *TIM2*, *ITK*, *MGC 26988*, *TIMD4*) der Region 5q31-33 auf die Ausbildung allergischer Erkrankungen untersucht. Hierfür wurden Kinder aus zwei longitudinal sorgfältig phenotypisierten Populationen (MAS und ETAC, n gesamt = 1872) genotypisiert. Es konnten keine Assoziationen mit Asthma, AD, ARK, Gesamt-IgE oder spezifischer Sensibilisierung gezeigt werden. Schwach signifikante Ergebnisse in einer der Populationen konnten in der zweiten Population jeweils nicht bestätigt werden.

Ein maßgeblicher Einfluss dieser genetischen Varianten auf Asthma und Atopie ist bei europäischen Kindern daher unwahrscheinlich.

Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit pharmakogenetische Untersuchungen durchgeführt. Zwei potentiell funktionelle Polymorphismen in Genen des Histaminstoffwechsels (*HNMT*, *HRH1*) wurden in der ETAC-Population genotypisiert. In der Behandlungsgruppe (Cetirizin) fand sich kein Unterschied in der Asthma-Häufigkeit bei Kindern mit bzw. ohne die *HNMT* bzw. *HRH1*-Varianten, sodass ein pharmakogenetischer Effekt hinsichtlich einer Asthma-präventiven Wirkung bei frühzeitiger Behandlung mit Cetirizin für diese Kandidatengene nicht gezeigt werden konnte.

6.1 Studienpopulationen.

Für die Arbeit standen zwei longitudinal charakterisierte pädiatrische Populationen zur Verfügung, hierdurch war die Möglichkeit gegeben, positive als auch negative Ergebnisse jeweils in einer unabhängigen Population zu bestätigen, Teilnehmer beider Studien waren weiß (deutsch bzw. europäisch/kanadisch).

- Die in die MAS-Studie aufgenommenen Kinder wurden von Geburt an jährlich nachverfolgt. Atopie-assoziierte Merkmale wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt standardisiert erfasst. Das Risiko falsch positiver als auch falsch negativer Klassifikationen ist hierdurch sehr gering. Insbesondere die Auswahl eindeutig nicht-atopischer Kontrollen wird durch die longitudinale

Charakterisierung der Kinder optimiert. Das die Auswahl von Kontrollen bei komplexen Erkrankungen wie Asthma maßgeblich ist, zeigte ein Studie von Bierbaum *et al.*: Je strikter die Kontrollgruppe innerhalb der MAS-Kohorte definiert wurde, umso größer wurde die Differenz der IL15-Haplotypverteilung zwischen Asthmatikern und Kontrollen [100].

- Auch die Kinder der ETAC-Studie wurden longitudinal sorgfältig, wiederholt und standardisiert für atopie-assoziierte Phänotypen charakterisiert. Insgesamt fanden zehn Nachuntersuchungen in drei Jahren statt. Der Beobachtungszeitraum war jedoch auf drei Jahre begrenzt. Asthma wurde bei den Kindern zu einem sehr frühen Zeitpunkt definiert (18 und 36 Monate nach Studienbeginn, wobei die Kinder im Alter zwischen 12 und 24 Monaten in die Studie eingeschlossen wurden). Es ist daher möglich, dass Kinder nach Ende des Beobachtungszeitraums noch Asthma entwickelten. Dass die hier dargestellten Negativ-Ergebnisse des ersten Teils der Arbeit durch einen Typ II Fehler zustande kamen, ist dennoch unwahrscheinlich.

6.2 Untersuchte Gene der Region 5q31-33

Wiederholt konnten Hinweise auf eine Kopplung von Atopie, Asthma und allergie-assoziierten Merkmalen mit der Region 5q31-33 gefunden werden [8; 60-64]. In dieser Region befinden sich Gene, die für Th2-Zell-Zytokine kodieren, von denen unter anderem *IL4* und *IL13* intensiv in Kandidatengenanalysen untersucht wurden. Für Varianten im *IL13* Gen konnte in mehreren Populationen eine signifikante Assoziation mit Gesamt-IgE Konzentrationen gezeigt werden [9; 101]. In letzter Zeit konnte in der Region eine weitere Gruppe von Genen identifiziert werden, die eine wichtige Rolle in allergischen Entzündungsprozessen spielen [18]. Diese Gene kodieren die T-Zell-Immunglobulin-Domänen-und-Muzin-Domänen-Proteine (**TIM1** und **TIM3**) und die IL2-induzierbare-T-Zellkinase (**ITK**), denen gemeinsam ist, dass sie in T-Zellen exprimiert werden.

Unabhängige Untersuchungen konnten durch Einsatz von ITK- als auch von TIM1-Inhibitoren deutliche Rückgänge der Entzündungsaktivität in Lungen asthmatischer Mäuse feststellen [102; 103]. Aufgrund dieser Untersuchungen und der nachfolgend beschriebenen zentralen Rolle dieser Proteine bei der allergischen Immunreaktion ist es von besonderem Interesse, den Einfluss von Polymorphismen dieser

Kandidatengene auf atopie-assoziierte Merkmale zu untersuchen.

6.2.1 *TIM1*

TIM1 ist ein Glykoprotein, welches vornehmlich auf aktivierten TH2-Zellen exprimiert wird [18]. Es ist involviert in die Entwicklung und die Regulation TH2-Zell dominierter Immunantworten. Zudem ist dieses Protein, dessen physiologischer Ligand noch nicht bekannt ist, verantwortlich für die Internalisierung des Hepatitis A Virus, weshalb es auch als zellulärer Rezeptor für Hepatitis A (HAVcr-1) bezeichnet wird.

