

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

DISSERTATION

**Evaluation von ICOS-Polymorphismen als Marker für Atopiedisposition bei
europäischen Kindern im Alter von 0-13 Jahren**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Steffi Humberdros
aus Schwedt/Oder

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. E. Hamelmann
 2. Prof. Dr. med. H. Witt
 3. Prof. Dr. Y.-A. Lee-Hübner

Datum der Promotion: 7. 9. 2012

Meiner Tochter

Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigenpräsentierende Zelle
CD	Cluster of Differentiation
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ETAC	Early Treatment of the Allergic Child Study
FEV1	Forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
ICOS	Inducible costimulator
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Kb	Kilobasen
LD	Linkage Disequilibrium
MAS	Mulicenter Allergy Study
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
nd	nicht durchgeführt
Nf κ B	Nuclear factor kappa B
ns	nicht signifikant
PCR	Polymerasekettenreaktion
RAST	Radioallergosorbent-Test
s	Sekunde
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Th	T-Helferzellen
Treg	Regulatorische T-Zellen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
1 Einleitung	9
1.1 Einführung.....	9
1.2 Atopische Erkrankungen	10
1.3 Die Bedeutung von ICOS bei der allergischen Inflammation.....	11
1.4 Polymorphismen im ICOS-Gen	14
1.5 Kohorten.....	16
2 Fragestellung.....	17
3 Material und Methoden.....	18
3.1 Studienpopulationen.....	18
3.2 Material	22
3.3 Methoden	24
3.3.1 Extraktion der Desoxyribonukleinsäure	24
3.3.2 Polymerasekettenreaktion	24
3.3.3 Genotypisierung durch Schmelzkurvenanalyse	25
3.4 Statistische Methoden	29
4 Ergebnisse	31
4.1 Untersuchung der risikotragenden ICOS-SNPs g.1-693 G>A und g.1-1413 G>A der Hutterer-Population bei europäischen Kindern.....	31
4.1.1 Allelfrequenzen und Genotypverteilungen der SNPs g.1-693 G>A und g.1-1413 G>A in den Kohorten.....	32
4.1.2 Assoziationen des SNPs g.1-693 G>A mit atopischen Phänotypen in der MAS-Kohorte	33
4.1.3 Überprüfung der Assoziationen des SNPs g.1-693 G>A mit atopischen Phänotypen in der ETAC-Kohorte	43
4.2 Untersuchung weiterer ICOS-SNPs an putativen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren.....	43

4.2.1	Allelfrequenzen und Genotypverteilungen der ICOS-SNPs g.1-2144 C>T, g.1-2419 T>C, g.20065 C>G, g.22126 G>T in den Kohorten	44
4.2.2	Assoziationen der SNPs mit atopischen Phänotypen in der MAS-Kohorte	45
4.2.3	Evaluation der SNPs in der ETAC-Kohorte	58
5	Diskussion.....	59
5.1	Diskussion der Studien-Kohorten und Methoden	59
5.2	Unterschiede in den Allelfrequenzen der untersuchten ICOS-SNPs.....	62
5.3	Risikotragende SNPs der Hutterer-Population waren nicht in beiden pädiatrischen Kohorten mit allergischen Phänotypen bei europäischen Kindern assoziiert	64
5.4	Suche nach Assoziationen zwischen weiteren ICOS-SNPs an putativen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und atopischen Erkrankungen	70
5.5	Assoziation des ICOS-SNPs g.22126 G>T mit atopischer Dermatitis und spezifischer Sensibilisierung gegen Kuhmilch	73
6	Zusammenfassung.....	76
	Literaturverzeichnis	77
	Danksagung	85
	Lebenslauf	86
	Erklärung	88

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Die zentrale Rolle der T-Zellen bei der allergischen Inflammation	12
Abb. 2:	Lokalisation von ICOS auf dem Chromosom 2q33	14
Abb. 3:	Nukleotidsequenzen der Primer und Sonden der untersuchten ICOS-Polymorphismen	27
Abb. 4:	Genotypisierung der SNPs durch Schmelzkurvenanalyse	28
Abb. 5:	Repräsentative Schmelzkurven des g.1-693 G > A-Polymorphismus in der MAS-Kohorte.....	31
Abb. 6:	Grasspezifische IgE-Serumkonzentration bei Kindern der MAS-Kohorte im Alter von 1 Jahr für die verschiedenen Genotypen im Promotor des ICOS-Gens an Position g.1-2144 C>T ...	53
Abb. 7:	Grasspezifische IgE-Serumkonzentration bei Kindern der MAS-Kohorte im Alter von 1 Jahr für die verschiedenen Genotypen im Promotor des ICOS-Gens an Position g.1-2419 T>C ...	54
Abb. 8:	Grasspezifische IgE-Serumkonzentration bei Kindern der MAS-Kohorte im Alter von 1 Jahr für die verschiedenen Genotypen des ICOS-Gens an Position g.20065 C>G	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Untersuchte Polymorphismen im ICOS-Gen.....	15
Tabelle 2a: Quantifizierung der CAP-Klassen (3)	19
Tabelle 2b: Perzentilen für Gesamt-IgE-Werte (94).....	19
Tabelle 3: Geräteliste.....	22
Tabelle 4: Reagenzien und Chemikalien	22
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 6: Primer für die PCR	25
Tabelle 7: Sonden zur Schmelzkurvenanalyse	26
Tabelle 8: Allelfrequenzen der ausgewählten ICOS-Varianten in der MAS- und ETAC-Kohorte	32
Tabelle 9: R ² als Maß des Kopplungsungleichgewichts in den Kohorten.....	32
Tabelle 10: Genotypverteilung des SNPs g.1-693 G>A bei Kindern der MAS- und ETAC-Kohorte mit Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	33
Tabelle 11: Assoziationen des ICOS-SNPs g.1-693 G>A mit atopischen Erkrankungen gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen in der MAS-Kohorte.....	34
Tabelle 12: Assoziation des ICOS-SNPs g.1-693 G>A mit spezifischer Sensibilisierung gegen Gräserpollen bei einem cut-off-Wert des spezifischen IgE <0,35 versus ≥0,35 in der MAS-Kohorte im Alter von 1 Jahr. „1“ steht für homozygot Wildtyp, „2“ steht für heterozygot und „3“ steht für homozygot Polymorphismus.	35
Tabelle 13: Assoziation des ICOS-SNPs g.1-693 G>A mit spezifischer Sensibilisierung gegen Gräserpollen bei einem cut-off-Wert des spezifischen IgE <0,7 versus ≥0,7 in der MAS-Kohorte im Alter von 1 Jahr.....	36
Tabelle 14: Assoziation des ICOS-SNPs g.1-693 G>A mit spezifischer Sensibilisierung gegen Gräserpollen bei einem cut-off-Wert des spezifischen IgE <0,35 versus ≥0,7 in der MAS-Kohorte im Alter von 1 Jahr.....	37
Tabelle 15a: Assoziation des SNPs g.1-693 G>A mit hohem spezifischem IgE gegen Gräserpollen in bestimmten Altersstufen. Spezifisches IgE als stetige Variable in kU/l.....	38
Tabelle 15b: Assoziation des SNPs g.1-693 G>A mit spezifischer Sensibilisierung gegen Gräserpollen im Alter von 1-10 Jahren.....	39
Tabelle 16: Assoziation des SNPs g.1-693 G>A mit hohem Gesamt-IgE in bestimmten Altersstufen. Gesamt-IgE als stetige Variable in kU/l.....	40
Tabelle 17: Assoziation des SNPs g.1-693 G>A mit hohem Gesamt-IgE über der 85. Kohortenperzentile (P) gegenüber unter der 15. Kohortenperzentile bei Kindern der MAS-Kohorte im Alter von 7 und 10 Jahren.....	41
Tabelle 18: Genotypverteilung des ICOS-SNPs g.1-693 G>A bei Betrachtung der Gesamt-IgE-Werte in der MAS-Kohorte in verschiedenen Altersstufen.....	42

Tabelle 19: Assoziation des SNPs g.1-693 G>A mit Asthma gegenüber den ETAC-Kindern ohne Asthma. AB steht für Asthma bronchiale.....	43
Tabelle 20: Allelfrequenzen ausgewählter ICOS-Varianten in der MAS-und ETAC-Kohorte.....	44
Tabelle 21: R ² als Maß des Kopplungsungleichgewichts.....	44
Tabelle 22a: Genotypverteilungen der ausgewählten ICOS-SNPs bei Kindern der MAS-Kohorte mit Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	45
Tabelle 22b: Genotypverteilungen der ausgewählten ICOS-SNPs in der ETAC-Kohorte mit Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	45
Tabelle 23a: Assoziationen des ICOS-SNPs g.1-2144 C>T mit atopischen Erkrankungen gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen in der MAS-Kohorte.....	46
Tabelle 23b: Assoziation des ICOS-SNPs g.1-2419 T>C mit atopischen Phänotypen gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen in der MAS-Kohorte.....	47
Tabelle 23c: Assoziation des ICOS-SNP g.20065 C>G mit atopischen Phänotypen gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen in der MAS-Kohorte.....	48
Tabelle 23d: Assoziation des ICOS-SNP g.22126 G>T mit atopischen Phänotypen gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen in der MAS-Kohorte.....	49
Tabelle 23e: Assoziation des ICOS-SNPs g.22126 G>T bei MAS-Kindern mit atopischer Dermatitis (AD) gegenüber den MAS-Kindern ohne atopische Dermatitis im Alter von 7 und 10 Jahren.	50
Tabelle 24: Assoziation der ausgewählten ICOS-SNPs mit erniedrigter FEV1 im Alter von 7 Jahren in der MAS-Kohorte.....	51
Tabelle 25: Assoziation der ICOS-SNPs mit hohem spezifischem IgE gegen Gräserpollen gegenüber niedrigem spezifischen IgE gegen Gräserpollen	52
Tabelle 26a: Assoziation der ICOS-SNPs mit hohem Gesamt-IgE über der 85. Kohortenperzentile (P) gegenüber niedrigem Gesamt-IgE unter der 15. Kohortenperzentile bei Kindern der MAS-Kohorte im Alter von 7 und 10 Jahren.....	56
Tabelle 26b: Assoziation des SNPs g.1-2419 T>C mit hohem Gesamt-IgE in verschiedenen Altersstufen in der MAS-Kohorte. P-gesamt ist der p-Wert des Kruskal-Wallis-Test.....	57
Tabelle 27: Assoziation der ICOS-SNPs mit Asthma gegenüber den ETAC-Kindern ohne Asthma im Alter von 4-5 Jahren.	58
Tabelle 28a: Lebenszeitprävalenz von Asthma (101).....	61
Tabelle 28b: Prävalenz von Asthma in den letzten 12 Monaten (101)	61
Tabelle 29: Vergleich der Allelfrequenzen der ausgewählten ICOS-Varianten g.1-693 G>A, g.1-1413 G>A, g.1-2144 C>T, g.1-2419 T>C, g.20065 C>G, g.22126 G>T in verschiedenen europäischen Kohorten.....	63

1 Einleitung

1.1 Einführung

Allergische Erkrankungen gehören zu den häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter. In den letzten Jahrzehnten kam es zu einem deutlichen Anstieg der atopischen Erkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter (38, 40, 67, 119). Die von atopischen Erkrankungen verursachten wirtschaftlichen Kosten sind beträchtlich – sowohl hinsichtlich der direkten Kosten der medizinischen Versorgung als auch bezüglich der indirekten Kosten wie verllorener Arbeitszeit und vorzeitigem Tod (2, 14, 40). Die Art der Manifestation und der Schweregrad der Erkrankung hängen von multiplen Genen und Umweltfaktoren ab.

Mit dem gegenwärtigen Wissen ist eine Vorhersage über das individuelle Atopierisiko oder den Krankheitsverlauf kaum möglich (15, 38, 40, 114). Genetische Marker, die eine Aussage über das individuelle Erkrankungsrisiko oder den Verlauf der allergischen Erkrankung zuließen, wären von großem Nutzen für die primäre Prävention von Allergien sowie für individuelle Therapieentscheidungen.

Wie entscheidend genetische Faktoren an der Allergieentstehung beteiligt sind, zeigt die Tatsache, dass eine positive atopische Familienanamnese einer der bedeutendsten Risikofaktoren ist (15, 16, 38, 65, 108, 109, 114). In den letzten Jahren wurden viele Gene in verschiedenen Populationen als Suszeptibilitätsorte für atopische Prädisposition identifiziert. Bei der Suche nach genetischen Markern wurde zum Beispiel wiederholt gezeigt, dass ein Polymorphismus im Filaggrin-Gen mit der Entwicklung von atopischer Dermatitis und allergischem Asthma bronchiale assoziiert ist (88, 96, 99).

Auch andere chromosomale Regionen wurden identifiziert, die mit der Entstehung von Atopie assoziiert sind (10, 16, 34, 65, 83, 93, 97, 102, 109, 114, 121). Für die Region 2q33-34, in der die Gene des Inducible costimulator (ICOS), CD28 und CTLA4 lokalisiert sind (11, 25, 77) wurde eine Assoziation mit atopischen Erkrankungen beschrieben (17, 27, 43, 52, 89, 103, 122). Diese Moleküle sind kostimulatorische T-Zell-Oberflächenmoleküle. Sie haben wesentlichen Einfluss auf den Verlauf von T-Zell-dominierten Immunantworten (13, 23, 26, 59, 61, 62, 80). Bei Erwachsenen wurde bereits eine Assoziation von zwei Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) im ICOS-Gen mit allergischer Sensibilisierung gegen Inhalationsallergene und hohem Gesamt-Immunglobulin (Ig)E beschrieben (103).

Das Ziel dieser Arbeit ist es nun, in einem kandidatengen-orientierten Ansatz zu untersuchen, ob sich die beiden zuvor beschriebenen und weitere SNPs im ICOS-Gen als prognostische oder diagnostische Marker für atopische Erkrankungen bei Kindern eignen.

1.2 Atopische Erkrankungen

Die Prävalenz atopischer Erkrankungen variiert weltweit sehr stark (57) bei stetigem Anstieg der Erkrankungshäufigkeit in vielen westlichen Ländern (38, 40, 67, 81, 119). In Deutschland wird die Lebenszeitprävalenz von mindestens einer atopischen Erkrankung bei Kindern im Alter von 0–17 Jahren laut dem Kinder- und Jugendgesundheitssurvey von 2003–2006 auf insgesamt 22,9 % geschätzt, dabei betrug der Anteil der atopischen Dermatitis 13,2 %, der allergischen Rhinokonjunktivitis 10,7 % und des allergischen Asthma bronchiale 4,7 % (101).

Die allergische Rhinokonjunktivitis ist eine Immunglobulin (Ig) E-vermittelte Entzündungsreaktion der nasalen Schleimhäute und der Konjunktiven. Saisonal ist sie gekennzeichnet durch Juckreiz, Niesen und verstärkte nasale Schleimproduktion, des Weiteren ist oft eine Konjunktivitis mit Rötung, Fremdkörpergefühl und Tränenfluss vorherrschend. Im weiteren Verlauf tritt insbesondere bei der perennialen Form eine nasale Obstruktion mit erschwerter Nasenatmung auf, die zu Schlafstörungen, Müdigkeit und beeinträchtigter Lebensqualität führt (74).

Das allergische Asthma bronchiale ist gekennzeichnet durch eine reversible Atemwegsobstruktion, unspezifische und spezifische Atemwegshyperreagibilität und chronische Atemwegsentzündung. Pathologisch beruht diese auf einer IgE-vermittelten chronischen Entzündung der Bronchialschleimhaut, insbesondere im Bereich der kleinen Atemwege, mit der Folge von Hyper- und Dyskrinie, Bronchospasmus und Schleimhautödem mit einer erhöhten Empfindlichkeit der Atemwege gegenüber verschiedenartigen endogenen und exogenen Reizen (74).

Die atopische Dermatitis ist eine chronisch-rezidivierende entzündliche Dermatose, die mit Pruritus und gerötetem, schuppendem Ekzem in typischer altersabhängiger Lokalisation einhergeht. Kinder mit atopischer Dermatitis haben ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung weiterer atopischer Erkrankungen wie allergische Rhinokonjunktivitis und allergisches Asthma bronchiale (74).

Die zeitliche Abfolge atopischer Krankheitsmanifestationen sowie der Zusammenhang zwischen allergischer Sensibilisierung und der Entstehung, beziehungsweise Persistenz, von allergischem Asthma bronchiale wurde prospektiv in der Multicenter Allergy Study (MAS) untersucht. Hierbei wurden 1314 Kinder aus der deutschen MAS-Kohorte mit positiver atopischer Familienanamnese über einen Zeitraum von der Geburt bis zum dreizehnten Lebensjahr untersucht (56). So konnte gezeigt werden, dass im natürlichen zeitlichen Verlauf der atopischen Krankheitsmanifestationen die atopische Dermatitis im Säuglingsalter an erster Stelle steht, gefolgt von den Nahrungsmittelallergien, der allergischen Rhinokonjunktivitis und dem allergischen Asthma bronchiale (42). Frühzeitig auftretende spezifische Sensibilisierungen gegen alimentäre und inhalative Allergene zusammen mit einer positiven atopischen Familienanamnese sind Prädiktoren für die Entwicklung weiterer atopischer Erkrankungen (15, 55, 67, 73, 85, 90, 124).

1.3 Die Bedeutung von ICOS bei der allergischen Inflammation

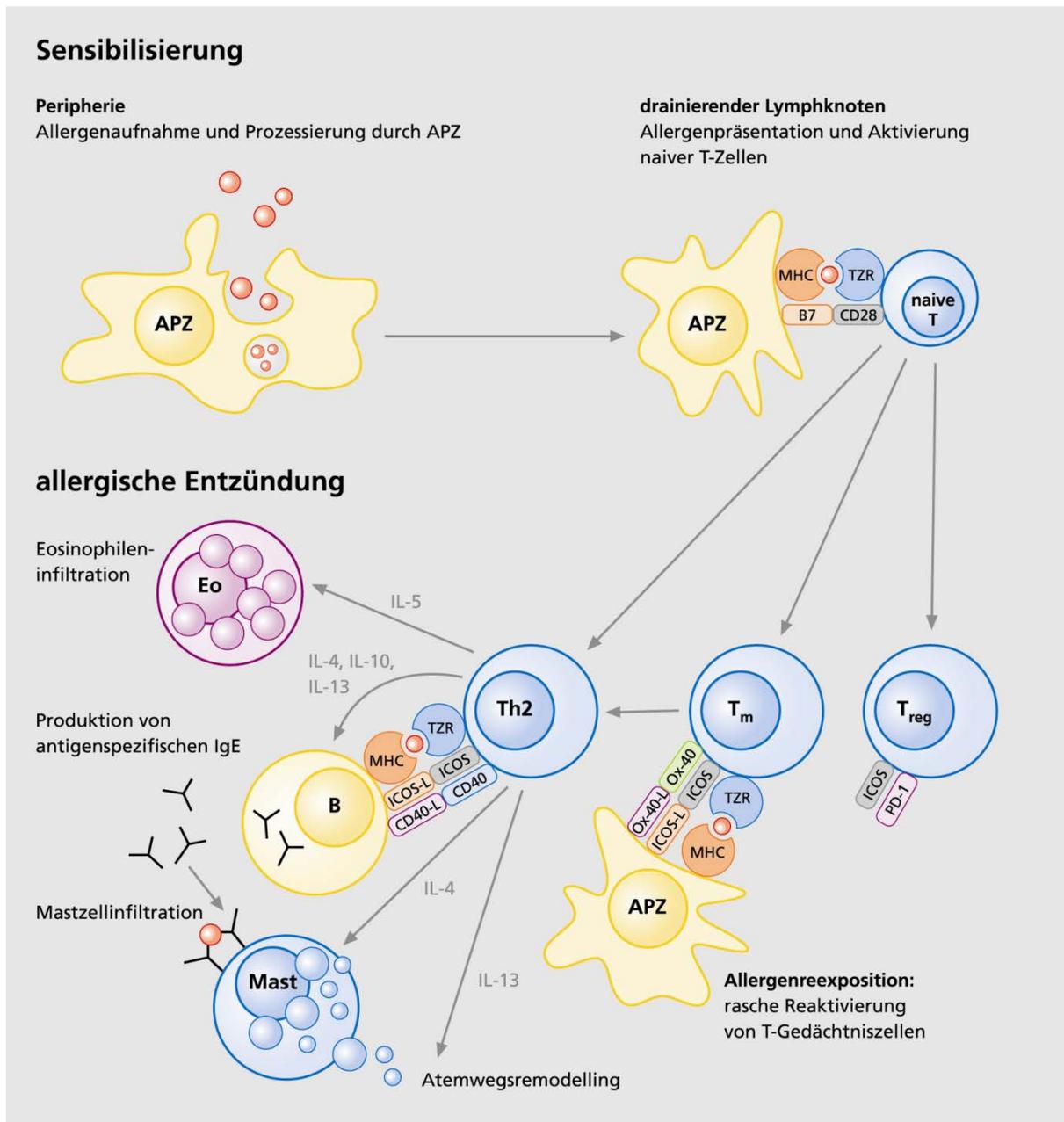
Der allergischen Immunantwort geht eine spezifische Sensibilisierung voraus. Die Sensibilisierung gegen ein Antigen verläuft symptomlos, so dass der Zeitpunkt des Erstkontakts außer unter experimentellen Bedingungen nicht bestimmbar ist. T- und B-Zellen erkennen unabhängig voneinander das betreffende Antigen. Den T-Zellen wird das Allergen durch Antigenpräsentierende Zellen (APZ) präsentiert. Die Präsentation der Allergenepitope an die T-Lymphozyten geschieht durch APZ über den Major Histokompatibility Complex (MHC) der Klasse II (62, 83, Abb.1). Für die vollständige Aktivierung der T-Lymphozyten sind jedoch weitere Signale notwendig, die das T-Zellrezeptor (TZR)-Signal positiv oder negativ verstärken (13, 14, 26, 59, 61):

- Positiv regulatorische Moleküle sind: ICOS, CD28, CD27, CD30, HVEM, OX40, 4-1BB, SLAM.
- Negativ regulatorische Moleküle sind: CTLA4, PD-1, BTLA, TIM-3.

Der Aktivierungsgrad und die Funktion von T-Zellen ist wesentlich vom Einfluss dieser kostimulatorischen Moleküle abhängig.

Aufgrund der zentralen Rolle von T-Zellen für die Initiation und Unterhaltung der allergischen Immunantwort (Abb.1) sind diese regulatorisch wirksamen Moleküle für die Allergieforschung als therapeutische Targets interessant (14, 23, 59, 61, 62, 80). So ist es denkbar, dass Mutationen, die sich auf die Expression oder Funktionsweise kostimulatorischer Moleküle auswirken, den Verlauf allergischer Entzündungen beeinflussen.

Abb.1: Die zentrale Rolle der T-Zellen bei der allergischen Inflammation



Eo ...Eosinophile

T_m ...T-Gedächtniszelle

T_{reg} ...regulatorische T-Zelle

Abbildungsbeschreibung

Die spezifische T-Zelle bringt die B-Zelle dazu spezifisches IgE zu produzieren. Durch ihre Zytokine fördert die aktivierte T-Zelle die Infiltration von Mastzellen und Eosinophilen in die Atemwege.

Zudem ist sie bei lange anhaltender wiederholter Allergenexposition in Folge ihrer freigesetzten Zytokine an einen chronischen Entzündungsprozess in der Lunge beteiligt, der einen irreversiblen Gewebeumbau, das sogenannte Atemwegsremodelling triggern kann.

Wie in der Abbildung 1 dargestellt, haben ICOS positive T-Zellen in Folge der Aufrechterhaltung der Th2-Immunantwort und der Beeinflussung der T-Gedächtniszell-APZ-Interaktion großen Einfluss auf nahezu alle Kaskaden im Zuge der allergischen Früh- und Spätreaktion sowie der chronischen allergischen Entzündung. Es ist nahe liegend, dass die Expression von ICOS auf T-Gedächtniszellen für die rasche Reaktivierung allergenspezifischer T-Gedächtniszellen bei Allergenreexposition verantwortlich ist. Außerdem spielt ICOS eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des B-Gedächtniszellpools (41). Durch den Einfluss von ICOS auf IL-10 produzierende Treg spielt das Molekül zudem eine kritische Rolle in der Immunregulation wie zum Beispiel der Induktion respiratorischer Toleranz mit Begrenzung der allergischen Entzündung (1, 23, 26, 80, 106).

ICOS ist ein positiver Regulator der T-Zell-Aktivierung wie CD28, der jedoch im Gegensatz zu CD28 erst nach Aktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert wird (25, 53, 86, 123).

Mehrere Studien am Mausmodell (12, 25, 35, 39, 79, 86, 112, 113, 118) und auch erste Patientendaten (17, 103) lassen eine Beteiligung von ICOS bei der Entwicklung der allergischen Atemwegsentzündung vermuten.

ICOS-positive Th produzieren vor allem Th2-Effektorzytokine (11, 25, 35, 39, 86, 113). CD4⁺ T-Zellen, die die Atemwege von Patienten mit allergischem Asthma bronchiale infiltrieren, produzieren vorzugsweise Th2-Zytokine IL (Interleukin)-4, IL-5 und IL-13 (62, 83, 97). Diese Th2-Zytokine rekrutieren und aktivieren weitere Effektorzellen wie zum Beispiel Mastzellen, B-Zellen und Eosinophile in die Atemwege und triggern den Prozess der allergischen Früh- und Spätreaktion (62, 83, 97, 119). Nach der Sensibilisierung kommt es zur Bildung von allergenspezifischem IgE durch die B-Zellen, das an IgE-Rezeptoren von Mastzellen bindet (83, 97). Hierfür benötigen antigenspezifische B-Zellen die Hilfe von antigenspezifischen T-Zellen (97). ICOS knock-out Mäuse produzieren nur wenig IgG1, IgG2 und kein IgE (35, 86, 112). Auch ICOS-defiziente Patienten produzieren kein IgE und haben einen deutlich reduzierten B-Gedächtniszellpool (41).

