

Aus der Kinderklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. H.-G. Lenard

***Korrelation zwischen dem HLA Klasse II DRB1-Genlocus
und der spezifischen IgE-vermittelten Immunantwort
auf aerogene Allergene***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tat Dac Dinh

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Herr Priv.-Doz. Dr. med. V. Stephan
Korreferentin: Frau Univ.-Prof. Dr. med. A. Schuster

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Historischer Rückblick	1
1.2	Immunologische Grundlage der allergischen Reaktion	3
1.2.1	Einführung	3
1.2.2	Antigenpräsentation	4
1.2.3	Major Histocompatibility Complex (MHC)	6
1.2.4	Zelluläre und humorale Interaktionen während der Immunantwort	10
1.2.5	IgE-vermittelte (Typ I-) Hypersensibilität	12
1.2.5.1	Gell und Coombs-Klassifikation	12
1.2.5.2	IgE und seine Wirkung auf die Targetzellen	13
1.2.5.3	Mediatoren der Typ I-Reaktion	16
1.2.5.4	Zytokine und ihre regulierende Wirkung auf die Typ I-Reaktion	17
1.3	Entstehung und Genetik von Allergien	18
1.4	Diagnostische Verfahren der Allergie	22
1.4.1	Anamnese und körperliche Untersuchung	22
1.4.2	Diagnostik durch Hauttests und Labormethoden	22
1.4.3	Provokationstest	26
1.4.4	Diagnostische Diät	26
1.5	Zielsetzung der Untersuchung	27
2	<i>Methodik und Probandenkollektiv</i>	29
2.1	2.1 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR)	29
2.1.1	Auswahl der geeigneten Primer	29
2.1.2	Herstellung des Reaktionsgemisches	29
2.1.3	Festlegung des Temperaturprofils	30
2.1.4	Ergebniskontrolle der PCR	31
2.2	Dot-Blotting	33
2.2.1	Vorbereitung der PCR-Produkte	33
2.2.2	Vorbereitung der Dot-Blot-Kammer	33

2.2.3	Blot der Patienten-DNA	34
2.2.4	Blot der Kontrollzell-DNA	35
2.3	Vorbereitung Hybridisierung	38
2.3.1	Auswahl der Kontrollzelllinie	38
2.3.2	Auswahl der sequenzspezifischen Oligonukleotide	40
2.3.3	Vorbereitung der Oligonukleotide	41
2.3.3.1	Elongationsreaktion des 3'-Ende des SSO	41
2.3.3.2	Aktivierung des 3'-aminomodifizierten SSO	41
2.3.3.3	Konjugation mit aktivierter Alkalischer Phosphatase	42
2.3.4	Blockierung der freien Bindungsstellen	42
2.4	Hybridisierung	43
2.4.1	Waschvorgang	43
2.4.2	Aktivierung der Chemolumineszenz	44
2.4.3	Reinigung der Membranen und Netze („Stripping“)	45
2.4.4	Auswertung	46
2.5	Auswahl der Probanden	55
2.5.1	Interview	56
2.5.2	Der Haut-Prick-Test	56
2.5.3	Venöse Blutentnahme	58
2.5.4	Bestimmung des spezifischen IgE	58
3	<i>Ergebnisse</i>	60
3.1	Probandenkollektiv	60
3.2	DRB1-Allelfrequenzen der Gesamtpopulation	61
3.3	DRB1-Allelfrequenzen der Elterngeneration	62
3.4	DRB1-Allelfrequenzen der Kindergeneration	63
3.5	Ergebnisanalyse nach SIBPAIR-, SIBPAL- und ETD-Test	64
3.5.1	SIBPAIR-Test	64
3.5.2	SIBPAL-Test	66
3.5.3	ETDT (Extended Transmission Disequilibrium Test)	67
4	<i>Diskussion</i>	70

4.1	DRB1-Allelfrequenzen der Gesamtpopulation	70
4.2	DRB1-Allelfrequenzen getrennt nach Eltern- und Kindergeneration	71
4.3	Geschwisterpaaranalyse (SIBPAIR-, SIBPAL- und ETD-Test)	73
5	<i>Zusammenfassung</i>	77
	<i>Literaturverzeichnis</i>	79
	<i>Abbildungen</i>	87
	<i>Tabellen</i>	88
	<i>Danksagung</i>	89

1 Einleitung

1.1 Historischer Rückblick

Das Phänomen der Allergie ist seit langem bekannt. Bereits 1906 wurde der Begriff der Allergie, so wie wir ihn heute kennen, vom Wiener Pädiater Baron Clemens von Pirquet geprägt [66]. Etymologisch stammt „*Allergie*“ aus dem Griechischen und setzt sich zusammen aus „*allos*“, was soviel bedeutet wie „verändert“, und „*ergon*“, was „Reaktion“ heißt. Von Pirquet vertrat die Auffassung, die Reaktion resultiere aus einer Veränderung des Immunsystems, die durch externe Einflüsse, wie orale oder aerogene Aufnahme eines Agens beziehungsweise durch direkten Hautkontakt mit dem Antigen induziert wird. Eine Differenzierung der verschiedenen immunologischen Reaktionstypen nahm er indessen nicht vor [44].

Das Phänomen der systemischen Anaphylaxie, die die Maximalvariante der Allergie darstellt, wurde zuvor 1839 von Magendie beschrieben [85]. Dieser Bericht blieb jedoch lange unbeachtet. Erst im Jahre 1902 beobachteten die beiden französischen Ärzte Paul J. Portier und Charles R. Richet durch Zufall ein ähnliches Phänomen und benutzten daraufhin erstmalig den Ausdruck *Anaphylaxie* (aus dem Griechischen „*ana*“ und „*phylaxis*“, was soviel bedeutet wie „Antischutz“) zur Beschreibung dieses Phänomens [76]. Bei dem Versuch einer Antitoxinentwicklung gegen das Gift der giftigen Qualle *portugiesische Galeere* (lat. *Physalia physalis*) fanden sie heraus, dass es bei den Versuchstieren nach erfolgter Erstinjektion des Allergens und einer Reexposition desselben einige Wochen später zu einer rapiden Sequenz von Symptomen, wie Erbrechen, blutigem Durchfall, Asphyxie, Bewusstseinsverlust und Tod kam [44].

Die Erstbeschreibung des immunologischen Mechanismus einer allergischen Reaktion wurde schließlich 1921 von Prausnitz und Küstner präsentiert [44, 84, 103]. In Selbstversuchen entnahmen sie von Küstner, der allergisch auf Fisch reagierte, Serum, das sie Prausnitz intrakutan injizierten. Nachfolgend wurde Fischantigen in dieselbe Stelle injiziert, und es entstand eine „Quaddel“. Sie postulierten die Existenz eines „allergischen Reagin“, das im Serum betroffener Allergiker vorhanden sein müsste [44].

1923 führten Coca und Cooke den Begriff der „Atopie“ ein [85]. Er beschreibt die klinische Manifestation der uns heute bekannten Typ I-Hypersensibilität. Dieser Typ I-Hypersensibilität können Erkrankungen wie das Asthma bronchiale, die atopische Dermatitis, die Pollinosis, die Urtikaria und die Nahrungsmittelallergie zugeordnet werden. Der klinische Symptomenkomplex trat bei Patienten mit einer positiven Familienanamnese auf, wobei sich in den Familien eine gewisse Symptomkonstanz zeigte.

Im Jahr 1966, 45 Jahre nach der Entdeckung von Prausnitz und Küstner, isolierte das japanische Ehepaar Teruko und Kimishige Ishizaka das „atopische Reagin“ und beschrieb damit eine neu entdeckte Immunglobulinklasse, die des Immunglobulin E (IgE) [40].

Die Zuordnung der allergischen Reaktion zur Typ I-Hypersensibilität nach Gell und Coombs besteht seit 1963, die noch heute weitestgehend ihre Bedeutung beibehalten hat [43].

1.2 Immunologische Grundlage der allergischen Reaktion

1.2.1 Einführung

Allergie ist ein sehr allgemeiner Begriff, der eine spezifische immunologische Reaktion beschreibt, die die Produktion von spezifischen Antikörpern der IgE-Klasse gegen eine körperfremde Substanz induziert, die bei Nichtallergikern im Allgemeinen toleriert werden.

Die Ursache für die Entstehung einer Allergie ist noch nicht geklärt und ist weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen und Studien. Allein einige pathophysiologische, molekulare und zelluläre Reaktionen sind bisher erforscht.

Aus der klinischen Beobachtung der Atopie wissen wir, dass die Allergie eine vererbare Eigenschaft ist, das heißt es besteht eine genetische Empfänglichkeit für das Auftreten von Symptomen als Ergebnis des allergenspezifischen IgE [101]. Diese Empirie lässt vermuten, dass bestimmte Gene an der Entwicklung einer manifesten Allergie beteiligt sind.

In prädisponierten Individuen bindet sich das IgE an hochaffine IgE-Rezeptoren der Mastzellen und der basophilen Granulozyten. Diese mit IgE besetzten Mastzellen können über Monate oder gar Jahre stabil und aktiv bleiben. Bei einer erneuten Exposition mit dem Allergen bilden mindestens zwei der zellgebundenen IgE-Moleküle mit einem spezifischen Allergen einen Komplex (sog. „*cross-linkage*“), wodurch eine Degranulation der Zellen mit Freisetzung von Mediatoren der Sofortreaktion, insbesondere Histamin, initiiert wird [7]. Diese Mediatoren sind verantwortlich für die typischen allergischen Symptome wie Pruritus, Niesen, Rhinorrhoe, geschwollene Nasenschleimhaut, Urtikaria, abdominelle Krämpfe, Bronchospasmus und gegebenenfalls systemische Anaphylaxie, je nach Organmanifestation und Disposition der betroffenen Individuen.

Allergische Reaktionen entwickeln sich normalerweise rasch – Symptome zeigen sich mitunter innerhalb weniger Minuten nach Allergenexposition. Einige Mediatoren zeigen jedoch erst Stunden nach der Initialreaktion ihre Effekte. Diese Spätphase-Reaktionen können über Stunden, Tage oder sogar Wochen persistieren. Diese „Spätreaktion“ äußert sich durch das Auftreten von Schwellungen und Entzündungsreaktionen, die im

Allgemeinen schwerer zu beherrschen sind als die im Rahmen der „Sofortreaktion“ auftretenden Symptome.

Allergien können durch körperfremde Substanzen, die Allergene, hervorgerufen werden. Hierzu zählen unter anderem Pollen, Pilze, Tierhaare, Insektengifte, Lebensmittel, Medikamente sowie Milben- und Schabenkot, wobei quantitativ den aerogenen beziehungsweise inhalativen Allergenen die größte Bedeutung zukommt.

Die Prävalenz der allergischen Rhinitis betrifft 10-15 % der mitteleuropäischen Bevölkerung. Die allergische Rhinitis ist eine spezifische allergische Reaktion der nasalen Mukosa auf inhalative Allergene, bei der eine seröse Rhinorrhoe, geschwollene Nasenschleimhaut, Niesen, Kratzen im Hals, Augen- und Nasenjucken charakteristisch ist. Sie kann jahreszeitlich gebunden, je nach Allergieart mit Gipfel im Frühling, Sommer und/oder Herbst als Antwort auf Pollen oder Schimmel, oder aber auch ganzjährig, bedingt durch mehr „hausgebundene“ Allergene wie Hausstaubmilben, Tierhaare oder Schimmelpilze auftreten.

Das Asthma bronchiale hat ebenfalls eine allergische Komponente und wird charakterisiert durch Atemwegsobstruktion, eine chronische Entzündungsreaktion und eine Hyperreagibilität des Bronchialsystems.

Der bedeutendste Prädiktor für die Genese des Asthmas, der allergischen Konjunktivitis, der Neurodermitis, der Urtikaria und der Nahrungsmittelallergie ist die Atopie.

1.2.2 Antigenpräsentation

Bevor ein körperfremdes Protein als Antigen durch eine T-Zelle erkannt werden kann, bedarf es zuvor einer Antigenprozessierung. Dabei wird das Protein in Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex = MHC) assoziierte Peptidfragmente degradiert. Ob das Epitop dann zusammen mit einem MHC-Klasse I- oder MHC-Klasse II-Molekül präsentiert wird, hängt von seiner Herkunft ab [69, 70, 101].

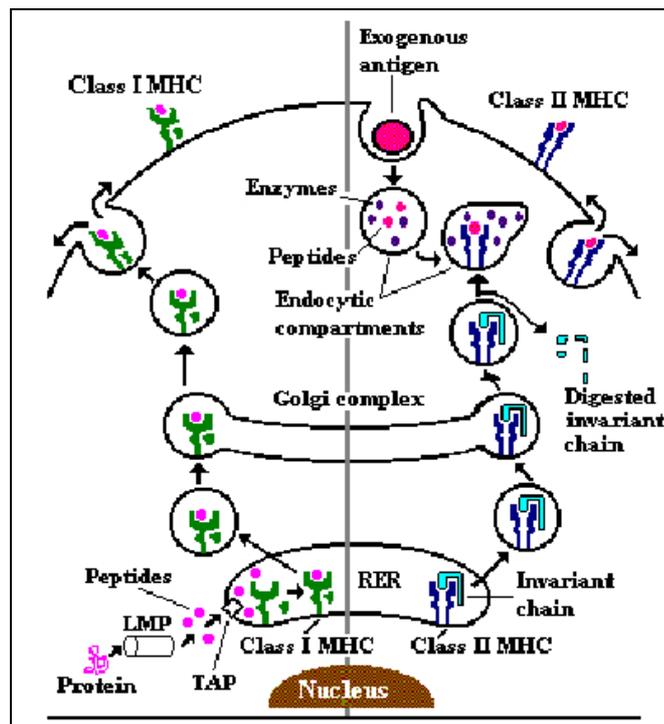


Abbildung 1: Antigenprozessierung

Exogene Antigene werden durch Endozytose oder Phagozytose von antigenpräsentierenden Zellen (antigen presenting cells = APCs), wie interdigitierende dendritische Zellen, Makrophagen, B-Zellen, Langerhans'sche Zellen oder Thymusepithelzellen aufgenommen. Das Antigen wird dann auf endosomalen Wege in MHC-Klasse II-Molekülen in MHC-Klasse II-Vesikeln prozessiert und anschließend mit einem MHC-Klasse II-Molekül auf der Zelloberfläche präsentiert (Abbildung 1) [90]. Da die MHC-Klasse II-Expression im Normalfall auf APCs limitiert ist, beschränkt sich die Präsentation der exogenen Antigene auf diese Gruppe [63, 65].

CD4⁺-T-Zellen erkennen die mit dem MHC-Klasse II-Molekül gebundenen Antigene und werden daher als MHC-Klasse II-restriktive Zellen bezeichnet. Diese Zellen fungieren in der Regel als „T-Helferzellen“ (T_H-Zellen) [12].

Endogene Antigene werden entweder durch intrazelluläre virale Proteinsynthese oder von Tumorzellen produziert. Es wird angenommen, dass diese Antigene im rauhen endoplasmatischen Retikulum prozessiert und an MHC-Klasse I-Moleküle gebunden auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Abbildung 1).

Da fast alle kernhaltigen Zellen zu einer MHC-Klasse I-Expression fähig sind, können theoretisch alle diese Zellen, die ein endogenes Antigen produzieren, im Normalfall auch dieses auf diesem Wege prozessieren [65].

T-Zellen, die CD8 exprimieren, können die mit MHC-Klasse I-assoziierten Antigene erkennen und werden als „MHC-Klasse I-restriktiv“ bezeichnet. Diese Zellen fungieren im Allgemeinen als zytotoxische T-Zellen (T_C -Zellen) [70].

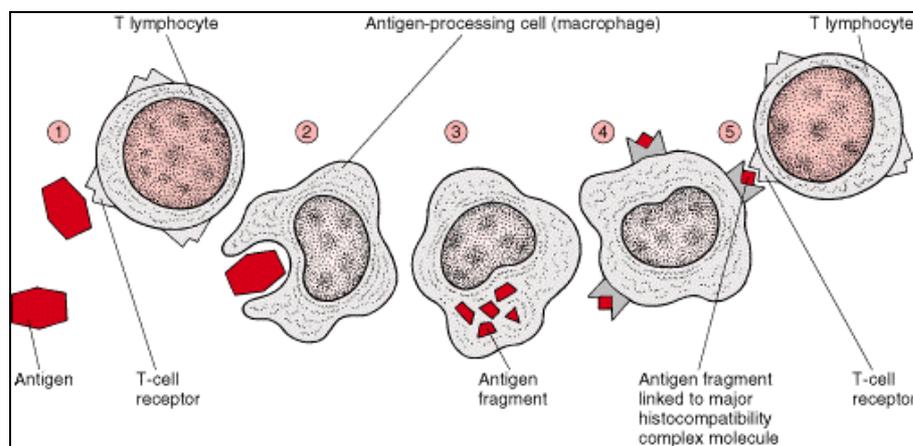


Abbildung 2: Antigenerkennung

1.2.3 Major Histocompatibility Complex (MHC)

Der MHC bezeichnet eine Gruppe von 40-50 Genen, die auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 des Menschen lokalisiert sind. Die Gene sind in 3 Regionen unterteilt und kodieren 3 Klassen von Molekülen (Abbildung 3). Die Klasse I-Moleküle kodieren Glykoproteine, die auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden und über die Antigenpräsentation einer veränderten körpereigenen Zelle T_C -Zellen aktivieren. Klasse II-Gene kodieren Glykoproteine, die exogene Antigene präsentieren, um T_H -Zellen zu aktivieren. Klasse III-Gene kodieren völlig andere Genprodukte, wie lösliche Serumproteine, die insbesondere Komponente des Komplementsystems, 21-Steroid-Hydroxylase und Tumornekrosefaktoren (TNF) etc. beinhalten [73].

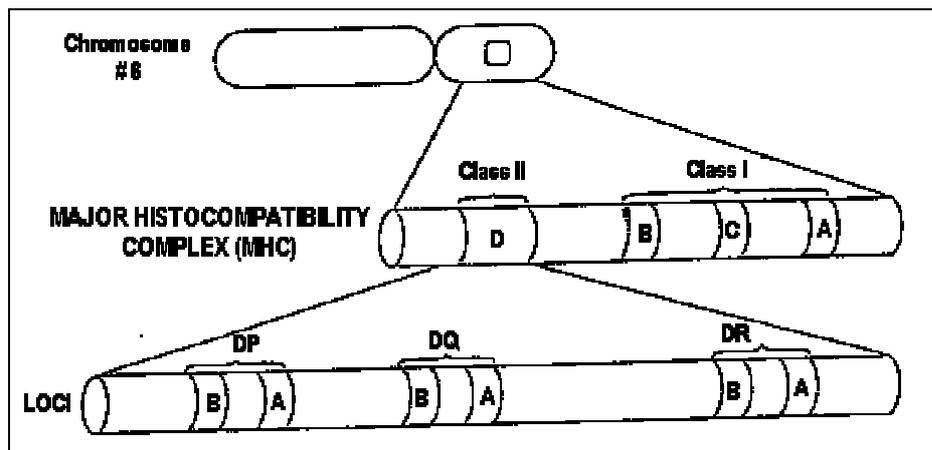


Abbildung 3: Chr 6/MHC

Beim Menschen werden die Klasse I-Moleküle auf den Regionen A, B und C, die Klasse II-Moleküle auf den Regionen DP, DQ und DR und die Klasse III-Moleküle auf den Regionen C4, C2 und Bf kodiert (Abbildung 3) [101].

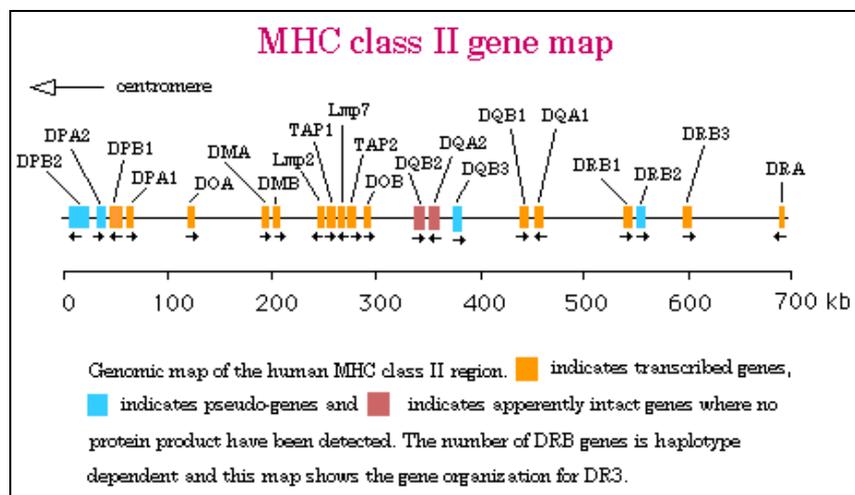


Abbildung 4: HLA Klasse II Gene

Da die exogenen Antigene, zu denen auch die Allergene zählen, MHC-Klasse II-assoziiert präsentiert werden, werden nachfolgend die Eigenschaften der MHC-Klasse II-Moleküle näher beschrieben.

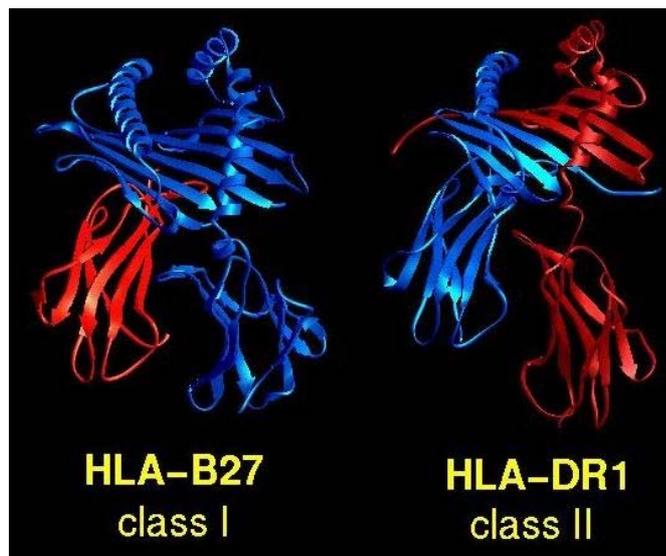


Abbildung 5: HLA Klasse I vs. HLA Klasse II

MHC-Klasse II-Moleküle sind Heterodimere und bestehen aus zwei unterschiedlichen α - und β -Ketten, die durch die Unterregionen DP, DQ und DR mindestens einmal kodiert werden. Im Gegensatz dazu setzt sich das MHC-Klasse I-Molekül aus einer schweren α -Kette und einer leichten β_2 -Mikroglobulin-Kette zusammen (Abbildungen 5 und 6).

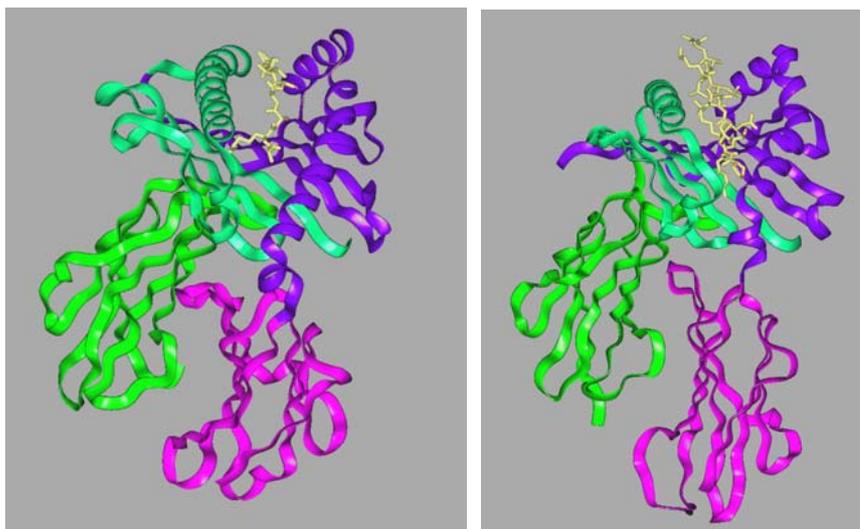


Abbildung 6: HLA Klasse I-Molekül / HLA Klasse II-Molekül

Die Moleküle beider Klassen sind membranständig und besitzen externe Domänen, ein transmembranöses Segment und eine intraplasmatische Komponente. Das Klasse II-Molekül hat je 2 externe Domänen: α_1 - und α_2 -Domänen beziehungsweise β_1 - und β_2 -Domänen (Abbildung 7).

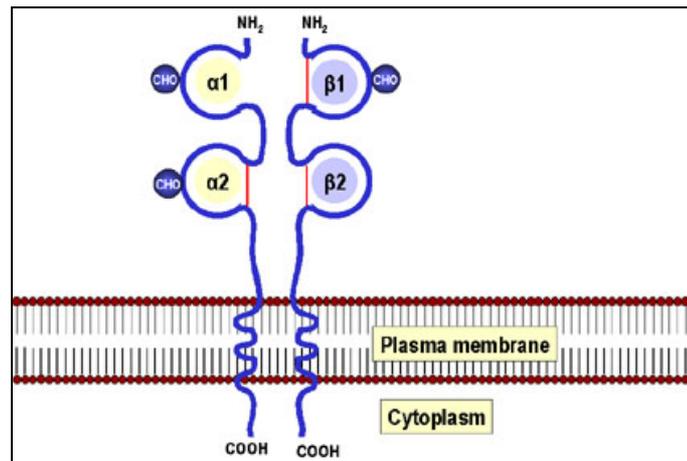


Abbildung 7: Schematische Darstellung des HLA Klasse II-Moleküls

Die membrannahen α_2 - und β_2 -Domänen besitzen eine Sequenzhomologie zu den Immunglobulinen. Die α_1 - und β_1 -Domänen sind membranfern und formen das antigenbindende Ende für die prozessierten Antigene (Abbildungen 8 und 9).

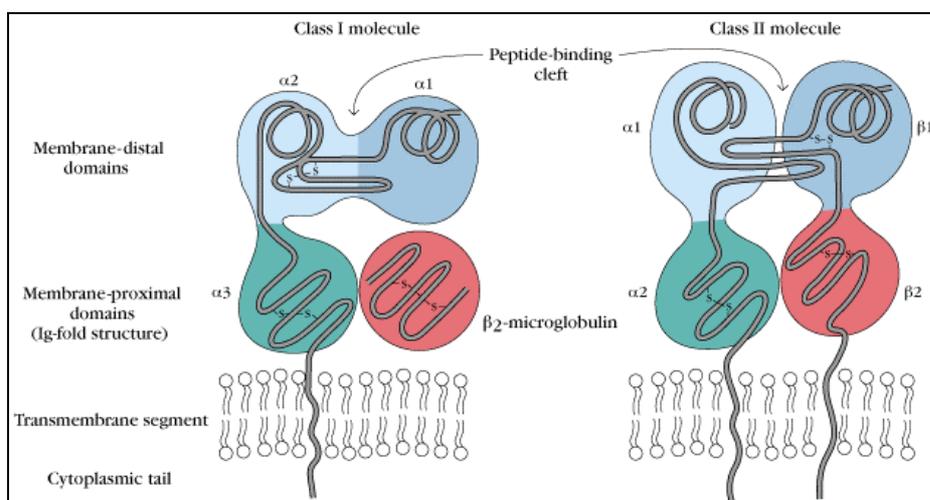


Abbildung 8: Schematische Darstellung der α_2 - und β_2 -Domänen

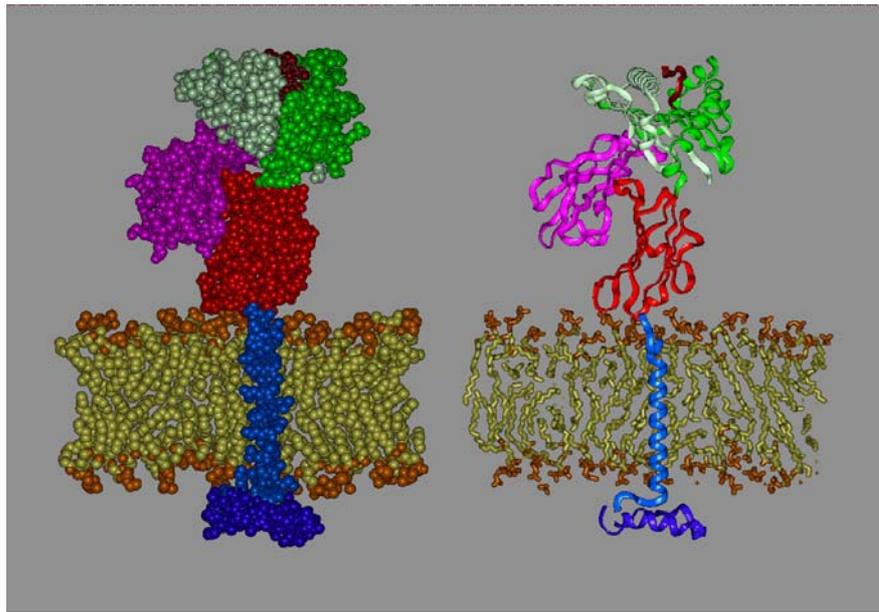


Abbildung 9: Verankerung des HLA Klasse II-Moleküls in der Membran

Die Genloci des MHC zeigen den höchsten Grad des Polymorphismus bei den höheren Vertebraten, das heißt jeder Genlocus besitzt eine außerordentlich große Anzahl verschiedener Allele (Abbildung 4), die eng miteinander verbunden sind. Sie haben lediglich eine Rekombinationsfrequenz von 0.5 %, was bedeutet, dass jedes menschliche Individuum je einen Satz an Allelen von den Eltern vererbt bekommt. Ein derartiger „Satz an Allelen“ wird auch als „*Haplotyp*“ bezeichnet [44].

1.2.4 Zelluläre und humorale Interaktionen während der Immunantwort

Im Anschluss an die Antigenrepräsentation (Abbildung 2) erfolgt eine Antigenerkennung durch T-Zellen. Diese können im Gegensatz zu den B-Zellen ein Antigen nur mit Hilfe der Corezeptoren CD4 und CD8 erkennen. Der B-Zellrezeptor ist ein Immunglobulin und kann ein Antigen direkt binden, während der T-Zell-Rezeptor (TCR) ein Heterodimer ist und nur MHC-assoziierte, also bereits prozessierte, Antigene mit Hilfe der CD4- beziehungsweise der CD8-Moleküle erkennt.

Die Corezeptoren CD4 und CD8 zeigen zwar nur eine schwache Affinität zum Antigen, sind aber für die Aktivierung der T-Zellen über intrazelluläre Mechanismen von entscheidender Bedeutung.

Über zahlreiche weitere wichtige akzessorische Moleküle wie CD2, LFA-1 (lymphocyte functional antigen-1) und CD 28 wird die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen zusätzlich verstärkt.

Neben diesen Zelloberflächeninteraktionen sind bei der Aktivierung der T-Zellen auch eine Reihe von Zytokinen beteiligt. In erster Linie stimulieren IL-1 (Interleukin-1) und IL-6 (Interleukin-6), die von den APCs gebildet werden, ruhende T-Zellen. Diese Stimulation induziert eine Expression der Rezeptoren für den T-Zell-Wachstumsfaktor Interleukin 2 (IL-2). Von APCs gebildetes Interleukin 12 (IL-12) erhöht die Interferon γ (IFN- γ)-Produktion der T-Zellen.

Über eine ebenfalls große Anzahl membranständiger, kostimulatorischer Moleküle gibt es wechselseitige Interaktionen zwischen B- und T-Zellen, resultierend in eine Induktion der Proliferation der B-Zellen, Differenzierung der B-Zellen zu spezifischen antikörperbildenden Plasmazellen sowie der B-Gedächtniszelle und der Vermehrung der T-Zellen.

Die T-Zellen lassen sich, je nach Expressierung von CD4- oder CD8-Molekülen, in T_H - beziehungsweise T_C -Zellen unterteilen. Die Gruppe der T_H -Zellen lässt sich noch, je nach Zytokinprofil (Tabelle 1), entweder in T_{H1} - oder T_{H2} -Subgruppen unterteilen. Beim Menschen zeigen jedoch viele T-Zellen ein intermediäres Zytokinprofil, weshalb sie zu der Untergruppe T_{H0} gezählt werden [72, 73].

Subtyp	Zytokinprofil	Wirkung
T_{H1}	IL-2, INF- γ , TNF- β	induziert eine Hypersensibilisierung vom verzögerten Typ erhöht die Produktion von IgG2a
T_{H2}	IL-4, IL-5, IL-9, IL-10	Erhöht die Produktion von IgE und IgG1

Tabelle 1: Zytokinprofile der T_{H1} - und T_{H2} -Subpopulationen

Es herrscht Übereinstimmung dahingehend, dass die T-Zellen - je nach Zytokinprofil der jeweiligen Untergruppe - für das Phänomen des sogenannten „*isotype switching*“ verantwortlich sind. Indessen sind die Signale, die diese Umschaltung kontrollieren, nicht vollends erforscht.

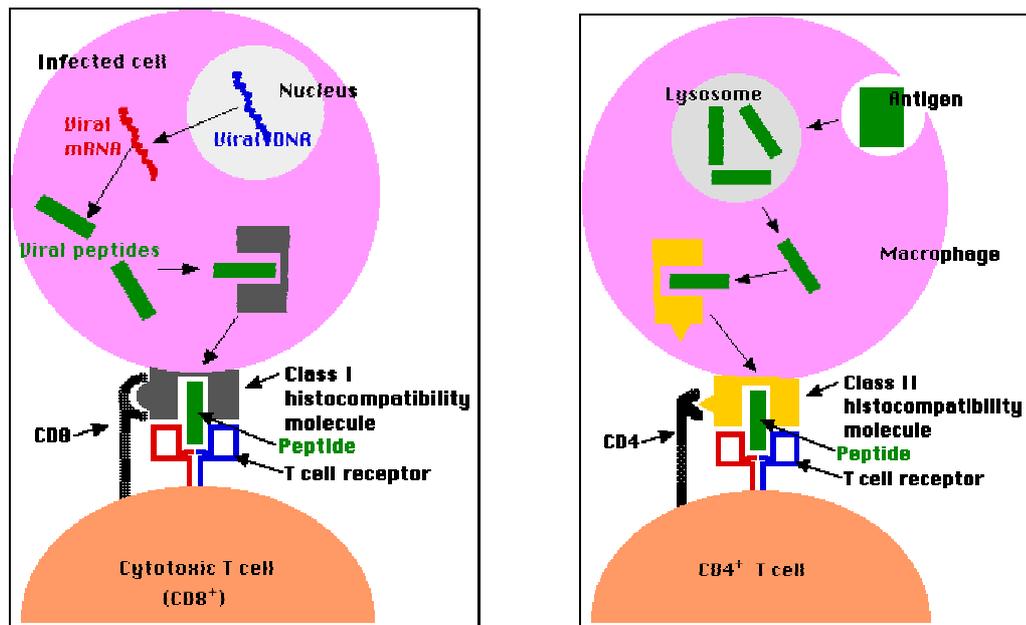


Abbildung 10: Antigenerkennung durch T-Zellen

1.2.5 IgE-vermittelte (Typ I-) Hypersensibilität

1.2.5.1 Gell und Coombs-Klassifikation

Verschiedene Hypersensibilitätsreaktionen können unterschieden und in der Klassifikation nach Gell und Coombs unterteilt werden [27]. Nachfolgend wird auf die für die vorliegende Arbeit relevante IgE-vermittelte Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I eingegangen, wobei der Vollständigkeit halber in Tabelle 2 alle bekannten hypersensitiven Reaktionen nach Gell und Coombs aufgelistet sind [44, 73].

Typ	Deskriptive Bezeichnung	Reaktionszeit	Mechanismus	Typische Manifestation
<i>Sofortreaktionen</i>				
Typ I	IgE-vermittelte Hypersensibilität	2-30 Minuten	Ag induziert <i>cross-linkage</i> von IgE gebunden an Mast-Zellen bzw. Basophile mit der Freisetzung von vasoaktiven Mediatoren	System. Anaphylaxie Lokalisierte Anaphylaxie: <ul style="list-style-type: none"> • Pollinose • Asthma • Urtikaria • Nahrungsmittelallergie • Atopische Dermatitis
Typ II	Antikörpervermittelte zytotoxische Hypersensibilität	5-8 Stunden	Ak gegen Zelloberflächen-Antigene verursacht Zerstörung via Komplementaktivierung oder Ak-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)	Transfusionsreaktion Erythroblastosis fetalis Autoimmune hämolyt. Anämie
Typ III	Immun-komplex-vermittelte Hypersensibilität	2-8 Stunden	In unterschiedl. Gewebe deponierte Ag-Ak-Komplexe induzieren Komplementaktivierung und verursachen eine Entzündungsreaktion	Lokalisierte Arthus-Reaktion Generalisierte Reaktionen: <ul style="list-style-type: none"> • Serumkrankheit • Glomerulonephritis • Rheumatoide Arthritis • SLE
<i>Verspätete Reaktion</i>				
Typ IV	Zellvermittelte Hypersensibilität	24-72 Stunden	Sensibilisierte T _{DTH} -Zellen setzen Cytokine frei, die Makrophagen oder T _C -Zellen aktivieren, die wiederum eine direkte zelluläre Zerstörung vermittelt	Kontaktdermatitis Tuberkulöse Läsionen Transplantatabstoßung

Tabelle 2: Gell und Coombs-Klassifikation

1.2.5.2 IgE und seine Wirkung auf die Targetzellen

Die Typ I-Reaktion zeigt alle klassischen Merkmale einer humoralen Immunantwort. Der einzige Unterschied zu der normalen humoralen Immunantwort, bei der IgM und IgG gebildet werden, ist die Bildung von IgE durch Plasmazellen [39]. Eine wichtige Charakteristik des IgE ist seine Fähigkeit, sich durch sein Fc-Ende mit hoher Affinität an die IgE-Rezeptoren FcεRI auf der Zelloberfläche der Mastzellen und der Basophilen zu binden [8, 28, 38]. Eine Quervernetzung („*cross-linkage*“) dieser Rezeptoren durch ein multivalentes Allergen an FcεRI-verankerte IgE-Moleküle induziert eine Zellaktivierung mit konsekutiver Degranulation und Sekretion von Histamin und anderen Zytokinen.

FcεRI besteht aus 4 Polypeptidketten, einer α-Kette, an die sich das IgE bindet, einer β-Kette, die als Signalverstärker dient und 2 identische, durch Disulfidbrücken miteinander verbundene γ-Ketten, die als Signaltransduktor fungieren. FcεRIβ und FcεRIγ beinhalten die sogenannten immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs), die Sekunden nach einer „cross-linkage“ phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung wird initiiert durch die Src family protein tyrosine kinase (PTK) Lyn und pflanzt sich fort über die Syk/Zap family Syk auf nachfolgende Signalmoleküle.

Lyn, gebunden an die β-Kette, phosphoryliert die ITAMs innerhalb der β- und γ-Ketten. Die PTK Syk bindet sich dann über ihre SH2-Domäne an die phosphorylierte γ-Kette. Nachfolgend werden der linker of activation of T cells (LAT) rekrutiert, SLP-76 phosphoryliert und aktiviert, die Tec family kinase Bruton's tyrosine kinase (Btk) und die Phospholipasen Cγ1 und Cγ2 (PLC1/PLC2) stimuliert. Die Initiierung dieser „frühen“ Ereignisse führt zu einem Ca²⁺-Influx, zellulärer Degranulation und Cytokinproduktion [62].

Neueste Studien mit aus Knochenmark gewonnenen Mastzellen von Lyn-defizienten Mäusen zeigen, dass Lyn wahrscheinlich nicht die einzige Src family PTK ist, die für eine Aktivierung der FcεRI-Kaskade zuständig ist. Parravicini *et al.* konnten nachweisen, dass die Zytokinproduktion der Lyn-defizienten Mastzellen trotz der Defekte in der FcεRI-vermittelten Tyrosinphosphorylierung und der Kalziummobilisierung intakt bleibt und die Degranulierung sogar verstärkt wird [64].

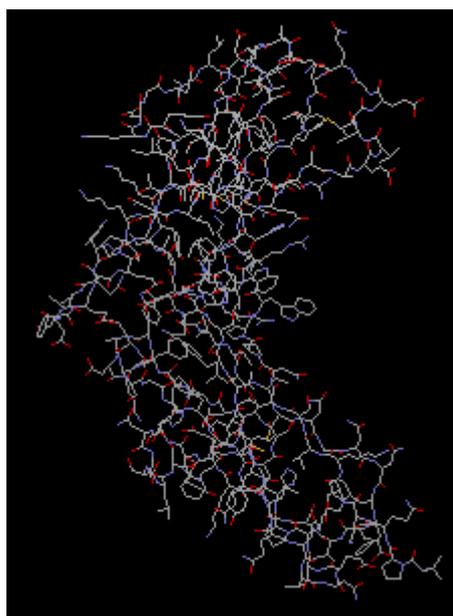


Abbildung 11: IgE- FcεRI -Molekül

Entscheidend für die Initiierung der IgE-vermittelten Degranulation ist demnach die Überbrückung von mindestens zwei der benachbarten membrangebundenen IgE-Moleküle [35, 41, 97]. Innerhalb von Sekunden werden verschiedene, membranständige Phospholipide methyliert. Im Folgenden wird die Serinproesterase in Serinesterase umgewandelt, die Phosphatidylserin in Phosphatidylethanolamin umwandelt. Gleichzeitig werden die membrangebundenen Enzyme Phospholipid-Methyltransferase I und II aktiviert (PMT I+II), die in zwei weiteren Schritten das Phosphatidylethanolamin zu Phosphatidylcholin methylieren.

Die Akkumulation von Phosphatidylcholin bewirkt eine Erhöhung der Membrandurchlässigkeit in Form einer vermehrten Bildung von Ca^{2+} -Kanälen. Anschließend kommt es zu einem Ca^{2+} -Einstrom. Ca^{2+} aktiviert Phospholipase A_2 und spaltet Phosphatidylcholin in Lysophosphatidylcholin und Arachidonsäure. Das Lysophosphatidylcholin verstärkt die erhöhte Membrandurchlässigkeit und ermöglicht weiteren Ca^{2+} -Influx. Die Arachidonsäure wird zu potenten Mediatoren, die zur Klasse der Prostaglandinen und Leukotrienen gehören, konvertiert. Diese nehmen eine entscheidende Rolle in der allergischen Reaktion ein. Zudem bewirkt der Ca^{2+} -Influx eine vermehrte Bildung von Mikrotubuli und eine Kontraktion der Mikrofilamente, die für den Transport der Granulae an die Plasmamembran benötigt werden [22].

Mit der Phospholipid-Methylierung und dem Ca^{2+} -Influx besteht gleichzeitig eine vorübergehende Erhöhung der membrangebundenen Adenylatcyclase-Aktivität mit einem raschen Anstieg des cAMP-Spiegels mit einem Maximum innerhalb von 15 Sekunden nach „*cross-linkage*“. Das cAMP aktiviert die cAMP-abhängigen Proteinkinasen, die wiederum die Membranproteine der Granulae phosphorylieren, wodurch die Permeabilität der Granulae für Wasser und Ca^{2+} verändert wird. Aus der zunehmenden Vergrößerung der Granulae mit gleichzeitiger Annäherung an die Zellmembran erfolgt die Degranulation. Da die Erhöhung des cAMP nur vorübergehend ist, ist der cAMP-Spiegel im Zeitintervall von 2-3 Minuten, in der der Ca^{2+} -Influx und die Histaminausschüttung ihre Maxima erreichen, bereits wieder auf ein normales Niveau gesunken. Das Absinken des cAMP-Spiegels scheint demnach für einen vollständigen Ablauf der Degranulation notwendig zu sein. Daher ist es erklärlich, dass durch die Aufrechterhaltung des cAMP-Spiegels mittels verschiedener Medikamente, die die cAMP-Synthese beeinflussen, die Degranulation verhindert werden kann [44].

Die Erholung der Basophilen/Mastzellen erfolgt sowohl durch Neusynthese als auch durch Wiederverwertung der zuvor sekretierten Proteine [22].

1.2.5.3 Mediatoren der Typ I-Reaktion

Die freigesetzten Mediatoren sind teilweise bereits vor der Degranulation vorhanden und in den Granulae gespeichert. Dazu zählen Histamine, Serotonin, Eosinophilen chemotaktischer Faktor (ECF-A), Neutrophilen chemotaktischer Faktor (NCF-A) und verschiedene Proteasen.

Für die Bedeutung der Symptome ist hauptsächlich das Histamin verantwortlich. Je nach Bindung an H₁- oder H₂-Rezeptoren kommt es zu unterschiedlichen Effekten. Die Bindung an H₁-Rezeptoren induziert eine Kontraktion der intestinalen und bronchialen glatten Muskulatur, eine Erhöhung der Permeabilität der Venolen und eine Erhöhung der mukösen Sekretion der Becherzellen.

Eine Interaktion des Histamins mit dem H₂-Rezeptor erhöht die Gefäßpermeabilität, verursacht eine Vasodilation und stimuliert die exokrinen Drüsen (zum Beispiel Magensäureproduktion). Außerdem wird durch die Bindung des Histamins an H₂-Rezeptoren im Sinne einer negativen Rückkopplung eine weitere Freisetzung der Mediatoren verhindert.

Im Gegensatz zu den primären, vor der Degranulation schon vorhandenen Mediatoren, werden Thrombozyten-aktivierender Faktor, Leukotriene, Prostaglandine und Bradykine erst im Verlauf des Degranulationsprozesses gebildet. Da sie zeitlich später gebildet werden, ist der Eintritt ihrer Wirkung verzögert. Der Effekt ist aber prägnanter und in seiner Wirkung andauernder. Schon geringe Spiegel im nmol-Bereich von Leukotrienen sind im Bezug auf eine Bronchokonstriktion tausendfach potenter als die Wirkung von Histamin. Leukotriene wirken auch auf die Stimulation der Mukussekretion wesentlich stärker als Histamin. Sie sind wahrscheinlich verantwortlich für den prolongierten Bronchospasmus und die massive Schleimproduktion bei Asthmatikern.

1.2.5.4 Zytokine und ihre regulierende Wirkung auf die Typ I-Reaktion

Unterschiedliche Zytokine regulieren die allergische Reaktion auf verschiedenen Ebenen [19]. Sie regulieren zum Beispiel die Isotypexpression, indem sie entweder die IgE-Produktion triggern oder unterdrücken, oder sie regeln die klonale Expansion der IgE-bildenden Plasmazellen [75].

Viele Studien lassen vermuten, dass von T_{H2} gebildetes Interleukin-4 (IL-4) die Umschaltung der Bildung von IgE in Plasmazellen bewirkt, die andernfalls IgM und IgG bilden würden (sog. „*immunoglobuline class/isotype switching*“) [72].