In der Bronchiallavageflüssigkeit asthmatischer Mäuse konnte eine signifikante Verringerung von Leukozyten durch Applikation von *TIM1*-Antikörpern erreicht werden [103]. Diese Ergebnisse haben das Augenmerk mehrerer Arbeitsgruppen auf die Bedeutung von dem in Region 5q31-33 lokalisierten *TIM1*-Gen als Kandidatengen in allergischen Erkrankungen gelenkt. Weiterhin zeigten Untersuchungen mit Mikrosatellitenmarkern in direkter Umgebung von *TIM1* in zwei unabhängigen Publikationen eine signifikante Kopplung mit Asthma und Atopie [6; 104].

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen zeigten Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen eine potentielle Rolle verschiedener *TIM1*-Polymorphismen bei allergischen Erkrankungen. Kontroverse Ergebnisse zu Assoziationen von *TIM1*-Polymorphismen mit Atopie in unterschiedlichen Populationen sind seitdem erschienen [10-12; 16; 41; 105; 106].

Der *TIM1*-SNP (rs2277025) wurde von uns erstmalig in einer deutschen und einer europäischen Population untersucht. Dabei zeigte sich keine Assoziation zu Asthma, AD, ARK und allergischer Sensibilisierung. Darüber hinaus wurde in unserer Arbeit der *TIM1*-SNP erstmals hinsichtlich allergischer Sensibilisierung und Lungenfunktionsparametern untersucht. Auch bei diesen Untersuchungen fand sich keine Assoziation.

Nur zwei vorherige Assoziationsstudien untersuchten eine Assoziation dieses im Intron liegenden *TIM1*-SNP mit allergischen Phänotypen:

- Gao et al. untersuchten 334 Afro-Amerikaner auf Assoziation verschiedener *TIM1*- und *TIM3*-Polymorphismen mit allergischen Phänotypen (89 Asthmatiker). Der *TIM1*-SNP (rs2277025) lag in ihrer Population mit einer Allelfrequenz von 0,49 vor

(in den Populationen MAS: 0,36 und ETAC: 0,38). Sie fanden eine leichte Assoziation mit Asthma, konnten diese im TDT aber nicht bestätigen (REF).

- Graves et al. fanden in einer ethnisch gemischten amerikanischen Population (n=564, Tuscon-Population) eine Allelfrequenz von 0,37 des *TIM1*-SNP (rs2277025). Graves et al. konnten in der Tuscon-Population keine Assoziationen dieses Polymorphismus mit allergischen Phänotypen finden.

Wir konnten also die Ergebnisse von Graves *et al.* bestätigen. Die Allelfrequenz unserer Populationen unterschied sich von der Tuscon-Kohorte von Graves *et al.* nur marginal. Allerdings besteht ein deutlicher Unterschied der Allelfrequenz unserer Studienpopulationen zu der in der afroamerikanischen Kohorte von Gao *et al.*. Ethnische Unterschiede in der Allelfrequenz von Varianten in immunologisch relevanten Genen sind sehr häufig beschrieben (s.u.) .

In großen epidemiologischen Studien konnte ein protektiver Effekt einer Hepatitis A Infektion auf die Entwicklung von allergischen Erkrankungen gezeigt werden. Wie oben erklärt, ist *TIM1* verantwortlich für die Internalisierung des Hepatitis A Virus. Genetische Varianten im *TIM1*-Gen könnten Einfluss auf die Vermittlung dieses protektiven Effekts nehmen. Ein Beleg dafür sind die Ergebnisse einer Arbeit von McIntire *et al.*, die zeigten, dass eine Hepatitis A Infektion vor der Entwicklung von Atopie schützen kann, wenn die Infizierten Träger bestimmter *TIM1*-Varianten sind [40].

Abhängig von der Anzahl Hepatitis A seropositiver Individuen in Studienpopulationen können vermutlich unterschiedlich starke Assoziationen von *TIM1*-Polymorphismen mit allergischen Phänotypen gefunden werden. Eine solche Gen-Umwelt-Interaktion könnte auch Ursache der differierenden Ergebnisse von Gao *et al.*, der Tuscon-Kohorte und den von uns untersuchten Populationen sein. Zur Berücksichtigung dieser Gen-Umwelt-Interaktionen wären, angesichts der geringen Anzahl von Hepatitis A Antigenträgern in Deutschland, hierfür allerdings noch weitaus größere Studienpopulationen notwendig.

Es ist nicht auszuschließen, dass dieser SNP erst in Interaktion mit anderen Polymorphismen die Suszeptibilität für allergische Erkrankungen erhöht. Ein wichtiger Einfluss des *TIM1*-Gens auf die Entstehung allergischer Erkrankungen wird daher

durch diese Untersuchung nicht in Frage gestellt. Zudem konnten wiederholt Assoziationen einer, von uns nicht untersuchten, häufig vorkommenden Deletion im *TIM1*-Gen mit Atopie und allergischen Phänotypen gezeigt werden [10; 12; 16].

6.2.2 *TIM3*

TIM3 ist ein Th1-spezifisches Oberflächenprotein [42; 107]. Zusätzlich zu ihrer Rolle bei der Immunabwehr regulieren Th-1- und Th-2-Zellen gegenseitig ihre Funktion und Expression. Eine verstärkte Induktion von Th-1-Zellen kann die Ausbildung von Asthma und Atopie inhibieren [43; 44]. Eine Aufhebung der Interaktion von *TIM3* mit seinen Liganden führt zu verstärkter TH-1-Antwort im Mausmodell, was die potentielle Bedeutung von *TIM3* für allergische Erkrankungen verdeutlicht [45; 106].

