

**Aus dem Institut für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik  
Direktor: Prof. Dr. med. Harald Renz  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg**

# **Genetische Disposition von Immunglobulintitern nach Immunisierung mit Birkenpollen bei Mäusen**

**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin**

**dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von**

**Uwe Kölsch**

**aus Berlin**

**Marburg 2005**

©Copyright Logos Verlag Berlin 2001  
Alle Rechte vorbehalten.

Logos Verlag Berlin  
Comeniushof  
Gubener Str. 47  
10243 Berlin  
Tel.: +49 30 42 85 10 90  
Fax: +49 30 42 85 10 92  
INTERNET: <http://www.logos-verlag.de>

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am 15.09.2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Gutachter:

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. H. Renz

Korreferent: Prof. Dr. K.-H. Grzeschik

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Atopie - Fehlregulationen des Immunsystems</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Epidemiologie allergischer Erkrankungen und Umwelteinflüsse</b>	<b>4</b>
2.2.1 Allergikerkarriere	9
<b>2.3 Immunologische Grundlagen allergischer Erkrankungen</b>	<b>11</b>
2.3.1 Die Allergische Sensibilisierung und T <sub>H</sub> 2-Reaktionen	11
2.3.2 Die Immunologische Synapse	17
<b>2.4 Genetik polygener Erkrankungen</b>	<b>20</b>
2.4.1 Strategien zur Suche nach krankheitsrelevanten Genen	22
2.4.2 Linkageanalysen	26
2.4.3 Linkageanalysen zu Atopie, Allergie und Asthma beim Menschen	27
2.4.4 Linkageanalysen zu Atopie, Allergie und Asthma im Mausmodell	34
<b>2.5 Relevanz des Tiermodells</b>	<b>36</b>
<b>2.6 Die allergische Sensibilisierung und der Intrakutantest</b>	<b>37</b>
<b>2.7 Ziele dieser Arbeit</b>	<b>38</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Tiermodell der allergischen Sofortreaktion der Haut</b>	<b>39</b>
3.1.1 Immunisierung	39
3.1.2 Serumgewinnung	40
3.1.3 Intracutaner Hypersensibilitätstest (ICHS-Test)	40
<b>3.2 Immunglobulinmessung mittels ELISA (Enzym Linked Immuno Sorbent Assay)</b>	<b>43</b>
<b>3.3 DNA-Präparation, Markerselektion und PCR</b>	<b>44</b>
3.3.1 Präparation der DNA	44
3.3.2. PCR, Markerselektion, PCR-Produktanalyse	45
<b>3.4 Statistische Auswertung und Linkageanalyse</b>	<b>46</b>
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Immunisierung und intrakutaner Hypersensibilitätstest</b>	<b>47</b>

<b>4.2 Die Immunglobulintiter</b>	<b>51</b>
4.2.1 Gesamt-IgE	52
4.2.2 Bet v - spezifisches IgG <sub>1</sub>	56
4.2.3 Bet v-spezifisches IgE	58
4.2.4. Bet v spezifisches IgG <sub>2a</sub>	60
<b>4.3 Linkageanalysen mit den Immunglobulintitern als Phänotyp</b>	<b>61</b>
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>67</b>
5.1 Vergleich der allergischen Reaktion bei Maus und Mensch	67
5.2 Abschätzung des Erbganges der Birkenpollenmodellallergie	68
5.3 Linkageanalysen mit ges. IgE und spez. IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2a</sub> und IgE-Titern	69
5.4 Fehleranalyse	71
5.6 Fishing in the dark? - Schlussfolgerungen	73
<b>6. ANHANG</b>	<b>74</b>
6.1 Abkürzungsverzeichnis	74
6.2 Literaturverzeichnis	76
6.3 Publikationen, die aus dieser Arbeit hervorgegangen sind	85
6.4 Lebenslauf	86
6.5 Meine akademischen Lehrer	87
6.6 Danksagung	88
6.6 Erklärung an Eides statt	89

# 1 Zusammenfassung

Atopische Erkrankungen, zu denen die atopische Dermatitis, die allergische Rhinokonjunktivitis und das Asthma bronchiale zählen, sind sowohl umweltbedingt als auch genetisch prädisponiert. Ziel dieser Studie war das Identifizieren von Genen bzw. Chromosomenabschnitten, die mit atopischen Phänotypen assoziiert sind. In dieser Arbeit wurde dafür ein Tiermodell der allergischen Entzündung gewählt, bei dem Mäuse nach Immunisierung mit Birkenpollen eine der Birkenpollenallergie des Menschen identische Immunreaktion entwickelten. Es wurden die allergische Sofortreaktion vom Typ 1 nach Coombs und Gell (Gell et al., 1975) und die birkenpollenspezifischen IgE-, IgG<sub>1</sub>- und IgG<sub>2a</sub>-Antikörpertiter sowie Gesamt-IgE gemessen und zwei Inzuchtmausstämme identifiziert, die diesbezüglich unterschiedlich starke allergische Sofortreaktionen der Haut entwickelten. Diese beiden Tierstämme wurden miteinander verpaart und die Nachkommen der F<sub>1</sub>-, F<sub>2</sub>-intercross und der F<sub>2</sub>-backcross-Generationen auf je einen der Parentalstämme auf die allergische Sofortreaktion und die allergenspezifischen und Gesamt-IgE Immunglobulintiter untersucht. Aus der Verteilung der Phänotypen bei den Nachkommen wurde auf das Vorliegen eines codominanten polygenen Erbganges geschlossen. Für 160 Marker in einem mittleren Abstand von 10,4 cM (1,4-25cM) wurden Linkageanalysen mit den Immunglobulintiter-Phänotypen durchgeführt. 2 Bereiche auf dem langen Arm von Chromosom 17 (bei 11,7 und 40 cM) sowie ein Bereich auf 19q zeigten eine wahrscheinlich signifikante Linkage (suggestive linkage) zu dem Phänotyp birkenpollenspezifisches IgG<sub>1</sub>. Für diese wahrscheinliche Linkage mit einem Bereich des Mausechromosoms 17 sind am ehesten MHC-II-Gene verantwortlich. In mehreren Studien zur bronchialen Hyperreagibilität ist zu diesen Genbereichen ebenfalls signifikante Linkage gefunden worden, die mit der Nähe zu den MHC-II-Genen erklärt werden konnte (De-Sanctis et al., 1995; Zhang et al., 1999; Prows et al., 1997). Weiterhin sind die an der Signalübertragung in Lymphozyten beteiligten intrazellulären Adaptermoleküle Vav, Sos und Alk interessante Kandidatengene in dieser Genregion. In dem vergleichbaren, syntenen Bereich des humanen Genoms 6p21-24 wurden bei genomweiten Linkageanalysen mehrfach signifikante Zusammenhänge beschrieben (Ober et al., 1998; Yokouchi et al., 2000; Anonymous, 1997; Wjst et al., 1999). Diese Untersuchung hat damit vorhandene Studien bestätigt. Weitere Untersuchungen der gefundenen Kandidatengene sind jedoch notwendig, um die Vererbung der Birkenpollenallergie in diesem Mausmodell aufzuklären.



## 2 Einleitung

Die Häufigkeit allergischer Erkrankungen wie Asthma, Heuschnupfen und des allergischen Ekzems hat in den letzten Jahrzehnten vor allem in den hochindustrialisierten Ländern stetig zugenommen. So gibt es auf der Welt zur Zeit ca. 155 Millionen Asthmatiker (Moffatt and Cookson, 1999). Davon lebt der größte Teil in den Industrieländern Europas und Nordamerikas. Jährlich kommen 180 000 Neuerkrankungen hinzu. Der Anstieg der Neuerkrankungen variiert zwischen 0,5-1% pro Jahr in den letzten 10 Jahren (Downs et al., 2001), und hat eine steigende Tendenz. In Westeuropa und in den hochentwickelten Industrieländern hat sich die Prävalenz für Asthma in den letzten 10 Jahren nahezu verdoppelt (Downs et al., 2001). Die meisten Allergiker und Asthmatiker pro Kopf der Bevölkerung werden aus England, Australien, Neuseeland und Irland gemeldet. Die niedrigsten Erkrankungszahlen für Industrieländer gibt es im Moment noch in den kürzlich der EU beigetretenen Industrieländern Osteuropas. Nach aktuellen Studien sind bis zu 30% der unter 18-jährigen und bis zu 15% der Gesamtbevölkerung in den Industrienationen von Erkrankungen des atopischen Formenkreises betroffen. Für allergische Erkrankungen werden sowohl Umweltfaktoren als Auslöser und Ursache als auch eine genetische Prädisposition diskutiert. Die Angaben über den Anteil der genetischen Prädisposition variieren in Studien zwischen 35 und 70%.

### 2.1 Atopie - Fehlregulationen des Immunsystems

Das Immunsystem höherer Organismen hat sich im Laufe der Evolution entwickelt, um vielzelligen Lebewesen Schutz gegen Bakterien, Viren, Parasiten, körperfremde Eiweiße und Fremdkörper zu geben. Jeder Organismus kommt durch seine Aktivität mit Erregern und Agenzien in Berührung, die dem Organismus potentiell schaden könnten. Daher ist ein gut trainiertes, komplex organisiertes und reguliertes und vielfältig differenziertes körpereigenes Abwehrsystem notwendig, um den Körper zu schützen. Die hier untersuchte Typ-1 Allergie ist ein Beispiel für eine Fehlregulation des körpereigenen Abwehrsystems, bei der es zu einer überschiessenden Immunreaktion gegen körpereigene Gewebe kommt, ausgelöst durch an sich harmlose Substanzen, wie z.B. Birkenpollen. Bei dieser Immunreaktion werden hohe Titer von spezifischen IgE-Antikörpern gebildet. Diese führen bei Reexposition mit dem allergieauslösenden Agens zur Ausbildung von Urtikaria und eines allergischen Ekzems. Ohne Behandlung durch eine immunmodulatorische Therapie kann die überschiessende Immunantwort zunehmen und sich über einen Heuschnupfen zum allergischen Asthma entwickeln. Um einem solchen „allergischen Parademarsch“ (**Abb. 1**), also der typischen

Weiterentwicklung der allergischen Erkrankung von der Dermatitis bis zum Asthma vorzubeugen und neue, bessere Therapien entwickeln zu können, ist die Aufklärung der Mechanismen der Allergieentstehung und der Genetik dieser Erkrankungen notwendig.

## 2.2 Epidemiologie allergischer Erkrankungen und Umwelteinflüsse

Viele Stoffe wurden im Bezug auf ihre Wirkung auf das Immunsystem untersucht. Der Weg der Beeinflussung des Immunsystems ist für die meisten dieser Substanzen jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Luftverunreinigungen durch Ozon, Schwefeldioxid, Stickoxide und Rußpartikel aus Industrie- und Dieselabgasen, Zigarettenrauch, Infektionserkrankungen, die in der Kindheit durchgemacht wurden - insbesondere Infektionen des Respirationstraktes, die Umgebung in der die Kindheit, verbracht wurde, Impfungen und viele andere Faktoren haben einen Einfluss auf die Entstehung, Häufigkeit und Mortalität allergischer Erkrankungen. Ebenso beeinflussen diese Faktoren auch die Häufigkeit und Dauer der Krankenhausaufenthalte bei Asthma bronchiale, die Anzahl der Arztbesuche und die Schwere der asthmatischen Erkrankungen (**Tab. 1**).

Nach der Wiedervereinigung Deutschlands waren die Erkrankungszahlen in den beigetretenen neuen Bundesländern auf dem Niveau der 2004 der EU beigetretenen Länder Osteuropas. Innerhalb weniger Jahre hat sich jedoch die Zahl atopischer Erkrankungen in Ostdeutschland nahezu verdoppelt (Mutius et al., 1994). Für diese extreme Zunahme allergischer Erkrankungen in nur wenigen Jahren werden viele Ursachen diskutiert. Die Umweltverschmutzung erschien in diesem Zusammenhang als die wahrscheinlichste Ursache, da Kinder, die in Großstädten aufwachsen, häufiger unter Allergien und Asthma leiden, als Kinder, die in weniger ozon- und schadstoffbelasteten ländlichen Gegenden aufwachsen. Gegen diese Schadstofftheorie als Krankheitsursache spricht jedoch, dass in den neuen Bundesländern Deutschlands in den Jahren nach der Wende die Luftverschmutzung immer mehr abgenommen hat. Gleichzeitig hat die Häufigkeit atopischer Erkrankungen zugenommen. Weiterhin spricht dagegen, dass in den westlichen Industrieländern mit geringerer Luftverunreinigung die Inzidenz allergischer Erkrankungen höher ist, als in den Industrieländern Osteuropas mit höherer Luftverschmutzung (Committee of Environmental and Occupational Health Assembly of the American Society, 1996) (**Tab. 1**). Inwieweit sich diese Prävalenz durch den Beitritt mehrerer Länder Osteuropas zur EU ändert, wird daher eine interessante Frage in den nächsten Jahren sein. Die Studien, die in den neuen Bundesländern nach der Wende gemacht wurden (Mutius et al., 1994), können eventuell in diesen Ländern wiederholt und verifiziert werden.

**Tab. 1: Umweltfaktoren, die atopische Erkrankungen beeinflussen** (Committee of the Environmental and Occupational Health Assembly of the American Thoracic Society, 1996; Tager, 1998; Britton and Weiss, 1997; Papadopoulos and Johnston, 1998; Lewis, 1998; Farooqi and Hopkin, 1998; Holt et al., 1997; Bjorksten, 1999; Bjorksten et al., 1999; Warner, 2004)

Risikofaktor	ist verantwortlich für erhöhtes Atopierisiko, da	ist eher kein Grund für erhöhtes Atopierisiko, da
<b>Luftverunreinigung</b> ( O <sub>2</sub> ,SO <sub>2</sub> , NO <sub>2</sub> und Ruß )	- Zunahme respiratorischer Symptome, der BHR, von Krankenhausaufenthalten, von Asthmaanfällen, der Sterblichkeit nach Exposition	- Unterschied Stadt-/Landbevölkerung nicht konsistent - Prävalenz allergischer Erkrankungen höher in weniger luftschadstoffbelasteten alten Bundesländern - Prävalenz atop. Erkrankungen steigt in den neuen Bundesländern, obwohl Luftverschmutzung sinkt
<b>Zigarettenrauch</b> aktiv	- tendenziell höhere IgE-Spiegel - erhöhtes Sensibilisierungsrisiko - erhöhtes Risiko für BHR	- COPD - Exazerbation einer vorhandenen Asthmaerkrankung - Rauchen ist Konfounder bei Phenotypdefinition
passiv	- kein erhöhtes Sensibilisierungsrisiko aber erhöhtes Auftreten resp. Sympt. bei Kindern von Rauchern (nichtatopische Bronchitis)	- Kinder rauchender Eltern haben schwerere Asthmaerkrankungen als Kinder von Nichtraucher - Rauchen verstärkt bestehende Erkrankungen aber verändert nicht Prädisposition für Neuerkrankung
<b>Virusinfektionen</b> des Respirationstraktes	- Verschlechterung bestehenden Asthmas - erhöhte BHR bei Allergikern - erhöhtes Auftreten respiratorischer Symptome bei Kindern mit bestehender atopischer Erkrankung	
<b>Frühkindliche Infektionen</b>		- geringeres Allergierisiko in großen Familien insbes. bei Zweitgeborenen mit älteren Geschwistern - geringeres Allergierisiko bei starker BCG-Impfreaktion wegen früherem Kontakt mit dem Erreger - häufige respiratorische Infektionen im Kindesalter vermindern Risiko für Entw. allerg. Erkrankungen
Darmflora/ Endotoxinkontak	- Endotoxinlevel in Fruchtwasser + Muttermilch	- Besiedlung durch Laktobacillen positiv ?
Antibiotikaeinsatz	- mit atop. Erkr. assoziiert	

Ozon, das in den Sommermonaten in großen Ballungsräumen erhöht zu finden ist, und Bestandteile des Zigarettenrauches stehen mit der Entstehung allergischer Erkrankungen in einem engen Zusammenhang. Kinder in hoch ozonbelasteten Innenstädten leiden häufiger unter asthmatischen Beschwerden als Kinder, die am Stadtrand oder auf dem Land leben. Raucher entwickeln höhere Serum-IgE-Titer, haben ein erhöhtes Risiko für eine allergische Sensibilisierung und ein höheres Risiko für die Entwicklung einer bronchialen Hyperreaktivität (Tager, 1998; Britton and Weiss, 1997).

Weitere, die Inzidenz und Ausprägung von Allergien beeinflussende Faktoren sind Impfungen und Infektionskrankheiten, die Größe der Familien, die Anzahl der Geschwister, der frühzeitige Besuch einer Kindertagesstätte und der Kontakt zu anderen Kindern. Durch stärker hygieneorientierte, bessere und sauberere Lebensbedingungen, systematische Impfungen und den Fortschritt der Medizin wurden Epidemien vergangener Jahrhunderte

vermindert und zurückgedrängt und banale Infektionen der Atemwege und des Magen-Darm-Traktes seltener und wegen verbesserter Behandlungsmöglichkeiten durch Einsatz von Antibiotika kürzer. Das Immunsystem wird somit weniger gefordert und trainiert und reagiert schon bei Kontakt mit an sich harmlosen Substanzen. Das Bekämpfen banaler Infektionen im Laufe des Lebens ist also als Training für das Immunsystems notwendig (Herz et al., 2000b; Herz et al., 1999). Der Einsatz von Antibiotika bei Infekten der oberen Luftwege ist in einigen Studien negativ korreliert mit der Prävalenz atopischer Erkrankungen (Farooqi and Hopkin, 1998), wogegen andere Studien keinen Zusammenhang zwischen Antibiotikaeinsatz und atopischen Erkrankungen finden konnten (Celedon et al., 2002).

Seit der Wiedervereinigung Deutschlands ist die in der DDR obligate Tuberkulose-Impfung in den neuen Bundesländern keine Pflichtimpfung mehr. Zur Zeit werden nur Kinder aus Risikofamilien mit Erkrankten und damit sehr wenige Kinder geimpft. Diese Impfung prägt das Immunsystem in Richtung  $T_H1$ -Reaktion und könnte daher einen präventiven Einfluss auf die Ausbildung atopischer Erkrankungen haben (Herz et al., 1998). Im Zuge des Anstiegs der Tuberkulose-Neuerkrankungen durch den Zuzug von Ausländern aus Osteuropa und vermehrte Impfungen in dieser Bevölkerungsgruppe ist eine erneute Beurteilung der Tuberkulose-Impfung und deren Zusammenhang zu allergischen Erkrankungen möglich.

Mit der Schmuddel- oder Infektionstheorie lässt sich der Anstieg allergischer Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen nach der Wiedervereinigung Deutschlands ebenfalls erklären. Seit 1990 besuchten in den neuen Bundesländern wegen zunehmender Arbeitslosigkeit der Eltern und wegen weniger zur Verfügung stehenden Plätzen in Kindertagesstätten im Beitrittsgebiet weniger Kinder eine Kinderkrippe, einen Kindergarten oder den Hort. Durch die soziale Unsicherheit ist die Geburtenrate stark gesunken. Die Anzahl der Kinder pro Familie hat ab- und die Anzahl an Einzelkindern zugenommen. Kinder in allen hochentwickelten, westlichen Industrieländern sind häufiger Einzelkinder, bleiben mit ihren Müttern am Anfang ihres Lebens länger zu Hause und kommen später und seltener mit Altersgefährten in Kontakt, als dies z.B. in der ehemaligen DDR der Fall war. Sie infizieren sich dadurch seltener mit Erregern banaler Infektionskrankheiten und „trainieren“ ihr Immunsystem weniger. Kinder mit älteren Geschwistern und Kinder, die vom ersten Lebensjahr an eine Krippe besucht haben, bekommen weniger Allergien, als Kinder ohne ältere Geschwister und Kinder, die erst später oder nie eine Kindertagesstätte besucht haben (Nicolai et al., 1997).

Auch die Darmflora ist am ständigen Training des Immunsystems beteiligt und hat einen Einfluss auf die Prävalenz allergischer Erkrankungen. Sie wird unter anderem durch die Ernährung und den Einsatz von Antibiotika verändert. Ein vermehrter Genuss von Laktobazillen enthaltenden Milchprodukten und damit das vermehrte Vorhandensein dieser Bazillen im Verdauungstrakt hat eine protektive Wirkung auf die Allergieentstehung (Alm et al., 1999; Holt et al., 1997; Bjorksten et al., 1999).

Der Anstieg allergischer Erkrankungen zeigte sich jedoch nicht nur bei Kindern und Jugendlichen, die nach der Wiedervereinigung geboren wurden und aufgewachsen sind, sondern auch bei Erwachsenen. Da bei diesen das Immunsystem schon voll entwickelt war, ist in dieser Bevölkerungsgruppe der Anstieg der Neuerkrankungsrate nur durch die Änderung von Ernährungsgewohnheiten und die Anpassung des Lebensstandards an den westlichen zu erklären. Mit dem Einsatz von modernen Heizungen, Klimaanlage, dichter schließenden Fenstern und der häufigen Verwendung von Teppichen im Wohnbereich verbessern sich die Raumklimabedingungen für Hausstaubmilben. Dies führt durch deren Vermehrung zu einer erhöhten Allergendichte in der Raumluft. Durch die Verwendung moderner, dicht schließender Fenster steigt die Luftfeuchtigkeit und führt zu einem besseren milbenfreundlicheren Raumklima. Textile Bodenbeläge schaffen „Nischen“ für Hausstaubmilben in der Wohnung. Fußbodenheizungen verbessern die Luftzirkulation und führen daher zu einer besseren Verteilung des Hausstaubs vom Boden in der Raumluft und somit ebenfalls zu einer höheren Allergendichte. Weiterhin dünsten aus neuen Möbeln Lösungsmittel und andere chemische Substanzen wie z.B. Formalin aus, die das Immunsystems beeinflussen. Zunehmende Erkrankungen des allergischen Formenkreises und die zunehmende Häufigkeit von Autoimmunkrankheiten sind damit eventuell der Preis für einen höheren Lebensstandard und die westliche Lebensweise (Renz, 2002; Dold et al., 1992; Mutius et al., 1994).

Die Inzidenz atopischer Erkrankungen ist außerdem abhängig vom sozialen Stand der Familien sowie vom Bildungsstand und Einkommen der Eltern. Kinder finanziell besser gestellter Familien besuchen später oder nie eine Kindertagesstätte, wohnen in baulich moderneren Wohnräumen und ernähren sich anders (mehr teurere Bioladenprodukte, häufiger vegetarische Ernährung). Sie werden jedoch gesundheitsbewusster erzogen und achten daher sensibler auf ihren Körper und gehen eher zum Hausarzt.

Trotz des beschriebenen starken Einflusses der Ernährungsgewohnheiten, von Erkrankungen und Impfungen, der Wohnumgebung und des sozialen Umfeldes findet sich auch eine familiäre Häufung allergischer Erkrankungen und eine Abhängigkeit des Allergierisikos von der Anzahl Verwandter 1. Grades mit allergischen Erkrankungen. In Geschwister- und Zwillingsstudien konnte gezeigt werden, dass eineiige Zwillinge eine höhere Konkordanzrate für allergische und atopische Erkrankungen haben als zweieiige Zwillinge, und dass somit atopische Erkrankungen genetisch prädisponiert sind. Es besteht daher Grund zu der Annahme, dass es krankheitsprädisponierende oder auch atopiepräventive Gene gibt, die den Beginn, das Ausmaß und den Verlauf atopischer oder anderer autoimmuner Erkrankungen beeinflussen.

Allergische Erkrankungen sind keine neuen Erkrankungen, sondern seit Beginn der Industrialisierung in Europa und Amerika lediglich häufiger zu beobachten. Die erste allergische Reaktion wurde bereits im Jahre 2900 v. Chr. in Ägypten dokumentiert, als der Pharaon Menes infolge eines Insektenstiches verstarb. Wegen der extremen Zunahme im letzten Jahrhundert zählen diese Erkrankungen zu den Zivilisationskrankheiten. Sie werden durch die Lebens- und Ernährungsweise stark beeinflusst und sind bei jedem Individuum anders ausgeprägt (Mutius et al., 1994; Wiesch et al., 1999; Meyers et al., 1991; Huang and Marsh, 1993; Marsh and Bias, 1988; Meyers et al., 1982).

Bei atopisch prädisponierten Individuen, die also mehrere Verwandte ersten Grades besitzen, ist die Stärke der Erkrankung und die Weiterentwicklung der atopischen Erkrankung von vielen Faktoren abhängig - unter anderem vom Zeitpunkt des ersten Kontaktes mit potentiellen Allergenen, von Impfungen, Infektionen und der Ernährung. Neugeborene reagieren in den ersten Lebensmonaten aufgrund des normalen Reifungsprozesses des Immunsystems oder aufgrund einer physiologischen Unreife vorwiegend mit einer  $T_H2$ -Reaktion. Die Produktion von IgG-Antikörpern kommt bei ihnen gerade erst in Gang. Neugeborene atopischer Mütter können jedoch schon erhebliche Mengen IgE produzieren. Sie sollten deshalb so lange wie möglich gestillt und damit über die Muttermilch mit schützenden IgG-Antikörpern und Zytokinen versorgt werden. So kommt der kindliche Organismus erst später mit Fremdartigen aus der Nahrung in Berührung und das Immunsystem muss sich erst später mit diesen Fremdartigen auseinandersetzen (Tab. 2).

### 2.2.1 Allergikerkarriere

Die typische Entwicklung einer atopischen Erkrankung beginnt mit der Dermatitis der Säuglinge im ersten Lebensjahr, die sich durch eine einfache, lokale Behandlung beherrschen lässt. Sobald die Kinder mit Kuhmilch ernährt werden oder mit anderem Eiweiß in der Nahrung in Kontakt kommen, lassen sich spezifische Antikörper gegen diese Proteine nachweisen. In diesem 2. Stadium der Erkrankung lassen sich die Symptome durch Allergenkarrenz noch gut in den Griff bekommen. Im Vorschulalter entwickelt sich bei prädisponierten Kindern mit der typischen Allergikerkarriere daraus oft jedoch eine saisonale Rhinitis (Heuschnupfen). In diesem Stadium ist die atopische Erkrankung meist gegen Birken-, Hasel- und Gräserpollen oder gegen Tierhaare oder Hausstaubmilben gerichtet. Durch eine spezifische Immuntherapie kann versucht werden, das Fortschreiten der Erkrankung aufzuhalten. Bei den häufigsten Allergien gegen Pollen, Hausstaubmilben und Tierhaarbestandteile führt eine spezifische Immuntherapie jedoch nur selten zum Erfolg. Nur Insektengiftallergien lassen sich mit dieser spezifischen Immuntherapie mit sehr gutem Erfolg behandeln. Die Symptome der Erkrankung müssen in diesem Stadium der Erkrankung bei akuten Schüben mit Antihistaminika behandelt werden. Bis zum frühen Jugendalter schreitet die Erkrankung typischerweise bis zum Vollbild des Asthma bronchiale weiter fort.

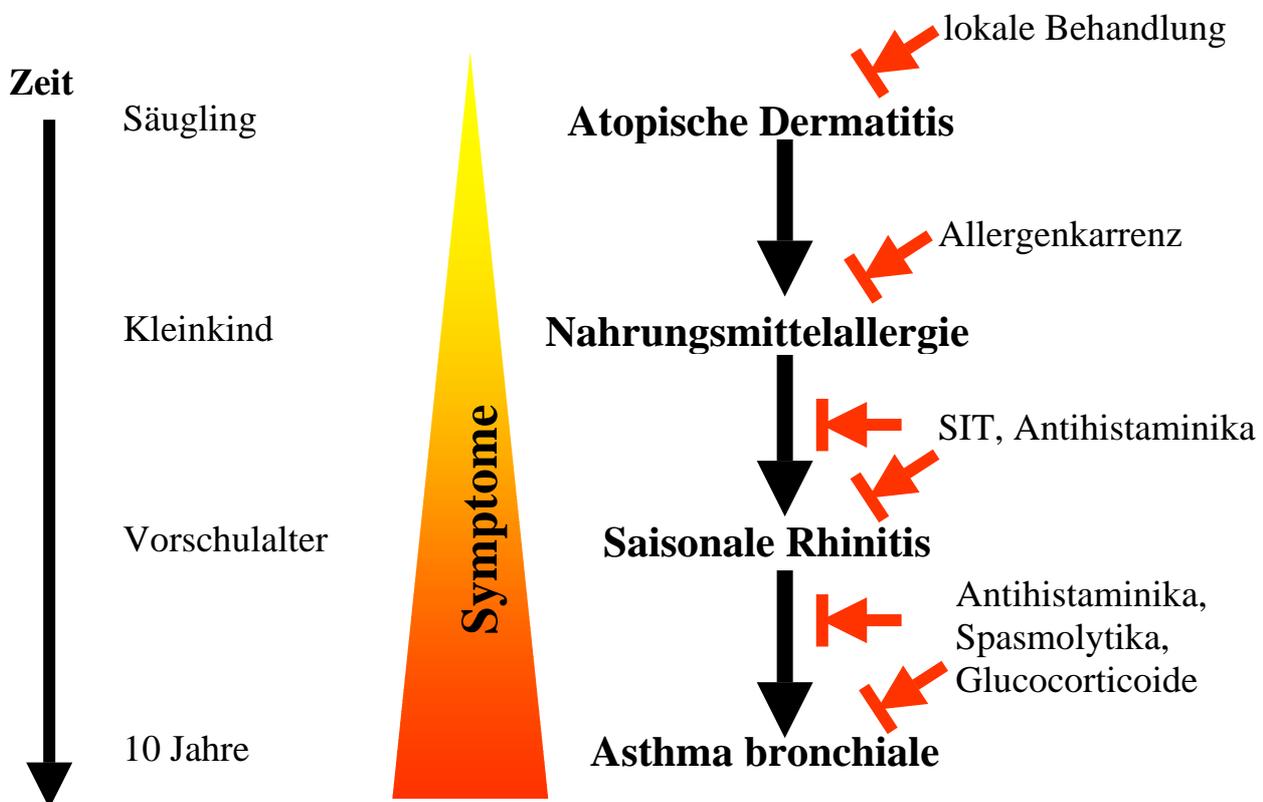


Abb. 1: Die „Allergikerkarriere“

Dieses Asthma bronchiale lässt sich nur durch eine ständige medikamentöse Kombinationstherapie mit Antihistaminika und Bronchospasmolytika mildern. In den Spitzen oder später auch als Dauertherapie muss die Behandlung nun durch Glucocorticoide ergänzt werden. Um diese typische Entwicklung einer „Allergikerkarriere“ frühzeitig aufhalten zu können sind neue Therapien mit DNA-Vakzinen, eine Verbesserung der spezifischen Immuntherapie oder andere immunmodulatorische Therapien notwendig (**Abb. 1**).

Die Faktoren, die die Erkrankung prädisponierter Individuen beeinflussen, sind prinzipiell dieselben, die auch zur Entstehung dieser Erkrankung beitragen (**Tab. 2**). Dazu zählen zunächst genetisch bedingte höhere oder niedrigere Reaktivität der Zellen des Immunsystems, die verschiedenen Zytokinspiegel, Infektionen und Impfungen sowie die Darmflora. Da die Immunantwort Neugeborener in den ersten Lebensmonaten vorwiegend  $T_H2$ -gerichtet ist, ist bei zu frühem Kontakt mit potentiellen Allergenen die Gefahr der Entstehung einer Allergie erhöht und sollte bei familiärer Disposition vermieden werden.

**Tab. 2: Faktoren, die die IgE-Produktion atopischer und für Atopie, Allergien und Asthma genetisch prädisponierte Individuen beeinflussen**

Intrinsische Faktoren, die die Atopieprädisposition und die $T_H1/ T_H2$ Balance beeinflussen	IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, $IFN\gamma$
bakterielle und virale Infektionen, Impfungen	Respiratory Syncytial Virus, TBC- und Masernimpfung
Darmflora	norm. Darmflora, Laktobazillen, Durchfallerreger, Pilze
früher Kontakt mit Allergenen + frühe Ernährung mit potentiellen Allergenen	Immunantwort Neugeborener vorw. $T_H2$ gerichtet zu kurze Stillperiode

## 2.3 Immunologische Grundlagen allergischer Erkrankungen

### 2.3.1 Die Allergische Sensibilisierung und T<sub>H</sub>2-Reaktionen

**Allergien** wurden von Pirquet als veränderte Reaktionsfähigkeit des Organismus auf eine Substanz definiert, die dieser durch vorherigen Kontakt erworben hat (allos= anders, ergēia = Reaktion). Coca und Groove haben diese Definition atopischer Erkrankungen 1904 um einen entscheidenden Punkt erweitert. Sie forderten für Atopie neben dem Vorhandensein von Heuschnupfen, Asthma und/ oder Ekzemen die Anwesenheit von reaginen Antikörpern, die für die passive Übertragung der Erkrankung mit dem Serum verantwortlich sind. Diese Reagine wurden 1967 von Johansson und Ishizaka als IgE identifiziert. Darauf aufbauend ist die Entwicklung atopischer Erkrankungen heute mit dem im folgenden beschriebenen Mechanismus erklärbar.

Beim **ersten Kontakt** eines Organismus mit einem potentiellen Allergen kommt es zur Sensibilisierung gegen dieses sonst ungefährliche Agens. Die an sich harmlose Substanz wird von antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen aufgenommen, internalisiert und in Lysosomen in Peptide aufgespalten. Diese werden, an MHC-II Moleküle gebunden, auf der Zelloberfläche reexprimiert und dort von CD4+ positiven T-Helfer Zellen erkannt (**Abb. 2**). Bei der Erkennung eines MHC-II gebundenen Peptids durch eine CD4+ T-Helferzelle kommt es zu einem Zell-Zell-Kontakt und zur Ausbildung einer immunologischen Synapse zwischen der antigenpräsentierenden Zelle und der T-Zelle (**Abb. 3**). Von beiden beteiligten Zellen werden lösliche Botenstoffe in die Synapse und die Umgebung sezerniert, die Signale übertragen und weitere Leukozyten rekrutieren und aktivieren (**Abb. 2**). In der immunologischen Synapse interagieren mehrere Rezeptor-Liganden-Paare miteinander, geben Signale an die beteiligten Zellen oder stabilisieren einfach nur die Bindung. Nach dem erfolgreichen Kontakt einer T-Zelle mit einer antigenpräsentierenden Zelle interagiert die T-Zelle mit B-Zellen und schüttet Zytokine, die B-Zell-Wachstumsfaktoren sind, aus. B-Lymphozyten werden so aktiviert und zur Produktion spezifischer Antikörper angeregt. Diese Antikörper spielen bei jedem späteren Kontakt mit dem Antigen eine entscheidende Rolle. B-Zellen können verschiedene Antikörper bilden, die unterschiedliche Funktionen im Immunsystem übernehmen. Die Entscheidung darüber, in welche Richtung die Immunreaktion gelenkt wird und welche Immunglobulinklasse von B-Zellen daher produziert wird, hängt von dem präsentierten Antigen selbst, von der antigenpräsentierenden Zelle und von dem umgebenden Zytokinmilieu ab, in dem sich die Reaktion abspielt, sowie von Signalen anderer CD4+ positiver und regulatorischer T-Zellen.

In Abhängigkeit von dem präsentierten Antigen schüttet die antigenpräsentierende Zelle Zytokine aus, die die **Richtung der Immunreaktion** schicksalhaft beeinflussen (**Abb. 3**). Hauptsächlich wird IL-2 und IL-12 (bei T<sub>H</sub>1-Reaktion) bzw. IL-2 zusammen mit IL-4 und IL-5 (bei T<sub>H</sub>2-Reaktion) ausgeschüttet. Reife CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen sind zunächst T<sub>H</sub>0-Zellen. Sie können sich nach Antigenkontakt zu T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2- Zellen entwickeln. Eine dritte Gruppe von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen ist ebenfalls für die Richtung bzw. das „Schicksal“ der Immunreaktion verantwortlich: die Suppressorzellen bzw. die regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>).