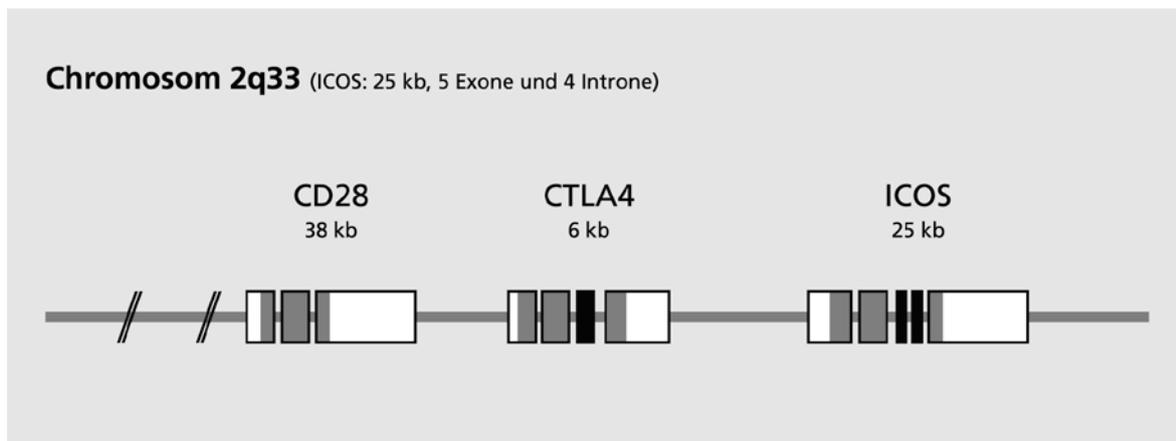
Außerdem sind ICOS-positive T-Zellen für die allergeninduzierte lokale B-Zellinfiltration und antigenspezifische IgE-Produktion im Lungengewebe erforderlich (12). Als ein früher und später T-Zell-Aktivierungsmarker vorkommend auf nahezu allen T-Effektorzellen und langlebigen T-Gedächtniszellen (11, 12, 23, 26, 53, 61, 79, 80, 104, 106) scheint das ICOS-Molekül früh und langandauernd die Richtung der allergischen Immunreaktion zu steuern. Bei Erwachsenen einer

Hutterer-Population wurden zwei SNPs im ICOS-Gen beschrieben, die mit verstärkter Th2-Zytokinbildung und erhöhtem Serum-Gesamt-IgE assoziiert waren (103).

1.4 Polymorphismen im ICOS-Gen

Die Gene von ICOS und CD28 sowie CTLA4 sind gekoppelt auf dem Chromosomen 2q33 lokalisiert (77), einer Region, die in mehreren genomweiten Suchen mit allergischen Phänotypen assoziiert war (17, 27, 43, 52, 89, 122).

Abb. 2: Lokalisation von ICOS auf dem Chromosom 2q33



Das für ICOS kodierende Gen umspannt mehr als 20 (Kilobasen) kb und wird in fünf Exons und vier Introns unterteilt (54). Im ICOS-Gen gibt es eine Vielzahl von Polymorphismen. Bisher wurde nur ein Polymorphismus in der kodierenden Region des ICOS-Gens beschrieben, während mehrere SNPs in der Promotorregion und den Intronregionen liegen (41, 44, 46, 54, 103). In der Promotorregion, etwa 3.500 Basenpaare aufwärts des ICOS-Gens, gibt es verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, jedoch ist keine TATA- oder CCAAT-Box oder ein anderes Initiatorelement vorhanden (44). Dies legt nahe, dass die Expression von ICOS durch Transkriptionsfaktoren reguliert wird und dass sich SNPs an diesen Positionen möglicherweise auf die ICOS-Expression auswirken.

Shilling et al. berichteten über zwei im Kopplungsungleichgewicht stehende SNPs in der ICOS-Promotorregion, g.1-1413 G>A und g.1-693 G>A, die mit einer Sensibilisierung gegen Aeroallergene, erhöhter Th2-Zytokinproduktion von IL-4, IL-5, IL-13 und erhöhter Gesamt-IgE-Produktion in einer Hutterer-Population assoziiert waren. Der ICOS-Polymorphismus g.1-1413 G>A war an einer funktionellen Nuclear factor kappa B (NFkappaB)-Bindungsstelle lokalisiert (103). In vorliegender Arbeit soll nun untersucht werden, ob diese bei erwachsenen Hutterern gefundene Assoziation auch bei europäischen Kindern eine Rolle spielt.

Des Weiteren sollen andere zuvor beschriebene SNPs (44), die an putativen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren lokalisiert sind, auf eine Assoziation mit atopischen Erkrankungen evaluiert werden. Zwei dieser SNPs sind in der Promotorregion von ICOS lokalisiert. Bei einem handelt es sich ebenfalls um eine Bindungsstelle für NFkappaB, g.1-2144 C>T (rs11889031), bei dem anderen um eine putative Bindungsstelle für Sp1, g.1-2419 T>C. Zwei weitere SNPs sind lokalisiert an putativen regulatorischen Stellen von Intron 3 und 4, g.20065 C>G (IVS3 + 126) und g.22126 G>T (IVS4-620). Als putativ gelten diese Bindungsstellen infolge ihrer Sequenz entsprechend einer NFkappaB-beziehungsweise Sp1-Bindungsstelle, anders als die bereits funktionell nachgewiesene NFkappaB-Bindungsstelle des ICOS-SNPs g.1-1413 G>A. Transkriptionsfaktoren sind Proteine die Promotorregionen der Gene binden und aktivieren. NFkappaB ist ein Transkriptionsaktivator für die Regulation vieler Immunantworten (9). Bei dem Transkriptionsfaktor Sp1 handelt es sich um ein DNS-Bindungsprotein, welches für die Genregulation speziell der selektiven Transkriptionsaktivierung der Promotorregion verantwortlich ist (60).

Tabelle 1: Untersuchte Polymorphismen im ICOS-Gen

Position	SNP	SNP-Referenznummer	Bereits untersuchte Assoziationen mit Atopie beim Menschen
Promotor	g.1-1413 G > A	rs11883722	103
Promotor	g.1-693 G > A		103
NFkappaB	g.1-2144 C > T	rs11889031	
Sp1	g.1-2419 T > C		
Intron3	g.20065 C > G	IVS3+126	
Intron4	g.22126 G > T	IVS4-620	

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur beginnt mit der Nukleotidnummer, gefolgt von dem Nukleotidaustausch (5).

1.5 Kohorten

MAS-Kohorte

Für die prospektive, multizentrische, longitudinale Geburtskohortenstudie MAS wurden 1.314 von 7.609 Neugeborenen aus den fünf deutschen Städten Berlin, Düsseldorf, Freiburg, Mainz, München während des Jahres 1990 rekrutiert. Unter diesen gab es 499 potentielle Hochrisikokinder mit einem Nabelschnur-IgE-Spiegel von $\geq 0,9$ kU/l und/oder mehr als zwei atopischen Familienangehörigen sowie 815 randomisierte selektierte Kontrollen (55, 72). Mehr als 800 Kinder wurden von der Geburt bis zum 13. Lebensjahr untersucht. Alle Kinder der Kohorte wurden im Alter von 1, 3, 6, 12, 18 und 24 Monaten sowie im weiteren Verlauf jährlich zu Nachuntersuchungen einbestellt.

Für die vorliegende Arbeit wird Desoxyribonukleinsäure (DNS) von mehr als 820 Kindern dieser Studie genutzt.

ETAC-Kohorte

Als zweite Kohorte wurde die Early Treatment of the Allergic Child Study (ETAC) für die vorliegende Arbeit hinzugezogen, um die in der MAS-Kohorte bei einigen wenigen Kindern gefundene Assoziation der SNPs mit einer Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen zu verifizieren, da in der ETAC-Kohorte gehäuft Kinder mit Frühsensibilisierung gegen Aeroallergene zu finden waren.

Von dieser Studie stand die DNS von mehr als 460 Kindern mit atopischer Dermatitis in den ersten zwei Lebensjahren für vorliegende Arbeit zur Verfügung.

Dies ergibt eine Zahl von über tausend Kindern aus zwei Kohorten an denen untersucht werden soll, ob sich Mutationen im ICOS-Gen als prädiktive Marker für Atopiedisposition eignen.

2 Fragestellung

Anhand von zwei großen europäischen pädiatrischen Kohorten, der MAS- und ETAC-Kohorte, soll untersucht werden, ob sich die zwei zuvor in einer Hutterer-Population beschriebenen und vier weitere SNPs im ICOS-Gen als prädiktive Marker für atopische Erkrankungen bei europäischen Kindern eignen. Zur Genotypisierung der Population bezüglich der ICOS-Polymorphismen wurde eine Schmelzkurvenanalyse mit dem LightCycler® durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.1 Studienpopulationen

Für die Fragestellung dieser Arbeit standen DNS-Proben und Daten von mehr als 820 MAS-Kindern bis zum 13. Lebensjahr zur Verfügung.

Gesamt- und spezifische IgE-Antikörper gegen herkömmliche Nahrungsmittel- und Inhalationsallergene (Kuhmilch, Hühnerei, Soja, Weizen, Gräser, Birke, Hunde- und Katzenhaare, Hausstaubmilben) wurden im Alter von 1, 2, 3, 5, 6, 7 und 10 Jahren mittels CAP-Radioallergosorbent (RAST)-Test FEIA (Pharmacia & Uppjohn, Freiburg, Deutschland) analysiert (55).

Lungenfunktionsuntersuchungen wurden im Alter von sieben, zehn und dreizehn Jahren bei 800, 638 und 680 Kindern mit dem Ganzkörperplethysmographen (Master-Lab, E Jaeger, Würzburg, Deutschland) durchgeführt. Histaminprovokationen wurden bei 647 Kindern im Alter von sieben Jahren durchgeführt. Die bronchiale Hyperreagibilität wurde basierend auf der 90. Perzentile einer gesunden Kontrollgruppe definiert nach dem Überschreiten einer Histaminkonzentration von 0,85 mg/ml, die einen 20 % Abfall des forcierten expiratorischen Volumens in 1 s (FEV1) bewirkte (56, 72, 91).

Folgende Phänotypen wurden für die MAS-Kohorte definiert:

Eine allergische Sensibilisierung lag bei einem spezifischen IgE-Antikörper $\geq 0,35$ kU/l gegen mindestens eines der neun Nahrungsmittel- und Aeroallergene vor. Es wurden zum Beispiel Kinder mit mindestens einer spezifischen Sensibilisierung der CAP-Klasse 1 jeweils im Alter von 7 und 10 Jahren mit den Kontrollen verglichen sowie den Kindern ohne Sensibilisierung gegenübergestellt. Das CAP-System ist international definiert und dient als Immunoassay zur Quantifizierung der IgE-Werte (Tabelle 2a).

Als hohes Gesamt-IgE wurden Werte > 85 . Kohortenperzentile zu mindestens zwei Zeitpunkten definiert. In der MAS-Kohorte konnten bevölkerungsbezogene Werte abgeleitet werden und altersbezogene Perzentilen für Kinder hinsichtlich der Gesamt-IgE-Werte im Serum erstellt werden (Tabelle 2b).

Tabelle 2a: Quantifizierung der CAP-Klassen (3)

Klassen	CAP kU/l
0	<0,35
I	0,35-0,69
II	0,70-3,49
III	3,50-17,49
IV	17,50-52,49
V	52,50-99,99
VI	>100

Tabelle 2b: Perzentilen für Gesamt-IgE-Werte (94)

Gesamt-Serum-IgE (kU/l)					
Perzentilen	1 Jahr	2 Jahre	3 Jahre	5 Jahre	6 Jahre
25. P	2	5	8	14	16
50. P	5	15	20	34	42
75. P	13	40	58	85	95
85. P	26	75	111	150	170
90. P	40	107	155	212	259
95. P	78	226	261	372	428

Die atopische Dermatitis wurde definiert als eine Kombination aus trockener Haut und mindestens drei von neun klassischen Merkmalen (Juckreiz, Erythem, rote Papeln, Blasen, Rhagaden, Exkoriationen, Schuppen, Lichenifikation, perifollikuläre Akzentuierung) an mindestens drei Hautarealen. Es wurden Kinder mit atopischer Dermatitis bis zu einem Alter von 2 Jahren und bis zu einem Alter von 7 Jahren jeweils den Kontrollen sowie den Kindern ohne atopische Dermatitis in diesem Alter gegenübergestellt. Desweiteren wurde im Zuge der „International Study on Asthma and Atopy in Childhood“ (ISAAC)-Definition die atopische Dermatitis jeweils im Alter von 7 und 10 Jahren mit den Kindern ohne atopische Dermatitis in den jeweiligen Altersgruppen verglichen.

Die folgenden sieben Fragen gehörten zu dem Kernfragebogen für Eltern von 6-7 jährigen Kindern zu atopischem Ekzem im Zuge der ISAAC (117):

1. Hatte Ihr Kind irgendwann einmal einen juckenden Hautausschlag, der stärker oder schwächer über mindestens 6 Monate auftrat?
2. Trat dieser juckende Hautauschlag bei Ihrem Kind auch in den letzten 12 Monaten auf?
3. Trat dieser juckende Hautausschlag irgendwann einmal an einer der folgenden Körperstellen auf:
In den Ellenbeugen oder Kniekehlen, an den Hand- oder Fußgelenken, im Gesicht, am Hals?
4. In welchem Alter trat bei Ihrem Kind dieser juckende Hautausschlag zum ersten Mal auf (vor dem 2. Lebensjahr, im 2.-4. Lebensjahr, nach dem 4. Lebensjahr) ?
5. Ist dieser juckende Hautausschlag bei Ihrem Kind in den letzten 12 Monaten jemals vollständig verschwunden?
6. Wie oft ist Ihr Kind im Durchschnitt in den letzten 12 Monaten wegen dieses juckenden Hautausschlages nachts aufgewacht (nie in den letzten 12 Monaten, weniger als eine Nacht pro Woche, eine Nacht und mehr pro Woche) ?
7. Hatte Ihr Kind irgendwann einmal Neurodermitits (Atopisches Ekzem, Endogenes Ekzem) ?

Die allergische Rhinitis wurde anhand der Symptome Niesen, laufende Nase ohne eine Erkältung, behinderte Nasenatmung, nasalere Juckreiz definiert, welche zwölf Monate vor dem siebenten Lebensjahr auftraten bei zusätzlichem Nachweis von spezifischen IgE-Antikörpern $\geq 0,7$ kU/l gegen Gräser und/oder Birkenpollen. Kinder mit allergischer Rhinitis und Pollensensibilisierung wurden jeweils im Alter von 7 und 10 Jahren untersucht und den Kontrollen sowie den Kindern ohne Heuschnupfensymptome gegenübergestellt.

Gegenwärtiges Asthma bronchiale wurde als Arzt diagnose Asthma und eine oder mehr Episoden von Giemen in den vorangegangenen zwölf Monaten im Alter von 7 Jahren definiert. Kinder mit Asthma bronchiale wurden jeweils im Alter von 7 und 10 Jahren mit den Kontrollen verglichen. Desweiteren wurden Kinder mit Asthma bronchiale insgesamt im Alter von 7 und 10 Jahren mit den Kindern ohne Asthma-Symptome jeweils im Alter von 7 und 10 Jahren verglichen.

Die Definition der Kontrollen basierte auf einer fehlenden Sensibilisierung im Alter von sieben und zehn Jahren. Ebenso durfte weder Giemen im Alter von zehn Jahren, eine laufende Nase ohne eine Erkältung im Alter von zehn Jahre noch eine gegenwärtige atopische Dermatitis im Alter von sieben Jahren bestehen.

Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt. Die Eltern gaben ihr Einverständnis.

Die ETAC-Studie untersuchte randomisiert, doppelblind-placebokontrolliert den Effekt einer Cetirizin-Behandlung zur primären Asthmaprvention. Das Antihistaminikum Cetirizin senkte das Asthmarisiko in der Gruppe der mit Gräserpollen und Hausstaubmilben sensibilisierten Kinder (37, 116). Dabei erreichten 795 der 830 gescreenten Kinder mit früher atopischer Dermatitis in den ersten zwei Lebensjahren aus zwölf europäischen Ländern und Kanada die Intention-To-Treat-Population (33, 116). Die Cetirizingruppe nahm zwei Mal täglich Cetirizin 0,25 mg/kg ein, in der Kontrollgruppe erhielten 40 % der Probanden im Alter von 12–24 Monaten für 18 Monate ein Placebo.

Zu den Einschlusskriterien gehörte das Vorliegen einer bereits manifesten atopischen Dermatitis seit mindestens einem Monat sowie eine positive Familienanamnese für allergische Erkrankungen. Zu den Ausschlusskriterien gehörten Asthmasymptome wie giemende Episoden, persistierend nächtlicher Husten oder andere schwere Erkrankungen.

Die Diagnose atopische Dermatitis basierte auf standardisierten Kriterien wie typische ekzematöse oder lichenifizierte Dermatitis mit Juckreiz im Gesicht, in den Beugen oder an beiden Arealen. Der Schweregrad der atopischen Dermatitis wurde mittels SCORAD-Scores bewertet.

Als primärer Endpunkt galt Asthma bronchiale, definiert als drei von mindestens sieben Tagen getrennten Episoden von erstens nächtlichem Husten in mindestens drei aufeinander folgenden Nächten mit Schlafstörung; zweitens drei giemenden Episoden oder eine Kombination der beiden Symptome (116).

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den sogenannten „EC guidelines on Good Clinical Practice and Declaration of Helsinki“ geleitet (33).

Klinische Untersuchungen fanden bei Einschluß in die Studie statt sowie nach einem und drei Monaten und anschließend alle drei Monate während des 18-monatigen Behandlungszeitraums, danach halbjährig für weitere 18 Monate (33, 116).

Blutproben wurden 0, 3, 12, 18, 24 und 36 Monate nach der Therapie gesammelt.

Gesamt- und spezifische IgE- Antikörper gegen Hühnerei, Kuhmilch, Hausstaub, Gräser und Katzenhaare wurden mittels CAP-Systems (Pharmacia, Uppsala, Sweden) gemessen. Spezifische IgE-Spiegel von 0,35 kU/l und mehr wurden als erhöht betrachtet.

Von der ETAC-Kohorte standen DNS-Proben von mehr als 460 Kindern zur Bearbeitung der Fragestellung dieser Arbeit zur Verfügung.

3.2 Material

Tabelle 3: Geräteliste

Gerätename	Herkunft
LightCycler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PCR-Geräte	
Tpersonal	Biometra GmbH, Göttingen
T3 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
Pipetten	
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Multichannel Finnpipette	Thermo Labsystems, Egelsbach
Transferpipette	Sarstedt AG &Co, Nümbrecht
Vortexer	
Minishaker MS1	IKA-Works Inc., Wilmington, NC. USA
Zentrifugen	
LC-Carousel-Centrifuge, Kapillazentrifuge	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Zentrifuge 5417C	Eppendorf AG, Hamburg

Tabelle 4: Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien und Chemikalien	Herkunft
PCR Öl	Bayol F, Serva, Heidelberg
Steriles Wasser	Braun, Melsungen
Enzyme und Puffer	
PCR-Puffer mit MgCl ₂	Applied Biosystems, Roche, Mannheim
Taq DNS Polymerase (AmpliTaq Gold)	Applied Biosystems, Roche, Mannheim
GeneAmp dNTPs	Applied Biosystems, Roche, Mannheim
Primer und Sonden	
Primer	TIBMOLBIOL, Berlin
Sonden	TIBMOLBIOL, Berlin

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Herkunft
LightCycler Kapillaren	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mikrotiterplatte, 96-well	Nunc, Dänemark
Falconröhrchen	Becton Dickinson, Labware, Meylan Cedex, Frankreich
Microcentrifuge Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
PCR Tubes ultradünn	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf (Hessen)
Pipettenspitzen	
Eurotips	Eppendorf AG, Hamburg
Combitips plus	Eppendorf AG, Hamburg
Finntips	Helsinki, Finnland
EDTA-Röhrchen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

3.3 Methoden

Die Genotypisierung erfolgte durch Schmelzkurvenanalyse mit dem LightCycler. Untersucht wurden die folgenden SNPs in der ICOS-Genregion: g.1-1413 G > A und g.1-693 G > A (103) sowie g.1-2144 C > T, g.1-2419 T > C, g.20065 C > G und g.22126 G > T (44).

Die verwendete Nomenklatur entspricht der der Nomenclature Working Group (5).

3.3.1 Extraktion der Desoxyribonukleinsäure

Von den Probanden der MAS- und ETAC-Kohorte wurde Vollblut in EDTA-Röhrchen abgenommen. Die DNS lag für vorliegende Arbeit bereits extrahiert vor. Als DNS-Aufreinigungskit wurde bei den MAS-Kindern der QIAamp DNS Mini Kit und bei den ETAC-Kindern der QIAamp DNS Midi Kit (Quiagen GmbH, Hilden) verwendet. Danach wurde die DNS durch ihre Ladung an eine Anionenaustauschmembran pH-abhängig gebunden und von anderen Blutbestandteilen gereinigt. Anschließend wurde die DNS-Konzentration photometrisch bestimmt. Nach einheitlicher Verdünnung der DNS-Proben auf 20 ng/µl wurden die so gewonnenen Proben in Pellets eingefroren.

3.3.2 Polymerasekettenreaktion

Die DNS wurde durch Polymerasekettenreaktion (PCR) enzymatisch vervielfältigt. Jeweils 2,5 µl DNS wurden mit einer Multipipette in die 96-well-Platte überführt. Die Pufferplatte enthielt in einem Gesamtvolumen von 25 µl neben der DNS 16,9 µl Aqua dest., 10 x 2,5 µl Reaktionspuffer, 1,5 µl MgCl₂ 25mM, 1,0 µl dNTPs, 0,25 µl Primer F, 0,25 µl Primer R, 0,1 µl AmpliTaq Gold Polymerase 5 U/µl. Anschließend wurde das Puffersystem mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

Die PCR wurde unter den folgenden Temperaturbedingungen auf einem Biometra T3-Thermocycler durchgeführt:

- Die initiale Denaturierung erfolgte bei 95°C für 12 min.
- Die Denaturierung erfolgte mit 40 Zyklen bei 95°C für je 20 s.
- Die Anlagerung erfolgte bei der entsprechenden spezifischen Temperatur für 40 s (Tabelle 6).
- Die Elongation erfolgte bei 72°C für 90 s. Die Finalelongation erfolgte bei 72°C für 2 min.

Temperaturabhängig wurde die DNS wiederholt denaturiert und mit Hilfe der sich anlagernden Primer entlang der DNS-Matrize verlängert.

3.3.2.1 Die Primer wurden von TIBMOLBIOL mit den in der Tabelle 6 aufgelisteten Nukleotidsequenzen hergestellt.

Tabelle 6: Primer für die PCR

Region von Interesse	Primer	Schmelztemperatur
ICOS-Promotor (g.1-693 G>A, g.1-1413 G>A)	forward: 5'-GGAACCAGGGATTCTCACC-3'	60°C
	reverse: 5'-CTGAGACCCAGGAGCCC-3'	
ICOS-Promotor (g.1-2144 C>T, g.1-2419 T>C)	forward: 5'-GCACTTCCTGTGAGGTGAATGG-3'	56°C
	reverse: 5'-CCAGACAGTGAACTCTGGATTCC-3'	
ICOS-Intron 3 (g.20065 C>G)	forward: 5'-TGCCCACTTACTGGATTCATGAC-3'	56°C
	reverse: 5'-GTA ACTCTCTGTAAGCCATCAAGTC-3'	
ICOS-Intron 4 (g.22126 G>T)	forward: 5'-CCACCCCTCAGTGGCTACAG-3'	52°C
	reverse: 5'-CATCTGTACTTCTCAGAGGTCC-3'	

3.3.3 Genotypisierung durch Schmelzkurvenanalyse

Nach der PCR-Amplifikation wurde dem PCR-Produkt ein Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Sondenpaar zugefügt und unter Verwendung des LightCyclers (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) analysiert. Die SNPs des entsprechenden Gens wurden mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse im LightCycler 480 (Roche Diagnostics) nachgewiesen.

Zu 4 µl PCR-Produkt wurden 1,5 µl Sondenansatz hinzupipettiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation in den Kapillaren für 30 Sekunden bei 3000rpm.

Tabelle 7 zeigt die verwendeten Sonden. Die Proben wurden von Olfert Landt (TIBMOLBIOL, Berlin) hergestellt.

Tabelle 7: Sonden zur Schmelzkurvenanalyse

SNP	Anchor	Sensor
g.1-693 G>A	LC640-GCAGGCTTTTAAACATTCTTGGTCTC-ph	GCAGGGATAGGGAGACCAC-FL
g.1-1413 G>A	LC705-CCCTGCAGGATCAGCCTCCTC-ph	AGCTTCAGCAGCTAGGAGG-FL
g.1-2144 C>T	GGTCTCCTATTTTCATGGTGGGAAGGATACT-FL	LC640-AGGTCCTAGAAG AAATTCCAAGATAAT-ph
g.1-2419 T>C	TTTTATGTCAAAGTCCTGTTTCAATGATCC-FL	LC640- TCCCATGCCTCACCTTCTCA-ph
g.20065 C>G	GTAATTTGACCAACAGGGAGACAATTCC-FL	LC640- TCCCCCAAGACATACCTAC-ph
g.22126 G>T	LC640-CCCCTTCTCCTGGGATCACCTCC-ph	TCACTCTCCCTGCCCCCTC-FL

Die Donorproben waren komplementär zur Mutante oder zur Wildtypsequenz (Abb. 3).

Abb. 3: Nukleotidsequenzen der Primer und Sonden der untersuchten ICOS-Polymorphismen

Auszug aus dem ICOS-Gen auf Chromosomen 2q33-34

36181 ctcaccccag gcgtctgcat acacaaatca aaaccatctt aagtcattgga atgaaaaaaaa

PR-FA attaaaagca aactaaaagc acttcctgtg aggtgaatgg aaatTTTTGC ccagTTAATT

PR-F ttccaggcac gtgaaagcag ttctgaaatat tttaaaccac aagtacttgt attcttgacc

g.1-2419 T>C (Sp1)

36361 aagatttttg a**gaaggTgag gcatggga**ag gatcattgaa acaggacttt gacataaaac

36541 gaactaaagc tgaatttaac cataacttgt gcaacttttc tccccttgag gtaaacatta

g.1-2144 C>T (NFkappaB)

36601 ccctccaatt gaccaggcat ctttttttga ttcaaa**ttat cttggaattt cct**ctaggac

PR-R tagccaaata aat**gaggata agtgtgtgag tgtggtgggt** agttaagagt tt**ggaaatcca**

PR-RA **gagtttcact gtctgga**att gaacaggctc cgttgctcat cagctctgtg actccgggca

g.1-1413 G>A (NFkappaB)

37321 caccactgc tgagaccag gagccctaca **gaaggtagct aggggaagct** tcagcagcta

37981 ttttacattt tgcattaaga tatattattt catataaaac atttaagtac atatacatat

g.1-693 G>A

38041 aattatctat gtaattatta **ttgttattgt tgttattgtc tactttacct** ccctgcaggg

1261 tcaaagtac acatggctct tgtcagagta atttgaccaa caggagaca attccttccc

g.20065 C>G

1321 cccaagacat acctactaat taaactaatc acttgaaca gaaattatg tatttgTTTT

3301 ctggctgttt ggatccccac aagcagaacc tgacataagg acttgggtgc aagtagTTTA

g.22126 G>T

3361 tttgggaggT gatcccagga agaaggggtg **agggggcagg gagagtgaga** cagccaacaa

R 3421 ggagaagcaa atgaagggcg cattattatc a**aggtctcag ctccaggcca** cagaggcctg

5761 tgtttgcagg tttctgtgtg tggg//

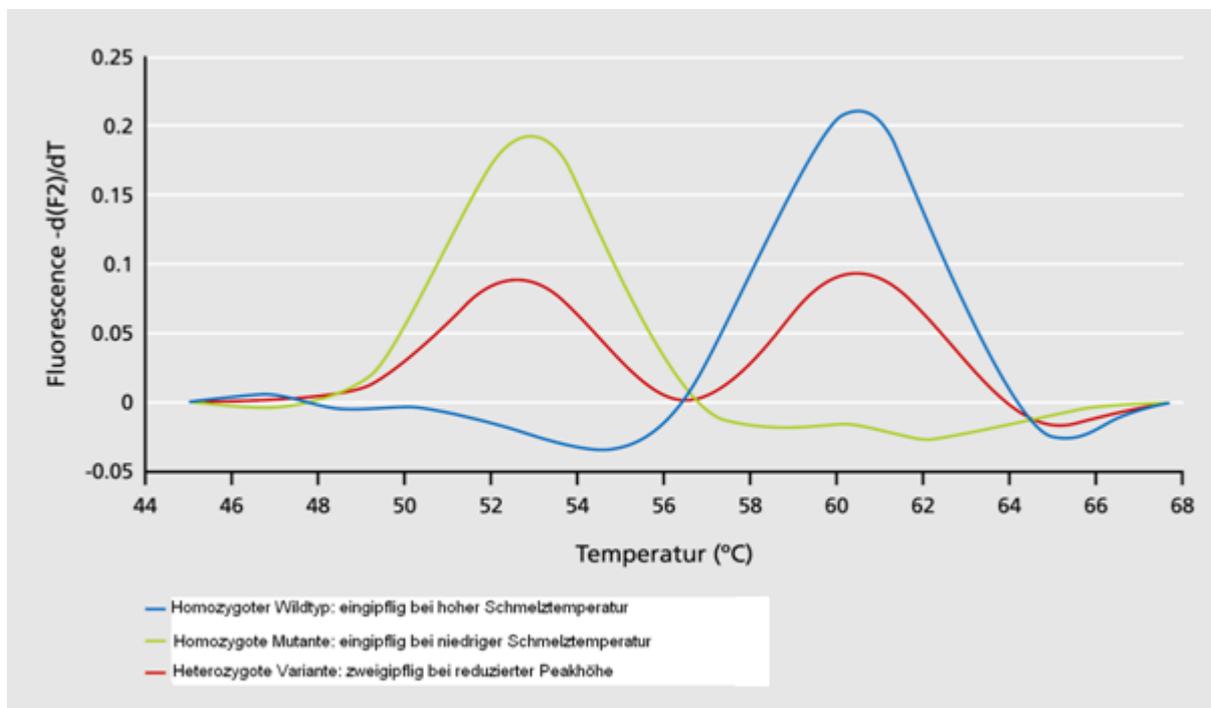
Im LightCycler werden die Proben von einer Hochleistungsleuchtdiode angeregt. Diese emittiert blaues Licht und hat nach Passage eines Filters und Kollimators eine Wellenlänge von 470 nm. Nach dem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C wird das Reaktionsgemisch durch das Thermometerelement von 95°C auf 45°C abgekühlt. Dann wird die Temperatur schrittweise erhöht und parallel die Fluoreszenz gemessen.

Danach wird eine Schmelzkurve erstellt. Das 3-Kanal-Fluorimeter kann gleichzeitig Licht der Wellenlänge 530 nm, 640 nm und 720 nm von drei unabhängigen Photoelementen detektieren.

Anhand der Schmelzwerte und des Kurvenverlaufs kann die Genotypisierung erfolgen (Abb. 4).

Abb. 4: Genotypisierung der SNPs durch Schmelzkurvenanalyse

Ist die Sonde komplementär zum Wildtyp, liegt eine Mutation vor, wenn der Schmelzpunkt niedriger ist.



3.4 Statistische Methoden

Die Berechnung der Allelfrequenzen für die einzelnen SNPs wurde wie folgt vorgenommen:

$$\frac{2x \text{ Anzahl der Polymorphismen} + 1x \text{ Anzahl der Heterozygoten}}{2x \text{ Anzahl aller Genotypisierten}}$$

Die Abweichungen der Genotypverteilungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurden mit dem Chi-Quadrat-Test bestimmt.

Zur Berechnung des Kopplungsungleichgewichts, Linkage Disequilibriums (LD), wurde als Maß der LD der LD-Koeffizient R^2 gewählt (32):

$$R^2 = \frac{(P_{12} - p_1 p_2)}{p_1 p_2 q_1 q_2}$$

R^2 misst die Differenz des beobachteten und erwarteten gemeinsamen Auftretens zweier Allele. A steht für Locus A, B steht für Locus B. Die Berechnung der Frequenzen p und q ergeben sich aus den Frequenzen des jeweiligen Allels von A und B.

Haplotypfrequenz

A1B1 P11

A1B2 P12

A2B1 P21

A2B2 P22

Allelfrequenz

$p_1 = P_{11} + P_{12}$

$p_2 = P_{21} + P_{22}$

$q_1 = P_{11} + P_{21}$

$q_2 = P_{12} + P_{22}$

	B1	B2	Summe
A1	P11	P12	p_1
A2	P21	P22	p_2
Summe	q_1	q_2	1

Je näher der LD-Koeffizient an 1 ist, desto höher ist das LD. Ein Wert von 1 bedeutet komplettes LD und Abhängigkeit zwischen SNPs, ein Wert von 0 bedeutet Abwesenheit von LD und Unabhängigkeit der SNPs. Ein Grund für ein hohes Kopplungsungleichgewicht zwischen SNPs kann dessen gekoppelte Vererbung sein (32).

In den beiden untersuchten Studienkohorten wurde zum Vergleich der Prävalenzen zwischen den Gruppen der Chi-Quadrat-Test angewendet.

Das dominante Modell wurde angewendet, um Probanden bei denen homozygot der Polymorphismus oder Heterozygotie vorlag mit dem Wildtyp zu vergleichen. Das rezessive Modell wurde angewendet, um homozygote Polymorphismusträger dem Wildtyp oder Heterozygoten gegenüberzustellen.

Der Exakte Fisher-Test wurde bei kleinen Fallzahlen eingesetzt, sowie der Mantel-Haenszel-Test (MH) für Trends.

Die Anwendung des nonparametrischen Wilcoxon-Tests erfolgte zum Vergleich kontinuierlicher Variablen zwischen zwei Gruppen, zur Überprüfung, dass die Grundgesamtheit für kleine Stichprobenumfänge symmetrisch zu 0 verteilt ist.

Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurde verglichen, ob sich verschiedene Gruppen hinsichtlich des Mittelwertes unterscheiden.

Unterschiede wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn $p < 0,05$ war.

Die Daten wurden mit der LightCycler Software (Version 3.5), dem statistischen Programm SAS sowie Microsoft Excel analysiert.

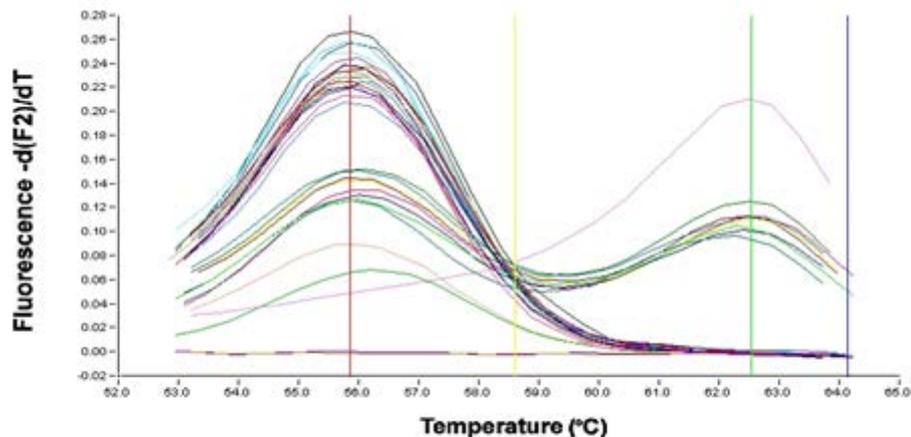
4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der risikotragenden ICOS-SNPs g.1-693 G>A und g.1-1413 G>A der Hutterer-Population bei europäischen Kindern

Für die beiden Polymorphismen im ICOS-Gen, g.1-693 G>A und g.1-1413 G>A, wurde bei Erwachsenen einer Hutterer-Population eine Assoziation mit atopischen Phänotypen gezeigt (103). Um diese Polymorphismen bei europäischen Kindern in der MAS- und ETAC-Kohorte auf Assoziationen mit atopischen Phänotypen zu untersuchen, erfolgte die Genotypisierung der Kohorten bezüglich dieser SNPs per LightCycler. Die Schmelzkurven sind auszugsweise für den SNP g.1-693 G>A für einige Probanden der MAS- Kohorte dargestellt (Abb. 5).

Die Sonden waren für den Polymorphismus spezifisch. In Folge liegt der Schmelzpunkt für den homozygoten Wildtyp (GG) bei 55,8°C und der Schmelzpunkt für den homozygoten Polymorphismus liegt bei 62,5°C.

Abb. 5: Repräsentative Schmelzkurven des g.1-693 G > A-Polymorphismus in der MAS-Kohorte.



4.1.1 Allelfrequenzen und Genotypverteilungen der SNPs g.1-693 G>A und g.1-1413 G>A in den Kohorten

In Tabelle 8 sind die Allelfrequenzen der ICOS-SNPs g.1-1413 G>A und g.1-693 G>A in der MAS- und ETAC-Kohorte dargestellt.

Tabelle 8: Allelfrequenzen der ausgewählten ICOS-Varianten in der MAS- und ETAC-Kohorte

Position	Regulatorisches Element	MAS-Kohorte		ETAC-Kohorte	
		G	A	G	A
g.1-693 G>A	unbekannt	0,78	0,22	0,82	0,18
g.1-1413 G>A	funktionelle NFkappaB-Bindungsstelle	0,78	0,22	0,82	0,18

Die Allelfrequenzen unterschieden sich kaum in den beiden Kohorten (Tabelle 8).

In Tabelle 9 ist die Kopplungsungleichgewichts-Analyse für die MAS- und ETAC-Kohorte dargestellt.

Tabelle 9: R² als Maß des Kopplungsungleichgewichts in den Kohorten

Polymorphismenpaare	Kohorten	R ²
g.1-693 G>A versus g.1-1413 G>A	MAS-Kohorte	0,999993599
	ETAC-Kohorte	0,999982178

Der Wert des LD-Koeffizienten R² ist gleich 1 (Tabelle 9). Das weist auf eine starke Abhängigkeit und ein hohes Kopplungsungleichgewicht zwischen den beiden SNPs hin. Wie schon in der Hutterer-Population beschrieben (103), standen auch in vorliegender Untersuchung die beiden ICOS-Varianten g.1-1413 G>A und g.1-693 G>A im Kopplungsungleichgewicht, die Ergebnisse waren identisch. Daher werden im Folgenden nur noch die Daten für den SNP g.1-693 G>A gezeigt.

Die Genotypverteilung des untersuchten ICOS-SNPs g.1-693 G>A ist in der Tabelle 10 in der MAS- und ETAC-Kohorte dargestellt. Um die Ergebnisse hinsichtlich einer idealen Population zu überprüfen, wurden die Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mittels Chi-Quadrat-Test berechnet.

Tabelle 10: Genotypverteilung des SNPs g.1-693 G>A bei Kindern der MAS- und ETAC-Kohorte mit Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

ICOS-SNP g.1-693 G>A	MAS-Kohorte	ETAC-Kohorte
Gesamtzahl	n=861	n=478
Wildtyp (GG)	61%	65%
Heterozygote (GA)	35%	30%
Polymorphismus (AA)	4%	5%
Hardy-Weinberg-Gleichgewicht [p (Chi²)]	0,214	0,159

Der untersuchte Polymorphismus stand im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die berechneten Abweichungen mit dem Chi-Quadrat-Test erreichten keine statistische Signifikanz (Tabelle 10).

4.1.2 Assoziationen des SNPs g.1-693 G>A mit atopischen Phänotypen in der MAS-Kohorte

Die folgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse der Untersuchung des SNPs g.1-693 G>A auf Assoziationen mit allergischen Phänotypen in der MAS-Kohorte. In Tabelle 11 ist die Genotypverteilung homozygot Wildtyp versus homozygot Polymorphismus für den SNP g.1-693 G>A zwischen atopischen Phänotypen und nicht-atopischen Kontrollen dargestellt.

Tabelle 11: Assoziationen des ICOS-SNPs g.1-693 G>A mit atopischen Erkrankungen gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen in der MAS-Kohorte.

Phänotypen	n	Genotypverteilung		p (Chi ²)	p (Fisher)
		GG	AA		
atopische Dermatitis im Alter von 2 Jahren	127	0,95	0,05	0,6794	0,7558
atopische Dermatitis im Alter von 7 Jahren	73	0,96	0,04	0,5886	0,7241
allergische Rhinitis im Alter von 7 Jahren	55	0,96	0,04	0,5314	0,7024
allergische Rhinitis im Alter von 10 Jahren	59	0,96	0,04	0,4749	0,6995
Polysensibilisierung im Alter von 7 Jahren	142	0,96	0,04	0,546	0,5394
Polysensibilisierung im Alter von 10 Jahren	140	0,96	0,04	0,5623	0,543
Asthma im Alter von 7 Jahren	58	0,96	0,04	0,4884	0,7
Asthma im Alter von 10 Jahren	38	1,00	0,00	0,1223	0,3438
nicht-atopische Kontrollen	83	0,95	0,06		

Bei dem SNP g.1-693 G>A konnten keine statistischen signifikanten Unterschiede zwischen den Kindern mit Atopie gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen festgestellt werden (Tabelle 11). Des Weiteren zeigte sich weder im Chi-Quadrat-Test noch im Exakten Test nach Fisher eine statistische signifikante Assoziation des SNPs bei Kindern mit atopischen Phänotypen gegenüber den Kindern, die den jeweiligen Phänotyp in der entsprechenden Altersklasse nicht aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchung des SNPs g.1-693 G>A auf eine Assoziation mit erniedrigter FEV1 im Alter von sieben Jahren ergab in der MAS-Kohorte keine statistische signifikante Assoziation zwischen den verschiedenen Genotypen (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren erfolgte eine Analyse des SNPs g.1-693 G>A hinsichtlich Assoziationen mit spezifischen Sensibilisierungen gegen herkömmliche Allergene in verschiedenen Altersstufen zwischen ein und zehn Jahren.

Die Tabellen 12-14 stellen die Genotypverteilungen des SNPs g.1-693 G>A mit hoher spezifischer Sensibilisierung gegen Gräserpollen gegenüber niedriger spezifischer Sensibilisierung gegen Gräserpollen im Alter von einem Jahr dar. Atopie wurde einerseits als hohes spezifisches IgE $\geq 0,35$ kU/l und andererseits als hohes spezifisches IgE $\geq 0,7$ kU/l gegen die getesteten Allergene definiert.

Tabelle 12: Assoziation des ICOS-SNPs g.1-693 G>A mit spezifischer Sensibilisierung gegen Gräserpollen bei einem cut-off-Wert des spezifischen IgE <0,35 versus $\geq 0,35$ in der MAS-Kohorte im Alter von 1 Jahr. „1“ steht für homozygot Wildtyp, „2“ steht für heterozygot und „3“ steht für homozygot Polymorphismus.

a: zwischen 1 versus 2 versus 3

Spezifisches IgE gegen Gräserpollen	<0,35	$\geq 0,35$	n-gesamt
1	99,21%	0,79%	380
2	98,15%	1,85%	216
3	91,30%	8,70%	23
n-gesamt	610	9	619

$p(\text{Chi}^2)=0,0073$, $p(\text{MH})=0,0127$

b: zwischen (1 oder 2) versus 3

Spezifisches IgE gegen Gräserpollen	<0,35	$\geq 0,35$	n-gesamt
1 oder 2	98,83%	1,17%	596
3	91,30%	8,70%	23
n-gesamt	610	9	619

$p(\text{Chi}^2)=0,0031$, $p(\text{Fisher})=0,0406$

c: zwischen 1 versus (2 oder 3)

Spezifisches IgE gegen Gräserpollen	<0,35	$\geq 0,35$	n-gesamt
1	99,21%	0,79%	380
2 oder 3	97,49%	2,51%	239
n-gesamt	610	9	619

$p(\text{Chi}^2)=0,0816$, $p(\text{Fisher})=0,0950$

d: zwischen 1 versus 3

Spezifisches IgE gegen Gräserpollen	<0,35	$\geq 0,35$	n-gesamt
1	99,21%	0,79%	380
3	91,30%	8,70%	23
n-gesamt	398	5	403

$p(\text{Chi}^2)=0,0009$, $p(\text{Fisher})=0,0281$

Tabelle 13: Assoziation des ICOS-SNPs g.1-693 G>A mit spezifischer Sensibilisierung gegen Gräserpollen bei einem cut-off-Wert des spezifischen IgE <0,7 versus $\geq 0,7$ in der MAS-Kohorte im Alter von 1 Jahr

a: zwischen 1 versus 2 versus 3

Spezifisches IgE gegen Gräserpollen	<0,7	$\geq 0,7$	n-gesamt
1	99,74%	0,26%	380
2	100,00%	0,00%	216
3	100,00%	0,00%	23
n-gesamt	618	1	619

$p(\text{Chi}^2)=0.7298$, $p(\text{MH})=0.4532$

b: zwischen (1 oder 2) versus 3

Spezifisches IgE gegen Gräserpollen	<0,7	$\geq 0,7$	n-gesamt
1 oder 2	99,83%	0,17%	596
3	100,00%	0,00%	23
n-gesamt	618	1	619

$p(\text{Chi}^2)=0.8441$, $p(\text{Fisher})=1.0000$

c: zwischen 1 versus (2 oder 3)

Spezifisches IgE gegen Gräserpollen	<0,7	$\geq 0,7$	n-gesamt
1	99,74%	0,26%	380
2 oder 3	100,00%	0,00%	239
n-gesamt	618	1	619

$p(\text{Chi}^2)=0.4274$, $p(\text{Fisher})=1.0000$

d: zwischen 1 versus 3

Spezifisches IgE gegen Gräserpollen	<0,7	$\geq 0,7$	n-gesamt
1	99,74%	0,26%	380
3	100,00%	0,00%	23
n-gesamt	402	1	403

$p(\text{Chi}^2)=0.8054$, $p(\text{Fisher})=1.0000$

Tabelle 14: Assoziation des ICOS-SNPs g.1-693 G>A mit spezifischer Sensibilisierung gegen Gräserpollen bei einem cut-off-Wert des spezifischen IgE <0,35 versus $\geq 0,7$ in der MAS-Kohorte im Alter von 1 Jahr

a: zwischen 1 versus 2 versus 3

Spezifisches IgE gegen Gräserpollen	<0,35	$\geq 0,70$	n-gesamt
1	99,74%	0,26%	378
2	100,00%	0,00%	212
3	100,00%	0,00%	21
n-gesamt	610	1	611

$p(\text{Chi}^2)=0.7344$, $p(\text{MH})=0.4565$

b: zwischen (1 oder 2) versus 3

Spezifisches IgE gegen Gräserpollen	<0,35	$\geq 0,70$	n-gesamt
1 oder 2	99,83%	0,17%	590
3	100,00%	0,00%	21
n-gesamt	610	1	611

$p(\text{Chi}^2)=0.8502$, $p(\text{Fisher})=1,0000$

c: zwischen 1 versus (2 oder 3)

Spezifisches IgE gegen Gräserpollen	<0,35	$\geq 0,70$	n-gesamt
1	99,74%	0,26%	378
2 oder 3	100,00%	0,00%	233
n-gesamt	610	1	611

$p(\text{Chi}^2)=0.4320$, $p(\text{Fisher})=1,0000$

d: zwischen 1 versus 3

Spezifisches IgE gegen Gräserpollen	<0,35	$\geq 0,70$	Gesamt
1	99,74%	0,26%	378
3	100,00%	0,00%	21
n-gesamt	398	1	399

$p(\text{Chi}^2)=0.8134$, $p(\text{Fisher})=1,0000$

Die Tabelle 15a zeigt die Genotypverteilung des SNPs g.1-693 G>A mit hohem spezifischem IgE gegen Gräserpollen in bestimmten Altersstufen bei MAS-Kindern.

Tabelle 15a: Assoziation des SNPs g.1-693 G>A mit hohem spezifischem IgE gegen Gräserpollen in bestimmten Altersstufen. Spezifisches IgE als stetige Variable in kU/l.

p-Gesamt“ ist der p-Wert des Kruskal-Wallis-Tests. „Mean“ bedeutet Mittelwert, „St.Dev.“ bedeutet Standardabweichung, „Min“ bedeutet Minimum, „Q“ bedeutet Quartil, „Med“ bedeutet Median, „Max“ bedeutet Maximum, „vs“ bedeutet versus.

Alter in Jahre	g.1-693 G>A		Mean	St.Dev	Min	1.Q	Med	3.Q	Max	p-Werte (Wilcoxon / Kruskal-Wallis)			
										gesamt	12 vs 3	1 vs 23	1 vs 3
1	GG 1	61% n=380	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	1.09	0.00744	0.00319	0.08146	0.00093
	GA 2	35% n=216	0.01	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.57				
	AA 3	4% n=23	0.05	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.69				
2	GG 1	62% n=356	0.31	4.41	0.00	0.00	0.00	0.00	82.90	0.39976	0.77426	0.17619	0.61088
	GA 2	34% n=199	0.09	0.45	0.00	0.00	0.00	0.00	5.43				
	AA 3	4% n=21	0.04	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.53				
3	GG 1	61% n=333	0.66	4.49	0.00	0.00	0.00	0.00	52.70	0.72502	0.42341	0.83602	0.42889
	GA 2	35% n=189	0.76	5.73	0.00	0.00	0.00	0.00	59.20				
	AA 3	4% n=24	0.01	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35				
5	GG 1	61% n=382	3.93	15.98	0.00	0.00	0.00	0.00	99.00	0.92092	0.93908	0.71473	0.98380
	GA 2	35% n=220	3.95	15.79	0.00	0.00	0.00	0.00	99.00				
	AA 3	4% n=25	0.84	3.05	0.00	0.00	0.00	0.00	15.20				
6	GG 1	61% n=312	3.36	14.27	0.00	0.00	0.00	0.00	99.00	0.86815	0.59712	0.85453	0.58765
	GA 2	35% n=178	5.31	18.33	0.00	0.00	0.00	0.00	99.00				
	AA 3	4% n=21	0.41	1.36	0.00	0.00	0.00	0.00	6.19				
7	GG 1	61% n=409	5.61	18.60	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.53361	0.37311	0.66018	0.42170
	GA 2	35% n=231	6.95	22.37	0.00	0.00	0.00	0.47	100.00				
	AA 3	4% n=24	1.33	5.11	0.00	0.00	0.00	0.00	24.90				
10	GG 1	62% n=350	7.09	21.74	0.00	0.00	0.00	0.77	100.00	0.68833	0.44543	0.84040	0.47009
	GA 2	34% n=190	8.87	23.70	0.00	0.00	0.00	1.62	100.00				
	AA 3	4% n=20	4.99	12.28	0.00	0.00	0.00	0.00	42.30				

Das A-Allel des SNPs an Position g.1-693 G>A zeigte im Alter von einem Jahr eine statistische signifikante Assoziation mit hohem spezifischem IgE gegen Gräserpollen. In den anderen Altersstufen von zwei bis zehn Jahren konnte diese statistische signifikante Assoziation nicht mehr nachgewiesen werden (Tabelle 15a).

Die Tabelle 15b stellt die statistischen Daten hinsichtlich der Genotypverteilung des SNPs g.1-693 G>A mit hohem spezifischem IgE gegen Gräserpollen gegenüber niedrigem spezifischem IgE gegen Gräserpollen zusammenfassend für das Alter von ein bis zehn Jahren dar. OR bedeutet Odds Ratio, CI bedeutet Konfidenzintervall.

Tabelle 15b: Assoziation des SNPs g.1-693 G>A mit spezifischer Sensibilisierung gegen Gräserpollen im Alter von 1-10 Jahren

spezifisches IgE gegen Gräserpollen in kU/l	Genotypverteilung des ICOS-SNPs g.1-693 G>A	OR	95%-CI	p-gesamt
<0,35 versus \geq 0,35	1	1.00	-	-
	2	1.03	0.77-1.38	0.8426
	3	0.83	0.39-1.76	0.6205
<0,70 versus \geq 0,70	1	1.00	-	-
	2	1,02	0.74-1.40	0.9117
	3	0.75	0.31-1.82	0.5300
<0,35 versus \geq 0,70	1	1.00	-	-
	2	1.01	0.74-1.39	0.9351
	3	0.75	0.31-1.83	0.5295
<0,35 versus \geq 0,35	(1 oder 2) versus 3	0.82	0.39-1.73	0.5974
<0,70 versus \geq 0,70	(1 oder 2) versus 3	0.75	0.31-1.79	0.5164
<0,35 versus \geq 0,70	(1 oder 2) versus 3	0.75	0.31-1.81	0.5187
<0,35 versus \geq 0,35	1 versus (2 oder 3)	1.01	0.76-1.34	0.9496
<0,70 versus \geq 0,70	1 versus (2 oder 3)	0.99	0.73-1.35	0.9531
<0,35 versus \geq 0,70	1 versus (2 oder 3)	0.99	0.72-1.34	0.9263
<0,35 versus \geq 0,35	1 versus 3	0.82	0.38-1.77	0.6136
<0,70 versus \geq 0,70	1 versus 3	0.76	0.31-1.83	0.5355
<0,35 versus \geq 0,70	1 versus 3	0.75	0.31-1.85	0.5347

Insgesamt konnte in den Altersstufen von ein bis zehn Jahren keine statistische signifikante Assoziation des A-Allels an Position g.1-693 G>A mit hohem spezifischem IgE gegen Gräserpollen gefunden werden (Tabelle 15b).

Die atopischen Phänotypen Sensibilisierungen gegen Innen- und Außenallergene, Aeroallergene, Birkenpollen, Hausstaubmilben, Katze und Hund waren nicht mit der Genotypverteilung des untersuchten SNPs im Alter von 1, 2, 3, 5, 6, 7 und 10 Jahren assoziiert (Daten nicht gezeigt).

Die Tabelle 16 zeigt die Assoziation des SNPs g.1-693 G>A mit hohem Gesamt-IgE in verschiedenen Altersstufen. Das Gesamt-IgE ist als stetige Variable in kU/l dargestellt. „p-Gesamt“ ist der p-Wert des Kruskal-Wallis-Tests. „Mean“ bedeutet Mittelwert, „St.Dev.“ bedeutet Standardabweichung, „Min“ bedeutet Minimum, „Qua.“ bedeutet Quartil, „Max“ bedeutet Maximum, „vs“ bedeutet versus.

Tabelle 16: Assoziation des SNPs g.1-693 G>A mit hohem Gesamt-IgE in bestimmten Altersstufen. Gesamt-IgE als stetige Variable in kU/l.

Gesamt-IgE im Alter von:	g.1-693 G>A		Mean	St.Dev.	Min	1.Qua.	Median	3.Qua.	Max	p-Werte (Wilcoxon / Kruskal-Wallis)			
										gesamt	12 vs 3	1 vs 23	1 vs 3
1Jahr	GG	61% n=384	22.40	47.03	0.00	2.50	6.85	21.55	545.00	0.42704	0.34997	0.26685	0.29475
	GA	35% n=221	16.06	26.20	0.00	2.80	5.90	15.80	186.00				
	AA	4% n=23	14.41	20.98	0.00	2.00	4.40	17.80	70.60				
2Jahren	GG	62% n=356	62.44	139.00	0.00	6.05i	17.30	53.40	1631.00	0.18777	0.06752	0.63671	0.06334
	GA	34% n=199	48.47	83.12	0.00	5.50	19.90	53.90	725.00				
	AA	4% n=21	24.86	35.84	2.00	2.70	9.00	25.40	134.00				
3Jahren	GG	61% n=335	95.14	227.71	0.00	10.00	25.70	78.20	1881.00	0.08436	0.11159	0.05436	0.07478
	GA	35% n=188	71.90	181.01	0.00	7.60	20.80	61.55	2000.00				
	AA	4% n=24	69.60	133.15	0.00	3.90	12.10	57.50	556.00				
5Jahren	GG	61% n=383	146.70	412.44	0.00	15.60	45.40	111.00	6020.00	0.26618	0.19071	0.20529	0.15750
	GA	35% n=221	145.10	748.31	0.00	15.50	37.80	100.00	10870.0				
	AA	4% n=25	90.70	172.61	0.00	8.00	20.80	83.50	807.00				
6Jahren	GG	61% n=312	170.14	499.30	0.00	17.05i	45.05	122.00	6900.00	0.48970	0.23882	0.90804	0.26300
	GA	35% n=178	173.83	635.08	0.00	21.30	47.70	123.00	7870.00				
	AA	4% n=21	65.04	79.60	0.00	14.00	35.80	89.40	289.00				
7Jahren	GG	61% n=410	178.14	486.96	0.00	19.60	50.45	152.00	7730.00	0.83731	0.60248	0.68387	0.58230
	GA	35% n=232	161.71	463.58	0.00	20.75	48.40	132.50	5690.00				
	AA	4% n=24	105.01	148.71	0.00	14.55	53.10	137.00	650.00				
10Jahren	GG	62% n=350	217.75	572.09	2.00	27.60	65.05	223.00	8825.00	0.81107	0.56915	0.66186	0.56455
	GA	34% n=192	171.22	290.29	2.06	23.80	64.55	180.00	2230.00				
	AA	4% n=20	220.58	337.70	2.53	14.10	66.80	229.00	1095.00				

In der Gruppe der Kinder mit hohem Gesamt-IgE im Alter von drei Jahren zeigte das A-Allel an Position g.1-693 G>A bei der Berechnung von homozygot Wildtyp gegenüber Heterozygote und homozygot Polymorphismus eine statistische signifikante Assoziation mit hohem Gesamt-IgE (Tabelle 16). Im Gegensatz dazu konnten keine weiteren Unterschiede in der Genotypverteilung des SNPs mit hohem Gesamt-IgE zu anderen Zeitpunkten im Alter von ein bis zehn Jahren gefunden werden.

In der Tabelle 17 ist die Genotypverteilung des SNPs g.1-693 G>A mit hohem Gesamt-IgE über der 85. Kohortenpercentile gegenüber niedrigem Gesamt-IgE unter der 15. Kohortenpercentile im Alter von sieben und zehn Jahren bei Kindern der MAS-Kohorte dargestellt.

Tabelle 17: Assoziation des SNPs g.1-693 G>A mit hohem Gesamt-IgE über der 85. Kohortenpercentile (P) gegenüber unter der 15. Kohortenpercentile bei Kindern der MAS-Kohorte im Alter von 7 und 10 Jahren.

SNPs g.1-693 G>A						
Alter	Gesamt-IgE	GG	AA		p (Chi ²)	p (Fisher)
7Jahre	>85.P	94%	6%	70	0,4660	0,5259
	<15.P	91%	9%	67		
10Jahre	>85.P	93%	3%	54	0,4075	0,5306
	<15.P	88%	12%	58		
7 und 10Jahre	>85.P	94%	6%	35	0,1413	0,2296
	<15.P	83%	17%	29		

Die Genotypverteilung des SNPs g.1-693 G>A bei der Betrachtung der Kindern mit hohem gegenüber niedrigem Gesamt-IgE im Alter von sieben und zehn Jahren erbrachte keine statistischen signifikanten Unterschiede (Tabelle 17).

In der Tabelle 18 ist die Genotypverteilung des SNPs g.1-693 G>A bei Kindern der MAS-Kohorte mit hohem Gesamt-IgE (über der 85. Kohortenperzentile) gegenüber den Kindern mit niedrigem Gesamt-IgE (unter der 15. Kohortenperzentile) zusammenfassend für die jungen Altersklassen (1, 2, 3 oder 5 Jahre) und älteren Altersklassen (5, 7 oder 10 Jahre) dargestellt.

Tabelle 18: Genotypverteilung des ICOS-SNPs g.1-693 G>A bei Betrachtung der Gesamt-IgE-Werte in der MAS-Kohorte in verschiedenen Altersstufen.

Atopische Phänotypen	n	Genotypverteilung		
		GG	GA	AA
Gesamt-IgE < 15.Perzentile zu zwei oder mehr Untersuchungszeitpunkten im Alter von 1, 2, 3 oder 5 Jahren	97	0.54	0.38	0.08
Gesamt-IgE >85.Perzentile zu zwei oder mehr Untersuchungszeitpunkten im Alter von 1, 2, 3 oder 5 Jahren	87	0.67	0.30	0.03
Gesamt-IgE < 15.Perzentile zu zwei oder mehr Untersuchungszeitpunkten im Alter von 5, 7 oder 10 Jahren	77	0.61	0.32	0.06
Gesamt-IgE >85.Perzentile zu zwei oder mehr Untersuchungszeitpunkten im Alter von 5, 7 oder 10 Jahren	82	0.67	0.29	0.04

Die Genotypverteilungen des SNPs g.1-693 G>A unterschieden sich weder im Alter von ein bis fünf Jahren noch im Alter von fünf bis zehn Jahren statistisch signifikant bei den Kindern mit hohem Gesamt-IgE über der 85. Kohortenperzentile gegenüber den Kindern mit niedrigem Gesamt-IgE unter der 15. Kohortenperzentile (Tabelle 18).

4.1.3 Überprüfung der Assoziationen des SNPs g.1-693 G>A mit atopischen Phänotypen in der ETAC-Kohorte

Der Polymorphismus g.1-693 G>A wurde auch in der ETAC-Kohorte auf Assoziationen mit atopischen Phänotypen untersucht.

In der Tabelle 19 ist die Genotypverteilung des SNPs bei der Betrachtung der Kinder mit allergischem Asthma bronchiale gegenüber den Kindern ohne allergisches Asthma bronchiale im Alter von vier bis fünf Jahren dargestellt. Im dominanten Modell sind die Polymorphismen mit den Heterozygoten zusammengefasst, im rezessiven Modell werden die Polymorphismen einzeln betrachtet.

Tabelle 19: Assoziation des SNPs g.1-693 G>A mit Asthma gegenüber den ETAC-Kindern ohne Asthma. AB steht für Asthma bronchiale.

g.1-693 G>A	Phänotyp	GG	GA	AA	n	p (dominant)	p (rezessiv)
ETAC-Kinder insgesamt	AB	65%	29%	6%	275	0,3717	0,9181
	kein AB	65%	31%	4%	200		

In der ETAC-Kohorte konnte keine statistische signifikante Assoziation des Polymorphismus g.1-693 G>A mit allergischem Asthma bronchiale gegenüber den ETAC-Kindern ohne allergisches Asthma bronchiale gefunden werden (Tabelle 19).

Untersuchungen des SNPs auf Assoziationen mit der Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen und hohem Gesamt-IgE im Serum zeigten in der ETAC-Kohorte keine statistische Signifikanz (Daten nicht gezeigt).

4.2 Untersuchung weiterer ICOS-SNPs an putativen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren

Weiterhin wurden vier zuvor beschriebene SNPs an potentiell regulatorischen Stellen in der ICOS-Promotorregion und im ICOS-Gen (44) anhand der MAS- und ETAC-Kohorte erstmals auf Assoziationen mit atopischen Erkrankungen untersucht.

4.2.1 Allelfrequenzen und Genotypverteilungen der ICOS-SNPs g.1-2144 C>T, g.1-2419 T>C, g.20065 C>G, g.22126 G>T in den Kohorten

In Tabelle 20 sind die Allelfrequenzen der untersuchten SNPs in der MAS- und ETAC-Kohorte dargestellt.

Tabelle 20: Allelfrequenzen ausgewählter ICOS-Varianten in der MAS- und ETAC-Kohorte

Position	Regulatorisches Element	MAS-Kohorte		ETAC-Kohorte	
g.1-2144 C>T	potentielle NFkappaB-Bindungsstelle	C 0.93	T 0.07	C 0.93	T 0.07
g.1-2419 T>C	potentielle Sp1-Bindungsstelle	T 0.77	C 0.23	T 0.78	C 0.22
g.20065 C>G	Intron-2-Verstärker	C 0.87	G 0.13	C 0.85	G 0.15
g.22126 G>T	potentielle Sp1-Bindungsstelle	G 0.92	T 0.08	nd	nd

Die Allelfrequenzen in der MAS- und ETAC-Kohorte waren vergleichbar. Die Allelfrequenzen der untersuchten SNPs g.1-2144 C>T, g.1-2419 T>C, g.20065 C>G und g.22126 G>T untereinander waren verschieden (Tabelle 20).

Die Kopplungsungleichgewichts-Analyse der untersuchten ICOS-SNPs ist in Tabelle 21a für die MAS-Kohorte und in Tabelle 21b für die ETAC-Kohorte dargestellt.

Tabelle 21: R² als Maß des Kopplungsungleichgewichts

a: in der MAS-Kohorte

Polymorphismenpaare	R ²
g.1-2144 C>T versus g.1-2419 T>C	0,1020
g.1-2144 C>T versus g.20065 C>G	0,3635
g.20065 C>G versus g.1-2419 T>C	0,2807
g.22126 G>T versus g.1-2144 C>T	0,0156
g.22126 G>T versus g.1-2419 T>C	0,1035
g.22126 G>T versus g.20065 C>G	0,3685

b: in der ETAC-Kohorte

Polymorphismenpaare	R ²
g.1-2144 C>T versus g.1-2419 T>C	0,1797
g.1-2144 C>T versus g.20065 C>G	0,3220
g.20065 C>G versus g.1-2419 T>C	0,5581

Zwischen den Polymorphismenpaaren lag der LD-Koeffizient R² näher an 0 (Tabelle 21), so dass ein Kopplungsungleichgewicht kaum feststellbar war. Ein Wert von 0 weist auf Unabhängigkeit zwischen den Loci hin. Die SNPs waren nicht gekoppelt und wurden daher individuell betrachtet.

In Tabelle 22a sind die Genotypverteilungen der untersuchten SNPs in der MAS-Kohorte und in Tabelle 22b in der ETAC-Kohorte dargestellt.

Tabelle 22a: Genotypverteilungen der ausgewählten ICOS-SNPs bei Kindern der MAS-Kohorte mit Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

ICOS-SNPs	g.1-2144 C>T	g.1-2419 T>C	g.20065 C>G	g.22126 G>T
Gesamtzahl	n=823	n=826	n=826	n=833
Homozygot Wildtyp	87%	59%	76%	85%
Heterozygote	12%	35%	22%	14%
Homozygot Polymorphismus	1%	6%	2%	1%
Hardy-Weinberg-Gleichgewicht [p(Chi²)]	0,211	0,781	0,547	0,348

Tabelle 22b: Genotypverteilungen der ausgewählten ICOS-SNPs in der ETAC-Kohorte mit Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

ICOS-SNPs	g.1-2144 C>T	g.1-2419 T>C	g.20065 C>G
Gesamtzahl	n=466	n=464	n=469
homozygot Wildtyp	86%	63%	73%
Heterozygote	13%	32%	24%
homozygot Polymorphismus	1%	5%	3%
Hardy-Weinberg-Gleichgewicht [p(Chi²)]	0,654	0,313	0,079

Die untersuchten Polymorphismen wichen in der Genotypverteilung nicht vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab (Tabelle 22a+b).

4.2.2 Assoziationen der SNPs mit atopischen Phänotypen in der MAS-Kohorte

Die folgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse der Untersuchung der Polymorphismen g.1-2144 C>T, g.1-2419 T>C, g.20065 C>G und g.22126 G>T der ICOS-Genregion 2q33 auf Assoziationen mit allergischen Phänotypen in der MAS-Kohorte.

Tabelle 23a: Assoziationen des ICOS-SNPs g.1-2144 C>T mit atopischen Erkrankungen gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen in der MAS-Kohorte.

Phänotypen	n	Genotypverteilung		p (Chi ²)	p (Fisher)
		CC	TT		
atopische Dermatitis im Alter von 2 Jahren	149	0,99	0,01	0,3749	0,5721
atopische Dermatitis im Alter von 7 Jahren	90	0,99	0,01	0,6594	1
allergische Rhinitis im Alter von 7 Jahren	72	0,99	0,01	0,8091	1
allergische Rhinitis im Alter von 10 Jahren	76	0,99	0,01	0,7654	1
Polysensibilisierung im Alter von 7 Jahren	183	0,99	0,01	0,5777	0,6259
Polysensibilisierung im Alter von 10 Jahren	63	0,99	0,01	0,2859	0,5574
Asthma im Alter von 7 Jahren	75	1	0	0,2316	0,512
Asthma im Alter von 10 Jahren	49	1	0	0,3332	1
nicht-atopische Kontrollen	106	0,98	0,02		

Bei dem SNP g.1-2144 C>T konnten keine statistischen signifikanten Unterschiede zwischen den Kindern mit Atopie gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen festgestellt werden (Tabelle 23a). Des Weiteren zeigte sich weder im Chi-Quadrat-Test noch im Exakten Test nach Fisher eine statistische signifikante Assoziation des SNPs bei Kindern mit atopischen Phänotypen gegenüber den Kindern, die den jeweiligen Phänotyp in der entsprechenden Altersklasse nicht aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Der SNP g.1-2144 C>T zeigte weder im Chi-Quadrat-Test noch im Exakten Test nach Fisher eine statistische signifikante Assoziation in der Untergruppe der Asthmatiker mit spezifischer Sensibilisierung gegen Inhalationsallergene oder Hausstaubmilben im Alter von sieben Jahren (Daten nicht gezeigt). Eine statistische signifikante Assoziation konnte für das T-Allel an Position g.1-2144 mit allergischer Polysensibilisierung (\geq zwei Sensibilisierungen) gegenüber Monosensibilisierung (eine Sensibilisierung) in der CAP-Klasse I im Alter von sieben Jahren im Chi-Quadrat-Test gezeigt werden ($p=0.0497$). Diese statistische signifikante Assoziation war weder in der CAP-Klasse II noch im Alter von zehn Jahren nachweisbar. Auch im Exakten Test nach Fisher zeigte sich keine statistische signifikante Assoziation des SNPs zwischen allergischer Polysensibilisierung und Monosensibilisierung (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 23b: Assoziation des ICOS-SNPs g.1-2419 T>C mit atopischen Phänotypen gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen in der MAS-Kohorte.

Phänotypen	n	Genotypverteilung		p (Chi ²)	p (Fisher)
		TT	CC		
atopische Dermatitis im Alter von 2 Jahren	117	0,95	0,05	0,1178	0,1708
atopische Dermatitis im Alter von 7 Jahren	69	0,93	0,07	0,4174	0,5753
allergische Rhinitis im Alter von 7 Jahren	52	0,96	0,04	0,1377	0,2003
allergische Rhinitis im Alter von 10 Jahren	54	0,96	0,04	0,1233	0,1988
Polysensibilisierung im Alter von 7 Jahren	134	0,94	0,06	0,1759	0,1982
Polysensibilisierung im Alter von 10 Jahren	130	0,95	0,05	0,1265	0,1799
Asthma im Alter von 7 Jahren	58	0,95	0,05	0,219	0,359
Asthma im Alter von 10 Jahren	36	1	0	0,0374	0,0553
nicht-atopische Kontrollen	81	0,89	0,11		

Das C-Allel an Position g.1-2419 T>C zeigte im Alter von zehn Jahren eine statistische signifikante Assoziation mit der Entwicklung von allergischem Asthma bronchiale gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen (Tabelle 23b). Diese statistische signifikante Assoziation des SNPs konnte auch zwischen Kindern mit Asthma bronchiale im Alter von zehn Jahren (n=36) und Kindern ohne Asthma bronchiale im Alter von zehn Jahren (n=388) belegt werden [p (Chi²)=0,0491]. Mit dem Exakten Test nach Fisher ergab sich keine statistische Signifikanz [p (Fisher)=0,0606]. In der Untergruppe der Asthmatiker mit spezifischer Sensibilisierung gegen Inhalationsallergene oder Hausstaubmilben zeigte der SNP g.1-2419 T>C weder im Chi-Quadrat-Test noch im Exakten Test nach Fisher eine statistische signifikante Assoziation im Alter von sieben Jahren (Daten nicht gezeigt). Der SNP g.1-2419 T>C zeigte weder im Chi-Quadrat-Test noch im Exakten Test nach Fisher eine statistische signifikante Assoziation mit allergischer Polysensibilisierung gegenüber Monosensibilisierung bei der Betrachtung der CAP-Klasse I und II im Alter von sieben und zehn Jahren in der MAS-Kohorte (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 23c: Assoziation des ICOS-SNP g.20065 C>G mit atopischen Phänotypen gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen in der MAS-Kohorte.

Phänotypen	n	Genotypverteilung		p (Chi ²)	p (Fisher)
		CC	GG		
atopische Dermatitis im Alter von 2 Jahren	136	0,98	0,02	0,5959	0,6831
atopische Dermatitis im Alter von 7 Jahren	79	0,97	0,03	0,7494	1
allergische Rhinitis im Alter von 7 Jahren	62	0,97	0,03	0,9609	1
allergische Rhinitis im Alter von 10 Jahren	68	0,96	0,04	0,736	1
Polysensibilisierung im Alter von 7 Jahren	166	0,99	0,01	0,2344	0,3462
Polysensibilisierung im Alter von 10 Jahren	158	0,97	0,03	0,7028	0,7049
Asthma im Alter von 7 Jahren	61	1	0	0,1475	0,2713
Asthma im Alter von 10 Jahren	44	1	0	0,218	0,5505
nicht-atopische Kontrollen	89	0,97	0,03		

Bei dem SNP g.20065 C>G konnten keine statistischen signifikanten Unterschiede zwischen den Kindern mit Atopie gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen festgestellt werden (Tabelle 23c). Des Weiteren zeigte sich weder im Chi-Quadrat-Test noch im Exakten Test nach Fisher eine statistische signifikante Assoziation des SNPs bei Kindern mit atopischen Phänotypen gegenüber den Kindern, die den jeweiligen Phänotyp in der entsprechenden Altersklasse nicht aufwiesen (Daten nicht gezeigt). In der Untergruppe der Asthmatiker mit spezifischer Sensibilisierung gegen Inhalationsallergene oder Hausstaubmilben zeigte der SNP g.20065 C>G weder im Chi-Quadrat-Test noch im Exakten Test nach Fisher eine statistische signifikante Assoziation im Alter von sieben Jahren (Daten nicht gezeigt). Der SNP g.20065 C>G zeigte weder im Chi-Quadrat-Test noch im Exakten Test nach Fisher eine statistische signifikante Assoziation mit allergischer Polysensibilisierung gegenüber Monosensibilisierung bei der Betrachtung der CAP-Klasse I und II im Alter von sieben und zehn Jahren in der MAS-Kohorte (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 23d: Assoziation des ICOS-SNP g.22126 G>T mit atopischen Phänotypen gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen in der MAS-Kohorte.

Phänotypen	n	Genotypverteilung		p (Chi ²)	p (Fisher)
		GG	TT		
atopische Dermatitis im Alter von 2 Jahren	147	0,99	0,01	0,3971	1
atopische Dermatitis im Alter von 7 Jahren	89	0,97	0,03	0,058	0,0948
allergische Rhinitis im Alter von 7 Jahren	68	0,98	0,02	0,2127	0,3931
allergische Rhinitis im Alter von 10 Jahren	80	0,99	0,01	0,2507	0,4324
Polysensibilisierung im Alter von 7 Jahren	190	0,98	0,02	0,1956	0,5549
Polysensibilisierung im Alter von 10 Jahren	188	0,99	0,01	0,4541	1
Asthma im Alter von 7 Jahren	69	0,98	0,02	0,216	0,3966
Asthma im Alter von 10 Jahren	51	0,98	0,02	0,15	0,3269
nicht-atopische Kontrollen	105	0	1		

Bei dem SNP g.22126 G>T konnten keine statistischen signifikanten Unterschiede zwischen den Kindern mit Atopie gegenüber den nicht-atopischen Kontrollen festgestellt werden (Tabelle 23d). In der Untergruppe der Asthmatiker mit spezifischer Sensibilisierung gegen Inhalationsallergene oder Hausstaubmilben zeigte der SNP g.22126 G>T weder im Chi-Quadrat-Test noch im Exakten Test nach Fisher eine statistische signifikante Assoziation im Alter von sieben Jahren (Daten nicht gezeigt). Der SNP g.22126 G>T zeigte weder im Chi-Quadrat-Test noch im Exakten Test nach Fisher eine statistische signifikante Assoziation mit allergischer Polysensibilisierung gegenüber Monosensibilisierung bei der Betrachtung der CAP-Klasse I und II im Alter von sieben und zehn Jahren in der MAS-Kohorte (Daten nicht gezeigt).

Jedoch zeigte der ICOS-SNPs g.22126 G>T bei MAS-Kindern mit atopischer Dermatitis (AD) gegenüber den MAS-Kindern ohne atopische Dermatitis im Alter von sieben Jahren eine statistische signifikante Assoziation (Tabelle 23e).

Zusätzlich erfolgten die entsprechenden statistischen Berechnungen auch nach den ISAAC-Kriterien. In dieser Studie basierte die Definition von atopischer Dermatitis auf der Aussage der Eltern über eine vorangegangene ärztliche Diagnose der Erkrankung (Tabelle 23e).

Tabelle 23e: Assoziation des ICOS-SNPs g.22126 G>T bei MAS-Kindern mit atopischer Dermatitis (AD) gegenüber den MAS-Kindern ohne atopische Dermatitis im Alter von 7 und 10 Jahren.

g.22126 G>T	7 Jahre				10Jahre	
	AD	Keine AD	ISAAC AD	ISAAC keine AD	ISAAC AD	ISAAC keine AD
GG	97%	99%	98%	99%	97%	99%
TT	3%	1%	2%	1%	3%	1%
n	89	564	43	636	40	541
p (Chi ²)	0,0091		0,2965		0,3415	
p (Fisher)	0,036		0,3257		0,3494	

Das T-Allel an Position g.22126 (G>T) zeigte eine statistische signifikante Assoziation bei Kindern mit atopischer Dermatitis gegenüber den Kindern ohne atopische Dermatitis im Alter von sieben Jahren (Tabelle 23e). Unter Verwendung der ISAAC-Definition zeigte der SNP weder im Alter von sieben Jahren noch im Alter von zehn Jahren eine statistische signifikante Assoziation bei Kindern mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu den Kindern ohne atopische Dermatitis (Tabelle 23e).

In der Tabelle 24 ist die Assoziation der ausgewählten ICOS-SNPs mit dem Ausmaß der bronchialen Reaktivität auf Histamin dargestellt.

Tabelle 24: Assoziation der ausgewählten ICOS-SNPs mit erniedrigter FEV1 im Alter von 7 Jahren in der MAS-Kohorte

PC20FEV1	SNP	1 versus 3		
		p(Chi ²)	p(Fisher)	p (Wilcoxon)
alle Kinder:	g.1-2144 C>T	0.3190	1.000	0,0975
nur Kinder mit Aeroallergensensibilisierung		0.3655	1.000	0,2557
alle Kinder:	g.1-2419 T>C	0.3922	0.5970	0,0541
nur Kinder mit Aeroallergensensibilisierung		0.7298	1.000	0,8567
alle Kinder:	g.20065 C>G	0.1460	0.2264	0,0944
nur Kinder mit Aeroallergensensibilisierung		0.2976	0.5670	0,0688
alle Kinder:	g.22126 G>T	0.4443	1.000	0,2047
nur Kinder mit Aeroallergensensibilisierung		0.5331	1.000	0,2364

Das C-Allel an Position g.1-2419 (T>C) war im Wilcoxon-Test bei der Betrachtung aller Kinder im Alter von sieben Jahren mit einer Einschränkung der Lungenfunktion assoziiert. Die anderen SNPs zeigten keine statistische signifikante Assoziation bei der Provokationskonzentration von Histamin mit 20%-igem FEV1-Abfall. Die PC20FEV1 unterschied sich auch nicht statistisch signifikant zwischen den Genotypen der SNPs in der Untergruppe der Kinder mit Sensibilisierung gegen Inhalationsallergene (Tabelle 24).

Die vier ICOS-SNPs wurden des Weiteren hinsichtlich Assoziationen mit spezifischen Sensibilisierungen gegen herkömmliche Allergene und mit hohem Gesamt-IgE untersucht.

Die Tabelle 25 zeigt die Untersuchung der ICOS-SNPs auf Assoziationen mit spezifischer Sensibilisierung gegen Gräserpollen in verschiedenen Altersstufen. Atopie wurde als hohes spezifisches $\text{IgE} \geq 0,35 \text{ kU/l}$ gegen Gräserpollen festgelegt.

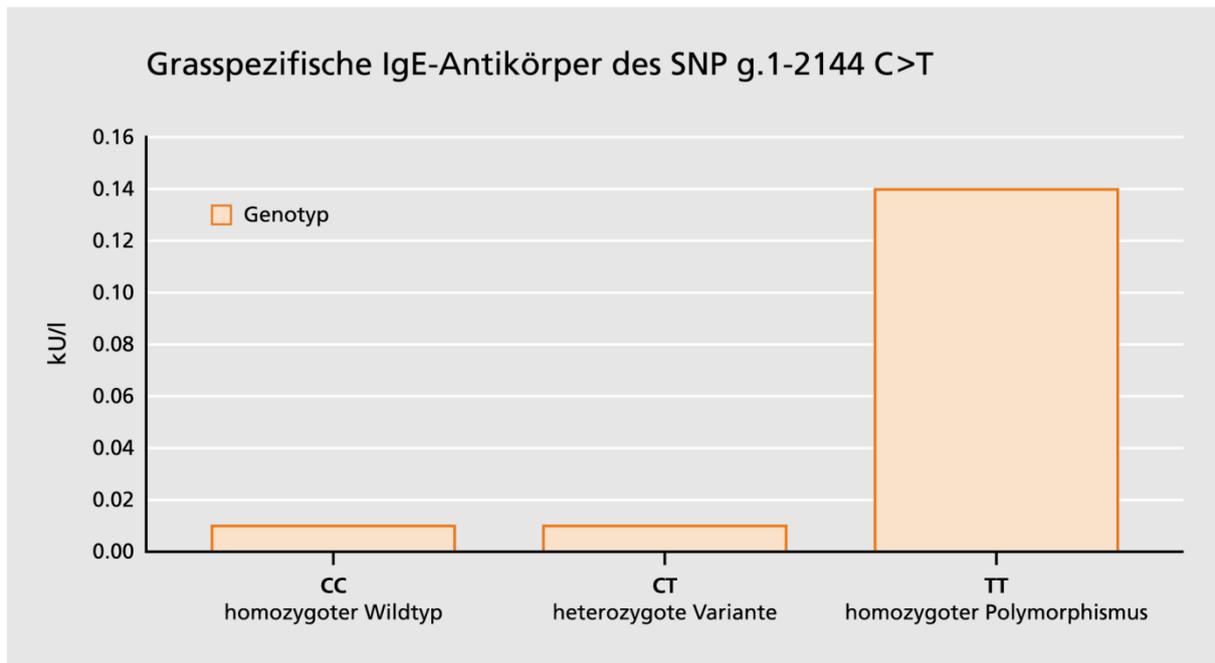
Tabelle 25: Assoziation der ICOS-SNPs mit hohem spezifischem IgE gegen Gräserpollen gegenüber niedrigem spezifischen IgE gegen Gräserpollen

Alter	SNP	p-Wert		
		homocytot Wildtyp versus homozygot Polymorphismus		
		p(Chi ²)	p(Fisher)	p (Wilcoxon)
1 Jahr	g.1-2144 C>T	0.0002	0.0648	0,0002
7 Jahre		0.8345	1.0000	0,9233
10 Jahre		0.8575	1.0000	0,9926
1 Jahr	g.1-2419 T>C	0.0003	0.0096	0,0003
7 Jahre		0.4608	0.5295	0,3859
10 Jahre		0.1639	0.2003	0,2262
1 Jahr	g.20065 C>G	0.0184	0.1313	0,0179
7 Jahre		0.4586	0.7427	0,4921
10 Jahre		0.6933	1.0000	0,7421
1 Jahr	g.22126 G>T	0.7572	1.0000	0,7623
7 Jahre		0.9899	1.0000	1
10 Jahre		0.5362	0.5104	0,5303

Es zeigten sich statistische signifikante Assoziationen der drei SNPs g.1-2144 C>T, g.1-2419 T>C und g.20065 C>G mit einer Sensibilisierung gegen Gräserpollen (Tabelle 25). Die Assoziationen bestanden jedoch nur im Alter von einem Jahr und konnten nicht mehr im Alter von sieben und zehn Jahren beobachtet werden.

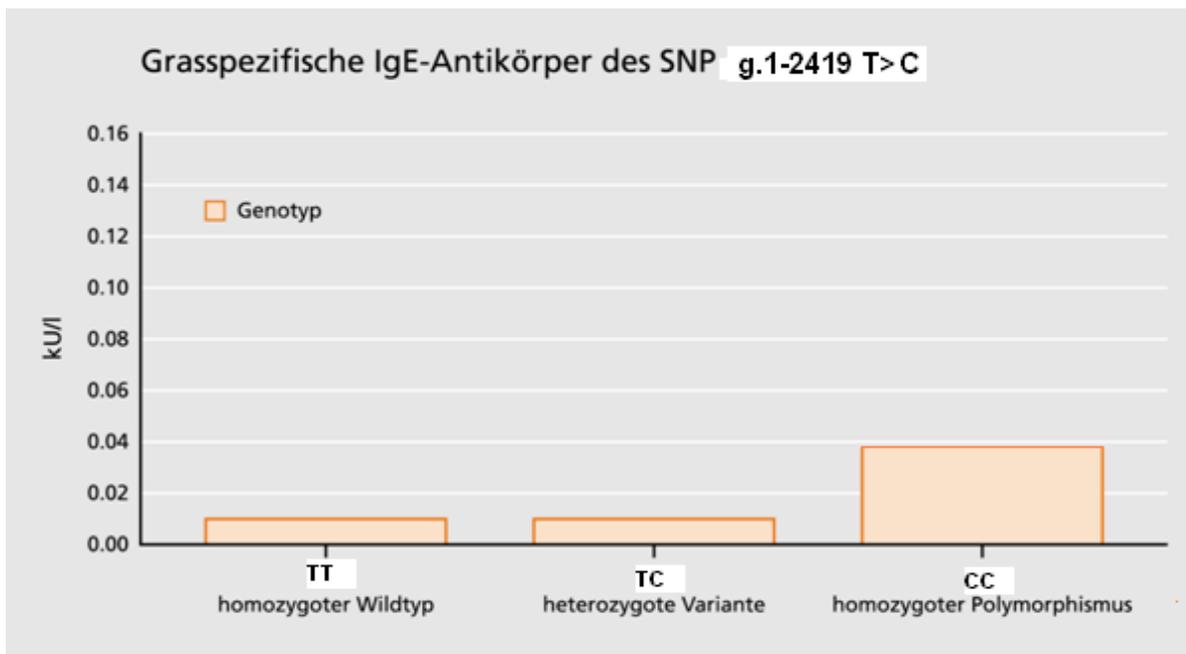
Das T-Allel an Position g.1-2144 C>T zeigte eine statistische signifikante Assoziation mit einer Sensibilisierung gegen Gräserpollen im ersten Lebensjahr in der MAS-Kohorte (Tabelle 25). Die grassspezifischen IgE-Werte waren bei den homozygoten Trägern des T-Allels mit 0,14 kU/l höher als bei den homozygoten Trägern des C-Wildtypallels und bei den heterozygoten Trägern (0,01 kU/l) (Abb. 6).

Abb. 6: Grasspezifische IgE-Serumkonzentration bei Kindern der MAS-Kohorte im Alter von 1 Jahr für die verschiedenen Genotypen im Promotor des ICOS-Gens an Position g.1-2144 C>T



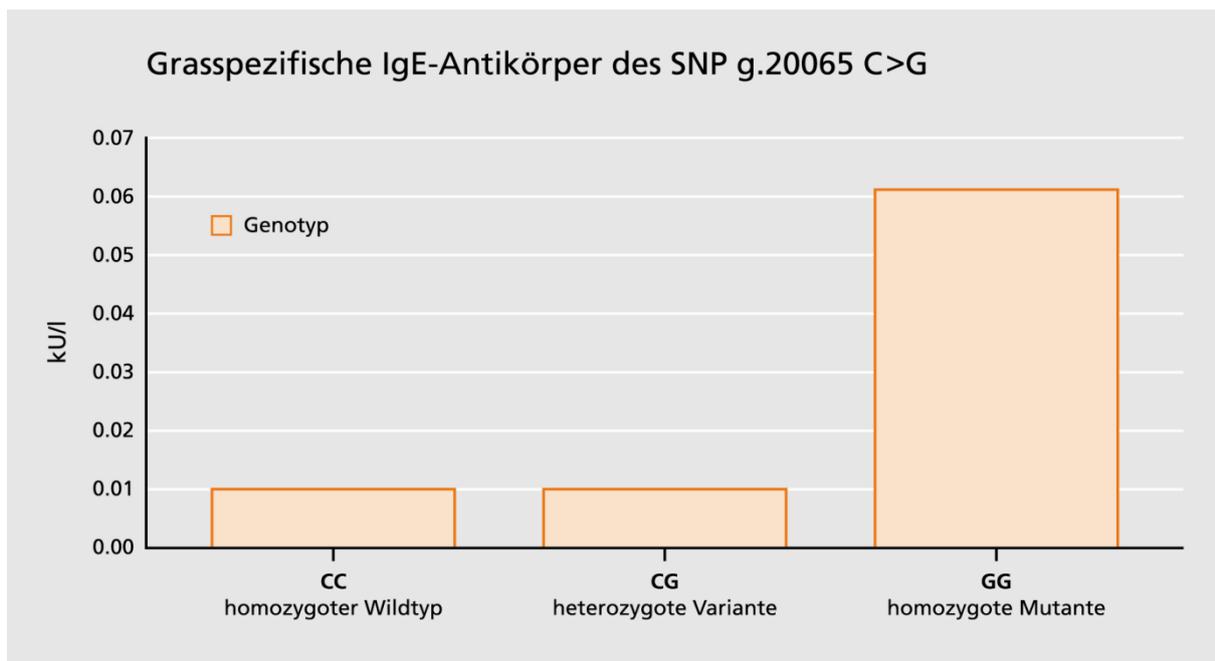
Das ebenfalls mit einer Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen assoziierte C-Allel an Position g.1-2419 T>C (Tabelle 25) zeigte im Alter von zehn Jahren eine statistische signifikante Assoziation mit der Entwicklung von allergischem Asthma bronchiale bei Kindern der MAS-Kohorte verglichen mit den nicht-atopischen Kontrollen (Tabelle 23b). Die grassspezifischen IgE-Werte waren bei den homozygoten Trägern des C-Allels mit 0,04 kU/l höher als bei den homozygoten Trägern des T-Wildtypallels und bei den heterozygoten Trägern (0,01 kU/l) (Abb. 7).

Abb. 7: Grasspezifische IgE-Serumkonzentration bei Kindern der MAS-Kohorte im Alter von 1 Jahr für die verschiedenen Genotypen im Promotor des ICOS-Gens an Position g.1-2419 T>C



Auch der Genotyp GG an Position g.20065 C>G (IVS3+126) zeigte eine statistische signifikante Assoziation mit einer Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen in der MAS-Kohorte (Tabelle 25). Die grassspezifischen IgE-Werte der Kinder im ersten Lebensjahr waren bei den homozygoten Trägern des mutierten G-Allels mit 0,06 kU/l höher als bei den homozygoten Trägern des C-Wildtypallels und den heterozygoten Trägern (0,01 kU/l) (Abb. 8).

Abb. 8: Grasspezifische IgE-Serumkonzentration bei Kindern der MAS-Kohorte im Alter von 1 Jahr für die verschiedenen Genotypen des ICOS-Gens an Position g.20065 C>G



Ein weiterer evaluierter SNP g.22126 G>T zeigte in der MAS-Kohorte keine statistische signifikante Assoziation mit einer Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen (Tabelle 25).

Interessanterweise zeigte der bereits mit atopischer Dermatitis im Alter von sieben Jahren assoziierte TT-Genotyp an Position g.22126 G>T (Tabelle 23e) auch eine statistische signifikante Assoziation mit spezifischer Sensibilisierung gegen Kuhmilch im Alter von sieben Jahren ($p=0,0236$, p ist der p -Wert des Wilcoxon-Test bei der Betrachtung der Genotypen 1 versus 3). Zwischen den anderen drei SNPs und spezifischen IgE-Werten gegen Kuhmilch konnte keine statistische signifikante Assoziation gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Weitere Untersuchungen der ICOS-SNPs auf Assoziationen mit spezifischen Sensibilisierungen gegen Hausstaubmilben, Innenallergenen, Außenallergenen, Inhalationsallergenen, Birke, Katze, Hund,

Hühnerei, Soja und Weizen waren nicht mit einem der untersuchten Genotypen assoziiert (Daten nicht gezeigt).

In der Tabelle 26a ist die Assoziation der ausgewählten ICOS-SNPs mit hohem Gesamt-IgE über der 85. Kohortenperzentile gegenüber niedrigem Gesamt-IgE unter der 15. Kohortenperzentile bei Kindern der MAS-Kohorte im Alter von sieben und zehn Jahren dargestellt.

Tabelle 26a: Assoziation der ICOS-SNPs mit hohem Gesamt-IgE über der 85. Kohortenperzentile (P) gegenüber niedrigem Gesamt-IgE unter der 15. Kohortenperzentile bei Kindern der MAS-Kohorte im Alter von 7 und 10 Jahren.

ICOS-SNPs	Alter	Phänotyp	Homozygot Wildtyp	Homozygot Polymorphismus	n	p (Chi ²)	p (Fisher)
g.1-2144	7Jahre	IgE>85.P	100%	0%	83	0,1647	0,4973
(C>T)		IgE<15.P	98%	2%	87		
g.1-2419		IgE>85.P	92%	8%	65	0,5819	0,7638
(T>C)		IgE<15.P	89%	11%	67		
g.20065		IgE>85.P	99%	1%	69	0,5847	1,0000
(C>G)		IgE<15.P	97%	3%	72		
g.22126		IgE>85.P	99%	1%	80	0,2984	0,4819
(G>T)		IgE<15.P	100%	0%	86		
g.1-2144	10Jahre	IgE>85.P	100%	0%	64	0,1822	0,4585
(C>T)		IgE<15.P	97%	3%	73		
g.1-2419		IgE>85.P	90%	10%	49	0,2797	0,4031
(T>C)		IgE<15.P	83%	17%	57		
g.20065		IgE>85.P	96%	4%	51	0,4939	0,6013
(C>G)		IgE<15.P	98%	2%	57		
g.22126		IgE>85.P	98%	2%	67	0,2982	0,4820
(G>T)		IgE<15.P	100%	0%	72		
g.1-2144	7 und 10 Jahre	IgE>85.P	100%	0%	36	0,1398	0,2323
(C>T)		IgE<15.P	94%	6%	34		
g.1-2419		IgE>85.P	90%	10%	31	0,2557	0,3006
(T>C)		IgE<15.P	80%	20%	30		
g.20065		IgE>85.P	96%	4%	27	0,3512	1,0000
(C>G)		IgE<15.P	100%	0%	23		
g.22126		IgE>85.P	97%	3%	39	0,3471	1,0000
(G>T)		IgE<15.P	100%	0%	34		

Die Genotypverteilungen der SNPs mit hohem Gesamt-IgE über der 85. Kohortenperzentile und niedrigem Gesamt-IgE unter der 15. Kohortenperzentile zeigten keine statistischen signifikanten Unterschiede zu den Untersuchungszeitpunkten im Alter von sieben und zehn Jahren (Tabelle 26a).

Die Tabelle 26b zeigt die Genotypverteilung des SNPs g.1-2419 T>C mit hohem Gesamt-IgE in verschiedenen Altersstufen exemplarisch für die vier untersuchten ICOS-SNPs.

Tabelle 26b: Assoziation des SNPs g.1-2419 T>C mit hohem Gesamt-IgE in verschiedenen Altersstufen in der MAS-Kohorte. P-gesamt ist der p-Wert des Kruskal-Wallis-Test.

Alter	TT 1	TC 2	CC 3	p-gesamt	p-Wert		
					Wilcoxon 12 vs 3	Wilcoxon 1 vs 23	Wilcoxon 1 vs 3
1J	59% n=357	36% n=218	5% n=33	0.1913	0.2506	0.0932	0.1580
2J	60% n=334	35% n=193	5% n=29	0.1218	0.0706	0.1477	0.0490
3J	59% n=308	35% n=186	6% n=32	0.0665	0.1034	0.0377	0.0596
5J	58% n=352	36% n=217	6% n=35	0.1151	0.0725	0.1266	0.0507
6J	59% n=293	35% n=173	6% n=27	0.1926	0.0710	0.7206	0.0845
7J	60% n=385	35% n=221	5% n=34	0.6182	0.5318	0.3658	0.4556
10J	60% n=323	35% n=187	6% n=30	0.5332	0.2880	0.5122	0.2859

Das C-Allel an Position g.1-2419 T>C war statistisch signifikant mit hohem Gesamt-IgE in der MAS-Kohorte im Alter von zwei bis fünf Jahren assoziiert (Tabelle 26b). Diese statistische signifikante Assoziation zeigte sich jedoch beim Vergleich der homozygoten Mutante mit dem homozygoten Wildtyp nur im Alter von zwei und fünf Jahren sowie bei der Betrachtung von homozygot Wildtyp versus Heterozygote oder homozygot Polymorphismus nur im Alter von drei Jahren (Tabelle 26b). Bei den anderen drei SNPs konnten keine statistischen signifikanten Assoziationen mit hohem Gesamt-IgE gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Evaluation der SNPs in der ETAC-Kohorte

Aufgrund der in der MAS-Kohorte beobachteten statistischen signifikanten Assoziation der drei ICOS-SNPs mit einer Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen bei einer relativ geringen Zahl von Kindern wurde die ETAC-Kohorte hinzugezogen, da hier gehäuft Kinder mit Frühsensibilisierung gegen Aeroallergene eingeschlossen wurden. In der ETAC-Kohorte war der Genotyp GG an Position g.20065 C>G im Chi-Quadrat-Test ($p=0,001848$) und im Exakten Test nach Fisher ($p=0,0097$) statistisch signifikant mit einer Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen assoziiert. Das C-Allel an Position g.1-2419 T>C zeigte des Weiteren eine statistische signifikante Assoziation mit hohem spezifischem IgE gegen Gräserpollen [p (Chi^2)= $0,032412$] und hohem Gesamt-IgE im Serum im Alter von zwei bis drei Jahren in der ETAC-Kohorte [p (Chi^2)= $0,051480$].

Wie in Tabelle 27 dargestellt, wurden die drei in der MAS-Kohorte mit einer Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen assoziierten ICOS-Polymorphismen auch auf Assoziationen mit allergischem Asthma bronchiale in der ETAC-Kohorte untersucht. Im dominanten Modell sind die Polymorphismen mit den Heterozygoten zusammengefasst, im rezessiven Modell werden die Polymorphismen einzeln betrachtet.

Tabelle 27: Assoziation der ICOS-SNPs mit Asthma gegenüber den ETAC-Kindern ohne Asthma im Alter von 4-5 Jahren.

ICOS-SNPs	Phänotyp	Homozygot Wildtyp	Heterozygot	Homozygot Polymorphismus	n	p (dominant)	p (rezessiv)
g.1-2144 C>T	Asthma	86%	13%	1%	273	0,9797	0,8049
	kein Asthma	86%	13%	1%	193		
g.1-2419 T>C	Asthma	62%	32%	6%	271	0,9418	0,4574
	kein Asthma	62%	33%	5%	193		
g.20065 C>G	Asthma	70%	26%	4%	274	0,1908	0,3161
	kein Asthma	76%	22%	2%	195		

Weder im dominanten noch im rezessiven Modell konnte eine statistische signifikante Assoziation der ICOS-SNPs mit allergischem Asthma bronchiale im Vergleich zu den ETAC-Kindern ohne allergisches Asthma bronchiale festgestellt werden (Tabelle 27).

5 Diskussion

Angesichts des Anstiegs allergischer Erkrankungen mit individuell eingeschränkter Lebensqualität und hoher sozioökonomischer Belastung wäre es von großem Nutzen, früh präventive Maßnahmen ergreifen zu können. Derzeit größter Risikofaktor für die Manifestation allergischer Erkrankungen ist die positive atopische Familienanamnese. Spezifische molekulargenetische Marker dagegen fehlen bisher. Ziel dieser Arbeit war es, in einem kandidatengenorientierten Ansatz neue prädiktive Marker für eine allergische Prädisposition zu finden. Hierzu wurden sechs SNPs im ICOS-Gen auf ihre Assoziation mit der Entwicklung allergischer Erkrankungen bei Kindern europäischen Ursprungs untersucht. Das kostimulatorische Molekül ICOS spielt eine wichtige Rolle bei der Früh- und Spätreaktion der allergischen Immunantwort im Mausmodell (12, 25, 35, 39, 79, 80, 86, 112, 113, 118). Auch beim Menschen konnte an ICOS-defizienten Patienten der Einfluss von ICOS auf die T-zellabhängige Antikörper-Antwort und insbesondere auch auf die IgE-Produktion gezeigt werden (41). Darüber hinaus wurde die Assoziation zweier ICOS-Polymorphismen mit allergischer Sensibilisierung gegen Aeroallergene in einer Hutterer-Population beschrieben (103). Einer dieser SNPs liegt an einer funktionellen NFkappaB-Bindungsstelle (103). In vorliegender Arbeit wurden diese beiden SNPs und vier weitere SNPs, die an potentiell regulatorischen Stellen der ICOS-Promotorregion und des ICOS-Gens liegen (44), in zwei großen europäischen pädiatrischen Kohorten untersucht.

5.1 Diskussion der Studien-Kohorten und Methoden

Die MAS-Kohorte ist mit 1.314 Neugeborenen eine sehr geeignete Geburtskohorte hinsichtlich der Untersuchung genetischer Marker zu Assoziationen mit atopischen Phänotypen. Die hohe Fallzahl erhöht die Aussagekraft, erleichtert es, Assoziationen aufzudecken, und reduziert falsch positive Ergebnisse. Die standardisierte und longitudinale Charakterisierung der Kinder hinsichtlich atopischer Phänotypen über mehr als zehn Jahre minimiert sowohl falsch positive als auch falsch negative Befunde. Dies ist von Vorteil für die objektive Definition der atopischen Phänotypen und Kontrollen. Dazu trägt zudem die hohe Teilnehmerzahl und die geforderte Arzt diagnose bei sowie die Tatsache, dass von allen Neugeborenen von den Eltern ausgefüllte standardisierte Fragebögen zur anamnestischen Erhebung des familiären Atopierisikos vorlagen (72). Kenntnisse über den Expositionstatus umfassten unter anderem Atemwegsinfekte, Rauchen, Haustierhaltung und Stillen (42, 55, 56, 67, 72, 73).

Bei den MAS-Kindern im Alter von sieben, zehn und 13 Jahren erfolgten in allen Zentren die Messungen hinsichtlich der Lungenfunktion einheitlich mit einem Bodyplethysmographen der Firma Master-Lab, E. Jaeger, Würzburg, Deutschland (91). Eine zusätzliche Objektivierung konnte mittels einheitlicher paraklinischer Messtechniken bei der Bestimmung der spezifischen IgE- und Gesamt-IgE-Werte im Serum (CAP-RAST-FEIA, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) gewährleistet werden.

Falsch positive Klassifizierungen sind dennoch nicht auszuschließen, da der Anteil der Teilnehmer an Blutabnahmen relativ niedrig war. Insgesamt konnte von 81% aller teilnehmenden MAS-Kinder zumindest eine Blutprobe gewonnen werden (55).

Bei den komplexen genetischen Erkrankungen, wie es die allergischen Erkrankungen sind, ist die Überprüfung positiver und negativer Daten in mindestens einer unabhängigen Population erforderlich, um die statistische Aussagekraft zu erhöhen. So wurde als zweite Kohorte die ETAC-Kohorte herangezogen, eine ebenfalls pädiatrische standardisierte Longitudinalstudie mit weißem ethnischen Hintergrund. Vergleicht man die verschiedenen Studienzentren dieser beiden Multicenterstudien können Selektionsbias durch unterschiedliche Umweltbedingungen angenommen werden. Die MAS-Kohorte könnte wegen der Verteilung auf nur sechs deutschen Zentren, davon zwei in Berlin (45 %) und jeweils eines in Freiburg, Mainz, Düsseldorf und München (42, 55) homogener als die ETAC-Kohorte mit 56 Zentren in zwölf europäischen Ländern und Kanada sein (33).