Auch das für *TIM3* kodierende Gen liegt in der Region 5q31-33, die vielfach Kopplung zu allergischen Phänotypen zeigte. McIntire *et al.* konnten zeigen, dass Polymorphismen im *TIM3*-Gen bei Mäusen mit einer bronchialen Hyperreagibilität und Verringerung der IL-4-Produktion assoziiert sind [40]. Der hier untersuchte SNP (rs 1036199) liegt im Exon 3 des *TIM3*-Gens und sorgt wahrscheinlich für einen Aminosäureaustausch im *TIM3* Protein (von Leuzin zu Arginin). Damit ist eine Funktionalität dieses SNP anzunehmen [10].

Wir untersuchten diesen SNP auf Assoziation mit Atopie und allergischen Phänotypen in insgesamt 1384 Kindern. Wir konnten weder in der MAS-Kohorte noch in der ETAC-Population Assoziationen zu Asthma, AD, ARK, Gesamt-IgE-Konzentrationen oder allergischer Sensibilisierung finden. Weiterhin konnten wir keine Assoziationen des *TIM3*-SNP (rs 1036199) mit Veränderungen der Lungenfunktion (nur in der MAS-Kohorte). Auch im TDT (nur in der ETAC-Population) zeigte sich keine vermehrte Transmission des SNP bei oben genannten Phenotypen.

In einer vorherigen Publikation von Graves *et al.* wurde eine Assoziation dieses SNP mit allergischen Phänotypen bei Kindern der Tuscon-Kohorte (US-amerikanische Geburtskohorte in Tuscon, Arizona (n=568)) untersucht [10]. Dort fand sich eine Assoziation mit Atopie ($p < 0,01$), wobei Atopie als eine positive Reaktion auf wenigstens ein Allergen in einem Prick-Test definiert wurde. Dabei sind die Definitionen unseres Phänotyps allergische Sensibilisierung und des Phänotyps Atopie von Graves *et al.* ähnlich und somit vergleichbar. Eine grenzwertige Assoziation zeigte

sich zu AD ($p=0,06$). Keine Assoziation fand sich mit Asthma. Das Vorliegen von AD und Asthma wurde hier durch von Eltern ausgefüllte Fragebögen ermittelt.

Chae *et al.* konnten in einer koreanischen Kohorte mit 638 Individuen eine Assoziation zu ARK feststellen ($p 0,029$) [108]. Die Diagnose ARK basierte hier auf den klinischen Symptomen wässrige Rhinorrhoe, nasale Obstruktion, Niesen, und einer positiven Reaktion auf wenigstens ein Allergen in einem Prick-Test. Eine Assoziation zu Asthma (definiert nach den Kriterien der American Thoracic Society [109]) fand sich in ihrer Studie nicht.

Die Allelfrequenzen des *TIM3*-Polymorphismus unterschieden sich weder in den beiden von uns untersuchten Populationen, ETAC und MAS, noch zu denen in der Tuscon-Kohorte. Deutlich unterschieden sich die Allelfrequenzen zu den von Chae *et al.* publizierten Daten, die in einer koreanischen Kohorte keinen Wildtyp finden konnten. Bei Koreanern scheint der von uns untersuchte *TIM3*-SNP also die Normvariante zu sein.

Für die abweichenden Ergebnisse unserer Untersuchung zu denen aus der Tuscon-Kohorte von Graves *et al.* sind folgende Ursachen denkbar:

- Unterschiede in den Definitionen der Phänotypen und die mangelnde Berücksichtigung der Schweregrade der untersuchten Erkrankungen in den untersuchten Populationen könnten Einfluss auf die Studienergebnisse genommen haben. So wurde der Phänotyp Asthma ja/nein in der MAS-Kohorte bei mindestens zwei aufgetretenden Episoden von pfeifender Atmung mit Luftnot festgelegt. In der ETAC-Population dagegen wurde der Asthmabeginn nach drei, in mindestens einer Woche Abstand auftretenden Episoden von nächtlichem Husten oder pfeifender Atmung mit Schlaf einschränkung festgestellt. Da bei Studienende die Kinder durchschnittlich nur fünf Jahre alt waren wurden möglicherweise später auftretende Asthma-Fälle hier nicht berücksichtigt. In der Tuscon-Population wurde Asthma definiert als positive Antwort auf die Frage: „Hat ihr Kind jemals Asthma gehabt und hat ein Arzt jemals festgestellt, ihr Kind habe Asthma?“. Allein die Diskrepanz dieser drei beispielhaft aufgeführten Definitionen macht die eingeschränkte Vergleichbarkeit deutlich.
- Möglicherweise steht der untersuchte SNP in einem Kopplungsgleichgewicht mit einer anderen genetischen Variante. Befinden sich mehrere SNPs in regulatorischen

Regionen eines Gens, wie bei *TIM3*, ist es wahrscheinlich, dass sie sich gegenseitig beeinflussen und Einfluss auf die Bedeutung eines funktionellen Polymorphismus nehmen. Die individuelle Analyse eines einzelnen SNP reflektiert deshalb nicht unbedingt die in vivo Genfunktion.

- Denkbar wäre eine Bedeutung der verschiedenen Ethnien der Studienpopulationen. Die Tuscon-Kohorte setzt sich aus verschiedenen Ethnizitäten zusammen, wobei 60% der Kinder zwei weiße Elternteile haben, 30% haben zumindest ein hispanisches Elternteil und 10% entstammen anderen Ethnien. Die MAS-Kohorte ist eine deutsche Geburtskohorte, die ETAC-Population schloss Kinder aus 12 europäischen Ländern und Kanada ein. Allerdings gab es weder Unterschiede der Allelfrequenzen zwischen den beiden Populationen noch bei der getrennten Auswertung der ethnischen Gruppen in der Tuscon-Kohorte
- Mittlerweile werden die Einflüsse verschiedener Umweltfaktoren als plausibelste Erklärung für die geringe Reproduzierbarkeit von Kandidatengenstudien angesehen [65; 110; 111]. Unterschiede in der Exposition zu Allergenen, viralen und bakteriellen Antigenen können eine unterschiedliche Aktivität des Immunsystems zur Folge haben und so den Einfluss genetischer Varianten maskieren (Phänokopie). Häufig können in Kandidatengenstudien Ergebnisse nicht reproduziert werden [111]. In einer vorherigen Untersuchung an einem Polymorphismus im *CD14*-Gen in der MAS-Population konnten Ergebnisse aus der Tuscon-Kohorte nicht reproduziert werden [66; 67]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Assoziation des *CD14* SNP mit Atopie und Asthma maßgeblich von der Endotoxinexposition der genotypisierten Individuen beeinflusst wird [65; 112; 113]. Hierdurch werden die kontroversen Ergebnisse von *CD14*-Assoziationsstudien erklärt.

