

**„Genetische und epidemiologische Risikofaktoren für allergische Erkrankungen –
Ergebnisse der Multizentrischen Allergiestudie“**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Pädiatrie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Frau Dr. Renate Nickel

geboren am 07.03.1967 in Erlangen

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen
Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. Urbanek
2. Prof. Dr. Sennhaeuser

eingereicht: September 2003

Datum der letzten Prüfung: 17. 05. 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Epidemiologie allergischer Erkrankungen	4
1.2	Genetik allergischer Erkrankungen	5
1.3	Die Multizentrische Allergiestudie (MAS-90)	9
2	Fragestellung und Ziel	10
3	Eigene Arbeiten	11
3.1	Epidemiologische Studien	11
3.2	Genetische Studien	14
3.2.1	Kopplungsstudien/TDT-Analysen	14
3.2.2	Kandidatengenstudien	16
4	Diskussion	20
4.1	Epidemiologische Studien	20
4.2	Genetische Studien	21
5	Zusammenfassung und Schlußfolgerung	26
	Referenzen	27
	Danksagung	32
	Eidesstattliche Erklärung	34

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie allergischer Erkrankungen.

Die Prävalenzen von Asthma, allergischer Rhinokonjunktivitis (ARK) und atopischer Dermatitis sind im Laufe der letzten Jahrzehnte dramatisch gestiegen. Allergische Erkrankungen stellen inzwischen die häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter in westlichen Industrienationen dar. So leiden über 10% der 13-14-Jährigen in Deutschland unter Asthma und bis zu 15% unter einer ARK [1].

Da erste Symptome allergischer Erkrankungen oft bereits im Säuglingsalter auftreten, sind mehrere prospektive Geburtskohorten-Studien weltweit initiiert worden, um den natürlichen Krankheitsverlauf zu beschreiben sowie frühe Risikofaktoren und Prädiktoren für allergische Erkrankungen zu evaluieren [2, 3, 4, 5, 6, 7].

Die typische „Atopikerkarriere“ beginnt mit einer atopischen Dermatitis im Säuglings- oder frühen Kindesalter gefolgt von ARK und Asthma bronchiale im Kleinkind- und Schulalter. Immunologisch ist eine - meist transiente - Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelallergene (insbesondere Ei und Milch) in den ersten zwei bis drei Lebensjahren bei allergisch prädisponierten Individuen nachweisbar, während mit zunehmendem Alter eine Sensibilisierung gegen inhalative Allergene stattfindet [8].

Im Erwachsenenalter sind pathophysiologisch signifikante Gemeinsamkeiten bei Asthma bronchiale und ARK bekannt, so daß bereits viele Autoren obere und untere Atemwege hinsichtlich allergischer Erkrankungen als „united airways“ bezeichnen. Bis zu 78% der Asthmatiker leiden unter einer ARK, umgekehrt haben Patienten mit ARK in 38% auch asthmatische Beschwerden. Selbst bei nicht-asthmatischen Individuen mit ARK läßt sich meist eine bronchiale Hyperreagibilität nachweisen [9].

Mehrere epidemiologische Studien haben Risikofaktoren evaluiert, die die stetige Zunahme der Atopie erklären könnten. So gibt es deutliche Hinweise darauf, daß früher Kontakt mit bakteriellen Antigenen (z.b. Endotoxin) sowie frühkindliche virale Infekte vor einer späteren Erkrankung an Asthma schützen (sog. Hygienetheorie; [10, 11, 12, 13, 14, 15]).

1.2 Genetik allergischer Erkrankungen

Obwohl Veränderungen im Lebensstil sicherlich zur Entstehung allergischer Erkrankungen beitragen, spielt die Vererbung ebenfalls eine entscheidende Rolle, was durch mehrere Zwillings- und Familienstudien belegt wurde (s. a. [16]). So schätzte eine Studie an 11.688 dänischen Zwillingspaaren den Anteil genetischer Faktoren bei Asthma bronchiale auf 73% [17]. Atopie-assoziierte Erkrankungen folgen jedoch nicht den klassischen Mendelschen Erbgängen (z.B. autosomal dominant oder rezessiv), sondern stellen komplexe genetische Merkmale dar. Phänokopie, inkomplette Penetranz und genetische Heterogenität erschwert die Analyse der genetischen Grundlage [18]. Die genetische Komplexität des Asthma bronchiale und der Atopie wird reflektiert durch die ständig steigende Zahl gekoppelter chromosomaler Regionen, sowie durch zahlreiche assoziierte Polymorphismen in proinflammatorischen Genen (zusammengefaßt in Ref. [19]).

Zur Lokalisation von "Asthma- und Atopiegenen" wurden zahlreiche Kopplungsstudien (sowohl genomweit als auch in Kandidatengenregionen) durchgeführt.

Bei **genomweiten Suchen** nach krankheitsverursachenden Genen werden 300 bis 500 polymorphe genetische Marker in regelmäßigen Abständen (ca. 10 cM, entsprechend 10^7 Basenpaaren [bp]) über das gesamte Genom verteilt eingesetzt. Meist werden betroffene Geschwisterpaare untersucht. Chromosomale Regionen, die hierbei auf eine Kopplung mit dem untersuchten Krankheitsbild hinweisen, werden anschließend mit weiteren enger beieinander liegenden Markern untersucht, um die Regionen, welche potentielle Krankheitsgene beinhalten, einzuengen (sog. "dense mapping"). Mehrere genomweite Suchen nach Asthma-Genen sind publiziert (zusammengefaßt in Ref. [19]). Die Ergebnisse dieser Studien sind jedoch äußerst widersprüchlich. Bemerkenswert ist jedoch die bisher größte genomweite Kopplungsstudie aus England, welche eine hochsignifikante Kopplung von Asthma und bronchialer Hyperreagibilität (BHR) in 460 britischen Familien aufzeigte. Anschließend gelang erstmalig im Rahmen einer genomweiten Suche nach Asthma-Genen durch positionelles Klonieren die Identifikation eines Suszeptibilitäts-Gens auf Chromosom 20p13, ADAM 33 [20]. ADAM Proteine sind Metalloproteinasen mit multiplen Funktionen, unter anderem tragen sie zum „Shedding“ von Oberflächenproteinen in den Atemwegen (Zytokine, Zytokin-Rezeptoren) bei.

Bei **Kopplungsstudien in Kandidatengenregionen** werden gezielt chromosomale Regionen untersucht, in denen Gene lokalisiert sind, welche aufgrund ihrer biologischen Funktion zur Krankheitsentstehung beitragen könnten. Im Gegensatz zu genomweiten Suchen ist eine a priori Hypothese erforderlich. Mehrere genetische Marker werden nach ihrer Lokalisation in diesen Regionen ausgewählt und auf Kopplung (meist in betroffenen Geschwisterpaaren oder mittels Transmissions Disäquilibrium Tests [TDT]) untersucht.

Insbesondere Chromosom 5q ist aufgrund zahlreicher potentieller Kandidatengene (IL4, IL13, IL3, IL5, GMCSF, CD14, SPINK5, sowie den pharmakogenetischen Kandidatengenen β_2 -adrenerger Rezeptor [ADRB2] und Glukokortikoidrezeptor [GR]) intensiv untersucht worden.

Während Kopplungsstudien nur auf die Lokalisation von krankheitsverursachenden Genen hinweisen, haben **Kandidatengenanalysen** das Ziel einen kausalen Zusammenhang zwischen einer funktionellen genetischen Variante und einem Krankheitsbild herzustellen. Die allergische Entzündung ist schematisch und stark vereinfacht in Abb. 1 dargestellt. Alle hier skizzierten Moleküle wurden auf genetische Varianten untersucht. Weit über 100 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in diesen Kandidatengenen sind identifiziert und mit diversen Atopie-assoziierten Phänotypen in Verbindung gebracht worden (zusammengefaßt in Ref. [19]). Wenige dieser Assoziationen konnten jedoch in unabhängig analysierten Studienpopulationen bestätigt werden.