**Regulatorische T-Zellen** können durch direkten Zell-Zell-Kontakt oder durch inhibitorische Zytokine die Aktivität anderer T-Zellen bremsen. Es gibt mehrere Klassen regulatorischer T-Zellen. Ca. 5-10% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Peripherie sind natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen. Diese sind CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-positiv und entwickeln sich wie alle anderen T-Zellen auch im Thymus. Weiterhin entwickeln sich in der Peripherie aus CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>0 Zellen nach Aktivierung und unter dem Einfluss von IL-10 die Tr1-regulatorischen T-Zellen und unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  die T<sub>H</sub>3-regulatorischen T-Zellen. Die beiden letztgenannten Gruppen können genauso wie die natürlich vorkommenden regulatorischen Zellen die Entstehung einer T<sub>H</sub>1 oder T<sub>H</sub>2-Reaktion durch Ausschüttung inhibitorischer Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  oder durch direkte Inhibition mittels Zell-Zell-Kontakt abwenden. Außer diesen gibt es noch weitere regulatorische T-Zellen, die jedoch für T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2-Reaktionen weniger bedeutsam sind (**Tab. 3**).

**Tab. 3: Populationen regulatorischer T-Zellen**

T <sub>reg</sub> - Zellen	Suppressormechanismus	Ref.
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> T <sub>reg</sub>	IL-10, TGF- $\beta$ , CTLA-4, PD-1	(Piccirillo and Shevach, 2004; Thompson and Powrie, 2004)
CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> T <sub>reg</sub>	?	(Gurunathan et al., 2000)
Tr1 (IL-10 abh.)	<u>IL-10</u> , TGF- $\beta$ , PD-1	(Thompson and Powrie, 2004; Cottrez et al., 2000; Akdis et al., 2000; Akdis et al., 2004; Blaser and Akdis, 2004)
T <sub>H</sub> 3 (TGF- $\beta$ -abh.)	<u>TGF-<math>\beta</math></u> , IL-4, IL-10	(Taylor et al., 2004)
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> T <sub>reg</sub>	direkte Apoptoseinduktion	(Zhang et al., 2000)
TCR- $\gamma\delta$ T <sub>reg</sub>	IL-10, TGF- $\beta$	(Ke et al., 1997)

Bei einer **T<sub>H</sub>1-Immunantwort** sezernieren T<sub>H</sub>1-Helfer-Zellen die Zytokine IL-2, IL-12, IL-18, IFN $\alpha$  und IFN- $\gamma$  und hemmen damit die Differenzierung von T<sub>H</sub>0-Zellen zu T<sub>H</sub>2-Zellen und fördern die Differenzierung weiterer T<sub>H</sub>0-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen. Die von T<sub>H</sub>1-Zellen stimulierten B-Zellen werden zur klonalen Expansion, zur Differenzierung zu Plasmazellen und zur Produktion der Immunglobuline IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2a</sub> stimuliert. (**Abb. 2**). Neben den T<sub>H</sub>1-Effektorzellen entwickeln sich Gedächtniszellen T<sub>H</sub>1<sub>mem</sub> und B<sub>mem</sub>, die sich bei erneutem Antigenkontakt klonal vermehren und schneller reagieren können oder schneller IgG produzieren können (B<sub>mem</sub>).

Die **T<sub>H</sub>2- Immunantwort** ist geprägt durch Produktion der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. T<sub>H</sub>0-Zellen werden durch diese Zytokine in Richtung T<sub>H</sub>2 geprägt. B-Zellen vollziehen unter dem Einfluss dieser Zytokine einen Antikörperklassenwechsel von IgM oder IgG<sub>1</sub> zu IgE oder IgG<sub>2b</sub>, vermehren sich klonal und differenzieren zu Plasmazellen (**Abb. 2**). Auch bei der T<sub>H</sub>2-Reaktion gibt es T<sub>H</sub>2<sub>mem</sub> und B<sub>mem</sub> Gedächtniszellen mit der Fähigkeit zur späteren schnellen klonalen Expansion und Produktion von IgE-Antikörpern nach erneutem Antigenkontakt (B<sub>mem</sub>). Außerdem wird bei einer T<sub>H</sub>2-Reaktion die klonale Vermehrung von eosinophilen Granulozyten initiiert.

Da T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Zellen selbst Zytokine produzieren, die weitere T<sub>H</sub>0 Zellen in die gleiche Entwicklungsrichtung lenken, entsteht ein **sich selbst aktivierender Kreislauf**, der von regulatorischen T-Zellen gebremst wird. Für die Initiierung dieses Circulus vitiosus in Richtung T<sub>H</sub>2 ist ein entscheidendes Signal in Form von IL-4 notwendig. Von welchen Zellen das erste entscheidende IL-4 produziert wird, ist noch nicht klar. Die antigenpräsentierenden Zellen selbst, regulatorische T-Zellen, CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>-NK-T-Zellen oder auch Makrophagen sind mögliche Kandidaten dafür (Daser et al., 1998b) (**Abb. 2**).

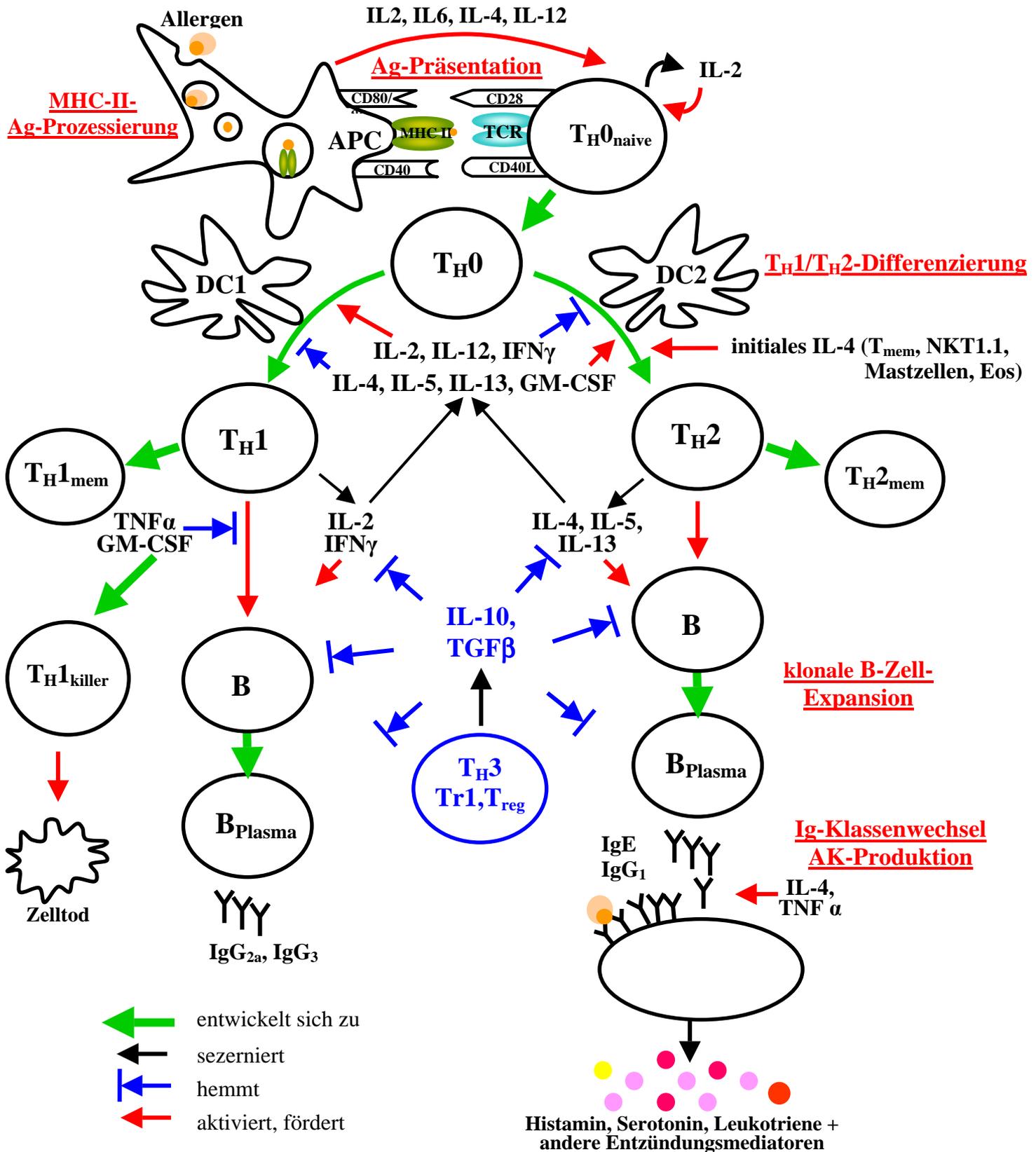


Abb. 2: TH1 und TH2 Immunreaktionen, Zytokine und Einfluss der Zellen aufeinander (Janeway-CA and Travers, 1996; Robertson and Lawrence, 1996; Gould et al., 2003; Liew, 2002)

Die von Plasmazellen produzierten **IgE-Antikörper** werden mittels der Rezeptoren FcεRI (high affinity IgE receptor) und FcεRII (low affinity IgE receptor) auf der Oberfläche von den Effektorzellen der allergischen Immunantwort wie Mastzellen, B-Zellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten gebunden. Bei erneutem Kontakt des Organismus mit dem Allergen, wird das Allergen von an Effektorzellen gebundenen Antikörpern erkannt und kreuzvernetzt mehrere Rezeptormoleküle. Die Effektorzellen werden dadurch aktiviert und zur Freisetzung von Granula angeregt. Diese enthalten Entzündungsmediatoren, Vasodilatoren, Enzyme und Interleukine. Dazu gehören unter anderem: Histamin, Serotonin (nur bei Mäusen und Ratten), Heparin, Tryptase, Chymase, Prostaglandine, Leukotriene, Chemokine und Interleukine (NCF -Neutrophilen Chemotaktischer Faktor, Eotaxin, RANTES, TNFα, GM-CSF, MIP-1α, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 und PAF-Plättchen aktivierender Faktor) (Janeway-CA and Travers, 1996; Gould et al., 2003). Diese Substanzen führen sofort zu einer lokalen Entzündungsreaktion mit Schleimhautödem, Kontraktion der glatten Muskulatur der Bronchiolen sowie zu Vasodilatation der versorgenden Arteriolen, erhöhter Gefäßpermeabilität, vermehrter Leukozytenadhäsion, Leukozytenaktivierung und Leukozytenchemotaxis (Nicolai et al., 1999). Infolgedessen treten lösliche Blutbestandteile und Entzündungszellen in die Gefäßintima aus. Durch die vasoaktiven Substanzen und die dadurch bedingte vermehrte Vaskularisierung entsteht eine Schwellung und Rötung der Haut und Schleimhaut sowie Juckreiz. In Schleimhäuten kommt es außerdem zu einer gesteigerten Mukusproduktion. Die ausgeschütteten Botenstoffe modulieren auch die Immunantwort gegen alle anderen Antigene im Organismus zu diesem Zeitpunkt, so dass auch gegen diese Antigene eine ähnliche Immunantwort entstehen kann. Durch vermehrte Antikörperproduktion nach erneutem Allergenkontakt kommt es zur Chronifizierung der Erkrankung und zur Zunahme der Symptome (**Abb. 1, 2**).

Durch die Aktivität **regulatorischer T-Zellen** werden alle Interaktionen zwischen Zellen des Immunsystems durch direkte Zell-Zell-Interaktion oder durch die antiinflammatorisch wirkenden Zytokine IL-10 und TGF-β gehemmt. T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Zellen proliferieren daraufhin nicht weiter, vermindern ihre Aktivitäten und den Ausstoß proinflammatorischer Zytokine. B-Zellen werden zu einem Antikörperklassenwechsel von IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> oder IgE zu IgG<sub>4</sub> stimuliert. Blockierende Antikörper vom Typ IgG entstehen z.B. im Rahmen einer spezifischen Immuntherapie und können die Wirkung von IgE mindern, da die Antigene bereits vor dem Kontakt mit IgE von in wesentlich größerer Menge vorhandenem IgG im Körper abgefangen werden.

Die Entwicklung einer überschießenden  $T_H2$ -Reaktion auf ein Protein gehört zum Vollbild einer allergischen Reaktion und ist eine fehlgerichtete, krankhafte Immunantwort. Auslöser für eine solche fehlerhafte Immunantwort können Bestandteile von Pflanzen, Tieren oder Pilzen sein. Allergene sind typischerweise Proteine, mit denen der menschliche Organismus selten und nur in geringen Dosen in Kontakt kommt. Die Immunabwehr gegen solche Proteine sollte normalerweise unproblematisch sein. In Teilen des Körpers, in denen das Immunsystem mit besonders vielen Fremdanitgenen in Kontakt kommt, wie z.B. in der Darmmukosa, werden viele Immunreaktionen durch inhibitorische Signale von regulatorischen T-Zellen (dort den lamina propria T-Lymphozyten) verhindert. Einige Individuen reagieren jedoch mit einer überschießenden und fehlgeleiteten Immunantwort gegen Nahrungsmittelbestandteile oder Proteine in der Atemluft und auf der Haut. Häufige Aeroallergene sind Pollen, Verdauungsenzyme von Hausstaubmilben oder Speicheldrüsensekretbestandteile von Haustieren wie Hunden und Katzen, die beim Putzen des Felles mit der Zunge im Fell kleben bleiben, dort antrocknen, abfallen und Bestandteil des Hausstaubes werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Birkenpollen als Allergieauslöser sind neben Hausstaubmilben die Hauptaeroallergene in Deutschland und Skandinavien

Bei Kontakt mit größeren Mengen eines Allergens ändert sich die Immunantwort in Richtung  $T_H1$ -Reaktion durch Produktion von inhibitorischen  $IgG_1$ - oder  $IgG_4$ -Antikörpern. Die allergischen Symptome sind nach einer solchen spezifischen Immuntherapie abgeschwächt und können sogar ganz verschwinden, obwohl noch große Mengen an  $IgE$  gebildet werden und vorhanden sind. Mit der **spezifischen Immuntherapie** wird versucht, die Produktion solcher blockierender Antikörper anzufachen. Die Menge des Allergens, das Zytokinmilieu am Ort der Entzündung, die generelle Abwehrsituation des Organismus oder das Priming in Richtung  $T_H1$  oder  $T_H2$  entscheiden dabei über den Erfolg der Behandlung und über die Richtung der Immunantwort. Die von uns verwendeten Allergendosen zur Immunisierung wurden daher so titriert, dass wir eine maximale Reaktion der Tiere im Hauttest sehen und gleichzeitig einen möglichst großen Unterschied zwischen zwei mit der gleichen Allergendosis behandelten und getesteten Tierstämmen finden konnten (siehe Material und Methodenteil). Außerdem wurde in dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell mit einem Adjuvans zur Provokation eines lokalen Entzündungsherdes gearbeitet, welches eine  $T_H2$ -Reaktion provoziert. Die zur gleichen Zeit injizierten Birkenpollen erzeugten daher vorwiegend oder größtenteils eine  $T_H2$ -Reaktionen bei den Versuchstieren.

### 2.3.2 Die Immunologische Synapse

Für die Entstehung von Allergien sind auf molekularer Ebene viele Interaktionen zwischen Molekülen auf T-Zellen, antigenpräsentierenden Zellen, B-Zellen und Effektorzellen notwendig. Durch eine Abschwächung oder Verstärkung der Signalkaskade bei der Aktivierung der T-Zellen und der daraufhin initiierten Signale an andere Zellen können Änderungen der Immunantwort erreicht werden. Daher soll in diesem Kapitel die Signalübertragung von der antigenpräsentierenden Zelle bis zur Proteinneusynthese im Zellkern der T-Zelle kurz behandelt werden.

Neben der Interaktion des T-Zell-Rezeptors (TCR) mit dem antigenpräsentierenden MHC-Komplex interagieren weitere Rezeptoren und Korezeptoren der T-Zellen mit Rezeptoren und Liganden auf antigenpräsentierenden Zellen. Über diese werden bei einem Zell-Zell-Kontakt Signale in beiden Zellen ausgelöst, verstärkt oder abgeschwächt, die die Richtung, Intensität und Länge der Zell-Zell-Interaktion und damit auch der Immunantwort regulieren. Gleichzeitig sind einige der Interaktionen für die Stabilisierung der Bindung und Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden notwendig.

Nach Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Peptid-MHC-Komplex bindet **CD4** als Korezeptor an eine konstante Domäne des MHC-II und erzeugt so ein costimulatorisches Signal für die T-Zelle (**Abb. 3**). Da der T-Zell-Rezeptor auch ohne MHC-Präsentation Peptide locker binden kann, wird über diese Bindung von CD4 an einen konstanten Teil des MHC-II Komplexes das T-Zell-Rezeptor Signal verstärkt, wenn der T-Zell-Rezeptor richtig präsentiertes Peptid erkannt hat. Somit wird eine zu frühe oder ungewollte Aktivierung der T-Zelle nicht verstärkt.

Gleichzeitig bindet **CD28** an CD80 oder CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen und verstärkt das Signal, welches die T-Zelle über den T-Zell-Rezeptor erhält. Das T-Zell-Rezeptor-Signal kann daher auch bei schwächerer Interaktion zwischen Rezeptor und Peptid-MHC Komplex über eine notwendige Schwelle verstärkt werden, so dass die T-Zelle trotzdem aktiviert wird. Innerhalb von Stunden bis 2 Tagen wird inhibitorisches CTLA-4 auf der Oberfläche hochreguliert, welches um die Bindung von CD28 an CD80 und CD86 konkurriert (nicht gezeigt). Durch ein Ungleichgewicht zugunsten von CD28 bei der Aktivierung und zugunsten von CTLA-4 nach Stunden bis Tagen führt das Signal von CD80 und CD86 daher zunächst zur Costimulation und stärkeren Aktivierung der Zelle und später

zur Deaktivierung. Diese Deaktivierung ist notwendig, um eine überschießende Immunantwort oder eine tumoröse Entartung der aktivierten Zellen zu verhindern.

Leicht differierende Expressionsmuster von Rezeptoren auf dendritischen Zellen lassen die Annahme zu, dass geringe Unterschiede z.B. bei verschiedenen Mausstämmen in der Expression von costimulatorischen Molekülen auf dendritischen Zellen bzw. von Rezeptoren auf T-Zellen zur Ausschüttung unterschiedlicher Mengen von Zytokinen in die immunologische Synapse führen. Diese Zytokine entscheiden über die Adaptermoleküle die aktiviert werden und über die Richtung der weiteren Signale. IL-12 von der antigenpräsentierenden Zelle führt bei T-Zellen zur Aktivierung von Signal transducer and activator of transcription 4 (STAT 4) und STAT1 und zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors T-bet, der für T<sub>H</sub>1-Zellen spezifisch ist und daher die T-Zelle spezifisch die Zytokine IL-2, IFN-gamma und TNF- $\alpha$  ausschütten lässt. Diese Zytokine leiten die Immunantwort anderer Zellen wie oben beschrieben in eine T<sub>H</sub>1-Richtung. Schüttet die antigenpräsentierende Zelle dagegen in einem alternativen Aktivierungsweg IL-4 aus, wird die T-Zelle zur Aktivierung von STAT6 und GATA3 stimuliert und startet die Transskription der Zytokine IL-4, IL-5, IL-13, die die Immunantwort benachbarter T-Zellen und B-Zellen in T<sub>H</sub>2-Richtung treiben (**Abb. 3**).

Moleküle die für die Anheftung der T-Zellen an Epithelzellen oder für die Stabilisierung der immunologischen Synapse verantwortlich sind, binden als Ring am Rand der Synapse. Dazu zählt die Interaktion zwischen CXCL12 (SDF-1) auf antigenpräsentierenden Zellen und LFA-1 (CD11a) auf T-Zellen. Durch die Bindung dieser Moleküle werden die Zellmembranen der Aktionspartner auf einem großen Areal eng zusammengehalten und viele andere Interaktionen erst ermöglicht. Durch die enge Bindung der Membranen in der Synapse wird die inhibitorische Phosphatase CD45, die 90% der Oberfläche der T-Zelle bedeckt, wegen ihrer Größe aus der Synapse gedrängt und ermöglicht die Aktivierung und Phosphorylierung von sich selbst aktivierenden Src-Kinasen. Diese sind an den T-Zell-Rezeptor gebunden und aktivieren diesen nach Aktivierung. So kann das Molekül Zap-70 (TCR zeta associated protein of 70 kD) an den aktivierten T-Zell-Rezeptor binden, wird ebenfalls von den Src-Kinasen aktiviert und ermöglicht die Bindung von LAT (linker for activated T-cells) an den T-Zell-Rezeptor. Durch Bindung weiterer Adaptermoleküle bildet sich ein großer Aktivierungskomplex mit den Molekülen Gads (Grb2-related adapter downstream of Shc), SLP-76 (SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kD), Vav, Grb2 (growth factor receptor-bound protein) und Sos (son of sevenless). Letztendlich werden

Transkriptionsfaktoren aktiviert, die in den Zellkern diffundieren und zur Produktion von mRNA führen (**Abb. 3**). So werden neue Rezeptoren und Botenstoffe produziert, exprimiert und sezerniert. Das Zentrum der Zytoskelettorganisation wird in die Nähe der Synapse verlegt. Dies ermöglicht einen schnelleren Transport von neusynthetisierten Proteinen in den synaptischen Spalt und die Internalisierung und Prozessierung und Erneuerung des Peptidgebundenen T-Zell-Rezeptors. Die Wechselwirkung zwischen Rezeptoren oder Adaptern kann das Signal in der T-Zelle abschwächen oder verstärken. Daher ist eine Beeinflussung der Immunantwort durch Mutation von Molekülen und Verhinderung, Abschwächung oder Verstärkung eines Signals für die Zelle möglich.

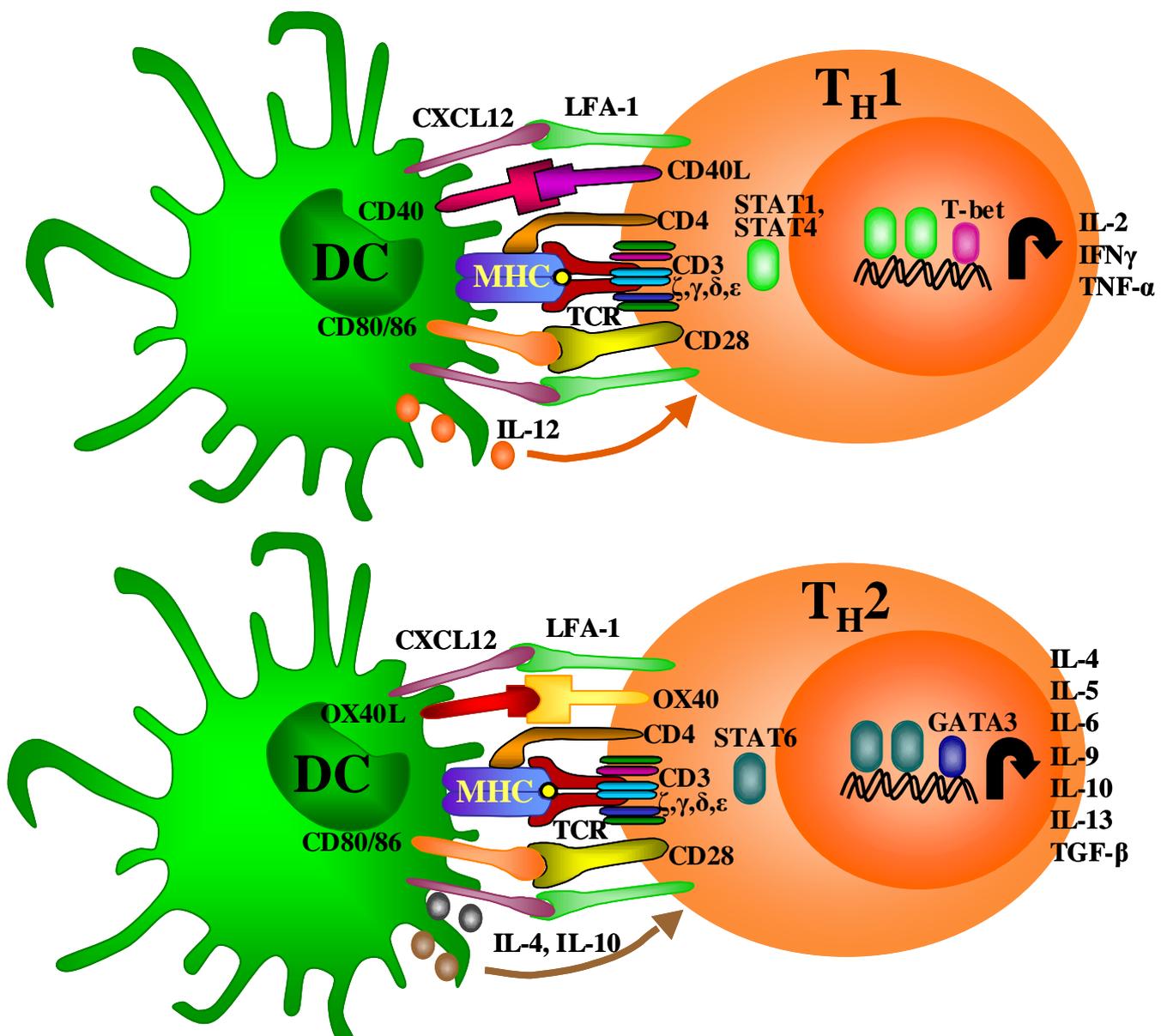
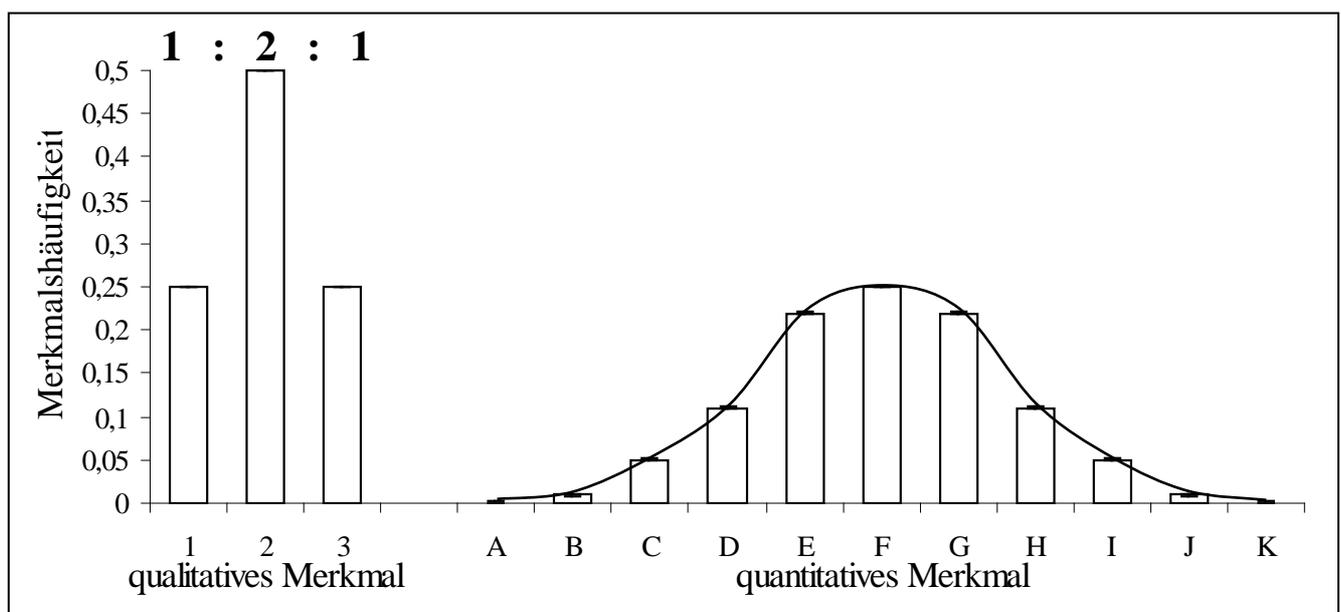


Abb. 3: APC-T-Zell-Interaktion bei T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2-Reaktion

## 2.4 Genetik polygener Erkrankungen

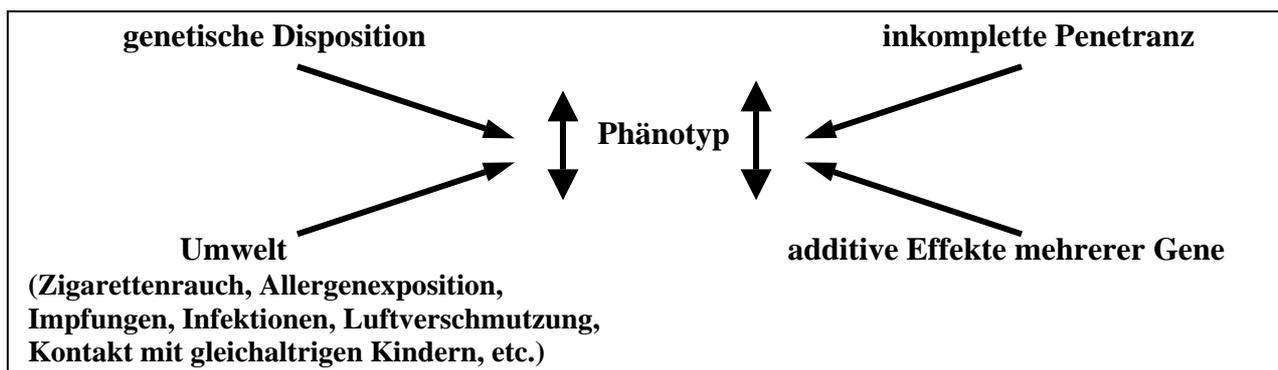
Durch Aufklärung der Ursachen genetischer Erkrankungen können Signalwege im Immunsystem und bei Immunreaktionen schneller entschlüsselt und neue Ansatzpunkte und Strategien für die Therapie polygen vererbter Erkrankungen entwickelt werden. Erste Untersuchungen, die von Mendel 1865 zur Vererbung äußerlich sichtbarer Phänotypen bei Pflanzen durchgeführt wurden, beruhten auf Merkmalen, für deren Ausprägung jeweils nur ein Gen bei den Pflanzen verantwortlich war. Feiner abgestufte und von mehreren Genen regulierte Merkmale sind als „Quantitative Traits“ erstmals in der durch den englischen Mathematiker Hardy und den Stuttgarter Arzt Weinberg im Jahr 1908 begründeten Populationsgenetik untersucht worden. Um 1920 konnten Haldane, Fisher und Wright zeigen, dass die Vererbung quantitativer Merkmale prinzipiell auch den von Mendel postulierten Gesetzen der Vererbung unterliegt. Sie begründeten damit die Theorie der quantitativen Genetik. Mehrere, jeweils nach den Regeln von Mendel vererbte Gene bestimmen danach im Verbund die Ausprägung eines Merkmals. Diese polygen vererbten Eigenschaften segregieren selbst jedoch nicht nach den von Mendel, für monogene Erbgänge beschriebenen Verhältnissen. Es finden sich stattdessen zahlreiche distinkte Phänotypen, die durch Mischung mehrerer sich gegenseitig beeinflussender Gene entstehen. Die Merkmalsverteilung der distinkten Phänotypen eines solchen restriktiven und komplexen Merkmals zeigt eine Häufigkeitsverteilung, die sich einer Normalverteilungskurve nähert (**Abb. 4**).



**Abb. 4:** Merkmalshäufigkeit eines monogenen, rezessiv vererbten Merkmals (links) und eines polygenen von mehreren Genen beeinflussten Merkmals (rechts). Die Verteilung der Merkmale nähert sich mit steigender Zahl beteiligter Gene einer Normalverteilung.

Daher teilen sich die Merkmale z.B. bei einem codominanten Erbgang wie folgt auf: **1:1:2:2:4:2:2:1:1**. Mithilfe komplexer Matrixberechnungen ist es möglich, Chromosombereiche mit krankheitsrelevanten Genen einer polygenen Erkrankung (Quantitative Trait Loci, QTL) zu finden. Dies ist auch möglich, wenn relativ wenig über den Mechanismus der genetisch prädisponierten Erkrankung bekannt ist.

Allergien, Asthma und Atopie sind **polygene Erkrankungen**, bei denen mindestens 2 oder mehr Gene an der Ausprägung beteiligt sind (Los et al., 1999; Los et al., 1999; Palmer and Cookson, 2000). Da Erkrankungen des atopischen Formenkreises sehr vielfältig in Erscheinung treten, wird die Definition des Phänotyps erschwert. Die Autoren zahlreicher Studien haben quantitative Phänotypen für die allergische Entzündung in der Bronchialschleimhaut, für das allergische Asthma und die bronchiale Hyperreagibilität sowie für Immunglobulintiter definiert und diese in Linkageanalysen benutzt (Kapitel 2.4.2).



**Abb. 5: Der Phänotyp eines komplexen Merkmals ist nicht nur abhängig von Umweltfaktoren und der genetischen Disposition.**

Da genetisch identische Individuen (eineieiige Zwillinge), die unter gleichen Umweltbedingungen, d.h. im gleichen Elternhaus aufwachsen, nicht 100% konkordant atopische Erkrankungen bei einer genetischen Disposition ausbilden, ist anzunehmen, dass incomplete Penetranz bei diesen Erkrankungen eine Rolle spielt. Weiterhin sind additive Effekte mehrerer Gene bei der Ausprägung atopischer Erkrankungen denkbar. Die Vielfalt der Ausprägung der Krankheit erschwert die Suche nach relevanten Genen ebenso, wie die vielen zu berücksichtigenden Umweltfaktoren. Bei Untersuchungen beim Menschen kommt erschwerend die genetische Heterogenität der untersuchten Individuen hinzu (**Abb. 5**).

### 2.4.1 Strategien zur Suche nach krankheitsrelevanten Genen

Für die Identifizierung krankheitsrelevanter Gene gibt es unterschiedliche Verfahren. Die Wahl des zu untersuchenden Kollektivs hat einen entscheidenden Einfluss auf die Aussagekraft der Studie und die Übertragbarkeit auf den Menschen. Der Vorteil des humanen Systems ist, dass bei Patienten gut definierte und sicher diagnostizierbare Krankheiten untersucht werden können und die Diagnosekriterien dafür durch jahrelange Anpassung und Optimierung festgelegt sind. Nachteilig wirken sich im humanen System die bereits erwähnte genetische Heterogenität und Umweltfaktoren als nicht zu standardisierende Störgrößen aus. In Tiermodellen für atopische Erkrankungen gibt es wegen der Möglichkeit der Verwendung gezüchteter Stämme kein Verwischen des Phänotyps durch genetische Vielfalt. Jedoch ist die Definition eines klaren Phänotyps oft schwieriger. Mäuse werden für genetische Untersuchungen bereits seit den 20-iger Jahren des letzten Jahrhunderts gezüchtet. Es sind heute viele gezüchtete Mausstämmen erhältlich. Es stehen daher unbeschränkt viele, genetisch identische Individuen für die Untersuchung unterschiedlicher Phänotypen zur Verfügung. Dies ermöglicht die Untersuchung von Gruppen von Tieren mit der gleichen Behandlung und die Wiederholung von Experimenten mit genetisch gleichen Individuen. Die Bedingungen, unter denen die Tiere aufwachsen und gehalten werden, lassen sich leicht konstant halten. Da Mäuse keine Allergien von sich aus entwickeln, muss eine Allergie durch Injektion eines Allergens provoziert werden.

