

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring)



Zelltypspezifische Methylierungs- und Expressionsmuster der atopischen Dermatitis

Anna Franziska Wert

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. St. Weidinger, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2. apl. Prof. Dr. K. Brockow

Die Dissertation wurde am 04.02.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 15.07.2015 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	ALLERGIE UND ATOPIE	1
1.2	ATOPISCHE DERMATITIS	2
1.2.1	KLINIK UND PATHOPHYSIOLOGIE	2
1.3	EPIDEMIOLOGIE	4
1.3.1	GENETISCHE RISIKOFAKTOREN DER ATOPISCHEN DERMATITIS	5
1.3.2	UMWELTBEDINGTE RISIKOFAKTOREN DER ATOPISCHEN DERMATITIS	8
1.4	EPIGENETIK	10
1.4.1	DNA-METHYLIERUNG	12
1.4.2	EPIGENETIK UND ALLERGIE	14
1.5	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	15
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	METHODEN	16
2.1.1	PROBANDENKOLLEKTIV	16
2.1.2	ISOLATION MONONUKLEÄRER ZELLEN AUS PERIPHEREM BLUT MITTELS DICHTEGradientENZENTRIFUGATION	17
2.1.3	ISOLATION VON CD4+ T-ZELLEN AUS VOLLBLUT	18
2.1.4	ISOLATION VON B-ZELLEN AUS VOLLBLUT	18
2.1.5	DNA-ISOLATION AUS B-ZELLEN UND CD4+ T-ZELLEN	19
2.1.6	DNA-ISOLATION AUS EPIDERMIS	19
2.1.7	DNA-ISOLATION AUS 9ML EDTA-BLUT	20
2.1.8	QUALITÄTSPRÜFUNG DER DNA	20
2.1.8.1	Konzentrationsmessung mit dem Nanodrop	20
2.1.8.2	DNA-Qualitätsgel	21
2.1.8.3	Amelogenin-PCR	21
2.1.9	METHYLIERUNGSANALYSE	23
2.1.9.1	Bisulfitkonvertierung	23
2.1.9.2	Infinium HumanMethylation27 BeadChip	25
2.1.10	RNA-EXPRESSIONSANALYSE	26
2.1.10.1	RNA-Extraktion aus Vollblut:	26
2.1.10.2	RNA-Extraktion aus Haut (läsional und nicht-läsional)	27
2.1.10.3	Qualitätskontrolle der RNA nach Isolation	28
2.1.10.4	Präparation der RNA-Proben	28
2.1.10.5	HumanHT 12v3 Expression BeadChip	29
2.1.11	STATISTISCHE ANALYSE	30
2.2	MATERIAL	32
2.2.1	GERÄTE UND HILFSMITTEL	32
2.2.1.1	Zentrifugen	32
2.2.1.2	Dokumentationssysteme	32

2.2.1.3	Apparatur	32
2.2.1.4	Gel-Ablage	32
2.2.1.5	Weitere Geräte	32
2.2.1.6	Pipettierroboter	32
2.2.2	CHEMIKALIEN, REAGENZIEN, PUFFER UND KITS	33
2.2.2.1	CD4+ T-Zell-/B-Zell-Isolation	33
2.2.2.2	DNA-Extraktion	33
2.2.2.3	RNA-Extraktion	33
2.2.2.4	RNA-Präparation und Chip	33
2.2.2.5	DNA-Qualitätsgel	33
2.2.2.6	Amelogenin-PCR	34
2.2.2.7	Bisulfit-Konvertierung	34
2.2.3	ENZYME	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	UNTERSCHIEDE ZWISCHEN VOLLBLUT, B-ZELLEN, T-ZELLEN UND EPIDERMIS HINSICHTLICH DER DNA-METHYLIERUNG	35
3.2	UNTERSCHIEDE DES DNA-METHYLIERUNGSMUSTERS BEI PATIENTEN MIT ATOPISCHER DERMATITIS UND GESUNDEN KONTROLLEN	37
3.3	UNTERSCHIEDE DER MRNA-EXPRESSION BEI PATIENTEN MIT ATOPISCHER DERMATITIS UND GESUNDEN KONTROLLEN	39
3.4	FUNKTIONALE INTEGRATION VON GENEXPRESSION UND METHYLIERUNGSSTATUS	40
4	DISKUSSION	50
4.1	AD-SPEZIFISCHE UNTERSCHIEDE DES METHYLIERUNGSMUSTERS IN DEN EINZELNEN GEWEBEN	53
4.2	REFLEKTION DES METHYLIERUNGSMUSTERS DER ANDEREN GEWEBE IN PERIPHEREM BLUT	54
4.3	INTEGRATION VON DNA-METHYLIERUNGS- UND EXPRESSIONSDATEN	54
5	ZUSAMMENFASSUNG	60
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	62
7	TABELLENVERZEICHNIS	64
8	LITERATURVERZEICHNIS	65
9	DANKSAGUNG	83
10	CURRICULUM VITAE	84

Abkürzungsverzeichnis

Maßeinheiten und –angaben werden gemäß internationaler Konvention in SI-Einheiten (Système International d'Unités) oder in SI-abgeleiteten Einheiten angegeben. Als Präfixe dienen grundsätzlich SI-Präfixe. Chemische Elemente, Moleküle und andere Verbindungen werden gemäß der Nomenklatur der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) abgekürzt.

Abb.	Abbildung
ALEX	Allergien und Endotoxin
AD	Atopische Dermatitis
APC	Antigen-präsentierende Zellen
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
CD	Differenzierungsmuster
cDNA	Komplementäre DNS
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
cRNA	Komplementäre RNS
Cy3	Carbocyanin 3
DC	Dendritische Zellen
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNS-Methyltransferase
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDR	False discovery rate
FLG	Filaggrin
G	Guanin
H	Histon
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HMT	Histonmethyltransferase
IFN γ	Interferon γ
IgE	Immunglobulin E
IGF	Insulin like growth factor
IL	Interleukin

LCR	Locus control region
MBD	Methyl-CpG-Binde-Domäne
MHC II	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex II
mRNA	Messenger-RNA
ND	Nanodrop
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	Principal-component-analysis
PCR	Polymerasenkettenreaktion
RBC	Rote Blutzellen
RIN	RNA-Integrity-Number
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Drehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Saline-EDTA-Puffer
TLR	Toll-like Rezeptor
Treg	Regulatorische T-Zellen
TSDR	Treg-spezifische differenziell methylierte Region
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

1.1 Allergie und Atopie

Die Aufgabe des Immunsystems ist es körperfremde und damit potentiell gefährliche Zellen zu erkennen und zu beseitigen. Dabei ist es notwendig, dass nicht nur zwischen fremden und körpereigenen, sondern auch zwischen harmlosen und potentiell gefährlichen Antigenen unterschieden wird. Bei allergischen Erkrankungen ist dieser Regulationsmechanismus, ähnlich wie bei Autoimmunerkrankungen, gestört. 1902 wurde von Charles Richet und Paul Portier das Phänomen der Anaphylaxie entdeckt (Portier und Richet 1902) und 1906 prägte der Wiener Pädiater Freiherr Clemens von Pirquet den Begriff „Allergie“ (Pirquet 1906), der an das griechische Wort „allos“ („anders“) angelehnt ist. Dies bezog sich auf das Konzept, dass ein Individuum eine veränderte Fähigkeit zeigt auf einen Fremdstoff zu reagieren. Diese Definition schließt sowohl eine verstärkte (Hyperergie), verminderte (Hypoergie) als auch eine fehlende (Anergie) Reaktivität ein. So war Pirquet der erste, der erkannte, dass das Immunsystem nicht nur protektive Immunantworten vermittelt, sondern auch für Überempfindlichkeitsreaktionen verantwortlich sein kann. Heutzutage ist eine Allergie definiert als überschießende Immunantwort auf normalerweise harmlose Umweltantigene. Der Begriff „Atopie“ wurde 1923 von Coca und Cooke in die medizinische Terminologie eingeführt, um ein Phänomen der Überempfindlichkeit auf Einflüsse aus der Umwelt zu beschreiben, welches familiär gehäuft auftrat. (Coca und Cooke 1923) Dafür fand der Altphilologe Perry auf Bitte von Coca und Cooke den Begriff „Atopie“, was so viel bedeutet wie "nicht an der üblichen Stelle", und eine erbliche Störung bezeichnen sollte, die sich klinisch als Asthma oder Heuschnupfen in Begleitung einer Hautreaktion vom Soforttyp gegen natürliche Antigene manifestiert. 1933 nahmen Wise und Sulzberger das „atopische Ekzem“ als Hautmanifestation in die Gruppe der atopischen Erkrankungen auf. Sie schlugen die Bezeichnung „atopic dermatitis or atopic eczema“ vor, um lokalisierte und generalisierte Lichenifikation und generalisierte ekzematöse Hautveränderungen zu bezeichnen. (Wise und Sulzberger 1993) Bereits 1921 hatten Prausnitz und Küstner die Übertragbarkeit der Überempfindlichkeit vom Soforttyp mit Serum nachweisen können. (Prausnitz und Küstner 1921) Coca und Cooke bezeichneten den ursächlichen Serumfaktor später als „Atopisches Reagin“. (Coca und Grove 1925) Nachdem 1966/1967 das japanische Ärzte-Ehepaar Kimishige und Teruko Ishizaka und der schwedische Immunologe SGO Johansson unabhängig voneinander entdeckt hatten, dass Antikörper der Immunglobulinklasse E (IgE) in Verbindung mit dem jeweiligen Allergen zu allergischen Reaktionen vom Soforttyp führen (Bennich, Ishizaka et al. 1969) definierte Jack Pepys Atopie als „vererbte Tendenz zur

Produktion erhöhter Mengen von IgE-Antikörpern gegen niedrige Mengen von Umweltallergenen“. (Pepys 1994) Seitdem war die Definition des Begriffes „Atopie“ Gegenstand vieler Kontroversen. Unlängst definierte eine Arbeitsgruppe der World Allergy Organization (WAO) Atopie als „individuelle oder familiäre Neigung zur Entwicklung einer Sensibilisierung und Produktion von IgE-Antikörpern als Antwort auf eine normale Exposition gegenüber Allergenen, gewöhnlichen Proteinen und Entwicklung von klinischen Symptomen“. (Johansson, Bieber et al. 2004) Demnach gehören zu den Erkrankungen des atopischen Formenkreises die allergische Rhinokonjunktivitis, das allergische Asthma und die atopische Dermatitis.

1.2 Atopische Dermatitis

1.2.1 Klinik und Pathophysiologie

Die atopische Dermatitis, auch Neurodermitis genannt, ist eine chronisch rezidivierende, durch starken Juckreiz charakterisierte Hauterkrankung. Die atopische Dermatitis hat keine pathognomonischen Laborveränderungen und eine große Variabilität klinischer Symptome von Minimalvarianten wie der Pityriasis alba bis hin zu schweren erythrodermischen Formen. Die Diagnose wird klinisch gestellt. Für epidemiologische Studien, bei denen die dermatologische Untersuchung als Goldstandard aus logistischen Gründen nicht durchführbar ist, wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Kriterienkataloge entwickelt, von denen die Hanifin und Rajka Kriterien (siehe Tabelle 1) (Hanifin und Rajka 1980), sowie die UK Working Party Criteria (Williams und al. 1994) am häufigsten eingesetzt werden. (Brennkmeijer, Schram et al. 2008) Die Vereinfachung und Standardisierung der Diagnosestellung geht allerdings mit einem gewissen Verlust an Spezifität und Reliabilität einher.

Für die Diagnosestellung wichtig ist das Vorliegen stark juckender, ekzematöser, manchmal auch lichenifizierter Läsionen in typischer altersabhängiger Lokalisation. Akute Läsionen präsentieren sich mit einer Rötung, Schwellung (Ödem) und gegebenenfalls einer Blasenbildung. Nimmt die Intensität zu, so können nässende Erosionen entstehen, die aufgrund möglicher Superinfektionen von eitrigen Krusten bedeckt sein können (Dermatitis). Bei subakuten Läsionen dominiert die Schuppung und bei chronischen Läsionen stehen die trockene, schuppige Haut, die Lichenifikation sowie streifenförmige Exkoriationen, Erosionen und Rhagaden im Vordergrund. In 45% der Fälle entwickelt sich die atopische Dermatitis während der ersten sechs Lebensmonate, in 60% im ersten Lebensjahr und 85% der Patienten erkranken vor Erreichen des 5. Lebensjahres. (Bieber 2010) Säuglinge zeigen in der Regel akut nässende, verkrustete Herde an Stirn, Wangen und dem behaarten Kopf

(Milchschorf) mit Ausbreitung der Hautveränderungen an Rumpf und Extremitäten, der Windelbereich ist hingegen fast immer symptomfrei. (Ruzicka, Ring et al. 1991) Nicht selten treten bakterielle Superinfektionen auf. In 20-30% der Fälle kommt es zu einer spontanen Rückbildung der Krankheit bis zum 2. Lebensjahr. Über die Hälfte der Patienten ist bei Erreichen des 7. Lebensjahres beschwerdefrei. Im Erwachsenenalter dominieren lichenifizierte Ekzeme in Extremitätenbeugen, am Kopf und Nacken. Neue Schübe sind zu jedem Zeitpunkt der Erkrankung möglich. (Bieber 2010)

Die atopische Dermatitis gilt als komplexe, multifaktorielle Erkrankung, die auf dem Boden komplexer Interaktionen erblicher und exogener (Umwelt-) Faktoren entsteht. Diese sind einerseits mit gestörter epidermaler Barrierefunktion, einem hohen transepidermalen Wasserverlust und einer daraus resultierenden starken Trockenheit der Haut (Xerosis cutis) verbunden, andererseits mit einer Veränderung von immunologischen Reaktionsmustern. Dies zeigt eine in Richtung Th2 verschobene systemische Immunantwort mit erhöhter Produktion der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 und einer konsekutiv gesteigerten IgE-Sekretion sowie einer sequentiellen Aktivierung von Th2- und Th1-Zellen in Hautläsionen. Die Th2-Dominanz hat zudem zur Folge, dass wichtige Funktionen von Th1- und Th17-Zellen wie die angeborene Immunabwehr der Haut empfindlich gestört sind. (Bieber 2008)

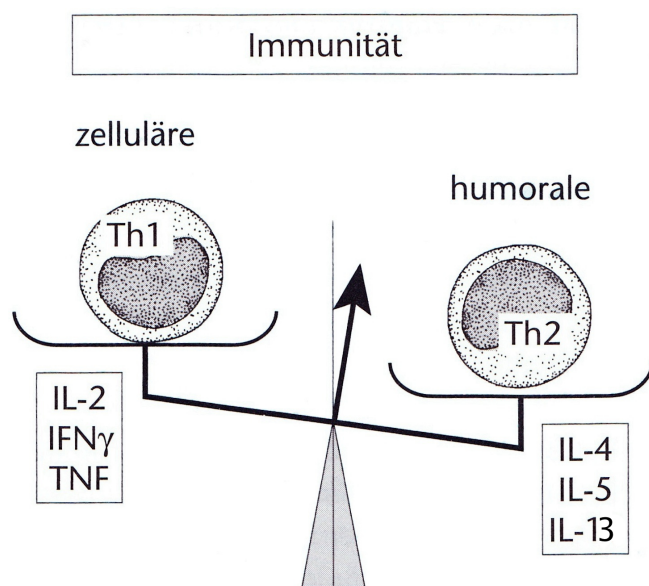


Abb. 1-1 Th1-Th2-Ungleichgewicht bei der atopischen Dermatitis. Beim Krankheitsbild der atopischen Dermatitis liegt eine immunologische Imbalance vor, bei der der Th2-Subtyp und die durch ihn gebildeten Zytokine, IL-4, IL-5 und IL-13 dominieren.

Mind. 3 Hauptkriterien	Mind. 3 Nebenkriterien
Pruritus Typische Morphologie und Verteilung Atopie in Eigen- o. Familienanamnese Chronisch o. chronisch rezidivierend	Xerosis cutis Weißer Dermographismus Erhöhter IgE-Spiegel Früher Krankheitsbeginn Tendenz zu Hautinfektionen Tendenz zu unspezifischer Hand/Fußdermatitis Mamillenekzem Cheilitis Rezidivierende Konjunktivitis Dennie-Morgan-Falte Keratokonius Anteriorer subscapulärer Katarakt Orbitale Hyperpigmentierung Gesichtsblässe, Gesichtserythem Pityriasis alba Anteriore Nackenfalte Pruritus beim Schwitzen Intoleranz von Wolle Perifollikuläre Akzenturierung Nahrungsmittelunverträglichkeit Kausaler Zusammenhang mit emotionaler Belastungssituation Ichthiosis/palmare Hyperlinearität/Keratosis pilaris

Tabelle 1 Kriterien nach Hanifin und Rajka

1.3 Epidemiologie

Auch wenn deutliche Unterschiede in der Häufigkeit atopischer Erkrankungen zwischen verschiedenen Ländern der Welt, Europas, aber auch zwischen Regionen innerhalb Deutschlands bestehen und viele Studien aufgrund unterschiedlicher Erhebungsinstrumente schwer vergleichbar sind, hat die Prävalenz atopischer Erkrankungen in den letzten Jahren insbesondere in industrialisierten Ländern zweifellos stark zugenommen. So leidet heutzutage ein Drittel der Bevölkerung an allergischer Rhinokonjunktivitis, Asthma, atopischer Dermatitis, einer Nahrungsmittel- oder Insektenstichallergie. (Kay 2001) (Kay 2001)

Die Prävalenz für atopische Dermatitis beträgt bis zu 20% bei Kindern und 5% bei Erwachsenen, wobei die Inzidenz in den Industrieländern während der letzten 30 Jahre um das 2- bis 3-fache gestiegen ist. (Novak 2009) Da sich der genetische Hintergrund in solch einem kurzen Zeitraum nicht grundlegend ändert, wird der Anstieg der Prävalenz auf Veränderungen der Umwelt zurückgeführt. Ein Erklärungsmodell stellt hierbei die Hygiene-Hypothese dar. (Braun-Fahrlander und Lauener 2003) Als Erklärung für die Prävalenzunterschiede werden z. B. Unterschiede im Klima oder der Ernährung genannt. (Flohr 2011)

1.3.1 Genetische Risikofaktoren der atopischen Dermatitis

Viele Studien haben gezeigt, dass bei atopischer Dermatitis erbliche Faktoren eine entscheidende Rolle spielen. (Holloway, Yang et al. 2010) So gilt eine positive Familienanamnese als größter Risikofaktor für die Entwicklung einer atopischen Dermatitis. Ist ein Elternteil betroffen, so verdoppelt sich das Risiko für das Kind, sind beide Elternteile betroffen, so verdreifacht es sich. (Schultz und Holm 1985) Es konnte gezeigt werden, dass die Allergieentwicklung eines Kindes stärker mit einer Allergie bei der Mutter assoziiert ist als mit einer Allergie beim Vater. (Moore, Rifas-Shiman et al. 2004) (Litonjua, Carey et al. 1998) Auch in Zwillingsstudien konnte der Einfluss von genetischen Faktoren nachgewiesen werden. So ist die Konkordanzrate bei monozygotischen Zwillingen mit 0,77 größer als bei dizygotischen Zwillingen mit 0,15. (Schultz und Holm 1985) Jedoch gibt es selbst bei genetisch identischen Zwillingen Unterschiede in Bezug auf das Auftreten von einer atopischen Dermatitis. Dies zeigt, dass die atopische Dermatitis als komplexe genetische Erkrankung bezeichnet werden muss, die sowohl von genetischen Faktoren als auch von Umweltfaktoren in ihrem klinischen Bild und ihrer IgE vermittelten Sensitivität beeinflusst wird. (Weidinger und Irvine 2011)

Die Gene, die an Entstehung und Verlauf der AD nach heutigem Kenntnisstand beteiligt sind, lassen sich vereinfacht nach der Funktion der von ihnen kodierten Proteine in vier Gruppen einteilen: (Weidinger und Irvine 2011)

1. Innates Immunsystem
2. Aufrechterhaltung der Hautbarriere
3. Adaptives Immunsystem
4. Gewebsreaktion

Zur ersten Gruppe gehören Gene, die für Komponenten des angeborenen Immunsystems, wie z.B. CD14 und TLR4 kodieren.

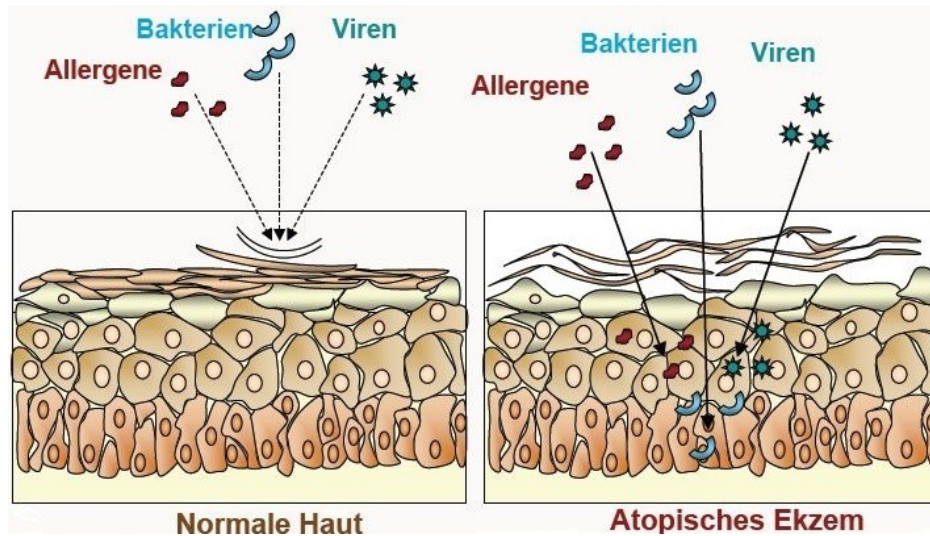


Abb. 1-2 Dysfunktion der Hautbarriere bei atopischer Dermatitis. Bei der atopischen Dermatitis ist die Hautbarriere gestört. Das Protein Filaggrin ist eine Schlüsselkomponente der Protein-Lipid-Schicht der Haut und verhindert normalerweise das Eintreten von Bakterien, Viren und Allergenen. Mutationen im Filaggrin-Gen führen bei Patienten mit atopischer Dermatitis zu verstärktem Eintritt von Allergenen in den Organismus.

Zur zweiten Gruppe gehören Gene, die für essentielle Proteine kodieren, welche die epidermale Hautbarriere aufrechterhalten und bei der Exposition von Umwelteinflüssen Signale an das Immunsystem weiterleiten, wie *SPINK5* (Moffat 2004, Weidinger, O'Sullivan et al. 2008) und *FLG*. (Smith, Irvine et al. 2006) (Palmer, Irvine et al. 2006) (Baurecht, Irvine et al. 2007) Die Identifikation von Null-Mutationen des Profilaggrin-Gens (*FLG*), die zu einer verminderten oder fehlenden Produktion von Filaggrin, einem essentiellen epidermalen Strukturprotein, führen, stellt einen Durchbruch in der Allergiegenetik dar. Profilaggrin wird als ca. 400kDa großes, wasserunlösliches und biologisch inaktives Prä-Protein im oberen Stratum granulosum exprimiert. Im weiteren Verlauf der Keratinozytendifferenzierung wird es in 10-12 identische Filaggrin-Peptide gespalten. Diese vernetzen die Keratin-Intermediärfilamente, was zur Abplattung der Keratinozyten hin zu Corneozyten führt. Nach der Vernetzung der Intermediärfilamente dissoziieren die FLG-Peptide wieder und werden proteolytisch abgebaut zu kleinen Peptiden und hygroskopischen AS wie Urocaninsäure und Pyrrolidoncarbonsäure, die als sogenannte „natürliche Feuchthaltefaktoren“ für die Hydratation des Stratum corneum sorgen. Daneben regulieren sie den Oberflächen-pH, der wiederum die Proteasenaktivität in der Haut beeinflusst und haben antimikrobielle Eigenschaften. (Jungersted, Scheer et al. 2010) (Miajlovic, Fallon et al. 2010) Damit vereint dieses Schlüsselprotein der Epidermis zentrale bei der AD gestörte Funktionen, insbesondere die korrekten Ausbildung einer physikochemischen Barriere.

Bevölkerungsrepräsentative Studien zeigen, dass etwa 8% der Bevölkerung Träger von *FLG*-Mutationen sind, die zu einer verminderten oder fehlenden Produktion von Filaggrin führen,

und bestätigen eine einhergehende Erhöhung des Erkrankungsrisikos für AD auf mehr als das Dreifache. (Baurecht, Irvine et al. 2007) (Rodriguez, Baurecht et al. 2009) Insbesondere scheint ein erblich bedingter Mangel an Filaggrin zu schweren sich früh manifestierenden Formen der AD mit allergischen Sensibilisierungen, hohem Gesamt-IgE und begleitendem Asthma zu prädisponieren. (Weidinger, O'Sullivan et al. 2008) (Henderson, Northstone et al. 2008) (Weidinger, Illig et al. 2006) Darüber hinaus scheint die durch ein Filaggrin-Defizit hervorgerufene Barrierestörung unabhängig von AD zu Hauttrockenheit, allergischer Sensibilisierung, Heuschnupfen und allergischem Kontaktekzem zu prädisponieren. (Novak, Baurecht et al. 2008) (Sergeant, Campbell et al. 2009) (Irvine 2007) (Rodriguez, Baurecht et al. 2009)

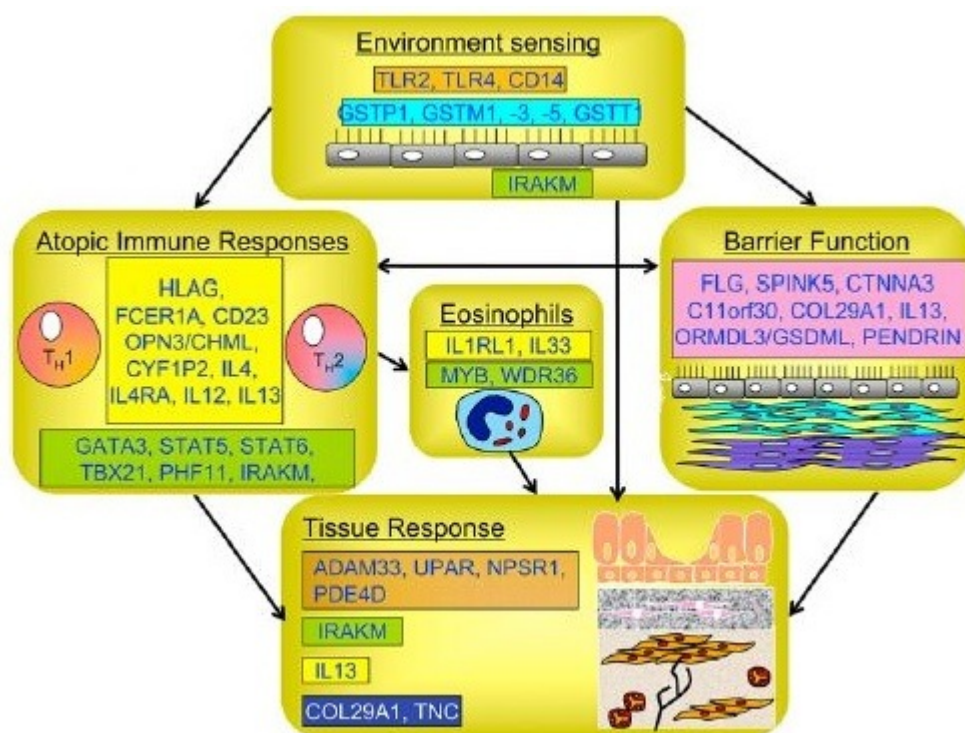


Abb. 1-3 Kandidatengene für allergische Erkrankungen. Die Gene, die an der Allergiegenese beteiligt sind, können in vier Gruppen eingeteilt werden. Nach den vier Bereichen, in denen sie zum Tragen kommen: Unmittelbare Reaktion auf Umwelteinflüsse, Aufrechterhaltung der Hautbarriere, Modulation der Immunantwort und Gewebsreaktion.