Wie oben beschrieben konnten Chae *et al.* eine Assoziation mit ARK finden, die wir nicht reproduzieren konnten, obwohl sich die Definition des Phänotypes ARK in der MAS-Kohorte und in der koreanischen Population glich [108]. Folgende Ursachen sind denkbar:

- Hier scheint die Ethnizität eine wesentliche Rolle zu spielen, insbesondere da sich in der koreanischen Kohorte kein Wildtyp finden ließ. Hierfür könnte ein unterschiedlicher Selektionsdruck durch Infektionen im Laufe der Evolution auf den verschiedenen Kontinenten, der zu signifikanten ethnischen Unterschieden in den

Genen der Immunabwehrmechanismen und damit der allergischen Reaktionen geführt hat, verantwortlich gemacht werden.

- Darüber hinaus sind, wie oben beschrieben, Gen-Gen-Interaktionen in dieser polymorphen Region durchaus vorstellbar. Auch wenn TIM3 in der allergischen Pathophysiologie eine große Rolle zu spielen scheint, hat unsere Untersuchung nur geringe Aussagekraft über die tatsächliche in vivo Gen- und Proteinfunktion.
- Vor allem Unterschiede in der Exposition zu Umweltfaktoren, die in der koreanischen Population wahrscheinlich zu einer Selektion des Polymorphismus geführt haben, sind von großer Bedeutung.

Unsere Ergebnisse aus zwei großen pädiatrischen Populationen zeigen im Vergleich mit den bisher publizierten Daten, dass zukünftig die standardisierte Berücksichtigung von Umweltfaktoren, die sorgfältige Definition von Phänotypen und die Rekrutierung von möglichst großen Studienpopulationen zur Evaluation von Gen-Umwelt- und Gen-Gen-Interaktionen notwendig sind für verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse aus Kandidatengenstudien. Eine anschließende Untersuchung mit weiteren Polymorphismen im *TIM3*-Gen erscheint sinnvoll.

6.2.3 ITK

ITK gehört zu den Tec-Kinasen, die wichtige Mediatoren bei der T-Zell-Aktivierung darstellen. Die intrazelluläre Tyrosinkinase ITK ist besonders für die Th2-Zell-Differenzierung von Bedeutung [102].

Auf dem Chromosom 5q in der Region 31-33 liegt das für ITK kodierende Gen. Zwei SNPs in der Promotorregion von *ITK* (*ITK* -1793 und *ITK* -1678) wurden in dieser Arbeit auf Assoziation mit Asthma, AD und weiteren allergischen Phänotypen untersucht. In beiden pädiatrischen Populationen (MAS und ETAC) konnte keine Assoziation mit Asthma, AD, allergischer Sensibilisierung, ARK oder Gesamt-IgE-Erhöhungen gefunden werden. Statistisch signifikante Ergebnisse hinsichtlich einer Assoziation der SNPs mit veränderter Lungenfunktion in der MAS-Kohorte konnten ebenfalls nicht gefunden werden. Die Allelfrequenzen der beiden *ITK*-Promotor-Polymorphismen unterschieden sich nicht signifikant in den beiden von uns untersuchten Populationen.

Allerdings fanden wir einen protektiven Effekt der Polymorphismen auf die Entwicklung von Asthma in der ETAC-Population, den wir aber durch unsere nachfolgenden Untersuchungen (TDT und Vergleich der Daten mit der MAS-Kohorte) nicht reproduzieren konnten. Zudem zeigten unsere Ergebnisse nach Korrekturen für multiples Testen lediglich eine Tendenz zu einem protektiven Effekt der Polymorphismen auf die Entwicklung von Asthma. Ein solcher Zusammenhang würde sich dennoch gut in das bisherige Verständnis der Rolle von ITK in Allergien einfügen.

Eine verminderte Suszeptibilität für Asthma in Individuen mit den Promotor-Polymorphismen könnte Zeichen für eine bestehende verminderte ITK-Expression sein. Im Mausmodell konnte eine verminderte Th2-Zell-Antwort in *ITK*-Defizienten Tieren gezeigt werden und damit eine verminderte allergische Reaktion [114]. Zudem konnte im Mausmodell mit selektiven ITK-Inhibitoren eine Symptomlinderung bei asthmatischen Mäusen erreicht werden, die so deutlich war, dass seitdem an einer Einführung von ITK-Inhibitoren in die humane Asthma-Therapie gearbeitet wird [102; 115; 116].

Lediglich eine vorherige Studie befasste sich mit Assoziationen dieser beiden *ITK*-SNPs mit Atopie, Asthma, und AD .

Graves *et al.* konnten einen statistisch signifikanten Unterschied der Allelfrequenzen des *ITK* –1678 Polymorphismus innerhalb ihrer Kohorte, zwischen den ethnischen Gruppen, darstellen. Deutliche Allelfrequenzunterschiede ergaben sich dort zwischen Kindern mit zwei hispanischen Elternteilen und der Gruppe mit zwei kaukasischen Elternteilen. Diese Unterschiede bestanden nicht für den *ITK* –1793 Polymorphismus. Keine statistisch signifikanten Unterschiede fanden sich beim Vergleich unserer Allelfrequenzen mit denen kaukasischer Kinder der Tuscon-Population für beide Promotorpolymorphismen. Den von Graves *et al.* beschriebenen statistisch signifikanten Unterschied der Allelfrequenzen des *ITK* –1678 SNP in hispanischen und kaukasischen Kindern konnten wir mit den Daten der ETAC- und der MAS-Kohorte reproduzieren.