Verfahren zur Suche nach krankheitsrelevanten Genen erfordern einen unterschiedlich hohen Arbeits- und Zeitaufwand. Die folgenden Verfahren und Strategien zur Gensuche sind daher möglich:

- 1. Zwillingsstudien:** Vergleich der Konkordanz der Erkrankungen bei eineiigen Zwillingen mit der Konkordanz bei zweieiigen Zwillingen und der Konkordanz der Erkrankung bei normalen Geschwistern zur Abschätzung des Erbganges.  
Bietet sich im humanen System an, Arbeitsaufwand gering bei monogenen Erkrankungen, eignet sich jedoch nicht zur Suche nach Genen polygener Erkrankungen.
- 2. Fall-Kontroll-Studien:** Vergleich der Häufigkeit von Allelen bei Betroffenen und Nichtbetroffenen (Kandidatengenanalyse oder Genomscan).  
Arbeitsaufwand mäßig groß, Fehlerquellen sind Konfounder, die die Krankheit und die Gruppenwahl beeinflussen sowie die genetische Vielfalt und Heterogenität der Individuen.

**3. Linkageanalyse:** Analyse möglichst großer Familien mit bekannter Erbfolge oder von Nachkommen aus Inzuchtkreuzungen oder nichtverwandter erkrankter und nichterkrankter Individuen auf einen Phänotyp. Suche nach überzufällig häufigem und gleichzeitigem Auftreten einer Erkrankung und chromosomaler Markern (Kandidatengenanalyse oder Genomscan).

Arbeitsaufwand bei Inzuchttieren groß, jedoch größer bei genetisch nicht heterogenen Individuen (Mensch).

**4. Zufällige Spontanmutation durch mutagene Substanzen im Tiermodell:** Schrotschussmethode, die das „Problem von hinten aufzäumt“. Durch den Einsatz mutagener Substanzen in Tiermodellen und Provokation zufälliger Spontanmutationen, Auszuchtung interessanter Phänotypen in Inzuchtstämmen und anschließende Analyse der Mutationsorte, lassen sich vielleicht interessante regulatorische Gene finden.

Der Arbeitsaufwand ist wegen der Blindschusstechnik groß. Eine gezielte Planung und Vorhersage der mit den Tieren durchzuführenden Analysen ist nicht möglich (Alessandrini et al., 2001; Keats et al., 2001) (**Abb. 6**).

**Zwillingsstudien** eignen sich zur Abschätzung des Erbganges monogener und polygener Erkrankungen. Dabei werden die Häufigkeiten der Erkrankungen bei eineiigen und zweieiigen Zwillingen sowie bei Geschwistern und Nichtverwandten miteinander verglichen. Die Häufigkeit an Zwillingen ist limitierend für diese Studien (nur 7% aller Zwillinge sind eineiig, jede 80. Geburt ist eine Zwillingsgeburt). Der Aufwand zum Finden der Probanden ist entsprechend groß. Für allergische Erkrankungen wurde eine Konkordanzrate von  $\lambda_{\text{sib}}=3,5$  bis 5 gefunden. Diese Konkordanzrate ist niedrig im Vergleich zu den Konkordanzraten anderer genetisch bedingter, polygener Erkrankungen ( $\lambda_{\text{Diabetes mellitus}} \approx 15$ ,  $\lambda_{\text{Multiple Sklerose}} \approx 20$ ,  $\lambda_{\text{Zöliakie}} \approx 60$ ). Die Konkordanzrate einer monogen vererbten Erkrankung ist im Vergleich dazu  $\lambda_{\text{Cystische Fibrose}} \approx 500$ . Somit spricht die niedrige Konkordanzrate atopischer Erkrankungen für einen relativ geringen genetischen Effekt und für einen starken Einfluss von Umweltfaktoren auf die Ausprägung der Erkrankung. Zwillingsstudien waren bei Asthma und atopischen Erkrankungen hilfreich, um die Vererbung dieser Erkrankungen nachzuweisen und Abschätzungen über die Anzahl verantwortlicher Gene zu machen (Los et al., 2001).

In **Fall-Kontroll-Studien** wird eine Assoziation des Auftretens einer Erkrankung und das gleichzeitige Vorhandensein bestimmter Allele potentieller Kandidatengene oder ganzer

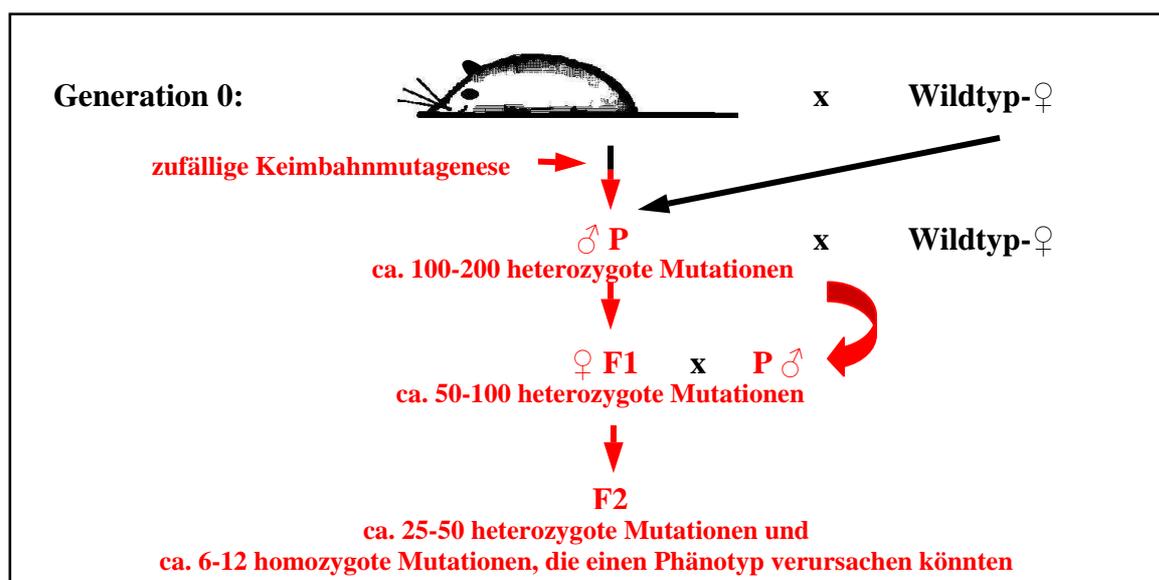
Bereiche des Genoms bei nicht verwandten, nicht erkrankten und erkrankten Individuen untersucht. Das Auffinden von Genen, die polygene Erkrankungen verursachen, ist mit dieser Methode im humanen System mit mäßig großem Aufwand möglich. Wegen der genetischen Heterogenität muss die Probandenzahl entsprechend groß gewählt werden. Für die Analyse monogener Erkrankungen sind die ersten zwei Methoden gut geeignet, erfordern einen relativ geringen Arbeitsaufwand und führen zu einem Genort. Bei polygenen Erkrankungen ist der Arbeitsaufwand entsprechend größer, lässt sich jedoch durch die Beschränkung auf ein oder mehrere Kandidatengene einschränken.

**Linkageanalysen** sind eine Erweiterung des Fall-Kontroll-Ansatzes unter Applikation von Methoden der modernen Molekularbiologie. Zur Vereinfachung der Untersuchung und Verkleinerung der notwendigen Untersuchungskollektive bieten sich Großfamilien oder Lebensgemeinschaften an, die durch jahrhundertelange Isolation in einigen Merkmalen und Allelvarianten eine geringere genetische Vielfalt haben. Ebenso können auch Generationen von Inzuchtierkreuzungen untersucht werden. Diese Methode eignet sich zum Auffinden krankheitsrelevanter Gene oder Chromosomenregionen, auch wenn relativ wenig über den Vererbungsmodus und den Mechanismus einer Krankheit bekannt ist. Im humanen System gibt es Lebensgemeinschaften mit verminderter genetischer Heterogenität aufgrund religiöser oder geographischer Isolation z.B. bei den Hutterern, den Amish-people oder den Siedlern im finnischen Binnenland. Diese Lebensgemeinschaften mit häufigen Verwandten-Ehen haben nur eine kleine Anzahl an Ahnen, den Gründer der Siedlergemeinschaften. Ebenso können gezielt gekreuzte Inzuchttiere für diese Studien verwendet werden. Hierbei sind geringere Gruppengrößen von Individuen möglich, da gezielt ingezüchtete Tiere mit mehr als 97,5% homologen Genen untersucht und für die Kreuzungsversuche benutzt werden können. In dieser Arbeit wurde mit dieser Methode nach möglichen Genorten für allergieverursachende Gene gesucht.

Die **zufällige Mutagenese des gesamten Genoms**, z.B. mit n-Ethyl-n-Nitro-Harnstoff, kann zum Auffinden von Regulatoren der Immunantwort oder anderer Funktionen des Organismus benutzt werden. Bei Fruchtfliegen konnte Nüsslein-Vollhard (Nusslein-Vollhard and Wischaus, 1980) mit dieser Methode mehrere für die Embryonalentwicklung wichtige Schlüsselgene entdecken. Auch bei Mäusen, die dem Menschen entwicklungs-genetisch näher stehen, wurde diese Methode angewendet (Alessandrini et al., 2001; Keats et al., 2001). Dazu wurden die Nachkommen der 3. Generation nach chemischer Spermien-Mutagenese

untersucht. Durch die Keimbahnmutagenese bei männlichen Tieren werden pro Spermium ca. 100-200 Mutationen in kodierenden Bereichen des Genoms gesetzt.

Die Tiere der P-Generation sind heterozygot für ca. 100-200 Mutationen. Um einige homozygote Mutationen zu erhalten, werden sie mit Wildtyp-Weibchen verpaart und 3 Monate später noch einmal mit den ersten Nachkommen der F1-Generation. Die Nachkommen der F2-Generation können ca. 8-9 Monate nach Spermiemutagenese auf einen Phänotyp hin untersucht werden (**Abb. 6**). Um größere Zahlen an untersuchbaren Individuen zu erhalten, können die Nachkommen der 2. Generation auch ingezüchtet und somit Gruppen genetisch gleicher Individuen erzeugt werden. Der logistisch züchterische Aufwand ist bei dieser Methode groß und die Chance, Mutationen in wichtigen Regulatorproteinen zu erhalten, gering. Zur Erhöhung der Wahrscheinlichkeit interessanter Mutationen können für Rückkreuzungen auch transgene Tiere oder Tiere, bei denen kurze Bereiche des Genoms fehlen oder mutiert sind, benutzt werden. Die Nachkommen der F1 Generation zeigen dann bei Mutationen in dieser Region sicher einen Phänotyp, da dieser Genabschnitt nur in einer Kopie bei den Nachkommen vorliegt. Wenn nun auch diese eine Kopie des Chromosomenstranges eine Mutation trägt, können schon die Nachkommen der F1-Generation auf einen Phänotyp untersucht werden. An das Finden eines interessanten Phänotyps schließt sich in jedem Fall die Suche nach dem mutierten Gen mit Hilfe von mRNA-Arrays oder Auszüchtung des Phänotyps und Linkageanalyse an.



**Abb. 6:** Auszüchtung interessanter Mutationen nach chemischer Keimbahnmutagenese

### 2.4.2 Linkageanalysen

In Linkageanalysen wird ein Zusammenhang zwischen einem Phänotyp und genetischen Markern gesucht. Eine Kopplung, d.h. Linkage besteht dann, wenn das untersuchte Merkmal überzufällig häufig genau dann auftritt, wenn ein bestimmter Marker vererbt wurde. Dazu können genetische Marker in Form von short nuclear tandem repeats (SNP/ SNTP) oder simple sequence length polymorphisms (SSLP) gewählt werden, die in unterschiedlicher Länge bei den verwendeten Inzuchtstämmen vorkommen. Diese Marker müssen nicht in kodierenden Genabschnitten liegen. Linkage zu einem dieser Marker ist ein Hinweis dafür, dass ein, in der Nähe dieses Markers liegendes Gen für die Ausprägung des untersuchten Merkmals mitverantwortlich sein könnte. Eine solche Assoziation zu finden, ist Ziel dieser Studie. Nach Aufspüren eines relevanten Genortes sollte sich in jedem Fall eine gezielte Untersuchung der in der Nähe des Markers liegenden Gene anschließen.

Zur Auswertung von Linkageanalysen wird der LOD-score herangezogen (LOD = Logarithmic Odds Differenz). Der LOD-score ist der negative dekadische Logarithmus  $-\log_{10}$  des Quotienten aus der Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins einer wahren Assoziation zwischen einem Marker und dem Merkmal (Alternativhypothese) und der Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Assoziation (Nullhypothese) (Zuraw and Herschbach, 2000).

$$\text{LOD-score} = -\log_{10} \frac{\text{Nullhypothese (keine Kopplung)}}{\text{Alternativhypothese (Kopplung)}} \quad (I)$$

Ein LOD-score von 3 entspricht einer 1000x-fach höheren Wahrscheinlichkeit des Vorliegens von Linkage. Bei der Untersuchung von den auf einen Elternstamm zurückgekreuzten Nachkommen der F1-Generation einer Verpaarung zweier Inzuchttierstämme (backcross) liegt ab einem LOD-score  $\geq 2.95$  signifikant Linkage vor. Das heißt, es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem untersuchten Merkmal und dem gerade untersuchten Marker ( $p \leq 0,001$ ). Bei einem LOD-score  $\geq 2.0$  kann man bei einer solchen Rückkreuzung (backcross) einen signifikanten Zusammenhang annehmen (suggestive linkage) (Lander and Kruglyak, 1995). Häufig wird statt des LOD-scores die LRS (Likelihood Ratio Static) oder der p-Wert der Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Assoziation angegeben. Die LRS kann in einen LOD-score durch Division durch 4,61 umgerechnet werden ( $= 2 \times \ln 10$ ). Der LOD-score, die LRS oder der p-Wert eines Markers wird dann mit dem entsprechenden Wert benachbarter Marker verglichen.

Der Abstand der Marker voneinander auf dem Genom hat bei Linkageanalysen einen entscheidenden Einfluss auf die Genauigkeit der Untersuchung. Umso größer der Abstand zweier Marker ist, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass bei der letzten oder einer vorherigen Meiose ein crossing over, d.h. eine Rekombination der beiden Markerallele stattgefunden hat. Bei einer optimalen Linkageanalyse sollte in jedem so entstandenen Bruchstück des Genoms mindestens ein Marker liegen. Um so dichter also die Marker liegen, um so höher ist die Wahrscheinlichkeit, eine ideale Linkageanalyse durchzuführen. Bei Linkageanalysen kann aus dem Verhältnis gemeinsamer Parentalallele zwischen zwei Markern bei allen untersuchten Individuen der Abstand der Marker zueinander abgeschätzt werden. Mit den Ergebnissen dieser Abstandsschätzungen können Genkarten erstellt und die Genomgröße abgeschätzt werden.

Im Rahmen des Human Genom Projektes und des Mouse Genom Projektes ist das ganze Genom des Menschen und der Maus analysiert worden. Beim Vergleich der physischen Genkarten, aus den Daten der Genom-Projekte, mit den bisher vorhandenen aus Rekombinationsfrequenzen errechneten Genkarten zeigt sich, dass die Karten in bestimmten Bereichen gut übereinstimmen, in anderen aber überhaupt nicht. Die aus Rekombinationsfrequenzen berechneten Genomkarten gehen von gleichmäßiger Häufigkeit der Rekombination in allen Bereichen des Genoms aus. Daher sind solche Karten in Bereichen, in denen die Rekombinationsfrequenz vom Mittelwert abweicht, nicht mit physischen Genkarten identisch. Weil die beiden Genomkarten nicht miteinander übereinstimmen, muss es im Genom der Maus und des Menschen Bereiche geben, in denen vermehrt crossing-over Ereignisse stattfinden (hot spots) und Bereiche, in denen solche Ereignisse seltener sind (cold spots). Für die Aussagefähigkeit von Linkageanalysen ist diese Inhomogenität der crossing over Ereignisse im Genom jedoch nicht von Bedeutung.

### **2.4.3 Linkageanalysen zu Atopie, Allergie und Asthma beim Menschen**

Die erste Linkageanalyse zur Genetik eines atopischen Phänotyps wie z.B. ges. IgE hat signifikante Linkage zu 5 Markern im Cytokingencluster auf Chromosom 5 in der Nähe von 5q31 gefunden (Marsh et al., 1994). Diese Studie wurde bei Amish people, einer europäischstämmigen Siedlergemeinschaft ehemals aus Oberösterreich mit häufigen Verwandtenehen, in Dakota gemacht. Die Untersuchung allergenspezifischer Immunglobulintiter führte in dieser Studie jedoch zu keinem Ergebnis. Zwei weitere in der

Studie von Marsh nahezu signifikante Genorte wurden in einer anderen Studie im selben Jahr bei niederländischen Familien mit Asthmakranken veröffentlicht (Meyers et al., 1994).

Die dritte Studie fand 1996 mehrere signifikante Zusammenhänge mit einem qualitativen (Atopie) und 4 quantitative Phänotypen (Gesamt-IgE, Hauttest, Eosinophilenzahl und Atemwegshyperreagibilität gegenüber Methacholin) (Daniels et al., 1996). Signifikante Linkage wurde zu Markern auf den Chromosomen 4, 6, 7, 11 und 16 gefunden. Somit wurden neue Genregionen entdeckt, die mit atopischen Erkrankungen in Verbindung stehen könnten. In dieser 3. Studie stand das in den ersten 2 Studien gefundene Cytokingencluster auf Chromosom 5 nicht in einem signifikanten Zusammenhang mit einem atopischen Phänotyp.

In weiteren Studien wurden immer neue Genorte gefunden, die signifikant mit Atopie, Asthma und Allergien assoziiert sind. Da die Untersuchungsmethoden, die Definition der Phänotypen und die untersuchten Bevölkerungsgruppen erheblich voneinander abweichen, wurden mehrere Studien in groß angelegten Multicenterstudien zusammengefasst, bei denen Menschen mehrerer Rassen auf unterschiedlichen Kontinenten untersucht wurden. Eine solche multiethnische und kontinentumspannende Studie ist die Collaborative study on Genetics of Asthma (CSGA) oder die auf nationaler Ebene organisierte Multicenter Atopy Study (MAS) in Deutschland. In diesen Studien wurden viele verschiedene Genloci mit signifikanter Assoziation gefunden (Hizawa et al., 1998c; Hizawa et al., 1998c; Hizawa et al., 1998a; Blumenthal et al., 1998; Anonymous, 1997; Gerhard et al., 2003; Liu et al., 2000). Das Ergebnis solcher überdimensional großen, kontinentübergreifenden und bei mehreren Rassen durchgeführten Studien ist jedoch nicht so überzeugend wie es erwartet wurde. In Teilgruppen wurde signifikante Linkage zu Markern gefunden, die sich nach Einschluss weiterer Rassen nicht bestätigte. Die Schlussfolgerung mehrerer Autoren multinationaler und kontinentübergreifender Untersuchungen ist daher, dass Studien in durch ihre Lebensweise isolierten Bevölkerungsgruppen wegen geringerer Heterogenität und kleinerer Untersuchungsgruppen sinnvoller und weniger aufwendig sind. Kontinentübergreifende Studien und Metaanalysen, die für kleine Genbereiche mehrere genomweiten Studien auswerten, sind aufwendiger und konnten signifikante Ergebnisse kleinerer Studien nicht mehr bestätigen (Palmer et al., 2001).

In **Tabelle 4** sind alle signifikanten und wahrscheinlich signifikanten Ergebnisse genomweiter Studien zusammengefasst. Eine „Häufung von Treffern“ und somit eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für einen engen Zusammenhang zeigte sich für Genregionen in den

humanen Chromosombereichen 5q31, 6p21, 11q, 12q14-22, 13q, 14q und 16q. In dem in mehreren Studien gefundenen Bereich auf Chromosom 5 (Ober et al., 2000; Cookson et al., 20010; Ober et al., 1998; Marsh et al., 1994; Meyers et al., 1994; Xu et al., 2001a; Yokouchi et al., 2000) liegt unter anderem das schon erwähnte Cytokingencluster mit Genen für die mit einer  $T_H2$ -Reaktion assoziierten Cytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sowie mit dem Gen für IL-9, den  $\beta_2$ -adrenergen Muscarinrezeptor und CD14. Dies sind die  $T_H2$ -Zytokine. Zusätzlich ist CD14 ein hochaffiner Ligand für von Bakterien produziertes LPS ebenso bedeutend für die Immunregulation. In dem Chromosomenbereich auf Chromosom 6 (Wjst et al., 1999; Daniels et al., 1996; Yokouchi et al., 2000; Xu et al., 2001a) codieren MHC-Gene, die die Präsentation von Allergenen vermitteln, und somit am Beginn der Signalkaskade stehen (Donfack et al., 2000). Auf Chromosom 11 befindet sich das Gen für den hochaffinen Fc $\epsilon$  Rezeptor I $\beta$ , der mit Atopie (Hill et al., 1995), Asthma (Shirakawa et al., 1996), BHR (Trabetti et al., 1998) und der atopischen Dermatitis (Cox et al., 1998) assoziiert ist.

Auf Chromosom 12q befinden sich Gene für den  $T_H2$ -Transscriptionsfactor Signal Transducer and Activator of Transcription 6 (STAT6), Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), die am Prostaglandinstoffwechsel beteiligte Hydrolase „Nitrogen Oxid Synthetase 1“ (NOS1), Leukotriene 4 Hydrolase (LTA4H) sowie die Activation Induced Cytidin Deaminase (AICDA) und das Gen für die Stammzell-Wachstumsfaktoren MC-GF/ SCF. Die Studien von Barnes (Nickel et al., 1997; Wilkinson et al., 1999; Hizawa et al., 1998c; Hizawa et al., 1998a; Barnes et al., 2001; Liu et al., 2000; Nickel et al., 1999; Nickel et al., 1997; Barnes et al., 1999; Barnes et al., 1996; Shao et al., 2004), die Linkage zu dieser Region von Chromosom 12 zeigten, wurden durch Kandidatengenanalysen bestätigt (Nickel et al., 1997; Wilkinson et al., 1999; Hizawa et al., 1998c; Hizawa et al., 1998a; Barnes et al., 2001; Liu et al., 2000; Nickel et al., 1999; Nickel et al., 1997; Barnes et al., 1999; Barnes et al., 1996; Shao et al., 2004).

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass aus der Vielzahl gefundener Genorte anzunehmen ist, dass atopische Erkrankungen nicht nur durch einige wenige, sondern durch viele Gene vererbt werden. In den meisten Studien konnte eine Assoziation zu für  $T_H1$  und  $T_H2$ -Immunreaktionen wichtigen Proteinen geknüpft werden. In den jeweils auf einige hundert bis tausend Individuen beschränkten Studien muss durch die Auswahl und Beschränkung auf ein Untersuchungskollektiv sowie auf eine oder mehrere Untersuchungsmethoden eine Selektion der veränderten Genorte und Phänotypen erfolgt sein, was diese unterschiedlichen Ergebnisse erklärt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um

eine Aussage über Gene und Genvarianten als „Atopiemarker“ machen zu können (**Tab. 4**). Interessant ist, dass nur in einer Studie eine Assoziation zum X-Chromosom hergestellt wurde. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass atopische Erkrankungen nahezu gleichverteilt bei Männern und Frauen vorkommen.

**Tab. 4: Signifikante und wahrscheinlich signifikante Linkageanalysen mit atopischen Phänotypen im humanen System (Genom-Scans mit  $p \leq 0,01$ )**

Chrom.-Region	potentielle Kandidatengene	Phänotyp	Population	P	Autor, Jahr, Lit.
1pter	?	ges. IgE	Kaukasier (D + S)	.0098	(Wjst et al., 1999)
1p36	CSF3R, IL12Rb2, PLA2G2A	Asthma	Kaukasier (DK)	$\leq .0001$	(Haagerup et al., 2002)
1p33	CSF3R, IL12Rb2, PLA2G2A	ges. IgE	Kaukasier (D + S)	.0045	(Wjst et al., 1999)
1p32	CSF3R, IL12Rb2	BHR	Amerikaner spanischer Abstammung	.002	(Xu et al., 2001a)
1p31	CSF3R, IL12Rb2	AR, Asthma (BHR+)	Kaukasier (F)	.000016	(Dizier et al., 2005)
1q31	CSF3R, IL12Rb2	Asthma	Europäer (F)	.005	(Dizier et al., 2000)
1q21	?	AD	Kaukasier (GB)	.0005	(Cookson et al., 20010)
1q25-q31	Cathepsin E, PLA2G4	Ges. IgE	Asiaten (China)	.001	(Xu et al., 2001b)
2pter	IL-1	BHR, Asthma, ges. IgE, spez. IgE	Kaukasier (D + S)	.0073; .0074; .0032; .0049	(Wjst et al., 1999)
2p12	?	Der p Sensib.	Kaukasier (D)		(Kurz et al., 2005)
2p	?	Asthma	Asiaten (China)	.00002	(Xu et al., 2001b)
2q21-2q23	?	Der p spez. IgE	Kaukasier	0,0033	(Hizawa et al., 1998b)
2q32	?	AR, Asthma (BHR+)	Kaukasier (F)	.000016	(Dizier et al., 2005)
2q32	?	ges. IgE	Kaukasier (D + S)	.0016	(Wjst et al., 1999)
2q33	?	Asthma	Spanisch-Amerikaner	.0005	CSGA (Anonymous, 1997)
3p24-p14	IL5R $\alpha$	AR, Asthma (BHR+)	Kaukasier (F)	.0001	(Dizier et al., 2005)
3q21-22	IL5R $\alpha$	ges. IgE	Kaukasier (DK)	$\leq .0001$	(Haagerup et al., 2002)
3q21	IL5R $\alpha$	AD	Kaukasier (D)	.0009	(Lee et al., 2000)
3q21	IL5R $\alpha$	Der p Sensib.	Kaukasier (D)	?	(Kurz et al., 2005)
4q	?	BHR	Australier	<0.001	(Daniels et al., 1996)
4q24	?	+SPT	Asiaten (China)	.0003	(Xu et al., 2001b)
4q35	?	Der. farinae assoziiertes Asthma	Asiaten (J)	.0002	(Yokouchi et al., 2000)
5p	?	Asthma	Kaukasier (Hutterer)	.001 .0061	(Ober et al., 2000)
5p15	?	Asthma	Afro-Amerikaner	.0008	CSGA (Anonymous, 1997)

5q	IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 – Cytokinegencluster CD14,	Asthma, BHR ges. IgE ges. IgE	Kaukasier (Hutterer) Kaukasier (GB) Kaukasier (NL)	.0007, 0,001 .0004 < 0,0002	(Ober et al., 2000) (Cookson et al., 20010) (Xu et al., 2000)
5q23-q31	IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, CD14, $\beta_2$ -adren. Rez.	Asthma	Kaukasier (Hutterer)	.00091	(Ober et al., 1998)
5q31.1	IL-4	ges. IgE	Amish people		(Marsh et al., 1994), (Meyers et al., 1994)
5q31	IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, CD14, $\beta_2$ -adren. Rez.	BHR, conditional Linkage test	Amerikaner afrikan., europäischer und spanischer Abstammung	.0002	(Xu et al., 2001a)
5q31	IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, CD14, $\beta_2$ -adren. Rez.	Asthma + ges. IgE	Kaukasier (DK)	$\leq$ .0001	(Haagerup et al., 2002)
5q31-q33	IL-12 $\beta$ , LTC4S	Df-Asthma	Asiaten (J)	$1,3 \times 10^{-6}$	(Yokouchi et al., 2000)
6p21.3	HLA-I, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$	Asthma, ges. IgE, spez. IgE, Eos.	Kaukasier (D + S)	.0081; .002; .0011; .0015	(Wjst et al., 1999)
6p	HLA-I, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$	Eos	Australier	< 0,001	(Daniels et al., 1996)
6p22-p21.3	HLA-II, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$	Df-Asthma	Asiaten (J)	.0009	(Yokouchi et al., 2000)
6p21	HLA-II, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$	BHR	Amerikaner europäischer Abstammung	0,003	(Xu et al., 2001a)
6p22.3	HLA-II, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$	ges. IgE	Kaukasier (D + S)	.0012	(Wjst et al., 1999)
6p24	HLA-II, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$	Asthma, ges. IgE, Atopie	Kaukasier (DK)	$\leq$ .0001	(Haagerup et al., 2002)
7q	TCR -chain	BHR ges. IgE	Australier Kaukasier (NL)	< 0,0005 < 0,00002	(Daniels et al., 1996) (Xu et al., 2000)
8p	?	Asthma	Kaukasier (Hutterer)	.0009; .039	(Ober et al., 2000)
8p23-8q21	?	Der p spez. IgE	Afro-Amerikaner	0,0011	(Hizawa et al., 1998b)
8p23	?	BHR, conditional Linkage test	Amerikaner afrikan., europäischer und spanischer Abstammung	< .0002	(Xu et al., 2001a)
9p22+ 9p22-34	?	AR, Asthma (BHR+)	Kaukasier (F)	.0001 .0007	(Dizier et al., 2005)
9q	?	Asthma, ges. IgE, spez. IgE	Kaukasier (D + S)	.0073; .0098; .0025	(Wjst et al., 1999)
10p	GATA3, IL-2R $\alpha$ , IL-15R $\alpha$	FEV <sub>1</sub>	Asiaten (China)	.0009	(Xu et al., 2001b)
11p15	?	Asthma	Afro-Amerikaner	.0089	CSGA (Anonymous, 1997)
11p13	Fc $\epsilon$ R1 $\beta$ , CC16, CC10	Atopie ges. IgE	Europäer (F)	.002 .006	(Dizier et al., 2000)
11q 109cM	?	+SPT <sup>(1)(2)</sup>	Amerikaner afrikan., europäischer und spanischer Abstammung	.004	(Blumenthal et al., 2004a)
11q13	Fc $\epsilon$ R1 $\beta$ , CC16, CC10	+SPT	Australier		(Daniels et al., 1996)
11q21	Fc $\epsilon$ R1 $\beta$	BHR	Afro-Amerikaner	.002	(Xu et al., 2001a)
11q21	Fc $\epsilon$ R1 $\beta$	ges. IgE	Afro-Amerikaner	<.01	(Mathias et al., 2001)
11q25	Fc $\epsilon$ R1 $\beta$	Eos	Kaukasier (D + S)	.0084	(Wjst et al., 1999)
11q D11S1984	Fc $\epsilon$ R1 $\beta$	+SPT <sup>(Der p)</sup>	Amerikaner span. Abstammung	.0007	(Blumenthal et al., 2004b)
11q	Fc $\epsilon$ R1 $\beta$	+SPT <sup>(1)</sup>	Amerikaner afrikan.,	.0004	(Blumenthal et al.,

D11S1986-D11S1998			europäischer und spanischer Abstammung		2004a)
12q	IFN $\gamma$ , IGF1, SCF, LTA4H, NFYB, NO-Synthase, LTA4H	Asthma ges. IgE	Kaukasier (D + S) Kaukasier (NL)	.01 < 0,00002	(Wjst et al., 1999) (Xu et al., 2000)
12q14-24.2	IFN $\gamma$ , MC-GF, LTA4H, NO-Synthase, STAT6	Asthma	Kaukasier, Spanisch-Amerikaner	.0042 .026	CSGA (Anonymous, 1997)
12q15-24.1	IFN $\gamma$ , MCGF, LTA4H, NO-Synthase, STAT6	Asthma Asthma, ges. IgE	Kaukasier (Hutterer) Afro-Caribbean Amish (Kaukasier)	.0025	(Ober et al., 1998) (Barnes et al., 1996)
12q21-q23	IFN $\gamma$ , IGF1, SCF, LTA4H, NFYB, NO-Synthase, LTA4H	Df-Asthma	Asiaten (J)	.001	(Yokouchi et al., 2000)
12q22	IFN $\gamma$ , IGF1, SCF, LTA4H, NFYB, NO-Synthase, LTA4H	BHR, conditional Linkage test	Amerikaner afrikan., europäischer und spanischer Abstammung	.02	(Xu et al., 2001a)
12q24	IFN $\gamma$ , IGF1, SCF, LTA4H, NFYB, NO-Synthase	Atopie Asthma +SPT	Europäer (F)	.0008 .0005 .0003	(Dizier et al., 2000)
12 D12S373	?	+SPT <sup>(Der p)</sup>	Amerikaner afrikan. Abstammung	.001	(Blumenthal et al., 2004b)
13q	?	ges. IgE, Spez. IgE	Australier	<.001	(Daniels et al., 1996)
13q11	IL5R $\alpha$ , ALOX5AP	Df-Asthma	Asiaten (J)	.0004	(Yokouchi et al., 2000)
13q14.1-q14.3	CysLT2R	Df-Asthma	Asiaten (J)	.001	(Yokouchi et al., 2000)
13q21.3q-ter	?	Asthma	Kaukasier (GB) Hutterer	.0014	CSGA (Anonymous, 1997)
13q31	?	Eos	Europäer (F)	.0001	(Dizier et al., 2000)
13 D13S787	?	+SPT <sup>(Der p)</sup>	Amerikaner span. Abstammung	.001	(Blumenthal et al., 2004b)
14q	?	Asthma	Kaukasier (Hutterer)	.019; .0001	(Ober et al., 2000)
14q11.2-13	TCR $\alpha$ , TCR $\gamma$ , BLT	Asthma	Kaukasier (GB)	.0062	CSGA (Anonymous, 1997)
14q24	AS1	Asthma	Kaukasier (IS)	.000009	(Hakonarson et al., 2002)
14q32	?	BHR	Afro-Amerikaner, Amerikaner europäischer und spanischer Abstammung	.017	(Xu et al., 2001a)
15q22	?	ges. IgE	Kaukasier (D + S)	.0027	(Wjst et al., 1999)
15q13	?	BHR, conditional Linkage test	Amerikaner afrikan., europäischer und spanischer Abstammung	< .0002	(Xu et al., 2001a)
16p13-p12	IL-4-R $\alpha$	FVC	Asiaten (China)	.0006	(Xu et al., 2001b)
16q	?	+ SPT (Alt a, Cla h, Asp f)	Kaukasier (Hutterer)	.0008; .029	(Ober et al., 2000)
16p21	?	Der p Sensibilisierung	Kaukasier (D)		(Kurz et al., 2005)
16q22-q24	?	ges. IgE	Australier		(Daniels et al., 1996)
16q-ter	?	ges. IgE	Kaukasier (GB)	.0007	(Cookson et al., 20010)

17p11.1-p11.2	?	Asthma	Afro-Amerikaner	.0015	CSGA (Anonymous, 1997)
17q12-21	?	Atopie	Europäer (F)	.0001	(Dizier et al., 2000)
17q25	?	AD	Kaukasier (GB)	.0004	(Cookson et al., 2010)
19q12-q13.11	BCL3, CD22	BHR (MCh)	Asiaten (China)	.002	(Xu et al., 2001b)
19q13	BCL3, CD22	Asthma	Kaukasier (Hutterer)	.01	(Ober et al., 1998)
19q13	BCL3, CD22	Asthma	Kaukasier	.0013	CSGA (Anonymous, 1997)
19 D19S591	?	+SPT <sup>(Der p)</sup>	Amerikaner afrikan., europäischer und spanischer Abstammung	.00008	(Blumenthal et al., 2004b)
20p	ADAM33	AD, Asthma	Kaukasier (GB)	.0005	(Cookson et al., 2010)
20p	ADAM33	+SPT <sup>(1) (2)</sup>	Amerikaner afrikan., europäischer und spanischer Abstammung	.004	(Blumenthal et al., 2004a)
20 D20S473/604	ADAM33	+SPT <sup>(Der p)</sup>	Amerikaner afrikan., europäischer und spanischer Abstammung	.001	(Blumenthal et al., 2004b)
20 D20S470	ADAM33	+SPT <sup>(Der p)</sup>	Amerikaner spanischer Abstammung	.0005	(Blumenthal et al., 2004b)
20p13	ADAM33, IL-1 $\beta$ , Gnas, Acra,	Asthma, BHR	Kaukasier (GB+USA)	.04 - .000003	(Eerdewegh et al., 2002)
21q2	?	Asthma +SPT	Europäer (F)	.008 .008	(Dizier et al., 2000)
22q13	?	FEV <sub>1</sub>	Asiaten (China)	.002	(Xu et al., 2001b)
21q21	?	Asthma	Kaukasier (Hutterer)	.033	(Ober et al., 1998)
21q21	?	Asthma	Spanisch-Amerikaner	.004	CSGA (Anonymous, 1997)
21q31	?	+SPT	Europäer (F)	.002	(Dizier et al., 2000)
Xq25	?	ges. IgE	Kaukasier (D + S)	.0096	(Wjst et al., 1999)

Da in den letzten Jahren sehr viele Studien zur Vererbung von Atopie, Allergien und Asthma durchgeführt wurden, beschränkt sich diese Tabelle auf genomweite Studien in denen signifikante oder wahrscheinlich signifikante Zusammenhänge gefunden wurden.

<sup>(1)</sup> Pricktest mit den Allergenen: Cladosporum herbarum, Aspergillus fumigatus, Alternaria tenuis, Poa pratensis, Ambrosia artemisiifolia, Artemisia vulgaris, Betula nigra, Quercus alba, Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae, Felis domesticus, Canis familiaris, Gistlia germana, Periplaneta americana

<sup>(2)</sup> Amerikaner spanischer Abstammung wurden zusätzlich mit den Allergenen von Bermuda Grass, der russischen Distel und der Berg-Zeder getestet

#### 2.4.4 Linkageanalysen zu Atopie, Allergie und Asthma im Mausmodell

Da bei Mäusen die Definition und Untersuchung eines allergischen Phänotyps schwieriger ist als beim Menschen, wurden die meisten Studien bei Mäusen zur bronchialen Hyperreagibilität nach Provokation mit Methacholin, Acetylcholin oder Ozon durchgeführt. Wie sich schon bei Studien im humanen System gezeigt hat, ist auch bei verschiedenen Mausstämmen mit unterschiedlich definierten Phänotypen das Spektrum der Chromosomenbereiche mit signifikanten Zusammenhängen groß. Im Bezug auf atopische oder allergische Phänotypen fällt jedoch auf, dass einige der Mausinzuchtstämme immer als high responder (A/J, AKR und DBA/2) oder low responder (C3H, SJL und C57BL/6) reagieren. Dies spricht für das Vorhandensein genetischer Faktoren (Levitt and Mitzner, 1989; Shinagawa and Kojima, 2003; Zhang et al., 1997; Miyabara et al., 1998; Sadakane et al., 2002; Whitehead et al., 2003; De-Sanctis et al., 1995; Kannan and Deshpande, 2003; Takeda et al., 2001). Die Genregionen, die signifikante Zusammenhänge zeigen, sind im Mausgenom in zum humanen Genom homologen (syntenen) Regionen lokalisiert. Diese codieren daher für identische Gene (z.B. langer Arm des Mauschromosom 17 = synten zu hum. Chromosombereich 6p21, Mauschromosom 7 und 9 = synten zu 11q21-11q23, Mauschromosom 11 = synten zu dem Cytokingencluster auf 5q31). Wegen der Fülle an Studien, die wahrscheinlich signifikante Zusammenhänge gefunden haben, sind in der nachfolgenden **Tabelle 5** nur genomweite Studien mit Kreuzungen von verschiedenen Inzuchtmäusen mit einem signifikanten Ergebnis aufgelistet.

In mehreren Linkageanalysen wurde ein Genort gefunden, der für einen Teil der atopischen Phänotypen bei Mäusen verantwortlich ist. In der TCR-beta-Kette und in dem Gen ADAM33 wurden mehrere Polymorphismen entdeckt, die die Verteilung der Phänotypen erklären (Cheng et al., 2004; Eerdewegh et al., 2002).

**Tab. 5: Signifikante QTL's aus Total-Genom-Scans im Mausmodell**

Maus-Chromosom	cM / Marker	Homologe Genregion bei Homo sapiens	Kandidatengene	Mausstämme	Phänotyp (Stimulans) LOD-score	Autor, Jahr, Lit.
2	74 (BHR1)	2q14 20p13	IL-1 $\beta$ , Gnas, Acra ADAM33	A/J, C57BL/6	BHR (MCh)	(De-Sanctis et al., 1995)
2	0-10	10p15-pter	GATA3, IL-2R $\alpha$ , IL-15R $\alpha$	A/J, C3H	BHR (Ova, MCh, ACh)	(Ewart et al., 2000)
2	18-23	9q33-q34.1	C5, Prostaglandin E-Synthase	A/J, C3H	BHR (Ova, MCh, ACh)	(Ewart et al., 2000)
3	3,9	8q21	IL-7	A/J, C57BL/6	BHR (O <sub>3</sub> )	(Prows et al., 1997)
5	33	4p15-p16	?	A/J, C57BL/6	BHR (O <sub>3</sub> )	(Prows et al., 1999)
5	69	12q24	IFN $\gamma$	A/J, C57BL/6	BHR (O <sub>3</sub> )	(Prows et al., 1999)
6	40,2	3p14	IL5R $\alpha$	A/J, C57BL/6	BHR (O <sub>3</sub> )	(Prows et al., 1999)
6	50,5 (BHR5)	3q21-22	IL5R $\alpha$	A/J, C3H	BHR (MCh)	(De-Sanctis et al., 1999)
6	53	2p11-p13 3p26-p24 7q22-qter 12p11-p13	IL-5R	A/J, C3H	BHR (ACh)	(Ewart et al., 1996)
7	11,0	19q13	BCL3, CD22	A/J, C57BL/6	BHR (O <sub>3</sub> )	(Prows et al., 1997)
7	16 (BHR4)	19q12	Kallikrein	A/J, C3H	BHR (MCh)	(De-Sanctis et al., 1999)
7	42,6	11q13	IL-16	NOA/ DBA2	Atopische Dermatitis, (ges. IgE)	(Watanabe et al., 2001)
9	ca. 18	11q23	IL-10R	Balb/C, BP2	BHR (Ova)	(Zhang et al., 1999)
9	15,0 (Derm1)	11q22.2-23.3	Thy1, Cd3d, Cd3e, Cd3g, IL-10ra, IL-18, Csk,	NC/Nga	Atopische Dermatitis, (ges. IgE)	(Kohara et al., 2001)
10	ca. 44	12q22-q24	IFN $\gamma$	Balb/C, BP2	BHR (Ova)	(Zhang et al., 1999)
11	ca. 7	5q31	IL-4 Cytokingencluster	Balb/C, BP2	Eosinophilie (Ova)	(Zhang et al., 1999)
11	55,6-56 (Ali 1) ca. 52	17q21-22	Tbet MPO, iNOS2, Cytokingencluster, NGFR	A/J, C57BL/6 Balb/C, BP2	BHR (O <sub>3</sub> ) BHR (Ova)	(Prows et al., 1997) (Prows et al., 1997; Prows et al., 1999) (Zhang et al., 1999)
13	51 (Ali 2)	5q13	PIK3R1 (p85 regulatory subunit der PI3-Kinase)	NOA/ DBA2	Atopische Dermatitis, (ges. IgE)	(Watanabe et al., 2001)
14	25-42,5	8p21 13q12-14	TCR $\alpha$	NOA, C57BL/6, IQI, C3H, DBA/2, Balb/C	Atopische Dermatitis, (ges. IgE)	(Natori et al., 1999)
15	47,1 (BHR2)	22q13	IL-2rb, IL-3rb1, IL-3rb2, Pdgfb	A/J, C57BL/6	BHR (MCh)	(De-Sanctis et al., 1995)
17	ca. 10 (BHR3) 14	6p21	MHC, TNF $\alpha$ , Mcpt6 + 7	Balb/C, BP2 A/J, C57BL/6	BHR (Ova) BHR (MCh)	(Zhang et al., 1999) (De-Sanctis et al., 1995)
17	32,2	6p21 19p13	MHC, TNF $\alpha$ (bei ca. 25cM)	A/J, C57BL/6	BHR (O <sub>3</sub> )	(Prows et al., 1999)

## 2.5 Relevanz des Tiermodells

Genetische Analysen komplexer Merkmale sind sowohl in Inzucht- als auch in Auszuchtpopulationen möglich. In Auszuchtpopulationen ist die Untersuchung genetischer Ursachen allergischer Erkrankungen wegen nicht standardisierbarer Umweltfaktoren und der hohen genetischen Heterogenität weniger erfolgversprechend. Faktoren wie Pollenflug, Hausstaub und Infektionserreger, die Ernährung, durchlebte Infektionen, Impfungen und die individuelle Wohnumgebung sowie die Allergen- und Erregerbelastung in der Kindertagesstätte sind praktisch nicht zu vereinheitlichen. Studien im humanen System, die trotz hoher genetischer Varianz durchgeführt wurden, benötigen eine entsprechend höhere Zahl an Probanden. Die Suche nach genetischen Ursachen von Krankheiten kann bei der Wahl zu heterogener oder zu kleiner Versuchsgruppen zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen.

Da für genetische Untersuchungen der Fellfarbe mehrere Mausstämme bereits seit 80 Jahren über 20-50 Generationen ingezüchtet wurden, bieten sich diese Inzuchtmausstämme für die Untersuchung der genetischen Ursachen komplexer Erkrankungen an. Diese Inzuchttiere sind einfach zu erhalten, haben eine kurze Generationszeit ( 3-4 Monate/ Generation ) und eine große Nachkommenanzahl. Die Umweltbedingungen sind bei der Haltung dieser Tiere einfach zu standardisieren. Viele dieser Mausstämme wurden bereits in genetischen Untersuchungen genutzt. Daher sind bei vielen dieser Inzuchtmauslinien genetische Marker zur Unterscheidung der verschiedenen Inzuchtstämmen bekannt. Bei der Kreuzung zweier Mausstämme lässt sich mit Hilfe dieser Marker die Herkunft eines Genomabschnittes einem der Parentalmausstämme zuordnen. Diese Inzuchttiere boten sich daher für die geplante Untersuchung genetischer Ursachen allergischer Erkrankungen an (De-Sanctis et al., 2001).

In verschiedenen Tiermodellen wurden zu Krankheiten des Menschen gute Korrelate mit gleicher oder ähnlicher Symptomatik und überlappenden Diagnostikkriterien beschrieben. Asthma, bronchiale Hyperreaktivität, inflammatorische Infiltrate in Haut und Lunge, erhöhte Schleimproduktion, allergische Sofortreaktionen der Haut, spezifische IgE-Erhöhung, Gesamt-IgE-Erhöhung und viele Autoimmunkrankheiten wurden bereits in Mausmodellen untersucht (Herz et al., 1996b; De-Sanctis and Drazen, 1997; Drazen et al., 1999).

Um in einem Tiermodell genetische Untersuchungen in Form von Linkageanalysen machen zu können, ist ein Test notwendig, mit dem sich mindestens 2 Tierstämme möglichst klar voneinander unterscheiden lassen. Die Untersuchung der Nachkommen aus einer Kreuzung dieser beiden Tierstämme gibt Aufschluss über einen Einfluss bestimmter Abschnitte des Genoms auf diesen Phänotyp.

## **2.6 Die allergische Sensibilisierung und der Intrakutantest**

Bei der Immunisierung mit Proteinen können diese selbst schon eine Entzündungsreaktion verursachen. So reichen bei Verwendung von Ovalbumin bereits 20 bis 50 µg Protein in physiologischer Kochsalzlösung und mehrmals über 1-3 Wochen intraperitoneal injiziert aus, um eine gute T<sub>H</sub>2-Immunantwort zu erzeugen (Ergebnisse eigener Vorversuche). Bei anderen Proteinen ist dies häufig nicht der Fall, oder es sind sehr viel höhere Dosen notwendig. Ob diese Reaktion jedoch wirklich auf Ovalbumin zurückzuführen ist, ist umstritten, da in einigen Ovalbuminchargen, die vor Jahren für Versuche genommen wurden, Endotoxin nachgewiesen wurde (Epstein, 2004). Da andere Proteine, allein verabreicht, keine Allergie provozieren, ist zur Triggerung der allergischen Sensibilisierung die Verwendung eines Adjuvans notwendig. Aluminiumhydroxid induziert als Adjuvans eine starke T<sub>H</sub>2-Immunantwort, die sich in einem für eine solche Immunantwort typischen Zytokinmuster und hohen allergenspezifischen und Gesamt-IgE und -IgG<sub>1</sub> Titern widerspiegelt. Gleichzeitig bewirkt die Bindung des Allergens an Kristalle des Al(OH)<sub>3</sub> eine verzögerte und langsame Freisetzung des Proteins und somit einen längeren Kontakt des Immunsystems der untersuchten Tiere mit diesem Protein. Daher wird bei einer solchen Immunisierung mit einem Proteingemisch (Birkenpollenextrakt) und Adjuvans eine lokale Entzündung provoziert und die Immunreaktion gleichzeitig in T<sub>H</sub>2-Richtung gelenkt. Damit wird jedoch nie eine reine T<sub>H</sub>2-Reaktion erreicht und es ist daher sowohl mit einer Erhöhung von T<sub>H</sub>1-Zytokinen IL-2, IL-12, IFN-γ und von Immunglobulin IgG<sub>2a</sub> wie auch von den T<sub>H</sub>2-Zytokinen IL-4, IL-5, IL-13 und den Immunglobulinen IgG<sub>1</sub> und IgE zu rechnen.

## 2.7 Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll die Vererbung von Allergien näher untersucht werden. Dafür soll wie im folgenden geschildert vorgegangen werden:

1. Durch die Immunisierung mit einem Modellallergen soll eine, einer Allergie des Menschen ähnliche, Erkrankung im Mausmodell etabliert werden. Dabei soll die allergische Sofortreaktion mit einem Hauttest getestet und die Produktion von spezifischen Immunglobulinen als Maß für die Stärke der allergischen Reaktion gemessen werden. Es sollen möglichst 2 Inzuchtstämme gefunden werden, die sich maximal in der Reaktion auf das ausgesuchte Modellallergen mit den geplanten Untersuchungsmethoden unterscheiden.  
Diese 2 Tierstämme sollen miteinander verpaart und die Nachkommen auf ihre Reaktion auf das Modellallergen untersucht werden. Aus der Verteilung der Allergie bei den Nachkommen der F1, F2-intercross und den F2-backcross-Generationen auf jeweils einen Elternstamm soll die Vererbung im Mausmodell abgeschätzt werden.
2. Mit den Ergebnissen der Allergietests und Daten aus der Analyse genetischer Marker der untersuchten Tiere sollen Linkageanalysen durchgeführt werden. Dazu sollen die allergenspezifischen Immunglobulintiter als quantitativer Phänotyp herangezogen werden.
3. Die in den durchgeführten Linkageanalysen gefundenen Genombereiche im Mausgenom sollen mit den Ergebnissen von anderen Linkageanalysen im Mausgenom und mit Studien im humanen Genom, die in syntenen Bereichen Linkage gefunden haben, verglichen werden. Dabei sollen Schlussfolgerungen für weitere Untersuchungen gezogen und die Ergebnisse in den derzeitigen Wissensstand zur Genetik allergischer Erkrankungen eingeordnet werden. Letztlich soll auch über mögliche Fehlerquellen nachgedacht und die Ursache für die vielfältigen Ergebnisse von Linkageanalysen mit atopischen Phänotypen gefunden werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Tiermodell der allergischen Sofortreaktion der Haut

#### verwendete Tiere:

weibliche Mäuse, A/J und C57BL/6, 6-8 Wochen alt	Harlan & Winkelmann, Deutschland
weibliche und männliche Mäuse [B6xA/J]F1	Jackson Labs, USA
eigene Nachzucht von (A/JxB6)F1 und ((B6xA/J)xB6)N2 sowie ((B6xA/J)xA)N2 backcross-Tieren	

Die Tiere wurden in der tierexperimentellen Einrichtung des Rudolf-Virchow-Klinikums in Räumen der Sicherheitsstufe S1 gehalten und gezüchtet. Wegen der in der Tierhaltung verwendeten Luftfilter ist das Risiko einer Beeinflussung der Versuche durch jahreszeitlich bedingten Pollenflug gering gehalten worden. In den Tierhaltungsräumen wurde das ganze Jahr über der gleiche Tag/ Nacht – Rhythmus simuliert und die Temperatur und Luftfeuchtigkeit konstant bei 21°C bzw. 65% Sättigung gehalten. Für die Immunisierungen einer Experimenterserie wurde Birkenpollen einer Charge benutzt. Die Tiere erhielten im Versuchszeitraum das gleiche Futter, waren alle im gleichen Raum untergebracht und waren bei Versuchsbeginn zwischen 6-10 Wochen alt. Alle Immunisierungen wurden von denselben Untersuchern mit einer Birkenpollencharge durchgeführt.

#### 3.1.1 Immunisierung

##### Material:

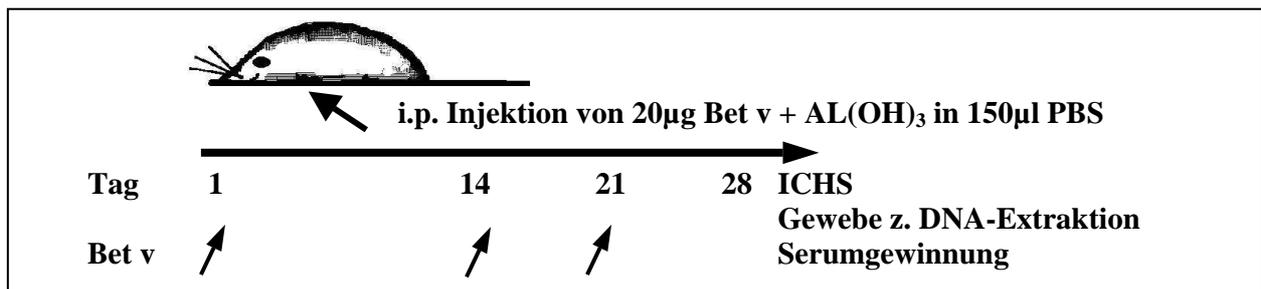
Birkenpollenextrakt	ALK-Abello, Hørsholm, Dänemark
Aluminiumhydroxid	Pierce, IL, USA
PBS-Dulbecco (steril)	Seromed/Biochrom, Deutschland
Kanülen (0,4x20 mm)	Terumo, Belgien
1ml Spritzen	Becton Dickinson, Deutschland
0,2 µm Sterilfilter	Pierce, IL, USA
Dreiwegehahn	Becton Dickinson, Deutschland

##### Allergenaufbereitung:

Das lyophilisierte Birkenpollenextrakt aus Pollen der Hängebirke (*Betula verrucosa*) wurde in phosphatgepufferter NaCl-Lösung gelöst, durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C bis zur Verwendung eingefroren. Der Gehalt an Majorallergen Bet-v I der von uns verwendeten Charge war 12,3 µg/ml bei 100.000 SQ/ml. Für den intracutanen Hyperreaktivitätstest und die allergenspezifischen ELISA's wurde rekombinanter Birkenpollen verwendet, der genauso wie das Birkenpollenextrakt gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert wurde.

Immunisierungsprotokoll:

Die Mäuse erhielten an den Tagen 1, 14 und 21 je eine intraperitoneale Bet v- Injektion (**Abb.7**). Je Maus wurden 20 mg Bet v, absorbiert an  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (1,5 mg/ml), gelöst in 150  $\mu\text{l}$  PBS, injiziert. Jeweils 2 Tiere der Parentalstämme A/J und C57BL/6 wurden als Kontrollen pro Versuchsgruppe (20-40 Tiere) mitimmunisiert. Vor der Immunisierung wurde das Birkenpollenextrakt mit Hilfe von zwei, über einen 3-Wegehahn verbundenen Spritzen 15 min lang mit  $\text{Al}(\text{OH})_3$  gemischt.



**Abb. 7: Immunisierung und Versuchsprotokoll**

### 3.1.2 Serumgewinnung

Material:

1ml Spritzen  
Kanülen (0,4x20 mm)

Becton Dickinson, Deutschland  
Terumo, Belgien

Für die Messung der Immunglobulintiter wurde den Tieren unmittelbar nach Tötung durch cervikale Dislokation und Präparation des Bauchfelles etwa 0,3 bis 0,5 ml Blut durch intrakardiale Punktion entnommen. Nach Gerinnung bei RT und Zentrifugation des Vollblutes (10 min bei 1200 g) wurde das Serum abgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Immunglobulinmessung eingefroren.

### 3.1.3 Intracutaner Hypersensibilitätstest (ICHS-Test)

Material:

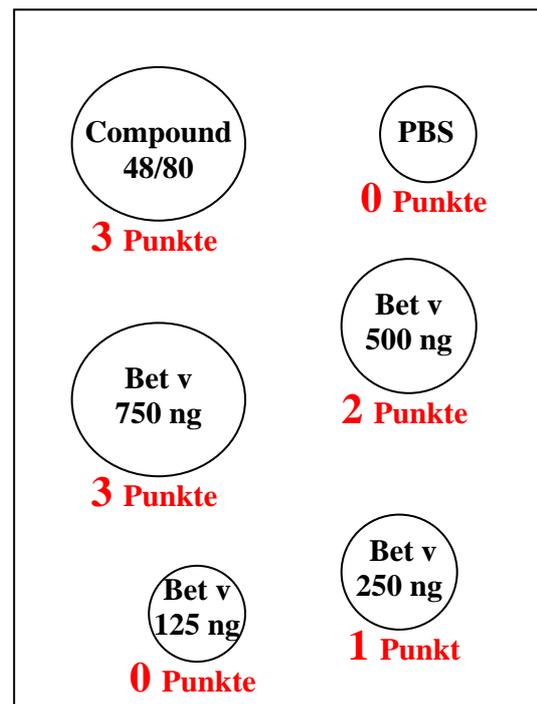
Evans blue 0,5% (No. E2129)  
1ml Spritzen  
Kanülen, 24G (0,4 mm Ø, 20 mm)  
Compound 48/80 (N-methyl-p-metoxi-phenethylamin)  
Rotlichtlampe 100W  
Rasierer für Kleintiere

Sigma-Aldrich, Deutschland  
Becton Dickinson, Deutschland  
Terumo, Belgien  
Sigma-Aldrich, Deutschland  
Philips, Deutschland  
Philips, Deutschland

Allergenlösungen mit rekombinantem Bet v:  
PBS-Dulbecco (steril)  
Bet v 1, rekombinantes Birkenpollenhauptallergen

Seromed/Biochrom, Deutschland  
Biomay, Österreich

Zur Testung der IgE-vermittelten Hypersensitivitätsreaktion Typ 1 nach Coombs und Gell wurde das Bauchfell der Tiere rasiert um intracutane Injektionen sicher setzen zu können. Die Tiere erhielten jeweils 100 µl einer 0,5%-igen Evans blue Lösung i.v. in eine Schwanzvene. Zur Erleichterung der Injektion wurden die Hautvenen durch Erwärmung der Tiere unter einer 100 W Rotlichtlampe für 5-10 min. im Abstand von 40 cm dilatiert. Dann wurden mit 24G Kanülen je 6 intracutane Quaddeln zu je 50 µl in einem ausreichenden Abstand voneinander in die Bauchhaut gesetzt. Es wurde eine Positivkontrolle mit dem Mastzelldegranulator Compound 48/80 (1µg/ml) sowie eine Negativkontrolle mit PBS zur Kontrolle einer erfolgreichen Farbstoffinjektion und der Injektionstechnik gesetzt. Die übrigen 4 Quaddeln enthielten unterschiedliche Konzentrationen des rekombinanten Birkenpollenhauptallergens Bet v I, gelöst in PBS. 15 Minuten nach Setzen der Quaddeln wurden die Tiere durch cervikale Dislokation getötet, die Bauchhaut präpariert, auf Styropor aufgespannt und in den nächsten 15 Minuten von 3 Begutachtern bewertet (**Abb. 8**).



**Abb. 8:** Dermis einer Maus zum Zeitpunkt des Ablesens des ICHS, aufgespannt und von der Subkutanseite betrachtet. Das Injektionsschema und die **Bewertungen**, die für diese Quaddeln vergeben wurden, sind in dem Schema rechts zu finden. Die Bewertung erfolgte direkt nach der Präparation und Fixation auf der Unterlage. Auf Fotos war die Bewertung leider nicht immer nachvollziehbar. Die Blaufärbung hob sich manchmal nur recht schwach vom dunklen Hintergrund ab (bei dunklem Fell schlechter zu beurteilen, da der dreidimensionale Eindruck fehlt). Die Blauverfärbung ist bei diesem Tier auf dem Foto wegen der hellen Fellfarbe jedoch gut nachvollziehbar.

In Vorversuchen haben wir die Konzentrationen der Hauttestlösungen so titriert, dass wir bei 2 Mausstämmen high und low responder definieren konnten. Die Vorversuche haben auch gezeigt, dass bei Verwendung höherer Birkenpollenkonzentrationen für die Intrakutaninjektionen auch bei den von uns gefundenen low responder Tieren stärkere Reaktionen zu beobachten sind (Daser et al., 1998a).

#### **3.1.4.1 ICHS-Bewertung**

Bewertet wurde die Fläche des blau gefärbten Hautareals. Die Positivkontrollen mit dem Mastzelldegranulator Compound 48/80 erhielten bei der Bewertung immer den Wert 3, die Negativkontrollen (PBS-Injektionen) immer den Wert 0. Falls die Positivkontrolle nicht ausreichend reagiert hat, d.h. sich nicht eine kräftige Blaufärbung zeigte oder die Negativkontrolle nicht sicher negativ war, weil sie z.B. auch eine leichte Blaufärbung zeigte, wurde das entsprechende Tier aus der Wertung genommen. Die Quaddeln mit Birkenpollentestlösung wurden mit diesen beiden Kontrollen verglichen und wie folgt bewertet: Quaddeln, die gleich groß aussahen, wie die Positivkontrolle, erhielten wie diese 3 Punkte. Quaddeln, die wie die Negativkontrolle ohne Blauverfärbung waren, erhielten wie diese auch 0 Punkte. Quaddeln, die kleiner, als die Positivkontrolle waren, erhielten 2 Punkte. Quaddeln, die deutlich kleiner als die Positivkontrolle waren und sich gleichzeitig von der Negativkontrolle unterschieden, erhielten 1 Punkt. Die Bewertungen der Quaddeln, die durch Allergenprovokation mit steigender Allergenkonzentration entstanden sind, wurden addiert. Bei 4 Allergentestquaddeln erhielten wir so Werte zwischen 0 und 12 Punkten. Die so erhaltenen Bewertungen stellen eine gut quantifizierte Aussage über die allergische Sofortreaktion der untersuchten Tiere dar (Daser et al., 1998a).

#### **3.1.4.2 Boniturmethode**

In Vorversuchen hat sich gezeigt, dass der Hauttest weder durch Messung der Größe oder Dicke der Quaddeln noch durch Fotografie und spätere Auswertung aller Fotos objektiv skalierbar und auswertbar ist. Daher haben wir die Boniturmethode zur Auswertung herangezogen. Dabei wurden die Hautteste wie beschrieben parallel immer von denselben 3 in der Auswertung geübten Untersuchern bewertet. Die Bewertung jedes einzelnen Untersuchers ist dabei als subjektiv zu betrachten. Durch die unabhängige Begutachtung mehrerer Untersucher und die anschließende statistische Kontrolle wurde die Bewertung der Hautteste objektiv quantifizierbar. Die Bewertungen der 3 Untersucher wurden dazu gemittelt. Zur

Kontrolle der Gültigkeit der Bewertungen wurde der Kendall-Konkordanzkoeffizient (Kendall-W) berechnet (Lienert, 1967).

### 3.2 Immunglobulinmessung mittels ELISA (Enzym Linked Immuno Sorbent Assay)

#### Material:

96-well Rundbodenplatten	Nunc, Deutschland
Coating-Puffer: (100 mM Natriumbikarbonat NaHCO <sub>3</sub> ; pH 8,2)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Waschpuffer: PBS (100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,4; 0,05 % Tween 20)	
Dinatriumphosphat Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tween 20, Polyoxyethylensorbitanmonolaureat	Sigma-Aldrich, Deutschland
Blocking-Puffer und Verdünnungspuffer: PBS (10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,4; 3 % BSA)	
Bovine Serum Albumin, BSA	Sigma-Aldrich, Deutschland
Gallatti-Puffer:	
Zitronensäure-Monohydrat 200mM	Merck, Deutschland
4 M Kaliumhydroxidlösung KOH	Merck, Deutschland
0,1% Wasserstoffperoxyd H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Deutschland
TMB, 3,3',5',5' Tetramethylbenzidin (100mM)	Fluka, Deutschland
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma-Aldrich, Deutschland
Streptavidinperoxidase	Calbiochem, Deutschland
Schwefelsäure, 2 M	Merck, Deutschland
Primäre Antikörper/ Antigen:	
Anti-Maus IgG <sub>1</sub> , monoklonal, #02001D	Pharmingen (BD), Deutschland
Anti-Maus IgG2a, monoklonal, #02011D	Pharmingen (BD), Deutschland
Schaf-anti-Maus IgE, polyklonal #5118-6504	Binding Site, England
Bet v 1, rekombinantes Birkenpollenhauptallergen	ALK-Abello, Hørsholm, Dänemark
Sekundäre Antikörper:	
Biotin-anti-Maus IgG <sub>1</sub> , monoklonal, #02002D	Pharmingen (BD), Deutschland
Biotin-anti-Maus IgG2a, monoklonal, #02012 D	Pharmingen (BD), Deutschland
Biotin-anti-Maus IgE, monoklonal, 02132 D	Pharmingen (BD), Deutschland
Standards:	
Purified Maus-IgG <sub>1</sub> , #03001D	Pharmingen (BD), Deutschland
Purified Maus-IgG2a, #03021D	Pharmingen (BD), Deutschland
Purified Maus-IgE, #03121D	Pharmingen (BD), Deutschland

ELISA-Reader DYNAX 9000, zugehörige Auswertesoftware

#### Durchführung:

Die 96-well Mikrotiterplatten wurden mit dem primären Antikörper gegen IgE oder mit rekombinantem Birkenpollen, gelöst in Coating-Puffer (100µl/well, 4°C ü.N.), inkubiert und nach zweimaligem Waschen zur Prävention unspezifischer Bindungen 2h bei RT mit Blocking-Puffer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Proben und die Standardverdünnungsreihe in Doppelbestimmungen, verdünnt in Blocking-Puffer, aufgetragen (100µl/well, Inkubation für 2h auf dem Schüttler bei RT). Nicht gebundene Probenreste wurden durch dreimaliges Waschen eliminiert und der biotinylierte, sekundäre

Antikörper aufgetragen (verdünnt in Blocking-Puffer, 2,5µg/ml, 100µl/well, Inkubation 2h auf einem Schüttler bei RT). Nach achtmaligem Waschen der Platten wurde zur spezifischen Markierung der gebundenen biotinylierten Antikörper der Enzymkomplex Streptavidin-Peroxidase aufgetragen (1µg/ml, 100µl/well, Inkubation ruhend ½h im Dunkeln bei RT). Nach 6-fachem Waschen wurde das Substrat 3,5',5,5'-Tetramethylbenzathidin (verdünnt in Gallati-Puffer, 100 mM, 150µl/well) zugegeben und die Platten im Dunkeln ruhen gelassen. Die Oxydationsreaktion wurde nach deutlich sichtbarer Blauverfärbung der Standardreihe (ca. 15-30 Minuten) durch Zugabe von 50µl 2M Schwefelsäure gestoppt. Nach dem Farbumschlag von blau nach gelb wurde die Extinktion (Testfilter 450nm, Referenzfilter 490nm) des von der Peroxydase umgesetzten Substrates gemessen und mit Hilfe der Standardverdünnungsreihe die Konzentration der Immunglobuline in den Proben berechnet.

Für die Bet v-spezifischen IgE, IgG1 und IgG2a ELISA wurde ein Standardserum aus immunisierten A/J-Mäusen generiert. Die Tiere wurden nach dem Immunisierungsschema mit 50 µg Bet v pro Tier und pro Injektion immunisiert. Zur Serumgewinnung wurde den Tieren mehrmals im Abstand von einer Woche Blut aus einer Schwanzvene abgenommen. Das Blut wurde bis zur vollständigen Gerinnung bei RT gelagert, zentrifugiert, Serum abgenommen und eingefroren. Für die Herstellung der Standardseren wurden so gewonnene Seren von stark immunisierten Tieren miteinander vermischt und aliquotiert bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Die Konzentration des zuerst generierten unverdünnten Standardserums wurde auf 2000 LU/ml festgelegt. Weitere Standardserumchargen wurden mit dem zuerst generierten Standardserum abgeglichen und entsprechend verdünnt. Alle Seren wurden im ELISA mindestens 1:2 oder höher verdünnt eingesetzt.

### **3.3 DNA-Präparation, Markerselektion und PCR**

#### **3.3.1 Präparation der DNA**

Die Präparation der DNA aus den Gewebeproben, die Auswahl der Marker sowie die PCR und deren Auswertung wurden in unserem Labor durchgeführt. Diese Daten sind in der Promotionsarbeit von K. Kötz veröffentlicht (Koetz, 2002). Die verwendeten Methoden werden deshalb hier nur kurz erläutert. Die Präparation der genomischen DNA erfolgte mit Hilfe des QIAamp Tissue Kit aus nativem Lebergewebe (QIAGEN, Hilden, Deutschland). Die Konzentration und Reinheit der extrahierten DNA wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 gegen 280 nm Wellenlänge mit einem Spektralphotometer (Spectrophotometer DU 640, Beckmann, USA) kontrolliert.

### 3.3.2. PCR, Markerselektion, PCR-Produktanalyse

Geräte:

Tetrad Cycler

MJ Research, Watertown, MA, USA

ABI 377XL DNA-Sequenzier

PE Biosystems, Weiterstadt, Deutschland

Die backcross-Tiere wurden auf die Allelität von 160 Mikrosatellitenmarkern und damit auf die Vererbung der Genabschnitte von einem Elternteil um diese Marker, untersucht. Die Markerdichte variiert zwischen 5 und 25 cM und lag im Mittel bei 10,4 cM. Die Marker ließen eine Differenzierung zwischen den untersuchten Inzuchtmausstämmen A/J und C57Bl/6 zu. Der reverse Primer jedes Markerpaares war mit einer Fluoreszenzfarbe am 5'-Ende markiert. Auf Chromosom 6 wurden wegen der dort für bronchiale Hyperreaktivität gefundenen QTL (Prows et al., 1999; Ewart et al., 1996; De-Sanctis et al., 1999) zusätzliche Marker untersucht. Die verwendeten Marker sind in Daser (Daser et al., 2000) publiziert.

Die PCR's wurden mit einem Tetrad Cycler durchgeführt (Denaturationszeit 20 sec, Primer-Anlagerung 20 sec, je nach Primer unterschiedliche Temperatur, Extension 20 sec). Die Proben wurden auf einem ABI 377XL DNA-Sequenzier mit der Software Genescan, Version 3.0 und Genotyper, Version 2.0 der Firma PE Biosystems durchgeführt.

Der größte Teil der DNA-Proben wurde mit einem Pipetierautomaten verarbeitet und analysiert. Für 23 Marker wurden die PCR-Ansätze jedoch von K. Koetz und H. Schulz pipettiert und analysiert. Die bei PCR-Analysen methodisch bedingte Ungenauigkeit zwischen den zwei verwendeten Messmethoden betrug 2,3 Prozent bei Analyse der gleichen Marker mit der automatisierten als auch mit der „per Hand“-Methode. Diese Fehlerquote liegt im erwarteten Bereich (bis zu 3%) und ist auf Ungenauigkeiten bei der Längenbestimmung der Amplifikate, Ablesefehler oder eventuell auch auf Pipetierfehler bei der „per Hand“-Methode zurückzuführen. Für die statistische Auswertung mit Hilfe von Linkageanalysen ist jedoch ein Fehler bis zu 5 % akzeptabel, ohne die Berechnung von Linkage maßgeblich zu beeinflussen (Manly et al., 2001b).

### 3.4 Statistische Auswertung und Linkageanalyse

Für die Auswertung und die graphische Darstellung sowie für die statistische Verarbeitung der Daten wurden das Microsoft-2000-Programmpaket, insbesondere EXCEL 2000, sowie Graph Pad Prism 3.1 und SPSS 10.07 benutzt. Für die Linkageanalysen wurde das Programmpaket Map Manager QTX in der Version b12 ([www.linkage.rockefeller.edu/soft/list.html](http://www.linkage.rockefeller.edu/soft/list.html) oder [mapmgr.roswellpark.org/mmQTX.html](http://mapmgr.roswellpark.org/mmQTX.html)) (Lander and Botstein, 1989; Lander et al., 1987; Lander and Schork, 1994; Manly et al., 2001a) verwendet.

Von den 160 Markern wurden 5 Marker in der Berechnung der Linkageanalysen nicht berücksichtigt, da diese 5 Marker zu nah an benachbarten Markern lagen. Wegen der Nähe der Marker zueinander hat kein crossing over zwischen diesen Markern stattgefunden und diese Marker sind daher nicht informativ. Nur rekombinierte Marker sind interessant für Linkageanalysen. Zu nah beieinanderliegende Marker können einen größeren Abstand zueinander vortäuschen. Da dies je nach verwendeter Mapping-Funktion zu mehr oder weniger starken Fehlern führt, wurden nicht informative Marker ausgeschlossen (Manly et al., 2001b).

Bei den Linkageanalysen wurde die Kosambi-Mapping-Funktion verwendet, da diese Interferenz zwischen zwei crossing over Ereignissen berücksichtigt, d.h. auch die Möglichkeit unterstützt, dass zwei crossing over gleichzeitig auf einem Gen bei einer Meiose stattfinden oder kein solches Ereignis auf einem Chromosom stattfindet (Manly et al., 2001b).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Immunisierung und intrakutaner Hypersensibilitätstest

Um die Varianz der Umweltfaktoren und die genetische Variabilität möglichst gering zu halten, wurde das Modell der birkenpollenallergisierten Maus gewählt. Als Test für die allergische Sofortreaktion (Typ I nach Coombs und Gell) wurde ein intrakutaner Hypersensibilitätstest etabliert.

In Vorexperimenten wurden die Mausstämme A/J, AKR, DBA/2, C57BL/6 und Balb/C auf die Hypersensibilitätsreaktion nach Immunisierung mit unterschiedlichen Allergenen getestet. Zur Immunisierung wurden verschiedene Konzentrationen von Hühnereiweiß (Ova), Hausstaubmilbenextrakt (Der p) oder Birkenpollenextrakt (Bet v) verwendet. Die Allergene wurden durch Mischung der Allergenlösungen mit Aluminiumhydroxydlösung an  $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Moleküle absorbiert und mehrfach nach dem erwähnten Immunisierungsschema intraperitoneal injiziert. Die Allergie der Tiere wurde nach 28 Tagen mit dem Hauttest getestet. Auch für diesen Test wurde die Konzentrationen der Allergeninjektionslösungen variiert und so angepasst, dass sich ein maximaler Unterschied in der Reaktion auf eines der verwendeten Allergene bei zwei Mausstämmen zeigte. Die Mausstämme A/J und C57BL/6 reagierten bei Verwendung von 20  $\mu\text{g}$  Birkenpollenextrakt pro Immunisierung als high und low responder und zeigten somit einen maximalen Unterschied (**Abb. 9**). Daher haben wir für weitere Untersuchungen zur genetischen Disposition der Birkenpollenallergie diese beiden Tierstämme gekreuzt und die Nachkommen der F1, F2, F2-intercross und der F2-backcross-Generationen auf die Parentalstämme untersucht.

Insgesamt wurden im Hauttest 39 A/J, 32 C57BL/6, 27 Nachkommen der F1-Generation (AxB)F1, 18 Nachkommen der F2-intercross-Generation (AB6F1 x AB6F1)F2, 58 Nachkommen der F2-backcross-Generation (B6AF1 x A)N2 sowie 156 Nachkommen der F2-backcross-Generation (B6AF1 x B)N2 untersucht. Für die Messung der Immunglobulintiter standen Seren der Parentalstämme A/J und C57BL/6, 22 Seren der F1-Generation (AxB)F1, 18 Seren der F2-Generation (AB6F1xAB6F1)F2, 58 Seren der F2-backcross-Generation auf den low responder Stamm A/J (B6AF1xA)N2 sowie 56 Seren der backcross-Generation auf den high responder Stamm C57BL/6 (B6AF1xB)N2 zur Verfügung. Da nur die im ICHS extremen Tiere genotypisiert wurden, standen für die Linkageanalyse mit den Immunglobulintitern nur 35 Tiere zur Verfügung.

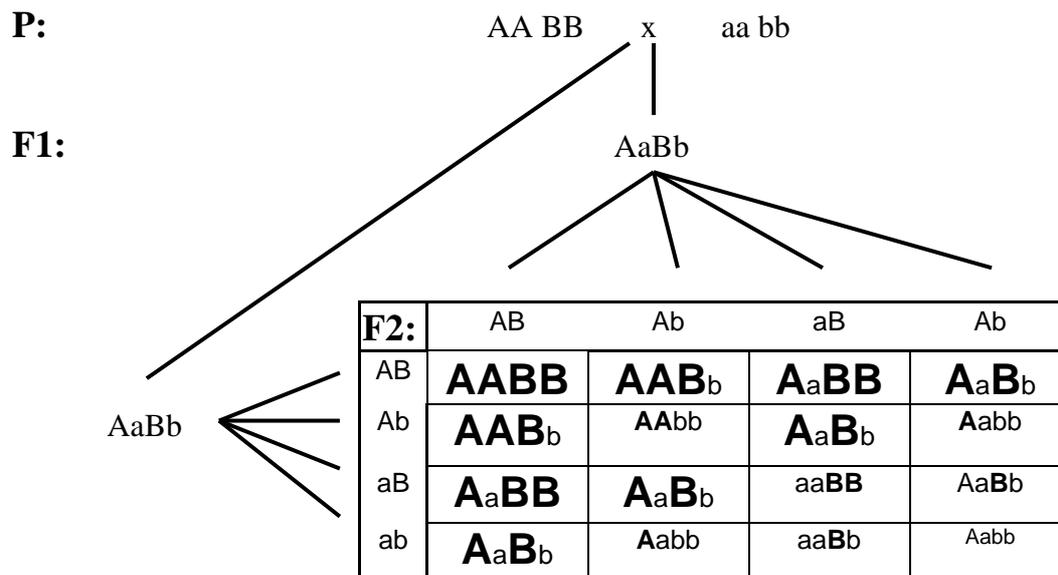


In der F1-Generation zeigten nahezu alle Tiere eine high response. Da diese Generation durch einfache Kreuzung zweier für alle Chromosomen homozygoter (da ingezüchteter) Eltern entstanden ist, sollten diese Tiere für alle Gene heterozygot sein und nach dem ersten Mendelschen Gesetz „uniform“ reagieren. Die Reaktion dieser einheitlich heterozygoten Tiere ist als high response zu werten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der definierte Phänotyp einem dominanten Erbgang unterliegt. Da bei Allergien, Atopie und Asthma von einem polygenen Erbgang ausgegangen werden muss, ist für diesen Phänotyp ein durch mehr als ein dominantes Allel geprägter Erbgang anzunehmen, am ehesten ein codominanter.

Aus der Varianz des Phänotyps innerhalb der F1-Generation kann auf inkomplette Penetranz des Phänotyps oder auf die Unsicherheit der Bestimmung des Phänotyps geschlossen werden. Unter den genetisch uniformen, heterozygoten Tieren fanden sich sowohl high responder (22 Tiere = 81% mit  $\geq 9$  ICHS-Punkten), low responder (3 Tiere = 11% mit 0 Punkten) sowie intermediate responder (2 Tiere = 7% mit 5 und 6 Punkten). Dies lässt die Annahme zu, dass der Einfluss anderer Faktoren auf den untersuchten Phänotyp trotz konstanter Umweltbedingungen groß ist und gleichzeitig eine große Varianz des Phänotyps besteht.

In der F2-Generation zeigte sich wie erwartet eine breitere Auffächerung des Phänotyps über das gesamte Spektrum der möglichen Punktzahlen. Wegen der starken Varianz des Phänotyps und der vorhandenen inkompletten Penetranz ist eine exakte Beurteilung der Aufteilung der Nachkommen der F2-Generation mit dieser noch geringen Tierzahl leider nicht möglich. Nach dem zweiten Mendelschen Gesetz teilt sich bei einem monogenen Erbgang in der F2-Generation der Genotyp im Verhältnis **1:2:1** auf. Der Phänotyp teilt sich bei einem monogenen, dominanten Erbgang **3:1**, bei einem monogenen, rezessiven Erbgang **1:3** auf. Bei einem polygenen codominanten Erbgang teilt sich der Genotyp **1:1:2:2:4:2:2:1:1** und der Phänotyp entsprechend **9:3:3:1** auf (**Abb. 10**).

Ein solches Verteilungsmuster 9:3:3:1 lässt sich nicht finden. Es kann daher von einem polygenen Erbgang mit mehr als zwei dominanten Allelen ausgegangen werden. Andererseits kann eine solche gleichmäßige Verteilung der Phänotypen in der F2-Generation auch durch einen additiven Effekt der beiden dominanten Allele vorgetäuscht werden. Ein additiver Effekt würde bewirken, dass der Phänotyp nur dann voll ausgeprägt ist, wenn beide dominanten Allele gleichzeitig vererbt wurden. Wurde nur eines der beiden dominanten Allele vererbt, so wird nur eine intermediate response erreicht.



**Abb. 10: Segregation des Genotyps bei einem codominanten Erbgang 1:1:2:2:4:2:2:1:1 und des Phänotyps 9:3:3:1**

In den backcross-Generationen zeigt sich wie schon in der F2-intercross-Generation eine breite Aufteilung des Phänotyps über das ganze Spektrum. Die backcross-Tiere, die durch Kreuzung der F1-Generation (AxB) auf den high response Stamm A/J entstanden sind, zeigen jedoch eine stärkere Reaktion als die Tiere, die auf den low response Stamm C57BL/6 zurückgekreuzt wurden. Dies spricht wieder für einen durch 2 oder mehr Gene verursachten dominanten Erbgang.

## 4.2 Die Immunglobulintiter

Da die Parentaltierstämme für die Genanalyse nicht nach der Höhe der Immunglobulintiter sondern nach ihrer Reaktion im Hauttest ausgesucht wurden, sind die Unterschiede zwischen den Parentalstämmen in der Höhe der Immunglobulintiter nicht so groß, wie erhofft. Trotzdem lassen sich Unterschiede zwischen den untersuchten Tierstämmen finden. Auch die Immunglobulintiter zeigen, dass die A/J-Tiere high responder sind. Die Titer waren für alle untersuchten Immunglobuline bei diesen Tieren am höchsten. Bei der Untersuchung auf andere immunologische Phänotypen fallen A/J-Tiere regelmäßig als high responder auf und entwickeln die stärksten T<sub>H</sub>2-Reaktionen. Dies zeigt sich unter anderem in einer erhöhten Atemwegsreaktivität bei Stimulation mit Ozon oder Acetylcholin, in vermehrten inflammatorischen Infiltraten in Lungenschnitten bei Anwendung der gleichen Stimulanzien und in der Höhe der Immunglobulintiter bei Immunisierung mit verschiedenen Allergenen (De-Sanctis et al., 1999; Ewart et al., 1996; De-Sanctis et al., 1995; Prows et al., 1997; Prows et al., 1999). Diese Hyperreaktivität konnten wir im Hauttest und in der Produktion spezifischer Immunglobuline wiederfinden. Neben den A/J-Tieren finden sich weitere Mausstämme, die eher hyperreaktiv reagieren. So zeigen Balb/C, AKR, und DBA/2 ebenfalls stärkere T<sub>H</sub>2-Antworten. Dagegen sind die Mausstämme C3H, C57BL/6 und SJL eher T<sub>H</sub>2-low responder und reagieren mit einer stärkeren T<sub>H</sub>1-Reaktion (Nicolaidis et al., 1997; Levitt and Mitzner, 1988). Diese Unterschiede in der Stärke und Richtung von inflammatorischen Reaktionen könnten auf generelle Unterschiede zwischen den Mausstämmen in der Prozessierung von Fremdprotein in antigenpräsentierenden Zellen, in der Präsentation der Antigene, in einer unterschiedliche Rezeptordichte von signalübertragenden Moleküle auf T- und B-Zellen, in einer unterschiedlichen Anzahl dieser Zellen und in einer unterschiedlichen Zahl und Reaktivität regulatorischer T-Zellen begründet sein.

**Tab. 6: Ergebnisse unserer Immunglobulinmessungen - Mittelwerte und Standardabweichungen aller Immunglobulintiter nach Immunisierung (MW ± Stdabw.)**

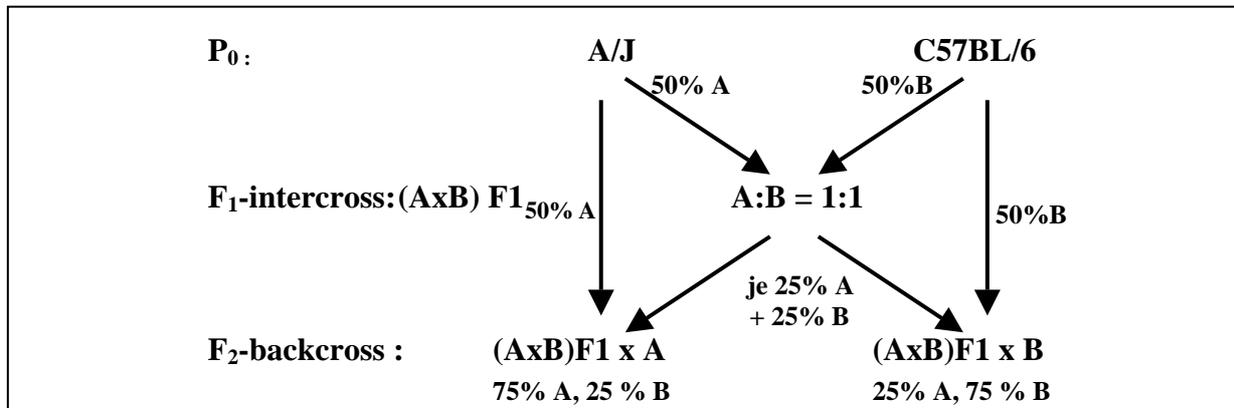
	<b>A</b> n=5	<b>B</b> n=5	<b>(AxB)F1</b> n=22	<b>(AxB)F2</b> n=18	<b>(AxB)F1xA</b> n=58	<b>(AxB)F1xB</b> n=56
<b>ges. IgE [ng/ml]</b>	<b>16150 ± 4724</b>	<b>9971 ± 3433</b>	<b>9841 ± 3553</b>	<b>8180 ± 4443</b>	<b>14571 ± 4897</b>	<b>6712 ± 6590</b>
<b>Bet v -IgG<sub>1</sub> [LU/ml]</b>	<b>5538 ± 1778</b>	<b>566 ± 182</b>	<b>4382 ± 3294</b>	<b>2447 ± 2974</b>	<b>3760 ± 2155</b>	<b>2261 ± 2452</b>
<b>Bet v -IgG<sub>2a</sub> [LU/ml]</b>	<b>13427 ± 3824</b>	<b>7125 ± 1540</b>	<b>4469 ± 6579</b>	<b>2599 ± 5968</b>	<b>2414 ± 2714</b>	<b>1402 ± 1864</b>
<b>Bet v -IgE [LU/ml]</b>	<b>13950 ± 1069</b>	<b>6690 ± 942</b>	<b>2963 ± 1554</b>	<b>1594 ± 1206</b>	<b>5021 ± 3227</b>	<b>8032 ± 8366</b>

### 4.2.1 Gesamt-IgE

Die Unterschiede im Hauttest der Parentalstämme lassen sich genauso wie oben beschrieben auch an der Höhe der Gesamt-IgE Titer nachvollziehen. Auf Grund der geringen Tierzahlen der Parentalstämme und großer Standardabweichungen überschneiden sich bereits die 25% und 75% Quantile dieser Tiergruppen (**Abb. 12A**). Die Aufteilung der Gesamt-IgE Immunglobulintiter in der F1, F2-intercross und F2-backcross-Generation entspricht nicht dem Muster, wie es von uns im Hauttest beobachtet wurde. Die für alle Allele heterozygote F1-Generation reagierte nicht als high responder, sondern als low responder. Somit folgt die Vererbung der Gesamt-IgE-Spiegel nicht einem dominanten sondern eher einem rezessiven Erbgang. Die F2-Generation müsste sich bei der Annahme eines monogenen rezessiven Erbganges nach den oben beschriebenen Regeln in Gruppen aufspalten. Diese Aufspaltung konnten wir nicht finden. Der Mittelwert der Gesamt-IgE-Titer der F2-Generation lag überraschenderweise sogar niedriger als der Mittelwert der Gesamt-IgE-Titer der F1-Generation. Dies spricht für einen additiven Einfluss mehrerer Gene auf die Höhe der Gesamt-IgE-Titer. Die IgE-Produktion stellt das Ergebnis von Zell-Zell-Interaktionen, intrazellulärer Signaltransduktion, Produktion von Interleukinen und Chemokinen dar und ist die Endstrecke der  $T_H2$ -Immunantwort. Daher ist eine Beeinflussung durch viele regulatorische Proteine und Gene anzunehmen. Der Erbgang der Gesamt-IgE-Spiegel kann nur durch die Überlagerung zahlreicher dominanter und rezessiver Gene erklärt werden.

Die backcross-Generation auf den high responder Parentalstamm zeigte eine high response. Dies bestätigt die Annahme, dass das untersuchte Merkmal dominant vererbt wird. Der Mittelwert der IgE-Titer erreicht bereits bei Anwesenheit von nur 75% der high responder Gene das high responder Niveau. Die F<sub>2</sub>-backcross-Tiere auf den low responder Parentalstamm zeigten entsprechend niedrigere Gesamt-IgE-Titer. Obwohl diese Tiere noch 25% der Gene des high responder Parentalstammes haben, liegt der Mittelwert sogar unter dem Mittelwert des low responder Parentalstammes. Anders gesehen spricht dies für einen starken additiven Einfluss von 2 oder mehr Allelen auf den untersuchten allergischen Phänotyp. Bei Diskriminierung der backcross-Generationen mit einem Wert von 11000 ng IgE/ml liegen 81% der backcross-Tiere auf den high responder Parentalstamm (11 von 58) über und nur 21% der backcross-Tiere auf den low responder Parentalstamm (12 von 57) über dieser Marke. Diese Verteilung lässt sich sehr gut mit dem Anteil der elterlichen Gene in diesen beiden Tiergruppen erklären. Demnach sollten 75% der backcross-Tiere auf den high

responder Stamm (mit 75% high responder Allelen) und nur 25% der backcross-Tiere auf den low responder Stamm (mit 25% high responder Allelen) high responder sein (**Abb. 11**).



**Abb. 11: Verteilung des Genpools der Parentalstämme auf die Nachkommen in der F<sub>1</sub>- und F<sub>2</sub>-Generation**

Insgesamt lässt die Analyse der Gesamt-IgE-Titer aller Tiergruppen auf einen dominanten, polygenen Erbgang mit mehr als 2 Genen schließen. Dabei liegt ein starker additiver Effekt mehrerer dominanter Gene vor. Ein monogener Erbgang kann mit den vorliegenden Daten genauso wie ein rezessiver Erbgang ausgeschlossen werden.

**Abb. 12: auf der folgenden Doppelseite:** Immunglobulintiter aller untersuchten Tiere (**A**) Gesamt-IgE (**B**) Bet v spez. IgG<sub>1</sub> (**C**) Bet v spez. IgE und (**D**) Bet v spez. IgG<sub>2a</sub>. Dargestellt sind alle einzelnen Tiere und geometrische Mittelwerte. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet. Die eingezeichneten gestrichelten Linien wurden zur Diskriminierung der Tiere in high und low responder genutzt. (siehe Erläuterungen im Text)

**A** = A/J,

**B** = C57BL/6,

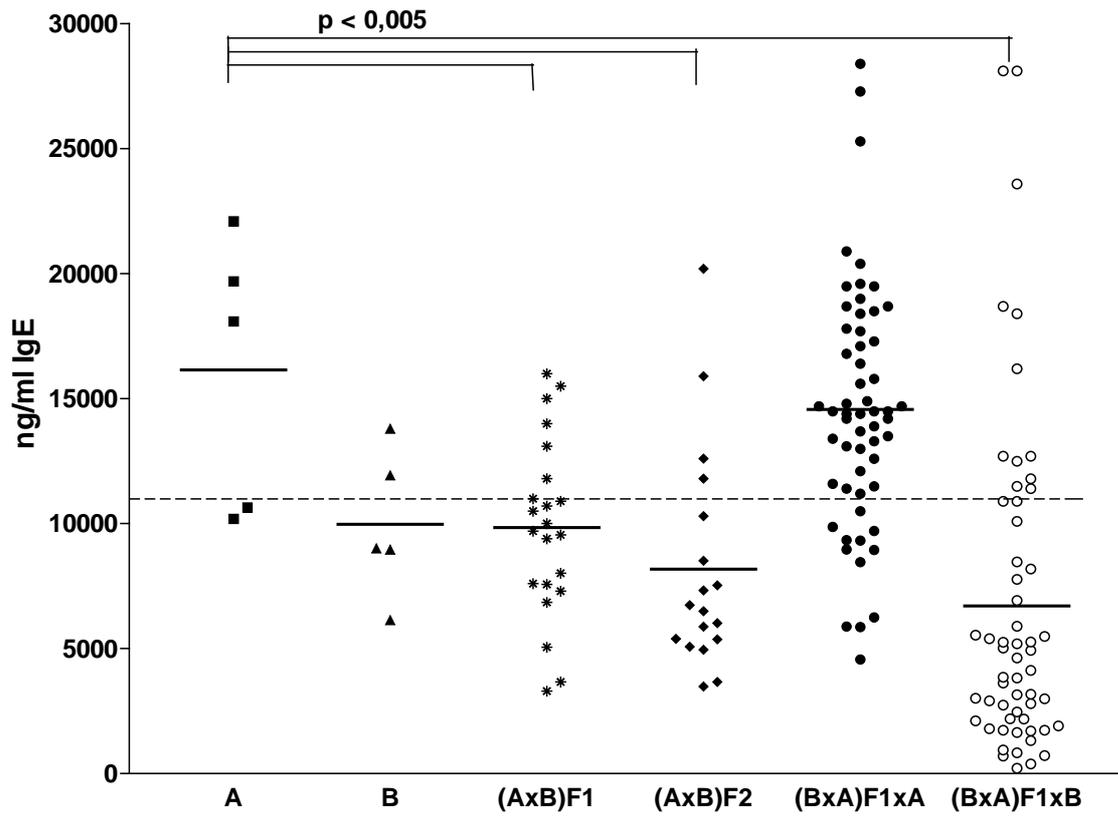
**(AxB)F1** = F<sub>1</sub>-Generation aus der Verpaarung von A/J♀ mit C57BL/6♂,

**(AxB)F2** = F<sub>2</sub>-Intercrosstiere aus der Verpaarung von (AxB)F<sub>1</sub>-Tieren untereinander,

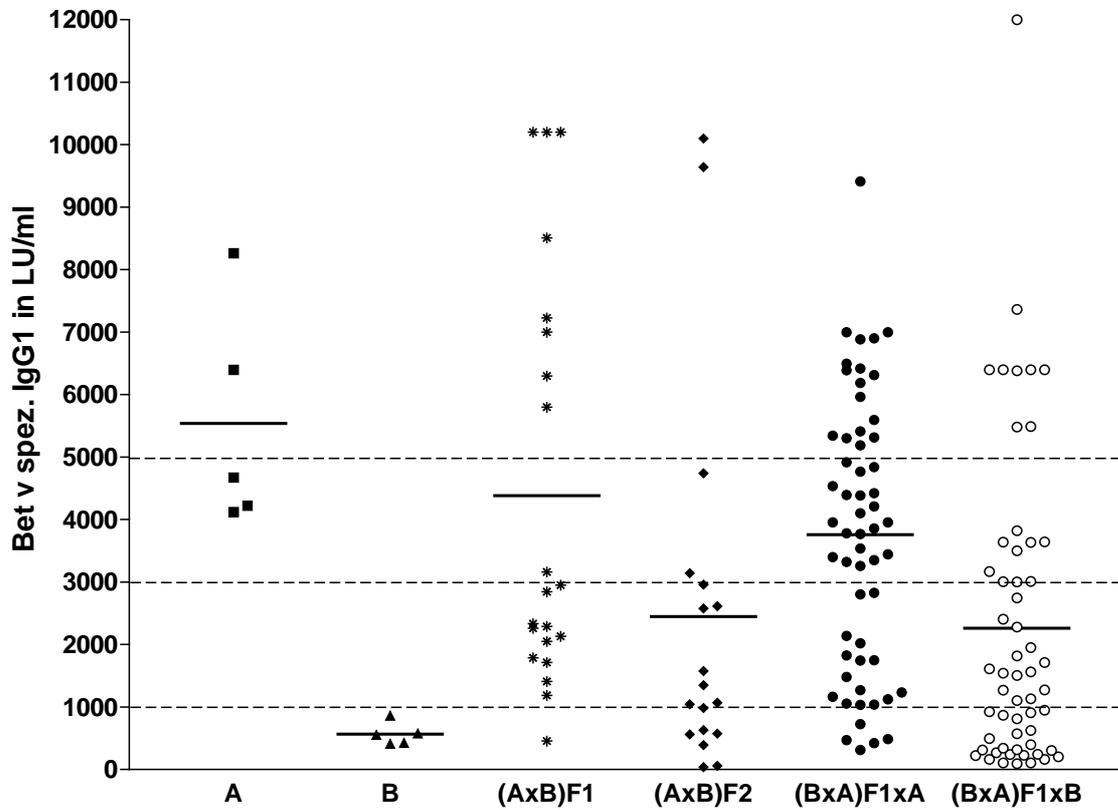
**(BxA)F1xA** = Nachkommen aus der Verpaarung von (BxA)F<sub>1</sub>♀ mit A/J♂

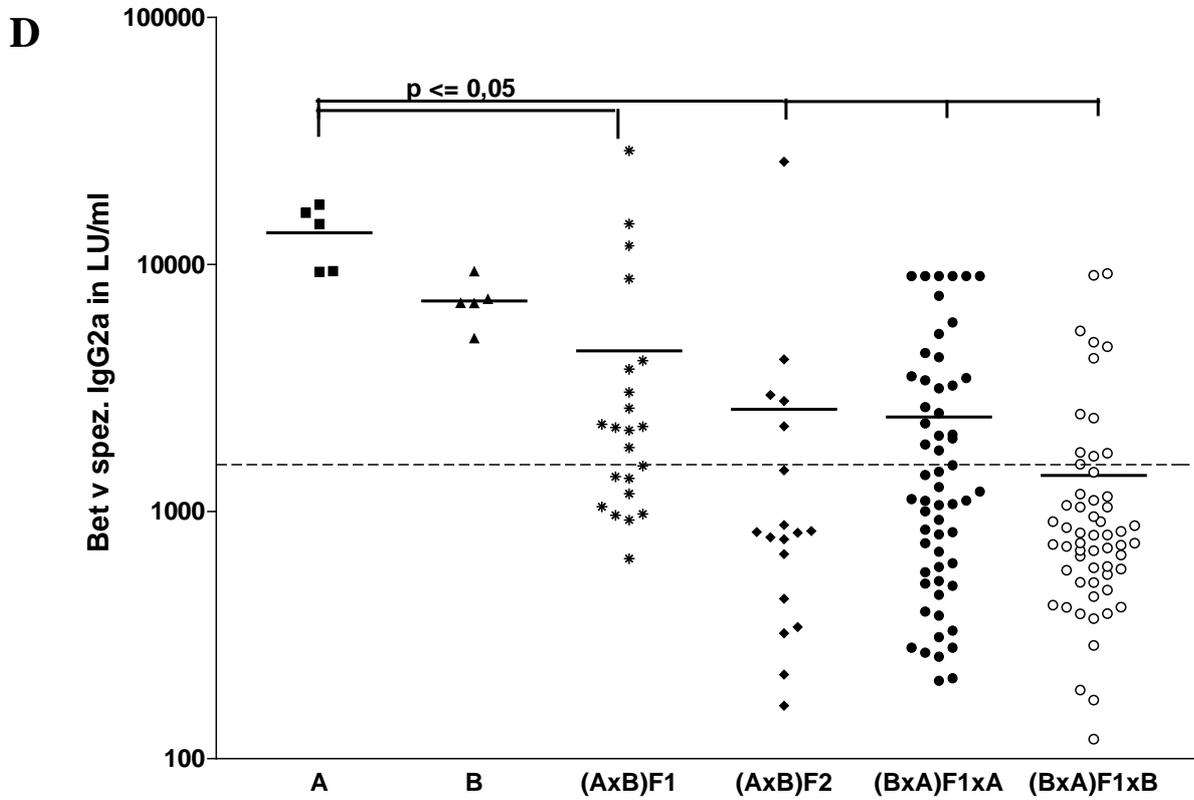
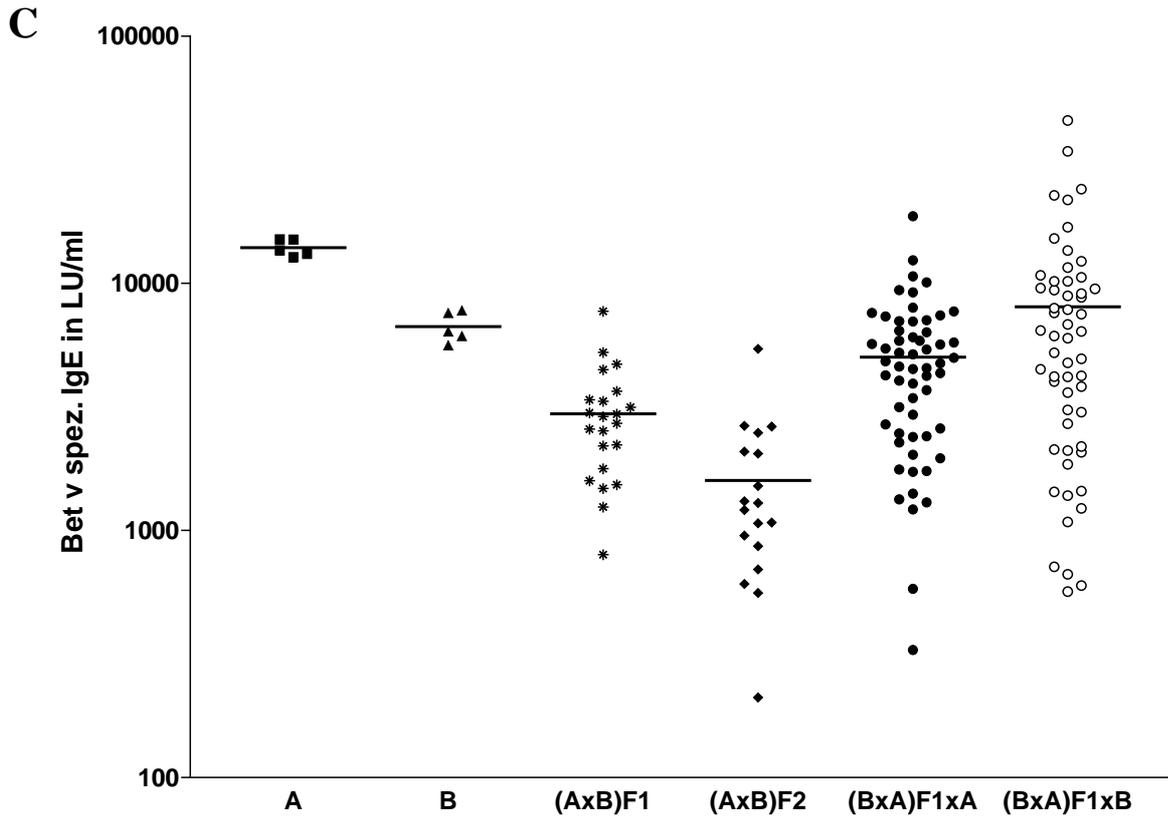
**(BxA)F1xB** = Nachkommen aus der Verpaarung von (BxA)F<sub>1</sub>♀ mit C57BL/6♂

**A**



**B**





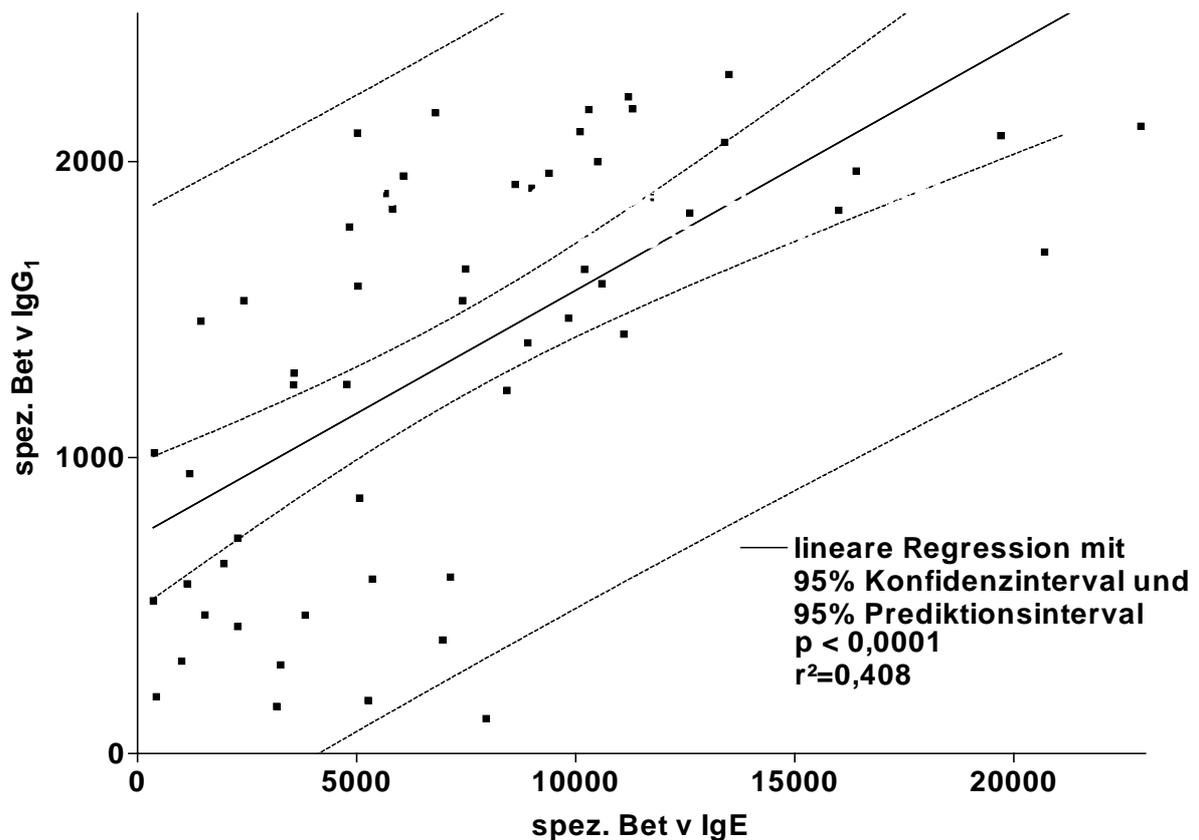
### 4.2.2 Bet v - spezifisches IgG<sub>1</sub>

IgG<sub>1</sub> wird vorwiegend bei T<sub>H</sub>2-Immunantworten gebildet und ist genauso wie spezifisches IgE ein Maß für die allergische Sensibilisierung. Auch bei den birkenpollenspezifischen IgG<sub>1</sub>-Immunglobulintitern zeigt sich, dass der high responder und am stärksten in T<sub>H</sub>2-Richtung reagierende Parentalstamm A/J die höchsten IgG<sub>1</sub>-Titer produziert. (**Abb. 12 B**) In der F1-Generation ist dieses Merkmal breit über den Bereich zwischen high response (> 4000 LU/ml) und low response (< 2000 LU/ml) verteilt. Da die Tiere in der F1-Generation für alle Allele heterozygot sind, ist bei einem monogenen wie auch bei einem polygenen Erbgang eine homogene Reaktion zu erwarten. Da die Immunglobulintiter trotzdem breit gestreut sind, lässt sich auf eine starke Varianz des Phänotyps schließen. Dieser Phänotyp ist daher eher ungeeignet, um über quantitative Methoden erfolgreich Genanalysen durchzuführen. Aufgrund der Streubreite des Merkmals ist es nicht möglich, Gruppen von Individuen mit einer starken oder schwachen Reaktion zu definieren.

Von der F2-intercross-Generation erwartet man bei einem dominanten Erbgang durch 2 oder mehr Gene eine Aufspaltung in Gruppen. Diese Aufspaltung des Phänotyps in der F2-intercross Generation konnten wir nicht finden. Der Mittelwert der Titer ist im Vergleich mit der F1-Generation in Richtung low response verschoben. Dies spricht für einen starken additiven Effekt mehrerer dominanter Gene.

Die auf den high response Stamm zurückgekreuzten F1-Tiere bestätigen den dominanten Erbgang. Der Mittelwert der backcross-Tiere (BxA)F1xA liegt höher als der Mittelwert der auf den low response Stamm gekreuzten Tiere (BxA)F1xB. Da diese, auf den high response Stamm zurückgekreuzten, Tiere (BxA)F1xA 75% high responder Gene besitzen, stimmt die Beobachtung einer high response mit der Erwartung (high response) überein.

Die F2-backcross-Generation auf den low response Parentalstamm reagierte erwartungsgemäß niedriger als die backcross-Generation auf den high response Stamm. Bei diesen Tieren finden sich nur 25% der high response Gene. Es fällt eine Häufung niedriger Immunglobulintiter in dieser Gruppe auf, so dass sich eine Gruppe von Tieren mit sehr niedrigen IgG<sub>1</sub>-Titern von dem Rest der Tiere abgrenzen lässt (<1000 LU/ml, 20 von 56 = 35%). Nur wenige Tiere (9 von 56 = 17%) erreichten extrem hohe Titer (>5000 LU/ml).



**Abb. 13:** Bet v Spezifisches IgE zu Bet v spezifischem IgG<sub>1</sub> der backcross-Tiere (AxB)F<sub>1</sub>xB auf den low responder Stamm C57/BL6

Da sowohl spezifisches IgG<sub>1</sub> und spezifisches IgE für die T<sub>H</sub>2-Antwort spezifische Immunglobuline sind, ist eine positive Korrelation der Immunglobulintiter zu erwarten. Dieser Zusammenhang hat sich auch in unseren Experimenten gezeigt (**Abb. 13**).

Auch der Vergleich der spezifischen IgG<sub>1</sub>-Titer mit den Gesamt-IgE-Titern zeigt eine positive Korrelation (nicht gezeigt). Daraus lässt sich ableiten, dass Tiere, die starke T<sub>H</sub>1-spezifische Reaktionen zeigen, auch hohe Gesamtimmunglobulintiter bilden. Von der Verteilung der IgG<sub>1</sub>-Titer bei allen untersuchten Tieren kann auf einen dominanten, polygenen Erbgang mit einem starken additiven Effekt mehrerer Gene geschlossen werden. Ein monogener Erbgang und ein rezessiver Erbgang können ausgeschlossen werden.

### 4.2.3 Bet v-spezifisches IgE

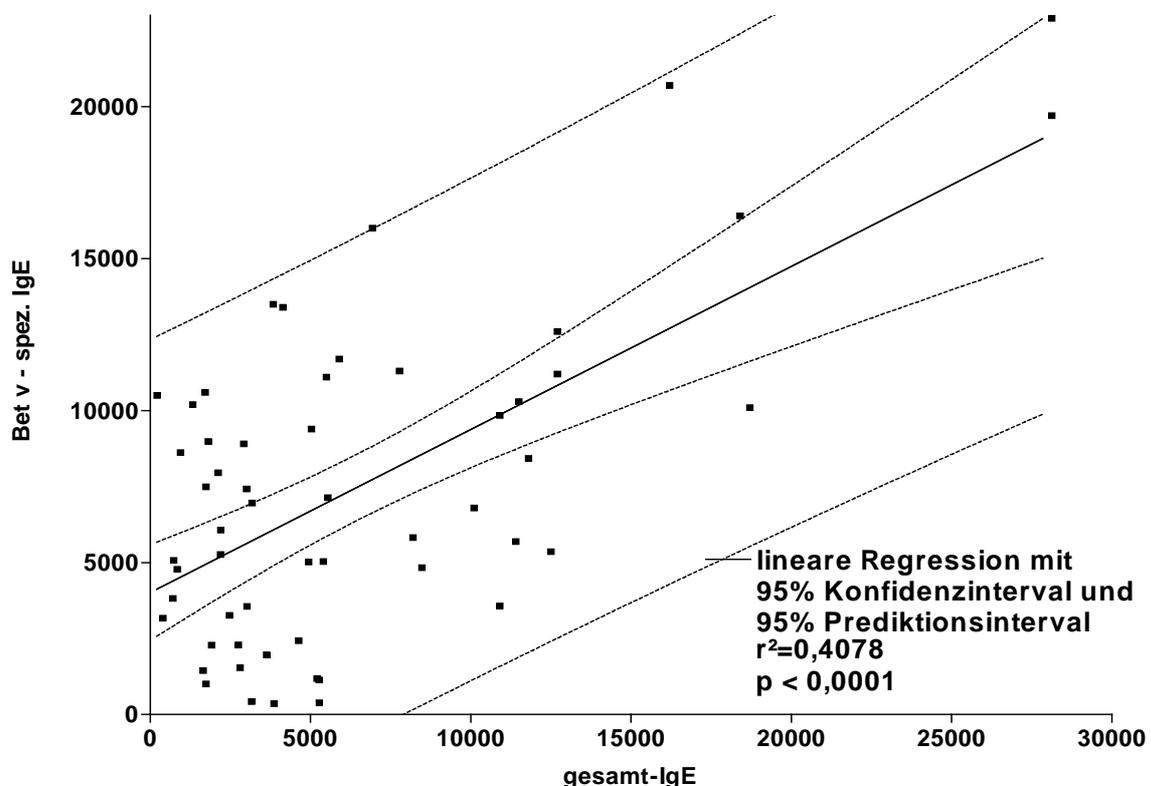
Allergenspezifisches IgE wird im Rahmen einer  $T_H2$ -Immunantwort von B-Zellen bzw. Plasmazellen produziert und ist daher wie IgG<sub>1</sub> ein Marker für eine  $T_H2$ -Immunantwort. Die Titer bei den Parentalstämmen sind high (AJ) und etwas niedriger bei C57BL/6-Tieren. Da letztere jedoch im Hauttest nicht bzw. nur gering reagiert haben und trotzdem fast gleich hohe spezifische IgE-Titer besitzen, liegen die Unterschiede in der Reaktion auf das intrakutan injizierte Birkenpollenextrakt zwischen den beiden Mausstämmen eventuell nicht in der Produktion von allergenspezifischem IgE, sondern in der Bildung von allergenspezifischem IgG<sub>1</sub>, in der Stabilität der Mastzellmembranen, der Rezeptordichte der high und low affinity IgE Rezeptoren FcεRI und FcεRII auf Mastzellen und basophilen Granulozyten, der Bindungskinetik von IgE-Molekülen an diese Rezeptoren oder an der gleichzeitigen Produktion von blockierenden IgG-Antikörpern gegen das Allergen. Da in beiden Inzuchtmausstämmen spezifisches IgE mit ähnlich hohen Titern gefunden wurde, ist anzunehmen, dass die Mastzellen und die basophilen Granulozyten in der Haut dieses IgE auch gebunden und exprimiert haben. Eventuell erfolgte diese Bindung aber mit unterschiedlicher Affinität der Rezeptoren oder es lag eine unterschiedliche Rezeptordichte der IgE-Rezeptoren bei diesen Tieren vor. Außerdem kann eine unterschiedliche Reaktivität der Mastzellen den Unterschied im Hauttest der Mäuse erklären. Andere Faktoren, wie die Zahl regulatorischer T-Zellen, von eosinophilen Granulozyten und von T- und Mastzellen sowie Unterschiede in deren Reaktivität könnten die Unterschiede ebenso erklären.

In der F1-Generation zeigt sich eine breitere Verteilung der Werte als in den Parentalstämmen. 95% der Tiere der F1-Generation (21 von 22) haben geringere Titer, als die Tiere des low responder Parentalstammes C57BL/6. Für die F1-Generation lassen sich die niedrigeren Titer wieder mit einem additiven Effekt erklären. Die Titer der F2-Generation liegen interessanterweise noch niedriger, obwohl sich die F2-Generation erwartungsgemäß breit über das ganze Spektrum verteilen sollte. Erst die auf einen Parentalstamm zurückgekreuzten Tiere haben höhere Titer, sowohl die Rückkreuzungen auf den high response Stamm, als auch die Rückkreuzungen auf den low response Stamm. Erstaunlicherweise haben die auf den low response Stamm zurückgekreuzten Tiere sogar noch höhere Titer als die, auf den high response Stamm zurückgekreuzten Tiere (**Abb. 12C**). Nur 25% der Tiere der backcross-Generation auf den high response Parentalstamm haben höhere spezifische IgE Titer als der low response Parentalstamm C57BL/6. Da diese Tiere

gleichzeitig 75% der Gene von dem high response Parentalstamm besitzen, ist auch hier ein starker additiver Effekt zweier oder mehrerer Gene zu vermuten. Diese Ergebnisse sind, wenn sie nicht im Widerspruch zu den im Hauttest gefundenen Resultaten stehen sollen, nur durch Unterschiede in der Mastzellbeschaffenheit, -granularität; -reaktivität etc. bei gleicher oder ähnlich starker IgE-Bildung zu erklären.

Aus den spezifischen IgE-Titern lässt sich kein schlüssiges Vererbungsmodell ableiten. Ein monogener Erbgang kann ausgeschlossen werden. Bei Annahme eines polygenen Erbganges (dominant oder rezessiv) lässt sich ein starker epistatischer Effekt ableiten. Dieser epistatische Effekt zeigt sich in einer starken Unterdrückung des spezifischen IgE-Phänotyps. Eine starke Wechselwirkung zwischen mehreren Genen sowie eine unvollständige Ausprägung des Genotyps bei Vorliegen inkompletter Penetranz könnte dies erklären.

Zwischen der Produktion spezifischer IgE-Antikörper und den Gesamt-IgE-Titern besteht erwartungsgemäß eine positive Korrelation (**Abb. 14**). Der Korrelationskoeffizient nach Pearson ist  $r=0,4078$  und signifikant ungleich null ( $p<0,0001$ ).



**Abb. 14: Gesamt-IgE gegen Bet v spezifisches IgE backcross-Tiere auf C57BL/6 (AxB)F1xB**

In der Arbeit von Daser (Daser et al., 2000) konnte ein Zusammenhang zwischen der spezifischen IgE-Antikörperproduktion und der Reaktion im Hauttest gezeigt werden. Daher ist ein Zusammenhang zwischen den spezifischen und den Gesamt-IgE Titern sowie der Reaktion im Hauttest und damit mit der Stärke der  $T_H2$ -Reaktion anzunehmen.

#### 4.2.4. Bet v spezifisches IgG<sub>2a</sub>

IgG<sub>2a</sub> ist spezifisch für  $T_H1$ -Reaktionen und sollte entgegengesetzt zu den anderen gemessenen Immunglobulinen reagieren. Im Gegensatz zu dieser Erwartung haben die high responder Parentaltiere höhere IgG<sub>2a</sub> Titer produziert als alle anderen untersuchten Tiergruppen (**Abb. 12D**).

In der F1-Generation bildeten 22 Tiere mittlere bis hohe spezifische IgG<sub>2a</sub>-Titer. 4 Tiere (=18%) erreichten das Niveau des high responder Parentalstammes. Eine weitere Aufteilung der birkenpollenspezifischen IgG<sub>2a</sub>-Titer ist, wie erwartet, in der F2-Generation zu finden. Hier lassen sich Tiere mit hohen IgG<sub>2a</sub>-Titern (über 1500 LU/ml, 5/18 Tieren = 28%) von Tieren mit niedrigen Werten (unter 500 LU/ml, 5/18 Tieren = 28%) sowie von Tieren mit mittelmäßig hohen Titern (zwischen 500 und 1500 LU/ml, 8/18 Tieren = 44%) abgrenzen. Dies entspricht ungefähr einem Verhältnis von 1:2:1, wie wir dies bei einem klassischen Mendelschen Erbgang erwartet hätten. Die backcross-Generation auf den high responder Parentalstamm zeigt hohe Immunglobulintiter, die backcross-Generation auf den low responder Parentalstamm niedrigere Reaktionen.

Da wir für die IgG<sub>2a</sub>-Titer ein zu den  $T_H2$ -Immunglobulinen inverses Muster erwartet haben und dies nicht finden konnten, lässt sich schlussfolgern, dass der höhere Immunglobulintiter produzierende Inzuchtmausstamm A/J generell stärkere Immunantworten entwickelt, sowohl bei  $T_H1$  als auch bei  $T_H2$  Reaktionen. A/J-Tiere sind also hyperreaktiv im Bezug auf viele Fremdproteine, reagieren jedoch vorzugsweise mit einer  $T_H2$ -Reaktion auf Birkenpollen und Adjuvans. Auch im Bezug auf die Atemweghyperreaktivität nach Exposition gegenüber Acetylcholin, 5-Hydroxytryptophan, Methacholinstimulation und Ozon zeigten A/J-Tiere Hyperreaktivität nach (Levitt and Mitzner, 1989; Emala and Hirshman, 2004).

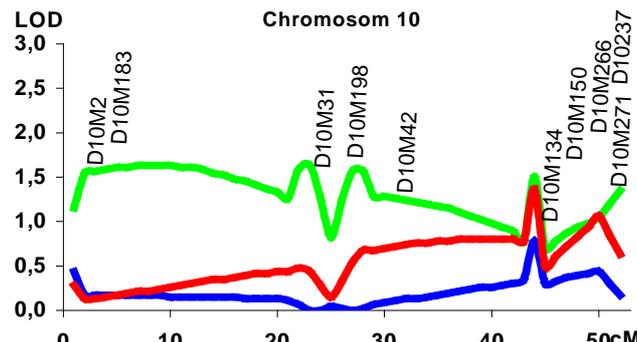
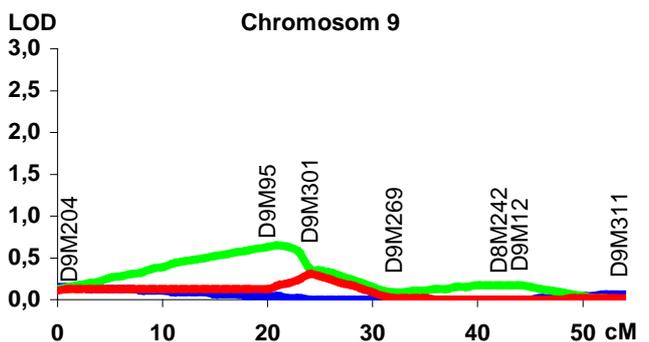
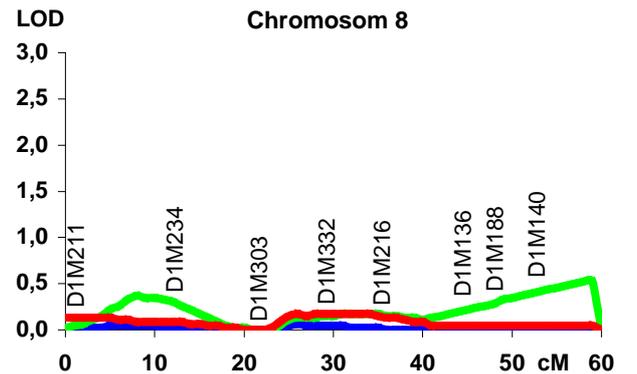
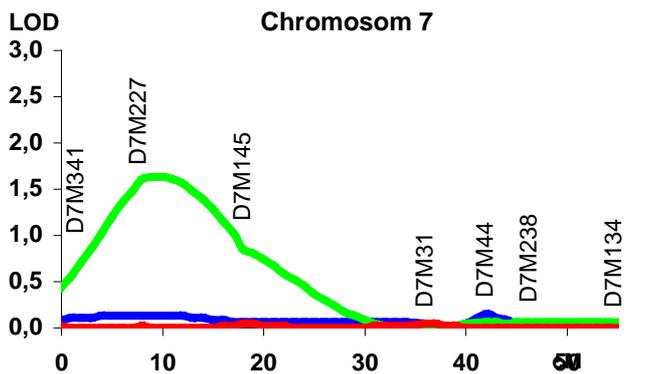
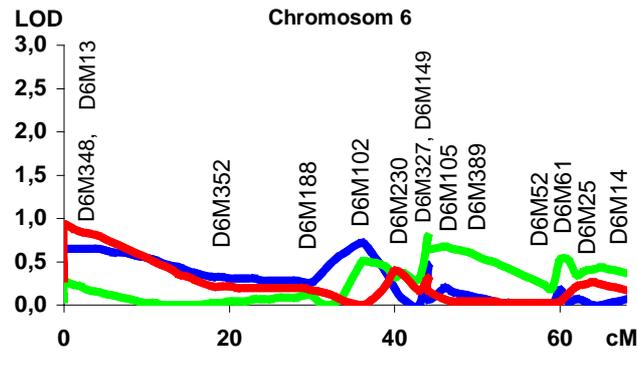
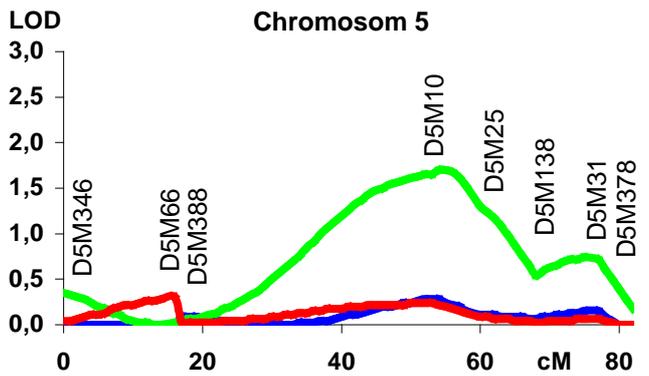
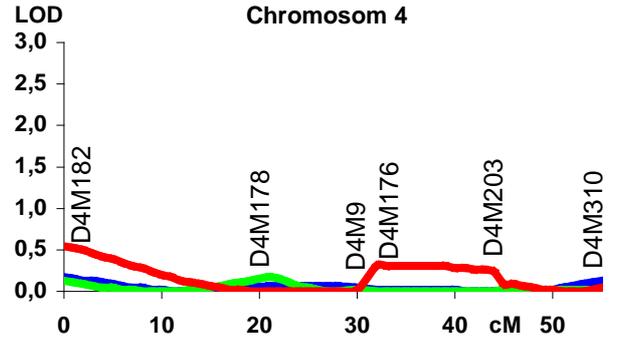
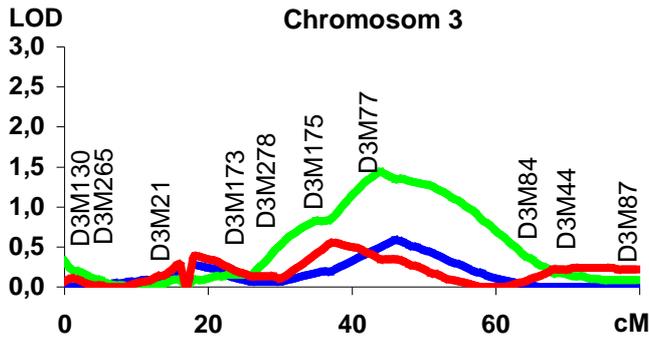
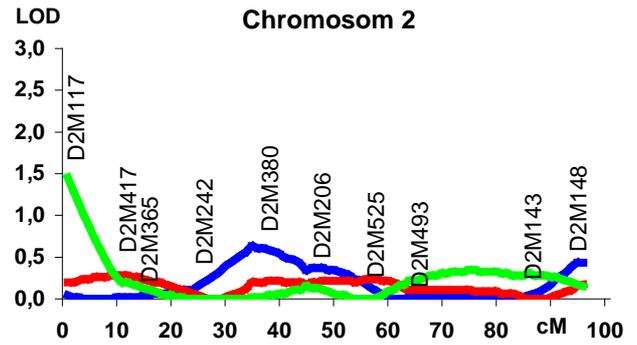
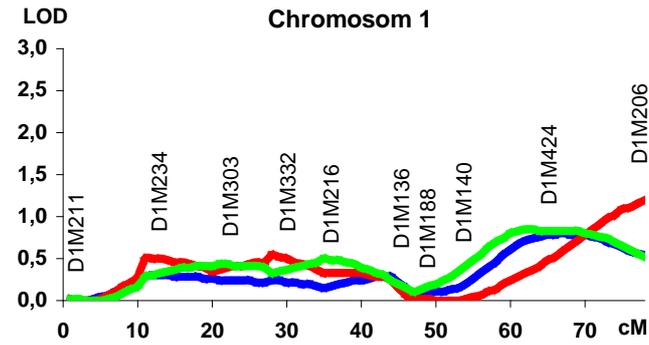
Aus der Analyse der spezifischen IgG<sub>2a</sub>-Titer lässt sich daher ein monogener Erbgang mit Sicherheit ausschließen. Es liegt sehr wahrscheinlich, wie sich auch bei der Analyse der  $T_H2$ -Immunglobulintiter gezeigt hat, ein dominanter polygener Erbgang mit inkompletter

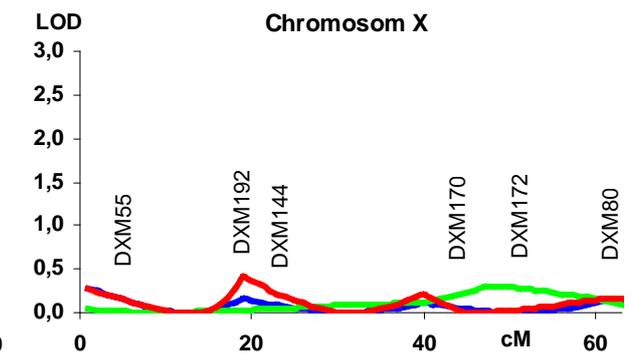
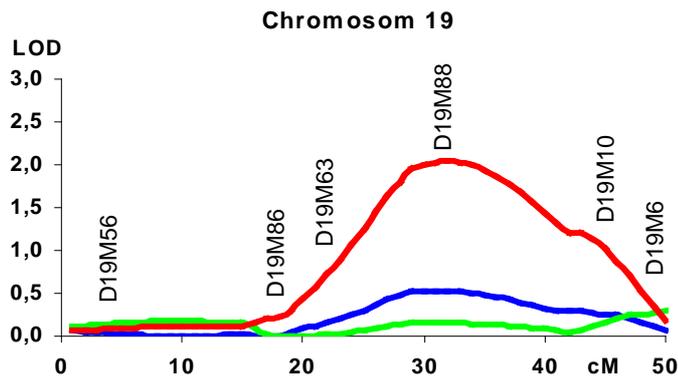
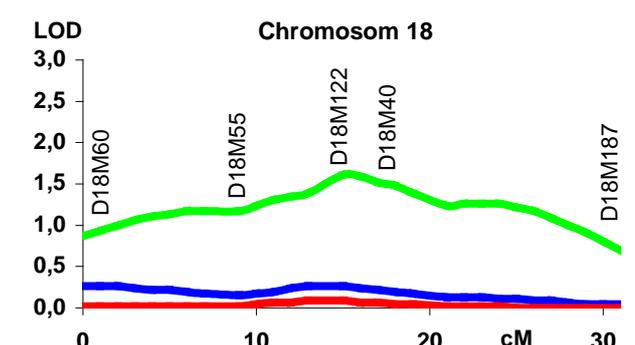
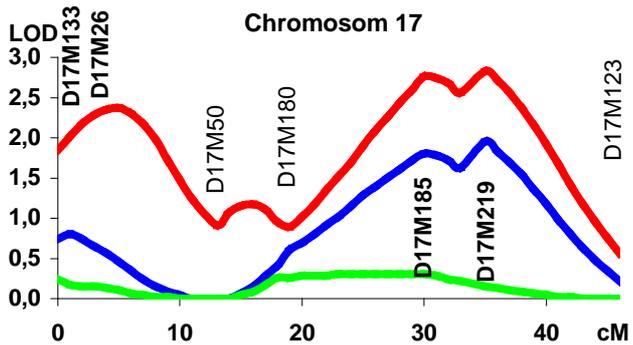
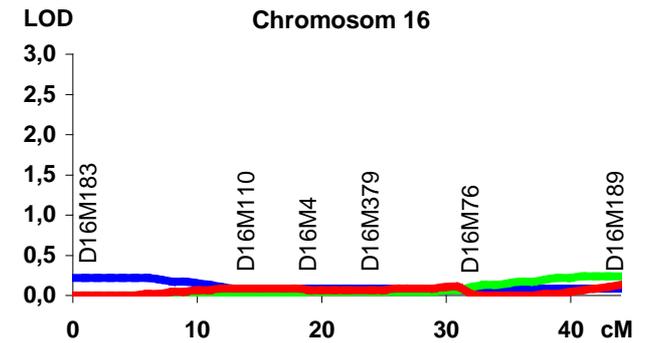
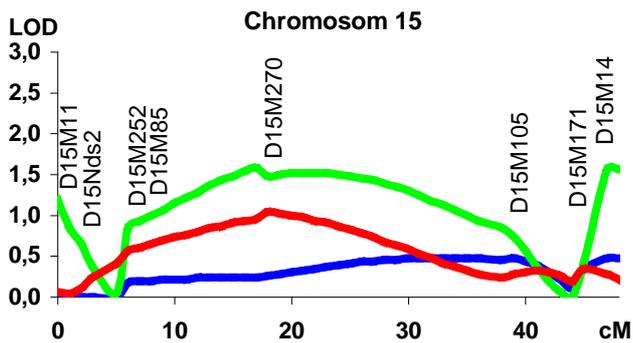
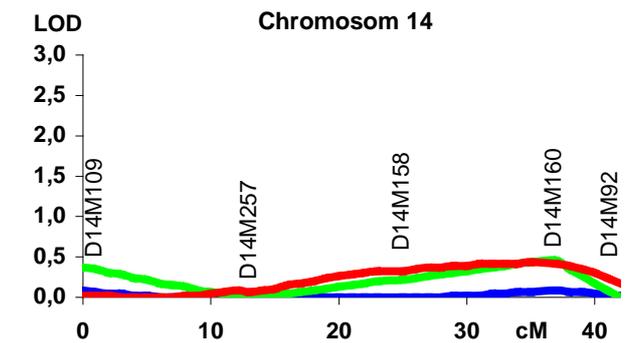
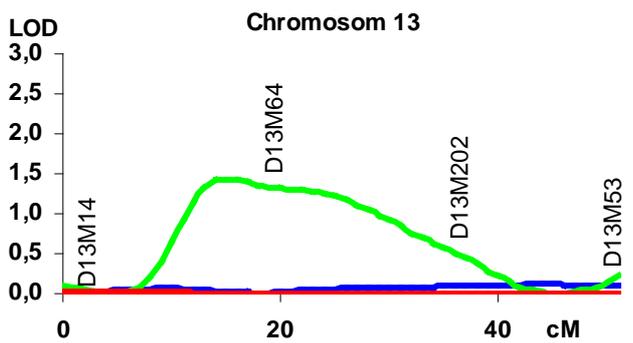
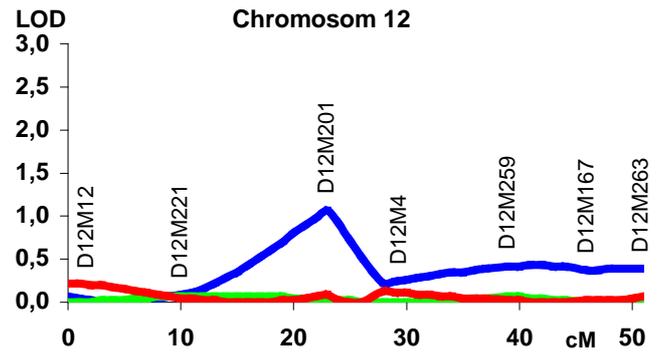
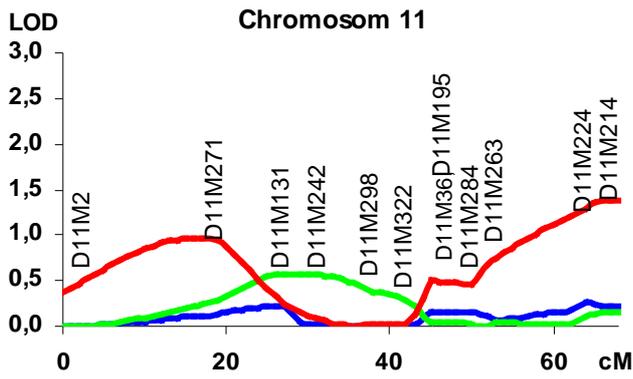
Penetranz vor. Da die Tiere der F1-Generationen als high responder reagierten, ist anzunehmen, dass dieser polygene Erbgang von mehreren dominanten Genen reguliert wird.

### 4.3 Linkageanalysen mit den Immunglobulintitern als Phänotyp

Linkageanalysen mit stetigen, d.h. qualitativen Merkmalen können entweder direkt mit statistischen Methoden für qualitative Merkmale oder nach Einteilung in mehrere Klassen mit quantitativen Methoden durchgeführt werden. Bei der letztgenannten Methode wird ein stetiges, qualitatives Merkmal durch Gruppierung in ein quantitatives Merkmal umgewandelt. Da sich eine Klassifizierung der von uns gemessenen Immunglobulintiter in high und low responder wegen nicht sicher abzugrenzender Gruppen von Tieren eher als schwierig erwies, haben wir uns für die direkte Methode entschieden und eine statistische Analyse für qualitative Merkmale benutzt. Die Ergebnisse der Linkageanalysen für Gesamt-IgE, spezifisches IgE und IgG<sub>1</sub> sind in **Abbildung 15** gezeigt. Da bei der Analyse der spezifischen IgG<sub>2a</sub>-Titer kein LOD-score über 1 errechnet wurde, sind die IgG<sub>2a</sub>-Daten nicht gezeigt. Bei der Analyse des Zusammenhanges zwischen einem der gemessenen Immunglobulintiter und der Allelverteilung der Marker bei den untersuchten Nachkommen konnten wir keinen statistisch signifikanten Zusammenhang finden. Wir haben jedoch mehrere wahrscheinlich signifikante Zusammenhänge gefunden. Diese sind in **Tabelle 7** zusammengefasst.

Für den Marker D17Mit185 auf Chromosom 17 haben wir im Zusammenhang mit dem spezifischen IgG<sub>1</sub>-Titer als Phänotyp einen LOD-score von 2,76 erhalten. Dieser Wert liegt nicht weit entfernt von der Grenze, ab der von einem statistisch signifikanten Zusammenhang ausgegangen werden kann. (Die p-Werte gelten bei Linkageanalysen aufgrund der mathematischen Assoziationen erst ab einem Wert von  $p \leq 0,0001$  als signifikant!) Eine interne Bestätigung für diese Assoziation ist, dass wir für den Marker D17Mit185 mit einem weiteren Phänotyp ebenfalls einen wahrscheinlich statistisch signifikanten Zusammenhang errechnen konnten und dass dieser 2. untersuchte Phänotyp ebenfalls auf einem T<sub>H</sub>2-Immunglobulin basiert. Eventuell war also für einen signifikanten Zusammenhang einfach die Tierzahl nicht hoch genug oder die Anzahl an analysierten Markern für diesen Phänotyp nicht ausreichend. Da diese Zusammenhänge nicht wirklich signifikant sind, muss die Möglichkeit eines zufälligen Zusammentreffens von Ereignissen in Betracht gezogen werden, die durch die Auswahl der Marker und Tiere oder andere Konfounder hervorgerufen wurden.





**Abb. 15 auf der vorhergehenden Doppelseite: Linkageanalysen für die Phänotypen Gesamt-IgE (grün), Bet v spezifisches IgE (blau), und Bet v spezifisches IgG1 (rot). Marker mit statistisch signifikanten LOD-scores ( $\geq 1,95$ ) sind fett hervorgehoben.**

Für diese gefundene Assoziation der 2 Immunglobulinphänotypen mit Markern auf Chromosom 17 können mehrere immunologisch wichtige Proteine verantwortlich sein, die in der Nähe der Marker mit den höchsten LOD-scores D17Mit185 und D17Mit219 codieren. Zu den immunologisch interessanten Genen in dieser Region zählen: *Sos1* (1,3cM entfernt), *IL25* (2,5 cM entfernt) und der Komplementfaktor *C<sub>3</sub>* (6cM entfernt). Etwas weiter entfernt von diesem Genort finden sich außerdem Gene für MHC-Moleküle, für die Chemokinrezeptoren für IL-1 bis -8 und -11, -13, -15, -16, und -GM-CSF, die AP1-Transkriptionsfaktor assoziierte gamma Untereinheit, sowie IL-6 Signal Transducer, Integrin alpha (CD103), mehrere MAP-Kinasen, den BRCA1-Rezeptor, PLC- $\delta$ 3, PKC $\alpha$ , RAS, eine SH3-Domäne der Grb2-ähnlichen Pseudogene 1 und 2, ein Quantitative Trait Locus für Lupus Erythemathodus, das Gen für den TNF-Rezeptor sowie Gene für STAT3, STAT5A, STAT5B, und FK506-Binding Protein 1. Anhand dieser Daten und im Zusammenhang mit dem zugehörigen Phänotyp der Tiere lässt sich feststellen, dass in unserem Modell für eine Allergie bei Mäusen bei zwei häufig untersuchten Inzuchtstämmen unterschiedliche Reaktionen auf das verwendete Birkenpollenallergen sowohl im Hauttest als auch in der Immunglobulintiterbildung vorhanden sind. Deshalb wurden diese zwei Mausstämme für weitere Versuche ausgewählt, gekreuzt und die Nachkommen in der F1- Generation untersucht. Der allergische Phänotyp dieser Generation war einheitlich. Es fanden sich ausschließlich stark auf die Immunisierung mit Birkenpollen reagierende Tiere mit positivem Hauttest und hohen IgE-Spiegeln (gesamt und spezifisch). Da anzunehmen ist, dass Allergien nicht nur durch ein Gen vererbt werden und es sich somit um eine polygene Vererbung handelt, war eine Rückkreuzung auf den stark reagierenden Parentalstamm notwendig. Hierbei erhielten wir eine Aufspaltung der Phänotypen. Dass heißt, die durch Rückkreuzung auf die Parentalstämme entstandenen F2-Generationen zeigten schwache, mittlere und starke Immunantworten.

**Tab. 7: Ergebnis der Linkageanalyse der Phänotypen IgE, spez. IgE und spez. IgG<sub>1</sub>**

Chr.	Marker	cM Pos.	vergleichbare Region, humanes Genom	ges. IgE			spez. IgE			spez. IgG <sub>1</sub>		
				LOD	% Var.	p<=	LOD	% Var.	p<=	LOD	% Var.	p<=
5	D5Mit10	54	4q13-21	1,65	18	0,00571						
7	D7Mit227	16	19q12	1,61	17	0,00669						
15	D15Mit270	28,4	8q24	1,63	17	0,00610						
15	D15Mit14	56,8	12q13-14	1,57	16	0,00741						
15	D15Mit217	57,8	12q12-13	1,93	21	0,00279						
17	D17Mit133	10,4	16p13							1,85	20	0,00347
<b>17</b>	<b>D17Mit26</b>	<b>11,7</b>	<b>16p13</b>							<b>2,02</b>	<b>22</b>	<b>0,00226</b>
<b>17</b>	<b>D17Mit185</b>	<b>40,6</b>	<b>2p22-21 / 18p-ter-p11.2</b>				1,80	23	0,00393	<b>2,76</b>	<b>30</b>	<b>0,00037</b>
<b>17</b>	<b>D17Mit219</b>	<b>45,3</b>	<b>2p23-22</b>				1,46	16	0,00988	<b>2,33</b>	<b>25</b>	<b>0,00106</b>
18	D18Mit122	31	5q31.2-q34	1,61	17	0,00646						
<b>19</b>	<b>D19Mit88</b>	<b>34</b>	<b>10q21-24</b>							<b>1,96</b>	<b>21</b>	<b>0,00276</b>

In dieser Tabelle sind nur Marker mit einem LOD-score > 1 zusammengefasst. Die genetischen Marker, für die eine Signifikanz angenommen werden kann (**suggestive linkage, LOD > 1,95** (Lander and Kruglyak, 1995)) sind hervorgehoben. Für spezifisches IgG<sub>2a</sub> wurde kein LOD-score >1 gefunden. % Var = Varianz des Phänotyps, die sich durch die Varianz des Genotyps an diesem Genort erklären lässt.

Bei der weiteren Analyse des Genoms in der Nähe der Marker mit Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang aus dieser Untersuchung, d.h. der Genorte, an denen ein wahrscheinlicher Zusammenhang (LOD-score zwischen 1,95 und 2,95 = wahrscheinlich signifikant, LOD-score ab 2,95 statistisch signifikant) mit dem Phänotyp gefunden wurde, ließen sich in unmittelbarer Nähe der gewählten Marker mehrere relevante Gene finden, die aufgrund der derzeitigen Kenntnisse mit der Entstehung von Allergien zusammenhängen. Weitere Untersuchungen und Markeranalysen sind notwendig, um gefundenen Zusammenhänge zu bestätigen und einen sicheren Zusammenhang der gefundenen Genbereiche mit Allergien aufzuzeigen.

**Tab. 8: Kandidatengene in unmittelbarer Nachbarschaft von Markern mit LOD>1. Wahrscheinliche Linkage = fett.**

Marker	Vergleichbare Region im humanen Genom	Kandidatengene, die an der Immunregulation bei atopischen Erkrankungen beteiligt sind
D5Mit10	4q13-21	CXCL-1, -2, -6, -9, -10, -15, AFP, FGF
D7Mit227	19q12	BHR6, EAE12, SLE3
D15Mit270	8q24	?
D15Mit14	12q13-14	BHR2, Integrin $\beta$ 7, Integrin $\alpha$ 5, NFE2
D15Mit217	12q12-13	BHR2, Integrin $\beta$ 7, Integrin $\alpha$ 5, NFE2
D17Mit133	16p13	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3, Mast cell protease 6+7
D17Mit26	16p13	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3, Mast cell protease 6+7
<b>D17Mit185</b>	<b>2p22-21 / 18p-ter-p11.2</b>	<b>MHC-II-Komplex, Vav1, SOS1, ALK, SCC4</b>
<b>D17Mit219</b>	<b>2p23-22</b>	<b>MHC-II-Komplex, Vav1, SOS1, ALK, SCC4</b>
D18Mit122	5q31-q34	IL4-Cytokine Gencluster, PDGF $\beta$ ,
<b>D19Mit88</b>	<b>10q21-24</b>	<b>EAE19, PTEN, JAK2</b>

In dieser Tabelle sind die möglichen Kandidatengene für die gefundenen quantitative trait - Genorte zusammengestellt. Marker, für die eine wahrscheinliche Linkage gefunden wurde (**suggestive linkage, LOD > 1,95** (Lander and Kruglyak, 1995)) sind hervorgehoben.

## 5. Diskussion

Die Hauptergebnisse dieser Arbeit:

1. Es wurde ein Modell für eine Birkepollenallergie bei Mäusen entwickelt. Als Maß für die Stärke der allergischen Reaktion wurde ein Test für die allergische Sofortreaktion in der Haut etabliert und die birkenpollenspezifischen IgE-, IgG<sub>1</sub>- und IgG<sub>2a</sub>-Antikörpern sowie Gesamt-IgE gemessen. Bei der Immunisierung mit Birkenpollen fand sich der Inzuchtstamm A/J als high responder und der Stamm C57BL/6 als low responder.
2. Aus der Analyse der birkenpollenspezifischen Antikörper- und der Gesamt-IgE-Titer lässt sich am ehesten auf einen polygenen Erbgang mit 2 oder mehr beteiligten Genen schließen.
3. Eine Linkageanalyse mit den Immunglobulintitern als quantitative Phänotypen und 160 Markern in einem mittleren Abstand von 10,4 cM (5-25cM) hat keine signifikanten Zusammenhänge gefunden. Der Phänotyp birkenpollenspezifisches IgG<sub>1</sub> zeigte wahrscheinlich signifikante Linkage zu 2 Regionen auf Chromosomen 17q und zu einer Region auf 19q.
4. In dem gefundenen Chromosomenbereich auf Chromosom 17 sind am ehesten die dort codierenden MHC-II Gene für die Vererbung der Birkenpollenallergie verantwortlich. Linkage zu diesen Genregionen wurde auch in anderen Studien zur Vererbung atopischer Phänotypen gefunden (De-Sanctis et al., 1995; Zhang et al., 1999). In dem genannten Chromosombereich auf Chromosom 17 liegt außerdem ein weiterer mit Atopie assoziierter QTL (BHR3). Studien im humanen System bestätigen die Assoziation von Atopie und Allergie zu syntenen, die HLA-II Gene enthaltenden Bereichen im humanen Genom (Yokouchi et al., 2000; Xu et al., 2001a; Wjst et al., 1999; Haagerup et al., 2002).

### 5.1 Vergleich der allergischen Reaktion bei Maus und Mensch

Atopische Erkrankungen sind Krankheitsbilder, die durch viele Umweltfaktoren, aber auch durch genetische Faktoren beeinflusst werden. Um einzelne Faktoren näher zu untersuchen, ist eine Vereinheitlichung und ein Modell notwendig, in dem möglichst viele Faktoren, die Ursache für die starke Varianz der Allergieentstehung sind, konstant gehalten werden. Mit Allergenen immunisierte Mäuse zeigen ähnliche Immunreaktionen, wie sie bei allergischen Erkrankungen des Menschen beobachtet wurden. Diese Tiere stehen dem Menschen entwicklungsbiologisch näher und eignen sich daher als Modelltiere (Herz et al., 1996b; Herz et al., 1996a; Hamelmann et al., 1997; Kay, 1996; Barnes, 2000). Mit dem von uns etablierten Modell einer Birkenpollenallergie haben wir zwei Inzuchtstämme gefunden, die

unterschiedlich stark auf eine Immunisierung mit Birkenpollen reagieren. Die Immunisierung führte zur Produktion spezifischer IgE-, IgG1- und IgG<sub>2a</sub>- Antikörper und zur Erhöhung des Gesamt-IgE Titers. Das verwendete Adjuvans und die geringe Menge an Allergen für die Immunisierung führten somit zur Induktion einer T<sub>H</sub>2-gerichteten Immunantwort, wie sich aus dem Verhältnis des Anstiegs der T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2-Immunglobuline abschätzen lässt.

Mit dem von uns etablierten Hauttest konnten wir Unterschiede in der Reaktion zweier Mausstämmen auf das verwendete Allergen zeigen. A/J-Mäuse reagierten in diesem Modell einer Birkenpollenallergie als high responder, C57BL/6-Mäuse als low responder. Unterschiede in der Reagibilität verschiedener Inzuchtmausstämmen auf immunologische und nervale Reize sind bekannt und wurden für den Phänotyp bronchiale Hyperreagibilität auf Stimulation mit Acetylcholin, 5-Hydroxytryptamin und Ozon beschrieben (Levitt and Mitzner, 1988; Levitt and Mitzner, 1989; De-Sanctis et al., 1995; Ewart et al., 1996; Prows et al., 1997; Prows et al., 1999). Bei diesen Untersuchungen fielen A/J-Mäuse ebenfalls als high responder und C57BL/6-Mäuse als intermediate oder low responder auf und wurden daher für genetische Untersuchungen der bronchialen Hyperreagibilität herangezogen. Der gefundene Phänotyp einer allergischen Sofortreaktion nach Immunisierung mit Birkenpollen steht mit der bronchialen Hyperreagibilität zwar in engem Zusammenhang, doch die Untersuchung dieser beiden immunologischen Phänotypen mit Hilfe von Genomscan und Linkageanalyse bei den gleichen Inzuchtmausstämmen kann zu verschiedenen genetischen Markern führen, wie die Ergebnisse der veröffentlichten Linkageanalysen im humanen und murinen Modell bei immunologischen Phänotypen zeigen (**Tab. 4 und 5**).

## **5.2 Abschätzung des Erbganges der Birkenpollenmodellallergie**

Nicht aus jeder Kombination der Antikörpertiter bei den Nachkommen ließ sich ein sinnvoller, einheitlicher Vererbungsmodus ableiten. Die meisten der betrachteten Antikörpertiter der Nachkommen von A/J und C57BL/6 lassen jedoch vermuten, dass die untersuchte Birkenpollenallergie einem codominanter Erbgang mit mindestens 2 oder mehr verantwortlichen Genen folgt (gezeigt bei Gesamt-IgE und spez. IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2a</sub>). Aus der gleichen Verteilung der Phänotypen bei den Nachkommen lässt sich außerdem ableiten, dass sich der Effekt mehrerer dominant vererbter Gene addiert und so zu einer Verstärkung des Allergiephänotyps bei gleichzeitiger Vererbung führt (gezeigt bei ges. IgE und spez. IgG1 und spez. IgE). Eine Wechselwirkung zwischen mehreren Genen könnte genauso gut durch Inhibition eines Geneffektes zum Verschwinden eines Phänotyps führen (gefunden bei der

Betrachtung der spez. IgE und spez. IgG<sub>2a</sub>-Titer). Mit Sicherheit lässt sich jedoch aus allen betrachteten Vererbungsmodi ein monogener Erbgang ausschließen.

### **5.3 Linkageanalysen mit ges. IgE und spez. IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> und IgE-Titern**

Bei unseren Linkageanalysen haben wir keinen statistisch signifikanten Zusammenhang finden können. Für 2 Regionen auf dem langen Arm von Chromosom 17 und eine Region auf dem langen Arm von Chromosom 19 konnten wir jedoch einen wahrscheinliche signifikanten Zusammenhang zu birkenpollenspezifischem IgG<sub>1</sub> finden. Damit wurde in dieser Untersuchung eine Assoziation zwischen spezifischen Immunglobulintitern und Markern in der Genregion, in der Gene für den MHC-II-Komplex kodieren, gefunden. Eine solche Assoziation ist im humanen System mehrfach gefunden worden (Yokouchi et al., 2000; Xu et al., 2001a; Wjst et al., 1999; Haagerup et al., 2002). Auch bei der Analyse des Hauttests fiel diese Region auf Chromosom 17 mit höheren, jedoch nicht signifikanten LOD-scores auf. Die wahrscheinlich signifikant assoziierten Marker auf Chromosom 17 liegen bei ca. 12 cM und 40 cM vom p-terminalen Ende des Chromosoms. Linkage zum zentromernahen Bereich auf Chromosom 17 wurde von De-Sanctis zur bronchialen Hyperreaktivität nach Methacholinstimulation bei A/J- und C57BL/6-Mäusen und von Zhang bei Balb/C und Biozzi-Mäusen zur bronchialen Hyperreaktivität nach Ova-Immunisierung der Tiere gefunden (De-Sanctis et al., 1995; Zhang et al., 1999). Der QTL für bronchiale Hyperreaktivität BHR3 wurde in diesen Studien bei ca. 14 cM lokalisiert. Die von uns gefundene wahrscheinliche Linkage im zentromernahen Bereich von Chromosom 17 liegt somit fast genau an diesem QTL und gibt einen Hinweis, das trotz der nur wahrscheinlichen Signifikanz in unseren Untersuchungen in diesem Bereich von Chromosom 17 immunologisch interessante Gene liegen, die eine Allergieentstehung beeinflussen. Für die in diesen Studien gefundenen Assoziationen wurden ebenfalls Gene des MHC-II-Komplexes diskutiert. Der MHC-II-Komplex liegt bei ca. 25 cM und somit genau in der Mitte zwischen den von uns gefundenen Markern mit den höchsten LOD-scores und nur 11 cM entfernt von BHR3. Da MHC-II Proteine bei der Immunantwort auf Fremdproteine eine wichtige Rolle spielen und auf allen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden, ist ein Einfluss auf die Immunantwort anzunehmen. Von mehreren Autoimmunkrankheiten des Menschen ist eine Assoziation mit bestimmten HLA-Subklassen bekannt. Somit entscheidet sich eventuell bereits bei der Antigenpräsentation die Richtung der weiteren Immunantwort. Die MHC-Gene sind am ehesten der Grund für die gefundenen Assoziationen auf Chromosom 17.

Im zentromernahen Bereich von Chromosom 17 kodieren außerdem TNF-Gene und somit Proteine, die an inflammatorischen Prozessen im Körper beteiligt sind. Außerdem kodieren dort das mit der MAP-Kinase8 assoziierte Protein und zwei Mast-Zell-Proteasen. Diese könnten an der Entstehung von Allergien beteiligt sein, da sie auf für die spezifische Immunantwort wichtigen Zellen exprimiert und an der Aufbereitung der Fremdproteine beteiligt sind. Im zentromerfernen Bereich von Chromosom 17 kodieren mehrere Proteine, die an der Signalübertragung in Lymphozyten beteiligt sind (Vav, Sos, Slp76, NOTCH4, NFκB). Diese sind daher Kandidatengene für die nähere Untersuchung auf einen Zusammenhang mit Allergien. Letztendlich finden sich auf dem langen Arm von Chromosom 17 auch Bestandteile des Komplementsystems C2, C3, C4a und C4b und eine anaplastische Lymphoma-Kinase sowie ein QTL, der Linkage zu Kolontumoren bei Mäusen aufweist. Diese genannten Gene sollten daher bei der weiteren Untersuchung der Genetik von Allergien berücksichtigt werden.

Für den Bereich auf Chromosom 19, in dem wir eine wahrscheinlich signifikante Assoziation zu Bet v spezifischem IgG<sub>1</sub> gefunden haben, wurde in genomweiten Linkageanalysen bisher noch kein signifikanter Zusammenhang beschrieben. In diesem Bereich liegt unter anderem ein QTL für Experimentelle Autoimmune Encephalitis EAE Nr. 19 und an der Signalübertragung in Lymphozyten beteiligte Gene PTEN und JAK2. Diese Gene stellen somit weitere interessante Kandidaten für eine genauere Analyse der Genetik der Birkenpollenallergie im Mausmodell dar. Aufgrund des bisher nur zu vermutenden Zusammenhangs mit Immunglobulintitern sollten weitere Studien abgewartet werden, die Linkage zu dieser Genomregion zeigen.

Die Genorte auf den Mauschromosomen 15, 5, 7 und 18, für die wir Lod-scores >1 gefunden haben, könnten bei einer Verbesserung dieser Analyse durch Einschluss größerer Tierzahlen eventuell noch signifikante Zusammenhänge hervortreten lassen. In diesen Chromosombereichen liegen mehrere immunologisch interessante Genorte, die bei Studien im Mausmodell signifikante Zusammenhänge mit immunologischen Phänotypen gezeigt haben: BHR2 und BHR6 – QTLoci für bronchiale Hyperreaktivität (De-Sanctis et al., 1995), das IL-4-Cytokingencluster (Zhang et al., 1999) sowie EAE12 – ein QTL für Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis und SLE3 – einen QTL für die Autoimmunerkrankung Systemischer Lupus Erythematoses.

## 5.4 Fehleranalyse

Linkageanalysen sind bei der Suche nach krankheitsrelevanten Genen hilfreich, auch wenn relativ wenig über den Pathomechanismus der zugrundeliegenden Erkrankung bekannt ist. Aufgrund der Art der Analyse und aufgrund der Betrachtung von noch unbekanntem, nicht vollständig geklärten Krankheitsmechanismen sind sie auch mit vielen Fehlerquellen behaftet. Eine ausführliche Betrachtung dieser Fehlerquellen ist daher notwendig.

Entscheidend für den Erfolg von Linkageanalysen sind die Wahl der zu untersuchenden Individuen und die Kriterien zur Festlegung und die Sicherheit des Phänotyps. Erst wenn in mehreren unabhängigen Analysen, bei unterschiedlichen Founderpopulationen oder unterschiedlichen Rassen im humanen System und bei unterschiedlichen Modellen einer Krankheit bei verschiedenen Inzuchtstämmen ein Genort immer wieder mit einer Krankheit assoziiert gefunden wird, ist diese Assoziation als relevant für diese Erkrankung zu betrachten (Panhuysen et al., 1995; Altmüller et al., 2001). Falsch-positive Ergebnisse sind bei Linkageanalysen möglich. Die Wahl der Wahrscheinlichkeit entscheidet über den Ausschluss zufälliger Assoziationen. Die Rechenmethode des Vergleichs von Wahrscheinlichkeiten, die bei Linkageanalysen angewandt wird, führt zwangsweise zu falsch positiven Ergebnissen. Die Häufigkeit falsch positiver Ergebnisse bei Linkageanalysen ist bei  $p=0,001$  ca. 0,5-1 pro Analyse und bei  $p=0,01$  ca. 5 pro Analyse (Lander and Kruglyak, 1995). Dies beruht unter anderem auch auf zufällig in der untersuchten Population überexprimierten Allelen und zu kleinen untersuchten Populationen. Am besten sollten verschiedene Rassen auf die gleiche Krankheit oder verschiedene Inzuchtmausstämme mit dem gleichen Modell untersucht werden (Manly et al., 2001b; Lander and Kruglyak, 1995). Somit hat Anzahl an untersuchten Individuen und die gewählte Markerdichte einen Einfluss auf die Power und die Aussagekraft einer Linkageanalyse. Da wir bei dem von uns gewählten  $P= 0,001$  keine signifikante sondern 2 wahrscheinlich signifikante Assoziationen gefunden haben, könnten diese genauso gut auf den normalen zu erwartenden Fehlern beruhen.

In unseren Untersuchungen sind relativ wenige Tiere für die statistischen und genetischen Untersuchungen herangezogen worden. Trotzdem haben wir auf Chromosom 17 zwei Bereiche mit wahrscheinlich signifikanter Assoziation finden können, die auch schon bei der Analyse des Hauttests von den hier untersuchten und in anderen Studien signifikante Linkage gezeigt haben. Es ist daher anzunehmen, dass das Ergebnis unserer Analyse in die richtige

Richtung geht, und dass bei einer Erhöhung der Tierzahl die gleichen Bereiche mit signifikanten Zusammenhängen beobachtet werden können.

Bei der Analyse der allergischen Sofortreaktionen in der Haut wurde mit einem Teil der Tiere ein wahrscheinlich signifikanter Zusammenhang (LOD-score=2,96) zu einem Genort in der Nähe des IL-5 Rezeptor-Gens gefunden (Daser et al., 2000; Koetz, 2002). Ein Polymorphismus im IL-5 Rezeptor konnte diesen wahrscheinlich signifikanten Zusammenhang erklären. Bei der Linkageanalyse derselben Markerdaten und Tiere mit anderen Phänotypen (Immunglobulintiter statt Hauttest) führten die Linkageanalysen zu anderen wahrscheinlich signifikanten Zusammenhängen, die sich am ehesten durch unterschiedliche MHC-II-Varianten der untersuchten Tiere erklären lassen. Während der erste Phänotyp das Ergebnis der spezifischen Reaktion auf Birkenpollen testet, ist die Untersuchung der Immunglobulintiter eher ein Test in der Mitte der Immunantwort. Die genannten Unterschiede in den Ergebnissen der Linkageanalysen derselben Tiere schließen sich somit nicht gegenseitig aus. Die Unterschiede sind eventuell durch unterschiedliche Affinitäten der Fcε und Fcγ Rezeptoren, unterschiedliche Dichte der Rezeptoren auf den APC, eine unterschiedliche Reaktivität der Effektorzellen oder Differenzen in der Granularität der basophilen Granulozyten und Mastzellen zu erklären. Generell sind bei unterschiedlichen Phänotypen auch unterschiedliche dafür verantwortliche Gene zu erwarten, auch wenn diese in einem engen Zusammenhang stehen.

Im Unterschied zum humanen high affinity IgE Rezeptor FcεRI bindet der murine FcεRI auch IgG<sub>1</sub>. Deshalb spielt bei der Analyse der allergischen Sofortreaktion bei Mäusen auch die Höhe des IgG<sub>1</sub>-Titers eine Rolle. Aufgrund des gleichzeitigen Anstiegs von spezifischem IgE und IgG<sub>1</sub> oder IgG<sub>4</sub>-Antikörpern, besteht die Möglichkeit der Verfälschung der Ergebnisse des Hauttests und der ELISA durch blockierende Antikörper. In Studien zur Bedeutung des feto-maternalen Einflusses auf die Weitergabe einer Allergie bei Mäusen wurde gezeigt, dass bereits geringe Mengen maternaler, transplazentar transferierter spezifischer IgG<sub>1</sub>-Antikörper ausreichen, um eine positive Reaktion auf das Allergen hervorzurufen (Herz et al., 2000b; Neuhaus-Steinmetz et al., 2000; Herz et al., 2000a). Letztendlich unterliegt die Messung der spezifischen Immunglobulintiter mit einem ELISA durch Konkurrenz der spezifischen Immunglobuline untereinander an den bei der Messung angebotenen Allergenmolekülen ebenfalls einer geringen Unsicherheit. So wird die Messung von spezifischen IgE-Titern bei extrem hohen spezifischen IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2a</sub> Titern niedriger ausfallen als bei weniger

konkurrierenden Immunglobulinen. Verdünnt eingesetzte Seren können die geringe Abweichung einschränken, aber nicht verhindern.

### **5.6 Fishing in the dark? - Schlussfolgerungen**

Für atopische Erkrankungen, Allergien, Asthma und bronchiale Hyperreaktivität wurden auf nahezu allen Chromosomen in verschiedenen Studien Bereiche beschrieben, die mit einer Erkrankung aus dem allergischen Formenkreis assoziiert sind (**Tab. 1 und 2**). In der Nähe auffälliger Marker befinden sich viele Kandidatengene, die für die spezifische Immunantwort steuernde Proteine kodieren. Häufig auffällige Regionen im humanen Genom in mehr als 2 Studien sind die Bereiche 5q31-33, 6p21, 11q13, 12q15-24, 13q12-31, 14q11 und 14q32. Zu diesen Regionen syntene Bereiche wurden im Mausgenom bei Linkageanalysen auch in dieser Studie gefunden. Somit passt das Ergebnis dieser Studie in das Bild von der Regulation komplexer Erkrankungen. Außerdem können sich neue, bislang unbekannte Gene, die die spezifische Immunantwort steuern, in den beschriebenen Genombereichen befinden.

Province hat Linkageanalysen als Fischfangexpeditionen bezeichnet, bei denen Gene zu fangende Fische sind (Province, 2001). Diese Fische sind für monogene Erkrankungen mit Linkageanalysen einfach zu „fangen“ (Zystische Fibrose, Diabetes Typ I). Polygen bedingte Krankheiten wie Herzkrankheit, Hypertonus, Hyperlipidämie, Tumoren, Fettsucht, Asthma und Diabetes Typ II sind schon allein aufgrund ihrer Farbenvielfalt in der Ausprägung am Beginn und im Verlauf der Erkrankung schwerer zu untersuchen. Die Schlussfolgerung von Province ist daher, dass je mehr Fische im Wasser herumschwimmen und je mehr Fischer darin herumfischen, desto mehr falsche Fische in's Netz gehen.

In den letzten Jahren sind im Bezug auf die molekularbiologischen Methoden und den Erkenntnisstand der Genetik und das Verständnis der untersuchten polygenen Erkrankungen durch die Genom Projekte zur Erforschung des menschlichen und murinen Genoms erhebliche Fortschritte gemacht worden. Im Bereich der Methodik heißt das, dass verbesserte und schnellere Genotypisierungsmethoden die Bewältigung immer größerer Probenmengen und somit immer feinere und genauere Untersuchungen ermöglichen. Bei gleichzeitig verbesserten Untersuchungsmethoden zur Definition und Differenzierung der untersuchten Phänotypen und verbesserten molekularbiologischen Methoden rückt der Zeitpunkt der Aufklärung genetischer Ursachen polygener Erkrankungen in die nahe Zukunft. Dazu sind jedoch viele weitere Studien notwendig.

## 6. Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ACRA	Acetylcholin Rezeptor alpha
AFP	alpha-Fetoprotein
ALK	Anaplastische Lymphoma Kinase
ALOX5AP	Arachidonsäure-5-lipoxygenase aktivierendes Protein
APC	antigenpräsentierende Zelle (dendritische Zellen, Makrophagen, B-Zellen)
Bet v	Birkenpollenextrakt, die Birkenpollenhauptallergene Bet v I/ II sind die Hauptbestandteile des Gemisches
BHR	bronchiale Hyperreaktivität
BLT	LTB <sub>4</sub> -receptor
CC16, CC10	Clara Cell Secretory Protein
cM	centi Morgan, $\frac{1}{100}$ des Abstandes zwischen zwei gleichzeitig stattfindenden crossing over-Ereignissen bei der Meiose auf einem Chromosom, ca. 100 kBasen
COPD	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung/ chronic obstructive pulmonary disease
CRHR	corticotropin releasing hormon receptor
Crossing over	Rekombination von 2 Allelen eines Chromosoms bei der Eizellbildung (Miose)
CSFG	= GCSF granulocyte colony stimulating factor
CSF3R	colony-stimulating factor 3 receptor
CysLT2R	CysLT <sub>2</sub> -receptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimental autoimmune encephalitis
FGF	fibroblast growth factor
GNAS	GS Protein alpha
Heritabilität	genetischer Anteil an der phänotypischen Variation eines Merkmals
HLA	human Leucocyt Antigen, humanes Leukozytenantigen
i.p.	intraperitoneal
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-4, IL-5	Interleukin-4, Interleukin-5, etc.
IL12RB2	Gen der IL-12 Rezeptor Untereinheit B2
LTC4S	LTC <sub>4</sub> synthase
LTA4H	LTA <sub>4</sub> -hydrolase
LU	laboratory unit,
MC-GF	Mast Cell growth Factor, Stem Cell Factor
MCh	Metacholin
MCPT6 + 7	Mast Zell Proteasen 6 und 7
MHC	major histokompatibility complex, Hauptantigenkomplex auf Zellen bei Mäusen
MPO	Myeloperoxidase
NCF	neutrophilic chemotactic factor, Chemotaktischer Faktor von Neutrophilen,
NFE2	nuclear factor erytroid derived 2

NGFR	nerve growth factor receptor, Nervenwachstumsfaktorrezeptor
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PBS	phosphate buffered saline, physiologische Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PDGFB	platelet derived growth factor (B-chain)
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit polipeptide 1 [p85 $\alpha$ ]
PLA2G4	Phospholipase A2
PLA2G2A	Phospholipase A2 type IIA
QTL	quantitative trait locus, Genort, für den eine Assoziation mit einem Merkmal beschrieben wurde
RANTES	<u>R</u> egulated on <u>A</u> ctivation, <u>N</u> ormal <u>T</u> cell <u>E</u> xpressed and <u>S</u> ecreted, ein Zytokin
RT	Raumtemperatur
SCC4	QTL für Kolontumoren, Susceptible Colon Cancer 4
SNP, SNTP	single nuclear (tandem) repeat
Sos	<u>S</u> on of <u>S</u> evenless
SSLP	<u>S</u> imple <u>S</u> equene <u>L</u> enght <u>P</u> olymorphism – Mikrosatellitenpolymorphismus, bestehend aus 10-50 Kopien von Folgen aus 1-6 Basenpaaren. Als genetischer Marker geeignet sind solche SSLP, deren Anzahl an Basenwiederholungen in einer Population hoch polymorph ist. Solche Marker lassen sich im Abstand von 30 kb im Genom außerhalb oder auch innerhalb von Exons oder Introns finden.
STAT6	<u>S</u> ignal <u>T</u> ransducer and <u>A</u> ctivator of <u>T</u> ranscription 6
Th-1, Th-2	T-Helfer-Zellen vom Typ1/2 bzw. Immunantwort mit den entsprechenden Zellen
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
ü.N.	über Nacht

## 6.2 Literaturverzeichnis

- Akdis,C.A., Akdis,M., Trautmann,A., and Blaser,K. (2000).** Immune regulation in atopic dermatitis. *Curr. Opin. Immunol.* *12* , 641-646.
- Akdis,M., Verhagen,J., Taylor,A., Karamloo,F., Karagiannidis,C., Crameri,R., Thunberg,S., Deniz,G., Valenta,R., Fiebig,H., Kegel,C., Disch,R., Schmidt-Weber,C.B., Blaser,K., and Akdis,C.A. (2004).** Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* *199*, 1567-1575.
- Alessandrini,F., Jakob,T., Wolf,A., Wolf,E., Balling,R., Hrabe-de-Angelis,M., Ring,J., and Behrendt,H. (2001).** ENU mouse mutagenesis: generation of mouse mutants with aberrant plasma IgE levels. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *124*, 25-28.
- Alm,J.S., Swartz,J., Lilja,G., Scheynius,A., and Pershagen,G. (1999).** Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet* *353*, 1485-1488.
- Altmüller,J., Palmer,L.J., Fischer,G., Scherb,H., and Wjst,M. (2001).** Genomwide Scans of Complex Human Diseases: True Linkage Is Hard to Find. *Am. J. Hum. Genet.* *69*, 936-950.
- Anonymous (1997).** A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *Nat. Genet.* *15*, 389-392.
- Barnes,K.C. (2000).** Atopy and asthma genes - Where do we stand? *Allergy* *55*, 803-817.
- Barnes,K.C., Neely,J.D., Duffy,D.L., Freidhoff,L.R., Breazeale,D.R., Schou,C., Naidu,R.P., Levett,P.N., Renault,B., Kucherlapati,R., Iozzino,S., Ehrlich,E., Beaty,T.H., and Marsh,D.G. (1996).** Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: Evidence from Afro-Caribbean and Caucasian populations. *Genomics* *37*, 41-50.
- Barnes,K.C., Freidhoff,L.R., Nickel,R., Chiu,Y.F., Juo,S.H., Hizawa,N., Naidu,R.P., Ehrlich,E., Duffy,D.L., Schou,C., Levett,P.N., Marsh,D.G., and Beaty,T.H. (1999).** Dense mapping of chromosome 12q13.12-q23.3 and linkage to asthma and atopy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *103*, 485-491.
- Barnes,K.C., Mathias,R.A., Nickel,R., Freidhoff,L.R., Stockton,M.L., Xue,X., Naidu,R.P., Levett,P.N., Casolaro,V., and Beaty,T.H. (2001).** Testing for gene-gene interaction controlling total IgE in families from Barbados: evidence of sensitivity regarding linkage heterogeneity among families. *Genomics* *71*, 246-251.
- Bjorksten,B. (1999).** The environmental influence on childhood asthma. *Allergy* *54*, 4917-4923.
- Bjorksten,B., Naaber,P., and Sepp,E. (1999).** The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin. Exp. Allergy* *29*, 342-346.
- Blaser,K. and Akdis,C.A. (2004).** Interleukin-10, T regulatory cells and specific allergy treatment. *Clin. Exp. Allergy* *34* , 328-331.
- Blumenthal,M.N., Rich,S.S., King,R., and Weber,J. (1998).** Approaches and issues in defining asthma and associated phenotypes map to chromosome susceptibility areas in large Minnesota families. The Collaborative Study for the Genetics of Asthma (CSGA). *Clin. Exp. Allergy* *28 Suppl*, 151-155.
- Blumenthal,M.N., Langefeld,C.D., Beaty,T.H., Bleecker,E.R., Ober,C., Lester,L., Lange,E., Barnes,K.C., Wolf,R., King,R.A., Solway,J., Oetting,W., Meyers,D.A., and Rich,S. (2004a).** A genom-wide search for allergic response (atopy) genes in three ethnic groups: Collaborative Study on the Genetics of Asthma. *Hum Genet* *114*, 157-164.
- Blumenthal,M.N., Ober,C., Beaty,T.H., Bleecker,E.R., Langefeld,C.D., King,R.A., Lester,L., Cox,N., Barnes,K., Togias,A., Mathias,R., Meyers,D.A., Oetting,W., Rich,S.S., and CSGA (2004b).** Genome scan for loci linked to mite sensitivity: The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *Genes Immun.* *5*, 226-231.

**Britton, J.R. and Weiss, S.T. (1997).** Health effects of passive smoking. *Thorax* 152, 904.

**Celedon, J.C., Litonjua, A.A., and Ryan, L. (2002).** Lack of association between antibiotic use in the first year of life and asthma, allergic rhinitis or eczema at 5 years of age. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 72-75.

**Cheng, L., Enomoto, T., Hirota, T., Shimizu, M., Takahashi, N., Akahoshi, M., Matsuda, A., Dake, Y., Doi, S., Enomoto, K., Yamasaki, A., Fukuda, S., Mao, X.Q., Hopkin, J.M., Tamari, M., and Shirakawa, T. (2004).** Polymorphisms in ADAM33 are associated with allergic rhinitis due to Japanese cedar pollen. *Clin. Exp. Allergy* 34, 1192-1201.

**Committee of Environmental and Occupational Health Assembly of the American Society (1996).** Health effects of outdoor air pollution. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 3-50.

**Cookson, W.O.C.M., Ubhi, B., Lawrence, R., Abecasis, G.R., Walley, A.J., Cox, H.E., Coleman, R., Leaves, N.I., Trembath, R.C., Moffatt, M.F., and Harper, J.I. (2001).** Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nat. Genet.* 27, 372-373.

**Cottrez, F., Hurst, S.D., Coffman, R.L., and Groux, H. (2000).** T regulatory 1 cells inhibit a Th2-specific response in vivo. *J. Immunol.* 165, 4848-4853.

**Cox, H.E., Moffatt, M.F., Faux, J.A., Walley, A.J., Coleman, R., Trembath, R.C., Cookson, W.O.C.M., and Harper, J.I. (1998).** Association of atopic dermatitis to the beta subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor. *Br. J. Dermatol.* 138, 182-187.

**Daniels, S.E., Bhattacharya, S., James, A., Leaves, N.I., Young, A., Hill, M.R., Faux, J.A., Ryan, G.F., Le-Souef, P.N., Lathrop, G.M., Musk, A.W., and Cookson, W.O.C.M. (1996).** A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 383, 247-250.

**Daser, A., Batjer, N., Kolsch, U., Kotz, K., Schmeling, H., Schou, C., and Renz, H. (1998a).** Quantitative assessment of immediate cutaneous hypersensitivity in a model of genetic predisposition to atopy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 117, 239-243.

**Daser, A., Gerstner, B., Hansen, R., Bulfone-Paus, S., and Renz, H. (1998b).** Impaired NK1.1+ T cells do not prevent the development of an IgE-dependent allergic phenotype. *Clin. Exp. Allergy* 28, 950-955.

**Daser, A., Koetz, K., Batjer, N., Jung, M., Ruschendorf, F., Goltz, M., Ellerbrok, H., Renz, H., Walter, J., and Paulsen, M. (2000).** Genetics of atopy in a mouse model: polymorphism of the IL-5 receptor alpha chain. *Immunogenetics* 51, 632-638.

**Daser, A. (2003).** Genetik allergischer Erkrankungen. In *Allergologie*, W.Heppt, H.Renz, and M.Röcken, eds. (Berlin: Springer-Verlag), pp. 13-23.

**De-Sanctis, G.T., Merchant, M., Beier, D.R., Dredge, R.D., Grobholz, J.K., Martin, T.R., Lander, E.S., and Drazen, J.M. (1995).** Quantitative locus analysis of airway hyperresponsiveness in A/J and C57BL/6J mice. *Nat. Genet.* 11, 150-154.

**De-Sanctis, G.T. and Drazen, J.M. (1997).** Genetics of airway responsiveness in the inbred mouse. *Res. Immunol.* 148, 73-79.

**De-Sanctis, G.T., Singer, J.B., Jiao, A., Yandava, C.N., Lee, Y.H., Haynes, T.C., Lander, E.S., Beier, D.R., and Drazen, J.M. (1999).** Quantitative trait locus mapping of airway responsiveness to chromosomes 6 and 7 in inbred mice. *Am. J. Physiol.* 277, L1118-L1123.

**De-Sanctis, G.T., Daheshia, M., and Daser, A. (2001).** Genetics of airway hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, 11-20.

**Dizier, M.H., Besse-Schmittler, C., Guilloud-Bataille, M., Annesi-Maesano, I., Boussaha, M., Bousquet, J., Charpin, D., Degioanni, A., Gormand, F., Grimfeld, A., Hochez, J., Hyne, G., Lockhart, A., Luillier-Lacombe, M., Matran, R., Meunier, F., Neukirch, F., Pacheco, Y., Parent, V., Paty, E., Pin, I., Pison, C., Scheinmann, P., Thobie, N.,**

Vervloet,D., and Kauffmann,F. (2000). Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEA study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 1812-1818.

**Dizier,M.H., Bouzigon,E., Guilloud-Bataille,M., Betard,C., Bousquet,J., Charpin,D., Gormand,F., Hochez,J., Just,J., Lemainque,A., Le Moual,N., Matran,R., Neukirch,F., Oryszczyn,M.P., Paty,E., Pin,I., Vervloet,D., Kauffmann,F., Lathrop,M., Demenais,F., and Annesi-Maesano,I. (2005).** Genome screen in the French EGEA study: detection of linked regions shared or not shared by allergic rhinitis and asthma. *Genes Immun.* 6, 95-102.

**Dold,S., Wjst,M., von-Mutius,E., Reitmeir,P., and Stiepel,E. (1992).** Genetic risk for asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. *Arch. Dis. Child* 67, 1018-1022.

**Donfack,J., Tsalenko,A., Hoki,D.M., Parry,R., Solway,J., Lester,L.A., and Ober,C. (2000).** HLA-DRB1\*01 alleles are associated with sensitization to cockroach allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 960-966.

**Downs,S.H., Marks,G.B., Sporik,R., Belosouva,E.G., Car,N.G., and Peat,J.K. (2001).** Continued increase in the prevalence of asthma and atopy. *Arch. Dis. Child* 84, 20-23.

**Drazen,J.M., Takebayashi,T., Long,N.C., De-Sanctis,G.T., and Shore,S.A. (1999).** Animal models of asthma and chronic bronchitis. *Clin. Exp. Allergy* 29 *Suppl*, 237-47.

**Eerdewegh,P., Little,R.D., Dupuis,J., Mastro,R.G., Falls,K., Simon,J., Torrey,D., Pandit,S., McKenny,J., Braunschweiger,K., Walsh,A., Liu,Z., Hayward,B., Folz,C., Manning,S.P., Bawa,A., Saracino,L., Thackston,M., Benchekroun,Y., Capparella,N., Wang,M., Adair,R., Feng,Y., Dubois,J., FitzGerald,M.G., Huang,H., Gibson,R., Allen,K.M., Pedan,A., Danzig,M.R., Umland,S.P., Egan,R.W., Cuss,F.M., Rorke,S., Clough,J.B., Holloway,J.W., Holgate,S.T., and Keith,T.P. (2002).** Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 418, 426-430.

**Emala,C. and Hirshman,C. (2004).** Animal models of bronchial hyperreactivity. In *Genetics of Asthma and Atopy*, I.P.Hall, ed. (Nottingham, Basel, Freiburg, Paris, London, New York, New Delhi, Bangkok, Singapore, Tokyo, Sydney: Karger), pp. 35-52.

**Epstein,M.M. (2004).** Do Mouse Models of Allergic Asthma Mimic Clinical Disease? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 133, 84-100.

**Ewart,S.L., Mitzner,W., DiSilvestre,A., Meyers,D.A., and Levitt,R.C. (1996).** Airway hyperresponsiveness to acetylcholine: segregation analysis and evidence for linkage to murine chromosome 6. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14, 487-495.

**Ewart,S.L., Kuperman,D., Schadt,E., Tankersley,C., Grupe,A., Shubitowski,D.M., Peltz,G., and Wills-Karp,M. (2000).** Quantitative trait loci controlling allergen-induced airway hyperresponsiveness in inbred mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23, 537-545.

**Farooqi,I.S. and Hopkin,J.M. (1998).** Early childhood infection and atopic disorder. *Thorax* 53, 927-932.

**Gell,P.G.H., Coombs,R.R.A., and Lachmann,P.J. (1975).** Classification of allergic reactions for clinical hypersensitivity and disease. In *Clinical Aspects of Immunology*, (Oxford: Blackwell Scientific), pp. 761-781.

**Gerhard,H., Christian,G., Michael,S., Hassan,A., Tara,D., Dieter,Y.K., Wilfried,K., Joachim,K., Johannes,F., Radvan,U., and Thomas,F. (2003).** Study on the Prevention of Allergy in Children in Europe (SPACE): Allergic sensitization at 1 year of age in a controlled trial of allergen avoidance from birth. *Pediatric Allergy and Immunology* 14, 10-17.

**Gould,H.J., Sutton,B.J., Bevil,A.J., Bevil,R.L., McCloskey,N., Coker,H., Fear,D., and Smurthwaite,L. (2003).** The biology of IgE and the basis of allergic disease. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 579-628.

**Gurunathan,S., Stobie,L., Prussin,C., Sacks,D.L., Glaichenhaus,N., Fowell,D.J., Locksley,R.M., Chang,J.T., Wu,C.Y., and Seder,R.A. (2000).** Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. *J. Immunol.* 165, 915-924.

**Haagerup,A., Bjerke,T., Schiøtz,P.O., Binderup,H.G., Dahl,R., and Kruse,T.A. (2002).** Asthma and Atopy - a total genom scan for susceptibility genes. *Allergy* 57, 680-686.

**Hakonarson,H., Bjornsdottir,U.S., Halapi,E., Palsson,S., Adalsteinsdottir,E., Gislason,D., Finnbogason,G., Gislason,T., Kristjansson,K., Arnason,T., Birkisson,I., Frigge,M.L., Kong,A., Gulcher,J.R., and Stefansson,K. (2002).** A Major Susceptibility Gene for Asthma Maps to Chromosome 14q24. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 483-491.

**Hamelmann,E., Schwarze,J., Takeda,K., Oshiba,A., Larsen,G., Irvin,C., and Gelfand,E.W. (1997).** Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156, 766-775.

**Herz,U., Lumpp,U., Da-Palma,J.C., Ennsle,K., Takatsu,K., Schnoy,N., Daser,A., Kottgen,E., Wahn,U., and Renz,H. (1996a).** The relevance of murine animal models to study the development of allergic bronchial asthma. *Immunol. Cell Biol.* 74, 209-217.

**Herz,U., Lumpp,U., Daser,A., Gelfand,E.W., and Renz,H. (1996b).** Murine animal models to study the central role of T cells in immediate-type hypersensitivity responses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 409, 25-32.

**Herz,U., Gerhold,K., Gruber,C., Braun,A., Wahn,U., Renz,H., and Paul,K. (1998).** BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 867-874.

**Herz,U., Bunikowski,R., Mielke,M., and Renz,H. (1999).** Contribution of bacterial superantigens to atopic dermatitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118, 240-241.

**Herz,U., Ahrens,B., Scheffold,A., Joachim,R., Radbruch,A., and Renz,H. (2000a).** Impact of in utero Th2 immunity on T cell deviation and subsequent immediate-type hypersensitivity in the neonate. *Eur. J. Immunol.* 30, 714-718.

**Herz,U., Lacy,P., Renz,H., and Erb,K. (2000b).** The influence of infections on the development and severity of allergic disorders. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 632-640.

**Hill,M.R., James,A.L., Faux,J.A., Ryan,G., Hopkin,J.M., Le-Souef,P., Musk,A.W., and Cookson,W.O.C.M. (1995).** Fc epsilon RI-beta polymorphism and risk of atopy in a general population sample. *BMJ.* 311, 776-779.

**Hizawa,N., Collins,G., Rafnar,T., Huang,S.K., Duffy,D.L., Weber,J.L., Freidhoff,L.R., Ehrlich,E., Marsh,D.G., Beaty,T.H., and Barnes,K.C. (1998a).** Linkage analysis of *Dermatophagoides pteronyssinus*-specific IgE responsiveness with polymorphic markers on chromosome 6p21 (HLA-D region) in Caucasian families by the transmission/disequilibrium test. Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 443-448.

**Hizawa,N., Freidhoff,L.R., Chiu,Y.F., Ehrlich,E., Luehr,C.A., Anderson,J.L., Duffy,D.L., Dunston,G.M., Weber,J.L., Huang,S.K., Barnes,K.C., Marsh,D.G., and Beaty,T.H. (1998b).** 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.* 102, 436-442.

**Hizawa,N., Freidhoff,L.R., Ehrlich,E., Chiu,Y.F., Duffy,D.L., Schou,C., Dunston,G.M., Beaty,T.H., Marsh,D.G., Barnes,K.C., and Huang,S.K. (1998c).** Genetic influences of chromosomes 5q31-q33 and 11q13 on specific IgE responsiveness to common inhaled allergens among African American families. Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 449-453.

**Holt,P.G., Sly,P.D., and Bjorksten,B. (1997).** Atopy versus infectious diseases in childhood: A question of balance. *Pediatr. Allergy Immunol.* 8, 53-58.

**Huang,S.K. and Marsh,D.G. (1993).** Genetics of allergy. *Ann. Allergy* 70, 347-358.

**Janeway-CA,J. and Travers,P. (1996).** The Humoral Immune Response. In *Immunobiology - The Immune System In Health And Disease*, J.Janeway-CA and P.Travers, eds. (1. London, San Francisco, Philadelphia; 2.

Edinburgh, London, New York; 3. New York, London: 1.Current Biology Ltd. & 2.Churchill Livingstone & 3.Garland Publishing Inc.), p. 8.1-8.31.

**Kannan,M.S. and Deshpande,D.A. (2003).** Allergic Asthma in mice: What determines the phenotype? *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 285, L29-L31.

**Kay,A.B. (1996).** Pathology of mild, severe, and fatal asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, S66-S69.

**Ke,Y., Pearce,K., Lake,J.P., Ziegler,H.K., and Kapp,J.A. (1997).** Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance. *J. Immunol.* 158, 3610-3618.

**Keats,A., Goodnow,N., and Goodnow,C.C. (2001).** Genome-Wide ENU Mutagenesis to Reveal Immune Regulators. *Immunity* 15, 409-418.

**Koetz, K.** Untersuchung der genetischen Disposition eines Phänotyps für die allergische Soforttypreaktion der Haut im Mausmodell: Nachweis einer Assoziation mit einem Kandidatengen auf Chromosom 6. 19-4-2002. Humboldt-Universität zu Berlin, Dissertation

**Kohara,Y., Tanabe,K., Matsuoka,K., Kanda,N., Matsuda,H., Karasuyama,H., and Yonekawa,H. (2001).** A major determinant quantitative-trait locus responsible for atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice is located on Chromosome 9. *Immunogenetics* 53, 15-21.

**Kurz,T., Altmüller,J., Strauch,K., Ruschendorf,F., Heinzmann,A., Moffatt,M.F., Cookson,W.O.C.M., Inacio,F., Nurnberg,P., Stassen,H.H., and Deichmann,K.A. (2005).** A genome-wide screen on the genetics of atopy in a multiethnic European population reveals a major atopy locus on chromosome 3q21.3. *Allergy* 60, 192-199.

**Lander,E.S., Green,P., Abrahamson,J., Barlow,A., Daly,M.J., Lincoln,S.E., and Newburg,L. (1987).** MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1, 174-181.

**Lander,E.S. and Botstein,D. (1989).** Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185-199.

**Lander,E.S. and Schork,N.J. (1994).** Genetic dissection of complex traits. *Science* 265, 2037-2048.

**Lander,E. and Kruglyak,L. (1995).** Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat. Genet.* 11, 241-247.

**Lee,Y.A., Wahn,U., Kehrt,R., Tarani,L., Businco,L., Gustafsson,D., Andersson,F., Oranje,A.P., Wolkertstorfer,A., Berg,A.V., Hoffmann,U., Kuster,W., Wienker,T., Ruschendorf,F., and Reis,A. (2000).** A major susceptibility locus for atopic dermatitis maps to chromosome 3q21. *Nat. Genet.* 26, 470-473.

**Levitt,R.C. and Mitzner,W. (1988).** Expression of airway hyperreactivity to acetylcholine as a simple autosomal trait in mice. *FASEB J.* 2, 2605-2608.

**Levitt,R.C. and Mitzner,W. (1989).** Autosomal recessive inheritance of airway hyperreactivity to 5-hydroxytryptamine. *J. Appl. Physiol.* 67, 1125-1132.

**Lewis,S. (1998).** Infections in asthma and allergy. *Thorax* 53, 911-912.

**Lienert,G.A. (1967).** Kapitel 10: Qualitative Methoden der subjektiven Merkmalsbeurteilung. In *Biostatistik, Verteilungsfreie Methoden in der*, (Meisenheim Verlag Anton Hain), pp. Band II/ 1 - 67.

**Liew,F.Y. (2002).** TH1 and TH2 cells: a historical perspective. *Nature Rev Immunol* 2, 55-60.

**Liu,X., Nickel,R., Beyer,K., Wahn,U., Ehrlich,E., Freidhoff,L.R., Bjorksten,B., Beaty,T.H., Huang,S.K., Zepp,F., Wahn,V., Forster,J., Bauer,C., and Bergmann,R. (2000).** An IL13 coding region variant is associated with a high total serum IgE level and atopic dermatitis in the German multicenter atopy study (MAS-90). *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, 167-170.

- Los,H., Koppelman,G.H., and Postma,D.S. (1999).** The importance of genetic influences in asthma. *Eur. Respir. J.* *14*, 1210-1227.
- Los,H., Postmus,P.E., and Boomsma,D.I. (2001).** Asthma Genetics and Intermediate Phenotypes: A Review From Twin Studies. *Twin Research* *4*, 81-93.
- Manly,K.F., Cudmore,R.H.Jr., and Meer,J.M. (2001a).** Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* *12*, 930-932.
- Manly, K. F., Meer, J., and Cudmore, R. H. Jr.** User Manual for Map Manager QTX. [beta12]. (2001b). Roswell Park Cancer Institute. Computerprogram
- Marsh,D.G., Neely,J.D., Breazeale,D.R., Ghosh,B., Freidhoff,L.R., Ehrlich-Kautzky,E., Schou,C., Krishnaswamy,G., and Beaty,T.H. (1994).** Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* *264*, 1152-1156.
- Marsh,D.G. and Bias,W.B. (1988).** The genetics of atopic allergy. In *Immunologic Diseases*, M.Samter, D.W.Talmage, M.M.Frank, and H.N.Claman, eds. (Boston: Little Brown and Co.), pp. 981-1008.
- Mathias,R.A., Freidhoff,L.R., Blumenthal,M.N., Meyers,D.A., Lester,L., King,R., Xu,J.F., Solway,J., Barnes,K.C., Pierce,J., Stine,O.C., Togias,A., Oetting,W., Marshik,P.L., Hetmanski,J.B., Huang,S.K., Ehrlich,E., Dunston,G.M., Malveaux,F., Banks-Schlegel,S., Cox,N.J., Bleecker,E., Ober,C., Beaty,T.H., and Rich,S.S. (2001).** Genome-wide linkage analyses of total serum IgE using variance components analysis in asthmatic families. *Genet. Epidemiol.* *20*, 340-355.
- Meyers,D.A., Bias,W.B., and Marsh,D.G. (1982).** A genetic study of total IgE levels in the Amish. *Hum. Hered.* *32*, 15.
- Meyers,D.A., Beaty,T.H., Colyer,C.R., and Marsh,D.G. (1991).** Genetics of total serum IgE levels: a regressive model approach to segregation analysis. *Genet. Epidemiol.* *8*, 351-359.
- Meyers,D.A., Postma,D.S., Panhuysen,C.I., Xu,J., Amelung,P.J., Levitt,R.C., and Bleecker,E.R. (1994).** Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5. *Genomics* *23*, 464-470.
- Miyabara,Y., Ichinose,T., Takano,H., Lim,H.B., and Sagai,M. (1998).** Effects of diesel exhaust on allergic airway inflammation in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* *102*, 805-812.
- Moffatt,M.F. and Cookson,W.O.C.M. (1999).** Genetics of asthma and inflammation: the status. *Curr. Opin. Immunol.* *11*, 606-609.
- Moffatt,M.F., Traherne,J.A., Abecasis,G.R., and Cookson,W.O.C.M. (2000).** Single nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium within the TCR alpha/delta locus. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 1011-1019.
- Mutius,E.V., Martinez,F., Fritsch,C., Nicolai,T., Roell,G., and Thiemann,H.-H. (1994).** Prevalence of Asthma and Atopy in Two Areas of West and East Germany. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *149*, 358-364.
- Natori,K., Tamari,M., Watanabe,O., Onouchi,Y., Shiimoto,Y., Kubo,S., and Nakamura,Y. (1999).** Mapping of a gene responsible for dermatitis in NOA (Naruto Research Institute Otsuka Atrichia) mice, an animal model of allergic dermatitis. *J. Hum. Genet.* *44*, 372-376.
- Neuhaus-Steinmetz,U., Uffhausen,F., Herz,U., and Renz,H. (2000).** Priming of allergic immune responses by repeated ozone exposure in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *23*, 228-233.
- Nickel,R., Wahn,U., Hizawa,N., Maestri,N., Duffy,D.L., Barnes,K.C., Beyer,K., Forster,J., Bergmann,R., Zepp,F., Wahn,V., and Marsh,D.G. (1997).** Evidence for linkage of chromosome 12q15-q24.1 markers to high total serum IgE concentrations in children of the German Multicenter Allergy Study. *Genomics* *46*, 159-162.
- Nickel,R., Beyer,K., Huang,S.K., Barnes,K.C., and Wahn,U. (1999).** Genetic markers of atopy in infancy: results from the German Multicenter Allergy Study. *Clin. Exp. Allergy* *29 Suppl*, 423-425.

- Nicolai, T., Bellach, B., Mutius, E.V., Thefeld, W., and Hoffmeister, H. (1997).** Increased prevalence of sensitization against aeroallergens in adults in West compared with East Germany. *Clin. Exp. Allergy* 27, 886-892.
- Nicolai, T., Meigel, W., and Kerscher, M. (1999).** 1 - Entstehung der Allergie 2 - Antihistaminika. In *Allergie - Prävention und Therapie mit modernen Antihistaminika*, W. Sterry and J. Ring, eds. (Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag), pp. 1-24.
- Nicolaides, N.C., Holroyd, K.J., Ewart, S.L., Eleff, S.M., Kiser, M.B., Dragwa, C.R., Sullivan, C.D., Grasso, L., Zhang, L.Y., Messler, C.J., Zhou, T., Kleeberger, S.R., Buetow, K.H., and Levitt, R.C. (1997).** Interleukin 9: A candidate gene for asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13175-13180.
- Nusslein-Vollhard, C. and Wischaus, E. (1980).** Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Ober, C., Cox, N.J., Abney, M., Di-Rienzo, A., Lander, E.S., Changyaleket, B., Gidley, H., Kurtz, B., Lee, J., Nance, M., Pettersson, A., Prescott, J., Richardson, A., Schlenker, E., Summerhill, E., Willadsen, S., and Parry, R. (1998).** Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1393-1398.
- Ober, C., Tsalenko, A., Parry, R., and Cox, N.J. (2000).** A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1154-1162.
- Palmer, L.J., Barnes, K.C., Burton, P.R., Chen, H., Cookson, W.O.C.M., Deichmann, K.A., Elston, R.C., Holloway, J.W., Jacobs, K.B., Laitinen, T., and Wjst, M. (2001).** Meta-analysis for linkage to asthma and atopy in the chromosome 5q31-33 candidate region. *Hum. Mol. Genet.* 10, 891-899.
- Palmer, L.J. and Cookson, W.O.C.M. (2000).** Genomic approaches to understanding asthma. *Genome Res.* 10, 1280-1287.
- Panhuysen, C.I.M., Meyers, D.A., Postma, D.S., and Bleeker, E.R. (1995).** The genetics of asthma and atopy. *Allergy* 50, 863-869.
- Papadopoulos, N.G. and Johnston, S.L. (1998).** Viruses and asthma exacerbations. *Thorax* 53, 913-914.
- Piccirillo, C.A. and Shevach, E.M. (2004).** Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the area of peripheral tolerance. *Semin. Immunol.* 16, 81-88.
- Province, M.A. (2001).** The Significance of Not Finding a Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 660-663.
- Prows, D.R., Shertzer, H.G., Daly, M.J., Sidman, C.L., and Leikauf, G.D. (1997).** Genetic analysis of ozone-induced acute lung injury in sensitive and resistant strains of mice. *Nat. Genet.* 17, 471-474.
- Prows, D.R., Daly, M.J., Shertzer, H.G., and Leikauf, G.D. (1999).** Ozone-induced lung injury: genetic analysis of F2 mice generated from A/J and C57BL/6J strains. *Am. J. Physiol.* 277, L372-L380.
- Renz, H.** Novartis-Preis Verleihung - Festvortrag 2002. Hearing
- Robertson, M. and Lawrence, E. (1996).** Immune Responses in the Absence of Infection. In *Immuno Biology - The Immun System in Health and Disease*, J. Janeway-CA and P. Travers, eds. (London: Current Biology Ltd.), p. 11.1-11.14.
- Sadakane, K., Ichinose, T., Takano, H., Yanagisawa, R., Sagai, M., Yoshikawa, T., and Shibamoto, T. (2002).** Murine strain differences in airway inflammation induced by diesel exhaust particles and house dust mite allergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 128, 220-228.
- Shao, C., Suzuki, Y., Kamada, F., Kanno, K., Tamari, M., Hasegawa, K., Aoki, Y., Kure, S., Yang, X., Endo, H., Takayangi, R., Nakazawa, C., Morikawa, T., Morimoto, M., Miyabayashi, S., Chiba, Y., Karahashi, M., Saito, S., Tamura, G., Shirakawa, T., and Matsubara, Y. (2004).** Linkage and association of childhood asthma with the chromosome 12 genes. *J. Hum. Genet.* 49, 115-122.

- Shirakawa,T.**, Mao,X.Q., Sasaki,S., Enomoto,T., Kawai,M., Morimoto,K., and Hopkin,J. (1996). Association between atopic asthma and a coding variant of Fc epsilon RI beta in a Japanese population. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1129-1130.
- Shinagawa,K.** and Kojima,M. (2003). Mouse Model of Airway Remodeling - Strain Differences. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 159-167.
- Tager,I.B.** (1998). Smoking and childhood asthma - where do we stand? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, 349-351.
- Takeda,K.**, Haczku,A., Lee,J.J., Irvin,C.G., and Gelfand,E.W. (2001). Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281, L394-L402.
- Taylor,A.**, Verhagen,J., Akdis,C.A., and Akdis,M. (2004). T regulatory cells in allergy and health: a question of allergen specificity and balance. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 135, 73-82.
- Thompson,C.** and Powrie,F. (2004). Regulatory T cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 408-414.
- Trabetti,E.**, Cusin,V., Malerba,G., and et al. (1998). Association of the Fc epsilon RI beta gene with bronchial hyper-responsiveness in an Italian population. *J Med Genet* 35, 680-681.
- Warner,J.O.** (2004). The early life origins of asthma and related allergic disorders. *Arch. Dis. Child* 89, 97-102.
- Watanabe,O.**, Tamari,M., Natori,K., Onouchi,Y., Shiimoto,Y., Hiraoka,I., and Nakamura,Y. (2001). Loci on murine chromosomes 7 and 13 that modify the phenotype of the NOA mouse, an animal model of atopic dermatitis.pdf. *J. Hum. Genet.* 46, 221-224.
- Whitehead,G.S.**, Walker,J.K., Berman,K.G., Foster,W.M., and Schwartz,D.A. (2003). Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 285, L32-L42.
- Wiesch,D.G.**, Meyers,D.A., and Bleeker,E.R. (1999). Genetics of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104, 895-901.
- Wilkinson,J.**, Thomas,N.S., Morton,N., and Holgate,S.T. (1999). Candidate gene and mutational analysis in asthma and atopy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118, 265-267.
- Wjst,M.**, Fischer,G., Immervoll,T., Jung,M., Saar,K., Rueschendorf,F., Reis,A., Ulbrecht,M., Gommelka,M., Weiss,E.H., Jaeger,L., Nickel,R., Richter,K., Kjellman,N.I., Griese,M., von-Berg,A., Gappa,M., Riedel,F., Boehle,M., van-Koningsbruggen,S., Schoberth,P., Szczepanski,R., Dorsch,W., Silbermann,M., Wichmann,H.E., and et.a. (1999). A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. *Genomics* 58, 1-8.
- Xu,J.**, Postma,D.S., Howard,T.D., Koppelman,G.H., Zheng,S.L., Stine,O.C., Bleeker,E.R., and Meyers,D.A. (2000). Major genes regulating total serum immunoglobulin E levels in families with asthma. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1163-1173.
- Xu,J.**, Meyers,D.A., Ober,C., Blumenthal,M.N., Mellen,B., Barnes,K.C., King,R.A., Lester,L.A., Howard,T.D., Solway,J., Langefeld,C.D., Beaty,T.H., Rich,S.S., Bleeker,E.R., and Cox,N.J. (2001a). 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.* 68, 1437-1446.
- Xu,X.**, Fang,Z., Wang,B., Chen,C., Guang,W., Jin,Y., Yang,J., Lewitzki,S., Aelony,A., Parker,A., Meyer,J., Weiss,S.T., and Xu,X. (2001b). A genomewide search for quantitative-trait loci underlying asthma. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 1271-1277.
- Yokouchi,Y.**, Nukaga,Y., Shibasaki,M., Noguchi,E., Kimura,K., Ito,S., Nishihara,M., Yamakawa-Kobayashi,K., Takeda,K., Imoto,N., Ichikawa,K., Matsui,A., Hamaguchi,H., and Arinami,T. (2000). 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* 66, 152-160.

**Zhang, Y., Lamm, W.J., Albert, R.K., Chi, E.Y., Henderson, W.R., and Lewis, D.B. (1997).** Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *155*, 661-669.

**Zhang, Y., Lefort, J., Kearsy, V., Lapa, Cookson, W.O.C.M., and Vargaftig, B.B. (1999).** A genome-wide screen for asthma-associated quantitative trait loci in a mouse model of allergic asthma. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 601-605.

**Zhang, Z.X., Yang, L., Young, K.J., DuTemple, B., and Zhang, L. (2000).** Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat. Med.* *6*, 782-789.

**Zuraw, B.L. and Herschbach, J. (2000).** Detection of C1 inhibitor mutations in patients with hereditary angioedema. *J. Allergy Clin. Immunol.* *105*, 541-546.

### **6.3 Publikationen, die aus dieser Arbeit hervorgegangen sind**

1. Daser A., Batjer N., Koelsch U., Kotz K., Schmeling H., Schou C., Renz H. Quantitative assessment of immediate cutaneous hypersensitivity in a model of genetic predisposition to atopy, *Int Arch Allergy Immunol.* 1998;**117**: 239-43.

2. Daser A, Koetz K, Batjer N, Jung M, Ruschendorf F, Goltz M, Ellerbrok H, Renz H, Walter J, Paulsen M. Genetics of atopy in a mouse model: polymorphism of the IL-5 receptor alpha chain. *Immunogenetics* 2000; **51**: 632-638.

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben:

Geburtstag und Geburtsort 15.09.1972 in Berlin  
 Familienstand ledig

### Schulbildung:

Sept. 1979 - Aug. 1989 Allgemeinbildende polytechnische Oberschule, Berlin  
 Sept. 1989 - Aug. 1991 Spezialklasse für Mathematik/Physik, Humboldt-Universität zu Berlin (Gymnasium)

### Wehrersatzdienst:

Sept. 1991 - Sept. 1992 Chirurgicaler OP des Krankenhauses im Friedrichshain, Berlin

### Studium/ praktische Ausbildung:

Okt. 1992 – Okt. 1999 Medizinstudium an der Freien Universität und der Humboldt-Universität zu Berlin

1997/98 Auslandsstudium am Karolinska-Institut, Stockholm/ Schweden

April 1996 - März 1999 Tutor im Praktikum der klinischen Chemie der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin

Febr./März 1995 Famulatur, Intensivstation, Krankenhaus im Friedrichshain, Berlin

Sept. 1996 Famulatur, Orthopädische Praxis, Berlin

Febr./März 1997 Famulatur, Internistische Praxis, Princeton/ USA

Okt. 1998 - Okt. 1999 praktisches Jahr:

- Chirurgie, Kantonsspital Glarus/ Schweiz
- Pädiatrie, Humboldt-Universität zu Berlin
- Innere Medizin, Jüdisches Krankenhaus, Berlin

Jan. 2000-Juni 2001 Arzt im Praktikum, Klinik für Neonatologie, Charité, Humboldt-Universität zu Berlin, Forschungsprojekt zur Lungenperfusion bei Flüssigkeitsbeatmung unter Leitung von Dr. Proquitté

Aug. –Okt. 2001 Assistenzarzt, orthopädische Abteilung, Brandenburgklinik

April 2002 - wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Immunologie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Biochemische, molekulare und funktionelle Charakterisierung der TRAP1-Knockoutmaus (T-Zell-Signaltransduktion)

## **Meine akademischen Lehrer**

**waren**

### **in Marburg**

Prof. Dr. Renz

### **in Berlin**

Dipl. med. Airanow

Prof. Dr. Bauer

Prof. Dr. Baumgarten

Prof. Dr. Bertschat

Prof. Dr. Blümcke

Prof. Dr. Bogusch

Prof. Dr. Carsten

Dr. Dimroth

Prof. Dr. Dudenhausen

Prof. Dr. Eckhardt

Dr. Eljaschewitsch

Dr. Franke

Prof. Dr. Frei

Prof. Dr. Fuhrhop

Prof. Dr. Gaedicke

Prof. Dr. Grauel

Prof. Dr. Gugenmoos-Holzmann

Prof. Dr. Gossrau

Prof. Dr. Grüsser

Prof. Dr. Hahn

Prof. Dr. Hopf

Prof. Dr. Huang

Prof. Dr. Huhn

Prof. Dr. Köpf-Meier

Prof. Dr. Klapp

Prof. Dr. Kramer

Prof. Dr. Krieg

Prof. Dr. Merker

Prof. Dr. Nau

Prof. Dr. Neubert

Prof. Dr. Neitzel

Prof. Dr. Pham

Prof. Dr. Reuter

Prof. Dr. Rosemeier

Prof. Dr. Rune

Prof. Dr. Samandari

Prof. Dr. Schultz

Prof. Dr. Sperling

Prof. Dr. Tauber

Prof. Dr. Thul

Prof. Dr. Toepfer

Prof. Dr. Wahn

Dr. Walter

Prof. Dr. Weber

Prof. Dr. Willich

Prof. Dr. Winau

Prof. Dr. Zimmermann

### **in Stockholm, Schweden**

Ass. Prof. Liljeqvist

Dr. Lindemalm

Ass. Prof. Mårtensson

Dr. Strådal

### **in Princeton, New Jersey/ USA**

M.D. Murray

### **in Glarus, Schweiz**

Dr. Blessing

## **Danksagung**

Für den Vorschlag des Themas der Arbeit und für die Möglichkeit unter seiner Aufsicht diese Arbeit anzufertigen sowie für seine ständige Begleitung möchte ich Herrn Prof. Dr. Harald Renz ganz besonders herzlich danken.

Diese Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe für Immunologie des Institutes für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie unter der Leitung von Prof. Dr. Harald Renz im Universitätsklinikum Rudolf Virchow der Charité in Berlin. Für die Hilfe bei der Planung und die gewissenhafte Betreuung der Experimente danke ich Frau PD Dr. Angelika Daser. Meinen herzlichen Dank möchte ich weiterhin allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre kollegiale Zusammenarbeit und freundschaftliche Unterstützung aussprechen. Insbesondere möchte ich Dr. Torsten Kuczius für die Einführung in die Laborarbeit, Dr. Armin Braun und PD Dr. Udo Herz für wissenschaftliche Unterstützung sowie Nina Bätjer, Dr. Karsten Kötz, Hendrik Schulz und Dr. Heinrike Schmeling für die freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor danken. Den Mitarbeitern des Tierlabors des Universitätsklinikums Rudolf Virchow der Charité danke ich für die Pflege der Versuchstiere.

Des weiteren gilt mein Dank all denjenigen, die mich im Laufe der Arbeit immer wieder zum Durchhalten und Fertigstellen derselben motiviert und ermuntert haben. Insbesondere möchte ich daher an dieser Stelle meinen Eltern dafür danken, dass sie meine Ausbildung ermöglicht, gefördert und verständnisvoll unterstützt haben.

Abschließend gilt mein Dank meiner lieben Freundin Elke für ihre Unterstützung und ihre Geduld und für die Zeit, die sie auf mich verzichten musste.

Uwe Kölsch  
Loreleyst. 11  
10318 Berlin

### **Erklärung an Eides statt**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin in Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Genetische Disposition von Immunglobulintitern nach Immunisierung mit Birkenpollen bei Mäusen“ im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité - medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Harald Renz mit Unterstützung von Frau Dr. Angelika Daser ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 08.05.2005

Uwe Kölsch