

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. E. Herting  
Sektion für Pädiatrische Pneumologie und Allergologie

---

Die Rolle der DNA-Methylierung der Adenylatzyklase bei  
Rhinovirus-Infektionen vor dem Hintergrund der  
Asthmapathogenese

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
aus der Sektion Medizin

vorgelegt von  
Johanna Koch-Schultze  
aus Köln

Lübeck 2022

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Markus Weckmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Klaas F. Franzen

Tag der mündlichen Prüfung: 07.09.2023

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.09.2023

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	6
Tabellenverzeichnis .....	7
Abkürzungsverzeichnis .....	8
<b>1</b> Einleitung.....	<b>11</b>
1.1 Asthma bronchiale.....	11
1.2 Asthmarelevante Pathomechanismen.....	13
1.3 Rhinoviren und Asthma .....	15
1.4 Das Enzym Adenylatzyklase und dessen Bedeutung für Inflammation und Asthma.....	17
1.5 Epigenetik .....	21
1.6 Fragestellung.....	24
<b>2</b> Material und Methoden .....	<b>26</b>
2.1 Material.....	26
2.2 Studienpopulation .....	26
2.3 DNA-Methylierungsanalyse und RNA-Sequenzierung in der Kohorte .....	27
2.4 <i>In vitro</i> Infektion mit humanem Rhinovirus-16.....	29
2.4.1 Beschichten der Zellkulturflaschen.....	29
2.4.2 Zellkultur primärer humaner Nasenepithelzellen .....	30
2.4.3 Infektion primärer humaner Nasenepithelzellen mit humanem Rhinovirus-16 .....	30
2.4.4 Zellkultur der Zelllinie BEAS-2B.....	31
2.4.5 Infektion der Zelllinie BEAS-2B mit humanem Rhinovirus-16.....	32
2.5 Probennahme nach Virusinfektion .....	33
2.6 Aufarbeitung von DNA und RNA .....	33
2.6.1 DNA und RNA-Konzentration .....	34
2.6.2 Qualitätsprüfung von DNA und RNA .....	34
2.7 Complementary DNA-Synthese .....	35
2.8 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR).....	36

2.9	Statistische Analysen .....	37
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Zusammensetzung der Studienpopulation .....	39
3.2	Einfluss von Alter und Geschlecht auf die DNA-Methylierung von ADCY9 .....	40
3.3	Einfluss der RVI auf die DNA-Methylierung bei Asthmatikern.....	42
3.4	Assoziation der Hospitalisierung und Behandlung mit systemischen Steroiden mit der DNA-Methylierung bei Asthmatikern .....	45
3.5	Assoziation der differentiellen Methylierung mit klinischen Aspekten bei Asthmatikern und Wheezern.....	47
3.5.1	Lungenfunktion.....	48
3.5.2	Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Blut .....	49
3.5.3	Atopie .....	51
3.5.4	Passive Rauchexposition.....	52
3.5.5	Behandlung mit SABAs .....	53
3.6	Korrelation von Methylierung und ADCY9-Expression .....	55
3.7	Einfluss einer RVI auf die ADCY9-Expression bei Asthmatikern und Nicht-Asthmatikern .....	57
3.8	Einfluss einer multiplen RVI auf die ADCY9-Expression einer Zellkultur humaner bronchialer Epithelzellen .....	58
3.8.1	Infektionskontrolle durch IL8.....	58
3.8.2	ADCY9-Expression in der Zellkultur .....	60
3.8.3	Powerkalkulation zur ADCY9-Expression in der Zellkultur .....	61
4	Diskussion .....	62
4.1	Methylierung und Expression von ADCY9 nach RVI in der Kohorte.....	63
4.2	Methylierung und Expression von ADCY9 nach multipler RVI in der Zellkultur .....	66
4.3	Methodenkritik .....	68
4.4	Mögliche Folgeexperimente .....	71
4.5	Botschaft für die Asthmapathogenese .....	73
4.6	Ausblick für die Asthmathherapie.....	74
5	Zusammenfassung.....	77

6	Literaturverzeichnis.....	78
7	Anhang.....	89
7.1	Materialverzeichnis.....	89
7.2	Ethikvotum.....	92
7.3	Abbildungen.....	93
7.3.1	Assoziation der differentiellen Methylierung mit der Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Blut.....	93
7.3.2	Assoziation der differentiellen Methylierung mit Atopie.....	95
7.3.3	Assoziation der differentiellen Methylierung mit einer SABA-Therapie.....	97
8	Danksagungen.....	99

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rolle der Adenylatzyklase in der Zelle. ....	18
Abbildung 2: Korrelation von DNA-Methylierung und Alter. ....	41
Abbildung 3: Einfluss der RVI auf die DNA-Methylierung. ....	45
Abbildung 4: Assoziation der DNA-Methylierung mit Hospitalisierung. ....	46
Abbildung 5: Assoziation der DNA-Methylierung mit der Anzahl der eosinophilen Granulozyten. ....	49
Abbildung 6: Assoziation der DNA-Methylierung mit Atopie. ....	51
Abbildung 7: Assoziation der DNA-Methylierung mit einer SABA Therapie. ....	54
Abbildung 8: Regressionsgerade der Korrelation von ADCY9-mRNA-Expression und spezifischen DNA-Methylierungen. ....	57
Abbildung 9: Einfluss einer multiplen RVI auf die RNA-Expression von ADCY9. ....	58
Abbildung 10: Infektionskontrolle durch IL8. ....	59
Abbildung 11: RNA-Expression von ADCY9 nach Mehrfachinfektion in Zellkultur. ....	60
Abbildung 12: Assoziation der DNA-Methylierung weiterer CpG-Loci mit der Anzahl der eosinophilen Granulozyten. ....	94
Abbildung 13: Assoziation der DNA-Methylierung weiterer CpG-Loci mit Atopie. ....	96
Abbildung 14: Assoziation der DNA-Methylierung weiterer CpG-Loci mit einer SABA Therapie. ....	98

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lagebestimmung der CpG-Loci mittels UCSC Genome Browser. ....	28
Tabelle 2: Thermo-Cycler-Programm zur cDNA-Synthese. ....	35
Tabelle 3: Beschreibung der Studienpopulation.....	40
Tabelle 4: Korrelation von DNA-Methylierung und Alter.....	41
Tabelle 5: Assoziation der DNA-Methylierung mit dem Geschlecht.....	42
Tabelle 6: Assoziation der DNA-Methylierung mit Hospitalisierung.....	46
Tabelle 7: Assoziation der DNA-Methylierung mit Steroidtherapie und Hospitalisierung. ....	47
Tabelle 8: Assoziation der differentiellen DNA-Methylierung mit der Lungenfunktion bei Asthmatikern. ....	48
Tabelle 9: Assoziation der differentiellen DNA-Methylierung mit der Anzahl der eosinophilen Granulozyten.....	50
Tabelle 10: Einfluss von Atopie bei Asthmatikern/Wheezern auf die differentielle DNA-Methylierung.....	52
Tabelle 11: Einfluss von passiver Rauchexposition auf die differentielle DNA-Methylierung.....	53
Tabelle 12: Einfluss inhalativer Betamimetika auf die differentielle DNA-Methylierung bei Asthmatikern.....	54
Tabelle 13: Korrelationsanalyse der mRNA-Expression von ADCY9 und DNA-Methylierung...	55
Tabelle 14: Power-Kalkulation Infektionsversuche.....	61

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
β <sub>2</sub>	Beta-2-Rezeptor
Δ	Delta
ΔΔ	Deltadelta
<b>A</b>	Wellenlänge
ADCY	Adenylatzyklase
ADCY9	Adenylatzyklase 9
ATP	Adenosintriphosphat
Avg.	Durchschnitt, engl. <i>average</i>
<b>B-Zellen</b>	B-Lymphozyten
BEAS-2B	primäre humane Bronchialzellen
BEBM™	<i>Bronchial Epithel Cell Growth Basal Medium™</i>
BEGM™	<i>Bronchial Epithelial Cell Growth Medium™</i>
bp	Basenpaare
<b>cAMP</b>	cyclisches Adenosinmonophosphat
cas9	<i>CRISPR associated Protein 9</i>
CDHR3	<i>cadherin-related family member 3</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CpG	Basenpaarung von Cytosin und Guanosen
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short <b>p</b>allidrome repeats</i>
crRNA	CRISPR-RNA
CT	<i>threshold-cycle</i>
<b>dd</b>	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZL	Deutsches Zentrum für Lungenforschung
<b>EB</b>	Elutionspuffer, engl. <i>elution buffer</i>
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum
FDR	Falscherkennungsrate, engl. <i>false discovery rate</i>
FeNO	Fraktion des exhalieren Stickstoffmonoxids
FEV <sub>1</sub>	forciertes expiratorisches Einsekundenvolumen
FEV <sub>1</sub> /FVC	relative Sekundenkapazität
FVC	forcierte Vitalkapazität
<b>G-Protein</b>	Guanosintriphosphat-bindendes Protein

G <sub>s</sub>	stimulierendes G-Protein
<b>h</b>	Stunden, engl. <i>hours</i>
HBEC	<i>human bronchial epithelial cells</i>
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
<b>ICAM-1</b>	interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IgE	Immunglobulin E
IFN	Interferon
IL	Interleukin
<b>kb</b>	Kilo-Basenpaare
K	Kontrolle
<b>LABA</b>	Langwirksames Beta-2-Mimetikum, engl. <i>long-acting beta2-agonist</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
<b>min.</b>	Minuten
miRNA	mikro RNA
MOI	Multiplizität der Infektion, engl. <i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
<b>n</b>	Anzahl
NEC	primäre nasale Epithelzellen
NTP	Nukleotidtriphosphat
NEU1	Neuraminidase 1
NO	Stickstoffmonoxid
<b>p</b>	p-Wert
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PKA	Proteinkinase A
<b>QC</b>	Qualitätskontrolle
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
<b>rcf</b>	relative Zentrifugalkraft
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
RPKM	<i>Reads Per Kilobase Million</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RS(V)	respiratorische Synzytial Viren
RT	Raumtemperatur
RV	Humanes Rhinovirus

RV16	Humanes Rhinovirus Typ 16
RVI	Humane Rhinovirus-Infektion
<b>s</b>	<b>Sekunden</b>
SABA	Kurzwirksames Beta-2-Mimetikum, engl. <i>short-acting beta2-agonist</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
<b>Tab.</b>	<b>Tabelle</b>
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
Th2	T-Helferzelle Typ 2
THAM	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tracrRNA	<i>trans-activating RNA</i>
T-Zellen	T-Lymphozyten
<b>UV</b>	<b>Ultra Violett</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Asthma bronchiale

Das Asthma bronchiale stellt im Kindesalter eine der häufigsten nicht übertragbaren chronischen Erkrankungen dar. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation waren im Jahr 2019 schätzungsweise 262 Millionen Menschen betroffen [1,2].

Die Erkrankung stellt somit ein globales Gesundheitsproblem dar, welches zu einer reduzierten Lebenserwartung und verminderten Lebensqualität in allen Altersklassen beiträgt. Dabei ist die Hospitalisierung von Betroffenen ein indirekter Indikator für die Inzidenz von schweren Asthmaformen. Während in Nationen mit hohem Einkommen in den letzten Jahren ein Rückgang der stationären Behandlung von Asthmapatienten verzeichnet wurde, herrscht insbesondere in weniger entwickelten Ländern eine Unterversorgung beispielsweise durch mangelnde Verfügbarkeit und Durchführung einer angemessenen medikamentösen Therapie [3]. Als weitere Risikofaktoren hierfür werden z.B. Tabakkonsum, passive Tabakrauchexposition, Luftverschmutzung in Innenstädten und genetische Einflüsse diskutiert [4–6].

In Deutschland wurden durch das Robert-Koch-Institut anhand der Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen (KiGGS) mit mehr als 10 000 Teilnehmern umfangreiche Daten zur Epidemiologie von Asthma bronchiale ausgewertet, welche im Rahmen der Basiserhebung (2003-2006) sowie Folgerhebungen (2009-2012 und 2014-2017) ermittelt wurden [7]. Die 12-Monats-Prävalenz von Asthma bronchiale bei Kindern und Jugendlichen lag demnach bei 3,5% [8]. Dieser Wert liegt in den letzten Jahren auf einem stabil hohen Niveau. Zwischen dem weiblichen und männlichen Geschlecht wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Inzidenz (3,4%), Remission (65% nach 10 Jahren) und Persistenz (35% nach 10 Jahren) von Asthma bronchiale festgestellt [9].

Im Kindesalter ist Asthma bronchiale mit einem erhöhten Bedarf an Akutmedizin verbunden, führt zu Fehltagen in der Schule und beeinträchtigt die Lebensqualität z.B. durch Vermeidung körperlicher Aktivitäten. Um diese Situation zu verbessern, ist es wichtig insbesondere das Grundverständnis von Asthma bronchiale zu verbessern und die Pathomechanismen weiter

aufzuschlüsseln, um Fortschritte in der Prävention und Behandlung bewirken zu können [10–12].

Im Allgemeinen beruht das Grundverständnis von Asthma bronchiale zunächst auf der Beschreibung des heterogenen Symptomkomplexes, welcher durch Entzündungsprozesse der kleinen und mittleren Atemwege hervorgerufen wird und durch eine variable Atemwegsobstruktion mit bronchialer Hyperreagibilität gekennzeichnet ist. Die klinische Symptomatik verhält sich zeitlich variabel, tritt in wechselnder Intensität auf und präsentiert sich durch ein thorakales Engegefühl, trockenen Reizhusten sowie Kurzatmigkeit [13,14].

Die Atemnebengeräusche können durch Giemen, Brummen und Pfeifen charakterisiert sein. Dieser Symptomkomplex wird auch unter dem englischen Begriff *wheezing* (annähernd engl. Übersetzung für „Pfeifen/Keuchen“) zusammengefasst [15,16]. Die Definition eines *Wheezers* ist vor allem bei der Diagnosefindung von Asthma bei Säuglingen und Kleinkindern hilfreich, wenn beispielsweise eine Spirometrie aufgrund mangelnder Compliance (z.B. altersbedingt) nicht durchführbar ist [17].

Mittels Spirometrie bzw. *peak-flow* (engl. Spitzendurchfluss) Messung kann eine Obstruktion bei älteren Kindern unter guter Mitarbeit quantifiziert werden. Ein wesentlicher Parameter der Spirometrie ist der *Tiffeneau-Index* (relative Einsekundenkapazität), welcher durch Division des forcierten expiratorischen Einsekundenvolumens ( $FEV_1$ ) durch die Vitalkapazität (FVC) berechnet wird. Bei einer obstruktiven Ventilationsstörung ist der *Tiffeneau-Index* auf altersabhängige Werte unterhalb der 5. Perzentile vermindert. Die Asthma bronchiale kennzeichnende Reversibilität einer Obstruktion kann anschließend mittels Bronchodilatationstest gemessen werden, bei dem das  $FEV_1$  nach Inhalation eines kurzwirksamen Beta-Mimetikums erneut bestimmt wird [18].

Die Behandlung von Asthma bronchiale richtet sich aktuell nach einem Stufenschema, anhand dessen je nach Symptomkontrolle eine Therapieeskalation bzw. Deseskalation empfohlen wird [13]. Hierunter kann in den meisten Fällen eine gute Symptomkontrolle erzielt und Spätfolgen reduziert bzw. vermieden werden. Dennoch leiden bei den Patienten mit schweren Asthmaformen etwa 3,6% trotz maximaler medikamentöser Therapie und guter Adhärenz unter einer schlechten Symptomkontrolle mit hoher Krankheitslast [19]. Um insbesondere diesem Patientenkollektiv eine bessere individuelle Behandlung zu ermöglichen, werden die bisher bekannten klinischen Phänotypen hinsichtlich des zugrundeliegenden Pathomechanismus aktuell genauer erforscht [20–22].

Die Gruppe der Wheezer kann entsprechend der klinischen Symptomatik zwei klinischen Phänotypen zugeordnet werden, welcher eine Therapieentscheidung beeinflussen kann. Die gängige Charakterisierung der Wheezer erfolgt in eine Gruppe mit „episodic viral wheeze“ (Auftreten virus-assoziiertes Exazerbationen mit intermittierender Symptombefreiheit) und eine Gruppe mit „multitrigger wheeze“ (durch Umwelteinflüsse ausgelöste Exazerbationen mit intermittierender Symptompersistenz) [23]. Diese berücksichtigt jedoch nicht die Schwere und Häufigkeit der Symptomatik und differenziert nicht ausreichend hinsichtlich nicht-asthmatischer Ursachen für eine wheezing Symptomatik, deren Kenntnisse jedoch wesentliche Behandlungskriterien bzgl. einer Therapieentscheidung und Therapiekontrolle darstellen [17,24]. Um eine Objektivierung dieses heterogenen Bildes zu ermöglichen und eine optimale individualisierte Behandlung zu erzielen, ist insbesondere das molekulare Grundverständnis von asthmarelevanten Pathomechanismen auch in dieser Altersgruppe von großer Bedeutung.

## 1.2 Asthmarelevante Pathomechanismen

Die Pathogenese von Asthma bronchiale ist noch nicht vollständig verstanden.

Bei den meisten Kindern und Jugendlichen ist Asthma bronchiale allergisch bedingt und entsteht aufgrund einer allergischen Sensibilisierung des Immunsystems [14,16].

Endogene Faktoren der allergischen Komponente von Asthma bronchiale konnte insbesondere auf zellulärer Ebene bereits tiefergehend erforscht werden.

Zu den endogenen Faktoren gehören eine Überexpression proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren, die von T-Zellen, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten produziert werden [25–27]. T-Helferzellen (Th) bilden Interleukin (IL)-4 und IL-13, steuern darüber die Ausschüttung von Immunglobulin (Ig)E und beeinflussen eosinophile Granulozyten über IL-5 [28]. Die eosinophile Entzündungsreaktion tritt bei etwa 40-60% der Patienten mit einer schweren Asthmaform auf und wird auch bei der Einteilung von Asthma Endotypen in „Th2-high“ (eosinophil) und „Th2-low“ (nicht-eosinophil) berücksichtigt [29].

Patienten mit schwerem, allergischem Asthma weisen hohe IgE-Level im Serum auf und sprechen in der Regel gut auf eine Anti-IgE-Therapie an. Auf der anderen Seite zeigen Patienten mit schwerem nicht-allergischem Asthma häufig eine Resistenz gegenüber einer

Therapie mit Glukokortikoiden. Hierfür verantwortlich sein können eine Dysfunktion am Glukokortikoid-Rezeptor oder eine Reduktion des Enzyms Histon-Deacetylase [30,31]. Histon-Modifikationen sind Teil epigenetischer Steuerungsmechanismen in der Zelle [32]. Diese Steuerungsmechanismen werden als wichtiger Aspekt in der Asthmapathogenese gesehen und werden im späteren Abschnitt genauer erläutert [33].

Neben den endogenen Faktoren sind auch exogene Faktoren an der Asthmapathogenese beteiligt. Hierzu gehören beispielsweise bestimmte Allergene, die besonders mit atopischem Asthma assoziiert sind. Das Allergenlevel in geschlossenen Räumen weist eine positive Korrelation mit Asthmasymptomen auf, wobei insbesondere der Zeitpunkt der Sensibilisierung und das Alter entscheidend sind [16,34–36]. Eine wichtige Rolle bei bakteriell ausgelösten Asthmaxazerbationen spielt das mikrobielle Lipopolysaccharid (LPS), ein Endotoxin und Bestandteil der Zellmembran gram-negativer Bakterien, welches primär eine neutrophile Entzündungsreaktion in den Atemwegen auslösen kann [37]. Allerdings kann eine erhöhte Exposition mit diesem Endotoxin im frühen Lebensalter durch Inhibierung von IL-13 protektiv wirken und dadurch negativ mit dem Auftreten von allergischem Asthma korrelieren [38,39].

Virale Infektionen führen im Gegensatz zu bakteriellen Infektionen häufig zu einer akuten Exazerbation der Symptomatik. Atemwegsinfekte, die mit Asthmasymptomen (Husten, Giemen, Pfeifen, Brummen) einhergehen sind besonders bei Kleinkindern im Alter von 1-2 Jahren sehr verbreitet [16,40]. Diese Infekte werden hauptsächlich von RS-Viren (Respiratorische Synzytial-Viren), humanen Rhinoviren, Parainfluenza- und zu einem geringeren Anteil von Adeno-, humanen Metapneumo-, Influenza- und Coronaviren ausgelöst [6,16,41,42].

Während die Symptome bei atopischem Asthma häufig bis in das Erwachsenenalter persistieren, werden die Symptome bei Virus-assoziiertem Asthma mit zunehmendem Alter eher weniger [29]. Beiden Formen gemein ist eine aberrante und übermäßige Abwehrreaktion des Immunsystems, die zu entzündlich bedingten Gewebeschäden in den Atemwegen und zu einer verstärkten Reaktion auf bronchokonstriktorisch wirkende Reize führt. Dieser Krankheitsprozess beginnt in den meisten Fällen im frühen Kindesalter und erstreckt sich dann häufig über mindestens 10 Jahre [43,44]. Dabei kommt es durch die chronische Entzündung zu reaktiven Umbauprozessen mit Hypertrophie und Hyperplasie glatter Muskelzellen sowie einer Fibrose durch aktivierte Fibroblasten. Diese sezernieren proinflammatorische

Signalproteine und führen so zu einer Kommunikation zwischen den bronchialen Epithelzellen mit der extrazellulären Matrix sowie einer Stimulation zur Hypervaskularisation, wodurch wiederum die klinische Symptomatik verstärkt wird [45–47].

Um das Verständnis dieser komplexen Interaktion aus multiplen endogenen und exogenen Faktoren zu verbessern und die Heterogenität des klinischen Bildes zu erklären, wird schon seit einigen Jahren die Interaktion des Genoms mit dessen Umwelt molekulargenetisch genauer erforscht [21,48].

Ziel ist es weitere Endotypen entsprechend Patientengruppen mit gleichem zugrundeliegenden Wirkmechanismus zu identifizieren, die dadurch von einer präzisierten Behandlung profitieren können, beispielsweise durch Biologika wie den monoklonalen IL-5-Antikörper Mepolizumab. Außerdem kann die Kenntnis des Endotyps eine Indikation zur Therapieeskalation darstellen [29,49].

Auf molekularer Ebene wurden anhand von genomweiten Assoziationsstudien bereits mehr als 100 Gene im Zusammenhang mit Asthmaanfälligkeit identifiziert. Bei den Genen handelt es sich beispielsweise um solche, die bei der Expression von Bestandteilen der epithelialen Matrix sowie glatten Muskelzellen beteiligt sind und somit eine wichtige Rolle am Erhalt der Epithelfunktion darstellen. Beispiele hierfür sind die Gene *ORMDL3* und *GSDMB*, welche eine starke Assoziation mit kindlichem Asthma bronchiale gezeigt haben, insbesondere bei denjenigen die einer Exposition gegenüber Tabakrauch als Umweltfaktor ausgesetzt waren [50,51].

### 1.3 Rhinoviren und Asthma

Bei den Rhinoviren handelt es sich um den häufigsten exogenen Auslöser einer Asthma Exazerbation im Kindesalter [52].

Allgemein gehören Humane Rhinoviren (RV) zur Familie der Picornaviren. Es handelt sich um positive RNA-Viren mit einem einzelsträngigen RNA-Genom von denen bisher etwa 150 Serotypen identifiziert wurden. In epidemiologischen Studien zur Serotypen-Zirkulation wurde herausgefunden, dass sich diese stabil verhalten und keinem Antigen-Drift unterziehen

[53–56]. Anhand ihrer Genstruktur wurden die Serotypen in drei genetisch unterschiedliche Gruppen A, B und C unterteilt [53,57].

Über 50% der Infekte der oberen Atemwege werden durch RV ausgelöst. Infekte der unteren Atemwege, z.B. Bronchiolitiden können ebenfalls von RV ausgelöst werden und führen dann zu akuten Asthma-Symptomen [58,59]. Infantiles wheezing (Alter 0-3 Jahre) wird häufig durch eine RV-Infektion (RVI) ausgelöst und ist zusätzlich mit einem hohen Risiko für erneutes Auftreten von wheezing im Kleinkindalter verbunden [6]. Wiederholte schwere virale Infektionen mit RV steigern das Asthmarisiko bis um das zehnfache. Liegt bereits eine asthmatische Erkrankung vor können virale Infekte zu Verschlechterungsschüben führen, insbesondere bei bestehender Atopie [25,26,43]. Für Infekte der unteren Atemwege werden vor allem RV vom Typ A und C verantwortlich gemacht. Diese lösen vergleichsweise stärkere Symptome aus, wobei Kinder unter fünf Jahren deutlich häufiger eine stationäre Behandlung benötigen [60,61].

Ein möglicher Faktor bei der Asthmapathogenese durch eine Infektion mit RV Typ C ist ein Polymorphismus des transmembranären Proteins CDHR3 (engl. *Cadherin-related family member 3*), welches einen Eintrittsfaktor für RV Typ C in die Epithelzellen der Atemwege darstellt [60,62,63]. Eine als „minor group“ bezeichnete Untergruppe der RV vom Typ A binden an LDL-Rezeptoren (engl. low-density lipoprotein). Die übrigen RV vom Typ A und B bilden mit über 90% die „major group“ und binden an das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1). Die RV werden dann über Endozytose in Zilien tragende nasale Epithelzellen aufgenommen. Das in dieser Arbeit untersuchte RV-16 gehört zur „major group“ [56,57,59].

Die meisten RV-Infektionen betreffen Kinder im Alter von unter zwei Jahren [64]. In diesem Zeitraum adaptieren sich die Atemwege an Umwelteinflüsse, um auf exogene Stimuli reagieren zu können. Im Wachstum finden strukturelle Umbauprozesse statt, wie zum Beispiel die Alveolarisierung, Epithelveränderungen, Vergrößerung des Atemwegsdurchmessers sowie deren neuronale Verschaltung. Es besteht die Möglichkeit, dass der spätere Phänotyp der Atemwege durch viral induzierte strukturelle und funktionelle Veränderungen vor allem in der frühen postnatalen Phase beeinflusst und hier eine Art Gedächtnisanlage stattfindet, wodurch die Grundlage für die spätere Entstehung von Asthma bronchiale gebildet wird [16,43,65,66]. Eine wichtige Rolle dabei spielen Sensorzellen des angeborenen Immunsystems (z.B. dendritische Zellen), die mit Hilfe von Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) nicht körpereigener Bestandteile von Zellen (z.B.

virale RNA) erkennen und so eine Th2-vermittelte adaptierte Immunantwort auslösen können [67–69].

Aktuell werden Multiplex-PCR-Assays verwendet, um Viren wie die RVs bei respiratorischen Infekten zu detektieren [70]. Während zur Prävention einer schweren RSV-Infektion eine Passivimmunisierung mit dem monoklonalen Antikörper Palivizumab für bestimmte Risikogruppen wie Frühgeborene oder Kinder mit angeborenen Herzfehlern saisonal empfohlen ist, konnte aufgrund der hohen Anzahl von Serotypen, bei denen sich die Antigen kodierenden Sequenzen sehr stark voneinander unterscheiden, noch kein spezifischer Impfstoff zur Prävention einer RVI entwickelt werden [57,71,72]. Ebenfalls gibt es derzeit noch keine zugelassenen RV spezifischen antiviralen Medikamente. Antivirale Therapieansätze bei Asthmapatienten sind Gegenstand aktueller Forschung, wobei unter anderem das viruskapsidbindende Medikament Pleconaril genauer untersucht wird, welches die Freisetzung der viralen Nukleinsäure hemmt [55,73,74].

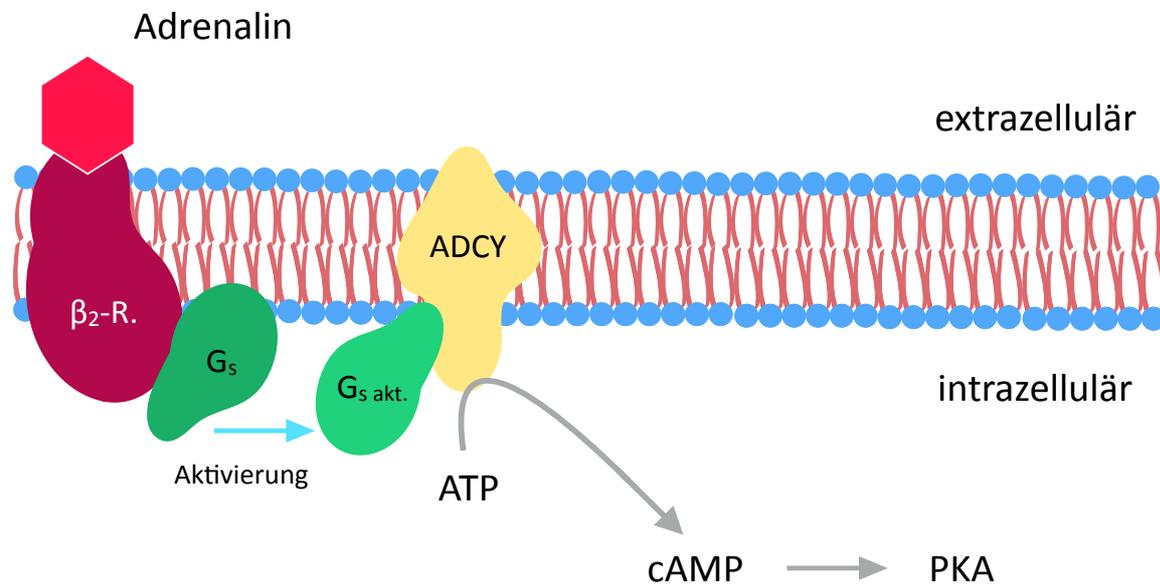
Wie eine durch RVI hervorgerufene akute Exazerbation mit der Entstehung von Asthma bronchiale pathophysiologisch zusammenhängt, ist auf molekulargenetischer Ebene noch nicht genau verstanden und wurde in dieser Arbeit genauer untersucht.

#### 1.4 Das Enzym Adenylatzyklase und dessen Bedeutung für Inflammation und Asthma

Der Fokus der molekulargenetischen Untersuchung dieser Arbeit liegt auf einem für das Enzym Adenylatzyklase kodierenden Genabschnitt.

Allgemein handelt es sich bei Adenylatzyklasen (ADCYs) um weit verbreitete Signalproteine, die unterschiedlichste intra- und extrazelluläre Reize in ein einheitliches intrazelluläres Signal verarbeiten können [75]. Die ADCYs reagieren typischerweise auf stimulierende und inhibierende Reize, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt werden. G-Proteine interagieren dann mit den ADCYs, die als Enzym die Synthese von intrazellulärem ATP zum *second-messenger* (engl. sekundärer Botenstoff) cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) katalysieren. cAMP entfaltet seine Wirkung durch Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), die wiederum andere zelluläre Proteine und damit eine Vielzahl zellulärer Prozesse durch Phosphorylierung steuert [76]. Die Regulation der ADCY-Aktivität

über Beta-Rezeptoren ist heute besonders gut verstanden. Durch Agonisten (z. B. Adrenalin) am  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor werden stimulierende G-Proteine ( $G_s$ ) aktiviert und so die ADCY angeregt (s. Abb. 1) [77–81].



**Abbildung 1: Rolle der Adenylatzyklase in der Zelle.**

Schematische Darstellung einer Zellmembran: Transmembranär befinden sich der  $\beta_2$ -Rezeptor ( $\beta_2$ -R.) und die Adenylatzyklase (ADCY). Durch Bindung eines  $\beta_2$ -Agonisten, z.B. Adrenalin wird das intrazellulär an den  $\beta_2$ -Rezeptor gebundene G-Protein ( $G_s$ ) aktiviert und so die ADCY zur Katalyse von ATP zu cAMP angeregt. cAMP aktiviert dann die Proteinkinase A (PKA).

Quelle: Eigene Darstellung adaptiert aus *Lehninger Biochemie*, Nelson und Cox, S. 560, 2011.

Bisher wurden mindestens neun ADCY-Isoformen und zwei Splicevarianten der ADCY8 identifiziert. Diese weisen eine starke Homologie in der Primärstruktur des katalytischen Zentrums auf und zeigen vermutlich die gleiche Tertiärstruktur. Insgesamt werden die ADCYs ubiquitär im Gewebe exprimiert, wobei bestimmte Isoformen gewebespezifisch vorliegen. In dieser Arbeit wurde die Isoform ADCY9, welche ubiquitär gefunden wurde und gehäuft in Gehirn, Lunge und Skelettmuskel exprimiert wird, untersucht. Schwedische Forscher untersuchten die RNA-Expression von ADCY9 aus Lungengewebeproben von 9 Erwachsenen mittels RNA-Sequenzierung und zeigten, dass innerhalb der vorliegenden Zelltypen ein Anteil von durchschnittlich 5% von bronchialen Epithelzellen, 10% von Makrophagen und etwa 30% von Alveolar- sowie Endothelzellen exprimiert wird. Der restliche Anteil wurde weiteren un spezifizierten Zelltypen der Gewebeprobe zugeordnet [82].

Das ADCY9-Gen befindet sich auf dem humanen Chromosom 16p13.3 (134) und erstreckt sich über mehr als 150 kb und 9 Introns. ADCY9 kann im Gegenteil zu allen anderen ADCYs nicht durch Forskolin aktiviert werden und wird nicht direkt über  $\text{Ca}^{2+}$  und die G-Protein Untereinheiten  $\beta\gamma$  reguliert [83–85].

Aufgrund ihrer enzymatischen Funktion bei der Katalyse von cAMP, bilden die Adenylatzyklasen einen essenziellen Bestandteil für den Energiestoffwechsel der Zellen insbesondere in den Mitochondrien. Durch einen Anstieg der cAMP Konzentration werden mitochondriale Proteine der Atmungskette durch Phosphorylierung aktiviert, die an der Zellatmung beteiligt sind und so die Bereitstellung von ATP für den zelleigenen Energiespeicher steuern [86–89].

Umgekehrt wird die Zellatmung durch den Abbau von cAMP durch Phosphodiesterasen (PDE2A) geschwächt [85,90]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass cAMP Verbrauch durch Hemmung von mitochondrialer ADCY eine Abnahme von funktionellen Untereinheiten der Komplexe I und V der Atmungskette induziert und eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials bewirkt [91,92]. Diese Funktionseinschränkung der Atmungskette resultiert entsprechend in einer verminderten ATP-Synthese, wodurch ATP abhängige Zellmechanismen wie z.B. der ATPase abhängige transmembranäre Ionentransport in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Dadurch kommt es zu Elektrolytverschiebungen mit übermäßigem intrazellulärem sowie mitochondrialem Calciumeinstrom, Inflammation und letztendlich möglichem Zelltod durch Nekrose und Apoptose [93–95].

Die Apoptose wird durch Freisetzung proapoptotischer Proteine aus den Mitochondrien (z.B. Bad, Bax und Bak) in Interaktion mit unspezifischen Proteasen, sogenannten „Caspasen“ koordiniert und durch multiple cAMP-PKA abhängige Signalkaskaden reguliert [94,96,97]. Dabei erfolgt beispielsweise die Aktivierung einiger proapoptotischer Proteine (z.B. Bax und Bad) durch PKA-abhängige Phosphorylierung [98–100]. Im Gegensatz dazu konnte auch ein protektiver Einfluss von mitochondrialem cAMP auf die Apoptose beobachtet werden [101]. Typischerweise geht die Apoptose nicht mit einer direkten Inflammationsreaktion einher [96]. Dennoch konnte die mitochondriale Beteiligung in der Pathogenese von Asthma bronchiale in multiplen epidemiologischen und klinischen Studien mit erhöhten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Zusammenhang gebracht werden, welche als Nebenprodukt bei der ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien gebildet werden und eine Apoptose induzieren können [102].

In bronchialen Zellen von Asthmatikern konnten sowohl nach ROS bedingter Proteinschädigung der mitochondrialen Atmungskette als auch nach Allergenprovokation vermehrte ROS gemessen werden [103,104].

Ebenso können ROS durch Exposition gegenüber Umweltfaktoren wie Luftverschmutzung und Tabakrauch entstehen und bei einem Übersteigen der zelleigenen enzymatischen Abbaumechanismen (z.B. durch Peroxidase) Zellschädigungen hervorrufen [105–107]. ROS können eine Entzündungsreaktion in den Atemwegen auslösen, indem z.B. Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die eine vermehrte Genexpression proinflammatorischer Zytokine sowie Adhäsionsmoleküle neutrophiler Granulozyten bewirken [108–110].

Die ADCY bildet daher eine Schlüsselrolle in multiplen cAMP-abhängigen Signalkaskaden der mitochondrialen Apoptoseregulation und Zellatmung. In dem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob eine Beeinflussung der Genexpression der ADCY z.B. durch Umwelteinflüsse wie Tabakrauchexposition oder virale Infektionen eine Rolle in der Pathophysiologie von Atemwegsinflammation durch Schädigung mitochondrialer Stoffwechselprozesse und ROS Entstehung darstellt.

Aufgrund der Vielzahl komplexer Signalwege der G-Protein gekoppelte Rezeptoren, deren Signaltransduktion mittels ADCY vielfältige biologische Antworten hervorrufen können, sind noch viele weitere Mechanismen denkbar, welche durch eine verminderte Genexpression von ADCY zu diversen Fehlregulationen unterschiedlicher Systeme führen und eine Entzündungsreaktion hervorrufen können.

Im Immunsystem sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren z.B. in den Zellmembranen der Immunzellen (T- und B-Lymphozyten) verankert und Bestandteil von Reifung, Migration, Proliferation, Adhäsion und Suppression der Immunzellen sowie chemotaktischen Attraktion von Leukozyten an Entzündungsherden [111,112]. Eine Dysregulation dieser Prozesse kann mit Autoimmunität oder Allergie in Verbindung gebracht werden [113–116].

Im klinischen Kontext von Asthma bronchiale spielt das Enzym ADCY eine besondere Rolle in der Asthmatherapie. Hier werden als Bedarfsmedikation kurz- und langwirksame  $\beta_2$ -Sympathomimetika eingesetzt. Diese entfalten Ihre Wirkung ebenfalls durch die G-Protein  $G_s$  vermittelte Aktivierung der ADCY und dem daraus resultierenden Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration (Abb. 1) [117]. Diese Medikamente werden in der Regel inhalativ verabreicht und bewirken eine Relaxation der glatten Bronchialmuskulatur. Durch die

Bronchodilatation wird der Atemwegswiderstand gesenkt, die Atemarbeit reduziert sowie die gesamte Atemmechanik verbessert und die Ventilation der Lunge optimiert.

Im Jahr 2007 konnten Edwards et al. zeigen, dass das proinflammatorische Zytokin Interleukin-6 (IL-6) nach *in vitro* RVI einer Zellkultur bronchialer Epithelzellen (BEAS-2B) verstärkt exprimiert wird und dass dieser Effekt durch Anwendung von  $\beta_2$ -Sympathomimetika durch Aktivierung cAMP empfindlicher Transkriptionsfaktoren verstärkt wird. Umgekehrt dazu konnten die Forscher zeigen, dass eine Applikation von Glucocorticoiden diesem Effekt möglicherweise durch Hemmung dieser Transkriptionsfaktoren entgegenwirkt. Die Ergebnisse liefern Evidenz für die sinnvolle Indikation einer kombinierten Therapie aus  $\beta_2$ -Sympathomimetika und inhalativer Glucocorticoide bei viral bedingten Asthma Exazerbationen [118].

Ob eine verminderte Genexpression der ADCY durch virale Infektion(en) oder exogene Umwelteinflüsse ebenfalls den Wirkmechanismus von  $\beta_2$ -Sympathomimetika sowie inhalativer Glucocorticoide auf transkriptioneller Ebene beeinflusst und eine pathophysiologische Ursache für eine Verschlechterung des Asthmas darstellen könnte, wurde bisher nicht untersucht.

## 1.5 Epigenetik

Epigenetische Mechanismen beschreiben vererbare Veränderungen der Genaktivität in Unabhängigkeit von der zugrundeliegenden DNA-Sequenz, die im Laufe der Entwicklung und Zellproliferation auftreten und den Organismus auf Umwelteinflüsse reagieren lassen [119–121]. Während die genetischen, phänotypischen und transkriptionellen Aspekte von Asthma bronchiale schon gut charakterisiert wurden, befinden sich die epigenetischen Untersuchungen noch in ihren Anfängen.

Zu den Grundlagen epigenetischer Veränderungen gehören DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und Mikro-RNA (miRNA)-Regulation, deren Wirkmechanismen eine potentielle molekulare Erklärung für das Zusammenspiel von genetischen Komponenten mit Umwelteinflüssen in der Pathogenese von Asthma und Atopie darstellen [122–125]. Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um den Einbau von Methylgruppen an bestimmten Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG) Basenpaaren. Die DNA-Methylierung reguliert so die

Genexpression entweder direkt, indem die Bindung von Transkriptionsfaktoren gehemmt wird oder indirekt, durch die Rekrutierung von Histon assoziierten Proteinen und Chromatinumbau. Histon-Modifikationen beinhalten vor allem eine Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinylierung, wodurch die Chromatinstruktur und transkriptionelle Aktivität reguliert werden kann. Diese Reaktionen werden durch bestimmte Enzyme katalysiert, woraus sowohl unterdrückende als auch aktivierende Effekte resultieren können. Die Acetylierung führt zum Beispiel zu einer weniger dichten Ummantelung der DNA durch die Histon-Proteine, wodurch die DNA leichter für die Transkription zugänglich ist [122,126,127]. miRNAs sind sehr kleine nicht kodierende RNAs, die im Zytoplasma durch die Endoribonuklease Dicer in kurze doppelsträngige RNA-Fragmente geschnitten und anschließend über ein doppelsträngiges RNA-Bindeprotein entwunden und einzelsträngig werden. Diese einzelsträngige miRNA bildet dann einen Proteinkomplex mit Argonautproteinen, den sogenannten RNA-induced silencing Komplex (RISC). Die miRNA bildet dabei einen spezifischen Leitstrang für die komplementäre Ziel-mRNA, welche in den RISC mitaufgenommen und dadurch z.B. die Translation an den Ribosomen supprimiert werden kann. Zusätzlich kann das Argonautprotein zu einer Ribonuklease aktiviert werden und einen Abbau der Ziel-mRNA bewirken, wodurch die entsprechende Proteinbildung reduziert oder verhindert werden kann [122,128–130].

In den letzten Jahren konnten in epigenomweiten Assoziationsstudien DNA-Methylierungsprofile aus Vollblut im Zusammenhang mit kindlichem Asthma erstellt werden, wobei insgesamt eine verminderte DNA-Methylierung an unterschiedlichen CpGs beobachtet wurde, deren zugehörigen Gene mit einer Aktivierung von Eosinophilen und zytotoxischen T-Zellen in Verbindung gebracht werden [131–133].

Die klinische Forschungsgruppe (Allergy, Asthma and Immunology Research Unit) der Northwestern University, Chicago konnte im Jahr 2014 außerdem DNA-Methylierungsänderungen in nasalen Epithelzelle nach RVI feststellen. Die Forscher erstellten dabei ein Profil der DNA-Methylierung von primären nasalen Epithelzellen (NECs) bei Asthmatikern und gesunden Spendern, die jeweils *in vitro* mit dem humanen Rhinovirus (RV) infiziert wurden. Das Profil der gesamten DNA-Methylierung wurde mit dem Human Methylation450BeadChip Kit (Illumina) analysiert und dazu Loci-spezifische Methylierungen mittels Pyrosequenzierung detektiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die RVI einen signifikanten Anstieg der genomweiten DNA-Methylierung in Zellen von Asthmatikern auslösen kann.

Neben krankheitsbedingten DNA-Methylierungsänderungen, die nicht durch die RVI ausgelöst wurden, konnten jedoch auch einzigartige Änderungen des Methylierungsgrades durch die RVI in beiden Versuchsgruppen gemessen werden. In der Studie wurde zum ersten Mal beschrieben, dass Rhinoviren unterschiedliche epigenetische Modifikationen in Zellen der Atemwege von Asthmatikern und gesunden Probanden auslösen [134]. Diese Ergebnisse konnten inzwischen mehrfach bestätigt werden, unter anderem durch die Forschungsgruppe der Sektion Pädiatrische Pneumologie und Allergologie der Kinderklinik am UKSH Lübeck, deren Ergebnisse die Grundlage dieser Arbeit bilden [135,136]. Diese Erkenntnisse liefern daher möglicherweise eine molekulargenetische Erklärung für viral bedingte Asthma Progression.

In weiteren Forschungsarbeiten wurde neben der RVI auch der Einfluss von anderen exogenen Umweltfaktoren auf die DNA-Methylierung untersucht und gezeigt, dass eine Exposition gegenüber Tabakrauch und Luftverschmutzung sowie Nahrungsmittelsensibilisierung eine differentielle Methylierung auslösen und mit Asthma und Atopie assoziiert werden können [137–139].

Es bleibt zu erforschen ob weitere Gene durch exogene Faktoren wie die virusinduzierte Methylierungsänderung in ihrer Expression beeinflusst und dadurch Asthma assoziierte Proteine signifikant in Ihrer Funktion beeinträchtigt werden.

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurde in dieser Arbeit untersucht, inwiefern exogene Faktoren, z.B. eine RVI die Genexpression von ADCY in Epithelzellen durch differentielle DNA-Methylierung beeinflusst und mit kindlichem Asthma bronchiale assoziiert ist.

## 1.6 Fragestellung

Die Pathogenese von Asthma bronchiale beruht auf genetischen und exogenen Faktoren, deren Zusammenhang mit epigenetischen Veränderungen aktuell genauer erforscht wird, um das Grundverständnis der heterogenen Erkrankung zu verbessern und eine individualisierte Behandlung anzustreben.

Einen wichtigen Risikofaktor für die Entstehung von Asthma im Kindesalter stellt die Rhinovirus-Infektion (RVI) dar. Bei Asthmatikern führt diese häufig zu einer Infektexazerbation wobei außerdem ein verschlechtertes Ansprechen auf eine Therapie mit  $\beta_2$ -Sympathomimetika beobachtet wurde. Das vom  $\beta_2$ -Rezeptor gesteuerte Enzym Adenylatzyklase (ADCY) übernimmt eine essenzielle Funktion bei der intrazellulären Signalverarbeitung. Die exakten ursächlichen Pathomechanismen wurden bisher noch nicht hinreichend geklärt. Arbeiten verschiedener Forschungsgruppen haben gezeigt, dass epigenetische Modifikationen wie eine differentielle DNA-Methylierung an spezifischen Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG) Loci mit einer RVI assoziiert sein können. In unserer Arbeitsgruppe wurden die Methylierungsgrade von mehrfach durch RV-16 *in vitro* infizierten Beas-2Bs mittels des Human Methylation450 BeadChip Kit (Illumina) bestimmt und signifikante Veränderungen der DNA-Methylierung an bestimmten CpG-Loci gemessen, welche im ADCY9 kodierenden Gen lokalisiert sind.

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Charakterisierung der Methylierungsänderung am ADCY9-Gen in Epithelzellen nach wiederholten RVI und deren Assoziation mit asthmarelevanten Pathomechanismen sowie in der Charakterisierung der Beeinflussung der Expression von ADCY9 durch die RVI. Dazu wurden Methylierungsänderungen am ADCY9-Gen von Asthmatikern, Wheezern und Nicht-Asthmatikern einer pädiatrischen Studienpopulation untersucht sowie die DNA-Methylierung und RNA-Expression in einer Zellkultur humaner bronchialer Epithelzellen im Zusammenhang mit einer RV-16 Infektion gemessen.

Es wird hypothetisiert, dass eine differentielle DNA-Methylierung von ADCY9 mit asthmarelevanten Pathomechanismen assoziiert ist und die RNA-Expression der ADCY9 durch eine differentielle Methylierung nach RVI vermindert wird. Eine reduzierte Genexpression mit resultierender Enzymdysfunktion der ADCY kann eine Inflammation der Bronchialzelle begünstigen und eine Asthma Exazerbation mit reduziertem Ansprechen auf  $\beta_2$ -

Sympathomimetika auslösen. Zur Bestätigung der Hypothese wurden folgende Fragestellungen überprüft:

1. Haben Alter und Geschlecht Einfluss auf die DNA-Methylierung im ADCY9 Gen?
2. Nimmt eine RV-Infektion Einfluss auf die DNA-Methylierung von ADCY9 bei Asthmatikern, Wheezern und Nicht-Asthmatikern?
3. Korreliert die Hospitalisierung bzw. zusätzliche Behandlung mit systemischen Steroiden mit der DNA-Methylierung von ADCY9 in Asthmatikern?
4. Ist eine differentielle DNA-Methylierung von ADCY9 assoziiert mit gestörter Lungenfunktion, Anzahl der eosinophilen Granulozyten, Atopie, passiver Rauchexposition bzw. einer Behandlung mit SABAs bei Asthmatikern/Wheezern?
5. Wie korreliert die DNA-Methylierung mit der RNA-Expression von ADCY9 bei Asthmatikern/Nicht-Asthmatikern vor und nach einer RV-Infektion?
6. Verändert sich die mRNA-Expression der ADCY9 bei Asthmatikern/Nicht-Asthmatikern durch eine RV-Infektion?
7. Verändert sich die mRNA-Expression der ADCY9 einer Zellkultur humaner bronchialer Epithelzellen durch mehrfache RV-Infektion?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Eine Auflistung aller verwendeten Materialien, Chemikalien und Gerätschaften mit Herstellerangaben befindet sich im Anhang unter Punkt 7.1.

### 2.2 Studienpopulation

Zur Untersuchung der differentiellen DNA-Methylierung von ADCY9 in Assoziation mit einer RV-16-Infektion und asthmarelevanten Pathomechanismen wurden zwei Datensets zusammengefasst. Beide Studienpopulationen waren Teil der Kohorte der *All Age Asthma Cohort* (ALLIANCE) des *Deutschen Zentrums für Lungenforschung* (DZL). Die Durchführung der Studien des pädiatrischen Arms wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck mit ihrem Votum AZ 12-215 am 18.12.2012 genehmigt (s. Anhang 7.2).

Zur Teilnahme an der Studie mussten folgende Einschlusskriterien erfüllt werden:

Die Teilnehmer mussten ein Alter von 6 Monaten bis 18 Jahre erreicht haben, Reifgeboren sein ( $\geq 37$ . Schwangerschaftswoche) und ein gutes Verständnis der deutschen Sprache vorweisen. Nach einem Aufklärungsgespräch mussten die Sorgeberechtigten oder Teilnehmer selbst, insofern das achtzehnte Lebensjahr erreicht wurde, das schriftliche Einverständnis erklären.

Die Diagnose bei Asthmatikern (Alter  $\geq 6$  Jahre) musste ärztlich anhand der aktuellen Leitlinien der *Global Initiative for Asthma* (GINA) von 2014 gestellt werden. Dabei musste eine Obstruktion, die durch bronchiale Provokation auftrat und durch Bronchodilatoren reversibel war, dokumentiert werden. In der Lungenfunktion erfolgte die Messung der expiratorischen Einsekundenkapazität ( $FEV_1$ ) und der forcierten Vitalkapazität (FVC). Als Biomarker einer Atemwegsinflammation wurde außerdem die Fraktion des exhalierten Stickstoffmonoxids (FeNO) bestimmt.

Bei Wheezern (Alter  $< 6$  Jahre) mussten in den letzten 12 Monaten mindestens zwei Episoden mit einer wheezing Symptomatik aufgetreten und ebenfalls ärztlich diagnostiziert worden

sein. Gesunde Kontrollen wurden definiert als Kinder ohne Vorliegen von wheezing/Asthma bronchiale.

Alle Teilnehmer wurden körperlich untersucht, es wurde Blut abgenommen und ein Fragebogen zur Krankengeschichte ausgefüllt. Dabei wurde dokumentiert, ob eine ärztlich diagnostizierte Atopie vorlag, ob der Proband selbst geraucht hat oder im Haushalt eine Exposition gegenüber Tabakrauch bestand, ob eine Therapie mit SABAs erfolgte, ob aufgrund einer Asthma Exazerbation eine Hospitalisierung in den vergangenen 12 Monaten notwendig war und ob im Rahmen der Hospitalisierung eine Behandlung mit systemischen Steroiden erfolgte. Eine Naivität gegenüber Steroid-/Leukotrien-Rezeptorantagonisten wurde akzeptiert, insofern entweder keine Anwendung stattgefunden hat oder zu einer inhalativen/systemischen Anwendung ein Mindestabstand von vier Monaten eingehalten wurde. Im Blut wurde die Anzahl der eosinophilen Granulozyten als korrelierender Marker für den Schweregrad der Erkrankung gemessen [140].

Die Rekrutierung der ersten Studienpopulation erfolgte von Januar 2014 bis zum Februar 2015. Es wurden insgesamt 20 Probanden mit einem Anteil von 50% Asthmatikern und 50% Nicht-Asthmatikern eingeschlossen.

Die Rekrutierung der zweiten Studienpopulation erfolgte in den Jahren von Januar 2014 bis Mai 2018. Hier wurden insgesamt 83 Probanden eingeschlossen.

Als Ausgangsmaterial für die Infektionsversuche mit RV-16 wurden jeweils primäre nasale Epithelzellen durch je zwei Bürstenabstriche (Top Caredent AG, Zürich, Schweiz) pro Seite gewonnen. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Bürsten in einem 15 ml Falcon mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate-buffered-saline = PBS) aufbewahrt und auf Eis gelagert.

### 2.3 DNA-Methylierungsanalyse und RNA-Sequenzierung in der Kohorte

Die Bestimmung der DNA-Methylierung und RNA-Expression von ADCY9 in der Kohorte erfolgte in unserer Arbeitsgruppe, deren Ergebnisse mir freundlicherweise von Markus Weckmann und Martin Pech zur Auswertung zur Verfügung gestellt wurden. Die Verarbeitung der Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein am Campus Kiel.

Bei der ersten Studienpopulation (2014-2015) erfolgte die Isolation von RNA und DNA unter Verwendung des AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers. Die DNA-Konzentration wurde mit dem FLUOstar Omega-System (BMG-Labtech, Ortenberg, Deutschland) gemessen.

Die Bestimmung der DNA-Methylierung erfolgte mit dem HumanMethylation450 BeadChip (Illumina, San Diego, USA). Bei der zweiten Studienpopulation (2014-2018) erfolgte erneut die Bestimmung der DNA-Methylierung. Diese erfolgte hier mit dem neuen Illumina HumanMethylationEPIC BeadChip (EPIC). Im Vergleich zum 450K-Chip können bei diesem mit der gleichen Funktionsweise mehr als 850.000 CpGs gemessen werden, die zu etwa 90% mit den CpGs des 450K Chips übereinstimmen. Aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, dass die Messergebnisse der beiden Chipdaten miteinander kompatibel sind und daher die Ergebnisse zur DNA-Methylierung aus beiden Kohorten zusammengefügt werden können [141]. Zur Bestätigung dieser Annahme wurde in dieser Arbeit eine Probe mit beiden Chips gemessen und so gezeigt werden, dass sich die  $\beta$ -Werte jeweils nicht signifikant voneinander unterscheiden. Diese Probe (männlicher Asthmatiker, 13 Jahre alt) wurde nur einmal in die Auswertung einbezogen.

Der Methylierungsgrad einer Region wurde in Form des  $\beta$ -Wertes aus den Chip-Daten kalkuliert. Der  $\beta$ -Wert errechnet sich aus dem Signal der methylierten Beads/ (methylierte + unmethylierte Beads) und wird auf einer Skala von 0 (unmethyliert) bis 1 (vollständig methyliert) abgebildet. Anhand der  $\beta$ -Werte kann dieser weiter unterteilt werden in nicht-methyliert ( $\beta$ -Wert = 0-0,2), teilmethyliert ( $\beta$ -Wert= 0,2-0,6) und vollmethyliert ( $\beta$ -Wert= 0,6-1,0). (Quelle: UCSC Genome Browser)

Ausgewertet wurden die Daten an den CpG-Loci cg04737885, cg0576501, cg00834536 und cg27066052, da diese ebenfalls bei den Ausgangsdaten der Arbeitsgruppe zur DNA-Methylierung in der Zellkultur erfasst wurden (siehe Pech et. al. [135]). Die Lagebestimmung der CpG-Loci im Gen erfolgte mit Hilfe des UCSC Gnome Browsers und zeigte folgende Ergebnisse (s. Tab. 1):

cg04737885	cg05765011	cg00834536	cg27066052
Promotorregion	Intronisch (2/10)	Promotorregion	Promotorregion

**Tabelle 1: Lagebestimmung der CpG-Loci mittels UCSC Genome Browser.**

Die Promotorregion dient als Bindungsstelle für RNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren bei der Transkription und stellt eine wichtige regulatorische Einheit bei der Genexpression dar. Intronische Genabschnitte bilden die nicht kodierenden Einheiten der DNA, enthalten aber häufig wichtige Regulationselemente für die Transkription.

Die Messung der RNA-Konzentration und Qualität erfolgte bei der ersten Studienpopulation (2014-2015) mit dem Agilent RNA6000 Nano Chip Kit (Agilent, Santa Clara, USA) und die Bestimmung der mRNA-Expression von ADCY9 mittels *RNASeq* (Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung).

Für die RNA-Sequenzierung wurden insgesamt 1000ng RNA (RNA-Integritätszahl (RIN) >8) verwendet und die Sequenzierung mit Hilfe des HiSeq PE Cluster Kits v4, cBot, des HiSeq SBS Kit v4 und des HiSeq2500 Systems (jeweils von Illumina, San Diego, USA) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

Die Datenanalyse der sequenzierten RNA-Fragmente (*reads*) erfolgte mit Partek Flow (Software Partek Flow 4.0, Partek, Chesterfield, USA), wobei Proben mit einem Qualitätsscore <20 nicht berücksichtigt wurden. Eine Zuordnung der Fragmente zum menschlichen Genom erfolgte mit dem GSNAP Algorithmus (Version 3) und die Analyse der RNA-Expression nach Normalisierung der Daten in *reads per kilobase per million mapped reads* (RPKM). Unter Berücksichtigung der Gengröße entsprechen hohe RPKM-Wert einer stärkeren Genexpression und niedrige RPKM-Werte einer niedrigen Genexpression.

## 2.4 *In vitro* Infektion mit humanem Rhinovirus-16

### 2.4.1 Beschichten der Zellkulturflaschen

Alle Arbeiten an der Zellkultur wurden an einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt und sterile Pipettenspitzen sowie sterile Zellkulturflaschen verwendet.

Zur Kultivierung der Zellen wurden die Zellkulturflaschen zunächst mit einer Anhaftungs-Lösung beschichtet, um den epithelialen Bronchialzellen eine gute Adhäsion zu ermöglichen. Die Anhaftungs-Lösung wurde aus BEBM™ (Bronchial Epithel Cell Growth Basal Medium), Fibronectin (Zielkonzentration 0,005 mg/ml), Rinder Kollagen Typ 1 (Zielkonzentration 0,03

mg/ml) und BSA-Stammlösung (Zielkonzentration 0,01 mg/ml) hergestellt und bei 4°C gelagert. Eine T75-Zellkulturflasche (T75= 75cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) wurde mit 4,5 ml Anhaftungs-Lösung befüllt, dann bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 12h - 18h in einem Brutschrank inkubiert und maximal einen Monat bis zur Verwendung lichtgeschützt gelagert.

#### 2.4.2 Zellkultur primärer humaner Nasenepithelzellen

Um möglichst viele Nasenepithelzellen zu gewinnen, wurde das Falcon-Röhrchen mit den sich in PBS befindlichen Nasenbürsten für einige Sekunden auf dem Vortexmischer geschüttelt und zusätzlich die Bürste insgesamt 10mal durch eine Pipettenspitze vor und zurück geschoben. Anschließend folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 300 rcf (relative Zentrifugalkraft). Das entstandene Zellpellet wurde dann in 1 ml BEGM™ (Bronchial Epithelial Cell Growth Medium mit Zusatz von Gentamycin) suspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 10µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau-Lösung verdünnt und auf die Neubauer Zählkammer aufgetragen. Die Zellen wurden dann in BEGM™ und einer Dichte von 50-100 Tsd./cm<sup>2</sup> in die kollagenbeschichtete T25-Zellkulturflasche (T25 = 25cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) gegeben und anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 18h wurde das Medium gewechselt und sobald eine Oberflächenkonfluenz von 90% vorlag in zwei T75 Flaschen passagiert. Hierfür wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, die Zellen dann mit PBS gespült und die adhärenen Zellen mit Trypsin-EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden dann in 10 ml PBS gelöst, in ein Falcon-Röhrchen überführt und die enzymatische Trypsin-Reaktion mit 10% FCS in RPMI-Medium (entwickelt am *Roswell Park Memorial Institute*) gestoppt. Im Anschluss erfolgte erneut eine fünfminütige Zentrifugation bei 300 rcf, Auflösen des Zellpellets in BEGM™ und Aussaat in kollagenbeschichtete Zellkulturflaschen. Alle drei Tage wurde das Zellkulturmedium gewechselt bis erneut eine Konfluenz von 90% vorlag. Für den Infektionsversuch wurden die Zellen dann bei der nächsten Passage auf eine beschichtete Multiwellplatte (1:50 in PBS verdünnt) überführt. Je Well wurden 500 Tsd. Zellen in 2 ml BEGM™ ausgesät und vor der Infektion mit RV16 zwei Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 2.4.3 Infektion primärer humaner Nasenepithelzellen mit humanem Rhinovirus-16

Die Virusinfektion erfolgte durch das humane Rhinovirus Typ 16. Das Virus wurde in Hela-Zellkulturen proliferiert und im Anschluss durch Ultrazentrifugation und Dichtegradienten-

Zentrifugation in Saccharose aufgereinigt. Der Virusstock wurde dann in 10mM TRIS (=THAM: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) und 1mM EDTA gelöst.

Für jedes Well mit 500 Tsd. Nasenepithelzellen in 2 ml BEGM™ sollten pro Zelle zehn Viren (MOI, *engl. multiplicity of infection* = 10) hinzugefügt werden. Die RV16 enthaltende Pufferlösung enthielt  $1,8 \times 10^8$  RV16/ml TE-Puffer (TRIS-EDTA-Puffer: 10mM TRIS, 1mM EDTA, pH8.0), sodass jedem Well 27,7µl dieser Lösung zur Infektion beigefügt wurde. Als Kontrolle wurde analog dazu ein zweites Well mit gleicher Menge TE-Puffer ohne Viruszusatz befüllt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur (RT), wonach jedem Well 1 ml BEGM™ hinzugefügt und anschließend eine erneute 48-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte. Der Überstand wurde danach entfernt, jedes Well mit 2 ml PBS gespült und die Zellen mit 1 ml Trypsin EDTA abgelöst (s.o.). Die Trypsin-Reaktion wurde mit 2 ml BEGM™ beendet, die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen überführt und eine fünfminütige Zentrifugation bei 300 rcf angeschlossen. Das Zellpellett wurde dann in RLT-Lysepuffer mit 1% β-Mercaptoethanol (aus dem RNeasy Kit von Qiagen, Hilden, Deutschland) suspendiert und das Lysat bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C eingefroren.

#### 2.4.4 Zellkultur der Zelllinie BEAS-2B

Die Infektionsversuche wurden mit der Zelllinie Beas-2B durchgeführt, bei denen es sich um humane bronchiale Epithelzellen handelt, die durch Autopsien von gesunden Individuen gewonnen und durch Infektion mit einem replikationskompetenten Hybridvirus aus Adenovirus 12 und Simian Virus 40 immortalisiert wurden [142].

Vor Verwendung der Flaschen zur Zellkultivierung wurde die Beschichtungslösung mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und einmal mit PBS gewaschen. Zum Ansatz der Beas-2B Kultur wurden die Zellen aufgetaut und anschließend in einem 15ml Falcon Tube mit 10 ml RPMI suspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann 5 min. bei Raumtemperatur und 350 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde nun vorsichtig abgenommen, die Zellen in 1 ml BEBM™ suspendiert und in eine beschichtete Kulturflasche überführt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> weiter kultiviert. Nach 2-3 Tagen wurde ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt, um die Stoffwechselendprodukte zu entsorgen und den Zellen genügend Nährstoffe zur Verfügung zu stellen. Hierzu wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt und 15ml neues Medium hinzugegeben. Dabei wurde mikroskopisch der Konfluenzgrad der Zellen geprüft sowie eine mögliche Kontamination mikroskopisch ausgeschlossen. Bei einem

Konfluenzgrad von ca. 90% wurden die Zellen passagiert, um das Wachstum in mehreren Schichten und somit auch Zelltod zu verhindern.

Um eine Zellkultur zu splitten, wurde der Überstand erneut abgesaugt, mit ca. 5 ml PBS gespült, dann wiederum abgesaugt und anschließend die Zellen mit 5 ml Trypsin abgelöst. Diese wurden dazu bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und nach 5-10 min. mikroskopisch kontrolliert. Wenn sich die Zellen erfolgreich abgelöst hatten, wurde die enzymatische Reaktion des Trypsins mit 10 ml RPMI + 10% FCS gestoppt und die Suspension in ein 50 ml Falcon überführt.

Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 2 ml Medium suspendiert und in eine neue beschichtete Kulturflasche mit weiteren 10 ml Medium überführt.

#### 2.4.5 Infektion der Zelllinie BEAS-2B mit humanem Rhinovirus-16

Zur Infektion einer Zellkultur mit BEAS-2Bs wurde zunächst eine Anzahl von 2 Millionen Zellen pro Zellkultur bestimmt. Hierzu wurde erst das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und anschließend abgelöst (s.o.). Die abgelösten Zellen wurden in einer 10µl Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt und anschließend in einer neuen kollagenbeschichteten Zellkulturflasche über 2h zur Adhäsion bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach erfolgte die Infektion durch Zugabe von 55 µl Viruslösung (Virus-Konzentration  $1,8 \times 10^8$  Viren/ml) zum Medium in der Zellkulturflasche.

Die Zellkulturen wurden nach der Infektion über 1h bei RT inkubiert und zwischendurch geschwenkt. Das Medium wurde im Anschluss mit 2 ml aufgefüllt und die Zellkulturen weiter für 48h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Für das Experiment wurden jeweils 5 Zellkulturen mit dem Virus wie oben beschrieben infiziert. Weitere 5 Zellkulturen dienten zur Kontrolle und wurden unter Zugabe von 55µl Viruspufferlösung (10mM TRIS-Puffer, 1mM EDTA) ohne Viruszusatz weiter kultiviert.

Die Virusinfektion wurde insgesamt fünfmal wiederholt, um konsekutive Infektionen zu simulieren. Hierbei wurden die Zellen vor jeder Infektion ausgezählt und jeweils 2 Mio. Zellen infiziert und weiterkultiviert. Die Kontrollkulturen wurden entsprechend fünfmal mit der Viruspufferlösung behandelt.

## 2.5 Probennahme nach Virusinfektion

Aus den infizierten und nicht infizierten Zellkulturen wurde zuerst jeweils 1 ml Überstand aus dem Medium abgenommen und eingefroren.

Das Medium wurde danach abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gespült. Im Anschluss wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin abgelöst. Nach 5 min. Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde die enzymatische Reaktion des Trypsins mit Medium + 10% FCS gestoppt. Die Zellkultursuspension wurde dann 5 min. bei 350 rcf und RT zentrifugiert. Zur Vorbereitung der Aufarbeitung von RNA, DNA und Proteinen wurde das Zellpellet nach Zentrifugation und Absaugen des Überstandes in 3,7 ml RLT-Puffer und 37µl Mercaptoethanol resuspendiert. Alle Inhaltsstoffe des RLT-Puffers werden vom Hersteller nicht veröffentlicht. Ein großer Anteil ist jedoch das Guanidiniumthiocyanat, welches zur Lyse der Zellen verwendet wird. Das Mercaptoethanol dient der Inaktivierung von RNAsen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -70°C.

## 2.6 Aufarbeitung von DNA und RNA

Die Proben aus den Infektionsversuchen wurden mit dem AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland) und unter Verwendung der zum Kit zugehörigen Lösungen, Säulen und Tubes aufgearbeitet.

Bei der Aufarbeitung wurden die Proben stets auf Eis aufbewahrt, sofern sie nicht bearbeitet wurden. Zuerst wurden alle Proben gleichzeitig 5 x 1 min. auf dem Vortexmischer geschüttelt und das Zelllysat im Anschluss in eine AllPrepDNA-Säule in einem Collection-Tube überführt. Diese wurden dann 30s bei 9000 rcf und RT zentrifugiert. Die DNA ist nun an die Säule gebunden und wurde in einem neuen Collection-Tube bei 4°C zwischengelagert.

Der Durchfluss enthält die RNA. Um die RNA Ausfällung zu begünstigen, wurden als nächstes 250µl Ethanol (96-100%) hinzugegeben, gut gemischt und zusammen in ein RNeasy-Spin Column (Bestandteil des AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kits) in einem Collection-Tube überführt. Dieses wurde erneut 15s bei 9000 rcf und RT zentrifugiert. Der Durchfluss enthält nun die Proteine und wurde ebenfalls bei 4°C zur Zwischenlagerung aufbewahrt. Die RNeasy-Spin Column wurden dann in mehreren Schritten gewaschen und jeweils wie zuvor

zentrifugiert. Hierzu wurden zunächst 700µl RW1- Puffer, im zweiten und dritten Schritt je 500µl RPE-Puffer verwendet. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 1 min. bei 9000 rcf und RT sowie die Säulentrocknung wiederum 1 min. bei 16 000 rcf. Das RNeasy-Spin Column wurde dann in ein neues Collection-Tube platziert und die RNA mit 50µl RNase-freiem Wasser eluiert. Nach einer erneuten Säulentrocknung durch Zentrifugation für 1 min. bei 9000rcf und RT konnte die isolierte RNA bei 4°C bis zur Konzentrationsbestimmung gelagert werden.

Zur Aufarbeitung der DNA wurden auf die vorbereitete AllPrepDNA-Säule 500µl AW1-Puffer gegeben. Es folgte die Zentrifugation für 15s bei 9000rcf und RT sowie die Zugabe von 500µl AW2 Puffer mit nachfolgender Zentrifugation für 2 min. bei 16000rcf. Die Säule wurde dann in ein neues Collection Tube überführt und 2 min. in 80µl EB-Puffer bei RT inkubiert. Der EB-Puffer wurde zuvor auf 70°C erhitzt. Im Anschluss erfolgte die Elution durch Zentrifugation für 1 min. bei 10 000 rcf, RT.

#### 2.6.1 DNA und RNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration erfolgte mit dem Gerät *FLUOstar OMEGA* (BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland), welches die Absorption der Probe misst. Zunächst wurde die Mikroplatte *LVis-Plate* (BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland) auf Sauberkeit geprüft, anschließend 2 µl der Probe auf das Deckglas pipettiert und mit einem zweiten Deckglas abgedeckt. Die Absorption der Probe wurde bei 260nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, gemessen. Da sich die Nukleinsäuren in einer Lösung befanden, wurden hierfür Leerwerte für EB-Puffer und RNase-freies Wasser gemessen und von der Probe subtrahiert. Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration wurde mit dem Programm *MARS data analysis 5.2R* (BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland) durchgeführt.

#### 2.6.2 Qualitätsprüfung von DNA und RNA

Die Reinheit der DNA wurde über das Verhältnis des Absorptionsgrades bei einer Wellenlänge (A) von 260nm und 280nm bestimmt, da das Licht störender Bestandteile bei einer Wellenlänge von 280nm absorbiert wird. Bei einem Verhältnis aus  $A_{260}/A_{280}$  im Bereich von 1,7 – 2,0 wird eine Probe als rein gewertet [143].

Die Qualität der RNA aus den primären Nasenepithelzellen der Kohorte und aus den Beas-2Bs wurde stichprobenartig mit dem *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

überprüft, um die Verlässlichkeit der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) zu erhöhen. Diese verbessert sich bei Verwendung von intakter, nicht fragmentierter RNA [144]. Zur vorbereitenden automatisierten Kapillarelektrophorese wurde das *Agilent RNA 6000 Nano Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verwendet. Die Analyse erfolgte mit der *2100 Expert Software 2.6* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

## 2.7 Complementary DNA-Synthese

Zur complementary DNA (cDNA) - Synthese wurde das SuperScriptVILO cDNA Synthesis Kit (Life technologies, Carlsbad, USA) verwendet. Der Enzym-Mix beinhaltet eine reverse Transkriptase, einen *RNaseOUT* Recombinant Ribonuklease Inhibitor zum Schutz der Target-RNA gegen Ribonuklease Kontamination, sowie ein Helferprotein. Der Reaction-Mix enthält zufällige zusammengesetzte Primer, MgCl<sub>2</sub> und dNTPs in einer für qRT-PCR optimierten Pufferlösung.

Zunächst wurde die RNA Konzentration der isolierten RNA Proben photometrisch gemessen und die notwendige Menge für die cDNA-Synthese berechnet. Die cDNA wurde nach Angaben des Herstellers synthetisiert.

Der Ansatz der PCR wurde zusammengesetzt aus 4 µl 5x VILO Reaction Mix, 2 µl 10x SuperScript Enzym Mix, 1000 ng RNA und ddH<sub>2</sub>O, sodass ein Gesamtvolumen von 20µl erreicht wurde. Die Substanzen wurden während der Arbeitsschritte auf Eis gekühlt. Die cDNA-Synthese erfolgte dann im Thermo-Cycler mit folgendem Programm (s. Tab. 2):

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
Mixen	10 min.	25°C
Inkubation	60 min.	42°C
Termination	5 min.	85°C
Lagerung	Bis zu 24h	-20°C

**Tabelle 2: Thermo-Cycler-Programm zur cDNA-Synthese.**

## 2.8 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Für die Echtzeit-PCR wurde der TagMan q-PCR-Assay (PrimeTimeMini qPCR Assay, Integrated DNA Technologies, Coralville, USA) und das qRT-PCR-Gerät *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Waltham, USA) mit der Software *SDS 2.4* (Applied Biosystems, Waltham, USA) verwendet.

Bei der qRT-PCR wird die PCR-Amplifikation mit dem PCR-Nachweis kombiniert. Die PCR-Produkte werden während der exponentiellen Phase der Reaktion mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert und die Anreicherung von Fluoreszenzsignalen gemessen. Dadurch gelingt bereits während der Vervielfältigung die genaue Quantifizierung der PCR-Produkte, indem die Anzahl der Zyklen auf der x-Achse, gegen die Fluoreszenzintensität auf der y-Achse aufgetragen wird. Aus der Hintergrundfluoreszenz wird dann ein Schwellenwert für die Fluoreszenz der Proben berechnet. Der Zyklus, bei dem ausreichend PCR-Produkt vorhanden ist, um den Schwellenwert zu überschreiten, wird als Schwellenwertzyklus (threshold-cycle) bezeichnet und als CT-Wert wiedergegeben. Bei einem niedrigen CT-Wert wird der Schwellenwert nach wenigen PCR-Zyklen erreicht, sodass viel cDNA in der Probe vorhanden war. Ein hoher CT-Wert bedeutet, dass viele Zyklen erforderlich sind, um den Schwellenwertzyklus zu erreichen und somit in der Ausgangsprobe wenig cDNA vorliegt. Die Messungen wurden dann anhand eines nicht regulierten Housekeeping-Gens normalisiert.

Der Master Mix (Taqman Universal PCR Master Mix 5, Life Technologies) enthält die DNA-Polymerase, Uracil-DNA Glycosylase und dNTPs mit dUTP und eine optimierte Pufferlösung. Die Substanzen wurden nach Herstellerangaben bei 4°C gelagert. Es wurden Ansätze mit Primern für jeweils drei Replikate für das Zielgen ADCY9 (Assay ID: Hs.PT.56a.39764734, IDT, Coralville, USA) und das Referenzgen (=endogene Kontrolle) RPS18 (Assay ID: Hs.PT.58.14390640, IDT, Coralville, USA) vorbereitet. Hierbei wurden die cDNA Proben (aus 1000 ng RNA) im Verhältnis 1:10 mit destilliertem H<sub>2</sub>O verdünnt und hinzugefügt. Nach Angaben des Herstellers wurden diese Ansätze mit dem Master Mix und PCR Wasser für die qRT-PCR vervollständigt. Die Proben wurden dann auf eine Multiply PCR-Platte (Cat.No. 72.1984.202, Sarstedt) aufgetragen und mit adhäsiver Folie (95.1994, Sarstedt) abgedeckt.

Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte nachfolgendem Protokoll: 10 min. bei 95 °C und anschließend 40 Zyklen mit 15 Sek. bei 95 °C und 45 Sek. bei 60 °C.

## 2.9 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen innerhalb der Studienpopulation und der Zellkultur wurden mit dem Programm *Prism 7 für Mac OS X* (GraphPad Software, Kalifornien, USA) durchgeführt und die graphischen Darstellungen zur Veranschaulichung der Daten hiermit erstellt. Die Datenauswertung zur genomweiten Methylierungsanalyse erfolgte mit dem Programm *JMP® 13.2* (SAS, Cary, USA).

Zur Auswertung der Charakteristika der Studienpopulation wurde zunächst ein möglicher Konfundierungseffekt durch die Störgrößen Alter und Geschlecht analysiert.

Mit Hilfe eines nicht parametrischen t-Tests wurde untersucht, ob ein signifikanter Unterschied in der Altersverteilung bei Nicht-Asthmatikern und Asthmatikern vorlag. Mittels Chi-Quadrat-Test wurde untersucht, ob bei Nicht-Asthmatikern und Asthmatikern ein Unterschied in der Geschlechtsverteilung bestand.

Eine Korrelation des Methylierungsgrades mit dem Alter wurde nach Überprüfung einer Normalverteilung der Daten mittels D'Agostino-Pearson-Test und Shapiro-Wilk-Test durch die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ( $r$ ) bzw. Spearman ( $r_s$ ) untersucht. Dieser bildet Werte im Bereich von -1 bis +1, wobei ein Wert von +1 eine perfekte lineare Beziehung mit positiver Korrelation angibt und -1 eine perfekt lineare Beziehung mit negativer Korrelation darstellt. Ein Korrelationskoeffizient von  $r = 0$  besagt hier, dass kein linearer Zusammenhang zwischen Alter und DNA-Methylierung besteht. Der p-Wert gibt an, ob eine signifikante Abweichung vom Wert 0 vorliegt und wird ab einem Wert  $<0,05$  als statistisch signifikant gewertet.

Für die Analyse der Korrelation von DNA-Methylierung und mRNA-Expression von ADCY9 wurde ebenfalls der Korrelationskoeffizient nach Pearson bzw. Spearman ( $r_s$ ) berechnet. Die Darstellung einer signifikanten Korrelation erfolgte mittels Regressionsgerade in einem Streudiagramm.

Um zu überprüfen, ob eine Assoziation zwischen Geschlecht und DNA-Methylierung besteht, wurden Mittelwerte und Standardabweichung der  $\beta$ -Werte für weibliche und männliche Probanden gebildet, diese mittels Mann-Whitney-Test verglichen und graphisch in einem Streudiagramm dargestellt.

Der Einfluss der RVI auf die DNA-Methylierung bei Nicht-Asthmatikern und Asthmatikern, sowie der Einfluss auf die RNA-Expression in der Zellkultur wurde mittels zweifacher Varianzanalyse (two-way-ANOVA) untersucht und multiple Vergleiche durchgeführt. Eine Korrektur der Ergebnisse erfolgte durch Kontrolle der Falscherkennungsrate (FDR, *engl. false discovery rate*) im Testverfahren nach Benjamini und Hochberg, um fälschlicherweise abgelehnte Hypothesen zu identifizieren. Die graphische Darstellung erfolgte mittels Box-Plot. Die Höhe der Boxen repräsentiert dabei die Verteilung der mittleren 50% der Werte. Der Median wird innerhalb der Box als horizontale Linie dargestellt. Vertikale Linien außerhalb der Box zeigen die Verteilung der verbleibenden 50% mit minimalem und maximalem Extremwert als Schlusspunkte.

Die weiteren Analysen zur Charakterisierung der Studienpopulation und Analyse der RNA-Expression innerhalb der Zellkultur erfolgte erneut durch den Vergleich der  $\beta$ -Werte nach Mittelwertbildung und unter Angabe der Standardabweichung für die unterschiedlichen Gruppen. Die Berechnung der p-Werte der differentiellen DNA-Methylierung bei der Assoziation mit klinischen Aspekten bei Asthmatikern/Wheezern erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. Das Signifikanzniveau wurde jeweils auf 0,05 festgelegt. Zur Vermeidung einer alpha-Fehler-Kumulation und Einhaltung eines globalen Signifikanzniveaus von 0,05 wurde bei den Analysen ebenfalls eine Korrektur nach Benjamini und Hochberg ( $FDR (Q) = 5\%$ ) durchgeführt. Zur Berechnung des kritischen Benjamini-Hochberg-Wertes ( $p_{BH}$ ) wurden die p-Werte für die untersuchten CpGs (Gesamtzahl der Tests  $m=4$ ) aufsteigend geordnet, jeweils einem Rang ( $i$ ) zugewiesen und nach der Formel ( $p_{BH} = i/m * Q$ ) für jeden p-Wert berechnet. Es wurden unterhalb des jeweiligen  $p_{BH}$ -Wertes liegende p-Werte als statistisch signifikant anerkannt [145].

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Zusammensetzung der Studienpopulation

Die gesamte Studienpopulation bestand aus insgesamt 102 Probanden von denen n=23 (22%) Nicht-Asthmatiker, n=63 (62%) Asthmatiker und n=16 (16%) Wheezer waren.

Das Alter der Probanden betrug 6 Monate bis 18 Jahre. Nicht-Asthmatiker und Asthmatiker hatten definitionsgemäß mindestens ein Alter von 6 Jahren, während die Wheezer jünger als 6 Jahre alt waren.

Der Anteil der männlichen Probanden des Gesamtkollektivs lag mit 70% insgesamt deutlich höher als der Anteil der weiblichen Teilnehmer mit 30%. Unter den Nicht-Asthmatikern war das Geschlechterverhältnis mit 48% weiblichen und 52% männlichen Probanden ausgeglichen, während bei den Asthmatikern und Wheezern die männlichen Probanden mit 75% gegenüber den weiblichen Probanden mit 25% die Mehrheit bildeten. In der Kohorte waren somit mehr männliche Probanden mit der Diagnose Asthma bronchiale/Wheezer enthalten als weibliche. Im Chi-Quadrat-Test zeigte sich ebenso ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Geschlechterverteilung bei Nicht-Asthmatikern und Asthmatikern ( $p < 0,05$ ) (s. Tab. 3).

n (gesamt) = 102	Nicht-Asthmatiker (n=23)		Asthmatiker (n=63)		Wheezer (n=16)	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
<b>Alter (Jahre)</b>	12,8	2,7	11	3,5	3,3	1,4
<b>weiblich: n=31 (30%)</b>	n = 11 (48%)		n = 16 (25%)		n = 4 (25%)	
<b>männlich: n=71 (70%)</b>	n = 12 (52%)		n = 47 (75%)		n = 12 (75%)	
<b>Hospitalisierung (n)</b>	-		16		9	
<b>Steroidtherapie unter Hospitalisierung (n)</b>	-		9		6	
<b>Reduzierte Lungenfunktion (n)</b>	-		9		1	
<b>Eosinophilie &gt; 300/<math>\mu</math>l (n)</b>	-		36		10	
<b>Ärztlich diagnostizierte Atopie (n)</b>	1		18		6	
<b>Passive Rauchexposition (n)</b>	3		22		4	
<b>Therapie mit SABAs (n)</b>	-		38		14	

**Tabelle 3: Beschreibung der Studienpopulation.**

SD: Standardabweichung.

### 3.2 Einfluss von Alter und Geschlecht auf die DNA-Methylierung von ADCY9

Um altersabhängige Methylierungsunterschiede an den vier CpG-Loci im ADCY9 Gen zu untersuchen, wurden die  $\beta$ -Werte aus der zweiten Studienpopulation in Relation zum Alter der Probanden ausgewertet. Zur Auswahl des Testverfahrens wurde zunächst mittels D'Agostino-Pearson-Test und Shapiro-Wilk-Test überprüft, ob die Daten zur DNA-Methylierung einer Normalverteilung unterliegen. Für die CpG-Loci cg04737885, cg05765011 und cg00834536 konnte so eine Normalverteilung bestätigt werden, während diese für die Methylierungsdaten am cg27066052 nicht zutrifft. Es erfolgte daher die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r) für cg04737885, cg05765011 und cg00834536 und nach Spearman ( $r_s$ ) für cg27066052. Für cg00834536 zeigt sich eine leicht positive Korrelation

von  $r = 0,33$ . Bei den weiteren CpGs zeigte sich keine signifikante Korrelation von DNA-Methylierung mit dem Alter (s. Tab. 4 und Abb. 2).

	cg04737885	cg05765011	cg00834536	cg27066052
r	0,17	-0,07	0,33	$r_s = 0,08$
p-Wert	n.s.	n.s.	$p = 0,0068$	n.s.

Tabelle 4: Korrelation von DNA-Methylierung und Alter.

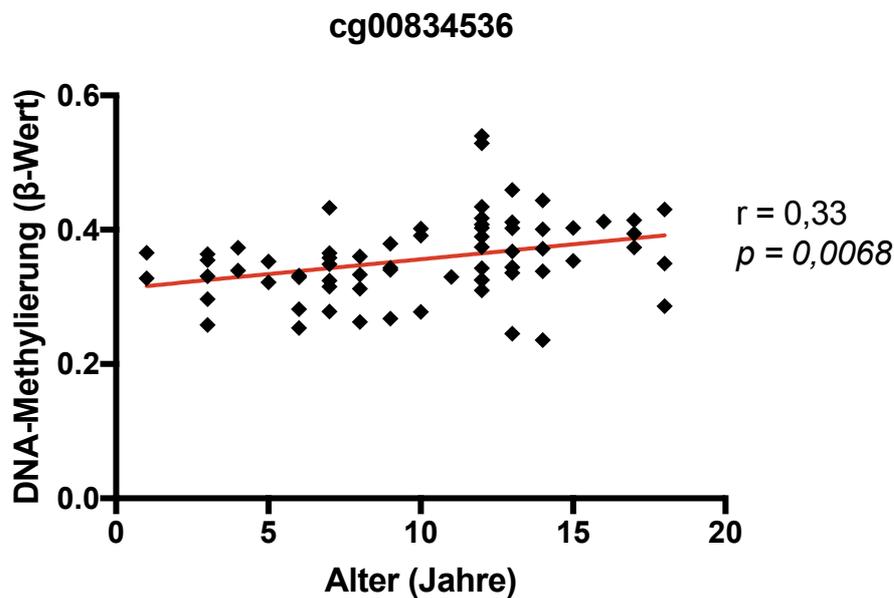


Abbildung 2: Korrelation von DNA-Methylierung und Alter.

Exemplarische Darstellung anhand von cg00834536. Es zeigt sich eine leicht positive Korrelation zwischen der DNA-Methylierung und dem Alter in Jahren,  $r = 0,33$ ;  $p = 0,0068$ . Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ( $r$ ).

Zur Beurteilung, ob das Geschlecht mit einem Methylierungsunterschied assoziiert ist, wurden insgesamt 71 männliche und 31 weibliche Studienteilnehmer beider Populationen miteinander verglichen. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede an den untersuchten CpG-Loci (s. Tab. 5).

	männlich (n=71)		weiblich (n=31)		p-Wert
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
<b>cg04737885</b>	0,7523	0,0567	0,7602	0,0607	n.s.
<b>cg05765011</b>	0,4124	0,1327	0,4042	0,1242	n.s.
<b>cg00834536</b>	0,3579	0,0591	0,3532	0,0579	n.s.
<b>cg27066052</b>	0,8652	0,0594	0,8800	0,0307	n.s.

**Tabelle 5: Assoziation der DNA-Methylierung mit dem Geschlecht.**

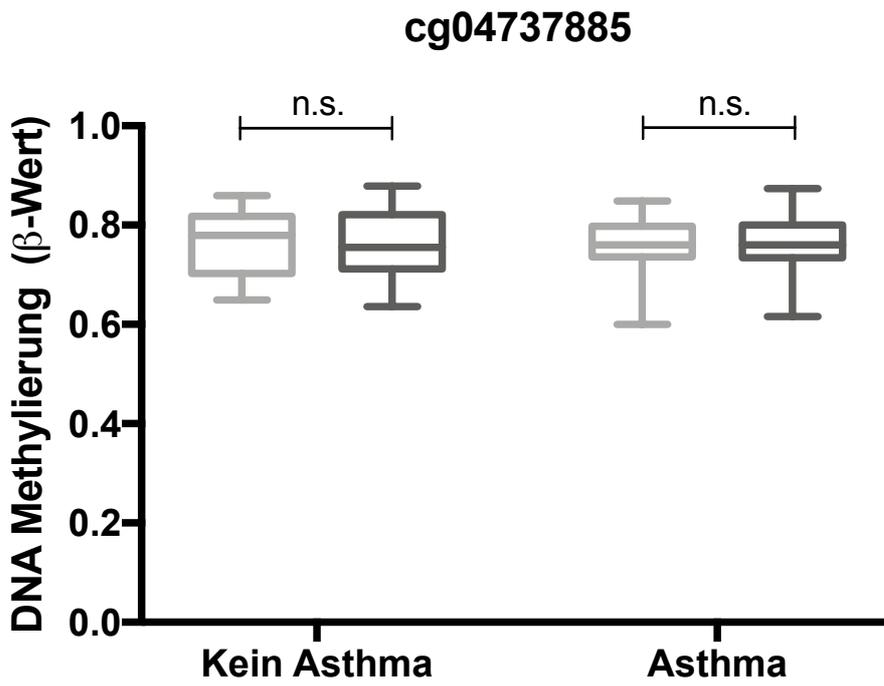
### 3.3 Einfluss der RVI auf die DNA-Methylierung bei Asthmatikern

Um den Einfluss einer Infektion mit Rhinoviren auf die DNA-Methylierung zu untersuchen, wurden die Gruppen der Nicht-Asthmatiker und Asthmatiker jeweils vor und nach RVI miteinander verglichen.

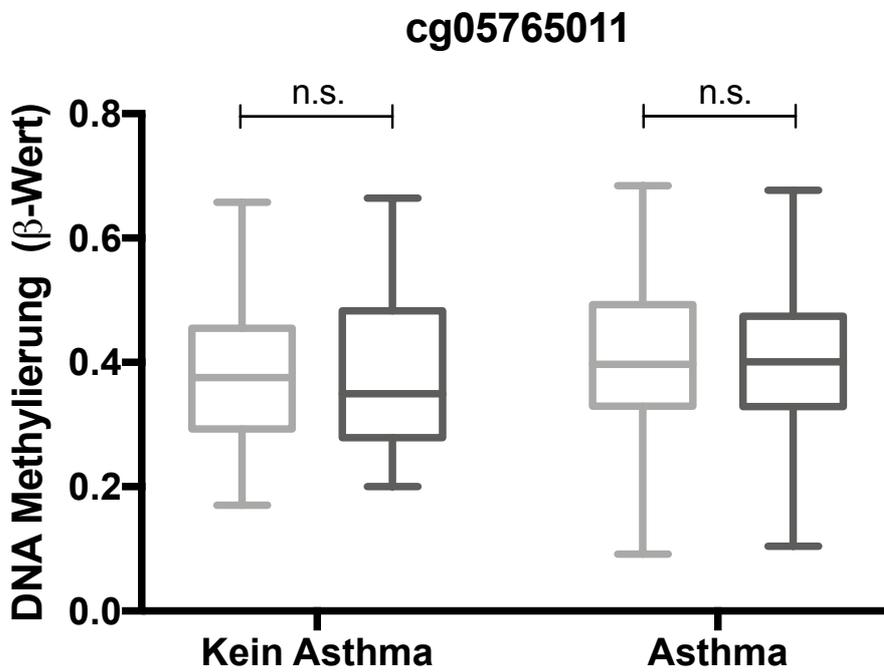
Für die Gruppe der Wheezer lag aufgrund der Rekrutierung keine gesunde Kontrollgruppe mit der entsprechenden Altersklasse (0-6 Jahre) vor, sodass für diese Gruppe keine Analyse vorgenommen wurde.

Die Berechnung der p-Werte erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse (engl. two-way ANOVA). Die Ergebnisse multipler Vergleiche wurden durch Kontrolle der FDR nach Benjamini und Hochberg korrigiert (s. Abb. 3).

A

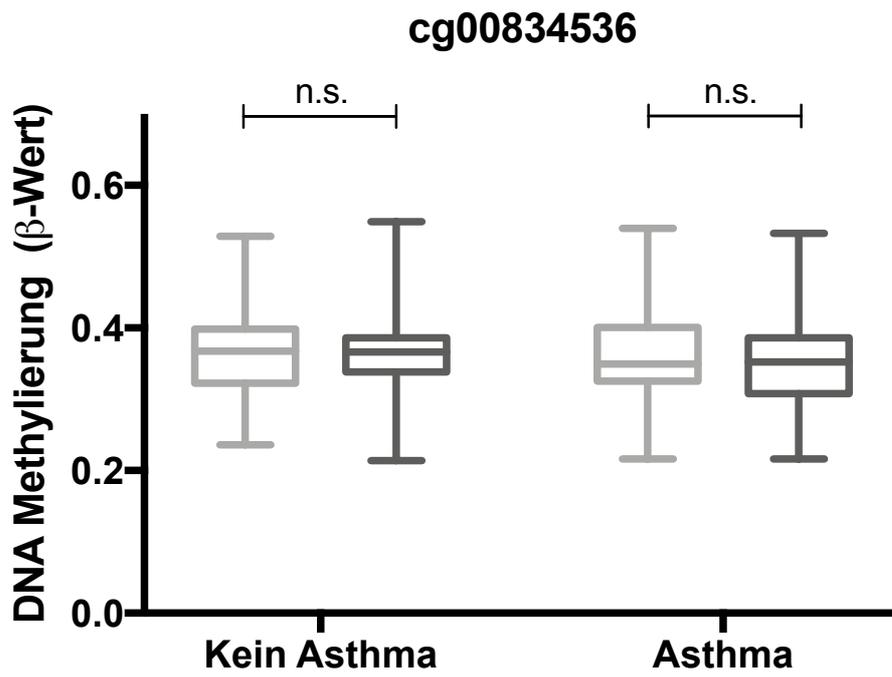


B

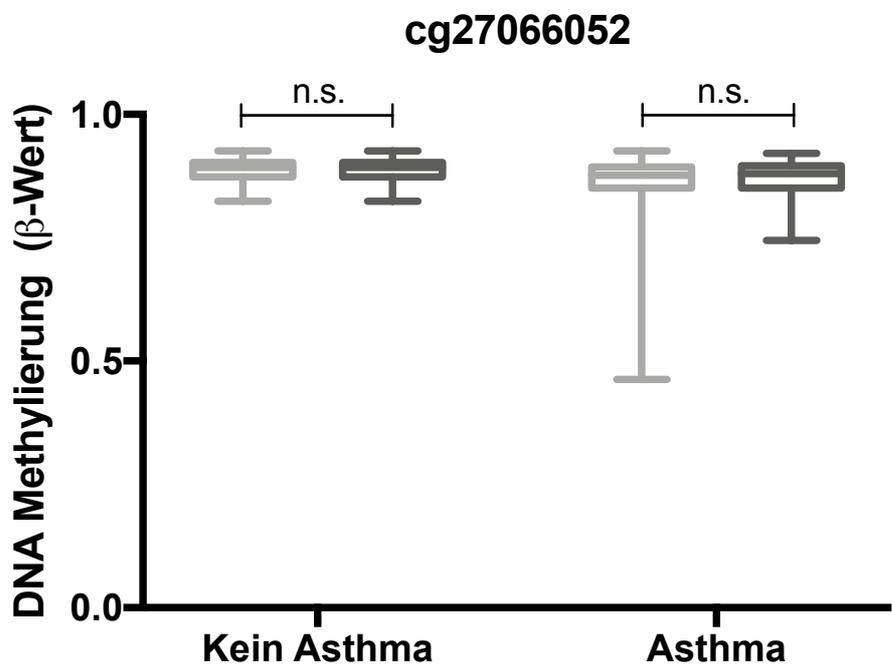


-  Kontrolle
-  RVI

c



d



□ Kontrolle

□ RVI

### **Abbildung 3: Einfluss der RVI auf die DNA-Methylierung.**

Darstellung der untersuchten CpG-Loci (A-D). DNA-Methylierungsanalyse mit dem Human Methylation 450 BeadChip Kit und EPIC (Illumina). Darstellung des Methylierungsgrades durch  $\beta$ -Werte (0= unmethyliert und 1=vollständig methyliert, y-Achse). Unterscheidung zwischen Nicht-Asthmatikern und Asthmatikern (x-Achse). Die Kastengrafik (engl. Box-Plot) zeigt die Mittelwerte sowie Maximum und Minimum je Gruppe. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und Asthmatikern vor und nach RVI. Testverfahren: two-way-ANOVA und Kontrolle der FDR. Zur besseren Übersicht wurden bei dem Vergleich von Nicht-Asthmatikern und Asthmatikern keine Querbalken dargestellt.

## **3.4 Assoziation der Hospitalisierung und Behandlung mit systemischen Steroiden mit der DNA-Methylierung bei Asthmatikern**

In der Studienpopulation wurde untersucht, ob neben der RVI auch andere relevante Einflussfaktoren für eine Asthmaerkrankung mit einem Unterschied in der DNA-Methylierung im ADCY9 Gen assoziiert sind. Hierzu wurden zunächst klinische Aspekte der Asthmaerkrankung, die mit einem schweren Krankheitsverlauf assoziiert sind, berücksichtigt und die Notwendigkeit einer Hospitalisierung in den vergangenen 12 Monaten sowie eine erforderliche systemische Steroidtherapie während des stationären Aufenthalts in die Auswertung einbezogen.

Die Berechnung der p-Werte erfolgte im Folgenden mittels nicht parametrischem t-Test, Mann-Whitney-Test. Die Ergebnisse wurden ebenfalls durch Kontrolle der FDR nach Benjamini und Hochberg korrigiert.

Hierbei zeigte sich am cg00834536 eine verminderte DNA-Methylierung bei Asthmatikern, welche in den vergangenen 12 Monaten hospitalisiert wurden (n= 16) im Vergleich zu Asthmatikern, die in den vergangenen 12 Monaten nicht hospitalisiert wurden (n= 27), ( $p < 0,0125$ ).

An den weiteren CpG-Loci konnten keine signifikanten Methylierungsunterschiede gemessen werden.

In der Wheezer Gruppe konnte aufgrund der Rekrutierung keine repräsentative Anzahl (n=3) untersucht werden (s. Tab. 6 und Abb. 4).

	Asthmatiker (n=27)		Hospitalisierte A. (n=16)		p-Wert
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
cg04737885	0,7539	0,0454	0,7424	0,0358	n.s.
cg05765011	0,4028	0,1365	0,3796	0,0969	n.s.
cg00834536	0,3771	0,0584	0,3360	0,0370	0,0122
cg27066052	0,8634	0,0419	0,8487	0,1059	n.s.

Tabelle 6: Assoziation der DNA-Methylierung mit Hospitalisierung.

A.= Asthmatiker

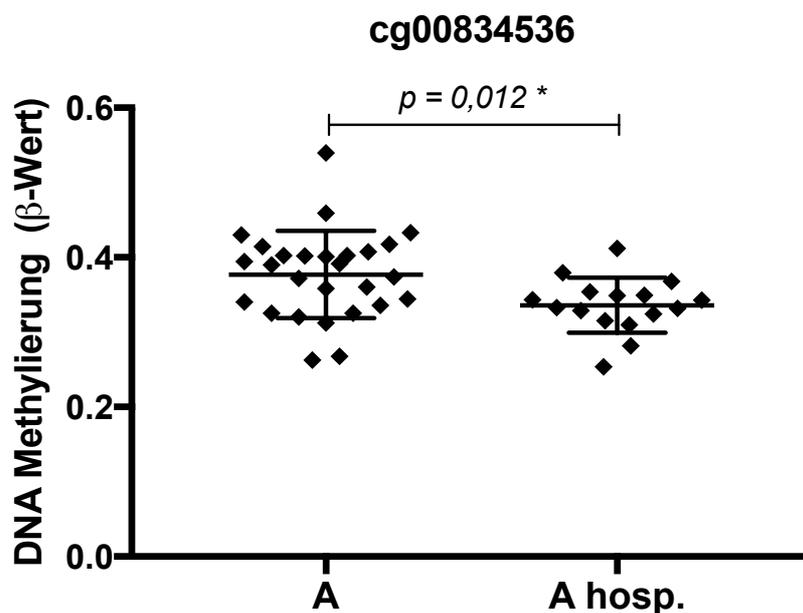


Abbildung 4: Assoziation der DNA-Methylierung mit Hospitalisierung.

Anzahl der Messwerte je Gruppe für die unterschiedlichen CpGs. Unterscheidung zwischen Asthmatikern (A) und in den vergangenen 12 Monaten hospitalisierten Asthmatikern (A hosp.). Darstellung des Methylierungsgrades durch  $\beta$ -Werte (0=unmethyliert, 1=vollständig methyliert, y-Achse) und Berechnung der Mittelwerte (MW) mit der entsprechenden Standardabweichung (SD).  $p = 0,0122$ , nicht parametrischer t-Test, Mann-Whitney-Test, nach Kontrolle der FDR signifikant\*.

In der Gruppe der hospitalisierten Asthmatiker betrug die Anzahl der Patienten ohne Steroidtherapie n=16 (64%) im Vergleich zu n=9 (36%) Patienten mit Steroidtherapie.

Die Gruppe der hospitalisierten Wheezer bestand aus n=9 (60%) ohne Steroidtherapie und n=6 (40%) mit Steroidtherapie. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen hospitalisierten Asthmatikern bzw. Wheezern mit und ohne systemischer Steroidbehandlung (s. Tab. 7).

1. Asthmatiker	Hospitalisiert (n=16)		Hosp. + Steroide (n=9)		p-Wert
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
cg04737885	0,7424	0,0358	0,7622	0,0312	n.s.
cg05765011	0,3796	0,0969	0,4002	0,1038	n.s.
cg00834536	0,3360	0,0370	0,3446	0,0313	n.s.
cg27066052	0,8487	0,1059	0,8347	0,1414	n.s.
2. Wheezer	Hospitalisiert (n=9)		Hosp. + Steroide (n=6)		
cg04737885	0,7227	0,0330	0,7212	0,0414	n.s.
cg05765011	0,3750	0,1150	0,3511	0,0960	n.s.
cg00834536	0,3308	0,0365	0,3270	0,0431	n.s.
cg27066052	0,8605	0,0352	0,8583	0,0427	n.s.

**Tabelle 7: Assoziation der DNA-Methylierung mit Steroidtherapie und Hospitalisierung.**

Anzahl der Messwerte je Gruppe für die unterschiedlichen CpGs. Unterscheidung zwischen Asthmatikern/Wheezern mit Hospitalisierung in den vergangenen 12 Monaten und hospitalisierten (Hosp.) Asthmatikern/Wheezern mit zusätzlicher Steroidtherapie. Darstellung des Methylierungsgrades durch  $\beta$ -Werte (0=unmethyliert, 1=vollständig methyliert) und Berechnung der Mittelwerte mit der entsprechenden Standardabweichung (SD). Berechnung der p-Werte mittels nicht parametrischem t-Test, Mann-Whitney-Test.

### 3.5 Assoziation der differentiellen Methylierung mit klinischen Aspekten bei Asthmatikern und Wheezern

Es wurde die differentielle DNA-Methylierung hinsichtlich weiterer klinischer Aspekte und wichtigen Charakteristika einer Asthmaerkrankung untersucht. Als Hinweis auf den Schweregrad einer Asthmaerkrankung wurde die Lungenfunktion, die Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Blut und das Vorhandensein einer Atopie in die Auswertung eingeschlossen. Als wichtiger Risikofaktor wurde zudem eine passive Tabakrauchexposition untersucht. Als wesentlicher Bestandteil der Asthmatherapie wurde zudem der Einfluss einer Behandlung mit SABAs analysiert, in deren Wirkmechanismus die Adenylatzyklase eine entscheidende Enzymfunktion aufweist.

### 3.5.1 Lungenfunktion

Bei Asthmatikern und Wheezern der Kohorte erfolgte die Einteilung hinsichtlich der Qualität der Lungenfunktion in eine Gruppe mit normaler Lungenfunktion und eine Gruppe mit reduzierter Lungenfunktion unter Berücksichtigung der aktuellen GINA-Kriterien zur Diagnosestellung von Asthma bronchiale und den aktuellen Empfehlungen der nationalen Versorgungsleitlinie zur Diagnosestellung von Asthma bronchiale für Kinder ab 6 Jahren. In der Lungenfunktionsprüfung soll hierbei eine variable, (partiell) reversible Atemwegsobstruktion typischerweise mittels Spirometrie nachgewiesen werden, wobei die besten Werte aus mindestens drei reproduzierbaren Fluss-Volumen-Kurven verwendet werden sollen. Eine reduzierte Lungenfunktion liegt vor, wenn die Messwerte unterhalb der 5. Perzentile liegen [13].

Bei Asthmatikern betrug die Anzahl derjenigen mit normaler Lungenfunktion  $n=44$  (83%), während  $n=9$  (17%) eine reduzierte Lungenfunktion vorwiesen.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit normaler und reduzierter Lungenfunktion in Bezug auf die differentielle DNA-Methylierung (s. Tab. 8). In der Wheezer Gruppe wurde aufgrund der geringen Fallzahl ( $n=1$ ) keine Korrelation untersucht.

	Lufu normal (n=44)		Lufu reduziert (n=9)		p-Wert
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
cg04737885	0,7523	0,0440	0,7535	0,0723	n.s.
cg05765011	0,4008	0,1302	0,4275	0,0751	n.s.
cg00834536	0,3710	0,0601	0,3368	0,0441	n.s.
cg27066052	0,8542	0,0707	0,8711	0,0266	n.s.

**Tabelle 8: Assoziation der differentiellen DNA-Methylierung mit der Lungenfunktion bei Asthmatikern.**

Asthmatiker mit normaler Lungenfunktion (Lufu normal), Asthmatiker mit reduzierter Lungenfunktion (Lufu reduziert), entsprechend Messwerten  $< 5.$  Perzentile in der Spirometrie. Darstellung des Methylierungsgrades durch  $\beta$ -Werte (0=unmethyliert, 1=vollständig methyliert) und Berechnung der Mittelwerte mit der entsprechenden Standardabweichung (SD). Berechnung der p=Werte mittels nicht parametrischem t-Test, Mann-Whitney-Test.

### 3.5.2 Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Blut

Zur Untersuchung, ob eine Assoziation der DNA-Methylierung mit der Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Blut besteht, wurden zwei Gruppen gebildet. Es wurde unterschieden zwischen Probanden mit normaler und erhöhter Eosinophilenzahl. Als Cut-off wurde ein Grenzwert der Eosinophilenzahl von  $300/\mu\text{l}$  festgelegt, da oberhalb dieses Wertes im Allgemeinen von schwerem eosinophilem Asthma ausgegangen werden kann und in dieser Gruppe ein gutes Ansprechen auf Antikörpertherapien, z.B. mit Mepolizumab (Anti-IL5) beobachtet wird [146,147]. Bei Kindern ist in diesem Fall eine Therapie mit Mepolizumab ab einem Alter von 6 Jahren und Benralizumab (Anti-IL5 Rezeptor  $\alpha$ ) ab 12 Jahren zugelassen [14].

Es zeigte sich kein signifikanter Methylierungsunterschied in den für ADCY9 identifizierten CpGs in Abhängigkeit der Eosinophilenzahl. Zur besseren Übersicht erfolgte exemplarisch die Darstellung eines CpG-Locus (cg00834536) (s. Abb. 5). Die Ergebnisse zu den weiteren CpG-Loci finden sich im Anhang unter 7.3.1.

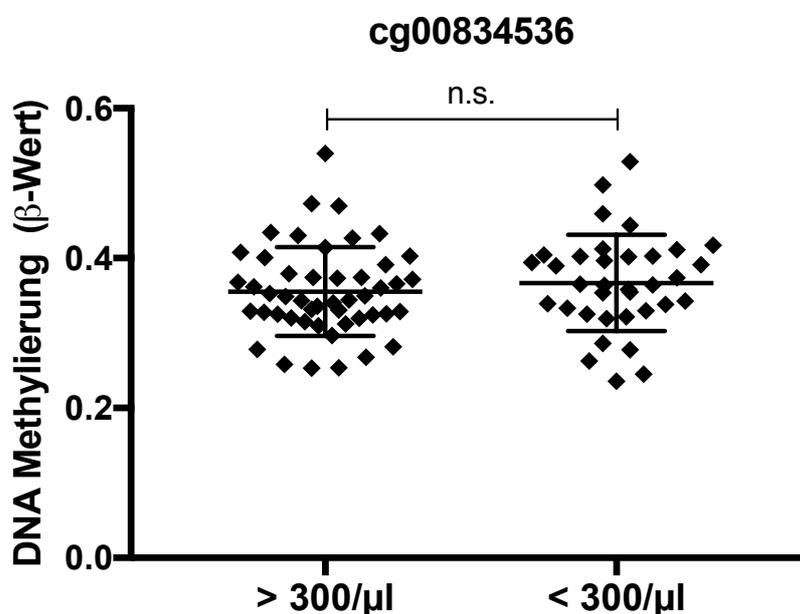


Abbildung 5: Assoziation der DNA-Methylierung mit der Anzahl der eosinophilen Granulozyten.

Exemplarische Darstellung von cg00834536. Unterscheidung von Eosinophilenzahlen von  $> 300/\mu\text{l}$  und  $< 300/\mu\text{l}$  im Blut. Darstellung des Methylierungsgrades durch  $\beta$ -Werte (0=unmethyliert, 1=vollständig methyliert) und Darstellung der Anzahl der Messwerte je Gruppe mit Berechnung der Mittelwerte und entsprechender Standardabweichung (SD). Berechnung des p-Wertes mittels nicht parametrischem t-Test, Mann-Whitney-Test.

Bei Asthmatikern und Wheezern wurde zusätzlich die differentielle Methylierung in Abhängigkeit der Eosinophilenzahl analysiert.

Bei Nicht-Asthmatikern konnte aufgrund der Rekrutierung keine repräsentative Vergleichsgruppe mit Eosinophilenzahlen > 300/μl (n= 2) untersucht werden.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der differentiellen Methylierung zwischen den einzelnen Gruppen (s. Tab. 9).

1. Asthmatiker	n Eos > 300/μl (n=36)		n Eos < 300/μl (n=18)		p-Wert
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
cg04737885	0,7553	0,0426	0,7462	0,0597	n.s.
cg05765011	0,4002	0,1247	0,4170	0,1167	n.s.
cg00834536	0,3557	0,0594	0,3840	0,0523	n.s.
cg27066052	0,8634	0,0374	0,8460	0,1004	n.s.
2. Wheezer	n Eos > 300/μl (n=10)		n Eos < 300/μl (n=6)		
cg04737885	0,7231	0,0406	0,7537	0,0511	n.s.
cg05765011	0,4885	0,1710	0,4135	0,1484	n.s.
cg00834536	0,3415	0,0595	0,3492	0,0290	n.s.
cg27066052	0,8635	0,0351	0,8753	0,0170	n.s.

**Tabelle 9: Assoziation der differentiellen DNA-Methylierung mit der Anzahl der eosinophilen Granulozyten.**

Gruppenaufteilung für Asthmatiker und Wheezer je CpG-Locus. Unterscheidung anhand der Anzahl der Eosinophilen im Blut. Darstellung des Methylierungsgrades durch  $\beta$ -Werte (0=unmethyliert, 1=vollständig methyliert) und Berechnung der Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung (SD). Berechnung der p=Werte mittels nicht parametrischem t-Test, Mann-Whitney-Test.

### 3.5.3 Atopie

Untersucht wurde der Einfluss von Atopie auf die DNA-Methylierung in den für ADCY9 identifizierten CpGs.

Im Gesamtkollektiv befanden sich  $n = 25$  (39%) mit Atopie und  $n = 39$  (61%) ohne Atopie. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Atopikern bzw. Nicht-Atopikern. Exemplarisch erfolgte die Darstellung eines CpG-Locus (cg00834536) (s. Abb. 6). Die Ergebnisse zu den weiteren CpG-Loci finden sich im Anhang unter 7.3.2.

Bei Asthmatikern und Wheezern und wurde zusätzlich die differentielle Methylierung in Abhängigkeit der Atopie analysiert. Hier konnten keine signifikanten Methylierungsunterschiede gemessen werden (s. Tab. 10).

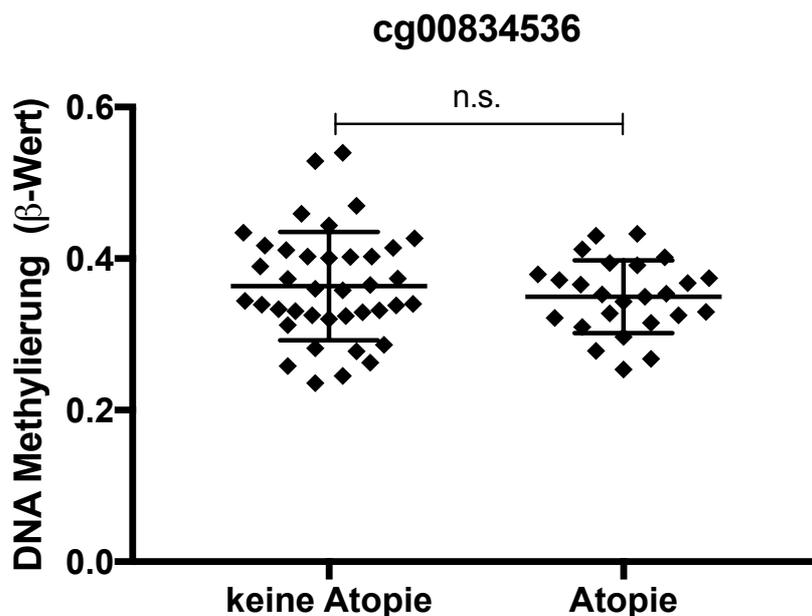


Abbildung 6: Assoziation der DNA-Methylierung mit Atopie.

Exemplarische Darstellung von cg00834536. Unterscheidung von Abwesenheit oder Vorliegen einer Atopie. Darstellung des Methylierungsgrades durch  $\beta$ -Werte (0=unmethyliert, 1=vollständig methyliert) und Darstellung der Anzahl der Messwerte je Gruppe mit Berechnung der Mittelwerte und entsprechender Standardabweichung (SD). Berechnung des p-Wertes mittels nicht parametrischem t-Test, Mann-Whitney-Test.

1. Asthmatiker	Atopie (n=18)		keine Atopie (n=22)		p-Wert
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
cg04737885	0,7493	0,0428	0,7526	0,0430	n.s.
cg05765011	0,3778	0,1206	0,4266	0,1129	n.s.
cg00834536	0,3596	0,0506	0,3671	0,0629	n.s.
cg27066052	0,8628	0,0496	0,8484	0,0899	n.s.
2. Wheezer	Atopie (n=6)		keine Atopie (n=5)		
cg04737885	0,7279	0,0297	0,7296	0,0401	n.s.
cg05765011	0,4288	0,1146	0,4830	0,2621	n.s.
cg00834536	0,3238	0,0329	0,3544	0,0770	n.s.
cg27066052	0,8666	0,0199	0,8568	0,0503	n.s.

**Tabelle 10: Einfluss von Atopie bei Asthmatikern/Wheezern auf die differentielle DNA-Methylierung.**

Unterscheidung von Asthmatikern (A) und Wheezern (W) mit Atopie (n= 18) und ohne Atopie (n= 22). Darstellung des Methylierungsgrades durch  $\beta$ -Werte (0=unmethyliert, 1=vollständig methyliert) und Berechnung der Mittelwerte mit der entsprechenden Standardabweichung (SD). Berechnung der p=Werte mittels nicht parametrischem t-Test, Mann-Whitney-Test.

### 3.5.4 Passive Rauchexposition

Es wurde der Einfluss einer passiven Rauchexposition auf die DNA-Methylierung am ADCY9-Gen untersucht.

Eine passive Rauchexposition wurde als Rauchen im Haushalt oder auch auf dem Balkon definiert. In der Kohorte gab es keine Teilnehmer, die aktiv geraucht haben.

Der Anteil derjenigen mit einer passiven Rauchexposition betrug n= 29 (36%) und der Anteil derjenigen, die in einem Nichtraucher Haushalt leben betrug n= 51 (64%).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Zusammenhang mit passiver Rauchexposition in der differentiellen DNA-Methylierung (s. Tab. 11).

	Nichtraucher (n=51)		passiv Rauchen (n=29)		p-Wert
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
cg04737885	0,7528	0,0417	0,7414	0,0430	n.s.
cg05765011	0,3923	0,1079	0,4459	0,1629	n.s.
cg00834536	0,3552	0,0588	0,3647	0,0590	n.s.
cg27066052	0,8683	0,0343	0,8480	0,0803	n.s.

**Tabelle 11: Einfluss von passiver Rauchexposition auf die differentielle DNA-Methylierung.**

Anzahl der Messwerte je Gruppe für die unterschiedlichen CpGs. Unterscheidung von Nichtraucher Haushalten und dem Vorliegen einer passiven Rauchexposition. Darstellung des Methylierungsgrades durch  $\beta$ -Werte (0=unmethyliert, 1=vollständig methyliert) und Berechnung der Mittelwerte mit der entsprechenden Standardabweichung (SD). Berechnung der p=Werte mittels nicht parametrischem t-Test, Mann-Whitney-Test.

### 3.5.5 Behandlung mit SABAs

Ferner wurde untersucht, ob eine Behandlung mit SABAs bei Asthmatikern und Wheezern Einfluss auf die DNA-Methylierung zeigt.

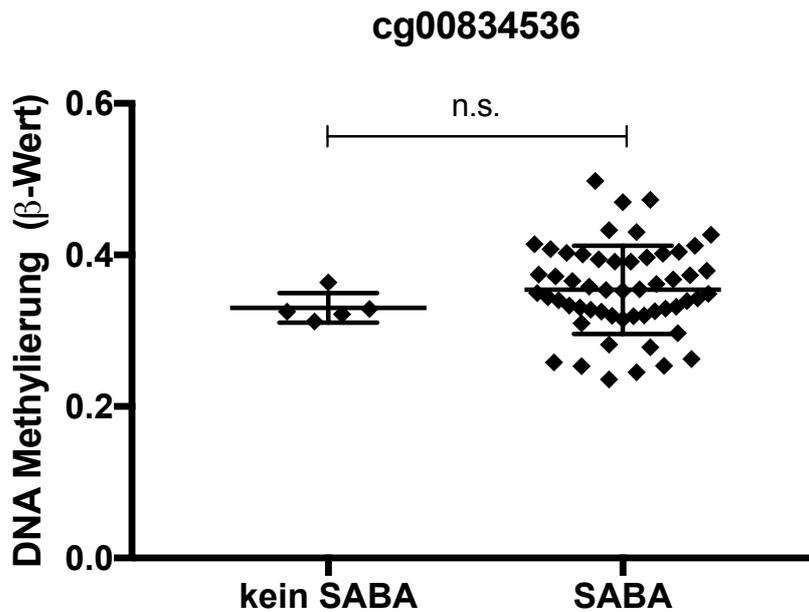
In der Zusammenfassung von Asthmatikern und Wheezern betrug die Anzahl derjenigen, die eine Therapie mit SABAs erhalten haben n= 52 (91%), während n= 5 (9%) keine Medikation mit SABAs erhielten.

Es zeigten sich bzgl. der Methylierung keine signifikanten Unterschiede bei Asthmatikern/Wheezern im Zusammenhang mit einer SABA- Therapie. Exemplarisch erfolgte die Darstellung eines CpG-Locus (cg00834536) (s. Abb. 7). Die Ergebnisse zu den weiteren CpG-Loci finden sich im Anhang unter 7.3.3.

Bei Asthmatikern konnte in der Gruppe ohne Behandlung mit SABAs aufgrund der Rekrutierung nur ein Vergleich mit einer geringen Anzahl (n=3) hergestellt werden.

Die differentielle DNA-Methylierung bei Asthmatikern zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (s. Tab. 12).

Die Gruppe der Wheezer zeigte aufgrund der Rekrutierung keine repräsentative Vergleichsgruppe ohne Therapie mit SABAs (n=2).



**Abbildung 7: Assoziation der DNA-Methylierung mit einer SABA Therapie.**

Exemplarische Darstellung von cg00834536. Unterscheidung von Probanden ohne SABA Therapie (kein SABA) und Probanden mit SABA Therapie (SABA). Darstellung des Methylierungsgrades durch  $\beta$ -Werte (0=unmethyliert, 1=vollständig methyliert) und Darstellung der Anzahl der Messwerte je Gruppe mit Berechnung der Mittelwerte (MW) und entsprechender Standardabweichung (SD). Berechnung des p-Wertes mittels nicht parametrischem t-Test, Mann-Whitney-Test.

Asthmatiker	SABAs (n=38)		ohne SABAs (n=3)		p-Wert
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
cg04737885	0,7547	0,0512	0,7616	0,0122	n.s.
cg05765011	0,4109	0,1218	0,4751	0,1368	n.s.
cg00834536	0,3644	0,0559	0,3221	0,0085	n.s.
cg27066052	0,8526	0,0761	0,8590	0,0268	n.s.

**Tabelle 12: Einfluss inhalativer Betamimetika auf die differentielle DNA-Methylierung bei Asthmatikern.**

Anzahl der Messwerte von Asthmatikern für die unterschiedlichen CpGs. Unterscheidung zwischen einer Therapie mit SABAs und ohne SABAs. Darstellung des Methylierungsgrades durch  $\beta$ -Werte (0=unmethyliert, 1=vollständig methyliert) und Berechnung der Mittelwerte und entsprechender Standardabweichung (SD). Berechnung der p-Werte mittels nicht parametrischem t-Test, Mann-Whitney-Test.

### 3.6 Korrelation von Methylierung und ADCY9-Expression

Im ersten Datenset der Studienpopulation erfolgte die Bestimmung der mRNA-Expression von ADCY9 mittels *RNASeq* (Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung) [135].

Um zu differenzieren, ob bei den primären humanen Nasenepithelzellen eine Korrelation zwischen der DNA-Methylierung an den vier CpG-Loci und der mRNA-Expression von ADCY9 vorliegt, wurde diese jeweils für die Kontrollgruppe (n=10), die Asthmatiker (n=10), die infizierten Kontrollen (n=10) und die infizierten Asthmatiker (n=10) untersucht. Aufgrund der geringen Strichprobengröße konnte hier keine Normalverteilung gezeigt werden. Da jedoch in der gesamten Studienpopulation (s. Ergebnisteil 3.2) eine Normalverteilung der Daten zur DNA-Methylierung gezeigt wurde, erfolgte die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ( $r$ ) für cg0437885, cg05765011 und cg00834536 und nach Spearman ( $r_s$ ) für cg27066052.