In der oben beschriebenen Tuscon Children's Respiratory Study konnte von Graves *et al.* eine Assoziation der *ITK*-Polymorphismen mit Atopie gezeigt werden [10]. Atopie wurde hier als eine positive Reaktion auf wenigstens ein Allergen im Rahmen eines Prick-Testes definiert, diese Phänotyp-Definition deckt sich mit unserem Phänotyp der

allergischen Sensibilisierung. Sie fanden weder eine Assoziation zu Asthma oder ARK, noch den von uns in der ETAC-Population gesehenen protektiven Effekt.

Folgende Ursachen kommen für die abweichenden Ergebnisse hinsichtlich einer Assoziation der *ITK*-Promotor-Polymorphismen mit Atopie, beziehungsweise mit allergischer Sensibilisierung in Frage:

- Auch die hier untersuchten SNPs könnten in einem Kopplungsgleichgewicht mit anderen genetischen Varianten stehen. Auch in *ITK* finden sich eine Vielzahl von SNPs, die sich gegenseitig beeinflussen könnten. Die individuelle Analyse einzelner SNPs kann auch hier nur zum Teil die in vivo Genfunktion reflektieren.
- Die Assoziation mit Atopie fand sich in der Tuscon-Population auch bei getrennter Auswertung der einzelnen Ethnien. Allein die ethnischen Unterschiede können hier kaum als Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse herangezogen werden.
- Graves *et al.* konnten eine statistisch signifikante Assoziation mit Atopie lediglich nach 11 Jahren feststellen, zu den weiteren Untersuchungszeitpunkten (6 Jahre und 16 Jahre) konnten sie keine Assoziation finden. Wie es zu einer zeitlich inkonsistenten Assoziation der Polymorphismen mit Atopie, hier also allergischer Sensibilisierung, kommen kann, bleibt unklar. Wir haben die Daten zur allergischen Sensibilisierung in MAS bis zum Alter von 7 Jahren auf Assoziation zu den Polymorphismen untersucht, alle später auftretenden Ausprägungen werden von unserer Studie nicht erfasst.
- Auch hier können unterschiedliche Umweltfaktoren als wahrscheinlichste Ursache für die mangelnde Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Graves *et al.* angesehen werden [65].
- In einer funktionellen Untersuchung, 2002, konnten Matsumoto *et al.* zeigen, dass sich eine vermehrte *ITK*-Transkription im peripheren Blut von Patienten mit moderater bis schwerer AD nachweisen lässt [117]. Wie auch Graves *et al.* konnten wir keine inverse Assoziation der Promotor-Polymorphismen mit dem Merkmal Atopie in der MAS-Kohorte finden. Da in der ETAC-Population, in der alle Kinder an einer AD leiden, keine gesteigerte Allelfrequenz im Vergleich zu den nicht-atopischen-Kontrollen in MAS gefunden werden konnte, können wir auch dadurch einen bedeutsamen Einfluss dieser Polymorphismen auf AD nicht untermauern.

Es ist allerdings noch nicht geklärt, ob die untersuchten Promotor-Polymorphismen tatsächlich zu einer verminderten ITK-Expression in T-Zellen führen. Daher erscheint es sinnvoll, zunächst Studien zum Einfluss der von uns untersuchten Polymorphismen auf die ITK-Spiegel in T-Zellen durchzuführen, bevor weitere Assoziationsstudien mit diesen SNPs stattfinden.

6.2.4 MGC 26988 und TIMD4

MGC 26988 und *TIMD4* liegen in der direkten Umgebung der oben besprochenen Kandidatengene in der Region 5q31-33. Die von ihnen kodierten Proteine konnten noch nicht identifiziert werden.

Eine Untersuchung von Graves *et al.* legte eine Bedeutung von zwei SNPs (rs31208 in *MGC 26988* und rs 1345618 in *TIMD4*) in diesen Genen für die Entstehung von Atopie und allergischen Phänotypen nahe.

Auch diese Polymorphismen sind in unseren Populationen nicht mit Atopie, Asthma und anderen allergischen Phänotypen assoziiert. Graves *et al.* konnten eine Assoziation des *MGC 26988* Polymorphismus mit Atopie in der Tuscon-Population zeigen. Mögliche Ursachen für diese inkonsistenten Ergebnisse sind oben ausführlich erklärt (6.1.2. und 6.1.3.).

6.3 Pharmakogenetische Untersuchung

6.3.1 HNMT-(C314T)SNP

Die Histamin-N-Methyltransferase katalysiert den Hauptabbauweg des Histamins in der menschlichen Bronchialschleimhaut.

Ein funktioneller Polymorphismus im *HNMT*-Gen (Chromosom 1p23) konnte von Preuss *et al.* identifiziert werden. Durch Bestimmung der Enzymaktivität in 127 humanen Nierenbiopsaten konnte gezeigt werden, dass der Polymorphismus *HNMT-C314T* durch eine Konformitätsänderung des Enzyms für eine signifikant niedrigere Enzymaktivität verantwortlich ist [71].

Der Polymorphismus könnte also einen verzögerten Histaminabbau in der Lunge zur Folge haben und damit eine verstärkte allergische Reaktion bedingen.