Betrachtet man kritisch die bisher durchgeführten genetischen Studien, so wiesen folgende chromosomale Regionen wiederholt Kopplung mit Asthma und assoziierten Phänotypen in unabhängig rekrutierten Studienpopulationen auf: Chromosom 5q23-33, 6q21-23, 11q13, 12q14-24 und 13q11-32. Diese chromosomalen Regionen enthalten zahlreiche Gene, welche an der allergischen Entzündung beteiligt sind (s. Tabelle 1). In der Region 5q31-33 sind IL4 und IL13 als Th2 Zytokin-Gene interessante Kandidatengene für Atopie und Asthma. SNPs in beiden Genen sowie deren gemeinsamer Rezeptoruntereinheit IL4RA (IL-4R α -Kette) auf Chromosom 16p sind mit Atopie-assoziierten Merkmalen in Verbindung gebracht worden [21, 22, 23, 24].

CD14, ein weiteres Kandidatengen auf Chromosom 5q31-33, fungiert als LPS-Rezeptor. Ein CD14 Promotor SNP wurde von zwei Arbeitsgruppen mit IgE-Spiegeln assoziiert [25, 26].

Auf Chromosom 11q13 sind neben der β -Kette des niedrig-affinen $Fc\epsilon$ -Rezeptors (FCER1B) das antiinflammatorische Protein CC16 und die Glutathion-S-Transferase P1 kodiert. Polymorphismen in beiden Genen wurden mit Asthma bzw. dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert [27, 28, 29].

Asthma, ARK und atopische Dermatitis sind chronisch-entzündliche Erkrankungen mit einer multifaktoriellen Genese. Dies trifft auch für andere häufige Krankheitsbilder zu: Entzündliche Darmerkrankungen (M. Crohn, Colitis ulcerosa), Psoriasis, Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis, im weiteren Sinne auch Multiple Sklerose und Typ I Diabetes. Becker et al. verglichen in einer bemerkenswerten Publikation die Ergebnisse genomweiter Studien dieser Krankheitsbilder: Es konnte gezeigt werden, daß Suszeptibilitätsloci dieser Krankheitsbilder in 18 chromosomalen Regionen geclustert sind, d.h. daß vermutlich gemeinsame genetische Faktoren zur Pathogenese chronisch-entzündlicher Erkrankungen beitragen [30]. Diese Hypothese wurde durch zwei genomweite Suchen nach AD-Suszeptibilitätsloci untermauert: Lee et al. (2000) identifizierten in einer europäischen Population einen singulären hochsignifikanten Locus auf Chromosom 3q21 [31]. In dieser Region liegen unter anderem die Gene für die beiden kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Cookson et al. (2001) konnten in einer britischen Population diese Ergebnisse nicht bestätigen, jedoch wurden in dieser Studie AD-Suszeptibilitäts-Loci auf Chromosom 1q21 und 17q25 beschrieben [32]. Diese Regionen zeigten bisher keine signifikante Kopplung mit Asthma oder anderen Atopie-assoziierten Merkmalen. Cookson et al. wiesen darauf hin, daß die in beiden genomweiten Studien identifizierten ‚AD-Loci‘, ebenso in Kopplungs-Studien der familiären Psoriasis Signifikanzen aufwiesen. Es liegt daher nahe, daß gemeinsame –organspezifische- genetische Determinanten unterschiedlichen entzündlichen Hauterkrankungen zugrunde liegen.

Tabelle 1: Chromosomale Regionen mit Hinweis auf Kopplung mit Atopie-assoziierten Phänotypen in ≥ 3 unabhängigen Studienpopulationen*.

Chromosomale Region	Kandidatengene	Phänotyp
5q23-33	IL4, IL13, IL3, IL5, IL9, GMCSF, CD14, SPINK5, ADRB2, GR	Asthma, BHR, Atopie, Gesamt- und spezifisches IgE, AD, Eosinophilie
6p21-23	HLAII, TNFA	Spezifisches IgE, Gesamt- IgE, Asthma, allergisches Asthma
11q13	FCER1B, GSTP1, CC16	Asthma, BHR, Atopie, Gesamt- und spezifisches IgE, AD
12q14-24	IFNG, MMP19, IL22, IL26, BTL1, KIT-ligand, LTA4 Hydrolase, NFYB, IGF1, PLA2	Gesamt-IgE, Asthma, BHR, Atopie, Eosinophilen- Konzentration
13q11-32	HMGP1 HRF	Asthma, allergisches Asthma, Atopie, AD, spezisches IgE, Eosinophilen-Konzentration

* Referenzen siehe bei Sengler et al. 2002 ([19])

1.3 Die Multizentrische Allergiestudie (MAS-90)

Sowohl die epidemiologischen Arbeiten als auch die genetischen Untersuchungen, welche im Folgenden kurz zusammengefaßt werden, basieren auf Daten der Multizentrischen Allergiestudie (MAS), welche deshalb zunächst beschrieben werden soll (siehe auch: Nickel et al. 2003 [33]).

Ziel der prospektiven MAS-Studie war und ist es, Risikofaktoren für allergische Erkrankungen im Kindesalter zu identifizieren sowie den natürlichen Verlauf allergischer Erkrankungen zu beschreiben. Hierfür wurden 1990 1314 gesunde Neugeborene in fünf deutschen Städten rekrutiert. 499 Kinder (38%) wurden als Hochrisiko-Probanden eingestuft: Diese hatten mindestens zwei erstgradige atopische Familienmitglieder und/oder wiesen eine IgE-Konzentration im Nabelschnurblut $> 0.9\text{kU/l}$ auf. Die Kinder der Kontrollgruppe (815 Kinder=62%) wurden unter den verbliebenen Neugeborenen zufällig ausgewählt. Hier war maximal ein Atopiker in der Kernfamilie und der Nabelschnurblut-IgE-Wert betrug $< 0.9\text{kU/l}$. Follow-up Untersuchungen fanden im Lebensalter von 1, 3, 6, 12, 18, 24 Monaten und anschließend einmal jährlich statt. Die Untersuchungen (s. Abb.1) beinhalteten unter anderem standardisierte Interviews, Fragebögen, eine körperliche Untersuchung, Blutentnahmen zur Bestimmung von Gesamt- und spezifischem IgE gegen Nahrungsmittel- und inhalative Allergene (sieben Zeitpunkte), Lungenfunktionstests und Histaminprovokation (im Alter von sieben Jahren). DNA Proben wurden von 888 Kindern und 1231 Eltern gewonnen.

Eltern gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Charité genehmigt.

2 Fragestellung und Ziel

Schwerpunkt meine wissenschaftlichen Arbeit ist die Evaluierung von Risikofaktoren und Prädiktoren für allergische Erkrankungen mit dem Ziel a) frühzeitig primär und sekundär präventive Massnahmen einzuleiten und b) Risikopatienten für Interventionsstudien zu identifizieren.

3 Eigene Arbeiten

3.1 Epidemiologische Studien

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.

Nickel R, Kulig M, Forster J, Bergmann R, Bauer CP, Lau S, Guggenmoos-Holzmann I, Wahn U. Sensitization to common indoor and outdoor allergens at the age of three years.

J Allergy Clin Immunol. 1997;99:613-7.

Die Voraussetzung für präventive Maßnahmen und Präventionsstudien hinsichtlich allergischer Erkrankungen ist die Identifizierung von spezifischen Prädiktoren für z.B. eine frühe Sensibilisierung gegen inhalative Allergene.

Wir untersuchten daher Kinder der MAS-Kohorte, bei welchen im Alter von 12 und 36 Monaten Gesamt- und spezifisches IgE gegen Nahrungsmittel- und inhalative Allergene im Serum bestimmt wurde. Folgende Risikofaktoren für eine allergische Sensibilisierung gegen inhalative Allergene im Alter von 36 Monaten konnten beschrieben werden:

1. Eine positive atopische Familienanamnese;
2. Nachweis von IgE gegen Hühnerei im Alter von 12 Monaten;
3. Ein erhöhtes Gesamt-IgE im Alter von 12 Monaten.

Die höchste prädiktive Wertigkeit (positiv prädiktiver Wert 78%, Spezifität 99%) wurde beobachtet, wenn IgE gegen Ei ≥ 2 kU/l in Kombination mit einer positiven atopischen Familienanamnese auftraten.

Diese Ergebnisse wurden inzwischen in einer großen Kohorte von europäischen Kindern mit AD (ETAC) bestätigt, in dieser Studie konnte eine Sensibilisierung gegen Ei innerhalb der ersten 24 Lebensmonate auch als Risikofaktor für Asthma beschrieben werden [34].

The pattern of atopic sensitization is associated with the development of asthma in childhood.

Illi S, von Mutius E, Lau S, Nickel R, Niggemann B, Sommerfeld C, Wahn U; Multicenter Allergy Study Group. *J Allergy Clin Immunol.* 2001. 108:709-14

Eine allergische Sensibilisierung ist zwar deutlich mit kindlichem Asthma bronchiale assoziiert, Asthma tritt jedoch nur bei einem Drittel der atopischen Kinder auf. Wir untersuchten daher, ob ein spezifisches Sensibilisierungsmuster im Säuglings- und Kleinkindesalter dem Asthma bronchiale vorausgeht. Hierfür wurden erneut Daten der MAS-Studie analysiert. Es zeigte sich, 1. daß bei atopischen Kindern, welche im Alter von 7 Jahren an Asthma litten, eine Sensibilisierung (gegen Nahrungsmittelallergene) signifikant früher auftrat als bei atopischen Kindern ohne Asthma; 2. daß eine frühe Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelallergene nur dann ein erhöhtes Risiko für Asthma darstellt, wenn eine Sensibilisierung gegen inhalative Allergene folgt und gleichzeitig eine positive atopische Familienanamnese vorliegt. Diese Ergebnisse ermöglichen es, Kinder mit einem hohen Risiko an Asthma bronchiale zu erkranken, frühzeitig zu identifizieren.

Comparison of bronchial responsiveness to histamine in asthma, allergic rhinitis and allergic sensitization at the age of 7 years.

Nickel R, Lau S, Niggemann B, Sommerfeld C, Wahn U; German Multicenter Allergy Study Group. *Clin Exp Allergy.* 2002;32:1274-7.

Bei erwachsenen Patienten mit ARK findet sich in einem hohen Prozentsatz eine bronchiale Hyperreagibilität (BHR), auch wenn kein Asthma bronchiale besteht. Wir untersuchten, ob bei nicht asthmatischen Kindern mit einer -im Vergleich zu Erwachsenen- kurzen ARK-Anamnese ebenfalls eine höhere bronchiale Reagibilität als bei Nicht-Atopikern besteht. Wir verglichen hierfür $PC_{20}FEV_1$ Werte im Alter von 7 Jahren bei Kindern der MAS-Kohorte mit Asthma, ARK, nicht-symptomatischer allergischer Sensibilisierung und nicht-atopischen Kontrollen. Wir beobachteten die niedrigsten $PC_{20}FEV_1$ Werte bei allergischen Asthmatikern, unabhängig ob die Kinder ebenfalls an einer ARK litten oder nicht. Überraschenderweise zeigte sich kein Unterschied in der bronchialen Reaktivität auf Histamin bei Kindern mit ARK,

allergischer Sensibilisierung oder Kontrollen. Diese Beobachtung impliziert, daß eine BHR als erster Hinweis auf einen „Etagenwechsel“ nicht zeitgleich mit allergischen Symptomen der ARK auftritt und möglicherweise durch frühzeitige konsequente antiinflammatorische Therapie und/oder Immunotherapie verhindert werden kann.

Transient suppression of atopy in early childhood is associated with high vaccination coverage.

Grüber C, Illi S, Lau S, Nickel R, Forster J, Kamin W, Bauer CP, Wahn V, Wahn U; MAS-90 Study Group. *Pediatrics*. 2003;111:282-8.

Ein Zusammenhang zwischen Impfungen und allergischen Erkrankungen wurde vielfach diskutiert. Wir untersuchten daher in der MAS-Kohorte, inwieweit die Anzahl der Impfungen innerhalb der ersten fünf Lebensjahre mit der Prävalenz von AD, Asthma und allergischer Sensibilisierung korreliert. Hierfür wurden Kinder anhand der kumulativen Impfdosen in Perzentilen gruppiert (<10%, 0-11 Dosen; 10%-50%, 12-14 Dosen; 51%-90%, 15-20 Dosen; >90%, 21-27 Dosen). Wir beobachteten eine inverse Korrelation zwischen Impfdosen und der Prävalenz der AD im Alter von 6 Monaten, 2, 3, und 5 Jahren, der Prävalenz des Asthma bronchiale im Alter von 3, 4, und 5 Jahren und der allergischen Sensibilisierungsrate.

Im Gegensatz zu Vermutungen, daß Impfungen im Kindesalter zum Prävalenzanstieg allergischer Erkrankungen beitragen, konnten wir einen protektiven Effekt innerhalb der ersten fünf Lebensjahre beobachten.

3.2 Genetische Studien

3.2.1 Kopplungsstudien/TDT-Analysen

Für die ersten genetischen Studien wurden die frühkindliche Manifestationen der Atopie - erhöhtes Gesamt-IgE sowie atopische Dermatitis ausgewählt. Betroffene Kinder und deren Eltern wurden für Mikrosatellitenmarker in Kandidatengenregionen genotypisiert, anschließend wurde in TDT-Analysen ermittelt, ob eine signifikant häufigere Transmission parental Allele auf eine Kopplung/Assoziation mit dem entsprechenden Phänotyp hinweist.

Evidence for linkage of chromosome 12q15-q24.1 markers to high total serum IgE concentrations in children of the German Multicenter Allergy Study.

Nickel R, Wahn U, Hizawa N, Maestri N, Duffy DL, Barnes KC, Beyer K, Forster J, Bergmann R, Zepp F, Wahn V, Marsh DG. *Genomics*. 1997;46:159-62.

Eine Kopplung von Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 12q15-q24 mit hohen Gesamt-IgE Spiegeln und Asthma war kurz zuvor von Barnes et al. (1996) beschrieben worden. Um diese Region weiter hinsichtlich der Gesamt-IgE Regulation zu untersuchen, genotypisierten wir 52 Kinder der MAS-Kohorte mit persistierenden hohen IgE Werten sowie deren Eltern. Wir definierten einen hohen IgE Phänotyp in der MAS-Kohorte, wenn Kinder zu mindestens zwei Zeitpunkten ein Gesamt-IgE über der 85. Perzentile der Gesamt-Kohorte hatten. Neun polymorphe Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 12q15-q24.1 wurden genotypisiert und mittels TDT auf Kopplung und Assoziation mit hohen IgE-Werten evaluiert. Vier der neun Marker zeigten signifikante Ergebnisse. Die Marker mit der höchsten Signifikanz waren interessanterweise identisch mit denen, die in zuvor in zwei unabhängigen Populationen ebenfalls die stärksten Hinweise auf Kopplung mit Gesamt-IgE Werten zeigten. Diese Studie demonstriert, wie wertvoll die Auswahl extremer Phänotypen bei der Analyse komplexer genetischer Merkmale ist

A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group.

Wjst M, Fischer G, Immervoll T, Jung M, Saar K, Rueschendorf F, Reis A, Ulbrecht M, Gomolka M, Weiss EH, Jaeger L, Nickel R, Richter K, Kjellman NI, Griese M, von Berg A, Gappa M, Riedel F, Boehle M, van Koningsbruggen S, Schoberth P, Szczepanski R, Dorsch W, Silbermann M, Wichmann HE. *Genomics*. 1999;58:1-8.

Eine genomweite Suche nach Suszeptibilitäts-Loci für Asthma bronchiale wurde in 97 deutschen Familien mit 156 betroffenen Geschwisterpaaren durchgeführt. 351 polymorphe Marker wurden genotypisiert. Vier chromosomale Regionen (auf Chromosom 2, 6, 9 und 12) wiesen auf eine Kopplung mit Asthma hin. Die Region auf Chromosom 12 war identisch mit der Region, die zuvor von Barnes et al. und Nickel et al. evaluiert wurde ([35, 36], s.o.).

Dense mapping of chromosome 12q13.12-q23.3 and linkage to asthma and atopy.

Barnes KC, Freidhoff LR, Nickel R, Chiu YF, Juo SH, Hizawa N, Naidu RP, Ehrlich E, Duffy DL, Schou C, Levett PN, Marsh DG, Beaty TH.

J Allergy Clin Immunol. 1999;104:485-91.

Um Suszeptibilitätsgene für Asthma und Atopie auf Chromosom 12q genauer zu lokalisieren, wurden 33 Großfamilien (528 Individuen) aus Barbados für insgesamt 22 Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 12q genotypisiert. Kopplungsstudien für Asthma und allergische Rhinitis zeigten Signifikanzen für Marker im 1. Intron des IFNG Gens bzw. in unmittelbarer Nachbarschaft des IFNG Gens sowie für die Region um die Marker *D12S326* und *D12S1052*.

Obwohl diese Studie deutlich zeigt, daß ein Suszeptibilitätsgen für allergische Atemwegserkrankungen in unmittelbarer Nähe zu IFNG lokalisiert ist, ist es bisher nicht gelungen, dieses Gen zu identifizieren.

Association and linkage of atopic dermatitis with chromosome 13q12-14 and 5q31-33 markers.

Beyer K, Nickel R, Freidhoff L, Bjorksten B, Huang SK, Barnes KC, MacDonald S, Forster J, Zepp F, Wahn V, Beaty TH, Marsh DG, Wahn U. *J Invest Dermatol.* 2000;115:906-8.

Wir genotypisierten zwei pädiatrische Studienpopulationen mit atopischer Dermatitis für Mikrosatellitenmarker in folgenden Kandidatengenregionen: 5q31-33, 6p21.3, 12q15-24.1, 13q12-31, and 14q11.2/14q32.1-32.3. Es wurden a) 192 Kinder der MAS-Kohorte (sowie beide Eltern von 77 dieser Kinder) und 59 nicht-atopische Kontrollen und b) 40 Schwedische Familien mit \geq einem Familienmitglied mit atopischer Dermatitis untersucht (International Study of Asthma and Allergy in Children). Assoziationstests und TDT-Analysen zeigten signifikante Ergebnisse für beide Populationen auf Chromosom 13q12-14 und Chromosom 5q31-33. Beide Regionen wurden ebenfalls in anderen Populationen mit atopischen Merkmalen in Verbindung gebracht.

3.2.2 Kandidatengenstudien

An IL13 coding region variant is associated with a high total serum IgE level and atopic dermatitis in the German multicenter atopy study (MAS-90).

Liu X, Nickel R, Beyer K, Wahn U, Ehrlich E, Freidhoff LR, Bjorksten B, Beaty TH, Huang SK. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106:167-70.

Auf Chromosom 5q31-33 sind insbesondere die Th2-Zytokin-Gene IL13 und IL4 hinsichtlich der IgE Regulation von besonderem Interesse. Wir führten Single Strand Confirmation Polymorphism (SSCP) Analysen und DNA Sequenzierungen durch, um Varianten im IL13 Gen zu identifizieren. Wir fanden eine genetische Variante im 4. Exon von IL13 (G4257A), welche zu einem Aminosäureaustausch (Arg130Gln) in der Liganden-bindenden Region führt. Diese Variante wurde zeitgleich unabhängig von zwei weiteren Arbeitsgruppen beschrieben [21, 23]. Eine Funktionalität dieses SNPs wurde durch Heinzmann et al. (2000) beschrieben [21]. Wir konnten sowohl in der MAS-Kohorte als auch in einer schwedischen pädiatrischen Population (ISAAC)

zeigen, daß Träger dieses SNPs ein erhöhtes Risiko für hohe Gesamt-IgE Werte hatten, in der MAS-Kohorte konnten wir auch eine Assoziation mit AD aufzeigen.

Associations between total serum IgE levels and the 6 potentially functional variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study.

Liu X, Beaty TH, Deindl P, Huang SK, Lau S, Sommerfeld C, Fallin MD, Kao WH, Wahn U, Nickel R. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:382-8.

Mehrere SNPs sind in den Genen, welche die Th2-Zytokine Il-4, Il-13 und die gemeinsame Rezeptoruntereinheit Il-4RA kodieren sind beschrieben worden. Assoziationsstudien, welche meist nur einzelne dieser SNPs untersuchten, ergaben jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Wir genotypisierten daher sechs (potentiell) funktionell wirksame Polymorphismen in MAS-Kindern und Eltern. Anschließend führten wir Haplotyp- sowie Gen-Gen und Gen-Umweltinteraktionsanalysen durch. Beide untersuchte Varianten im IL13-Gen (Arg130Gln und C-1055T) zeigten deutliche Assoziationen mit Gesamt-IgE-Spiegeln zu allen untersuchten Zeitpunkten. Dieser Effekt wurde durch Tabakrauchexposition der Kinder weiter modifiziert. Keine Assoziationen fanden sich für die Varianten im IL4- und IL4RA-Gen.

Evaluation of the CD14 C-159 T polymorphism in the German Multicenter Allergy Study cohort.

Sengler C, Haider A, Sommerfeld C, Lau S, Baldini M, Martinez F, Wahn U, Nickel R; German Multicenter Allergy Study Group. *Clin Exp Allergy.* 2003;33:166-9.

Ein weiteres Kandidatengen in der Region 5q31-33 ist CD14. CD14 fungiert als Rezeptor für Lipopolysaccharide (LPS). Ein funktioneller Polymorphismus im Promotor des CD14 Gens (C-159T) wurde von Baldini et al. (1999) identifiziert und mit Gesamt-IgE Spiegeln korreliert. Koppelman et al. (2001) beobachteten bei homozygoten Trägern des -159C Allels ebenfalls höhere Gesamt-IgE Werte sowie eine

höhere Zahl von positiven Hauttests als bei Individuen mit dem –159T Allel. Wir genotypisierten über 800 Kinder der MAS-Kohorte für diesen SNP. Wir konnten zu keinem der 7 Untersuchungszeitpunkte Unterschiede der Gesamt-IgE Werte bei den 3 Genotypen finden, auch die Anzahl der Sensibilisierungen gegen Nahrungsmittel- und inhalative Allergene war zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich.

Atopic dermatitis is associated with a functional mutation in the promoter of the C-C chemokine RANTES.

Nickel RG, Casolaro V, Wahn U, Beyer K, Barnes KC, Plunkett BS, Freidhoff LR, Sengler C, Plitt JR, Schleimer RP, Caraballo L, Naidu RP, Levett PN, Beaty TH, Huang SK.

J Immunol. 2000;164:1612-6.

Neben Th2-Zytokinen spielen auch CC-Chemokine bei der allergischen Entzündung eine ausschlaggebende Rolle. Im Promotor des RANTES-Gen identifizierten wir mittels SSCP und Sequenzierung einen G zu A Austausch an Position –401, welcher zu einer neuen Konsensus-Bindungsstelle für GATA-Proteine führt. Transfektionsassays zeigten eine bis zu 8-fach erhöhte Aktivität des mutierten Promotors im Vergleich zum Wildtyp. Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) zeigten deutliche Unterschiede hinsichtlich der Bindung nukleärer Proteine an die Wildtyp- und die mutierte Promotor-Sequenz. Wir genotypisierten 5 große Populationen (afro-amerikanisch, afro-karibisch, kolumbisch, US-kaukasisch, deutsch) und beobachteten hochsignifikante Unterschiede in der Allelfrequenz. Die Promotorvariante war deutlich häufiger in Populationen mit afrikanischem als mit europäischem Ursprung. Eine schwache Assoziation fanden wir für atopische Dermatitis in der MAS-Kohorte (keine der anderen Populationen war hinsichtlich atopischer Dermatitis phänotypisiert), eine Assoziation mit Asthma fand sich in keiner der Populationen.

Clara cell protein 16 (CC16) gene polymorphism influences the degree of airway responsiveness in asthmatic children.

Sengler C, Heinzmann A, Jerkic SP, Haider A, Sommerfeld C, Niggemann B, Lau S, Forster J, Schuster A, Kamin W, Bauer C, Laing I, LeSouef P, Wahn U, Deichmann K, Nickel R.

J Allergy Clin Immunol. 2003;111:515-9.

CC16 wird von Clara Zellen im Bronchialepithel exprimiert und hat multiple anti-inflammatorische Funktionen. Ein SNP im CC16 Gen (A38G) wurde von Laing et al. mit niedrigeren CC16 Serum-Konzentrationen und Asthma in einer australischen Population assoziiert. Wir genotypisierten diesen SNP in 872 Kindern der MAS-Kohorte sowie 112 Freiburger Kindern mit allergischem Asthma bronchiale. Eine Assoziation dieser Variante mit Asthma konnten wir nicht zeigen. Interessanterweise beobachteten wir jedoch bei asthmatischen Kindern der MAS-Kohorte signifikante Unterschiede der $PC_{20}FEV_1$ zwischen den drei Genotypen: Individuen, welche homozygot für das 38 A Allel ($n = 3$) hatten signifikant niedrigere $PC_{20}FEV_1$ Werte als heterozygote Kinder oder homozygote für das 38G Allel. Diese Ergebnisse konnten in der Freiburger Asthma-Population bestätigt werden: Nach körperlicher Belastung (Laufband) hatten homozygote (CC1638AA) asthmatische Kinder den höchsten FEV_1 Abfall im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen. Diese Studie legt nahe, daß der CC16 Polymorphismus nicht zu Asthma prädisponiert, bei bestehendem Asthma jedoch den Schweregrad beeinflusst.

4 Diskussion

4.1 Epidemiologische Studien

International sind mehrere Kohortenstudien –darunter auch die deutsche MAS-Studie– durchgeführt worden, um frühkindliche Risikofaktoren für allergische Erkrankungen zu identifizieren [2, 3, 4, 5, 6, 7]. Trotz des erheblichen zeitlichen und finanziellen Aufwands haben sich diese Kohortenstudien im Vergleich zu Querschnittsuntersuchungen bewährt. Insbesondere kann die Bedeutung von Expositions-faktoren (wie z.B. Hausstaubmilbenallergen, Tabakrauch) hinsichtlich Beginn, Dauer und Quantität nur in longitudinalen, prospektiven Studien abgeschätzt werden (s.a.[33]).

So konnten in den letzten 10 Jahren neue Erkenntnisse über den natürlichen Krankheitsverlauf sowie Risikofaktoren für allergische Erkrankungen gewonnen werden. Analysen der MAS-Kohorte zeigten unter anderem, daß eine frühe Sensibilisierung gegen Hühnerei (insbesondere in Kombination mit einer positiven atopischen Familienanamnese) ein sehr spezifischer Prädiktor für spätere Sensibilisierung gegen inhalative Allergene darstellt [37]. Diese Untersuchungen wurden in anderen Kohorten bestätigt [34] und ermöglichen es, Risikokinder für sekundär präventive Maßnahmen bzw. Interventionsstudien auszuwählen. Weiterführende Analysen in der MAS-Kohorte konnten ein frühkindliches Sensibilisierungsmuster definieren, welches dem allergischem Asthma bronchiale vorausgeht [38]. Diese und andere Beobachtungen in der MAS-Kohorte bilden die Grundlage im klinischen Alltag für Aufklärungsgespräche mit Eltern hinsichtlich des Atopie- und Asthma-Risikos ihres Kindes. Die Analyse von Impfungen und allergischen Erkrankungen in der MAS-Kohorte [39] ist in der Pädiatrie von ausserordentlicher Relevanz, da die These, daß Impfungen zu einem erhöhtem Atopie-Risiko beitragen [40] widerlegt werden konnte.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Geburtskohorten ist, dass klinische Parameter, die bei erwachsenen allergischen/asthmatischen Patienten bekannt sind hinsichtlich des Beginns und des zeitlichen Verlaufs überprüft werden können. So ist vielfach beschrieben, dass eine ARK auch bei Nicht- Asthmatikern im Erwachsenenalter mit einer BHR einhergeht [9], ob dies jedoch bereits bei Erkrankungsbeginn (ARK) der Fall ist, kann in Erwachsenenkollektiven nicht geprüft werden. In der MAS-Kohorte konnten

wir dagegen deutlich zeigen, dass nicht-asthmatische Kinder mit ARK im Alter von 7 Jahren keine höhere bronchiale Reagibilität als nicht-atopische Kinder hatten [41]. Das bedeutet, daß eine BHR nicht zeitgleich mit ersten Symptomen einer ARK („united airways“) einhergeht, sondern vermutlich erst nach mehreren Episoden einer allergischen Entzündung der oberen Atemwege manifest wird. Dies legt den frühzeitigen Einsatz präventiver Maßnahmen bei Kindern mit ARK nahe, um einem „Etagenwechsel“ vorzubeugen.

4.2 Genetische Studien

Allergische Erkrankungen sind multifaktoriell bedingt. Neben Umwelteinflüssen spielen genetische Faktoren bei der Krankheitsentstehung eine maßgebliche Rolle. Die Identifizierung von Genen, welche die Suszeptibilität für Asthma, ARK oder atopischer Dermatitis erhöhen hat sich jedoch als äußerst komplex herausgestellt (s.a. [19]).

Auch wenn die genetischen Analysen in der Geburtskohorte MAS nur einen kleinen Baustein in der Allergiegenetik darstellen, zeichnen sie sich durch folgende Besonderheiten aus:

1. Die Phänotypen (z.B. hohes Gesamt-IgE) wurden sehr strikt definiert. Mehrere Untersuchungszeitpunkte wurden berücksichtigt, so daß eine falsch positive Klassifizierung unwahrscheinlich war. Hierdurch konnten wir z.B. trotz relativ niedriger Fallzahl hochsignifikante Ergebnisse in TDT-Analysen auf Chromosom 12q aufzeigen [36].
2. Die sorgfältige longitudinale Charakterisierung aller Kinder ermöglicht die Auswahl einer validen Kontrollgruppe für verschiedene Atopie-assoziierte Merkmale.
3. Durch die Genotypisierung von MAS-Kindern als auch der Eltern können sowohl Fall-Kontroll- als auch TDT-Analysen durchgeführt werden. Signifikante Ergebnisse in einer Fall-Kontrollstudie können so durch TDT-

Analysen validiert werden. Dies wurde bei Markeranalysen auf Chromosom 5q und 13q hinsichtlich atopischer Dermatitis erfolgreich demonstriert [42].

4. Weiterhin konnten Assoziationen von genetischen Varianten (z.b. IL13) mit Gesamt-IgE Werten longitudinal mehrfach (an sechs Zeitpunkten) überprüft werden: So hatten Kinder mit einem IL13 110Gln/Gln und/oder IL13-1055TT Genotyp zu jedem Untersuchungszeitpunkt signifikant höhere Gesamt IgE Werte als Kinder mit einem oder zwei Wildtyp-Allelen ([43], s. Abb 1 in beigefügter Publikation). Eine Korrelation mit Gesamt-IgE Werten für diese IL13-Varianten wurde auch von Graves et al. in drei unabhängigen kaukasischen Populationen beschrieben [23], so daß hier -eine Rarität in der Atopie-Genetik- ohne Zweifel ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Phänotyp und Genotyp besteht.
5. Positive Ergebnisse konnten meist in mindestens einer weiteren Studienpopulation bestätigt werden. Insbesondere bei signifikanten Ergebnissen mit kleinen Fallzahlen halten wir die Überprüfung der Resultate in einer zweiten Population für unabdingbar. So konnten wir eine Assoziation von CC16 Genotypen mit dem Ausmaß der BHR bei asthmatischen Kindern der MAS Kohorte in einer unabhängig rekrutierten Asthma-Population aus Freiburg bestätigen [44]. Auch in zukünftigen Studien werden sowohl negative als auch positive Daten zu allen Untersuchungszeitpunkten bzw. in mindestens einer unabhängigen Studienpopulation überprüft. Nationale und internationale Kooperation werden hierfür in Anspruch genommen.

Auch wenn unsere Untersuchungen dazu beigetragen haben, valide Loci bzw. Kandidatengenvarianten zu identifizieren, konnten positive Ergebnisse der meisten

anderen publizierten Kopplungs- und Assoziationsstudien nicht -zumindest nicht für die gleichen Phänotypen- bestätigt werden.

Folgende Faktoren könnten zu diesen kontroversen Ergebnissen beitragen:

- Niedrige Fallzahlen;
- Falsch positive Ergebnisse: Oft wurden mehrere genetische Varianten in relativ kleinen Studienpopulationen auf eine Assoziation mit multiplen atopie-assoziierten Phänotypen getestet ohne für multiple Tests zu korrigieren. Hierdurch erhöht sich das Risiko falsch positiver Ergebnisse;
- Fehlende Haplotypenanalysen: Einzelne SNPs in Kandidatengenen wurden auf eine Assoziation mit Atopie untersucht sowie *in vitro* auf funktionelle Auswirkungen getestet. Polymorphe Gene können jedoch mehr als eine funktionelle Variante exprimieren (z.B. ADRB2, IL4RA). Je polymorpher ein Gen ist, desto schwieriger ist es, die biologische Relevanz hinsichtlich Interaktionen dieser Polymorphismen *in vitro* zu testen. Die Analyse einzelner SNPs spiegelt daher nicht immer die Funktion des Gens wider, wie kürzlich Untersuchungen des ADRB2 zeigten: Deutliche Unterschiede hinsichtlich des Ansprechens auf β -Mimetika wurden bei Trägern bestimmter Haplotypen (d.h. einer Kombination unterschiedlicher SNPs), jedoch nicht einzelner SNPs beobachtet [45]. Sind mehrere SNPs innerhalb eines Gens bekannt sollten daher bevorzugt Haplotypenanalysen durchgeführt werden.
- Gen-Gen-Interaktionen: Sind Polymorphismen in Genen mit ähnlicher Funktion sowie deren Rezeptoren (z.b. IL4, IL13, IL4RA) bekannt, ist es naheliegend, daß nicht einzelne SNPs, sondern das Zusammenspiel verschiedener Varianten einen Einfluß auf den Phänotyp (z.b. IgE-Synthese) haben. Gen-Gen Interaktionsstudien, wie von unserer Arbeitsgruppe beschrieben [43] werden daher eine große Bedeutung beigemessen.
- Gen-Umwelt-Interaktionen: Genetische Faktoren können nicht den dramatischen Anstieg der Prävalenz allergischer Erkrankungen über die letzten Jahrzehnte erklären. Es wird vermutet, daß die Änderung von Umweltfaktoren (Ernährung, Kontakt mit viralen und bakteriellen Antigenen etc.) in Zusammenspiel mit „genetischen Risikofaktoren“ die Entstehung allergischer Erkrankungen begünstigt. Daher ist die Untersuchung von Gen-Umweltinteraktionen von

großem Interesse. Diese Interaktionen stellen analytisch eine Herausforderung dar, da Quantifizierung und Charakterisierung von umweltbezogenen Risikofaktoren für Atopie (einschließlich Beginn und Dauer der Exposition) äußerst komplex und aufwendig sind. Es bedarf einer großen Anzahl möglichst longitudinal und sorgfältig charakterisierter Individuen, um Interaktionen zwischen genetischen und Umwelt-Einflüssen untersuchen zu können. Erste Gen-Umweltanalysen sind erfolgreich in der MAS-Kohorte durchgeführt worden: So beobachteten wir einen modifizierenden Effekt von Tabakrauchexposition auf die Gesamt-IgE Konzentration bei Trägern der IL13-Varianten C-1055T und Arg130Gln [43].

Auch ethnische Faktoren müssen bei dem Vergleich verschiedener Kopplungs- und Assoziationsstudien berücksichtigt werden. Vergleicht man die Häufigkeit genetischer Varianten in inflammatorischen Genen (die möglicherweise sowohl bei parasitären als auch allergischen Erkrankungen eine Rolle spielen), finden sich meist hochsignifikante Unterschiede in Allel- und Genotypfrequenzen. So konnten wir hochsignifikante Unterschiede in der Frequenz eines funktionellen Polymorphismus im Promotor des Chemokin-Gen RANTES beschreiben: Die Variante war bei Populationen mit afrikanischem Ursprung hochsignifikant häufiger als bei europäischen Populationen [46]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei einer kürzlich identifizierten Variante im C5AR (Komplement Faktor 5 Rezeptor) Promotor: Erneut fanden wir die funktionelle Variante hochsignifikant häufiger bei afrikanischen Individuen als bei Europäern (Barnes *et al.* in press). Weitere Beispiele wurden von LeSouef *et al.* zusammengefaßt [47].

Diese Differenzen könnten durch verschiedene Selektionsmechanismen (durch kontinentale Unterschiede im bakteriellen und parasitären Erregerspektrum), welche Abwehr und Überleben von Infektionskrankheiten verbesserten, entstanden sein. Folgende Studien deuten tatsächlich darauf hin, daß genetische Faktoren, die Resistenz gegen parasitäre Erreger vermitteln, ebenfalls die Suszeptibilität für allergische Erkrankungen erhöhen.

- Sowohl die Resistenz gegen *Schistosoma mansoni* [48] als auch die Parasitendichte von *Plasmodium falciparum* im Blut [49] ist mit Chromosom 5q31-33 Markern gekoppelt. Diese Region beinhaltet den Th2 Zytokin-Cluster und wurde mehrfach mit Asthma, AD und Atopie in Verbindung gebracht (s. o.).
- SNPs im FcεRI-β Gen sind mit IgE Konzentration in Parasiten-infizierten Australischen Aborigines korreliert. Diese SNPs zeigten ebenfalls Assoziationen mit Asthma, BHR, AD und Atopie. FcεRI-β ist auf Chromosom 11q13 lokalisiert, eine Region die in mehreren Studien eine Kopplung mit Asthma und anderen Atopie-assoziierten Merkmalen zeigte (s.o.).
- Ein Polymorphismus im β₂AR-kodierenden Gen (Arg16) der mit Asthma assoziiert wurde, wurde ebenso mit einer höheren Parasitendichte in infizierten Individuen assoziiert [50].

Ethnische Unterschiede in der Häufigkeit proinflammatorischer genetischer Varianten tragen möglicherweise auch zu den hochsignifikanten Unterschieden hinsichtlich der Prävalenz allergischer Erkrankungen weltweit bei [1].

5 Zusammenfassung und Schlußfolgerung.

Asthma, ARK und atopische Dermatitis sind komplexe, multifaktoriell bedingte Krankheitsbilder. Man vermutet, daß genetische Faktoren, welche evolutionär (Überleben von Infektionskrankheiten) selektiert wurden, bei mangelndem Kontakt mit viralen, bakteriellen oder parasitären Antigenen die Entstehung von atopischen Merkmalen begünstigen.

Kopplungs- und Kandidatengenstudien deuten auf gemeinsame als auch Krankheits- (bzw. Organ-) spezifische genetische Determinanten hin, wobei zahlreiche chromosomale Regionen und Kandidatengene mit Atopie-assoziierten Krankheitsbildern in Verbindung gebracht wurden. Internationale Zusammenarbeiten und Metaanalysen erscheinen notwendig, um die relevanten chromosomalen Regionen und Kandidatengene zu identifizieren. Haplotyp-, Gen-Gen- und Gen-Umweltinteraktionsstudien sind ebenfalls von hoher Relevanz, um genetische Risikofaktoren für allergische Erkrankungen zu evaluieren. Studienpopulationen wie die MAS-90 Geburtskohorte sind für derartige Analysen ideal, da seit Geburt longitudinal sowohl Exposition von verschiedenen Umwelteinflüssen dokumentiert wurden als auch Atopie-assoziierte Phänotypen mehrfach standardisiert erfaßt wurden.

Referenzen

- [1] (1998): Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee, *Lancet* 351 [9111], pp. 1225-32.
- [2] Arshad, S. H.; Tariq, S. M.; Matthews, S. and Hakim, E. (2001): Sensitization to common allergens and its association with allergic disorders at age 4 years: a whole population birth cohort study, *Pediatrics* 108 [2], p. E33.
- [3] Croner, S. and Kjellman, N. I. (1992): Natural history of bronchial asthma in childhood. A prospective study from birth up to 12-14 years of age, *Allergy* 47 [2 Pt 2], pp. 150-7.
- [4] Ownby, D. R.; Peterson, E. L. and Johnson, C. C. (2000): Factors related to methacholine airway responsiveness in children, *Am J Respir Crit Care Med* 161 [5], pp. 1578-83.
- [5] Palmer, L. J.; Rye, P. J.; Gibson, N. A.; Burton, P. R.; Landau, L. I. and Lesouef, P. N. (2001): Airway responsiveness in early infancy predicts asthma, lung function, and respiratory symptoms by school age, *Am J Respir Crit Care Med* 163 [1], pp. 37-42.
- [6] Rhodes, H. L.; Sporik, R.; Thomas, P.; Holgate, S. T. and Cogswell, J. J. (2001): Early life risk factors for adult asthma: a birth cohort study of subjects at risk, *J Allergy Clin Immunol* 108 [5], pp. 720-5. URL: <http://www.mosby.com/scripts/om.dll/serve?action=searchDB&searchDBfor=art&artType=abs&id=a119151&target=>
- [7] Tariq, S. M.; Matthews, S. M.; Hakim, E. A.; Stevens, M.; Arshad, S. H. and Hide, D. W. (1998): The prevalence of and risk factors for atopy in early childhood: a whole population birth cohort study, *J Allergy Clin Immunol* 101 [5], pp. 587-93.
- [8] Kulig, M.; Bergmann, R.; Klettke, U.; Wahn, V.; Tacke, U. and Wahn, U. (1999): Natural course of sensitization to food and inhalant allergens during the first 6 years of life, *J Allergy Clin Immunol* 103 [6], pp. 1173-9.
- [9] Togias, A. (1999): Mechanisms of nose-lung interaction, *Allergy* 54 [Suppl 57], pp. 94-105.
- [10] Gereda, J. E.; Leung, D. Y.; Thatayatikom, A.; Streib, J. E.; Price, M. R.; Klinnert, M. D. and Liu, A. H. (2000): Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma, *Lancet* 355 [9216], pp. 1680-3.
- [11] Illi, S.; von Mutius, E.; Lau, S.; Bergmann, R.; Niggemann, B.; Sommerfeld, C. and Wahn, U. (2001): Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study, *Bmj* 322 [7283], pp. 390-5.
- [12] Von Ehrenstein, O. S.; Von Mutius, E.; Illi, S.; Baumann, L.; Bohm, O. and von Kries, R. (2000): Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers, *Clin Exp Allergy* 30 [2], pp. 187-93.
- [13] von Mutius, E.; Martinez, F. D.; Fritsch, C.; Nicolai, T.; Reitmeir, P. and Thiemann, H. H. (1994): Skin test reactivity and number of siblings, *Bmj* 308 [6930], pp. 692-5.
- [14] von Mutius, E.; Martinez, F. D.; Fritsch, C.; Nicolai, T.; Roell, G. and Thiemann, H. H. (1994): Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany, *Am J Respir Crit Care Med* 149 [2 Pt 1], pp. 358-64.

- [15] von Mutius, E.; Braun-Fahrlander, C.; Schierl, R.; Riedler, J.; Ehlermann, S.; Maisch, S.; Waser, M. and Nowak, D. (2000): Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy, *Clin Exp Allergy* 30 [9], pp. 1230-4.
- [16] Sandford, A.; Weir, T. and Pare, P. (1996): The genetics of asthma, *Am J Respir Crit Care Med* 153 [6 Pt 1], pp. 1749-65.
- [17] Skadhauge, L. R.; Christensen, K.; Kyvik, K. O. and Sigsgaard, T. (1999): Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11,688 Danish twin pairs, *Eur Respir J* 13 [1], pp. 8-14.
- [18] Lander, E. S. and Schork, N. J. (1994): Genetic dissection of complex traits, *Science* 265 [5181], pp. 2037-48.
- [19] Sengler, C.; Lau, S.; Wahn, U. and Nickel, R. (2002): Interactions between genes and environmental factors in asthma and atopy: new developments, *Respir Res* 3 [1], p. 7.
- [20] Van Eerdewegh, P.; Little, R. D.; Dupuis, J.; Del Mastro, R. G.; Falls, K.; Simon, J.; Torrey, D.; Pandit, S.; McKenny, J.; Braunschweiger, K.; Walsh, A.; Liu, Z.; Hayward, B.; Folz, C.; Manning, S. P.; Bawa, A.; Saracino, L.; Thackston, M.; Benchekroun, Y.; Capparell, N.; Wang, M.; Adair, R.; Feng, Y.; Dubois, J.; FitzGerald, M. G.; Huang, H.; Gibson, R.; Allen, K. M.; Pedan, A.; Danzig, M. R.; Umland, S. P.; Egan, R. W.; Cuss, F. M.; Rorke, S.; Clough, J. B.; Holloway, J. W.; Holgate, S. T. and Keith, T. P. (2002): Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness, *Nature* 418 [6896], pp. 426-30.
- [21] Heinzmann, A.; Mao, X. Q.; Akaiwa, M.; Kreomer, R. T.; Gao, P. S.; Ohshima, K.; Umeshita, R.; Abe, Y.; Braun, S.; Yamashita, T.; Roberts, M. H.; Sugimoto, R.; Arima, K.; Arinobu, Y.; Yu, B.; Kruse, S.; Enomoto, T.; Dake, Y.; Kawai, M.; Shimazu, S.; Sasaki, S.; Adra, C. N.; Kitaichi, M.; Inoue, H.; Yamauchi, K.; Tomichi, N.; Kurimoto, F.; Hamasaki, N.; Hopkin, J. M.; Izuhara, K.; Shirakawa, T. and Deichmann, K. A. (2000): Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy, *Hum Mol Genet* 9 [4], pp. 549-59.
- [22] Liu, X.; Nickel, R.; Beyer, K.; Wahn, U.; Ehrlich, E.; Freidhoff, L. R.; Bjorksten, B.; Beaty, T. H. and Huang, S. K. (2000): An IL13 coding region variant is associated with a high total serum IgE level and atopic dermatitis in the German multicenter atopy study (MAS-90), *J Allergy Clin Immunol* 106 [1 Pt 1], pp. 167-70.
- [23] Graves, P. E.; Kabesch, M.; Halonen, M.; Holberg, C. J.; Baldini, M.; Fritzsche, C.; Weiland, S. K.; Erickson, R. P.; von Mutius, E. and Martinez, F. D. (2000): A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children, *J Allergy Clin Immunol* 105 [3], pp. 506-13.
- [24] Hershey, G. K.; Friedrich, M. F.; Esswein, L. A.; Thomas, M. L. and Chatila, T. A. (1997): The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor, *N Engl J Med* 337 [24], pp. 1720-5.
- [25] Baldini, M.; Lohman, I. C.; Halonen, M.; Erickson, R. P.; Holt, P. G. and Martinez, F. D. (1999): A Polymorphism* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E, *Am J Respir Cell Mol Biol* 20 [5], pp. 976-83.

- [26] Koppelman, G. H.; Reijmerink, N. E.; Colin Stine, O.; Howard, T. D.; Whittaker, P. A.; Meyers, D. A.; Postma, D. S. and Bleecker, E. R. (2001): Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy, *Am J Respir Crit Care Med* 163 [4], pp. 965-9.
- [27] Laing, I. A.; Goldblatt, J.; Eber, E.; Hayden, C. M.; Rye, P. J.; Gibson, N. A.; Palmer, L. J.; Burton, P. R. and Le Souef, P. N. (1998): A polymorphism of the CC16 gene is associated with an increased risk of asthma, *J Med Genet* 35 [6], pp. 463-7.
- [28] Laing, I. A.; Hermans, C.; Bernard, A.; Burton, P. R.; Goldblatt, J. and Le Souef, P. N. (2000): Association between plasma CC16 levels, the A38G polymorphism, and asthma, *Am J Respir Crit Care Med* 161 [1], pp. 124-7.
- [29] Spiteri, M. A.; Bianco, A.; Strange, R. C. and Fryer, A. A. (2000): Polymorphisms at the glutathione S-transferase, GSTP1 locus: a novel mechanism for susceptibility and development of atopic airway inflammation, *Allergy* 55 Suppl 61 [8], pp. 15-20.
- [30] Becker, K. G.; Simon, R. M.; Bailey-Wilson, J. E.; Freidlin, B.; Biddison, W. E.; McFarland, H. F. and Trent, J. M. (1998): Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [17], pp. 9979-84. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/full/95/17/9979>
- [31] Lee, Y. A.; Wahn, U.; Kehrt, R.; Tarani, L.; Businco, L.; Gustafsson, D.; Andersson, F.; Oranje, A. P.; Wolkertstorfer, A.; Berg, Av; Hoffmann, U.; Kuster, W.; Wienker, T.; Ruschendorf, F. and Reis, A. (2000): A major susceptibility locus for atopic dermatitis maps to chromosome 3q21, *Nat Genet* 26 [4], pp. 470-3.
- [32] Cookson, W. O.; Ubhi, B.; Lawrence, R.; Abecasis, G. R.; Walley, A. J.; Cox, H. E.; Coleman, R.; Leaves, N. I.; Trembath, R. C.; Moffatt, M. F. and Harper, J. I. (2001): Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci, *Nat Genet* 27 [4], pp. 372-3.
- [33] Nickel, R.; Niggemann, B.; Gruber, C.; Kulig, M.; Wahn, U. and Lau, S. (2002): How should a birth cohort study be organised? Experience from the German MAS cohort study, *Paediatr Respir Rev* 3 [3], pp. 169-76.
- [34] Warner, J. O. (2001): 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* 108 [6], pp. 929-37.
- [35] Barnes, K. C.; Neely, J. D.; Duffy, D. L.; Freidhoff, L. R.; Breazeale, D. R.; Schou, C.; Naidu, R. P.; Levett, P. N.; Renault, B.; Kucherlapati, R.; Iozzino, S.; Ehrlich, E.; Beaty, T. H. and Marsh, D. G. (1996): Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: evidence from Afro-Caribbean and Caucasian populations, *Genomics* 37 [1], pp. 41-50.
- [36] Nickel, R.; Wahn, U.; Hizawa, N.; Maestri, N.; Duffy, D. L.; Barnes, K. C.; Beyer, K.; Forster, J.; Bergmann, R.; Zepp, F.; Wahn, V. and Marsh, D. G. (1997): Evidence for linkage of chromosome 12q15-q24.1 markers to high total serum IgE concentrations in children of the German Multicenter Allergy Study, *Genomics* 46 [1], pp. 159-62.

- [37] Nickel, R.; Kulig, M.; Forster, J.; Bergmann, R.; Bauer, C. P.; Lau, S.; Guggenmoos-Holzmann, I. and Wahn, U. (1997): 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* 99 [5], pp. 613-7.
- [38] Illi, S.; Von Mutius, E.; Lau, S.; Nickel, R.; Niggemann, B.; Sommerfeld, C. and Wahn, U. (2001): The pattern of atopic sensitization is associated with the development of asthma in childhood, *J Allergy Clin Immunol* 108 [5 Part 1], pp. 709-14. URL: <http://www.mosby.com/scripts/om.dll/serve?action=searchDB&searchDBfor=art&artType=abs&id=a118786&target=>
- [39] Gruber, C.; Illi, S.; Lau, S.; Nickel, R.; Forster, J.; Kamin, W.; Bauer, C. P.; Wahn, V. and Wahn, U. (2003): Transient suppression of atopy in early childhood is associated with high vaccination coverage, *Pediatrics* 111 [3], pp. e282-8.
- [40] Alm, J. S.; Swartz, J.; Lilja, G.; Scheynius, A. and Pershagen, G. (1999): Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle, *Lancet* 353 [9163], pp. 1485-8.
- [41] Nickel, R.; Lau, S.; Niggemann, B.; Sommerfeld, C. and Wahn, U. (2002): Comparison of bronchial responsiveness to histamine in asthma, allergic rhinitis and allergic sensitization at the age of 7 years, *Clin Exp Allergy* 32 [9], pp. 1274-7.
- [42] Beyer, K.; Nickel, R.; Freidhoff, L.; Bjorksten, B.; Huang, S. K.; Barnes, K. C.; MacDonald, S.; Forster, J.; Zepp, F.; Wahn, V.; Beaty, T. H.; Marsh, D. G. and Wahn, U. (2000): Communications: association and linkage of atopic dermatitis with chromosome 13q12-14 and 5q31-33 markers, *J Invest Dermatol* 115 [5], pp. 906-8.
- [43] Liu, X.; Beaty, T. H.; Deindl, P.; Huang, S. K.; Lau, S.; Sommerfeld, C.; Fallin, M. D.; Kao, W. H.; Wahn, U. and Nickel, R. (2003): Associations between total serum IgE levels and the 6 potentially functional variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study, *J Allergy Clin Immunol* 112 [2], pp. 382-8.
- [44] Sengler, C.; Heinzmann, A.; Jerkic, S. P.; Haider, A.; Sommerfeld, C.; Niggemann, B.; Lau, S.; Forster, J.; Schuster, A.; Kamin, W.; Bauer, C.; Laing, I.; LeSouef, P.; Wahn, U.; Deichmann, K.; Nickel, R.; Baldini, M. and Martinez, F. (2003): Clara cell protein 16 (CC16) gene polymorphism influences the degree of airway responsiveness in asthmatic children, *J Allergy Clin Immunol* 111 [3], pp. 515-9.
- [45] Drysdale, C. M.; McGraw, D. W.; Stack, C. B.; Stephens, J. C.; Judson, R. S.; Nandabalan, K.; Arnold, K.; Ruano, G. and Liggett, S. B. (2000): Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [19], pp. 10483-8.

- [46] Nickel, R. G.; Casolaro, V.; Wahn, U.; Beyer, K.; Barnes, K. C.; Plunkett, B. S.; Freidhoff, L. R.; Sengler, C.; Plitt, J. R.; Schleimer, R. P.; Caraballo, L.; Naidu, R. P.; Levett, P. N.; Beaty, T. H. and Huang, S. K. (2000): Atopic dermatitis is associated with a functional mutation in the promoter of the C-C chemokine RANTES, *J Immunol* 164 [3], pp. 1612-6.
- [47] Le Souef, P. N.; Goldblatt, J. and Lynch, N. R. (2000): Evolutionary adaptation of inflammatory immune responses in human beings, *Lancet* 356 [9225], pp. 242-4.
- [48] Marquet, S.; Abel, L.; Hillaire, D.; Dessein, H.; Kalil, J.; Feingold, J.; Weissenbach, J. and Dessein, A. J. (1996): Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33, *Nat Genet* 14 [2], pp. 181-4.
- [49] Rihet, P.; Traore, Y.; Abel, L.; Aucan, C.; Traore-Leroux, T. and Fumoux, F. (1998): Malaria in humans: *Plasmodium falciparum* blood infection levels are linked to chromosome 5q31-q33, *Am J Hum Genet* 63 [2], pp. 498-505. URL: <http://www.journals.uchicago.edu/cgi-bin/resolve?AJHG980143ABS>
- [50] Ramsay, C. E.; Hayden, C. M.; Tiller, K. J.; Burton, P. R.; Hagel, I.; Palenque, M.; Lynch, N. R.; Goldblatt, J. and LeSouef, P. N. (1999): Association of polymorphisms in the beta2-adrenoreceptor gene with higher levels of parasitic infection, *Hum Genet* 104 [3], pp. 269-74.

Danksagung

Ich danke meinen Eltern, die mich in meinem beruflichen Werdegang in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Mein Partner Jan Krüger hat mich sehr zur Habilitation ermutigt und dafür des öfteren einsame Nächte, Stimmungsschwankungen und Kinderbetreuung in Kauf genommen.

Meinem Chef Prof. Dr. Ulrich Wahn bin ich für seinen ansteckenden Enthusiasmus für wissenschaftliches Arbeiten auf dem Gebiet der Allergologie dankbar. Er hat mir nicht nur den Aufenthalt am Johns Hopkins Allergy and Asthma Center (USA) sondern auch die erfolgreiche Fortsetzung meiner dort durchgeführten Studien in Berlin ermöglicht.

Mein Betreuer am Johns Hopkins Allergy and Asthma Center Dr. David Marsh hat mir Theorie und Praxis der Molekularbiologie vermittelt. Die Qualität und der hohe Anspruch an seine wissenschaftliche Arbeit sind mir zum Vorbild geworden.

Über die weiterbestehende, produktive Zusammenarbeit mit meinen Kolleginnen am Johns Hopkins Allergy and Asthma Center Dr. Kathleen Barnes, Dr. Liu Xin und Dr. Terri Beaty bin ich sehr erfreut.

Ganz besonders bin ich natürlich allen Mitarbeitern der MAS-Studie sowie allen seit 13 Jahren teilnehmenden MAS-Familien verbunden, die meine wissenschaftliche Arbeit so intensiv unterstützt bzw. ermöglicht haben.

Ohne meine MitarbeiterInnen und DoktorandInnen Claudia Sengler, Anja Kubinski, Assja Haider, Philipp Deindl, Sebastian Müller, Sebastian Obereit, Stefan Deckana und Mera Abera-Lemu wären die hier dargestellten Arbeiten nicht zustande gekommen.

PD Dr. Klaus Deichmann und Dr. Andrea Heinzmann (Freiburg) und Dr. Michael Kabesch (München) bin ich für ihre Kooperation bei mehreren Projekte dankbar.

Mit Dr. Heiko Witt teile ich räumliche und finanzielle Ressourcen und genieße die Planung und Durchführung gemeinsamer Projekte sowie viele stimulierende -nicht nur- wissenschaftliche Diskussionen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt:

- dass die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen und technischen Hilfskräften sowie die Literatur vollständig angegeben sind;
- dass mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist;
- dass kein Habilitationsverfahren im Geltungsbereich des Grundgesetzes im gleichen wissenschaftlichen Fach oder Fachgebiet früher durchgeführt oder bereits wiederholt wurde;
- dass nicht gleichzeitig an anderer Stelle ein Habilitationsverfahren im gleichen wissenschaftlichen Fach oder Fachgebiet durchgeführt wird;
- dass kein staatsanwaltliches Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig ist.

Berlin, den 18. September 2003

Anhang