Zur dritten Gruppe zählt man die Gene, die die Immunantwort modulieren wie *IL13*, *IL4*, *IL4A*, *RANTES*, *CARD4*, *STAT6*, *TBX21*, *HLAG* und *GATA3*, die die Differenzierung von naiven T-Zellen in TH1 und TH2 regulieren (Holloway, Yang et al. 2010) und *CMA1*, das von Mastzellen exprimiert wird. (Weidinger, Rümmler et al. 2005)

Zur vierten Gruppe fasst man die Gene zusammen, die die Gewebsantwort auf chronische Entzündung mitbestimmen. Dazu gehört *ADAM33*, das von Fibroblasten und glatter Muskulatur exprimiert wird, *PDE4D* und *COL29A1*. (Holloway, Yang et al. 2010)

Es gibt bis heute drei genomweite Assoziationsstudien (GWAS) zur atopischen Dermatitis, die sechs weitere Risikogene aufdecken konnten. Hierzu zählen *C11orf30/LRRC32* auf Chromosom 11q13.5 (Esparza-Gordillo, Weidinger et al. 2009), *OVOL1*, *ACTL9* und *KIF3A/IL4* (Paternoster, Standl et al. 2011) sowie *TMEM232* und *TNFRSF6B* (Sun, Xiao et al. 2011). Diese Gene spielen ebenfalls eine Rolle für die Aufrechterhaltung der natürlichen Hautbarriere und/oder beeinflussen die Immunregulation. Zusammengenommen erklären die bekannten genetischen Suszeptibilitätsloci jedoch nur etwa 20% der Gesamtheritabilität. (Weidinger und Irvine 2011) Neben Umweltfaktoren könnten epigenetische Mechanismen hingegen den Schlüssel zum Verständnis der Krankheitsentstehung bei atopischer Dermatitis liefern.

1.3.2 Umweltbedingte Risikofaktoren der atopischen Dermatitis

Neben der erblichen Prädisposition sind Umwelt- und Lebensstil-Faktoren wichtig für die Entstehung und den Verlauf atopischer Erkrankungen. So konnten als umweltbedingte Risikofaktoren für atopische Dermatitis Aeroallergene aus Hausstaubmilben, Pollen und Tierepithelien (Purvis, Thompson et al. 2005) sowie Nahrungsmittelallergene wie Kuhmilch und Hühnereiweiß (Hauk 2008) identifiziert werden. Neuere Studien deuten darauf hin, dass zumindest bei einem Teil der Patienten mit AD autoreaktive Mechanismen eine Rolle spielen könnten. (Tang, Bieber et al. 2012)

Neben Allergenen können auch mikrobielle Antigene (Kisich, Carspecken et al. 2008) (Elias und Schmuth 2009) sowie Irritantien wie Seife, Wolle und Schweiß (Schmid-Ott, Jaeger et al. 2001) (Moes, Niggemann et al. 2005) eine atopische Dermatitis triggern. Ein Erklärungsmodell für die steigende Inzidenz der atopischen Dermatitis stellt die Hygiene-Hypothese dar. (Strachan 1989) Sie besagt, dass Infektionen und unhygienische Bedingungen mit niedriger Allergieprävalenz assoziiert sind. So entwickeln Kinder, die auf einem Bauernhof aufwachsen deutlich weniger Allergien, als Kinder in Städten. (Mutius 2010) Dabei scheinen der Zeitpunkt und die Dauer der Exposition eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass die größte Risikoreduktion erreicht wird, wenn die Kinder bereits pränatal (Ege, Bieli et al. 2006) und anschließend im ersten Lebensjahr der Bauernhofumgebung ausgesetzt sind (ALEX Studie).

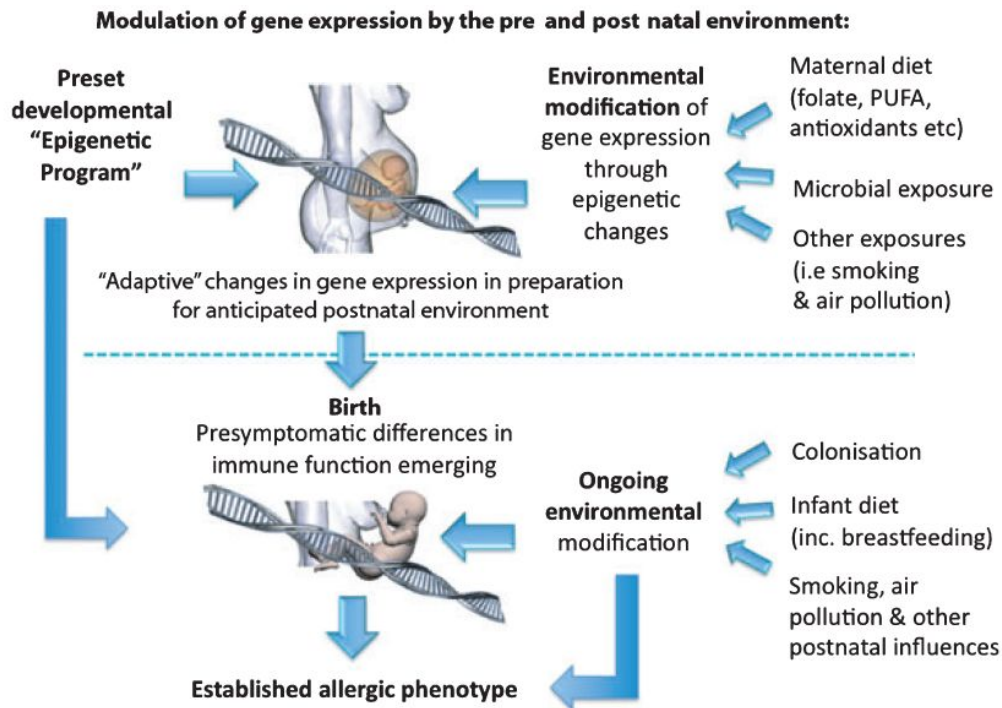


Abb. 1-4 Modulation der Genexpression durch die prä- und postnatale Umwelt. Eine Reihe an prä- und postnatalen Umweltfaktoren können das Epigenom und die Genexpression während der frühen Entwicklung maßgeblich beeinflussen. Das könnte Auswirkungen auf den Phänotyp und die Krankheitsprädisposition haben.

Als wichtigste protektive Faktoren werden der Kontakt mit Bauernhoftieren (Downs, Marks et al. 2001) (Wickens, Lane et al. 2002) (Perkin und Strachan 2006) und das Trinken unpasteurisierter Milch (Wickens, Lane et al. 2002) (Riedler, Braun-Fahrlaender et al. 2001) angenommen. Auch erhöhte Mengen an mikrobiellen Substanzen scheinen zum „Farm-Effekt“ beizutragen. So wurden in Matratzen von auf Bauernhöfen lebenden Kindern mehr Bakterienbestandteile wie Endotoxine und Muraminsäuren gefunden, als bei anderen Kindern. (Schram, Doekes et al. 2005) Die Menge an Endotoxinen in den Matratzen zeigt einen inversen Zusammenhang mit der Prävalenz für atopische Sensitivierung. (Braun-Fahrlaender, Riedler et al. 2002) Periphere Leukozyten von Kindern aus der ALEX-Population, die auf Bauernhöfen leben, zeigen eine vermehrte Expression von Genen für CD14, TLR2 und TLR4. (Lauener, Birchler et al. 2002) (Ege, Bieli et al. 2006) Dies legt die Vermutung nahe, dass Umwelteinflüsse, vor allem mikrobielle Bestandteile, die Expressionsrate von den Genen beeinflussen, die für die mikrobiellen Ligand-Rezeptoren codieren. (Lauener, Birchler et al. 2002) Bisher ist jedoch unklar, über welche Mechanismen Umweltkomponenten allergieprotektive Effekte vermitteln. Neue Ergebnisse zeigen, dass Umweltbedingungen über epigenetische Mechanismen Einfluss auf das Krankheitsrisiko nehmen können. (Martino und Prescott 2010) (White, Hollams et al. 2006)

1.4 Epigenetik

Epigenetische Prozesse gelten als eine zentrale Schnittstelle zwischen Umwelt, genetischer Prädisposition und Phänotyp. Der Begriff Epigenetik kommt ursprünglich aus dem Griechischen und bedeutet wörtlich übersetzt: zusätzlich zur Genetik. Erstmals geprägt wurde der Ausdruck 1942 von Conrad Waddington: „Zweig der Biologie, der die kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und ihren Produkten untersucht, welche den Phänotyp hervorbringen“. Diese doch recht allgemeine Vorstellung wurde zunehmend weiterentwickelt, und heute wird der Begriff Epigenetik meist verwendet, um vererbte Veränderungen in der Genomfunktion, die nicht auf einer Änderung der DNA-Sequenz beruhen, zu beschreiben. Dem können sehr unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen, unter anderem DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und RNA vermittelte Mechanismen (siehe Abb. 1-6). Die DNA liegt in Nukleosomen vor. Dabei sind 147



Abb. 1-5 Milch direkt aus dem Euter. Wichtige protektive Faktoren stellen den frühkindlichen Kontakt zu Bauernhoftieren, sowie der Verzehr unpasteurisierter Milch dar. (Wickens, Lane et al. 2002)

Basenpaare um ein Histonoktamer gewunden. (Portela und Esteller 2010) Je nachdem, ob die Histone am N-Terminus acetyliert, methyliert, ubiquitiniert oder phosphoryliert sind, liegt die DNA als transkriptionsaktives Euchromatin oder dem Transkriptionsapparat weitgehend unzugängliches Heterochromatin vor. Durch diese posttranslationalen Modifikationen der Histone kann also die Genexpression maßgeblich beeinflusst werden. (Bernstein 2005) MikroRNAs sind kleine einzelsträngige, hochkonservierte RNAs, die in der Lage sind die Genexpression, durch Degradation von mRNA-Transkripten oder Inhibition der Translation, negativ zu beeinflussen. (Bartel 2004) Man schätzt, dass 30% aller Gene durch MikroRNAs reguliert werden. (Lewis, Burge et al. 2005) Umweltfaktoren können über solche Mechanismen molekularer Strukturen, die die DNA im Zellkern verpacken, dauerhaft, aber reversibel regulatorischen Einfluss auf die Genexpression nehmen und auf diese Weise die Krankheitssuszeptibilität beeinflussen und das klinische Bild mitbestimmen. Die Epigenetik liefert somit eine Erklärung, wie Umweltfaktoren den Aktivitätszustand von Genen verändern können und wie diese Veränderungen von einer Generation zur nächsten weitergegeben werden können und ist mit hoher Wahrscheinlichkeit neben genetischen Faktoren für einen Teil der hohen Heritabilität vieler häufiger Erkrankungen verantwortlich. Am intensivsten untersucht sind epigenetische Mechanismen im Bereich der Onkologie. Für das Genom von

Tumorzellen konnte eine globale DNA-Hypomethylierung nachgewiesen werden. Dadurch entsteht eine genomische Instabilität, die zur Expression von Onkogenen führen kann. (Jones und Baylin 2007) Epigenetische Mechanismen werden jedoch zunehmend auch als wichtiger Faktor betrachtet, der das individuelle Risiko für nicht-neoplastische Erkrankungen wie die AD beeinflusst. Zu den epigenetischen Mechanismen gehören u. a. die Histonproteinmodifizierung (Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung) und die DNA-Methylierung.

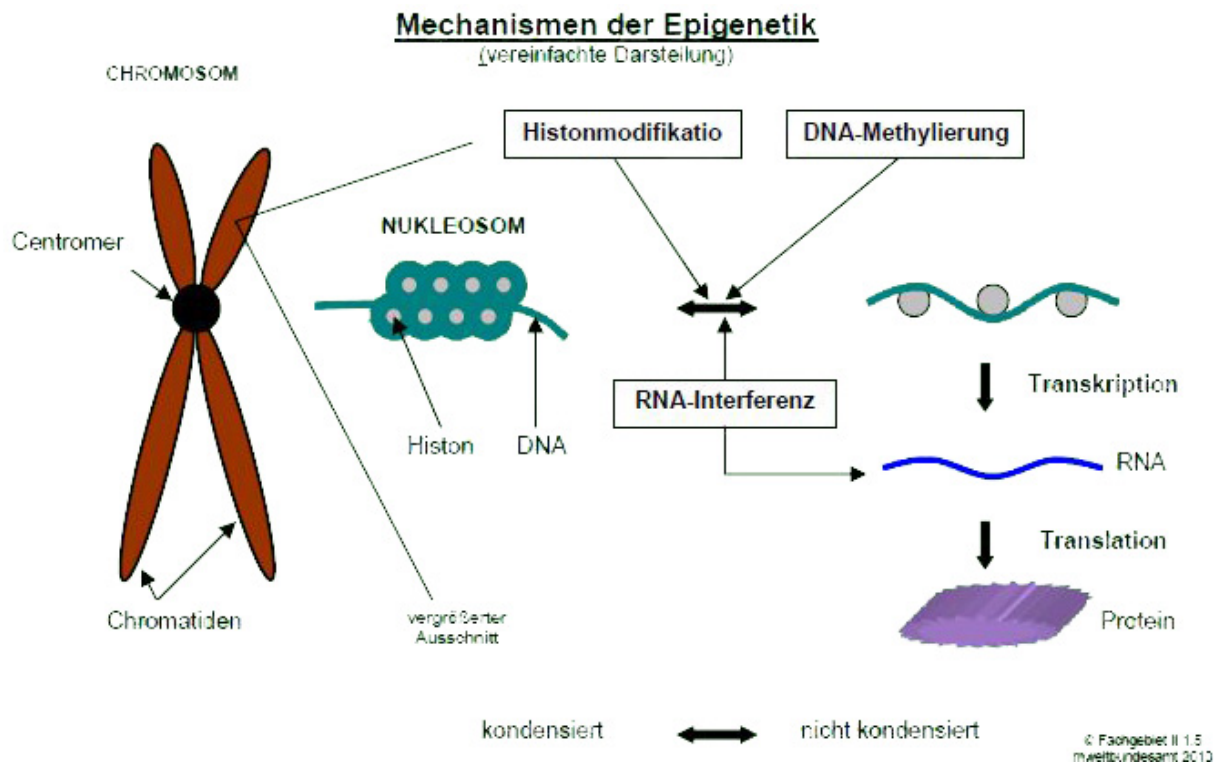


Abb. 1-6 Epigenetische Mechanismen. Die DNA bildet mit den Histonen Nukleosome. Dabei kann die DNA als Heterochromatin (transkriptionsinaktiv) oder als Euchromatin (transkriptionsaktiv) vorliegen. Histonmodifikation und DNA-Methylierung können die DNA-Konformation verändern und somit Einfluss auf die Genexpression nehmen.

1.4.1 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist der am besten verstandene epigenetische Mechanismus. Hierbei wird eine Methylgruppe auf das Carbon 5 des Nukleotides Cytosin, innerhalb eines CpG-Dinukleotides übertragen. Dieser Methylierungsprozess wird von DNA-Methyltransferasen (DNMT) ausgeführt, die eine Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin (SAM), der stoffwechselaktiven Form der Aminosäure Methionin, auf die DNA übertragen.

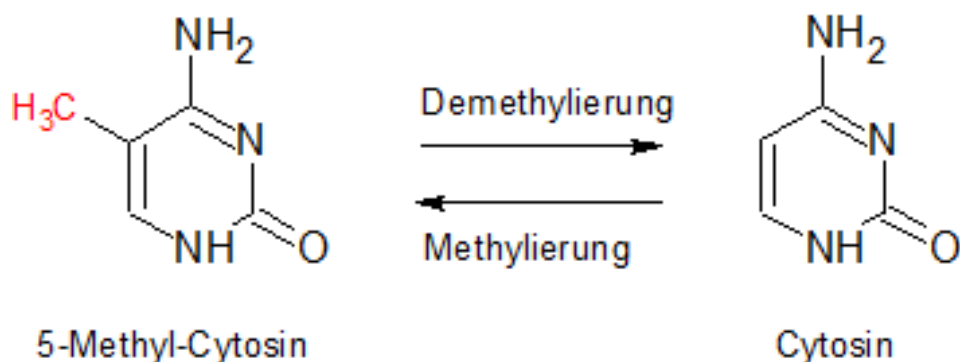


Abb. 1-8 DNA-Methylierung

Die DNMT1, auch Maintenance-Methyltransferase genannt, ist bei der Mitose von Bedeutung. Sie nutzt den Mutter-DNA-Strang als Template und überträgt die Methylgruppen auf die entstehenden Tochterstränge. So bleibt das Methylierungsmuster bei der Replikation erhalten. Neben der Maintenance-Methyltransferase existieren noch die DNMT3A und DNMT3B, die für die de novo Methylierung zuständig sind und keine Zellteilung erfordern. (Janson 2009) Sie sind vor allem während des Embryonalstadiums von Bedeutung und legen das Methylierungsmuster fest. Sie werden daher vor allem in embryonalen Stammzellen und weniger in ausdifferenzierten Zellen exprimiert. (Esteller 2007)

In der DNA gibt es Abschnitte, die besonders reich an CpG-Dinukleotiden sind, sogenannte „CpG-Islands“. Diese Regionen bestehen definitionsgemäß aus mindestens 500 Basenpaaren und enthalten über 55% C- und G-Nukleotide, wobei das Verhältnis von GpCs zu den zu erwartenden CpGs $\geq 0,65$ beträgt. (Takai und Jones 2002, Isidoro-Garcia 2007) Meist sind „CpG-Islands“ in Promotorregionen von Genen zu finden und sind typischerweise unmethyliert. Von den 30 Millionen CpGs des menschlichen Genoms liegen nur 1-2% in CpG-Islands vor. Der Großteil befindet sich in einem methylierten Zustand innerhalb repetitiver Sequenzen. (Bird 2002) Hypomethylierung geht in der Regel mit einer verstärkten Transkriptionsrate einher (Pfeifer 2000), Hypermethylierung hingegen mit einer direkten oder indirekten Repression der Transkription. Die direkte Repression erfolgt durch sterische Inhibition DNA-bindender Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren, bei der indirekten

Repression werden Chromatin-modifizierende Enzyme über Methyl-CpG-bindende Proteine (MBPs) rekrutiert. Bei den für diese Modifikationen zuständigen Enzymen handelt es sich z.B. um Histonacetyltransferasen (HATs), Histondeacetylasen (HDACs) und Histonmethyltransferasen (HMTs). (Bhavsar 2008) Eine Acetylierung durch eine Histonacetyltransferase führt zum Öffnen der Chromatinstruktur und begünstigt somit die Transkription, eine Deacetylierung durch eine Histondeacetylase hingegen führt die Nucleosomen in die Form des Heterochromatins und stoppt somit die Transkription. (Bhavsar 2008) (Bhavsar 2008) (Janson 2009)

Eine Schlüsselrolle spielt die DNA-Methylierung beim genomischen Imprinting, bei dem eines der parental Allele hypermethyliert ist, sodass eine monoallelische Expression zum Tragen kommt. Ähnliches wird bei der Dosiskompensation der X-Chromosom-Inaktivierung bei Frauen beobachtet. (Reik und Lewis 2005) Weiterhin trägt die DNA-Methylierung zur Genomstabilität bei, indem sogenannte Genom-Parasiten wie Transposons und Retrotransposons durch Hypermethylierung stillgelegt werden. (Dean, Lucifero et al. 2005)

In Tumorzellen sind die „CpG-Islands“ oft hypermethyliert, was zur Folge hat, dass Tumor-Suppressor-Gene nicht transkribiert werden und es zum ungehemmten Zellwachstum kommt. Aus diesem Grund bringt man Veränderungen des Methylierungsmusters in „CpG-Islands“ mit malignen Transformationen in Verbindung. (Portela und Esteller 2010) Die Rolle der DNA-Methylierung in der Pathogenese von Krebserkrankungen ist bereits gut verstanden und wird sogar als Therapieansatz genutzt. (Yoo und et al. 2006) Für allergische Erkrankungen wie die atopische Dermatitis hingegen ist der Stellenwert der DNA-Methylierung bislang ungeklärt.

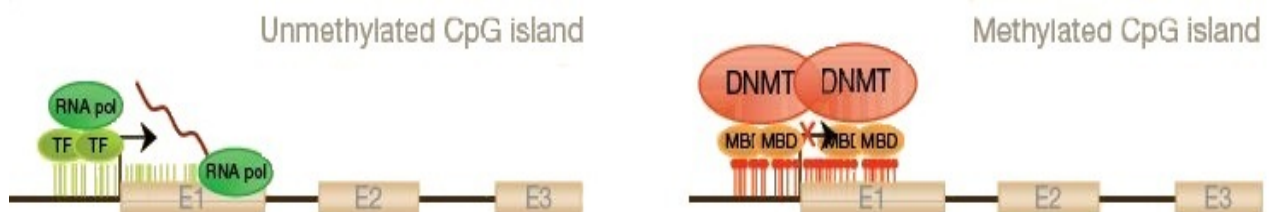


Abb. 1-8 Genregulation durch CpG-Methylierung. Zu sehen ist ein CpG-Island im Bereich eines Gen-Promoters. Auf der linken Seite ist das CpG Island demethyliert. Die Transkriptionsfaktoren (TF) und die RNA-Polymerase (RNA pol) können ungehindert binden und das Gen wird exprimiert. Auf der rechten Seite wird das CpG-Island von der DNA-Methyltransferase (DNMT) methyliert. Auf Grund von sterischen Effekten und durch das Anlagern von Methyl-CpG-Bindedomänen (MBD)-Proteinen ist der Transkriptionsapparat nicht mehr in der Lage an die DNA zu binden. Das Gen wird nicht exprimiert.

1.4.2 Epigenetik und Allergie

Allergische Erkrankungen wie die atopische Dermatitis sind gekennzeichnet durch eine in Richtung Th2 verschobene systemische Immunantwort. (Martino und Prescott 2010) Der Th2-Lokus enthält die Gene für die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, die einen bedeutenden Anteil an der allergischen Immunantwort haben, sowie für das konstitutiv exprimierte Rad50-Gen. Die Differenzierung in Th1- und Th2-Zellen unterliegt einer epigenetischen Kontrolle. (Lee, Kim et al. 2006) (Lee, Agarwal et al. 2002) Vor allem IFN γ ist bei der Th1-Differenzierung von großer Bedeutung. So kommt es während der Th2-Differenzierung zur repressiven Modifikation des IFN γ -Promotors durch Hypermethylierung und damit einhergehendem „Silencing“ der IFN γ -Transkription. (Jones und Chen 2006) Weiterhin konnten DNaseI-Hypersensitivitätsstellen und demethylierte CpGs innerhalb dieser Stellen im IL-4 und IL-13 Promotor identifiziert werden. (Santangelo, Cousins et al. 2002) (Lee, Agarwal et al. 2002) Eine weitere wichtige regulatorische Region des Th2-Lokus ist die Th2-Zytokin Locus Control Region (LCR), die sich am 3'Ende des Rad50-Gens befindet und mehrere Hypersensitivitätsstellen enthält. (Lee, Kim et al. 2006) Während der Th2-Differenzierung findet hier eine Demethylierung der RAD50-Hypersensitivitätsstelle 7 statt. (Kim, Fields et al. 2007) (Yang und Schwartz 2012)

Weitere Hinweise auf eine Rolle von Methylierungsmustern bei allergischen Erkrankungen kommen aus epidemiologischen Studien. So konnte gezeigt werden, dass bei einem Leben auf dem Bauernhof eine verstärkte Methylierung an der Treg-spezifische differenziell methylierte Region (TSDR) im Gen *FOXP3* auftritt. (Martino und Prescott 2010) A. Iwoffii konnte als ein protektiver Faktor der Bauernhofumgebung identifiziert werden. In einer Studie wurde er trächtigen Tieren pränatal intranasal appliziert, was einen protektiven Effekt für die Nachkommen hatte, die weniger Inflammation der Atemwege aufwiesen. Bei ihnen gab es starke Unterschiede in der Th1-IFN γ -Produktion, was auf Veränderungen im Methylierungsmuster des IFN γ -Promotors zurückgeführt werden konnte. (Conrad, Ferstl et al. 2009) Dies ist eine der ersten Studien, die zeigt, dass mikrobielle Exposition das fetale Immunsystem durch epigenetische Mechanismen verändern kann. Auch für Ernährung konnte ein solcher Einfluss nachgewiesen werden. So kann die Einnahme von Folsäure, einem starken Methylgruppdonor, während der Schwangerschaft die allergische Disposition des Feten verändern. In einer Studie wurde trächtigen Mäusen Folsäure verabreicht, was ein verändertes Methylierungsmuster von 84 Genloci und eine veränderte allergische Antwort zur Folge hatte. (Hollingsworth, Maruoka et al. 2008) Auch inhalierte Schadstoffe beeinflussen die epigenetische Kontrolle. So ist Kontakt mit Schadstoffen aus dem Autoverkehr während der Schwangerschaft mit einem erhöhten Risiko für frühkindliches Asthma assoziiert. (Perera,

Tang et al. 2009) Auch postnatal zeigen viele Expositionen einen starken Zusammenhang mit der Entwicklung von Asthma, wie z. B. Zigarettenrauch (Bouzigon, Corda et al. 2008), Viruserkrankungen (Folkerts, Busse et al. 1998) oder die Immunisierung gegen verschiedene Infektionskrankheiten. (Shirakawa, Enomoto et al. 1997) Bis heute gibt es in der Literatur nur zwei Publikationen die sich mit der Epigenetik speziell im Zusammenhang mit der atopischen Dermatitis auseinandergesetzt haben. Nakamura et al. berichteten über eine signifikant verminderte Expression der DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) in peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) bei Patienten mit atopischer Dermatitis, die hohe IgE-Spiegel im Blut aufweisen. (Nakamura, Sekigawa et al. 2006) Eine Fehlfunktion dieses Enzyms könnte eine veränderte DNA-Methylierung zur Folge haben und zu einer veränderten Expression AD-assoziiierter Gene führen. Weiter wurde gezeigt, dass der Promotor FCER1G des hochaffinen IgE-Rezeptors FCεRI in Monozyten von Patienten mit atopischer Dermatitis hypomethyliert ist, was eine verstärkte Genexpression nach sich zieht. (Liang, Wang et al. 2012) In der Kaskade der allergischen Immunreaktion ist das Binden des Antigen-IgE-Komplexes an den hochaffinen IgE-Rezeptor auf der Oberfläche verschiedener Immunzellen ein wesentlicher Vorgang. All dies zeigt, dass epigenetische Einflüsse eine wichtige Rolle in der Allergiegenese spielen könnten.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Eine Reihe aktueller Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass epigenetische Mechanismen in der Pathogenese der AD relevant sein könnten. Um erste Erkenntnisse über die Rolle der DNA-Methylierung für die AD zu erlangen, wurde im Rahmen dieser Dissertation eine erste Epigenomweite-Methylierungs-Studie (EWAS) durchgeführt. Dabei sollte nicht nur untersucht werden, ob und in welchen Genregionen Unterschiede im Methylierungsmuster zwischen AD-Patienten und Gesunden erkennbar sind, sondern auch in welchen Geweben die meisten/größten Unterschiede zu beobachten sind, ob diese Unterschiede mit differentieller Expression einhergehen und bis zu welchem Grad sich die Gewebearten in dieser Hinsicht unterscheiden. Dazu wurde die DNA von Keratinozyten (epidermal sheets), T-Zellen, B-Zellen und peripheren Leukozyten und die mRNA aus Epidermis und Vollblut von 12 Patienten und 13 Kontrollen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Probandenkollektiv

Das Probandenkollektiv umfasste 12 Patienten mit atopischer Dermatitis und 13 gesunde Kontrollen. Bei den Fällen handelte es sich um Patienten der Klinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein sowie der Universitätsklinik Bonn. Für die Patienten galt als Einschlusskriterium die ärztliche Diagnose einer atopischen Dermatitis. Es wurden nur Patienten eingeschlossen, die in den letzten 4 Wochen keine systemischen Medikamente eingenommen hatten und in den letzten 72 Stunden vor Probenentnahme auf topische Medikamente verzichtet hatten. Die Kontrollpersonen waren gesunde freiwillige Probanden, die in ihrer Vorgeschichte keine atopischen Erkrankungen wie Asthma, atopische Dermatitis oder allergische Rhinitis aufwiesen. Für beide Gruppen wurden nur Probanden zwischen 20 und 40 Jahren ausgewählt, da die DNA-Methylierung mit dem Alter variiert. (Fuke, Shimabukuro et al. 2005) (Fraga, Ballestar et al. 2005) So lag das mediane Alter in dem Patientenkollektiv bei 33,7 Jahren und in dem Kontrollkollektiv bei 25,5 Jahren. Ebenso wurde eine möglichst gleiche Geschlechterverteilung in beiden Vergleichsgruppen angestrebt, da die DNA-Methylierung geschlechtsabhängig ist. (Eckhardt, Lewin et al. 2006) So lag der Anteil weiblicher Probanden in der Patientengruppe bei 42% und in der Kontrollgruppe bei 54%. Eine Beschreibung des Probandenkollektivs findet sich in Tabelle 2-1. Allen Probanden wurde Blut abgenommen für die Gewinnung von DNA aus peripheren Leukozyten, CD4+ T-Zellen und B-Zellen, und für die RNA-Isolation aus Leukozyten. Weiterhin wurden shave Biopsien von Arm oder Rücken gewonnen. Bei den Fällen wurden für die DNA-Methylierungsanalyse Proben aus läsionaler Haut verwendet, für die RNA-Expressionsanalyse Proben aus sowohl läsionaler, als auch nicht-läsionaler Haut.