Dieser funktionelle SNP wurde deshalb mehrfach hinsichtlich einer erhöhten Suszeptibilität für Asthma untersucht. Yan *et al.* konnten eine signifikante Erhöhung der Allelfrequenz (0,14) in einer Population asiatischer Asthmatiker (n=192) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=237) finden (Allelfrequenz: 0,08; OR=1,9; p<0,01). Diese Ergebnisse konnten bei einer Untersuchung in der MAS-Geburtskohorte und in der Freiburger Asthmatiker Kohorte allerdings nicht reproduziert werden [73].

Auch in der ETAC-Population untersuchten wir daher eine Assoziation dieses *HNMT*-Polymorphismus mit Asthma. Unsere Ergebnisse in der ETAC-Population konnten keine Unterschiede der Genotypverteilung zwischen der Gruppe der Asthmatiker und der Nicht-Asthmatiker zeigen. Damit bestätigten wir die Ergebnisse von Deindl *et al.* [73]. Weiterhin konnten wir keine Assoziation des Polymorphismus zu erhöhten IgE-Spiegeln oder zu einer vermehrten Sensibilisierung finden.

Unser Hauptaugenmerk lag allerdings auf der Hypothese, dass ein verminderter Histaminabbau, bedingt durch diesen *HNMT*-Polymorphismus, Einfluss auf das Ansprechen einer Pharmakotherapie mit dem Antihistaminikum Cetirizin haben könnte. Eine Assoziation mit der therapeutischen Wirksamkeit von Antihistaminika wäre ein wichtiger Schritt zur Entwicklung von individualisierten antiallergischen Therapien, verbunden mit einer möglichen Senkung von Morbidität und Gesundheitskosten. Eine Assoziation zu folgenden Phänotypen in der Behandlungsgruppe wurde untersucht: Entwicklung von Asthma, hohen SCORAD-Werten und damit schweren Verläufen von AD, erhöhten Gesamt-IgE-Spiegeln und der Anzahl spezifischer Sensibilisierungen.

Dabei zeigten sich keine Unterschiede in der Asthmainzidenz zwischen den verschiedenen *HNMT*-Genotypen der Behandlungsgruppe, weder unter der Annahme eines dominanten noch eines rezessiven Modells. Auch Unterschiede in der Ausprägung der AD (SCORAD), erhöhte Gesamt-IgE-Spiegel sowie eine erhöhte Anzahl spezifischer Sensibilisierungen in der Behandlungsgruppe konnten nicht gefunden werden.

Der *HNMT*-Polymorphismus scheint keinen pharmakogenetischen Effekt hinsichtlich der Cetirizin-Wirkung in der ETAC-Population zu haben. Dies könnte folgende Ursachen haben:

- Ein potentieller pharmakogenetischer Effekt ist bei geringen Wirkunterschieden und bei einem fraglich präventiven Effekt von Cetirizin nur schwer nachweisbar. Eine

präventive Cetirizin-Wirkung auf die Entwicklung von Asthma konnte bei Betrachtung der gesamten ETAC-Population nicht nachgewiesen werden. Nur in der Untergruppe der früh gegen Gräserpollen und Hausstaubmilben Sensibilisierten zeigte sich ein präventiver Effekt. Noch unveröffentlichte Ergebnisse einer daraufhin durchgeführten Studie mit einer größeren Anzahl frühzeitig gegen Aeroallergene sensibilisierter Probanden konnten keinen präventiven Effekt nachweisen.

- In der Behandlungsgruppe fand sich eine verminderte Ausprägung der AD (gemessen mit SCORAD). Auch dieser Behandlungseffekt war gering, was den Nachweis eines pharmakogenetischen Effekts erschwert.
- Die Probanden der Plazebogruppe und der Behandlungsgruppe konnten zur Linderung der AD auf topische Therapien, zum Beispiel auf Glukokortikoide zurückgreifen. Dadurch ließ sich der tatsächliche Einfluss von Cetirizin auf die Ausprägung der AD nur abschätzen. In der Auswertung der ETAC-Studie wurde zwar ein Vergleich der Menge der verbrauchten Glukokortikoide in Behandlungsgruppe und Plazebogruppe durchgeführt, diese Daten lagen allerdings für unsere Auswertung nicht vor. Diese unterschiedlichen topischen Therapien haben einen schwer einschätzbaren Einfluss auf unsere pharmakogenetische Assoziationsstudie genommen.

Trotz unserer Ergebnisse ist weiterhin davon auszugehen, dass genetische Varianten von Mediatoren allergischer Entzündungen Einfluss auf die Wirkung einer antiallergischen Pharmakotherapie nehmen. Tantisira *et al.* konnten zeigen, dass sich die Lungenfunktion asthmatischer Individuen mit Polymorphismen im *CRHR1* Gen (Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor 1) unter einer Therapie mit Glukokortikoiden signifikant stärker verbessert im Vergleich zu asthmatischen Individuen ohne die untersuchten Polymorphismen [20]. Auch Unterschiede in der Wirksamkeit von β -Mimetika und von Leukotrienantagonisten in Abhängigkeit individueller Genotypen konnten nachgewiesen werden [81; 82]. So könnten auch Veränderungen im Histaminmetabolismus und in der Histaminrezeptorwirkung Einfluss auf die Wirkung von Antihistaminika haben.

Folgeuntersuchungen sollten daher unter kontrollierteren Bedingungen, idealerweise unter Monotherapie nur eines Arzneimittels durchgeführt werden.