In Anbetracht der nahezu identischen Allelfrequenzen zwischen den beiden Kohorten (Tabelle 29) dürfte es sich jedoch um nicht relevante Umweltbedingungen mit nur geringem Selektionsdruck auf den Genpool handeln, sodass die beiden Kohorten hinsichtlich der genetischen Analyse recht valide Aussagen für europäische Kinder liefern dürften. Wie in der MAS- lagen auch in der ETAC-Kohorte Aussagen zu Umweltfaktoren wie Exposition gegenüber Haustiere und Tabakrauch vor (33). Kritisch anzumerken ist, dass die ETAC-Kohorte eine durchweg sehr junge Atopikerpopulation darstellt, denn alle 817 Kinder im Alter von zwölf bis 24 Monaten hatten eine positive atopische Familienanamnese und litten selbst unter einer atopischen Dermatitis (37). In der Folge haben alle ETAC-Kinder ein hohes genetisches Risiko für Atopie. Hingegen handelt es sich in der MAS-Kohorte um eine zu einem Drittel angereicherte Risikopopulation hinsichtlich Atopieprädisposition.

Während 10% der ETAC-Kinder aus der sogenannten Intention-To-Treat Population mit einem Durchschnittsalter von siebzehn Monaten eine erhöhte spezifische Sensibilisierung gegenüber Gräserpollen aufwiesen (33), waren es 6,2 % der MAS-Kinder in den ersten beiden Lebensjahren (55). Im Vergleich zur MAS-Kohorte war also in der ETAC-Kohorte von einer noch höheren Prävalenz für allergische Erkrankungen, speziell mit hohem Risiko früher allergischer Sensibilisierungen, zu rechnen.

Wie in der MAS- war auch in der ETAC-Kohorte der Verlust durch Drop-out geringer als erwartet. Eine relativ starke Verringerung des Gesamtkollektivs in der Nachbehandlungsphase ging auf den Ausschluss von Zentren zurück, die weniger als zehn Patienten rekrutierten (116). In diese Richtung könnten die Studienergebnisse verzerrt worden sein. Der prozentuale Verlust zwischen den einzelnen Teilnehmergruppen der Behandelten und Nichtbehandelten war nahezu vergleichbar. Zum Ende der Behandlungsphase hin sank die Teilnehmerzahl in der Placebogruppe von 87 % nach 18 Monaten auf 69 % nach 36 Monaten sowie in der Ceterizingruppe entsprechend von 89 % auf 69 %. Die Kinder, die bis zum Ende in der Studie verblieben, unterschieden sich hinsichtlich der biologischen Marker Alter, Geschlecht, positive atopische Familienanamnese und SCORAD-Score kaum von jenen, die vorzeitig ausschieden (116). Die verringerte Teilnehmerzahl bringt einen Nachteil für die statistische Auswertung mit sich, denn daraus könnten falsch positive Befunde resultieren.

Auch falsch negative Befunde müssen beachtet werden, da der Asthmastatus in der ETAC-Kohorte bereits sehr früh, nach einem Beobachtungszeitraum von nur drei Jahren, erhoben wurde. In der MAS-Kohorte war der späte Gipfel einer Häufung von Asthma bereits mit 10,3 % im fünften Lebensjahr erreicht (42). In Deutschland zeichnete sich folgendes Bild ab:

Tabelle 28a: Lebenszeitprävalenz von Asthma (101)

	Gesamt	Mädchen	Jungen
0-17 Jahre	4,7	3,9	5,5
0-2 Jahre	0,5	0,3	0,8
3-6 Jahre	2,7	1,8	3,6
7-10 Jahre	4,7	3,7	5,6
11-13 Jahre	7,0	5,4	8,6
14-17 Jahre	7,0	6,7	7,2

Tabelle 28b: Prävalenz von Asthma in den letzten 12 Monaten (101)

	Gesamt	Mädchen	Jungen
0-17 Jahre	3	2,5	3,4
0-2 Jahre	0,5	0,3	0,7
3-6 Jahre	2,0	1,3	2,7
7-10 Jahre	3,2	2,5	3,8
11-13 Jahre	4,4	3,1	5,5
14-17 Jahre	3,9	4,2	3,7

Angaben in %

Eine Einschränkung der Vergleichbarkeit der Studienergebnisse dürfte gering sein, da viele objektive Parameter – wie die longitudinalen standardisierten Fragebögen und Untersuchungen, einschließlich einer geforderten Arzt diagnose – beachtet worden sind.

Für die Bestimmung der Gesamt- und spezifischen IgE-Werte wurde in der ETAC-Kohorte die gleiche Messtechnik angewandt wie in der MAS-Kohorte (CAP-RAST-System). Die hier angewandte einheitliche serologische IgE-Bestimmung lässt eine gute Vergleichbarkeit der beiden Studienkohorten zu.

Für die vorliegende Arbeit stand DNS aus EDTA-Blut von 62 % der MAS-Kinder im Alter von vier Jahren (820 von 1314) und 58 % der ETAC-Kinder in den ersten zwei Lebensjahren (460 von 795) zur Verfügung. Der relativ hohe Drop-out aus der Grundgesamtheit beruht auf dem fehlenden Einverständnis der Eltern für genetische Untersuchungen. Die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse sinkt allerdings durch die Wahl von zwei unabhängigen Kohorten. Mit dem LightCycler PCR-Analysesystem steht ein im Vergleich zur konventionellen PCR äußerst schnelles und flexibles Real-Time-PCR-System zur Verfügung (78, 82). Die kurzen PCR-Zeiten sind bedingt durch die schnellen Temperaturänderungen aufgrund der Luftzirkulation und der Glaskapillaren. Die gemeinsame Reaktionskammer für alle 32 Kapillaren gewährt eine sehr gute Reproduzierbarkeit und Quantifizierung der Ergebnisse und birgt den Vorteil des kleinen Probenvolumens. Das hohe Kontaminationsrisiko, welches am Ende einer konventionellen PCR gegeben war, entfällt (78, 82). Mit dem LightCycler-Nachweisverfahren erhält man sofort eine qualitative Aussage, da man in Echtzeit die Fluoreszenzsignalveränderungen der einzelnen Proben am Bildschirm noch während der Amplifikation verfolgen kann.

5.2 Unterschiede in den Allelfrequenzen der untersuchten ICOS-SNPs

Shilling und Mitarbeiter untersuchten insgesamt elf SNPs im ICOS-Gen hinsichtlich einer Assoziation mit positivem Hautpricktest auf Allergene, bronchiale Hyperreagibilität bei Metacholin-Provokation und Gesamt-IgE. Die Untersuchung umfasste 750 Individuen einer erwachsenen Hutterer-Population. Die Autoren identifizierten eine funktionelle NFkappaB-Bindungsstelle in der ICOS-Promotorregion an Position g.1-1413 G>A und zeigten, dass diese bei G>A-Alleltransition funktionslos war. Bei Austausch der Base G-gegen A kam es nicht zur NFkappaB-Bindung. Des Weiteren erwies sich, dass das A-Allel des SNPs g.1-1413 mit dem A-Allel des SNPs g.1-693 im Kopplungsungleichgewicht war. Beide SNPs waren signifikant mit erhöhtem Gesamt-IgE im Serum, Th2-Zytokinproduktion und allergischer Sensibilisierung gegen Aeroallergene assoziiert (103). In einer dänischen Studie wurden diese beiden SNPs zuerst erwähnt (44). Etwas später wurde der ICOS-SNP -693 G>A in einer finnischen Studie an 106 Familien mit Zöliakie analysiert (47). Bislang liegt allerdings noch keine Studie vor, in welcher die Ergebnisse von Shilling et al. hinsichtlich der Assoziation mit Atopie repliziert wurden.

In vorliegender Arbeit wird nun erstmals untersucht, ob sich diese SNPs als prädiktive Marker für atopische Erkrankungen bei europäischen Kindern eignen. Zusätzlich wurden vier weitere von Haaning beschriebene SNPs an putativen regulatorischen Stellen im ICOS-Gen untersucht. Davon ist der SNP g.1-2144 C>T (rs11889031) ebenfalls an einer potentiellen NFkappaB-Bindungsstelle lokalisiert, der SNP g.1-2419 T>C an einer potentiellen Sp1-Bindungsstelle. Die beiden anderen ICOS-SNPs sind an potentiell regulatorischen Stellen des Intron 3 und 4 lokalisiert. Der SNP g.20065 C>G (IVS3+126) ist ein Intron-2-Verstärker. Er wurde als ein Verstärker im Intron 2 des Apolipoprotein B beschrieben. Der SNP g.22126 G>T (IVS4-620) ist an einer potentiellen Sp1-Bindungsstelle im Intron 4 lokalisiert (44). Die Allelfrequenzen in der MAS- und ETAC-Kohorte entsprechen bei allen untersuchten SNPs denen der initial beschriebenen in der dänischen Kohorte (44), während die SNPs in der Hutterer-Population (103) angereichert zu sein scheinen (Tabelle 29).

Tabelle 29: Vergleich der Allelfrequenzen der ausgewählten ICOS-Varianten g.1-693 G>A, g.1-1413 G>A, g.1-2144 C>T, g.1-2419 T>C, g.20065 C>G, g.22126 G>T in verschiedenen europäischen Kohorten.

Position	Allelfrequenzen				
	MAS-Kohorte	ETAC-Kohorte	dänische Kohorte (44)	Hutterer-Population (103)	finnische Kohorte (47)
g.1-693	G 0,78 A 0,22	G 0,82 A 0,18	G 0,78 A 0,22	G 0,61 A 0,39	G 0,78 A 0,22
g.1-1413	G 0,78 A 0,22	G 0,82 A 0,18	G 0,78 A 0,22	G 0,61 A 0,39	nd nd
g.1-2144	C 0,93 T 0,07	C 0,93 T 0,07	C 0,92 T 0,08	nd	
g.1-2419	T 0,77 C 0,23	T 0,79 C 0,21	T 0,78 C 0,22		
g.20065	C 0,87 G 0,13	C 0,85 G 0,15	C 0,85 G 0,15		
g.22126	G 0,92 T 0,08	nd nd	G 0,85 T 0,15		

Obwohl die Hutterer ebenfalls europäischen Ursprungs sind, war die Allelfrequenz der SNPs in der Hutterer-Population im Vergleich zu den anderen europäischen Kohorten doppelt so hoch. Das spricht für eine Anreicherung dieser SNPs durch Inzucht in dieser Population.

5.3 Risikotragende SNPs der Hutterer-Population waren nicht in beiden pädiatrischen Kohorten mit allergischen Phänotypen bei europäischen Kindern assoziiert

Im Gegensatz zu der Untersuchung von Shilling et al. an einer erwachsenen Hutterer-Population (103) konnten bei der Untersuchung an europäischen Kindern keine reproduzierbaren Assoziationen der risikotragenden Genvarianten g.1-1413 A und g.1-693 A mit atopischen Phänotypen in beiden Kohorten gefunden werden.

So besteht die Möglichkeit, dass diese Genotypen in der Hutterer-Population durch die Inzucht mit weiteren Genotypen assoziiert sind, die das Atopierisiko zusätzlich verstärken, oder dass Umweltfaktoren zusätzlich eine Rolle spielen. Die Verteilung der Allergene wird durch klimatische Faktoren in unterschiedlicher geographischer Lage beeinflusst (107). So könnte für die fehlende Reproduzierbarkeit der Assoziation der ICOS-SNPs mit allergischen Erkrankungen in verschiedenen Populationen die spezifische Allergenexposition verantwortlich sein. Die Umweltbedingungen sind in den untersuchten Kohorten jedenfalls verschieden:

In der Hutterer-Population ist als spezifisches Allergen die Küchenschabe vorherrschend (93, 103).

Es ist seit Längerem bekannt, dass die allergische Reaktivität dieses Allergens ethnisch variiert (22, 76). Gräserpollen-, Birkenpollen- und Hausstaubmilbenallergene spielen hingegen in Deutschland eine dominante Rolle bei der Entwicklung allergischer Erkrankungen (45, 107). Signifikante Differenzen zwischen den Kontinenten lassen sich als Evolutionsdruck hinsichtlich Infektionserreger deuten (10, 102). Eine Reihe an Studien verweist im Zuge der Hygienehypothese darauf, dass eine verminderte Auseinandersetzung mit bakteriellen, viralen und parasitären Pathogenen allergische Erkrankungen begünstigt (8, 10, 30, 49, 50, 83, 101, 102, 108, 119). Kinder, die auf einem Bauernhof mit hoher Endotoxin-Exposition aufwachsen, haben eine niedrige Inzidenz für allergische Erkrankungen (98). Da Hutterer zumeist Bauern sind bzw. in sehr ländlichem Umfeld leben (93), kann von einer hohen Endotoxin-Exposition in dieser Population ausgegangen werden. Wiederholte Infekte der unteren Atemwege stellten in der MAS-Kohorte ein Risiko für Asthma im Alter von sieben Jahren dar (42).

Nicht nur die Allergen- und Endotoxin-Exposition gehören zu wichtigen Umweltfaktoren für allergische Erkrankungen, sondern auch die Luftverschmutzung (8, 10) und vermutlich Lebensgewohnheiten (114). Asthmatiker unterschiedlicher Ethnizität zeigen ein unterschiedliches Verhalten bei der Anpassung an Umwelteinflüsse, wie beispielsweise hinsichtlich der Haustierhaltung und der Verwendung von Matrasenüberzügen; zudem sind die Rauchgewohnheiten unterschiedlich (100). So sind die Hutterer prinzipiell Nichtraucher (93). In der MAS-Kohorte ergab eine prä- und postnatale Tabakrauchexposition der Mutter ein erhöhtes Risiko für nutritive Sensibilisierungen (42).

Umweltfaktoren könnten also durchaus die Abweichungen zwischen der Hutterer-Population und anderen Populationen erklären.

Die Hutterer-Population zeichnet sich durch einen eher milden Asthma-Phänotyp, ein niedriges Atopierisiko von nur 50 % statt 80 % der Asthmatiker im Vergleich zu anderen weißen Populationen aus (93). Dies bekräftigt, dass es einen populationsspezifischen Selektionsdruck gegeben haben könnte. Selektion ist die natürliche Auslese durch die Umwelt. Die hier diskutierte Selektion kann, wie beschrieben, auf das Infektionserregerspektrum oder andere Umwelteinflüsse zurückgehen. Ethnische Einflüsse in Kombination mit Umweltfaktoren stellen relevante Faktoren bei der Selektion genetischer Varianten dar (10, 102). Eine These für die Aufrechterhaltung bestimmter Allelfrequenzvarianten in unterschiedlichen Populationen verschiedener Kontinente verweist also auf den zielgerichteten, am Phänotyp ansetzenden natürlichen Selektionsdruck durch die beschriebenen Umweltfaktoren. Die beobachtete Akkumulation des risikotragenden A-Allels in der Hutterer-Population könnte diverse Selektionsmechanismen widerspiegeln. Hutterer sind Immigranten mit vorwiegend deutschen Vorfahren, die um 1870, also vor ungefähr 240 Jahren, aus Russland nach Amerika einwanderten. Hutterer gehören zu einer sehr religiösen Bevölkerungsgemeinschaft, die abgeschottet von ihrer Umwelt lebt (93). Infolge dieser geographischen Isolation mag es in der Hutterer-Population unter veränderten Selektionsbedingungen in neuer Umgebung zur Entstehung einer Teilpopulation mit spezifischem Genbestand gekommen sein. Denkbar wäre also eine Anhäufung des hier untersuchten SNPs durch positive Selektion.

So ließe sich auch die Diskrepanz zwischen den Kohorten erklären. Der evolutionäre Selektionsdruck durch Ethnie und Umwelt könnte die variierenden Allelfrequenzunterschiede genetischer Polymorphismen nachvollziehbar machen.

Eine dritte Erklärung für die Abweichungen in der Allelfrequenz und die Aufrechterhaltung bestimmter Allelfrequenzvarianten verschiedener Populationen beruht auf genetischen Aspekten (10, 76, 102). Demnach gibt es im Evolutionsgeschehen nicht nur die oben genannte zielgerichtete Selektion durch die Umwelt, sondern noch die zufälligen genetisch bedingten Evolutionsfaktoren. Dazu zählen die am Genotyp ansetzende Mutation, Rekombination und Gendrift, die als Zufallsereignisse den Genpool verändern. In kleinen Populationen wie in jener der Hutterer hat die genetische Drift, die zufällige Genotypfrequenzveränderung, eine größere evolutionäre Bedeutung als in individuenreichen Populationen. In kleinen Populationen ist infolge einer Zunahme von Inzuchtpaarungen ein durch Mutation entstandenes Gen häufiger homozygot. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass in Heterozygoten verborgene rezessive nachteilige Allele miteinander kombiniert werden, in der Folge verringert sich die Individuenanzahl. Mit dem Verlust von Individuen, den Trägern von Allelen, ist wiederum ein Rückgang der genetischen Variabilität durch diese Inzuchtdepression verbunden. Bei Inzuchtlinien, die in Bezug auf möglichst viele Allele homozygot mit nahezu identischem Erbgut sind, ist die Wahrscheinlichkeit des Verlustes bestimmter Allelkombinationen groß, auch treten einzelne Allele häufiger auf. Demnach hätte es auch bei den Hutterern zu statistischen Verschiebungen bei den Häufigkeiten von Allelen kommen können. Die hohe Frequenz des risikotragenden Gens im Gegensatz zu unseren Kohorten ist darauf zurückzuführen, dass die Hutterer-Population eine stark selektierte Inzucht-Population ist. Die Hutterer bilden ein überwiegend geschlossenes genetisches System; die Isolation unterbindet den Austausch genetischen Materials.

Genetische Faktoren interagieren im Zuge von evolutionärem Druck mit sich ändernden Umweltfaktoren (10, 76, 102). Solche Gen-Umwelt-Interaktionen können ebenso eine Ursache für die Nichtübereinstimmung der Ergebnisse in der Hutterer-Population einerseits und unserer Kohorten andererseits sein.

Es besteht viertens die Möglichkeit, dass weitere Gen-Gen-Interaktionen die Unterschiede zwischen den Populationen erklären können. Für die Überlegung, dass mehrere Gene gemeinsam Einflüsse ausüben, sprechen die Befunde des starken Kopplungsungleichgewichts zwischen den ICOS-SNPs g.1-1413 G>A und g.1-693 G>A. Wie bereits in der Hutterer-Population beschrieben (103), standen auch in vorliegenden Kohorten die beiden ICOS-Polymorphismen g.1-1413 G>A und g.1-693 G>A in einem starken Kopplungsungleichgewicht. Dies lässt einen gemeinsamen Abstammungszweig und fehlende Trennung durch Rekombination aufgrund begrenzten Selektionsdrucks der SNPs vermuten. In einer finnischen Studie konnte bemerkenswertes Kopplungsungleichgewicht der 2q33-Genregion insbesondere zwischen intragenetischen SNPs der Einzelgene CD28, CTLA4 und ICOS beobachtet werden. Marker im Bereich des CD28-, CTLA4-Gens, der telomeric-flanking Regionen D2S72 und des in vorliegender Arbeit untersuchten SNPs ICOS-693 G/A waren stark miteinander assoziiert (47).

Die hier untersuchten SNPs könnten durch die enge Nachbarschaft von hohem Kopplungsungleichgewicht geprägt sein. Es ist denkbar, dass das g.1-1413 A-Allel mit weiteren entfernter liegenden ICOS- oder anderen genetischen Varianten dieser Chromosomenregion interagiert und somit für die beschriebene Atopieassoziation in der Hutterer-Population verantwortlich sein könnte.

Diese Überlegung wird gestützt durch die in verschiedenen Populationen publizierten Daten mehrerer ICOS-Varianten in dem hier untersuchten polymorphen Kandidatengen (44, 46, 54, 77). Bei Japanern wurden zwei SNPs (T)_n und (GT)_n im Intron 4 des ICOS-Gens identifiziert (54). Bei Dänen fanden sich diese beiden und drei weitere SNPs im Intron 4 sowie fünf SNPs im Intron 3 und sechs SNPs im Bereich von 3'-ÚTR (44). Bei finnischen Probanden wurden neben zwei anderen SNPs ebenfalls fünf dieser SNPs im 3'-ÚTR-Bereich gefunden sowie ein SNP im Intron 1 (46). Ihara et al. konnten einerseits Kopplungsungleichgewicht zwischen den neu entdeckten Mikrosateliten-SNPs im ICOS-Gen (T)_n und (GT)_n finden, jedoch konnte kein Kopplungsungleichgewicht zwischen den SNPs im CTLA4- und ICOS-Gen nachgewiesen werden (54). Auch Haaning et al. zeigten bei drei ICOS-SNPs ein starkes Kopplungsungleichgewicht auf. Im Rahmen der Haplotypanalyse konnte bei mehr als 100 gesunden Dänen auch ein nur schwaches oder gar kein Kopplungsungleichgewicht bei ICOS-SNPs nachgewiesen werden (44). Haimila et al. konnten bei ICOS-SNPs ein starkes Kopplungsungleichgewicht innerhalb des genomischen Segments ~1,3kb nachweisen. Ein statistisches signifikantes Kopplungsungleichgewicht wurde für einen SNP am 3'-Ende der cDNS zwischen zwei weiteren ICOS-SNPs beobachtet. Kein Kopplungsungleichgewicht wurde zwischen dem Intron1-SNP und weiteren SNPs im letzten Exon des ICOS-Gens gefunden (46).

Für die Überlegung, dass die diskrepanten Ergebnisse der SNPs auch auf weiteren, noch unbekanntem Interaktionen mit benachbarten Genen oder Genvarianten in verschiedenen Populationen beruhen

könnten, spricht des Weiteren die enge Nachbarschaft von ICOS zu den kostimulatorischen Molekülen CD28 und CTLA4, die aus einer Genduplikation hervorgegangen sind (11, 25, 77).

Ergebnisse einer in vitro Studie an menschlichen CD4+T-Zellen unterstützen die Vermutung, dass ein Effekt nicht nur durch einzelne genetische Varianten in der hier untersuchten Chromosomenregion 2q33 bedingt ist; so regulieren zwei genetische Varianten im ICOS-Gen sowohl die Expression von ICOS als auch jene von CTLA4 (63).

Viele Studien konnten bei einer Reihe an Autoimmunerkrankungen genetische Assoziationen mit CTLA4-SNPs und Marker nahe dem CTLA4-Gen aufdecken (10, 54, 66). Ling et al. vermuten sogar, dass genetische Assoziationen von Autoimmunerkrankungen mit 2q33 eher durch ICOS-SNPs als durch CD28- oder CTLA4-SNPs entstehen (77). Weitere in diversen Populationen durchgeführte Haplotypenanalysen in der Chromosomenregion 2q33 hinsichtlich rheumatoider Arthritis (64, 115), SLE (28) und Zöliakie (4, 19, 47) bekräftigen die Vermutung, es handele sich um eine genetische Interaktion in den Genen dieser kostimulatorischen Moleküle.

Die Einzel- und Multilokusanalyse von 24 kostimulatorischen Genen bei >3.000 holländischen Kindern im Alter von ein bis zwei und sechs bis acht Jahren aus drei Geburtskohorten zeigte, dass das Serum-IgE durch multiple Gen-Gen-Interaktionen im kostimulatorischen Signalweg reguliert wird. Multiple signifikante statistische Assoziationen traten u. a. in den Genen für CTLA4, CD28 und ICOS auf (17).

Analog zu den in der Literatur publizierten Daten, die in der Chromosomenregion 2q33 starke Gen-Gen-Interaktionen vermuten lassen, kann davon ausgegangen werden, dass es auch bei den hier untersuchten ICOS-SNPs einen gemeinsamen Vererbungseffekt mit anderen SNPs wie den kostimulatorischen Molekülen der CD28/B7-Familie gibt.

Nach heutigem Verständnis sind die widersprüchlichen Resultate des SNPs g.1-1413 G>A und g.1-693 G>A bei Hutterer und europäischen Kindern evtl. mit dem in verschiedenen Studien beschriebenen Modell von Gen- Gen- und SNP-SNP-Interaktionen zu erklären (48, 102, 109). Wird der Ansatz diverser genetischer Interaktionen populationsspezifisch angewandt, so eröffnet sich zumindest eine interessante Erklärungsmöglichkeit für die Diskrepanz zwischen den Kohorten. Die Annahme, dass multiple Gen-Gen- und SNP-SNP-Interaktionen die Ausprägung atopischer Phänotypen beeinflussen, müsste jedoch mit weiteren Analysen gezielt geprüft und bestätigt werden. Es erscheint sogar die Erwägung anderer noch unbekannter SNPs und deren Interaktionen erfolgversprechend zu sein.

Unterstützt werden diese Hypothesen der Gen-Gen-Interaktionen dadurch, dass das ICOS-Molekül nie alleine agiert, sondern neben anderen positiven und negativen kostimulatorischen Molekülen exprimiert wird (13, 14, 26, 59). Schließlich ist zu betonen, dass die Beteiligung vieler kostimulatorischer Moleküle an sehr komplexen Immunantworten auf multiple allergene Reize divergente Auswirkungen auf die Initiierung und Regulation der allergischen Entzündung sowie die Entwicklung allergischer Phänotypen haben könnte. Ihre Hoch- und Herunterregulation wird beeinflusst von einer Vielzahl an Transkriptionsfaktoren (9). Diese genetische und immunologische Komplexität atopischer Erkrankungen kann zu uneinheitlichen Ergebnissen genetischer Assoziationsstudien beitragen. Genetik, Umwelt und Ethnie erschweren in der Interaktion den Vergleich und ziehen kontroverse Studienergebnisse nach sich.