Andere Zytokine, wie Interferon γ (IFN- γ), gebildet von T_{H1} , zeigen eine supprimierende Wirkung auf die IgE-Produktion. Daher kommt dem Verhältnis zwischen IFN- γ und IL-4 wahrscheinlich eine entscheidende Bedeutung zu. Dies würde dann auch einen Einfluss auf das Ergebnis einer allergischen Reaktion durch die unterschiedlichen Aktivitäten der Untertypen der $CD4^+$ -Zellen vermuten lassen [74].

Neben den oben schon erwähnten primären und sekundären Mediatoren bilden aktivierte Mastzellen zudem Tumornekrosefaktor (TNF), IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 und Granulozyten- und Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktoren (GM-CSF). Hohe Spiegel von TNF und IL-1 führen wahrscheinlich im Rahmen einer Anaphylaxie zum Schock - ähnlich der Rolle des TNF und IL-1 beim septischen Schock bei einer bakteriellen Infektion beziehungsweise beim Toxic Shock Syndrome. TNF und IL-1 erhöhen zudem die Expression der zellulären Adhäsionsmoleküle bei venösen Endothelien und führen zu einer Anbindung der Neutrophilen, der Eosinophilen und der Monozyten, wie man es auch bei der Spätphase-Reaktion beobachten kann. Andere Zytokine wie IL-3, IL-5 und GM-CSF aktivieren Eosinophile [73].

1.3 Entstehung und Genetik von Allergien

Studien in den zwanziger Jahren zeigten, dass Kinder von Eltern mit bekannter allergischer Diathese eher dazu neigen, ebenfalls an einer Allergie zu erkranken [15]. Kinder sind eher betroffen als Erwachsene. Von den Betroffenen ist eine Knabenwendigkeit zu verzeichnen [42, 49].

Zwillingsstudien belegen, dass 40-60 % der Allergieinzidenz hereditär ist [49]. Wenn beide Elternteile an einer Allergie leiden, ist die Wahrscheinlichkeit für jedes einzelne Kind, ebenfalls zu erkranken, größer als 50 %. Bei nur einem allergischen Elternteil reduziert sich die Wahrscheinlichkeit auf 30 % [1]. Daher kann die parentale Anamnese einer Allergie als Risikofaktor einer Atopie gewertet werden [44, 49].

Die Entstehung einer Allergie ist multikausal. Sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren scheinen eine Rolle zu spielen [6, 50, 53].

Genetische Mechanismen regulieren 3 Aspekte der allergischen Antwort, und zwar die des Gesamt-IgE-Spiegels, der allergenspezifischen Antwort und der allgemeinen Hyperreaktivität [33]. Familien- und Zwillingsstudien belegen, dass der Gesamt-IgE-Spiegel durch genetische Faktoren bestimmt wird. Da T_{H2} -Zellen und deren Zytokinfreisetzung das Milieu für eine „*immunglobuline class switching*“ bereitstellt, ist es naheliegend, dass eine Kopplung zwischen genetischen Markern in der *IL-4-Cytokine Gene-Cluster-Region* und dem Gesamt- und spezifischen IgE-Spiegel besteht. Marsh zeigte in seinen Studien, dass IL-4 und/oder ein anderes Gen dieser Region den Gesamt-IgE-Spiegel, nicht jedoch den spezifischen IgE-Spiegel reguliert [55].

Eine der genetischen Hauptregulatorgene scheint im MHC zu liegen [36]. Die Assoziation mit einem bestimmten HLA-Typ ist besonders signifikant bei einer nur geringen Dosis des Allergens und insbesondere bei niedrigem Molekulargewicht der Determinanten. Diese Assoziation lässt sich eher durch den Gesamt-IgE-Spiegel und Hauttests als bei einem Gesamt-IgG-Spiegel nachweisen. Des Weiteren ist eine HLA-Kopplung deutlicher signifikant mit abnehmendem Gesamt-IgE-Spiegel.

Ein Patient, der beim Hauttest auf mehrere Allergene reagiert, wird allgemein als hyperreaktiv bezeichnet. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass

hyperreaktive Individuen eine signifikant höhere Frequenz von HLA-B8 und HLA-Dw3 aufweisen. Eine Kopplung zu HLA-A1 konnte jedoch nicht festgestellt werden. HLA-B8 ist auch bei anderen Formen der Hyperreaktivität des Immunsystems bekannt, wie beispielsweise bei einigen Autoimmunerkrankungen.

Da die erniedrigte Suppressor-T-Zell-Aktivität als Erklärung für die Entwicklung sowohl der Autoimmun- als auch der IgE-Immunantwort verstanden wird, kann angenommen werden, dass die Möglichkeit einer Kopplung von HLA-B8 mit der Kontrolle der Immunantwort durch Suppressor-Zellen besteht.

Bei mit Formelmilch ernährten Säuglingen konnte ein Zusammenhang zwischen einem T-Zell-Mangel und Atopie festgestellt werden. Soothill *et al.* zeigten, dass die Inzidenz von Ekzemen bei gestillten Kindern deutlich niedriger lag [91, 92]. Andere wiederum wiesen eine Relation zwischen der reduzierten Anzahl einiger Subtypen der regulatorischen T-Zellen und einem erhöhten IgE-Spiegel nach, wobei jedoch noch ungeklärt ist, ob Formelmilchernährung die Anzahl der T-Zellen direkt beeinflusst [44]. Auch die Bedeutung der T_{H1}/T_{H2} -Ratio ist noch nicht eindeutig geklärt.

Zu den Umweltfaktoren zählen unter anderem das Ausmaß der Exposition, sowohl im Sinne der Menge als auch der Häufigkeit, die Tatsache, ob ein Individuum in den ersten 6 Monaten voll gestillt wurde oder nicht, vorbestehende chronische Infektionen und akute Viruserkrankungen [44]. Nach Illi *et al.* reduzieren rezidivierende virale Infekte während der frühen Kindheit, die nicht den unteren Respirationstrakt betreffen, das Erkrankungsrisiko des Asthma bronchiale [37].

Umweltgifte wie Schwefeldioxid, Stickoxide, Dieselabgase und kleinste mineralische, nicht brennbare Kohlebestandteile (sog. *fly ash*) können die Permeabilität der Mukosa erhöhen und dadurch den Allergeneintritt erleichtern und so eine erhöhte IgE-Antwort induzieren. Dieselabgaspartikeln, die Bestandteile der verschmutzten urbanen Atmosphäre sind, können als patente Adjuvantien für eine IgE-Produktion fungieren [99]. Sie messen weniger als $1\mu\text{m}$ im Durchmesser, weshalb sie leicht inhaliert werden. Die Konzentration dieser Partikel in der städtischen Luft liegt bei $2\mu\text{g}/\text{m}^3$. $30\mu\text{g}/\text{m}^3$ sind an den Hauptstrassen und bei Hochverkehr sogar Werte bis zu $500\mu\text{g}/\text{m}^3$ zu messen [44]. Intranasal applizierte Dieselabgaspartikel kombiniert mit einem Allergen verursacht einen deutlichen Anstieg des antigenspezifischen IgE-Spiegels [44].

Parallel zur ansteigenden Inzidenz allergischer Rhinitis und Asthma in den Industrieländern in den letzten drei Dekaden konnte hier aber eine quantitativ zurückgehende Luftverschmutzung verzeichnet werden. Die Zusammensetzung scheint sich jedoch zu Gunsten der potenteren Adjuvantien verändert zu haben, was die höhere Inzidenz erklären könnte. In den Entwicklungsländern schien die Inzidenzrate in den entscheidenden drei Dekaden nicht signifikant angestiegen zu sein, obwohl dort die Luftverschmutzung in dieser Zeit deutlich zugenommen hatte [49].

Zuwanderer ländlichen Ursprungs, die in die Stadt gezogen sind, zeigen eher Symptome der Allergie als jene, die auf dem Land geblieben sind. Demnach scheint die Luftverschmutzung, je nach Zusammensetzung, eine Verschlechterung der möglicherweise bereits vorher bestehenden Symptome zu bewirken. Als alleinige Erklärung für die Manifestation der allergischen Diathese kann sie jedoch nicht angesehen werden [49].

Der Effekt des Rauchens scheint dosisabhängig zu sein, wobei überraschenderweise eine gegenläufige Beziehung besteht [10]. Aktive Raucher zeigen eine reduzierte Immunantwort auf inhalative Allergene, wohingegen Passivrauchen das Asthmarisiko bei Kindern erhöht [61]. Kinder von rauchenden Eltern zeigen ein doppeltes Risiko, an Asthma bronchiale zu erkranken [49].

Andere Ursachen sind die Lebensbedingungen, die eine Allergiemanifestation begünstigen. Zum Beispiel gedeihen Hausstaubmilben bei dem gedämpften Licht der gemäßigten Breiten der nördlichen Hemisphäre, auf der nahezu alle Industrieländer angesiedelt sind, am besten [49, 67, 68]. Auch war zu beobachten, dass bei einigen Eingeborenenstämmen Neuguineas, nachdem sie Bettlaken eingeführt hatten, die Inzidenz des Asthmas drastisch anstieg [49]. Wissenschaftliche Studien belegen, dass eine höhere Konzentration der Hausstaubmilbenallergene das Risiko der Entwicklung einer Atemwegserkrankung bei atopischen Individuen deutlich erhöht [47]. Darüber hinaus können weitere, durch Wohlstand und technischen Fortschritt hervorgerufene Faktoren hierfür ursächlich sein. Durch die zunehmend attraktiver gestaltete Medienwelt bleiben immer mehr Kinder zu Hause, sitzen vor dem Fernseher, Personal Computer oder der Spielekonsole. Sie gehen nicht mehr so häufig an die frische Luft.

Dieses Verhalten kann verantwortlich sein für eine erhöhte Inzidenz der Hausstaubmilbenallergie bei Kindern [48].

Immer mehr Haushalte halten Katzen. Auch haben sie mehr Möbel als Generationen zuvor. Diese Umstände sowie die Tatsache, dass die Luftzirkulation der Zimmer wegen der besseren Isolierung der Häuser reduziert ist, was zusätzlich eine höhere Wärme und Luftfeuchtigkeit verursacht und den Wachstum von Pilzen fördert, können durchaus die ansteigende Inzidenz der Katzenallergie und des Asthma bronchiale erklären [45, 49].

Früh-, mangelgeborene und adipöse Kinder neigen eher dazu, ein Asthma bronchiale zu entwickeln. Mit medizinischem Fortschritt und Wohlstand in der westlichen Welt steigt natürlich durch zunehmende Anzahl dieser Kinder auch die Prävalenz des Asthma bronchiale [86].

Eine andere Erklärung der Zunahme der Allergieprävalenz liefert die sogenannte „Hygiene-Hypothese“. Ihr zufolge wird durch zu hygienische Lebensbedingungen der Bevölkerung der westlichen Industrieländer die Inzidenz der respiratorischen Allergien erhöht. Matricardi *et al.* fanden an einem großen italienischen Probandenkollektiv heraus, dass respiratorische Allergien weniger bei Probanden auftraten, die stärker orofäkalen und durch Nahrung übertragenen Erregern exponiert waren [57].

Es ist evident, dass eine gewisse Anzahl von Faktoren zur Allergie führen. Die klinisch manifesten Allergien entstehen, wenn ein gewisser Grad der immunologischen Aktivität überschritten wird. Dies ist abhängig von der Höhe der Allergenexposition, der genetischen Disposition, der Tendenz zur IgE-Produktion, dem gleichzeitigen Bestehen von, beziehungsweise durchgemachten viralen Infektionen der oberen Luftwege, der Mitwirkung der T_{H1} -/ T_{H2} -Zellen bei der Immunantwort und einem möglicherweise bestehenden transienten IgA-Mangel. Ein weiterer wesentlicher nicht-genetischer Faktor muss mitberücksichtigt werden, der zu einer klinischen Manifestation der Allergie führen kann. Es ist die ansteigende Allergie-Prävalenz, die mit bestimmten Anteilen der Umweltverschmutzung assoziiert ist [9].

1.4 Diagnostische Verfahren der Allergie

1.4.1 Anamnese und körperliche Untersuchung

Die Basisdiagnostik bildet klassischerweise die detaillierte Anamnese und die körperliche Untersuchung. Zuallererst ist die Familienanamnese und die frühkindliche Anamnese von großer Bedeutung, da so bereits das Risiko einer allergischen Diathese abgeschätzt werden kann. Die Sozialanamnese, mit Informationen über die Wohngegend und die Ausstattung der Wohnung beziehungsweise des Hauses, gibt Auskunft über die mögliche Beteiligung von Adjuvantien, sowie urbaner versus ländlicher Umgebung, Aktiv- versus Passivrauchen, Auto- und industrielle Abgase, die möglicherweise zu einem Allergiedurchbruch beitragen können oder aber auch über die unmittelbare Nachbarschaft von Allergenquellen, wie Wald, Wiesen, Park, Äcker oder Felder.

Bei der Suche nach einem möglichen allergischen Agens können direkte Fragen nach Expositionshäufigkeit bestimmter Allergene oder aber auch indirekte Informationen über den tageszeitlichen, saisonalen oder örtlichen Zusammenhang mit dem Auftreten der Symptome von großem Nutzen sein. Dementsprechend weisen saisonale Beschwerden auf eine Pollensensibilisierung, perenniale Symptome auf eine häuslich bedingte Allergie, beispielsweise verursacht durch Hausstaubmilbenallergenen, hin. Letzteres liegt insbesondere bei nächtlich auftretenden Symptomen nahe.

Ein spezieller Allergie-Fragebogen kann die Dokumentation der Anamnese, die auf diese Weise standardisiert wird, erleichtern.

1.4.2 Diagnostik durch Hauttests und Labormethoden

Aufbauend auf die Anamnese werden weitere spezifischere Tests durchgeführt. Hierzu zählen die gängigen Hauttests, die Bestimmung des Gesamt-IgE- und des allergenspezifischen IgE-Spiegels.

Die Hauttestung ist eine der häufigsten und akkuratesten Methoden, um eine Allergie zu bestätigen. Dazu wird in verschiedenen Testverfahren eine kleine Dosis des zu testenden potentiellen Allergens in oder auf die Haut gebracht. Dies kann auf dreierlei Weise erfolgen, entweder mittels eines epikutanen Patch-Tests, eines Haut-Prick-Tests oder eines intrakutanen Tests.



Abbildung 12: Prick-Test-Koffer

Beim epikutanen Patch-Test wird ein mit einer Allergenlösung getränktes Testpflaster auf die Haut geklebt. Nach zwei bis drei Tagen wird kontrolliert, ob dies zu einer ekzemauslösende Spätreaktion geführt hat.

Beim Haut-Prick-Test werden einzelne Tropfen des Testreagenz auf die Haut aufgetragen, und zwar bevorzugt auf die ventrale Seite des Unterarms. Das mögliche Allergen wird in die Haut gebracht, indem mit einer sterilen Nadel durch den jeweiligen Tropfen gestochen wird (Abbildungen 12-16).



Abbildung 13: Prick-Test-Vorbereitung



Abbildung 14: Prick-Test-Auftragen



Abbildung 15: Prick-Test-Einritzen



Abbildung 16: Prick-Test-Ergebnis

Beim Intrakutan-Test wird das Testallergen direkt über eine Spritze und eine Kanüle intrakutan - meist in die Rückenhaut - injiziert.

Als Negativ- und Positivkontrolle dienen bei den beiden letztgenannten Tests je ein Tropfen NaCl 0.9 % beziehungsweise Histaminlösung. Nach 20 Minuten wird die Reaktion an Hand des Ausmaßes der Quaddelbildung bewertet (Abbildung 17).



Abbildung 17: Quaddelbildung

Zur weiteren Objektivierung der Diagnose helfen die Bestimmungen sowohl des Gesamt-IgE-Spiegels, der zum Beispiel mit einem PRIST (Paper-Radio-Immuno-Sorbent-Test) erfasst werden kann, als auch des allergenspezifischen IgE, das sich durch einen RAST (Radio-Allergo-Sorbent-Test) ermitteln lässt.

Während eine Erhöhung des spezifischen IgE-Spiegels auf eine bestimmte Allergie hindeuten kann und von der Sensibilisierungsdauer, der Qualität und der Quantität des

Allergens sowie der genetisch definierten Empfänglichkeit abhängig ist, ist der Gesamt-IgE-Spiegel lediglich richtungsweisend. Denn ein erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel kann außer bei bestehender Allergie schließlich auch bei einer Parasitose, bei Erkrankungen des T-Zell-Systems, wie zum Beispiel dem Morbus Hodgkin, bei einigen Syndromen oder auch bei anderen Erkrankungen vorkommen.

Mit dem Basophilen-Degranulationstest kann auf zellulärer Ebene durch eine in-vitro Testung eine Sensibilisierung nachgewiesen werden.

Auf molekularer Ebene kann die Prädisposition durch die Bestimmung von C3-Komplement und IgA unterstützend vermutet werden.

1.4.3 Provokationstest

In vielen Fällen muss nach den oben genannten Diagnostikmethoden noch ein Provokationstest erfolgen. An dem betroffenen Zielorgan wird durch einen konjunktivalen, nasalen, oralen oder bronchialen Belastungstest unter kontrollierten Bedingungen geprüft, ob das nachgewiesene Allergen auch tatsächlich die Krankheitssymptome hervorruft. Da die Provokation nicht ohne Risiko ist, erfolgt ihre Durchführung stets in Notfallbereitschaft.

1.4.4 Diagnostische Diät

Bei Verdacht einer Nahrungsmittelallergie kann eine Auslassprobe oder Eliminationsdiät die Diagnose verifizieren. Eine möglicherweise schon zuvor nachgewiesene allergische Reaktion auf eine Exposition durch das Allergen kann dadurch bestätigt werden.

Abschließend sind alle Testresultate stets mit der Anamnese und den klinischen Befunden abzugleichen.

1.5 Zielsetzung der Untersuchung

Die Allergie ist ein wesentliches medizinisches, aber auch gesundheitspolitisches Problem. Schätzungen über die Prävalenz der allergischen Diathese in der europäischen Bevölkerung variieren zwischen 10 bis 30 %. Geschätzte direkte und indirekte jährlichen Kosten von 7 Milliarden US \$ für die USA und 29 Milliarden US \$ in der europäischen Union machen die sozioökonomische Relevanz dieser Erkrankung deutlich [49].

Mit zunehmender Erkenntnis über die molekularen Vorgänge erfahren unsere pathophysiologischen Konzepte der allergischen Diathese zunehmend einen Wandel. Aufbauend auf diesen Konzepten wird angestrebt, das Risiko für die Manifestation einer allergischen Erkrankung besser prognostizieren und so präventive Maßnahmen ergreifen zu können.

Von entscheidender Bedeutung für das pathogenetische Verständnis der allergischen Diathese wie auch für die Entwicklung möglicher Therapien sind Kenntnisse über die genetische Kontrolle der spezifischen IgE-Antwort, der eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese der allergischen Reaktion zukommt. Langfristiges Ziel ist die Etablierung einer Therapie zur Modulierung oder Unterbindung dieser Immunantwort.

In vorangegangenen Studien an unterschiedlichen Patientenkollektiven konnten die Mechanismen der genetischen Kontrolle der spezifischen IgE-Antwort bisher noch nicht eindeutig geklärt werden.

Zur Klärung dieses Problems eignet sich insbesondere eine Untersuchung der Gene des MHC, die im Rahmen der allergischen Reaktion eine wichtige Rolle spielen, ebenso wie die Gene des IL-4, die bei der Typ I-Hypersensibilität ebenfalls relevant sind.

In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte HLA Klasse II-Gene, insbesondere DRB1-Allele, mit spezifischen Sensibilisierungen korrelieren. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen möglichen Zusammenhang zwischen einzelnen HLA-DRB1-Allelen und der spezifischen IgE-vermittelten Immunantwort einer bestimmten inhalativen Allergie zu untersuchen.

Eine mögliche Kopplung wurde statistisch, jedoch im Gegensatz zu bisher erfolgten Auswertungen anderer Studien durch eine Geschwisterpaaranalyse mittels SIBPAIR-, SIBPAL- und Extended Transmission Disequilibrium Test (ETDT) ausgewertet. Der Vorteil dieser drei Tests liegt in der Möglichkeit, komplexe Nicht-Mendelsche-Vererbungsmodi aufzudecken. Ein weiterer Vorteil dieser Familienuntersuchung liegt in der vorhandenen Kontrollgruppe, die durch die nicht sensibilisierten Geschwister gebildet wird.

2 Methodik und Probandenkollektiv

2.1 2.1 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR)

2.1.1 Auswahl der geeigneten Primer

Gemäß des XIIth International Histocompatibility Workshop (12. IHW)-Protokolls wurden für die Amplifikation des 2. Exons der Allele des Genlocus HLA-DRB1 Primer benutzt, die PCR-Produkte mit einer Länge von 26 beziehungsweise 22 Basenpaaren bildeten. Die notwendigen Primer wurden von der *Firma Eurogentec (Belgien)* bezogen:

DRB5-I: 5'-ACC GGA TCG TTC ITG TCC CCI CAG CA-3'

DRB3-I: 5'-CTC GCC ICT GAC CIG TIC AGC-3'

2.1.2 Herstellung des Reaktionsgemisches

Ein Reaktionsvolumen von 100 µl je Ansatz wurde gewählt, das aus folgenden Komponenten bestand (Tabelle 3):

Reagenz	Volumen in µl	Endkonzentration
dNTP-Mix	2.0	0.2 µM
10x-PCR-Puffer	10.0	1x
MgCl (50 mM)	4.0	2 mM
Primer-Mix	5.0	0.5 µM
Taq-Polymerase	0.5	2.5 U
Aqua destillata	ad 95	= 73.5 µl

Tabelle 3: Reaktionsgemisch

Für die jeweilige Probenanzahl (n) wurde dann ein sogenannter „*Master-Mix*“ (n * 94.5 µl pro Ansatz aus einem *PCR-Kit* der *Firma Gibco (Karlsruhe)* hergestellt. Hierfür wurden von den genannten Komponenten der dNTP-Mix, der 10x-PCR-Puffer, das MgCl sowie Aqua destillata benötigt. Dieser „*Master-Mix*“ wurde bei -20°C gelagert.

Am Versuchstag wurde anschließend die benötigte Menge an Taq-Polymerase ($n \cdot 0.5 \mu\text{l}$) hinzugegeben. Das so gewonnene Reaktionsgemisch wurde zu je $95 \mu\text{l}$ auf zuvor autoklavierte *Eppendorf-Cups* mit einem 0.5 ml Fassungsvermögen der *Firma Eppendorf (Köln)* verteilt.

Parallel zu dieser Vorbereitung wurden die zu untersuchenden tiefgefrorenen DNA-Proben aufgetaut und jeweils $5 \mu\text{l}$ (dies entsprach einer DNA-Menge von 100 ng) zu dem Reaktionsgemisch pipettiert. Die PCR-Ansätze wurden gemischt und zentrifugiert. Abschließend wurden alle Versuchsansätze zur Vermeidung möglicher Evaporation beziehungsweise Kondensation mit 2 Tropfen ($\approx 50 \mu\text{l}$) sterilem Mineralöl abgedichtet, da sich die *Eppendorf-Cups* nicht vollständig im Thermoblock des PCR-Gerätes befanden.

2.1.3 Festlegung des Temperaturprofils

Zur Optimierung des Amplifikationsvorgangs von HLA-DRB1 wurden die Temperaturangaben des 12. IHW-Protokolls gewählt, die den spezifisch vorherrschenden Laborbedingungen und dem zur Verfügung stehenden PCR-Gerät *Mastercycler* der *Firma Eppendorf (Köln)* angepasst wurden.

Die Denaturierung der DNA-Doppelstränge erfolgte durch eine Erhitzung der Proben auf 95° C für die Dauer von 5 Minuten. Zur Trennung der DNA-Stränge wurde die Temperatur für eine weitere Minute auf 95° C gehalten. Danach wurde eine Primeranlagerung initiiert durch eine Abkühlung auf 55° C für eine Minute. Die rasche Abkühlung verhinderte zugleich eine erneute Verbindung der getrennten DNA-Einzelstränge. Im Anschluss erfolgte die erwünschte Replikation der DNA bei 72° C innerhalb einer Minute. Der PCR-Zyklus wurde dann zur Anreicherung der zu replizierenden DNA über eine Loop-Funktion 40 Mal wiederholt. Zuletzt wurde der letzte Zyklus für weitere 10 Minuten bei 72° C gehalten. Die so gewonnene DNA wurde dann bis zur weiteren Verarbeitung bei 4° C aufbewahrt (Tabelle 4).

Denaturierung		95°C	5 Minuten	1x
PCR	Trennung DNA-Stränge	95° C	1 Minute	40x
	Primeranlagerung	55° C	1 Minute	
	Replikation	72° C	1 Minute	
		72° C	10 Minuten	1x
Konservierung		4° C	Bis zur weiteren Verarbeitung	

Tabelle 4: PCR-Programm in Kurzform

Zur Ergebniskontrolle wurde aus diesen PCR-Proben 5 µl entnommen. Der Rest wurde bis zum Dot-Blotting bei -20° C aufbewahrt.

2.1.4 Ergebniskontrolle der PCR

Bei jedem PCR-Ansatz erfolgte auch eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Die Positivkontrolle bestand aus Kontroll-DNA, die aus früheren Versuchen ein sicheres Positivergebnis brachte. Im Gegensatz dazu bestand die Negativkontrolle aus 5 µl Aqua destillata. Hierdurch konnte eine potentielle Kontaminierung durch Fremd-DNA bei unsauberen Arbeiten, durch fehlerhaftes Arbeiten des PCR-Gerätes oder ein falsch angesetzter Reaktionsmix ausgeschlossen werden.

Wäre bei der Negativkontrolle in der Elektrophorese eine typische Bande beziehungsweise bei der Positivkontrolle keine typische Bande aufgetreten, so hätten die gesamten PCR-Produkte des jeweiligen Ansatzes verworfen werden müssen. Darüber hinaus wäre eine Kontaminationssuche durchzuführen gewesen. Hätte andererseits eines der PCR-Produkte der Probanden in der Elektrophorese keine typische beziehungsweise eine zu schwache Bandenbildung gezeigt, wäre die DNA-Probe des jeweiligen Probanden auf deren DNA-Gehalt zu überprüfen gewesen.

Der Erfolg der Amplifikation wurde durch eine *DNA-Standard-Probe* der Firma *Biorad (München)* mittels Gelelektrophorese bestätigt (Abbildung 18).

Zur Herstellung des Gels wurden 0.75 g Agarose mit 50 ml *1-fach MOPS* (3-N-Morpholinopropan-Sulfonat) der Firma *Sigma (Deisenhofen)* in einem Erlenmeyerkolben gemischt, der mit einer Aluminiumfolie abgedeckt und unter

ständigem Rühren auf 200° C aufgeheizt wurde, bis die Lösung optisch homogen wurde. Unter weiterem Rühren wurde auf 60° C abgekühlt und anschließend 25 µl einer 1 mg/ml-haltigen Ethidiumbromid-Lösung der Firma Sigma (Deisenhofen) hinzugegeben. Dies ergab eine Endkonzentration von 0.5 µg Ethidiumbromid pro ml Gel, die empfohlene Konzentration, um DNA unter UV-Licht optisch nachzuweisen.

40 ml der so zubereiten Lösung wurde in die *Mini-Agarosegelkammer* der Firma Welabo (Düsseldorf) eingegossen, je nach Bedarf entweder mit einem Gelkamm für 12 Probenaschen oder zwei Gelkämmen für 2 x 12 Probenaschen versehen und bei Raumtemperatur abgekühlt.

In der Zwischenzeit wurden die zuvor gewonnenen PCR-Produkte vorbereitet. Dazu wurden je 5 µl der PCR-Produkte und eines Bromphenolblau enthaltenen *Probenpuffers* der Firma Sigma (Deisenhofen) in einen 0.5 ml *Eppendorf-Cup* pipettiert, gemischt und zentrifugiert.

Außerdem war für jedes Gel eine *DNA-Size-Standard-Probe* (Abbildung 18 rechts) vorgesehen, die aus 4 µl *DNA-Size-Standard Low Range* der Firma Biorad (München), 3 µl Aqua destillata und 1 µl des genannten *Probenpuffers* bestand.

Nach Verfestigung des Agarosegels wurden je 7 µl der PCR-Produkte, der Positiv-, der Negativkontrolle und des DNA-Standards in die Probenaschen pipettiert. Das Agarosegel wurde dann in eine *Elektrophoresekammer* der Firma Biorad (München) eingesetzt. Die Kammer wurde mit dem 0.5 µg/ml-ethidiumbromidhaltigem 1-fach *MOPS* bis zur kompletten Bedeckung des Agarosegels aufgefüllt.

Bei einer Spannung von 100 Volt wanderten die Proben von Kathode (Minuspol) zur Anode (Pluspol). Wenn das optisch sichtbare, vor den DNA-Proben herlaufende Bromphenolblau $\frac{3}{4}$ des gesamten Gels bei 12 Probenaschen beziehungsweise $\frac{3}{4}$ des halben Gels bei 24 Probenaschen erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

Die Tatsache, dass an DNA angelagertes Ethidiumbromid unter UV-Licht intensiv orange illuminiert, wird für die Fotografie des Agarosegels mittels einer UV-Licht-Polaroid-Kamera genutzt, um den Erfolg der PCR an Hand der Positiv-, der Negativkontrolle und der Intensität der Banden der Probanden-DNA zu überprüfen (Abbildung 18 links).

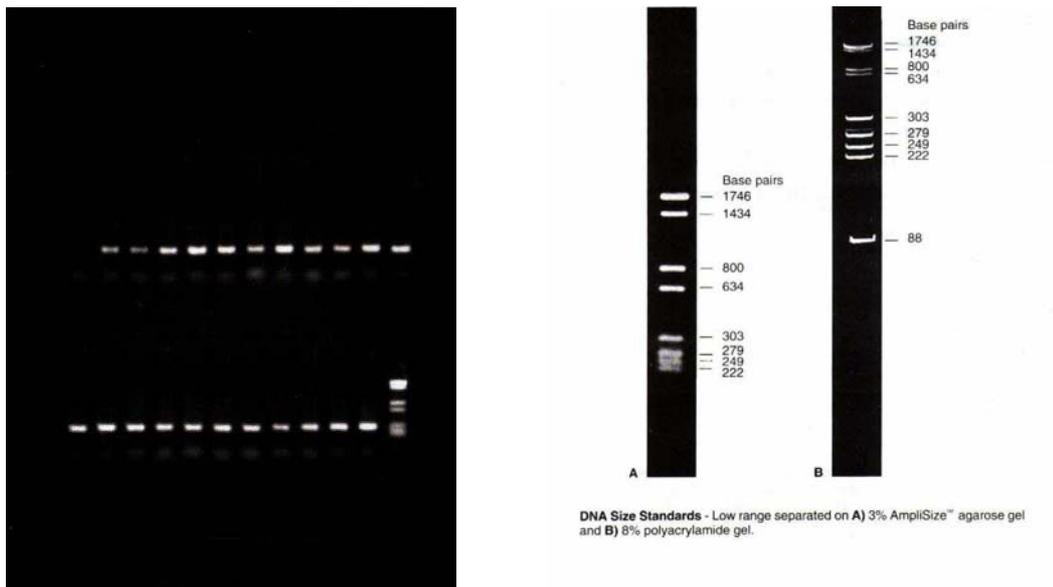


Abbildung 18: Kontroll-Fotografie der PCR-Produkte und DNA-Size-Standard. Links dargestellt ist eine typische PCR-Kontrolle. An Hand der Negativkontrolle (Spur 1) und des DNA-Size-Standard (Spur 24) werden die PCR-Produkte geprüft.

2.2 Dot-Blotting

2.2.1 Vorbereitung der PCR-Produkte

Um eine Verunreinigung zu vermeiden, wurde bei allen Arbeiten mit sauberen Einmalhandschuhen gearbeitet. Benutzt wurden sterile Pipetten, autoklavierte Spitzen und sterile Eppendorfggefäße.

Von jeder Probe wurden 40 µl PCR-Produkt entnommen und zusammen mit 1600 µl einer 0.4 N NaOH- und 0.25 M EDTA-Lösung enthaltenden Denaturierungslösung in ein 2 ml-Eppendorfggefäß der Firma Eppendorf (Köln) gegeben und gründlich gemischt.

2.2.2 Vorbereitung der Dot-Blot-Kammer

Die 96-Loch-Dot-Blot-Kammer der Firma Biorad (München) wurde vor jedem Durchgang gereinigt. Dazu wurde ein 3 mm starkes Filterpapier und eine Hybond N[®]-Nylonmembran der Firma Amersham (Braunschweig) auf 7.5 x 11 cm zurecht geschnit-

ten, die angefeuchtet eingespannt wurden. Die Kammer wurde an allen vier Ecken gleichmäßig zugeschraubt und an eine Vakuumpumpe angelegt. Jede Auftragsstelle wurde mit je 500 µl 10 %-iger NaOH-Lösung gefüllt, die restlos abgesaugt wurde. Anschließend wurden auf die gleiche Weise wiederum alle Auftragsstellen zweimal mit je 500 µl Aqua destillata durchgespült. Zuletzt wurden Filterpapier und Nylonmembran verworfen.

2.2.3 Blot der Patienten-DNA

Wichtig war bei allen Durchgängen eine übersichtliche und exakte Protokollführung der Probenanordnung und eine deutliche Kennzeichnung der Membranen. Dazu wurden die Transfermembranen auf das exakte Maß der Dot-Blot-Kammer zugeschnitten, dann durch Ausschneiden eines kleinen dreieckigen Stückes der unteren rechten Ecke, eines viereckigen Stückes der oberen rechten Ecke und je nach Membrannummer durch entsprechend viele kleine Dreiecke am linken Membranrand als spezifische Markierung gekennzeichnet.

Die Nylonmembran wurde bei dem Zuschneiden und der Markierung zwischen den Schutzfolien belassen und erst dann mit einer Pinzette entnommen. Sowohl die neu zugeschnittene Transfermembran als auch neues Filterpapier wurden in 10-fach SSC-Lösung (1.5 M NaCl und 0.15 M Na-Citrat) für 30 Sekunden eingeweicht und anschließend mit der Nylonmembran zu den Kammern hin in die Kammer eingespannt. Nachfolgend wurden alle Auftragsstellen zunächst jeweils mit 500 µl 10-fach SSC-Lösung gründlich durchgespült.

Nach dem Abtrennen der Pumpe von der Kammer konnte nun der eigentliche Blot-Vorgang erfolgen. Dazu wurden je 200 µl denaturierte DNA-Lösung eines Probanden im Doppelansatz, das heißt in zwei benachbarte Auftragsstellen der Kammer pipettiert. So konnte die DNA von jeweils 48 Probanden auf jede Membran fixiert werden.

Nach einer Einwirkzeit von mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Kammer durch das Anlegen einer Vakuumpumpe über 30 Sekunden vollständig entleert. Danach wurde die Membran - nach Lösen der Schrauben - vorsichtig mit der Pinzette aus der Kammer entfernt. Die nun physikalisch relativ locker fixierte DNA auf der teils noch feuchten Membran wurde mit einer UV-Lampe für 5 Minuten von unten und 3 Minuten von oben bestrahlt. Danach wurde die Membran mit der Unterseite auf

eine vorbereitete Aluminiumfolie gelegt und zur thermischen Fixierung in einem vorgeheizten Inkubator bei 80° C für 2 Stunden behandelt.

Schließlich wurde sie für circa 1 Minute in Neutralisationslösung eingelegt und danach sofort in Folie eingeschweißt bei -20° C gelagert. Alle DNA-Proben wurden im Doppelansatz auf 4 Membranen fixiert, um später eine gleichzeitige Hybridisierung von 4 verschiedenen SSO zu ermöglichen. Zur Unterscheidung wurden Kerben in den oberen Membranrand geschnitten.

Nach dem Abschluss standen insgesamt 24 Nylonmembranen mit Patienten-DNA zu Verfügung.

2.2.4 Blot der Kontrollzell-DNA

Zur Typisierung der HLA-Typen wurden ebenfalls im Doppelansatz jeweils pro Kammer 48 DNA-Proben der im XIIth International Histocompatibility Workshop empfohlenen Kontrollzellreihen mit bekannter Sequenz auf 8 verschiedene Nylonmembranen geblottet.

Zur bestmöglichen Abbildung der verschiedenen HLA-Untertypen wurden die Zelllinien gewählt, die entweder allein oder in Kombination mit einer anderen die zu untersuchenden HLA-Typen eindeutig zuordnen ließen.

Dies ergab insgesamt 8 Membranen mit den gleichen 48 Kontroll-DNA-Proben für die nachfolgende Hybridisierung.

Lösungen:

Denaturierungslösung:

20 ml 10 N NaOH

250 ml 0.5 M EDTA

230 ml Aqua destillata

Endkonzentration:

0.4 N

0.25 M

10 % NaOH:

50 g NaOH-Plätzchen

ad 500 ml Aqua destillata

10-fach SSC:

250 ml 20-fach SSC

250 ml Aqua destillata

Neutralisationslösung:

78.8 g Tris-Cl MG: 157.6

0.5 M

87.7 g NaCl MG: 58.5

1.5 M

10 ml 0.5 M EDTA

5 mM

ad 1000 ml Aqua destillata

Reagenzien:

Natriumhydroxyd-Plätzchen

500 g, Firma Sigma (Deisenhofen)

EDTA 0.5 M

100 ml Firma Sigma (Deisenhofen)

NaCl

1 kg, Firma Sigma (Deisenhofen)

SSC (1.5 M NaCl+0.15 M Na-Citrat)

1 l, Firma Sigma (Deisenhofen)

Tris-HCl

250 g, Firma Sigma (Deisenhofen)

Transfer-Membran Hybond N

15 x 19 cm, 20 Stück, Firma Amersham (Braunschweig)

2.3 Vorbereitung Hybridisierung

2.3.1 Auswahl der Kontrollzelllinie

Die in der Tabelle 5 für die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse aufgelisteten erforderlichen Kontrollzelllinien entstammen dem XIIth International Histocompatibility Workshop (12. IHW). Durch geeignete Auswahl der benutzten in Tabelle 5 aufgeführten sequenzspezifischen Oligonukleotide konnte mittels einer bekannten Basensequenz der jeweiligen Kontrollzelllinie eine HLA-Typisierung eindeutig durchgeführt werden.

Der Großteil der *Kontrollzellen* - Epstein-Barr-Virus-transformierte B-Zelllinien - wurde über die *Firma ECACC (USA)* bestellt.

Nicht mit einer IHW-Nummer klassifiziert sind Kontrollzelllinien, die sich in einer vorangegangenen Studie bewährt hatten und aus dem *Institut für Immunologie Prof. Große-Wilde (Universität Essen)* bezogen wurden.

IHW - Nummer	Name der Kontrollzelle	DRB1	DRB1
IHW9061	31227ABO	1401	
IHW9286	AKIBA	1502	
IHW9010	AMAI	1503	
IHW9064	AMALA	1402	
IHW9291	APD	1301	
IHW9293	AZH	1601	
	BAE	DR8	
IHW9040	BM15	1102	
IHW9038	BM16	1201	
	BM24	DR2	DR11
IHW9348	C212	0101	1301
IHW9311	CB	0410	
IHW9060	CB6B	1301	
IHW9315	C.M.L.	0301	0401
IHW9052	DBB	0701	
IHW9097	EMJ	1302	
IHW9011	E4181324	1502	
IHW9317	FORE	0404	1604
IHW9105	FPAF	11041	
IHW9365	GRC-138	1413	
IHW9297	HAG	1303	
IHW9074	HID	09	
	HLA59	DR6	DR8
	HLA92	DR5	DR6
	HLA104	DR10	
	HOF	DR2	
IHW9055	HO301	1302	
IHW9009	KAS011	1601	
IHW9309	KGU	1404	
IHW9048	LBUF	0701	
IHW9070	LUY	08032	
IHW9308	MARMari	1411	1102
IHW9050	MOU	0701	
IHW9316	M.R.	0401	03012
IHW9002	MZO70782	0102	
IHW9071	OLGA	08022	
IHW9028	PE117	0404	
IHW9318	PGF	1501	
IHW9020	QBL	0301	
IHW9016	RML	1602	
IHW9021	RSH	0302	
IHW9314	V.E.C.	1302	0401
IHW9017	WT8	1501	
IHW9015	WT24	Negativkontrolle	Negativkontrolle
IHW9285	WT49	0301	
IHW9029	WT51	0401	
IHW9349	ZM-FC	0403	11
IHW9313	1125	1304	

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Kontrollzellen (mit Angabe des Eigennamens der EBV-transformierten B-Lymphozyten-Zelllinien sowie der Kennnummer des 12. IHW-Protokolls) zusammen mit ihren HLA-II-DRB-Alleleigenschaften

2.3.2 Auswahl der sequenzspezifischen Oligonukleotide

Die zur Analyse benötigten sequenzspezifischen Oligonukleotide (SSO) für den Nachweis der bis 1996 bekannten HLA-DRB-Allele, die in der Tabelle 6 aufgelistet sind, entsprechen der Empfehlung des XIIth International Histocompatibility Workshops.

DRB1-SSO (XII. IHW-Protokoll)	DNA-Sequenz (5'→3')	Kontrollzelllinien
1001W	TGG CAG CTT AAG TTT GAA	MZO70782
1002W	AG CCT AAG AGG GAG TGT C	AKIBA, AMAI, AZH, BM24, E4181324, HOF, KAS011, PGF, RML, WT8
1003	G TAC TCT ACG TCT GAG TG	31227ABO, AMALA, APD, BM15, C212, CB6B, EMJ, FPAF, HAG, HLA59, HLA92, HO301, MARMari, M.R., QBL, RSH, WT49, ZM-FC, 1125
1004	GAG CAG GTT AAA CAT GAG	CB, C.M.L.FORE, HLA59, PE117, V.E.C., WT51
1005W	GAG TAC TCT ACG GGT GAG	BAE, BM16, HLA59, KGU, LUY, OLGA, ZM-FC
1006	TGG CAG GGT AAG TAT AAG	DBB, LBUF, MOU,
1008	GAG GAG GTT AAG TTT GAG	HLA104
<hr/>		
2804	G TAT CTG CAC AGA GGC AT	HID
2813	G TTC CTG GAC AGA TAC TT	31227ABO, AKIBA, APD, AZH, BAE, BM15, BM24, C212, CB, CB6B, C.M.L., EMJ, E4181324, FORE, FPAF, HAG, HLA59, HLA92, HO301, HOF, KAS011, KGU, LUY, MARMari, OLGA, PE117, PGF, RML, V.E.C., WT8WT51, ZM-FC, 1125
<hr/>		
3703	AC CAG GAG GAG AAC GTG C	AMALA, APD, C212, CB6B, EMJ, HLA59, HLA92, HO301, M.R., QBL, RSH, WT49
3704	AT CAC CAA GAG GAG TAC G	CB, C.M.L., FORE, PE117, V.E.C., WT51
3705W	C CAG GAG GAG CTC CTG CG	BM16, ZM-FC
3715	AT CAC CAA GAG GAG TCC G	HLA59
<hr/>		
5702	G CCT AGC GCC GAG TAC TG	BAE, HAG, LUY, 1125
5703	G CCT GAT GAG GAG TAC TG	BM15, FPAF, HLA59, HLA92, MARMari, ZM-FC
5704	G CCT GCT GCG GAG CAC TG	31227ABO, HLA59, KGU
5708	G CCT GAT GCT GAG TAC TG	HLA59
5711W	G CCT GAT GCG GAG CAC TG	HLA59

DRB1-SSO (XII. IHW-Protokoll)	DNA-Sequenz (5'→3')	Kontrollzelllinien
7001	TC CTG GAG CAG AGG CGG G	AMALA, FORE, HLA59, MZO70782, PE117
7003	GAC CTC CTG GAA GAC AGG	BM24, HLA59, HOF, RML, 1125
7004	GGC CGG GTG GAC AAC TAC	BM15, RSH, ZM-FC
7007	AC ATC CTG GAA GAC GAG C	APD, C212, CB6B, EMJ, HLA92, HO301, MARMari
7016W	TG GAA GAC AGG CGG GCC G	BAE, FPAF, HLA92, ZM-FC
7030W	G GAA GAC AGG CGG GCC CT	BAE, HLA59, LUY, OLGA

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten HLA-DRB1-SSO mit Nukleotidsequenz und den sie definierten Kontrollzelllinien. Diejenigen SSO, die einer hypervariablen Region zuzuordnen sind, erscheinen blockweise.

2.3.3 Vorbereitung der Oligonukleotide

Zur Konversion eines unmodifizierten Oligonukleotid in ein AP-konjugiertes Oligonukleotid wurde das *LIGHTSMITH II System* der Firma *Serva (Heidelberg)* benutzt. Der Vorgang kann in 3 Reaktionsabschnitte unterteilt werden.

2.3.3.1 Elongationsreaktion des 3'-Ende des SSO

Um die Alkalische Phosphatase an das 5'-Ende binden zu können, wurde mit Hilfe der Terminaltransferase die Aminogruppe mit dem 3'-Ende gekoppelt. Unter bestimmten Reaktionsbedingungen wurden exakt 3 aufeinanderfolgende aminomodifizierte ATP an das 3'-Ende hinzugefügt. Auf diese Weise wurden annähernd 90 % aller SSO modifiziert.

2.3.3.2 Aktivierung des 3'-aminomodifizierten SSO

Der Elongationsreaktion folgend, wurden mittels eines hochmolekularen kationischen Polymer die SSO in 95 % Ethanol präzipitiert und konzentriert. Die Aminogruppe reagierte dann mit einem heterobifunktionalem Reagenz mit Hilfe eines allgemeinen Acyltransfer-Katalysators, der die Aminogruppe in eine geschützte Sulfhydrylgruppe umwandelte. Durch DTT wurden nach der Aktivierung die geschützten Gruppen gespalten und es entstanden 3'-SH-modifizierte Oligonukleotide, die präzipitiert wurden, um den DTT-Überschuss zu entfernen.

2.3.3.3 Konjugation mit aktivierter Alkalischer Phosphatase

Die 3'-Sulphydryl-modifizierten Oligonukleotide wurden dann via einer Disulfid-Austauschreaktion mit modifizierter Alkalischer Phosphatase konjugiert. Danach wurden sie durch einen Molekularsieb-Drehfilter von den ungekoppelten Oligonukleotiden gereinigt.

2.3.4 Blockierung der freien Bindungsstellen

Bevor die Hybridisierung im engeren Sinne erfolgen konnte, musste durch eine Blockierung der freien Bindungsstellen eine optimale Bedingung hergestellt werden.

Dafür wurden pro 50 ml fassendes *Falcon-Tube* der Firma *Becton Dickinson (Heidelberg)* 3-4 Membranen durch Netze getrennt in einer 1-fach SSC-Lösung mit der Rückseite zur Gefäßwand bei Raumtemperatur eingerollt. Dann wurden 10 ml der je nach SSO spezifischen Hybridisierungstemperatur (Tabelle 8) vorgeheizten *Quantum Yield Blocking Solution* der Firma *Serva (Heidelberg)* dazugegeben. Danach wurden die *Falcon-Tubes* bei ebenfalls vorgeheiztem Inkubator zwischen 30-45 Minuten inkubiert.

2.4 Hybridisierung

Nach erfolgter Blockierung wurde die *Quantum Yield Blocking Solution* abgeschüttet, die durch 10 ml der *Quantum Yield Hybridisation Solution* der Firma Serva (Heidelberg) und 33 µl der AP-konjugierten SSO ersetzt wurde, und anschließend exakt 30 Minuten bei spezifischer Hybridisierungstemperatur (Tabelle 8) inkubiert.

2.4.1 Waschvorgang

Das Waschen lässt sich in 3 Schritte unterteilen:

- 1) Der erste Schritt bestand aus zweimaliger Inkubation mit je 10 ml einer 1-fach SSC- + 1 % SDS-Lösung bei einer spezifischen, vorher bestimmten Waschtemperatur (Tabelle 8).
- 2) Danach wurde zweimal je zu 10 Minuten mit jeweils 10 ml einer TMAC-Lösung inkubiert.
- 3) Zum Schluss wurde der erste Schritt noch einmal wiederholt.

Vor jedem Teilschritt wurden die Membranen erst mit der gleichen, bei jedem Teilschritt zu benutzenden Lösung durchgespült, um sie von der zuvor benutzten Lösung zu befreien.

Als Richtwerte der Waschtemperaturen dienten die jeweiligen empfohlenen Hybridisierungstemperaturen der einzelnen SSO (Tabelle 7), die nicht nur von der Länge und dem Cytosin-/Guaningehalt des benutzten SSO, sondern auch von den unterschiedlichen Laborbedingungen abhängig sind. Daher musste die für das Labor spezifische Waschtemperatur zumeist noch über Änderung der Ausgangstemperatur für bestimmte SSO ermittelt werden (Tabelle 8).

Alle bei der Hybridisierung und dem Waschvorgang benutzten Lösungen wurden vor jedem Schritt stets auf die benötigte Temperatur vorgeheizt.

Oligonukleotidlänge	Hybridisierung	Waschvorgang
18 mer.	54° C	59° C
19 mer.	55° C	59-60° C
20 mer.	56° C	60° C

Tabelle 7: Empfohlene Hybridisierungs- und Waschvorgangtemperatur nach 12. IHW-Protokoll, abhängig von Oligonukleotidlänge

HLA-DRB1-SSO	Hybridisierungstemperatur (in ° C)	Waschtemperatur (in ° C)	Röntgenfilmauflagezeit (in Stunden)
1001	45	45	12
1002	42	45	5
1003	42	42	14
1004	42	47	5
1005	42	42	44
1006	45	45	4
1008	45	45	4
2804	45	45	12
2813	45	50	12
3703	45	45	12
3704	42	45	12
3705	45	45	16
3715	42	45	12
5702	40	40	8
5703	45	45	12
5704	40	40	12
5708	40	40	12
5711	40	40	12
7001	42	45	8
7003	40	42	8
7004	40	48	4
7007	42	42	4
7016	40	45	8
7030	40	42	4

Tabelle 8: Individuell ermittelte Hybridisierungs- und Waschttemperatur der zur Analyse der HLA-DRB1-Allele verwendeten sequenzspezifischen Oligonukleotide sowie der anschließenden Belichtungszeit des Röntgenfilms

2.4.2 Aktivierung der Chemolumineszenz

Nach dem Waschen wurden die hybridisierten AP-konjugierten SSO aktiviert und für die Belichtung der XOMat-Filme vorbereitet. Dazu wurden die Membranen einzeln in

mit 1-fach SSC-gefüllten Schälchen 3 Minuten lang bei Raumtemperatur auf einem Rütteltisch geschaukelt, dann 3 Minuten in Diethanolamin-Puffer mit pH 10 gelegt. Nach weiterer 5-minütiger Inkubation der Membranen in *Quantum Yield Chemiluminiscent Substrate Solution* der Firma *Serva (Heidelberg)* bei Raumtemperatur auf dem Rütteltisch wurden die Membranen unter Abschluss von Luft in Plastikfolie eingeschweißt.

Alle Hybridisierungsresultate wurden auf die gleiche Weise eingeschweißt, um die spätere Auswertung zu erleichtern. Die ersten 4 Probandenmembranen wurden immer nach dem gleichen Muster in eine Plastikfolie eingeschweißt, die folgenden 2 immer mit einer Kontrollmembran. Dann wurden die Folien an Hand des bei dem Dot-Blot eindeutig markierten Randes identifiziert und mit der Unterseite der Membran zum Boden zeigend in eine lichtundurchlässige Filmkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde dann ein mit Einschnitten am Rand markierter Film eingelegt und anschließend - je nach zu untersuchendem SSO - 4, 8 beziehungsweise 16 Stunden lang einer Belichtung durch die von der Membran ausgehende Chemolumineszenz ausgesetzt. Nach der Belichtung wurden die Filme entwickelt (Abbildungen 19 und 20), beschriftet und ausgewertet.

2.4.3 Reinigung der Membranen und Netze („Stripping“)

Nach dem Waschvorgang wurden die Membranen von den Netzen getrennt. Die Trennnetze wurden mit jeweils 6-7 in einem Falcon-Tube bei 50° C in ungefähr 15 ml Reinigungslösung über Nacht im Inkubator gereinigt. Zur Konservierung wurden sie in 1-fach SSC im Kühlschrank gelagert.

Die Nylonmembranen wurden nach der Filmentwicklung einzeln in Reinigungslösung bei 50° C über 30 Minuten im Wasserbad inkubiert, dann in Neutralisationslösung über 10 Minuten bei Raumluft auf dem Rütteltisch geschaukelt und danach weitere 10 Minuten in 1-fach SSC bei Raumtemperatur stehen gelassen. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie eingeschweißt und bei -20° C aufbewahrt.

2.4.4 Auswertung

Die Anfertigung einer der Membran maßstabgetreuen Schablone ermöglichte eine rasche und sichere Zuordnung der auf dem Röntgennegativ geschwärzten Stellen zu den jeweiligen Probanden. Unter dem Röntgennegativ konnte dann je nach Schwärzung der Punkte auch die Signalstärke dem jeweiligen Probanden zugeordnet werden.

DRB1	DR1				DR2						
	SSO	0101	0102	0103	0104	1501	1502	1503	1601	1602	1603
1001	+	+	+	+							
1002						+	+	+	+	+	+
1003											
1004											
1005											
1006											
1008											
2804											
2813						+	+		+	+	+
3703											
3704											
3705											
3715											
5702											
5703											
5704											
5708											
5711											
7001	+	+			+						
7003										+	
7004											
7007				+							
7016											
7030											

Tabelle 9: Hybridisierungsmuster der HLA-DRB1-Allele, markiert mit den entsprechenden SSO. Komplementäre Sequenzen sind durch ein „+“ gekennzeichnet

DRB1	DR3				DR4						
SSO	0301 1	0301 2	0302	0303	0401	0402	0403	0404	0405	0406	0407
1001											
1002	+	+	+	+							
1003											
1004					+	+	+	+	+	+	+
1005											
1006											
1008											
2804											
2813					+	+	+	+	+	+	+
3703	+	+	+	+							
3704					+	+	+	+	+		+
3705											
3715										+	
5702									+		
5703											
5704											
5708											
5711											
7001							+	+	+	+	+
7003											
7004	+		+	+							
7007						+					
7016											
7030											

Tabelle 10: Hybridisierungsmuster der HLA-DRB1-Allele, markiert mit den entsprechenden SSO. Komplementäre Sequenzen sind durch ein „+“ gekennzeichnet

DRB1	DR4									
SSO	0408	0409	0410	0411	0412	0413	0414	0415	0416	0417
1001										
1002										
1003										
1004	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1005										
1006										
1008										
2804										
2813	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3703										
3704	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3705										
3715										
5702		+	+	+	+					+
5703								+		
5704										
5708										
5711										
7001	+		+	+						+
7003										
7004										
7007							+			
7016								+		
7030					+					

Tabelle 11: Hybridisierungsmuster der HLA-DRB1-Allele, markiert mit den entsprechenden SSO. Komplementäre Sequenzen sind durch ein „+“ gekennzeichnet

DRB1	DR5											
SSO	1101 1	1101 2	1102	1103	1104 1	1104 2	1105	1106	1107		1201	1201
1001												
1002												
1003	+	+	+	+	+	+		+	+			
1004												
1005							+				+	+
1006												
1008												
2804												
2813	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
3703												
3704												
3705											+	+
3715												
5702												
5703	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
5704												
5708												
5711												
7001												
7003												
7004									+			
7007			+									
7016	+	+			+	+	+	+				
7030												

Tabelle 12: Hybridisierungsmuster der HLA-DRB1-Allele, markiert mit den entsprechenden SSO. Komplementäre Sequenzen sind durch ein „+“ gekennzeichnet

DRB1	DR6												
	SSO	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1401	1402	1403	1404
1001													
1002													
1003		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1004													
1005													+
1006													
1008													
2804													
2813		+	+	+	+	+	+	+	+	+			+
3703		+	+			+	+				+	+	
3704													
3705													
3715													
5702				+	+								
5703													
5704										+			+
5708													
5711													
7001											+		
7003												+	
7004													
7007		+	+		+				+				
7016						+	+	+					
7030												+	

Tabelle 13: Hybridisierungsmuster der HLA-DRB1-Allele, markiert mit den entsprechenden SSO. Komplementäre Sequenzen sind durch ein „+“ gekennzeichnet

DRB1	DR6							DR7	DR8	
SSO	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	0701	0801	0802 1
1001										
1002										
1003	+	+	+	+	+					
1004						+				
1005							+		+	+
1006								+		
1008										
2804										
2813	+		+	+	+	+	+		+	+
3703		+			+					
3704										
3705										
3715										
5702									+	
5703							+			
5704			+			+				
5708	+									
5711				+						
7001		+			+					
7003										
7004										
7007										
7016										
7030									+	+

Tabelle 14: Hybridisierungsmuster der HLA-DRB1-Allele, markiert mit den entsprechenden SSO. Komplementäre Sequenzen sind durch ein „+“ gekennzeichnet

DRB1	DR8							DR9		DR10
SSO	0802	0803 1	0803 2	0804 1	0804 2	0805	0806	0901 1	0901 2	1001
1001										
1002										
1003										
1004										
1005	+	+	+	+	+	+	+			
1006										
1008										+
2804								+	+	
2813	+	+	+	+	+	+	+			
3703										
3704										
3705										
3715										
5702		+	+			+	+			
5703										
5704										
5708										
5711										
7001										
7003										
7004										
7007										
7016						+				
7030	+	+	+	+	+		+			

Tabelle 15: Hybridisierungsmuster der HLA-DRB1-Allele, markiert mit den entsprechenden SSO. Komplementäre Sequenzen sind durch ein „+“ gekennzeichnet

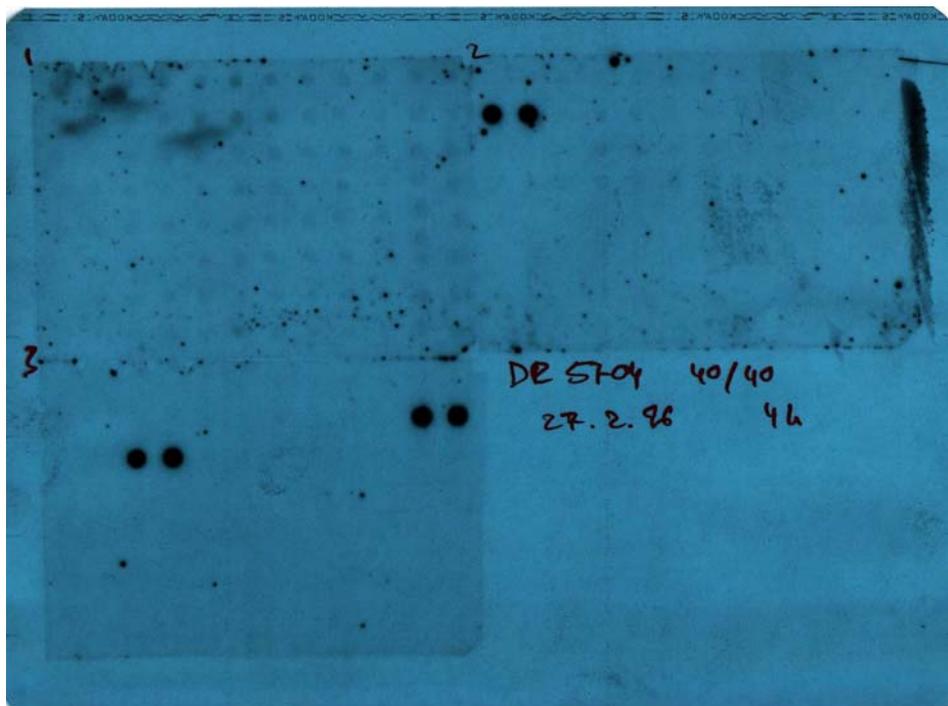


Abbildung 19: Ergebnis der Hybridisierung (Membranen 1, 2 und 3)

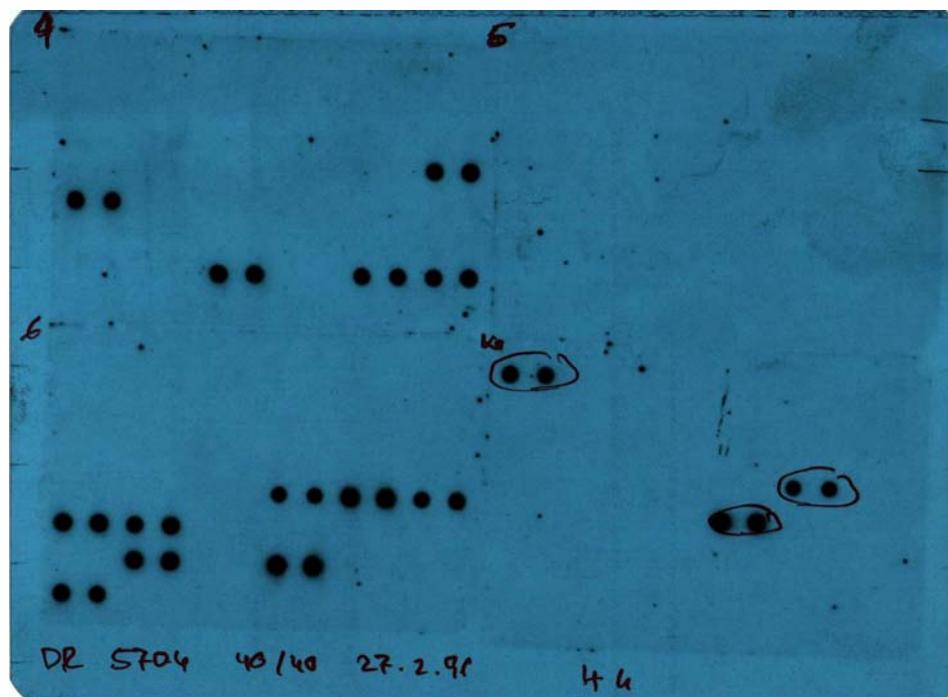


Abbildung 20: Ergebnis der Hybridisierung (Membranen 4-6 und Kontrollmembran)

Lösungen:

TMAC (Tetra-Methyl-Ammoniumchlorid)-Lösung:

300 ml 5 M TMAC

25 ml 1 M Tris

2 ml 0.5 M EDTA

5 ml 10 % SDS

ad 500 ml Aqua destillata

Reinigungs(Stripping)lösung:

50 ml 10 N NaOH

87.66 g 1.5 M NaCl

ad 1000 ml Aqua destillata

Reagenzien:

TMAC (Tetra-Methyl-Ammoniumchlorid)

Firma Sigma (Deisenhofen)

20 % SDS (Sodium-Dodecylsulfat)

Firma Biometra (Göttingen)

Quantum Yield Blocking Solution

Firma Serva (Heidelberg)

Quantum Yield Hybridisation Solution

Firma Serva (Heidelberg)

Quantum Yield Chemiluminiscent Substrate Solution

Firma Serva (Heidelberg)

2.5 Auswahl der Probanden

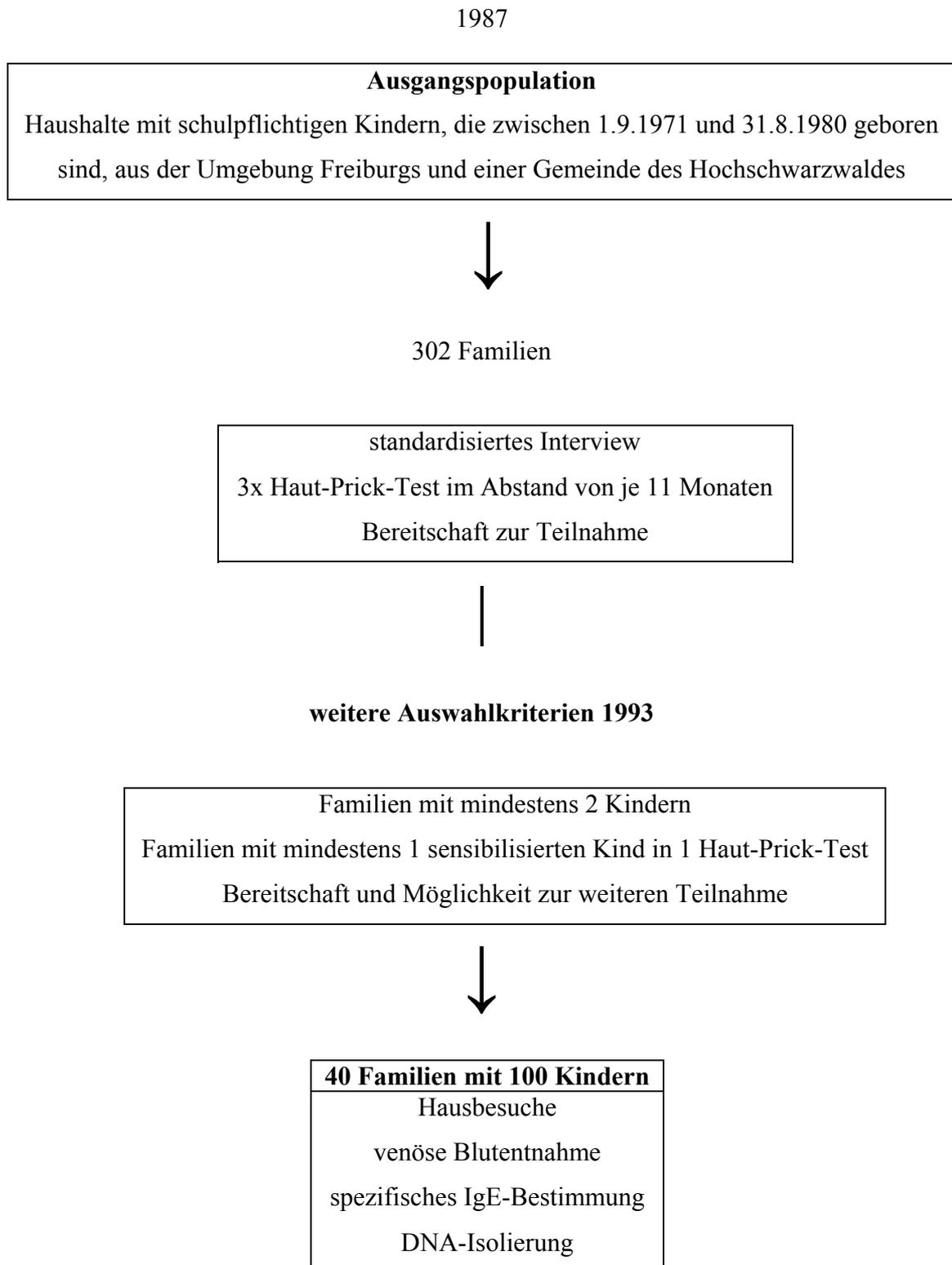


Abbildung 21: Übersicht der Probandenrekrutierung

Die Rekrutierung der Studienpopulation erfolgte in den Jahren 1987-1994.

Zunächst wurden insgesamt 463 Familien aus der Umgebung von Freiburg sowie dem Schwarzwald randomisiert angeschrieben. Die schulpflichtigen Kinder waren zwischen dem 01.09.1971 und 31.08.1980 geboren. Davon konnten 302 Familien für eine Longitudinalstudie gewonnen werden.

Um eine vorhandene Sensibilisierung zu objektivieren, wurde bei allen Probanden dreimal in 11-monatigen Abständen eine Haut-Prick-Testung und ein standardisiertes Interview durchgeführt.

Im Jahre 1993 wurde das Probandenkollektiv durch weitere Auswahlkriterien eingeschränkt. Die Familien mussten mindesten 2 Kinder haben, wobei bei mindestens einem Kind eine Sensibilisierung bestehen musste.

Von 123 in Frage kommenden Familien standen im weiteren Verlauf 40 Familien mit insgesamt 100 Kindern für die Studie zur Verfügung.

2.5.1 Interview

In einem standardisierten Verfahren wurden allen Probanden Fragen gestellt zur allergischen Vorgeschichte, wie Rhinitis, Konjunktivitis, Dermatitis und Asthma.

Bei Kindern unter 16 Jahren wurden die Mütter befragt. Kinder, die älter als 16 Jahre waren, konnten die Fragen selbst beantworten, wobei die Mutter stets anwesend war und fehlende Informationen ergänzte.

2.5.2 Der Haut-Prick-Test

In 3 Haut-Prick-Testungen im Abstand von je 11 Monaten wurden die Sensibilisierungen festgestellt. Dabei wurden folgende standardisierte Allergenextrakte der Firma ALK (Dänemark) mit einer Konzentration von 10 U/ml verwendet:

- Milbenallergen: *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*)
Dermatophagoides farinae (*Der f*)



Abbildung 22: Hausstaubmilben

- Lieschgraspollen: *Lolium perenne* (*Lol p*)

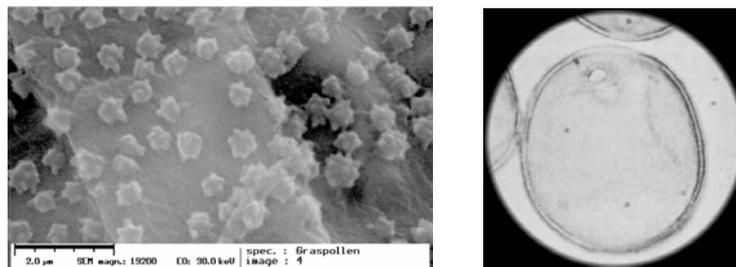


Abbildung 23: Graspollen

- Birkenpollen: *Betula verrucosa* (*Bet v*)

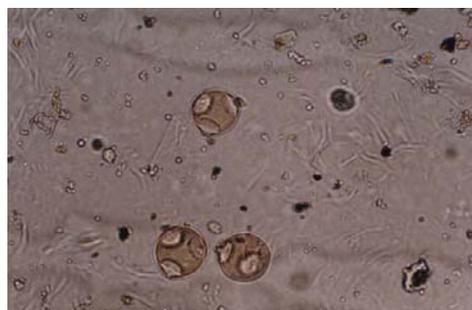


Abbildung 24: Birkenpollen

- Katzenepithelallergen: *Felis domesticus* I (*Fel d I*)

Zur Positivkontrolle wurde Histaminhydrochlorid zu je 10 mg/ml und 1 mg/ml verwendet. Als Negativkontrolle diente NaCl 0.9 %. Allen Probanden wurde in gleichbleibender Reihenfolge mit einem Mindestabstand von 2 cm je 1 Tropfen der Allergenextrakte, der Negativ- und der beiden Positivkontrollen auf die Volarseite des Unterarms aufgetragen. Anschließend wurde das Allergen mittels einer Stahllanzette in die Haut eingebracht. Nach 15 Minuten wurde dann jeweils der längste und der dazu orthogonale Quaddeldurchmesser ermittelt und das arithmetische Mittel errechnet. Davon wurde der Durchmesser der Negativkontrolle subtrahiert. Blieb danach ein Quaddeldurchmesser von mehr als 2 mm bei einer Allergen-/Histaminquaddel-Ratio von mindestens 0.5, konnte dies als eine positive Hautreaktion gewertet werden.

Der Haut-Prick-Test diente als wesentliche Screeninguntersuchung zur Bestimmung allergisch erkrankter Probanden. Als einziges Kriterium für eine Sensibilisierung galt im weiteren Verlauf der Studie jedoch allein eine spezifische IgE-Serumkonzentration von ≥ 1.43 U/ml.

2.5.3 Venöse Blutentnahme

Jedem Probanden wurde 17 ml Vollblut aus einer Unterarmvene entnommen. Davon wurden 5 ml abgesert und zur Bestimmung des spezifischen IgE verwendet. Die restlichen 12 ml wurden mit Natrium-Heparinat gemischt. Aus 6 ml wurden mittels Ionenaustauschchromatografie Desoxyribonukleinsäure (DNA) extrahiert, die in der Studie analysiert wurde. Die übrigen 6 ml Heparinblut wurden für künftige Projekte tiefgefroren.

2.5.4 Bestimmung des spezifischen IgE

Das *Magic Lite SQ Spezifische IgE Immunoassay System* der Firma ALK (Dänemark) wurde zur quantitativen Bestimmung der zirkulierenden spezifischen IgE gegen die oben genannten Allergene verwendet.

Das System benutzt ein kovalent an paramagnetische Partikel gebundenes Allergen, um das zu untersuchende spezifische IgE zu binden.

Nach Auswaschen der unspezifischen IgE wird indirekt durch Acridiniumester-gebundene IgE-Antikörper das übriggebliebene spezifische IgE markiert.

Mit Hilfe des *Magic Lite Analyser* können die dann entstehenden Photonen in *Relative Light Units* (RLUs) gemessen werden. Diese RLUs sind direkt proportional zur spezifischen IgE-Menge.

Als positive Probe wurden Serumkonzentrationen von ≥ 1.43 U/ml gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Probandenkollektiv

Tabelle 16 zeigt das endgültige Probandenkollektiv dieser Studie mit insgesamt 180 Probanden. Für beide Generationen wurde jeweils die prozentuale Geschlechtsverteilung, das mittlere Alter und der prozentuale Anteil der Sensibilisierungstypen bestimmt. Bei Mehrfachsensibilisierung ist die Summe aller Sensibilisierungstypen in beiden Generationen größer 100 %.

	Kinder N=100	Eltern N=80
Männliches Geschlecht (%)	52	50
Mittleres Alter (Jahre)	17.4	46.0
Sensibilisierungstyp (%)		
• Graspollen	63	25
• Birkenpollen	46	28.8
• Katzenepithelien	33	16.3
• Milbenallergen	49	32.5

Tabelle 16: Geschlecht, Alter und IgE-Reaktivität in der Studienpopulation

3.2 DRB1-Allelfrequenzen der Gesamtpopulation

Primär war zu untersuchen, ob innerhalb der einzelnen Sensibilisierungsgruppen bestimmte Allele häufiger auftraten als andere.

Tabelle 17 zeigt für jeden Phänotyp den ermittelten prozentualen Anteil der untersuchten Allele. Zudem zeigt sie den prozentualen Anteil jedes Allels am Gesamtallelpool.

Phänotyp	Spez. IgE ↑	DRB1-Allelfrequenzen der Gesamtpopulation (Kind- und Elterngeneration)										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Total
Graspollen	0	12.89	8.76	20.62	7.22	10.31	1.03	12.89	20.10	4.64	1.55	100
	1	19.28	12.65	18.67	9.64	9.04	2.41	9.04	15.66	3.61	0.00	100
Birkenpollen	0	15.77	9.91	19.82	6.76	8.11	1.35	13.06	18.02	5.86	1.35	100
	1	15.94	11.59	19.57	10.87	12.32	2.17	7.97	18.12	1.45	0.00	100
Katzenepithel	0	15.67	10.07	19.40	8.21	10.07	1.87	12.31	17.16	4.10	1.12	100
	1	16.30	11.96	20.65	8.70	8.70	1.09	7.61	20.65	4.35	0.00	100
Milbenallergen	0	13.81	7.14	19.52	8.57	11.43	1.43	11.90	20.48	4.76	0.95	100
	1	18.67	15.33	20.00	8.00	7.33	2.00	10.00	14.67	3.33	0.67	100
IgE _{Total} > 100 kU/L	0	10.47	8.72	22.09	8.72	9.3	0.58	16.28	17.44	5.23	1.16	100
	1	20.74	12.23	17.55	7.98	10.11	2.66	6.38	18.26	3.19	0.53	100
Total		57	38	71	30	35	6	40	65	15	3	360
%		15.83	10.56	19.72	8.33	9.72	1.67	11.11	18.06	4.17	0.83	100

Tabelle 17: DRB1-Allelfrequenzen der Gesamtpopulation (Kind- und Elterngeneration) aufgeteilt nach Phänotypen (0: keine Reaktion auf das Allergen i.S. einer spezifischen IgE-Erhöhung / 1: spezifische IgE-Erhöhung)

Die Allele HLA-DR2 und HLA-DR7 wiesen mit 19.72 % und 18.08 % die höchsten Allelfrequenzen auf, allerdings unabhängig vom spezifischen IgE-Spiegel.

HLA-DR2 und HLA-DR7 traten mit je 20.65 % am häufigsten bei Katzenepithel-sensibilisierung auf.

Bei Gras- und Birkenpollen trat HLA-DR2 mit 20.62 % zu 18.67 % bzw. 19.82% zu 19.57 % bei Nichtsensibilisierten sogar häufiger auf.

HLA-DR7 trat hingegen bei Graspollen mit 20.1 % zu 15.66 % und Milbenallergen mit 20.48 % zu 14.67 % bei Nichtsensibilisierten häufiger auf.

3.3 DRB1-Allelfrequenzen der Elterngeneration

Wie in der Gesamtpopulation zeigten bei der Parentalgeneration ebenfalls HLA-DR2 und HLA-DR7 mit je 17.5 % und 16.88 % die höchsten Allelfrequenzen, die ebenso unabhängig von der gemessenen spezifischen IgE-Konzentration auftraten.

HLA-DR2 trat mit 26.92 % am häufigsten zusammen mit Katzenepithelsensibilisierungen auf, die bei der Parentalgeneration gleichzeitig auch insgesamt die höchste Allelfrequenz für die einzelnen Sensibilisierungsgruppen darstellten. Hingegen trat HLA-DR7 mit 23.91 % im Zusammenhang mit Birkenpollensensibilisierungen vermehrt auf.

Wie bei der Gesamtpopulation trat HLA-DR2 bei Gras- und Birkenpollen mit 18.33 % zu 15 % und 17.54 % zu 17.39 % bei Nichtsensibilisierten häufiger auf, während HLA-DR7 nur bei Milbenallergenen mit 17.59 % zu 15.38 % häufiger bei Nichtsensibilisierten auftrat.

Phänotyp	Spez. IgE ↑	DRB1-Allelfrequenzen der Elterngeneration										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Total
Graspollen	0	13.33	9.17	18.33	9.17	12.50	1.67	14.17	15.83	4.17	1.67	100
	1	22.50	12.50	15.00	10.00	10.00	0.00	7.50	20.00	2.50	0.00	100
Birkenpollen	0	17.54	7.89	17.54	8.77	11.40	1.75	14.04	14.04	5.26	1.75	100
	1	10.87	15.22	17.39	10.87	13.04	0.00	8.70	23.91	0.00	0.00	100
Katzenepithel	0	15.67	9.70	15.67	9.70	11.94	1.49	14.18	15.67	4.48	1.49	100
	1	15.38	11.54	26.92	7.69	11.54	0.00	3.85	23.08	0.00	0.00	100
Milbenallergene	0	13.89	8.33	14.81	10.19	12.96	1.85	13.89	17.59	4.63	1.85	100
	1	19.23	13.46	23.08	7.69	9.62	0.00	9.62	15.38	1.92	0.00	100
IgE _{Total} > 100 kU/L	0	12.75	10.78	14.71	8.82	10.78	0.98	16.67	16.67	5.88	1.96	100
	1	20.69	8.62	22.41	10.34	13.79	1.72	5.17	17.24	0.00	0.00	100
Total		25	16	28	15	19	2	20	27	6	2	160
%		15.63	10.00	17.50	9.38	11.88	1.25	12.50	16.88	3.75	1.25	100

Tabelle 18: DRB1-Allelfrequenzen der Population nur für die Elterngeneration, aufgeteilt nach Phänotypen (0: keine Reaktion auf das Allergen i.S. einer spezifischen IgE-Erhöhung / 1: spezifische IgE-Erhöhung)

3.4 DRB1-Allelfrequenzen der Kindergeneration

Auch bei den Kindern ließen sich die Allele HLA-DR2 mit 21.5 % und HLA-DR7 mit 19 % am häufigsten nachweisen, die auch unabhängig von der IgE-Serumkonzentration auftraten.

Im Gegensatz zur Gesamtpopulation und der Parentalgeneration ließ sich mit HLA-DR2 bei Milbenallergenen (24.51 %) die höchste Allelfrequenz bei Nichtsensibilisierten nachweisen, während die höchste HLA-DR7-Allelfrequenz (27.03 %) bei Nichtsensibilisierten für Graspollen nachzuweisen war, die gleichzeitig auch die höchste Allelfrequenz für die einzelnen Sensibilisierungsgruppen darstellt.

Phänotyp	Spez. IgE ↑	DRB1-Allelfrequenzen der Kindergeneration										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Total
Graspollen	0	12.16	8.11	24.32	4.05	6.76	0.00	10.81	27.03	5.41	1.35	100
	1	18.25	12.70	19.84	9.52	8.73	3.17	9.52	14.29	3.97	0.00	100
Birkenpollen	0	13.89	12.04	22.22	4.63	4.63	0.93	12.04	22.22	6.48	0.93	100
	1	18.48	9.78	20.65	10.87	11.96	3.26	7.61	15.22	2.17	0.00	100
Katzenepithel	0	15.67	10.45	23.13	6.72	8.21	2.24	10.45	18.66	3.73	0.75	100
	1	16.67	12.12	18.18	9.09	7.58	1.52	9.09	19.70	6.06	0.00	100
Milbenallergen	0	13.73	5.88	24.51	6.86	9.80	0.98	9.80	23.53	4.90	0.00	100
	1	18.37	16.33	18.37	8.16	6.12	3.06	10.20	14.29	4.08	1.02	100
IgE _{Total} > 100 kU/L	0	7.14	5.71	32.86	8.57	7.14	0.00	15.71	18.57	4.29	0.00	100
	1	20.77	13.85	15.38	6.92	8.46	3.08	6.92	19.23	4.62	0.77	100
Total		32	22	43	15	16	4	20	38	9	1	200
%		16.00	11.00	21.50	7.50	8.00	2.00	10.00	19.00	4.50	0.50	100

Tabelle 19: DRB1-Allelfrequenzen der Population nur für die Kindergeneration, aufgeteilt nach Phänotypen (0: keine Reaktion auf das Allergen i.S. einer spezifischen IgE-Erhöhung / 1: spezifische IgE-Erhöhung)

Zusammengefasst lässt sich auch in der getrennten Analyse der Allelfrequenzen der Parental- und Filialgeneration keine Korrelation zwischen einem bestimmten Allel und einer speziellen Sensibilisierung erkennen.

3.5 Ergebnisanalyse nach SIBPAIR-, SIBPAL- und ETD-Test

Zur statistischen Auswertung des Kandidatgens DRB1 und seiner Allele dienen die weltweit etablierten Standardtests SIBPAIR und SIBPAL der Geschwisterpaaranalysen, die auf „*identity-by-descent*“ (IBD; Identität-durch-Vererbung) basieren [23, 31, 32]. Beide prüfen einzelne Merkmale auf eine Kopplung mit einem möglichen Empfänglichkeitsgen, wobei die Verteilung von geteilten und nicht-geteilten Allelen bei betroffenen Geschwistern untersucht werden. Sie ermöglichen somit eine Untersuchung auf eine mögliche hereditäre Ursache für komplexe Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Asthma und Atopie [11].

IBD bedeutet, dass zwei Allele nur dann gleich sind, wenn sie von demselben Elternteil stammen. Weicht diese Verteilung des zu untersuchenden Allels bei den Geschwisterpaaren von einer zufälligen Allelverteilung ab, ist davon auszugehen, dass eine Assoziation zwischen diesem Allel und dem aufgetretenen Phänotyp besteht.

3.5.1 SIBPAIR-Test

Da drei Möglichkeiten der IBD-Informationen bestehen, gilt für rein zufällige Vererbung folgende theoretische Verteilung:

IBD	0	1	2
Häufigkeit	0.25	0.5	0.25

Tabelle 20: Verteilung der IBD-Häufigkeit

Bei beiden Geschwisterpaaranalysen werden zuerst die Anzahl der gleichen Gene bestimmt. Bei dem SIBPAIR-Test werden danach alle IBD-Informationen der zu untersuchenden Geschwisterpaare zusammengefasst und diese Verteilung mit der rein zufälligen Verteilung verglichen. Eine Abweichung dieser Verteilung von der einer unabhängigen Vererbung zu erwartenden Verteilung wird dann durch χ^2 beziehungsweise p ausgedrückt.

Als signifikante Abweichung wurde nach Anpassung bei vier verschiedenen untersuchten Phänotypen ein p -Wert von < 0.01 festgelegt, das heißt wenn $p < 0.01$ ist, ist

davon auszugehen, dass Marker- und Krankheitslocus nicht unabhängig voneinander vererbt werden und daher ein Zusammenhang besteht zwischen dem untersuchten Allel und dem Phänotyp.

Tabelle 21 gibt die Ergebnisse der SIBPAIR-Analyse wieder. Alle fünf Gruppen zeigten keine signifikante Veränderung bezüglich der Allelverteilung. Lediglich die Gruppe mit der spezifischen Sensibilisierung auf Milbenallergen zeigte eine grenzwertige Signifikanz ($\chi^2 = 8.4$, $p = 0.02$). Von 16 untersuchten Geschwisterpaaren zeigten 9 jeweils 2 identische elterliche Allele, 5 jeweils 1 und 2 keine identische Allele.

Phänotyp	DRB1-Allele					χ^2	p
	n	geteilte Allele					
		0	1	2			
Graspollen	30	6	13	11	2.2	0.3	
Birkenpollen	17	4	10	3	0.7	0.7	
Katzenepithelien	5	1	1	3	3.8	0.2	
Milbenallergen	16	2	5	9	8.4	0.02	
IgE _{Total} > 100 kU/L	32	8	15	9	0.19	0.91	

Tabelle 21: SIBPAIR-Test: Beziehungsanalyse der HLA-Klasse-II-Allele

Die Tabellen 22 und 23 schlüsseln die jeweils untersuchten vererbten Allele getrennt nach mütterlichem und väterlichem Ursprung auf. Hier war zu untersuchen, ob sensibilisierte Kinder häufiger mütterliche oder väterliche Allele teilten.

Dabei zeigte sich, dass in allen 5 untersuchten Gruppen väterlich keine Signifikanzen bestanden. Mütterlich jedoch ließ sich für die Gruppe der Milbensensibilisierten eine statistische Signifikanz nachweisen ($\chi^2 = 9.94$, $p = 0.002$). Von den 17 betroffenen Geschwisterpaaren hatten 15 das identische mütterliche Allel erhalten.

Phänotyp	Väterliche Allele				χ^2	p
	n	geteilte Allele				
		0	1			
Graspollen	33	14	19	0.76	0.38	
Birkenpollen	18	10	8	0.22	0.63	
Katzenepithelien	6	1	5	2.67	0.10	
Milbenallergen	17	7	10	0.53	0.47	
IgE _{Total} > 100 kU/L	39	18	21	0.23	0.63	

Tabelle 22: SIBPAIR-Analyse der väterlichen DRB1-Allele (n: Anzahl der Allele / p: Wahrscheinlichkeit / χ^2 : Maß für die Abweichung von p)

Phänotyp	Mütterliche Allele				χ^2	p
	n	geteilte Allele				
		0	1			
Graspollen	31	12	19	1.58	0.21	
Birkenpollen	17	8	9	0.06	0.80	
Katzenepithelien	6	1	5	2.67	0.10	
Milbenallergen	17	2	15	9.94	0.002	
IgE _{Total} > 100 kU/L	32	13	19	1.13	0.29	

Tabelle 23: SIBPAIR-Analyse der mütterlichen DRB1-Allele (n: Anzahl der Allele / p: Wahrscheinlichkeit / χ^2 : Maß für die Abweichung von p)

3.5.2 SIBPAL-Test

Beim SIBPAL-Test, einem Modul der S.A.G.E.-Software (Statistical Analysis for Genetic Epidemiology), der eine nichtparametrische Kopplungsanalyse durchführt, werden die n-Anzahl IBD-Informationen gebildet und durch 2 dividiert, um den π -Wert zu erhalten. Bei unabhängiger Vererbung hätten $\frac{1}{4}$ N (IBD-0), $\frac{1}{2}$ N (IBD-1) und $\frac{1}{4}$ N (IBD-2), das heißt:

$$\pi = (\frac{1}{4} N^*(IBD-0) + \frac{1}{2} N^*(IBD-1) + \frac{1}{4} N^*(IBD-2)) : 2 = 0.5$$

Ist $\pi > 0.5$, liegt wahrscheinlich eine höhere Verteilung einer Allelgleichheit zu einer Normalverteilung vor. Auf diese Weise könnte eine nicht-unabhängige Vererbung aufgedeckt werden.

Beide Tests überprüfen dieselbe Hypothese auf unterschiedliche Weise. Bei signifikanter Abweichung der Ergebnisse zur Normalverteilung einer unabhängigen Vererbung bezüglich des untersuchten Allels in beiden Tests würde die Validität der Resultate bekräftigt werden.

Auch bei dem SIBPAL-Test lässt sich für die Gruppe mit der spezifischen Sensibilisierung auf Milbenallergen eine signifikant erhöhte Allelgleichheit ($\pi = 0.66$, $p = 0.01$) der 23 betroffenen Geschwisterpaaren nachweisen (Tabelle 24), was die grenzwertige Signifikanz des SIBPAIR-Tests unterminiert.

Phänotyp	DRB-Allele	
	π (n)	p
Graspollen	0.58 (36)	0.09
Birkenpollen	0.50 (22)	1.0
Katzenepithelien	0.55 (11)	0.37
Milbenallergen	0.66 (23)	0.01
Irgendeine Sensibilisierung	0.56 (49)	0.11
IgE _{Total} > 100 kU/L	0.55 (41)	0.18

Tabelle 24: SIBPAL-Test: Beziehungsanalyse der HLA-Klasse-II-Allele, die von Geschwisterpaaren mit einer IgE-vermittelten Immunantwort geteilt werden (n: Anzahl der analysierten Geschwisterpaarbeziehungen / p: Wahrscheinlichkeit, dass eine Allelverteilung zufällig ist / π : mittlerer IBD/2)

3.5.3 ETDT (Extended Transmission Disequilibrium Test)

Zur weiteren Bestätigung der Ergebnisse wurde der ETDT durchgeführt. Dieser Test berücksichtigt alle betroffenen Kinder heterozygoter Eltern bezüglich des zu untersuchenden Allels. Er vergleicht die Häufigkeit, mit der das Allel auf die betroffenen Kinder übertragen wird, mit der Häufigkeit, mit der die Eltern andere Allele an betroffene Kinder weitergeben. Er deckt somit eine Kopplungsdisbalance zwischen einem Kandidatlocus und einem Krankheitslocus auf [94].

Der Standard TDT untersucht ein einzelnes Allel eines Markers und gibt Aufschluss darüber, ob es von heterozygoten Eltern häufiger als zufällig auf ein betroffenes Kind

übertragen wird. Für polymorphe Marker müssten viele Tests durchgeführt und das Signifikanzniveau angepasst werden [24].

Der Erweiterte TDT (ETDT) dehnt die Untersuchung auf multiallelische Marker aus und testet spezifisch, ob ein einzelnes Allel oder gar eine Gruppe von Markerallelen mit einer Krankheit beziehungsweise einem Phänotyp assoziiert ist. Er führt Wahrscheinlichkeits-Ratio-Tests durch, basierend auf logistischen Regressionsanalysen. Der Vorteil ist, dass er jeden Genotyp separat (das heißt ein Paar des Markerallels) betrachtet und zeigt, ob für einige Genotypen eine Tendenz besteht, häufiger auf Betroffene übertragen zu werden. Darüber hinaus untersucht er auch genotypübergreifend einzelne Allele auf bevorzugte Übertragung.

Beispielsweise wäre bei einer Gruppe betroffener Kinder eines Elternteils mit dem Genotyp 1/?, wovon X Betroffene das eine Allel und Y Individuen das andere Allel von diesem heterozygoten Elternteil erhalten haben, die TDT-Statistik $(X-Y)^2/(X+Y)$, die asymptotisch als eine χ^2 -Statistik mit einem Freiheitsgrad verteilt wird [93]. Die Anzahl der Freiheitsgrade des χ^2 -Tests ist durch die Anzahl der zu untersuchenden Allele minus eins vorgegeben. Weicht nun eines der Verhältnisse der Allele zu den anderen ab, liegt eine ungleiche Transmissionswahrscheinlichkeit beziehungsweise ein sogenanntes Disequilibrium vor [87].

Im Gegensatz zum SIBPAIR- und SIBPAL-Test untersucht der TDT also nicht, ob betroffene Geschwister häufiger Allele teilen, sondern ob bestimmte Allele bei Betroffenen anders häufig übertragen werden. Dadurch erhärtet er die Validität der SIBPAIR- und SIBPAL-Ergebnisse, indem er auf einen anderen Aspekt der Daten eingeht.

Tabelle 25 zeigt die Ergebnisse der Analyse mittels des ETD-Tests. Für die Gruppe der Milbenallergiker konnte ein signifikantes Disequilibrium der Transmission der Allele nachgewiesen werden ($\chi^2 = 20.7$, $p = 0.01$). Dies bedeutet, dass die untersuchten DRB1-Allele signifikant häufiger als nur zufällig an die betroffenen Nachfahren vererbt werden und so wahrscheinlich maßgeblich direkt oder indirekt an der spezifischen IgE-Antwort der Sensibilisierten verantwortlich sind.

Phänotyp	DRB-Allele		
	n	χ^2 (df)	p
Graspollen	62	11.4 (9)	0.3
Birkenpollen	40	8.9 (9)	0.4
Katzenepithelien	26	9.8 (8)	0.3
Milbenallergen	45	20.7 (9)	0.01

Tabelle 25: Erweiterter TD-Test (Extended Transmission Disequilibrium Test) für HLA-Klasse-II-Allele bei Kindern mit erhöhter spezifischer IgE-Serumkonzentration für das entsprechende Allergen (n: Anzahl der betroffenen Kinder / p: Übertragungswahrscheinlichkeit der DRB-Allele / χ^2 : Maß für die Abweichung von p / df: degree of freedom = Freiheitsgrad)

4 Diskussion

4.1 DRB1-Allelfrequenzen der Gesamtpopulation

Die DRB1-Typisierung des untersuchten Kollektivs ergab für die serologischen Typen HLA-DR2 und HLA-DR7 die höchsten Allelfrequenzen, unabhängig von der Art der Sensibilisierung.

Einen signifikanten Unterschied ($p > 0.01$) in der Verteilung der Allergiker und Nichtallergiker konnte nicht nachgewiesen werden. Ein spezieller HLA-DR-Typ scheint in der untersuchten Population nicht allein für die klinische Manifestation einer Allergie verantwortlich zu sein.

Dass MHC-Klasse II Moleküle, insbesondere DRB1-kodierte, dennoch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Allergie einnehmen, wurde bereits durch viele Studien nachgewiesen [5].

So konnten zum Beispiel Ansari und Shinomiya bereits 1991 eine stark signifikante Assoziation zwischen der Sequenz Glu-Tyr-Ser-Thr-Ser (EYSTS), die Bestandteil von HLA-DR3, HLA-DR11 (Untergruppe von HLA-DR5) und HLA-DRw6 ist, und der Antikörperproduktion gegen *Lol p III* zeigen [3].

Carbada *et al.* stellten 1993 einen positiven Zusammenhang zwischen HLA-DR7 und HLA-DQ2 mit der IgE-spezifischen Antwort auf das Hauptantigen *Ole e I* (Olivenpollen) her [14].

Aron *et al.* bestätigten in ihrer Studie die Bedeutung des MHC [4]. Sie sahen eine Assoziation zwischen HLA-DR4 und HLA-DR7 und der Atopie.

In einer anderen Studie von Verhoef *et al.* wird zusätzlich deutlich, dass definierte Epitope durch unterschiedliche HLA-Genprodukte (DRB1*1101 und DQB1*0301) präsentiert werden [104], so dass ein Vergleich verschiedener Studien, die sich mit HLA-Klasse II und Allergien befassen, wahrscheinlich nur begrenzt möglich ist.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen vorliegender Untersuchung fanden Young *et al.*, die ebenfalls eine Korrelation zwischen bestimmten HLA-DR- beziehungsweise HLA-DP-Serotypen und inhalativen Allergenen untersuchten, dass ein HLA-DR1-Exzess in *Fel d I*-, HLA-DR4-Exzess in *Alt a I*-Allergiker nachgewiesen werden konnte [105]. Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen den Hauptallergenen *Der p I*, *Der p II*, *Phl p V* und *Can f I* mit HLA-DR hergestellt werden. Zu HLA-DP konnte sogar für alle untersuchten Allergene keine signifikante Korrelation festgestellt werden. Diese Ergebnisse entstammen einer britischen Familienstudie aus einem großen Patientenkollektiv mit 83 untersuchten Familien.

4.2 DRB1-Allelfrequenzen getrennt nach Eltern- und Kindergeneration

Die getrennte Betrachtung der Verteilung der Allelfrequenzen nach Eltern- und Kindergeneration zeigte sowohl für die Eltern- als auch Kindergeneration für die Serotypen HLA-DR2 und HLA-DR7 die höchste Verteilung, was dem Ergebnis der Gesamtpopulation entspricht. Einen signifikanten Zusammenhang zur IgE-Serumkonzentration bestand auch hier nicht.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch andere Arbeitsgruppen, die sich mit der Untersuchung der DPB1- und DQB1-Allele des gleichen Kollektivs beschäftigten [95]. Hier wurden für DQB1-Allele sowohl in der Gesamtpopulation als auch nach Eltern- und Kindergeneration betrachtet die Allele DQB1*0201 und DQB1*0301 prozentual am häufigsten nachgewiesen. Mit Ausnahme der Sensibilisierungsgruppe bezüglich der Milbenallergene konnte keine signifikante Assoziation zwischen bestimmten DQB1-Allelen und einer spezifischen IgE-Antwort nachgewiesen werden. Für DPB1 ließ sich sowohl in der Gesamtpopulation als auch in der getrennten Analyse nach Eltern- und Kindergeneration DPB1*0401 mit Abstand am häufigsten nachweisen. Einen Zusammenhang zwischen einem bestimmten Allel und einer spezifischen IgE-Immunantwort konnte auch hier nicht bestätigt werden.

Auch Caraballo und Hernandez führten 1990 eine serologische Typisierung sowohl der HLA-Klasse I als auch HLA-DR und HLA-DQ durch, jedoch konnte keine signifikante

Assoziation zwischen den untersuchten HLA-Typen und dem allergischen Asthma hergestellt werden [13].

1996 zeigte eine Studie von Stephan *et al.* an 129 nichtverwandten Grundschulkindern, dass den HLA-Klasse II-Molekülen wahrscheinlich keine große Bedeutung bei der Entwicklung von Hausstaubmilbenallergie zugemessen werden kann [96]. Dort ließen sich die Allele DRB1*0401, DRB1*0402, DQB1*0201, DQB1*0301, HLA-DP2 und HLA-DP4 am häufigsten bestimmen.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen vorliegender Arbeit scheint zwischen dem Vorhandensein eines bestimmten DRB1-Allels und der spezifischen IgE-Immunantwort kein Zusammenhang zu bestehen.

Angesichts des äußerst komplexen Regelmechanismus der IgE-Immunantwort und der noch nicht hinreichend geklärten Immunmodulation ist es unwahrscheinlich, dass ein einzelnes Gen für die Entwicklung einer Allergie verantwortlich ist. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass das Zusammentreffen einer Vielzahl von Genen eine Prädisposition zu einer Atopie bewirkt und eine weitere Vielfalt an Faktoren, unter anderem auch aus der Umwelt, diese triggert und so die Entwicklung einer Allergie begünstigt. Dem MHC wird sicherlich eine Relevanz zukommen, die aber aller Wahrscheinlichkeit nach nicht alleine entscheidend ist für die Manifestation einer allergischen Erkrankung.

Mit größerem Verständnis der Modulation der IgE-Immunantwort wissen wir, dass noch andere Gene, außer denen des MHC, eine Rolle spielen. Eines der wichtigsten potentiellen Kandidatgene scheint dem *5q31.1 Cytokin-Gencluster* zu entstammen, das IL-4 kodiert [21, 55, 58, 77-80].

Andere Arbeitsgruppen fanden heraus, dass die β -Untereinheit des hochaffinen IgE-Rezeptors (Fc ϵ RI- β), dessen Gen auf dem Chromosom 11q13 kodiert ist, maternal an eine Atopie beziehungsweise an eine bronchiale Hyperreaktivität gekoppelt ist [17, 18, 88, 89, 102].

In einer Geschwisterpaaruntersuchung einer britischen und australischen Population wiesen Moffatt *et al.* auf eine signifikante Beziehung zwischen dem T-Zell-Rezeptor α (TCR- α), dessen Genlocus auf Chromosom 14 lokalisiert ist, und der Ausbildung einer spezifischen IgE-Immunantwort auf inhalative Allergene hin [59].

4.3 Geschwisterpaaranalyse (SIBPAIR-, SIBPAL- und ETD-Test)

Eine Vielzahl von Studien untersuchte den Zusammenhang zwischen HLA-Klasse II-Genen und der spezifischen IgE-Immunantwort.

In dieser Studie wurde eine Assoziation zwischen HLA-Klasse II-Genen und der Allergie untersucht, aber zusätzlich mittels dreier statistischer Tests die Möglichkeit einer Nicht-Mendelschen-Vererbung beziehungsweise eines polygenen Vererbungsmodus der Allergie analysiert. Dazu wurde eine Familienstudie benutzt, bei der die Untersuchung mit Hilfe der Geschwisterpaaranalysen, den SIBPAIR- und SIBPAL-Tests, und des etablierten ETD-Tests die Untersuchungen durchgeführt wurden.

Auf ähnliche Weise haben Hager *et al.* möglicherweise ein Kandidatgen für den nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus (NIDDM) aufgedeckt [29]. Diese Krankheit präsentiert einen polygenen Vererbungsmodus, dessen Mechanismen und beteiligte Gene noch ungeklärt sind. Hager wies durch eine Analyse einer französischen und sardinischen Population mittels ETDT nach, dass eine signifikante Assoziation zwischen dem NIDDM und einer Punktmutation im Glucagon-Rezeptorgen besteht.

Ebenso konnte Deichmanns Arbeitsgruppe durch den SIBPAIR-Test eine signifikante Kopplung der maternal, aber nicht paternal vererbten Allele des IL-4-Rezeptorgens und des klinisch heterogenen Syndroms der Atopie mit kompliziertem Vererbungsmuster nachweisen [20].

Bereits in den achtziger Jahren konnten Studien einen Zusammenhang zwischen HLA-Klasse II-Molekülen und Ambrosia-Allergene herstellen, hauptsächlich waren dies *Amb a IV* mit HLA-Dw2 beziehungsweise HLA-DR5 [51, 52, 54].

In den späten achtziger Jahren wiesen andere Arbeitsgruppen eine Assoziation zwischen HLA-DR3 und HLA-DR5 und den Lieschgras-Allergenen *Lol p I-III* nach [2, 26].

Anfang der neunziger Jahre stellten Kühr *et al.* fest, dass der Allergiestatus der Mutter einen besseren prädiktiven Wert bezüglich der Entwicklung einer Sensibilisierung ihrer Kinder ergab als der Status des Vaters [46].

1994 zeigte die Arbeitsgruppe von Young in einer Familienstudie mit 83 Familien und 431 Probanden, dass HLA-DR1 mit *Fel d I* und HLA-DR4 mit *Alt a I* assoziiert ist. Eine erhöhte Gemeinsamkeit der HLA-DR-/DP-Haplotypen konnte an Geschwisterpaaren festgestellt werden, die auf beide Allergene reagierten. Die Allergene *Der p I+II*, *Phl p V* und *Can f I* standen in keinem Zusammenhang zu jeglichen HLA-DR-Allelen. Auch zwischen HLA-DP und allen getesteten Allergenen konnte keine Assoziation bestätigt werden [105].

Den SIBPAIR-Test nutzend konnten Torres-Galvan *et al.* jüngst in 18 Familien und 161 nicht verwandten Individuen einer spanischen Population einen signifikanten Unterschied bezüglich der erwarteten Werte der Haplotypen, die die betroffenen Hausstaubmilben sensibilisierten Geschwister teilten, konstatieren. Sie konnten keinen Zusammenhang zu einem bestimmten HLA-Klasse II-Allel herstellen [100].

Zuvor zeigte Holloway 1996 in seiner Studie an einer britischen Population anhand einer SIBPAIR-Analyse, dass es keinen Zusammenhang zwischen HLA-DR, HLA-DQ beziehungsweise HLA-DP und Hausstaubmilbenallergie gibt [34].

Ähnlich Torres-Galvans Studie konnte vorliegende Studie während der geschwisterungebundenen Betrachtung keinen Zusammenhang zwischen DRB1-Allelen und einer der untersuchten Sensibilisierungen bestätigen. Allerdings konnte sie im ETDT ein signifikantes Transmissionsdisequilibrium für die Milbenallergiker feststellen.

Schon in der Geschwisterpaaranalyse mittels SIBPAL-Test ergab sich für die Sensibilisierungsgruppe der Hausstaubmilbenallergiker eine signifikante Allelgleichheit, die zuvor im SIBPAIR-Test grenzwertig signifikant für diese Gruppe war.

Erstaunlich war das Ergebnis der getrennten Analyse mittels des SIBPAIR-Tests für väterliche und mütterliche Allele. Während die paternale Allelverteilung für alle Sensibilisierungen von einer unabhängigen Normalverteilung nicht signifikant abwich, zeigte die maternale Allelverteilung eine signifikante Allelgleichheit in der Gruppe der Milbenallergiker ($\chi^2 = 9.95$, $p = 0.002$) [95].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass diese Studie die Hypothese einer monogenen Kausalität bezüglich der HLA-DRB1-Allele und der Entwicklung einer Allergie nicht bestätigt. Eine erhöhte Allelgleichheit bei den betroffenen Kindern scheint eine Rolle bei der Sensibilisierung mit Hausstaubmilbenallergenen zu spielen, jedoch unabhängig vom Serum-IgE-Spiegel und speziellen DRB1-Allelen.

Der durch die getrennte Analyse der elterlichen Allele im SIBPAIR-Test festgestellte mögliche maternale Vererbungseffekt bestätigt die bekannte „*maternale Prägung*“ bei der Vererbung der Allergie. Eine ähnliche maternale Weitergabe der Gene wurde bereits 1992 von Cookson für Gene auf Chromosom 11q13 in Verbindung mit einer Untersuchung auf einer allergischen Immunantwort angenommen. Das Vererbungsmuster spricht entweder für ein sogenanntes paternales „*genomic imprinting*“ oder für eine sonstige maternale Modifikation der entwickelnden Immunantwort [18].

Säugetiere benötigen für eine normale embryonale und postnatale Entwicklung sowohl maternales als auch paternales Genom. Die funktionelle Abwesenheit eines der komplementierenden parental Allelen wird durch „*genomic imprinting*“ vermittelt, einen epigenetischen Mechanismus, bei dem die Expression bestimmter Gene durch den parental Ursprung abhängig ist [25]. Das Resultat ist eine funktionelle Hemizygotie bezüglich des geprägten Locus.

Ein epigenetischer Modifikationstyp ist die Addition einer Methylgruppe auf die Position 5 des Cytosin mit Präferenz an CpG Dinukleotiden. Solch eine Modifikation ist bedeutsam, da im Allgemeinen methylierte DNA-Sequenzen während der Transkription inaktiv sind. Es liegt daher nahe, dass DNA-Methylierung für die epigenetische Markierung der Imprinting-Phänomene in Säugern verantwortlich ist oder zumindest

einen während der Gametogenese entstandenen geprägten Zustand eines Locus reflektiert [83].

Am häufigsten untersucht und am besten aufgeklärt ist das „*genomic imprinting*“ bei den elternteilspezifischen Modifikationen der transgenen Methylierung und Expression in Mäusen [71, 82, 98] und in transgenen Zebrafischen [56]. Einige endogene Regionen und Genloci auf murinen Chromosomen sind als genomisch geprägt nachgewiesen [16]. Heutzutage sind ungefähr 40 humane Genloci bekannt, die durch „*genomic imprinting*“ geprägt werden können [60]. Äquivalent zur geprägten transgenen DNA-Sequenz weisen die endogenen Regionen ebenfalls einen hohen Gehalt an DNA-Methylierungen an den geprägten beziehungsweise inaktivierten Allelen auf.

Zunächst nahm man an, dass „*genomic imprinting*“ sich nur auf frühe embryonale Entwicklung beschränke. Doch mit zunehmendem Wissen wurde bekannt, dass die Penetranz und die Schwere vieler komplexer humaner Erkrankungen durch das parentale Geschlecht des beigetragenen Allels beeinflusst wird. Der parentale Effekt lässt auf „*genomic imprinting*“ schließen. Zu den durch „*genomic imprinting*“ bestimmten Erkrankungen zählen unter anderem der Morbus Huntington, die Cystische Fibrose, das Prader-Willi- und das Angelman-Syndrom [30, 81].

5 Zusammenfassung

Der Begriff der Allergie beschreibt einen pathophysiologischen Zustand als inadäquate Reaktion verschiedener physiologischer Systeme auf ein Agens. Im Rahmen der Etablierung pathophysiologischer Konzepte gewinnt die Analyse molekulargenetischer Mechanismen eine zunehmende Bedeutung.

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit der Korrelation zwischen HLA-Klasse II DRB1-Genen und der spezifischen IgE-vermittelten Immunantwort der wichtigsten inhalativen Allergien, um ein mögliches Screeninginstrument für die Früherkennung allergiegefährdeter Kinder etablieren zu können.

Mit PCR, Dot-Blotting und DNA-Hybridisierung wurde aus einem Kollektiv von 180 Patienten aus 40 Familien (100 Kinder und 40 Elternpaare aus der Umgebung Freiburgs und einer Gemeinde des Hochschwarzwaldes) mit mindestens 2 schulpflichtigen Kindern, wobei mindestens eines der Kinder eine Sensibilisierung gegen Milbenallergen, Katzenepithelien, Gras- und/oder Birkenpollen aufwies, die HLA-DRB1-Allele DR1-DR10 bestimmt. Prozentual traten in diesem Kollektiv die Allele HLA-DR2 und HLA-DR7 am häufigsten auf, unabhängig von der Art der Sensibilisierung und der Generation.

Mittels drei statistischer Standardtests wurden DRB1-Allelfrequenzen und deren Verteilung auf die Kinder untersucht. Durch den SIBPAIR-Test konnte nachgewiesen werden, dass in der Gruppe der Milbenallergiker die Allelgleichheit bei den betroffenen Geschwisterpaaren grenzwertig signifikant erhöht war ($p = 0.02$), was im SIBPAL-Test sogar als signifikantes Ergebnis bestätigt werden konnte ($p = 0.01$; $\pi = 0.66$). Im ETD-Test konnte in der gleichen Gruppe ein Disequilibrium der Transmission der Allele festgestellt werden ($p = 0.01$; $\chi^2 = 20.7$). Zudem konnte nach getrennter Analyse der väterlichen und mütterlichen Allele festgestellt werden, dass in der Milbenallergikergruppe die betroffenen Geschwisterpaare signifikant häufiger die gleichen Allele mütterlicherseits teilten ($p = 0.002$; $\chi^2 = 9.94$). Für die Gruppen der auf Katzenepithelien, Gras- und Birkenpollen sensibilisierten Kinder konnten diese 3 Tests kein signifikantes Ergebnis nachweisen. Lediglich für die Gruppe der

Graspollenallergiker konnte im SIBPAL-Test eine Tendenz zur Allelgleichheit ($p = 0.09$; $\pi = 0.58$) festgestellt werden.

Zusammengefasst ergibt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit eine eingeschränkte Bedeutung der HLA-DRB1-Gene für die Entwicklung einer Milbenallergie im Sinne eines monokausalen Zusammenhanges. Vermehrtes Auftreten von bestimmten, insbesondere mütterlichen DRB1-Allelen innerhalb einer Familie scheinen relevant zu sein, jedoch muss angenommen werden, dass zur Entwicklung einer Allergie komplexe Regelmechanismen verantwortlich sind, die von multiplen Genen und Faktoren abhängig sind.

Literaturverzeichnis

1. AAAI, *Allergy Report*, in www.theallergyreport.org. 2000.
2. Ansari, A.A., et al., *Human immune responsiveness to Lolium perenne pollen allergen Lol p III (rye III) is associated with HLA-DR3 and DR5*. Hum Immunol, 1989. **25**(1): p. 59-71.
3. Ansari, A.A., et al., *HLA-D gene studies in relation to immune responsiveness to a grass allergen Lol p III*. Immunogenetics, 1991. **33**(1): p. 24-32.
4. Aron, Y., et al., *Evidence of a strong, positive association between atopy and the HLA class II alleles DR4 and DR7*. Clin Exp Allergy, 1996. **26**(7): p. 821-8.
5. Aron, Y., E. Swierczewski, and A. Lockhart, *HLA class II haplotype in atopic asthmatic and non-atopic control subjects*. Clin Exp Allergy, 1995. **25 Suppl 2**: p. 65-7; discussion 95-6.
6. Barney, N.P. and C.S. Foster, *Atopic ocular disease*. Int Ophthalmol Clin, 1993. **33**(2): p. 87-92.
7. Beaven, M.A., *Histamine: its role in physiological and pathological processes*. Monogr Allergy, 1978. **13**: p. 1-113.
8. Beaven, M.A. and H. Metzger, *Signal transduction by Fc receptors: the Fc epsilon RI case*. Immunol Today, 1993. **14**(5): p. 222-6.
9. Becklake, M.R. and P. Ernst, *Environmental factors*. Lancet, 1997. **350 Suppl 2**: p. SII10-3.
10. Berg, T. and S.G. Johansson, *IgE concentrations in children with atopic diseases. A clinical study*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1969. **36**(3): p. 219-32.
11. Blackwelder, W.C. and R.C. Elston, *A comparison of sib-pair linkage tests for disease susceptibility loci*. Genet Epidemiol, 1985. **2**(1): p. 85-97.
12. Braciale, T.J. and V.L. Braciale, *Antigen presentation: structural themes and functional variations*. Immunol Today, 1991. **12**(4): p. 124-9.
13. Caraballo, L.R. and M. Hernandez, *HLA haplotype segregation in families with allergic asthma*. Tissue Antigens, 1990. **35**(4): p. 182-6.
14. Cardaba, B., et al., *DR7 and DQ2 are positively associated with immunoglobulin-E response to the main antigen of olive pollen (Ole e I) in allergic patients*. Hum Immunol, 1993. **38**(4): p. 293-9.

15. Casolaro, V., et al., *Biology and genetics of atopic disease*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(6): p. 796-803.
16. Cattanaach, B.M. and C.V. Beechey, *Autosomal and X-chromosome imprinting*. Dev Suppl, 1990: p. 63-72.
17. Cookson, W.O., et al., *Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q*. Lancet, 1989. **1**(8650): p. 1292-5.
18. Cookson, W.O., et al., *Maternal inheritance of atopic IgE responsiveness on chromosome 11q*. Lancet, 1992. **340**(8816): p. 381-4.
19. de Vries, J.E., *Novel fundamental approaches to intervening in IgE-mediated allergic diseases*. J Invest Dermatol, 1994. **102**(2): p. 141-4.
20. Deichmann, K.A., et al., *Linkage and allelic association of atopy and markers flanking the IL4- receptor gene*. Clin Exp Allergy, 1998. **28**(2): p. 151-5.
21. Doull, I.J., et al., *Allelic association of gene markers on chromosomes 5q and 11q with atopy and bronchial hyperresponsiveness*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(4 Pt 1): p. 1280-4.
22. Dvorak, A.M. and H.F. Dvorak, *The basophil. Its morphology, biochemistry, motility, release reactions, recovery, and role in the inflammatory responses of IgE- mediated and cell-mediated origin*. Arch Pathol Lab Med, 1979. **103**(11): p. 551-7.
23. Eaves, L. and J. Meyer, *Locating human quantitative trait loci: guidelines for the selection of sibling pairs for genotyping*. Behav Genet, 1994. **24**(5): p. 443-55.
24. Ewens, W.J. and R.S. Spielman, *The transmission/disequilibrium test: history, subdivision, and admixture*. Am J Hum Genet, 1995. **57**(2): p. 455-64.
25. Feil, R. and S. Khosla, *Genomic imprinting in mammals: an interplay between chromatin and DNA methylation?* Trends Genet, 1999. **15**(11): p. 431-5.
26. Freidhoff, L.R., et al., *Association of HLA-DR3 with human immune response to Lol p I and Lol p II allergens in allergic subjects*. Tissue Antigens, 1988. **31**(4): p. 211-9.
27. Gell, P.G.H., R.R.A. Coombs, and P.J. Lachmann, *Clinical Aspects of Immunology*. 1975: Blackwell, Oxford.
28. Gemsa, D., J.R. Kalden, and K. Resch, *Immunologie: Grundlagen-Klinik-Praxis*. 1997: Thieme Verlag Stuttgart/New York.