6.3.2 Histamin-1-Rezeptor (-17C/T) SNP

Der Histamin-1-Rezeptor (HRH1) vermittelt die proinflammatorische Wirkung von Histamin (Bachert 1998). Das *HRH1*-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 3 in der Region 3p21-p14, einer Region von der Lee *et al.* zeigen konnten, dass sie in Kopplung mit AD steht [75]. Sasaki *et al.* fanden in einer japanischen Population einen SNP (-17C/T) 17 Basenpaare entfernt vom ersten ATG-Triplet in der nichtkodierenden Region von Exon 2 des *HRH1*-Gens. In der Annahme, dieser Polymorphismus könne Einfluss auf die Genexpression haben und damit auf die Entwicklung allergischer Erkrankungen, untersuchten sie eine Assoziation dieses Polymorphismus mit allergischem Asthma [76]. In einer Population von 200 Kindern konnten sie keine erhöhte Suszeptibilität finden. Die Allelfrequenz dieses SNP in der japanischen Kohorte (0,025) unterschied sich deutlich von der Allelfrequenz in unserer Population (0,16).

Da der Histaminrezeptor wesentlich an der oben beschriebenen immunmodulatorischen Wirkung von Histamin beteiligt ist, schien ein Einfluss besonders auf die präventive Wirkung von Cetirizin auf die Entstehung von allergischem Asthma wahrscheinlich. Wir konnten jedoch weder unterschiedliche Genotypverteilungen zwischen Asthmatikern und Nicht-Asthmatikern finden, noch konnten wir Assoziationen zu einer erhöhten Anzahl allergischer Sensibilisierungen oder erhöhten Gesamt-IgE-Spiegeln feststellen. Zudem konnte in der Cetirizin-Behandlungsgruppe keine unterschiedliche Genotypverteilung zwischen den Kindern, die Asthma entwickelten und denen, die kein Asthma entwickelten gefunden werden. Weiterhin ließ sich kein Einfluss des SNP auf den SCORAD-Index, weder in der Behandlungsgruppe, noch in der Kontrollgruppe finden.

So konnten hier die Ergebnisse aus einer asiatischen Population, in der der *HRH1*-SNP keine Assoziation zu allergischem Asthma zeigte [76], in einer europäischen Population reproduziert werden. Ursachen für den mangelnden Nachweis pharmakogenetischer Wechselwirkungen sind unter Abschnitt 6.2.1. näher ausgeführt.

6.4 Kritische Anmerkungen

6.4.1 Umweltfaktoren

Atopische Erkrankungen unterliegen dem Einfluss einer Vielzahl von Genen (komplexe genetische Merkmale), bei denen sowohl Gen-Gen-, als auch Gen-Umwelt-Interaktionen eine wichtige Rolle spielen. Die untersuchten Populationen unterliegen verschiedenen Umwelteinflüssen, wie:

- Kontakt mit Viren und Bakterien
- Kontakt mit Exogenen Noxen (Tabakrauch, Ruß, Feinstaub, Diät)
- Allergenexposition, u.a.m.

In den letzten Jahren sind einige Studien publiziert worden, die auf eine Interaktion von Genen der angeborenen Immunität (bzw. Varianten in diesen Genen) und bakteriellen sowie viralen Bestandteilen hindeuten: Wie bereits beschrieben, hängt eine Assoziation von einer CD14 Promotor-Variante mit Atopie und Asthma maßgeblich von der Umwelt bzw. der Endotoxin-Exposition ab, dies konnte inzwischen von drei unabhängigen Gruppen belegt werden [65; 112; 113]. Weiterhin zeigten *TLR2* (Toll like receptor 2) und *CARD4* Varianten eine Assoziation mit Atopie, Asthma und ARK bei Kindern, welche auf Bauernhöfen mit Tierhaltung aufwuchsen, jedoch nicht bei Kindern welche in einem ländlichen Milieu ohne Tierhaltung aufwuchsen [118; 119]. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass der protektive Effekt des „farming-environments“ durch Gene vermittelt wird, die bei der Erkennung von bakteriellen Bestandteilen eine maßgebliche Rolle spielen. Ein Beispiel für Gen-Umwelt-Interaktionen hinsichtlich viraler Erreger ist die bereits zuvor erwähnte Studie von McIntire *et al.*, die zeigte, dass der protektive Effekt einer Hepatitis A Infektion hinsichtlich der Atopie von Varianten im *TIM1* Gen abhängig ist [40].

Die Quantifizierung und Charakterisierung von umweltbezogenen Risikofaktoren stellt sich äußerst komplex und aufwendig dar. Hinzu kommt, dass nicht nur die Quantität sondern auch der Zeitpunkt der Exposition gegenüber diverser Umweltfaktoren bei allergischen Erkrankungen entscheidend ist. Bauernstudien deuten darauf hin, dass bereits die intrauterine Exposition/ bzw. die der Mutter die Entwicklung der Atopie im Schulkindalter signifikant beeinflussen [120].

Zwar wurden Infekte in unseren Studienpopulationen standardisiert dokumentiert, ein

Erregernachweis erfolgte jedoch nicht. Auch wurde die Endotoxinexposition im Säuglingsalter weder in der ETAC- noch in der MAS-Population bestimmt. Gen-Umwelt-Interaktionsanalysen sind daher in unseren Studienpopulationen hinsichtlich viraler und bakterieller Exposition kaum möglich.

6.4.2 Phänotyp

In Kandidatengenstudien werden Phänotypen oft unterschiedlich definiert. Dies führt zu einer eingeschränkten Vergleichbarkeit der Studienergebnisse. In einigen Publikationen wurden die Phänotypen allein durch Auswertung von Elternfragebögen definiert, in den hier vorgestellten Populationen durch standardisierte Interviews, klinische Untersuchungen und unter Einbeziehung von zahlreichen Labor- und funktionellen Parametern. Eine Einbeziehung unterschiedlicher Schweregrade der Erkrankungen gestaltet sich oft als schwierig, insbesondere da diese abhängig vom Beobachtungszeitpunkt und von aktueller Medikation sind.

Da sich allergische Erkrankungen häufig in einer bestimmten Altersperiode entwickeln und später eine Tendenz zu Spontanremissionen zeigen, nehmen die Beobachtungsdauer und die Zeitpunkte der Wiedervorstellung einen großen Stellenwert ein.