Mechanismen adulter Sensibilisierung, wie sie in der Hutterer-Population beobachtet werden konnten, könnten ebenfalls von der Sensibilisierung bei Kindern abweichen. Möglicherweise spielt die NFkappaB-Bindungsstelle des SNPs erst im fortgeschrittenen Alter eine Rolle. Die diskrepanten Ergebnisse könnten mithin, so die fünfte Hypothese, auf Altersunterschiede zwischen den Populationen zurückgehen. Während Erwachsene relativ fixierte Sensibilisierungen haben und oft ihre allergische Erkrankung beibehalten, ist bei Kindern ein rapider Wechsel mit der Ausbildung neuer Sensibilisierungen zu verzeichnen (24, 85).

Es ist bekannt, dass es viele Asthmaphänotypen sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen gibt (20, 36, 42, 49, 56, 65, 69, 70, 81, 95, 114). Diese Asthmaphänotypen könnten mit verschiedenen Genotypen assoziiert sein.

Ereignisse, die früh im Leben stattfinden, sind durchaus entscheidend für die Manifestation atopischer Erkrankungen und können auch erst später Einfluss nehmen (20, 50, 55, 56, 95). Was die Prädisposition zu allergischen Erkrankungen betrifft, könnte die Umweltexposition gerade in jungen Jahren zum Beispiel die Abwesenheit mikrobieller Stimuli während der Reifung des kindlichen Immunsystems und sogar schon während der Prägungsphase in utero Einfluss nehmen, darauf deuten Studien der letzten Jahre hin (8, 20, 49, 50, 69, 71, 119).

Hypothetisch könnte eine frühe Exposition gegenüber spezifischen Umweltfaktoren und eine Beeinflussung der zeitlich festgelegten genetischen Programmierung durch ICOS-Varianten die spätere Manifestation atopischer Erkrankungen begünstigen. Shilling demonstrierte die Bedeutung des SNPs g.1-1413 G>A hinsichtlich einer funktionellen NFkappaB-Bindungsstelle, wobei die Variante in der Bindung des Transkriptionsfaktors versagte (103). Von Relevanz könnte ein Ereignis mit Einfluss auf ICOS-SNPs in einem wichtigen frühen Zeitfenster, zum Beispiel während der Induktion der allergischen Sensibilisierung, sein, infolge dessen die Entwicklung von atopischen Erkrankungen in späteren Lebensjahren beeinflusst werden könnte. Das würde bedeuten, dass zu dem frühen Zeitpunkt die ICOS-SNPs g.1-1413 G>A und g.1-693 G>A bei den europäischen Kindern noch keine Rolle für allergische Erkrankungen spielen, sondern erst im späteren Leben, wie bei den erwachsenen Hutterern.

Insofern könnten die heterogenen Ergebnisse der Studien auf einen zeitlichen Einfluss genetischer Varianten im Rahmen der Manifestation atopischer Erkrankungen hinweisen. Folglich wären für möglichst frühzeitige Prädiktion genetische Marker unerlässlich.

Die ICOS-SNPs, die bei erwachsenen Hutterern mit atopischen Phänotypen assoziiert waren, bergen bei europäischen Kindern kein erhöhtes Atopie-Risiko. Zu den kontroversen Studienergebnissen mögen also ethnische und Umwelteinflüsse sowie Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen beigetragen haben. Folglich ist ein Einfluss dieser genetischen Varianten bei europäischen Kindern unwahrscheinlich, wengleich bei Erwachsenen nicht ausgeschlossen. Ob die Negativergebnisse der SNPs als Prädiktoren für die Manifestation atopischer Erkrankungen in der pädiatrischen Kohorte zu Positivergebnissen im Erwachsenenalter werden, müsste in Folgestudien in Erwachsenenkollektiven der MAS-Kinder weiter verfolgt werden. Andererseits gilt es auch die bereits bekannte Manifestation atopischer Phänotypen bei

den erwachsenen Hutterern hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs in eigenen Geburtskohorten zu überprüfen. Nur so ließen sich frühzeitig Präventionsmaßnahmen einleiten.

Die Daten belegen, dass diese beiden ICOS-SNPs sich nicht als prädiktive Marker für die Entwicklung von Atopie bei europäischen Kindern eignen. Unklar ist aber noch, ob sie vielleicht eine Rolle für einen adulten Phänotyp spielen. Schließlich zeigte das A-Allel an Position g.1-693 G>A eine transiente statistische signifikante Assoziation mit hohem spezifischem IgE gegen Gräserpollen bei MAS-Kindern im Alter von einem Jahr, diese konnte allerdings weder zu einem späteren Zeitpunkt noch in der ETAC-Kohorte verifiziert werden.

5.4 Suche nach Assoziationen zwischen weiteren ICOS-SNPs an putativen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und atopischen Erkrankungen

Bei den vier an putativen regulatorischen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren lokalisierten ICOS-Varianten zeigten sich in beiden pädiatrischen Kohorten Assoziationen mit atopischen Phänotypen.

Bei den drei ICOS-Varianten g.1-2144 C>T, g.1-2419 T>C und g.20065 C>G konnten statistische signifikante Assoziationen mit einer Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen in der MAS-Kohorte nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, dass das C-Allel an Position g.1-2419 T>C auch statistisch signifikant mit hohem Gesamt-IgE, erniedrigter FEV1 und Asthma bronchiale in der MAS-Kohorte assoziiert war. In der ETAC-Kohorte konnte für diesen SNP eine statistische signifikante Assoziation mit hohem spezifischem IgE gegen Gräserpollen und hohem Gesamt-IgE im Serum im Alter von 2-3 Jahren gezeigt werden. Zudem konnte in der ETAC-Kohorte für das C-Allel an Position g.20065 C>G die Assoziation mit einer Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen reproduziert werden.

Wichtigstes Ergebnis der Evaluation der an putativen Regulationsstellen gelegenen ICOS-SNPs war der Nachweis signifikanter Assoziationen mit einer Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen bei drei SNPs in der MAS-Kohorte. Bei dem zunächst untersuchten ICOS-Promotor-Polymorphismus g.1-2144 T zeigte sich eine statistische signifikante Assoziation mit einer Sensibilisierung gegen Gräserpollen im ersten Lebensjahr sowohl im Chi²-Test als auch im Wilcoxon-Test. Ähnliche Ergebnisse der Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen wurden in der MAS-Kohorte für die SNPs g.1-2419 C und g.20065 G ermittelt. Bei dem zweiten untersuchten SNP g.1-2419 C wurde die Assoziation gegen Gräserpollen im ersten Lebensjahr im Chi²-Test, im Fishers exaktem Test und im Wilcoxon-Test nachgewiesen. Bezogen auf den dritten SNP g.20065 G erwies sich ebenfalls eine Assoziation mit Gräserpollensensibilisierung im ersten Lebensjahr im Chi²- und Wilcoxon-Test.

Das Risiko für eine frühzeitige spezifische Sensibilisierung ist genetisch bedingt (36, 90, 111). Mütterliche und väterliche Sensibilisierung gegen Gräserpollen ging mit einem signifikant erhöhten Risiko der Sensibilisierung gegen Gräserpollen auch bei den Nachkommen einher (87). Wie wichtig genetische Marker hinsichtlich spezifischer allergischer Sensibilisierung gegenüber Aeroallergene für die Prädiktion sind, zeigen mehrere Studien: Die Aeroallergensensibilisierung gehört nachweislich zu den Hauptrisikofaktoren für Asthma (18, 55, 56, 58, 70, 84, 85, 95, 110). Aeroallergensensibilisierung ist jedoch nicht nur mit Asthma bronchiale, sondern auch mit atopischer Dermatitis und/ oder mit Heuschnupfen assoziiert (18, 85, 105). Hader et al. konstatierten im Zuge der Überprüfung zehn wichtiger Aeroallergene bei deutschen Schulkindern im Alter von sieben bis sechzehn Jahren die hohe Prävalenz der Aeroallergensensibilisierung als wichtigen Risikofaktor für allergische Erkrankungen im Kindesalter (45).

Die Betrachtung der ETAC-Kohorte stellt die erste Studie dar, die auch Gräserpollen als Prädiktor für Asthma einbezieht (31, 37, 116). Zuvor bekannt war eine starke Assoziation der Gräserpollensensibilisierung mit Heuschnupfen in einer adulten europäischen Population von 3.985 Individuen (6). In einer Geburtskohorte, die mehr als 1.000 Kinder im Alter von einem, zwei und vier Jahren in Großbritannien einschloss und mittels Hautpricktest untersuchte, zeigten die 77 gegen Gräserpollen sensibilisierten Kinder eine starke Assoziation mit der Prävalenz allergischer Erkrankungen: 65 % hatten eine allergische Erkrankung; 42 % hatten Asthma bronchiale, 25 % Heuschnupfen und 39 % atopische Dermatitis (7).

Entscheidend scheint gerade die frühe Sensibilisierung zu sein. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der aufgezeigten Assoziation einer Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen bei ICOS-Varianten unterstreicht die Möglichkeit, schon sehr früh Maßnahmen zur Primärprävention bei Hochrisikokindern einleiten zu können. Mehrere Autoren betonen, dass die ersten Lebensjahre während der Entwicklung des Immunsystems entscheidend für die spätere Allergikerkarriere seien (8, 50, 55, 56, 70). In einer longitudinalen Studie wurde zum Beispiel bei über 1.000 deutschen Kindern spezifisches IgE mit zwölf Monaten und im weiteren Verlauf bis sechs Jahre bestimmt. Die Kinder mit Frühsensibilisierung gegen Aeroallergene im ersten Lebensjahr hatten das höchste Risiko für die Entwicklung atopischer Erkrankungen wie atopische Dermatitis, Heuschnupfen und Asthma (18). Die Relevanz der frühen allergischen Sensibilisierung als Prädiktor für Giemen im Alter von dreizehn Jahren nimmt mit zunehmendem Manifestationsalter von Giemen ab (84). Viele vorangegangene Untersuchungen verweisen darauf, dass ein frühkindliches Sensibilisierungsmuster dem Asthma vorausgeht und demnach einen hohen prädiktiven Wert für die spätere Entwicklung allergischer Erkrankungen hat (18, 29, 55, 56, 85, 116). Dass gerade prädiktive Marker hinsichtlich des früh erhöhten spezifischen IgE gegen Gräserpollen entscheidend sind, konnte, wie gesagt, in der ETAC-Kohorte eindrucksvoll aufgezeigt werden. So senkte das Antihistaminikum Cetirizin bei Hochrisikokindern mit positiver atopischer Familienanamnese und atopischer Dermatitis die Asthmainzidenz auf die Hälfte in der Subgruppe der Kinder mit früher Gräserpollensensibilisierung (31, 37, 116).

Gemäß vorliegender Arbeit scheint die Assoziation der ICOS-SNPs mit einer Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen als prädiktive Marker gerade wegen des hohen Asthmarisikos sehr relevant zu sein. Entscheidend wäre demzufolge der frühe Zeitpunkt der Einleitung von Präventionsmaßnahmen wie zum Beispiel die Einnahme von Cetirizin bei risikotragenden Individuen.

Interessant ist, dass der SNP g.1-2419 C weitere Assoziationen mit anderen atopischen Phänotypen aufweist. Die Bedeutung des mit einer Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen und hohem Gesamt-IgE im Alter von zwei bis fünf Jahren assoziierten ICOS-SNPs g.1-2419 C könnte angesichts weiterer Assoziationen mit reduzierter FEV1 im Alter von sieben Jahren und Asthma bronchiale im Alter von zehn Jahren in der Ausbildung eines zwar seltenen, aber klinisch relevanten schweren Asthma-Phänotyps liegen. Kinder, die homozygot für das C-Allel waren, hatten signifikant niedrigere PC20FEV1-Werte als heterozygote oder homozygote Kinder für das T-Allel.

Demnach sind genetische Determinanten für eine reduzierte Ruhelungenfunktion dieses SNPs anzunehmen. Eine niedrige Lungenfunktion in früher Kindheit beeinflusst den Verlauf von Asthma bronchiale im jungen Erwachsenenalter; eine reduzierte Lungenfunktion und die bronchiale Hyperreagibilität sind Schlüsselkomponenten für Asthma (20, 91, 95, 107, 110). Dies scheint – im Gegensatz zu den anderen beiden SNPs, bei denen zwar auch eine Assoziation mit einer Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen, nicht aber eine statistische Signifikanz hinsichtlich veränderter Lungenfunktion und Asthma gefunden werden konnte – für einen speziellen Asthma-Phänotyp bei der Variante g.1-2419 C mit differentem klinischem Verlauf zu sprechen.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung einer frühzeitigen Programmierung allergischer Erkrankungen könnte speziell der hier untersuchte ICOS-SNP g.1-2419 C dank der Möglichkeit, Präventionsmaßnahmen einzuleiten, die Weichen für atopische Erkrankungen im späteren Leben stellen.

Um die Assoziationen der drei SNPs mit einer Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen zu verifizieren, wurde die ETAC-Kohorte hinzugezogen, die noch mehr Kinder mit einem hohen Risiko der Frühsensibilisierung gegen Inhalationsallergene einschloss. In der ETAC-Kohorte hatten 9,8 % der 566 Patienten, die in der Nachbeobachtungsphase waren, ein erhöhtes spezifisches IgE gegen Gräserpollen (8,7 % in der Placebogruppe und 10,8 % in der Cetirizingruppe) (116). Entsprechend waren es 10,7 % der 795 Patienten aus der Intention-To-Treat-Population (10,4 % in der Placebogruppe und 10,9 % in der Cetirizingruppe) (33). Die Assoziation der SNPs mit einer transienten Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen in der MAS-Kohorte, die bei einem SNP dem Asthma bronchiale vorausging, bestätigte sich in der ETAC-Kohorte für den SNP g.1-2419 C.

Übereinstimmend zur MAS-Kohorte war das C-Allel an Position g.1-2419 T>C auch mit hohen Gesamt-IgE-Werten assoziiert. Es kann hier davon ausgegangen werden, dass ein Zusammenhang der Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen mit der Genotypverteilung insbesondere hinsichtlich des SNPs g.1-2419 C mit klinischer Relevanz wahrscheinlich ist, da diese ICOS-Variante auch später mit niedriger Lungenfunktion und Asthma in der MAS-Kohorte assoziiert war.

Daher kann die These aufgestellt werden, dass sich der zu einem erhöhten Risiko einer Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen auf die Entwicklung eines persistierenden Asthmas im späteren Leben auswirkende SNP g.1-2419 C als Marker für Atopieprädisposition bei europäischen Kindern eignet.

5.5 Assoziation des ICOS-SNPs g.22126 G>T mit atopischer Dermatitis und spezifischer Sensibilisierung gegen Kuhmilch

Interessanterweise konnte bei der vierten ICOS-Variante g.22126 G>T eine Assoziation mit atopischer Dermatitis und Kuhmilchsensibilisierung bei Kindern im Alter von sieben Jahren in der MAS-Kohorte gefunden werden. Nahrungsmittelsensibilisierungen sind bei Kindern mit atopischem Ekzem häufig. Ein Drittel aller Kinder mit schwerer atopischer Dermatitis leidet unter einer Nahrungsmittelallergie (75). Es gibt eine Assoziation von schwerer atopischer Dermatitis mit Kuhmilchsensibilisierung für das Outcome, die Persistenz und die Erkrankungsschwere (120). Weitere Studien verweisen darauf, dass sowohl das atopische Ekzem (21, 69) als auch Nahrungsmittelsensibilisierungen (18, 69, 73, 90, 105, 124) mit anderen atopischen Erkrankungen einhergehen können. Entsprechend sind für beide Erkrankungen genetische Marker als Prädiktoren wichtig.

Des Weiteren besteht bei Ekzem und Nahrungsmittelallergie ein signifikanter Zusammenhang mit einem frühen Ausbruch von persistierendem Giemen (69). Die Wichtigkeit genetischer Marker für atopische Dermatitis zeigt sich mithin nicht zuletzt darin, dass die Manifestation schon sehr früh im Leben einsetzt. Bei 71,8 % entwickelt sich die atopische Dermatitis bereits in den ersten sechs Lebensmonaten (71). In der MAS-Kohorte lag der Inzidenzgipfel im ersten Lebensjahr (12,9 %), die höchste Periodenprävalenz im dritten Lebensjahr (13,6 %) (42).

Im natürlichen Verlauf der allergischen Sensibilisierung gegen nutritive Allergene ist das frühe Kindesalter ebenso von maßgeblicher Bedeutung (7, 42, 90, 114). Sensibilisierungen gegenüber Kuhmilch gehören zu den frühesten IgE-Antworten (51, 55, 68, 71).

Gegen eine klinische Relevanz des hier untersuchten SNPs mit atopischer Dermatitis und Kuhmilchsensibilisierung könnte die späte Assoziation im siebten Lebensjahr sprechen. Mehrere Studien verweisen auf den hohen prädiktiven Wert der Frühsensibilisierung (29, 73, 85, 90). Die Frühsensibilisierung gegen Nahrungsmittel im ersten Lebensjahr ist ein Prädiktor für die Entwicklung atopischer Erkrankungen mit sechs Jahren bei Kindern mit positiver atopischer Familienanamnese (18). Die frühe Identifizierung von Kindern mit atopischem Ekzem und oder Nahrungsmittelallergien könnte Präventionsmaßnahmen hinsichtlich der Entwicklung des „allergischen Marsches“ bereitstellen (51).

Die in vorliegender Untersuchung erst spät, im Alter von sieben Jahren, aufgetretene genetische Assoziation des ICOS-SNPs mit atopischer Dermatitis und einer Nahrungsmittelsensibilisierung lässt Zweifel an der klinischen Relevanz aufkommen.

Zahlreiche Kandidatengenstudien haben multiple genetische Varianten mit Assoziationen zu allergischen Erkrankungen aufgedeckt (10, 16, 83, 93, 102, 109). Allerdings konnten nur wenige der Studien konsistente Ergebnisse mit demselben atopischen Phänotyp in mehr als einer Population reproduzieren.

Generell geht die kontroverse Datenlage von mit Atopie assoziierten Kandidatengenstudien auch auf die fehlende Korrektur des Fehlerniveaus zurück (48, 102). Bezüglich der hier untersuchten Chromosomenregion konnte nach Korrektur für multiples Testen die Assoziation des zuvor assoziierten SNPs g.20065 G mit einer Frühsensibilisierung gegenüber Gräserpollen weder in der MAS-Kohorte noch in der ETAC-Kohorte nachgewiesen werden (MAS $p=0,107$; ETAC $p=0,058$).

Durch Annahme einer zu geringen Zahl sich in Wechselwirkung befindlicher Genvarianten und Allelkombinationen kann es zur Minderung der Aussagekraft kommen. In diesem Zusammenhang ist die Wichtigkeit großer Fallzahlen zu betonen, um auch kleine genetische Unterschiede nicht zu übersehen (10).

Die genetische Heterogenität prägt das Bild der klinisch stark variablen phänotypischen Ausprägung allergischer Erkrankungen nicht allein. Atopische Erkrankungen sind komplexe genetische Erkrankungen mit vielen ursächlichen Genvarianten, die nicht zwingend den mendelschen Vererbungsregeln folgen und zudem starke Abhängigkeit von Umwelteinflüssen unterliegen (83, 102, 109). Umwelteinflüsse bedingen die geringe Reproduzierbarkeit genetischer Studien, wie auch unsere Ergebnisse hinsichtlich der unterschiedlichen Allelfrequenzen der ICOS-SNPs bei Hutterer und europäischen Kindern vermuten lassen. Hierbei wird die Bedeutung standardisierter Umweltfaktoren nachvollziehbar, was kaum realisierbar ist. Dazu gehört die differenzierte Betrachtung von Expositionsfaktoren aus der belebten und unbelebten Natur, wie Umweltschadstoffe, unterschiedliche allergene Potenz und eine Kombination noch nicht bekannter Umweltfaktoren. Die Identifizierung solcher Umwelteinflüsse ist allerdings aufwendig. Zu beachten ist zudem der natürliche Selektionsdruck unter verschiedenen Umwelteinflüssen wie der mikrobiellen Exposition durch Viren, Bakterien und Parasiten. Der Genotyp gibt einen mehr oder weniger begrenzten Rahmen für die Reaktionen auf Umwelteinflüsse bei der Merkmalsausprägung vor. Durch eine entsprechende Modifikabilität kann sich der Organismus an die herrschenden Umweltbedingungen anpassen. Der Phänotyp eines Organismus entsteht erst aus dem Zusammenspiel von Genotyp und Umwelteinflüssen. In der Folge können sich Organismen unter variierenden Umweltbedingungen trotz gleicher genetischer Information erheblich voneinander unterscheiden. Umwelteinflüsse können beispielsweise eine inkomplette Penetranz bewirken, sodass trotz Prädisposition keine Erkrankung resultiert. Da im Sinne der Polyphänie bzw. Pleiotropie mehrere Merkmale auf die Ausprägung nur einer Erbanlage zurückzuführen sind, spielt der Umwelteinfluss eine umso größere Rolle.

Mehrere Gene in Kombination mit Umweltfaktoren bedeuten eine komplexe gegenseitige Einflussnahme. Dieser Genotyp-Phänotyp-Zusammenhang durch Gen-Umwelt-Interaktionen (8, 10, 16, 20, 27, 76, 83, 89, 95, 102, 108, 109), der die Heterogenität allergischer Erkrankungen verstärkt, muss bei genetischen Analysen beachtet werden. Speziell bei Allergien ist eine eingeschränkte Standardisierung in Folge der multifaktoriellen Genese zu berücksichtigen. Nichtsdestotrotz kann eine einzige Mutation eine klinisch manifeste Erkrankung nach sich ziehen.

Die Arbeit zeigt, dass der in der Promotorregion des ICOS-Gens lokalisierte SNP g.1-2419 C signifikant mit der Entwicklung allergischer Phänotypen in den beiden prospektiven pädiatrischen Kohorten assoziiert war. Vorliegende Untersuchung konstatiert zudem ein interessantes Ergebnis bezüglich der ICOS-Variante g.22126 T als Marker für späte atopische Dermatitis und Kuhmilchsensibilisierung bei MAS-Kindern, was auf einen persistierenden Krankheitsverlauf hinweisen könnte. Die Ergebnisse legen nahe, dass sich die ICOS-Varianten g.1-2419 C und g.22126 T als diagnostische Marker für Atopie bei europäischen Kindern eignen. Weitere Studien müssten angeschlossen werden, um die klinische Tauglichkeit der beiden Polymorphismen im ICOS-Gen zu verifizieren. Zur vertiefenden Evaluation möglicher SNP-SNP-Interaktionen würden es Gen-Array Analysen möglich machen, viele Gene auf einmal zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs Varianten im ICOS-Gen auf eine Assoziation mit atopischen Phänotypen in zwei großen europäischen pädiatrischen prospektiven Kohorten untersucht.

Die Genotypisierung der Polymorphismen erfolgte mit Hilfe eines PCR-basierten Verfahrens am LightCycler durch Schmelzkurvenanalyse der DNS.

Die zuvor in einer Hutterer-Population beschriebenen Assoziationen der ICOS-Polymorphismen g.1-1413 A und g.1-693 A mit erhöhtem Gesamt-IgE und spezifischer Sensibilisierung gegen Aeroallergene konnten in den beiden pädiatrischen Populationen nicht bestätigt werden. Von vier weiteren untersuchten Polymorphismen an potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zeigten drei signifikante Assoziationen mit der Frühsensibilisierung gegen Gräserpollen in der MAS-Kohorte, der Polymorphismus g.1-2419 C war zusätzlich mit Asthma bronchiale, hohem Gesamt-IgE und bronchialer Hyperreagibilität assoziiert, was in einer zweiten Kohorte hinsichtlich erhöhtem spezifischem IgE gegen Gräserpollen und hohem Gesamt-IgE im Serum verifiziert werden konnte. Der vierte Polymorphismus, g.22126 T, war mit atopischer Dermatitis und Kuhmilchsensibilisierung in der MAS-Kohorte assoziiert. Nicht alle Assoziationen der ICOS-Polymorphismen mit atopischen Phänotypen in der MAS-Kohorte ließen sich in der ETAC-Kohorte verifizieren.

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass genetische Varianten von kostimulatorischen Molekülen wegen der herausragenden Bedeutung der T-Zellaktivierung bei der Ausbildung der allergischen Immunreaktion eine besondere Rolle spielen können. Aufgrund des seltenen Vorkommens der untersuchten Polymorphismen in den beiden Kohorten ist es jedoch schwierig, eine eindeutige Aussage über die Bedeutung dieser Polymorphismen bei der Entwicklung atopischer Phänotypen auszusprechen. Offen bleibt auch die Frage, ob die genetischen Veränderungen in der ICOS-Genregion zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber allergischen Erkrankungen bei Erwachsenen führen. Weitere Studien bei erwachsenen Atopikern sollten angeschlossen werden, um in großen Populationen speziell die ICOS-Polymorphismen g.1-2419 C und g.22126 T zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

1. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med.* 2002;8(9):1024-32.
2. Allergieprävention. Evidenzbasierte und konsentrierte Leitlinie. Borowski C, Schäfer T. Im Auftrag des Aktionsbündnisses Allergieprävention (ABAP). Medizin & Wissen. Urban & Vogel GmbH, München 2005.
3. Allergologie-Handbuch. Saloga J, Klimek L, Buhl R, Mann W, Knop J. Schattauer GmbH, Stuttgart 2006, S. 217
4. Amundsen SS, Nalwai AT, Ascher H, Ek J, Gudjónsdóttir AH, Wahlström J, Lie BA, Sollid LM. Genetic analysis of the CD28/CTLA4/ICOS (CELIAC3) region in coeliac disease. *Tissue Antigens.* 2004;64(5):593-9.
5. Antonarakis SE. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Human Mutation* 1998; 11 (1): 1-3.
6. Arshad SH, Karmaus W, Matthews S, Mealy B, Dean T, Frischer T, Tsitoura S, Bojarskas J, Kuehr J, Forster J; Association of allergy-related symptoms with sensitisation to common allergens in an adult European population. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2001a;11(2):94-102.
7. Arshad SH, Tariq SM, Matthews S, Hakim E. Sensitization to common allergens and its association with allergic disorders at age 4 years: a whole population birth cohort study. *Pediatrics.* 2001b;108(2):E33.
8. Babu KS, Arshad SH. The role of allergy in the development of airway inflammation in children. *Paediatr Respir Rev.* 2003;4(1):40-6. Review.
9. Barnes PJ, Adcock IM. Transcription factors and asthma. Review, *Eur Respir J* 1998, 12:221-234.
10. Barnes KC. Genetic epidemiology of health disparities in allergy and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(2):243-54; quiz 255-6. Review.
11. Beier KC, Hutloff A, Dittrich AM, Heuck C, Rauch A, Büchner K et al. Induction, binding specificity and function of human ICOS. *European Journal of Immunology* 2000; 30 (12): 3707-3717.
12. Beier KC, Hutloff A, Löhning M, Kallinich T, Kroczeck RA, Hamelmann E. Inducible costimulator-positive T cells are required for allergen-induced local B-cell infiltration and antigen-specific IgE production in lung tissue. *J Allergy Clin Immunol* 2004, 114: 775-82.
13. Beier KC, Kallinich T, Hamelmann E. Mini-Series "T-cell co-stimulatory molecules", Number 1: Master switches of T- cell activation and differentiation. *Eur Respir J* 2007a, 29:804-812.
14. Beier KC, Kallinich T, Hamelmann E. Mini-Series "T-cell co-stimulatory molecules", Number 3: T-cell co-stimulatory molecules: novel targets for the treatment of allergic airway disease. *Eur Respir J* 2007b, 30:383-390.
15. Bergmann R; Woodcock A. Whole population or high-risk group? Childhood asthma. *Eur Respir J Suppl.* 1998; 27: 9s-12s. Review.
16. Blumenthal MN. The role of genetics in the development of asthma and atopy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2005; 5 (2): 141-145.

17. Bottema RW, Postma DS, Reijmerink NE, Thijs C, Stelma FF, Smit HA, van Schayck CP, Brunekreef B, Koppelman GH, Kerkhof M. Interaction of T-cell and antigen presenting cell co-stimulatory genes in childhood IgE. *Eur Respir J*. 2010;35(1):54-63.
18. Brockow I, Zutavern A, Hoffmann U, Grübl A, von Berg A, Koletzko S, Filipiak B, Bauer CP, Wichmann HE, Reinhardt D, Berdel D, Krämer U, Heinrich J; GINIplus Study Group. Early allergic sensitizations and their relevance to atopic diseases in children aged 6 years: results of the GINI study. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19(3):180-7.
19. Brophy K, Ryan AW, Thornton JM, Abuzakouk M, Fitzgerald AP, McLoughlin RM, O'morain C, Kennedy NP, Stevens FM, Feighery C, Kelleher D, McManus R. Haplotypes in the CTLA4 region are associated with coeliac disease in the Irish population. *Genes Immun*. 2006;7(1):19-26.
20. Bush A, Menzies-Gow A. Phenotypic differences between pediatric and adult asthma. *Proc Am Thorac Soc*. 2009 Dec;6(8):712-9. Review.
21. Businco L, Marziali M, Furcolo G, Meglio P. [From atopic dermatitis to asthma]. *Minerva Pediatr*. 1997;49(10):477-81. Review.
22. Celedón JC, Sredl D, Weiss ST, Pisarski M, Wakefield D, Cloutier M. Ethnicity and skin test reactivity to aeroallergens among asthmatic children in Connecticut. *Chest*. 2004;125(1):85-92.
23. Chen YQ, Shi HZ. CD28/CTLA-4-CD80/CD86 and ICOS-B7RP-1 costimulatory pathway in bronchial asthma. *Allergy* 2006, 61: 15-26.
24. COLLINS-WILLIAMS C. Allergy in children versus allergy in adults. *Can Med Assoc J*. 1958 15;78(4):276-9.
25. Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S et al. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 2000; 13 (1): 95-105.
26. Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The role of ICOS and other costimulatory molecules in allergy and asthma. *Springer Seminars in Immunopathology*. 2004; 25 (3-4): 349-59.
27. CSGA. A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. *Nat Genet*. 1997, 15 (4): 389-392.
28. Cunninghame Graham DS, Wong AK, McHugh NJ, Whittaker JC, Vyse TJ. Evidence for unique association signals in SLE at the CD28-CTLA4-ICOS locus in a family-based study. *Hum Mol Genet*. 2006 1;15(21):3195-205
29. Dean T, Venter C, Pereira B, Arshad SH, Grundy J, Clayton CB, Higgins B. Patterns of sensitization to food and aeroallergens in the first 3 years of life. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(5):1166-71.
30. de Benedictis FM, Franceschini F, Hill D, Naspitz C, Simons FE, Wahn U, Warner JO, de Longueville M; EPAAC Study Group. The allergic sensitization in infants with atopic eczema from different countries. *Allergy*. 2009 ;64(2):295-303.
31. de Longueville M; ETAC Study Group (Early Treatment of the Atopic Child). What are the candidate groups for pharmacotherapeutic intervention to prevent asthma? *Pediatr Allergy Immunol*. 2000;11 Suppl 13:41-4. Review.
32. Depner M. Genetische Determinanten von Asthma Methodik und Anwendung. Dissertation 2009
33. Diepgen TL; Long-term treatment with cetirizine of infants with atopic dermatitis: a multi-country, double-blind, randomized, placebo-controlled trial (the ETAC trial) over 18 months. *Pediatr Allergy Immunol*. 2002;13(4):278-86.

34. Dizier MH, Besse-Schmittler C, Guilloud-Bataille M, Annesi-Maesano I et al. Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEA study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 162: 1812-1818
35. Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, Flavell RA. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 2001; 409 (6816): 97-101.
36. Duffy DL, Mitchell CA, Martin NG. Genetic and Environmental Risk Factors for Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 157 (3): 840-845.
37. ETAC Study Group. Allergic factors associated with the development of asthma and the influence of cetirizine in a double-blind, randomized, placebo-controlled trial: first results of ETAC. *Pediatr Allergy Immunol.* 1998; 9 (3): 116-124
38. Gold MS, Kemp AS. Atopic disease in childhood. *MJA Practice Essentials-Paediatrics.* 2005; 182(6): 298-304.
39. Gonzalo JA, Tian J, Delaney T, Corcoran J, Rottman JB, Lora J, Al-garawi A, Kroczeck R, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ. ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses. *Nat Immunol.* 2001;2(7):597-604.
40. Gore C, Custovic A. Can we prevent allergy? *Allergy* 2004; 59 (2):151-161.
41. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Drager R et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nature Immunology* 2003; 4 (3): 261-8.
42. Grüber C, Lau S, Nickel R, Kulig M, Bergmann R, Forster J, Bauer CP, Illi S, von Mutius E, Wahn V, Bergmann KE, Wahn U. Zehn Jahre Multizentrische Allergiestudie. MAS-90. *ImpfDialog* 4 / 2002 183-187
43. Haagerup A, Bjerke T, Schøtz PO, Binderup HG, Dahl R, Kruse TA. Allergic rhinitis--a total genome-scan for susceptibility genes suggests a locus on chromosome 4q24-q27. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(12):945-52.
44. Haaning Andersen AD, Lange M, Lillevang ST. Allelic variation of the inducible costimulator (ICOS) gene: detection of polymorphisms, analysis of the promoter region, and extended haplotype estimation. *Tissue Antigens* 2003; 61 (4): 276-85.
45. Hader S, Kühr J, Urbanek R. [Sensitization to 10 important air-borne allergens in school children]. *Monatsschr Kinderheilkd.* 1990 Feb;138(2):66-71. German.
46. Haimila KE, Partanen JA, Holopainen PM. Genetic polymorphism of the human ICOS gene. *Immunogenetics* 2002; 53 (12): 1028-32.
47. Haimila K, Smedberg T, Mustalahti K, Mäki M, Partanen J, Holopainen P. Genetic association of coeliac disease susceptibility to polymorphisms in the ICOS gene on chromosome 2q33. *Genes Immun.* 2004;5(2):85-92.
48. Hoffjan S, Nicolae D, Ober C. Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respiratory Research* 2003, 4: 14.
49. Holloway JW, Yang IA, Holgate ST. Interpatient variability in rates of asthma progression: can genetics provide an answer? *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(3):573-9.
50. Holt PG, Jones CA. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy.* 2000;55(8):688-97. Review. No abstract available.
51. Høst A, Halken S. Practical aspects of allergy-testing. *Paediatr Respir Rev.* 2003;4(4):312-8.

52. Howard TD, Postma DS, Hawkins GA, Koppelman GH, Zheng SL, Wysong AKS, Xu J, Meyers DA and Bleecker ER. Fine mapping of an IgE-controlling gene on chromosome 2q: Analysis of CTLA4 and CD28. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110 (5): 743-51.
53. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999; 397 (6716): 263-6.
54. Ihara K, Ahmed S, Nakao F, Kinukawa N, Kuromaru R, Matsuura N et al. Association studies of CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphisms with type 1 diabetes in the Japanese population. *Immunogenetics* 2001; 53 (6): 447-54.
55. Illi S, von Mutius E, Lau S, Nickel R, Niggemann B, Sommerfeld C, Wahn U. Multicenter Allergy Study Group. The pattern of atopic sensitization is associated with the development of asthma in childhood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001 (108): 709-714.
56. Illi S, von Mutius, Lau S, Niggemann B, Grüber C, Wahn U. Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study. *Lancet* 2006; 368(9537):763-70.
57. ISSAC: Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Lancet.* 1998; 351 (9111): 1225-32.
58. Jedrychowski W, Flak E, Mróz E, Lis G. [Sensitization to common airborne allergens in school children with bronchial asthma]. *Przegl Lek.* 2000;57(9):441-5. Review. Polish.
59. Jen KY, Jain VV, Makani S, Finn PW. Immunomodulation of allergic responses by targeting costimulatory molecules. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2006, 6: 489-494.
60. Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 1987; 51(6):1079-90.
61. Kallinich T, Beier KC, Gelfand EW, Kroczeck RA, Hamelmann E. Co-stimulatory molecules as potential targets for therapeutic intervention in allergic airway disease. *Clinical & Experimental Allergy* 2005; 35: 1521-1534.
62. Kallinich T, Beier KC, Wahn U, Stock P, Hamelmann E. Mini-series "T-Cell Co-Stimulatory Molecules", Number 2: T-cell co-stimulatory molecules: their role in allergic immune reactions. *Eur Respir J* 2007; 29: 1246-1255.
63. Kaartinen T, Lappalainen J, Haimila K, Autero M, Partanen J. Genetic variation in ICOS regulates mRNA levels of ICOS and splicing isoforms of CTLA4. *Mol Immunol* 2007; 44(7):1644-51.
64. Kim YO, Kim HJ, Kim SK, Chung JH, Hong SJ. Association of the CD28/CTLA4/ICOS polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med* 2010 ; 48(3) :345-53
65. Koppelman GH, Stine OC, Xu J, Howard TD, Zheng SL, Kauffman HF, Bleecker ER, Meyers DA and Postma DS. Genome-wide search for atopy susceptibility genes in Dutch families with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002: 109 (3): 498-506.
66. Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases--a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun.* 2000;1(3):170-84.
67. Kulig M, Bergmann R, Niggemann B, Burow G, Wahn U. The MAS Study Group. Prediction of sensitization to inhalant allergens in childhood: evaluating family history, atopic dermatitis and sensitization to food allergen. *Clin Exp Allergy* 1998; 28 (11): 1397-1403.
68. Kulig M, Bergmann R, Klettke U, Wahn V, Tacke U, Wahn U. Natural course of sensitization to food and inhalant allergens during the first 6 years of life. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:1173-1179

69. Kurukulaaratchy RJ, Matthews S, Arshad SH. Does environment mediate earlier onset of the persistent childhood asthma phenotype? *Pediatrics*. 2004;113(2):345-50.
70. Kurukulaaratchy RJ, Matthews S, Arshad SH. Defining childhood atopic phenotypes to investigate the association of atopic sensitization with allergic disease. *Allergy*. 2005;60(10):1280-6.
71. Kusel MM, Holt PG, de Klerk N, Sly PD. Support for 2 variants of eczema. *Allergy Clin Immunol*. 2005;116(5):1067-72.
72. Lau S, Illi S, Sommerfeld C, Niggemann B, Bergmann R, von ME et al. Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. Multicentre Allergy Study Group. *Lancet* 2000; 356 (9239): 1392-1397.
73. Lau S, Nickel R, Niggemann B, Grüber C, Sommerfeld C, Illi S, Kulig M, Forster J, Wahn U, Groeger M, Zepp F, Kamin W, Bieber I, Tacke U, Wahn V, Bauer CP, Bergmann R, von Mutius E; MAS Group. The development of childhood asthma: lessons from the German Multicentre Allergy Study (MAS). *Paediatr Respir Rev*. 2002;3(3):265-72. Review.
74. Leitlinien Kinderheilkunde und Jugendmedizin. Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin. Urban und Fischer. München, Jena 2005.
75. Leitlinie 2008. Vorgehen bei vermuteter Nahrungsmittelallergie bei atopischer Dermatitis. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft Allergologie und klinische Immunologie, dem Ärzteverband Deutscher Allergologen und der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie. Nr. 061/010. Stand: 01.04.2008 , gültig bis 01.12.2011
76. Lester LA, Rich SS, Blumenthal MN, Togias A, Murphy S, Malveaux F, Miller ME, Dunston GM, Solway J, Wolf RL, Samet JM, Marsh DG, Meyers DA, Ober C, Bleecker ER; Collaborative Study on the Genetics of Asthma. Ethnic differences in asthma and associated phenotypes: collaborative study on the genetics of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(3):357-62.
77. Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Agostino MJ, Graham JR, Chen S, Jussiff JM, Fisk GJ, Miller CP, Collins M. Assembly and annotation of human chromosome 2q33 sequence containing the CD28, CTLA4, and ICOS gene cluster: analysis by computational, comparative, and microarray approaches. *Genomics* 2001, 78 (3): 155-168.
78. Lohmann S, Lehmann L, Tabiti K. Fast and Flexible Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection with the LightCycler System. Roche Molecular Biochemicals, Penzberg, Germany. BIOCHEMICA No. 4 m 2000 ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS. 23-28
79. Löhning M, Hutloff A, Kallinich T, Mages HW, Bonhagen K, Radbruch A et al. Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *The Journal of Experimental Medicine* 2003; 20; 197 (2): 181-93.
80. Lombardi V, Singh AK, Akbari O. The role of costimulatory molecules in allergic disease and asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;151:179-189.
81. Lowe L, Custovic A, Woodcock A. Childhood asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2004; 4 (2): 159-65.
82. Lyon E, Wittwer CT. LightCycler technology in molecular diagnostics. *J Mol Diagn*. 2009, 11(2):93-101.
83. Maddox L, Schwartz DA. The pathophysiology of asthma. *Annual Review of Medicine* 2002; 53: 477-98.
84. Matricardi PM, Illi S, Grüber C, Keil T, Nickel R, Wahn U, Lau S. Wheezing in childhood: incidence, longitudinal patterns and factors predicting persistence. *Eur Respir J* 2008;32:585-592.

85. Matricardi PM, Bockelbrink A, Keil T, Grüber C, Niggemann B, Hamelmann E, Wahn U, Lau S. Dynamic evolution of serum immunoglobulin E to airborne allergens throughout childhood: results from the Multi-Centre Allergy Study birth cohort. *Clin Exp Allergy*. 2009 39(10):1551-7.
86. McAdam AJ, Chang TT, Lumelsky AE, Greenfield EA, Boussiotis VA, Duke-Cohan JS et al. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *The Journal of Immunology* 2000; 165 (9): 5035-40.
87. Misiak RT, Wegienka G, Havstad S, Ownby DR, Johnson CC, Zoratti EM. Specific allergic sensitization in parents and their 18-year-old offspring in the Suburban Detroit Childhood Allergy Study. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(6):1401-6.e2.
88. Müller S, Marenholz I, Lee YA, Sengler C, Zitnik SE, Griffioen RW, Meglio P, Wahn U, Nickel R. Association of Filaggrin loss-of-function-mutations with atopic dermatitis and asthma in the Early Treatment of the Atopic Child (ETAC) population. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009;20(4):358-61.
89. Munthe-Kaas MC, Carlsen KH, Helms PJ, Gerritsen J, Whyte M, Feijen M, Skinningsrud B, Main M, Kwong GNM, Lie BA, PhD, Lødrup Carlsen KC, Undlien DE. CTLA-4 polymorphisms in allergy and asthma and the T_H1/ T_H2 paradigm. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 114 (2): 280-7.
90. Nickel R, Kulig M, Forster J, Bergmann RL, Bauer CP, Lau S, Guggenmoos-Holzmann I, Wahn U. Sensitization to hen's egg at the age of twelve months is predictive for allergic sensitization to common indoor and outdoor allergens at the age of three years. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99 (5): 613-617.
91. Niggemann B, Illi S, Madloch C, Völkel K, Lau S, Bergmann R, von Mutius E, Wahn U; MAS-Study Group. γ Histamine challenges discriminate between symptomatic and asymptomatic children. Multicentre Allergy Study. *Eur Respir J*. 2001;17(2):246-53.
92. Ober C, Cox NJ, Abney M, Di Rienzo A, Lander ES, Changyaleket B, Gidley H, Kurtz B, Lee J, Nance M, Pettersson A, Prescott J, Richardson A, Schlenker E, Summerhill E, Willadsen S, Parry R. Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. *The Collaborative Study on the Genetics of Asthma*. *Hum Mol Genet*. 1998;7(9):1393-8.
93. Ober C, Tsalenko A, Parry R, Cox NJ. A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *Am J Hum Genet* 2000. 67: 1154-1162.
94. Pädiatrische Allergologie und Immunologie. Wahn U, Seger R, Wahn V, Holländer GA. Urban und Fischer. Berlin, Zürich, Schwedt, Basel 2005. S. 304
95. Panettieri RA Jr, Covar R, Grant E, Hillyer EV, Bacharier L. Natural history of asthma: persistence versus progression-does the beginning predict the end? *J Allergy Clin Immunol*. 2008,121(3):607-13.
96. Palmer CN, Ismail T, Lee SP, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Smith FJ, McLean WH, Mukhopadhyay S. Filaggrin null mutations are associated with increased asthma severity in children and young adults. *J Allergy Clin Immunol* 2007: 120(1):64-8.
97. Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*. 2001;54(8):577-89. Review.
98. Riedler J, Eder W, Oberfeld G, Schreuer M. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(2):194-200.
99. Rodriguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, Irvine AD, Weidinger S. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2009, 123(6): 1361-70.

100. Roy A, Wisnivesky JP. Racial and ethnic differences in the use of environmental control practices among children with asthma. *J Asthma*. 2010;47(5):507-12.
101. Schlaud M, Atzpodien K, Thierfelder W. Allergische Erkrankungen. Ergebnisse aus dem Kinder- und Jugendgesundheitsurvey (KiGGS), Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 2007, Springer Medizin Verlag, 50: 701-710.
102. Sengler C, Lau S, Wahn U, Nickel R. Interactions between genes and environmental factors in asthma and atopy: new developments. *Respir Res*. 2002;3:7.
103. Shilling RA, Pinto JM, Decker DC, Schneider DH, Bandukwala HS, Schneider JR, Camoretti-Mercado B, Ober C, Sperling AI. Cutting edge: Polymorphisms in the ICOS promoter region are associated with allergic sensitization and Th2 cytokine production. *The Journal of Immunology*, 2005, 175: 2061-2065.
104. Shilling RA, Bandukwala HS, Sperling AI. Regulation of T:B cell interactions by the Inducible Costimulator molecule: Does ICOS „induce“ disease? *Clinical Immunology* 2006, 121, 13-18.
105. Sigurs N, Hattevig G, Kjellman B, Kjellman NI, Nilsson L, Björkstén B. Appearance of atopic disease in relation to serum IgE antibodies in children followed up from birth for 4 to 15 years. *J Allergy Clin Immunol*. 1994;94(4):757-63.
106. Simpson TR, Quezada SA, Allison JP. Regulation of CD4 T cell activation and effector function by inducible costimulator (ICOS). *Current Opinion in Immunology* 2010;22:1-7.
107. Spezialbericht Allergien, Teil 4 Epidemiologie (6) [Spezialbericht Allergien, 2000] Gesundheitsberichterstattung des Bundes. <http://www.gbe-bund.de>
108. Spiric VT, Jankovic S, Bogic M, Maksimovic N, Djuric V, Bolpacic J. Atopisches Asthma und dessen Risikofaktoren. *Allergologie*, Jahrgang 30, Nr. 2/2007, S. 41-49.
109. Steinke JW, Rich SS, Borish L. Genetics of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 384-387.
110. Stevenson MD, Sellins S, Grube E, Schroer K, Gupta J, Wang N, Khurana Hershey GK. Aeroallergen sensitization in healthy children: racial and socioeconomic correlates. *J Pediatr*. 2007;151(2):187-91.
111. Strachan DP, Wong HJ, Spector TD. Concordance and interrelationship of atopic diseases and markers of allergic sensitization among adult female twins. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 108 (6): 901-7.
112. Tafuri A, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A et al. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 2001; 409 (6816): 105-9.
113. Tesciuba AG, Subudhi S, Rother RP, Faas SJ, Frantz AM, Elliot D, Weinstock J, Matis LA, Bluestone JA, Sperling AI. Inducible costimulator regulates Th2-mediated inflammation, but not Th2 differentiation, in a model of allergic airway disease. *The Journal of Immunology*, 2001, 167: 1996-2003.
114. Wahn U. What drives the allergic march? *Allergy* 2000; 55 (7):591-599.
115. Walker EJ, Hirschfield GM, Xu C, Lu Y, Liu X, Lu Y, Coltescu C, Wang K, Newman WG, Bykerk V, Keystone EC, Mosher D, Amos CI, Heathcote EJ, Siminovitch KA. CTLA4/ICOS gene variants and haplotypes are associated with rheumatoid arthritis and primary biliary cirrhosis in the Canadian population. *Arthritis Rheum*. 2009;60(4):931-7.

116. Warner JO. A double-blinded, randomized, placebo-controlled trial of cetirizine in preventing the onset of asthma in children with atopic dermatitis: 18 months' treatment and 18 months' posttreatment follow-up. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108 (6):929-37.
117. Weiland SK, von Mutius E, Keil U, für das ISAAC Steering Committee* Die Internationale Studie zu Asthma und Allergien im Kindesalter (ISAAC). *Allergologie*, Jahrgang 22, Nr. 5/1999, S.275-282
118. Wiley RE, Goncharova S, Shea T, Johnson JR, Coyle AJ, Jordana M. Evaluation of inducible costimulator/B7-related protein-1 as a therapeutic target in a murine model of allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(6):722-30.
119. Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 2001; 1 (1):69-75.
120. Wolkerstorfer A, Wahn U, Kjellman NI, Diepgen TL, De Longueville M, Oranje AP. Natural course of sensitization to cow's milk and hen's egg in childhood atopic dermatitis: ETAC study group. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(1):70-3.
121. Wjst M, Fischer G, Immervoll T, Jung M, Saar K et al. A genome-wide search for linkage to asthma. *Genomics* 1999, 58.
122. Yang KD, Liu CA, Chang JC, Chuang H, Ou CY, Hsu TY, Wang CL. Polymorphism of the immune-braking gene CTLA-4 (+49) involved in gender discrepancy of serum total IgE levels and allergic diseases. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34 (1): 32-37.
123. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 1999; 402 (6763): 827-32.
124. Zeiger RS, Heller S. The development and prediction of atopy in high-risk children: follow-up at age seven years in a prospective randomized study of combined maternal and infant food allergen avoidance. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;95(6):1179-90.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Katja Beier für ihre fachliche und kollegiale Unterstützung meiner Arbeit. In ihrer stets angenehmen Art hat sie mich bei den experimentellen Arbeiten angeleitet, half mit vielen Diskussionen und wertvollen Ratschlägen bei der intensiven Betreuung der wissenschaftlichen Arbeit. Ganz herzlich möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. E. Hamelmann für das interessante Dissertationsthema danken. Er hat mich bei der Durchführung der Arbeit und bei der Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen hilfreich beraten und mein Interesse für die pädiatrische Allergologie und Immunologie geweckt. Für die experimentelle Anleitung am LightCycler danke ich Herrn Prof. Dr. H. Witt. Mein Dank gilt ferner den Teilnehmern und Mitarbeitern der MAS- und ETAC-Kohorte, insbesondere Frau Prof. Dr. R. Nickel, Frau Prof. Dr. S. Lau und Herrn Prof. Dr. U. Wahn für ihre Unterstützung bei den mehrjährig angelegten Studien. Insbesondere danke ich Frau Dr. S. Illi, ebenso danke ich Frau Prof. Dr. YA. Lee und Herrn Dr. F. Rüschenhof, die die Statistik durchführten. Herrn M. Brown sei für die Unterstützung im Labor gedankt. Ich danke Herrn O. Landt von TIB MOLBIOL in Berlin für die Synthese der Primer und Sonden. Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. S. Strobel für das Lektorat und Herrn Schmitz für die Grafikbearbeitung. Speziell bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. KP. Liesenkötter, ohne den ich die Arbeit nicht begonnen hätte, der mich für die Pädiatrie begeistert hat und Vorbild war. Nicht unerwähnt bleiben soll Herr Prof. Dr. B. Niggemann, der mich in der allergologischen Ausbildung großzügig gefördert hat. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. V. Wahn und den Kollegen aus Schwedt und Neubrandenburg bedanken, die dazu beigetragen haben, dass ich meine beruflichen Ziele verwirklichen kann. Zum Schluss gilt mein ganz besonderer Dank der liebevollen und verlässlichen Unterstützung durch meine Eltern.

Lebenslauf

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

Publikationen aus dieser Arbeit:

- 1.) Humberdros S, et al. Evaluation of Polymorphisms in the ICOS-Gene for Association with Atopic Disease Susceptibility. Poster auf der Jahrestagung der European Academy for Allergy and Clinical Immunology (EAACI), 2006.
- 2.) Beier KC, Humberdros S, Witt H, Illi S, Rüschen-dorf F, Nickel R, Lee YA, Lau S, Wahn U, Hamelmann E. ICOS-gene variants are not associated with atopic disease susceptibility in European children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009 May;20(3):242-5. Epub 2008 Oct 6.

Erklärung

„Ich, Steffi Humberdros, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Evaluation von ICOS-Polymorphismen als Marker für Atopiedisposition bei europäischen Kindern im Alter von 0-13 Jahren“ 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.

Januar 2012 Steffi Humberdros