Variabel	Untersuchungskohorte	
	AD (n=12)	Kontrollen (n=13)
n weiblich (%)	5 (42%)	7 (54%)
Medianes Alter (IQR)	33 (30.5-38)	25.5 (22-27.25)
n Expressionsdaten (%)	10 (83%)	13 (100%)

Tabelle 2-1 Beschreibung des Probandenkollektivs

Vor Beginn der Studie wurden alle Probanden schriftlich und mündlich über das Projekt aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Ein entsprechendes Ethikvotum der Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer (Nr. 02014) lag vor.

2.1.2 Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut mittels

Dichtegradientenzentrifugation

Zu den peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) gehören B-Zellen, T-Zellen und Monozyten. Unmittelbar nach der Blutentnahme erfolgte die Isolation mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Paque). Ficoll ist ein synthetisches Polysaccharid, das eine höhere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, aber eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten besitzt. Zur Zellfraktionierung wurden 15ml Ficoll in einem 50ml Falcon-Röhrchen vorgelegt. 15-20ml EDTA Blut wurde mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) auf 30ml aufgefüllt und über das Ficoll geschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation

bei 470xg für 20min ohne Bremse. Dabei lagern sich die mononukleären Zellen ihrer spezifischen Dichte entsprechend in der Interphase zwischen Überstand (Plasma, Thrombozyten) und der Ficoll-Lösung ab. Die Erythrozyten und Granulozyten sinken als Pellet auf den Boden des Falcon-Röhrchens. Die PBMCs wurden vorsichtig mit einer Pipette in ein neues Röhrchen überführt. Danach wurden sie dreimal mit 15-30ml PBS gewaschen und mit Bremse zentrifugiert (410xg für 15min, dann zweimal 300xg für 10min). Die Zellen wurden in einem Falcon-Röhrchen vereinigt

und ein Aliquot in der Neubauer-Kammer gezählt. Ein Viertel der insgesamt ca. 25×10^6 Zellen wurde anschließend für die T-Zell-Isolation, drei Viertel für die B-Zell-Isolation verwendet.

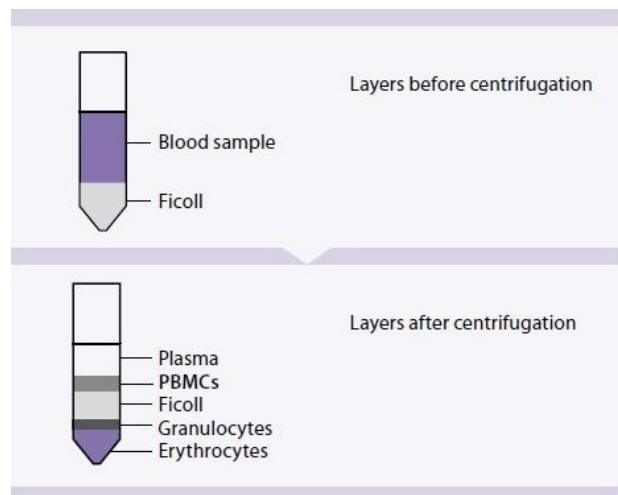


Abb. 2-1 Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Durch die Zentrifugation lagern sich die mononukleären Zellen ihrer spezifischen Dichte entsprechend in der Interphase zwischen Überstand und Ficoll-Lösung ab. Die Erythrozyten sinken dabei als Pellet auf den Boden. So ist ein Abpipettieren der PBMCs möglich.

2.1.3 Isolation von CD4+ T-Zellen aus Vollblut

Die Isolation von CD4+ T-Zellen aus Vollblut erfolgte mit dem MACS CD4+ T-Zell-Isolations-Kit nach Protokoll des Herstellers (Miltenyi Biotec). Das Isolationsverfahren beruht auf dem Prinzip der negativen Selektion der T-Zellen mittels indirekter magnetischer Markierung aller nicht-T-Zellen. Die Zellen werden mit Antikörper-gekoppelten ferromagnetischen MicroBeads markiert und über eine Säule gegeben, die sich in einem Magnetfeld befindet. Unmarkierte Zellen passieren dabei die Säule ungehindert, während die markierten Zellen zurückgehalten werden. Mittels dieser Methode können „unberührte“ CD4+ T-Zellen gewonnen werden. Dadurch wird eine negative Einflussnahme auf nachfolgende Versuche durch markierende Antikörper vermieden.

Zunächst wurden wie oben beschrieben aus dem Vollblut periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Paque) gewonnen. Anschließend wurden die PBMCs mit einem Cocktail Biotin-markierter Antikörper gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TZR γ/δ und Glycophorin A inkubiert. Nach der Inkubation waren alle nicht-CD4+ T-Zellen mit biotinylierten Antikörpern markiert. Nach Zugabe anti-Biotin-konjugierter, ferromagnetischer MicroBeads wurden die markierten Zellen von den unmarkierten mittels MACS-Technologie separiert. Durch das Magnetfeld des Separators wurden die mit den ferromagnetischen MicroBeads markierten nicht-CD4+ T-Zellen zurückgehalten und die unmarkierten CD4+ T-Zellen passierten die Säule. In der negativen Fraktion waren anschließend ca. $2,6 \times 10^6$ „unberührte“ CD4+ T-Zellen enthalten.

2.1.4 Isolation von B-Zellen aus Vollblut

Die Isolation von B-Zellen aus Vollblut beruht wie die Isolation von CD4+ T-Zellen, auf dem Prinzip der negativen Selektion mittels magnetischer Markierung. Für die Isolation von B-Zellen wurde das B Cell Isolation Kit II von MACS Miltenyi Biotec verwendet. Nach Gewinnung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden Biotin-markierte Antikörper gegen CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 und CD235a (Glycophorin A) zugesetzt. Als zweites Reagenz wurden anti-Biotin-konjugierte, ferromagnetische MicroBeads hinzugegeben und mittels Auto-MACS Separator die B-Zellen mit einer Ausbeute von $1,9 \times 10^6$ von den nicht-B-Zellen separiert.

2.1.5 DNA-Isolation aus B-Zellen und CD4+ T-Zellen

Für die DNA-Isolation aus B-Zellen und CD4+ T-Zellen wurde das QIAamp® DNA Mini Kit von QIAGEN verwendet. Die Isolation erfolgte nach dem Herstellerprotokoll (Blood and Body Fluid Spin Protocol). In jeweils einem 1,5ml Reagenzgefäß wurden 20µl QIAGEN Protease vorgelegt und 200µl Probenmaterial zugefügt. Um genomische, RNA-freie DNA zu erhalten wurden noch 4µl RNase A Lösung zugesetzt. Anschließend wurde das Gemisch mit 200µl AL-Puffer versetzt und für 15s gemischt. Es folgte eine Inkubation bei 56°C für 10min. Um Tropfen von der Deckelinnenseite zu entfernen wurden die Reagenzgefäße kurz zentrifugiert. Nach der Zugabe von 200µl 96-100%igem Ethanol wurden sie erneut im Vortexer gemischt und abzentrifugiert. Dann wurden in 2ml Sammelröhrchen QIAamp-Säulen platziert, das Gemisch aus den Reagenzgefäßen in diese überführt und für 1min bei 6000xg zentrifugiert. Die QIAamp-Säulen wurden mit 500µl AW1 Waschpuffer versetzt, erneut für 1min zentrifugiert und in neue Sammelröhrchen platziert. Für den nächsten Waschvorgang wurden 500µl AW2 Puffer verwendet. Es folgt eine 3-minütige Zentrifugation bei 20.000xg. Das Filtrat wurde nach jedem Zentrifugationsschritt verworfen. Im letzten Schritt wurde auf die Säulen jeweils 2 x 100µl Elutionspuffer (AE Puffer) pipettiert, für 5min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend bei 6000xg für 1min zentrifugiert.

2.1.6 DNA-Isolation aus Epidermis

Die Isolation von DNA aus epidermalemem Gewebe (shave Biopsien) erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit nach Protokoll des Herstellers (Tissue Protocol). Die Hautproben wurden in kleine Stücke geschnitten und jeweils in ein 1,5ml Reagenzröhrchen platziert. Anschließend wurden zu jeder Probe 180µl ATL Puffer sowie 20µl Proteinase K hinzugegeben. Es schloss sich ein Inkubationsschritt von 1-3h bei 56°C an, bis das Gewebe vollständig zersetzt war. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde das Gemisch mit 4µl RNase versetzt, gut gemischt und 2min bei Raumtemperatur inkubiert. 200µl AL Puffer wurden zugefügt, gemischt und alles erneut bei 70°C für 10min inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 200µl Ethanol (96-100%) zugegeben, gut gemischt und abzentrifugiert. Das Gemisch wurde in QIAamp-Säulen überführt, die in Sammelröhrchen platziert wurden. Nach einer Zentrifugation bei 6000xg für 1min folgten zwei Waschvorgänge mit jeweils 500µl AW1 Puffer und AW2 Puffer. (Zentrifugation bei 6000xg für 1 min bzw. 20.000xg für 3min) Das Filtrat wurde nach jeder Zentrifugation verworfen. Abschließend erfolgte die Elution mit 2 x 100µl AE Puffer nach 5 min Inkubation bei RT und Zentrifugation bei 6000xg für 1min.

2.1.7 DNA-Isolation aus 9ml EDTA-Blut

Die verwendete Methode für die Gewinnung von DNA basiert auf Miller (Miller, Dykes et al. 1988) und umfasst die Ausfällung der Zellproteine mittels einer saturierten NaCl Lösung.

Für die Erythrozytenlyse wurden 9ml EDTA Blut in 50ml Polypropylenröhrchen mit 30ml eiskaltem RBC-Lysis-Puffer resuspendiert und 15min auf Eis inkubiert. Nach anschließender 10-minütiger Zentrifugation bei 2500rpm wurde der Überstand, bestehend aus den degradierten Erythrozyten, dekantiert.

Zu den verbliebenen Zelllysaten wurden für die Leukozytenlyse 5ml SE-Puffer, 25µl Proteinase K und 250µl SDS 20% hinzugegeben und es folgte eine Inkubation über Nacht bei 55°C, dem Temperaturoptimum der Proteinase K. Für die Eiweißfällung wurde nach abgeschlossener Inkubation jedes Röhrchen mit 5ml SE-Puffer und 3ml saturiertem NaCl versetzt, für 10min bei 55°C inkubiert, anschließend für exakt 25s geschüttelt und bei 3500 rpm für 15 min bei 40°C zentrifugiert. Am Grund des Röhrchens blieb ein ausgefälltes Protein Kügelchen übrig und der Überstand, der die DNA enthielt, wurde in ein 13ml 100% Isopropanol (2-Propanol) enthaltendes Röhrchen dekantiert. Das Röhrchen wurde behutsam invertiert bis die DNA präzipitierte. Nach erneuter Zentrifugation bei 4500rpm für 5min wurde der Überstand erneut unter Beobachtung des DNA-Pellets dekantiert. Anschließend wurden 5ml 70% Ethanol hinzugegeben und eine zweite Zentrifugation bei 4500rpm für 5min folgte. Der Überstand wurde dekantiert und das Röhrchen trocknete 30min umgedreht auf Filterpapier. Zur anschließenden DNA-Renaturierung wurde die DNA in 1ml TE-Puffer gelöst.

Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte eine kurzfristige Lagerung aller DNA-Isolate bei 4°C, langfristig wurden die Proben bei -20°C bis -80°C aufbewahrt.

2.1.8 Qualitätsprüfung der DNA

Um die isolierte DNA auf ausreichende Konzentration, Integrität und Reinheit zu überprüfen, wurden folgende Methoden der Qualitätskontrolle auf alle Proben angewandt.

2.1.8.1 Konzentrationsmessung mit dem Nanodrop

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen erfolgte durch Messung der optischen Dichte mittels Spectrophotometrie. DNA hat ein UV-Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260nm. Eine Lösung mit 50µg/ml DNA weist eine optische Dichte (OD) von 1 bei einer Wellenlänge von 260nm auf. Eine gleichzeitig stattfindende Messung der Absorption bei 280nm erlaubt eine Schätzung der Verunreinigung mit Proteinen. Für

reine DNA ist die OD bei 260 nm doppelt so hoch wie die OD bei 280 nm. Der Verhältniswert der Absorption OD260/OD280 stellt deshalb ein Maß für die Reinheit der Probe dar und sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Der Nanodrop ND-1000 ist ein „Voll“-Spektrum (220-750nm) Spektrophotometer, das 1µl Proben sehr akkurat und reproduzierbar misst. Es benutzt eine patentierte Proben Retentionstechnologie, die allein die Oberflächenspannung benutzt um die Probe an ihrem Platz zu halten. Dies ermöglicht ein Arbeiten ohne sperrige Küvetten und andere Hilfsmittel und man kann in Sekunden die Oberfläche von der vorherigen Probe säubern. Weiterhin kann der ND-1000 auch hoch konzentrierte Proben ohne Verunreinigung messen.

Für die DNA-Methylierungsanalyse wurden nur Proben mit einer Konzentration >23ng/µl und einer OD260/280 von 1,7 – 2,0 verwendet.

2.1.8.2 DNA-Qualitätsgel

Eine Agarose Gel Elektrophorese wird eingesetzt, um die DNA-Fragmente der Größe nach aufzutrennen. Die jeweilige Fragmentgröße kann durch einen Vergleich mit kommerziell erhältlichen Fragmenten, bekannter Größe, abgeschätzt werden. Die Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld zur Anode, da sie eine natürliche negative Ladung an ihrem Phosphodiesterückgrat tragen. Je kleiner das DNA-Fragment ist, desto schneller wandert es durch das elektrische Feld. Um die Integrität, d.h. eine ausreichende Fragmentgröße der isolierten DNA zu überprüfen, wurden Gele mit 0,8% Agarose Anteil gegossen. Dafür wurde die Agarose in TBE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle erhitzt. Um die DNA sichtbar zu machen wurde anschließend Ethidium-Bromid hinzugegeben, ein interkalierendes Agens, das bei 266nm fluoresziert. Anschließend wurde es in Gelkammern mit Taschenkämmen gegossen. Das fertige Gel wurde in Elektrophoresekammern mit 1x TBE-Puffer bedeckt. Zu 1µL DNA wurden 4µL Auftragspuffer (BlueJuice™) zugefügt, um sie in der Geltasche am Boden zu halten und sichtbar zu machen. Zusätzlich wurden 4µL eines Markers (Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker), sowie 5µL fünf verschiedener Größenstandards, in weitere Geltaschen gegeben. Die Elektrophorese lief 90 Minuten bei 90V. Die Banden wurden anschließend mit Hilfe des zugesetzten Ethidiumbromids unter UV-Licht sichtbar gemacht und das Gel wurde fotografiert. Kompakte DNA-Banden mit einer Größe von >20kb wiesen auf eine sehr gute Qualität hin und wurden ohne Bedenken für alle nachfolgenden Analysen benutzt. Degradierete Proben ohne klare Banden wurden verworfen.

2.1.8.3 Amelogenin-PCR

Die Polymerasenkettenreaktion (PCR) (Saiki, Gelfand et al. 1988) stellt eine Standardmethode zur Amplifikation spezifischer DNA-Regionen dar. Die Reaktion startet mit

einem Denaturierungsschritt, bei dem die Proben auf 95°C erhitzt werden und der dazu verwendet wird die DNA-Doppelhelix in ihre beiden Einzelstränge aufzuspalten. Damit die Primer sich spezifisch an die komplementären Sequenzen des Matrizenstrangs anlagern können (Annealing), wird die Temperatur herabgesetzt. Die Primer sind normalerweise 18 bis 25bp lang und so konstruiert, dass sie den Bereich der DNA einschließen, der amplifiziert werden soll. Die Annealing-Temperatur ist von der Basenzusammensetzung der Primer abhängig und liegt normalerweise 5°C unter ihrer Schmelztemperatur. Während des folgenden Elongationsschritts wird die Temperatur auf 72°C erhöht, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase. Die Taq-Polymerase lagert sich an jeden Primer an und nutzt das 3'OH Ende der Primer und die bereitgestellten Desoxyribonukleotide (dNTPs) um die Synthese neuer DNA Stränge zu katalysieren. Die Amplifikation besteht aus 30 bis 45 Zyklen Denaturierung, Annealing und Elongation, in deren Verlauf es zur logarithmischen Vervielfältigung des durch die Primer festgelegten Abschnitts des Genoms kommt.

Für die Amelogenin-PCR wurde ein Bereich im Amelogenin-Gen (AMEL), das für eine Proteinkomponente des Zahnschmelzes kodiert, amplifiziert und analysiert. AMEL ist auf den Chromosomen Xp22.2 und Yp11.2 lokalisiert. Eine Deletion von 141bp in AMELY erlaubt eine Unterscheidung zwischen AMELX und AMELY mittels PCR und dadurch eine Bestimmung des Geschlechts des DNA-Spenders. Die eingesetzten PCR-Primer schließen die 141bp Deletion in AMELY ein und führen zu einem 789bp PCR-Produkt, wogegen AMELX durch ein vollständiges PCR-Produkt von 930bp gekennzeichnet ist. Da weibliche Individuen zwei identische Kopien von AMELX aufweisen, wird auf dem Gel nur eine Bande (930bp) beobachtet. Bei männlichen Individuen zeigen sich dagegen zwei verschiedenen Banden, eine für AMELX (930bp) und eine kleinere für AMELY (789bp). Die Amelogenin-PCR ermöglicht es eine Verunreinigung der DNA-Proben durch PCR-Inhibitoren, wie Hämoglobin, zu erkennen. Auch stellt sie einen Test dar, durch den man ein Vertauschen von Proben ausschließend und die richtige Probenzuordnung sicherstellen kann.

Primer F	CTGATGGTTGGCCTCAAGCCTGTG
Primer R	TAAAGAGATTCATTAAGTTGACTG

Tabelle 2-2 Primer-Sequenzen 5'-3' für die Amelogenin-PCR

Reagenz	50x
10 x Puffer*	100µl
dNTPs (2mM)*	100µl
MgCl ₂ (25mM)*	60µl
F Primer (100pmol)	2.5µl
R Primer (100pmol)	2.5µl
Taq Polymerase (5U/µl)*	10µl
Wasser	675µl

Tabelle 2-3 PCR-Mix (50 Reaktionen). 1µl DNA wurde zu 10µl PCR-Mix gegeben und die PCR gestartet.
*Qiagen

2µl PCR Produkt wurden mit 2µl 10x Auftragspuffer (BlueJuice™) auf ein 1,5% Agarosegel gegeben. Das Gel lief bei 90V für 95min. Anschließend wurden die zwei verschiedenen PCR Produkte für AMELX und AMELY unter UV-Licht sichtbar gemacht.

1.	95°C für 15min
2.	95°C für 30s
3.	62°C für 30s
4.	72°C für 1min
5.	Wiederholung von Schritt 2-4, 34 mal
6.	72°C für 10min
7.	4°C dauerhaft

Tabelle 2-4 Programm für den Thermocycler.

2.1.9 Methylierungsanalyse

2.1.9.1 Bisulfitkonvertierung

2.1.9.1.1 Prinzip

Um DNA-Methylierungen identifizieren und quantifizieren zu können, müssen die entsprechenden DNA-Proben zuvor mit Natriumbisulfit behandelt werden. Hierdurch kann das Methylierungsmuster in eine messbare Veränderung der Basenabfolge übersetzt werden. Dabei werden alle unmethylierten Cytosine in Uracil umgewandelt, wohingegen methylierte Cytosine unverändert bleiben. Das bedeutet, dass alle nach der Behandlung verbliebenen Cytosinreste in der Sequenz zuvor methylierte Cytosine repräsentieren. Zu einem vernachlässigbaren Anteil wird 5-Methyl-Cytosin auch zu Thymin deaminiert. Diese Reaktion fällt jedoch nicht ins Gewicht. (Frommer, McDonald et al. 1992) Die Deaminierung von Cytosin zu Uracil erfolgt in drei Schritten:

1. Sulfonierung: Anlagerung von Bisulfit an die 5-6-Doppelbindung von Cytosin
2. Hydrolytische Desaminierung des Uracil-Bisulfit-Derivats

3. Alkalische Desulfonierung: Entfernung der Sulfonatgruppe, es entsteht Uracil (Clark, Harrison et al. 1994).

2.1.9.1.2 Durchführung

Für die Bisulfitkonvertierung wurde das EZ-DNA-Methylierungskit von Zymo Research benutzt. Eingesetzt wurden 500ng DNA mit einer Konzentration von 2µg. Zunächst wurde zu jeder DNA-Probe 5µl M-Dilution-Buffer hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben bei 37°C für 15min inkubiert.

Jeder Probe wurden 100µl Conversion-Reagenz zugefügt (vor Gebrauch wurde dieses mit 750µl Wasser und 210µl M-Dilution-Puffer vermischt) und es folgte eine Inkubation bei 95°C für 30s gefolgt von einer Inkubation bei 50°C für 15min (20 Zyklen). Danach wurden die Proben für 20min auf Eis gekühlt. Im Anschluss wurden 400µl M-Binding-Puffer in eine Zymo-Spin™ IC Säule vorgelegt und diese in ein Sammelröhrchen gestellt.

Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Proben in die Zymo-Spin™ IC Säulen gegeben und diese wurden mehrmals invertiert. Für 30s erfolgte eine Zentrifugation bei höchstmöglicher Geschwindigkeit (mind. 10,000xg). Das Filtrat im Sammelröhrchen wurde dekantiert. In jede Säule

wurde 100µl M-Wash-Puffer hinzugefügt und es folgte eine erneute Zentrifugation für 30s. Danach wurden die Säulen mit je 200µl M-Desulphonation-Puffer befüllt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15 – 20min wurden die Proben erneut für 30s zentrifugiert und das Filtrat dekantiert.

Zwei weitere Male wurde 200µl M-Wash-Puffer hinzugegeben, für 30s zentrifugiert und das Filtrat dekantiert.

Zum Schluss wurde die Säule in ein 1,5ml Röhrchen gestellt, 10µl Wasser in die Säulen Matrix gegeben und für 30s zentrifugiert um die DNA zu lösen. Die Proben wurden im Anschluss bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

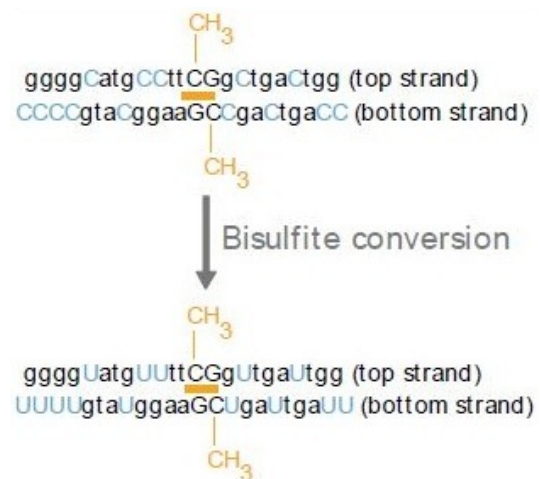


Abb. 2-2 Bisulfit-Konvertierung. Bei der Bisulfitkonvertierung werden unmethylierte Cytosine (hier blau dargestellt) durch Sulfonierung, Desaminierung und Desulfonierung in Uracil umgewandelt, wohingegen methylierte Cytosine unverändert bleiben. So kann das Methylierungsmuster in einer messbaren Veränderung der Basenabfolge übersetzt werden.

2.1.9.2 Infinium HumanMethylation27 BeadChip

Mit Hilfe dieses Arrays von Illumina Inc. kann der Methylierungsstatus von insgesamt 27.578 einzelnen CpG-Dinukleotiden, die vorwiegend in den regulierenden Bereichen (Promotoren) von mehr als 14.000 Genen liegen, bestimmt werden. (Bibikova, Lin et al. 2006)

Nach erfolgter Bisulfitkonvertierung wird eine „Whole Genome Amplification“ durchgeführt. Hierfür wird die DNA denaturiert und amplifiziert und anschließend enzymatisch fragmentiert. Dann ist sie bereit für den BeadChip.

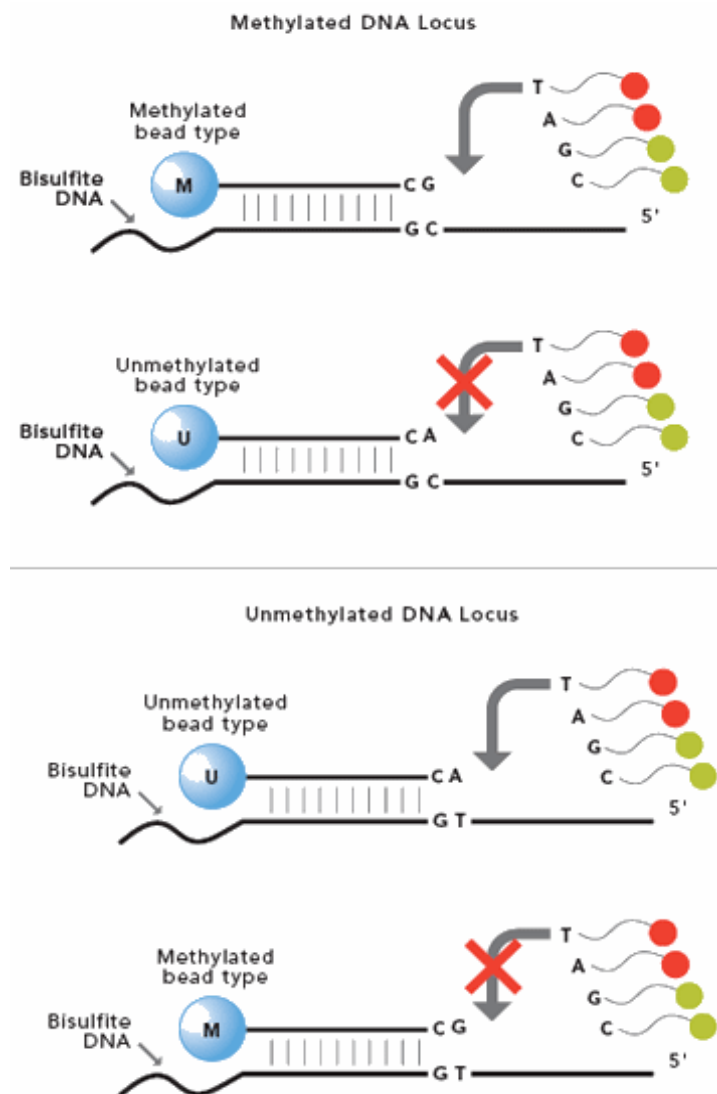


Abb. 2-3 Prinzip des HumanMethylation 27 BeadChip. Jedem Dinukleotid entsprechen zwei Beads auf dem Chip, die mittels sequenzspezifischer Oligonukleotide (50mer Primer) die DNA erkennen und binden. Dabei unterscheiden sich die beiden Primer der Beads am 3'-Ende durch eine Base (Base G – methyliertes CpG, Base A – unmethyliertes CpG). So bindet nur der M-Bead-Typ an methylierte CpG-Sites und der U-Bead-Typ an unmethylierte CpG-Sites. Bei Übereinstimmung kommt es zur Einzelbasenverlängerung mit Biotin/Dinitrophenyl-markierten ddNTPs.

Das Infinium I Assay beruht auf einer Kombination aus Sequenz-spezifischer Hybridisierung und Allel-spezifischer Einzelbasen-verlängerung. Jedem CpG-Dinukleotid entsprechen zwei Beadtypen auf der Oberfläche des Chips. Diese Beads tragen sequenzspezifische Oligonukleotide (50mer Primer), durch die die genomische DNA mittels komplementärer Basenpaarung erkannt und gebunden wird. Da sich die Primer für ein bestimmtes CpG an ihrem 3' Ende durch die Base G (methyliertes CpG) bzw. A (unmethyliertes CpG) unterscheiden, bindet der eine Primer-Typ an die methylierte CpG-Site (M-Bead-Typ) und der andere an die unmethylierte CpG-Site (U-Bead-Typ). Nur bei Übereinstimmung der Primersequenz mit der Probensequenz kommt es zu einer Einzelbasenverlängerung mit Biotin- bzw. Dinitrophenyl-markierten ddNTPs (siehe Abb. 2-

3). Nach Anfärben der hybridisierten Proben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, wird die

Platte durch den sogenannten Bead Array Reader ausgelesen. Dabei wird die Signalintensität der methylierten Beads durch die Summe aller Signale (methylierte und unmethylierte Beads) für das jeweilige CpG dividiert, das Ergebnis liegt dann zwischen Null und Eins. Null bedeutet dabei unmethyliert und Eins komplett methyliert. So ist es möglich, die Methylierung einzelner CpGs zu quantifizieren. Die weitere Auswertung erfolgte mit der speziellen Software BeadStudio.

2.1.10 RNA-Expressionsanalyse

Für die Expressionsanalyse wurden Blutproben und epidermales Gewebe entnommen und die RNA mit dem PAXgene® Blood miRNA Kit (Qiagen GmbH, Hilden) bzw. dem PAXgene Tissue RNA Kit (Qiagen GmbH, Hilden) extrahiert. Zur Überprüfung von Reinheit und Integrität der RNA wurden der Bioanalyzer 2100 (Agilent) mit dem RNA 6000 Nano Kit (Agilent) verwendet. 500ng der RNA wurden mit dem Illumina TotalPrep-96 RNA Amplification Kit (Ambion) in einer Reverse Transkriptase Reaktion zu cRNA transkribiert und mit Biotin-UTP markiert. 3000ng der cRNA wurde auf dem Illumina HumanHT-12v3 Expression Chip hybridisiert. Die Chips wurden nach Herstellerangaben gewaschen und gescannt.

2.1.10.1 RNA-Extraktion aus Vollblut:

Die Extraktion von RNA aus Vollblut erfolgte mit dem PAXgene® Blood miRNA Kit (Qiagen GmbH, Hilden). Wie im Herstellerprotokoll empfohlen wurden die Proben zunächst zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde dekantiert und das verbliebene Pellet wurde mit 4ml RNase-freiem-Wasser versetzt. Anschließend wurde alles mit einem Vortexer gemischt. Im Anschluss folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10min, 4000xg). Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 350µl BM1-Pufferlösung gelöst. Die Probe wurde in 1,5ml Röhrchen überführt, mit 300µl BM2 Puffer und 40µl Proteinase K versetzt, gemischt und bei 55°C für 10min inkubiert (Schüttel-Inkubator, 1000rpm). Anschließend wurde das Gemisch in eine PAXgene-Shredder-Säule pipettiert und in ein 2ml-Röhrchen platziert und zentrifugiert. In einem neuen 1,5ml-Röhrchen wurde das Filtrat anschließend mit 700µl Isopropanol versetzt. Aufgrund der begrenzten Füllmenge der Säulen wurde das Probengemisch danach in zwei Arbeitsschritten auf die PAXgene-Säule aufgetragen. Im ersten Vorgang trugen wir 700µl auf und setzten die Säule dann auf ein leeres Cup. Dieses zentrifugierten wir für 1min bei 8000g und wiederholten den Vorgang mit dem Rest des Gemisches. 350µl BM3-Puffer wurden hinzugegeben, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt. In einem separaten 1,5ml Röhrchen wurden 10µl DNase 1 Lösung mit 70µl RDD-Puffer vermischt. Der DNase-Mix

wurde in die PAXgene-Säule gegeben und bei 25°C für 15min inkubiert. Es folgten drei Waschgänge, zunächst mit 350µl BM3-Puffer und anschließend zwei Mal mit je 500µl BM4-Puffer. Um die Probe aus der Säule zu lösen, gaben wir 40µl BR5-Puffer auf die Säule und zentrifugierten diese für 1min bei 8000g. Diesen Vorgang wiederholten wir noch einmal. Anschließend inkubierten wir die Probe für 5min bei 65°C. Die Proben wurden im Anschluss bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.1.10.2 RNA-Extraktion aus Haut (läsional und nicht-läsional)

Die RNA-Extraktion aus Haut wurde mit dem PAXgene Tissue RNA Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Zunächst wurde das Gewebe mit dem Tissue Ruptor homogenisiert. Dafür wurde das Gewebe, zusammen mit 300µl TR1-Puffer in ein Prozessierungs-Röhrchen platziert und unter Zuhilfenahme des TissueRuptors bei höchst möglicher Geschwindigkeit innerhalb von 20-40s homogenisiert. Zu dem Lysat wurden 580µl RNase-freies-Wasser, sowie 20µl Proteinase K hinzugegeben und für 5s gevortext. Es folgte ein Inkubationsschritt für 15min bei 45°C in einem Schüttel-Inkubator bei 1400rpm. Anschließend wurde der Schüttelinkubator auf 65°C vorgewärmt. Das Lysat wurde für drei Minuten bei 20.000xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues Mikrozentrifugen-Röhrchen transferiert, dabei verbleibt das Pellet in dem Prozessierungs-Röhrchen. 450µl Ethanol absolut wurden hinzugegeben, 5s gevortext und 2s bei 1000xg zentrifugiert. 700µl der Probe wurde in eine PAXgene-RNA-MinElute-Spin-Säule überführt, diese in einem 2ml-Prozessierungs-Röhrchen platziert und alles für 1min bei 8000xg zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und der Arbeitsschritt mit den restlichen ca. 700µl der Probe unter Verwendung der gleichen MinElute-Spin-Säule und Prozessierungsröhrchens wiederholt. Die Spin-Säule wurde in ein neues 2ml Prozessierungs-Röhrchen gegeben und das vorher verwendeten Prozessierungs-Röhrchens mit Inhalt verworfen. Zu der PAXgene-RNA-MinElute-Spin-Säule wurden 350µl TR2-Puffer gegeben, für 20s bei 8000xg zentrifugiert und die Spin-Säule erneut in ein neues 2ml-Prozessierungs-Röhrchen platziert. 10µl DNase 1 Stock-Lösung wurde mit 70µl RDD-Puffer in einem 1,5ml-Mikrozentrifugen-Röhrchen mit einer Pipette vermischt und direkt in die PAXgene-RNA-MinELUTE-Spin-Säule gegeben. Es folgte ein Inkubationsschritt bei Raumtemperatur für 15min. 350µl TR2-Puffer wurden anschließend hinzupipetiert und alles für 20s bei 8000xg zentrifugiert. Die Spin-Säule wurde in eine neues 2ml-Prozessierungs-Röhrchen überführt und 500µl TR3-Puffer hinzugegeben. Erneut wurde für 20s bei 8000xg zentrifugiert und die Spin-Säule in eine neues Prozessierungs-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 500µl 80%igem Ethanol, folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 8000xg für 2min. Die Spin-Säule wurde in ein neues Prozessierungs-Röhrchen platziert und für 5min bei 20.000xg zentrifugiert. Die PAXgene

RNA-MinElute-Spin-Säule wurde in ein 1,5ml-Mikrozentrifugen-Röhrchen gestellt und mit 40µl TR4-Puffer versetzt. Um die RNA zu lösen, folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 1min bei 20.000xg. Anschließend erfolgte ein zweiter Elutionsschritt mit 40µl TR4-Puffer und 1min Zentrifugation bei 20.000xg. Das Eluat wurde für 5min in dem auf 65° vorgewärmten Schüttel-Inkubator ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurde es sofort auf Eis gekühlt. Die Proben wurden im Anschluss bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.1.10.3 Qualitätskontrolle der RNA nach Isolation

Als Qualitätskontrolle wurde die Konzentration und Integrität der RNA-Moleküle mit dem Agilent RNA 6000 Nano-Kit (Agilent Technologies, Waldbronn) am Agilent 2100 Bioanalyzer bestimmt. Hierbei werden die RNA-Moleküle mit dem RNA-LabChip nach ihrer Größe aufgespalten und die relative Menge von 18S und 28S ribosomaler RNA (rRNA) bestimmt. Bei Proben, die aus nicht-degradierter RNA in voller Länge bestehen, ist das Verhältnis von 28S zu 18S rRNA 2:1. Anschließend wird die RIN (RNA integrity number) berechnet, die Aussage über den Grad der RNA-Degradierung gibt (RIN1=komplett degradiert, RIN10=ohne Degradation) und es wird die Konzentration der Probe bestimmt.

In die Transkriptionsreaktion wurden nur Proben mit einer $RIN \geq 6$ und einer Ausbeute von insgesamt 500ng eingesetzt.

2.1.10.4 Präparation der RNA-Proben

Für eine erfolgreiche Hybridisierung auf dem HumanHT-12v3 Expressions-Chip mussten die RNA-Proben zunächst präpariert werden. Dabei wurde in einer Reverse-Transkriptase-Reaktion unter Verwendung eines T7 Oligo (dT)-Primers ein cDNA-Einzelstrang synthetisiert. Anschließend wurde die Einzelstrang-cDNA in eine Doppelstrang-cDNA konvertiert. Diese diente als Matrize für die Synthese von cRNA. Die cRNA-Proben wurden abschließend mit Biotin markiert und amplifiziert. Die biotinmarkierte RNA-Fraktion korrespondierte dabei jeweils mit der polyadenylierten (mRNA) Fraktion. Für die Präparation der RNA-Proben wurde das Illumina® TotalPrep™-96 RNA Amplification Kit (Illumina®, San Diego, CA, USA) verwendet. Dabei wurde nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Das Protokoll basierte im Wesentlichen auf vier Schritten:

1. Vorbereitung der RNA
2. cDNA Einzelstrangsynthese
3. cDNA Doppelstrangsynthese
4. In Vitro Transkription in cRNA und Markierung mit Biotin

Zunächst wurden 500ng RNA in eine PCR-Platte gegeben und mit Nuklease freiem Wasser auf 11µl aufgefüllt. Zu jeder Probe wurden 9µl Reverse-Transkriptase-Master-Mix hinzugegeben. Die Platte wurde mit Folie verschlossen und 2h bei 42°C inkubiert. Im Anschluss wurde sie auf 4°C heruntergekühlt. Zu jeder Probe wurde danach mit 80µl Second-Strand-Master-Mix vermischt und 2h bei 16°C inkubiert. Zur Reinigung der cDNA wurden die Proben mit je 180µl cDNAPure versetzt, auf eine U-Bottom-Platte überführt und 2min geschüttelt. Während dieses Vorgangs binden die magnetischen Beads im cDNAPure an die cDNA-Proben. Für 5min wurde die U-Bottom Platte anschließend in ein Magnetfeld eingebracht, wodurch die magnetischen Beads Pellets bilden. Der Überstand wurde abpipettiert. Zum Waschen der Proben wurden außerhalb des magnetischen Feldes 150µl cDNA-Waschpuffer zu jeder Probe gegeben und für 1min geschüttelt. Im Anschluss wurde die U-Bottom-Platte erneut in das Magnetfeld gestellt und der Überstand nach 5min abpipettiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt. Um die cDNA von den magnetischen Beads zu lösen, wurden die Proben mit 20µl vorgewärmten (50°C) Nuklease-freiem-Wasser versetzt. Nach einem 3-minütigem Schüttelvorgang wurde die U-Bottom-Platte erneut in das Magnetfeld eingebracht, bis alle magnetischen Beads entfernt und das Wasser transparent war. 17,5µl cDNA wurden jeweils auf eine neue PCR-Platte aufgetragen. Jeder Probe wurden 7,5µl In-Vitro-Transkriptions-Master-Mix (enthält biotinmarkiertes UTP) zugesetzt, gefolgt von 10h Inkubation bei 37°C. Zur Reinigung der cRNA wurden 70µl Binding-Mix und 95µl Ethanol hinzugegeben und schließlich das Gemisch auf eine U-Bottom-Platte transferiert und für 2min geschüttelt. Erneut wurde sie in ein Magnetfeld eingebracht und der Überstand abpipettiert. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 100µl cRNA Waschlösung. Zum Abschluss wurde die cRNA mit 40-100µl vorgeheiztem (50°C) cRNA-Elutionspuffer gelöst und mit dem NanoDrop quantifiziert.

2.1.10.5 HumanHT 12v3 Expression BeadChip

Das Hybridisieren erfolgte nach dem Whole-Genome Gene Expression Direct Hybridization Assay System der Firma Illumina® (San Diego, CA, USA). Dieses System beruht auf dem Prinzip der „direkten Hybridisierung“. Genspezifische Proben werden dabei benutzt um die markierten RNAs zu detektieren. Hierfür wurde der HumanHT 12v3 Expression BeadChip verwendet (Illumina, San Diego, CA, USA). Dieser Chip besteht aus 12 Arrays mit jeweils mehr als 48000 Transkripten. Die Hybridisierung fand unter Rotation für 16h bei 58°C im Hybridisierungsofen der Firma Illumina® statt. Nach der Hybridisierung wurden ungebundene cRNA abgewaschen. Danach wurde Streptavidin-Cy3 hinzugegeben, welches an das Biotin der hybridisierten cRNA band und so die cRNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (FluoroLink® Cy3, GE Bioscience) markierte. Der Bead-Chip wurde zur Elimination

nicht gebundener cRNAs erneut gewaschen und getrocknet. Anschließend konnte das Fluoreszenzsignal mit dem Illumina Bead Array Reader gescannt werden. Zur Auswertung wurde die BeadStudio Application Software von Illumina verwendet.

2.1.11 Statistische Analyse

Für die Datenaufbereitung und Normalisierung der Rohdaten des Methylierungsexperiments wurden R (v2.14.1) (Team 2011) und das Bioconductor Package Lumi (Davis, Du et al. 2013) (Du, Kibbe et al. 2008) verwendet. Die Qualität der Rohdaten wurde mittels MDS-Plot beurteilt, wobei sich die Proben nach Geschlecht und Gewebsart gruppieren sollten. Proben mit einem Detection-p-Wert $>0,02$ wurden ausgeschlossen, da das Signal vom Rauschen nicht unterscheidbar ist. Die Rohdaten wurden anschließend in drei Schritten mit Hilfe des Lumi-Package normalisiert. Innerhalb jedes Arrays (Chips) wurden die Messsignale um den Color-Bias adjustiert ("lumiMethyC") und das Hintergrundrauschen rausgerechnet ("lumiMethyB"). Um die Arrayeffekte zu eliminieren wurde eine Quantilnormalisierung über alle Arrays hinweg durchgeführt ("lumiMethyN"). Die β -Werte repräsentieren das Verhältnis der Intensität des methylierten Bead-Typs zur Gesamtintensität des Lokus und sind intuitiv interpretierbar. Sie spiegeln die Methylierung in Prozent wieder und werden für die deskriptive Beschreibung der Ergebnisse verwendet. Die \log_2 -Transformation des Intensitätsverhältnis von methyliert zu unmethyliert werden als M-Werte bezeichnet und für die statistischen Analysen verwendet. Grund hierfür ist deren Homoskedastizität auf dem gesamten Wertebereich. (Du, Kibbe et al. 2008)

$$\beta = \frac{I_{meth}}{I_{meth} + I_{unmeth}}$$
$$M = \log_2 \left(\frac{I_{meth}}{I_{unmeth}} \right)$$

Zusätzlich verwendeten wir zwei Standard-gDNA von einer Kontrollprobe (Blut und Haut) um die Reliabilität des Experiments bewerten zu können. Die Korrelation über alle CpGs war $>0,98$. M-Werte und β -Werte von Replikatsmessungen wurden gemittelt.

Für die differentielle Methylierung zwischen Fällen und Kontrollen wurde der nichtparametrische Permutationstest (Brunner und Munzel 2000) (Neubert 2007) verwendet, der im Parcomp-Package implementiert ist. (Konietschke 2011)

Alle p-Werte wurden für das Multiple-Testing mittels der False-Discovery-Rate-Methode (FDR) adjustiert. (Benjamini und Hochberg 1995)

Für die Expressionsanalyse wurden die Rohdaten von der Illumina Software “GenomeStudio” nach R exportiert. Die Daten wurden über die Arrays hinweg mit Hilfe des Lumi-Package quantilsnormalisiert und anschließend logarithmisiert. (Du, Kibbe et al. 2008) Wir testeten mit Hilfe des Welch-Tests (t-Test für ungleiche Varianten) auf Unterschiede in der Expression zwischen Fällen und Kontrollen.

2.2 Material

2.2.1 Geräte und Hilfsmittel

2.2.1.1 Zentrifugen

Sigma 4K15C
Rotanta 46 RS
Mikrozentrifuge
Zentrifuge 5417R

Sigma Labor Zentrifugen, Osterode
Hettich, Tuttlingen
NeoLab, Heidelberg
Eppendorf AG, Hamburg

2.2.1.2 Dokumentationssysteme

UVT-40 M Transilluminator
E.A.S.Y. 429 K Camera

Herolab, Wiesloch
Herolab, Wiesloch

2.2.1.3 Apparatur

Bio-Rad Power Pac 300/3000

BIO-RAD Laboratories, München

2.2.1.4 Gel-Ablage

Sub-Cell GT Systems

BIO-RAD Laboratories, München

2.2.1.5 Weitere Geräte

Eismaschine AF30

Scotsman, Mailand, Italien

Mikrowelle Micromaxx

Medion AG, Essen

PCR Cycler

DNA Engine DYAD™

MJ Research, South San Francisco, USA

DNA Engine Tetrad

MJ Research, South San Francisco, USA

2.2.1.6 Pipettierroboter

Multimek 96 Automatisierter 96-Kanal

Beckman Coulter, Fullerton, USA

Pipettierer

Temo

Tecan, Crailsheim

Genesis RSP 150 Work Station

Tecan, Crailsheim

Aquarius

Tecan, Crailsheim

Schüttler Roto-Shake Genie

Scientific Industries, New York, USA

Vortex MS2 Minishaker

IKA-Labortechnik, Staufen

AutoMACS Separator

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Agilent Bioanalyzer

Agilent Technologies, Waldbronn

Hybridisierungsofen

Illumina®, San Diego, CA, USA

Bead Array Reader

Illumina®, San Diego, CA, USA

BeadStudio Application

Illumina®, San Diego, CA, USA

2.2.2 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Kits

2.2.2.1 CD4+ T-Zell-/B-Zell-Isolation

Ficoll-Paque	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS CD4+ T Cell Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS B Cell Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS Puffer für AutoMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.2.2.2 DNA-Extraktion

QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
RBC-Lysis-Puffer (pH 7.4)	NH ₄ Cl (155mM) KHCO ₃ (20mM) Na ₂ EDTA (0.1mM)
SE-Puffer (pH 8.0)	NaCl (75mM) Na ₂ EDTA (25mM)
NaCl-Lösung (saturiert)	NaCl (~6 M)
TE-Puffer (pH 8.0)	Tris/HCl (10mM) EDTA (1mM)
SDS-Lösung	SDS (20%)

2.2.2.3 RNA-Extraktion

PAXgene® blood miRNA Kit	Qiagen GmbH, Hilden
PAXgene® tissue RNA Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Waldbronn

2.2.2.4 RNA-Präparation und Chip

Whole-Genome Gene Expression Direct Hybridization Assay System	Illumina®, San Diego, CA, USA
Ambion Illumina® TotalPrep™-96 RNA Amplification Kit	Illumina®, San Diego, CA, USA
HumanHT-12v3 Expression Bead Chip	Illumina®, San Diego, CA, USA
Fluoreszenzfarbstoff Cy3	FluoroLink® Cy3, GE Bioscience

2.2.2.5 DNA-Qualitätsgel

6x färbender Auftragspuffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Agarose Ultra Pure	GibcoBRL, Eggenstein
DNA-Agarose	Biozym, Oldendorf
Ethidiumbromid	Biomol, Hamburg

Gene Ruler 100 bp DNA-Ladder Plus
Tris-Borate-EDTA Puffer (TBE)

MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Sigma-Aldrich, Osterode

2.2.2.6 Amelogenin-PCR

dNTP mix (2 mM)

Qiagen GmbH, Hilden

MgCl₂ (25 mM)

Qiagen GmbH, Hilden

PCR-Puffer mit MgCl₂ (10x)

Qiagen GmbH, Hilden

2.2.2.7 Bisulfit-Konvertierung

EZ-96 DNA Methylation KitTM

Zymo Research Corp., Orange, USA

Enthält:

CT Conversion-Reagenz

M-Dilution-Puffer

M-Binding-Puffer

M-Wash-Puffer

M-Desulphonation-Puffer

M-Elution-Puffer

2.2.3 Enzyme

HotStar Taq DNA Polymerase

Qiagen GmbH, Hilden

Proteinase K

Merck, Darmstadt

Primer, insgesamt

Metabion, Martinsried

3 Ergebnisse

3.1 Unterschiede zwischen Vollblut, B-Zellen, T-Zellen und Epidermis hinsichtlich der DNA-Methylierung

Für die meisten epigenetischen Studien wurde bisher DNA aus Vollblut zur Untersuchung der DNA-Methylierung herangezogen. Es gibt jedoch Hinweise in der Literatur, dass sich die verschiedenen Gewebetypen im Methylierungsmuster unterscheiden. (Eckhardt, Lewin et al. 2006) Da in der Pathogenese der atopischen Dermatitis neben der Haut als betroffenem Organ, B-Zellen und T-Zellen eine wichtige Rolle spielen, wurden diese Gewebetypen neben Vollblut zur Analyse herangezogen. Zunächst wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) der CpGs von Chromosom 1-22 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Proben von Haut (Epidermis), Vollblut, T-Zellen und B-Zellen jeweils Gruppen bildeten. So wiesen die DNA-Proben der verschiedenen Probanden aus Haut einen ähnlichen Methylierungsgrad auf, ebenso wie die Proben aus Vollblut, aus T-Zellen und aus B-Zellen. Dabei zeigt sich vor allem ein großer Unterschied der Methylierungsmuster von Haut und dem der übrigen Blutzellen (siehe Abb. 3-1). Dies unterstreicht, dass gewebsspezifische Unterschiede im Methylierungsmuster existieren und zeigt, dass sich die Epidermis in dieser Hinsicht deutlich von Blutzellen unterscheidet.

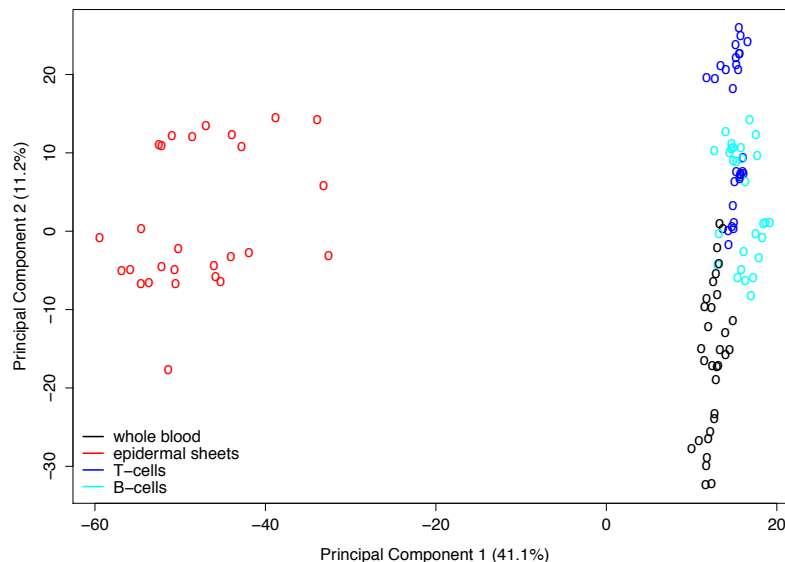


Abb. 3-1 Hauptkomponentenanalyse der CpGs von Chromosom 1-22. Zu sehen ist ein deutlicher Unterschied zwischen dem allgemeinen Methylierungsgrad der Haut (rot), sowie den übrigen Blutzellen, die untereinander ebenfalls Gruppen bilden und somit einen unterschiedlichen Methylierungsgrad aufweisen (Vollblut = schwarz, B-Zellen = hellblau, T-Zellen = dunkelblau)

Um weitere Aussagen über die Gewebsspezifität der DNA-Methylierung treffen zu können, wurden die inter- und intraindividuellen Unterschiede näher betrachtet. Wie in Abb. 3-2 zu sehen, weisen gleiche Gewebe in verschiedenen Individuen nur geringe Unterschiede auf.

Intraindividuell zeigt sich, dass die verschiedenen Gewebe in ein und demselben Individuum große Unterschiede aufweisen (siehe Abb. 3-3). Dabei zeigen sich die größten Differenzen zwischen den verschiedenen Blutzellen und der Epidermis. Auf genomweiter Ebene ist das DNA-Methylierungsmuster demnach wenig individuenspezifisch, aber deutlich gewebsspezifisch.

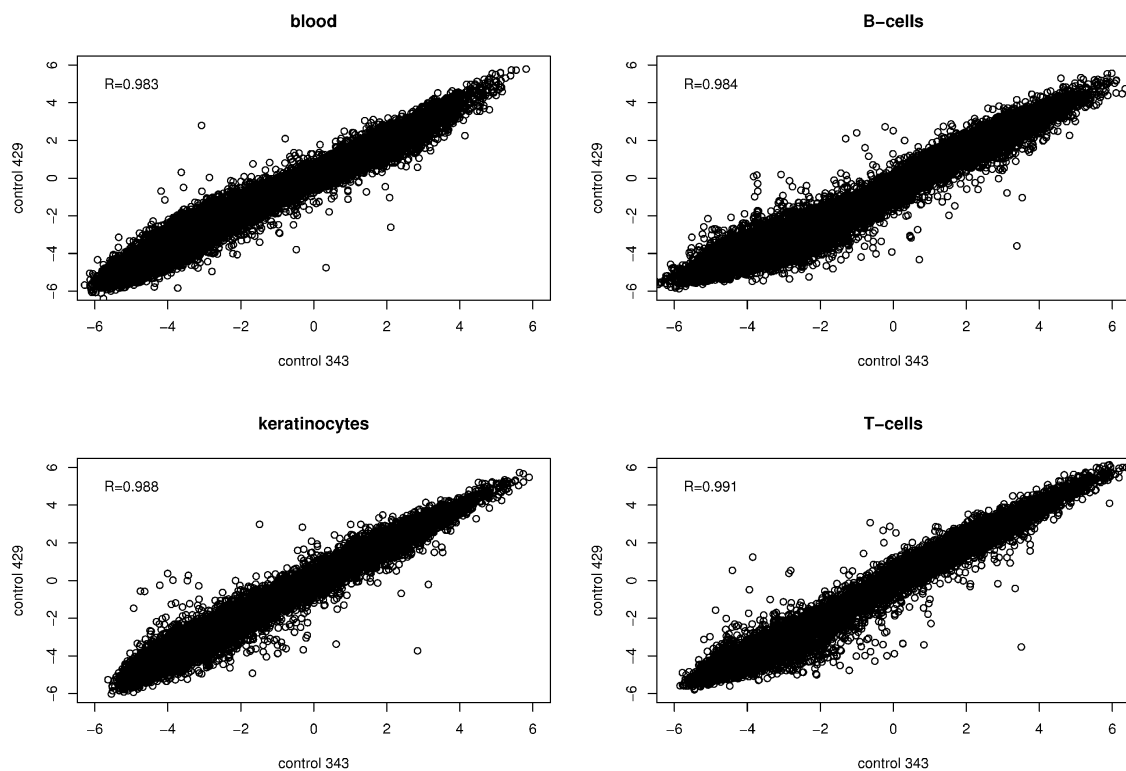


Abb. 3-2 Interindividuelle Unterschiede der DNA-Methylierung. Korrelation von zwei Kontrollen gleichen Alters und Geschlechts in peripherem Blut, B-Zellen, T-Zellen und Keratinozyten.

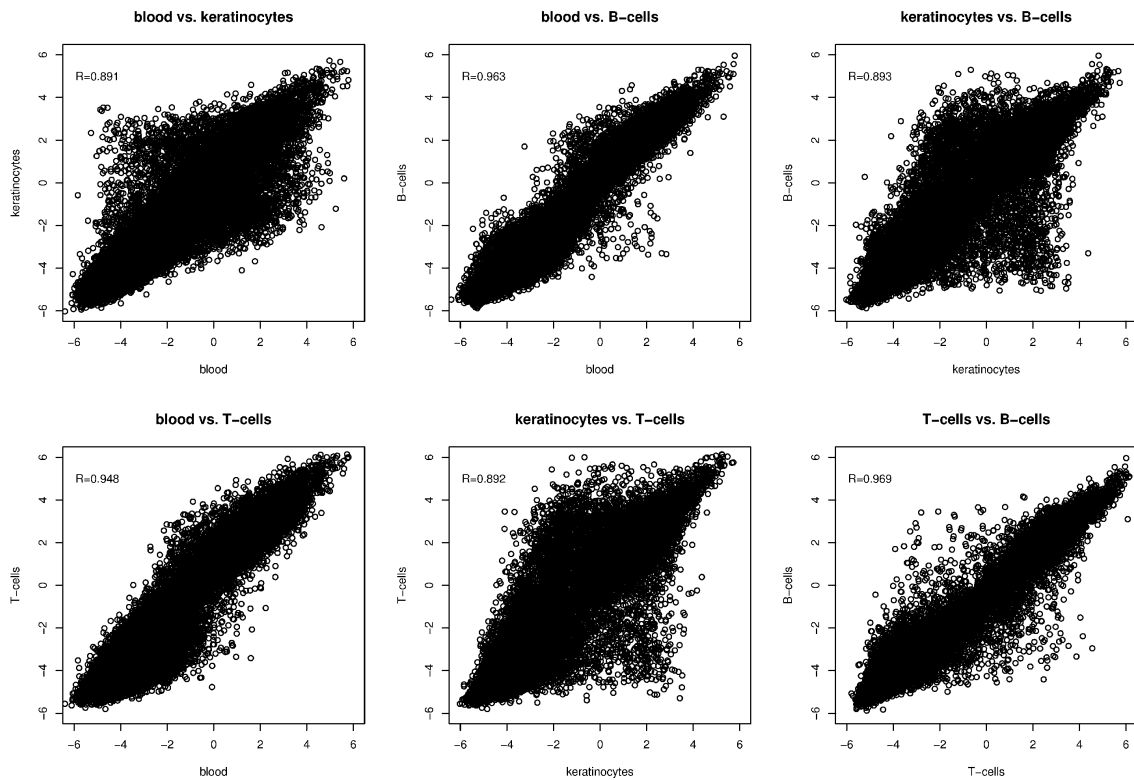


Abb. 3-3 Intraindividuelle Unterschiede der DNA-Methylierung. Korrelation der verschiedenen Gewebetypen bei einer männlichen Kontrolle.

3.2 Unterschiede des DNA-Methylierungsmusters bei Patienten mit atopischer Dermatitis und gesunden Kontrollen

In der genomweiten Methylierungsanalyse der verschiedenen Zelltypen waren die größten Unterschiede zwischen Fällen und Kontrollen in der aus epidermalen sheets gewonnenen DNA zu finden. Bei den verschiedenen Blutzellen gab es dagegen keine signifikanten Unterschiede im globalen Methylierungsmuster. Deshalb wurde der Fokus der weiteren Analysen auf die Unterschiede in der DNA aus Haut gelegt. Bei läSIONALER Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis und gesunder Haut der Kontrollen wurden 11 CpGs gefunden, die sich nach Korrektur für multiples Testen signifikant im Methylierungsgrad voneinander unterschieden. Hierbei galt als Einschlusskriterium eine False Discovery Rate (FDR) von $<0,01$, eine $\geq 2,5$ fache Veränderung im Methylierungsgrad (Unterschied im M-Wert $>0,1322$) und ein Unterschied im β -Wert von $\geq 0,1$ (siehe Tabelle 3-1). Ein hierarchisches Clustering der 11 signifikant assoziierten CpGs in Form einer Heat Map zeigt eine deutliche Trennung von Fällen und Kontrollen (siehe Abb. 3-4). Wie in Abb. 3-4 zu sehen, kamen bei den Fällen sowohl hypermethylierte als auch hypomethylierte CpGs vor. Keines der 11 unterschiedlich methylierten CpGs lag in bekannten Risikogenen für atopische Dermatitis. Jedoch waren

Gene betroffen, die mit Psoriasis assoziiert sind. (Guttmann-Yassky, Suarez-Farinas et al. 2009)

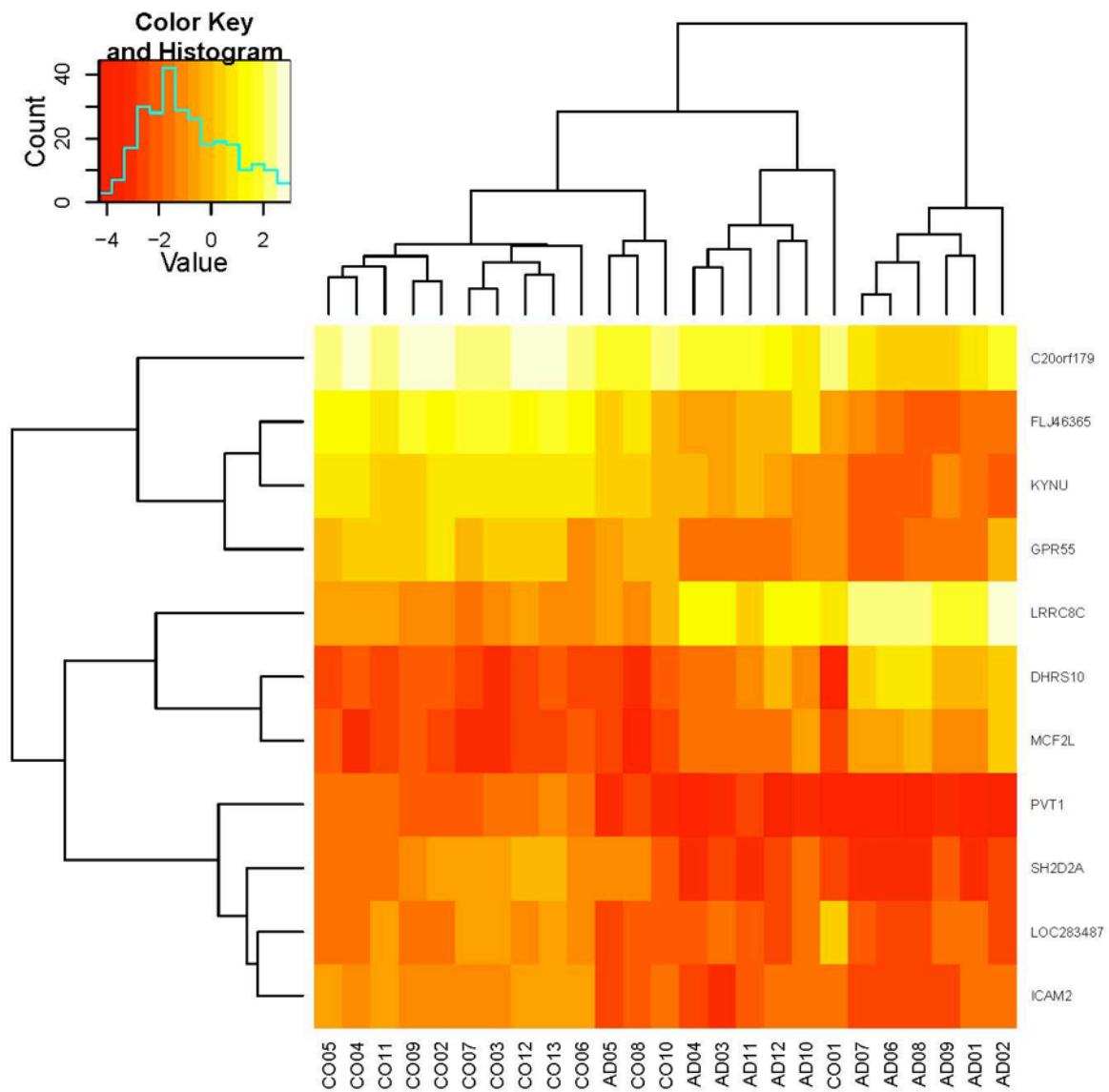


Abb. 3-4 Heat Map des Methylierungsstatus. Zu sehen sind die unterschiedlichen CpGs (y-Achse) und die Fälle (AD) und Kontrollen (CO) auf der x-Achse. Gelb=Hypermethylierung, Rot= Hypomethylierung.

CpG	CHR	CpG-Lokalisation	FDR Brunner perm. Test	med. diff(M)	med. diff(β)	Fälle vs. Kontrollen
cg06641366	1	LRRC8C	2.43E-18	2.684	0.438	erhöht
cg20839149	1	SH2D2A	2.43E-18	1.48	0.163	vermindert
cg06131859	2	KYNU	2.43E-18	1.823	0.311	vermindert
cg20287234	2	GPR55	2.43E-18	1.677	0.269	vermindert
cg13784855	8	PVT1	2.43E-18	1.639	0.136	vermindert
cg25538571	8	FLJ46365	2.43E-18	2.112	0.353	vermindert
cg11668844	13	MCF2L	2.43E-18	1.598	0.184	erhöht
cg22131172	13	LOC283487	2.43E-18	1.334	0.17	vermindert
cg10275770	17	ICAM2	2.43E-18	1.536	0.188	vermindert
cg26267310	19	DHRS10	2.43E-18	2.405	0.336	erhöht
cg03387497	20	C20orf179	2.43E-18	1.457	0.18	vermindert

Tabelle 3-1 Differenziell methylierte CpGs bei Patienten mit atopischer Dermatitis und gesunden Kontrollen. Zu sehen sind die CpGs, die bei Patienten mit atopischer Dermatitis (läsionale Haut) und gesunden Kontrollen (gesunde Haut) einen unterschiedlichen Methylierungsstatus aufwiesen. FDR cutoff =0.01 (Unter Verwendung des Brunnerschen nicht parametrischen Permutationstest), ein Unterschied von $\geq 2,5$ fach im Methylierungsstatus zwischen Patienten und Kontrollen und ein Unterschied im β -Wert von 0.1.

3.3 Unterschiede der mRNA-Expression bei Patienten mit atopischer Dermatitis und gesunden Kontrollen

Um zu analysieren ob die Veränderung im Methylierungsgrad auch mit einer Veränderung in der Expression der assoziierten Gene einhergeht, wurde eine genomweite Expressionsanalyse durchgeführt. Hierfür wurde neben Vollblut auch gesunde Haut der Kontrollen mit läsionaler und nicht-läsionaler Haut der Patienten verglichen. Die größten Unterschiede in der Expression stellten sich zwischen läsionaler Haut der Patienten mit atopischer Dermatitis und gesunder Haut der Kontrollen dar. In der Expressionsanalyse wurden 23 Transkripte gefunden, die sich in Bezug auf die Expression signifikant bei Patienten (läsionale Haut) und Kontrollen unterschieden. Ein hierarchisches Clustering der 23 signifikant assoziierten Transkripte, dargestellt als Heat Map in Abb. 3-5, zeigt auch hier eine deutliche Klassifizierung von Fällen und Kontrollen. Hierbei kann man verschiedene Gruppen von Transkripten abgrenzen. So sind viele der Transkripte, gemäß der Gene Ontology Datenbank, an der epidermalen Differenzierung (KRT16, KRT6A, KRT6B.1, SPRR2B, SPRR1A), Verhornung (LCE3D, LCE3E), Zellkommunikation (GJB6, IL1F9), Antigenpräsentation (CD36.1), chronischen Entzündung (S100A9) und Apoptose (IFI27, CD36.1) beteiligt. Bei den Patienten mit atopischer Dermatitis waren sowohl eine vermehrte, als auch eine verminderte Expression zu finden, wobei die gesteigerte Expression bei den meisten Transkripten überwog (siehe Abb. 3-5). Allerdings gab es keine Übereinstimmung zwischen den 23 unterschiedlich exprimierten Transkripten der Expressionsanalyse und den 11 unterschiedlich methylierten CpGs der Methylierungsanalyse.

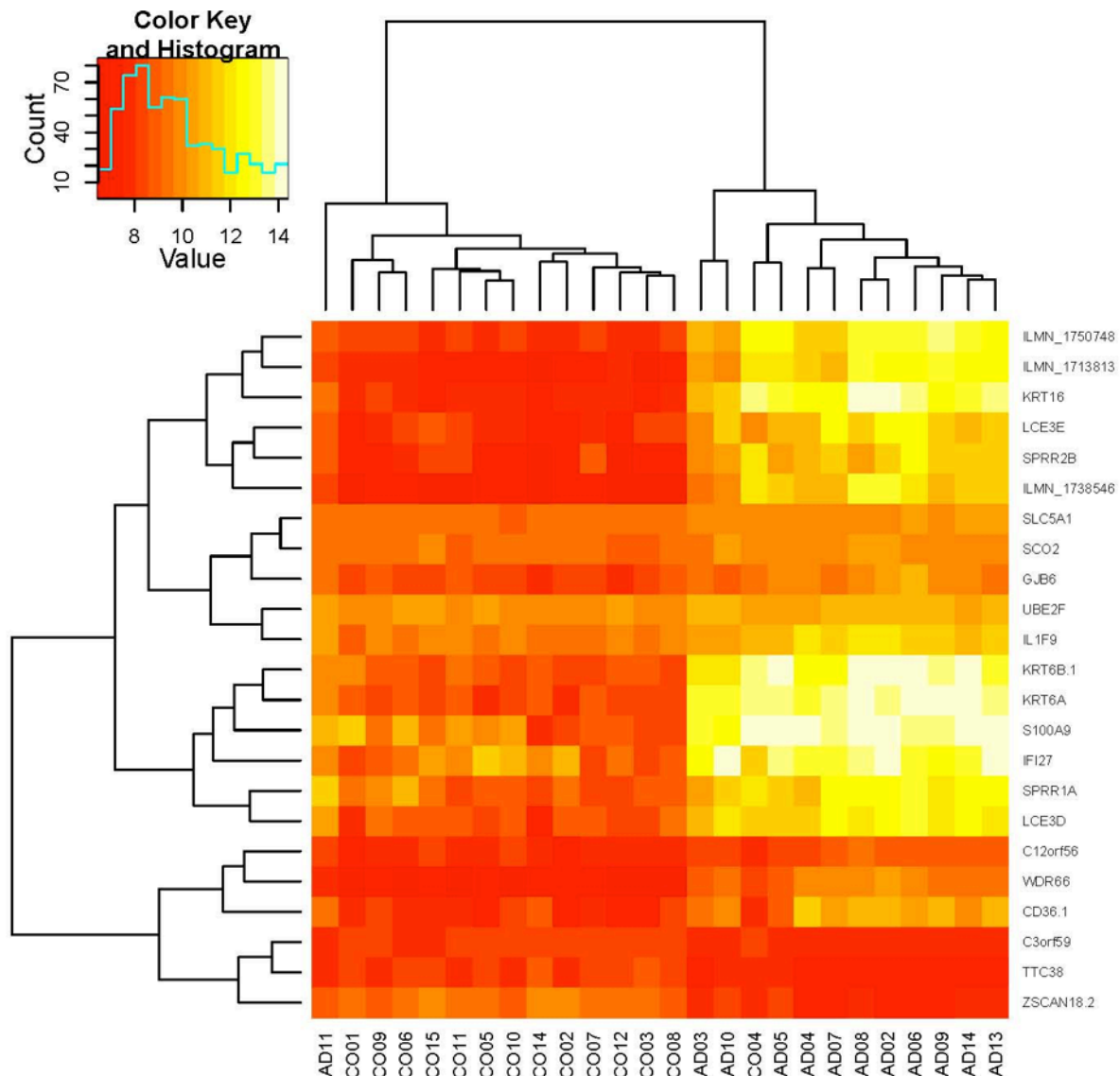


Abb. 3-5 Heat Map, Expression. Zu sehen sind die 23 Transkripte auf der y-Achse und die Fälle (AD) und Kontrollen (CO) auf der x-Achse. $P < 1e-6$. Gelb=vermehrte Expression, Rot=verminderte Expression

3.4 Funktionale Integration von Genexpression und Methylierungsstatus

Von allen Probanden konnten Daten zum DNA-Methylierungsstatus und zur Genexpression gewonnen werden. Um differentiell methylierte CpGs zu finden, die mit einer veränderten Expression der in der Umgebung liegenden Gene korrelieren, wurden die Daten von Methylierung und Expression integriert. In die Analyse eingeschlossen wurden ausschließlich CpGs mit einer $FDR < 0,05$ und einem Methylierungsunterschied von mindestens 10%, und Transkripte mit einer $FDR < 0,05$ und einer maximalen Entfernung von 50kb zur entsprechenden CpG site (cis Regulation). Ein Unterschied im Methylierungsgrad wurde erneut nur in den Hautproben gefunden. Bei der Funktionalen Integration wurden 12 unterschiedlich methylierte CpGs gefunden, die auch eine veränderte Expression im assoziierten Gen aufwiesen (siehe Tabelle 3-1). Die stärkste Korrelation zwischen

Methylierung und Expression in Fällen und Kontrollen wurden für IFI27 nachgewiesen. So zeigte sich eine negative Korrelation von Methylierung und Expression. Bei Patienten mit atopischer Dermatitis war IFI27 hypomethyliert und wurde verstärkt exprimiert, während gesunde Kontrollen einen höheren Methylierungsgrad in Verbindung mit einer erniedrigten Expression von IFI27 zeigten.

CpG-Lokalisation	CHR	Methylierung						Expression				r*
		CpG-ID	med. diff(β)	P-Wert	FDR	Meth.-Grad Fälle vs. Kontrollen	Proben-ID	Transkript	P-Wert	FDR		
NTRK1	1	cg00626119	0.114	1.00E-20	2.43E-18	vermindert	ILMN_1917198	NTRK1	3.17E-04	0.0403	0.547	
S100A9	1	cg07039113	0.096	2.00E-04	0.0301	vermindert	ILMN_1750974	S100A9	5.83E-07	0.0015	-0.529	
FHL2	2	cg10635061	0.216	4.00E-04	0.0477	erhöht	ILMN_2355831	FHL2	8.16E-05	0.0199	0.413	
C10orf99	10	cg04126866	0.166	2.00E-04	0.0301	vermindert	ILMN_1802192	C10orf99	5.51E-06	0.0047	-0.678	
CCND1	11	cg06539449	0.154	1.00E-20	2.43E-18	erhöht	ILMN_1688480	CCND1	9.13E-06	0.0060	-0.645	
KRT6C	12	cg00213044	0.120	1.00E-20	2.43E-18	vermindert	ILMN_1754576	KRT6C	2.07E-06	0.0027	-0.679	
OAS2	12	cg20870559	0.237	2.00E-04	0.0301	vermindert	ILMN_1674063	OAS2.3	2.19E-06	0.0027	-0.681	
IFI27	14	cg20161089	0.284	2.00E-04	0.0301	vermindert	ILMN_2058782	IFI27	7.75E-08	0.0006	-0.739	
KIAA1199	15	cg20828084	0.102	1.00E-20	2.43E-18	vermindert	ILMN_1813704	KIAA1199	2.60E-04	0.0372	-0.432	
SERPINB3	18	cg10533434	0.164	1.00E-20	2.43E-18	vermindert	ILMN_1703855	SERPINB3	1.26E-05	0.0067	-0.522	
SERPINB3.1	18	cg10533434	0.164	1.00E-20	2.43E-18	vermindert	ILMN_2120222	SERPINB3.1	2.61E-04	0.0372	-0.396	
FCGBP.1	19	cg19103704	0.133	2.00E-04	0.0301	vermindert	ILMN_2302757	FCGBP.1	3.39E-05	0.0121	0.518	

Tabelle 3-2

Korrelation zwischen CpG-Methylierung und mRNA-Expression. $FDR_{meth} < 0.05$ & $FDR_{express} < 0.05$ & β -Wert ≥ 0.1 . *Korrelationskoeffizient (Spearman).

Viele der Gene spielen eine Rolle bei der epidermalen Zelldifferenzierung und dem Zellwachstum (siehe Tabelle 3-3).

Symbol	Funktion
CCND1	Zellzyklusregulation
NTRK1, S100A9, OAS2, FHL2	Zelldifferenzierung
OAS2, IFI27	Zellwachstum, Apoptose
KRT6C	Aufrechterhaltung der Hautbarriere
FCGBP	Fc-Fragment des IgG-Bindeproteins
S100A9	Chronische Entzündung
SERPINB3	Proteolyse
OAS2	Immunantwort
KIAA1199, C10orf99	Funktion unbekannt

Tabelle 3-3 Funktion der Gene mit differentiell veränderter DNA-Methylierung und Genexpression. Funktion gemäß Gene Ontology Biological Process.

Es waren sowohl negative, als auch positive Korrelationen zu erkennen. So ging bei S100A9, IFI27, C10orf99, KRT6C, OAS2, KIAA1199 und SERPINB eine Hypomethylierung mit erhöhter Expression einher. Bei NTRK1 und FCGBP, sowie FHL2 korrelierte eine Hypomethylierung mit einer verminderten Expression der Transkripte und für CCND1 konnte eine Korrelation von Hypermethylierung und verminderter Expression gezeigt werden. Auf folgenden Abbildungen ist die Korrelation von Methylierungsgrad (M-value) und korrespondierender Expression bei Fällen und Kontrollen zu sehen. Auf der x-Achse ist das M-value aufgetragen, je höher der Wert des M-value, desto stärker ist das entsprechende CpG methyliert. Auf der y-Achse ist das Expressionslevel aufgetragen.

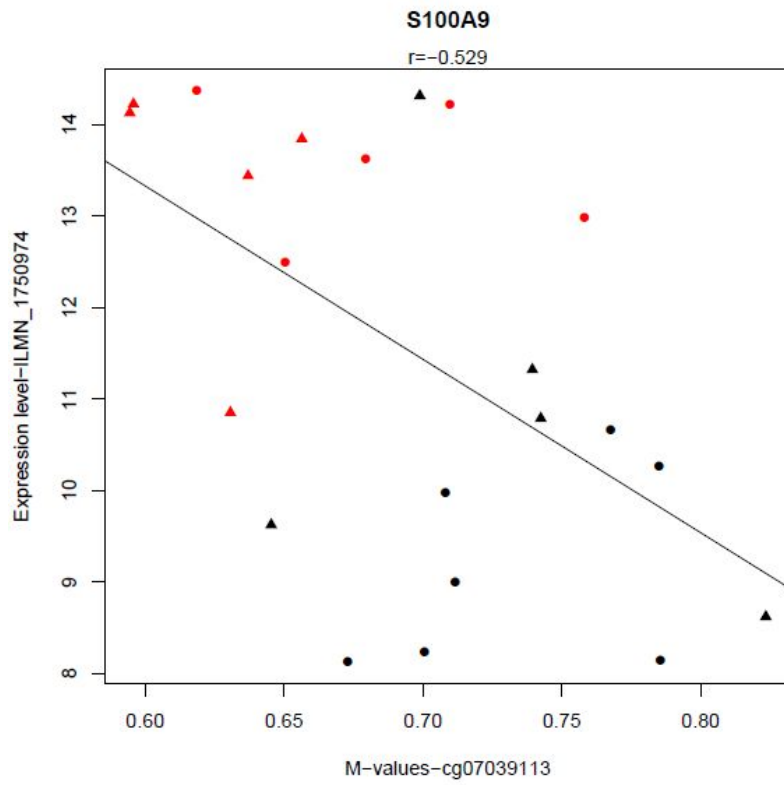


Abb. 3-6 Korrelation DNA-Methylierung und Genexpression für S100A9. ●▲ Fälle ●▲ Kontrollen

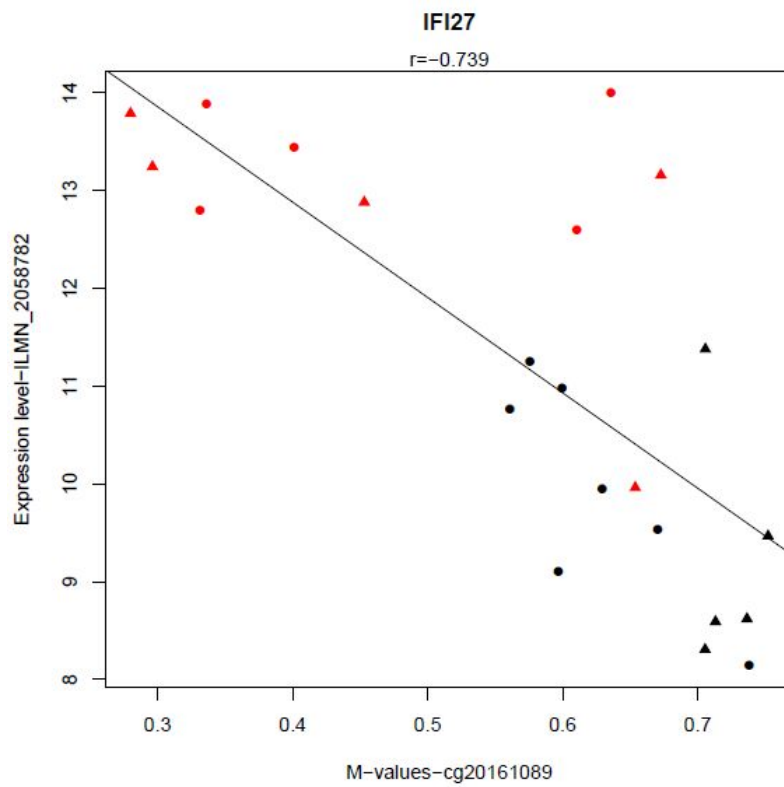


Abb. 3-7 Korrelation DNA-Methylierung und Genexpression für IFI27. ●▲ Fälle ●▲ Kontrollen

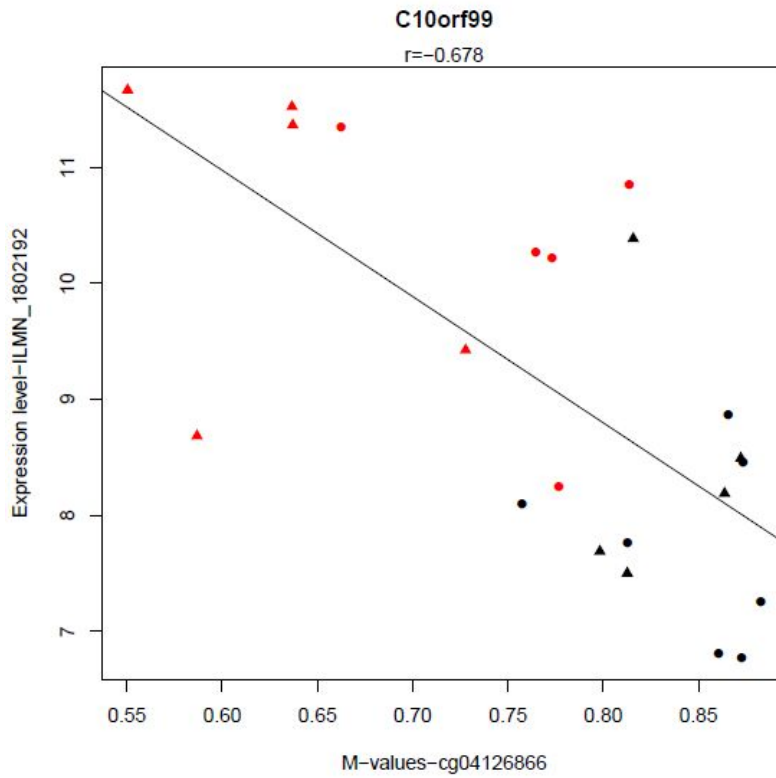


Abb. 3-8 Korrelation DNA-Methylierung und Genexpression für C10orf99. ●▲ Fälle ●▲ Kontrollen

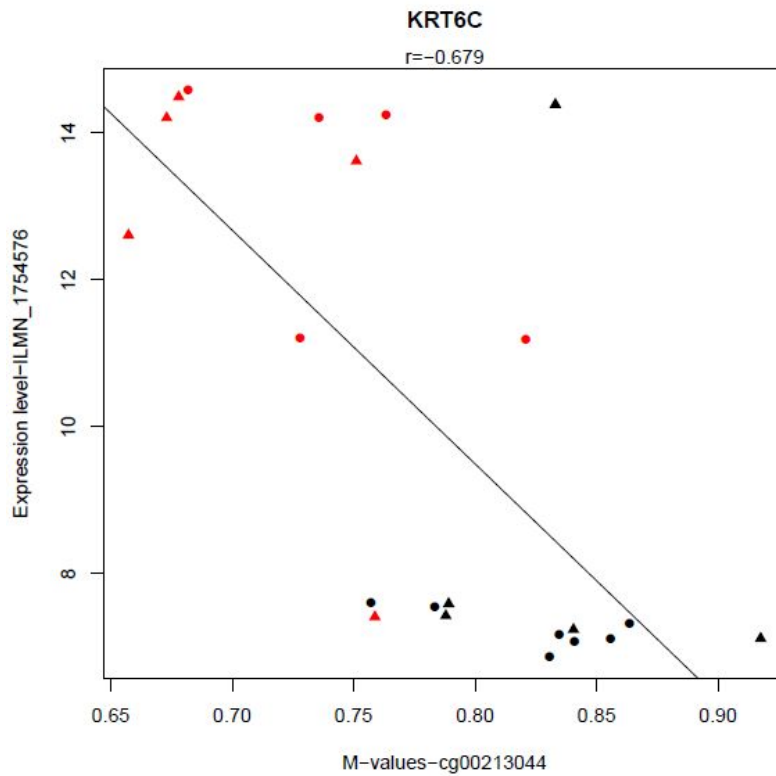


Abb. 3-9 Korrelation DNA-Methylierung und Genexpression für KRT6C. ●▲ Fälle ●▲ Kontrollen

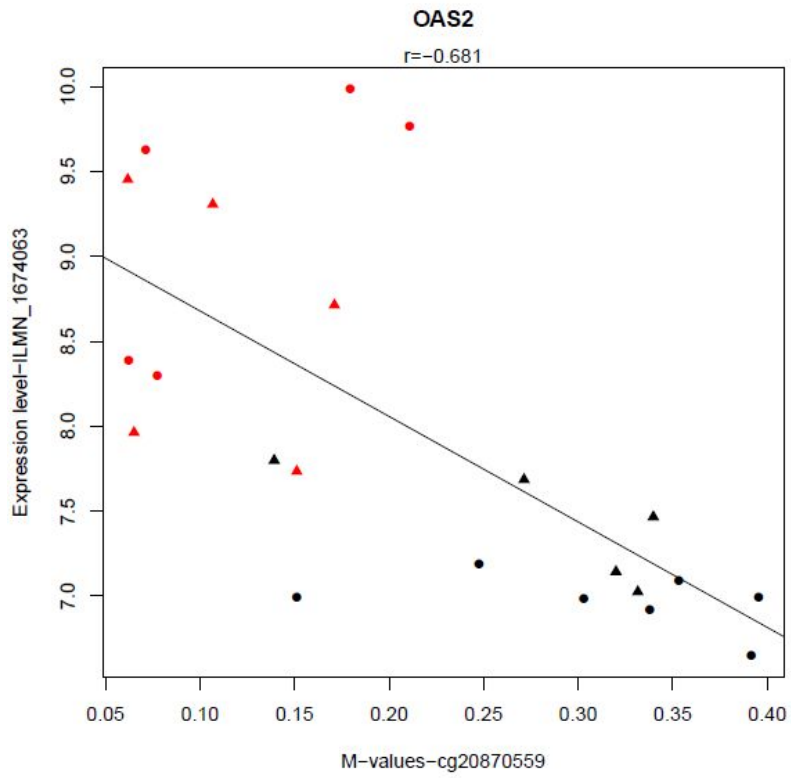


Abb. 3-10 Korrelation DNA-Methylierung und Genexpression für OAS2. ●▲ Fälle ●▲ Kontrollen

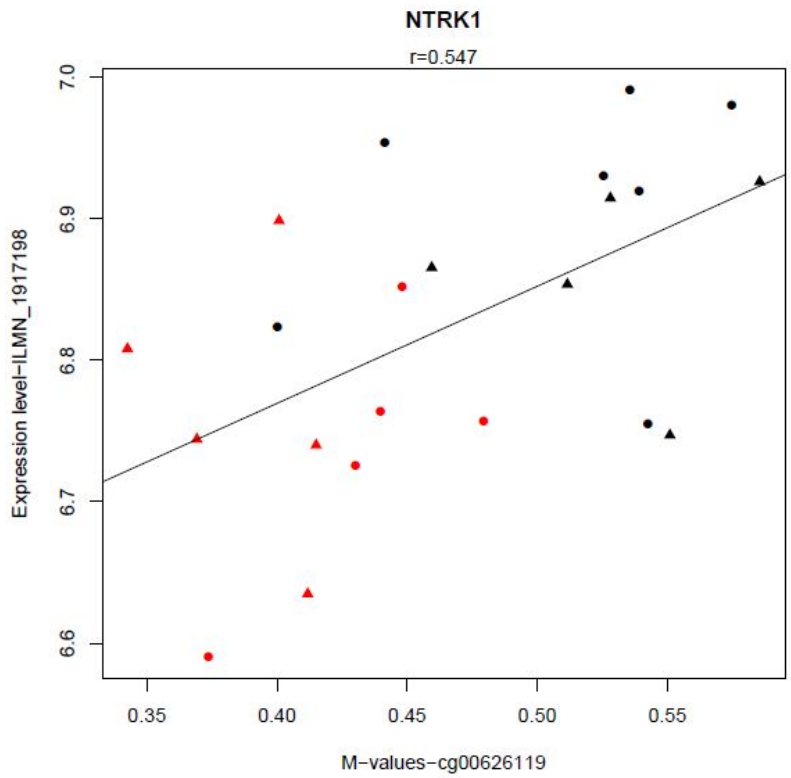


Abb. 3-11 Korrelation DNA-Methylierung und Genexpression für NTRK1. ●▲ Fälle ●▲ Kontrollen

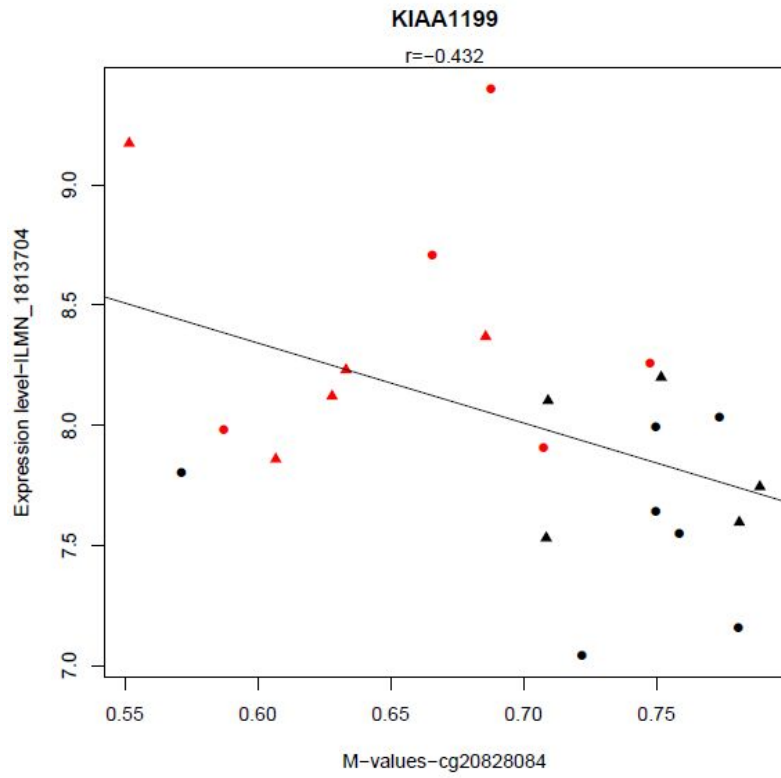


Abb. 3-12 Korrelation DNA-Methylierung und Genexpression für KIAA1199. ●▲ Fälle ●▲ Kontrollen

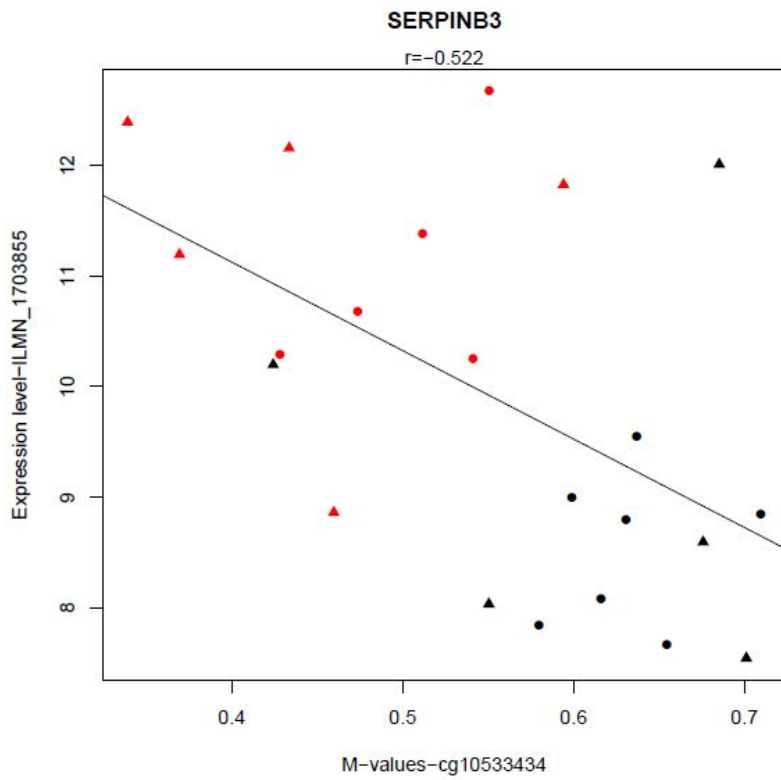


Abb. 3-13 Korrelation DNA-Methylierung und Genexpression für SERPINB3. ●▲ Fälle ●▲ Kontrollen

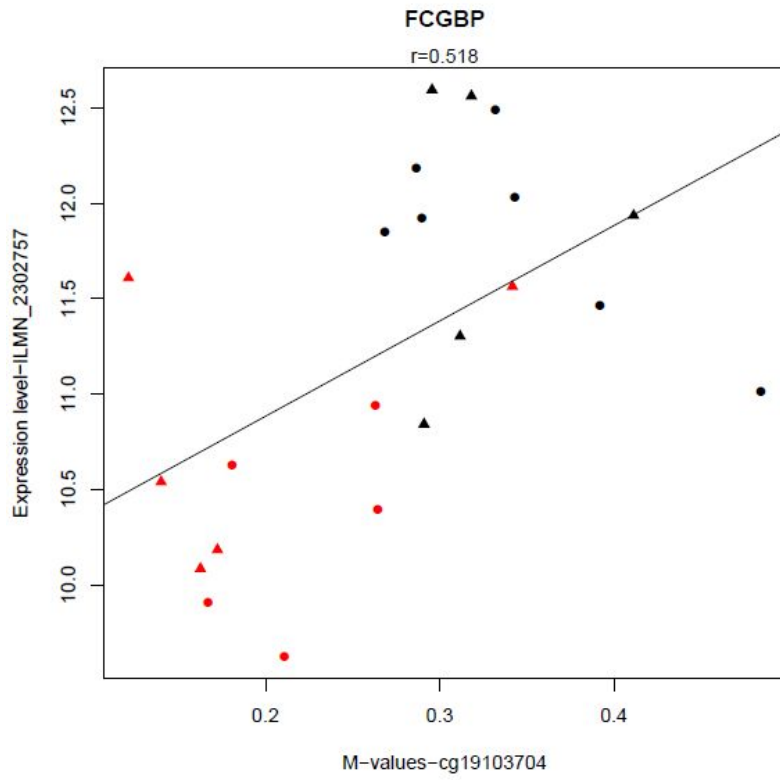


Abb. 3-14 Korrelation DNA-Methylierung und Genexpression für FCGBP. ●▲ Fälle ●▲ Kontrollen

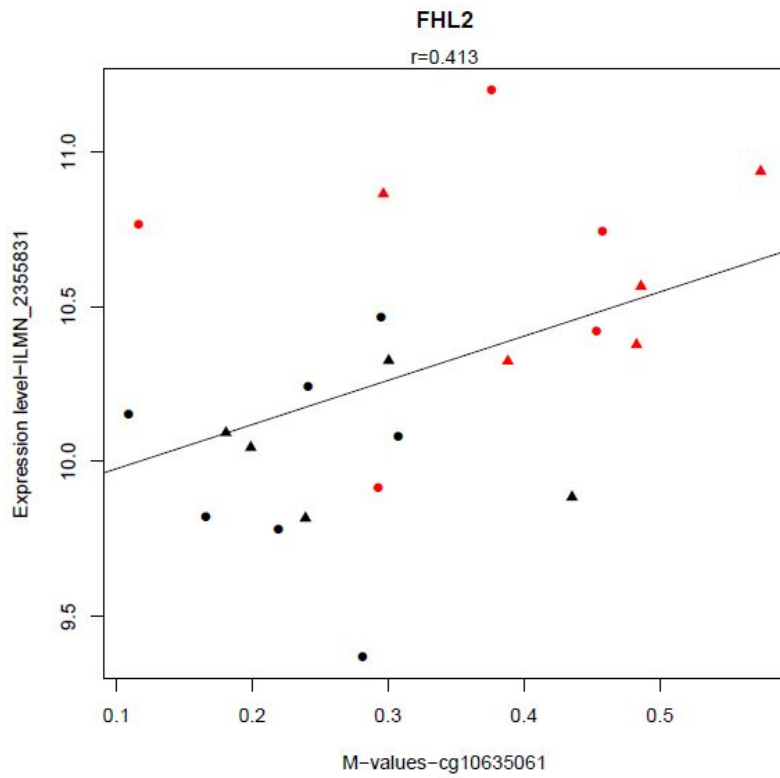


Abb. 3-15 Korrelation DNA-Methylierung und Genexpression für FHL2. ●▲ Fälle ●▲ Kontrollen

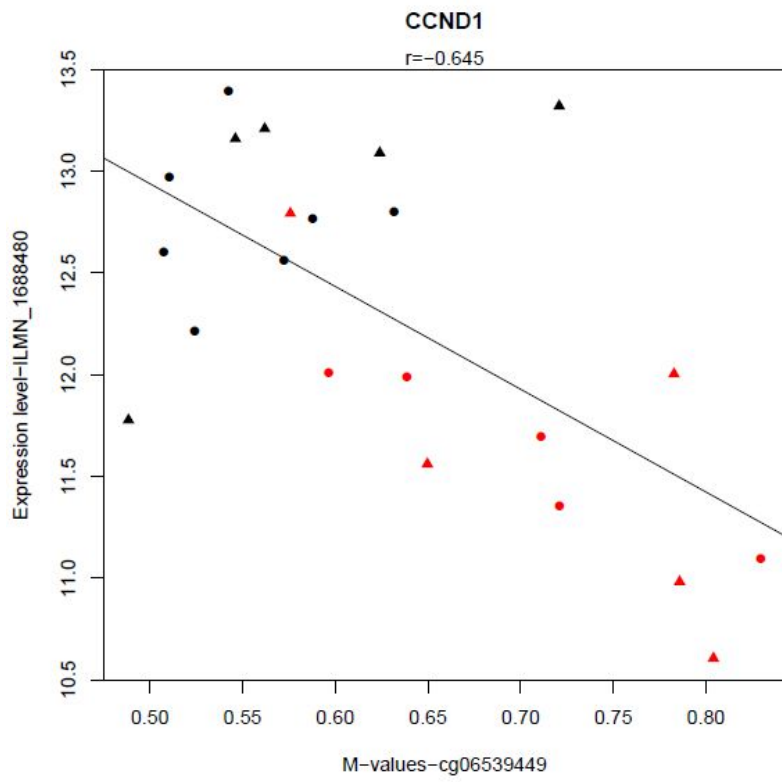


Abb. 3-16 Korrelation DNA-Methylierung und Genexpression für CCND1. ●▲ Fälle ●▲ Kontrollen

4 Diskussion

Der klinische Phänotyp der atopischen Dermatitis wird nicht allein durch die genetische Disposition bedingt. Umweltfaktoren üben einen zusätzlichen, modifizierenden Einfluss aus, indem sie z.B. die Penetranz von "Vulnerabilitätsgenen" und die Ausprägung des Krankheitsbildes beeinflussen. Der Effekt von Umwelteinflüssen wie Essverhalten (Strickland, Hewagama et al. 2013), Raucherverhalten (Zeilinger, Kühnel et al. 2013) und Alkoholkonsum (Harlaar und Hutchison 2013) kann aber auch durch epigenetische Mechanismen wie eine Veränderung der DNA-Methylierung, die zu einer veränderten Genexpression führt, vermittelt werden. Die meisten Studien dazu liegen aus dem onkologischen Bereich vor. Im Vergleich zu gesundem Gewebe weisen Tumorzellen oft abweichende Methylierungsmuster auf. (Jones und Baylin 2007) So wurde gezeigt, dass bei vielen Krebsarten das Tumorsuppressorgen p16 auf Grund von de novo Methylierung einer CpG-Insel im entsprechenden Promotor nicht mehr transkribiert wird, was den betroffenen Zellen einen Wachstumsvorteil verschafft. (Herman, Merlo et al. 1995) Ähnliches konnte für das Tumorsuppressorgen p14ARF beschrieben werden, das für die Aktivierung von p53, dem klassischen Tumorsuppressor verantwortlich ist. So findet auf Grund von Hypermethylierung weniger Transkription von 14ARF statt, was die verminderte Aktivierung von p53 bedingt. (Robertson und Jones 1998) Heute stellt die DNA-Methylierung einen Ansatzpunkt für die epigenetische Tumorthherapie dar. (Yoo und et al. 2006) So sind in den USA zur Behandlung des Myelodysplastischen Syndroms 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-Deoxycytidin zugelassen. Diese Cytosinanaloga inhibieren die Methylierung durch Blockade der DNMTs und sind dadurch in der Lage Zellwachstum auszuschalten. (Kondo 2009) Im onkologischen Bereich wird die Epigenetik demnach bereits als wichtiger Faktor in der Pathogenese der verschiedenen Tumorerkrankungen angesehen und hat neue Therapiemöglichkeiten eröffnet.

Die Rolle der Epigenetik bei nicht-neoplastischen Erkrankungen ist bisher noch weitgehend unklar. Bekannt ist, dass epigenetische Mechanismen von entscheidender Bedeutung für zahlreiche physiologische Prozesse sind, wie z.B. für die der Inaktivierung des X-Chromosoms bei Frauen. (Yang, Chapman et al. 2011) Bei der genomischen Prägung („Imprinting“) führen unterschiedliche Chromatinmarkierungen (Methylierung, Histonmodifikationen) zur Genexpression des einen Allels und zur Unterdrückung der Genexpression des anderen Allels. Manche Gene werden nur vom väterlichen Allel exprimiert, andere nur vom mütterlichen Allel. Dadurch werden geschlechtsspezifische Ausprägungen phänotypischer Merkmale möglich. (Tarutany und Takayama 2011) Aktuelle Studien konnten auch Korrelationen zwischen Zivilisationserkrankungen wie Diabetes

mellitus, Übergewicht oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen, bestimmten Umweltbedingungen und epigenetischen Mechanismen herstellen. (Heijmans 2009) Untersuchungen zum Hungerwinter 1944/45 in den Niederlanden zeigten, dass Erwachsene, deren Mütter während der Schwangerschaft hungerten, später ein höheres Risiko für Schizophrenie, Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Lumey 2007) und Diabetes mellitus (Kahn, Graff et al. 2009) aufwiesen, als ihre gleichgeschlechtlichen Geschwister, die nach einer Verbesserung der Nahrungssituation für die Mutter zur Welt kamen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass durch den pränatalen Hungerzustand das Methylierungsmuster eines Schlüsselfaktors für Wachstum und Entwicklung des Menschen, der Insulin-like-growth-factor 2 (IGF2), dauerhaft verändert wurde. (Heijmans, Tobi et al. 2008) Unterliegt das IGF2-Gen normalerweise dem maternalen Imprinting, so zeigt es bei diesen Menschen eine signifikant reduzierte DNA-Methylierung, was zu einer biallelischen Expression führt. (Cui und et al. 2003) Erste Untersuchungen deuten außerdem darauf hin, dass bei Erkrankungen des Immunsystems epigenetische Einflüsse eine Rolle spielen. So korreliert der Grad der Erkrankung bei Systemischem Lupus Erythematodes und Rheumatoider Arthritis mit der DNA-Hypomethylierung in T-Zellen. (Pan und Sawalha 2009) Für allergische Krankheitsbilder wurden im Mausmodell wichtige Hinweise auf einen Einfluss epigenetischer Mechanismen generiert. So geht eine an Methylendonoren reiche, maternale Diät während der Schwangerschaft einher mit Veränderungen im DNA-Methylierungsgrad verschiedener Genloci und einer Verschlechterung asthmatischer Phänotypen wie z.B. einer verstärkte Hyperreaktivität der Atemwege, höheren IL13-Spiegel, sowie erhöhten Konzentrationen des Serum-IgE bei den Nachkommen. (Hollingsworth, Maruoka et al. 2008)

Für epigenetische Einflüsse bei der atopischen Dermatitis liegen bisher kaum Daten vor. Nakamura und Kollegen untersuchten die mRNA-Spiegel für DNA-Methyltransferase 1 (DNMT-1) in mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Patienten mit atopischer Dermatitis. Sie konnten zeigen, dass Patienten mit hohem Serum-IgE signifikant niedrigere mRNA-Spiegel für DNMT-1 aufweisen als gesunde Kontrollen. (Nakamura, Sekigawa et al. 2006) DNMT-1 ist das Schlüsselenzym für die Aufrechterhaltung des Methylierungsmusters bei der Zellteilung und scheint auch bei der de novo Methylierung eine wichtige Rolle zu spielen. Eine Fehlfunktion dieses Enzyms könnte eine veränderte DNA-Methylierung und folglich eine veränderte Genexpression von AD-assoziierten Genen nach sich ziehen. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass DNA-Methylierung in der Pathogenese der atopischen Dermatitis eine Rolle spielt. Aktuell existieren drei Studien am Menschen, die indirekt Zusammenhänge zwischen epigenetischen Faktoren und atopischer Dermatitis herstellen. So zeigte Kiefte-de Jong, dass Nachkommen von Frauen, die während der Schwangerschaft hohe

Spiegel an Folsäure und Vitamin B12 hatten, ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer atopischen Dermatitis aufweisen. (Kiefte-de-Jong, Timmermans et al. 2012) Hinz et al. zeigten, dass die Anzahl regulatorischer, FOXP3 exprimierender T-Zellen, die durch eine spezifische demethylierte Region im FOXP3-Gen gekennzeichnet sind, im Nabelschnurblut durch mütterliche Zytokine und mütterliche Exposition gegenüber Tabakrauch vermindert werden. Es konnte eine Assoziation einer geringen Anzahl an Tregs mit der Entstehung von atopischer Dermatitis bei Einjährigen nachgewiesen werden. (Hinz, Bauen et al. 2012) Auch wurde festgestellt, dass eine Demethylierung des Promotors FCER1G von Patienten mit atopischer Dermatitis eine vermehrte Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors FcεRI auf Monozyten nach sich zieht. (Liang, Wang et al. 2012) Die meisten Kohorten, die zur Untersuchung genetischer Faktoren etabliert wurden, haben nur DNA aus dem heterogen zusammengesetzten peripheren Blut zur Verfügung. Epigenetik steuert jedoch die Differenzierung von Zellen und Geweben, indem zelltypspezifische Genprogramme an- oder abgeschaltet werden. Bei der atopischen Dermatitis spielen immunologische und strukturelle Störungen in der Epidermis (z. B. Filaggrinmutationen) sowie eine gestörte T-Zell-vermittelte Immunität eine wichtige Rolle. Weiterhin können B-Zellen durch die vermehrte Produktion von IgE-Antikörpern zum klinischen Phänotyp beitragen. (Bieber 2008) Aufgrund dieser Überlegungen haben wir eine Pilotstudie entworfen, in der wir das Methylierungsmuster von Patienten mit atopischer Dermatitis und gesunden Kontrollen nicht nur in DNA aus dem peripheren Blut, welche aus vielen Kohorten zur Verfügung steht, sondern auch aus Epidermis, T-Zellen und B-Zellen verglichen. Die Probanden wurden dabei nach Alter und Geschlecht ausgewählt, da beide Faktoren epigenetischen Veränderungen unterliegen. (Fuke, Shimabukuro et al. 2005) (Fraga, Ballestar et al. 2005) Neben DNA gewannen wir auch RNA, um eine Korrelation zwischen DNA-Methylierung und Expression zu ermöglichen. Die Fragen, die wir mit dieser Pilotstudie klären wollten, waren:

1. Gibt es AD-spezifische Unterschiede des Methylierungsmusters in den einzelnen Geweben?
2. Welches Gewebe weist die deutlichsten Unterschiede im DNA-Methylierungsmuster zwischen Gesunden und Patienten auf?
3. Wie gut reflektiert peripheres Blut die Methylierungszustände der anderen Gewebe?
4. Für welche Loci/Gene korrelieren genomweite Methylierungs- und Expressionsdaten?

4.1 AD-spezifische Unterschiede des Methylierungsmusters in den einzelnen Geweben

Im Rahmen dieser Pilotstudie konnten wir zeigen, dass in Epidermis AD-spezifische Unterschiede des Methylierungsmusters existieren, wohingegen Vollblut, T-Zellen und B-Zellen keine deutlichen Unterschiede aufwiesen. Dies bestätigt u.a. Ergebnisse von Han et al., die in einer genomweiten Methylierungsanalyse von CD4+ T-Zellen bei Patienten mit atopischer Dermatitis und gesunden Kontrollen, keine signifikanten Unterschiede im Methylierungsmuster nachweisen konnten. (Han, Park et al. 2012) Dagegen zeigten mehrere Regionen, in der aus Epidermis gewonnenen DNA, hochsignifikante Methylierungsunterschiede zwischen Patienten mit atopischer Dermatitis und gesunden Kontrollen. Einige der zugeordneten Gene spielen eine Rolle bei der Zelldifferenzierung oder der Immunantwort (siehe Tabelle 4).

Symbol	Funktion
SH2D2A, GPR55	Zelldifferenzierung
KYNU	NAD Biosynthese
MCF2L	Apoptose
ICAM2	Zelladhäsion, Immunantwort
DHRS10	Steroidkatabolismus
LRRC8C, PVT1, FLJ46365, LOC283487, C20orf179	Funktion unbekannt

Tabelle 4 Funktion der Gene mit den signifikantesten Methylierungsunterschieden. Funktion gemäß Gene Ontology biological process.

Auch Hautproben von Patienten mit Psoriasis zeigen für MCF2L eine Veränderung im Methylierungsgrad. MCF2L ist ein Gen, das für ein an der Apoptose beteiligtes Protein (Guanine nucleotide exchange factor DBS) kodiert. Bei Patienten mit Psoriasis ist eine verstärkte Methylierung von MCF2L in läsionaler Haut beschrieben. (Roberson, Liu et al. 2012) Gleiches konnten wir für Patienten mit atopischer Dermatitis zeigen. Trotz der Unterschiede im DNA-Methylierungsgrad, konnten wir keine Veränderung in der Genexpression feststellen. Ebenso konnte auch bei Psoriatikern keine Veränderung in der Expression nachgewiesen werden. (Roberson, Liu et al. 2012) Ein Grund hierfür könnte sein, dass MCF2L in so niedriger Menge exprimiert wird, dass es von dem, auf Hybridisierung basierenden Analyseverfahren der RNA-Expression nicht erfasst werden konnte. KYNU codiert für das Enzym Kynureninase, das eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von NAD-Kofaktoren aus Tryptophan spielt. (Guttmann-Yassky, Suarez-Farinas et al. 2009) Für KYNU konnten wir bei Patienten mit atopischer Dermatitis zwar eine signifikante Demethylierung, jedoch keine signifikante Veränderung der Expression nachweisen. In der Literatur ist bereits

eine verstärkte Expression für KYNU in der Epidermis bei Patienten mit atopischer Dermatitis (Guttmann-Yassky, Suarez-Farinas et al. 2009), sowie Psoriasis (Suarez-Farinas, Lowes et al. 2010) (Roberson, Liu et al. 2012) beschrieben. Es könnte der geringen Anzahl an Probanden dieser Studie geschuldet sein, dass KYNU hier keine veränderte Expression aufweist. Ein AD-spezifisches Methylierungsmuster existiert demnach nur in Epidermis. Die allgemein postulierte gewebsspezifische DNA-Methylierung (Fernandez, Assenov et al. 2012) (Eckhardt, Lewin et al. 2006) (Rakyan, Hildmann et al. 2004) konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Hauptkomponentenanalyse zeigt deutlich, dass sich die DNA-Methylierung von Zellen aus Vollblut maßgeblich von der bei epidermalen Zellen unterscheidet. Dabei ist zu beobachten, dass die verschiedenen Zellen wie B-Zellen und T-Zellen ihrerseits Subcluster bilden. Weiterhin zeigen sich größere Unterschiede in der DNA-Methylierung verschiedener Gewebe eines Individuums, als in gleichen Geweben verschiedener Individuen.

4.2 Reflektion des Methylierungsmusters der anderen Gewebe in peripherem Blut

Die Top-Hits der DNA-Methylierung in peripherem Blut stimmten in den vorliegenden Analysen nicht mit den Top-Hits in Epidermis, T-Zellen und B-Zellen überein. Peripheres Blut ist demnach nicht in der Lage das Methylierungsmuster der anderen Gewebe adäquat zu reflektieren. Blut ist eine heterogene Zellpopulation. Durch die Heterogenität können mögliche Unterschiede einzelner Zelltypen überdeckt werden. Weiterhin kann der Anteil an bestimmten Zelltypen zeit- und situationsabhängig variieren. So kann z.B. eine Leukozytose, im Rahmen einer Infektion, zu einem veränderten Ergebnis der DNA-Methylierung bei peripherem Blut führen.

Eine Studie zur Psoriasis zeigte, dass peripheres Blut von Patienten mit Psoriasis, verglichen mit dem gesunder Kontrollen, kaum Unterschiede in Bezug auf die Transkript-Expression aufweist (Lee, Jeon et al. 2009), wohingegen in einer anderen Studie deutliche Expressionsunterschiede in Hautproben nachgewiesen werden konnten. (Roberson, Liu et al. 2012) Bei Psoriasis zeigen sich demnach die Unterschiede in der DNA-Expression vor allem in Epidermis. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass für die atopische Dermatitis ähnliche Grundsätze gelten. Demnach können wir festhalten, dass peripheres Blut/Vollblut sich wenig eignet, um krankheitsbezogene Unterschiede im DNA-Methylierungsmuster oder der Transkriptexpression bei der atopischen Dermatitis zu identifizieren.

4.3 Integration von DNA-Methylierungs- und Expressionsdaten

Für 12 Loci korrelierten die genomweiten Methylierungs- und Expressionsdaten in der Epidermis. Hierbei zeigten sich neben negativen, auch positive Korrelationen von

Methylierungsstatus und Genexpression. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus anderen Studien. (Gervin, Vigeland et al. 2012) (Häsler, Feng et al. 2012) (Botchkarev, Gdula et al. 2012) Aktuelle Studien haben gezeigt, dass die Position der Methylierung innerhalb der Transkriptionseinheit einen Einfluss auf die Genkontrollfunktion hat. (Jones 2012) CpG-Methylierungen in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Promotor blockieren die Transkription, methylierte CpGs innerhalb des Gens hingegen können die Transkription sogar stimulieren. (Maunakea, Nagariajan et al. 2010) Das Auftreten positiver Korrelationen könnte hiermit erklärt werden.

Viele der Gene spielen eine Rolle bei der epidermalen Zelldifferenzierung und dem Zellwachstum (siehe Tabelle 6), so wie man es bei dem Krankheitsbild der atopischen Dermatitis, das durch eine gestörte epidermale Differenzierung und chronische Entzündung charakterisiert ist, erwarten würde.

Für einige der Gene konnte bereits eine veränderte Expression bei Patienten mit atopischer Dermatitis nachgewiesen werden. So wurde bereits gezeigt, dass S100A9, OAS2, SERPINB3 in Epidermis verstärkt und FCGBP vermindert bei Patienten mit atopischer Dermatitis exprimiert werden (Guttman-Yassky, Suarez-Farinas et al. 2009) (Segiura, Ebise et al. 2005), was die Ergebnisse aus unserer Studie bestätigt. S100A9 codiert für ein Calcium bindendes Protein, das bei chronischer Entzündung, Autoimmunerkrankungen, sowie dem Prozess der epidermalen Differenzierung von Bedeutung ist. So steht S100A9 im Zusammenhang mit Krankheiten wie rheumatoider Arthritis, Lupus erythematodes, Riesenzellarthritis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. (Perrera, McNeil et al. 2010) (Soyfoo, Roth et al. 2009) (Foell, Hernandez-Rodriguez et al. 2004) (Foell, Wittkowski et al. 2008) S100A9 gilt als exzellenter Biomarker für einen inflammatorischen Prozess. (Xu, Wu et al. 2013) Es liegt auf Chromosom 1q21, für das bereits auf genetischer Ebene Veränderungen bei Patienten mit atopischer Dermatitis aufgezeigt werden konnten. (Cookson, Ubhi et al. 2001)

KRT6C zeigt in unserer Studie eine verminderte DNA-Methylierung, einhergehend mit verstärkter Expression. Segiura et al. konnten ebenfalls eine verstärkte Expression von Keratin 6 in Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis nachweisen. (Segiura, Ebise et al. 2005) KRT6C ist ein Strukturprotein und Bestandteil der intermediären Hautfilamente. Somit stellt es, ähnlich wie Filaggrin, einen wichtigen Faktor für die Widerstandsfähigkeit der Haut dar. (Hobbs, Lessard et al. 2012) So könnte die Hautbarriere nicht nur durch FLG auf genetischer Ebene, sondern auch durch KRT6C auf epigenetischer Ebene beeinflusst werden.

Das Krankheitsbild der Psoriasis ist, ähnlich wie das atopische Ekzem, durch epidermale Hyperplasie gekennzeichnet. So wurden für einige, der in dieser Arbeit herausgestellten Gene, ähnliche Veränderungen für Patienten mit Psoriasis beschrieben. Für S100A9, OAS2, SERPINB3 und C10orf99 konnten wir bei herabgesetztem Methylierungsgrad eine negative Korrelation von DNA-Methylierungsgrad und Transkript-Expression nachweisen, ebenso zeigt sich für diese Gene bei Patienten mit Psoriasis ein erniedrigter Methylierungsgrad (Roberson, Liu et al. 2012) sowie eine verstärkte Expression (Semprini, Capon et al. 2002) (Zhou, Krueger et al. 2003) (Suarez-Farinas, Lowes et al. 2010). Für FCGBP konnte in der vorliegenden Arbeit bei Patienten mit atopischer Dermatitis eine signifikante Korrelation von Hypomethylierung einhergehend mit verminderter Expression der Transkripte gezeigt werden. Auch Patienten mit Psoriasis weisen eine verminderte Methylierung (Roberson, Liu et al. 2012) sowie eine verminderte Expression von FCGBP auf. (Suarez-Farinas, Lowes et al. 2010)

IFI27 stellte sich in unseren Analysen als der Locus mit der stärksten Korrelation zwischen Methylierung und Expression dar. IFI27 ist ein Interferon alpha induzierbares Protein und liegt auf Chromosom 14. Zu seiner Funktion ist kaum etwas bekannt. Bowcock et al. konnten zeigen, dass IFI27 bei Patienten mit Psoriasis in läsionaler und nicht-läsionaler Haut hochreguliert ist. (Bowcock, Shannon et al. 2001) Weiterhin wurde eine verstärkte Expression der IFI27 mRNA in Keratinozyten bei Lichen planus, chronischem Ekzem, squamösem Hautkrebs und während der normalen Wundheilung nachgewiesen (Suomela 2004), sodass vermutet wird, dass IFI27 einen Marker für epitheliale Proliferation und Krebs darstellt. (Suomela 2004) Auch scheint es bei der Apoptose von Bedeutung zu sein. (Roberson, Liu et al. 2012) In einer genomweiten Methylierungsstudie konnte gezeigt werden, dass dasselbe IFI27-CpG (cg20161089), wie in unserer Studie, bei Psoriatikern hypomethyliert ist, was mit einer erhöhten Expression einherging. (Roberson, Liu et al. 2012) Die vorliegende Arbeit zeigt, dass IFI27 auch in Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis hypomethyliert ist und dementsprechend eine verstärkte Expression aufweist. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Ergebnissen von Guttmann-Yassky et al., die nachwiesen, dass IFI27 auch bei atopischer Dermatitis hochreguliert ist. (Guttmann-Yassky, Suarez-Farinas et al. 2009)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die größten parallel bestehenden Unterschiede sowohl im DNA-Methylierungsmuster, als auch in der Genexpression, zwischen Patienten mit atopischer Dermatitis und gesunden Kontrollen in der Epidermis zu beobachten sind. Betroffen sind v.a. Gene, welche die Zelldifferenzierung, das Zellwachstum und die Apoptose regulieren. Es fällt insgesamt eine Demethylierung mit einhergehender

Überexpression der entsprechenden Gene auf. Allerdings handelt es sich bei unseren Ergebnissen um Assoziationen, sodass keine verlässliche Aussage darüber getroffen werden kann, ob die veränderte Methylierung prädisponierend für die atopische Dermatitis ist oder ob sie sekundär als Folge der veränderten Signalwege bei der AD auftritt. Ein Beispiel für eine DNA-Methylierung als prädisponierendes Ereignis für die Aktivierung des Immunsystems stellt Interleukin 2 (IL2) dar. Für Interleukin 2 wurde gezeigt, dass die Demethylierung eines speziellen CpGs im IL2-Promotor mit einer verstärkten IL2-Expression assoziiert ist und dieser vorausgeht. (Bird 2003) Die Demethylierung führt zu einer Rekrutierung von Oct-1 und Histon-Modifikationen. Dies hat zur Folge, dass bei weiteren Stimulationen IL2 künftig stärker und schneller induziert wird. So stellt die DNA-Methylierung in diesem Fall das Gedächtnis eines regulatorischen Vorgangs dar. (Murayama, Sakura et al. 2006) Möglicherweise existieren ähnliche Mechanismen dieses epigenetischen Gedächtnisses für atopische Dermatitis. Bei der Betrachtung der Ergebnisse sollte man mit einbeziehen, dass Epidermis von Patienten mit atopischer Dermatitis eine andere Zellzusammensetzung hat, als die von gesunden Kontrollen. So findet man bei Patienten mit AD vermehrt Entzündungszellen und ein vermehrtes Wachstum von Blutgefäßen. (Gudjonsson und Krueger 2012) Da die verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Epigenome aufweisen, könnten die epigenetischen Unterschiede möglicherweise die verschiedene Zellzusammensetzung der Gewebe reflektieren und keine epigenetischen Unterschiede im eigentlichen Sinne darstellen.

Peripheres Blut ist zwar ein gut zugängliches Gewebe, aber zugleich sehr heterogen zusammengesetzt. Für epigenetische Untersuchungen bei atopischer Dermatitis ist es zielführender, zelltypspezifische DNA, insbesondere DNA aus Epidermis als Zielgewebe heranzuziehen, da hier die signifikantesten Unterschiede nachweisbar waren und diese von peripherem Blut nicht wiedergespiegelt werden konnten. Ein weiterer Ansatz könnte sein, T-Zellsubpopulationen, wie Th1, Th2 und Th17 isoliert auf Unterschiede im DNA-Methylierungsmuster zu untersuchen.

Insgesamt zeigten relativ wenig Gene eine Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Genexpression. Einen Grund hierfür könnte die eher kleine Probandenzahl darstellen. Deshalb ist es zu empfehlen bei künftigen DNA-Methylierungsanalysen, größere Probandenzahlen zu wählen, was sich aufgrund der invasiven Probengewinnung des Zielgewebes Epidermis schwierig gestalten dürfte. Weiterhin wurden Arrays verwendet, die nur einen begrenzten Teil des Genoms abdecken. Der 27 K Bead Chip enthält hauptsächlich CpG-Islands und kaum intergene CpGs. Veränderungen in diesen CpGs entgehen somit der

Analyse. Mit der Chip-basierten Expressionsanalyse kann niedrig transkribierte RNA nicht erfasst werden und der Einfluss regulatorischer miRNAs fehlt. Dies stellt eine weitere Erklärung für geringe Anzahl an Korrelationen dar. Ein weiterer interessanter Ansatz wäre es, den Effekt auf das Epigenom der als Risikofaktoren geltenden Umwelteinflüsse, wie Allergene, Infektionen, Rauchen, etc. getrennt voneinander zu untersuchen und somit die relevanten Risikofaktoren für atopische Dermatitis zu verifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden keine Umweltfaktoren untersucht. Somit kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie krankheitsbezogene Unterschiede im Methylom zustande gekommen sind. Um dies möglich zu machen, müssten epigenetische Einflussfaktoren wie Rauchen, Alkoholkonsum oder Ernährung bei Probanden und Kontrollen kontrolliert werden.

Epigenetik ist ein komplexes Feld. Die DNA-Methylierung ist der bisher am besten verstandene Mechanismus und für Analysen mit hohem Durchsatz sehr gut geeignet. Daher ist es sinnvoll bei der Erforschung epigenetischer Einflüsse den Fokus primär auf die DNA-Methylierung zu legen. Jedoch ist dies nicht der einzige epigenetische Mechanismus. Das Prinzip der posttranslationalen Histonmodifikation und der MikroRNAs könnten ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese der atopischen Dermatitis spielen. Ob und inwiefern diese beiden epigenetischen Mechanismen bei der atopischen Dermatitis von Bedeutung sind, ist unbekannt. Es ist jedoch anzunehmen, dass sie das Epigenom zusammen mit der DNA-Methylierung beeinflussen. Auch darf das mögliche Zusammenspiel von genetischen Varianten mit epigenetischen Faktoren nicht außer Acht gelassen werden. (Heijmans und Mill 2011) Studien haben gezeigt, dass Allel-spezifische DNA-Methylierungen (ASM) im Genom existieren, die inter-individuell stark variieren können. Sie können sowohl durch genetische Varianten bedingt sein, als auch durch genomisches Imprinting oder Umwelteinflüsse. ASMs können den Effekt von Risikoallelen durch Blockierung der Expression maskieren. (Shoemaker, Deng et al. 2010)

Epigenetische Studien zu komplexen Erkrankungen basieren stark auf den Erfahrungen, die im Bereich der Krebsforschung gemacht wurden. CpG Islands sind im onkologischen Bereich von großer Bedeutung. Ob ihnen jedoch auch bei der epigenetischen Kontrolle nichtneoplastischer Erkrankungen eine solch tragende Rolle zukommt, ist unklar. (Eckhardt, Lewin et al. 2006) Außerdem bieten die derzeit verfügbaren Methoden nicht die quantitative und räumliche Auflösung, um auch subtile Veränderungen des Epigenoms zu erkennen. Die Herausforderung der nächsten Jahre wird es sein neue, kostengünstige Methoden zu entwickeln, die es möglich machen das Epigenom komplexer Erkrankungen in höherer

Auflösung zu untersuchen. Hierfür wäre es wichtig Probanden und Kontrollen in Bezug auf Alter, Geschlecht und auch weiteren epigenetischen Einflussfaktoren aufeinander abzustimmen, um mögliche Confounder zu vermeiden. Weiterhin müsste von beiden Vergleichsgruppen Biomaterial gesammelt werden, hier empfiehlt sich vor allem Epidermis, aber auch T-Zellsubpopulationen könnten mit eingeschlossen werden. Weiterhin sollten zelltypspezifische DNA und RNA gewonnen werden, um die Korrelation von DNA-Methylierung und Gen-Expression kenntlich zu machen.

5 Zusammenfassung

Die atopische Dermatitis (AD) ist eine häufige, chronisch-rezidivierende, entzündliche Hauterkrankung, deren Ätiologie größtenteils auf erblichen, aber auch umweltbedingten Faktoren basiert. Obwohl bereits einige Risikogenvarianten für die AD identifiziert werden konnten, lässt sich nur ein geringer Teil der beobachteten Heritabilität der Erkrankung durch diese Faktoren erklären. Epigenetische Mechanismen stellen eine plausible und potenziell vererbare Verbindung zwischen Umwelteinflüssen und Genomfunktion dar und könnten so eine wichtige Rolle in der Krankheitsgenese der AD spielen. Bis heute gibt es in der Literatur nur wenige Publikationen, die sich mit der Epigenetik bei der atopischen Dermatitis auseinandergesetzt haben. Eine genomweite DNA-Methylierungsanalyse für atopische Dermatitis existiert bisher nicht. Ziel dieser Arbeit war die Identifikation epigenetischer Faktoren, die an der Pathogenese der AD beteiligt sein könnten. Zu diesem Zweck wurde die bislang einzige genomweite Untersuchung des Methyloms und Transkriptoms zur AD durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Gewebetypen miteinander verglichen. Insgesamt zeigten sich größere Unterschiede in der DNA-Methylierung verschiedener Gewebe eines Individuums (intraindividuelle Variabilität), als in gleichen Geweben verschiedener Individuen (interindividuelle Variabilität). Die Ergebnisse deuten weiter darauf hin, dass die stärksten AD-assoziierten Unterschiede in der Epidermis bestehen, dem bei der AD primär betroffenen Gewebe. Dabei konnten eine Reihe von Loci identifiziert werden, bei denen ein differentielles Methylierungsmuster auch mit einer veränderten Expression einherging. Neben der klassischen Korrelation von Hypomethylierung/erhöhte Expression und Hypermethylierung/verminderte Expression waren auch Korrelationen von Hypomethylierung mit verminderter Expression zu beobachten. Unter den Genen mit AD-assoziierten Unterschieden im Methylierungsmuster in der Epidermis fanden sich v.a. solche, die bei der epidermalen Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum und der Apoptose von Bedeutung sind. Interessanterweise wurden für einige dieser Gene analoge Beobachtungen bei der Psoriasis, einer anderen chronisch-entzündlichen Hauterkrankung mit überwiegend antagonistischen Mechanismen gemacht, was darauf hindeutet, dass die Unterschiede in der Methylierung eher im Zusammenhang mit der Entzündung zu sehen sind. Künftige Studien in diesem Bereich sollten die Epidermis als Zielgewebe einschließen und größere Fallzahlen heranziehen. Wünschenswert wären longitudinale Studien, die es möglich machen auch die zeitlichen Veränderungen der epigenetischen Marker zu erfassen und die Erfassung von Umweltexpositionen. Die Epigenetik könnte das noch lückenhafte Verständnis der

Krankheitsentstehung der AD entscheidend verbessern und so vielleicht zur Entwicklung zielgerichteter therapeutischer Ansätze und präventiver Maßnahmen beitragen.

6 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1-1 Th1-Th2-Ungleichgewicht bei der atopischen Dermatitis. Eigene Abbildung nach U Wahn, J Grabbe, In: Pädiatrische Allergologie und Immunologie, 4. Auflage, U Wahn, R Seger, V Wahn, GA Holländer (Herausgeber), Elsevier Urban&Fischer Verlag, München, Jena 2005, S. 413, Abb. 30-1
- Abbildung 1-2 Dysfunktion der Hautbarriere bei atopischer Dermatitis. N Novak (2009). „New insights into the mechanism and management of allergic diseases: atopic dermatitis.“ Allergy; 64: 266
- Abbildung 1-3 Kandidatengene für allergische Erkrankungen. JW Holloway, IA Yang, ST Holgate (2010). „Genetics of allergic disease.“ J Allergy Clin Immunol; 125(2): 89
- Abbildung 1-4 Modulation der Genexpression durch die prä- und postnatale Umwelt. DJ Martino, SL Prescott (2010). „Silent mysteries: epigenetic paradigms could hold the key to conquering the epidemic of allergy and immune disease.“ Allergy; 65: 2
- Abbildung 1-5 Milch direkt aus dem Euter. Die Welt online (11.09.2011), Im Internet verfügbar unter URL: <http://www.welt.de/vermischtes/kurioses/article13597777/Kleinkind-stillt-seinen-Durst-direkt-am-Kuheuter.html> Stand: 25.11.2012
- Abbildung 1-6 Epigenetische Mechanismen. K Sühling (2010).: “Epigenetik- Das molekulare Gedächtnis für Umwelteinflüsse.“ Umweltbundesamt. www.umweltbundesamt.de/gesundheit/publikationen/epigenetik.pdf Stand: 09.09.2012
- Abbildung 1-7 DNA-Methylierung. Eigene Abbildung nach Advanced Chemistry Development, Inc.,

		ChemSketch, Version 12.01, Toronto, 2010
Abbildung 1-8	Genregulation durch CpG-Methylierung.	A Portela, M Esteller (2010). „Epigenetic modification and human disease.“ Nature biotechnology; 28(10): 1058
Abbildung 2-1	Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation.	Miltenyi Biotec (2008), Aus dem Protokoll: „ Isolation of mononuclear cells from human peripheral blood by density gradient centrifugation.“ Im Internet verfügbar unter URL: http://www.miltenyibiotec.com/download/protocols_sample_preparation_en/1396/SP_MC_PB_density_gradient.pdf Stand: 21.07.2012
Abbildung 2-2	Bisulfitkonvertierung.	Illumina (2008), Aus dem Protokoll: „Infinium Assay Methylation Protocol Guide.“
Abbildung 2-3	Prinzip des HumanMethylation 27 BeadChip.	Illumina, „Infinium Methylation Assay, HumanMethylation27 BeadChip.“ Im Internet verfügbar unter URL: http://www.illumina.com/technology/infinium_methylation_assay.ilmn Stand: 29.09.2013
Abbildung 3-1 – 3-5	Hauptkomponentenanalyse, Heat Maps.	Eigene Abbildung
Abbildung 3-6 – 3-16	Korrelationen Methylierung und Expression.	Eigene Abbildung

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1	Kriterien nach Hanifin und Rajka.	Hanifin JM, Rajka G (1980). “Diagnostic features in atopic dermatitis.” Acta Derm Venereol.; 92: 44–7
Tabelle 2-1	Beschreibung des Probandenkollektivs.	Eigene Tabelle
Tabelle 2-2	Primer-Sequenzen 5´-3´ für die Amelogenin-PCR.	Eigene Tabelle
Tabelle 2-3	PCR-Mix (50 Reaktionen). 1µl DNA wurde zu 10µl PCR-Mix gegeben und die PCR gestartet.	Eigene Tabelle
Tabelle 2-4	Programm für den Thermocycler.	Eigene Tabelle
Tabelle 3-1	Differentiell methylierte CpGs bei Patienten mit atopischer Dermatitis und gesunden Kontrollen.	Eigene Tabelle
Tabelle 3-2	Korrelation zwischen CpG-Methylierung und mRNA-Expression.	Eigene Tabelle
Tabelle 3-3	Funktion der Gene mit differentiell veränderter DNA-Methylierung und Genexpression.	Eigene Tabelle nach The Gene Ontology Website. Im Internet verfügbar unter URL: http://www.geneontology.org Stand: 29.09.2012
Tabelle 4	Funktion der Gene mit den signifikantesten Methylierungsunterschieden.	Eigene Tabelle nach The Gene Ontology Website. Im Internet verfügbar unter URL: http://www.geneontology.org Stand: 16.10.2012

8 Literaturverzeichnis

Bartel, D. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.

Baurecht, H., A. Irvine, N. Novak, T. Illig, B. Buhler und J. Ring (2007). "Toward a major risk factor for atopic eczema: meta-analysis of filaggrin polymorphism data." J Allergy Clin Immunol **120**: 1406-1412.

Benjamini, Y. und Y. Hochberg (1995). "Controlling the False Discovery Rate- a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." J Roy Stat Soc B Met **57**: 289-300.

Bennich, H., K. Ishizaka und S. Johansson (1969). "Comparative antigenic study of E globulin and myeloma IgND." J Immunol **102**: 826-831.

Bernstein, E. (2005). "RNA meets chromatin." Genes Dev **19**: 1635-1655.

Bhavsar, P. (2008). "The role of histone deacetylases in asthma and allergic diseases." J Allergy Clin Immunol **121**: 580-584.

Bibikova, M., Z. Lin, L. Zhou, E. Chudin, E. Garcia, B. Wu, D. Doucet, N. Thoman und Y. Wang (2006). "High throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays." Genome Res **16**: 383-393.

Bieber, T. (2008). "Atopic dermatitis." N Engl J Med **358**: 1483-1494.

Bieber, T. (2010). "Atopic Dermatitis." Ann Dermatol **22**(2): 125-137.

Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes Dev **16**: 6-21.

Bird, A. (2003). "I λ 2 transcription unleashed by active DNA demethylation." Nature Immunology **4**(3): 208-209.

Botchkarev, V., M. Gdula, A. Mardareyev, A. Sharov und M. Fessing (2012). "Epigenetic Regulation of Gene Expression in Keratinocytes." J Invest Dermatol **132**(11): 2505-2521.

Bouzigon, E., E. Corda, H. Aschard, M. Dizier, A. Boland und J. Bousquet (2008). "Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma." N Engl J Med **359**: 1985-1994.

Bowcock, A., W. Shannon, F. Du, J. Duncan, K. Cao, K. Aftergut, J. Catier, M. Fernandez-Vina und A. Menter (2001). "Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies." Hum. Mol. Genet. **10**(17): 1793-1805.

Braun-Fahrlaender, C., J. Riedler und U. Herz (2002). "Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children." N Engl J Med **347**: 869-877.

Braun-Fahrlaender, C. und R. Lauener (2003). "Farming and protective agents against allergy and asthma." Clin Exp Allergy **33**: 409-411.

Brenninkmeijer, E., M. Schram, M. Leeflang, J. Bos und P. Spuls (2008). "Diagnostic criteria for atopic dermatitis: a systematic review." Br J Dermatol **158**(4): 754-765.

Brunner, E. und U. Munzel (2000). "The nonparametric Behrens-Fisher problem: Asymptotic theory and a small-sample approximation." Biometrical Journal **42**: 17-25.

Clark, S., J. Harrison, C. Paul und M. Frommer (1994). "High sensitivity mapping of methylated cytosines." Nucleic acids Res **22**: 2990-2997.

Coca, A. und R. Cooke (1923). "On the classification of the phenomena of hypersensitiveness." J Immunol: 163-182.

Coca, A. und E. Grove (1925). "Study in hypersensitiveness. XIII. Study of atopic reagins." J Immunol: 445-464.

Conrad, M., R. Ferstl, R. Teich, S. Brand, N. Blümer, A. Yildirim, C. Patrascan, A. Hanuszkiewicz, S. Akira, H. Wagner, O. Holst, E. Von Mutius, P. Pfefferle, C. Kirschning, H. Garn und H. Renz (2009). "Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by nonpathogenic microbe *Acinetobacter Iwoffii* F78." J Exp Med **13**: 2869-2877.

Cookson, W., B. Ubhi, R. Lawrence und E. al. (2001). "Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci." Nature Genet **27**: 372-373.

Cui, H. und et al. (2003). "Loss of IGF2 imprinting: A potential marker of colorectal cancer risk." Science **299**: 1753-1755.

Davis, S., P. Du, S. Bilke, T. J. Triche und M. Bootwalla (2013). "Methylumi: Handle Illumina methylation data. ." R package version 2.6.1.

Dean, W., D. Lucifero und F. Santos (2005). "DNA Methylation is mammalian development and disease." Birth Defects Res C Embryo Today **75**(2): 98-111.

Downs, S., G. Marks und T. Mitakakis (2001). "Having lived on a farm and protection against allergic diseases in Australia." Clin Exp Allergy **31**: 570-575.

Du, P., W. Kibbe und S. Lin (2008). "lumi: a pipeline for processing Illumina microarray." Bioinformatics **24**: 1547-1548.

Eckhardt, F., J. Lewin, R. Cortese, V. Rakyan, J. Attwood, M. Burger, J. Burton, S. Beck und E. al. (2006). "DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22." Nat Genet **38**(12): 1378-1385.

Ege, M., C. Bieli und R. Frei (2006). "Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children." J Allergy Clin Immunol **117**: 817-823.

Elias, P. und M. Schmuth (2009). "Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis." Curr Allergy Asthma Rep **9**(4): 265-272.

Esparza-Gordillo, J., S. Weidinger, R. Fölster-Holst, A. Bauerfeind, F. Ruschendorf, G. Patone, K. Rohde, F. Schulz, T. Kerscher, N. Hubner, U. Wahn, H. Baurecht, E. Rodriguez, T. Illig, Y. Lee und A. Ruether (2009). "A common variant on chromosome 11q13 is associated with atopic dermatitis." Nat Genet **41**(5): 596-601.

Esteller, M. (2007). "Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome." Hum. Mol. Genet. **16**(1): R50-R59.

Fernandez, A., Y. Assenov, J. Martin-Subero, B. Balint, R. Siebert, H. Taniguchi, H. Yamamoto, M. Hidalgo und E. al. (2012). "A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples." Genome Res **22**: 407-419.