6.4.3 Ethnizität

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass Polymorphismen in manchen ethnischen Gruppen gehäuft, beziehungsweise gar nicht auftreten. Im Rahmen einer NHLBI (National Heart Lung and Blood Institute, USA) geförderten Studie wurden (und werden) zahlreiche „Innate immunity“ Gene in drei unterschiedlichen Ethnischen Gruppen sequenziert und die Häufigkeit genetischer Varianten und Haplotypen beschrieben. Hoch signifikante Unterschiede der Allelfrequenz finden sich bei der Mehrzahl der Varianten in den untersuchten Genen, insbesondere zwischen Afro-Amerikanischen und Europäischen Individuen (<http://innateimmunity.net>). Es wird vermutet, dass diese Unterschiede durch natürliche Selektion unter verschiedenen Umweltbedingungen zustande kamen. Der Selektionsdruck durch Infektionskrankheiten war im Laufe der Evolution auf den einzelnen Kontinenten sehr

verschieden. Dadurch ist es zu Unterschieden in Genen der Immunabwehrmechanismen gekommen, also in Genen, die auch für die allergische Reaktion eine wichtige Rolle spielen. Dies könnte auch eine wichtige Ursache für die weltweiten Unterschiede in den Prävalenzen von Asthma, AD und ARK darstellen. Weiterhin könnten ethnische Unterschiede die Inkonsistenz einiger Studienergebnisse erklären.

6.4.4 Funktionalität, Haplotyp-Analysen, Gen-Gen-Interaktionen

Für die Auswahl eines Kandidatengens ist die Funktionalität von Polymorphismen ein entscheidendes Kriterium. Bei vielen Kandidatengenuntersuchungen fanden im Vorfeld allerdings nur *in vitro* Untersuchungen oder funktionelle Untersuchungen in anderen Spezies statt, wie teilweise auch bei den in dieser Arbeit vorgestellten Polymorphismen. Dies lässt lediglich hypothetische Überlegungen zum Einfluss von Polymorphismen auf pathophysiologische Prozesse zu.

Befinden sich zudem mehrere SNPs in der regulatorischen Region eines Gens wie beispielsweise bei *ITK* (-1793 und -1678) ist eine gegenseitige Beeinflussung wahrscheinlich. Die individuelle Analyse einzelner SNPs zeigt deshalb nur einen Ausschnitt des Genotyps und ohne eine Sequenzierung des Gens und seiner Promotor-Region ist der Einfluss weiterer Polymorphismen bzw. von Haplotypen auf die Genfunktion nicht auszuschließen.

Neben Gen-Umwelt-Interaktionen spielen auch Gen-Gen-Interaktionen bei der Entstehung von Asthma und assoziierten Phänotypen eine entscheidende Rolle. Die Bedeutung von Gen-Gen-Interaktionen ist erst in den letzten Jahren zunehmend evident geworden.

Zahlreiche Kandidatengenanalysen sind publiziert, nur wenige konnten in unabhängigen Studienpopulationen repliziert werden (zusammengefasst von [121]), weiterhin sind nur selten hochsignifikante Ergebnisse bei Assoziationsstudien zu finden. Kabsch et al. [122] untersuchten kürzlich den Effekt von vier einzelnen genetischen Varianten sowie die Kombinationen dieser vier SNPs in funktionell eng gekoppelten Genen (*STAT6*, *IL13*, *IL4*, *IL4R*) hinsichtlich Asthma und hohem Gesamt-IgE. Kein oder ein geringgradig erhöhtes Risiko für Asthma und/oder erhöhtes Gesamt-IgE wurde bei den Einzelanalysen gesehen, bei einer Kombination von drei SNPs

dagegen bestand ein 17- bzw. 11-fach erhöhtes Risiko. Diese Studie demonstriert die Bedeutung von Gen-Gen-Interaktionen insbesondere bei funktionell verwandten Genen.

6.4.5 Multiples Testen/Statistik

Viele unterschiedliche Kandidatengene konnten in den letzten Jahren identifiziert und auf Assoziation mit allergischen Erkrankungen untersucht werden. Einige der publizierten Assoziationen sind allerdings auf Untersuchungen einer großen Anzahl von Untergruppen (Subphänotypen), ohne Korrekturen für multiples Testen und mit geringen Fallzahlen in den Untergruppen zurückzuführen. Eine bevorzugte Veröffentlichung positiver Ergebnisse mag einerseits Ursache für das multiple Testen sein, andererseits Grund dafür sein, dass Negativergebnisse teilweise keine Erwähnung finden [111].

Bei der Auswertung der Ergebnisse kommt ein großes Spektrum an statistischen Methoden zum Einsatz, was die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Studien zusätzlich einschränkt.

6.5 Schlussfolgerung

Assoziationsstudien komplexer genetischer Merkmale (wie z.B. allergischen Phänotypen) sind wichtig, da sie den Einfluss einzelner Gene auf die Krankheitsentstehung aufzeigen können. Erfahrungen der letzten Jahre zeigen jedoch, dass Ergebnisse von Assoziationsstudien (insbesondere bei der Analyse einzelner SNPs) kritisch interpretiert werden müssen: Haplotypen, Gen-Gen-, Gen-Umweltinteraktionen, die Ethnizität und das Alter der Studienteilnehmer beeinflussen die Untersuchungsergebnisse maßgeblich und können die Vergleichbarkeit von Studien erschweren oder unmöglich machen.

Große, longitudinal charakterisierte Geburtskohorten mit standardisierter Erfassung und Quantifizierung von relevante Umweltfaktoren (Endotoxin, Diät, Tabakrauch etc.) wären eine ideale Voraussetzung für weitere Kandidatengenstudien unter Berücksichtigung von Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen.