

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
Institut für Epidemiologie
Direktor Prof. Dr. Dr. H. -Erich Wichmann
Neuherberg

**Genetische Assoziation von SNPs in *IL1RN* mit
Asthma bronchiale**

Henning Gohlke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.rer.nat., Dr.agr.habil. Heinrich H. D. Meyer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ. -Prof. Dr.sc.techn.ETH, Dr.agr.habil. Hans-Rudolf Fries
2. Univ.-Prof. Dr.med., Dr.rer.nat. Heinz-Erich Wichmann
(Ludwig-Maximilians-Universität München)
3. Priv.-Doz. Dr.rer.nat., Dr.rer.biol.hum. Jerzy Adamski

Die Dissertation wurde am 06.05.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.8.2004 angenommen.

Danksagung:

Mein Dank gilt sowohl Herrn Prof. Dr. Dr. H. -Erich Wichmann, der mich bei der vorliegenden Arbeit anleitete und mir die Möglichkeit gab, an diesem interessanten Thema an der GSF zu forschen, als auch Herrn Prof. Dr. R. Fries, der die externe Betreuung dieser Dissertation an der TU München übernahm. Für die freundliche Unterstützung und die Übernahme als dritter Prüfer dieser Arbeit möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. Dr. Jerzy Adamski bedanken.

Herrn Dr. Thomas Illig danke ich für die zuverlässige theoretische und praktische Hilfestellung bei der Anfertigung meiner Arbeit. Durch seine wissenschaftliche und persönliche Unterstützung wurden mir viele Schwierigkeiten aus dem Wege geräumt, was zur erfolgreichen Fertigstellung wesentlich beitrug. Frau Magreth Bahnweg danke ich für ihre unermüdliche Mitarbeit, Geduld und Freundlichkeit, die sich zu einem großen Teil in der Arbeit niedergeschlagen haben. Herrn PD Dr. Wjst danke ich für die sorgfältige Durchsicht der Rohfassung der Arbeit.

Meinen Eltern bin ich dafür dankbar, dass sie mir in dieser Zeit immer mit Rat und Tat zur Seite standen, wenn ich Hilfe brauchte.

Frau Gabi Dütsch hat mir mit ihrer Diskussionsbereitschaft und ihrem freundschaftlichen Rat sehr geholfen, die Arbeit trotz mancher Probleme zu vollenden.

Unterstützung habe ich weiterhin von Herrn Dr. Norman Klopp und Frau Dr. Caren Vollmert erhalten, für die ich mich gleichfalls bedanke.

Bedanken möchte ich mich zusätzlich bei Frau Dr. Annegret Glang-Süberkrüb, meiner Schwester Berit Baumeister und allen anderen fleißigen Korrekturlesern.

Außerdem danke ich allen, die hier nicht erwähnt sind, dass sie sich während dieser Jahre soviel Mühe gegeben haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Jessica Glang, die mir zu jeder Zeit mit Liebe und Geduld zur Seite stand.

INHALTSVERZEICHNIS	I
AUFGABENSTELLUNG	V
ZUSAMMENFASSUNG	VII
SUMMARY	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
1. Einleitung	1
1.1. Asthma bronchiale: Definition und Einteilung	1
1.2. Zelluläre und humorale Grundlagen von Asthma bronchiale	2
1.2.1. Sensibilisierung und Gedächtnis	4
1.2.2. Die Sofortreaktion	5
1.2.3. Die Spätreaktion	6
1.3. Genetische Komponenten von Asthma	7
1.3.1. Genomweite Suchen	9
1.3.2. Die Kopplungsregion Chromosom 2q12-14	10
1.4. Asthmakandidatengene im IL1-Cluster	12
1.4.1. Interleukin-1	12
1.4.1.1. IL-1 α und IL-1 β	13
1.4.1.2. IL-1 – “High-Affinity Receptor Complex”	14
1.4.1.3. Signalvermittlung durch IL1-RI	14
1.4.1.4. Regulation der IL-1-Aktivität	16
1.4.2. Interleukin-18	18
1.4.2.1. IL-18 - “High-Affinity Receptor Complex”	19
1.4.2.2. Signalvermittlung durch IL-18RI	20
1.4.2.3. Regulation der IL-18-Aktivität	20
1.4.3. Signalwege ungeklärter Funktion	20
1.4.3.1. Interleukin-1F9	20
1.4.3.2. T1/ST2	21
1.4.3.3. Liganden mit noch unbekannter Funktion	21
2. Methoden	22
2.1. DNA-Präparation aus Vollblut	22
2.2. Konzentrationsbestimmung genomischer DNA-Lösungen	22
2.3. DNA-Elektrophorese	23
2.4. Erstellung genomischer Pools	23
2.5. PCR (Polymerase Chain Reaction)	23
2.6. Aufreinigung von PCR-Produkten	25
2.7. Sequenzierung aufgereinigter PCR-Fragmente	25
2.8. SNP-Detektion mittels MALDI-TOF MS	26
2.8.1. PROBE-Reaktion	28
2.8.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) im Rahmen der PROBE-Reaktion	29

2.8.1.2. Primer-Extensionsreaktion im Rahmen der PROBE-Reaktion	30
2.8.1.3. MALDI-TOF MS-Analyse im Rahmen der PROBE-Reaktion	30
2.8.2. PROBE-Reaktion „TAG-Primer“	31
2.8.3. hME-(homogeneous MassExtend™) Methode	32
2.8.3.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) im Rahmen der hME-Methode	32
2.8.3.2. Primer-Extensions-Reaktion im Rahmen der hME-Methode	33
2.8.3.3. MALDI-TOF-Massenspektrometrie im Rahmen der hME-Methode	33
2.9. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	35
2.9.1. IL-1ra Nachweis mittels ELISA	35
2.10. Statistische Analysen	36
2.10.1. Paternitätstest (Mendel Check)	36
2.10.2. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	36
2.10.3. Einzellocus-Analyse	36
2.10.4. Zwei- und Dreilocus-Analyse	36
2.10.5. Tagging-SNPs und Mehrpunkthaplotypen	37
2.10.6. Berechnung des Kopplungsungleichgewichtes	37
3. Material	38
3.1. Geräte	38
3.2. Computerprogramme	39
3.2.1. Pipettierrobotor	39
3.2.2. MALDI-TOF-Massenspektrometrie	39
3.2.3. Sequenzierung	39
3.2.4. Primer und PCR-Bedingungen	40
3.2.5. Analyse genomischer DNA-Sequenzen	40
3.2.6. Datenbanken aus dem Internet	40
3.2.7. Statistische Programme	40
3.3. Puffer, Lösungen, Reagenzien	40
3.3.1. Reagenzien, Lösungen und Puffer für die PCR	40
3.3.2. Reagenzien, Lösungen und Puffer für die Sequenzierung	41
3.3.3. Reagenzien, Lösungen und Puffer für MALDI-TOF	41
3.3.4. Reagenzien, Lösungen und Puffer für die DNA Gel-Elektrophorese	41
3.3.5. Weitere Reagenzien, Lösungen und Puffer	41
3.3.6. Längenstandards für DNA-Agarose-Gele	41
3.4. Reaktionskits	41
3.4.1. DNA-Isolation aus Vollblut	41
3.4.2. Konzentrationsbestimmung von DNA	41
3.4.3. PCR-Aufreinigung	42
3.4.4. Sequenzierkits	42
3.4.5. MALDI-TOF Massenspektrometrie	42
3.4.6. Sequenzierprodukt-Aufreinigungskit	42
3.5. ELISA-Kits	42

3.6. Enzyme	42
3.6.1. Polymerasen	42
3.7. Sonstige Enzyme	42
3.8. Primer	42
4. Probanden	43
4.1. Asthma-Familienstudie Deutschland	43
4.1.1. Studienaufbau und Kriterien	43
4.1.2. Phänotypisierung der Studienteilnehmer	44
4.2. Asthma-Familienstudie Italien	44
4.3. KORA S 2000-Studie	45
4.4. ECRHS-Studie	45
5. Ergebnisse	46
5.1. Biallelische Marker (SNPs) aus dem <i>IL1</i> -Cluster in genomischen Pools	46
5.2. Genotypisierung biallelischer SNPs aus Genen des <i>IL1</i> -Clusters	50
5.2.1. Analyse von SNPs im <i>IL1R2</i> Gen	54
5.2.2. Analyse von SNPs im <i>IL1R1</i> Gen	55
5.2.3. Analyse von SNPs im <i>IL1RL2</i> Gen	56
5.2.4. Analyse von SNPs im <i>IL1RL1</i> Gen	57
5.2.5. Analyse von SNPs im <i>IL18R1</i> Gen	58
5.2.6. Analyse von SNPs im <i>IL18RAP</i> Gen	59
5.2.7. Analyse von SNPs im <i>IL1A</i> Gen	60
5.2.8. Analyse von SNPs im <i>IL1B</i> Gen	61
5.2.9. Analyse von SNPs im <i>IL1F6</i> Gen	62
5.2.10. Analyse von SNPs im <i>IL1F8</i> Gen	63
5.2.11. Analyse von SNPs im <i>IL1F5</i> Gen	63
5.2.12. Analyse von SNPs im <i>IL1RN</i> Gen	65
5.2.13. Analyse von SNPs in der zu <i>IL1RN</i> distalen Region	67
5.3. Analyse exonischer Bereiche von <i>IL1RN</i>	69
5.4. Überprüfung der Assoziationsergebnisse in einer unabhängigen Studie	73
5.5. Analyse des Intron 2 Repeats aus <i>IL1RN</i>	74
Zusammenfassende statistische Auswertung der Ergebnisse	75
5.5.1. Linkage Disequilibrium im <i>IL1</i> -Cluster	75
5.5.2. Einzellocusanalyse im <i>IL1</i> -Cluster	76
5.5.3. Zwei-Locusanalyse im <i>IL1</i> -Cluster	77
5.5.4. Drei-Locusanalyse im <i>IL1</i> -Cluster	78
5.5.5. Haplotype tagging (ht) SNPs und Mehrpunkthaplotypen	79
5.6. Konzentrationsbestimmung von IL-1ra im Serum	81
5.7. Resequenzierung des Promotorbereiches mit anschließender Genotypisierung	82
6. Diskussion	85
6.1. Auswahl der SNPs und Genotypisierung	85
6.2. Assoziationsergebnisse der SNPs	86

6.3. Studiendesign	88
6.4. IL-1ra im Serum	90
6.5. Mögliche Auswirkungen des IL-1 – IL-1ra Ungleichgewichts auf die Entwicklung von Asthma	90
6.5.1. IL-1/IL-1ra- Ungleichgewicht und T _H 1/T _H 2 Ungleichgewicht	92
6.5.2. IL-1/IL-1ra Ungleichgewicht und entzündliche Reaktion bei Asthma bronchiale	95
6.5.3. IL-1/IL-1ra Ungleichgewicht und andere Erkrankungen	97
6.6. Ausblick	98
7. Anhang	A
7.1. Verwendete Primer für die Genotypisierung	A
7.2. Für die Sequenzierung verwendete Primer	K
7.3. Primer für den Intron Repeat	K
7.4. SNPs aus der Resequenzierung	A
7.5. Abbildungsverzeichnis	F
7.6. Tabellenverzeichnis	J
7.7. Publikationsliste	O
7.8. Literaturverzeichnis	P

Aufgabenstellung

Bei Asthma bronchiale handelt es sich um eine Atemwegserkrankung, von der in Deutschland aufgrund zunehmender Prävalenz ca. 6-8 % der Erwachsenen und über 10 % der Kinder betroffen sind. Wegen starker Einschränkung der Lebensqualität der Erkrankten, aber auch durch die Belastung des Gesundheitssystems besteht ein Forschungsziel darin, die dieser Krankheit zu Grunde liegenden Ursachen zu bestimmen und wirkungsvolle Behandlungsmethoden zu entwickeln. Neben starker Umwelteinflüsse, die vermutlich einen Beitrag zur Krankheitsentwicklung von Asthma bronchiale liefern, häufen sich die Indizien, dass dieser Erkrankung auch eine bedeutende genetische Komponente zu Grunde liegt. In verschiedenen genomweiten Suchen konnten auf unterschiedlichen humanen Chromosomen Kopplungsregionen identifiziert werden, die mit Asthma und ähnlichen Phänotypen assoziierte Gene enthalten.

In einer vorangegangenen genomweiten Suche und einer anschließenden Feinkartierung wurde Kopplung mit der chromosomalen Region 2q12-14 und Asthma gefunden.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, in der beschriebenen Kopplungsregion 2q12-14 Kandidatengene zu identifizieren. Asthma bronchiale ist eine Erkrankung, bei der vermutlich ein fehlgesteuertes Immunsystem eine Rolle spielt, welches mit einer verstärkten Entzündungsreaktion auf Umweltallergene reagiert. Aufgrund dieser Annahme wurden primär potentielle Kandidatengene mit immunologischer Funktion ausgewählt.

Anschließend sollte für die auf diese Weise identifizierten Kandidatengene in öffentlichen Datenbanken nach bekannten Polymorphismen, vornehmlich SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), gesucht werden. Das Vorhandensein dieser DNA-Variationen war daraufhin zu bestätigen und danach einzeln laborexperimentell zu untersuchen. Die Validierung der SNPs, sowie die Einzelgenotypisierung sollte mittels MALDI-TOF MS-Analyse (Matrixassisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI); Time Of Flight (TOF); Massenspektrometrie (MS)) spezifischer Primer-Extensionsprodukte erfolgen. Zur Auswertung gefundener Assoziation sollte die

präferenzielle Weitergabe bestimmter Allele in Asthmafamilien getestet werden und evtl. positive Assoziationen durch geeignete funktionelle Studien überprüft werden.

Zusammenfassung

Asthma ist eine inflammatorische Erkrankung der Atemwege, die momentan eine der häufigsten chronischen Erkrankungen von Kindern in Industrieländern darstellt. Obwohl erwiesen ist, dass Umweltfaktoren einen Beitrag zur Krankheitsentwicklung leisten, weisen epidemiologische Studien zusätzlich auf eine bedeutende genetische Komponente hin. Nach einer genomweiten Suche innerhalb einer deutschen Familienstudie mit „affected sib pairs“ und einer anschließenden Feinkartierung konnte Kopplung mit Asthma in der chromosomalen Region 2q12-2q14 gefunden werden. Das IL-1 Cluster (Interleukin-1-Cluster) auf dem menschlichen Chromosom 2q12-2q14 beinhaltet verschiedene viel versprechende Kandidatengene für Asthma und andere inflammatorische Erkrankungen. In dieser Arbeit wurde eine systematische Assoziationsstudie mit SNPs durchgeführt, die in Kandidatengenen dieses Clusters lokalisiert sind. Sowohl die statistische Einzelmarkeranalyse als auch die Zweilocus- und Dreilocushaplotypenanalyse ergaben mehrere signifikante Ergebnisse ($p < 0.05 - 0.0021$) für das menschliche *IL1RN*-Gen, das das IL-1ra-Protein, ein antiinflammatorisches Cytokin, codiert. IL-1ra spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen inflammatorischen und antiinflammatorischen Reaktionen. Diese Ergebnisse wurden in einer unabhängigen italienischen Familienstudie bestätigt, innerhalb derer schwächere, aber trotzdem ebenfalls signifikante Assoziationsergebnisse ermittelt wurden. Mit Hilfe einer Sequenzierung für die codierende Region des humanen *IL1RN* Gens konnten zusätzliche DNA-Varianten bestimmt werden, von denen weitere SNPs sowohl in der deutschen als auch in der italienischen Studie mit der Krankheit assoziiert waren. Zusätzlich konnte in anderen Versuchen, die nicht Bestandteil dieser Arbeit sind, gezeigt werden, dass 13 SNPs aus dem *IL1RN* Gen in der ECRHS Studie (European Community Respiratory Health Survey) mit Asthma und IgE (Immunglobulin E) sowohl bei der Einzelmarkeranalyse als auch bei dem aus 13 Markern gebildeten Haplotypen assoziiert sind. Die Berechnung des Kopplungsungleichgewichtes im menschlichen *IL1RN* Gen zeigte hohes LD (Linkage Disequilibrium) für fast alle analysierten SNPs. Darüber hinaus wies eine Haplotypenanalyse auf, dass 6 SNPs ausreichend sind, um die Variationen aller Haplotypen mit einer Prävalenz von $> 1\%$ zu beschreiben. Der am häufigsten vorkommende Haplotyp, der aus diesen 6 „tagging SNPs“ gebildet wird, ist in den deutschen Familien 1,4-fach häufiger transmittiert. Die Resultate dieser Arbeit zeigen damit, dass bestimmte SNPs und Haplotypen im menschlichen *IL1RN* Gen Risikofaktoren für die Ausprägung von Asthma sind. Anhand einer zusätzlichen Resequenzierung konnten mehrere bis dahin unbekannte DNA-Variationen in beiden Promotoren, die die *IL1RN* Aktivität regulieren, identifiziert werden. Einer dieser Polymorphismen liegt in einer NFkB-

Bindestelle (Nuclear Factor- κ B), wies aber keine Assoziation mit Asthma auf. Außerdem war die IL-1ra Konzentration im Serum bei Asthmatikern höher als bei Nichtasthmatikern.

Summary

Asthma is an inflammatory disease of the airways, currently the most common chronic childhood disorder in industrialized countries. Although environmental factors are known to contribute to the development of the disease, epidemiological studies point towards a strong genetic influence. After a genome-wide screen in German affected sib pair families and a subsequent finemapping approach linkage with asthma was identified on chromosome 2q12-2q14. The interleukin-1 cluster on human chromosome 2q12-2q14 harbours various promising candidate genes for asthma and other inflammatory diseases. A systematic association study with SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) located in candidate genes was conducted. Single marker association, two locus and three locus haplotype analyses of SNPs, yielded several significant results ($p < 0.05 - 0.0021$) for the human *IL1RN* gene. It encodes the IL-1ra protein, an anti-inflammatory cytokine playing an important role in the maintenance of the balance between inflammatory and anti-inflammatory cytokines. These results were replicated and confirmed in an independent Italian family sample where also significant though weaker association with SNPs and asthma was detected. Further analysis of 13 SNPs, which was not part of this work showed significant association with asthma and IgE (Immunglobuline E) in the *IL1RN* gene in single as well as in 13 Marker haplotype-analysis in the ECRHS-study (European Community Respiratory Health Survey). Resequencing of the coding region of the human *IL1RN* gene revealed additional DNA variants, from which a subset was also associated in the German and the Italian sample. Calculation of the linkage disequilibrium in the human *IL1RN* gene showed almost perfect LD (Linkage Disequilibrium) for nearly all analysed SNPs. Further haplotype analysis indicated that 6 SNPs are sufficient for tagging haplotypes with a prevalence $> 1\%$. The most frequent haplotype constructed from these SNPs was 1,4 fold overtransmitted in the German families. The results of this study provide evidence that specific SNPs and haplotypes in the human *IL1RN* gene encoding the IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) are a risk factor for the etiology of asthma. An additional re-sequencing approach to reveal undiscovered DNA variations in either of the two promoters regulating the IL-RN expression identified additional variants, from which one SNP was located in a NFkB binding site which did not show association with the disease. Finally the IL-1ra concentration was measured in all participants of the German family study and showed higher levels in patients with asthma.

Abkürzungsverzeichnis

b	Base
BHR	Bronchiale HyperReaktivität
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
IgE	Immunglobulin E
IL-1, -2, -3 ...	Interleukin-1, -2, -3 ...
IL1ra	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
l	Liter
LD	Linkage Disequilibrium
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight
min	Minute
mo	Mol
MS	Massenspektrometrie
PCR	Polymerase chain reaction
PROBE	Primer Oligo Base Extension Reaction
RNA	Ribonucleic Acid
sec	Sekunde
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TBE	Tris-Borat-EDTA-Elektrophorese-Puffer
TDT	Transmissions-Disequilibrium-Tests
TE	Tris-EDTA
T _H 1, -2, -0	T-Helfer Lymphozyten des Typs I, II, 0
Tris	Tri(hydroxymethyl)-Aminomethan

1. Einleitung

Asthma bronchiale hat aufgrund zunehmender Prävalenz besonders in der westlichen Welt die Ausmaße einer Volkskrankheit angenommen¹. In Deutschland sind beispielsweise ca. 6-8 % der Erwachsenen und über 10 % der Kinder an Asthma erkrankt²⁻⁷. Die durch Asthma entstehenden Kosten für Therapie und Medikation beziffern sich in Deutschland auf ca. 3 Mrd., in Großbritannien auf ca. 1,6 Mrd. und in den USA auf ca. 6 Mrd. Euro^{8;9}. Schon wegen der gravierenden Einschränkung der Lebensqualität, welche die Betroffenen hinnehmen müssen, aber auch wegen der starken finanziellen Belastung der Gesundheitssysteme ist das Forschungsinteresse an dieser Krankheit groß, um wirkungsvolle Behandlungsmethoden entwickeln zu können.

1.1. Asthma bronchiale: Definition und Einteilung

Durch den Begriff „Asthma“ wird eine Syndromkonstellation mit einem heterogenen Krankheitsbild beschrieben¹⁰. Es ist deshalb schwierig, eine verbindliche Definition dieser Krankheit festzulegen. Dies ist zur internationalen Vergleichbarkeit jedoch von größter Bedeutung¹¹. Um trotzdem derartige Vergleiche zu ermöglichen, wurde 1997 von dem amerikanischen „National Heart, Lung and Blood Institute“ folgende Definition erarbeitet: *„Asthma ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, bei der zahlreiche Zellen eine Rolle spielen, insbesondere Mastzellen, Eosinophile, Lymphozyten, Neutrophile und Epithelzellen. Bei entsprechend reaktionsbereiten Menschen führt diese Entzündung zu rezidivierenden Episoden mit Giemen, Atemnot, Engegefühl in der Brust und Husten, insbesondere nachts und in den frühen Morgenstunden. Diese Episoden sind üblicherweise von einer ausgedehnten, aber variablen Atemwegsobstruktion begleitet, die oft reversibel ist, entweder spontan oder als Folge einer Behandlung. Die Entzündung bewirkt außerdem eine begleitende Erhöhung einer bestehenden bronchialen Hyperreaktivität gegenüber einer Reihe verschiedener Stimuli“* (National Heart, Lung and Blood Institute 1997).

In der klinischen Praxis wird zwischen zwei verschiedenen Asthmatypen unterschieden. Asthma bronchiale kann in die extrinsische (exogen-allergisch) oder intrinsische (endogene) Form unterteilt werden¹²⁻¹⁴. Bei extrinsischem Asthma

handelt es sich um eine Atemwegserkrankung, die mit einer Überempfindlichkeitsreaktion gegenüber exogenen Antigenen (Allergenen) verbunden ist¹⁵. Es entwickelt sich meist in der frühen Kindheit und wird häufig von Heuschnupfen, Ekzemen oder Neurodermitis begleitet. Charakteristisch sind in diesem Fall eine erhöhte Eosinophilenzahl im peripheren Blut und in den Bronchien¹⁶⁻²⁰ sowie häufig hohe gesamt- und allergenspezifische IgE-Spiegel²¹⁻²⁶. Zusätzlich wurde ein vermehrtes Vorkommen von speziellen T_H2-Zellen (T-Helfer Lymphozyten des Typs II) festgestellt, die über ihr spezifisches Cytokinmuster die Krankheitsentwicklung beeinflussen²⁷⁻³¹.

Intrinsisches Asthma hingegen tritt erst ab einem Lebensalter von über 40 Jahren auf. Für diese Krankheitsform konnten auslösende Faktoren, anders als im vorgenannten Fall, bisher noch nicht identifiziert werden. Intrinsisches Asthma scheint gehäuft nach Atemwegsinfektionen aufzutreten. Diese Asthmakranken weisen ebenso wie Extrinsiker eine erhöhte Eosinophilenzahl im Blut und der Bronchialwand auf, die in diesem Fall allerdings jahreszeitenunabhängig ist. Die diagnostizierte Eosinophilenzahl bei intrinsischen Asthmatikern ist gegenüber Asthmatikern des extrinsischen Typs häufig erhöht. Eine anhaltende Aktivierung von T_H2-Zellen und cytotoxischen T-Lymphozyten ist in beiden Fällen sowohl im Blut als auch in den Bronchien nachweisbar. Der entscheidende Unterschied zu extrinsischem Asthma besteht vor allem in der fehlenden IgE-vermittelten Bronchialobstruktion, da hier weder erhöhte Gesamt-IgE-, noch allergenspezifische IgE-Spiegel detektiert werden können^{13;32;33}.

Eine Einteilung von Asthma kann jedoch auch durch die Angabe von Schweregraden wie leicht, mittelschwer und schwer erfolgen. Eine derartige Charakterisierung hängt hierbei im Wesentlichen von der Anzahl der Asthmaanfälle und der Art und Frequenz der benötigten Medikation zur Symptombefreiheit ab^{34;35}.

1.2. Zelluläre und humorale Grundlagen von Asthma bronchiale

Die in dieser Arbeit besprochenen molekularen Grundlagen beziehen sich ausschließlich auf das extrinsische, also durch Allergene hervorgerufene Asthma, da die meisten untersuchten Kinder von dieser Krankheitsform betroffen sind.

Die extrinsischem Asthma zugrunde liegende Atemwegsentzündung wird durch eine fehlerhafte Immunantwort ausgelöst und kann sowohl durch zelluläre Komponenten als auch durch Antikörper vermittelt werden³⁶. Dieser komplexe Prozess, der in

seiner Gesamtheit noch nicht vollständig verstanden ist, basiert auf einer IgE-vermittelten, allergischen Reaktion. Ihre Entstehung und Entwicklung kann in drei Phasen eingeteilt werden¹² (vgl. **Abbildung 1**). Der Beginn der Krankheitsentwicklung besteht in der Sensibilisierungs- und Gedächtnisphase (vgl. 1.2.1), welche die Basis für die spätere allergische Reaktion bildet. In der zweiten Phase bedingen die in der Sensibilisierungsphase gelegten molekularen Grundlagen die sogenannte Sofortreaktion (vgl. 1.2.2), die eine Gefäßerweiterung und eine Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege, sowie eine Mucussekretion auslöst. Anschließend führt in der dritten Phase (Spätphase, vgl. 1.2.3) ein durch Zellen und Mediatoren ausgelöster Prozess zur Beschädigung der Atemwegsepithelien und im weiteren Verlauf zum fibrösen Umbau der Atemwege (Airway Remodeling)^{10;11;37}.

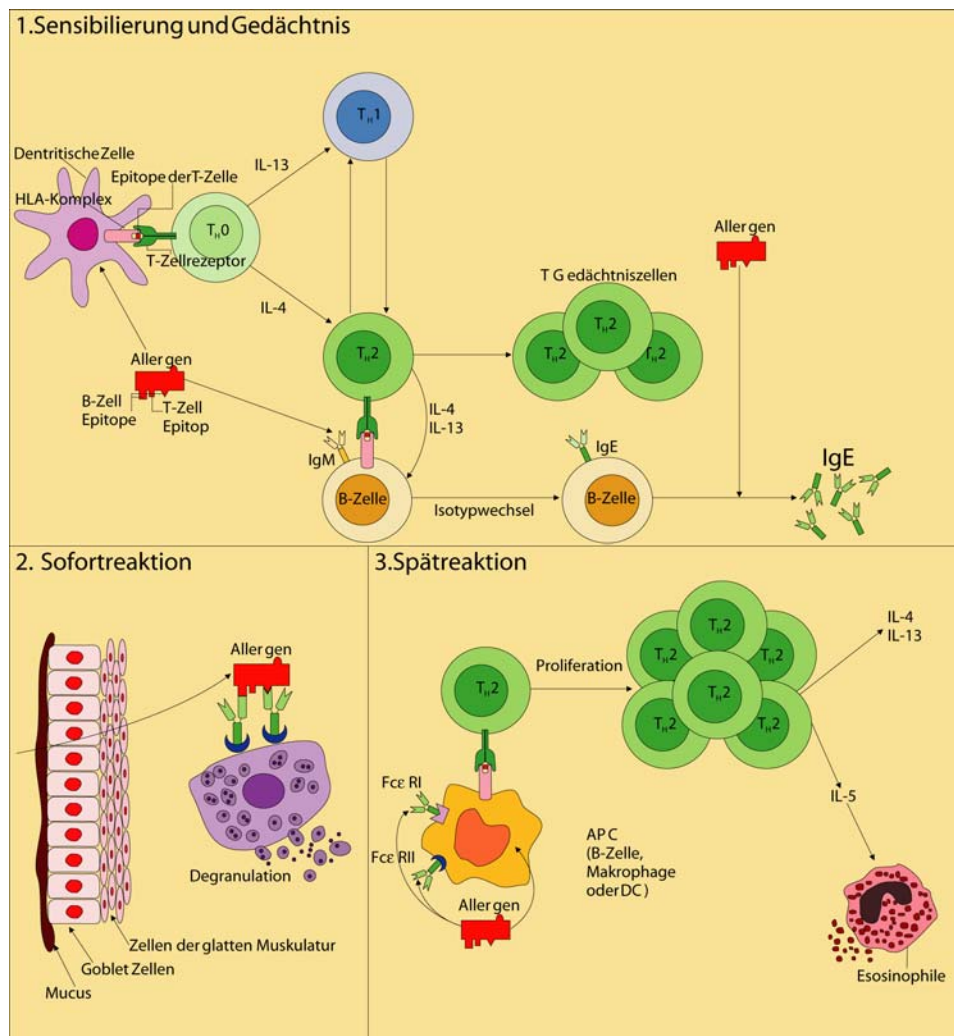


Abbildung 1: Grundlagen zu Allergie und Asthma. Die Asthma zugrundeliegende allergische Reaktion wird in drei Phasen eingeteilt: Phase 1: Sensibilisierung und Gedächtnisreaktion; Phase 2: Sofortreaktion; Phase 3: Spätreaktion modifiziert nach⁽¹²⁾

1.2.1. Sensibilisierung und Gedächtnis

Unter dem Begriff Sensibilisierungsreaktion versteht man die ersten Vorgänge, die das Immunsystem bei einem Allergenkontakt zeigt. Im Falle einer Atemwegsallergie werden zunächst geringe Mengen löslicher Allergene, aus eingeatmeten Partikeln (z.B. Pollen) bestehend, auf die Epithelien der Atemwegsorgane gespült^{10;11;15}. Diese Allergene, die später die IgE-vermittelte Immunantwort auslösen, sind größtenteils Proteine oder Glykoproteine, deren jeweilige molekulare Masse zwischen 5-80 kDa liegt³⁸. Sie werden von antigenpräsentierenden Zellen in den Atemwegen vor allem von dendritischen Zellen aufgenommen und mittels des HLA-Systems (Human Leucocyte Antigen) naiven T_H0-Zellen präsentiert³⁹⁻⁴⁴. Ob das präsentierte Antigen im Folgenden eine IgE-vermittelte Allergie und damit einen Asthmaanfall auslöst, wird hauptsächlich dadurch bestimmt, zu welcher Subklasse sich die naiven T-Zellen differenzieren. Bilden sich während dieses Differenzierungsprozesses primär T_H1-Zellen, kommt es nicht zu einer allergischen Reaktion^{3;4;15;28}. Folgt auf die Antigenpräsentation die Entwicklung von T_H2-Zellen, kommt es hingegen zu einer IgE-vermittelten Immunantwort^{15;21;45}.

T_H1-Zellen steuern die humoralen und zellulären Abwehrmechanismen gegen intrazelluläre Krankheitserreger, indem sie charakteristische Mediatoren sezernieren. Sie produzieren IL-2, IFN- γ (Interferon- γ), TNF α (Tumor Nekrosis Faktor), LT (Lymphotoxin) und andere Cytokine, die zusätzlich zur Steuerung der Antikörper und zellvermittelten Immunantwort die durch T_H2-Zellen ausgelöste IgE-vermittelte Immunantwort inhibieren^{15;21;27;30;46-49}.

T_H2-Zellen sezernieren ebenso wie T_H1-Zellen ein typisches Cytokinprofil, das der Koordination von Abwehrmechanismen gegen extrazelluläre Krankheitserreger wie z.B. Helminthen dient⁵⁰. T_H2-Cytokine sind unter anderem IL-4, IL-13 und IL-5. IL-5 dient der Differenzierung, Bereitstellung und Aktivierung von Eosinophilen^{51;52}, einem charakteristischen Merkmal der Spätreaktion. IL-4 und IL-13 sind von zentraler Bedeutung für die Regulation des sogenannten „IgE-class switching“ der Antikörper bildenden B-Zellen⁵³⁻⁵⁷. T_H2-Zellen induzieren nämlich nach ihrer Ausdifferenzierung durch Interaktion mit einer allergenspezifischen B-Zelle deren Aktivierung. Diese aktivierten B-Zellen proliferieren anschließend und führen gleichzeitig den durch die Cytokine ausgelösten Isotypenwechsel (isotype class switching) ihrer membranständigen Antikörper von IgM (Immunglobulin M) zu IgE durch.

Abschließend sezernieren die B-Zellen antigenspezifische IgE-Antikörper, welche die allergische Sofortreaktion auslösen^{12;15;21;45}.

Gerade bei Asthmatikern ist das Verhältnis zwischen T_H1- und T_H2-Zellen und damit ihren sezernierten Cytokinmustern zugunsten der T_H2-Zellen und deren Mediatoren verschoben, so dass eine unverhältnismäßig starke Immunantwort auf ein Allergen ausgelöst wird. Das Schlüsselereignis, d.h. der Allergenkontakt, welcher den Phänotyp der allergenspezifischen T-Gedächtniszellen festlegt, scheint sehr früh in der körperlichen Entwicklung stattzufinden. In den meisten Fällen geschieht dieser Vorgang Jahre bevor eine Allergie oder Asthma nachweisbar ist²⁸. Es wird vermutet, dass die Prägung gegen Umweltallergene bereits im Uterus durch den transplazentalen Transport eines Allergens im maternalen Kreislauf stattfindet⁵⁸. Eine mögliche Erklärung für die Verschiebung des T_H1/T_H2-Gleichgewichtes könnte auch in der Eigenschaft antigenpräsentierender dendritischer Zellen liegen, die in Abhängigkeit vom Cytokinmilieu entweder Toleranz gegenüber dem Allergen vermitteln oder eine starke T_H2-Antwort begünstigen⁵⁹.

Zusammenfassend ist somit festzuhalten, dass für den Allergieverlauf während der Sensibilisierungs-Reaktion die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses sowohl auf humoraler als auch auf zellulärer Ebene entscheidend ist.

Während der Sensibilisierungsphase findet folglich der Aufbau eines allergenspezifischen IgE-Antikörpergedächtnisses statt⁶⁰. Zusätzlich bilden auch B-Zellen, die allergenspezifische IgE-Antikörper produzieren, ein immunologisches B-Zellgedächtnis, das bei erneutem Kontakt mit dem spezifischen Allergen aktiviert wird und zu einer erhöhten Sezernierung von spezifischen IgE-Antikörpern führt⁶¹. Es bilden allergenspezifische T-Zellen darüber hinaus einen T-Gedächtniszellenspeicher, der sofort auf späteren Allergenkontakt reagieren kann⁶².

1.2.2. Die Sofortreaktion

Kontakt mit einem Allergen, für das bereits ein „immunologisches Gedächtnis“ besteht, führt unmittelbar zu einer allergisch-entzündlichen Reaktion (Sofort-Reaktion), auf welche anschließend die sogenannte Spät-Reaktion folgt. Die Sofort-Reaktion wird ausgelöst, indem Zellen in den Atemwegen, die auf der Zelloberfläche allergenspezifisches IgE tragen, über die Bindung des spezifischen Allergens aktiviert werden^{11;63-67} (vgl. **Abbildung 1**).

Zunächst zirkulieren allergenspezifische IgE-Antikörper im Blut, die von B-Zellen synthetisiert und sezerniert wurden, und binden anschließend an FC_εRI den hoch

affinen IgE-Rezeptor auf der Zelloberfläche von Mastzellen im Gewebe oder Basophilen aus dem peripheren Blut^{12;21;45;67;68}. Die Verknüpfung der Rezeptoren (FC_εRI) durch allergengebundenes IgE führt zur Aktivierung der Zelle und im weiteren zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren¹⁰, wie Histaminen^{11;69}, Eicosanoiden⁷⁰ und reaktiven Sauerstoffverbindungen¹¹, wodurch innerhalb kürzester Zeit die Symptome der Sofortreaktion hervorgerufen werden. Die sezernierten Mediatoren induzieren nach ihrer Freisetzung aus Mastzellen und Basophilen, die Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege, die Sekretion von Mucus und die Gefäßerweiterung in der Lunge. Dabei kommt es zu einer Verengung des Lumens der Atemwege, ausgelöst durch den Eintritt von Plasma über mikrovaskuläre Lecks, die durch die freigesetzten Mediatoren verursacht wurden^{11;71;72}. Es ist den allergenspezifischen IgE-Antikörpern zusätzlich möglich an FC_εR2, den niedrig affinen IgE-Rezeptor, auf der Zelloberfläche von Lymphozyten, Eosinophilen, Blutplättchen und Makrophagen zu binden^{10;21}. Ob in diesem Fall die Interaktion von IgE mit dem niedrig affinen IgE-Rezeptor zu einer Entzündung der Atemwege beiträgt, ist zwar noch unklar¹⁰, allerdings reguliert die Bindung allergenspezifischer Antikörper an FC_εR2 generell die Synthese von IgE und somit die Auswirkungen der allergischen Reaktion^{10;21}.

1.2.3. Die Spätreaktion

Nach dem Allergenkontakt tritt nach etwa 4 bis 6 Stunden die Spätreaktion auf. Dafür sind allergenspezifische T_H2-Zellen (vgl. **Abbildung 1**), die nach einem vorhergehenden Allergenkontakt das immunologische Gedächtnis aufgebaut haben^{11;12;73}, von zentraler Bedeutung. Im weiteren Verlauf dieser Reaktion werden durch die T_H2-Immunantwort sog. Effektorzellen^{72;74-78} aktiviert, die ihrerseits wiederum eine Vielzahl von Mediatoren⁶⁹ freisetzen. Diese tragen sowohl zum Entzündungsprozess als auch im Weiteren maßgeblich zur strukturellen Veränderung der Atemwege, wie Epithelschäden, Zunahme der Bronchialmuskulatur, Umbau der Atemwege mit Bronchialwandverdickung (Airway Remodeling) und therapeutisch schwer beeinflussbarer Atemwegobstruktion bei. In dieser Hinsicht ist neben den T_H2-Zellen, die die zellvermittelte Immunantwort steuern, vor allem der eosinophile Granulozyt als Effektorzelle der allergischen Entzündung bei der Spätreaktion bedeutend. Die Differenzierung dieses Eosinophilen findet im Knochenmark statt und wird durch die von aktivierten T_H2-Zellen sezernierten Interleukine IL-3, IL-5 und GM-CSF (Granulocyten Makrophagen-

colony-stimulating factor) gesteuert^{28;79}, wobei IL-5 maßgeblich die terminale Differenzierung von unreifen eosinophilen Zellen induziert⁸⁰. Die reife eosinophile Zelle besteht aus einer dichten intrazellulären Granula, die einen Speicher verschiedener inflammatorisch wirkender Proteine bildet. Eines dieser in den Eosinophilen gespeicherten Proteine ist das MBP (Major Basic Protein), welches das Atemwegsepithel direkt beschädigen kann und damit die bronchiale Empfindlichkeit – ein typisches Merkmal der Asthmasymptomatik – direkt erhöht. Zudem bewirkt dieses Protein die Degranulation von Basophilen und Mastzellen, wodurch eine zusätzliche Steigerung der Symptome erfolgt. Darüber hinaus ist die eosinophile Zelle ein Lieferant von Leukotrienen – hauptsächlich des Leukotrien C₄ – welche die Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege induzieren, die vaskuläre Permeabilität erhöhen und zusätzliche Eosinophile in die Atemwege rekrutieren^{10;81}. Die Freisetzung der Eosinophilen aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf wird hauptsächlich durch das T_H2-Interleukin IL-5 aktiviert, welches zusätzlich auch deren Überleben in den Atemwegen verlängert. Um jedoch überhaupt an der allergisch-entzündlichen Reaktion teilnehmen zu können, muss die eosinophile Zelle aus dem Blutkreislauf in die Atemwege gelangen^{82;83}. Dieser Vorgang, in dem die Eosinophilen von IL-5 und GM-CSF¹⁰ stabilisiert werden, geschieht mit Hilfe verschiedener Cytokine und Chemokine. Innerhalb dieser gerichteten Wanderung nehmen folgende Moleküle eine Schlüsselrolle wahr: RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-Cell Expressed and Secreted), MIP1 α (Macrophage Inflammatory Protein 1 α), MCP1 (Monocyte Chemotactic Protein 1) und verschiedene Eotaxine⁸⁴⁻⁸⁶. Diese chemotaktischen Stoffe werden von Epithelzellen, Makrophagen, Lymphozyten und Eosinophilen produziert^{10;84}.

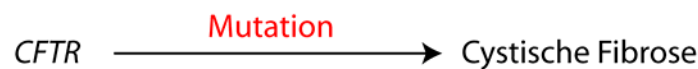
1.3. Genetische Komponenten von Asthma

Obwohl der Wandel von Lebensbedingungen, der sich besonders gravierend in den Industrienationen vollzogen hat, zu einer veränderten Allergenexposition und damit zum Fehlen protektiver Mechanismen gegen Asthma führte, ist die steigende Prävalenz von Asthma nicht nur durch veränderte Umweltbedingungen erklärbar^{2-4;9;87-90}.

Beispielsweise leiden Chinesen aus Singapur seltener an Asthma als die ebenfalls dort lebenden Inder und Malaien⁹¹. Eine ähnliche Beobachtung kann man auch hinsichtlich der Bewohner isolierter Inselpopulationen machen. Auf der britischen

Inselgruppe Tristan da Cunha im atlantischen Ozean kommt z.B. eine Asthmaprävalenz von etwa 30 % vor. Alle 282 Einwohner dieser Inselgruppe lassen sich auf 15 Vorfahren zurückführen, unter denen sich bekanntermaßen zwei Asthmatiker befanden. In den aufgeführten Beispielen sind die Betroffenen annähernd gleichen Lebensbedingungen ausgesetzt, so dass zusätzlich zu den Umweltfaktoren nur eine genetische Komponente die auffällige Prävalenz innerhalb der Populationen erklären kann^{92;93}. Auf einen starken genetischen Beitrag zur Entwicklung von Asthma bronchiale weisen ebenfalls Zwillings- und Familienstudien hin^{9;94;95}. Da die Vererbung dieser Krankheit jedoch keinem klassischen Mendelschen Vererbungsmodell folgt – charakteristisch für viele weitere „komplexe“ Erkrankungen, wie z.B. Diabetes, Morbus Crohn, u.a. – wird angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit, an Asthma zu erkranken, aus einer Interaktion verschiedener Gene mit unterschiedlichen Umweltfaktoren resultiert⁸⁷. Auf der Grundlage vorgenommener Untersuchungen wird vermutet, dass genetische Faktoren ca. 50-70% zur Entwicklung von Asthma bronchiale beitragen^{89;96}.

A. Monogene Erkrankungen



B. Komplexe Erkrankungen

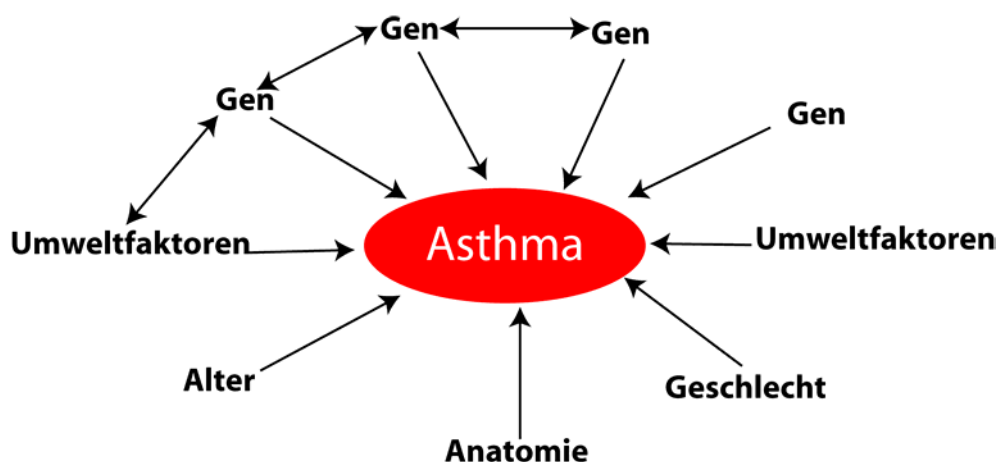


Abbildung 2: Vergleich monogener und komplexer Erkrankungen modifiziert nach⁽⁹⁷⁾

1.3.1. Genomweite Suchen

Um Gene, die einen Beitrag zur Entwicklung von Asthma leisten, bestimmen zu können, bietet sich als möglicher Ansatz die sogenannte „genomweite Suche“ an⁹⁸. Dabei werden genetische Marker, die über das gesamte Genom verteilt sind, bestimmt und mittels Genotypisierung die gemeinsame Vererbung dieser Marker innerhalb betroffener Familien getestet. Die erlangten Kopplungsergebnisse, die aus der Untersuchung einer ausreichend großen Anzahl von Probanden stammen müssen, werden dazu verwendet, chromosomale Regionen zu identifizieren, welche mit der Krankheit zusammen vererbt werden. Derartige Regionen werden man „Kopplungs-Regionen“ genannt.

Im Gegensatz zu Kandidatengenanalysen werden mit der genomweiten Suche sämtliche Krankheitsloci mit nachweisbaren Effekten ohne Wissen über deren mögliche Funktionen für die jeweilige Erkrankung identifiziert.

An diese Grobkartierung schließt sich die sog. Feinkartierung des jeweiligen identifizierten Krankheitslocus an. Hiermit kann im Folgenden entweder ein „Positional Cloning“⁹⁹ oder ein „Candidate Cloning“¹⁰⁰ durchgeführt werden. Die klassische Form des „Positional Clonings“ wird heute allerdings nicht mehr verwendet, da das Genom durch das Humangenomprojekt weitgehend entschlüsselt und mit der Basenabfolge auch ein Großteil der Gene bekannt ist.

Das „Candidate Cloning“ hingegen reduziert den bisher erforderlichen Aufwand, der in der Erstellung arbeitsintensiver BAC- und YAC-Contigs (BAC: Bacterial Artificial Chromosome; YAC: Yeast Artificial Chromosome) lag, und ermöglicht die direkte Analyse der in der Kopplungsregion lokalisierten und im Hinblick auf eine wahrscheinliche Krankheitsbeteiligung ausgesuchten Gene⁹⁸.

Genomweite Suchen sind für Asthma und assoziierte Phänotypen bisher in 13 unterschiedlichen Populationen durchgeführt worden¹⁰¹⁻¹¹⁸. Genauere Angaben zu diesen Studien können außer den Originalarbeiten der Asthma Gen Datenbank entnommen werden¹¹⁹⁻¹²¹. Erstaunlicherweise erfüllen nur wenige der durchgeführten Studien die von Lander und Mitarbeitern aufgestellten Signifikanzkriterien für Kopplung^{122;123}. Trotzdem kristallisieren sich nach einem Vergleich einige „Konsensusregionen“ heraus, die den Schluss zulassen, dass in diesen Regionen ein oder mehrere Kandidatengene für Asthma liegen^{98;124}.

Folgende chromosomale Regionen haben dabei Kopplung in mindestens zwei Studien gezeigt: Chr 2p, 2q, 5q, 6p, 7q, 11q, 12q, 13q, 14q, 16q (Chromosom 2p, 2q,

5q, ...). Erwähnenswert ist ebenfalls die chromosomale Region 20p, in der Van Eerdewegh und Mitarbeiter¹¹⁸ das erste positionsklonierte Gen identifiziert haben, das wahrscheinlich zur Ausbildung der Krankheitssymptome von Asthma beiträgt. Die vorliegenden Ergebnisse konnten ebenso in anderen Studien bestätigt werden^{125;126}.

1.3.2. Die Kopplungsregion Chromosom 2q12-14

Nach Durchführung einer genomweiten Suche¹⁰⁷ und mit Hilfe einer anschließenden Feinkartierung¹⁰⁸, die dazu diente, die lokalisierten Regionen genauer einzugrenzen, konnte in der eigenen Arbeitsgruppe eine Genregion auf dem Chromosom 2q12-14 identifiziert werden, in der mehrere interessante Kandidatengene für Asthma liegen.

Zusätzlich zu der Studie, die dieser Arbeit zugrundeliegt, wurde dieselbe Region in weiteren Untersuchungen ebenfalls als mit Asthma gekoppelte Region bestimmt^{103-106;110;116;127;128}.

Neben diesen Bestätigungen durch andere Kopplungsstudien zeigen auch Rückkreuzungsanalysen mit Mäusen die Bedeutung dieses chromosomalen Bereiches für Asthma und verwandte Phänotypen an. So zeigen Rückkreuzungsversuche Kopplung mit der Mausregion an, welche konservierte Synthänie zur humanen Region auf dem Chromosom 2q12-14 aufweist¹²⁹⁻¹³¹. Diese Kopplungsregion beinhaltet viele mögliche Kandidatengene für Asthma und Allergien, die bei entzündlichen Prozessen eine Rolle spielen¹³²⁻¹³⁵. Zu diesen gehören die Mitglieder der Interleukin-1 Rezeptorfamilie, die im Bereich zwischen 101,5 Mb and 102 Mb codiert sind¹³³⁻¹³⁵. Die entsprechenden Liganden sind zwischen 114,6 Mb and 115,2 Mb lokalisiert¹³² (vgl. **Abbildung 3**).

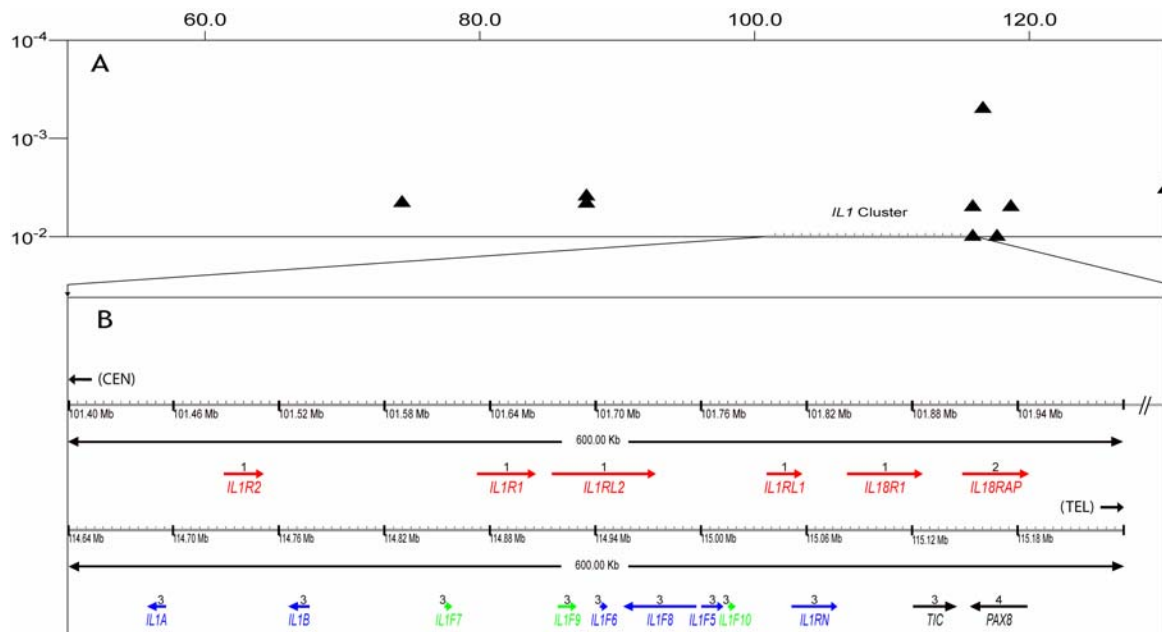


Abbildung 3: A: Kopplungsergebnisse 13 genomweiter Suchen in der Region 2q12-14 (vgl. <http://cooke.gsf.de>). Die Anordnung der Marker erfolgte unter Einbeziehung einer Decode Kopplungskarte¹³⁶ und einer physicalische UCCSC Karte (<http://www.genome.ucsc.edu>). Schwarze Dreiecke zeigen Kopplungsergebnisse der Studien an. B: Schematischer Ausschnitt des IL-1-Clusters, modifiziert nach^(132-134;137). Rot dargestellte Gene gehören zur IL1-Rezeptorfamilie. Blau sind die IL1-homologen Liganden, schwarz alle Gene, die zur Bestimmung der LD-Grenzen genotypisiert wurden. In grün markierten Genen waren noch keine Polymorphismen bekannt. Die Pfeilrichtung gibt die Transkriptionsrichtung an.

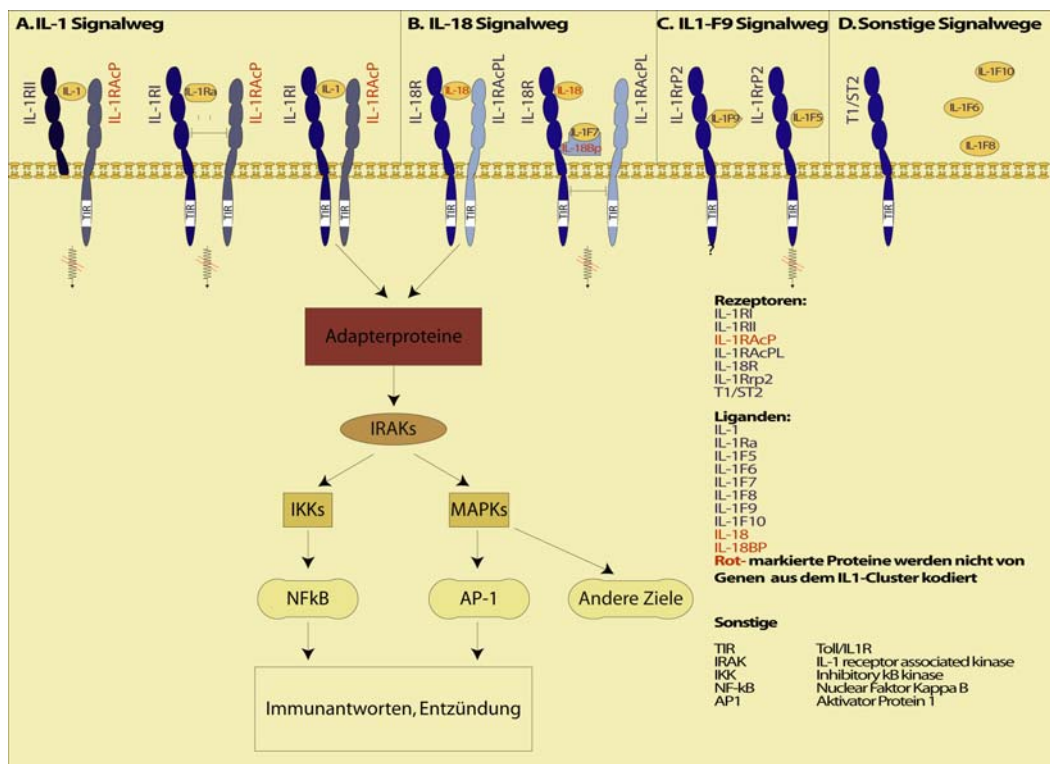


Abbildung 4: Überblick über im IL1-Cluster gelegene Liganden und Rezeptoren innerhalb der Signalübertragungswege modifiziert nach⁽¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾

1.4. Asthmakandidatengene im IL1-Cluster

Die im IL1-Cluster lokalisierten Gene bzw. ihre Genprodukte sind an inflammatorischen sowie regulativen Prozessen hinsichtlich des T_H1/T_H2 -Gleichgewichts beteiligt und stellen somit sowohl positionelle als auch funktionelle Kandidaten für die Entwicklung von Asthma dar. Die Signaltransduktionskaskaden, beeinflusst durch im IL-1-Cluster gelegene Gene bzw. deren Genprodukte, bilden ein vielschichtiges Netzwerk, das im Falle einer Fehlregulation zur Entwicklung komplexer Krankheiten wie Asthma beitragen könnte (vgl. **Abbildung 4**).

1.4.1. Interleukin-1

Interleukin-1 ist ein proinflammatorisches Cytokin, das über seinen Rezeptor Zellen unterschiedlicher Funktionen aktiviert, die daraufhin weitere inflammatorische Substanzen sezernieren^{138;141-145}. Die Interaktion von IL-1 mit seinem Rezeptor setzt eine komplexe Signaltransduktionskaskade in Gang, an der unterschiedliche Kinasen beteiligt sind. Am Ende der Signalkette stehen die Transkriptionsfaktoren NFκB (Nuclear Factor-κB) und AP-1 (Activator Protein 1). NFκB und AP-1 regulieren jeweils die Transkription ihrer Zielgene und vermitteln dadurch die inflammatorischen Eigenschaften von IL-1^{139;146-149}. Dieser Prozess führt zu einer verstärkt entzündlichen Reaktion sowie einem Gewebeumbau. Das sind jeweils charakteristische Symptome bei der Entwicklung von Asthma bronchiale¹⁴⁴. Innerhalb dieses Vorgangs spielen durch IL-1 aktivierte Zellen und ihre Produkte eine wichtige Rolle. Endothelzellen setzen durch die Aktivierung des IL-1 Rezeptors vermehrt PAF (Platelet - Activating Factor)¹⁵⁰⁻¹⁵², NO (Stickstoffmonoxid)¹⁵³ und PGE (Prostaglandin E)¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ frei, wodurch eine starke Erweiterung der betroffenen Gewebe zum Beispiel in der Lunge verursacht wird^{144;156} (vgl. 1.2.3). IL-1 induziert ebenfalls die Synthese von ICAM-1 (IntraCellular Adhesion Molecule-1) und VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) auf Endothelzellen, die ihrerseits den Eintritt von Neutrophilen, Makrophagen und Lymphozyten in das Lungengewebe ermöglichen¹⁵⁷⁻¹⁶⁰. Diese Infiltration von Zellen des Immunsystems in die Lunge prägt entscheidend den Krankheitsverlauf von Asthma^{10;141;144} (vgl. 1.2.3). Außerdem ist IL-1 ein Wachstumsfaktor für T_H2 -¹⁶¹ und B-Zellen¹⁶². Darüber hinaus stimuliert IL-1 die Reaktion der glatten Muskulatur der Lunge, so dass es zu einer Überempfindlichkeit der Atemwege kommt (BHR: Bronchiale HyperReaktivität)¹⁶³⁻¹⁶⁵, einer weiteren Folge der Spätreaktion, deren Funktion allerdings noch nicht im Detail verstanden ist¹⁶⁶.

Zusätzlich erhöhen sekretorische Epithelzellen, die mit IL-1 stimuliert werden, die Produktion von Mucinen¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Entzündliche Krankheiten der Atemwege, wie Asthma oder chronische Bronchitis werden von starker Mucussekretion begleitet, weshalb es zu einer Verengung der kleinen und großen Atemwege kommt^{170;171}.

1.4.1.1. IL-1 α und IL-1 β

Mit der Bezeichnung IL-1 sind die Moleküle IL-1 α (Gen: *IL1A*) und IL-1 β (Gen: *IL1B*) erfasst, deren Expression jeweils unabhängig voneinander reguliert wird. Ihre Aktivität entfaltet sich aber über den gleichen Rezeptor^{138;142}. Obwohl viele Gemeinsamkeiten zwischen IL-1 α und IL-1 β bestehen, z.B. eine ähnliche Tertiärstruktur, Translation im Cytosol, nehmen sie unterschiedliche Funktionen innerhalb der Immunregulation wahr^{142;143}.

Die Aufgabe von IL-1 β , einem systemischen, hormonähnlichen Cytokin, besteht hauptsächlich darin, seine proinflammatorische Aktivität zellübergreifend im Immunsystem zu entfalten^{142;144;172}. Zu diesem Zweck wird das zunächst in inaktiver Pro-Form vorliegende Molekül mit Hilfe von ICE (Interleukin-1 β Converting Enzyme) in der Zelle in seine inflammatorisch wirksame Form gespalten und anschließend aus dem Cytosol in das extrazelluläre Kompartiment freigesetzt¹⁷³⁻¹⁷⁵.

IL-1 α hingegen fungiert hauptsächlich als Übermittler intrazellulärer Ereignisse, z.B. terminaler Differenzierung, jedoch auch als Vermittler lokaler entzündlicher Reaktionen vor allem in der Haut^{143;176}. IL-1 α kommt aus diesem Grund hauptsächlich intrazellulär in seiner aktiven Pro-Form vor und kann daher weder im Blutkreislauf noch in anderen Körperflüssigkeiten im nichtpathologischen Zustand detektiert werden. Im Falle schwerer Krankheitsverläufe jedoch wird IL-1 α in die anschließend freigesetzte, reife Form überführt, welche ebenfalls wie die Pro-Form aktiv ist. Diese Freisetzung von reifem IL-1 α in das umgebende Gewebe erfolgt entweder aufgrund apoptotischer Prozesse¹⁷⁷ der betroffenen Zellen, oder durch eine calpaininduzierte Spaltung¹⁷⁸.

Es ist somit festzuhalten, dass IL-1 α , IL-1 β , und Pro IL-1 α die von ihnen ausgehende proinflammatorische Aktivität mittels zweier Signalübertragungswege entfalten. Die noch nicht hinreichend untersuchte Signalübermittlung des im Cytosol befindlichen Pro IL-1 α führt zur Expression von Genen, die die terminale Differenzierung von epithelialen und ektodermalen Zellen steuern¹⁴³. Besser untersucht ist die durch IL-1 α bzw. IL-1 β vermittelte Signalübermittlung mittels des Typ I IL-1 Rezeptors, an der IL-1 α jedoch zu einem geringeren Teil beteiligt ist, da es nur unter

pathologischen Bedingungen von Zellen freigesetzt wird^{138;143;148}. Im Weiteren wird daher nicht mehr zwischen IL-1 α und IL-1 β unterschieden.

1.4.1.2. IL-1 – “High-Affinity Receptor Complex”

Die IL-1-Signalübermittlung wird durch die Bindung von IL-1 an den Typ I IL-1 Rezeptor (IL-1RI Gen: *IL1R1*) eingeleitet, der sowohl aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne als auch aus einem 200-aminosäure-großen, cytoplasmatischen Bereich (TIR Domäne (Toll/IL-1 Rezeptor)) besteht^{138;179-181}. Neben der Interaktion des Liganden mit der Bindedomäne von IL-1RI ist zusätzlich zur Signalvermittlung die Rekrutierung von IL-1RacP (IL-1 receptor accessory protein) erforderlich. IL-1RacP ist ein IL-1RI-Homolog, das ebenfalls aus einer TIR-Domäne besteht, aber keine Bindungsaffinität zu IL-1 aufweist^{138;182;183}. Die Bindung von IL-1 an IL-1RI und die sich anschließende Interaktion des Rezeptors mit IL-1RacP führt zur Bildung des „High-Affinity Receptor Complexes“^{143;182}, der das von IL-1 ausgelöste Signal in die Zelle weiterleitet¹³⁹.

1.4.1.3. Signalvermittlung durch IL1-RI

Die Bindung des Liganden IL-1 an den IL-1R-Komplex steuert über das Zusammenspiel der TIR-Domänen von IL-1RI und IL-1RacP die Rekrutierung von MyD88 (MYeloid Differentiation primary response gene 88)¹⁸⁴⁻¹⁸⁸, welches wiederum IRAK-4 (Interleukin-1 Receptor Associated Kinase 4)^{189;190} zu dem Komplex hinzuzieht. Zusätzlich werden zuvor gebildete TOLLIP-IRAK-1-Komplexe (TOLLIP:TOLL Interacting Protein; IRAK-1: Interleukin-1 Receptor Associated Kinase 1) an den Rezeptor gebunden, was durch die Interaktion der Death-Domänen von IRAK-1^{191;192} und MyD88 ermöglicht wird¹⁹³. Das hat im Weiteren zur Folge, dass IRAK-1 und IRAK-4 in dichte Nachbarschaft zueinander rücken und IRAK-4 von IRAK-1 durch Phosphorylierung aktiviert wird¹⁸⁹. TRAF6 (TNFR-Associated Factor-6)^{140;194-197} wird ebenfalls über Interaktionen mit dem phosphorylierten IRAK-1 an den Rezeptorkomplex gebunden¹⁹⁸ (vgl. **Abbildung 5** Teil A).

Das phosphorylierte IRAK-1 und TRAF6 trennen sich vom Rezeptor und interagieren an der Membran mit einem aus TAK1 (TGF- β -Activated Kinase 1), TAB1 (TAK1 Binding Proteine) und TAB2 (TAK1 Binding Proteine 2) bestehenden Komplex, der bereits zuvor gebildet wurde^{198;199}. Dieser Vorgang induziert eine Phosphorylierung von TAB2 und TAK1, die anschließend mit TRAF6 und TAB1 zum Cytosol wandern¹⁹⁶. IRAK-1 bleibt an der Membran, wo es abgebaut wird, was vermutlich

durch einen ubiquitin-abhängigen Prozesses geschieht^{200;201} (vgl. **Abbildung 5** Teil B).

Im Cytosol verbindet sich der aus TRAF6, TAK1, TAB1 und TAB2 zusammengesetzte Proteinkomplex^{198;199} mit den Ubiquitin-Ligasen Ubc13 (Ubiquitin Conjugating enzyme 13) und Uev1A. Dies führt zu einer Ubiquinierung von TRAF6^{195;202}, was für die Steuerung der TAK1-Kinaseaktivität von hoher Bedeutung ist¹⁹⁶ (vgl. **Abbildung 5** Teil C).

Das aktivierte TAK1 phosphoryliert sowohl den IKK-Komplex (zusammengesetzt aus den Untereinheiten IKK α (Inhibitory κ B Kinase α), IKK β (Inhibitory κ B Kinase β) und IKK γ (Inhibitory κ B Kinase γ)) als auch die MKKs 3,4,6 (Mapkinase Kinase 3,4,6), was im Weiteren Verlauf zur Aktivierung der NF- κ B und JNK/p38 MAPKs (c-Jun NH₂-terminal Kinase) führt^{195;196} (vgl. **Abbildung 5** Teile D und F).

Die Phosphorylierung des IKK-Komplexes setzt I κ B und das aus den Untereinheiten p50 und p65 gebildete NF κ B frei und ermöglicht dessen Translokation in den Zellkern¹⁹⁴. Dort induziert NF κ B als Transkriptionsfaktor die Transkriptionsaktivierung inflammatorischer Gene, die Cytokine (z.B. IL-6 IL-8), Chemokine, Enzyme wie COX2 (Cyclooxygenase-2) und die induzierbare Form der iNOS (induceable Nitrit Oxide Syntase) und Adhäsionsmoleküle codieren¹⁴⁶. Außerdem phosphorylieren die IKKs das NF κ B inhibierende I κ B (Inhibitory κ B), was zu dessen Ubiquinierung und anschließendem Abbau durch das Proteasom führt¹⁹⁶ (vgl. **Abbildung 5** Teil E).

Aktivierte MKKs phosphorylieren und aktivieren Mitglieder der JNK/p38 MAPK-Familie. Diese wandern ebenfalls zum Nukleus, wo sie verschiedene Transkriptionsfaktoren der Leucin Zipper (bZIP)-Familie, wie c-Jun und c-Fos (AP-1), phosphorylieren können und als Transkriptionsfaktoren die Expression verschiedener proinflammatorischer Gene regulieren¹⁹⁶. Durch die Bindung von IL-1 an seinen Oberflächenrezeptor kommt es somit zu einer verstärkten Expression NF κ B- und AP-1-induzierbarer Gene, deren Produkte den entzündlichen Prozess verstärken (vgl. **Abbildung 5** Teil F).

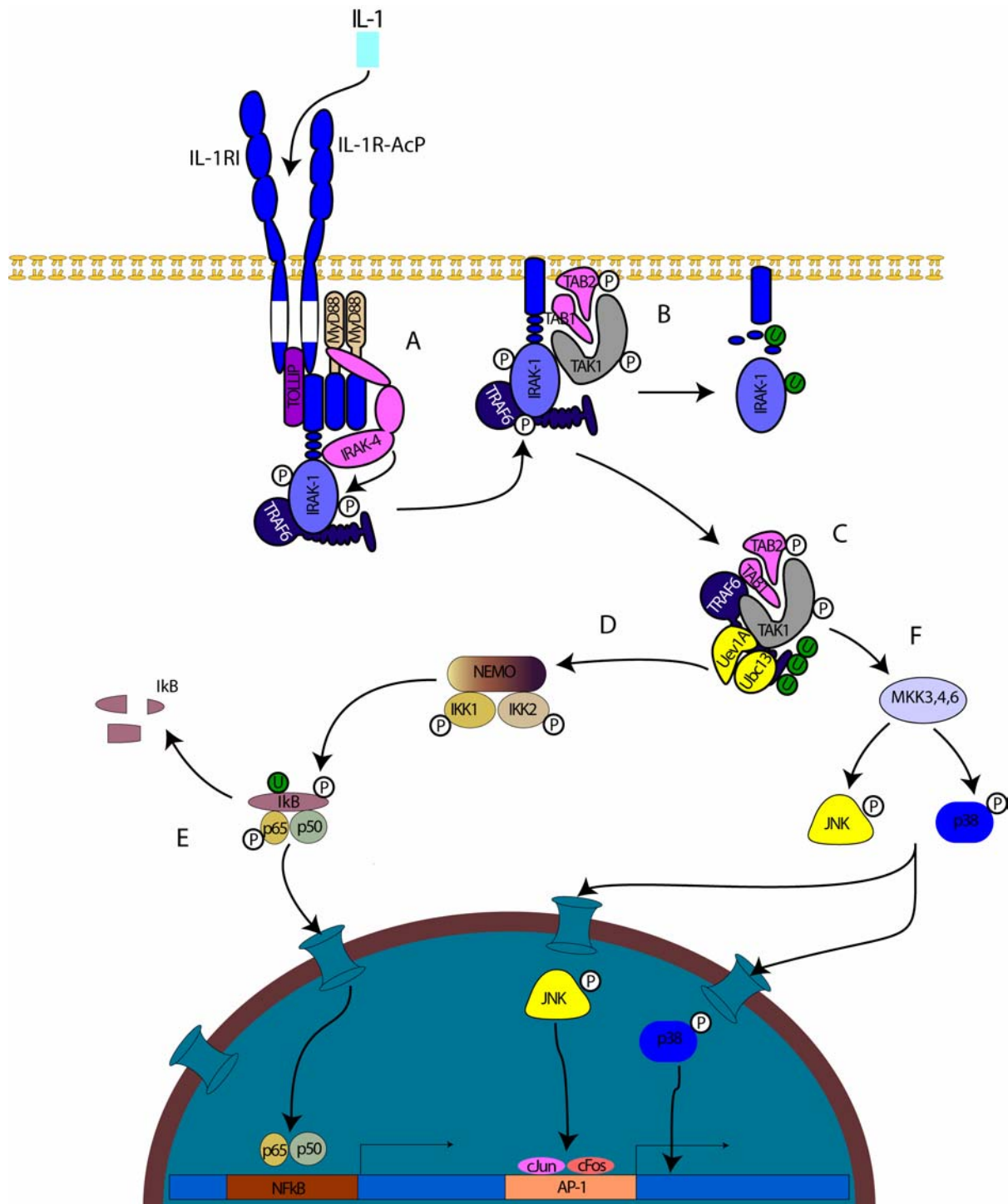


Abbildung 5: Schematische Darstellung der durch IL-1RI vermittelten Aktivierung von NFκB und AP-1 modifiziert nach⁽¹⁹⁶⁾

1.4.1.4. Regulation der IL-1-Aktivität

Um zu verhindern, dass die Wirkung von IL-1 zu pathologisch entzündlichen Prozessen führt, wird dessen Aktivität sowohl durch einen IL-1-homologen Liganden^{203;204} als auch durch den entsprechenden IL-1RI-homologen Rezeptor²⁰⁵ reguliert¹³⁸.

Im Falle dieses Liganden handelt es sich um eine nicht funktionelle Form von IL-1, IL-1ra (IL-1R Antagonist, Gen: *IL1RN*)²⁰³, welche diesem hinsichtlich Aminosäuresequenz, dreidimensionalem Faltungsmuster und Genstruktur ähnelt und die gleiche Affinität zum IL-1 Rezeptor aufweist¹³⁸.

Röntgenstrukturanalysen der Liganden-Rezeptor-Komplexe, die sowohl mit IL-1¹⁸¹ als auch mit IL-1ra²⁰⁶ als Liganden durchgeführt wurden, zeigen die Unterschiede in der Interaktion mit dem IL-1-Rezeptor auf und verdeutlichen, wie IL-1ra antagonistisch zu IL-1 wirkt. Es konnte gezeigt werden, dass es zwei Kontaktstellen in der Bindedomäne des Rezeptors gibt, welche für die Ausbildung eines funktionellen Rezeptor-Komplexes essentiell sind. Sowohl IL-1ra als auch IL-1 interagieren mit einer von zwei aminoterminalen Ig-Domänen gebildeten Spalte. IL-1ra ist aber nicht in der Lage, mit der zweiten Kontaktstelle zu interagieren, welche in der dritten Ig-Domäne des Rezeptors liegt. Aus diesem Grunde kann der Komplex bestehend aus dem Rezeptor und dem Liganden, kein IL-1RacP^{182;183} rekrutieren und deshalb auch keinen „High-Affinity Receptor Complex“ bilden, der die Signalübermittlung in die Zelle auslösen würde²⁰⁶. Anhand dieser Erkenntnisse wird deutlich, dass IL-1ra als Antagonist die Wirkung von IL-1 inhibiert, weil er verhindert, dass es zu einer Ausbildung des funktionalen Rezeptor-Signal-Komplexes kommt, indem er IL-1 daran hindert, gleiches zu tun, da er die Ligandenbindedomäne des Rezeptors besetzt hält¹³⁸.

Der zweite Regulator der IL-1 Aktivität ist der IL-1RI homologe Rezeptor des Typs II (IL-1RII Gen *IL1R2*)²⁰⁵. Dieser ähnelt in der extrazellulären Domäne stark dem Typ I Rezeptor IL-1R (IL-1RI) und weist zudem die gleiche Exon-Intron-Struktur auf¹³⁸. Im Gegensatz zu IL-1RI besteht IL-1RII neben der extrazellulären Domäne jedoch nur aus einem kurzen zytoplasmatischen Bereich, mit dem keine Signale des Liganden IL-1 weitergeleitet werden können¹³⁸. IL-1RII liegt jedoch nicht ausschließlich membranständig vor, sondern kann durch eine Metalloproteinase in eine lösliche Form überführt werden, die wie die membranständige Form von IL-1RII IL-1 binden und dessen Aktivität dadurch zusätzlich inhibieren kann^{207;208}.

IL-1RII besitzt eine hohe Affinität zu IL-1, jedoch eine bedeutend niedrigere Affinität zu IL-1ra. Diese Beobachtungen stehen mit der Theorie im Einklang, dass beide Moleküle die Aktivität von IL-1 regulieren. Besäße IL-1RII nämlich eine starke Affinität zu IL-1ra, würde durch diese Interaktion der inhibitorische Effekt beider

Moleküle aufgehoben¹³⁸. IL-1RII wird aus diesem Grund als „Decoy“-Rezeptor bezeichnet, da er vorhandenes IL-1 bindet, so dass dieses nicht mehr für eine Interaktion mit dem funktionellen Typ I Rezeptor von IL-1R zur Verfügung steht^{140;209}. Eine weitere inhibitorische Eigenschaft von IL-1RII liegt darin, dass es im ligandengebundenen Zustand mit AcP (IL-1 receptor Accessory Protein) interagiert und somit nicht nur die Bindung von IL-1 sondern auch von AcP an IL-1RI verhindert und auf diesem Wege die Wirkung von IL-1 inhibiert¹³⁸.

1.4.2. Interleukin-18

IL-18 (Interleukin-18) ist ebenso wie IL-1 ein Interleukin, das seine pleiotrope Wirkung über seinen Rezeptor mittels der gleichen Signaltransduktionskaskade entfaltet^{138;149;210-213}. Zu den typischen T_H2-gesteuerten Immunantworten auf Umweltallergene tragen vermutlich genetische Veränderungen bei molekulare Mechanismen betreffend, die entweder direkt die Entwicklung von T_H2-Zellen fördern oder eine unzulängliche Regulation der T_H2-Zellen durch charakteristische T_H1-Cytokine hervorrufen²⁷. In diesem Zusammenhang nimmt IL-18, das eine Vielzahl von Aufgaben im Immunsystem wahrnimmt, eine besondere Rolle ein, da es sowohl an T_H1- als auch an T_H2-gesteuerten Immunantworten beteiligt ist¹⁴⁹. Zu wichtigen, von IL-18 zusammen mit IL-12 gesteuerten T_H1-Immunantworten gehört die Induktion der Expression von IFN γ sowohl in T_H1- als auch in naiven T-Zellen²¹⁴⁻²²³. IL-18 und IL-12 unterdrücken gemeinsam die Sekretion von IgE durch Induktion der Expression von IFN- γ ^{21;224}. IFN γ unterdrückt dabei die IgE-Synthese durch direkten Einfluss auf IgE-produzierende B-Zellen^{21;46-49;223} (vgl. 1.2.1, **Abbildung 1**). Zusätzlich löst IL-18 in Verbindung mit IL-12 die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H1-Zellen aus¹⁴⁹.

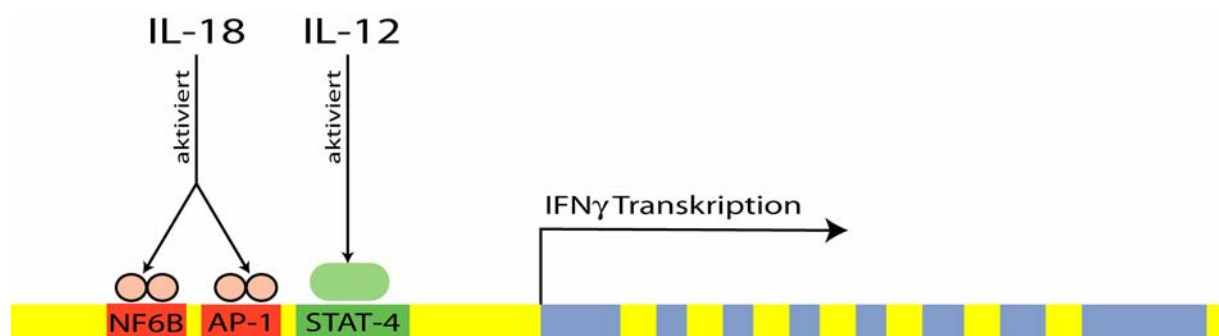


Abbildung 6: Die IFN γ Expression wird durch gemeinsame Aktivität von IL-18 und IL-12 ausgelöst modifiziert nach (²¹³)

Naive T-Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche geringe Mengen des IL-18-Rezeptors (IL-18R, Gen: *IL18R1*) und produzieren nach konzertierter Wirkung von IL-18 und IL-2 die für atopische Zustände typischen T_H2-Cytokine IL-13, GM-CSF und IL-4^{149;225}. Zusätzlich bewirkt IL-18, dass sich naive T-Zellen in IL-4-abhängiger Weise zu T_H2-Zellen differenzieren¹⁴⁹.

Die Bedeutung von IL-18 mit IL-12 konnte kürzlich in einem Mausmodell von Asthma gezeigt werden, in dem die Behandlung mit IL-12 und IL-18 die Entwicklung von T_H2-Zellen, BHR und Eosinophileninfiltration verhinderte²²⁶. Neuere experimentelle Asthmamedikamente, z.B. Oligodesoxynukleotide mit CpG-Motiven, bedienen sich dieser Erkenntnisse und beeinflussen die Krankheitssymptome, indem sie die Produktion von IL-12 und IL-18 hochregulieren^{149;223}.

1.4.2.1. IL-18 - “High-Affinity Receptor Complex”

Mittlerweile sind aus der IL-1-Ligandenfamilie 10 Mitglieder (vgl. **Abbildung 3**, **Abbildung 4**) bekannt, welche starke Übereinstimmungen hinsichtlich Aminosäuresequenz, Genstruktur und vorhergesagter Tertiärstruktur zeigen¹³⁸. Unter diesen ist IL-18 das erste zu IL-1 homologe Molekül^{218;227}, das hinsichtlich seiner Funktionen genauer charakterisiert werden konnte^{132;138}. Humanes IL-18 besteht aus 193 Aminosäuren²¹⁴ und wird als Vorläufer ohne „Leader-Sequenz“ translatiert. Diese intrazellulär vorliegende Pro-Form von IL-18 wird wie IL-1 β mittels ICE oder Caspase 1 geschnitten und aktiviert^{218;228;229}.

Entsprechend den starken Ähnlichkeiten zwischen IL-18 und IL-1 hat der IL-18R-Signalkomplex große Übereinstimmungen mit dem von IL-1 hinsichtlich seines Aufbaus, seiner Regulation und der aktivierten Signaltransduktionswege^{143;149}.

Infolgedessen besteht der IL-18-Signalkomplex aus einer Rezeptoreinheit, welche mit IL-18 interagiert, und einem IL1RacP-ähnlichen Protein – IL1RacPL (IL-1R Asseccory Protein)^{134;230} – ,das analog zur Signalvermittlung des IL-1 Signalkomplexes gebraucht wird^{149;231}. Entsprechend bindet IL-18RI seinen Liganden mit niedriger Affinität, jedoch dann mit hoher Affinität, wenn IL1RacPL rekrutiert wird¹³⁸.

Die Signalvermittlung kann demnach wie beim IL-1-Rezeptorkomplex nur dann stattfinden, wenn sich der oben beschriebene Komplex aus Rezeptor, Ligand und zusätzlichem Protein gebildet hat^{134;138;232}.

1.4.2.2. Signalvermittlung durch IL-18RI

Die Signaltransduktionkaskade, welche durch die Bildung des IL-18-Rezeptorkomplexes ausgelöst wird, ist zum Großteil mit der des IL-1-Rezeptorkomplexes identisch. Es werden die gleichen Adaptormoleküle verwendet, und auch das „Downstream-Ereignis“ besteht in beiden Prozessen in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und AP1^{138;149;213;233}.

1.4.2.3. Regulation der IL-18-Aktivität

Zwischen der Regulation der Aktivität von IL-18 und IL-1 besteht ein geringfügiger Unterschied, da es kein identifiziertes Gegenstück zu IL-1ra gibt. Stattdessen ist jedoch ein kleineres, „IL-18 bindendes Protein“ namens IL-18BP²³⁴ bekannt, welches an IL-18 binden kann und dadurch dessen Interaktion mit dem Rezeptor verhindert. Das führt zu einer Inhibierung von IL-18 führt²³⁵. IL-18BP kommt somit die Aufgabe eines löslichen „Decoy“-Moleküls zu^{138;149}. In neueren Versuchen konnte ergänzend gezeigt werden, dass IL-1F7, ein kürzlich identifiziertes IL-1-Homolog, die inhibitorische Aktivität von IL-18BP verstärkt²³⁶.

1.4.3. Signalwege ungeklärter Funktion

Die Funktionen der anderen Cytokine und Rezeptoren, die im IL1-Cluster lokalisiert und weder an der Signalübermittlung durch IL-1 noch IL-18 beteiligt sind, werden zur Zeit erforscht. Zwar konnten diesbezüglich bereits neue Erkenntnisse gewonnen werden, jedoch bleiben viele Eigenschaften der übrigen IL-1 Familienmitglieder weiterhin unaufgeklärt¹³². In diesem Zusammenhang ist entscheidend, dass die Genexpression dieser funktionell wenig erforschten IL-1 Homologen stärker als bei IL-1 und IL-18 reglementiert und auf bestimmte Zelltypen beschränkt ist. Diese Beobachtung spricht dafür, dass diese Cytokine und Rezeptoren im Immunsystem eine stärker spezialisierte Rolle als die pleiotropen Cytokinen IL-1 und IL-18 spielen¹³².

1.4.3.1. Interleukin-1F9

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass IL-1Rrp2 (Gen *IL1RL2*) – ein zum IL-1-Rezeptor vom Typ I homologes Protein – verstärkt auf Epithelzellen exprimiert wird und dort aufgrund seiner Interaktion mit Interleukin-1F9 (IL-1F9, Gen *IL1F9*) den Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert²³⁷. In diesem Zusammenhang wurde zudem festgestellt, dass die Aktivität von IL-1F9 durch das hinsichtlich seiner sonstigen

Funktion ungeklärte, Cytokin IL-1F5 (Gen: *IL1F5*) inhibiert wird²³⁷. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass in diesem Fall die Signalvermittlung analog zur Transduktionskaskade von IL-1 bzw. IL-18 erfolgt¹³².

Ergebnisse von Expressionsstudien zeigen, dass sowohl IL-1F9 als auch IL-1F5 hauptsächlich in Epithelzellen exprimiert werden, was darauf hindeutet, dass diese Proteine im Fall einer Fehlregulation an entzündlichen Prozessen in den Epithelien der Lunge bzw. Haut beteiligt sind und auf diese Weise zur Entwicklung von Asthma und/oder Neurodermitits beitragen können^{132;237}.

1.4.3.2. T1/ST2

T1/ST2 (Gen: *IL1RL1*) codiert ebenfalls einen IL-1RI-homologen Rezeptor, der sowohl in löslicher, als auch membrangebundener Variante vorkommt²³⁸. Weder sind zu diesem Rezeptor Interaktionspartner bekannt noch ist geklärt, über welche Transduktionskaskade der Rezeptor Signale vermittelt¹³⁸. Neben der Tatsache, dass die membranständige Form des Rezeptors auf T_H2-Zellen exprimiert wird^{239;240} und dass T1/ST2 wichtig für T_H2-Immunantworten ist^{241;242}, konnte gezeigt werden, dass bei schweren Asthmaanfällen erhöhte Mengen von T1/ST2 im Serum gemessen wurden²⁴³.

1.4.3.3. Liganden mit noch unbekannter Funktion

Die Funktion der Cytokine IL-1F6 (Gen: *IL1F6*), IL-1F8 (Gen: *IL1F8*) und IL-1F10 (Gen: *IL1F10*) ist noch weitgehend unbekannt. Die Homologien zu IL-1 und IL-18 lassen allerdings vermuten, dass sie ähnliche Aufgaben wie diese in der Regulation des Immunsystems wahrnehmen, die möglicherweise jedoch auf bestimmte Zelltypen beschränkt ist¹³².

2. Methoden

2.1. DNA-Präparation aus Vollblut

DNA-Isolation erfolgte aus Vollblut von Probanden der Asthma-Familienstudie mit dem des Puregene Genomic DNA-Isolation Kits (Gentra Systems, Minneapolis, USA). Durch selektive Lyse und anschließende Zentrifugation wurden die zellkernlosen Erythrozyten von den restlichen Zellen mit intakten Nuklei abgetrennt. Später konnte die Lyse der kernhaltigen Zellen unter Zugabe eines DNA-Stabilisators durchgeführt werden. Des Weiteren wurden Proteine durch Salzfällung entfernt. Die Präzipitation der im Überstand gelösten genomischen DNA erfolgte im Anschluss durch Zugabe von 100 % Isopropanol. Die gefällte DNA wurde anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen und das getrocknete Pellet in 1-2 ml TE-Puffer über Nacht gelöst. Mit dieser Methode konnte aus 9-10 ml Vollblut durchschnittlich 300-400 µg genomische DNA isoliert werden, deren Aufbewahrung als Stammlösung bei -20°C und - 80°C in Mikrotiterplatten erfolgte.

2.2. Konzentrationsbestimmung genomischer DNA-Lösungen

Soll durch Absorptionsmessung bei 260 nm im Photometer die Konzentration einer in Wasser gelösten DNA-Probe bestimmt werden, treten Schwierigkeiten dahingehend auf, dass die Messwerte vor allem durch einzelsträngige (ss) DNA und RNA sowie einzelne Nukleotide beeinflusst werden. Dieser Umstand ist damit zu erklären, dass die genannten Präparationsartefakte, aus der Isolierung genomischer DNA stammend, das Absorptionsmaximum ebenfalls bei 260 nm haben und dadurch die Konzentrationsmessung doppelsträngiger (ds) DNA verfälschen²⁴⁴. Um eine derartige Beeinflussung der Messung zu verhindern, wurde der PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes, Leiden, NL) verwandt, da dieser einen Fluoreszenzfarbstoff enthält, der sich bevorzugt an doppelsträngige DNA anlagert. Der Vorgang der Anlagerung ist nicht genau bekannt, es spricht aber viel für eine Bindung des Farbstoffes in der „minor groove“^{244;245}. Der Farbstoff ermöglicht die genaue Detektion ds DNA in einer Konzentration von 25 pg/ml ds DNA während Anwesenheit gleicher Mengen von ss DNA oder RNA²⁴⁴. Um standardisierte DNA-Konzentrationsmessungen durchführen zu können, ist neben den eigentlichen Probenmessungen eine 8-Punkt Eichgerade mit dem im Kit enthaltenen Lambda-DNA-Standard zu bestimmen. Die Konzentrationsmessungen wurden mit Hilfe des

GeniOS Fluorescence Plate Readers der Fa. Tecan (Crailsheim, D) unter Verwendung von Standard-Fluoreszenz-Wellenlängen (Anregung 482 nm, Emission 520 nm) nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Anhand der ermittelten Eichgerade wurde abschließend die Konzentration der genomischen DNA ermittelt.

2.3. DNA-Elektrophorese

Nukleinsäuren enthalten in ihrem Phosphodiester-Rückgrat negative Ladungen, die bewirken, dass sich DNA im elektrischen Feld in Richtung Anode bewegt.

Es wurden je nach Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente 0,8 - 4 %ige Gele aus Agarose angefertigt. Zu diesem Zweck wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TBE Puffer durch Erhitzung in einem Mikrowellengerät aufgelöst.

2.4. Erstellung genomischer Pools

Um genomische Pools zu erstellen, wurde zunächst jeweils die Konzentration der DNA zufällig ausgewählter Probanden ermittelt, wofür die PicoGreen Methode (vgl. 2.2) herangezogen wurde. Unter Beachtung der festgestellten Konzentrationen wurden die Stammlösungen auf eine Endkonzentration von je 1 ng/µl mit 1x TE „normalisiert“. Anschließend waren die äquimolaren DNA-Lösungen in einem Volumen von jeweils 18µl einer jeden „normalisierten“ Probe in ein Röhrchen zu pipettieren und dort zu vermischen (Pool), um einen aus äquimolaren Mengen zusammengesetzten Pool zu erstellen²⁴⁶. Von dieser nunmehr gepoolten DNA-Lösung wurden daraufhin jeweils 18µl auf die Wells einer 96er-Mikrotiterplatte überführt und trockneten über Nacht ein. Die eingetrockneten DNA-Pools (18 ng) wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Sämtliche Pipettierungen erfolgten mittels der Genesis RSP 150 Work Station (Tecan, Crailsheim, D) unter Zuhilfenahme der Gemini 3.2-Software (Tecan, Crailsheim, D).

2.5. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Unter Verwendung der PCR²⁴⁷ ist es möglich, zu untersuchende Nukleinsäureabschnitte in milliardenfacher Kopienzahl zu generieren. Die Reaktion beginnt mit der thermischen Denaturierung (95°C) eines DNA-Strangs. Vor der Denaturierung werden der DNA zwei Varianten von Oligonukleotiden, sogenannte Primer, im vielfachen Überschuss zugesetzt, deren Sequenz so gewählt wird, dass sich sowohl der zum Gegenstrang komplementäre „Sense“-Primer als auch der zum Sinnstrang komplementäre „Antisense“-Primer an den jeweiligen DNA-Abschnitt

anlagern können. Auf diese Weise ausgewählte Oligonukleotide nennt man antiparallele Primer.

Nach der Denaturierung wird das Reaktionsgemisch abgekühlt. Es kommt dabei zur Anlagerung (Annealing) der Oligonukleotide an den jeweils komplementären Strang. Die Oligonukleotide stellen das freie 3'OH-Ende für die anschließende DNA-Synthese bereit, die durch die Taq-DNA-Polymerase katalysiert wird. Der zwischen diesen Primerpaaren liegende DNA-Abschnitt kann nun mit Hilfe von dNTPs unter katalytischer Wirkung der Taq-DNA-Polymerase, deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt, vervielfältigt werden.

Die Amplifikationsreaktion besteht aus 30 bis 45 Temperaturzyklen mit den Teilreaktionen Denaturierung, Primerannealing und Primerelongation und setzt sich wie folgt zusammen:

11,3 µl	H ₂ O	
1,0 µl	genomische DNA	(40ng/µl)
2,0 µl	dNTP-Mix	2mM
2,0 µl	10x-Puffer	
1,5 µl	MgCl ₂	25 mM
1,0 µl	Primer „Sense“	10 µM
1,0 µl	Primer „Antisense“	10 µM
0,2 µl	Taq DNA-Polymerase	(1U/µl)

Tabelle 1: Standard PCR Ansatz

Die Amplifikation wurde mit dem PCR PTC 225 Tetrad Peltier Thermal Cyclern der Fa. MJ Research (Boston, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95°C	15 min	Denaturierung	1 Zyklus
95°C	1 min	Denaturierung	
X°C	1 min	Annealing	35 Zyklen
72°C	1 min	Elongation	
72°C	10 min	Elongation	1 Zyklus
4°C	unendlich		

Tabelle 2: Standardtemperaturprofil für die PCR

Alle eingesetzten Primer, die entsprechenden Annealing-Temperaturen sowie die Längen der einzelnen PCR-Fragmente sind im Anhang aufgeführt (vgl. 7.1). PCR-Bedingungen, die für die Probe-Reaktion oder die hME-Methode verwendet wurden, sind unter 2.8 beschrieben.

2.6. Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels des Biomek 2000 (Beckman, Coulter) nach Standardbedingungen unter Zuhilfenahme des NucleoSpin[®] Robot Extract Kits (Macherey Nagel GmbH & Co, Düren, D). Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit 50 µl H₂O eluiert und auf einem Agarosegel überprüft.

2.7. Sequenzierung aufgereinigter PCR-Fragmente

Um unbekannte genomische Variationen insbesondere SNPs zu identifizieren, wurden PCR-Produkte von jeweils 48 zufällig ausgewählten Probanden der Asthmafamilienstudie sequenziert. Die Sequenzierungen erfolgten auf dem Kapillarsequenziergerät ABI Prism 3100 Genetic Analyser der Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt, D). Die angewandte Sequenziermethode beruht auf dem Sanger-Abbruch-Verfahren mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (ddNTPs)²⁴⁸.

Die generierten PCR-Amplifikate wurden mit dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit der Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt, D) nach folgendem Standardprotokoll der Herstellerfirma sequenziert:

1 µl	aufgereinigtes PCR-Template
2 µl	BigDye [™] Terminator Mix
1 µl	Sequenzierprimer 10pmol/µl
6 µl	LiChrosolv H ₂ O
Gesamtvolumen 10 µl	

Tabelle 3: Standardprotokoll zum Cyclesequencing

Das Thermocycling fand auf dem PCR PTC 225 Tetrad Peltier Thermal Cycler der Fa. MJ Research (Boston, USA) nach folgendem Temperaturprofil statt.

95°C 30 sec	Denaturierung	
50°C 15 sec	Annealing	30 Zyklen
60°C 4 min	Extension	insgesamt
4°C bis zur Weiterverarbeitung		

Tabelle 4: Temperaturbedingungen für das Cyclesequencing

Die sich anschließende Aufreinigung der Sequenzierprodukte erfolgte mit Hilfe des Montagekits[™] der Firma Millipore (München, D). Die aufgereinigten Sequenzierprodukte wurden in 10µl Millipore-Puffer aufgenommen und in spezielle

Mikrotiterplatten (Applied Biosystems, Weiterstadt, D) überführt. Anschließend wurde der Sequenzierer mit diesen Platten beschickt. Die Auftrennung der Sequenzierprodukte fand unter Standardbedingungen statt.

2.8. SNP-Detektion mittels MALDI-TOF MS

Bei der matrixunterstützten Laser Desorption/Ionisation (MALDI) wird die zu untersuchende Probe mit dem 100- bis 1000fachen Überschuss an Matrix versetzt, auf einem Probenhalter co-kristallisiert und anschließend im Hochvakuum des Massenspektrometers einem intensiven Laserimpuls von wenigen Nanosekunden Dauer ausgesetzt^{249;250}. Als Matrix dienen vorwiegend organische Säuren, so z.B. 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA), mit der sich in der DNA-Analytik besonders aussagekräftige Ergebnisse erzielen lassen²⁵¹⁻²⁵³. Die Aufgaben der Matrix bestehen zunächst darin, die zugeführte Laserenergie zu absorbieren und die Ionisierung des Analytmoleküls zu unterstützen bzw. zu induzieren. Zusätzlich soll die Matrix eine photolytische Beschädigung des Analyten verhindern und die Interaktion der Analytenmoleküle untereinander sowie zwischen den Analyten und dem Probenträger verhindern²⁵⁴.

Für den Vorgang der Desorption/Ionisation werden verschiedene Modelle diskutiert, jedoch gilt der Prozess bis heute als nicht vollständig aufgeklärt.

Vermutlich werden bei der Übertragung der Laserenergie auf die in der Matrix eingebetteten Probenmoleküle hauptsächlich einfach geladene Molekülionen erzeugt, welche in die Gasphase übertreten²⁵⁴. Diese Ionen werden in einem elektrischen Feld auf das gleiche Potential beschleunigt und durchlaufen nach Verlassen der Ionenquelle eine feldfreie Driftstrecke, das sog. Flugrohr, in dem sie abhängig vom Masse-/Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt werden, bevor sie am Detektor auftreffen²⁵⁵. Dabei wandern Ionen mit hohen m/z -Werten langsamer durch das Flugrohr und erreichen somit den Detektor später als Ionen mit niedrigen m/z -Werten. Dieses Flugzeitmassenspektrometer, das eine sehr genaue elektronische Messung der Zeit zwischen dem Start der Ionen in der Quelle bis zum Eintreffen im Detektor durchführen muss, nennt man TOF-Analysator (Time Of Flight)²⁵⁵.

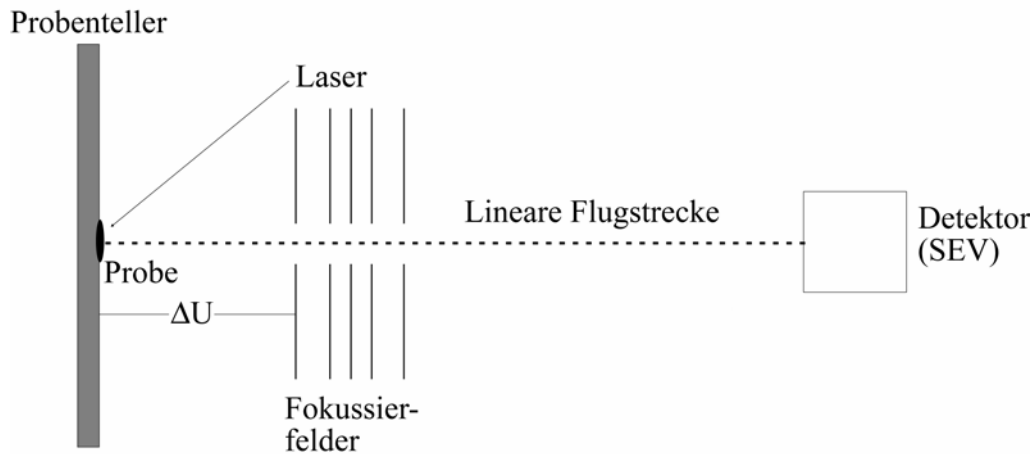
Aufgrund der Entwicklung der MALDI-TOF Massenspektrometer ist es möglich, DNA-Fragmente in einer Größenordnung von 1000 bis 9000 Da, d.h. 3-30 Basen, mit einer Genauigkeit von 0,1 % bis 0,01 % zu bestimmen, womit sich ein Massenbereich erschließt, in dem eine SNP-Analyse (SNP = Single Nucleotide Polymorphism)

mittels Primer-Extensionsprodukten durchgeführt werden kann²⁵⁵⁻²⁵⁸. SNPs kommen im Genom etwa alle 1000 bp als sog. Einzelbasenaustausch und zumeist in biallelischer Form vor²⁵⁹.

Das von Hillenkamp und Karas^{249;260} sowie Tanaka²⁶¹ eingeführte matrixunterstützte Laserdesorptionsverfahren (**Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight**), hat in den letzten Jahren zur Entwicklung von effektiven Hochdurchsatzmethoden (High-Troughput-Methods) geführt, mit deren Hilfe DNA-Variationen im Erbgut schnell und präzise detektiert werden können²⁵⁵⁻²⁵⁸. Die am weitesten für die Genotypisierung von Einzelbasenaustausch optimierte, auf MALDI-TOF MS basierende Methode ist die Primer-Extensions-Reaktion. Hier entstehen durch eine Primer-Verlängerung (Primer-Extension), allelspezifische Primer-Extensionsprodukte, die sich aufgrund ihres unterschiedlichen Gewichtes massenspektrometrisch unterscheiden lassen²⁵⁷. Um einen Einzelbasenaustausch mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie detektieren zu können, ist es notwendig, den genomischen Bereich, in dem sich der SNP befindet, mit der PCR zu amplifizieren. Dabei werden die Primer so gewählt, dass PCR-Amplifikate entstehen, die ca. 100 bp groß sind, um eine möglichst hohe PCR-Effizienz zu erzielen. Anschließend werden die so generierten PCR-Produkte für die Primer-Extensionsproduktion als Template eingesetzt.

In dieser Arbeit wurden zwei Verfahren der SNP-Detektion verwendet, die sich hauptsächlich in der Art der durchgeführten PCR und der Aufreinigung der Primer-Extensionsprodukte unterscheiden. So wurde zu Beginn dieser Arbeit sowohl die Einzelgenotypisierung als auch die Bestimmung von Allelfrequenzen in genomischen Pools mit Hilfe der PROBE™ (Primer Oligo Base Extension Reaction) im 96-Well-Format durchgeführt^{251;252}.

Im späteren Verlauf der Arbeit wurde die hME-Methode (Homogeneous-Mass-Extent™) sowohl für die Bestimmung von Allelfrequenzen in genomischen Pools als auch für die Einzelgenotypisierung im 384-Well-Format verwendet²⁶²⁻²⁶⁴.



ΔU : Beschleunigungsspannung
 SEV: Sekundärelektronenvervielfacher

Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF Massenspektrometers nach⁽²⁵⁵⁾

2.8.1. PROBE-Reaktion

Von entscheidender Bedeutung für die MALDI-TOF-Analyse der allelspezifischen Primer-Extensionsprodukte ist die Probenvorbereitung. Nukleinsäuren zeigen eine hohe Affinität zu Alkali- und Erdalkalitionen. Diese Kationenanlagerung, z.B. ubiquitärer Na^+ oder K^+ Ionen, stört die MALDI-Messung empfindlich, da separate Signale entstehen, die den eigentlichen Molekülonen vor- bzw. nachgelagert sind und so zu einer Reduktion des Signalrauschverhältnisses führen. Aus diesem Grund ist es notwendig, mit einer Methode zu arbeiten, die diese Kationenanlagerung weitestgehend unterbindet²⁶⁵. Deshalb erfolgte bei der PROBE™ die Aufreinigung der Primer-Extensionsprodukte mittels des Biotin-Streptavidin-Systems²⁶⁶, das Verunreinigungen sehr effizient eliminiert, indem die Ionenanlagerung durch den quantitativen Austausch von Alkali- gegen Ammoniumionen durchgeführt wird. Die dabei entstehenden Ammoniumsalze setzen in der Gasphase Ammoniak frei, und die Primer-Extensionsprodukte können als freie Säuren detektiert werden²⁶⁶.

Streptavidin ist ein bakterielles Protein, das eine sehr hohe Affinität (1×10^6 größer als Antigen-/Antikörperbindung) zu Biotin bzw. biotinyliertem Template aufweist. Daher wird zur Detektion eines Einzelbasenaustausches mit der PROBE zunächst eine Amplifikation der Region um den SNP mit einem biotinylierten und einem nicht biotinylierten PCR-Primer durchgeführt. Das entstandene Produkt ist danach an seinem 5' Ende biotinyliert und kann anschließend durch eine Bindung an mit Streptavidin gekoppelten, paramagnetischen Beads immobilisiert werden. Das immobilisierte, doppelsträngige PCR-Produkt wird im Anschluss denaturiert, und es

kann nach einer Fixierung des Komplexes aus paramagnetischen Beads, Streptavidin, Biotin und DNA der komplementäre Einzelstrang entfernt und verworfen^{251;252} werden. Der immobilisierte Einzelstrang des PCR-Produktes kann jetzt als Template für die folgende Primer-Extensions-Reaktion verwendet werden. Hierbei findet ein sog. PROBE-Primer Einsatz (Extensions-Primer), der komplementär zum immobilisierten Templatestrang ist. Der Primer wird so gewählt, dass das 3' Ende unmittelbar vor dem zu detektierenden SNP liegt. Das 3' Ende wird dann mittels einer speziellen DNA-Polymerase entsprechend der Basenabfolge auf dem Templatestrang verlängert. Durch die Zugabe einer bestimmten Mischung aus Di-Desoxynukleotiden und Desoxynukleotiden entstehen je nach Zustand des zu detektierenden Allels unterschiedliche Primer-Extensionsprodukte. Die Extensionsprodukte liegen nach einem weiteren Denaturierungsschritt gelöst im Überstand vor und sind für die anschließende Massendetektion mit Hilfe von MALDI-TOF entsprechend vorbereitet^{251;252;267}.

2.8.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) im Rahmen der PROBE-Reaktion

Als vorteilhaft erwies sich die Durchführung einer asymmetrischen PCR, bei der mit einem deutlichen Überschuss des nicht-biotinylierten Primers gearbeitet wurde. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass der biotinylierte Primer vollständig in das Amplifikat eingebaut wurde und deshalb bei der späteren massenspektrometrischen Analyse nicht oder nur in geringer Menge detektiert werden konnte. Die PCR erfolgte in diesem Fall sowohl für die Einzelgenotypisierung als auch für die Messung der Allelfrequenz in genomischen Pools in einem Reaktionsvolumen von 50µl. Dabei wurde folgender Ansatz verwendet, der direkt auf das eingetrocknete DNA-Template pipettiert wurde:

33,9 µl	H ₂ O
5,0 µl	dNTP-Mix [2mM]
5,0 µl	PCR-Puffer [10x]
3,0 µl	MgCl ₂ [25mM]
2,5 µl	nicht-biotinylierter Primer [10pmol/µl]
0,1 µl	biotinylierter Primer [10pmol/µl]
0,5 µl	Taq DNA Polymerase (1U/µl)

Tabelle 5: PCR-Ansatz zur Erstellung biotinylierter PCR Produkte

Die Amplifikationen erfolgten dabei auf PCR PTC 225 Tetrad Peltier Thermal Cyclern der Fa. MJ Research (Boston, USA) unter folgenden Reaktionsbedingungen:

95°C	10 min	Denaturierung	1 Zyklus
95°C	45 sec	Denaturierung	
56°C	45 sec	Annealing	45 Zyklen insgesamt
72°C	45 sec	Elongation	
72°C	10 min	Elongation	1 Zyklus
4°C	unendlich		

Tabelle 6: Temperaturbedingungen für die PCR mit biotinylierten Primern

2.8.1.2. Primer-Extensionsreaktion im Rahmen der PROBE-Reaktion

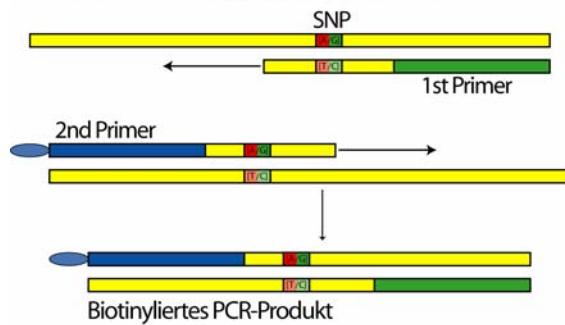
Die Immobilisierung der PCR-Produkte über paramagnetische Beads, die Primer-Extensions-Reaktion sowie alle damit verbundenen Denaturierungs- und Waschschriffe wurden unter Verwendung des MassEXTEND™ Core Kits der Fa. Sequenom (Hamburg, D) nach einem Standardprotokoll der Herstellerfirma (Manual Processing Procedure for the MassARRAY™ II System; Sequenom Hamburg, D) durchgeführt. Alle erforderlichen Pipettierschritte erfolgten dabei auf der Pipettierstation Multimek96 Automated 96 Channelpipettor (Beckmann Coulter, Fullerton, USA) unter Verwendung von programmierten Standardabläufen (Sequenom, Hamburg, D). Das für die Primer-Extensionsreaktion erforderliche Thermocycling wurde auf PCR PTC Tetrad Peltier Thermal Cyclern der Fa. MJ Research (Boston, USA) unter Standardbedingungen (Manual Processing Procedure for the MassARRAY™ II System; Sequenom Hamburg, D) durchgeführt.

2.8.1.3. MALDI-TOF MS-Analyse im Rahmen der PROBE-Reaktion

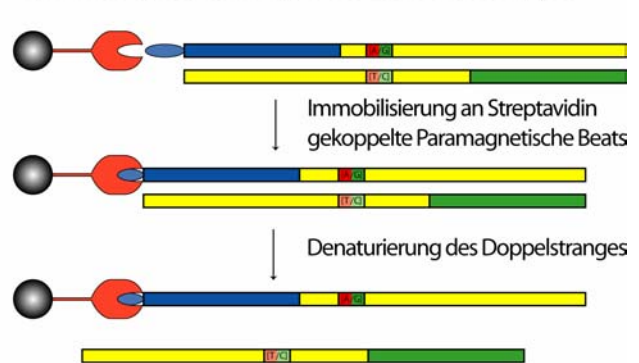
Für die Analyse mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden mit Hilfe eines Nanoplotters mit 4 Piezopipetten (SpectroJet™ Sequenom Hamburg) jeweils 15 nl der Primer-Extensionsprodukte auf einen sogenannten SpektroCHIP™ (Sequenom, Hamburg D) übertragen. Hierbei handelt es sich um einen 96er Siliziumchip, der mit einer kristallinen Matrix (3-Hydroxypicolinsäure) beladen ist. Zusätzlich zu diesen 96-Matrixspots, auf welche die zu analysierenden Proben übertragen wurden, befinden sich fünf weitere Matrixspots auf dem Chip, die mit einem Kalibranten (Sequenom Hamburg, D) beschickt wurden. Der verwendete Kalibrant bestand aus einer Mischung von drei Oligonukleotiden bekannter Masse und diente der Kalibrierung des Analysesystems.

Nach Beladung des Chips wurde dieser auf einen metallischen Probenträger übertragen und in die Vakuumschleuse des MassARRAY™ Massenspektrometers eingeführt. Die Vermessung der Proben und Analyse sowie die Kalibrierung des Systems erfolgten automatisch nach Standardeinstellungen.

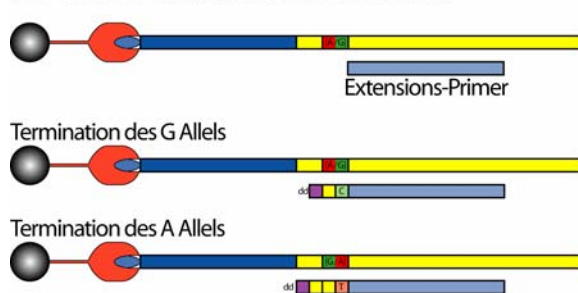
1. PCR mit biotyniliertem Primer



2. Immobilisierung des Einzelstranges



3. Primer-Extensionsreaktion



4. MALDI-TOF Analyse

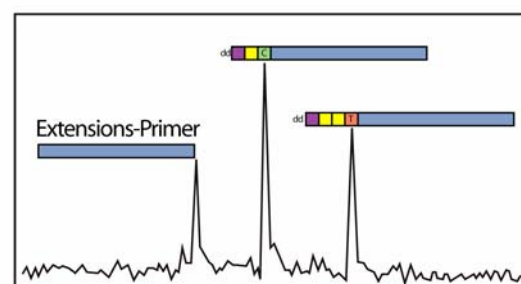


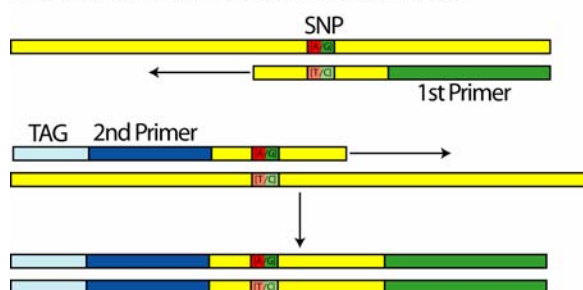
Abbildung 8: Schematischer Ablauf der PROBE Reaktion

2.8.2. PROBE-Reaktion „TAG-Primer“

Zum Großteil wurde die PCR mit drei Primern, einem genspezifischen, einem genspezifischen getagten und einem universellen biotynilierten Primer (vgl. **Abbildung 9**, vgl. 7.1) durchgeführt, um Kosten zu reduzieren. Sämtliche Reaktionen wurden analog zur PROBE-Reaktion ohne mit einem „TAG“ versehenem Primer durchgeführt.

PCR mit biotyniliertem TAG-Primer

1. Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern



2. Amplifikation mit sequenzspezifischem und Biotin-Tag-Primer

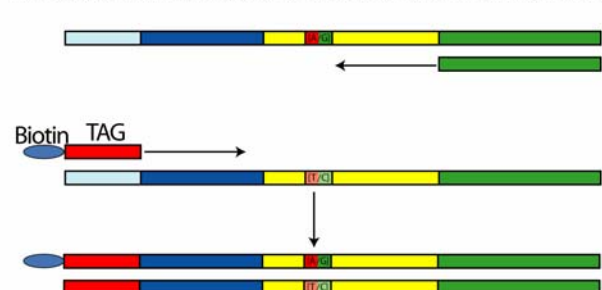


Abbildung 9: Biotinylierung des PCR-Produktes

2.8.3. hME-(homogeneous MassExtend™) Methode

Von der PROBE-Reaktion unterscheidet sich die hME-Methode hauptsächlich darin, dass die Aufreinigung der Primer-Extensionsprodukte nicht über das Biotin-Streptavidin-System erfolgt – weswegen keine Biotinylierung des PCR-Produktes erforderlich ist – ,sondern über ein Ionenaustauschharz vorgenommen wird (SpectroClean™ ,Sequenom, Hamburg, D). Ebenso wie bei der PROBE-Reaktion wird vor der Primer-Extensions-Reaktion der genomische Bereich um den zu untersuchenden SNP mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Die für diese Amplifikation verwendeten „Sense“- und „Antisense“-Primer weisen neben dem sequenzspezifischen Bereich jeweils ein zusätzliches Motiv von zehn Basen auf (vgl 7.1). Das zusätzliche Sequenzmotiv, der sogenannte „Tag“, erfüllt in diesem Zusammenhang mehrere Aufgaben. Zum einen verläuft die Amplifikationsreaktion gleichmäßiger, wenn mehrere PCR-Reaktionen in einem Reaktionsgefäß stattfinden (Multiplex), zum anderen ist es notwendig, die Masse dieser Primer mit Hilfe des „Tags“ soweit zu erhöhen, dass sie bei der anschließenden MALDI-TOF Analyse nicht im Massenbereich der Primer-Extensionsprodukte liegen und somit außerhalb des eingestellten Massenfensters sind, da bei der hME-Methode die überschüssigen, in der PCR unverbrauchten Primer nicht entfernt werden. Nach erfolgter PCR werden freie, nicht in das Amplifikat eingebaute Desoxynukleotide durch das Enzym SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) abgebaut. Ein derartiges Vorgehen ist notwendig, da durch die freien Nukleotide andere als die vorher bestimmten Primer-Extensionsprodukte entstünden, wodurch Probleme bei der korrekten SNP-Detektion aufträten. In einem letzten Schritt sind die Extensionsprodukte mittels eines Ionenaustauschharzes (SpectroClean™, Sequenom, Hamburg, D) aufzureinigen, bevor sie massenspektrometrisch analysiert werden können.

2.8.3.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) im Rahmen der hME-Methode

Die PCR-Reaktionen, die innerhalb der hME-Methode durchgeführt wurden, erfolgten in einem Reaktionsvolumen von 6 µl in einer 384er Mikrotiterplatte, in der sich die vorgelegte, über Nacht eingetrocknete DNA befand (5 ng). Dazu wurde mit Hilfe der Pipettierstation Genesis RSP 150 Workstation der Fa. Tecan (Crailsheim, D) folgender, vorher angesetzter Mastermix in die einzelnen Wells pipettiert:

4,34µl	H ₂ O	
0,6µl	10x Puffer	
0,6µl	dNTPs	je 2mM
0,1µl	Primer sense	10pmol/µl
0,1µl	Primer antisense	10pmol/µl
0,24µl	MgCl ₂	25mM
0,02µl	HotStarTag	1U/µl

Tabelle 7: PCR für die hME-Methode im 384-Well-Format (Gesamtvolumen 6µl)

Das Thermocycling wurde mit dem PCR PTC 225 Tetrad Peltier Thermal Cyclern der Fa. MJ Research (Boston, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95°C	15 min	Denaturierung	1 Zyklus
95°C	20 sec	Denaturierung	
56°C	30 sec	Denaturierung	45 Zyklen
72°C	1 min	Extension	
72°C	3 min	Extension	1 Zyklus
4°C	unendlich		

Tabelle 8: Temperaturbedingungen für die PCR im 384-Well-Format

2.8.3.2. Primer-Extensions-Reaktion im Rahmen der hME-Methode

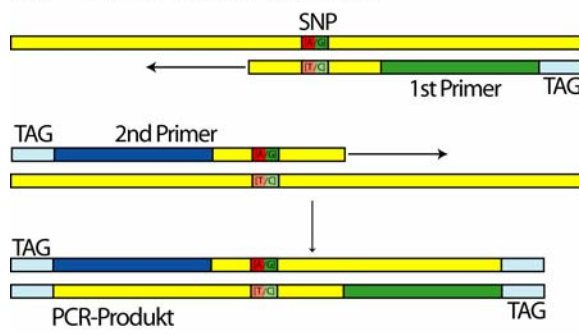
Die Inaktivierung der Desoxynukleotide fand mit Hilfe der Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) statt, die anschließende Primer-Extensions-Reaktion sowie die Probenaufbereitung mit dem Ionenaustauschharz erfolgte nach einem Standardprotokoll der Fa. Sequenom. (Manual Processing Procedure for the MassARRAY™ II System; Sequenom Hamburg, D).

2.8.3.3. MALDI-TOF-Massenspektrometrie im Rahmen der hME-Methode

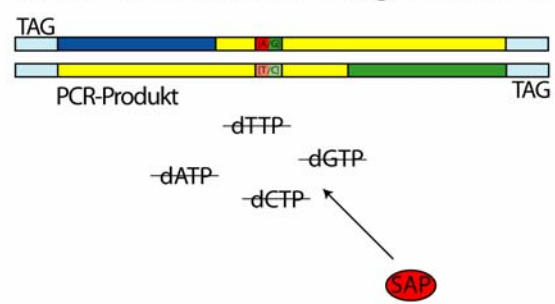
Nach erfolgter Probenaufbereitung wurden 1-2 nl des Analytengemisches mit Hilfe des Spectro Point Nanoliter Pipetting Systems™ der Fa. Sequenom (Hamburg, D) auf einen Siliziumchip transferiert. Auf diesem befanden sich neben 384 Matrixspots (3-Hydroxypicolinsäure) für die Proben zehn weitere Matrixspots für den oben erwähnten Kalibranten (vgl. 2.8.1.3).

Die Messung der Proben erfolgte entsprechend dem Vorgehen bei der PROBE-Reaktion.

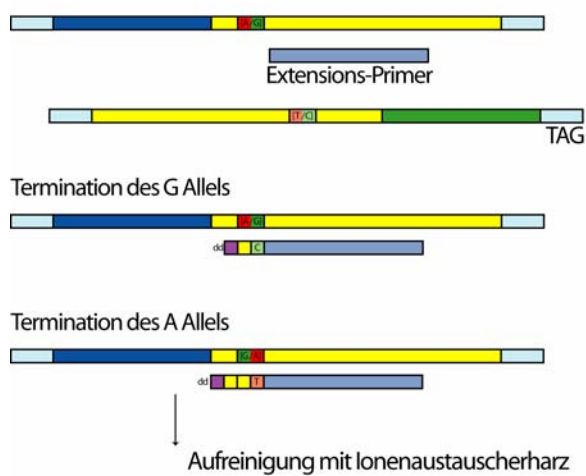
1. PCR mit hME Primern



2. SAP-Verdau nicht eingebauter dNTPs



3. Primer-Extensionsreaktion



4. MALDI-TOF Analyse

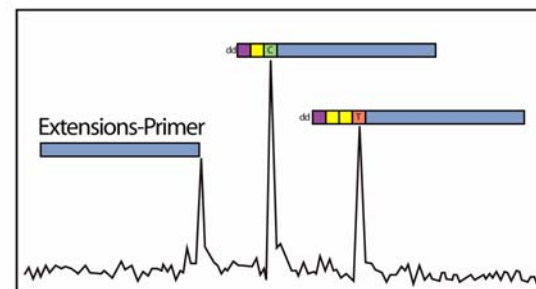


Abbildung 10: Schematischer Ablauf der hME-Methode

2.9. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Bei einem ELISA handelt es sich um einen serologischen Test, durch den gebundene Antigene oder Antikörper mit Hilfe eines gekoppelten Enzyms, das ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umwandelt, nachgewiesen werden. In dieser Arbeit fanden ausschließlich sog. Sandwich-ELISAs Verwendung, für die unmarkierte Antikörper, welche spezifisch für das zu testende Antigen sind, auf einer Kunststoffoberfläche (Mikrotiterplatte) fixiert waren. Nach Zugabe des zu testenden Serums und einem anschließenden Waschschrift konnte das gebundene Antigen durch einen zweiten antigenspezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Dieser Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, das die Farbreaktion hervorruft.

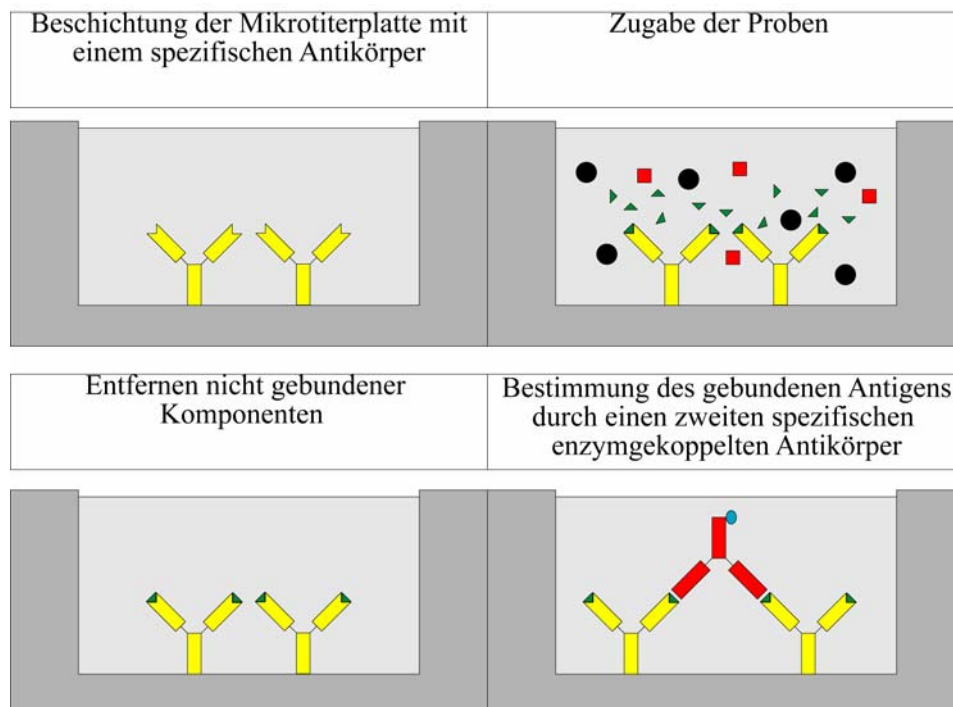


Abbildung 11: Sandwich-ELISA

2.9.1. IL-1ra Nachweis mittels ELISA

Durch Anwendung des Quantikine humane IL-1ra/IL-1F3 Kits der Firma R&D Systems konnten IL-1ra-Konzentrationen im Serum nachgewiesen werden. Es erfolgte sowohl eine Doppelbestimmung der Serumproben als auch die Ermittlung einer Eichreihe, anhand derer die unbekannte IL-1ra-Konzentration im Serum ermittelt wurde. Sämtliche Pipettierschritte erfolgten, wie vom Hersteller empfohlen und im Handbuch beschrieben.

2.10. Statistische Analysen

Sämtliche statistischen Analysen wurden vom Autor dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Michael Knapp und Herrn PD Dr. Matthias Wjst durchgeführt.

2.10.1. Paternitätstest (Mendel Check)

Mit Hilfe des Programms SiBPair 0.99 wurde die Genotypenkonformität innerhalb der deutschen und italienischen Familien nach den Mendelschen Vererbungsgesetzen überprüft.

2.10.2. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Um Genotypisierungsfehler weitgehend ausschließen zu können, wurde zusätzlich jeder SNP, der in der deutschen und oder der italienischen Familienstudie verwendet wurde, mit dem χ^2 Test auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) getestet.

2.10.3. Einzellocus-Analyse

Die Einzellocusanalyse wurde mit Hilfe des TDT (Transmissions-Disequilibrium-Test)²⁶⁸ durchgeführt. Dieser ist ein familienbasierter Assoziationstest, mit dem nachgewiesen werden kann, inwiefern Eltern, die bzgl. eines bestimmten Allels heterozygot sind, dieses häufiger an ihre Nachkommen transmittieren, als es nach den Mendelschen Regeln der Fall sein sollte, wenn weder Assoziation noch Kopplung gegeben sind²⁶⁸. Der Vorteil des TDT gegenüber dem einfachen Assoziationstest liegt darin, dass parallel sowohl auf Kopplung zwischen einer DNA-Variation und einem möglichen Krankheitslocus als auch auf Assoziation getestet werden kann²⁶⁸. Mit dieser Methode wird vermieden, dass es durch stratifizierte Populationen zu fehlerhaften Ergebnissen kommt

Die statistische Analyse wird mittels eines χ^2 –Testes für verbundene Stichproben über eine Kontingenztafel für biallelische Marker vorgenommen²⁶⁸.

2.10.4. Zwei- und Dreilocus-Analyse

Die Zwei- bzw. Dreilocus-Analyse erfolgte mittels der von Zhao und Mitarbeitern vorgeschlagenen Tests für je zwei bzw. drei benachbarte SNPs²⁶⁹. Hierbei bestimmt die Anzahl der durchgeführten Simulationen die Präzision des angegebenen *P*-Werts. So wurden zunächst alle benachbarten SNPs mit einer geringen Anzahl von Replikationen (*R* = 400) untersucht. Anschließend wurden alle Kombinationen, die

bei $R = 400$ einen P -Wert $< 0,10$ aufwiesen, mit $R = 2000$ erneut analysiert. Schließlich wurden Kombinationen, die bei $R = 2000$ einen P -Wert $< 0,02$ zeigten, mit $R = 20000$ gerechnet. Dieser Replikationsumfang gewährleistet, dass hinreichend genaue P -Werte in der Größenordnung von $0,002$ erhalten werden.

2.10.5. Tagging-SNPs und Mehrpunkthaplotypen

Die statistische Bestimmung der Haplotypen erfolgte mit einem von Becker und Mitarbeitern²⁷⁰ entwickelten ML-Schätzer (Maximum Likelihood). Zu diesem Zweck wurde der so genannte „Locus-iterative“ Modus des Programms FAMHAP verwendet um Frequenzschätzungen für so genannte „long-range“ Haplotypen im *IL1RN* Gen zu ermitteln (<http://www.uni-bonn.de/~umt70e/becker.html>).

Als nächstes wurde die kleinstmögliche Teilmenge an SNPs bestimmt („haplotype-tagging SNPs“), die es erlauben zwischen allen Haplotypen die eine Frequenz $>1\%$ besitzen zu unterscheiden. Mit diesen SNPs, wurde das Program FAMHAP erneut gestartet um für jeden Haplotypen, die geschätzte Frequenz dieses Haplotypen bei nicht-transmittierten und transmittierten Haplotypen mit Hilfe eines Wahrscheinlichkeits Verhältnistests mit einem Freiheitsgrad zu bestimmen.

2.10.6. Berechnung des Kopplungsungleichgewichtes

Paarweises Kopplungsungleichgewicht (LD linkage disequilibrium) D'^{271} wurde mit Hilfe einer Haplotyp-Frequenz-Schätzungen, welche die Wahrscheinlichkeit der Genotypeinformation des Kindes einbaut, ermittelt²⁷⁰. Die Berechnung der Darstellung wurde mit dem Programm GOLD²⁷² durchgeführt. Die eigentliche graphische Darstellung erfolgte mit Sigmaplot.

3. Material

3.1. Geräte

Gelelektrophoreseapparatur:	Sunrise, horizontal Gel Electrophoresis Apparatus (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe, D) Bio-Rad Power Pac 300/3000 (Bio-Rad, München, D)
Gel-Dokumentationssystem:	UVT40 M Transilluminator (Herolab, Wiesloch, D) E.A.S.Y 429 K Kamera (Herolab, Wiesloch, D)
DNA-Sequenzierer:	ABI-Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt, D)
Kühlzentrifugen für Platten:	Sigma 4K15C (Sigma Laborzentrifugen, Osterode, D) Rotanda 46 RS (Hettich, Darmstadt, D)
Massenspektrometer:	BIFLEX II-TOF (Bruker Franzen Analytik GmbH, Bremen, D)
Mikrowelle:	(Siemens, D)
PCR-System:	PCR PTC 225 Tetrad, Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Boston, USA) PCR PTC 200 Tetrad, Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Boston, USA)
Pipettierroboter:	Biomek 2000 (Beckman Coulter, Fullerton, USA) Multimek 96 Automated 96-Channel Pipettor (Beckman Coulter, Fullerton USA) Genesis RSP 150 Work Station (Tecan AG, Crailsheim, D) Temo (Tecan AG, Crailsheim, D)
Photometer:	Genios® Fluorescence Plate Reader (Tecan AG, Crailsheim, D) UltraSpec 3100 pro (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, D)
Schüttler:	Taumelschüttler Unitwist 3D (UniEquip Laborgeräte + Vertriebs GmbH, München, D) ROTO-Shake Genie (Scientific Industries, Inc Bohemia, USA)

Spotter:	SpectroPoint™ Nanoliter Pipetting System (SEQUENOM GmbH, Hamburg, D; RoboDesign, USA)
Thermomixer:	Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburg, D)
Tischzentrifuge:	Centrifuge 5417R (Eppendorf AG, Hamburg, D) MicroCentrifuge SD110VAC (Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D)
Vortexer:	MS2 Minishaker (IKA-Labortechnik, Staufen, D)
Vakkum Manifold:	Millipore
Eismaschine:	AF30 (Scotsman, Mailand, Italien)
Reinstwasser-System:	Ultra Clear UV (SG Wasseraufbereitung und Regeneration GmbH, Barsbüttel, D)
Waage:	572 (Kern, Ballingen, D)

3.2. Computerprogramme

3.2.1. Pipettierrobotor

Gemini 3.2 (Visual Basic Programme)	Tecan, Crailsheim, D
Xfluor4	Tecan, Crailsheim, D
Normalisation WorklistMaker (Visual Basic Program)	Tecan, Crailsheim, D
Bioworks	Beckmann Coulter, Fullerton, USA

3.2.2. MALDI-TOF-Massenspektrometrie

SpectroTyper RT™	SEQUENOM, Hamburg, D
Genotype Analyser™ Version 2.0.0.5	SEQUENOM, Hamburg, D
SpectroREADER	SEQUENOM, Hamburg, D
Pintool Software	SEQUENOM, Hamburg, D, RoboDesign USA
SpectroDesigner 2.1	SEQUENOM, Hamburg, D

3.2.3. Sequenzierung

DNA Sequencing Analysis Software™	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
Version 3.6.1	

3100 Data Collection Software™ Version Applied Biosystems, Weiterstadt, D

3.2.4. Primer und PCR-Bedingungen

Vector NTI Suite 6	www.informaxinc.com
SpectroDESIGNER™	SEQUENOM, Hamburg, D

3.2.5. Analyse genomischer DNA-Sequenzen

Vector NTI Suite 6	www.informaxinc.com
phred (Basecalling)	Washington University, USA
phrap (alignments)	Washington University, USA
polyphred (SNP Markierung)	Washington University, USA
consed (Viewer)	Washington University, USA

3.2.6. Datenbanken aus dem Internet

Asthma& Allergy Gene Database	http://cooke.gsf.de/asthmagen/main.cfm
Ensemble	http://ensembl.org
National Center for Biotechnology Information	http://ncbi.nlm.nih.gov/
UCSC Human Genome Projekt Working Draft, Genome Browser	http://genome.ucsc.edu
Unified Database for Human Genome Mapping	http://bioinformatics.weizmann.ac.il/udb/
The SNP Consortium LTD	http://snp.cshl.org/
The Association Database	http://geneticassociationdb.nih.gov/

3.2.7. Statistische Programme

SIB-Pair Version 0.99.9 by David L. Duffy
 SAS 8.1. und SAS 8.2.
 Selbstgeschriebene Programme von PD
 Dr. M. Knapp

3.3. Puffer, Lösungen, Reagenzien

3.3.1. Reagenzien, Lösungen und Puffer für die PCR

- 10x Puffer (Abgene)
- 25mM MgCl₂ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)

- dNTP-Set, je 100mM (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)

3.3.2. Reagenzien, Lösungen und Puffer für die Sequenzierung

- 10x Running Buffer with EDTA (Applied Biosystems, Weiterstadt, D)
- LiChrosolv, H₂O, HPLC grade (Merck, Darmstadt, D)
- FG, 3100 POP6 Sequenziergel (Applied Biosystems, Weiterstadt, D)

3.3.3. Reagenzien, Lösungen und Puffer für MALDI-TOF

- MassEXTEND™ Nucleotide Tri-Mix Pack (SEQUENOM, Hamburg, D)
- MassEXTEND™ Nucleotide Di-Mix Pack (SEQUENOM, Hamburg, D)
- MassEXTEND™ Nucleotide Uni-Mix Pack (SEQUENOM, Hamburg, D)
- hME MassEXTEND™ Nucleotide Tri-Mix Pack (SEQUENOM, Hamburg, D)
- 3-Punkt Kalibrant (SEQUENOM, Hamburg, D)
- hME Puffer (SEQUENOM, Hamburg, D)
- Spectro CLEAN (SEQUENOM, Hamburg, D)

3.3.4. Reagenzien, Lösungen und Puffer für die DNA Gel-Elektrophorese

- Agarose ultra pure (GibcoBRL, Eggenstein, D)
- 6x Loading Dye Solution (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)
- 1x TBE-Laufpuffer (Sambrook und Russel 2001)

3.3.5. Weitere Reagenzien, Lösungen und Puffer

- 10mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,0
- alle weiteren Lösungen und Puffer wurden den jeweiligen Kits entnommen.

3.3.6. Längenstandards für DNA-Agarose-Gele

- -pUC Mix, Marker, 8(MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)

3.4. Reaktionskits

3.4.1. DNA-Isolation aus Vollblut

- Puregene Genomic DNA Isolation Kit (Gentra, Minneapolis, USA)

3.4.2. Konzentrationsbestimmung von DNA

- PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes, Leiden, NL)

3.4.3. PCR-Aufreinigung

- NucleoSpin® Robot 96-T Extract Kit

3.4.4. Sequenzierkits

- BigDye™ Terminator v 1.0 Cycle Sequencing Kit

3.4.5. MALDI-TOF Massenspektrometrie

- MassEXTEND™ Core Kit (SEQUENOM, Hamburg, D)

3.4.6. Sequenzierprodukt-Aufreinigungskit

- Montagne Millipore D

3.5. ELISA-Kits

- human IL-1ra/IL-1F3 Kit der Firma R&D Systems
- human IL-1β Kit der Firma R&D Systems

3.6. Enzyme

3.6.1. Polymerasen

- HotStar Taq™ DNA Polymerase (Abgene)
- Thermosequenzase™ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D)

3.7. Sonstige Enzyme

- Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D)

3.8. Primer

PCR- und Sequenzierprimer, die für die Resequenzierung und die Genotypisierung des Repeats im Intron 2 von *IL1RN* Einsatz fanden, wurden vom hauseigenen Service (U. Linzner, Abteilung BioDV am Institut für Pathologie der GSF) synthetisiert. Im Zuge der Genotypisierung mit Hilfe von MALDI-TOF MS fanden HPSF-gereinigte PCR und Extensions-Primer der Fa. Metabion (Martinsried, Deutschland) Verwendung. Sämtliche in dieser Arbeit zum Einsatz gebrachten Primer mit den jeweiligen PCR-Bedingungen bzw. den Durchführungsvoraussetzungen für die Primer-Extensions-Reaktionen sind im Anhang aufgelistet.

4. Probanden

4.1. Asthma-Familienstudie Deutschland

4.1.1. Studienaufbau und Kriterien

Die Zusammenstellung der Familien dieser Studie erfolgte hauptsächlich ab 1994 in pädiatrischen Abteilungen von Universitätskliniken in Deutschland und Schweden. Die Kernfamilien bestanden jeweils aus den Eltern und mindestens zwei, an Asthma erkrankten Kindern ("affected-sib-pairs")^{107;273}. In einem ersten Schritt erfolgte die Rekrutierung von 108 Familien (474 Probanden), von denen nach eingehender Überprüfung 97 Familien (415 Probanden) für eine genomweite Suche¹⁰⁷ und die nachfolgende Feinkartierung Verwendung fanden¹⁰⁸. Im Weiteren konnte die bestehende Studie auf insgesamt 172 Familien aufgestockt werden (748 Probanden: persönliche Mitteilung J. Altmüller/Dr. M. Wjst). Für alle durchgeführten Versuche und Analysen lag eine unterschriebene Einverständniserklärung der Probanden vor.

Der Studie liegt ein positives Votum der Ethikkommission von Nordrhein-Westfalen (1995) zugrunde¹⁰⁷, sowie eine weitere Begutachtung der Bayerischen Landesärztekammer (2001).

Folgende Richtlinie waren für die Auswahl der Familien entscheidend (persönliche Mitteilung J. Altmüller/Dr. M. Wjst):

1. Bei mindestens zwei Kindern der Kernfamilie muss *Asthma bronchiale* ärztlich diagnostiziert sein. Diese müssen leibliche Kinder und dürfen keine eineiigen Zwillinge sein.

Begründung: *affected-sib-pair*-Design

2. Alle Familienmitglieder sollen deutsch sprechen können.

Begründung: Vermeidung von Verständigungsschwierigkeiten, ausländische Angehörige wären für weiterführende Untersuchungen nicht erreichbar.

3. Kein Kind durfte ein Früh- oder Mangelgeborenes sein (Gestationsalter über der 37. Schwangerschaftswoche, Geburtsgewicht über 2.500 g) und durfte in den ersten 6 Monaten nicht mechanisch beatmet worden sein

Begründung: Ausschluss von Phänokopien, wie Surfactant-Mangel- und/oder Lungenreifungsstörungen

4. Das Einverständnis der Eltern und Kinder muss vorliegen.

Begründung: Juristische und ethische Gründe

5. Das Alter des Kindes sollte zwischen 6 und 18 Jahren liegen

Begründung: Bis zu diesem Alter haben die meisten betroffenen Kinder Asthma-Symptome entwickelt

4.1.2. Phänotypisierung der Studienteilnehmer

Neben dem Phänotyp Asthma bronchiale wurden mit Asthma assoziierte Merkmale, wie bronchiale Hyperreaktivität, Gesamt-IgE-Spiegel, spezifischer IgE-Spiegel und Eosinophilenzahl bei allen Probanden bestimmt.

Asthma bronchiale wurde zunächst klinisch diagnostiziert und später durch standardisierte Fragebögen bestätigt. Zusätzlich zur klinischen Diagnose hatten alle betroffenen Kinder seit wenigstens drei Jahren wiederkehrende, pfeifende Atemgeräusche, jedoch keine anderen diagnostizierten Atemwegserkrankungen. Sowohl zur Bestätigung der klinischen Diagnose als auch zur Bestimmung der bronchialen Hyperreaktivität (BHR) erfolgten zusätzlich Lungenfunktionstests, Peakflow-Messungen und eine bronchiale Provokation mit Methacholin^{107;273}. Ferner wurden die Probanden mittels eines standardisierten Skin Prick Tests (SPT) auf Allergien gegenüber zwölf häufig vorkommenden Allergenen getestet²⁷³. Zusätzlich wurde der Gesamt-IgE-Spiegel im Serum und der spezifische IgE-Spiegel für die im SPT verwendeten Allergene durch RAST Assays (Pharmacia Freiburg, D) ermittelt¹⁰⁷. Die Eosinophilenzahl, ein weiteres mit Asthma bronchiale assoziiertes Merkmal, wurde durch Auszählung dieser Zellen in einer Neubauer Kammer bestimmt¹⁰⁷.

4.2. Asthma-Familienstudie Italien

Während eines Zeitraumes von drei Jahren (1995-1998) wurden in Norditalien 127 weitere Familien für diese Studie durch die pädiatrischen Kliniken der Universität Verona und des Krankenhauses Bozen rekrutiert. Die Auswahl der Familien erfolgte anhand mindestens zweier allergischer, asthmatischer Kinder, welche einen positiven SPT aufwiesen und bei denen Asthma nach der Definition der ATS (American Thoracic Society)²⁷⁴ klinisch diagnostiziert war. Zusätzlich zum Phänotyp Asthma bronchiale wurden mit dieser Krankheit assoziierte Merkmale, wie bronchiale Hyperreaktivität, Gesamt-IgE-Spiegel und spezifischer IgE-Spiegel bei allen Probanden bestimmt²⁷⁵.

4.3. KORA S 2000-Studie

Die KORA S 2000-Studie ist eine deutsche, populationsbezogene Studie, die zwischen 1999 und 2001 in der Region Augsburg aufgebaut wurde. Diese Studie umfasst mehr als 4.000 Probanden. Die Probanden wurden auf ihren Gesundheitsstatus hin untersucht; die Studie schloss aber keine explizite Untersuchung auf Asthma und Allergie ein²⁷⁶.

4.4. ECRHS-Studie

Bei der ECRHS-Studie (ECRHS: European Community Respiratory Health Survey) handelt es sich um eine populationsbezogene Studie, in der ca. 5000 ostdeutsche Probanden aus der Gegend um Erfurt zwischen 19 und 65 Jahren erfasst sind²⁷⁷. Die Erhebung stellt einen Teil einer der größten epidemiologischen Studien für Atemwegserkrankungen dar.

5. Ergebnisse

5.1. Biallelische Marker (SNPs) aus dem *IL1*-Cluster in genomischen Pools

Der chromosomale Bereich q12-14 auf dem Chromosom 2 (s.1.3.2) stellt aufgrund der Kopplungsergebnisse und der möglichen Funktionen der dort lokalisierten Gene für Cytokine und deren Rezeptoren eine vielversprechende Kandidatengenregion für Asthma dar. Um den möglichen Beitrag der Gene aus dem *IL1*-Cluster zur Entwicklung von Asthma bestimmen zu können, wurde für alle bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Gene aus der *IL1*-Familie, die im chromosomalen Bereich 2q12-14 lokalisiert sind, eine Datenbankrecherche nach bekannten DNA-Variationen durchgeführt. Bei den recherchierten Polymorphismen handelte es sich hauptsächlich um Einzelbasenaustausche, sogenannte SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), die weitestgehend biallelisch vorkommen. Diese konnten mit Hilfe öffentlicher Datenbanken ermittelt werden (s.3.2.6). Mit der SpectroDesigner Software (s.3.2.2) wurden die passenden Reaktionsbedingungen und Primer berechnet (s.2.8.2, 2.8.3), um die jeweiligen Allele der in den Datenbanken gefundenen SNPs mit Hilfe von MALDI-TOF MS (s. 2.8) (vgl. **Abbildung 12**) analysieren zu können.

Der erste Schritt bestand darin, experimentell zu bestimmen, ob die ausgewählten SNPs in der deutschen Asthmafamilienstudie und der KORA S 2000 populationsbasierten Studie (vgl. 4) überhaupt nachzuweisen waren, da es zu Beginn dieser Arbeit noch keine unabhängigen Ergebnisse gab, die die Existenz der in den Datenbanken identifizierten SNPs bestätigten. Im Folgenden wurden deshalb zunächst zwei „Pools“, jeweils bestehend aus äquimolaren Mengen genomischer DNA, von zufällig ausgewählten Teilnehmern der deutschen Asthmafamilienstudie und der KORA Populationsstudie zusammengestellt, um Ergebnisse über den Allelstatus zu erhalten.

In den anschließend durchgeführten PCRs fanden diese „DNA-Pools“ als genomische „Templates“ Einsatz, um den Bereich amplifizieren zu können, der die jeweils zu analysierende SNPs in einem Bereich von bis zu 250 bp umgibt. (vgl. **Tabelle 29**). Anhand der linear verlaufenden Primer-Extensionsreaktion mit anschließender MALDI-TOF MS Analyse der Extensionsprodukte konnte der Anteil

der Allele im genomischen Pool nachgewiesen werden, da mit Hilfe der PCR zuvor die Ausgangssequenz der genomischen DNA um den zu untersuchenden Einzelbasenaustausch exponentiell vervielfältigt wurde. Diese Methoden sind aufgrund der exponentiell verlaufenden PCR und der sich anschließenden, linear verlaufenden Primer-Extensionsreaktion, durch welche der Allelstatus im Pool nachweisbar wurde, geeignet, die Allelverteilung im Pool zu ermitteln, da sie nur zu einer Verstärkung der Signale, nicht aber zu einer Verschiebung der Allelverteilung führen.

Im Anschluss an die MALDI-TOF MS Analyse konnte zum einen bestimmt werden, ob die Allelspektren polymorph, d.h. es konnten zwei allelspezifische Primer-Extensionsprodukte detektiert werden, oder monomorph waren, d.h. ein allelspezifisches Primer-Extensionsprodukt wurde detektiert, und zum anderen, in welchem Verhältnis die Allele im Pool vorlagen.

Zu diesem Zweck musste im MALDI-TOF Massenspektrum an den Stellen, an denen allelspezifische Primer-Extensionsprodukte detektiert werden konnten, die Fläche unter der Kurve berechnet werden (s. 3.2.2). Das Verhältnis beider Integrale zueinander ergab die Allelverteilung im Pool (**Abbildung 13**).

Zur Bestimmung der Allelverteilung wurden unterschiedliche Methoden verwandt, deren Durchführung unter 2.8 genauer beschrieben ist. Die Ermittlung der Allelverteilung bzw. die Analyse, ob der SNP in biallelischer Form vorlag, erfolgte zunächst mittels der Biotin–Streptavidin-Methode. (vgl. 2.8.1, 2.8.2 und 7.1). Nach einer Methodenweiterentwicklung durch die Firma Sequenom, wurde dieses Verfahren jedoch durch die einfachere, schnellere und kostengünstigere hME-Methode ersetzt werden (vgl. 2.8.3). Konnte in den genomischen Pools entweder nur ein Allel, nur ein Allel mit einer Frequenz von unter 5 % detektiert oder gar kein Allel bestimmt werden, wurde der SNP verworfen und nicht weiter analysiert. Im Falle der Detektion zweier allelspezifischer Primer-Extensionsprodukte, die eine „minor“ Allelfrequenz von über 5 % anzeigten, wurde dieser SNP weiteren Analysen zugeführt.

In dieser Arbeit wurden auf diese Weise 60 % (144 SNPs) der in öffentlichen Datenbanken gefundenen SNPs (240) als biallelische Marker identifiziert und in einer Auswahl von Probanden der Familienstudie genotypisiert.

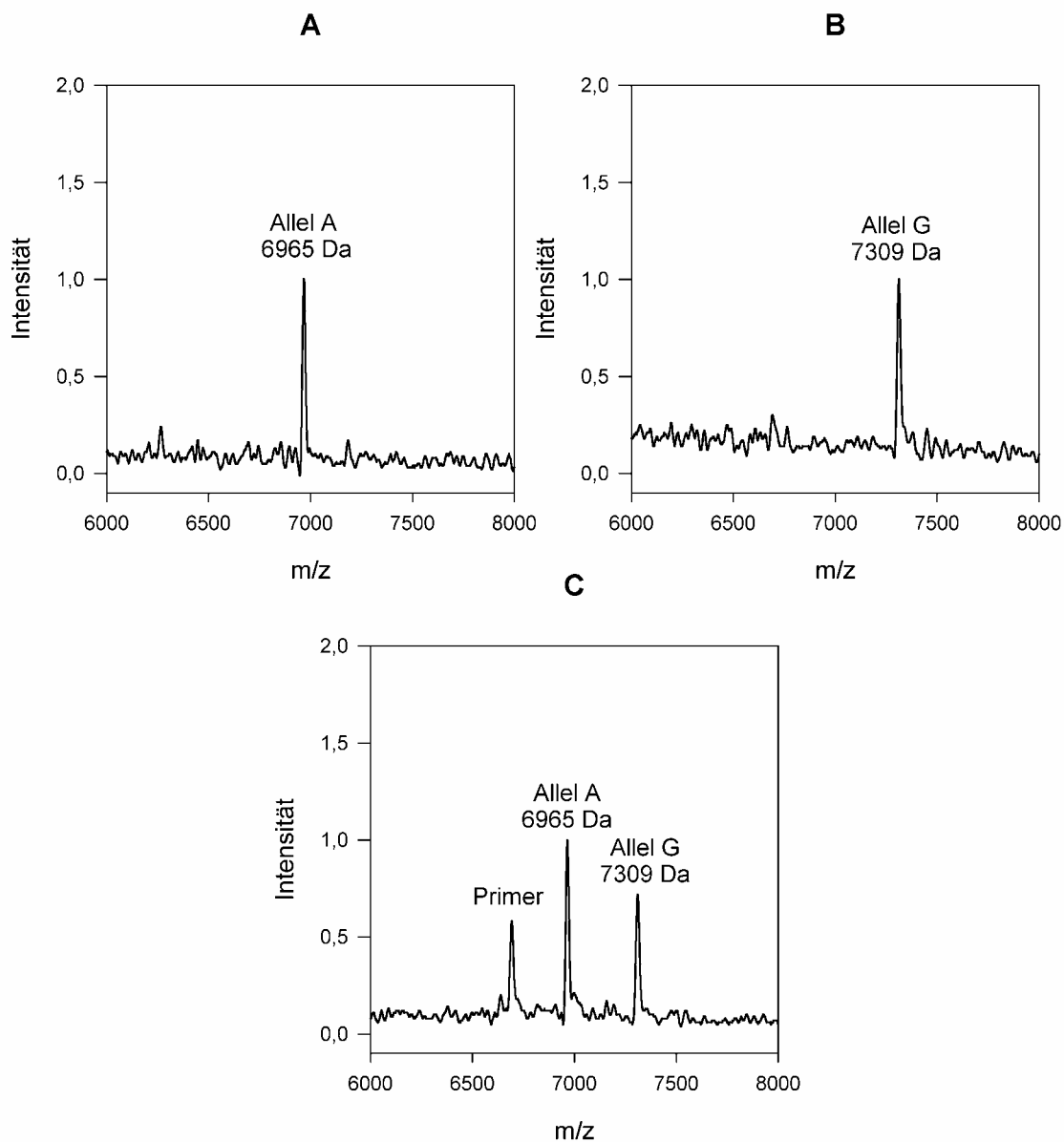


Abbildung 12: MALDI-TOF Massenspektren der Primer-Extensions-Reaktion des SNP rs12905[G/A] aus IL1RL1. A: zeigt den homozygoten Zustand des Allels A für den SNP rs12905 B: zeigt den homozygoten Zustand des Allels G für den SNP rs12905 C: zeigt den heterozygoten Zustand für den SNP rs12905

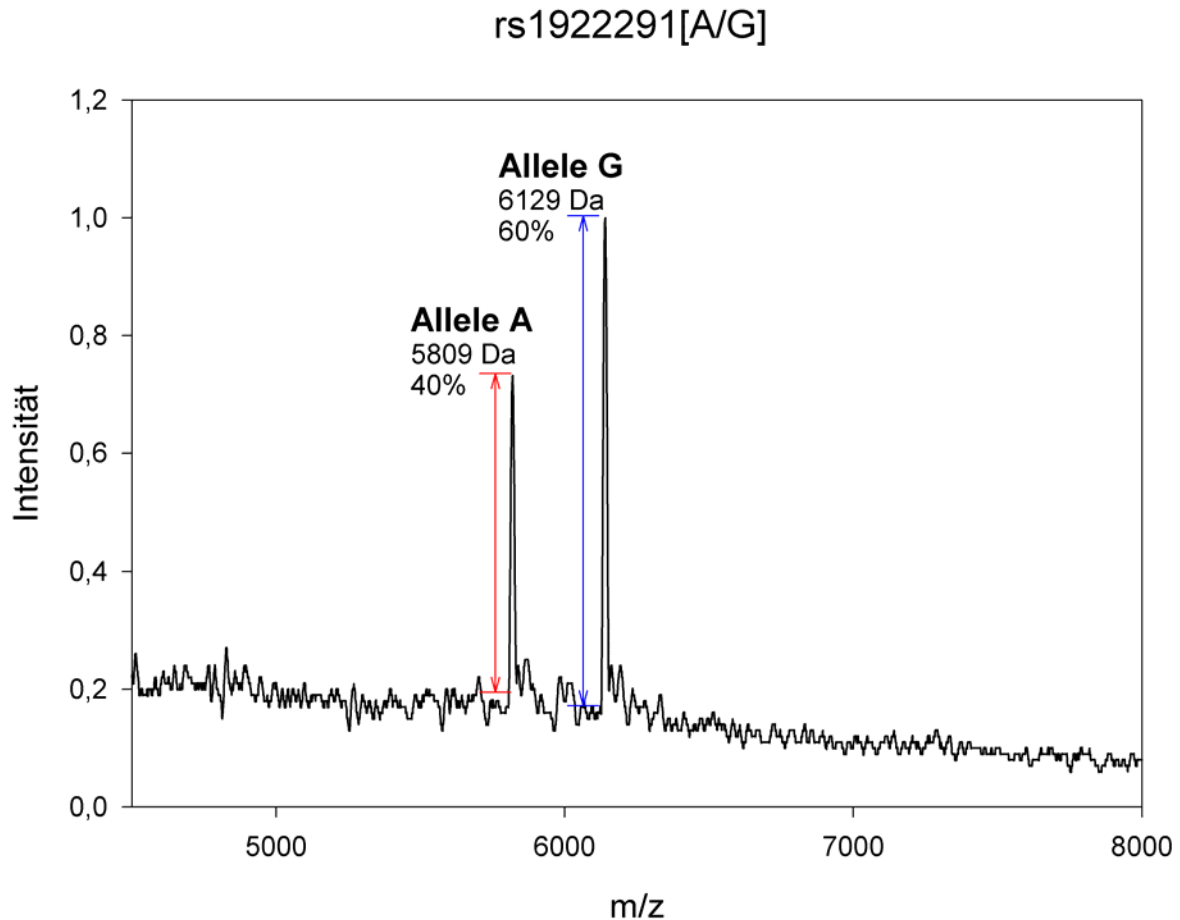


Abbildung 13: MALDI-TOF Massenspektrum der Primer-Extensionsreaktion für den SNP rs1922291[A/G] im IL1RL2 Gen. Als „Template“ für die PCR wurde ein genomischer Pool verwendet. Mit Hilfe der MALDI-TOF MS Analyse der allelspezifischen Primer-Extensionsprodukte kann das Verhältnis der Allele im Pool nachgewiesen werden. Die exakte Bestimmung der Allelfrequenz erfolgt durch die Bestimmung des Verhältnisses der beiden Flächen unter den für die jeweiligen Allele detektierten Kurven. Die Integralrechnung wurde zeitgleich zur MALDI-TOF Analyse mit der SpectroTyper™ Software durchgeführt (vgl.3.2.2).

5.2. Genotypisierung biallelischer SNPs aus Genen des *IL1*-Clusters

Die sich anschließende Einzelgenotypisierung der validierten, polymorphen SNPs erfolgte mittels der hME-Methode im 384-Well-Format (s.2.8.3). Zu diesem Zweck wurde eine zufällige Auswahl von 129 Familien der deutschen Studie (s.4.1) verwendet, die aus sogenannten Trios – zwei Eltern, ein erkranktes Kind – bestand. Die DNA der Probanden wurde daraufhin genotypisiert, indem man gleichzeitig mehrere Ansätze parallel in einem Reaktionsgefäß analysierte (Multiplex). Grund für diese parallele Vorgehensweise waren sowohl Kosten- als auch Zeitersparnis.

Der erste Schritt der hME-Multiplexreaktion bestand darin, dass mittels PCR, entsprechend der Anzahl zu untersuchender SNPs, bis zu fünf Amplicons zeitgleich in einem Reaktionsgefäß gebildet wurden (Pentaplex). Die mit Hilfe der SpektroDesigner Software berechneten PCR-Bedingungen waren so spezifiziert, dass sämtliche in dieser Arbeit im Rahmen der hME-Methode durchgeführten Amplifikationsreaktionen nicht mehr optimiert werden mussten und nach einem vereinheitlichten Pipettierprotokoll bzw. Temperaturprogramm ablaufen konnten (s.2.8.3.1). Im gleichen Reaktionsansatz fanden anschließend ebenfalls die entsprechenden Primer-Extensionsreaktionen statt, um die zu analysierenden SNPs nachzuweisen. Auch bei dieser Reaktion waren die durch die SpektroDesigner Software berechneten Bedingungen optimiert, so dass auch für diese standardisierte Pipettierprotokolle und Temperaturprogramme verwendet wurden (s.2.8.3.2).

Die MALDI-TOF MS Analyse einer Primer-Extensions-Reaktion, bei der bis zu fünf Reaktionen parallel durchgeführt werden, ist im Gegensatz zu einer Primer-Extensionsreaktion, die im sogenannten Uniplex-Verfahren durchgeführt wird, komplexer. Während einer MALDI-TOF-Analyse von Primer-Extensionsprodukten einer Multiplexreaktion werden Analyten über einen Massenbereich von etwa 3000 Da (vgl. **Abbildung 15**) detektiert, während eine Uniplex-Reaktion ein weniger umfangreiches MALDI-TOF Spektrum zeigt, in dem nur wenige Analyten innerhalb eines Massenbereiches von ca. 700 Da erfasst werden (vgl.

Abbildung 12).

Für die erfolgreiche Durchführung der beschriebenen Multiplexreaktion sind zwei Aspekte von entscheidender Bedeutung. Zunächst sind die Primer-Extensionsreaktionen bzw. die Massen der erwarteten Produkte so zu berechnen,

dass es nicht zu Überschneidungen verschiedener Analyten mit gleicher Masse im MALDI-TOF MS Spektrum kommt.

Diese erste Voraussetzung wurde gewährleistet, indem alle Parameter der durchgeführten Reaktionen mit Hilfe der SpectroDesigner Software bestimmt wurden, so dass die Massen der Primer und deren jeweiliger Extensionsprodukte im Massenspektrum mindestens einen Abstand von 50 Da zueinander hatten.

Des Weiteren müssen die Signale der allelspezifischen Extensionsprodukte weit über dem Grundrauschen des Spektrums detektierbar sein, damit eine zuverlässige Genotypisierung gewährleistet ist. Das Hauptproblem dieser Anforderung besteht darin, dass, häufig eine unregelmäßige Variation in der Signalintensität der eingesetzten Extensionsprimer gegeben war, wie in den durchgeführten Vorabexperimenten festgestellt wurde. Diese Abweichungen können zum einen bedingt durch falsche Konzentrationsbestimmungen der bestellten Primer bedingt und zum anderen auf das heterogene Desorptions-/Ionisations-Verhalten der Oligonukleotide bei der MALDI-TOF MS Analyse zurückzuführen sein. Aufgrund dieses Umstandes konnten während der MALDI-TOF MS Analyse der Multiplexreaktion die von Primern mit niedriger Signalintensität gebildeten Extensionsprodukte nicht mehr zuverlässig vom Grundrauschen unterschieden werden.

Um diese Probleme zu vermeiden, wurde vor Durchführung einer Primer-Extensions-Reaktion zunächst ein 1 μM Gemisch der in der Reaktion verwendeten Primer mit MALDI-TOF MS analysiert. Durch diesen Arbeitsschritt konnte festgestellt werden, wie stark die Signalintensitäten der Primer variierten (vgl.

Abbildung 14). Die Menge des Primers mit dem stärksten Signal wurde deshalb, wie im Standardprotokoll beschrieben, in den folgenden Multiplexreaktionen beibehalten (vgl. 2.8.3.2). Von den Primern mit niedrigerer Intensität wurde jedoch entsprechend dem Verhältnis der Signalintensitäten mehr Primer eingesetzt, so dass letztlich gleich starke Signale der sich anschließenden Primer-Extensionsreaktionen im Massenspektrum detektiert wurden und somit eine zuverlässige Genotypisierung gewährleistet werden konnte.

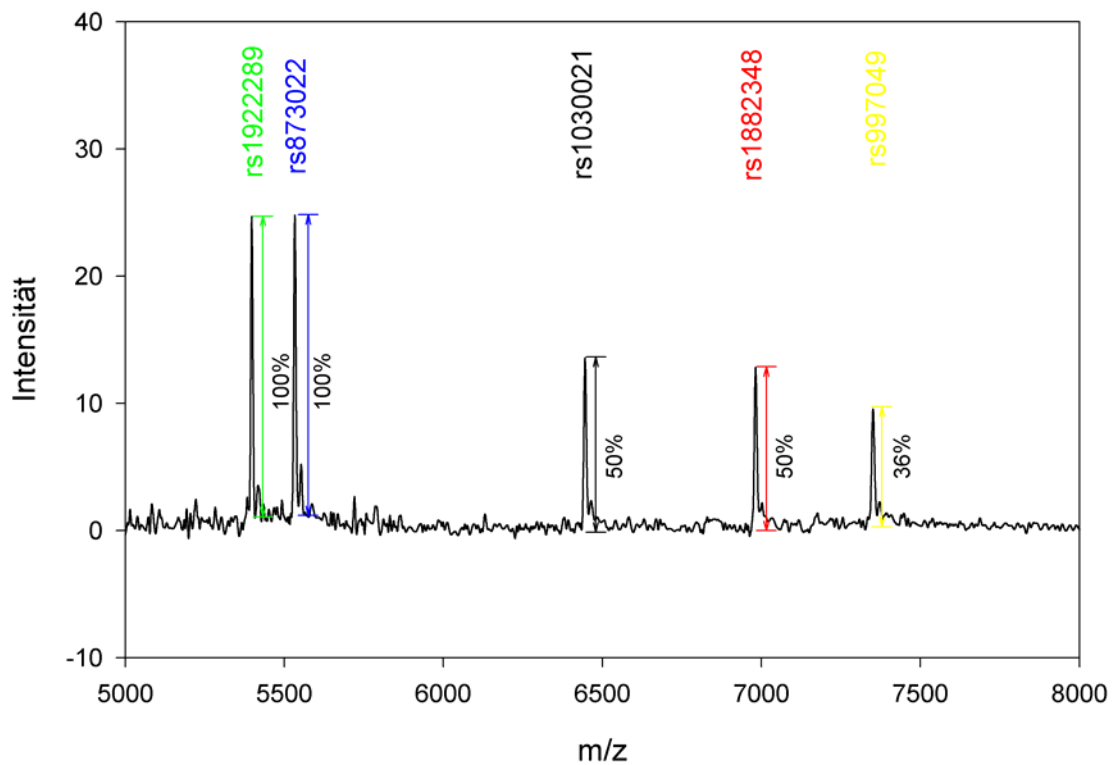


Abbildung 14: MALDI-TOF Massenspektrum der Extensionsprimer rs1922289, rs873022, rs1030021, rs1882348, rs997049 einer später durchzuführenden Multiplexreaktion. Verwendet wurden gleiche Mengen jedes Primers (9 μ M jeder Primer; Mengenbestimmung nach Angaben des Herstellers Metabion). Die Prozentangaben beziehen sich auf das Intensitätsverhältnis der Primer rs1030021, rs1882348, rs997049 im Massenspektrum zu den Primern rs1922289 und rs873022 in %.

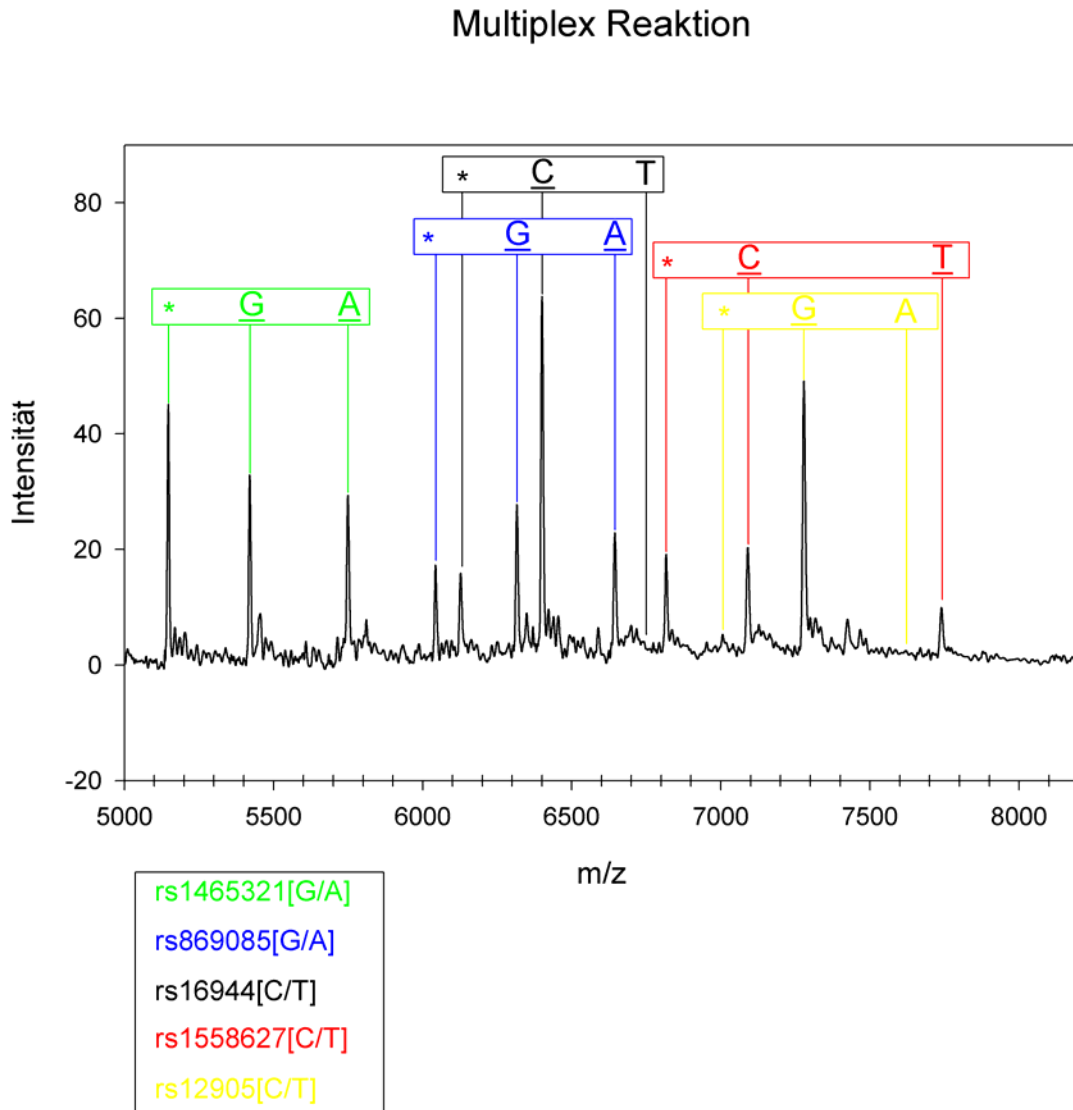


Abbildung 15: MALDI-TOF Massenspektrum einer Multiplexreaktion zur Genotypisierung fünf biallelischer SNPs. Das Massenspektrum zeigt die Analyse der Primer-Extensionsreaktion für die SNPs rs1465321[A/G], rs869085[A/G], rs16944[C/T], rs1558627[C/T] und rs12905[C/T]. Die unterstrichenen Buchstaben zeigen die Stellen im Massenspektrum, an denen die allelspezifischen Extensionsprodukte der durchgeführten Reaktionen detektiert werden können. Durch ein Sternchen wird der Massenbereich markiert, in dem die jeweiligen nicht extendierten Primer detektiert werden können.

5.2.1. Analyse von SNPs im *IL1R2* Gen

IL1R2 ist ein „single copy gene“ und befindet sich in der Region q12-14 auf Chromosom 2 zwischen 101,46 und 101,52 Mb. Dieses Gen liegt damit im Vergleich zu den übrigen Mitgliedern der IL1-Familie am nächsten zum Zentromer, besteht aus 8 Exons und wird in Richtung des Telomers transkribiert^{133;278}. Es ist zwar bis jetzt noch nicht im Zusammenhang mit Assoziationsstudien und Asthma und verwandten Phänotypen untersucht worden, allerdings konnte in Expressionsstudien festgestellt werden, dass IL-1RII bei Nichtatopikern stärker als bei Atopikern exprimiert ist²⁷⁹.

Zu Beginn dieser Arbeit waren für *IL1R2* 4 SNPs in öffentlichen Datenbanken bekannt, von denen 3 im Promotorbereich des Gens identifiziert wurden und einer im Intron 7 des Gens liegt.

Zunächst wurde überprüft, welche dieser SNPs in den generierten, genomischen Pools polymorph nachweisbar waren. Es war allerdings nur möglich, den SNP rs719248 in den Pools zu bestätigen und anschließend in der beschriebenen Auswahl von 129 Familien der deutschen Asthmastudie (vgl. 4.1 und 5.2) einzeln zu genotypisieren.

Der untersuchte SNP wies keine Unstimmigkeiten zwischen den Genotypen der Eltern und denen der Kinder auf (Paternitätstest; nicht gezeigt). Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE, Hardy-Weinberg-Equilibrium) waren für die elterlichen Genotypen ebenfalls nicht festzustellen, so dass Genotypisierungsfehler weitestgehend ausgeschlossen werden konnten (vgl. **Tabelle 9**).

Der durchgeführte TDT-Test auf Assoziation mit Asthma zeigte jedoch keinen signifikanten p-Wert an ($P = 0,9304$).

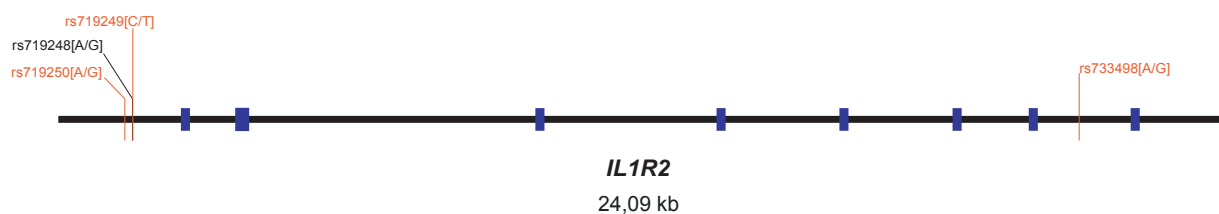


Abbildung 16: Schematische Darstellung des *IL1R2* Gens. Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs konnten in genomischen Pools nicht bestätigt werden. Die schwarze Markierung zeigt den SNP an, der im Pool polymorph vorlag und in der Trio-Auswahl genotypisiert wurde.

SNP(rs)	Position [bp]	Typ	selteneres Allel	vollständige Familien	Genotypverteilung	P_{HWE}	T/U	P_{TDT}
719248	101495233	A/G	0.488(G)	126	31 /67 /28	0.4719	66 /65	0.9304

Tabelle 9 Genotypisierungsergebnisse von rs719248 aus dem *IL1R2* Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nucleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen; p-Wert des TDT-Tests

5.2.2. Analyse von SNPs im *IL1R1* Gen

IL1R1 liegt im Bereich zwischen 101,64 und 101,70 Mb im IL1- Cluster und erstreckt sich über einen 33 kb-großen Bereich. Das Gen besteht aus 10 Exons und wird in Richtung des Telomers transkribiert^{133;278}.

In seiner Funktion als Vermittler der Aktivität von IL-1 kommt *IL1R2* eine zentrale Bedeutung zu. IL-1 ist zusätzlich nicht nur ein positionelles sondern auch ein funktionelles Kandidatengen²⁷⁹.

Zum Zeitpunkt der Recherche waren 10 SNPs in öffentlichen Datenbanken bekannt (vgl. **Abbildung 17**). In den sich anschließenden Validierungsexperimenten der SNPs wurde gezeigt, dass 6 von diesen in der deutschen Familienstudie biallelisch vorkamen und anschließend in der Trio-Auswahl genotypisiert werden konnten (vgl. **Tabelle 10**).

Tabelle 10).

Der Paternitätstest zeigte keine signifikanten Fehler an, allerdings ist der p-Wert für das HWE des SNPs rs871658 signifikant ($P = 0,0308$), was auf eine möglicherweise fehlerhafte Genotypisierung oder Populationssubstruktur hinweisen könnte.

Der TDT-Test zeigte kein positives Assoziationsergebnis mit Asthma an.

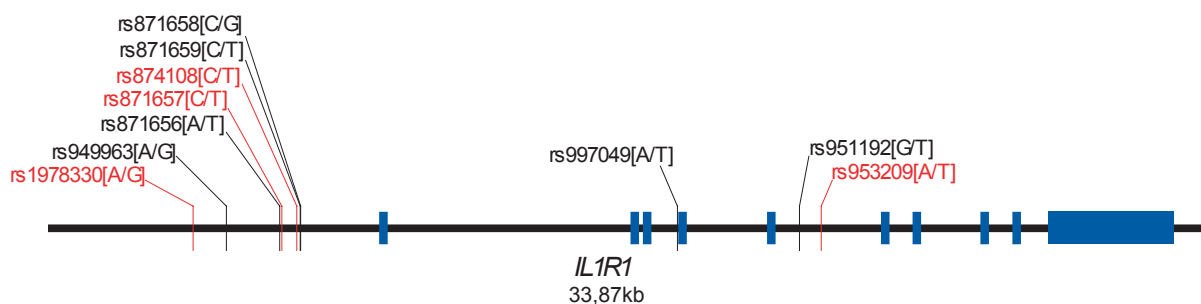


Abbildung 17: Schematische Darstellung des *IL1R1* Gens. Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden.

SNP	Position	Typ	selteneres Allel	vollständige Familien	Genotypverteilung	P_{HWE}	T/U	P_{TDT}
949963	101641144	A/G	0.209(A)	117	8 /33 /76	0.1090	32 /40	0.3458
871656	101642640	A/T	0.207(A)	104	7 /29 /68	0.1265	31 /36	0.5413
871659	101643213	C/T	0.304(C)	97	7 /45 /45	0.3442	38 /47	0.3290
871658	101643223	C/G	0.152(G)	125	93 /26 /6	0.0308	27 /17	0.1317
997049	101653791	A/T	0.352(T)	122	49 /60 /13	0.3925	56 /75	0.0969
951192	101657212	G/T	0.274(G)	115	10 /43 /62	0.5201	45 /46	0.9165

Tabelle 10: Genotypisierungsergebnisse der 6 biallelischen SNPs aus dem *IL1R1* Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummern, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests

5.2.3. Analyse von SNPs im *IL1RL2* Gen

IL1RL2 befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu *IL1R1* und erstreckt sich etwa über 60 kb zwischen 101,67 Mb und 101,73 Mb. Das Gen besteht aus 12 Exons und wird aus Richtung des Zentromers transkribiert¹³³. *IL1RL2* bzw. sein Genprodukt löst in noch unbekannter Weise die Freisetzung des proinflammatorische Zielgene aktivierenden NF κ B in den Zellkern aus²³⁷. Zu Beginn der Arbeit waren 32 SNPs in öffentlichen Datenbanken aufgeführt, die hauptsächlich in intronischen Bereichen des Gens lokalisiert sind (vgl. **Abbildung 18**). Von diesen konnten 19 SNPs bestätigt und genotypisiert werden. In der nachfolgenden statistischen Analyse zeigte keiner der untersuchten SNPs Auffälligkeiten beim Paternitätscheck oder hinsichtlich des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes, die auf eine fehlerhafte Genotypisierung hindeuten würden. Die Assoziationsanalyse mittels TDT-Tests führte zu keinen signifikanten Ergebnissen.

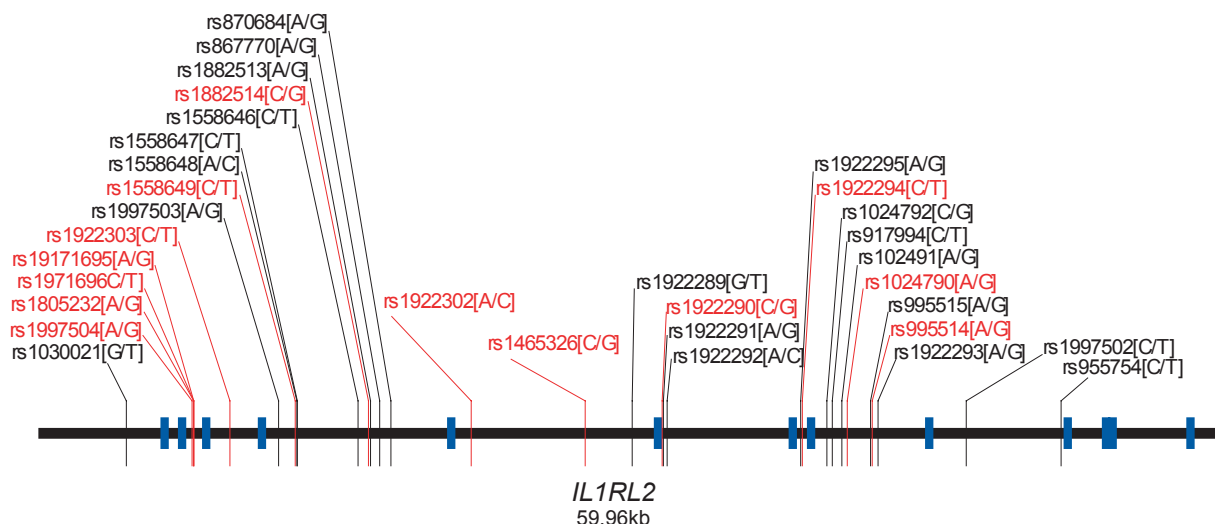


Abbildung 18: Schematische Darstellung des *IL1RL2* Gens. Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden.

SNP	Position	Typ	selteneres Allel	vollständige Familien	Genotypverteilung	P_{HWE}	T/U	P_{TDT}
1030021	101672836	G/T	0.294(G)	124	13 /47 /64	0.3294	51 /55	0.6976
1997503	101680593	A/G	0.070(A)	115	1 /14 /100	0.5229	11 /15	0.4328
1558648	101681526	A/C	0.130(C)	115	86 /28 /1	0.4316	26 /24	0.7773
1558647	101681543	C/T	0.124(C)	117	1 /27 /89	0.4974	20 /25	0.4561
1558646	101684636	C/T	0.335(T)	118	50 /57 /11	0.3582	50 /64	0.1898
1882513	101685273	A/G	0.333(G)	105	46 /48 /11	0.7697	40 /55	0.1238
867770	101685733	A/G	0.356(A)	118	12 /60 /46	0.2363	63 /56	0.5211
870684	101686300	A/G	0.340(G)	119	49 /59 /11	0.2557	52 /62	0.3490
1922289	101698601	G/T	0.328(T)	125	54 /60 /11	0.3205	53 /67	0.2012
1922291	101700175	A/G	0.395(G)	110	41 /51 /18	0.7504	55 /50	0.6256
1922292	101700371	A/C	0.360(A)	82	10 /39 /33	0.7689	46 /35	0.2216
1922295	101707169	A/G	0.333(A)	123	11 /60 /52	0.2793	65 /53	0.2693
1024792	101708505	C/G	0.120(G)	117	91 /24 /2	0.7756	22 /19	0.6394
917994	101708772	C/T	0.409(C)	116	20 /55 /41	0.8329	57 /63	0.5839
1024791	101709268	A/G	0.126(G)	123	96 /23 /4	0.0938	25 /22	0.6617
995515	101710740	A/G	0.338(G)	114	48 /55 /11	0.4018	51 /61	0.3447
1922293	101711113	A/G	0.333(G)	117	50 /56 /11	0.4054	52 /63	0.3050
1997502	101715607	C/T	0.350(T)	123	53 /54 /16	0.7012	66 /55	0.3173
955754	101720439	C/T	0.161(C)	90	4 /21 /65	0.1944	24 /19	0.4458

Tabelle 11: Genotypisierungsergebnisse der 19 biallelischen SNPs aus dem *IL1RL2* Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests

5.2.4. Analyse von SNPs im *IL1RL1* Gen

Das Genprodukt von *IL1RL1* wird bei Asthmaanfällen in erhöhtem Maße exprimiert und spielt eine Rolle bei der T_H2 -vermittelten Immunantwort²⁸⁰. *IL1RL1* liegt im IL1-Cluster zwischen den Genen *IL1RL2* und *IL18R1* und umspannt einen genomischen Bereich von ca. 21 kb und besteht aus 11 Exons^{238;281}. Zu Beginn der Experimente waren 9 SNPs bekannt, (s.**Abbildung 19**), von denen sieben als polymorph bestätigt und anschließend genotypisiert wurden. Es gab weder im Paternitätstest noch im Hardy-Weinberg-Test Auffälligkeiten, die auf eine fehlerhafte Genotypisierung hingedeutet hätten. Die nachfolgend durchgeführte statistische Analyse zeigte bei keinem der genotypisierten SNPs eine signifikante Assoziation mit Asthma.

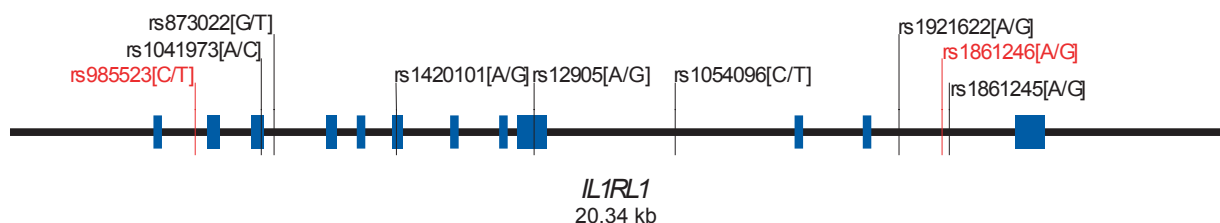


Abbildung 19: Schematische Darstellung des *IL1RL1* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden.

SNP	Position	Typ	selteneres Allel	vollständige Familien	Genotypverteilung	P_{HWE}	T/U	P_{TDT}
1041973	101826826	A/C	0.210(A)	100	5 /32 /63	0.7221	25 /30	0.5002
873022	101827041	G/T	0.276(T)	123	62 /54 /7	0.2796	51 /59	0.4456
1420101	101829074	A/G	0.378(A)	78	9 /41 /28	0.2990	36 /35	0.9055
12905	101831365	A/G	0.274(A)	124	7 /54 /63	0.2946	60 /49	0.2921
1054096	101833708	C/T	0.087(C)	126	2 /18 /106	0.2451	17 /18	0.8658
1921622	101837425	A/G	0.471(A)	122	25 /65 /32	0.4454	77 /68	0.4548
1861245	101838264	A/G	0.270(A)	115	7 /48 /60	0.5206	57 /61	0.7127

Tabelle 12: Genotypisierungsergebnisse der 7 biallelischen SNPs aus dem *IL1RL1* Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-EquilibriumVerhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests

5.2.5. Analyse von SNPs im *IL18R1* Gen

Das hinsichtlich der Funktion dem *IL1R1* ähnliche *IL18R1* erstreckt sich über einen Bereich von ca. 45 kb zwischen 101,84 Mb bis 101,89 Mb im IL1-Cluster¹³³. Es setzt sich aus 10 Exons zusammen und wird in Richtung Telomer transkribiert. Zwar ist *IL18R1* selbst noch in keiner Assoziationsstudie untersucht worden, dafür wurde *IL18* allerdings als Kandidatengen für Asthma in Betracht gezogen²⁸².

Nach Datenbankrecherchen war es möglich, 17 SNPs in diesem Bereich zu bestimmen (vgl. **Abbildung 20**), von denen 14 SNPs nach erfolgter Validierung einzelgenotypisiert wurden (vgl. **Tabelle 13**).

Genotypisierungsfehler konnten durch einen Paternitätstest und einen Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ausgeschlossen werden. Die statistische Auswertung ergab keine signifikante Assoziation mit den analysierten SNPs.

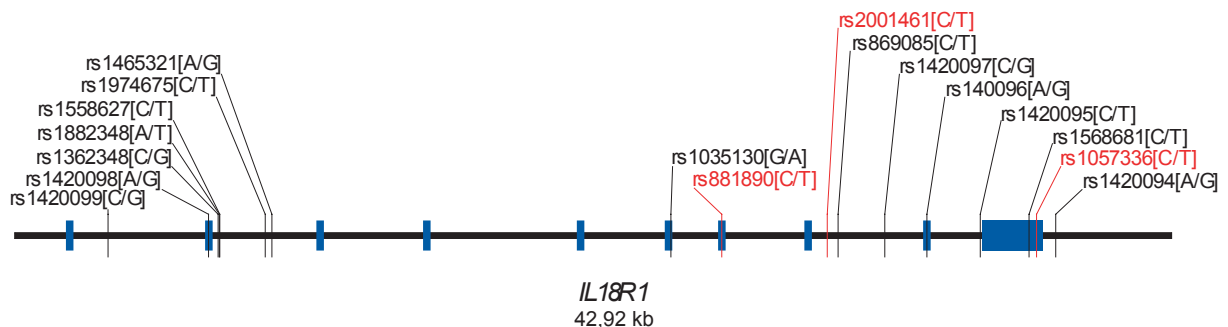


Abbildung 20: Schematische Darstellung des *IL18R1* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden.

SNP	Position	Typ	selteneres Allel	vollständige Familien	Genotypverteilung	P_{HWE}	T/U	P_{TDT}
1420099	101851901	C/G	0.386(C)	110	15 /55 /40	0.5678	43 /53	0.3074
1420098	101855637	A/G	0.335(G)	91	40 /41 /10	0.9166	38 /46	0.3827
1362348	101855982	C/G	0.359(C)	124	14 /61 /49	0.4420	48 /55	0.4904
1882348	101856029	A/T	0.354(T)	123	50 /59 /14	0.5851	58 /67	0.4208
1558627	101856042	C/T	0.282(C)	124	8 /54 /62	0.4049	52 /54	0.8460
1974675	101857733	C/T	0.351(T)	121	49 /59 /13	0.4419	52 /45	0.4772
1465321	101857976	A/G	0.282(A)	124	8 /54 /62	0.4049	52 /54	0.8460
1035130	101872760	A/G	0.272(A)	123	7 /53 /63	0.3339	57 /48	0.3798
869085	101878980	A/G	0.282(A)	124	8 /54 /62	0.4049	53 /55	0.8474
1420097	101880712	C/G	0.437(C)	126	21 /68 /37	0.2760	53 /58	0.6351
1420096	101882270	A/G	0.465(A)	100	20 /53 /27	0.5143	44 /46	0.8330
1420095	101884260	C/T	0.097(C)	118	0 /23 /95	0.2408	18 /21	0.6310
1568681	101886054	C/T	0.276(C)	116	7 /50 /59	0.3956	51 /51	1.0000
1420094	101887045	A/G	0.436(A)	125	21 /67 /37	0.3151	52 /57	0.6320

Tabelle 13: Genotypisierungsergebnisse der 14 biallelischen SNPs aus dem *IL18R1* Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests

5.2.6. Analyse von SNPs im *IL18RAP* Gen

IL18RAP ist unmittelbar neben *IL18R1* lokalisiert und codiert damit das am weitesten vom Zentromer entfernte IL1-Rezeptor-Homologe. Es umspannt eine Region von ca. 40 kb und besteht aus einem codierenden Bereich von 10 Exons, der in Richtung Telomer transkribiert wird¹³⁴.

In öffentlichen Datenbanken wurden innerhalb dieses Gens 15 SNPs identifiziert, von denen 10 der Einzelgenotypisierung zugeführt wurden. Die Genotypisierungskontrolle, mittels Paternitäts- (nicht gezeigt) und HWE-Test (s. **Tabelle 14**) durchgeführt, zeigte keine signifikanten Fehler an. Die im Weiteren durchgeführte statistische Auswertung ergab keine signifikanten p-Werte, die eine Assoziation eines SNPs aus diesem Gen mit Asthma angezeigt hätten.

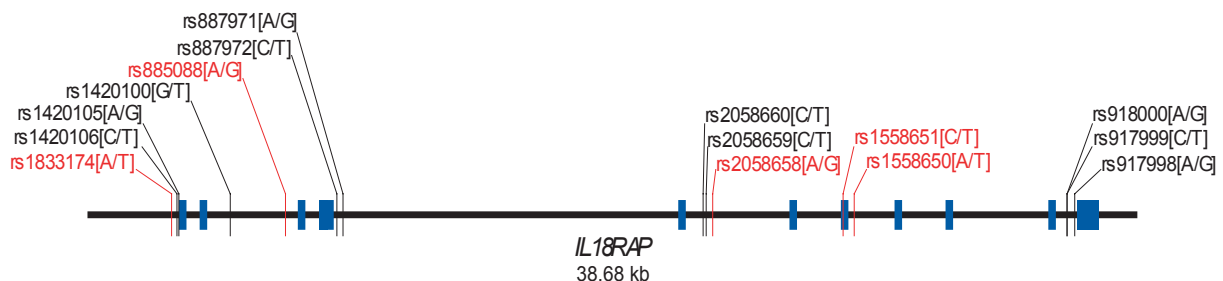


Abbildung 21: Schematische Darstellung des *IL18RAP* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden.

SNP	Position	Typ	selteneres Allel	vollständige Familien	Genotypverteilung	P_{HWE}	T/U	P_{TDT}
1420106	101906402	C/T	0.273(T)	119	61 /51 /7	0.3863	51 /53	0.8445
1420105	101906477	A/G	0.438(G)	120	37 /61 /22	0.7193	54 /49	0.6222
1420100	101908360	G/T	0.447(T)	123	35 /66 /22	0.3442	58 /50	0.4414
887972	101912303	C/T	0.295(T)	117	55 /55 /7	0.1583	45 /54	0.3657
887971	101912525	A/G	0.296(G)	115	54 /54 /7	0.1717	45 /52	0.4772
2058660	101925807	C/T	0.282(C)	117	9 /48 /60	0.8883	50 /51	0.9207
2058659	101925914	C/T	0.437(T)	119	38 /58 /23	0.9177	54 /50	0.6949
918000	101939220	A/G	0.264(A)	123	9 /47 /67	0.8482	46 /45	0.9165
917999	101939227	C/T	0.264(T)	123	67 /47 /9	0.8482	45 /46	0.9165
917998	101939514	A/G	0.093(A)	118	0 /22 /96	0.2641	23 /20	0.6473

Tabelle 14: Genotypisierungsergebnisse der 10 biallelischen SNPs aus dem *IL18RAP* Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests

5.2.7. Analyse von SNPs im *IL1A* Gen

IL1A ist ein viel diskutiertes Kandidatengen sowohl im Zusammenhang mit Asthma und assoziierten Phänotypen²⁸³ als auch mit anderen komplexen inflammatorischen Erkrankungen²⁸⁴. Es codiert das Cytokin IL-1 α . *IL1A* liegt ebenso wie die nachfolgend beschriebenen IL1-homologen Liganden zwischen 114,6 und 115,8 Mb als Cluster vor und wird in Richtung Zentromer transkribiert. Es besteht aus 7 Exons und umfasst einen ca. 12 kb großen Bereich¹³².

Zu Beginn der durchgeführten experimentellen Arbeiten wurden 8 SNPs in öffentlichen Datenbanken identifiziert (vgl. **Abbildung 22**) und in genomischen Pools validiert.

Anschließend konnten 4 SNPs in der Trio-Auswahl genotypisiert werden (vgl. **Tabelle 15**). Weder HWE- noch Paternitätstest ließen vermuten, dass Fehler bei der Genotypisierung vorlagen. Der nachfolgende TDT-Test zeigte für den SNP rs 1609682 eine schwache Assoziation ($p = 0,0322$) mit Asthma.

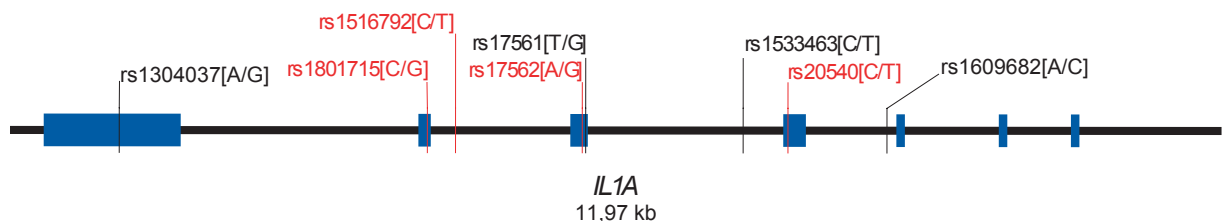


Abbildung 22: Schematische Darstellung des *IL1A* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden.

SNP	Position	Typ	selteneres Allel	vollständige Familien	Genotypverteilung	P_{HWE}	T/U	P_{TDT}
1304037	114680207	A/G	0.291(G)	122	65 /43 /14	0.1073	53 /53	1.0000
17561	114684824	G/T	0.297(T)	101	54 /34 /13	0.0513	43 /39	0.6587
1533463	114685554	C/T	0.325(C)	103	14 /39 /50	0.1634	36 /48	0.1904
1609682	114686977	A/C	0.368(C)	76	32 /32 /12	0.4064	40 /23	0.0322

Tabelle 15: Genotypisierungsergebnisse der 4 biallelischen SNPs aus dem *IL1A* Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests

5.2.8. Analyse von SNPs im *IL1B* Gen

IL1B wird in Richtung Zentromer transkribiert und besteht aus 7 Exons¹³². Sein Genprodukt nimmt eine bedeutende Rolle bei pro-inflammatorischen Prozessen wahr und ist ein mehrfach untersuchtes Kandidatengen in diesem Bereich²⁸⁵⁻²⁸⁷. Es wurden 21 SNPs identifiziert (vgl. **Abbildung 23**) und davon 6 als polymorph bestätigt. Die Genotypisierung zeigte weder Fehler im Paternitätstest, noch Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht an. Die statistische Analyse wies für den SNP rs1143623 ($P = 0,0227$) eine schwach signifikante Assoziation auf.

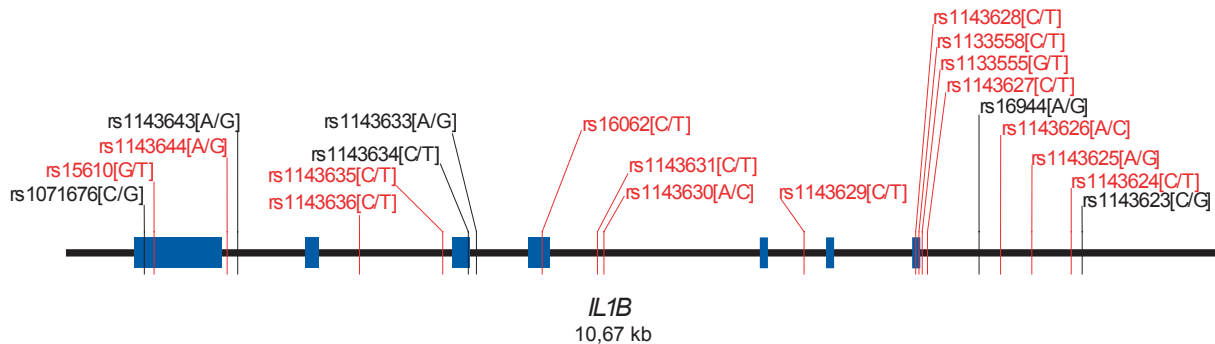


Abbildung 23: Schematische Darstellung des *IL1B* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden.

SNP	Position	Typ	selteneres Allel	vollständige Familien	Genotypverteilung	P_{HWE}	T/U	P_{TDT}
1071676	114767801	C/G	0.233(C)	116	9 /36 /71	0.1580	42 /38	0.6547
1143643	114768670	A/G	0.332(A)	98	12 /41 /45	0.5776	47 /41	0.5224
1143634	114770758	C/T	0.225(T)	102	64 /30 /8	0.1107	30 /38	0.3320
1143633	114770835	A/G	0.353(A)	126	19 /51 /56	0.2003	55 /56	0.9244
16944	114775235	A/G	0.368(A)	125	19 /54 /52	0.4255	43 /57	0.1615
1143623	114776197	C/G	0.302(C)	126	13 /50 /63	0.5149	32 /53	0.0227

Tabelle 16: Genotypisierungsergebnisse der 6 biallelischen SNPs aus dem *IL1B* Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests

5.2.9. Analyse von SNPs im *IL1F6* Gen

*IL1F6*²⁸⁸ wird entgegengesetzt zu *IL1A* und *IL1B* in Richtung des Telomers transkribiert. Das Gen ist ein erst kürzlich identifiziertes IL1-Homolog, dessen Funktion und Aufbau zwar noch unbekannt sind, von dem man jedoch annimmt, dass es sich aus 3, vielleicht sogar auch aus 4 Exons zusammensetzt¹³². In diesem Fall konnten von 6 in öffentlichen Datenbanken gefundenen SNPs 5 validiert und genotypisiert werden. Die Auswertung nach der Genotypisierung zeigte keine Fehler bei der Überprüfung der Vererbung nach Mendel an, jedoch konnten für die SNPs rs1446511 und rs2305151 starke Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht festgestellt werden, so dass mit Genotypisierungsfehlern gerechnet werden muß. Die statistische Analyse ergab, dass in unserer Studie in diesem Gen kein SNP mit Asthma assoziiert ist.

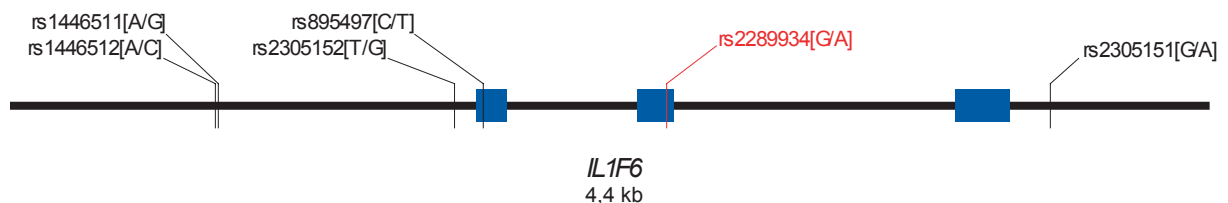


Abbildung 24: Schematische Darstellung des *IL1F6* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden.

SNP	Position	Typ	selteneres Allel	vollständige Familien	Genotypverteilung	P_{HWE}	T/U	P_{TDT}
1446512	114942900	A/C	0.264(A)	121	10 /44 /67	0.4725	43 /43	1.0000
1446511	114942911	A/G	0.463(G)	122	15 /101 /6	0.0000	111 /109	0.8927
2305152	114943831	G/T	0.363(G)	120	15 /57 /48	0.7614	43 /61	0.0776
895497	114943943	C/T	0.245(T)	110	63 /40 /7	0.8478	36 /41	0.5688
2305151	114946148	A/G	0.474(G)	116	12 /98 /6	0.0000	110 /106	0.7855

Tabelle 17: Genotypisierungsergebnisse der 5 biallelischen SNPs aus dem *IL1F6* Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests

5.2.10. Analyse von SNPs im *IL1F8* Gen

Das aus 7 Exons bestehende Gen *IL1F8*²⁸⁸ wird in entgegengesetzter Richtung zu *IL1F6* transkribiert. Für dieses Gen ist noch keine Funktion und damit auch nichts über eine potentielle Rolle bei der Entwicklung von Asthma bekannt¹³². Im Gen wurden von 8 recherchierten SNPs (vgl. **Abbildung 25**) 5 als polymorph identifiziert und genotypisiert (vgl. **Tabelle 18**). Nach Überprüfung auf Genotypisierungsfehler zeigte die Auswertung mittels TDT-Tests keine signifikanten Assoziationswerte.

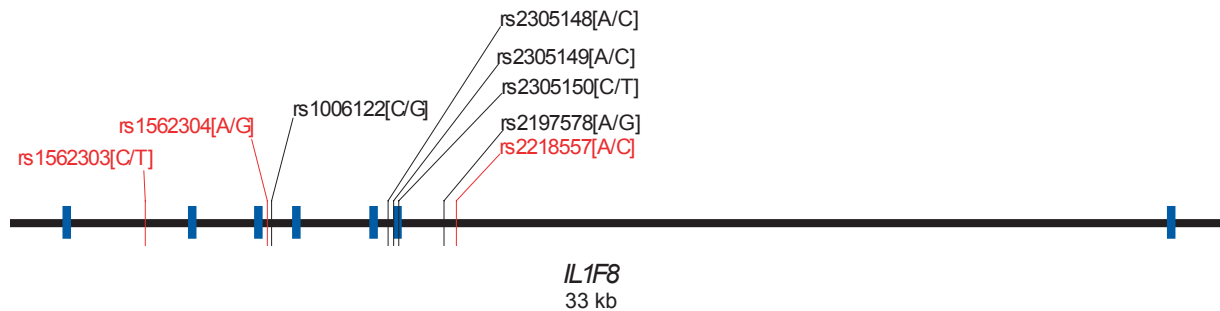


Abbildung 25: Schematische Darstellung des *IL1F8* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden.

SNP	Position	Typ	selteneres Allel	vollständige Familien	Genotypverteilung	P_{HWE}	T/U	P_{TDT}
1006122	114966210	C/G	0.267(C)	120	10 /44 /66	0.4936	42 /43	0.9136
2305148	114969385	A/C	0.106(A)	108	1 /21 /86	0.8204	32 /23	0.2249
2305149	114969537	A/C	0.132(A)	91	0 /24 /67	0.1473	21 /17	0.5164
2305150	114969684	C/T	0.391(C)	96	13 /49 /34	0.4797	52 /41	0.2540
2197578	114970921	A/G	0.300(G)	120	59 /50 /11	0.9307	51 /50	0.9207

Tabelle 18: Genotypisierungsergebnisse der 5 biallelischen SNPs aus dem *IL1F8* Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests

5.2.11. Analyse von SNPs im *IL1F5* Gen

*IL1F5*²⁸⁸ wird Richtung Telomer transkribiert und ist im Gegensatz zu mehreren kürzlich identifizierten IL1-homologen Cytokinen hinsichtlich seiner Funktion

wahrscheinlich bereits identifiziert. Sein Genprodukt nimmt danach ähnliche inhibitorische Aufgaben wie IL-1ra hinsichtlich der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B wahr¹³².

Es konnten von 48 DNA-Variationen, die in öffentlichen Datenbanken verfügbar waren, 34 als polymorph bestätigt und einzelgenotypisiert werden. Im Anschluss konnten weder durch den Paternitäts- noch durch den Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht Fehler in der Bestimmung der Genotypen festgestellt werden. Es konnte keine signifikante Assoziation eines SNPs mit Asthma gefunden werden.

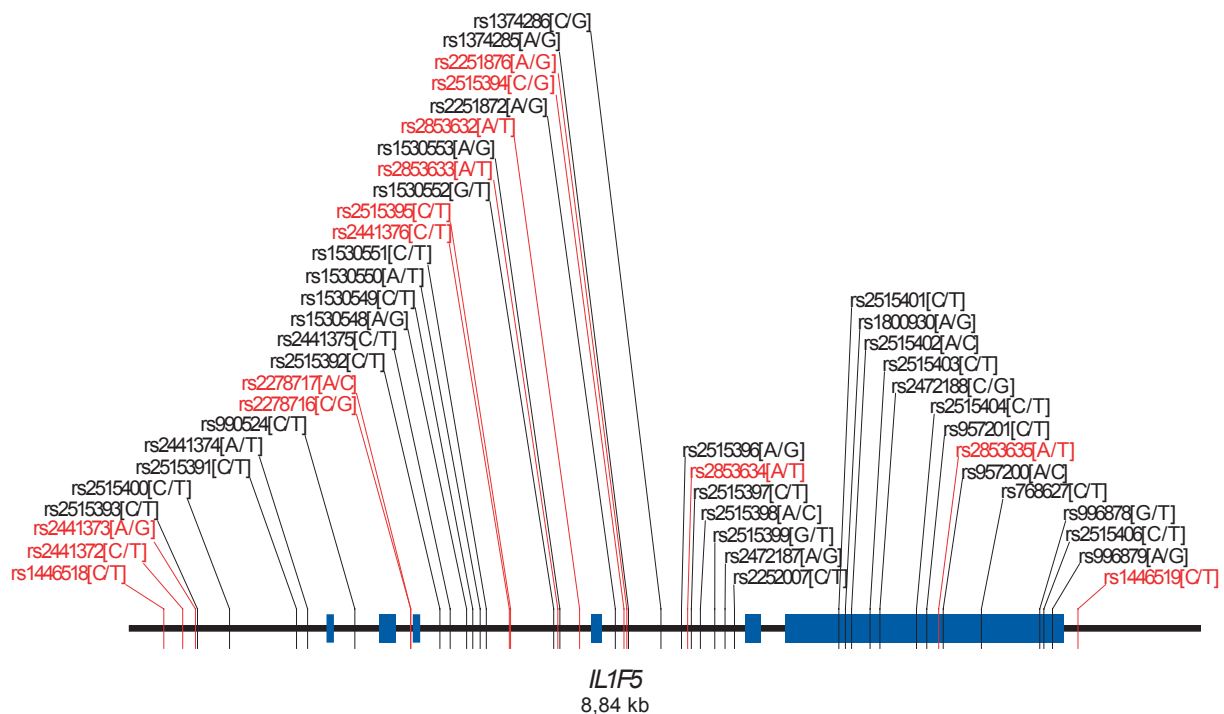


Abbildung 26: Schematische Darstellung des *IL1F5* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden.

SNP	Position	Typ	selteneres Allel	vollständige Familien	Genotypverteilung	P_{HWE}	T/U	P_{TDT}
2515393	114995550	C/T	0.193(T)	122	80 /37 /5	0.7829	33 /37	0.6326
2515400	114995815	C/T	0.308(C)	125	14 /49 /62	0.3687	49 /53	0.6921
2515391	114996365	C/T	0.387(C)	119	20 /52 /47	0.3911	47 /58	0.2831
2441374	114996458	A/T	0.302(T)	111	56 /43 /12	0.3947	47 /44	0.7532
990524	114996849	C/T	0.324(C)	102	13 /40 /49	0.2932	39 /45	0.5127
2515392	114997549	C/T	0.390(C)	123	21 /54 /48	0.3901	50 /59	0.3887
2441375	114997636	C/T	0.367(T)	98	39 /46 /13	0.9223	44 /40	0.6625
1530548	114997770	A/G	0.374(G)	107	43 /48 /16	0.6655	49 /44	0.6041
1530549	114997823	C/T	0.092(C)	114	0 /21 /93	0.2787	24 /14	0.1048
1530550	114997881	A/T	0.391(T)	110	41 /52 /17	0.9391	54 /44	0.3124
1530551	114997934	C/T	0.386(T)	114	44 /52 /18	0.6876	54 /48	0.5525
1530552	114998488	G/T	0.391(G)	110	17 /52 /41	0.9391	44 /54	0.3124
1530553	114998539	A/G	0.382(G)	110	43 /50 /17	0.6971	51 /46	0.6117
2251872	114999000	A/G	0.371(G)	101	41 /45 /15	0.6463	47 /42	0.5961
1374285	114999106	A/G	0.414(G)	87	30 /42 /15	0.9635	44 /35	0.3113

SNP	Position	Typ	selteneres Allel	vollständige Familien	Genotypverteilung	P_{HWE}	T/U	P_{TDT}
1374286	114999375	C/G	0.371(C)	105	15 /48 /42	0.8298	45 /49	0.6799
2515396	114999543	A/G	0.380(G)	121	48 /54 /19	0.5596	58 /50	0.4414
2515397	114999626	C/T	0.378(T)	119	48 /52 /19	0.4395	57 /48	0.3798
2515398	114999702	A/C	0.395(A)	119	20 /54 /45	0.5815	48 /59	0.2876
2515399	114999819	G/T	0.378(G)	111	19 /46 /46	0.2098	50 /55	0.6256
2472187	114999904	A/G	0.380(A)	121	19 /54 /48	0.5596	49 /59	0.3359
2252007	114999982	C/T	0.376(T)	105	41 /49 /15	0.9534	50 /42	0.4042
2515401	115000844	C/T	0.390(T)	123	48 /54 /21	0.3901	61 /52	0.3972
1800930	115000898	A/G	0.373(A)	106	17 /45 /44	0.3434	45 /49	0.6799
2515402	115000948	A/C	0.390(C)	123	48 /54 /21	0.3901	61 /52	0.3972
2515403	115001100	C/T	0.389(T)	126	50 /54 /22	0.2697	61 /54	0.5139
2472188	115001182	C/G	0.389(C)	122	21 /53 /48	0.3399	52 /60	0.4497
2515404	115001485	C/T	0.301(C)	123	13 /48 /62	0.4228	51 /52	0.9215
957201	115001568	C/T	0.403(T)	118	43 /55 /20	0.7365	53 /49	0.6921
957200	115001704	A/C	0.126(A)	119	1 /28 /90	0.4586	16 /18	0.7316
768627	115002021	C/T	0.399(T)	124	47 /55 /22	0.4016	62 /54	0.4576
996878	115002503	G/T	0.091(T)	110	90 /20 /0	0.2943	13 /22	0.1282
2515406	115002536	C/T	0.103(T)	126	101 /24 /1	0.7425	18 /27	0.1797
996879	115002609	A/G	0.107(A)	121	1 /24 /96	0.7069	25 /18	0.2858

Tabelle 19: Genotypisierungsergebnisse der 34 biallelischen SNPs aus dem *IL1F5* Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium-Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests

5.2.12. Analyse von SNPs im *IL1RN* Gen

IL1RN, das aus 7 Exons besteht, wird, ausgehend von 2 Promotoren²⁸⁹⁻²⁹¹, in Richtung Telomer transkribiert, wobei vier alternative Splice-Produkte entstehen können²⁹¹⁻²⁹³. *IL1RN* wird als mögliches krankheitsauslösendes Gen neben Asthma auch bei einer Reihe anderer Krankheiten in Betracht gezogen^{143;172;294-298}.

Für *IL1RN* wurden 34 SNPs in öffentlichen Datenbanken gefunden, von denen 22 biallelisch vorlagen. Nach der sich anschließenden Genotypisierung konnten bei der Überprüfung der Vererbung nach den Mendel'schen Vererbungsgesetzen keine signifikanten Fehler gefunden werden. Allerdings zeigte der Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, dass drei SNPs nicht im Gleichgewicht lagen (rs928940 rs1794066 rs380092) (vgl. **Tabelle 20**). Die weitere statistische Analyse ergab, dass neun SNPs aus dem *IL1RN* Gen signifikant mit Asthma assoziiert waren (vgl. **Tabelle 20**).

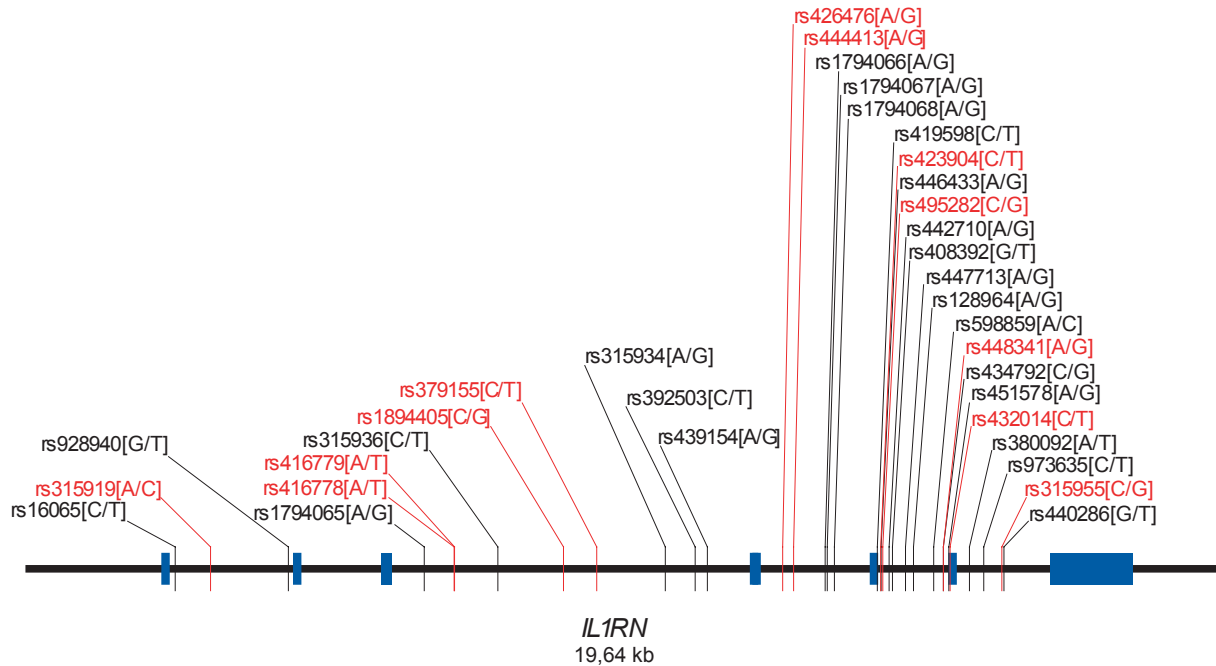


Abbildung 27: Schematische Darstellung des *IL1RN* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden.

SNP	Position	Typ	selteneres Allel	vollständige Familien	Genotypverteilung	P_{HWE}	T/U	P_{TDT}
16065	115055524	C/T	0.328(C)	116	14 /48 /54	0.5131	32 /50	0.0468
928940	115057389	G/T	0.157(G)	121	6 /26 /89	0.0383	26 /34	0.3017
1794065	115059621	A/G	0.328(A)	119	14 /50 /55	0.6122	35 /53	0.0550
315936	115060835	C/T	0.308(T)	107	51 /46 /10	0.9359	44 /29	0.0792
315934	115063594	A/G	0.161(G)	118	83 /32 /3	0.9678	33 /36	0.7180
392503	115064083	C/T	0.385(C)	113	17 /53 /43	0.9195	25 /48	0.0071
439154	115064289	A/G	0.479(A)	121	29 /58 /34	0.6625	45 /70	0.0197
1794066	115066238	A/G	0.229(A)	118	2 /50 /66	0.0293	46 /54	0.4237
1794067	115066272	A/G	0.335(A)	106	13 /45 /48	0.6281	23 /38	0.0548
1794068	115066391	A/G	0.322(A)	118	14 /48 /56	0.4573	35 /51	0.0845
419598	115067095	C/T	0.329(C)	120	14 /51 /55	0.6799	35 /54	0.0440
446433	115067161	A/G	0.329(A)	120	14 /51 /55	0.6799	35 /54	0.0440
442710	115067287	A/G	0.328(A)	122	14 /52 /56	0.7161	35 /55	0.0350
408392	115067346	G/T	0.332(T)	119	55 /49 /15	0.4350	52 /35	0.0684
447713	115067560	A/G	0.326(G)	121	56 /51 /14	0.6477	54 /35	0.0440
128964	115067691	A/G	0.343(G)	115	51 /49 /15	0.5536	53 /32	0.0227
598859	115068022	A/C	0.258(A)	122	11 /41 /70	0.1754	54 /61	0.5139
434792	115068358	C/G	0.335(G)	121	55 /51 /15	0.5555	54 /36	0.0578
451578	115068445	A/G	0.336(A)	122	15 /52 /55	0.6202	37 /55	0.0606
380092	115068788	A/T	0.335(T)	121	59 /43 /19	0.0262	59 /52	0.5064
973635	115069022	C/T	0.176(T)	125	85 /36 /4	0.9371	44 /33	0.2100
440286	115069357	G/T	0.315(T)	119	53 /57 /9	0.2315	53 /31	0.0164

Tabelle 20: Genotypisierungsergebnisse der 22 biallelischen SNPs aus dem *IL1RN* Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests

5.2.13. Analyse von SNPs in der zu *IL1RN* distalen Region

Um überprüfen zu können, ob die in (5.2.12) beschriebenen Assoziationsergebnisse ursächlich auf SNPs in *IL1RN* zurückzuführen sind, wurden weitere SNPs aus öffentlichen Datenbanken herangezogen, die in dem zu *IL1RN* distal gelegenen Bereich von ca. 140 kb lokalisiert sind. Zur Durchführung dieser Experimente wurden jeweils in einem Abstand von 15 kb SNPs ausgewählt, die zum einen intergenisch und zum anderen in den Nicht-Cytokingenen TIC (Sec 7 homolog) und PAX8 lagen, so dass auf diese Weise weitere 26 SNPs ausgesucht wurden, die anschließend ebenfalls bestätigt und einzelgenotypisiert wurden.

Von den 26 eingangs ausgewählten SNPs wurden 11 positiv validiert und genotypisiert. Der daraufhin durchgeführte Paternitätstest zeigte keine Fehler, die auf eine inkorrekte Genotypisierung hindeuten würden. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich mit Hilfe des Tests auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bestätigt. Die weitere statistische Analyse zeigt, dass zwei der SNPs, die proximal zu *IL1RN* liegen (rs3087271 rs895496) signifikant mit Asthma assoziiert sind. Sämtliche weiter entfernt liegenden SNPs weisen auf keine signifikante Assoziation hin.

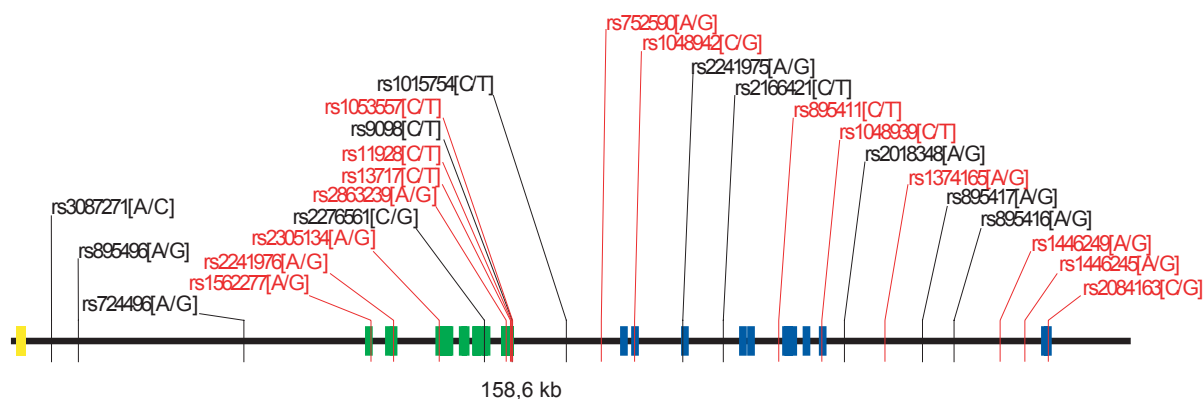


Abbildung 28: Schematische Darstellung der zu *IL1RN* distal gelegenen Genregion: Gelbe Boxen markieren exonische Bereiche von *IL1RN*. Grüne Boxen markieren exonische Bereiche des Gens *TIC*. Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens *PAX8*. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nichtpolymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die im Pool polymorph waren und in Einzelprobanden genotypisiert werden konnten.

SNP	Position	Typ	selteneres Allel	vollständige Familien	Genotypverteilung	P_{HWE}	T/U	P_{TDT}
3087271	115075088	A/C	0.313(C)	120	55 /55 /10	0.4652	54 /34	0.0330
895496	115078908	A/G	0.312(A)	77	10 /28 /39	0.1808	52 /31	0.0212
724496	115102387	A/G	0.321(A)	120	8 /61 /51	0.0683	47 /53	0.5485
2276561	115136482	C/G	0.475(G)	121	37 /53 /31	0.1803	61 /48	0.2131
9098	115140416	C/T	0.067(T)	119	103 /16 /0	0.4317	15 /13	0.7055
1015754	115148101	C/T	0.324(T)	88	40 /39 /9	0.9108	29 /41	0.1515
2241975	115164614	A/G	0.072(A)	118	1 /15 /102	0.5934	15 /14	0.8527
2166421	115170353	A/G	0.234(G)	122	72 /43 /7	0.8626	37 /53	0.0917

SNP	Position	Typ	selteneres Allel	vollständige Familien	Genotypverteilung	P_{HWE}	T/U	P_{TDT}
2018348	115187631	A/G	0.238(G)	122	71 /44 /7	0.9575	43 /59	0.1131
895417	115198700	A/G	0.269(A)	121	7 /51 /63	0.4236	55 /49	0.5563
895416	115203189	A/G	0.267(A)	120	7 /50 /63	0.4741	55 /48	0.4904

Tabelle 21: Genotypisierungsergebnisse der 11 biallelischen SNPs aus der zu *IL1RN* distal gelegenen Region(von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests

5.3. Analyse exonischer Bereiche von *IL1RN*

Die statistische Analyse der Daten der im IL1-Cluster gelegenen SNPs zeigte, dass hauptsächlich solche aus dem *IL1RN* Gen mit Asthma assoziiert sind.

Es konnte allerdings keine funktionelle Mutation in *IL1RN* gefunden werden. Aus diesem Grund wurde der gesamte codierende Bereich des Gens resequenziert, sowohl um die mögliche kausale Mutation, die zur Krankheitsentwicklung beisteuert, zu identifizieren, als auch um ausschließen zu können, dass eine DNA-Variante, die nicht in den Datenbanken aufgeführt war, übersehen wurde.

Zu diesem Zweck wurden die Exons von *IL1RN* jeweils mittels PCR amplifiziert und anschließend mit einem in der PCR verwendeten Primer (vgl. **Tabelle 30**) sequenziert. Die Amplifikationsprodukte wurden so gewählt, dass mindestens 50 bp der jeweiligen intronischen Sequenz mitsequenziert wurden, um SNPs detektieren zu können, die innerhalb der Exon-Intron-Grenzen lokalisiert sind. In diesem Zusammenhang konnte für die Exons icI, icII, icIII, 1 bzw. 1i, 2, 3 jeweils ein die Exon-Intron-Grenzen überlappendes PCR-Produkt generiert werden. Diese Vorgehensweise war für das ca. 1,4 kb große Exon 4 aufgrund dessen Größe nicht möglich, so dass dieses mit Hilfe dreier überlappender Amplikons vervielfältigt und sequenziert werden musste.

Die detektierten Chromatogramme wurden anschließend anhand eines Sequenzanalysesoftwarepaketes (s. 3.2.3) untersucht. Zu diesem Zweck wurden zunächst die Chromatogramme mit Hilfe der Software „phred“ den entsprechenden Basen zugeordnet (Base-Calling). Anschließend waren diese Chromatogramme mit dem Programm „phrap“ zu einem sogenannten Alignment zu ordnen. Die mit dieser Vorgehensweise gefundenen Polymorphismen wurden daraufhin mittels „polyphred“ markiert. Die Darstellung erfolgte mittels des „consed“-Editors²⁹⁹. Die Amplifikationsreaktionen wurden mit DNA von jeweils 24 zufällig ausgewählten Probanden der KORA S 2000 Studie und der deutschen Asthmafamilienstudie durchgeführt. Aufgrund dieses Ansatzes konnten 28 zusätzliche SNPs gefunden werden, von denen 16 bereits während dieser Experimente in die öffentlichen Datenbanken eingetragen worden waren (vgl. **Tabelle 22**). Nach eingehender Analyse dieser DNA-Variationen wurden 8 SNPs ausgewählt und in der deutschen Asthmafamilienstudie genotypisiert.

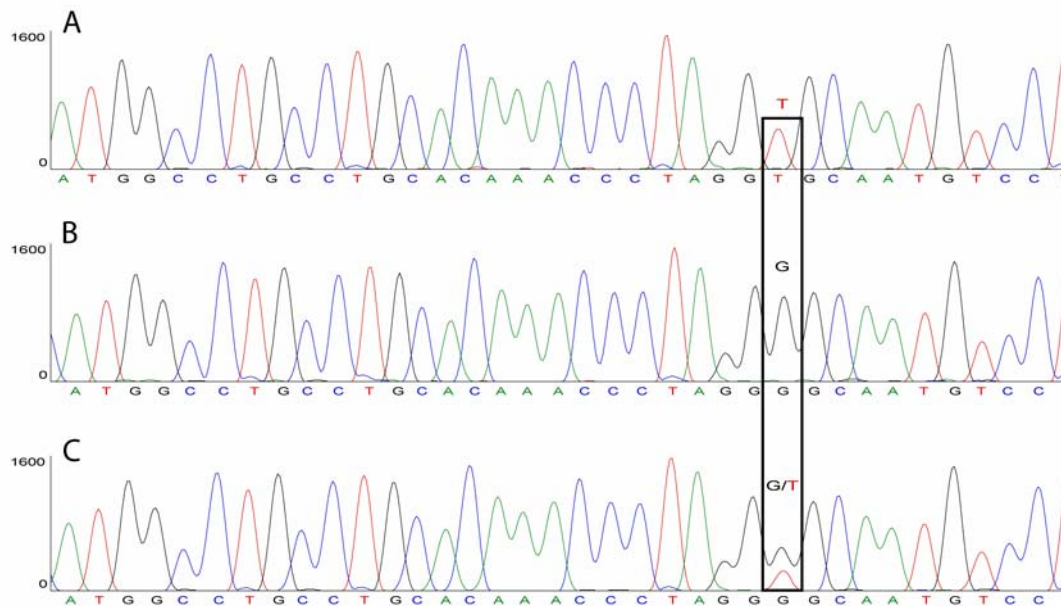


Abbildung 29: Beispielhafter Ausschnitt dreier Chromatogramme der Resequenzierung des Exons 2 von *IL1RN*: Die schwarz markierte Box kennzeichnet den Bereich, in welchem der SNP rs 22232354 [G/T] detektiert wurde. A zeigt den homozygoten Zustand, d.h., es konnte nur ein T (rot) detektiert werden. B zeigt den anderen homozygoten Zustand, d.h., es konnte nur ein G (schwarz) detektiert werden. C zeigt den heterozygoten Zustand, d.h., es konnten sowohl G (schwarz) als auch für das T (rot) detektiert werden.

interne Nr.	rs Nr.	Position[bp]	Genelement	Art der Variation*	Motif	Sequenzierung Allelfrequenz (%)	Einzelgenotypisierung (deutsch)		Einzelgenotypisierung (italienisch)	
							Allelfreq. (%)	p TDT	Allelfreq. (%)	p TDT
icl_1		115.055.318	Intron	G/A		0.25				
icl_2	2234677	115.055.399	UTR	G/A		0.25				
icl_3		115.055.403	UTR	G/A		0.02				
icl_4	2234678	115.055.455	UTR	G/A	5C/3D	0.25	0.34	0.0116	0.24	0.0348
icl_5	2234679	115.055.476	UTR	G/C	5C/3D+5B/3A	0.25				
icl_6	16065	115.055.523	Intron	T/C		0.24	0.33	0.0468		
icl_7		115.055.647	Intron	C/G		0.24				
icl_8		115.055.667	Intron	A/G		0.24				
	928940	115.057.389	Intron	G/T			0.16	NS		
icll_1		115.057.432	Intron	G/C		0.16				
icll_2	878972	115.057.605	Intron	A/C			0.32	0.0550	0.244	0.0436
icll_3		115.057.842	Intron	T/C	NIT2/Pbx-2	0.01				
icll_4		115.057.845	Intron	G/C	NIT2/Pbx-2	0.01				
iclll_1		115.059.192	Intron	G/A		0.12	0.16	NS	0.096	NS
	1794065	115.059.621	Intron	A/G			0.33	0.0550		
	315936	115.060.835	Intron	C/T	AP-4		0.31	0.0792	0.311	NS
	315934	115.063.594	Intron	A/G			0.16	NS		
	392503	115.064.083	Intron	C/T			0.39	0.0071	0.311	NS
	439154	115.064.289	Intron	A/G			0.48	0.0197	0.375	NS
	1794066	115.066.238	Intron	A/G			0.23	NS		
	1794067	115.066.272	Intron	A/G			0.34	0.055		
	1794068	115.066.391	Intron	A/G	GCR1/Pu.1		0.32	0.085		
2_1	419598	115.067.099	Exon	C/T	5A/3G	0.26	0.33	0.0440	0.26	0.0662
2_2	423904	115.067.154	Intron	C/T		0.26				
2_3	446433	115.067.165	Intron	G/A		0.26	0.33	0.0440	0.26	0.662
2_4	495282	115.067.186	Intron	G/C		0.26				
2_5		115.067.219	Intron	A/G		0.26				
2_6	2232354	115.067.227	Intron	T/G		0.33				
2_7	495410	115.067.230	Intron	C/A		0.26				
	442710	115.067.287	Intron	A/G			0.33	0.0350	0.26	0.0719
	408392	115.067.346	Intron	G/T			0.33	0.0684		
	447713	115.067.560	Intron	A/G			0.33	0.0440	0.25	0.0391
	128964	115.067.691	Intron	A/G			0.34	0.0227	0.29	NS
In2 Rp		115.068.005	Intron					0.0560		NS
	598859	115.068.022	Intron	A/C			0.26	NS		
3_1	432014	115.068.299	Intron	T/C		0.30				
	434792	115.068.358	Intron	C/G			0.34	0.0578	0.30	NS
	451578	115.068.445	Intron	A/G			0.34	0.0606		
3_3	454078	115.068.513	Intron	T/A	HSF	0.30	0.36	0.0063	0.27	NS
	380092	115.068.788	Intron	A/T			0.34	NS		
	973635	115.069.022	Intron	C/T			0.18	NS		
	440286	115.069.357	Intron	G/T			0.32	0.0164	0.26	NS
4_21	315952	115.070.024	Exon	T/C			0.30	NS	0.24	NS
4_11	315951	115.070.306	UTR	G/C	3C	0.39	0.31	NS	0.25	NS
4_22		115.070.330	UTR	T/C		0.07				
4_3		115.070.458	UTR	T/C		0.02				
4_12		115.071.010	UTR	G/T		0.02				
4_23	9005	115.071.132	UTR	A/G		0.25				
	3087271	115.075.088	intergenic	A/C			0.31	0.0330	0.256	0.0184
	895496	115.078.908	intergenic	A/G			0.31	0.0212	0.470	0.0521

Tabelle 22: Genotypisierungsergebnisse nach Resequenzierung codierender Bereiche aus *IL1RN*: Graue Felder: SNP wurde sowohl in deutscher, als auch italienischer Asthmafamilienstudie (vgl. 5.4) genotypisiert und statistisch untersucht. Dunkelgraue Felder: Auswertung des Intron 2 Repeats bei deutscher und italienischer Studie (vgl. 5.4). Schwarz umrahmte Felder: SNPs, die nach Resequenzierung genotypisiert wurden.

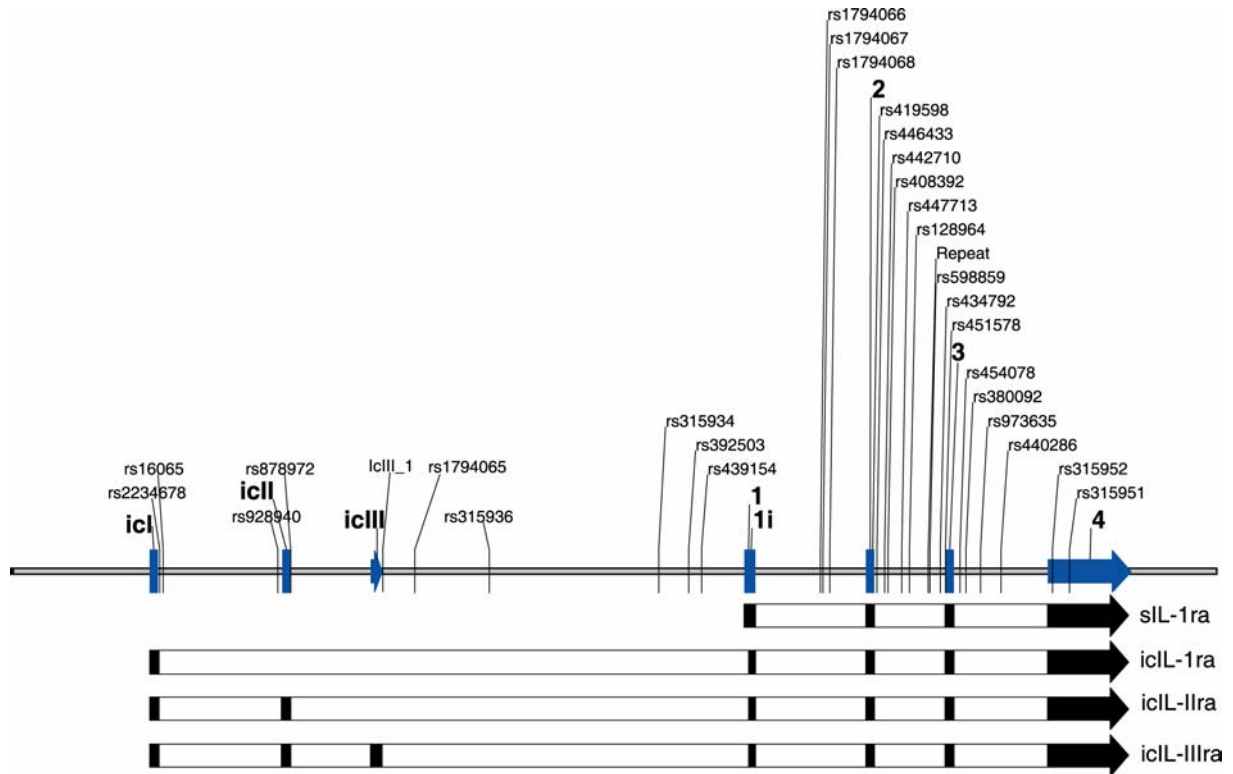


Abbildung 30: Splice-Produkte von *IL1RN* mit allen genotypisierten SNPs und deren relative Position.

5.4. Überprüfung der Assoziationsergebnisse in einer unabhängigen Studie

Die für *IL1RN* erhaltenen Assoziationsergebnisse mussten, um mögliche Fehler z.B. hinsichtlich Probandenauswahl, ausschließen zu können, in einer unabhängigen Studie überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden Teilnehmer einer weiteren kaukasischen Asthmastudie, die in der Umgebung von Verona (Italien) (vgl. 4.2) durchgeführt wurde, als Kontrollgruppe herangezogen. Im Weiteren wurden zur Bestätigung der Ergebnisse in der deutschen Studie die SNPs aus *IL1RN*, die signifikant mit Asthma assoziiert waren, in einer Auswahl von 382 Probanden der italienischen Studie genotypisiert.

SNP	Position	Typ	selteneres Allel	vollständige Familien	Genotypverteilung	P_{HWE}	T/U	P_{TDT}
2234678	115055457	A/G	0.243(G)	101	59 /35 /7	0.5670	31 /50	0.0348
878972	115057605	A/C	0.244(C)	82	48 /28 /6	0.5017	27 /44	0.0436
1	115059193	A/G	0.096(A)	115	1 /20 /94	0.9551	17 /18	0.8658
315936	115060835	C/T	0.311(T)	95	47 /37 /11	0.3781	40 /37	0.7324
392503	115064083	C/T	0.311(C)	66	7 /27 /32	0.7161	28 /22	0.3961
439154	115064289	A/G	0.375(A)	120	18 /54 /48	0.6613	58 /47	0.2831
419598	115067095	C/T	0.257(C)	113	10 /38 /65	0.2073	57 /39	0.0662
446433	115067161	A/G	0.257(A)	113	10 /38 /65	0.2073	57 /39	0.0662
442710	115067287	A/G	0.261(A)	117	11 /39 /67	0.1436	59 /41	0.0719
447713	115067560	A/G	0.248(G)	115	68 /37 /10	0.1418	37 /57	0.0391
128964	115067691	A/G	0.290(G)	105	55 /39 /11	0.3108	41 /45	0.6662
434792	115068358	C/G	0.303(G)	76	38 /30 /8	0.5721	32 /33	0.9013
454078	115068515	A/T	0.274(T)	104	57 /37 /10	0.2804	40 /51	0.2489
440286	115069357	G/T	0.259(T)	116	67 /38 /11	0.1165	39 /54	0.1198
315952	115070027	C/T	0.239(C)	115	10 /35 /70	0.0793	35 /40	0.5637
315951	115070310	C/G	0.253(G)	95	55 /32 /8	0.2926	34 /25	0.2413
3087271	115075088	A/C	0.256(C)	82	46 /30 /6	0.7185	23 /42	0.0184
895496	115078908	A/G	0.470(A)	118	25 /61 /32	0.6834	43 /63	0.0521

Tabelle 23: Genotypisierungsergebnisse der Italienischen Asthmafamilienstudie (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests.

Diese Analyse bestätigt die Ergebnisse der deutschen Studie, auch wenn die SNPs in unterschiedlicher Weise und mit geringerer Signifikanz mit Asthma assoziiert sind (vgl. **Tabelle 22** und **Tabelle 23**).

5.5. Analyse des Intron 2 Repeats aus *IL1RN*

In mehreren früheren Studien wurde gezeigt, dass ein VNTR (Variable Number Tandem Repeat), der im Intron 2 von *IL1RN* liegt³⁰⁰, mit verschiedenen komplexen Erkrankungen assoziiert ist. Im Falle von Lungenkrankheiten wie Asthma und COPD wurde ebenfalls festgestellt, dass dieser Repeat in einigen Studien mit der Krankheit assoziiert ist, jedoch in anderen keine derartige Assoziation zu finden ist^{295;296}.

Aus diesem Grund wurde dieser Intron-Repeat, für den in beiden Studien 4 Allele detektiert werden konnten, sowohl in der deutschen als auch in der italienischen Trio-Auswahl auf Assoziationen getestet (vgl. **Tabelle 22**). Die statistische Analyse zeigt, dass das A2 Allel im Intron 2 in der deutschen Studie mit Asthma assoziiert ist (vgl. **Tabelle 22**), in der italienischen allerdings nicht.

Zusammenfassende statistische Auswertung der Ergebnisse

5.5.1. Linkage Disequilibrium im IL1-Cluster

Die Analyse auf Kopplungsungleichgewicht in der deutschen Asthmafamilienstudie zeigt, dass sämtliche SNPs, die für *IL1RN* genotypisiert wurden, in starkem LD zueinander liegen ($D' > 0,7$) (vgl. **Abbildung 31**: rot markierter Bereich). Die LD-Werte fallen zu den benachbarten Markern hin ab, so dass es unwahrscheinlich ist, dass ein benachbarter Marker aus einem angrenzenden Gen die gefundene Assoziation mit Asthma hervorruft.

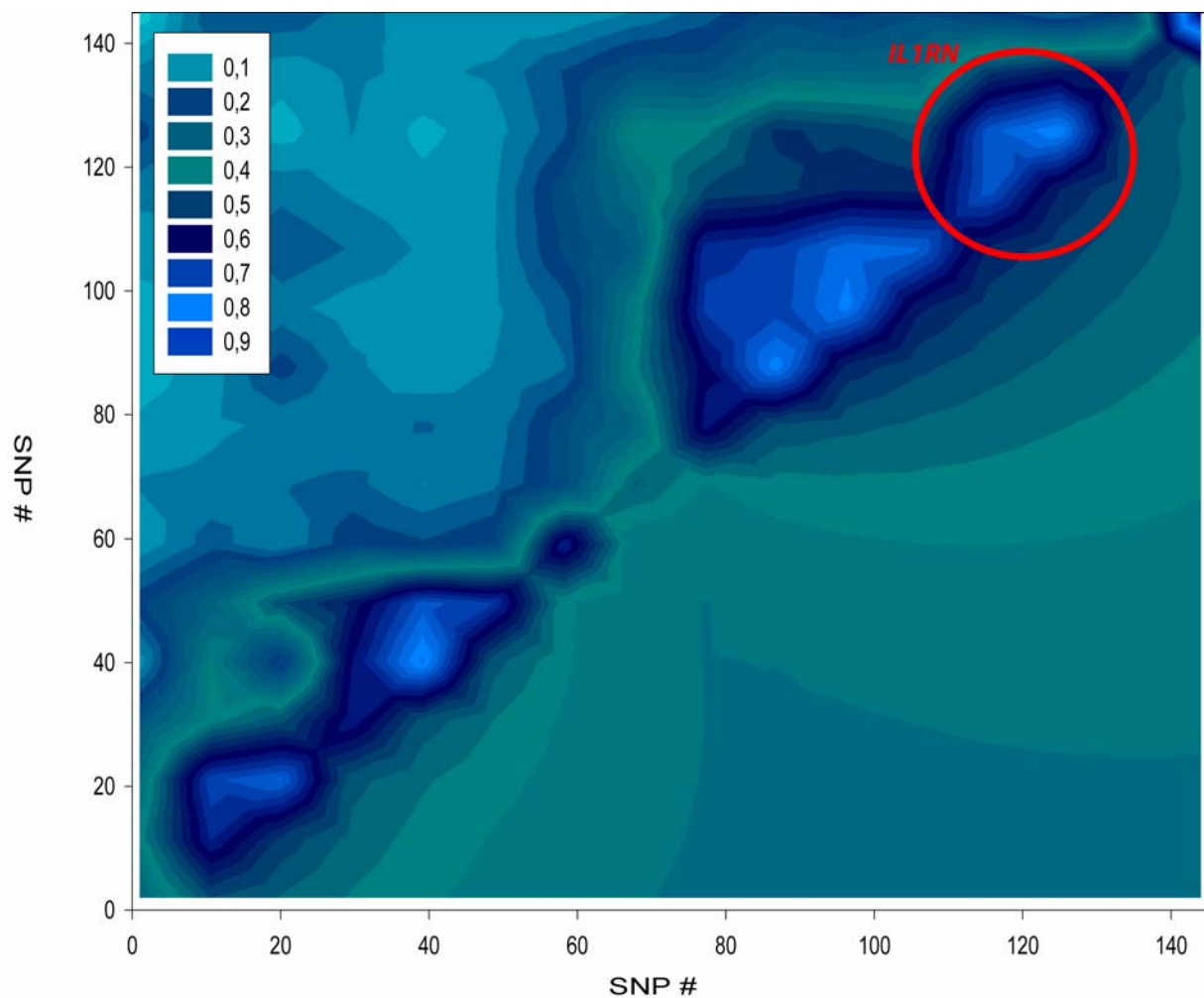


Abbildung 31: LD Karte des IL1-Clusters, rot markiert ist der Bereich von IL1RN mit hohem LD. Die Berechnung des Kopplungsungleichgewichtes bzw. die Darstellung erfolgte wie in 2.10.6 beschrieben.

5.5.2. Einzellocusanalyse im IL1-Cluster

In der nachfolgenden Abbildung sind die Einzelmarkeranalysen sämtlicher genotypisierter DNA-Variationen dargestellt, inklusive der SNPs, die nach der Resequenzierung untersucht wurden. Aus dieser wird deutlich, dass neben der signifikanten Assoziation von jeweils einem SNP in *IL1A*- und *IL1B*-Gen (vgl. **Tabelle 15** und **Tabelle 16**) mehrere signifikante Assoziationen in *IL1RN* gefunden wurden (vgl. **Tabelle 22**). Diese sogenannte Einzellocusanalyse wurde nur von der deutschen Studie gezeigt, da für die italienische Studie lediglich die in *IL1RN* signifikanten SNPs und nicht auch die übrigen genotypisiert wurden.

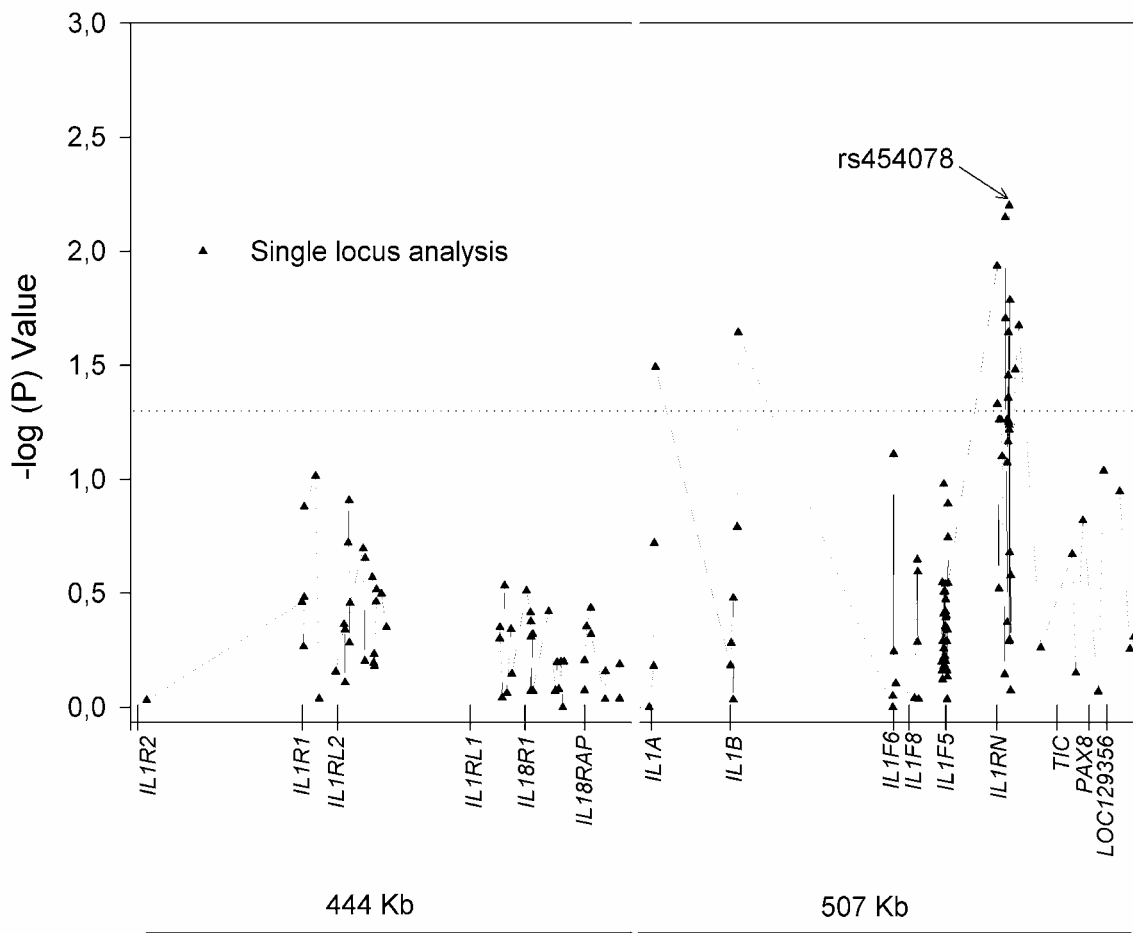


Abbildung 32: Einzellocusanalyse der genotypisierten SNPs aus dem IL1-Cluster. Die Berechnung erfolgte wie in 2.10.3 beschrieben, die Darstellung erfolgte mit Sigma-Plot

5.5.3. Zwei-Locusanalyse im IL1-Cluster

In der Darstellung unten ist eine Zwei-Locusanalyse aller genotypisierter Polymorphismen abgebildet, inklusive der SNPs, die nach der Resequenzierung untersucht wurden. Diese Zwei-Locusanalyse wurde innerhalb der deutschen Studie durchgeführt, da für die italienische Studie nur die in *IL1RN* signifikanten SNPs und nicht auch alle übrigen genotypisiert wurden. Diese Analyseergebnisse zeigen, dass eine Assoziation mit Asthma hauptsächlich für benachbarte SNPs im *IL1RN* Gen zu finden ist. (vgl. **Tabelle 24**).

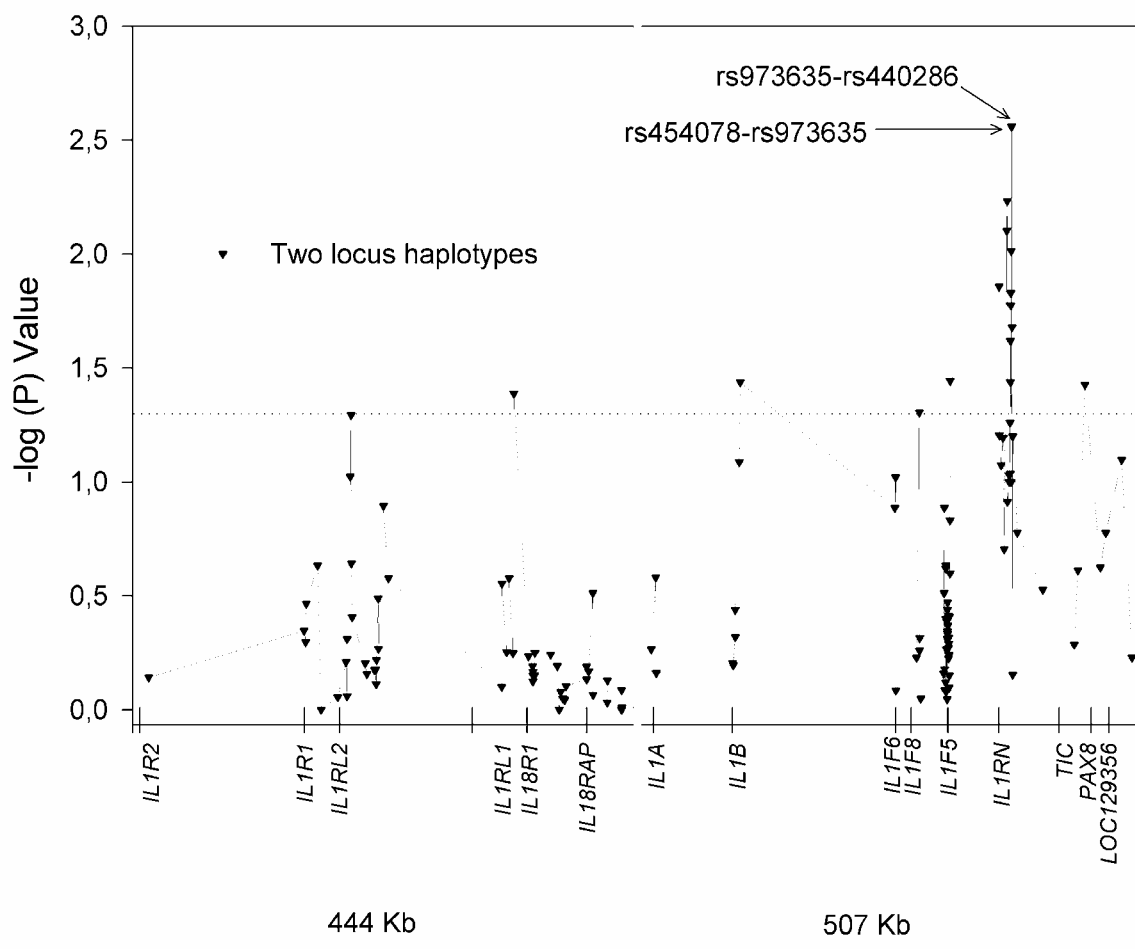


Abbildung 33: Zwei-Locusanalyse von SNPs aus dem IL1-Cluster. Die Berechnung erfolgte wie in 2.10.4 beschrieben, die Darstellung erfolgte mit Sigma-Plot

Haplotyp	TDT, p-Wert
454078-973635	0,00275
973635-440286	0,00275
392503-439154	0,00585
315934-392503	0,0079
451578-454078	0,0097

Tabelle 24: Zwei-Locus Haplotypen (von links nach rechts): Benachbarte SNPs des jeweiligen Haplotypen wurden untersucht, p-Wert des TDT-Tests

5.5.4. Drei-Locusanalyse im IL1-Cluster

In nachfolgender Abbildung ist eine Drei-Locusanalyse aller genotypisierter Polymorphismen dargestellt, inklusive der SNPs, die nach der Resequenzierung untersucht wurden. Diese Analyse wurde ausschließlich für die deutsche Studie durchgeführt, da für die italienische nur die in *IL1RN* signifikanten SNPs genotypisiert wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass Assoziation hauptsächlich für benachbarte SNPs in *IL1RN* zu finden ist. (vgl. **Tabelle 25**).

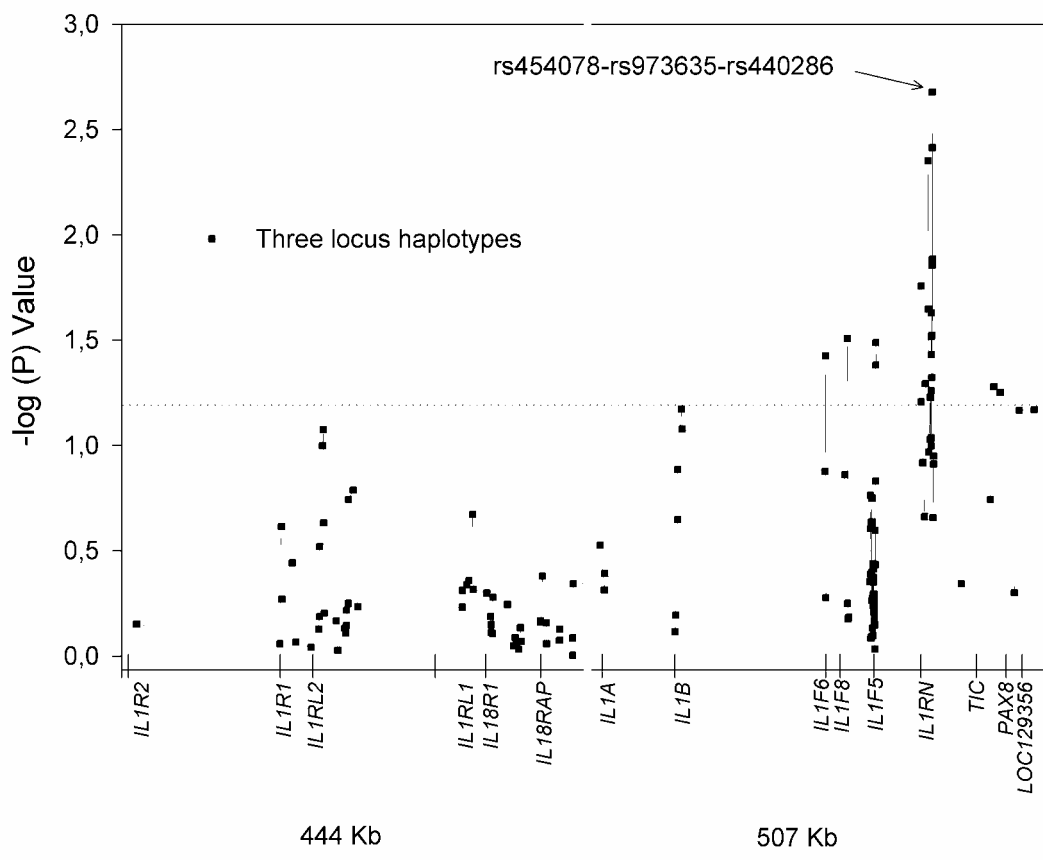


Abbildung 34: Drei-Locusanalyse von SNPs aus dem IL1-Cluster Die Berechnung erfolgte wie in 2.10.4 beschrieben, die Darstellung erfolgte mit Sigma-Plot.

Haplotyp	TDT, p-Wert
454078-973635-440286	0,0021
451578-454078-973635	0,00385
315934-392503-439154	0,00445

Tabelle 25: Drei-Locus Haplotypen von SNPs aus dem IL1-Cluster: Benachbarte SNPs des jeweiligen Haplotypen wurden untersucht, p-Wert des TDT-Tests

5.5.5. Haplotype tagging (ht) SNPs und Mehrpunkthaplotypen

Eine erweiterte Haplotypenanalyse hat gegenüber der reinen Untersuchung von SNPs den Vorteil, dass nicht nur Einzelmarker, sondern auch benachbarte Marker einbezogen werden können und damit einen größeren Informationsgehalt haben. Die statistische Bestimmung der Haplotypen erfolgte hier mit einem von Becker und Mitarbeitern²⁷⁰ entwickelten ML-Schätzer (Maximum Likelihood).

Das Problem, mit einer gegebenen Menge von Haplotypen eine Menge von SNPs zu bestimmen (ht), so dass jeder häufige Haplotyp durch diese SNPs eindeutig charakterisiert ist, wurde ebenfalls mit einer von Becker und Mitarbeitern entwickelten Methode gelöst²¹⁵.

Um Haplotypen in *IL1RN* bestimmen zu können, wurden zunächst die Marker rs794066 und rs380092 aus der Analyse ausgeschlossen, da beide nicht im Hardy-Weinberg-Equilibrium lagen. Anschließend wurde mit den 5 am weitesten proximal gelegenen SNPs mit der Bestimmung der ML-Schätzung der Haplotypen begonnen. Nachdem von den verbliebenen 21 SNPs jeweils ein SNP schrittweise hinzugefügt wurde, war eine Anzahl von 57 Haplotypen erreicht, von denen lediglich 9 eine Frequenz von > 1% in der Studie zeigten (vgl. **Tabelle 26**).

Um diese 9 Haplotypen eindeutig bestimmen zu können, waren 6 der 26 SNPs (8-9-11-19-23-24 oder rs315934-rs392503-rs1794067-rs598859-rs973635-rs440286) erforderlich.

Diese sogenannten „tagging SNPs“ wurden zur Haplotypisierung herangezogen, somit wurden die Hauptvarianten in *IL1RN* beschrieben. In diesem Zusammenhang zeigen zwei Allele im TDT einen signifikanten p-Wert (vgl. **Tabelle 27**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	Freq(%)
Haplotype.	rs2234678	rs16065	rs928940	rs878972	icill_1	rs1794065	rs315936	rs315934	rs392503	rs439154	rs1794067	rs1794068	rs419598	rs446433	rs442710	rs408392	rs447713	rs128964	rs598859	rs434792	rs451578	rs454078	rs973635	rs440286	rs315952	rs3159951	
1	1	2	2	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	35,9
2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	1	2	1	2	2	1	18,8
3	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	2	11,1
4	1	2	1	1	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	2	8,1
5	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	4,3
6	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2,8
7	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	2	2,7
8	1	2	1	1	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1,2
9	1	2	2	1	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1,1

Tabelle 26: Überblick über die 9 häufigsten Haplotypen im *IL1RN* Gen. Das Allel mit der höheren Prävalenz ist mit 1, das mit der niedrigeren mit 2 bezeichnet. Die Reihenfolge der SNPs ist in 5'->3'Richtung angegeben. Gelb markiert sind die „tagging SNPs“.

Haplotyp	T	NT	P-Value
122211	0.449201	0.318490	p=0,0026
111112	0.191965	0.212587	NS
222211	0.153149	0.149033	NS
122221	0.085302	0.119750	NS
111121	0.027559	0.011858	NS
111212	0.020634	0.076390	0,0032
112221	0.017060	0.037918	NS
222212	0.015748	0.003951	NS
221211	0.011823	0.004168	NS

Tabelle 27: Haplotypenhäufigkeit der transmittierten (T) Allele und nicht transmittierten (NT): Allele, 6-Punkt-Haplotypen, die aus den „tagging SNPs“ rs315934-rs392503-rs1794067-rs598859-rs973635-rs440286 gebildet wurden

5.6. Konzentrationsbestimmung von IL-1ra im Serum

Um feststellen zu können, ob IL-1ra tatsächlich einen Beitrag zur Asthmaentwicklung leistet, z.B. durch fehlerhafte Regulation seiner Expression, sollte die Menge des Moleküls im Serum aller Probanden der deutschen Familienstudie bestimmt werden. Zu diesem Zwecke wurde ein standardisierter ELISA-Test der Fa. R&D Systems verwendet.

Die Ermittlung der IL-1ra Konzentrationen erfolgte mittels einer 8-Punkt-Eichgeraden. Die OD-Werte (450 nm) bekannter IL-1ra Konzentrationen wurden durch einen ELISA-Test bestimmt. Aus diesen Werten konnte eine Eichgerade erstellt werden, mit der es möglich war, die unbekanntes Serumkonzentrationen der Probanden zu errechnen. Alle Konzentrationsbestimmungen wurden mindestens im Doppelansatz durchgeführt, wobei die Standardabweichung nicht > 1% war.

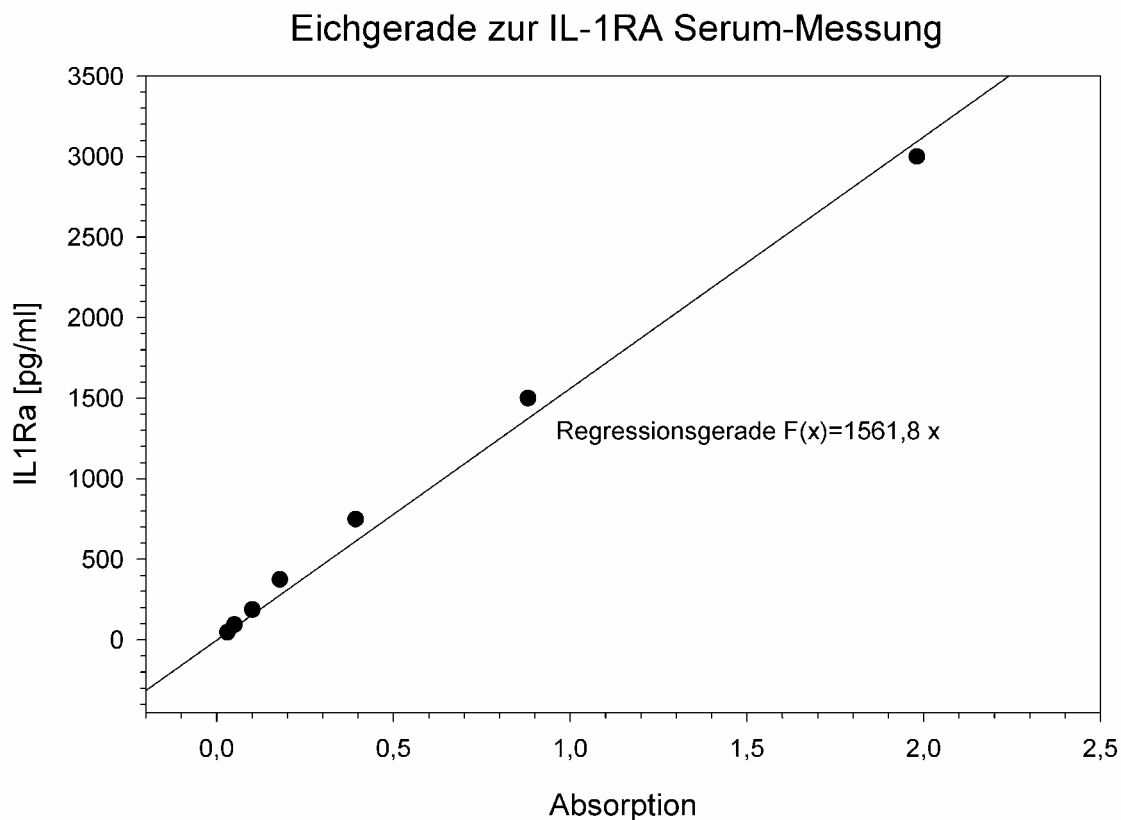


Abbildung 35: 8-Punkt-Eichgerade zur IL-1ra-Bestimmung anhand Proben bekannter Konzentration

In den Versuchen zeigte sich, dass bei den Asthmatikern eine erhöhte IL-1ra-Konzentration gegenüber den Nichtasthmatikern vorlag (vgl. **Abbildung 36**).

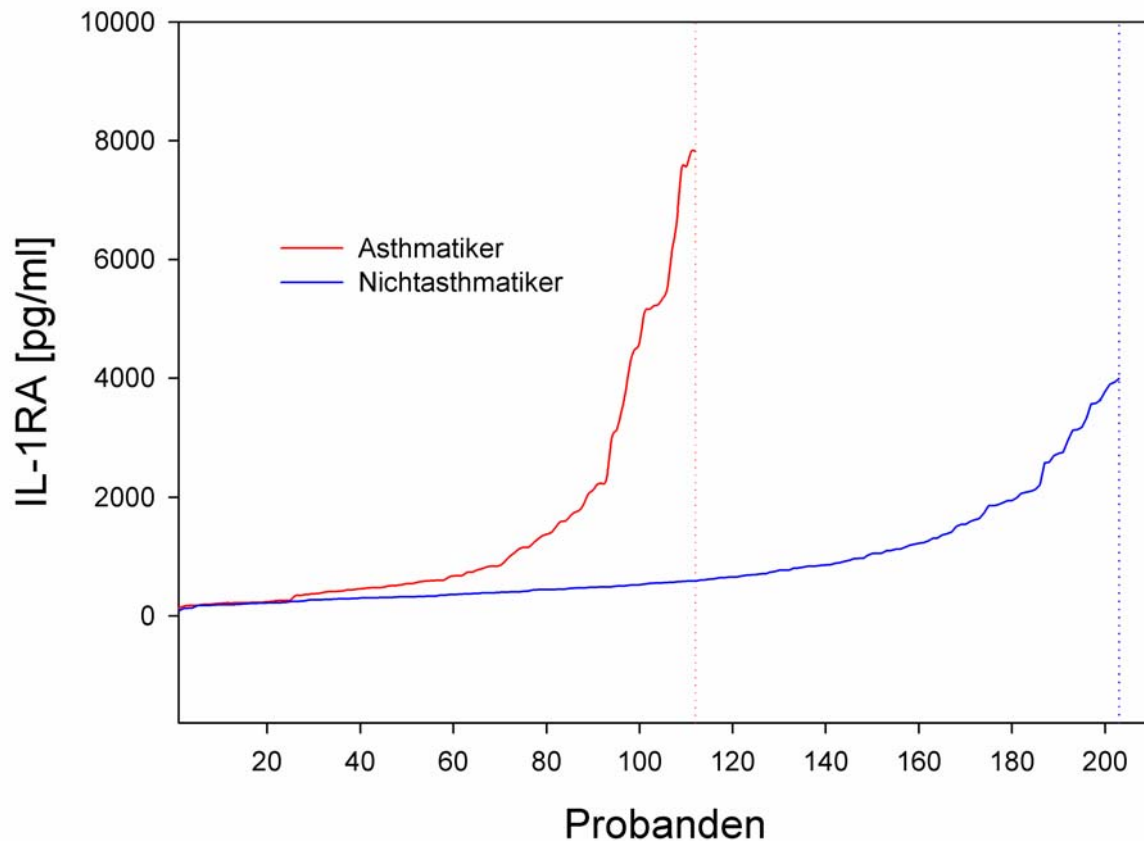


Abbildung 36: Verteilung der IL-1ra Serumkonzentration bei Asthmatikern und Nichtasthmatikern in der deutschen Asthma Familienstudie

5.7. Resequenzierung des Promotorbereiches mit anschließender Genotypisierung

Bis jetzt konnten zwar mehrere SNPs in *IL1RN* identifiziert werden, welche mit Asthma assoziiert sind, auch konnte die signifikante Erhöhung des Serumspiegels nachgewiesen werden, jedoch war es nicht möglich, die krankheitsauslösenden DNA-Varianten zu finden. Aus diesem Grund war es notwendig, regulatorische, d.h. Promotorbereiche dieses Gens zu analysieren, in denen die kausale Mutation eventuell zu finden ist. Der Promotor, der die Expression der sekretorischen Formen von IL-1ra (sIL1RA) steuert, erstreckt sich über eine Region von 500 bp. Dagegen umspannt die Promotorregion, welche die Expression der intrazellulären Formen von IL-1ra (iIL1RA) reguliert, einen Bereich von ca. 2,5 kb.

Zu diesem Zweck wurden die Bereiche beider Promotoren von der Fa. MediGenomix resequenziert. Die anschließende Identifizierung der DNA-Variationen wurde vom Autor dieser Arbeit durchgeführt (vgl. 5.3).

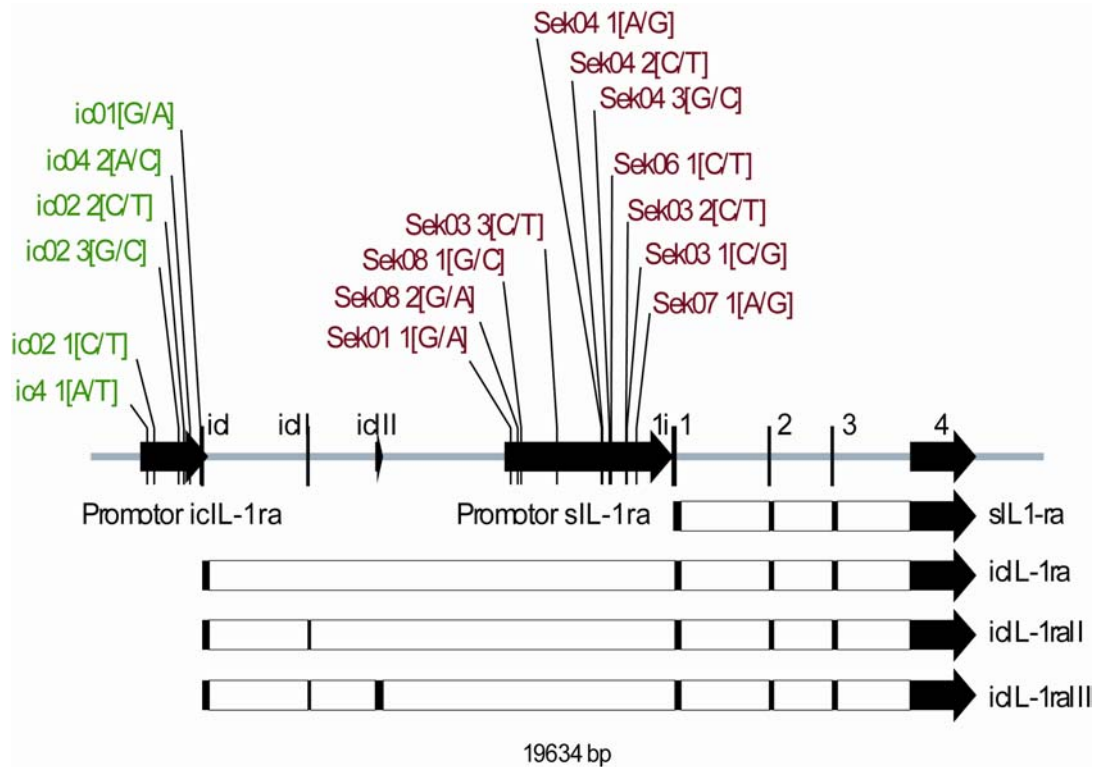


Abbildung 37: Resequenzierung des Promotorbereiches von *IL1RN*

Mit Hilfe dieses Ansatzes konnten in beiden Promotorregionen bis dahin unbekannte 17 SNPs identifiziert werden

Intene Nr	Variation	Motif
Cel04_1	A/T	nicht bekannt
Cel02_1	C/T	nicht bekannt
Cel02_3	C/G	nicht bekannt
Cel02_2	C/T	VCREB/HLF.01
Cel04_2	A/C	nicht bekannt
Cel01	A/G	nicht bekannt
Sek01_1	A/G	nicht bekannt
Sek08_2	A/G	nicht bekannt
Sek08_1	C/G	nicht bekannt
Sek03_3	C/T	nicht bekannt
Sek04_1	A/G	nicht bekannt
Sek04_2	C/T	nicht bekannt
Sek04_3	C/G	nicht bekannt
Sek06_1	C/T	nicht bekannt
Sek03_2	C/T	nicht bekannt

Intene Nr	Variation	Motif
Sek03_1	C/G	nicht bekannt
Sek07_1	A/G	nicht bekannt

Tabelle 28: Mittels Resequenzierung des Promotorbereiches neu identifizierte SNPs (von links nach rechts): interne SNP-Bezeichnung (Cel=intrazelluläre Form, Sek=sekretorische Form von IL1RN), Art des Polymorphismus, betroffener Sequenzabschnitt vgl. 7.4

Die gelieferten Rohsequenzen, die von der Fa. MediGenomix geliefert worden waren, eigneten sich zwar dazu, unbekannte SNPs zu detektieren, waren jedoch nicht hochwertig genug, um in aussagekräftiger Weise eine Bestimmung der Allelfrequenzen der jeweiligen SNPs vorzunehmen. Nach anschließender Datenbankrecherche hinsichtlich betroffener Promotorbindemotive konnte für den SNP Cel02_2 erkannt werden, dass er direkt in einem NFκB-Bindemotiv liegt. Dieser SNP wurde im Anschluss genotypisiert, zeigte allerdings keine signifikante Assoziation mit Asthma an (persönliche Mitteilung PD Dr. Wjst).

6. Diskussion

Mit der dieser Arbeit zugrundeliegenden Asthma-Familienstudie konnte ebenso wie in anderen genomweiten Suchen, Kopplung der chromosomalen Region 2q12-14 mit Asthma und assoziierten Phänotypen in unterschiedlichen ethnischen Populationen nachgewiesen werden^{103-108;110;116;127;128}. Ausgehend von unseren und den Kopplungsdaten weiterer Genomscans, verknüpft mit der funktionellen Information über Kandidatengene in der Region, wurden alle bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Mitglieder sowohl der IL-1-Rezeptor- als auch der Ligandenfamilie auf Assoziation mit Asthma untersucht. Im Folgenden werden Studiendesign, Qualität der Daten, die erzielten Assoziationsergebnisse und deren Einordnung in den pathophysiologischen Hintergrund diskutiert.

6.1. Auswahl der SNPs und Genotypisierung

In dieser Arbeit wurden SNPs aus öffentlichen Datenbanken für die Genotypisierung identifiziert. Zu diesem Zweck war es zunächst erforderlich zu bestimmen, ob die jeweiligen DNA-Variationen tatsächlich existierten. Während der gesamten Untersuchungszeit konnte eine Validierungsquote von ca. 60% erzielt werden, die jedoch bei den ausgewählten Kandidatengenen unterschiedlich stark abwich. Gründe hierfür liegen sowohl in den unterschiedlichen Methoden, als auch in der SNP-Auswahl aus den öffentlichen Datenbanken. Diese Werte sind niedriger als die von Reich und Mitarbeitern mittels Resequenzierung erzielten Ergebnisse. Das liegt daran, dass bei diesen eine Erfassung von SNPs mit einer Allelfrequenz $>1\%$ erfolgte³⁰¹. In dieser Arbeit konnten durch Validierung im Pool nur solche SNPs nachgewiesen werden, bei denen die Allelfrequenz $> 5\%$ betrug.

Zunächst wurde die Validierung mit beiden Biotin-Streptavidinmethoden durchgeführt (vgl. Methodenteil und Anhang). Diese Methoden erfordern ein präzises Vorgehen hinsichtlich der Pipettierschritte und sind deshalb im Gegensatz zu der später verwandten HME-Methode wesentlich fehleranfälliger, da bei diesen Methoden Reagenzien zum Ansatz sowohl hinzugefügt als auch entnommen werden. Bei der HME-Methode ist diese Fehleranfälligkeit geringer, weil nur Reagenzien zum Ansatz hinzupipettiert werden. Aus diesem Grund lag anfangs die Validierungsquote bei ca. 50%, konnte allerdings durch das geänderte Vorgehen auf ca. 70% erhöht werden, so dass eine durchschnittliche Validierungsquote von 60% erreicht wurde.

Da zu Beginn dieser Untersuchungen zwar Informationen zu einer großen Anzahl SNPs in den öffentlichen Datenbanken vorlagen, jedoch nicht bekannt war, ob diese polymorph waren, weil die Angaben häufig auf fehlerhaften Alignments und Sequenzierfehlern beruhten, war die Validierungsquote auch aus diesem Grund anfangs niedriger als gegen Ende der Arbeit. Aufgrund der Tatsache, dass im Laufe der Zeit viele SNPs der öffentlichen Datenbanken in anderen Studien als polymorph bestätigt wurden, stieg die Wahrscheinlichkeit, dass die jeweiligen SNPs biallelisch vorlagen.

Aufgrund der anfänglich verwendeten Validierungsmethoden und der zunächst unvollständigen Datenbankinformationen wurden evtl. einige SNPs fälschlicherweise nicht als polymorph identifiziert. Zusammen mit den eventuell fehlerhaften SNPs aus öffentlichen Datenbanken könnte die Validierungsquote verfälscht worden sein.

War ein SNP als polymorph identifiziert, wurde er in der Familientrio-Auswahl auf Assoziation mit Asthma untersucht. Für die statistische Analyse ist es von entscheidender Bedeutung gewesen, dass die Genotypeninformationen zu den jeweiligen SNPs für jeden Probanden möglichst vollständig und fehlerfrei vorlagen. Die Genotypisierung wurde mittels MALDI-TOF MS - Analyse in der Trio-Auswahl im Multiplexverfahren durchgeführt. Die in dieser Arbeit ermittelten Daten zeigen, dass diese Methode verlässlich zur Genotypisierung eingesetzt werden kann, da dabei grundsätzlich eine Vollständigkeit von über 95% erreicht wurde.

Ein weiterer Aspekt, der das Vorliegen einer qualitativ hochwertigen Genotypisierung bestätigt, besteht darin, dass für alle analysierten SNPs keine Auffälligkeiten hinsichtlich der Genotypenkonformität zwischen Eltern und Kindern auftraten. Dieser Umstand spricht für eine geringe Fehlerrate bei der Genotypisierung, was zusätzlich durch die Bestimmung der Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untermauert wurde.

6.2. Assoziationsergebnisse der SNPs

Nach Analyse der Ergebnisse ist festzustellen, dass neben einer schwachen Assoziation von SNPs in den Genen *IL1A* und *IL1B* ausschließlich das *IL1RN*-Gen mit Asthma assoziiert ist. Die Assoziationsergebnisse sprechen dafür, dass *IL1RN* bzw. sein Genprodukt IL-1ra einen Beitrag zur Entwicklung der komplexen Gen-/Umweltbeziehungen leistet, die den Phänotypen Asthma ausmachen. Die

statistischen Analysen zeigen, dass SNPs und Haplotypen in *IL1RN* signifikant mit der Krankheit assoziiert sind (vgl. 0). Es ist unwahrscheinlich, dass ein zu *IL1RN* benachbartes Gen für diese Assoziationsergebnisse verantwortlich ist, da alle SNPs in *IL1RN* im starken LD (Linkage Disequilibrium) zueinander liegen, und das LD zu den beobachteten Markern hin erheblich abfällt (vgl. **Abbildung 31**).

Um die Hypothese, dass *IL1RN* einen Beitrag zu Asthma leistet, zu bestätigen, wurden 12 SNPs, die in der deutschen Studie mit Asthma assoziiert waren, auch in der italienischen Familienstudie getestet. Es war möglich, eine zwar schwächere, aber trotzdem signifikante Assoziation mit Asthma zu detektieren, was somit die Resultate in der deutschen Studie untermauert. (vgl. **Tabelle 23**)

Zusätzlich wurden dieselben 12 SNPs in einer Fallkontrollstudie untersucht, bei der ebenfalls Assoziation mit *IL1RN* und Asthma bzw. IgE festgestellt wurde (persönliche Mitteilung PD Dr. Wjst).

Die vorliegenden Ergebnisse werden darüber hinaus durch eine frühere japanische Fallkontrollstudie bestätigt, bei der mit dem A2-Allel des DNA-Repeats im Intron 2 eine Assoziation mit Asthma gezeigt wurde²⁹⁵. Joos und Mitarbeiter konnten einen protektiven Effekt des A2-Allels hinsichtlich der Abnahme der Lungenfunktion finden²⁹⁶. Keine Auswirkung des DNA-Repeats im Intron 2 konnten Ishii und Mitarbeiter bei COPD feststellen³⁰². In der deutschen Asthma-Familienstudie war es möglich, eine schwache Assoziation mit dem A2-Allel zu detektieren, was in der italienischen Population jedoch nicht gelang (vgl. **Tabelle 22**).

Nach Vergleich der Daten der in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen und den beschriebenen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen erhärtet sich die Annahme, dass *IL1RN* einen Beitrag zur Ausprägung von Asthma leistet.

Die sich teilweise widersprechenden Ergebnisse deuten im wesentlichen die Heterogenität komplexer Erkrankungen wie Asthma an. Sämtliche Daten stammen aus verschiedenen Populationen, in denen die untersuchten Probanden jeweils unterschiedliche genetische Entwicklungen aufweisen und anderen Umweltbedingungen ausgesetzt sind. Komplexe Erkrankungen wie Asthma resultieren vermutlich aus Gen-Gen-Interaktionen im Zusammenspiel mit Umweltfaktoren. Aus diesem Grund ist es verständlich, dass Gene in verschiedenen

Populationen einen unterschiedlichen Effekt auf die Entwicklung von komplexen Krankheiten wie Asthma haben¹²⁵.

6.3. Studiendesign

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Kopplungsanalysen sowie die durchgeführten genetischen Assoziationsstudien in der deutschen und der italienischen Population gründen auf einem familienbasierten Studiendesign (vgl. 4). Derartige Studien lassen sich zum einen, wie im vorliegenden Fall, mit einem familienbasierten Ansatz oder zum anderen mit Hilfe einer sogenannten Fall-Kontroll-Studie durchführen. Infolgedessen ist es wichtig, sich mit den Vor- bzw. Nachteilen der jeweiligen Ansätze auseinanderzusetzen, um die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse einordnen zu können.

Durch einen Fall-Kontrollansatz werden Marker (SNPs) identifiziert, die signifikante Unterschiede bzgl. der Allelfrequenz zwischen betroffenen Individuen (Fällen) und einer Reihe unabhängiger Kontrollen zeigen³⁰³.

Der Fall-Kontrollansatz gewährleistet im Gegensatz zum familienbasierten Ansatz eine um 1/3 höhere Effizienz, da hier für jedes Fall-Kontrollpaar DNA bzw. Genotypen von zwei Probanden benötigt werden. Dagegen sind beim familienbasierten Ansatz für ein Fall-Kontrollpaar DNA und Genotypen des betroffenen Kindes und beider Eltern erforderlich. Außerdem werden bei einer familienbasierten Studie nur solche Familien in die Berechnung einbezogen, bei denen mindestens ein Elternteil heterozygot für das zu testende Allel ist. Folglich wird ein großer Anteil der Genotypen nicht in die Berechnung einbezogen im Gegensatz zum Fall-Kontrollansatz, wo jede Information verwendet werden kann. Eine Reihe technischer Erwägungen erleichtert die Durchführung einer Fall-Kontrollstudie. Zum einen können umfangreiche Stichproben mit einer großen Anzahl von Probanden erhoben werden, was für eine familienbasierte Studie nur schwer möglich ist, da man hier immer mindestens 3 Probanden rekrutieren muß. Zum anderen müssen die verwandschaftlichen Beziehungen klar dokumentiert und beschrieben sein, was zu weiteren Problemen führen kann. Aus der deutschen Familienstudie mussten bspw. 11 Familien ausgeschlossen werden, bei denen die Kinder nicht genetisch konform zu den Eltern waren (persönliche Mitteilung Guido Fischer).

Ein wichtiger Punkt jedoch, der gegen die Verwendung von Fall-Kontrollstudien spricht, ist die Tatsache, dass es aufgrund von Populationsstrukturen zu fehlerhaften

Assoziationsergebnissen kommen kann. Wenn Fälle und Kontrollen aufgrund von Populationsstrukturen eine Diversität hinsichtlich der Allelfrequenzen verschiedener Marker aufweisen, die nicht auf die Krankheit zurückzuführen sind, spricht man von einer stratifizierten Population. Stratifikation ist der in der Literatur am häufigsten angegebene Grund, warum genetische Assoziationsergebnisse sich von unabhängigen Experimenten nicht bestätigen ließen³⁰⁴⁻³⁰⁷. Um mögliche Stratifizierungen zu minimieren, ist es unerlässlich, dass Fälle und Kontrollen hinsichtlich ihres genetischen Hintergrundes übereinstimmen, und somit irrelevante allelische Unterschiede auf ein Mindestmaß reduziert werden. Die Übereinstimmung von Fällen und Kontrollen kann zwar Stratifizierungsprobleme verkleinern, sie aber nicht vollständig ausschließen. Aus diesem Grund sollten in Fall-Kontrollstudien sogenannte „genomic controls“ Verwendung finden^{304;308-313}. Darunter versteht man genetische Marker, die über das gesamte Genom verteilt sind und als Indikatoren den Grad genetischer Hintergrunddiversität zwischen Fällen und Kontrollen anzeigen. In der Literatur wird vorgeschlagen, diesen Grad an Diversität zu berechnen und als Korrekturfaktor in die weiteren Assoziationsergebnisse einzubeziehen³⁰⁴. Zusätzlich bietet der Fall-Kontrollansatz keine zuverlässige Möglichkeit, vorhandene Genotypisierungsfehler bzw. das Vertauschen von Proben anzuzeigen. Zwar werden die Ergebnisse immer auf eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht getestet, jedoch kann die Überprüfung der Genotypenkonformität gemäß den Mendelschen Regeln in einer Familienstudie solche Fehler um einiges genauer anzeigen.

Durch einen familienbasierten Ansatz werden Marker (SNPs) identifiziert, die signifikante Unterschiede bezüglich der Allelfrequenz zwischen betroffenen Individuen (Fällen) und ihren Eltern (Pseudokontrollen) zeigen. Zur statistischen Analyse wird oft der von Spielmann 1993 entwickelte „Transmissions-Disequilibrium Test“ (TDT)^{268;303} - ein familienbasierter Assoziationstest - herangezogen. Dieser Test stellt mit Hilfe der Genotypen der Eltern betroffener Individuen sicher, dass Assoziation zwischen einem Markerallel und dem Phänotyp nur detektiert wird, wenn der Marker tatsächlich mit dem Krankheitslocus gekoppelt ist. Dies ist wichtig, um Verzerrungen, die durch stratifizierte Populationen entstehen können, auszuschließen. Durch den TDT wird überprüft, ob heterozygote Eltern ein bestimmtes Allel signifikant häufiger an ihre erkrankten Kinder weitergeben, als nach den Mendelschen Regeln zu erwarten ist, wenn keine Kopplung bzw. Assoziation

besteht. Mittels Familienstudien können eine Reihe von Problemen, die bei Fall-Kontrollstudien auftreten, vollkommen ausgeschlossen werden. Außerdem wird durch das Familiendesign eine sehr geringe Fehlerrate der Genotypen gewährleistet, da zum einen alle getesteten Marker auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht hin überprüft werden können und zusätzlich mit einem Paternitätstests die Genotypenkonformität von Eltern und Kindern überprüft wird.

Nach eingehender Betrachtung erscheint es im vorliegenden Fall sinnvoller, eine Familienstudie für die genetischen Assoziationsanalysen einzusetzen, da die erlangten Assoziationsergebnisse weder durch mögliche Stratifikationsprobleme beeinflusst noch durch eine fehlerhafte Genotypisierung verfälscht sind.

6.4. IL-1ra im Serum

Die in dieser Arbeit durchgeführten IL-1ra-Konzentrationsbestimmungen im Serum für alle bei der Genotypisierung verwendeten Probanden der deutschen Trio-Auswahl wurden mit Hilfe eines sog. Sandwich-Elisa-Tests vorgenommen. Es zeigte sich hierbei, dass die Serumkonzentration bei den Asthmatikern deutlich höher lag, als es bei Nichtasthmatikern der Studie der Fall war. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass sowohl die IL-1ra- als auch die IL1 β -Konzentration bei Asthmatikern in der Lunge erhöht sind²⁹⁵.

6.5. Mögliche Auswirkungen des IL-1 – IL-1ra Ungleichgewichts auf die Entwicklung von Asthma

Anhand der, in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass Asthma mit SNPs aus *IL1RN* in zwei unterschiedlichen Familienstudien assoziiert ist. Bei einer zusätzlichen Überprüfung konnte in einer Fallkontrollstudie Assoziation mit diesen SNPs und IgE bzw. Asthma festgestellt werden (persönliche Mitteilung Dr. M. Wjst).

Das Genprodukt von *IL1RN* (IL1ra) wirkt antagonistisch zu IL-1, welches als proinflammatorisches Cytokin an zahlreichen entzündlichen Reaktionen beteiligt ist (vgl. 1.4.1). Die Bindung von IL1ra an seinen Rezeptor löst im weiteren Verlauf, anders als bei IL1, keine Signaltransduktionskaskaden aus, sondern nimmt ausschließlich inhibitorische Aufgaben hinsichtlich des proinflammatorisch wirkenden IL1 wahr und wirkt damit antiinflammatorisch (vgl.1.4.1.4).

Im nichtpathologischen Zustand herrscht ein Gleichgewicht zwischen der entzündlichen Reaktion von IL-1 und der entzündungshemmenden von IL-1ra. Dagegen wurde bei Asthmatikern in dieser Hinsicht ein Ungleichgewicht in Form einer Verschiebung zugunsten der proinflammatorischen Wirkung gefunden²⁹⁵.

Dieses Ungleichgewicht könnte entweder auf eine Verminderung der Bindungsaffinität von IL-1ra durch eine Mutation, welche die reguläre Faltungsstruktur des Proteins ändert, oder auf eine Mutation innerhalb einer regulatorischen Einheit, die eine geringere Expression von IL-1ra im Verhältnis zu IL-1 bewirkt, zurückgeführt werden. Das erste Erklärungsmodell scheint aufgrund der gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der Resequenzierung des codierenden Bereiches von *IL1RN* eher unwahrscheinlich. Es konnte keine funktionelle Mutation entdeckt werden, die eine Änderung der Proteinfaltungsstruktur zur Folge gehabt hätte. Zusätzlich war es mit Hilfe von Expressionsexperimenten möglich auszuschließen, dass eine Mutation in einem Spliceenhancermotiv³¹⁴⁻³¹⁶ (rs419598, vgl. **Tabelle 22**) fehlerhaftes Splicen nach sich zieht (persönliche Mitteilung E. André).

Nachdem das Vorliegen einer Variation ausgeschlossen werden konnte, die die Faltungsstruktur des Proteins ändert, ist es umso wahrscheinlicher, dass hier eine DNA-Variation innerhalb einer Regulationseinheit vorliegt, die zur Verschiebung des IL1 / IL1ra-Gleichgewichtes führt.

In dieser Arbeit wurden mehrere SNPs in den vermuteten Promotorbereichen der sekretorischen und der intrazellulären Formen von IL1ra gefunden, jedoch müssen noch zusätzliche Assoziations- und Promotorstudien angestrengt werden, da zum einen noch nicht alle gefundenen SNPs genotypisiert werden konnten und zum anderen die jeweilige Bedeutung der betreffenden SNPs für die Promotoraktivität zu klären ist. Denkbar ist auch in Anbetracht der Tatsache, dass ein SNP aus *IL1B*, der ebenfalls signifikant assoziiert war, zusammen mit Variationen in *IL1RN* das Ungleichgewicht hervorruft (vgl. 5.2.8).

Das gestörte Gleichgewicht zwischen IL-1 und IL-1ra könnte innerhalb verschiedener Phasen (vgl. **Abbildung 1**) des Krankheitsverlaufes die nachfolgend beschriebenen Beiträge zur Entwicklung der pathologischen Symptome von Asthma bronchiale bzw. des jeweiligen Schweregrades leisten.

6.5.1. IL-1/IL-1ra- Ungleichgewicht und T_H1/T_H2 Ungleichgewicht

IL-1 induziert über die durch Rezeptorbindung ausgelösten, Signaltransduktionskaskaden (vgl. **Abbildung 4**) die Expression von COX2 (vgl. **Abbildung 38**), welches im Zusammenwirken mit anderen Enzymen an der Produktion verschiedener Prostaglandine beteiligt ist^{156;317}. Für die Ausprägung von Asthma scheint dem gebildeten Prostaglandin E₂ (PGE₂) eine grundsätzliche Bedeutung zuzukommen, da dieses wiederum die nachfolgend erwähnten Prozesse mitreguliert, welche die allergische Reaktion im Zusammenhang mit Asthma bronchiale beeinflussen¹⁵⁶ (vgl. **Abbildung 38**).

Die durch IL-1 induzierte Produktion von PGE₂ hat einen starken Effekt auf die Cytokinbildung der T-Zellen, indem es auf der einen Seite die Produktion der T_H2-Cytokine IL-4, IL-5 und IL-10 durch T_H2-Zellen fördert, auf der anderen Seite die Produktion der T_H1-Cytokine Interferon- γ und IL-2 durch T_H1-Zellen inhibiert^{156;318} (vgl. **Abbildung 38**). Aufgrund dieser Auswirkungen kann ein IL-1/IL-1ra-Ungleichgewicht bei der Entwicklung der Immunantworten auf Allergene bereits früh zu einer Verschiebung des T_H1/T_H2-Gleichgewichtes führen, welches wiederum eine wichtige Komponente für die Entstehung von Allergie und Asthma darstellt (vgl. **Abbildung 1** und 1.2.1).

PGE₂ reguliert ebenfalls die Aktivität reifer B-Zellen, indem es das IG-Class-Switching verstärkt^{156;319} (vgl. **Abbildung 38**). Dieser Prozess ist mitentscheidend für die Ausprägung von Allergie und Asthma, da ohne das Class-Switching die durch IgE-Antikörper induzierte allergische Sofortreaktion nicht stattfinden kann (vgl. **Abbildung 1** und 1.2.2). Durch ein IL-1/IL-1ra- Ungleichgewicht scheint es deshalb auch in diesem Fall zu einer Verschiebung in Richtung allergischer Reaktionen und damit zum Asthma zu kommen.

PGE₂ moduliert darüber hinaus die Aktivität antigenpräsentierender Zellen wie z.B. dendritischer Zellen und Makrophagen. Nachdem unreife dendritische Zellen das Antigen im peripheren Gewebe aufgenommen haben, was zu ihrer Aktivierung und zur anschließenden Migration in die lymphoiden Organe führt, reifen in den Lymphknoten die dendritischen Zellen heran und entwickeln während der Reifung die Fähigkeit, Antigene zu präsentieren und T-Zellen zu aktivieren. Im Zuge dieses Vorgangs reguliert PGE₂ die Produktion von Cytokinen durch DCs, indem es die nachfolgende Immunreaktion vorbereitet. Falls PGE₂ während der T-Zellaktivierung

mittels dendritischer Zellen präsent ist, können die DC-Zellen kein IL-12 herstellen (vgl. 1.4.2). Der Grund für diesen Effekt ist darin zu sehen, dass diese DCs hohe IL-10-Spiegel produzieren^{156;320}, welche die IL-12-Synthese unterdrücken^{3;321}. Die PGE₂ induzierten DCs regen zudem die Differenzierung naiver T-Zellen zu T_H2-Zellen direkt an¹⁵⁶ (vgl. **Abbildung 38**).

Bereits im ersten Schritt der Immunantwort, nämlich der Präsentation des Antigens, fördert ein IL-1/IL-1ra- Ungleichgewicht somit die spätere Ausbildung des T_H1/T_H2- Ungleichgewichts.

Zu den typischen T_H2-gesteuerten Immunantworten auf Umweltallergene trägt demnach vermutlich ein IL-1/IL-1ra Ungleichgewicht bei, indem diese über die Induktion von COX2 und damit PGE₂ die Entwicklung von T_H2-Zellen fördert, eine unzulängliche Regulation der T_H2-Zellen durch charakteristische T_H1-Cytokine hervorruft und das für Asthma typische IG-Classswitching unterstützt.

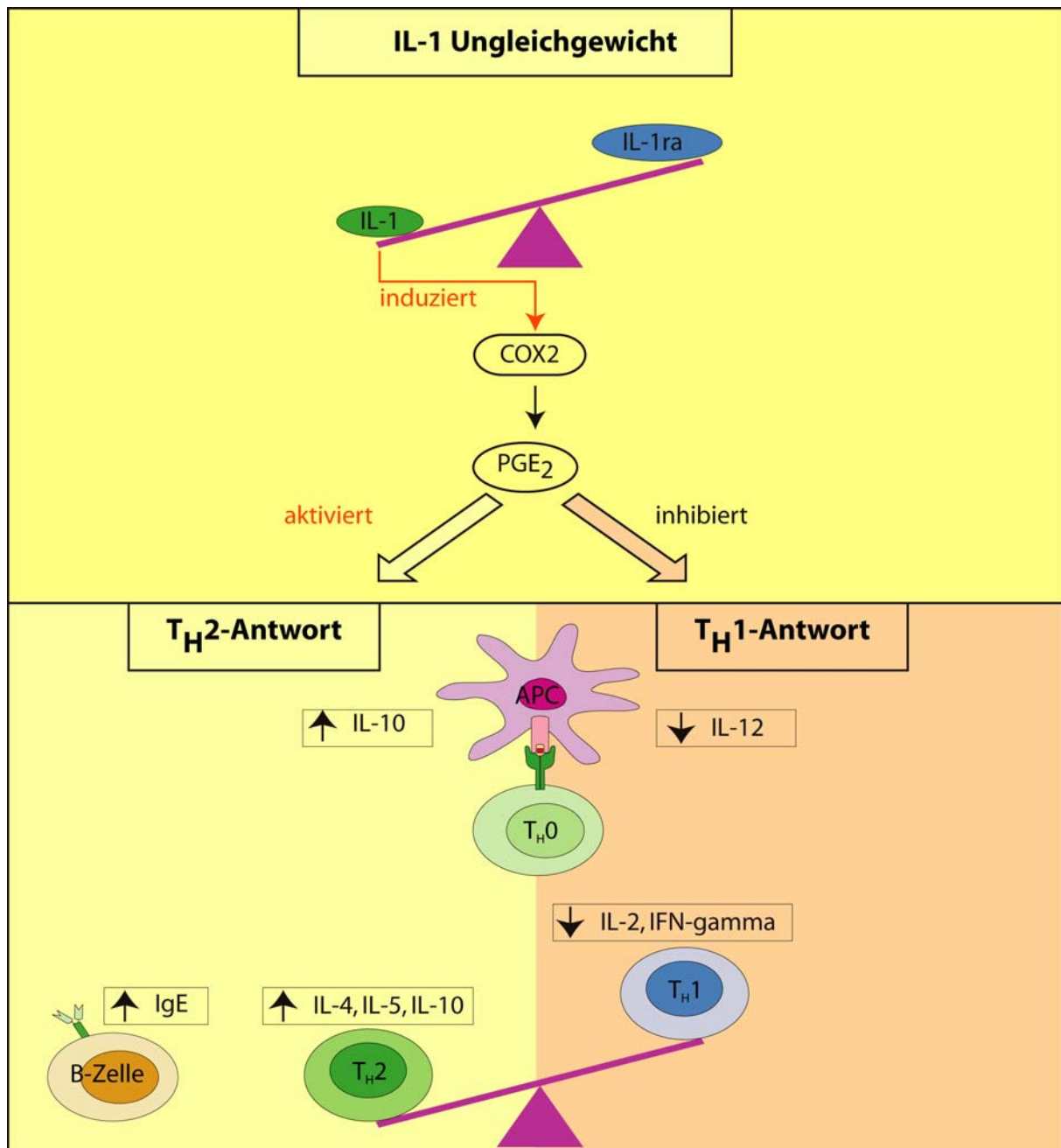


Abbildung 38: IL-1/IL-1ra- Ungleichgewicht und T_H1/T_H2-Ungleichgewicht

6.5.2. IL-1/IL-1ra Ungleichgewicht und entzündliche Reaktion bei Asthma bronchiale

Wirkung von IL-1 bei der inflammatorischen Reaktion

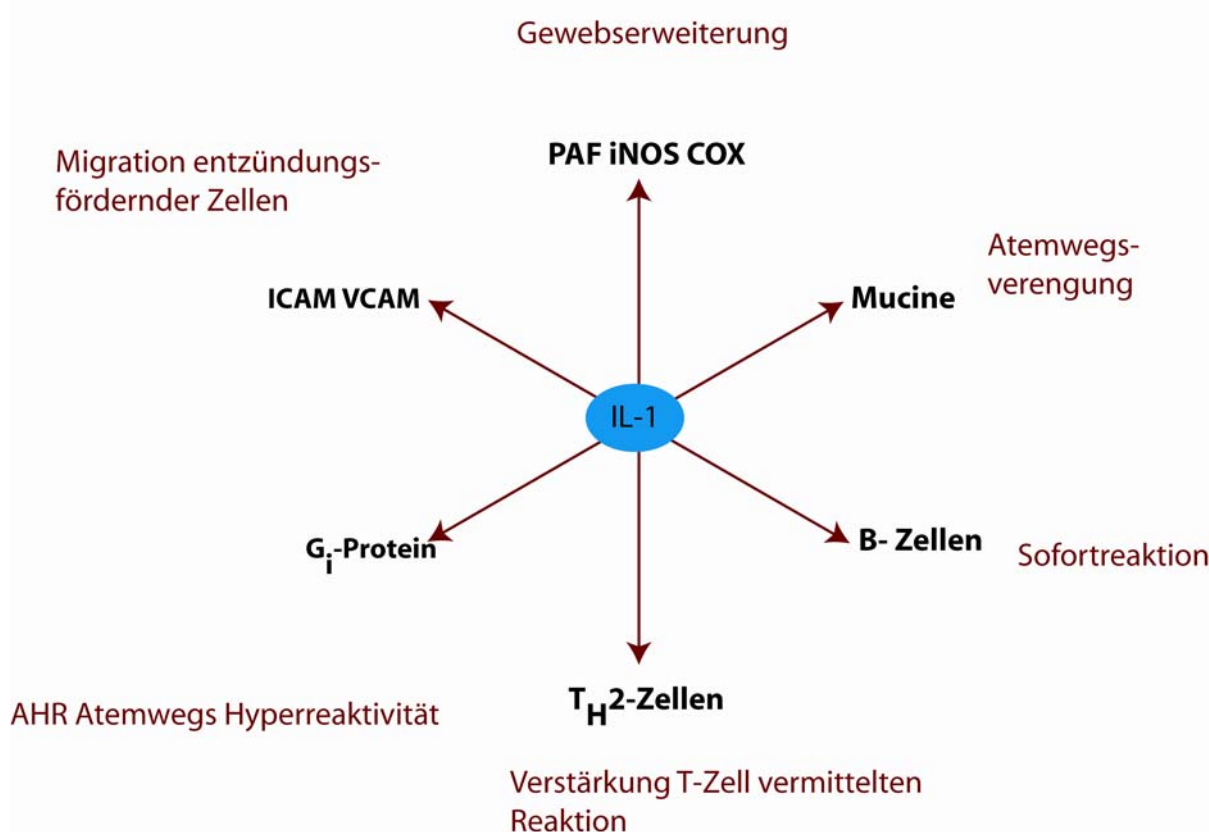


Abbildung 39: Entzündliche Wirkung von IL-1

Mit der Verschiebung des T_H1/T_H2 Gleichgewichtes zuungunsten der T_H1-Zellen, das durch ein IL-1/IL-1ra- Ungleichgewicht mit hervorgerufen wird, ist die Grundlage für eine entzündliche Reaktion bei erneutem Allergenkontakt geschaffen. Zusätzlich fördert das Ungleichgewicht zwischen der Wirkung des proinflammatorischen IL-1 und seines antiinflammatorischen Antagonisten IL-1ra direkt den entzündlichen Prozess bei Allergie und Asthma.

Die Auswirkungen der Interaktion von IL-1 mit seinem Rezeptor sind zwar teilweise gut erforscht, auf welchem Weg jedoch dies im Detail geschieht, ist größtenteils noch unbekannt. Es gilt als gesichert, dass IL-1 eine komplexe Signaltransduktionskaskade in Gang setzt, an der unterschiedliche Kinasen beteiligt sind, die letztlich die Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1 aktivieren (vgl. 1.4.1.3).

Diese regulieren jeweils die Transkription unterschiedlicher Zielgene und vermitteln dadurch inflammatorische Eigenschaften von IL-1^{139;146-149}.

Zielgene der durch IL-1 induzierten Transkriptionsfaktoren sind z.B. PAF¹⁵⁰⁻¹⁵², iNOS¹⁵³ und COX2¹⁵⁴⁻¹⁵⁶, durch die eine starke Erweiterung bzw. Entzündung der betroffenen Gewebe zum Beispiel in der Lunge, verursacht wird^{144;156} (vgl. 1.2.3). In diesem Zusammenhang induziert IL-1 ebenfalls die Synthese von ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen und ermöglicht damit Neutrophilen, Makrophagen und Lymphozyten den Eintritt in das Lungengewebe¹⁵⁷⁻¹⁶⁰. Diese Infiltration von Zellen des Immunsystems in die Lunge verstärkt die entzündliche Reaktion bei Asthma und prägt dadurch entscheidend die Spätreaktion im Krankheitsverlauf (vgl. 1.2.3)^{10;141;144}.

Weniger gut untersucht ist die IL-1-induzierte Produktion von Mucinen durch sekretorische Zellen der Atemwege. Mucine sind Glycoproteine, die gebildet werden, um Gefäße z.B. in der Lunge zu schützen^{169;171}. Im Zusammenhang mit Asthma stellt eine erhöhte Mucinproduktion ein bedeutendes Kennzeichen für die Krankheitsentwicklung dar^{168;170;171}, da diese zu der typischen Verengung der kleinen und großen Atemwege führt^{170;171}.

Es war bereits möglich, 18 verschiedene Mucingene zu identifizieren³²², von denen einige durch inflammatorische Mediatoren induziert werden^{171;323-328}. In diesem Zusammenhang scheint IL-1 die Mucinsynthese zu regulieren, was vermutlich mittels PGE₂ und verschiedener MAP-Kinasen geschieht^{171;322}. Der genaue Mechanismus, der dieser Regulation zu Grunde liegt, ist zwar noch nicht vollständig erforscht. Dies widerspricht jedoch nicht der Schlüsselrolle von IL-1.

Ein IL-1-Übergewicht verursacht zusätzlich eine Überempfindlichkeit der Atemwege (BHR: bronchiale Hyperreaktivität), indem es eine wichtige Rolle bei der asthmatischen Veränderung des Kontraktionsverhaltens der glatten Muskulatur der Atemwege spielt. Die Gabe von IL-1 vermindert zum einen die isoprotenerolvermittelte Relaxation in vitro^{329;330}, auf zum anderen führt die Gabe von IL-1ra bei antigensensibilisierten Tieren zu einer Inhibierung sowohl der Histamin-^{330;331} und Substanz-P-Überempfindlichkeit^{330;332} als auch der Einwanderung von Leukocyten, Eosinophilen und Neutrophilen in das Lungengewebe³³¹⁻³³³. IL-1 induziert die Abschwächung der durch den β -adrenergen-Rezeptor vermittelten

Relaxierung der Atemwege, indem es die Expression und damit die Wirkung des G_i-Proteins hochreguliert. Das wiederum inhibiert die cAMP-Akkumulation in der glatten Muskulatur der Lunge, so dass diese nicht mehr in der Lage ist zu relaxieren^{165;330;334}. Neben dieser direkten Auswirkung von IL-1 auf die BHR der glatten Muskulatur der Lunge wird durch IL-1 eine Vielzahl Cytokine, Chemokine, zellulärer Adhäsionsmoleküle und anderer Signaltransduktionsmoleküle hochreguliert, die zusätzlich die BHR verstärken¹⁶⁵.

Ein weiterer Beitrag, den das IL-1/IL1RA Ungleichgewicht zur Entwicklung der Entzündung bei Asthma liefert, liegt in der Wirkung von IL-1 auf die Proliferation von T_H2-¹⁶¹ und B-Zellen¹⁶². Durch die verstärkte T_H2-Proliferation wird die Schlüsselreaktion des allergischen Prozesses verstärkt und durch die B-Zell-Proliferation ein Beitrag zur Verstärkung der Sofortreaktion geliefert.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass das IL-1/IL-1ra-Ungleichgewicht in verschiedener Hinsicht einen erheblichen Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung der Entzündungsreaktion bei Allergie und Asthma hat.

6.5.3. IL-1/IL-1ra Ungleichgewicht und andere Erkrankungen

Das Ungleichgewicht zwischen IL-1 und IL-1ra scheint nicht nur bei Asthma, sondern auch bei anderen komplexen inflammatorischen Erkrankungen eine Rolle zu spielen. Als Beispiele können in dieser Hinsicht rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, multiple Sklerose, Alzheimer und Diabetes genannt werden, die auch mit SNPs im *IL1RN*-Gen assoziiert sind¹⁴³ (vgl auch <http://geneticassociationdb.nih.gov/>). Diese Krankheiten sind ebenso wie Asthma durch einen verstärkten entzündlichen Prozess gekennzeichnet, der jedoch jeweils andere Gewebe betrifft und unterschiedlich reguliert ist. Aufgrund der positiven Assoziationsergebnisse und der generellen Ähnlichkeit der Erkrankungen hinsichtlich der Entzündungsreaktion ist es wahrscheinlich, dass Mutationen in *IL1RN* eine generelle Prädisposition für inflammatorische Prozesse begründen, die jeweils durch verschiedene Gen-Gen-Interaktionen sowie Umweltfaktoren ausgelöst werden.

6.6. Ausblick

Die Identifizierung von *IL1RN* als ein Gen, welches möglicherweise den Krankheitsverlauf von Asthma bronchiale beeinflusst, trägt dazu bei, die genetische Komponente zu beleuchten, die dieser komplexen Erkrankung zu Grunde liegt.

Im Zuge dieser Erkenntnisse sind verschiedene Schritte erforderlich, um die Ergebnisse zu bestätigen und zu untermauern.

Zunächst sollten sämtliche SNPs, die in dieser Arbeit signifikant mit Asthma getestet worden sind, in weiteren Familien- und Fallkontrollstudien in unterschiedlichen ethnischen Populationen auf Assoziation untersucht werden, um die Ergebnisse allgemeingültig, d.h. nicht nur für die bereits analysierten Kaukasier, zu bestätigen.

Des Weiteren erscheint es notwendig, sämtliche in den Promotorregionen neu identifizierte SNPs in der deutschen Asthmafamilienstudie sowie in den oben genannten Replikationsstudien zu genotypisieren. Im Anschluss an die Genotypisierung ist es erforderlich, diese DNA-Variationen auf bestimmte DNA-Bindemotive hin zu untersuchen, welche die Regulation der Expression dieses Gens beeinflussen können, da in dieser Arbeit keine funktionelle Mutation identifiziert werden konnte. Hierbei bietet es sich auf der einen Seite an, mit speziellen Computerprogrammen bekannte DNA-Motive zu identifizieren³³⁵, und auf der anderen Seite, mittels Promotorstudien die DNA-Varianten zu finden, die an der Entstehung von Asthma beteiligt sind.

Zusätzlich ist es angeraten, unter Zuhilfenahme von transgenen Mäusen die Auswirkungen bestimmter SNPs zu testen.

In 2003 wurde von Allen und Mitarbeitern³³⁶ Assoziation mit *DPP10* (Dipeptidyl Peptidase 10), einem Gen, 800 kb vom IL-1-Cluster entfernt, gefunden. Zu diesem Zweck sollten die in diesem Gen gelegenen SNPs genotypisiert werden, um zu überprüfen, ob in der deutschen Asthmafamilienstudie ebenfalls eine Assoziation mit Asthma und besagtem Gen ermittelt werden kann. Würde Assoziation gefunden werden, wäre zu vermuten, dass in der Kopplungsregion 2q12-14 auf dem Chromosom 2 mindestens zwei Gene lokalisiert sind, die zur Entwicklung von Asthma bronchiale beitragen.

7. Anhang: Primer

7. Anhang

7.1. Verwendete Primer für die Genotypisierung

rs ID	1 st Primer	2nd Primer	Extension Primer	Stop Mix	Amplicon [bp]
<i>IL1R2</i>					
719248	ACGTTGGATGTGGATCACTCAAAGCCCAAG	ACGTTGGATGACAGGAGTTAATCCGTAGGG	TCATATTTCACTTGTGAGAGA	ACT	100
719248	TCACTCAAAGCCCAAGAGTC	GGCGCACGCCTCCACGTAGACCAGAGTGTTAGCAGG	CATATTTCACTTGTGAGAGA	ACT	151
719249	TCACTCAAAGCCCAAGAGTC	GGCGCACGCCTCCACGTAGACCAGAGTGTTAGCAGG	GCCCAAGAGTCCTCATATTTAC	ACG	150
719250	ATCCAGGGAGAAAAGCAAC	GGCGCACGCCTCCACGTGTGAGAAGGTCATCAGG	ATAGCTTGACAAGTTTATGAA	ACT	150
733498	TAAGTCTGAGATCTGTGTTTGTGA	BIO-AGTGAACTGGAAAGCCAATGAT	CACAGCGCACAGTTGGA	CGT	139
<i>IL1R1</i>					
871656	ACGTTGGATGGGCTGAGAAGCCATAAGTTC	ACGTTGGATGTTCTCTGCCACCTGCAAAATG	GCCATAAGTCCCACAAC	CGT	98
871656	CATAAACCAGAGGTGGGTTCT	GGCGCACGCCTCCACGAGCCCTTGGCTTAAAACCTG	AGCCATAAGTCCCACAAC	CGT	150
871657	TGTCTACTGGAAGAGCCATG	GGCGCACGCCTCCACGACTTATGGCTTCTCAGCCTC	TCCAACAACATCATGTTCTG	ACT	163
871658	ACGTTGGATGGGACTTCTGACTTGGATAGC	ACGTTGGATGCACAGAAATTCAGGCAGG	CTTGGATAGCCATTCAACTGC	ACT	100
871658	GACTTCTGACTTGGATAGCC	GGCGCACGCCTCCACGTTAACCCACACACTCCAAC	GGATAGCCATTCAACTGC	ACT	151
871659	ACGTTGGATGTTGAGGGACTTCTGACTTGG	ACGTTGGATGACAGAAATTCAGGCAGGG	CTTCTGACTTGGATAGCC	ACT	104
871659	TTGAGGGACTTCTGACTTGG	GGCGCACGCCTCCACGTTAACCCACACACTCCAAC	GGACTTCTGACTTGGATAGCC	ACT	157
874108	BIO-CAACATAGATGGCATGTTGAGTAAA	ACTGTTCTAAGCCCTTTGCATGT	CATAGCGCCATCAATGACAT	CGT	139
949963	ACGTTGGATGTGATTCATTTCTGCACCCCG	ACGTTGGATGAGAGCTTGACAACCACAAGC	CACCCCGGTGTCTAGCAAAGTGC	ACG	101
949963	BIO-TGACAACCACAAGCTATTTTGATTA	AAAACCTCAAGCTCTGTTTTACAG	CCGGTGTCTAGCAAAGTGC	ATG	135
951192	ACGTTGGATGGGCTAATGTGACAGAGGAAC	ACGTTGGATGAGGTGCATGGAGTTATGGAC	TGACAGAGGAACTAATTTTTAAT	ACT	110
951192	CACATGTGGCTATTAAGCCC	GGCGCACGCCTCCACGGTGCAGTAGTTACTAGGTGC	GACAGAGGAACTAATTTTTAAT	ACT	149
953209	BIO-TTTGTAGATTGAGAGATCAATGCAG	TATNTAAGGTTTTCTTGCCCTCTTCC	TTTGCCCTGCTGGCC	CGT	138
997049	ACGTTGGATGGGAGCTCCATTTTTTACC	ACGTTGGATGAACTGTTTCCAAAAGCCAG	CTGGAAAAGTTCCTTACATATAGT	CGT	124
997049	AATAACCAATAACTTTCCCAATCT	BIO-CTGTTTCCAAAAGCCAGTATTA	CTGGAAAAGTTCCTTACATATAGT	ACG	136
<i>IL1RL2</i>					
867770	ACGTTGGATGACACTGCAGAAGTAGCTTGC	ACGTTGGATGGCAGGTGGTATTTTCAGAG	AAGTAGCTTGCCCTGAGAGC	ACG	106
867770	AGGTGGTGTATTTTCAGAGTTGATTC	ATCTGTGAAAGTACTCAGGAAGTGG	AAGTAGCTTGCCCTGAGAGC	ATG	125
870684	ACGTTGGATGCCCAAATTAAGTCTCAGCAC	ACGTTGGATGAGAGCGCGAAGTAACCTCAG	CAGTGGTTTTGGGTCCC	ACG	101
870684	BIO-TGAATGTCAATTTAGCAACTGAAGA	TTTTTGTTCATCCCAAATTAAGTCTC	ACAGTGGTTTTGGGTCCC	ATG	116
917994	ACGTTGGATGCCTCCCTTAGAATTGCAGTG	ACGTTGGATGGTGAAGCAGAGAATGTGCAC	GTGAATAGGATCTGTGC	ACT	97
917994	GACACAGAAGTGAAGCAGAGAATGT	BIO-TTAGAATTGCAGTGAATAGGGATCT	AGAGCTGCAAGCTGCCA	ACG	80
955754	ACGTTGGATGTGAGTCTAAGTCCACCACTC	ACGTTGGATGATTACAGCCATGCACCACTG	AGAAATGAGAATTAAGGCGAG	ACT	110
955754	BIO-TCTTTTGTAGTCTAAGTCCACCACTC	TCCTGCTCAGCTTGTATTACAG	ACTGCGCTGGACGAGTCT	ACG	113

7. Anhang: Primer

rs ID	1 st Primer	2nd Primer	Extension Primer	Stop Mix	Amplicon [bp]
995514	AACTAACTGGTCACAGCATTAGCTC	BIO-CCCAACTACTGACTTGTTGAACTTTT	GACTTGGCCTCAGAATCCTTC	CGT	99
995515	ACGTTGGATGGGAAATCGCTATTGGTCAGC	ACGTTGGATGAGGAGACCTGAAGTGGTTAC	TTGGTCAGCTTCAGTCTAT	ACT	118
995515	AGTGCITTTCAAAAAGTTCAACAAGT	BIO-CAACTTAAATCTGTCCCAACCTAGA	CGCTATTGGTCAGCTTCAGTCTAT	ACT	116
1024790	BIO-AAGAAAATTCAGCTGATTCTTACA	CTATCTTGTCCACTTAGGAGCTGG	GCTGGGTGAGGACAGCA	ATG	137
1024791	ACGTTGGATGTTTCCAGCTGTGTAAGGGAC	ACGTTGGATGAAACAGAACCAGGAGGTTGG	ACTGGCTGATGTCAGAAAGCA	ACG	102
1024791	BIO-GAAGATACAGGAGTCCCACATAACAA	GTGTAAGGGACTGCAGATACACTG	TGGCTGATGTCAGAAAGCA	ATG	108
1024792	ACGTTGGATGTTGCATGTAGCTAGCCACAC	ACGTTGGATGGCTGTGTGGTTTACCAAGAC	TGCAAACACACACACACACA	ACT	131
1024792	ATCATTAAAGGACATCAGCAAATTC	BIO-TTACCAAGACAGTTGTTCTTGATTCT	TGCAAACACACACACACACA	ACT	138
1030021	ACGTTGGATGAATCACAGGATAGCTTTTAC	ACGTTGGATGCATTGCTTCATGTTCTTACC	GGATAGCTTTTACATCAGAGC	CGT	111
1030021	TCATTGCTTCATGTTCTTACCAATA	BIO-GGGCATAACCTCTCAATCTAAATGT	TTTTAAATTTTGGCAGTTTTCG	ACG	128
1465326	BIO-GAACTCCTTGTCAGTGTGTTTG	GAGCAACTTATTCAAGGTCACAAAAG	GAGCAACTTATTCAAGGTCACAAA	ACT	113
1558646	ACGTTGGATGGGCCTTGGTTAGAGTTTAGG	ACGTTGGATGCCTGATGGTAGGATCACTG	GTTAGAGTTTAGGGCACAT	ACT	122
1558646	BIO-TTGGCATAAATGGTGTATTTTCT	AAGGAAGGTCAGTAATTAGAGGGAA	TTGGTTAGAGTTTAGGGCACAT	CGT	138
1558647	ACGTTGGATGGAAAAATGTGGTCAATCTCAC	ACGTTGGATGCCTACAACCTTGTGTTGAAC	GTACATTTTATACCCACCAAA	ACG	149
1558647	TGAAAAATGTGGTCAATCTCACTAA	BIO-TTCCTACAACCTTGTGTTGAACTTT	AAGGTACATTTTATACCCACCAAA	ATG	132
1558648	ACGTTGGATGCCTACAACCTTGTGTTGAAC	ACGTTGGATGAGGTACATTTTATACCCACC	TTGAACTTTGTATTATAAGCC	ACT	96
1558648	BIO-TGAAAAATGTGGTCAATCTCACTAA	TTCCTACAACCTTGTGTTGAACTTT	TGTTGAACTTTGTATTATAAGCC	ACT	132
1558649	BIO-ATCTAGAATACTCCTGGTGAGCCAT	TTTGTGTGACAGAATCTTGCTATGA	TGGCCTCCCAAAGTGGT	CGT	140
1805232	CTCTTGAGTAGCTGGGACTACAGG	BIO-GTGAACCCCGTCTCTACTAAAAAT	AGGCGCCCGCCACCGCGCCC	CGT	84
1882513	ACGTTGGATGAAAGTAGAGAGGTCAGGTGG	ACGTTGGATGGGGCATTACACTTTTCCACC	GGTGGGCTAATCCAGTTAAGA	ACG	109
1882513	BIO-CATTACACTTTTCCACCTGAACTTT	TACCTGAAAGAGCTTGGAAATTAGA	GGTGGGCTAATCCAGTTAAGA	ATG	113
1882514	TCTAATTTCCAAGCTCTTTCAGGTA	BIO-AGAGTTGAGTACTGGAAGGGAAGT	GGATTCACGTGCCATCACTT	ACT	99
1922289	ACGTTGGATGATACAGGCCATGACCTACTC	ACGTTGGATGAATGGCTCTGGAGGAAAACC	CTCCACCATCCAAAGGCA	CGT	134
1922289	BIO-GGAAAACCAGATTTAGGAGTGAGAT	CATGTCTCCAGTCCTTCCCTAAG	TCCACCATCCAAAGGCA	CGT	136
1922290	TATACACACCCAGTTTCCAGC	BIO-GACTTCTCTGCTACCACAACCTTTT	CCAGTTTCCAGCTTTGGATATAC	ACT	109
1922291	ACGTTGGATGGACTTCTCTGCTACCACAAC	ACGTTGGATGGATATACGTGAGCTCATGGG	TGCTACCACAACCTTTTCCA	ACG	104
1922291	GAGAGGAATCAAAATAAACACCAG	BIO-ATAGTCCTCATTGCCAGACTTCTCT	ACACCAGAGAGCCGAAGC	ACT	80
1922292	ACGTTGGATGGAGGCAATGCTTATTGATCC	ACGTTGGATGATGTTGACCAGGAGTTCTGG	CATCATAATTTTTTCACTCCT	ACT	140
1922292	ATGTTGACCAGGAGTTCTGGATTAT	BIO-CAATGCTTATTGATCCTTTTCCATA	ACCTCACAATGCAAGATATATTA	ATG	116
1922293	ACGTTGGATGGACCCTGCTTCAGAAAAACC	ACGTTGGATGGCTAAGGTTATAGCTTCTCC	TCTGGAGGTGTCTTTAACAAAC	ACT	111
1922293	BIO-TGCTTCAGAAAAACCAATAAGATT	GGGACAGAGCTAAGGTTATAGCTTC	GCTTCTCCATTTGACTTCCTTA	ATG	94
1922294	ATGATTATGCACTGTCTTCCCTAAG	BIO-ATACAAAGCAAACACTGGAATGAC	CCCTAAGAGTCCCCATTGG	ACG	131
1922295	ACGTTGGATGTATATCATGAGCCATCGGCC	ACGTTGGATGGTGCATTTCCAGTGTITTC	CCTTCAAAGCTTAATGCC	ACG	89
1922295	BIO-ATACACATTTGTCTATTCCAGTG	TCCCATTCTCATTGTTATATCT	GCCTTCAAAGCTTAATGCC	ATG	96
1922302	BIO-AGTAATCCCATTTACAATAGCCACA	TCTTCTACTTCTTGGTTAATCTCT	TTCTAGGTATTTAATTTTCG	ACT	115
1922303	AGTAATTTGTTAAGGTCATGCAAGC	BIO-GGGGCTGAATAAACACATCT	GCCCTCAGGCTAAATTTGTTC	ACG	96
1971695	BIO-CTCTTGAGTAGCTGGGACTACAGG	GTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAAT	AAAATTAGCCGGGCG	ATG	84
1971696	CTCTTGAGTAGCTGGGACTACAGG	BIO-GTGAACCCCGTCTCTACTAAAAAT	AGGCGCCCGCCACCG	ACG	84

7. Anhang: Primer

rs ID	1 st Primer	2nd Primer	Extension Primer	Stop Mix	Amplicon [bp]
1997502	ACGTTGGATGTCCTGGGAGTCGCAATGACT	ACGTTGGATGCGTATTCTTCTGGAAGCTC	AGTGAGAGAGACACACCA	ACG	127
1997502	BIO-TCAGTGAGAGAGAGACAGTGAGA	GGTTCAGTTGCTTTCTACTTTTTGA	TGGAAGCTCAGGCCCC	CGT	113
1997503	ACGTTGGATGGCACAGGCTAGTCATTTGAG	ACGTTGGATGAAAACATGACCCAGAGGG	ATTAGTTTTCTGCTTGTTAA	ACG	103
1997503	AATTTGCGTAATCTTTACCATTA	BIO-AGATTGGAATTAGTTTTCTGCTT	GGGTGTGCTGGCAGGC	ACT	128
1997504	BIO-ATTTTTAGTAGAGACGGGTTTCAC	CTGTAATCCAGTACTTTGGGAGG	GGGCGGATCACGAGG	ACG	102
<i>IL18R1</i>					
12905	ACGTTGGATGTTAAGCAGCAGAGAAGCTCC	ACGTTGGATGGCCTGTGCCATAAAATGTGC	AGATCAGACAGCAAACAACATCC	ACG	118
12905	BIO-CTAGCAAGTGTAAAGCAGAATGGAGT	CAGTCTACAAAAGATCAGACAGCAAA	GATCAGACAGCAAACAACATCC	ACG	125
873022	ACGTTGGATGTCCAAATAGCTCAGAATGAG	ACGTTGGATGCCTAGTCCTTTCTGGAACAG	GCTCAGAATGAGCTAGAC	CGT	133
873022	CCTAGTCCTTTCTGGAACAGTTAAA	BIO-CTGCAACTGTAATCCAAATAGCTC	CTTCTAGGAATACTATCAGGTTGA	ACG	126
985523	BIO-GAAGTTTTGGTCCATATAGCTTTCA	ATGAGACTGGTGAATATAACTGCG	AAGTAGCATGATAACTGTGAAATA	CGT	86
1041973	ACGTTGGATGAATCGTGTGTTTGCCTCAGG	ACGTTGGATGGGGACTTCTGACAATACAGG	TCTGAAGTTTCTACCAGCTG	CGT	110
1041973	AGAAATCGTGTGTTTGCCTCAG	BIO-GAATGTGGGACTTCTGACAATACAG	TTCTGAAGTTTCTACCAGCTG	ATG	84
1054096	ACGTTGGATGAAGCAGGAGTACACAAGGGC	ACGTTGGATGTAGACCCTGCAGCCATCCATC	GTACACAAGGCGAGTGTG	ACT	80
1054096	CAGTAGACCCTGCAGCCATC	BIO-ATCAATGATAACGTAGCAAAGCAG	CATCCAGCCTGCCAC	ACG	81
1420101	ACGTTGGATGGTATACCATCACAAAGCCTC	ACGTTGGATGTTTGGTGTGAGTTTCTGC	CATCACAAAGCCTCTCATT	ACT	115
1861245	ACGTTGGATGTGCTGCCTTCAATGTGTGAC	ACGTTGGATGAGGAAAGGTGAGGACATG	CTGGAATGGTTTTCTACTTCC	ACG	103
1861245	TTCTTAAGTGAAGAGTGAAGTTTGG	BIO-AATCTGGAATGGTTTTCTACTTCT	CAGAGGACATGCATTGACAGA	CGT	108
1861246	TAGTATGTTGTACACATTGAAGGC	BIO-AGCTCTTACCTCTTCTTTTCTCAGT	AGTGTAACTAGAACTTAGGTGGAT	CGT	126
1921622	ACGTTGGATGTTTCTAGCTAGTGCCTATGGC	ACGTTGGATGCAGGATAACTCTGCCACTTC	GTGCCTATGGCTACCAGAACAAAA	ACG	119
1921622	BIO-TTCTGTCCATAAGATTTGAAAGAGG	TGTTTACCAACATAAAGAAAGTCA	GCCTATGGCTACCAGAACAAAA	ATG	128
<i>IL18R1</i>					
869085	ACGTTGGATGGGTTTTGAACCTGTGAAGG	ACGTTGGATGAGAAGTCTCAAGTTTCCAG	GTTTTTTCTGCAAAACACA	ACG	140
881890	BIO-TAACGAACAGAGCCTACTGCTAAAT	TGCTTTCACCAATATTTTCAATTCT	TTGCCTTCTGGAGTCTGTAA	ACT	105
1035130	ACGTTGGATGTGTATATTAGGATCCGATCC	ACGTTGGATGCTGTCTTTGCTGAATGAAG	CGATCCATTTCTTCCCC	ACT	95
1035130	CATAATTCTCATTTCTTCTTCTCATGT	BIO-GAAGAGGATGTAATTTATTGGATGTTT	CGATCCATTTCTTCCCC	ACT	84
1057336	TTGTGTACCAACTGGATGAC	GGCGCACGCCTCCACGGAGACTATGCAATAGCAATG	GATGACTAAAAAGAGTAAATAA	ACG	140
1362348	ACGTTGGATGCATGTCATAGGAAGAGTAGG	ACGTTGGATGTGCTCTTTGTTTCTAGCAACTC	GAGTAGGAAAGAAAAGGATGTG	ACT	109
1362348	TCATGTCATAGGAAGAGTAGGAAAGA	BIO-CCCTTCTTTTCAAATGTATTTCA	AAGAGTAGGAAAGAAAAGGATGTG	ACT	124
1420094	ACGTTGGATGGCTTCTAGGACATGACAGAC	ACGTTGGATGGCACAACTACCTTTCTAGGG	TAGGACATGACAGACATGTAAGA	ACT	84
1420094	BIO-GAGTAAATGCTTCTAGGACATGACA	TGCCCTTAAACTGTGAAGTCTATTT	AGGGCACGTGAAGAAACAC	ATG	107
1420095	AATTTAAGATAACTGAAAGGGGGAA	BIO-GCATATAAAATTAAGAACAAATGGTTT	CATTTTGCACAGTCTTATTTTATA	ATG	128
1420095	ACGTTGGATGGAACAAATGGTTTGTCTTAAAG	ACGTTGGATGGGGAACATGAGATAAAAGTC	ATTAGTAGGTTAGGAGTTA	ACT	114
1420096	ACGTTGGATGATGTTTTCCATCTAGGAGG	ACGTTGGATGCTTACTTACGACATTCAC	CATCTAGGAGGTAAGATTG	ACT	118
1420096	AGCATCATATGTTTTCCATCTAGG	BIO-ACTTACGACATTCACCTTAAGTTTGTACT	TTTTCCATCTAGGAGGTAAGATTG	ACT	100
1420097	ACGTTGGATGCAGGTTTTAAAGGTTTAGGG	ACGTTGGATGACCATTAGTTTTCAAATTCC	AAAAGGTTTAGGGGACTTGA	ACT	97
1420098	ACGTTGGATGAATGTGGGGACGTGAAGTAC	ACGTTGGATGACCTAATGCATTAGGAGACC	CGTGAAGTACAAGATTCTTCA	ACT	131
1420098	BIO-AGCAATGTTTCTAGATAGAAAGGTTT	TACCTTGTCAATTTGGTTTTGTTT	ATTTATTTACTTTACTAATCTT	ATG	122

7. Anhang: Primer

rs ID	1 st Primer	2nd Primer	Extension Primer	Stop Mix	Amplicon [bp]
1420099	ACGTTGGATGTTACACACTCTCCAGAGGTG	ACGTTGGATGATCCAAAGCTTCTAGCTGCC	GTEGGAGGTTGATAATTGAAA	ACT	100
1420099	TGTGCTCTCTGGAAGTATTACCATT	BIO-TAGATATCCAAAGCTTCTAGCTGCC	GGTGGGAGGTTGATAATTGAAA	ACT	129
1465321	ACGTTGGATGTCACAGCTTTGGGTCAGTTG	ACGTTGGATGTCAACAACACACTGCACCTG	GGCCTCAGTGTTAACCC	ACG	98
1465321	BIO-AACACTCAACAAATGCTAGAGGACT	GGTCAGTTGGCCTCAGTGTTA	TTGGCCTCAGTGTTAACCC	ATG	138
1558627	ACGTTGGATGTCTCCTTTTCATTAAGGTCAC	ACGTTGGATGCCTACTCTTCCCTATGACATG	AGCAGAGAGAGATAAACTTATT	ACG	117
1558627	BIO-CCCTAAAAGGAAATCCTATCAAAGT	CATCCTTTTCTTTCCTACTCTTCCCT	AAATACATTCCTTTGTTATGGAACA	ACT	137
1568681	ACGTTGGATGTGCATCTGCCTCTTTTGACG	ACGTTGGATGATCATCAAGAAGGCTCCCAG	GACGTTGGAAGACACATGTCTTAC	ACG	100
1568681	BIO-AAAGATATCTCTCCATTGTGCATCT	CAGTCACTTGGTGATTTTCTTGAAT	GGGCTCCCTTTGGGG	CGT	139
1882348	ACGTTGGATGCCTACTCTTCCCTATGACATG	ACGTTGGATGTCTCCTTTTCATTAAGGTCAC	TCCTATGACATGAAATACATTCT	CGT	117
1882348	BIO-CCCTAAAAGGAAATCCTATCAAAGT	CATCCTTTTCTTTCCTACTCTTCCCT	TTCCTATGACATGAAATACATTCT	CGT	137
1974675	ACGTTGGATGATCAACTAAGAAGGAAGGGG	ACGTTGGATGGTACATTTCCCTTACCTTC	AAGGGGATACAAAAGGGATA	ACT	100
1974675	BIO-CTGTGTGTACATTTCCCTTACCTT	ATCCTGCAGTAAAATCACTTTATC	GGAAGGGGATACAAAAGGGATA	CGT	132
2001461	ATCGAGACCATCCTGGCTAAC	BIO-CTCCCAGTAGCTGGGACTAC	CTGGCTAACAGAGTAAAACCC	ACG	104
<i>IL18Rap</i>					
885088	GTGGTTTGAAGGTCCCATG	GGCGCACGCCTCCACGCCTCCAGAGAATCAGATCTG	TCCCATGACTGCCTTATCA	ACT	100
887971	ACGTTGGATGGTTGCTTTCTAAGACAGTG	ACGTTGGATGCCTTTTGATCAACACCAGAG	AATGAGTGAACCTATCTTCCCT	ACT	149
887971	GTTGCTTTTCTAAGACAGTG	GGCGCACGCCTCCACGCCTTTTGATCAACACCAGAG	TGAGTGAACCTATCTTCCCT	ACT	145
887972	ACGTTGGATGCAGGGCCAGTTTTGAGAAG	ACGTTGGATGATGGTATCTTCTTTCATGGGC	GATTCTCAAACACGCCTTTTC	ACG	100
887972	CAGGGCCAGTTTTGAGAAG	GGCGCACGCCTCCACGATGGTATCTTCTTTCATGGGC	GATTCTCAAACACGCCTTTTC	ACG	96
917998	ACGTTGGATGAACCTTGAGTCAGAGAGGTC	ACGTTGGATGAAACATGTCTCCCTTCCCTCC	AGTCAGAGAGGTCCTTGCAAT	ACT	84
917998	AACCTTGAGTCAGAGAGGTC	GGCGCACGCCTCCACGAAACATGTCTCCCTTCCCTCC	CAGAGAGGTCCTTGCAAT	ACT	80
917999	ACGTTGGATGGGCTGAGATCTGGACTTCTC	ACGTTGGATGACAAAGCTCACTCAGCACTG	ATCTGGACTTCTCAGGGTGT	ACG	104
917999	GGCTGAGATCTGGACTTCTC	GGCGCACGCCTCCACGACAAAGCTCACTCAGCACTG	CTGGACTTCTCAGGGTGT	ACG	100
918000	ACGTTGGATGACAAAGCTCACTCAGCACTG	ACGTTGGATGTGAGATCTGGACTTCTCAGG	TTCTCAGGCCTGGGCCA	ACG	101
918000	TGAGATCTGGACTTCTCAGG	GGCGCACGCCTCCACGTTCCACAAAGCTCACTCAGC	TCTCAGGGTGTCCAGGGC	ACT	101
1420100	ACGTTGGATGTTAGTTACCACGATGCCAG	ACGTTGGATGGCATCAGTAGGCAGTATCTG	TCTCCAGCACTCAGGAAT	ACT	101
1420100	TTAGTTACCACGATGCCAG	GGCGCACGCCTCCACGGTGCATCAGTAGGCAGTATC	GTCTCCAGCACTCAGGAAT	ACT	99
1420105	ACGTTGGATGCCATGGACATTGTGAAATGG	ACGTTGGATGCTTCAGAGCACTTCCCTACTG	GGTCATACAGAGGAAAATCA	ACT	98
1420105	CCATGGACATTGTGAAATGG	GGCGCACGCCTCCACGTTTCAGAGCACTTCCCTACTG	GGTCATACAGAGGAAAATCA	ACT	94
1420106	ACGTTGGATGCAGTAGGAAGTGCTCTGAAG	ACGTTGGATGGGAAAACCAGTTACTCACTC	TTCTCTGACCAACCTCCTTGA	ACG	132
1420106	CAGTAGGAAGTGCTCTGAAG	GGCGCACGCCTCCACGGGAAACCAGTTACTCACTC	CTCTGACCAACCTCCTTGA	ACG	128
1558650	GTAGGAACAGTTTGACGTGG	GGCGCACGCCTCCACGCTTATCTCCAAGCAGTCTGG	CAAGCTATTGAGCAGACAG	CGT	98
1558651	TTGCATCAGGAGACAGCTTC	GGCGCACGCCTCCACGGTGCCAGAGAAAACAAGAAGG	CCCAGATGATGACAAAAGT	ACT	104
1833174	ATAAAATGGTGTGGAGAC	GGCGCACGCCTCCACGGTGACCTTTGAGATAAACAC	TTGGAGACATAATTTTCTTTT	CGT	105
2058658	GAGTTTCACTTGGTCTGGG	GGCGCACGCCTCCACGGTGGTTGACGTAGCTGTTAG	GGTTTGTATCTTGTAAATAAGA	ACT	105
2058659	ACGTTGGATGTGCTCCATAGTATACTTCCC	ACGTTGGATGGCGGAAGAAAGCCAATGAAC	TAGTATACTTCCCTGACTAATAT	ACT	100
2058659	CCATAGTATACTTCCCTGAC	GGCGCACGCCTCCACGGACAAGTTGCGGAAGAAAGC	GTATACTTCCCTGACTAATAT	ACT	100
2058660	ACGTTGGATGGTTTGCCAATTTACAGCCCC	ACGTTGGATGAGCTCCACTTAACACCAGTC	ATTAGCAGTAAATGCCCTTT	ACT	115

7. Anhang: Primer

rs ID	1 st Primer	2nd Primer	Extension Primer	Stop Mix	Amplicon [bp]
2058660	GTTTGCCAATTTACAGCCCC	GGCGCAGCGCTCCACGAGCTCCACTTAACACCCAGTC	ATTAGCAGTAAATGCCCTTT	ACT	111
<i>IL1A</i>					
17561	ACGTTGGATGTTTCACATTGCTCAGGAAGC	ACGTTGGATGATCTGCACCTTGATCATGG	CTCAGGAAGCTAAAAGGTG	CGT	96
17561	BIO-ATCTGCACTTGTGATCATGG	CGTCATTCAGGATGAATTCG	CTCAGGAAGCTAAAAGGTG	CGT	122
17562	CACCTTTTAGCTTCTGAGC	BIO-TGATTGAGGGCGTCATTACAG	CCTGAGCAATGTGAAATAC	ATG	85
20540	BIO-CTGAAGAAGAGACGGTTGAG	ATTGTGCTTGACCCCTTACC	CTCCAGGTCATCATCAGT	CGT	98
1304037	ACGTTGGATGAGCCACAGACCTAGGATTTT	ACGTTGGATGGAGGTCCCAGAACTTATGC	ATTTCAACTGTTTGCCCTTCT	ACT	122
1304037	AGCCACAGACCTAGGATTTT	BIO-GAGGTCCCAGAACTTATGC	ATTTCAACTGTTTGCCCTTCT	ACT	102
1516792	BIO-TCAACACTTATTCAGCCCCG	TGTCTTCCACACTCACTAGG	AAATACTTGGTTAATGTTCTTA	CGT	93
1533463	ACGTTGGATGGGAGATAATCAGAATCCCC	ACGTTGGATGGCTAGCTCAGTCTGTAAAGC	AATCCCCACTCATTGGA	ACG	95
1533463	TGCCTCCTTGGTCATGTTAC	BIO-GTCTGTAAAGCCTGAGACTC	AATCCCCACTCATTGGA	ATG	124
1609682	ACGTTGGATGAAGACAGGTCTCTGGATCTC	ACGTTGGATGCTTCATCCAAAGAGAACAGC	TGAGGGTAAAACAAAAGTATT	ACT	100
1609682	BIO-TGGGACTGCTATTCTTACAC	TCTCTGGATCTCTAGTGAGG	TGAGGGTAAAACAAAAGTATT	ACT	100
1801715	GGTCTTCTCTTACCAGTG	BIO-CATCTTGGCAGTCACATAC	GTGCTTATAAGTCATCAAAG	ACT	120
<i>IL1B</i>					
15610	GAGCACACCAGTCCAAATTG	GGCGCAGCGCTCCACGTTCTGATGAGCAACCGCTTC	AAAACTAGGCTCTTTTACAGACA	CGT	174
16062	TCCAGCTACGAATCTCCGAC	GGCGCAGCGCTCCACGAGAAGGTGCTCAGGTCATTC	GAATCTCCGACCACCACTA	ACG	154
16944	ACGTTGGATGATTTTCTCCTCAGAGGCTCC	ACGTTGGATGTGTCTGTATTGAGGGTGTGG	TGCAATTGACAGAGAGCTCC	ACG	111
16944	ACCCTGCATACCGTATGTTT	GGCGCAGCGCTCCACGTGTCTGTATTGAGGGTGTGG	GCAATTGACAGAGAGCTCC	ACG	150
1071676	ACGTTGGATGCAGAACCATTGAACAGTATG	ACGTTGGATGCTGGTGTGCTCTCTTAAATC	ATCTGAGCTTATATATTTTCAGT	ACT	135
1071676	TCAATGATCAGGAAAGACCC	GGCGCAGCGCTCCACGATTTGGACTGGTGTGCTCTC	CTGAGCTTATATATTTTCAGT	ACT	188
1133555	AGACAGAGAGACTCCCTTAG	GGCGCAGCGCTCCACGACTGGCAGATACCAAACCTC	GCAGCTGTGTGCTT	ACT	149
1133558	ACAAAGAGGCAGAGAGACAG	GGCGCAGCGCTCCACGAAACCTCTTCGAGGCACAAG	GCAATGAAGATTGGCTGAA	ACT	150
1143623	CTGCTTGAATGGGTGAATGG	GGCGCAGCGCTCCACGGAACCTATTTCCCTCGTGTC	CGTGCTCGCTCTGCATTAT	ACT	150
1143624	TGTCCAGCCTGTAACACTTC	GGCGCAGCGCTCCACGAGCAAACCTATCCACCTG	AGCACAGTGCCTGGCAT	ACT	151
1143625	CTCTTTGACAGGTCTGCATC	GGCGCAGCGCTCCACGAGGAGAATGGTGTGAACCCG	TTTTGAGACAGAGTCTCAC	ACG	152
1143626	AACCTGGAGATAAGCTCAC	GGCGCAGCGCTCCACGCCACTTTTCAGAGTTCACC	TCAATGCCAGATGAGCTC	ACT	147
1143627	AGAGGTTTGGTATCTGCCAG	GGCGCAGCGCTCCACGCCACCAACTCTTTTCCCC	TCTCCCTCGCTGTTTTTAT	ACT	153
1143628	ACAAAGAGGCAGAGAGACAG	GGCGCAGCGCTCCACGAAACCTCTTCGAGGCACAAG	CTAGTTGTAAGGAAGATTA	ACT	150
1143629	GCTAAAATCTGAGCTCTCCC	GGCGCAGCGCTCCACGGAGGCTATCCAGATGTGTTG	CTTGATTGTGGGCTTGGGA	ACT	148
1143630	GAATAGCCTGTAAGGTGTC	GGCGCAGCGCTCCACGATCCCTCTCTGAAGCTCAAG	GCTGTGTGCCCTTGAGTACAC	CGT	126
1143631	ATTGTACCACTGCACTCCAG	GGCGCAGCGCTCCACGACACCCTTAACCTCCTTGAG	ATAAAACAAAACAAAACAAAACA	ACT	154
1143633	ACGTTGGATGTGACCGTATATGCTCAGGTG	ACGTTGGATGTAAATCAGAAGGGCAGGCC	CCTCCAAGAAATCAAATTTTGCC	ACT	98
1143633	GTATATGCTCAGGTCTCCTC	GGCGCAGCGCTCCACGCTTATCCCATGTGTGCAAG	CCAAGAAATCAAATTTTGCC	ACT	149
1143634	ACGTTGGATGAGTGATCGTACAGGTGCATC	ACGTTGGATGGTGTCCACATTTCAGAACC	CTCGTTATCCCATGTGTC	ACT	100
1143634	CACATAAGCCTCGTTATCCC	GGCGCAGCGCTCCACGAGGTGCTCCAAGAAATC	CCTCGTTATCCCATGTGTC	ACT	151
1143635	CCAGTGCAATCAAATGTGCC	GGCGCAGCGCTCCACGTGGCAGCTTGCTAATTCTCC	GTGTTGATCATTGCTTAA	ACT	153
1143636	AGGAGCGGAACAACCTGATC	GGCGCAGCGCTCCACGTCTCTCCCAGTTTCTTC	GGAAGGAAAGGAAAGAGGTGA	ACT	144

7. Anhang: Primer

rs ID	1 st Primer	2nd Primer	Extension Primer	Stop Mix	Amplicon [bp]
1143643	ACGTTGGATGACTCCTGAGTTGTAAGTGGG	ACGTTGGATGCCTCAGCATTGGGCACTAAG	CTGGGCCCCCAACTTTC	ACG	113
1143643	GAAAGGAACTGACGAGCAG	GGCGCACGCCTCCACGCCTCAGCATTGGGCACTAAG	AACTGGGCCCCCAACTTTC	ACG	149
1143644	CTCTGCAGCGAAAGAGAAAAG	GGCGCACGCCTCCACGTTACAACCTCAGGAGTCTGGC	GGCAAGGGACAAAAGATGC	ACG	152
<i>IL1F6</i>					
895497	ACGTTGGATGACCCGATGATTGATATCCTG	ACGTTGGATGGGGTGATATTCTGTGCTCTC	ATATCCTGAATGCTCCCC	ACG	130
1446511	ACGTTGGATGAGCTTCTCAGAGCCACTGTG	ACGTTGGATGTCAGGAGCTGGCTTTGCTAC	TGCATGCTGCTTCTCCATGG	ACT	95
1446512	ACGTTGGATGTCTAGAGTCCATTGAGGTGG	ACGTTGGATGATGCTGCTTCTCCATGGAAG	GGAGCTGGCTTTGCTACAGTAA	ACT	103
2289934	ACGTTGGATGGAATGGACTCAATCTCTGCC	ACGTTGGATGTGTCTTCCACACTCACCTTC	GCCTGATGTGTGCTAAAGT	ACG	100
2305151	ACGTTGGATGATGGCAAGGCCCTCAATTC	ACGTTGGATGATGCAGTGACCTAAGTGCTG	ACATGGCCCCAGGGAGA	ACT	102
2305152	ACGTTGGATGCAATTTTTCGCCCTTCCACG	ACGTTGGATGACTCCTATCCTTGGCAGTTC	GCCCTTCCACGAGGATC	ACT	99
<i>IL1F8</i>					
1006122	ACGTTGGATGAGGGACAAAGGCAGATGAAG	ACGTTGGATGTATGGGAACCCAGTGAGTTC	CAGATGAAGCAGGGCATTAGA	ACT	85
1562303	ACGTTGGATGAGGGCTGCAAAGAATGTGAG	ACGTTGGATGACTGTCCAGGATTACATTGC	TCTGTAATAGCTAAATGTGCAG	ACT	116
1562304	ACGTTGGATGTCTCCACATACAGGTCCATG	ACGTTGGATGCACACTCAGAGCTGAGTTAC	GGCTTGTAGAGAGGAGG	ACT	124
2197578	ACGTTGGATGTTAGGCCAGATGCTGAGTTG	ACGTTGGATGTTTAGTGGGTCAAGAGAGC	AGGCCAGATGCTGAGTTGAGGAGA	ACT	125
2218557	ACGTTGGATGATCACTTGAACCTGAGAGGC	ACGTTGGATGTTTTGAGATGGAGTCTCGC	CCTGAGAGGCGGAAGTT	ACT	118
2305148	ACGTTGGATGAGGGCTATTAGTGACTTGTC	ACGTTGGATGGGGCACCTAGCTCTTTTATT	ATGTCTAGGTGGTAAAAA	CGT	184
2305149	ACGTTGGATGACAATAGGATGGAAGGACCC	ACGTTGGATGGCCGTTTTAGGAACTGAGTG	TTGCTAAGCTATAAATGTATTT	ACT	102
2305150	ACGTTGGATGACTGTTAACAGCCTCCTCAC	ACGTTGGATGCGTTGTGGGTTTCATGATGTC	CCACCATCTGATCTATCTT	ACT	102
<i>IL1F9</i>					
2121334	ACGTTGGATGCCTCTGGATACTTGCATGTG	ACGTTGGATGGGATACTGCCCTGCTAAATC	TCAGTTTCTTTTGAAGTCA	ACT	134
2121335	ACGTTGGATGTCCTTCAAGTTTCGTCACAG	ACGTTGGATGTCATTCTAGACAGGGAGCTG	GTCCAGATGTGGCTCA	ACT	108
<i>IL1F5</i>					
768627	ACGTTGGATGCTGCAAACTCCGATCTCTG	ACGTTGGATGGAAAAGGAGAGGACACAGAG	CTTTACATAGTCTTCCCCGC	ACT	98
957200	ACGTTGGATGGTTCCTTACCCAGAGATTCC	ACGTTGGATGACAGATCTCAGCAAAGCCAC	GAGATTCAGCCACACAACTCA	ACT	92
957201	ACGTTGGATGCAATTTGAATTTACTCTGGG	ACGTTGGATGGAAAAGAAATTAATCTTGAGG	AGGACAATCAGAGATGATGTCT	ACT	106
990524	ACGTTGGATGAAGAAGGAAGAAAGGGAGGG	ACGTTGGATGTCAGACCCTAAGAGTCAGTG	GCAGGGAGGAAAGAAAGT	ACG	105
996878	ACGTTGGATGGTCTCTTTATAGGCCTGCTC	ACGTTGGATGCCCAATCTATCTTGGCTCAC	ATAGGCCTGCTCATAGCATGG	CGT	91
996879	ACGTTGGATGACCTAGAAGCAGAGACTCTG	ACGTTGGATGGCTGCATAACAAGTTAGACC	GAGACTCTGTGAGATAATC	ACT	100
1374285	ACGTTGGATGTGACAAGACAAGCCTCTTGG	ACGTTGGATGAAGTGAAGACACAGGCTCTG	AAGCCTCTTGGAAAACATTC	ACG	99
1374286	ACGTTGGATGAAGGATCTACCTGGCATCTG	ACGTTGGATGATTGTTGGACCTCCTGCTTG	AAACTATTTTAGAGAGGGAC	ACT	140
1446518	ACGTTGGATGAACATTATCAAACAGGCCTC	ACGTTGGATGATTTACAGAGTCTGAGACC	AAACAGGCCTACCAACA	ACT	111
1446519	ACGTTGGATGAGAGGATCTCAATCTTGCAG	ACGTTGGATGCAACTATCCTTCATTTACCC	CAATCTTGACAACCATGAT	ACT	111
1530548	ACGTTGGATGAGACTGACTGATGGTAATGG	ACGTTGGATGATGTAAGCTCACCACCTCTG	CCCAAAGAGTAGCAGGGAGG	ACG	107
1530549	ACGTTGGATGTTGGTACATGCCAGTGGGTG	ACGTTGGATGTCCCTCCCTGCTACTCTTTG	AGTGGGTGGACAGACTG	ACT	104
1530550	ACGTTGGATGATGTACCAAGCCAGACACTC	ACGTTGGATGAGACTGAGAGAAAGGACCAC	TGCCGTGTTCTGGGCTT	CGT	94
1530551	ACGTTGGATGCCTCTAATCGAGTCCCATAG	ACGTTGGATGAACAGAGGATGAGAGTGGTC	ATCGAGTCCCATAGAACACATC	ACT	99
1530552	ACGTTGGATGAAGAGAAGCTGCACGGTGAG	ACGTTGGATGAGTTGTCTCCTGCGACTCAG	CTAGTTCTTGCCCCATCT	CGT	102

7. Anhang: Primer

rs ID	1 st Primer	2nd Primer	Extension Primer	Stop Mix	Amplicon [bp]
1530553	ACGTTGGATGAACCTAGGGCTCTGACTCAC	ACGTTGGATGCTCCTTACCCTATTCAACC	ACCGTGCAGCTTCTCTTCCA	ACT	103
1800930	ACGTTGGATGAGGAATGATCCCACCACTC	ACGTTGGATGCCTTGAAAAACCATGTGGG	CACTCCCCACCCCACC	ACG	107
2251872	ACGTTGGATGCACCTTGCTGAGAGGTGTAG	ACGTTGGATGTAGCATAGGCCTACAGAGC	CCTGGTTTGCTGCTGCC	ACG	111
2251876	ACGTTGGATGAAGTGAAGACACACGCTCTG	ACGTTGGATGTGACAAGACAAGCCTCTTGG	GGCCACCTGAAGCTTCT	ACT	99
2252007	ACGTTGGATGATGCCTTTCCCTCCTTCTTC	ACGTTGGATGTCATGACAGCTGCTGAGAAG	GGGCACAGGACTGCTGT	ACT	129
2278716	ACGTTGGATGAAAATCATGGAGAGAGAGGC	ACGTTGGATGTGGAGGCTGTTACATGCTG	GAGAGAGAGGCTGAGTTG	ACT	105
2278717	ACGTTGGATGTGGAGGCTGTTACATGCTG	ACGTTGGATGGAAAATCATGGAGAGAGAGG	CTCCCCAGACCCCAGCC	CGT	106
2441372	ACGTTGGATGGACAGTATACACAGTCATAG	ACGTTGGATGTAAGATGAAATGAGACAAGCC	GGCTCAATCTTGGCTCAC	ACG	287
2441373	ACGTTGGATGCAGTAGAAATAAGATGAAATG	ACGTTGGATGTTTCATTTACTTATTATTT	GGCCAACGTGGCAAAACCCCATCT	ACG	276
2441374	ACGTTGGATGGAGTGCATCATCAGAAAACC	ACGTTGGATGTTTACATGTGTATGTGTGTGG	ATCAGAAAACCAATGACAACACT	CGT	80
2441375	ACGTTGGATGTTGGATAGACTTGGCTGGAG	ACGTTGGATGCTTTAGAGTTTTCCAGCC	CTAGACTGGGAGGTTCACTT	ACT	147
2441376	ACGTTGGATGAAATTGGGTCGATGCATGGC	ACGTTGGATGGCTCAGCATATGAGTGACTC	TGGGTCGATGCATGGCTAAATAC	ACT	101
2472187	ACGTTGGATGAGCTGTCATGACATGGCTTC	ACGTTGGATGAGTGGAGGTGGTACAATGTG	TTCTCTGTCCACTGGC	ACG	100
2472188	ACGTTGGATGTTCTGAGCTCGACCCATTTTC	ACGTTGGATGCCTTTCCTATCTCTTCCCTC	GCCATTTCTTCTGACATCA	ACT	100
2515391	ACGTTGGATGCCTATACTTTTTCCAACCTC	ACGTTGGATGTACAGCTATTGAAGCATGTC	TTCCAACCTCATTTTTTTCATGT	ACT	114
2515392	ACGTTGGATGCCTGCCCTATTTGAAAAAG	ACGTTGGATGCCATTGCAGCTGGGAAATTG	TGGGAAAACCTAAGAGCA	ACT	96
2515393	ACGTTGGATGGATGAAATGAGACAAGCCTG	ACGTTGGATGACAAAATGTGCACCACCAACC	AGACAAGCCTGGCCAAC	ACT	108
2515394	ACGTTGGATGATAAGAGAACCACAGCCCAG	ACGTTGGATGGCAGTGTAATAAATTGGGTCG	GCATATGAGTGACTGAGG	ACT	127
2515395	ACGTTGGATGAACCAGGCTCTAAGCAAAGG	ACGTTGGATGTTCTGCACAGAAGCTTCAGG	TCTCAGCAAAGTGAAGACACA	ACT	112
2515396	ACGTTGGATGCCACCCACATACATCAGATC	ACGTTGGATGTCCTTCAGCTAGGCCATATG	ACTCACACATACATGGTTACA	ACG	231
2515397	ACGTTGGATGTCCTTCAGCTAGGCCATATG	ACGTTGGATGCCACCCACATACATCAGATC	GTGCATGCATGTATCTGTG	ACG	231
2515398	ACGTTGGATGTACAGAGAGGAATGAGACCC	ACGTTGGATGCCCTTTTGAATTGTTGG	CCTCTTTTCTCTCAGCAAC	CGT	100
2515399	ACGTTGGATGAAAAAGCCTGAGACCCAAG	ACGTTGGATGCAGGGTCAAATCTTCAAGCC	GGGTTGAGTCTATTTTGGG	ACT	101
2515400	ACGTTGGATGGGCTCATATGTCTGAATACC	ACGTTGGATGAGGGTCAAGTGCACAAAAAAC	TAAAATGTACGCTTTAACATGTA	ACG	257
2515401	ACGTTGGATGTTCCAGTTTACCCACATG	ACGTTGGATGAGATTTGGAGCTCAGTCCAC	CCCACATGGTTTTTACAAG	ACT	108
2515402	ACGTTGGATGACCCTATAAGGCTCAACTGG	ACGTTGGATGAGTGGTGGGAATCATTCTG	CCTGCGGGGCTCAGGGTAACACT	ACT	111
2515403	ACGTTGGATGTGGTCATAGATCAGGGATC	ACGTTGGATGGTAGCATATGACAGTGGCAG	CTTGGCCCCAGCCCCACC	ACG	99
2515404	ACGTTGGATGTCTGCTCTGCTTACCTCAAG	ACGTTGGATGTGAGGGTGGTGGCAGTATAG	GTAGAAAAATTAGGAAATACAG	ACT	156
2515406	ACGTTGGATGCCAAAGTTGTCTTTGTGACC	ACGTTGGATGTCTAGGTTCACTAATGTGGC	CAGGCCTATAAAGAGACTTA	ACG	264
2853632	ACGTTGGATGAACCCATCTCCTGTTGGAAG	ACGTTGGATGCAGCATTGGAGGCATAGATG	TGAGTCAGAGCCCTAGG	CGT	99
2853633	ACGTTGGATGAACCCATCTCCTGTTGGAAG	ACGTTGGATGCAGCATTGGAGGCATAGATG	TGTTGGAAGAGAAGCTGC	CGT	99
2853634	ACGTTGGATGTCCTTCAGCTAGGCCATATG	ACGTTGGATGCCACCCACATACATCAGATC	TGTAGGTATGAGCATGTGTGTG	CGT	231
2853635	ACGTTGGATGCCACACAAACTCATCACAGC	ACGTTGGATGGCTCTGTTGTTGATAGTAG	CAGTGGCTTGTGAGATCTG	CGT	100
<i>IL1RN</i>					
16065	ACGTTGGATGCCAGAGCCTGAAAGCATTTG	ACGTTGGATGTAGGTAAGCTCCTTCCACTC	TCCTCTCTCATTTCTCAGGTG	ACT	113
16065	CCAGAGCCTGAAAGCATTG	GGCGCACGCCTCCACGTAGGTAAGCTCCTTCCACTC	CTCTCTCATTTCTCAGGTG	ACT	109
128964	ACGTTGGATGGACAACAGGATGTGCGATTC	ACGTTGGATGAGGTGGAGGTAATACCATCC	GCCTTCCAGGATGTTTTC	ACT	110
128964	GACAACAGGATGTGCGATTC	GGCGCACGCCTCCACGAGGTGGAGGTAATACCATCC	GCCTTCCAGGATGTTTTC	ACT	106

7. Anhang: Primer

rs ID	1 st Primer	2nd Primer	Extension Primer	Stop Mix	Amplicon [bp]
315919	TCTTTGCCCCACACAAATCC	GGCGCACGCCTCCACGCCAGACAATAAAGCAAGCAG	TGCAAAGTGGCAGCTTATA	CGT	101
315934	ACGTTGGATGAAAATGTCTCCTTGGCCCTC	ACGTTGGATGCAGCCAGCCATCATTTTTG	GGCCCTCAAAGGAAGACACT	ACT	90
315934	TATACATCACCCCTTCAGC	GGCGCACGCCTCCACGCAGCCAGCCATCATTTTTG	CCCTCAAAGGAAGACACT	ACT	138
315936	ACGTTGGATGCCACCAAGTTCATGAATGC	ACGTTGGATGACTGGTGCCCTTTACTCCTG	CCAAGTTCATGAATGCTCAAAA	ACT	101
315936	CCACCAAGTTCATGAATGC	GGCGCACGCCTCCACGAGCACTGGTGCCCTTTACTC	AGTTCATGAATGCTCAAAA	ACT	100
315951	ACGTTGGATGACTGAGGACCAGCCATTGAG	ACGTTGGATGTTGAAGAGGAGGCAGAGTCC	TGGACCCTCAGAAGGCGTCACAA	ACT	99
315952	ACGTTGGATGTGAGCGAGAACAGAAAAGCAG	ACGTTGGATGGGCAGACTCAAACTGGTGG	CTTCATCCGCTCAGACAG	ACG	100
315955	GTATGGCCACTCACATTGAG	GGCGCACGCCTCCACGTGTTAATGGGTTTCCCAGCC	CACTCACATTGAGGTTAAG	ACT	105
379155	CCTTCAGACAGCGTTTCAAG	GGCGCACGCCTCCACGTGAATTCAGACTGGGTCAG	GTTTCAAGTAAAAAGCCCC	ACT	99
380092	ACGTTGGATGTTGGAAGCTGCATTCAGCAG	ACGTTGGATGTCACATGGAAGAGAGCCTG	GCATTCAGCAGAGTGCC	CGT	104
380092	TTGGAAGCTGCATTCAGCAG	GGCGCACGCCTCCACGTACATGGAAGAGAGCCTG	TGCATTCAGCAGAGTGCC	CGT	100
392503	ACGTTGGATGAACCTCTGGCCATAATGGG	ACGTTGGATGTTTCTAATGTTCCAGGCC	CTGGCCATAATGGGCTCTGATAC	ACT	104
392503	AACTTCTGGCCATAATGGG	GGCGCACGCCTCCACGTTTCTAATGTTCCAGGCC	CCATAATGGGCTCTGATAC	ACT	100
408392	ACGTTGGATGTGTGGAGAGGTAGAGTCTAG	ACGTTGGATGTTCTGGTATTGGCCCTTCCC	GTAGAGTCTAGGTCAGAG	ACT	106
408392	TGTGGAGAGGTAGAGTCTAG	GGCGCACGCCTCCACGTTCTGGTATTGGCCCTTCCC	GTAGAGTCTAGGTCAGAG	ACT	102
416778	TTTAAAGCCAGCCCGATGAG	GGCGCACGCCTCCACGATCTGTCCACTGTCTCCAAC	GGGTAATGTTGTCAGGAG	CGT	124
416779	TTTAAAGCCAGCCCGATGAG	GGCGCACGCCTCCACGATCTGTCCACTGTCTCCAAC	AAAGGGTAATGTTGTCAGG	CGT	124
419598	ACGTTGGATGGGGATGTTAACCAGAAGACC	ACGTTGGATGTTGACTTTCTGGCAACCAC	TGAGGAACAACCAACTAGTTGC	ACG	128
419598	GGGATGTTAACCAGAAGACC	GGCGCACGCCTCCACGTTGACTTTCTGGCAACCAC	GGAACAACCAACTAGTTGC	ACG	124
423904	ATTGCACCTAGGGTTTGTGC	GGCGCACGCCTCCACGTTAGAAGGTGAGTGGTTGCC	GTGATGCCACATACATTG	ACT	122
426476	CCATATCAGTCTGGCCCTTC	GGCGCACGCCTCCACGCTGCGATTGAGGCTAGTTG	GGCCTTCGGGCTGTGCC	ACG	100
432014	CCACATCTATCTTTCTGGG	GGCGCACGCCTCCACGAAAATACCCAGGGTCTCTTC	GTCAGGTTAATAGAAGAGGA	ACT	105
434792	ACGTTGGATGAGAGAGGTCTCATCTTCCTG	ACGTTGGATGCTTAGGAGTAAGTGGGTAG	CATCTTCTGGTCTGCAG	ACT	94
434792	AAAATCCCGAGGTCAGAAGG	GGCGCACGCCTCCACGTAAGTGGGTAGTGTGCTTG	TCATCTTCTGGTCTGCAG	ACT	103
439154	ACGTTGGATGTTTGTCAAGGTCACACGGG	ACGTTGGATGCAGCATTTGGACAGGAATGG	CACAAGGCAAGTGGCAGA	ACT	95
439154	GTGAAGAAGACATGATCACC	GGCGCACGCCTCCACGTTTGGACAGGAATGGGTCTA	CACAAGGCAAGTGGCAGA	ACT	150
440286	ACGTTGGATGATGTGAGTGGCCATACTGTG	ACGTTGGATGATGCAATGTCCTAGCCATCC	GGCCATACTGTGGCACTGTC	CGT	125
440286	ATGTGAGTGGCCATACTGTG	GGCGCACGCCTCCACGATGCAATGTCCTAGCCATCC	CCATACTGTGGCACTGTC	CGT	121
442710	ACGTTGGATGTAGACTCTACCTCTCCACAC	ACGTTGGATGTCAAGTTTGAAGCTGGGAGG	GCCCTCATATGTGCCCTT	ACG	102
442710	TAGACTCTACCTCTCCACAC	GGCGCACGCCTCCACGTCAAGTTTGAAGCTGGGAGG	TGCCCTCATATGTGCCCTT	ACG	98
444413	AGGCTCTTACAATGCACGG	GGCGCACGCCTCCACGACCTTGGTTTCCCCGTCTGT	CAATGCACGGAATACTGTTA	ACG	148
446433	ACGTTGGATGATTGCACCTAGGGTTTGTGC	ACGTTGGATGTTAGAAGGTGAGTGGTTGCC	GCAAAGTGACGTGATGCC	ACG	126
446433	ATTGCACCTAGGGTTTGTGC	GGCGCACGCCTCCACGTTAGAAGGTGAGTGGTTGCC	GCAAAGTGACGTGATGCC	ACG	122
447713	ACGTTGGATGTTCTGGACACCATACTCAG	ACGTTGGATGAGAGTGGTGAAGCTTCTTC	AGCCATATTCTGGTCCAC	ACT	100
447713	TTCCTGGACACCATACTCAG	GGCGCACGCCTCCACGCACACTCTGTTGTCCAGTTG	CAGCCATATTCTGGTCCAC	ACT	148
448341	AAAATCCCGAGGTCAGAAGG	GGCGCACGCCTCCACGTAAGTGGGTAGTGTGCTTG	TCCTGGTCTGCAGCTAAA	ACG	103
451578	ACGTTGGATGAGGAGGCAGCAATAATGAAG	ACGTTGGATGTTCTGACCTCGGGATTTTAG	GGCAGCAATAATGAAGAGACCC	ACG	101
451578	AAGAGGAGGCAGCAATAATG	GGCGCACGCCTCCACGTTCTGACCTCGGGATTTTAG	AGCAATAATGAAGAGACCC	ACG	100

7. Anhang: Primer

rs ID	1 st Primer	2nd Primer	Extension Primer	Stop Mix	Amplicon [bp]
454078	ACGTTGGATGAATCACCCAAAACCCAGTG	ACGTTGGATGAACTACCCAGCTAATCCTGG	CCCAGTGGCTTGAAACAACCAA	CGT	103
495282	GAAAGCCAATGTATGTGGGC	GGCGCACGCCTCCACGATTGCACCTAGGGTTTGTGC	GCATCACGTCACCTTTGCC	ACT	100
598859	ACGTTGGATGAGTCTCCTGGATGTTGTTCC	ACGTTGGATGACACTCCTATTGACCTGGAG	CTGGATGTTGTTCCATGTGAT	ACT	103
598859	GAGTCTCCTGGATGTTGTTCC	GGCGCACGCCTCCACGACACTCCTATTGACCTGGAG	GGATGTTGTTCCATGTGAT	ACT	100
878972	ACGTTGGATGAGACAATGCTGACTCAAAGG	ACGTTGGATGGTTGTTTCATATCTAGTAGCC	GCTGACTCAAAGGGTAAATT	CGT	99
878972	AAGGTGAAGACAATGCTGAC	GGCGCACGCCTCCACGGTTGTTTCATATCTAGTAGCC	GCTGACTCAAAGGGTAAATT	CGT	102
928940	ACGTTGGATGCCTTTACCCTCTGTTCTCAC	ACGTTGGATGGGGTGCCAAGAAGAGAAAAG	CCCTTCCAGTTTCCAGTC	CGT	96
928940	CCTTTACCCTCTGTTCTCAC	GGCGCACGCCTCCACGGGGTGCCAAGAAGAGAAAAG	ACCCTTCCAGTTTCCAGTC	CGT	92
973635	ACGTTGGATGTAAGCTAGCCCCTTGTGAG	ACGTTGGATGTAGATGGTTACAGTGGTGGC	CCCTTGTGAGAGGAGACT	ACT	107
973635	TAAGTCTAGCCCCTTGTGAG	GGCGCACGCCTCCACGTAGATGGTTACAGTGGTGGC	CCCTTGTGAGAGGAGACT	ACT	103
1794065	ACGTTGGATGCATTACAAGGCAGTGTGCAC	ACGTTGGATGCATTTGTGTACGCAAGCAC	GCACATCTGTCCACCCAA	ACT	99
1794065	GAAGCCATTACAAGGCAGTG	GGCGCACGCCTCCACGCATTTGTGTACGCAAGCAC	TGCACATCTGTCCACCCAA	ACT	100
1794066	ACGTTGGATGATAAACAGAGCTCTGGCCAG	ACGTTGGATGGTACAGTTAGCCACACATTC	GACCTGTGCCTCACCTC	ACG	96
1794066	ATAAACAGAGCTCTGGCCAG	GGCGCACGCCTCCACGGTACAGTTAGCCACACATTC	GGGACCTGTGCCTCACCTC	ACG	92
1794067	ACGTTGGATGAGGACTCAAAGCTGTGAGAC	ACGTTGGATGACACATTCACAGGTGAGGAG	GAGACGTAATAAACAGAGCTC	ACG	107
1794067	AGGACTCAAAGCTGTGAGAC	GGCGCACGCCTCCACGACACATTCACAGGTGAGGAG	GACGTAATAAACAGAGCTC	ACG	103
1794068	ACGTTGGATGTTCTCCTCATTAGCTGGTGAC	ACGTTGGATGAAGGATTTGGACCCAGAATC	GCTACCCTTGGGAACAACC	ACG	132
1794068	TTCCTCCATTAGCTGGTGAC	GGCGCACGCCTCCACGAAGGATTTGGACCCAGAATC	GCTACCCTTGGGAACAACC	ACG	128
1894405	CCTTTCTTCTCCTCCTAAG	GGCGCACGCCTCCACGTTTCCAGTCCAGTCTCAAG	AGTGATTGACAGCCCCCCC	ACT	98
2232353	ACGTTGGATGGCAGTCACCTAATCACTCTC	ACGTTGGATGCTTGTGATTTTCTCCCAG	CTTCTGTTCCATTGAGAGAC	ACT	100
2234678	ACGTTGGATGAGCTTACCTAAAGCCATGGG	ACGTTGGATGGCAGCTCAGTTGAGTTAGAG	ATAGGACAGGAGGTCTTC	ACG	101
Ex6.4_SNP1	ACGTTGGATGTCAGAAGTTTCTCAGCTCCC	ACGTTGGATGCCTTCAGCAGAGGAAGAAAAG	CCCAAGGCTCTGAGCAAAT	ACT	92
icIII_1	ACGTTGGATGTGATCCCCTTCATCATCCAG	ACGTTGGATGACATCTGTACCCCTGAGTAC	CATCCAGGAGAGCAGAG	ACT	121
<i>TIC</i>					
9098	ACGTTGGATGTTACAAGCATGGGAAGGGAG	ACGTTGGATGTCAGCCAAGTGTGCAAGTAG	TGGGGAGGCAGTGTGTCAG	ACG	147
11928	ACGTTGGATGAGCTGGGCTTGTCTCTGAG	ACGTTGGATGAGAGACAATGGTGGCTGGTC	GTTCTCTGAGGGAGGTTT	ACG	121
13717	ACGTTGGATGAACCTCCCTCAGAGAACAAG	ACGTTGGATGTAACCTTCTTCTCTGTGGG	GCTGCCAGAGATGGGGAAGG	ACT	160
724496	ACGTTGGATGTTAGCAACCTTGGCACCAGC	ACGTTGGATGTCTCCAGAAAAGCGAGGAC	CCCCTCATGGCTTTGGTACC	ACG	151
895496	ACGTTGGATGCCTAATTTGCCCAACAATAC	ACGTTGGATGTGGAAACCAGCTGTCAAGTAG	GCCCCACAATACACAAAAAAA	ACT	110
1015754	ACGTTGGATGAGAAAAGGGAGAGAAGGGTC	ACGTTGGATGAGCAGTCTAGAACTCACAG	GAGTGGGAAATGGCAAGC	ACT	122
1053557	ACGTTGGATGCAAGGGCCAACCTTACTTTG	ACGTTGGATGTCCCTTCCCATTGCTTGTAA	TGGAGGTGCAAGCCCCA	ACT	84
1562277	ACGTTGGATGTTCTGCCTGTGCTCCCTCTG	ACGTTGGATGGATCCACCGGAGCCTTTCGA	CTGGCAAGGCTCCAGCC	ACG	283
2241976	ACGTTGGATGCGCCTCACTTCATGTTCTTC	ACGTTGGATGAAGGTGCAGGGAAGAGATTC	GATGAGAGGGAGGGTGG	ACT	91
2276561	ACGTTGGATGAGGATGAGCTCCTGGATC	ACGTTGGATGAGGATGGGCCGCACGAATCT	ATCAACTTGGCTGCGGCCAC	ACT	129
2305134	ACGTTGGATGCCAAGAAGATTTCATCGGTG	ACGTTGGATGACCTGCAAGAACACTTGACC	CTCACTTGAATAGACATGCAG	ACT	100
2863239	ACGTTGGATGCCTAATCCCAGAGCAAGAC	ACGTTGGATGACCAAGTGTCTATGTGGTGTG	TTCCCAGAGCAAGACCATCCT	ACG	139
3087271	ACGTTGGATGCTTCCCTCTCTGTGCTTTTC	ACGTTGGATGGCTTTTGTCAACTGGGAGG	CCACCTCCAGTCACCTG	ACT	103
<i>PAX8</i>					

7. Anhang: Primer

rs ID	1 st Primer	2nd Primer	Extension Primer	Stop Mix	Amplicon [bp]
752590	ACGTTGGATGATTTCTGCAAGCTCCTAGC	ACGTTGGATGACTTCTCCCTGGTCCATTAC	TGTGCTAGAACCTGAGGATG	ACT	112
895411	ACGTTGGATGTTCTTGCTAGTGCTCAGGAC	ACGTTGGATGACCTCTCACATCTCTGTGTCAG	GAATCATAACAGGTTGGTGTGTC	ACG	99
895416	ACGTTGGATGTTCCCTAAGGTGGCTCAGAG	ACGTTGGATGTTCCCATTTGCTGTCTCCTTC	ATGCAGAGTCCCAGGAGGGTGT	ACT	136
895417	ACGTTGGATGGATGCACGGTTTTGTCACAG	ACGTTGGATGGGACCATAACAGGTAAGAAC	TTTGCTCCTGTGTGTCCCTCA	ACT	105
1048939	ACGTTGGATGTTACCTGCCAAGGATCTTGC	ACGTTGGATGTTGTGAATGGCAGACCTCTG	AAGGATCTTGCTGACGCA	ACT	157
1048942	ACGTTGGATGTACTCAGCAAGCTGGAGTTG	ACGTTGGATGTACTCTGGCAATGCCTATGG	GCTGGAGTTGGGAAGC	ACT	102
1374165	ACGTTGGATGGATCACCTCCCATTCTC	ACGTTGGATGTCTTTGGAGTCTGAGCCAAG	TCTATGGCCCAGGTTAAAA	ACT	99
1446245	ACGTTGGATGAATAACTTGTGCGAGCCAC	ACGTTGGATGTTAGAGACATCGTCTCTGC	CCCACTCCCACCAGTCC	ACG	108
1446249	ACGTTGGATGACCCTCCATAGTCTGAATG	ACGTTGGATGAAATGTGACATGGGCAGAGC	GATGCCAGCAATCCCTG	ACG	118
2018348	TAGGGGTTTAAGTCAGCAGC	ACGTTGGATGATCCCTTCTTTGACACTGCC	AAGTCAGCAGCAGGCATA	ACT	149
2018348	ACGTTGGATGTAGGGGTTTAAGTCAGCAGC	ACGTTGGATGATCCCTTCTTTGACACTGCC	AAGTCAGCAGCAGGCATA	ACT	149
2084163	ACGTTGGATGTAACCCCTGGGTGACATAAC	ACGTTGGATGTTCAGAAGGAGGAGAGACAC	CCGGCTGCAGGCCCTCACTG	ACT	120
2166421	CCTGTCATCCTGTTAGCATC	ACGTTGGATGACAGCTGACAGTAGTTGGAG	CCTGTCAACATGCAGTCA	ACT	93
2166421	ACGTTGGATGCCTGTCATCCTGTTAGCATC	ACGTTGGATGACAGCTGACAGTAGTTGGAG	CCTGTCAACATGCAGTCA	ACT	93
2241975	CTCCCTATTTAACTTGCCCC	ACGTTGGATGCCTCCCTTTTCATCATGGAG	TCCTTCTTCCCAGGCCT	ACT	97
2241975	ACGTTGGATGCTCCCTATTTAACTTGCCCC	ACGTTGGATGCCTCCCTTTTCATCATGGAG	TCCTTCTTCCCAGGCCT	ACT	97

Tabelle 29: Primer für die Genotypisierung

7.2. Für die Sequenzierung verwendete Primer

Region	1st Primer	2nd Primer	Lenght
Ex icI	<u>GCATCAAGTCAGCCATCAGCCG</u>	ACACCTCTCTGTTACCTGCTGCC	495
Ex icII	AAAGTTGACGGGTGCATACTCGG	<u>TGCTGCTGCAAATCCAGGCAC</u>	585
Ex icIII	AGCAACACAGTTGTCCCCTTCCCC	<u>AGGCAGCAGGACAGGTTTGGAGAC</u>	426
Ex icIII	AGCAACACAGTTGTCCCCTTCCCC	<u>ACCCAGTCCTGCCAAGTAGCCAAG</u>	491
Ex 1	<u>CACTCCATTGCGACACTTAGTGGGG</u>	CCCCTGGCAGCTGTGATATGTTTCC	385
Ex 2	<u>TCTCATCCATGCATGCCGTGG</u>	<u>AGGCCCTCCCAGCTTCAAACCTG</u>	393
Ex 3	GTTTTGTGGGGACCAGGGGAGATAG	<u>CCAGCTAATCCTGGTCAACCCACAG</u>	313
Ex 4	GCTGTCCAGAGGGCCATTTATG	<u>AAGAATGGGAACAGGCAGGCCTG</u>	343
Ex 4	ATTTGGTGACCATGACGCCTTCG	<u>GGGGGCTTTTAGGGTATGGCATTTC</u>	332
Ex 4	CAGCCCCTCAGCCTCACCAATATG	<u>AGTGGCAAGAGGAGAGCAGGTTGG</u>	391
Ex 4	<u>GTGAATCAGAGCACAGCAGCCCCTG</u>	GTCCTCAGCCTCTCCCCGAAAGAAC	340
Ex 4	ATGTTCTTTGCGGGAGAGGCTGAGG	<u>CCACATTTGCTCAGAGCCTTGGGAG</u>	319
Ex 4	<u>GCATTCAGGATCAAACCCCGACC</u>	TCTGGAGTGGAGATGGAGCTTGGAG	508
Ex 4	<u>CAGCCTCCAAGCTCCATCTCCACTC</u>	AACTCTCAGAGAAGAGGCCAGGC	521

Tabelle 30: Resequenzierung der codierenden Region. Der unterstrichene Primer wurde gleichzeitig als Sequenzierprimer verwendet

7.3. Primer für den Intron Repeat

	1 st Primer	2nd Primer
In 2 Repeat	GCCCCTCAGCAACTCCTATTGA	CTCCCCTGGTCCCCACAAAATA

Tabelle 31: Primer für PCR des Repeats im Intron 2 von *IL1RN*

7.4. SNPs aus der Resequenzierung

Cel04_1

gttgaatgaagagacctgggaatgagtccaggtctgcagggttagaggaaattgaaggcccttaccagatccctgttgagaagttatgaattatgagcccttctgcaaatgagaggggtcttc
cctgtcaggagggacagattgtaggtggcaagattggtggcagccagtaggctggtctgctcctcctctctat[t/a]tcatatgtgtatgaaggcattacctgcagcaagggcctgtgtaaatac
tgtgattacagagcattttatgtactgctgtcattcatgcttccggtgagccctaagtctaagataggggcagatagcatcaggccattttgcagctgtcaaaatgaggtctgaagggcagaag
tggtgtgcccacacacacacaact

Cel02_1

caggagggacagattgtaggtggcaagattggtggcagccagtaggctggtctgctcctcctctctatttcatatgtgtatgaaggcattacctgcagcaagggcctgtgtaaatacattgatt
acagagcattttatgtactgctgtcattcatgcttccggtgagccctaagtctaagataggggcagatagca[t/c]caggccattttgcagctgtcaaaatgaggtctgaagggcagaagtggt
gtgcccacacacacacaactggtggctgcagacctggggacttagaccgggacttctgctcctgccaggggtctcttgcactgctccccatcaactggatggctttaagcatttgagttgtc
tgctccctgatggcagaatgcaga

Cel02_3

tgtggacaatgtcacggcagagggccaggtatagggcatggggtaactggaagcgggatggaccctgttattccctaagacatggctccacgtagtctcaacaaggcctttgcccttgc
gtccctccacctggaatattcttcccctccttgacattgctcaggctcctccttattgtcacccttcagaga[g/c]ggcttccctggccactttccctaaaatagccaccctcctaggtccctca
aaagcatatcctgctttgattttccctatagcaaatgccctatgaagttattttgctaactgtttctgtctgtttccttggtagagcgttggggacctgtctggctgttcccaatgcctggaaga
gtgcctggcaca

7. Anhang: Sequenzen

Cel02_2

tgcccttgctgttccctccacctggaatattcttccccttcttgacattgctcaggtctccactcttatgtcacctctcagagagggcttccctggccactttccctaaaatagccaccactcctaggt
ccctcaaaagcatatcctgcttggattttccctatagcaatatgccctatgaagttatftttatg[c/t]taactgttcttctgctgtttcctttagagcggtggggacctgtctggctgttcccaatgcc
tggaagagtgcctggcacacaggattaagccaacacatatgtttgaatgaatgtgtgcacacatgcatgagctggcggcagtcgggggtggggtaagcacgaaggcccagctcagttctctg
catgtgacc

Cel04_2

caaaagcatatcctgcttggattttccctatagcaatatgccctatgaagttatftttatgtaactgttcttctgctgtttcctttagagcggtggggacctgtctggctgttcccaatgcctggaa
gagtgctggcacacaggattaagccaacacatatgtttgaatgaatgtgtgcacacatgc[a/c]tgagctggcggcagtcgggggtggggtaagcacgaaggcccagctcagttctctgca
tgtgacctcccatcttacgcagataagaaccagtttggtttctgctagcctgagtcacccctcctggaaactgggcctgctggcatcaagtcagccatcagccggcccatctcctcatgctggcca
accctctgtgagtggt

Cel01

gcagtcgggggtggggtaagcacgaaggcccagctcagttctctgcatgtgacctcccatcttacgcagataagaaccagtttggtttctgctagcctgagtcacccctcctggaaactgggcctg
cttggcatcaagtcagccatcagccggcccatctcctcatgctggccaaccctctgtgagtggtgggag[g/a]ggaggctgggctcctcctgtactctctgaggtgctctggaaggaggggca
gtccaccctgggagggactgtggcccaggtactgcccgggtgctactttatgggcagcagctcagttgagttagagcttgaagacctcagaagacctcctgtcctatgaggccctcccatg
gcttaggtaagctcctccactctcatt

Sek01_1

cttcatcaaaaccctttacgtggggcttagacactcctgttctctagtgcttagtagcacagggctcagcacatggaagccactagatacaatttgatgaccaggacctccgatgaaagcca
tgggtgctgactctgggaaggcattgtctttatgtgctatcggctcctaaagcttcatccaggaagcagaactc[g/a]gggggtgctgaggaccagaaccgagaataagattagtcagagatt

7. Anhang: Sequenzen

tcctgtgggcagaaatcataaggacgccaactgtttgggtgagataagacgaaaccaagagtgactgtggccagaagcgtgaggaagagggagagagcttccctgtcccctttcttctc
tccctaagccacagtgattgacagccccc

Sek08_2

gggaaggcattgtctttatgtgctatcggtccttaagcttcatccaggaagcagaactcgggggggtgctgaggaccagaaccgagaataagattagtcagagatttctgtgggcagaaat
cataaggacgccaactgtttgggtgagataagacgaaaccaagagtgactgtggccagaagcgtgaggaagagg[g/a]agagagcttccctgtcccctttcttctcctcctcctaagccaca
gtgattgacagcccccccttggagtcagagcaggcttgagactggactgggaaaggaggggtgggtcaggatacagagcaggaaggctgggagtgacagggcaggagcaaggggctg
gggcattcattgtgcctgatctctcccactttacctggg

Sek08_1

gggggggtgctgaggaccagaaccgagaataagattagtcagagatttctgtgggcagaaatcataaggacgccaactgtttgggtgagataagacgaaaccaagagtgactgtggc
cagaagcgtgaggaagagggagagagcttccctgtcccctttcttctcctcctaagccacagtgattgacagccccc[c/g]ctttggagtcagagcaggcttgagactggactgggaaag
gaggggtgggtcaggatacagagcaggaaggctgggagtgacagggcaggagcaaggggctggggcattcattgtgcctgatctctcccactttacctggggtaaagaagcatatgcaaaag
ccacgggtgagatatttccaagtgccaggggtcagggcat

Sek03_3

gggcttttacttgaaacgctgtctgaaggcagtgccaggatggaacttccaccctacctggcaagccacttcttctgcaatctgtaaggacattgttgagagaattatggcttccaattccg
gaggggtgaagaaagacaaataggagagaacctatcatagtcaggtgctagctgccttctctttcagagag[t/c]gtgagaataaagtgatacacttgattattagcaaatactttgaaattta
aacgctaataattcaacacactctggaagaggcaataagtagacaggttcatatacatcatctccttcagctagctctcacaacaaacaaatgaataaacaaaattcttctttggccctcat
aggaagacactgtttcttgaacg

Sek04_1

7. Anhang: Sequenzen

ctcctgcctcagcctcccagtagctgggattacaggcacatgccaccatccctgctaattttgcattttcagtagagacggagttcaccatggtggtcaggttggtcttgaactcctgacctcagg
tgatccgcccacctcagcctccccaagtgctgggattacaggtgtgagccaccgtgccagcccagccatc[a/g]ttttgaaacacgttgagaaaatagtgcttctttgagggccaaggaga
cattttttgtttattgtttgtttgtgaggactagctgaagggggtgatgtatattaacctgcctactattgcctcttcccagagtgtgatgaatattagggtttaaagtttctgaagcatttgtaataaa
gcccggggctg

Sek04_2

gctgggattacaggcacatgccaccatccctgctaattttgcattttcagtagagacggagttcaccatggtggtcaggttggtcttgaactcctgacctcaggtgatccgcccacctcagcctcc
ccaagtgctgggattacaggtgtgagccaccgtgccagcccagccatcattttgaaacacgttgagaaa[t/c]agtgtcttctttgagggccaaggagacattttttgtttattgtttgtttgt
gaggactagctgaagggggtgatgtatattaacctgcctactattgcctcttcccagagtgtgatgaatattagggtttaaagtttctgaagcatttgtaataaaagcccggggctggaggtcaga
agacctgatttct

Sek04_3

tgagccaccgtgccagcccagccatcattttgaaacacgttgagaaaatagtgcttctttgagggccaaggagacattttttgtttattgtttgtttgtgaggactagctgaagggggtgatg
tatattaacctgcctactattgcctcttcccagagtgtgatgaatattagggtttaaagtttct[g/c]aagcatttgtaataaaagcccggggctggaggtcagaagacctggatttctgcatacttt
gcatcagcaagctgtgtgacctggacagatccctttttgtctaaatcttctgagtcttctgaaaacaatgccaggtgggacaggatgattgccaagctcccgtccagctctaaaacactgca
acgtatgctt

Sek06_1

tcattttgaaacacgttgagaaaatagtgcttctttgagggccaaggagacattttttgtttattgtttgtttgtgaggactagctgaagggggtgatgtatattaacctgcctactattgcctctt
ccagagtgtgatgaatattagggtttaaagtttctgaagcatttgtaataaaagcccgggg[c/t]tgaggtcagaagacctggatttctgcatactttgcatcagcaagctgtgtgacctgga
cagatccctttttgtctaaatcttctgagtcttctgaaaacaatgccaggtgggacaggatgattgccaagctcccgtccagctctaaaacactgcaacgtatgcttctgcaccagcactgtcca
tcctgta

7. Anhang: Sequenzen

Sek03_2

agggtgggacaggatgattgccaagctcccgtccagctctaaaacactgcaacgtatgcttctgcaccagcactgtccatcctgtagatcatgcagaaattcttcaacttttctaccataaa
ataggagcatgcttaccttttctaatgttccaggccccgggtctagaatattgtaagtaaggaagtaatg[c/t]gtatcagagcccattatgggccagaagttctcttcttctctacacctgctt
cctccctccctccctccctcttcccttcttcttccatccatttgaagaagacatgatcacctcattctgagagtgaagagacagaggctcaactaatgaaatgattgttcaagggtcacacgg
gtggcacaaggcaagt

Sek03_1

gacaggatgattgccaagctcccgtccagctctaaaacactgcaacgtatgcttctgcaccagcactgtccatcctgtagatcatgcagaaattcttcaacttttctaccataaaataggag
catgcttaccttttctaatgttccaggccccgggtctagaatattgtaagtaaggaagtaatgcgtatca[g/c]agcccattatgggccagaagttctcttcttcttctacacctgcttctccct
ccctccctccctcttcccttcttcttccatccatttgaagaagacatgatcacctcattctgagagtgaagagacagaggctcaactaatgaaatgattgttcaagggtcacacgggtggca
caaggcaagtggcagaa

Sek07_1

agagcccattatgggccagaagttctcttcttcttctacacctgcttccctccctccctccctcttcccttcttcttccatccatttgaagaagacatgatcacctcattctgagagtgaa
gagacagaggctcaactaatgaaatgattgttcaagggtcacacgggtggcacaaggcaagtggcaga[a/g]gttgaatttagaccattcctgtccaaatgctgagttatgtcatcgtcccga
gaccataactttaagatgtaagatagtgggaaaagagttgattcaaacctctcagaaggactcactttacatcaggggtcagcagactcaggccaaatccgggtccattccccgctttgc
aaagaaagttgtagtgaaca

7.5. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Grundlagen zu Allergie und Asthma. Die Asthma zugrundeliegende allergische Reaktion wird in drei Phasen eingeteilt: Phase 1: Sensibilisierung und Gedächtnisreaktion; Phase 2: Sofortreaktion; Phase 3: Spätreaktion modifiziert nach ⁽¹²⁾	3
Abbildung 2:	Vergleich monogener und komplexer Erkrankungen modifiziert nach ⁽⁹⁷⁾	8
Abbildung 3:	A: Kopplungsergebnisse 13 genomweiter Suchen in der Region 2q12-14 (vgl. http://cooke.gsf.de). Die Anordnung der Marker erfolgte unter Einbeziehung einer Decode Kopplungskarte ¹³⁶ und einer psysicalische UCCSC Karte (http://www.genome.ucsc.edu). Schwarze Dreiecke zeigen Kopplungsergebnisse der Studien an. B: Schematischer Ausschnitt des IL-1-Clusters, modifiziert nach ^(132-134;137) . Rot dargestellte Gene gehören zur IL1-Rezeptorfamilie. Blau sind die IL1-homologen Liganden, schwarz alle Gene, die zur Bestimmung der LD-Grenzen genotypisiert wurden. In grün markierten Genen waren noch keine Polymorphismen bekannt. Die Pfeilrichtung gibt die Transkriptionsrichtung an.	11
Abbildung 4:	Überblick über im IL1-Cluster gelegene Liganden und Rezeptoren innerhalb der Signalübertragungswege modifiziert nach ⁽¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾	11
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der durch IL-1RI vermittelten Aktivierung von NFκB und AP-1 modifiziert nach ⁽¹⁹⁶⁾	16
Abbildung 6:	Die IFNγ Expression wird durch gemeinsame Aktivität von IL-18 und IL-12 ausgelöst modifiziert nach ⁽²¹³⁾	18
Abbildung 7:	Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF Massenspektrometers nach ⁽²⁵⁵⁾	28
Abbildung 8:	Schematischer Ablauf der PROBE Reaktion	31
Abbildung 9:	Biotinylierung des PCR-Produktes	31
Abbildung 10:	Schematischer Ablauf der hME-Methode	34
Abbildung 11:	Sandwich-ELISA	35
Abbildung 12:	MALDI-TOF Massenspektren der Primer-Extensions-Reaktion des SNP rs12905[G/A] aus IL1RL1. A: zeigt den homozygoten Zustand des Allels A für den SNP rs12905 B: zeigt den homozygoten Zustand des Allels G für den SNP rs12905 C: zeigt den heterozygoten Zustand für den SNP rs12905	48
Abbildung 13:	MALDI-TOF Massenspektrum der Primer-Extensionsreaktion für den SNP rs1922291[A/G] im IL1RL2 Gen. Als „Template“ für die PCR wurde ein genomischer Pool verwendet. Mit Hilfe der MALDI-TOF MS Analyse der allelspezifischen Primer-Extensionsprodukte kann das Verhältnis der Allele im Pool nachgewiesen werden. Die exakte Bestimmung der Allelfrequenz erfolgt durch die Bestimmung des Verhältnisses der beiden Flächen unter den für die jeweiligen	

7. Anhang: Abbildungsverzeichnis

- Allele detektierten Kurven. Die Integralrechnung wurde zeitgleich zur MALDI-TOF Analyse mit der SpectroTyper™ Software durchgeführt (vgl.3.2.2). 49
- Abbildung 14:** MALDI-TOF Massenspektrum der Extensionsprimer rs1922289, rs873022, rs1030021, rs1882348, rs997049 einer später durchzuführenden Multiplexreaktion. Verwendet wurden gleiche Mengen jedes Primers (9 µM jeder Primer; Mengenbestimmung nach Angaben des Herstellers Metabion). Die Prozentangaben beziehen sich auf das Intensitätsverhältnis der Primer rs1030021, rs1882348, rs997049 im Massenspektrum zu den Primern rs1922289 und rs873022 in %. 52
- Abbildung 15:** MALDI-TOF Massenspektrum einer Multiplexreaktion zur Genotypisierung fünf biallelischer SNPs. Das Massenspektrum zeigt die Analyse der Primer-Extensionsreaktion für die SNPs rs1465321[A/G], rs869085[A/G], rs16944[C/T], rs1558627[C/T] und rs12905[C/T]. Die unterstrichenen Buchstaben zeigen die Stellen im Massenspektrum, an denen die allelspezifischen Extensionsprodukte der durchgeführten Reaktionen detektiert werden können. Durch ein Sternchen wird der Massenbereich markiert, in dem die jeweiligen nicht extendierten Primer detektiert werden können. 53
- Abbildung 16:** Schematische Darstellung des *IL1R2* Gens. Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs konnten in genomischen Pools nicht bestätigt werden. Die schwarze Markierung zeigt den SNP an, der im Pool polymorph vorlag und in der Trio-Auswahl genotypisiert wurde. 54
- Abbildung 17:** Schematische Darstellung des *IL1R1* Gens. Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden. 55
- Abbildung 18:** Schematische Darstellung des *IL1RL2* Gens. Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden. 56
- Abbildung 19:** Schematische Darstellung des *IL1RL1* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden. 57
- Abbildung 20:** Schematische Darstellung des *IL18R1* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden. 58

7. Anhang: Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 21:** Schematische Darstellung des *IL18RAP* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden. 59
- Abbildung 22:** Schematische Darstellung des *IL1A* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden. 60
- Abbildung 23:** Schematische Darstellung des *IL1B* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden. 61
- Abbildung 24:** Schematische Darstellung des *IL1F6* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden. 62
- Abbildung 25:** Schematische Darstellung des *IL1F8* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden. 63
- Abbildung 26:** Schematische Darstellung des *IL1F5* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden. 64
- Abbildung 27:** Schematische Darstellung des *IL1RN* Gens: Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nicht polymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die in den Pools bestätigt und in der Trio-Auswahl einzelgenotypisiert wurden. 66
- Abbildung 28:** Schematische Darstellung der zu *IL1RN* distal gelegenen Genregion: Gelbe Boxen markieren exonische Bereiche von *IL1RN*. Grüne Boxen markieren exonische Bereiche des Gens *TIC*. Blaue Boxen markieren exonische Bereiche des Gens *PAX8*. Rot gekennzeichnete SNPs wurden in genomischen Pools als nichtpolymorph identifiziert. Schwarze Markierungen zeigen SNPs an, die im Pool polymorph waren und in Einzelprobanden genotypisiert werden konnten. 67
- Abbildung 29:** Beispielhafter Ausschnitt dreier Chromatogramme der Resequenzierung des Exons 2 von *IL1RN*: Die schwarz markierte Box kennzeichnet den Bereich, in welchem der SNP rs 22232354 [G/T] detektiert wurde. A zeigt den homozygoten Zustand, d.h., es konnte nur ein T (rot) detektiert werden. B zeigt den anderen homozygoten

7. Anhang: Abbildungsverzeichnis

	Zustand, d.h., es konnte nur ein G (schwarz) detektiert werden. C zeigt den heterozygoten Zustand, d.h., es konnten sowohl G (schwarz) als auch für das T (rot) detektiert werden.	70
Abbildung 30:	Splice-Produkte von <i>IL1RN</i> mit allen genotypisierten SNPs und deren relative Position.	72
Abbildung 31:	LD Karte des IL1-Clusters, rot markiert ist der Bereich von IL1RN mit hohem LD. Die Berechnung des Kopplungsungleichgewichtes bzw. die Darstellung erfolgte wie in 2.10.6 beschrieben.	75
Abbildung 32:	Einzellocusanalyse der genotypisierten SNPs aus dem IL1-Cluster. Die Berechnung erfolgte wie in 2.10.3 beschrieben, die Darstellung erfolgte mit Sigma-Plot	76
Abbildung 33:	Zwei-Locusanalyse von SNPs aus dem IL1-Cluster. Die Berechnung erfolgte wie in 2.10.4 beschrieben, die Darstellung erfolgte mit Sigma-Plot	77
Abbildung 34:	Drei-Locusanalyse von SNPs aus dem IL1-Cluster Die Berechnung erfolgte wie in 2.10.4 beschrieben, die Darstellung erfolgte mit Sigma-Plot.	78
Abbildung 35:	8-Punkt-Eichgerade zur IL-1ra-Bestimmung anhand Proben bekannter Konzentration	81
Abbildung 36:	Verteilung der IL-1ra Serumkonzentration bei Asthmatikern und Nichtasthmatikern in der deutschen Asthma Familienstudie	82
Abbildung 37:	Resequenzierung des Promotorbereiches von <i>IL1RN</i>	83
Abbildung 38:	IL-1/IL-1ra- Ungleichgewicht und T _H 1/T _H 2-Ungleichgewicht	94
Abbildung 39:	Entzündliche Wirkung von IL-1	95

7.6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Standard PCR Ansatz	24
Tabelle 2:	Standardtemperaturprofil für die PCR	24
Tabelle 3:	Standardprotokoll zum Cyclesequencing	25
Tabelle 4:	Temperaturbedingungen für das Cyclesequencing	25
Tabelle 5:	PCR-Ansatz zur Erstellung biotinylierter PCR Produkte	29
Tabelle 6:	Temperaturbedingungen für die PCR mit biotinylierten Primern	30
Tabelle 7:	PCR für die hME-Methode im 384-Well-Format (Gesamtvolumen 6µl)	33
Tabelle 8:	Temperaturbedingungen für die PCR im 384-Well-Format	33
Tabelle 9	Genotypisierungsergebnisse von rs719248 aus dem <i>IL1R2</i> Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen; p-Wert des TDT-Tests	55
Tabelle 10:	Genotypisierungsergebnisse der 6 biallelischen SNPs aus dem <i>IL1R1</i> Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummern, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests	56
Tabelle 11:	Genotypisierungsergebnisse der 19 biallelischen SNPs aus dem <i>IL1RL2</i> Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests	57
Tabelle 12:	Genotypisierungsergebnisse der 7 biallelischen SNPs aus dem <i>IL1RL1</i> Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests	58
Tabelle 13:	Genotypisierungsergebnisse der 14 biallelischen SNPs aus dem <i>IL18R1</i> Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium,	

7. Anhang: Tabellenverzeichnis

	Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests	59
Tabelle 14:	Genotypisierungsergebnisse der 10 biallelischen SNPs aus dem <i>IL18RAP</i> Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests	60
Tabelle 15:	Genotypisierungsergebnisse der 4 biallelischen SNPs aus dem <i>IL1A</i> Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests	61
Tabelle 16:	Genotypisierungsergebnisse der 6 biallelischen SNPs aus dem <i>IL1B</i> Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests	62
Tabelle 17:	Genotypisierungsergebnisse der 5 biallelischen SNPs aus dem <i>IL1F6</i> Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests	63
Tabelle 18:	Genotypisierungsergebnisse der 5 biallelischen SNPs aus dem <i>IL1F8</i> Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests	63
Tabelle 19:	Genotypisierungsergebnisse der 34 biallelischen SNPs aus dem <i>IL1F5</i> Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests	65

7. Anhang: Tabellenverzeichnis

Tabelle 20:	Genotypisierungsergebnisse der 22 biallelischen SNPs aus dem <i>IL1RN</i> Gen (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests	66
Tabelle 21:	Genotypisierungsergebnisse der 11 biallelischen SNPs aus der zu <i>IL1RN</i> distal gelegenen Region(von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests	68
Tabelle 22:	Genotypisierungsergebnisse nach Resequenzierung codierender Bereiche aus <i>IL1RN</i> : Graue Felder: SNP wurde sowohl in deutscher, als auch italienischer Asthmafamilienstudie (vgl. 5.4) genotypisiert und statistisch untersucht. Dunkelgraue Felder: Auswertung des Intron 2 Repeats bei deutscher und italienischer Studie (vgl. 5.4). Schwarz umrahmte Felder: SNPs, die nach Resequenzierung genotypisiert wurden.	71
Tabelle 23:	Genotypisierungsergebnisse der Italienischen Asthmafamilienstudie (von links nach rechts): NCBI rs Nummer, Position in [bp], Art des Nukleinsäureaustausches, Allelfrequenz des selteneren Allels, Anzahl vollständig genotypisierter Familien, Genotypenverteilung, Hardy-Weinberg-Equilibrium, Verhältnis transmittierter Allele zu nichttransmittierten Allelen, p-Wert des TDT-Tests.	73
Tabelle 24:	Zwei-Locus Haplotypen (von links nach rechts): Benachbarte SNPs des jeweiligen Haplotypen wurden untersucht, p-Wert des TDT-Tests	78
Tabelle 25:	Drei-Locus Haplotypen von SNPs aus dem IL1-Cluster: Benachbarte SNPs des jeweiligen Haplotypen wurden untersucht, p-Wert des TDT-Tests	79
Tabelle 26:	Überblick über die 9 häufigsten Haplotypen im <i>IL1RN</i> Gen. Das Allel mit der höheren Prävalenz ist mit 1, das mit der niedrigeren mit 2 bezeichnet. Die Reihenfolge der SNPs ist in 5'->3'Richtung angegeben. Gelb markiert sind die „tagging SNPs“.	80
Tabelle 27:	Haplotypenhäufigkeit der transmittierten (T) Allele und nicht transmittierten (NT): Allele, 6-Punkt-Haplotypen, die aus den „tagging SNPs“ rs315934-rs392503-rs1794067-rs598859-rs973635-rs440286 gebildet wurden	80
Tabelle 28:	Mittels Resequenzierung des Promotorbereiches neu identifizierte SNPs (von links nach rechts): interne SNP-Bezeichnung (Cel=intrazelluläre Form, Sek=sekretorische Form von <i>IL1RN</i>), Art des Polymorphismus, betroffener Sequenzabschnitt vgl. 7.4	84

7. Anhang: Tabellenverzeichnis

Tabelle 29:	Primer für die Genotypisierung	J
Tabelle 30:	Resequenzierung der codierenden Region. Der unterstrichene Primer wurde gleichzeitig als Sequenzierprimer verwendet	K
Tabelle 31:	Primer für PCR des Repeats im Intron 2 von <i>IL1RN</i>	K

LEBENS LAUF:

Name: Henning Gohlke
Anschrift: Heimperthstraße 4
80935 München
Geburtstag: 06.07.1972
Geburtsort: Bielefeld, Nordrhein-Westfalen
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulischer Werdegang/Wehrdienst

1979-1983 Grundschole Hillegossen
1983-1992 Cecilien Gymnasium Bielefeld
1992-1993 Grundwehrdienst beim fünften Schnellbootgeschwader in
Olpenitz

Universitätsausbildung/Beruf

1993-1998 Biologiestudium an der Universität Bielefeld
1998-1999 Diplomarbeit im Institut für Säugetiergenetik
1999-2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der GSF; Institut für
Epidemiologie

7.7. Publikationsliste

1. Gohlke H, Illig T, Bahnweg M, Klopp N, André E, Altmüller J, Herbon N, Werner M, Knapp M, Pescollderung L, Bonner A, Malerba G, Pignatti PF, Wjst M. Association of the Interleukin 1 Receptor Antagonist Gene with Asthma. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 2004;in Press:
2. Werner M, Herbon N, Gohlke H, Altmüller J, Knapp M, Heinrich J, Wjst M. Asthma is associated with single-nucleotide polymorphisms in ADAM33. *Clin.Exp.Allergy* 2004;34:26-31
3. Herbon N, Werner M, Braig C, Gohlke H, Dütsch G, Illig T, Altmüller J, Hampe J, Lantermann A, Schreiber S, Bonifacio E, Ziegler A, Schwab S, Wildenauer D, van den Boom D, Braun A, Knapp M, Reitmeir P, Wjst M. High-resolution SNP scan of chromosome 6p21 in pooled samples from patients with complex diseases. *Genomics* 2004;81:510-518
4. Dütsch G, Illig T, Loesgen S, Rohde K, Klopp N, Herbon N, Gohlke H, Altmüller J, Wjst M. STAT6 as an asthma candidate gene: polymorphism-screening, association and haplotype analysis in a Caucasian sib-pair study. *Hum.Mol.Genet.* 2002;11:613-621
5. Immervoll T, Loesgen S, Dütsch G, Gohlke H, Herbon N, Klugbauer S, Dempfle A, Bickeböller H, Becker-Follmann J, Rüschemdorf F, Saar K, Reis A, Wichmann HE, Wjst M. Fine mapping and single nucleotide polymorphism association results of candidate genes for asthma and related phenotypes. *Hum.Mutat.* 2001;18:327-336

7.8. Literaturverzeichnis

1. Asthma. *Nat.Biotechnol.* 2000;18:IT10-IT11
2. Yazdanbakhsh M, Kreamsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 2002;296:490-494
3. Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat.Immunol.* 2002;3:715-720
4. Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat.Rev.Immunol.* 2001;1:69-75
5. Trepka MJ, Heinrich J, Wichmann HE. The epidemiology of atopic diseases in Germany: an east-west comparison. *Rev Environ Health* 1996;11:119-131
6. von Mutius E, Fritzsche C, Weiland SK, Roll G, Magnussen H. Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. *BMJ* 1992;305:1395-1399
7. Weiland SK et al. Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. *Eur Respir J* 1999;14:862-870
8. Palmer LJ and Cookson WO. Using single nucleotide polymorphisms as a means to understanding the pathophysiology of asthma. *Respir.Res.* 2001;2:102-112
9. Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 1999;402:B5-B11
10. Busse WW and Lemanske RF. Asthma. *N.Engl.J.Med.* 2001;344:350-362
11. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 2000;161:1720-1745

7. Anhang: Literaturverzeichnis

12. Valenta R. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat.Rev.Immunol.* 2002;2:446-453
13. Humbert M, Menz G, Ying S, Corrigan CJ, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol.Today* 1999;20:528-533
14. Virchow JC. Bronchial asthma: extrinsic, intrinsic or mixed? *Wien Med Wochenschr* 1996;146:415-418
15. Holgate ST. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 1999;402:B2-B4
16. Bousquet J et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N.Engl.J.Med.* 1990;323:1033-1039
17. Bousquet J, Chanez P, Vignola AM, Lacoste JY, Michel FB. Eosinophil inflammation in asthma. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1994;150:33-38
18. Horn BR, Robin ED, Theodore J, Van Kessel A. Total eosinophil counts in the management of bronchial asthma. *N.Engl.J.Med.* 1975;292:1152-1155
19. de Monchy JG, Kauffman HF, Venge P, Koeter GH, Jansen HM, Sluiter HJ, de Vries K. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1985;131:373-376
20. Ferguson AC, Whitelaw M, Brown H. Correlation of bronchial eosinophil and mast cell activation with bronchial hyperresponsiveness in children with asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1992;90:609-613
21. Corry DB and Kheradmand F. Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 1999;402:B18-B23
22. Oettgen HC and Geha RS. IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2001;107:429-440
23. Yssel H, Abbal C, Pene J, Bousquet J. The role of IgE in asthma. *Clin.Exp.Allergy* 1998;28:104-109

7. Anhang: Literaturverzeichnis

24. Sutton BJ and Gould HJ. The human IgE network. *Nature* 1993;366:421-428
25. Mitsuyasu H et al. Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. *Nat. Genet.* 1998;19:119-120
26. Oettgen HC and Geha RS. IgE in asthma and atopy: cellular and molecular connections. *J.Clin.Invest.* 1999;104:829-835
27. Romagnani S. T-cell responses in allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001;1:73-78
28. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* 1999;402:B12-B17
29. Prescott SL, Macaubas C, Yabuhara A, Venaille TJ, Holt BJ, Habre W, Loh R, Sly PD, Holt PG. Developing patterns of T cell memory to environmental allergens in the first two years of life. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 1997;113:75-79
30. Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat.Med.* 2002;8:567-573
31. Ho IC and Glimcher LH. Transcription: tantalizing times for T cells. *Cell* 2002;109:109-120
32. Menz G, Ying S, Durham SR, Corrigan CJ, Robinson DS, Hamid Q, Pfister R, Humbert M, Kay AB. Molecular concepts of IgE-initiated inflammation in atopic and nonatopic asthma. *Allergy* 1998;53:15-21
33. Müller B. Cytokine imbalance in non-immunological chronic disease. *Cytokine* 2002;18:334-339
34. Warner JO and Naspitz CK. Third International Pediatric Consensus statement on the management of childhood asthma. International Pediatric Asthma Consensus Group. *Pediatr.Pulmonol.* 1998;25:1-17
35. Wahn U. Pädiatrische Allergologie und Immunologie. 3. Auflage 1999

7. Anhang: Literaturverzeichnis

36. Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu.Rev.Immunol.* 1999;17:255-281
37. Kumar RK. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy? *Pharmacol Ther* 2001;91:93-104
38. Valenta R and Kraft D. Recombinant allergen molecules: tools to study effector cell activation. *Immunol.Rev.* 2001;179:119-127
39. Lambrecht BN. The dendritic cell in allergic airway diseases: a new player to the game. *Clin.Exp.Allergy* 2001;31:206-218
40. Masten BJ and Lipscomb MF. Comparison of lung dendritic cells and B cells in stimulating naive antigen-specific T cells. *J.Immunol.* 1999;162:1310-1317
41. van Rijt LS and Lambrecht BN. Role of dendritic cells and Th2 lymphocytes in asthma: lessons from eosinophilic airway inflammation in the mouse. *Microsc.Res.Tech.* 2001;53:256-272
42. Stumbles PA, Thomas JA, Pimm CL, Lee PT, Venaille TJ, Proksch S, Holt PG. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J.Exp.Med.* 1998;188:2019-2031
43. Maloy KJ and Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat.Immunol.* 2001;2:816-822
44. Sharpe AH and Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat.Rev.Immunol.* 2002;2:116-126
45. Turner H and Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* 1999;402:B24-B30
46. Lack G, Renz H, Saloga J, Bradley KL, Loader J, Leung DY, Larsen G, Gelfand EW. Nebulized but not parenteral IFN-gamma decreases IgE production and normalizes airways function in a murine model of allergen sensitization. *J.Immunol.* 1994;2546-2554

7. Anhang: Literaturverzeichnis

47. Coffman RL and Carty J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J.Immunol.* 1986;136:949-954
48. Pene J et al. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1988;85:6880-6884
49. Nakanishi K et al. IL-2 inhibits IL-4-dependent IgE and IgG1 production in vitro and in vivo. *Int.Immunol.* 1995;7:259-268
50. Locksley RM. Th2 cells: help for helminths. *J.Exp.Med.* 1994;179:1405-1407
51. Chung KF, van Rensen E, Stirling R, Barnes PJ. IL-5 in asthma. *Thorax* 2002;57:751-
52. Hamelmann E and Gelfand EW. IL-5-induced airway eosinophilia--the key to asthma? *Immunol.Rev.* 2001;179:182-191
53. Worm M and Henz BM. Molecular regulation of human IgE synthesis. *J.Mol.Med.* 1997;75:440-447
54. Corry DB. IL-13 in allergy: home at last. *Curr.Opin.Immunol.* 1999;11:610-614
55. de Vries JE. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1998;102:165-169
56. Bacharier LB, Jabara H, Geha RS. Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 1998;115:257-269
57. Mueller TD, Zhang JL, Sebald W, Duschl A. Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochim.Biophys.Acta* 2002;1592:237-250
58. Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Loh R, Sly PD, Holt PG. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J.Immunol.* 1998;160:4730-4737
59. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat.Immunol.* 2001;2:725-731

7. Anhang: Literaturverzeichnis

60. Niederberger V, Niggemann B, Kraft D, Spitzauer S, Valenta R. Evolution of IgM, IgE and IgG(1-4)antibody responses in early childhood monitored with recombinant allergen components: implications for class switch mechanisms. *Eur.J.Immunol.* 2002;32:576-584
61. Steinberger P, Bohle B, di Padova F, Wrann M, Liehl E, Scheiner O, Kraft D, Valenta R. Allergen-specific IgE production of committed B cells from allergic patients in vitro. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1995;96:209-218
62. Chakir J, Laviolette M, Turcotte H, Boutet M, Boulet LP. Cytokine expression in the lower airways of nonasthmatic subjects with allergic rhinitis: influence of natural allergen exposure. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2000;106:904-910
63. Murray JJ, Tonnel AB, Brash AR, Roberts LJ, Gosset P, Workman R, Capron A, Oates JA. Prostaglandin D2 is released during acute allergic bronchospasm in man. *Trans.Assoc.Am Physicians* 1985;98:275-280
64. Liu MC, Hubbard WC, Proud D, Stealey BA, Galli SJ, Kagey-Sobotka A, Bleecker ER, Lichtenstein LM. Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. Cellular, mediator, and permeability changes. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1991;144:51-58
65. Tonnel AB, Joseph M, Gosset P, Fournier E, Capron A. Stimulation of alveolar macrophages in asthmatic patients after local provocation test. *Lancet* 1983;1:1406-1408
66. Calhoun WJ, Reed HE, Moest DR, Stevens CA. Enhanced superoxide production by alveolar macrophages and air-space cells, airway inflammation, and alveolar macrophage density changes after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1992;145:317-325
67. Kawakami T and Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat.Rev.Immunol.* 2002;2:773-786
68. Benoist C and Mathis D. Mast cells in autoimmune disease. *Nature* 2002;420:875-878

7. Anhang: Literaturverzeichnis

69. Jarjour NN, Calhoun WJ, Kelly EA, Gleich GJ, Schwartz LB, Busse WW. The immediate and late allergic response to segmental bronchopulmonary provocation in asthma. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1997;1:1515-1521
70. Wenzel SE, Westcott JY, Smith HR, Larsen GL. Spectrum of prostanoid release after bronchoalveolar allergen challenge in atopic asthmatics and in control groups. An alteration in the ratio of bronchoconstrictive to bronchoprotective mediators. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1989;139:450-457
71. Greiff L, Erjefalt I, Svensson C, Wollmer P, Alkner U, Andersson M, Persson CG. Plasma exudation and solute absorption across the airway mucosa. *Clin Physiol* 1993;13:219-233
72. Van Vyve T, Chanez P, Bernard A, Bousquet J, Godard P, Lauwerijs R, Sibille Y. Protein content in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma and control subjects. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1995;95:60-68
73. Kay AB. "Helper" (CD4+) T cells and eosinophils in allergy and asthma. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1992;145:S22-S26
74. de Monchy JG, Kauffman HF, Venge P, Koeter GH, Jansen HM, Sluiter HJ, de Vries K. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1985;131:373-376
75. Guo CB, Liu MC, Galli SJ, Bochner BS, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Identification of IgE-bearing cells in the late-phase response to antigen in the lung as basophils. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1994;10:384-390
76. Koh YY, Dupuis R, Pollice M, Albertine KH, Fish JE, Peters SP. Neutrophils recruited to the lungs of humans by segmental antigen challenge display a reduced chemotactic response to leukotriene B₄. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1993;8:493-499
77. Montefort S, Gratziau C, Goulding D, Polosa R, Haskard DO, Howarth PH, Holgate ST, Carroll MP. Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways. *J.Clin.Invest.* 1994;93:1411-1421

7. Anhang: Literaturverzeichnis

78. Calhoun WJ, Jarjour NN, Gleich GJ, Stevens CA, Busse WW. Increased airway inflammation with segmental versus aerosol antigen challenge. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1993;147:1465-1471
79. Hogan SP, Koskinen A, Matthaei KI, Young IG, Foster PS. Interleukin-5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1998;157:210-218
80. Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 1992;79:3101-3109
81. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N.Engl.J.Med.* 1998;338:1592-1600
82. Bochner BS. Cellular adhesion and its antagonism. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1997;100:581-585
83. Wardlaw AJ. Molecular basis for selective eosinophil trafficking in asthma: A multistep paradigm. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1999;104:917-926
84. Hamid QA and Minshall EM. Molecular pathology of allergic disease: I: lower airway disease. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2000;105:20-36
85. Nickel R, Beck LA, Stellato C, Schleimer RP. Chemokines and allergic disease. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1999;104:723-742
86. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N.Engl.J.Med.* 1998;338:436-445
87. Barnes KC and Marsh DG. The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunol.Today* 1998;19:325-332
88. Anderson GG and Cookson WO. Recent advances in the genetics of allergy and asthma. *Mol.Med.Today* 1999;5:264-273
89. Sengler C, Lau S, Wahn U, Nickel R. Interactions between genes and environmental factors in asthma and atopy: new developments. *Respir.Res.* 2002;3:1-7
90. Palmer LJ and Cookson WO. Genomic approaches to understanding asthma. *Genome Res.* 2000;10:1280-1287

7. Anhang: Literaturverzeichnis

91. Ng TP, Niti M, Tan WC. Trends and ethnic differences in asthma hospitalization rates in Singapore, 1991 to 1998. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 2003;90:51-55
92. Slutsky AS and Zamel N. Genetics of asthma: the University of Toronto Program. University of Toronto Genetics of Asthma Research Group. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1997;156:130-132
93. Ordman D. Asthma in the Tristan da Cunha islanders. *J Asthma Res* 1968;5:177-190
94. Los H, Postmus PE, Boomsma DI. Asthma genetics and intermediate phenotypes: a review from twin studies. *Twin Res* 2001;4:81-93
95. The European Community Respiratory Health Survey Group. Genes for asthma? An analysis of the European Community Respiratory Health Survey. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1997;156:1773-1780
96. Skadhauge LR, Christensen K, Kyvik KO, Sigsgaard T. Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11,688 Danish twin pairs. *Eur Respir J* 1999;13:8-14
97. Whittaker PA. Genes for asthma: much ado about nothing? *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:212-219
98. Hoffjan S and Ober C. Present status on the genetic studies of asthma. *Curr.Opin.Immunol.* 2002;14:709-717
99. Collins FS. Positional cloning: let's not call it reverse anymore. *Nat.Genet.* 1992;1:3-6
100. Collins FS. Positional cloning moves from perditional to traditional. *Nat.Genet.* 1995;9:347-350
101. Daniels SE et al. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 1996;383:247-250
102. Xu J et al. Genomewide screen and identification of gene-gene interactions for asthma-susceptibility loci in three U.S. populations: collaborative study on the genetics of asthma. *Am.J.Hum.Genet.* 2001;68:1437-1446
103. Mathias RA et al. Genome-wide linkage analyses of total serum IgE using variance components analysis in asthmatic families. *Genet.Epidemiol.* 2001;20:340-355

7. Anhang: Literaturverzeichnis

104. Hizawa N et al. Genetic regulation of Dermatophagoides pteronyssinus-specific IgE responsiveness: a genome-wide multipoint linkage analysis in families recruited through 2 asthmatic sibs. Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *J.Allergy Clin.Immunol.* 1998;102:436-442
105. Ober C et al. Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. *Hum.Mol.Genet.* 1998;7:1393-1398
106. 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
107. Wjst M et al. A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. *Genomics* 1999;58:1-8
108. Immervoll T et al. Fine mapping and single nucleotide polymorphism association results of candidate genes for asthma and related phenotypes. *Hum.Mutat.* 2001;18:327-336
109. Dizier MH et al. Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEA study. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2000;1812-1818
110. Xu X et al. A genomewide search for quantitative-trait Loci underlying asthma. *Am.J.Hum.Genet.* 2001;69:1271-1277
111. Xu J, Postma DS, Howard TD, Koppelman GH, Zheng SL, Stine OC, Bleecker ER, Meyers DA. Major genes regulating total serum immunoglobulin E levels in families with asthma. *Am.J.Hum.Genet.* 2000;67:1163-1173
112. Koppelman GH, Stine OC, Xu J, Howard TD, Zheng SL, Kauffman HF, Bleecker ER, Meyers DA, Postma DS. Genome-wide search for atopy susceptibility genes in Dutch families with asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2002;109:498-506
113. Yokouchi Y et al. Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31-q33 near the interleukin 12 B locus by a genome-wide search in japanese families. *Genomics* 2000;66:152-160

7. Anhang: Literaturverzeichnis

114. Yokouchi Y et al. A genome-wide linkage analysis of orchard grass-sensitive childhood seasonal allergic rhinitis in Japanese families. *Genes Immun.* 2002;3:9-13
115. Laitinen T et al. A susceptibility locus for asthma-related traits on chromosome 7 revealed by genome-wide scan in a founder population. *Nat. Genet.* 2001;28:87-91
116. Haagerup A, Bjerke T, Schoitz 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;9:945-952
117. Hakonarson H et al. A major susceptibility gene for asthma maps to chromosome 14q24. *Am.J.Hum.Genet.* 2002;71:483-491
118. Van Eerdewegh P et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002;418:426-430
119. Wjst M and Immervoll T. An Internet linkage and mutation database for the complex phenotype asthma. *Bioinformatics* 1998;14:827-828
120. Immervoll T and Wjst M. Current status of the Asthma and Allergy Database. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:213-214
121. Wjst M. When air is rare: behind the scenes of an asthma web site. *J Asthma* 2001;38:399-404
122. Lander E and Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat. Genet.* 1995;11:241-247
123. Altmüller J, Palmer LJ, Fischer G, Scherb H, Wjst M. Genomewide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find. *Am.J.Hum.Genet.* 2001;69:936-950
124. Hakonarson H and Wjst M. Current concepts on the genetics of asthma. *Curr.Opin.Pediatr.* 2001;13:267-277

7. Anhang: Literaturverzeichnis

125. Howard TD, Postma DS, Jongepier H, Moore WC, Koppelman GH, Zheng SQL, Xu JF, Bleecker ER, Meyers DA. Association of a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene with asthma in ethnically diverse populations. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2003;112:717-722
126. Werner M, Herbon N, Gohlke H, Altmüller J, Knapp M, Heinrich J, Wjst M. Asthma is associated with single-nucleotide polymorphisms in ADAM33. *Clin.Exp.Allergy* 2004;34:26-31
127. Bhattacharyya S, Leaves NI, Abecasis GR, Moffatt MF, Daniels SE, Musk AW, Athrop GM, Cookson WO. Linkage of asthma and associated phenotypes to the interleukin 1 cluster on human chromosome 2q13. Human Genome Meeting Turin:1998 Abstract
128. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. *Nat.Genet.* 1997;15:389-392
129. Ewart SL. Quantitative trait loci controlling allergen-induced airway hyperresponsiveness in inbred mice. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2000;23:537-545
130. Heinzmann A and Daser A. Mouse models for the genetic dissection of atopy. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 2002;127:170-180
131. De Sanctis GT, Merchant M, Beier DR, Dredge RD, Grobholz JK, Martin TR, Lander ES, Drazen JM. Quantitative locus analysis of airway hyperresponsiveness in A/J and C57BL/6J mice. *Nat.Genet.* 1995;11:150-154
132. Nicklin MJ, Barton JL, Nguyen M, FitzGerald MG, Duff GW, Kornman K. A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster. *Genomics* 2002;79:718-725
133. Dale M and Nicklin MJ. Interleukin-1 receptor cluster: gene organization of IL1R2, IL1R1, IL1RL2 (IL-1Rrp2), IL1RL1 (T1/ST2), and IL18R1 (IL-1Rrp) on human chromosome 2q. *Genomics* 1999;57:177-179
134. Born TL, Thomassen E, Bird TA, Sims JE. Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling. *J.Biol.Chem.* 1998;273:29445-29450

7. Anhang: Literaturverzeichnis

135. Nothwang HG et al. Molecular cloning of the interleukin-1 gene cluster: construction of an integrated YAC/PAC contig and a partial transcriptional map in the region of chromosome 2q13. *Genomics* 1997;41:370-378
136. Kong A et al. A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat.Genet.* 2002;31:241-247
137. Pilz AJ, Povey S, Gruss P, Abbott CM. Mapping of the human homologs of the murine paired-box-containing genes. *Mamm.Genome* 1993;4:78-82
138. Sims JE. IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. *Curr.Opin.Immunol.* 2002;14:117-122
139. Martin MU and Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim.Biophys.Acta* 2002;1592:265-280
140. Mantovani A, Locati M, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol* 2001;22:328-336
141. Chung KF and Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999;54:825-857
142. Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997;8:253-265
143. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-2147
144. Dinarello CA. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N.Engl.J.Med.* 2000;343:732-734
145. Fitzgerald KA and O'Neill LA. The role of the interleukin-1/Toll-like receptor superfamily in inflammation and host defence. *Microbes Infect.* 2000;2:933-943
146. Zuany-Amorim C, Hastewell J, Walker C. Toll-like receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:797-807
147. Adcock IM. Glucocorticoid-regulated transcription factors. *Pulm Pharmacol Ther* 2001;14:211-219

7. Anhang: Literaturverzeichnis

148. Auron PE. The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;9:221-237
149. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12:53-72
150. Kruse S et al. The Ile198Thr and Ala379Val variants of plasmatric PAF-acetylhydrolase impair catalytical activities and are associated with atopy and asthma. *Am.J.Hum.Genet.* 2000;66:1522-2000
151. Christie PE and Henderson WR, Jr. Lipid inflammatory mediators: leukotrienes, prostaglandins, platelet-activating factor. *Clin Allergy Immunol* 2002;16:233-254
152. Stafforini DM. PAF acetylhydrolase gene polymorphisms and asthma severity. *Pharmacogenomics* 2001;2:163-175
153. Barnes PJ. NO or no NO in asthma? *Thorax* 1996;51:218-220
154. Uracz W, Uracz D, Olszanecki R, Gryglewski RJ. Interleukin 1beta induces functional prostaglandin E synthase in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J.Physiol.Pharmacol.* 2002;53:643-654
155. Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, Gamble JR, James MJ. Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J.Immunol.* 2001;167:2831-2838
156. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002;23:144-150
157. Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MA, Jr., Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, Klunk D, Schleimer RP. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J.Exp.Med.* 1991;173:1553-1557

7. Anhang: Literaturverzeichnis

158. Ebisawa M, Yamada T, Bickel C, Klunk D, Schleimer RP. Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. III. Effect of the chemokine RANTES. *J.Immunol.* 1994;153:2153-2160
159. Godding V, Stark JM, Sedgwick JB, Busse WW. Adhesion of activated eosinophils to respiratory epithelial cells is enhanced by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1995;13:555-562
160. Pober JS, Gimbrone MA, Jr., Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer TA. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J.Immunol.* 1986;137:1893-1896
161. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, Mescher MF. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J.Immunol.* 1999;162:3256-3262
162. Lipsky PE, Thompson PA, Rosenwasser LJ, Dinarello CA. The role of interleukin 1 in human B cell activation: inhibition of B cell proliferation and the generation of immunoglobulin-secreting cells by an antibody against human leukocytic pyrogen. *J.Immunol.* 1983;130:2708-2714
163. Hakonarson H, Herrick DJ, Serrano PG, Grunstein MM. Autocrine role of interleukin 1beta in altered responsiveness of atopic asthmatic sensitized airway smooth muscle. *J.Clin.Invest.* 1997;99:117-124
164. Nakae S et al. IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. *Int.Immunol.* 2003;15:483-490
165. Hakonarson H, Halapi E, Whelan R, Gulcher J, Stefansson K, Grunstein MM. Association between IL-1beta/TNF-alpha-induced glucocorticoid-sensitive changes in multiple gene expression and altered responsiveness in airway smooth muscle. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2001;25:761-771
166. Crimi E, Milanese M, Pingfang S, Brusasco V. Allergic inflammation and airway smooth muscle function. *Sci.Total Environ.* 2001;270:57-61

7. Anhang: Literaturverzeichnis

167. Wanner A, Salathe M, O'Riordan TG. Mucociliary clearance in the airways. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1996;154:1868-1902
168. Kim KC, McCracken K, Lee BC, Shin CY, Jo MJ, Lee CJ, Ko KH. Airway goblet cell mucin: its structure and regulation of secretion. *Eur Respir J* 1997;10:2644-2649
169. Kim YS, Gum JR, Jr., Crawley SC, Deng G, Ho JJ. Mucin gene and antigen expression in biliopancreatic carcinogenesis. *Ann.Oncol.* 1999;10:51-55
170. Kim WD. Lung mucus: a clinician's view. *Eur Respir J* 1997;10:1914-1917
171. Kim YD, Kwon EJ, Park DW, Song SY, Yoon SK, Baek SH. Interleukin-1beta induces MUC2 and MUC5AC synthesis through cyclooxygenase-2 in NCI-H292 cells. *Mol.Pharmacol.* 2002;62:1112-1118
172. Rosenwasser LJ. Biologic activities of IL-1 and its role in human disease. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1998;102:344-350
173. Dinarello CA. Interleukin-1. *Adv.Pharmacol.* 1994;25:21-51
174. Dinarello CA. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1998;856:1-11
175. Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G, Dinarello CA. IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2001;98:13249-13254
176. Vollmert, C. Methoden- und Geräteentwicklung zur *in vitro* Exposition humaner Keratinozyten aus atopischem Ekzem gegenüber Schadstoffen in der Gasphase.2003;Thesis/Dissertation
177. Wakabayashi G, Gelfand JA, Jung WK, Connolly RJ, Burke JF, Dinarello CA. Staphylococcus epidermidis induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. Comparison to Escherichia coli. *J.Clin.Invest.* 1991;87:1925-1935
178. Watanabe N and Kobayashi Y. Selective release of a processed form of interleukin 1 alpha. *Cytokine* 1994;6:597-601

7. Anhang: Literaturverzeichnis

179. Sims JE et al. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 1988;241:585-589
180. Sims JE, Acres RB, Grubin CE, McMahan CJ, Wignall JM, March CJ, Dower SK. Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1989;86:8946-8950
181. Vigers GP, Anderson LJ, Caffes P, Brandhuber BJ. Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta. *Nature* 1997;386:190-194
182. Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J.Biol.Chem.* 1995;270:13757-13765
183. Cullinan EB, Kwee L, Nunes P, Shuster DJ, Ju G, McIntyre KW, Chizzonite RA, Labow MA. IL-1 receptor accessory protein is an essential component of the IL-1 receptor. *J.Immunol.* 1998;161:5614-5620
184. Burns K, Martinon F, Esslinger C, Pahl H, Schneider P, Bodmer JL, Di Marco F, French L, Tschopp J. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J.Biol.Chem.* 1998;273:12203-12209
185. Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL- 1 signaling. *Science* 1997;278:1612-1615
186. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997;7:837-847
187. Janssens S and Beyaert R. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem.Sci.* 2002;27:474-482
188. Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, Tong L. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 2000;408:111-115
189. Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R, Tschopp J. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J.Exp.Med.* 2003;197:263-268

7. Anhang: Literaturverzeichnis

190. Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2002;99:5567-5572
191. Cao Z, Henzel WJ, Gao X. IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 1996;271:1128-1131
192. Martin M, Bol GF, Eriksson A, Resch K, Brigelius-Flohe R. Interleukin-1-induced activation of a protein kinase co-precipitating with the type I interleukin-1 receptor in T cells. *Eur J Immunol* 1994;24:1566-1571
193. Burns K et al. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat.Cell.Biol.* 2000;2:346-351
194. Li Q and Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat.Rev.Immunol.* 2002;2:725-734
195. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001;412:346-351
196. Janssens S and Beyaert R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor- associated kinase (IRAK) family members. *Mol.Cell* 2003;293-302
197. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996;383:443-446
198. Jiang Z, Ninomiya-Tsuji J, Qian Y, Matsumoto K, Li X. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol.Cell.Biol.* 2002;22:7158-7167
199. Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol.Cell* 2000;5:649-658
200. Yamin TT and Miller DK. The interleukin-1 receptor-associated kinase is degraded by proteasomes following its phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 1997;272:21540-21547

7. Anhang: Literaturverzeichnis

201. Li X, Commane M, Burns C, Vithalani K, Cao Z, Stark GR. Mutant cells that do not respond to interleukin-1 (IL-1) reveal a novel role for IL-1 receptor-associated kinase. *Mol.Cell.Biol.* 1999;19:4643-4652
202. Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000;103:351-361
203. Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, Verderber E, Brewer MT, Hannum CH, Thompson RC. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 1990;343:341-346
204. Haskill S et al. cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin 1 receptor antagonist associated with epithelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1991;88:3681-3685
205. McMahan CJ et al. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J.* 2001;10:2821-2832
206. Schreuder H, Tardif C, Trump-Kallmeyer S, Soffientini A, Sarubbi E, Akesson A, Bowlin T, Yanofsky S, Barrett RW. A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist. *Nature* 1997;386:194-200
207. Reddy P, Slack JL, Davis R, Cerretti DP, Kozlosky CJ, Blanton RA, Shows D, Peschon JJ, Black RA. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *J.Biol.Chem.* 2000;275:14608-14614
208. Orlando S, Sironi M, Bianchi G, Drummond AH, Boraschi D, Yabes D, Mantovani A. Role of metalloproteases in the release of the IL-1 type II decoy receptor. *J.Biol.Chem.* 1997;31764-31769
209. Colotta F et al. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 1993;261:472-475
210. Dinarello CA. Interleukin-18. *Methods* 1999;19:121-132

7. Anhang: Literaturverzeichnis

211. Tsutsui H, Matsui K, Okamura H, Nakanishi K. Pathophysiological roles of interleukin-18 in inflammatory liver diseases. *Immunol.Rev.* 2000;174:192-209
212. Dinarello CA. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1999;103:11-24
213. Akira S. The role of IL-18 in innate immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 2000;12:59-63
214. Ushio S et al. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J.Immunol.* 1996;156:4274-4279
215. Barbulescu K, Becker C, Schlaak JF, Schmitt E, Meyer zum Buschenfelde KH, Neurath MF. Cutting Edge: IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes. *J.Immunol.* 1998;160:3642-3647
216. Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T, Okamura H, Nakanishi K. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. *Int.Immunol.* 2000;12:151-160
217. Kunikata T, Torigoe K, Ushio S, Okura T, Ushio C, Yamauchi H, Ikeda M, Ikegami H, Kurimoto M. Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral blood cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody. *Cell.Immunol.* 1998;189:135-143
218. Okamura H et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995;3:88-91
219. Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S, Nakanishi K. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J.Immunol.* 1998;161:3400-3407
220. Robinson D et al. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity* 1997;7:571-581

7. Anhang: Literaturverzeichnis

221. Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T, Suemoto Y, Okamoto I, Usui M, Ikeda M, Kurimoto M. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J.Immunol.* 1997;158:1541-1550
222. Micallef MJ et al. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur.J.Immunol.* 1996;26:1647-1651
223. Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa YI, Iwakura Y, Nakanishi K. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997;94:3948-3953
224. Yoshimoto T, Nagai N, Ohkusu K, Ueda H, Okamura H, Nakanishi K. LPS-stimulated SJL macrophages produce IL-12 and IL-18 that inhibit IgE production in vitro by induction of IFN-gamma production from CD3intIL- 2R beta+ T cells. *J.Immunol.* 1998;161:1492-
225. Hoshino T, Wiltrout RH, Young HA. IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *J.Immunol.* 1999;162:5070-5077
226. Hofstra CL, Van A, I, Hofman G, Kool M, Nijkamp FP, Van Oosterhout AJ. Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia, and serum IgE levels. *J.Immunol.* 1998;161:5054-5060
227. Bazan JF, Timans JC, Kastelein RA. A newly defined interleukin-1? *Nature* 1996;379:591-
228. Gu Y et al. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin- 1beta converting enzyme. *Science* 1997;225:619-623
229. Ghayur T et al. Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* 1997;386:619-623
230. Torigoe K et al. Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. *J.Biol.Chem.* 1997;272:25737-25742

7. Anhang: Literaturverzeichnis

231. Parnet P, Garka KE, Bonnert TP, Dower SK, Sims JE. IL-1Rrp is a novel receptor-like molecule similar to the type I interleukin-1 receptor and its homologues T1/ST2 and IL-1R AcP. *J.Biol.Chem.* 1996;271:3967-3970
232. Debets R et al. IL-18 receptors, their role in ligand binding and function: anti-IL- 1RAcPL antibody, a potent antagonist of IL-18. *J.Immunol.* 2000;165:4950-4956
233. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL- 18-mediated function. *Immunity* 1998;9:143-150
234. Aizawa Y et al. Cloning and expression of interleukin-18 binding protein. *FEBS Lett.* 1999;445:338-342
235. Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* 1999;10:127-136
236. Bufler P, Azam T, Gamboni-Robertson F, Reznikov LL, Kumar S, Dinarello CA, Kim SH. A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2002;99:13723-13728
237. Debets R et al. Two novel IL-1 family members, IL-1 delta and IL-1 epsilon, function as an antagonist and agonist of NF-kappa B activation through the orphan IL-1 receptor-related protein 2. *J.Immunol.* 2001;167:1440-1446
238. Li H, Tago K, Io K, Kuroiwa K, Arai T, Iwahana H, Tominaga S, Yanagisawa K. The cloning and nucleotide sequence of human ST2L cDNA. *Genomics* 2000;67:284-290
239. Löhning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, Levinson D, Radbruch A, Kamradt T. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998;95:6930-6935

7. Anhang: Literaturverzeichnis

240. Xu D, Chan WL, Leung BP, Hunter D, Schulz K, Carter RW, McInnes IB, Robinson JH, Liew FY. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J.Exp.Med.* 1998;188:1485-1492
241. Coyle AJ et al. Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses. *J.Exp.Med.* 1999;7:855-902
242. Walzl G, Matthews S, Kendall S, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ, Openshaw PJ, Hussell T. Inhibition of T1/ST2 during respiratory syncytial virus infection prevents T helper cell type 2 (Th2)- but not Th1-driven immunopathology. *J.Exp.Med.* 2001;193:785-792
243. Oshikawa K, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Ohno S, Tominaga SI, Sugiyama Y. Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 2001;164:277-281
244. Singer VL, Jones LJ, Yue ST, Haugland RP. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence- based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Anal.Biochem.* 1997;249:228-238
245. Spielmann HP, Wemmer DE, Jacobsen JP. Solution structure of a DNA complex with the fluorescent bis- intercalator TOTO determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 1995;34:8542-8553
246. Buetow KH et al. High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip- based matrix- assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2001;98:581-584
247. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491
248. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1977;74:5463-5467

7. Anhang: Literaturverzeichnis

249. Karas M and Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal.Chem.* 1988;60:2299-2301
250. Kirpekar F, Nordhoff E, Larsen LK, Kristiansen K, Roepstorff P, Hillenkamp F. DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* 1998;26:2554-2559
251. Little DP, Braun A, Darnhofer-Demar B, Frilling A, Li Y, Mclver RT, Jr., Koster H. Detection of RET proto-oncogene codon 634 mutations using mass spectrometry. *J.Mol.Med.* 1997;75:745-750
252. Little DP, Braun A, Darnhofer-Demar B, Koster H. Identification of apolipoprotein E polymorphisms using temperature cycled primer oligo base extension and mass spectrometry. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:545-548
253. Gut IG. Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Hum.Mutat.* 2001;17:475-492
254. Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal.Chem.* 1991;63:1193A-1203A
255. Griffin TJ and Smith LM. Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Trends Biotechnol.* 2000;18:77-84
256. Storm N, Darnhofer-Patel B, van den BD, Rodi CP. MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. *Methods Mol.Biol.* 2003;212:241-262
257. Leushner J. MALDI TOF mass spectrometry: an emerging platform for genomics and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2001;1:11-18
258. Pusch W, Wurmbach JH, Thiele H, Kostrzewa M. MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. *Pharmacogenomics* 2002;3:537-548
259. Kruglyak L and Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat.Genet.* 2001;27:234-236

7. Anhang: Literaturverzeichnis

260. Karas M, Bahr U, Ingendoh A, Nordhoff E, Stahl B, Strupat F, Hillenkamp F. Principles and applications of matrix-assisted UV-laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal.Chim.Acta.* 1991;241:151-153
261. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 1988;2:151-153
262. Little DP, Braun A, O'Donnell MJ, Koster H. Mass spectrometry from miniaturized arrays for full comparative DNA analysis. *Nat.Med.* 1997;3:1413-1416
263. Hartmer R, Storm N, Boecker S, Rodi CP, Hillenkamp F, Jurinke C, van den BD. RNase T1 mediated base-specific cleavage and MALDI-TOF MS for high- throughput comparative sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:1-10
264. Ding C and Cantor CR. A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2003;100:3059-3064
265. Gross J and Strupat K. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) applied to biological macromolecules. *Trends Anal.Chem.* 1998;17:470-484
266. Jurinke C, van den BD, Collazo V, Luchow A, Jacob A, Koster H. Recovery of nucleic acids from immobilized biotin-streptavidin complexes using ammonium hydroxide and applications in MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal.Chem.* 1997;69:904-910
267. Leushner J and Chiu NH. Automated mass spectrometry: a revolutionary technology for clinical diagnostics. *Mol.Diagn.* 2000;5:341-348
268. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am.J.Hum.Genet.* 1993;52:506-516
269. Zhao H, Zhang S, Merikangas KR, Trixler M, Wildenauer DB, Sun F, Kidd KK. Transmission/disequilibrium tests using multiple tightly linked markers. *Am.J.Hum.Genet.* 2000;67:936-946

7. Anhang: Literaturverzeichnis

270. Becker T and Knapp M. Efficiency of haplotype frequency estimation when nuclear family information is included. *Hum.Hered.* 2002;54:45-53
271. Lewontin RC. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 1988;120:849-852
272. Abecasis GR and Cookson WO. GOLD--graphical overview of linkage disequilibrium. *Bioinformatics* 2000;16:182-183
273. Wjst M and Wichmann HE. Collaborative study on the genetics of asthma in Germany. *Clin.Exp.Allergy* 1995;25 Suppl 2:23-25
274. Statement of the American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1987;136:225-244
275. Malerba G et al. Linkage analysis of chromosome 12 markers in Italian families with atopic asthmatic children. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 2000;162:1587-1590
276. Filipiak B, Heinrich J, Schäfer T, Ring J, Wichmann HE. Farming, rural lifestyle and atopy in adults from southern Germany-- results from the MONICA/KORA study Augsburg. *Clin.Exp.Allergy* 2001;31:1829-1838
277. Wassmer G, Jorres RA, Heinrich J, Wjst M, Reitmeir P, Wichmann HE. The association between baseline lung function and bronchial responsiveness to methacholine. *Eur.J.Med.Res.* 1997;2:47-54
278. Sims JE, Painter SL, Gow IR. Genomic organization of the type I and type II IL-1 receptors. *Cytokine* 1995;7:483-490
279. Gupta K and Bewtra A. IL-1 receptor-type expression in relation to atopy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1999;103:1100-1107
280. Ritz SA, Cundall MJ, Gajewska BU, Alvarez D, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ, McKenzie AN, Stampfli MR, Jordana M. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor-driven respiratory mucosal sensitization induces Th2 differentiation and function independently of interleukin-4. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2002;27:428-435

7. Anhang: Literaturverzeichnis

281. Lambrecht BN, De Veerman M, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Thielemans K, Pauwels RA. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J.Clin.Invest.* 2000;106:551-559
282. Kruse S, Kuehr J, Moseler M, Kopp MV, Kurz T, Deichmann KA, Foster PS, Mattes J. Polymorphisms in the IL 18 gene are associated with specific sensitization to common allergens and allergic rhinitis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2003;111:117-122
283. Karjalainen J, Joki-Erkkila VP, Hulkkonen J, Pessi T, Nieminen MM, Aromaa A, Klaukka T, Hurme M. The IL1A genotype is associated with nasal polyposis in asthmatic adults. *Allergy* 2003;58:393-396
284. Bensen JT, Langefeld CD, Li L, McCall CE, Cousart SL, Dryman BN, Freedman BI, Bowden DW. Association of an IL-1A 3'UTR polymorphism with end-stage renal disease and IL-1alpha expression. *Kidney Int.* 2003;63:1211-1219
285. Kornman KS, Pankow J, Offenbacher S, Beck J, di Giovine F, Duff GW. Interleukin-1 genotypes and the association between periodontitis and cardiovascular disease. *J.Periodont.Res.* 1999;34:353-357
286. Genevay S, di Giovine FS, Perneger TV, Silvestri T, Stingelin S, Duff G, Guerne PA. Association of interleukin-4 and interleukin-1B gene variants with Larsen score progression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;47:303-309
287. Buchs N, di Giovine FS, Silvestri T, Vannier E, Duff GW, Miossec P. IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. *Genes Immun.* 2001;2:222-228
288. Sims JE et al. A new nomenclature for IL-1-family genes. *Trends Immunol.* 2001;22:536-537
289. Smith MF, Eidlen D, Arend WP, Gutierrez-Hartmann A. LPS-induced expression of the human IL-1 receptor antagonist gene is controlled by multiple interacting promoter elements. *J.Immunol.* 1994;153:3584-3593

7. Anhang: Literaturverzeichnis

290. Smith MF, Eidlen D, Brewer MT, Eisenberg SP, Arend WP, Gutierrez-Hartmann A. Human IL-1 receptor antagonist promoter. Cell type-specific activity and identification of regulatory regions. *J.Immunol.* 1992;149:2000-2007
291. Jenkins JK, Drong RF, Shuck ME, Bienkowski MJ, Slightom JL, Arend WP, Smith MF. Intracellular IL-1 receptor antagonist promoter: cell type-specific and inducible regulatory regions. *J.Immunol.* 1997;158:748-755
292. Holtkamp GM, de Vos AF, Kijlstra A, Peek R. Expression of multiple forms of IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) by human retinal pigment epithelial cells: identification of a new IL-1ra exon. *Eur.J.Immunol.* 1999;29:215-224
293. Weissbach L, Tran K, Colquhoun SA, Champlaud MF, Towle CA. Detection of an interleukin-1 intracellular receptor antagonist mRNA variant. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1998;244:91-95
294. Marculescu R, Endler G, Schillinger M, Iordanova N, Exner M, Hayden E, Huber K, Wagner O, Mannhalter C. Interleukin-1 receptor antagonist genotype is associated with coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:3582-3585
295. Mao XQ et al. Imbalance production between interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in bronchial asthma. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2000;276:607-612
296. Joos L, McIntyre L, Ruan J, Connett JE, Anthonisen NR, Weir TD, Pare PD, Sandford AJ. Association of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist haplotypes with rate of decline in lung function in smokers. *Thorax* 2001;56:863-866
297. Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin.Infect.Dis.* 2002;34:204-209
298. Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13:323-340

7. Anhang: Literaturverzeichnis

299. Rieder MJ, Taylor SL, Tobe VO, Nickerson DA. Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res.* 1998;26:967-973
300. Steinkasserer A, Koelble K, Sim RB. Length variation within intron 2 of the human IL-1 receptor antagonist protein gene (IL1RN). *Nucleic Acids Res.* 1991;19:5095-
301. Reich DE, Gabriel SB, Altshuler D. Quality and completeness of SNP databases. *Nat.Genet.* 2003;33:457-458
302. Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, Matsui H, Miyao M, Hosoi T, Takahashi H, Fukuchi Y, Ouchi Y. Neither IL-1beta, IL-1 receptor antagonist, nor TNF-alpha polymorphisms are associated with susceptibility to COPD. *Respir Med* 2000;94:847-851
303. Lewis C.M. Genetic association studies: Design, analysis and interpretation. *Bioinformatics* 2002;3:146-153
304. Cardon LR and Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 2003;361:598-604
305. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat.Rev Genet.* 2002;3:391-396
306. Weiss KM and Terwilliger JD. How many diseases does it take to map a gene with SNPs? *Nat.Genet.* 2000;26:151-157
307. Terwilliger JD and Goring HHH. Gene mapping in the 20th and 21st centuries: Statistical methods, data analysis, and experimental design. *Hum.Biol.* 2000;72:63-132
308. Pritchard JK and Rosenberg NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am.J.Hum.Genet.* 1999;65:220-228
309. Bacanu SA, Devlin B, Roeder K. Association studies for quantitative traits in structured populations. *Genet.Epidemiol.* 2002;22:78-93

7. Anhang: Literaturverzeichnis

310. Devlin B and Roeder K. Genomic control for association studies. *Biometrics* 1999;55:997-1004
311. Devlin B, Roeder K, Wasserman L. Genomic control, a new approach to genetic-based association studies. *Theor Popul Biol* 2001;60:155-166
312. Bacanu SA, Devlin B, Roeder K. The power of genomic control. *Am.J.Hum.Genet.* 2000;66:1933-1944
313. Devlin B, Roeder K, Bacanu SA. Unbiased methods for population-based association studies. *Genet.Epidemiol.* 2001;21:273-284
314. Maquat LE. The power of point mutations. *Nat.Genet.* 2001;27:5-6
315. McCarthy EM and Phillips JA, III. Characterization of an intron splice enhancer that regulates alternative splicing of human GH pre-mRNA. *Hum.Mol.Genet.* 1998;7:1491-1496
316. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat.Rev.Genet.* 2002;3:285-298
317. Xie WL and Herschman HR. Transcriptional regulation of prostaglandin synthase 2 gene expression by platelet-derived growth factor and serum. *J.Biol.Chem.* 1996;271:31742-31748
318. Hilkens CMU, Snijders A, Snijdewint FGM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Modulation of T-cell cytokine secretion by accessory cell-derived products. *Eur Respir J* 1996;9:S90-S94
319. Fedyk ER, Harris SG, Padilla J, Phipps RP. Prostaglandin receptors of the EP2 and EP4 subtypes regulate B lymphocyte activation and differentiation to IgE-secreting cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1997;433:153-157
320. Kalinski P, Hilkens CMU, Snijders A, Snijdewint FGM, Kapsenberg ML. Dendritic cells, obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE(2), promote Th2 responses. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1997;417:363-367

7. Anhang: Literaturverzeichnis

321. Barrat FJ et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J.Exp.Med.* 2002;195:603-616
322. Song KS, Lee WJ, Chung KC, Koo JS, Yang EJ, Choi JY, Yoon JH. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce MUC5AC overexpression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinases-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 2003;278:23243-23250
323. Takeyama K, Dabbagh K, Shim JJ, Dao-Pick T, Ueki IF, Nadel JA. Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: Role of neutrophils. *J.Immunol.* 2000;164:1546-1552
324. Gray T, Nettesheim P, Basbaum C, Koo JS. Regulation of mucin gene expression in human tracheobronchial epithelial cells by thyroid hormone. *Biochem.J.* 2001;353:727-734
325. Perrais M, Pigny P, Ducourouble MP, Petitprez D, Porchet N, Aubert JP, Van Seuningen I. Characterization of human mucin gene MUC4 promoter - Importance of growth factors and proinflammatory cytokines for its regulation in pancreatic cancer cells. *J.Biol.Chem.* 2001;276:30923-30933
326. Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ueki IF, Lausier JA, Nadel JA. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J.Immunol.* 1999;162:6233-6237
327. Longphre M et al. Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. *J.Clin.Invest.* 1999;104:1375-1382
328. Shim JJ, Dabbagh K, Ueki IF, Dao-Pick T, Burgel PR, Takeyama K, Tam DCW, Nadel JA. IL-13 induces mucin production by stimulating epidermal growth factor receptors and by activating neutrophils. *Am.J.Physiol.Lung Cell Mol.Physiol.* 2001;280:L134-L140
329. Wills-Karp M, Uchida Y, Lee JY, Jinot J, Hirata A, Hirata F. Organ culture with proinflammatory cytokines reproduces impairment of the beta-adrenoceptor-mediated relaxation in tracheas of a guinea pig antigen model. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1993;8:153-159

7. Anhang: Literaturverzeichnis

330. Hakonarson H, Herrick DJ, Serrano PG, Grunstein MM. Mechanism of cytokine-induced modulation of beta-adrenoceptor responsiveness in airway smooth muscle. *J.Clin.Invest.* 1996;97:2593-2600
331. Watson ML, Smith D, Bourne AD, Thompson RC, Westwick J. Cytokines contribute to airway dysfunction in antigen-challenged guinea pigs: inhibition of airway hyperreactivity, pulmonary eosinophil accumulation, and tumor necrosis factor generation by pretreatment with an interleukin-1 receptor antagonist. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1993;8:365-369
332. Selig W and Tocker J. Effect of interleukin-1 receptor antagonist on antigen-induced pulmonary responses in guinea pigs. *Eur.J.Pharmacol.* 1992;213:331-336
333. Ulich TR, Watson LR, Yin SM, Guo KZ, Wang P, Thang H, del Castillo J. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am.J.Pathol.* 1991;138:1485-1496
334. Hakonarson H, Herrick DJ, Grunstein MM. Mechanism of impaired beta-adrenoceptor responsiveness in atopic sensitized airway smooth muscle. *Am.J.Physiol.* 1995;269:645-652
335. Ponomarenko JV, Orlova GV, Merkulova TI, Gorshkova EV, Fokin ON, Vasiliev GV, Froloy AS, Ponomarenko MR. rSNP_Guide.: An integrated database-tools system for studying SNPs and site-directed mutations in transcription factor binding sites. *Hum.Mutat.* 2002;20:239-248
336. Allen M et al. Positional cloning of a novel gene influencing asthma from Chromosome 2q14. *Nat.Genet.* 2003;35:258-263