Flohr, C. (2011). "Recent perspectives on the global epidemiology of childhood eczema." Allergologia et Immunopathologia **39**(3): 174-182.

Foell, D., J. Hernandez-Rodriguez, M. Sanchez, T. Vogl, M. Cid und J. Roth (2004). "Early recruitment of phagocytes contributes to the vascular inflammation of giant cell arteritis." J Pathol **204**(3): 311-316.

Foell, D., H. Wittkowski, Z. Ren, J. Turton, G. Pang, J. Daebritz, J. Ehrchen, J. Heidemann, T. Borody, J. Roth und R. Clancy (2008). "Phagocyte-specific S100 proteins are released from affected mucosa and promote immune responses durin inflammatory bowel disease." J Pathol **216**(2): 183-192.

Folkerts, G., W. Busse, F. Nijkamp, R. Sorkness und J. Gern (1998). "State of the art: virus-induced airway hyperresponsiveness and asthma." Am J Respir Crit Care Med **157**: 1708-1720.

Fraga, M. F., E. Ballestar, M. F. Paz, S. Ropero, F. Setien, M. L. Ballestar, D. Heine-Suner, J. C. Cigudosa, M. Urioste und M. Esteller (2005). "Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**: 10604-10609.

Frommer, M., L. McDonald, D. Millar, C. Collis, F. Watt, G. Grigg, P. Mollory und C. Paul (1992). "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**: 1827-1831.

Fuke, C., M. Shimabukuro, A. Petronis, J. Sugimoto, T. Oda, K. Miura, T. Miyazaki, C. Ogura, Y. Okazaki und Y. Jinno (2005). "Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study." Annals of human genetics **68**: 196-204.

Gervin, K., M. Vigeland, M. Mettingsdal, M. Hammero, H. Nygard, A. Olsen, I. Brandt, J. Harris, D. Undien und R. Lyle (2012). "DNA methylation and gene expression changes in monozygotic twins discordant for psoriasis: Identification of epigenetically dysregulated genes." PLoS Genet **8**: e1002454.

Gudjonsson, J. und G. Krueger (2012). "A Role for Epigenetics in Psoriasis: Methylated Cytosine-Guanine Sites Differentiate Lesional from Nonlesional Skin and from Normal Skin." Journal of Investigative Dermatology **132**: 506-508.

Guttman-Yassky, E., M. Suarez-Farinas, A. Chiricozzi, K. Nogales, A. Shemer, J. Fuentes-Duculan, I. Cardinale, P. Lin, R. Bergman, A. Bowcock und J. Krueger (2009). "Broad defects in epidermal cornification in atopic dermatitis identified through genomic analysis." J Allergy Clin Immunol: 1235-1244.e1258.

Han, J., S. Park, J. Bae, J. Choi, J. Lyu, S. Park, S. Kim, Y. Kim, S. Kim und T. Kim (2012). "The characteristics of genome-wide DNA methylation in naive CD4+ T cells of patients with psoriasis or atopic dermatitis." Biochemical and Biophysical Research Communications **422**: 157-163.

Hanifin, J. und G. Rajka (1980). "Diagnostic features in atopic dermatitis." Acta Derm Venereol **92**: 44-47.

Harlaar, N. und K. Hutchison (2013). "Alcohol and the methylome: Design and analysis considerations for research using human samples." Drug Alcohol Depend.

Häsler, R., Z. Feng, L. Bäckdahl, M. Spehlmann, A. Franke, A. Teschendorff, V. Rakyán, T. Down, G. Wilson, A. Feber, S. Beck, S. Schreiber und P. Rosenstiel (2012). "A functional methylome map of ulcerative colitis." Genome Research **22**: 2130-2137.

Hauk, P. (2008). "The role of food allergy in atopic dermatitis." Current allergy and asthma reports **8**(3): 188-194.

Heijmans, B. und J. Mill (2011). "Commentary: The seven plagues of epigenetic epidemiology." International Journal of Epidemiology.

Heijmans, B., T. et al. (2009). "The epigenome-archive of the prenatal environment." Epigenetics **4**: 526-531.

Heijmans, B. T., E. W. Tobi, A. D. Stein, H. Putter, G. J. Blauw, E. S. Susser, P. E. Slagboom und L. H. Lumey (2008). "Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**: 17046-17049.

Henderson, J., K. Northstone, S. Lee, H. Liao, Y. Zhao and M. Pembrey (2008). "The burden of disease associated with filaggrin mutations: a population-based, longitudinal birth cohort study." J Allergy Clin Immunol **121**: 872-877.

Herman, J. G., A. Merlo, L. Mao und et al. (1995). "Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 Gene is frequently associated with aberrant DNA Methylation in all Human Cancers." Cancer Research **55**: 4525-4530.

Hinz, D., M. Bauen, S. Röder, S. Olek, J. Huehn, U. Sack, M. Borte, J. Simon, I. Lehmann, G. Herberth und L. s. group (2012). "Cord blood Tregs with stable FOXP3 expression are influenced by prenatal environment and associated with atopic dermatitis at the age of one year." Allergy **67**: 380-389.

Hobbs, R., J. Lessard und P. Coulome (2012). "Keratin intermediate filament proteins - novel regulators of inflammation and immunity in skin." Journal of Cell Science **125**: 5257-5258.

Hollingsworth, J., S. Maruoka, K. Boon, S. Garantziotis, Z. Li und J. Tomfohr (2008). "In utero supplementation with methyl donors enhance allergic airway disease in mice." Clin Invest **118**: 3462-3469.

Holloway, J. W., I. A. Yang und S. T. Holgate (2010). "Genetics of allergic disease." J Allergy Clin Immunol: 81-94.

Irvine, A. (2007). "Fleshing out filaggrin phenotypes." J Invest Dermatol **127**(3): 504-507.

Isidoro-Garcia, P. M. (2007). "Interactions between genes and the environment. Epigenetics in allergy." Allergologia et Immunopathologia **35**: 254-258.

Janson, P. (2009). "At the crossroad of T helper lineage commitment-Epigenetics points the way." Biochim Biophys Acta **1790**: 906-909.

Johansson, S., T. Bieber, R. Dahl, P. Friedmann, B. Lanier, R. Lockey, C. Motala, J. Ortega Martell, T. Platts-Mills, J. Ring, F. Thien, P. Van Cauwenberge und H. Williams (2004). "Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003." J Allergy Clin Immunol **113**: 832-836.

Jones, B. und J. Chen (2006). "Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development." EMBO J **25**: 2443-2452.

Jones, P. (2012). "Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond." nature **13**: 484-491.

Jones, P. A. und B. Baylin (2007). "The Epigenomics of Cancer." Cell **128**: 683-692.

Jungersted, J., H. Scheer, M. Mempel, H. Baurecht, L. Cifuentes, J. Hogh, L. Hellgren, G. Jemec, T. Agner und S. Weidinger (2010). "Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema." Allergy **65**(7): 911-918.

Kahn, H., M. Graff, A. Stein und L. Lumey (2009). "A fingerprint marker from early gestation associated with diabetes in middle age: the Dutch Hunger Winter Families Study." Int J Epidemiol **38**(1): 101-109.

Kay, A. (2001). "Allergy and allergic diseases. Second of two parts." N Engl J Med **344**: 109-113.

Kay, A. (2001). "Allergy and allergic diseases. First of two parts." N Engl J Med **344**: 30-37.

Kiefte-de-Jong, J., S. Timmermans, V. W. V. Jaddoe, A. Hofman, H. Tiemeier, E. A. Steegers, J. C. de Jongste und H. A. Moll (2012). "High Circulation Folate and Vitamin B-12 Concentrations in Women During Pregnancy Are Associated with Increased Prevalence of Atopic Dermatitis in Their Offspring." The Journal of Nutrition **142**: 731-738.

Kim, S., P. Fields und R. Flavell (2007). "Demethylation of a specific hypersensitive site in the Th2 locus control region." Proc Natl Acad Sci USA **104**: 17052-17057.

Kisich, K., C. Carspecken, S. Fieve, M. Boguniewicz und D. Leung (2008). "Defective killing of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis is associated with reduced mobilization of human beta-defensin-3." J Allergy Clin Immunol **122**(1): 62-68.

Kondo, Y. (2009). "Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modification in human cancers." Yonsei medical journal **50**: 455-463.

Konietschke, F. (2011). "nparcomp: nparcomp-package."

Lauener, R., T. Birchler und J. Adamski (2002). "Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non farmers' children. ." Lancet **360**: 465-466.

Lee, D., S. Agarwal und A. Rao (2002). "Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene." Immunity **16**: 649-660.

Lee, D., S. Agarwal und A. Rao (2002). "Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extendet demethylation of the IL-4 gene." Immunity **16**: 649-660.

Lee, G., S. Kim, C. Spilianakis, P. Fields und R. Flavell (2006). "T helper cell differentiation: regulation by cis elements and epigenetics." Immunity **24**: 369-379.

Lee, G., S. Kim, C. Spilianakis, P. Fields und R. Flavell (2006). "T helper cell differentiation: regulation by cis elements and epigenetics." Immunity **24**: 369-379.

Lee, S., E. Jeon, Y. Kim und E. al. (2009). "A global gene expression analysis of the peripheral blood mononuclear cells reveals the gene expression signature in psoriasis." Ann Dermatol **21**: 237-242.

Lewis, B., C. Burge und D. Bartel (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell **120**(1): 15-20.

Liang, Y., P. Wang, M. Zhao, G. Liang, H. Yin, G. Zhang, H. Wen und Q. Lu (2012). "Demethylation of the FCER1G promoter leads to FCεRI overexpression on monocytes of patients with atopic dermatitis." Allergy **67**: 424-430.

Litonjua, A., V. Carey, H. Burge, S. Weiss und D. Gold (1998). "Parental history and the risk for childhood asthma." Am J Respir Crit Care Med **158**: 176-181.

Lumey, L., Aryeh D Stein, Henry S Kahn, Karin M van der Pal-de Bruin, GJ Blauw, Patricia A Zybert, Ezra S Susser (2007). "Cohort Profile: The Dutch Hunger Winter Families Study." International Journal of Epidemiology **36**: 1196-1204.

Martino, D. und L. Prescott (2010). Modulation of gene expression by the pre and post natal environment.

Martino, D. J. und L. Prescott (2010). "Silent mysteries: epigenetic paradigms could hold the key to conquering the epidemic of allergy and immune disease." Allergy **65**: 7-15.

Maunakea, A., R. Nagarajan, M. Bilenky, T. Ballinger, J. Costello und e. al. (2010). "Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters." Nature **466**: 253-257.

Miajlovic, H., P. Fallon, A. Irvine und T. Foster (2010). "Effect of filaggrin breakdown products on growth of and protein expression by *Staphylococcus aureus*." J Allergy and Clin Immunol **126**(6): 1184-1190.

Miller, S., D. Dykes und H. Polesky (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." Nucleic Acids Research **16**(3): 1215.

Moffat, M. (2004). "SPINK5: a gene for atopic dermatitis and asthma." Clin Exp Allergy **34**(3): 325-327.

Moore, M., S. Rifas-Shiman, J. Rich-Edwards, K. Kleinman, C. J. Camargo, D. Gold, S. Weiss und M. Gillman (2004). "Perinatal predictors of atopic dermatitis occurring in the first six months of life." Pediatrics **113**: 468-474.

Mothes, N., B. Niggemann, C. Janneck, T. Hagemann, S. Weidinger, T. Bieber, R. Valenta und N. Novak (2005). "The cradle of IgE autoreactivity in atopic eczema lies in early infancy." J Allergy Clin Immunol **116**(3): 706-709.

Murayama, A., K. Sakura, M. Nakama, K. Yasuzawa-Tanaka, E. Fujita, Y. Tateishi, Y. Wang und E. al. (2006). "A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promotor is an epigenetic memory." The Embo Journal **25**: 1081-1092.

Mutius, E. v. (2010). "Farm lifestyles and the hygiene hypothesis." Clinical and Experimental Immunology **160**: 130-135.

Nakamura, T., I. Sekigawa, H. Ogasawara, K. Mitsuishi, K. Hira, S. Ikeda und H. Ogawa (2006). "Expression of DNMT-1 in patients with atopic dermatitis." Archives of dermatological research **298**: 253-256.

Neubert, K. (2007). "A studentized permutation test for the non-parametric Behrens-Fisher problem." Computational Statistics & Data Analysis **51**(5192-5204).

Novak, N., H. Baurecht, T. Schäfer, E. Rodriguez, S. Wagenpfeil, N. Klopp, J. Heinrich, H. Behrendt, J. Ring, E. Wichmann, T. Illig und S. Weidinger (2008). "Loss-of-function

mutations in the filaggrin gene and allergic contact sensitization to nickel." J Invest Dermatol **128**(6): 1430-1435.

Novak, N. (2009). "New Insights into the mechanism and management of allergic diseases: atopic dermatitis." Allergy **64**: 265-275.

Palmer, C., A. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski, Y. Zhao, H. Liao und S. Lee (2006). "Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis." Nat Genet **38**: 441-446.

Pan, Y. und A. Sawalha (2009). "Epigenetic regulation and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus." Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine **153**: 4-10.

Paternoster, L., M. Standl, C. Chen, A. Ramasamy, K. Bonnelykke, L. Duijts, H. Baurecht, K. Heim, H. Prokisch, H. Wichmann, N. Novak, N. Klopp, E. Rodriguez, T. Illig, D. Strachan und S. Weidinger (2011). "Meta-analysis of genome-wide association studies identifies three new risk loci for atopic dermatitis." Nat Genet **44**(2): 187-192.

Pepys, J. (1994). ""Atopy": a study in definition." Allergy **49**: 397-399.

Perera, F., W.-y. Tang, J. Herbstman, D. Tang, L. Levin und R. Miller (2009). "Relation of DNA Methylation of 5' CpG Island of ACSL3 to Transplacental Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Childhood Asthma." PLoS ONE **4**: e4488.

Perkin, M. und D. Strachan (2006). "Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy?" J Allergy Clin Immunol **117**: 1-374.

Perrera, C., H. McNeil und C. Geczy (2010). "S100 Calgranulins in inflammatory arthritis. ." Immunol Cell Biol **88**(1): 41-49.

Pfeifer, K. (2000). "Mechanisms of Genomic Imprinting." Am J Human Genetics **67**: 777-787.

Pirquet, C. (1906). "Allergie." Munch Med Wschr **30**: 1457-1458.

Portela, A. und M. Esteller (2010). "Epigenetic modifications and human disease." nature biotechnology(10): 1057-1068.

Portier, P. und C. Richet (1902). "Nouveaux faits d'anaphylaxie, ou sensibilisation aux venins par doses réitérées." R. Soc. Biol. **54**: 548-551.

Prausnitz, C. und H. Küstner (1921). "Studien über die Überempfindlichkeit." Zentralbl Bakt Parasit Infect: 160-169.

Purvis, D., J. Thompson, P. Clark, E. Robinson, P. Black, C. Wild und E. Mitchell (2005). "Risk factors for atopic dermatitis in New Zealand children at 3.5 years of age." The British journal of dermatology **152**(4): 742-749.

Rakyan, V., T. Hildmann, K. Novik, J. Lewin, J. Tost, A. Cox, T. Andrews, K. Howe, T. Otto, A. Olek, J. Fischer, I. Gut, K. Berlin und S. Beck (2004). "DNA Methylation Profiling of the Human Major Histocompatibility Complex: A Pilot Study for the Human Epigenome Project." PLoS Biol **2**(12): e405.

Reik, W. und Lewis (2005). "Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals." Nat. Rev. Genet. **6**: 403-410.

Riedler, J., C. Braun-Fahrlaender und W. Eder (2001). "Early life exposure to farming environment is essential for protection against the development of asthma and allergy: a cross-sectional survey." Lancet **358**: 1129-1133.

Roberson, E., Y. Liu, C. Ryan, C. Jpoyce, S. Duan, L. Cao, A. Martin, W. Liao, A. Menter und A. Bowcock (2012). "A Subset of Methylated CpG Sites Differentiate Psoriatic from Normal Skin." Journal of Investigative Dermatology **132**: 583-592.

Robertson, K. D. und P. A. Jones (1998). "The human ARF cell cycle regulatory gene promotor is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53." Molecular and Cellular Biology **18**: 6457-6473.

Rodriguez, E., H. Baurecht, E. Herberich, S. Wagenpfeil, S. Brown, H. Cordell, A. Irvine und S. Weidinger (2009). "Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease." J Allergy Clin Immunol **123**(6): 1361-1370.

Ruzicka, T., J. Ring und B. Przybilla (1991). Handbook of atopic eczema, Springer-Verlag.

Saiki, R., D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis und H. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-491.

Santangelo, S., D. Cousins, N. Winkelmann und D. Staynov (2002). "DNA methylation changes at human Th2 cytokine genes coincide with DNase I hypersensitive site formation during CD4(+) T cell differentiation." J Immunol **169**: 1893-1903.

Schmid-Ott, G., B. Jaeger, C. Adamek, H. Koch, F. Lamprecht, A. Kapp und T. Werfel (2001). "Levels of circulating CD8(+) T lymphocytes, natural killer cells, and eosinophils increase upon acute psychosocial stress in patients with atopic dermatitis." J Allergy Clin Immunol **107**(1): 171-177.

Schram, D., G. Doekes und M. Boeve (2005). "Bacterial and fungal components in house dust of farm children, Rudolf Steiner school children and reference children- the PARSIFAL study." Allergy **60**: 611-618.

Schultz, L. F. und N. Holm (1985). "Atopic dermatitis in a population based twin series. Concordance rates and heritability estimation." Acta Derm Venereol Suppl **114**: 159.

Segiura, H., H. Ebise, T. Tazawa, K. Tanaka, Y. Sugiura, U. M und E. al. (2005). "Largescale DNA microarray analysis of atopic skin lesions shows overexpression of an epidermal differentiation gene cluster in the alternative pathway and lack of protective gene expression in the cornified envelope." Br J Dermatol **152**: 146-149.

Semprini, S., F. Capon, A. Tacconelli und e. al. (2002). "Evidence for differential S100 gene over-expression in psoriatic patients from genetically heterogeneous pedigrees." Hum Genet **111**: 310-313.

Sergeant, A., L. Campbell, P. Hull, M. Porter, C. Palmer, F. Smith, W. McLean und C. Munro (2009). "Heterozygous null alleles in filaggrin contribute to clinical dry skin in young adults and the elderly." J Invest Dermatol **129**(4): 1042-1045.

Shirakawa, T., T. Enomoto, S. Shimazu und J. Hopkin (1997). "The inverse association between tuberculin response and atopic disorder." Science **275**: 77-79.

Shoemaker, R., J. Deng, W. Wang und K. Zhang (2010). "Allele-specific methylation is prevalent and is contributed by CpG-SNPs in the human genome." Genome Research **20**: 883-889.

Smith, F., A. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski, A. Sandilands, C. LE und Y. Zhao (2006). "Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris." Nat Genet **38**: 337-342.

Soyfoo, M., J. Roth, T. Vogl, R. Pochet und G. Decaux (2009). "Phagocyte-specific S100A8/A9 protein levels durin disease exacerbations and infections in systemic lupus erythematosus." J Rheumatol **36**(10): 2190-2194.

Strachan, D. (1989). "Hay fever, hygiene, and household size." BMJ **299**: 1259-1260.

Strickland, F., A. Hewagama, A. Wu, A. Sawalha, C. Delaney, M. Hoeltzel, R. Yung, K. Johnson, B. Mickelson und B. Richardson (2013). "Diet influences expression of autoimmune-associated genes and disease severity by epigenetic mechanisms in a transgenic mouse model of lupus." Arthritis Rheum **65**(7): 1872-1881.

Suarez-Farinas, M., M. Lowes, L. Zaba und E. al. (2010). "Evaluation of the psoriasis transcriptome across different studies by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)." PLoS ONE **5**: e10247.

Sun, L., F. Xiao, Y. Li, W. Zhou, H. Tang, A. Franke, S. Weidinger, Z. Yao und X. Zhang (2011). "Genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Chinese Han population." Nat Genet **43**(7): 690-694.

Suomela, S., L. Cao, A. Bowcock, U. Saarialho-Kere (2004). "Interferon alpha-Inducible Protein 27 (IFI27) is Upregulated in Psoriatic Skin and Certain Epithelial Cancers." J Invest Dermatol(122): 717-721.

Takai, D. und P. Jones (2002). "Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(6): 3740-3745.

Tang, T., T. Bieber und H. Williams (2012). "Does "autoreactivity" play a role in atopic dermatitis?" J Allergy Clin Immunol **129**(5): 1209-1215.

Tarutany, Y. und S. Takayama (2011). "Monoallelic gene expression and its mechanisms." Current Opinion in Plant Biology **14**: 608-613.

Team, R. D. C. (2011). "R: A language and environment for statistical computing. ." R Foundation of statistical computing.In.

Weidinger, S., L. Rümmler, N. Klopp, S. Wagenpfeil, H. Baurecht, G. Fischer, R. Holle, A. Gauger, T. Schäfer, T. Jakob, M. Ollert, H. Behrendt, H. Wichmann, J. Ring und T. Illig (2005). "Association study of mast cell chymase polymorphisms with atopy." Allergy **60**(10): 1256-1261.

Weidinger, S., T. Illig, H. Baurecht, A. Irvine, E. Rodriguez, A. Diaz-Lacava, N. Klopp, S. Wagenpfeil, Y. Zhao, H. Liao, S. Lee, C. Palmer, C. Jenneck, L. Maintz, T. Hagemann, H. Behrendt, J. Ring, M. Nothen, W. McLean und N. Novak (2006). "Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations." J Allergy Clin Immunol **118**(1): 214-219.

Weidinger, S., M. O'Sullivan, T. Illig, H. Baurecht, M. Depner und E. Rodriguez (2008). "Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children." J Allergy Clin Immunol **121**: 1203-1209.

Weidinger, S. und A. Irvine (2011). Genetics of eczema. Pediatric Dermatology. A. Irvine, A. Oranje and N. Prose. London Vercelli, Blackwell Science.

White, G. P., E. M. Hollams, S. T. Yerkovich, A. Bosco, B. J. Holt, M. R. Bassami, M. Kusel, P. D. Sly und P. G. Holt (2006). "CpG methylation patterns in the IFN γ promoter in naive T cells: variations during Th1 and Th2 differentiation and between atopics and non-atopics." Pediatr. Allergy Immunol **17**: 557-564.

Wickens, K., J. Lane und P. Fitzharris (2002). "Farm residence and exposures and the risk of allergic diseases in New Zealand children." Allergy **57**: 1171-1179.

Williams, H. und E. al. (1994). "The UK Working Party's Diagnostic Criteria for Atopic Dermatitis. I. Derivation of a minimum set of discriminators for atopic dermatitis." Br J Dermatol **131**(3): 383-396.

Wise, F. und M. Sulzberger (1993). The 1933 year book of dermatology and syphilology. Chicago, Year Book Publishers.

Xu, X., W. Wu, W. Tu, H. Chu, X. Zhu, M. Liang, Y. Xue, J. Wang und H. Zou (2013). "Increased expression of S100A8 and S100A9 in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. A correlation with organ involvement and immunological abnormalities." Clin Rheumatol.

Yang, C., A. G. Chapman, A. D. Kelsey, J. Minks, A. M. Cotton und C. J. Brown (2011). "X-chromosome inactivation: molecular mechanisms from the human perspective." Human Genetics **130**: 175-185.

Yang, I. und D. Schwartz (2012). "Epigenetic mechanisms and the development of asthma." J Allergy and Clin Immunol **130**: 1243-1255.

Yoo, C. B. und et al. (2006). "Epigenetic therapy of cancer: past, present and future." Nature reviews. Drug discoveries **5**: 37-50.

Zeilinger, S., B. Kühnel, K. N, H. Baurecht, A. Kleinschmidt, C. Gieger, S. Weidinger, E. Lattka, J. Adamski, A. Peters, K. Strauch, M. Waldenberger und T. Illig (2013). "Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation." PLoS One **8**(5): e63812.

Zhou, X., J. Krueger, M. Kao und e. al. (2003). "Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63, 100-element oligonucleotide array." Physiol Genomics **13**: 69-78.

9 Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Stephan Weidinger für die Bereitstellung dieses tollen Themas und die wunderbare Betreuung in den letzten Jahren.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Elke Rodriguez, der wahrscheinlich besten Betreuerin der Welt, für die unermüdliche Unterstützung und warmherzige Betreuung, sogar aus dem fernen Norden.

Auch möchte ich mich herzlich bei Herrn PD Dr. Thomas Illig für die Möglichkeit bedanken, die Experimente im Rahmen seiner Arbeitsgruppe am Institut für Epidemiologie des Helmholtz-Zentrums München durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Ring danke ich sehr für die Möglichkeit im Fachbereich Dermatologie und Allergologie zu promovieren.

Allen Mitarbeitern aus dem Institut für Epidemiologie des Helmholtz-Zentrums München danke ich für die vielen Hilfestellungen, die Einarbeitung, die konstruktiven Gespräche und die tolle Atmosphäre. Vor allem danke ich Dr. rer. nat. Norman Klopp für die fachlichen Ratschläge, Hansjörg Baurecht für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung, Sonja Zeilinger und Anja Kleinschmidt für die aktive Begleitung des Projekts und allen technischen Assistentinnen des Labors, insbesondere Nadine Lindemann, Alexandra Nieme und Franziska Scharl.

Für die Unterstützung bei der Expressionsanalyse möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Holger Prokisch, Katharina Heim, Gertrud Eckstein und Katja Junghans bedanken.

Mein Dank geht auch an Prof. Dr. med. Natalija Novak, Dr. med. Liliana Cifuentes und Dr. Andrea Braun für die Hilfe bei der Gewinnung des Probenmaterials.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir durch ihre Liebe und Unterstützung stets Kraft und Halt geben. Meinem Vater möchte ich auch dafür danken, dass er mir jederzeit mit fachlichem Rat zur Seite steht.

Meinem Ehemann, Leonhard Wert, danke ich für die vielen Stunden, in denen er mir geduldig die Details der Textformatierung näher gebracht hat und dafür, dass er immer an meiner Seite steht.

10 Curriculum vitae

Zur Person

Name	Anna Franziska Wert, geb. Wahn
Geburtsdatum	30. August 1986
Geburtsort	Berlin
Nationalität	deutsch
Eltern	Prof. Dr. med. Hans Ulrich Wahn, Pädiater und Hochschullehrer Annemarie Wahn, Lehrerin

Schulbildung

09.1993 – 07.1997	Nordgrundschule Berlin Zehlendorf
07.2003 – 12.2003	Matthew Flinders Anglican College, Buderim, Australien
09.1997 – 07.2006	Evangelisches Gymnasium zum Grauen Kloster, Berlin

Medizinstudium

10.2006 – 03.2008	Medizinstudium an der Philipps-Universität Marburg
04.2008 – 03.2013	Medizinstudium an der Technischen Universität München

Famulaturen

08.2009	Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum Dritter Orden, Ludwig-Maximilians-Universität München
09.2010	Praxis für Kinderheilkunde von Dr. Friederike Nützenadel, Berlin
03.2011	Pädiatrische Ambulanz am Siriraj Hospital der Mahidol University, Bangkok, Thailand
08.2011	Pädiatrische Gastroenterologie am Dr.-von-Haunerschen Kinderspital der LMU München

Praktisches Jahr

02.2012 – 06.2012	Pädiatrie am Children's Hospital Boston, Harvard Medical School, Boston, USA
06.2012 – 10.2012	Innere Medizin am Rotkreuzkrankenhaus der Technischen Universität München
10.2012 – 12.2012	Allgemeinchirurgie am Kantonsspital Nidwalden der Universität Zürich, Stans, Schweiz
12.2012 – 01.2013	Kinderchirurgie am Klinikum Schwabing der Technischen Universität München

Weiterbildung

Seit 08.2013

Assistenzärztin an der Klinik für Pädiatrische Pneumologie,
Allergologie und Neonatologie der Medizinischen Hochschule
Hannover

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für

Medizin

der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung

vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Zelltypspezifische Methylierungs- und Expressionsmuster der atopischen Dermatitis

in Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein

unter der Anleitung und Betreuung durch

Prof. Dr. med. Stephan Weidinger

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5

angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Die vollständige Dissertation wurde in veröffentlicht. Die Fakultät für hat der Vorveröffentlichung zugestimmt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Ich habe bereits am bei der Fakultät für der Hochschule unter Vorlage einer Dissertation mit dem Thema die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis:

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

Hannover, den

Unterschrift