29. Hager, J., et al., *A missense mutation in the glucagon receptor gene is associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Nat Genet, 1995. **9**(3): p. 299-304.
30. Hall, J.G., *Genomic imprinting: review and relevance to human diseases*. Am J Hum Genet, 1990. **46**(5): p. 857-73.
31. Haseman, J.K. and R.C. Elston, *The estimation of genetic variance from twin data*. Behav Genet, 1970. **1**(1): p. 11-9.
32. Haseman, J.K. and R.C. Elston, *The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus*. Behav Genet, 1972. **2**(1): p. 3-19.
33. Holgate, S.T., *The cellular and mediator basis of asthma in relation to natural history*. Lancet, 1997. **350 Suppl 2**: p. SII5-9.
34. Holloway, J.W., et al., *Lack of evidence of a significant association between HLA-DR, DQ and DP genotypes and atopy in families with HDM allergy*. Clin Exp Allergy, 1996. **26**(10): p. 1142-9.
35. Howell, W.M., *HLA immunogenetics and specific IgE responses to allergens*. Clin Exp Allergy, 1994. **24**(5): p. 401-4.
36. Howell, W.M. and S.T. Holgate, *HLA genetics and allergic disease*. Thorax, 1995. **50**(8): p. 815-8.
37. Illi, S., et al., *Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study*. Bmj, 2001. **322**(7283): p. 390-5.
38. Ishizaka, K., *IgE-binding factors and regulation of the IgE antibody response*. Annu Rev Immunol, 1988. **6**: p. 513-34.
39. Ishizaka, T., et al., *Identification of basophil granulocytes as a site of allergic histamine release*. J Immunol, 1972. **108**(4): p. 1000-8.
40. Ishizaka, T. and K. Ishizaka, *Biology of immunoglobulin E. Molecular basis of reaginic hypersensitivity*. Prog Allergy, 1975. **19**: p. 60-121.
41. Ishizaka, T., et al., *A new concept of triggering mechanisms of IgE-mediated histamine release*. J Allergy Clin Immunol, 1978. **61**(5): p. 320-30.
42. Jarvis, D. and P. Burney, *ABC of allergies. The epidemiology of allergic disease*. Bmj, 1998. **316**(7131): p. 607-10.
43. Keller, R., *Immunologie und Immunpathologie*. 1981: Thieme Verlag Stuttgart/New York.
44. Kuby, J., *Immunology*. 1992: W.H. Freeman and Company.

45. Kuehr, J., et al., *Early childhood risk factors for sensitization at school age*. J Allergy Clin Immunol, 1992. **90**(3 Pt 1): p. 358-63.
46. Kuehr, J., et al., *Sensitization to four common inhalant allergens within 302 nuclear families*. Clin Exp Allergy, 1993. **23**(7): p. 600-5.
47. Lau, S., et al., *High mite-allergen exposure increases the risk of sensitization in atopic children and young adults*. J Allergy Clin Immunol, 1989. **84**(5 Pt 1): p. 718-25.
48. Lau, S., et al., *Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study*. Multicentre Allergy Study Group. Lancet, 2000. **356**(9239): p. 1392-7.
49. Lomborg, B., *The Skeptical Environmentalist - Measuring the Real State of the World*. 8th Reprint (Part IV/18) ed. 2002: Cambridge University Press.
50. Marsh, D.G., *Genetic factors determining asthma in childhood*. Allergol Immunopathol (Madr), 1981. **Suppl**(9): p. 60-1.
51. Marsh, D.G., et al., *Immune responsiveness to *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed) pollen allergen *Amb a VI (Ra6)* is associated with HLA-DR5 in allergic humans*. Immunogenetics, 1987. **26**(4-5): p. 230-6.
52. Marsh, D.G., et al., *HLA-Dw2: a genetic marker for human immune response to short ragweed pollen allergen *Ra5*. I. Response resulting primarily from natural antigenic exposure*. J Exp Med, 1982. **155**(5): p. 1439-51.
53. Marsh, D.G., D.A. Meyers, and W.B. Bias, *The epidemiology and genetics of atopic allergy*. N Engl J Med, 1981. **305**(26): p. 1551-9.
54. Marsh, D.G., et al., *HLA-Dw2: a genetic marker for human immune response to short ragweed pollen allergen *Ra5*. II. Response after ragweed immunotherapy*. J Exp Med, 1982. **155**(5): p. 1452-63.
55. Marsh, D.G., et al., *Linkage analysis of *IL4* and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations*. Science, 1994. **264**(5162): p. 1152-6.
56. Martin, C.C. and R. McGowan, *Genotype-specific modifiers of transgene methylation and expression in the zebrafish, *Danio rerio**. Genet Res, 1995. **65**(1): p. 21-8.

57. Matricardi, P.M., et al., *Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study.* Bmj, 2000. **320**(7232): p. 412-7.
58. Meyers, D.A., et al., *Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5.* Genomics, 1994. **23**(2): p. 464-70.
59. Moffatt, M.F., et al., *Genetic linkage of T-cell receptor alpha/delta complex to specific IgE responses.* Lancet, 1994. **343**(8913): p. 1597-600.
60. Morison, I.M., C.J. Paton, and S.D. Cleverley, *The imprinted gene and parent-of-origin effect database.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(1): p. 275-6.
61. Murray, A.B. and B.J. Morrison, *It is children with atopic dermatitis who develop asthma more frequently if the mother smokes.* J Allergy Clin Immunol, 1990. **86**(5): p. 732-9.
62. Nadler, M.J. and J.P. Kinet, *Uncovering new complexities in mast cell signaling.* Nat Immunol, 2002. **3**(8): p. 707-8.
63. Norman, P.S., *Modern concepts of immunotherapy.* Curr Opin Immunol, 1993. **5**(6): p. 968-73.
64. Parravicini, V., et al., *Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation.* Nat Immunol, 2002. **3**(8): p. 741-8.
65. Peters, P.J., et al., *Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments.* Nature, 1991. **349**(6311): p. 669-76.
66. Pirquet, C.v., *Allergie.* Münch. med. Wschr., 1906. **30**: p. 1457.
67. Platts-Mills, T.A. and M.C. Carter, *Asthma and indoor exposure to allergens.* N Engl J Med, 1997. **336**(19): p. 1382-4.
68. Platts-Mills, T.A., et al., *Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop.* J Allergy Clin Immunol, 1997. **100**(6 Pt 1): p. S2-24.
69. Rammensee, H.G., K. Falk, and O. Rotzschke, *MHC molecules as peptide receptors.* Curr Opin Immunol, 1993. **5**(1): p. 35-44.
70. Rammensee, H.G., K. Falk, and O. Rotzschke, *Peptides naturally presented by MHC class I molecules.* Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 213-44.
71. Reik, W., et al., *Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice.* Nature, 1987. **328**(6127): p. 248-51.

72. Ricci, M., *IL-4: a key cytokine in atopy*. Clin Exp Allergy, 1994. **24**(9): p. 801-12.
73. Roitt, I., J. Brostoff, and D. Male, *Immunology*. 6th ed. 2001: Mosby, Harcourt Publishers Limited.
74. Romagnani, S., *Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology*. Int Arch Allergy Immunol, 1992. **98**(4): p. 279-85.
75. Romagnani, S., *Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response?* Immunol Today, 1992. **13**(10): p. 379-81.
76. Rosenwasser, L.J., *Genetics of asthma and atopy*. Toxicol Lett, 1996. **86**(2-3): p. 73-7.
77. Rosenwasser, L.J., *Genetics of atopy and asthma: promoter-based candidate gene studies for IL-4*. Int Arch Allergy Immunol, 1997. **113**(1-3): p. 61-4.
78. Rosenwasser, L.J., *Genetics of atopy and asthma. The rationale behind promoter-based candidate gene studies*. Chest, 1997. **111**(6 Suppl): p. 74S-77S.
79. Rosenwasser, L.J. and L. Borish, *Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10)*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(4 Pt 2): p. S152-5.
80. Rosenwasser, L.J., et al., *Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy*. Clin Exp Allergy, 1995. **25 Suppl 2**: p. 74-8; discussion 95-6.
81. Sapienza, C., *Genome imprinting: an overview*. Dev Genet, 1995. **17**(3): p. 185-7.
82. Sapienza, C., et al., *Degree of methylation of transgenes is dependent on gamete of origin*. Nature, 1987. **328**(6127): p. 251-4.
83. Sasaki, H., N.D. Allen, and M.A. Surani, *DNA methylation and genomic imprinting in mammals*. Exs, 1993. **64**: p. 469-86.
84. Schadewaldt, H., *Geschichte der Allergie*. 1980: Verlag Dusterlöh, Dusen Hofen.
85. Schadewaldt, H., *Idiosynkrasie, Anaphylaxie, Allergie, Atopie. Ein Beitrag zur Geschichte der Überempfindlichkeitskrankheiten*. Rheinisch Westfälische Akademie der Wissenschaften, 1981.
86. Shaheen, S.O., et al., *Birth weight, body mass index and asthma in young adults*. Thorax, 1999. **54**(5): p. 396-402.

87. Sham, P.C. and D. Curtis, *An extended transmission/disequilibrium test (TDT) for multi-allele marker loci*. Ann Hum Genet, 1995. **59**(Pt 3): p. 323-36.
88. Shirakawa, T., et al., *Linkage between severe atopy and chromosome 11q13 in Japanese families*. Clin Genet, 1994. **46**(3): p. 228-32.
89. Shirakawa, T., et al., *Association between atopy and variants of the beta subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor*. Nat Genet, 1994. **7**(2): p. 125-9.
90. Sinigaglia, F. and J. Hammer, *Defining rules for the peptide-MHC class II interaction*. Curr Opin Immunol, 1994. **6**(1): p. 52-6.
91. Soothill, J.F., *Allergy and infant feeding*. Proc Nutr Soc, 1976. **35**(3): p. 283-4.
92. Soothill, J.F., et al., *Predisposing factors and the development of reagenic allergy in infancy*. Clin Allergy, 1976. **6**(4): p. 305-19.
93. Spielman, R.S. and W.J. Ewens, *A sibship test for linkage in the presence of association: the sib transmission/disequilibrium test*. Am J Hum Genet, 1998. **62**(2): p. 450-8.
94. Spielman, R.S., R.E. McGinnis, and W.J. Ewens, *Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)*. Am J Hum Genet, 1993. **52**(3): p. 506-16.
95. Stephan, V., et al., *Genetic linkage of HLA-class II locus to mite-specific IgE immune responsiveness*. Clin Exp Allergy, 1999. **29**(8): p. 1049-54.
96. Stephan, V., et al., *Mite allergy, clinical atopy, and restriction by HLA class II immune response genes*. Pediatr Allergy Immunol, 1996. **7**(1): p. 28-34.
97. Sullivan, A.L., P.M. Grimley, and H. Metzger, *Electron microscopic localization of immunoglobulin E on the surface membrane of human basophils*. J Exp Med, 1971. **134**(6): p. 1403-16.
98. Swain, J.L., T.A. Stewart, and P. Leder, *Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: a molecular mechanism for parental imprinting*. Cell, 1987. **50**(5): p. 719-27.
99. Takafuji, S., et al., *Diesel-exhaust particulates inoculated by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice*. J Allergy Clin Immunol, 1987. **79**(4): p. 639-45.
100. Torres-Galvan, M.J., et al., *Linkage of house dust mite allergy with the HLA region*. Ann Allergy Asthma Immunol, 1999. **82**(2): p. 198-203.

-
101. Travers, P., and C.A. Janeway, *Immunologie*. 2. Auflage ed. 1999: Spektrum, Akad. Verlag.
 102. van Herwerden, L., et al., *Linkage of high-affinity IgE receptor gene with bronchial hyperreactivity, even in absence of atopy*. *Lancet*, 1995. **346**(8985): p. 1262-5.
 103. van Milligen, F.J., et al., *IgE epitopes on the cat (*Felis domesticus*) major allergen *Fel d I*: a study with overlapping synthetic peptides*. *J Allergy Clin Immunol*, 1994. **93**(1 Pt 1): p. 34-43.
 104. Verhoef, A., et al., *Clonal analysis of the atopic immune response to the group 2 allergen of *Dermatophagoides* spp.: identification of HLA-DR and -DQ restricted T cell epitopes*. *Int Immunol*, 1993. **5**(12): p. 1589-97.
 105. Young, R.P., et al., *HLA-DR and HLA-DP genotypes and immunoglobulin E responses to common major allergens*. *Clin Exp Allergy*, 1994. **24**(5): p. 431-9.

Abbildungen

<i>Abbildung 1: Antigenprozessierung</i>	5
<i>Abbildung 2: Antigenerkennung</i>	6
<i>Abbildung 3: Chr 6/MHC</i>	7
<i>Abbildung 4: HLA Klasse II Gene</i>	7
<i>Abbildung 5: HLA Klasse I vs. HLA Klasse II</i>	8
<i>Abbildung 6: HLA Klasse I-Molekül / HLA Klasse II-Molekül</i>	8
<i>Abbildung 7: Schematische Darstellung des HLA Klasse II-Moleküls</i>	9
<i>Abbildung 8: Schematische Darstellung der α_2- und β_2-Domänen</i>	9
<i>Abbildung 9: Verankerung des HLA Klasse II-Moleküls in der Membran</i>	10
<i>Abbildung 10: Antigenerkennung durch T-Zellen</i>	12
<i>Abbildung 11: IgE- $F_{\epsilon}RI$ -Molekül</i>	14
<i>Abbildung 12: Prick-Test-Koffer</i>	23
<i>Abbildung 13: Prick-Test-Vorbereitung</i>	24
<i>Abbildung 14: Prick-Test-Auftragen</i>	24
<i>Abbildung 15: Prick-Test-Einritzen</i>	24
<i>Abbildung 16: Prick-Test-Ergebnis</i>	25
<i>Abbildung 17: Quaddelbildung</i>	25
<i>Abbildung 18: Kontroll-Fotografie der PCR-Produkte und DNA-Size-Standard</i>	33
<i>Abbildung 19: Ergebnis der Hybridisierung (Membranen 1, 2 und 3)</i>	53
<i>Abbildung 20: Ergebnis der Hybridisierung (Membranen 4- 6 und Kontrollmembran)</i>	53
<i>Abbildung 21: Übersicht der Probandenrekrutierung</i>	55
<i>Abbildung 22: Hausstaubmilben</i>	57
<i>Abbildung 23: Graspollen</i>	57
<i>Abbildung 24: Birkenpollen</i>	57

Tabellen

<i>Tabelle 1: Zytokinprofile der T_{H1}- und T_{H2}-Subpopulationen</i>	11
<i>Tabelle 2: Gell und Coombs-Klassifikation</i>	13
<i>Tabelle 3: Reaktionsgemisch</i>	29
<i>Tabelle 4: PCR-Programm in Kurzform</i>	31
<i>Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Kontrollzellen</i>	39
<i>Tabelle 6: Auflistung der verwendeten HLA-DRB1-SSO</i>	41
<i>Tabelle 7: Empfohlene Hybridisierungs- und Waschvorgangtemperatur</i>	44
<i>Tabelle 8: Individuell ermittelte Hybridisierungs- und Waschttemperatur</i>	44
<i>Tabelle 9: Hybridisierungsmuster der HLA-DRB1-Allele</i>	46
<i>Tabelle 10: Hybridisierungsmuster der HLA-DRB1-Allele</i>	47
<i>Tabelle 11: Hybridisierungsmuster der HLA-DRB1-Allele</i>	48
<i>Tabelle 12: Hybridisierungsmuster der HLA-DRB1-Allele</i>	49
<i>Tabelle 13: Hybridisierungsmuster der HLA-DRB1-Allele</i>	50
<i>Tabelle 14: Hybridisierungsmuster der HLA-DRB1-Allele</i>	51
<i>Tabelle 15: Hybridisierungsmuster der HLA-DRB1-Allele</i>	52
<i>Tabelle 16: Geschlecht, Alter und IgE-Reaktivität in der Studienpopulation</i>	60
<i>Tabelle 17: DRB1-Allelfrequenzen der Gesamtpopulation</i>	61
<i>Tabelle 18: DRB1-Allelfrequenzen der Population nur für die Elterngeneration</i>	62
<i>Tabelle 19: DRB1-Allelfrequenzen der Population nur für die Kindergeneration</i>	63
<i>Tabelle 20: Verteilung der IBD-Häufigkeit</i>	64
<i>Tabelle 21: SIBPAIR-Test: Beziehungsanalyse der HLA-Klasse-II-Allele</i>	65
<i>Tabelle 22: SIBPAIR-Analyse der väterlichen DRB1-Allele</i>	66
<i>Tabelle 23: SIBPAIR-Analyse der mütterlichen DRB1-Allele</i>	66
<i>Tabelle 24: SIBPAL-Test: Beziehungsanalyse der HLA-Klasse-II-Allele</i>	67
<i>Tabelle 25: Erweiterter TD-Test (Extended Transmission Disequilibrium Test)</i>	69

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Volker Wahn für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit an der Kinderklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchführen zu können.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Volker Stephan danke ich für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. J. Kühr und Herrn Dr. med. M. Moseler danke ich für die Unterstützung bei dem statistischen Teil.

Des Weiteren danke ich Frau A. Seibt, Frau Dr. med. S. Zingsem und Herrn Dr. med. H. Saueressig, die mit mir viele Stunden im Labor verbracht haben.

Zu großem Dank bin ich meinen Eltern Thi Dung Do und Duy Diem Dinh verpflichtet, ohne deren Unterstützung mir das Studium der Medizin nicht möglich gewesen wäre.

Zu guter letzt danke ich meiner Frau Thi Tuyet Nhung Le-Dinh, meinem Bruder Duc Phu Dinh, meiner Schwägerin Thi Tuyet Tham Le, meinem Pflegebruder Christian Schüppen und meinen beiden besten Freunden Andreas Josupeit und Wilfried Krölls für ihre moralische Unterstützung während des Studiums und während der Fertigstellung der Arbeit.

Curriculum vitae

Angaben zur Person

Name: Tat Dac Dinh
Geburtsdatum: 23.12.1970
Geburtsort: Saigon/Vietnam

Schulausbildung

1976-1979 Grundschole, Saigon/Vietnam
1979-1983 Grundschole Van-Gogh-StraÙe, Duisburg
1983-1991 Krupp-Gymnasium, Duisburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

1991-1998 Studium der Humanmedizin
1991-1993 Vorklinischer Studienabschnitt an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
1993-1996 Erster und Zweiter Klinischer Studienabschnitt an der Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf
WS 1996/97 Urlaubssemester mit Forschungstätigkeit im Rahmen der Disser-
tation
1997-1998 Praktisches Jahr an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Innere Medizin: Kardiologie und Pulmologie
Chirurgie: Herz-Thorax-Chirurgie, Allgemeine Chirurgie
Pädiatrie: Intensivmedizin, Gastroenterologie, Endokrinologie
(Thomas Jefferson University, Pennsylvania/ USA)
September 1993 ärztliche Vorprüfung
September 1994 Erste ärztliche Prüfung
März 1997 Zweite ärztliche Prüfung

Beruflicher Werdegang

07/99-05/99 Zivildienst in Verbindung mit Arzt im Praktikum im Kinderkran-
kenhaus Köln-Riehl
06/99-02/00 Arzt im Praktikum im Kinderkrankenhaus Köln-Riehl
03/00-03/03 Assistenzarzt im Kinderkrankenhaus Köln-Riehl
ab 01.04.2003 Assistenz-/Facharzt in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
St. Josef-Hospital Bochum mit Weiterbildung Allergologie
22.12.2003 Facharztprüfung Kinderheilkunde und Jugendmedizin

Krefeld, den 25.02.2004

Tat Dac Dinh

Titel der Dissertation: Korrelation zwischen dem HLA Klasse II DRB1-Genlocus und der spezifischen IgE-vermittelten Immunantwort auf aerogene Allergene

Dissertation vorgelegt von Tat Dac Dinh

Abstract

Der Begriff der Allergie beschreibt einen pathophysiologischen Zustand als inadäquate Reaktion verschiedener physiologischer Systeme auf ein Agens. Im Rahmen der Etablierung pathophysiologischer Konzepte gewinnt die Analyse molekulargenetischer Mechanismen eine zunehmende Bedeutung.

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit der Korrelation zwischen HLA (englisch: *Human Leucocyte Antigen*)-Klasse II DRB1-Genen und der spezifischen IgE (*Immunglobulin E*)-vermittelten Immunantwort der wichtigsten inhalativen Allergien, um ein mögliches Screeninginstrument für die Früherkennung allergiegefährdeter Kinder etablieren zu können.

Mit PCR (englisch: *Polymerase Chain Reaction*), Dot-Blotting und DNA (englisch: *Desoxyribo-Nucleic-Acid*)-Hybridisierung wurde aus einem Kollektiv von 180 Patienten aus 40 Familien (100 Kinder und 40 Elternpaare aus der Umgebung Freiburgs und einer Gemeinde des Hochschwarzwaldes) mit mindestens 2 schulpflichtigen Kindern, wobei mindestens eines der Kinder eine Sensibilisierung gegen Milbenallergene, Katzenepithelien, Gras- und/oder Birkenpollen aufwies, die HLA-DRB1-Allele DR1-DR10 bestimmt. Prozentual traten in diesem Kollektiv die Allele HLA-DR2 und HLA-DR7 am häufigsten auf, unabhängig von der Art der Sensibilisierung und der Generation.

Mittels drei statistischer Standardtests wurden DRB1-Allelfrequenzen und deren Verteilung auf die Kinder untersucht. Durch den SIBPAIR-Test konnte nachgewiesen werden, dass in der Gruppe der Milbenallergiker die Allelgleichheit bei den betroffenen Geschwisterpaaren grenzwertig signifikant erhöht war ($p = 0.02$), was im SIBPAL-Test sogar als signifikantes Ergebnis bestätigt werden konnte ($p = 0.01$; $\pi = 0.66$). Im ETD-Test konnte in der gleichen Gruppe ein Disequilibrium der Transmission der Allele festgestellt werden ($p = 0.01$; $\chi^2 = 20.7$). Zudem konnte nach getrennter Analyse der väterlichen und mütterlichen Allele festgestellt werden, dass in der Milbenallergikergruppe die betroffenen Geschwisterpaare signifikant häufiger die gleichen Allele mütterlicherseits teilten ($p = 0.002$; $\chi^2 = 9.94$). Für die Gruppen der auf Katzenepithelien, Gras- und Birkenpollen sensibilisierten Kinder konnten diese 3 Tests kein signifikantes Ergebnis nachweisen. Lediglich für die Gruppe der Graspollenallergiker konnte im SIBPAL-Test eine Tendenz zur Allelgleichheit ($p = 0.09$; $\pi = 0.58$) festgestellt werden.

Zusammengefasst ergibt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit eine eingeschränkte Bedeutung der HLA-DRB1-Gene für die Entwicklung einer Milbenallergie im Sinne eines monokausalen Zusammenhanges. Vermehrtes Auftreten von bestimmten, insbesondere mütterlichen DRB1-Allelen innerhalb einer Familie scheinen relevant zu sein, jedoch muss angenommen werden, dass zur Entwicklung einer Allergie komplexe Regelmechanismen verantwortlich sind, die von multiplen Genen und Faktoren abhängig sind.