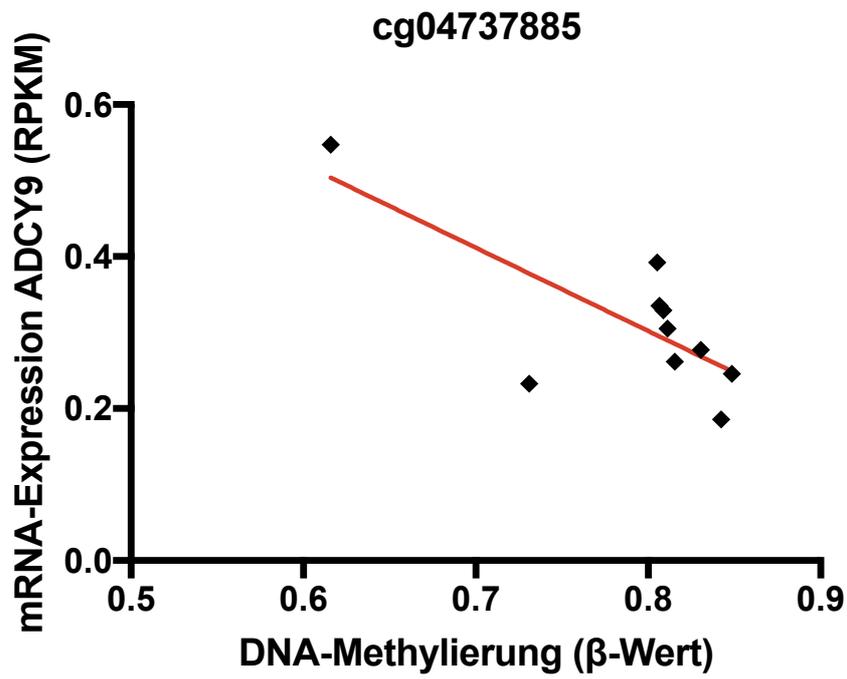
Eine negative Korrelation der mRNA-Expression von ADCY9 mit zunehmender DNA-Methylierung konnte am cg04737885 für Asthmatiker ohne Infektion und am cg00834536 für Asthmatiker mit und ohne Infektion gezeigt werden (s. Tab. 13 und Abb. 8).

	CpG	r	p-Wert
Asthmatiker ohne Infektion	cg04737885	- 0,7492	0,0126
Asthmatiker ohne Infektion	cg00834536	- 0,7045	0,0229
Asthmatiker mit Infektion	cg00834536	- 0,6465	0,0434

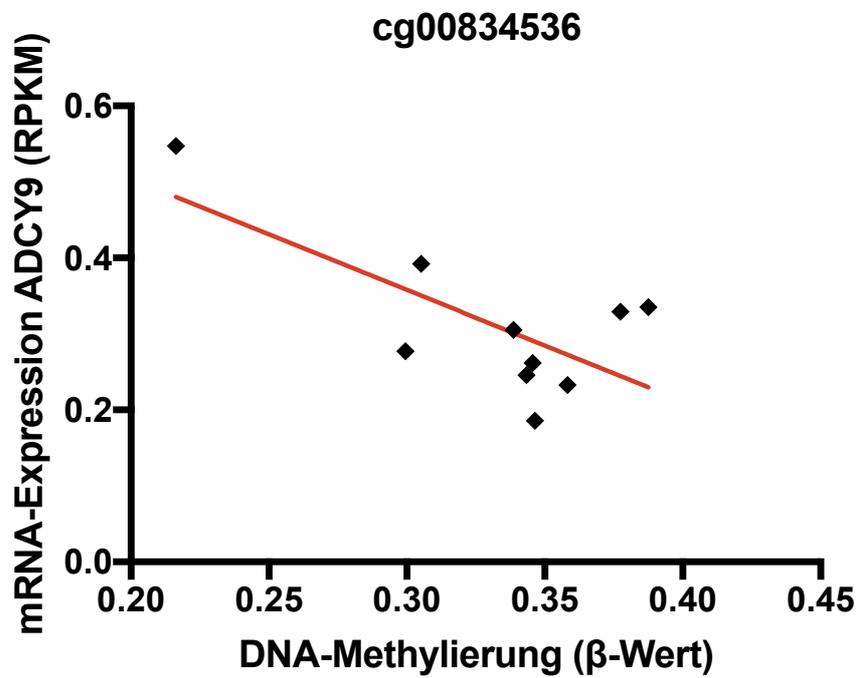
**Tabelle 13: Korrelationsanalyse der mRNA-Expression von ADCY9 und DNA-Methylierung.**

Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ( $r$ ) in humanen nasalen Epithelzellen von Asthmatikern mit oder ohne RV-Infektion.

A Asthmatiker ohne RVI



B Asthmatiker ohne RVI



### C Asthmatiker mit RVI

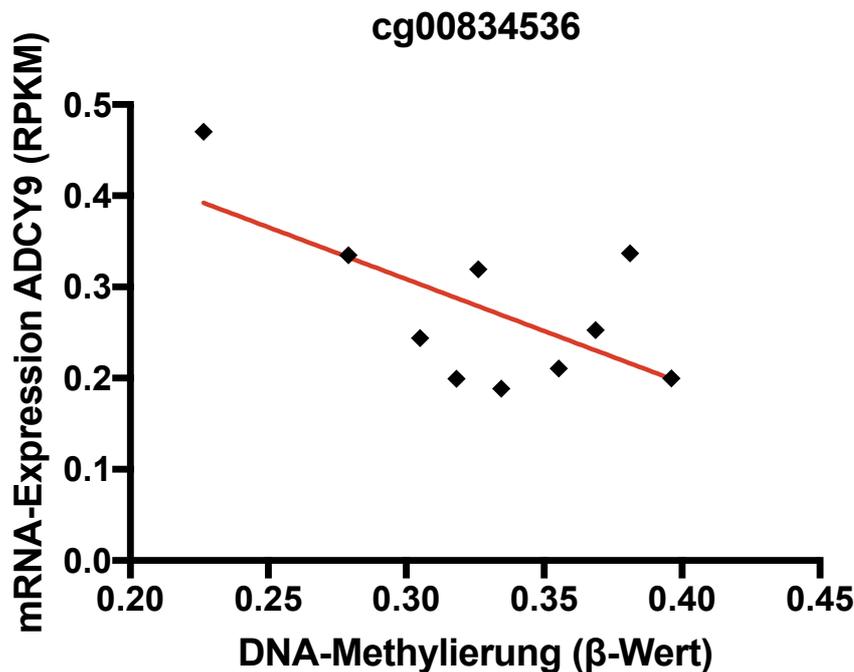


Abbildung 8: Regressionsgerade der Korrelation von ADCY9-mRNA-Expression und spezifischen DNA-Methylierungen.

A, B: Asthmatiker ohne *in vitro* RVI C: Asthmatiker mit *in vitro* RVI. mRNA-Expression in RPKM (Reads per Kilobase per million mapped reads), Methylierungsniveau als  $\beta$ -Wert.

### 3.7 Einfluss einer RVI auf die ADCY9-Expression bei Asthmatikern und Nicht-Asthmatikern

Die Analyse der RNA-Sequenzierungsergebnisse erfolgte nach Normalisierung der Expressionsstärke in RPKM (Anzahl der Fragmente pro Kilobase Transkriptlänge pro eine Millionen Sequenzen). Dieser Wert ermöglicht den Vergleich der RNA-Expressionsstärke von ADCY9 in unterschiedlichen Gruppen innerhalb der Kohorte. Mittels zweifacher Varianzanalyse wurde untersucht, ob Asthmatiker und Nicht-Asthmatiker mit und ohne *in vitro* RVI eine differentielle DNA-Methylierung zeigten. Dabei wurden multiple Vergleiche durchgeführt und die Ergebnisse durch Kontrolle der FDR nach Benjamini und Hochberg korrigiert. Der Vergleich der RNA-Expression von ADCY9 zwischen den Kontrollen zeigt ein ähnliches Ausgangsniveau. Nach der Virusinfektion wurde eine Tendenz zur höheren RNA-

Expression von ADCY9 bei Asthmatikern im Vergleich zu Nicht-Asthmatikern gefunden. Der Unterschied ist allerdings nicht signifikant (s. Abb. 9).

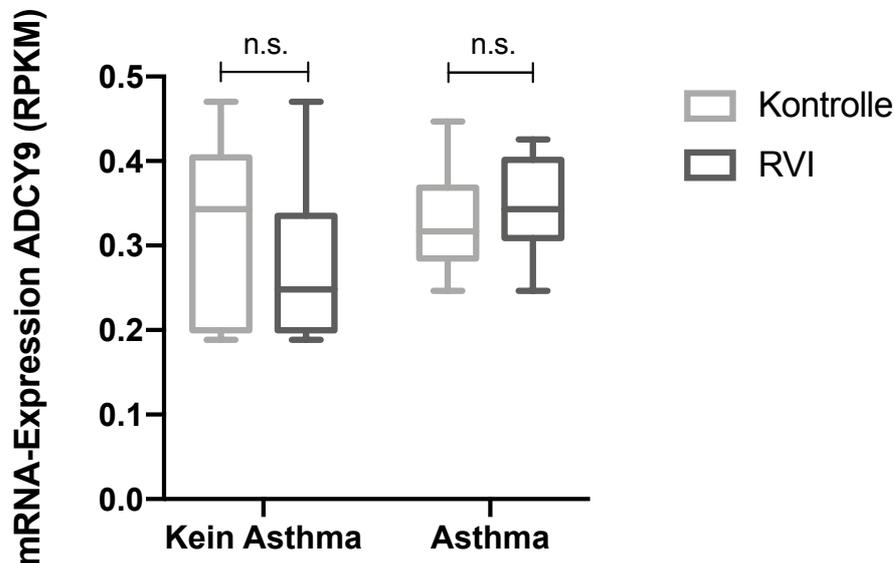


Abbildung 9: Einfluss einer multiplen RVI auf die RNA-Expression von ADCY9.

RNA-Expression von ADCY9 durch RNA-Sequenzierung und Darstellung nach Normalisierung in RPKM (Anzahl der Fragmente pro Kilobase Transkriptlänge pro eine Millionen Sequenzen) bei Nicht-Asthmatikern (kein Asthma) und Asthmatikern (Asthma) mit und ohne *in vitro* RVI. Testverfahren: two-way-ANOVA und Kontrolle der FDR. Zur besseren Übersicht wurden bei dem Vergleich von Nicht-Asthmatikern und Asthmatikern keine Querbalken dargestellt.

### 3.8 Einfluss einer multiplen RVI auf die ADCY9-Expression einer Zellkultur humaner bronchialer Epithelzellen

#### 3.8.1 Infektionskontrolle durch IL8

Um im Infektionsversuch nachzuweisen, dass eine erfolgreiche Infektion der Zellen stattgefunden hat, erfolgte die Messung der RNA-Expression von IL8 mittels qPCR. Das Zytokin IL8 zeigt bei einer Infektion mit dem RV16 einen besonders hohen Anstieg und wird bei einer Asthma Exazerbation verstärkt exprimiert [26,148–150].

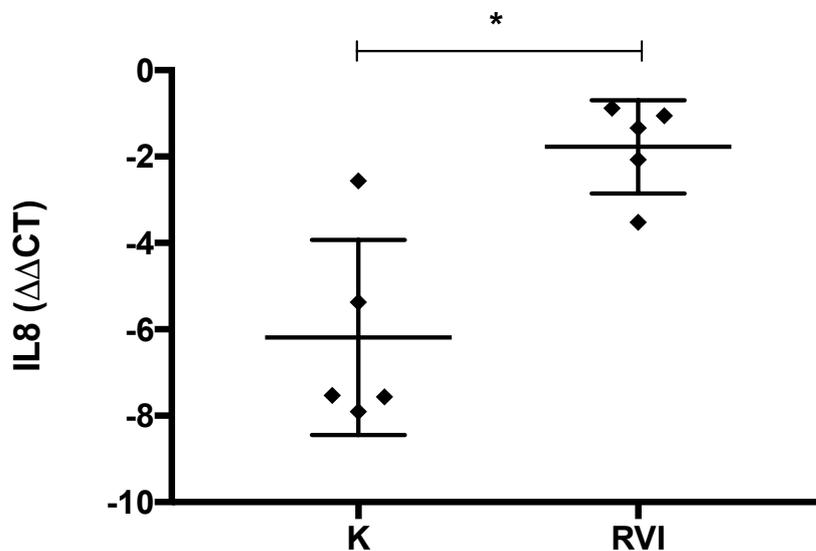
Für die Auswertung der qPCR wurde zunächst der CT-Mittelwert (CT-MW) aus den CT-Werten der drei Replikate je Probe berechnet. Ein hoher CT-Wert bedeutet, dass wenig cDNA vorliegt.

Zur Berechnung der  $\Delta$ CT-Werte wurden für die Infektionskontrolle und zur Auswertung der Infektionsversuche das Housekeeping-Gen RPS-18 verwendet. Aus einem vorherigen Versuch der Arbeitsgruppe geht hervor, dass sich RPS18 im Vergleich zu HPRT1 und ACTB über eine Anzahl von fünf Infektionen stabil verhält.

Der  $\Delta$ CT-Wert wurde durch Subtraktion des Zielgens vom CT-MW des Housekeeping-Gens berechnet. Da sowohl die CT-MW für IL8 als auch für ADCY9 höhere Werte zeigten als der CT-MW für RPS18, ergaben sich in beiden Auswertungen negative  $\Delta$ CT-Werte. Niedrigere  $\Delta$ CT-Werte bedeuten auch eine geringere Menge vorliegender cDNA und eine geringere RNA-Expression.

Der  $\Delta\Delta$ -CT Wert errechnet sich anhand der Differenz zwischen den  $\Delta$ CT-Werten aus der 5. Infektion minus der 1. Infektion.

Die  $\Delta\Delta$ -CT Werte zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollzellen und infizierten Zellen, sodass von einer erfolgreichen Infektion ausgegangen werden kann ( $p=0,016$ ) (s. Abb. 10).

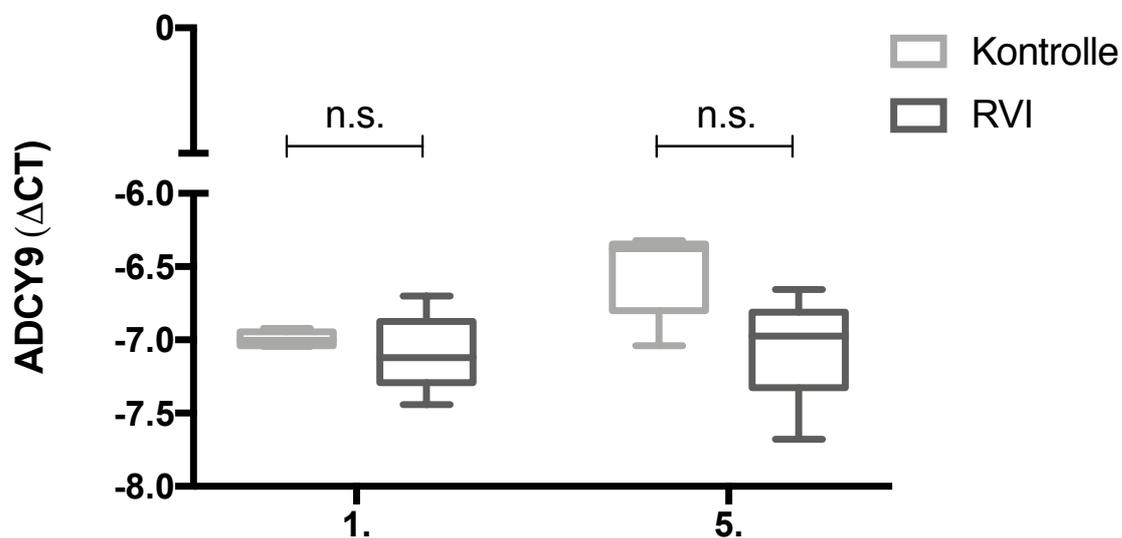


**Abbildung 10: Infektionskontrolle durch IL8.**

Erfolgreiche Infektion bei signifikantem Anstieg der RNA-Expression von IL8 bei den infizierten Proben (RVI) im Vergleich zu den Kontrollen (K):  $p=0,016^*$  (Mann-Whitney-Test) in der qPCR. Jeder Punkt steht für einen berechneten Messwert, die Linien zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung.

### 3.8.2 ADCY9-Expression in der Zellkultur

Die mRNA-Expression in den Beas2-Bs wurde nach der 1. Infektion und nach der 5. Infektion untersucht. Nach einmaliger Infektion zeigten die Kontrollkulturen und infizierten Zellen ein fast gleiches Ausgangsniveau der mRNA-Expression von ADCY9. Über die fünf Infektionen blieb der  $\Delta$ CT-Mittelwert bei infizierten Zellen auf gleichem Niveau, während bei Kontrollzellen eine Tendenz zum Anstieg der Expression von ADCY9 sichtbar war. Der Expressionsunterschied zwischen Kontrollzellen und infizierten Zellen nach fünf Infektionen (K5 vs. RV5) ist jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) (s. Abb.11).



**Abbildung 11: RNA-Expression von ADCY9 nach Mehrfachinfektion in Zellkultur.**

Messung mittels qPCR in Beas-2B. Unterscheidung von RV16 infizierten Zellen nach erster Infektion (1.) und nach fünfter Infektion (5.) (x-Achse). Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen. Bei den Kontrollzellen zeigt sich über die Kulturdauer ein Anstieg von ADCY9, während die RV16 infizierten Zellen eine eher gleichbleibende Expression von ADCY9 zeigen. Der Anstieg zwischen den Kontroll- und RV16-Zellkulturen ist nicht signifikant. K5 vs. RV5: n.s.  $p = 0,095$  (Mann-Whitney Test).

Die Erhöhung des  $\Delta$ CT-Werts bei den Infektionskontrollen würde auf eine Zunahme der RNA-Expression von ADCY9 mit zunehmender Passage der Zellen hindeuten.

Die mehrfache Virusinfektion scheint diesem Expressionsanstieg entgegenzuwirken (Trend).

Anhand der Berechnung der  $\Delta\Delta$ -CT-Werte wird der Einfluss der Infektionen auf die mRNA-Expression von ADCY9 abgebildet. Hierfür wurde die Differenz zwischen den  $\Delta$ CT-Werten aus

der 5. Infektion minus der 1. Infektion bei den Kontrollen (K (5-1)) und den Infizierten (RV (5-1)) gebildet. Die  $\Delta\Delta$ -CT Werte zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollen und infizierten Zellen ( $p=0,15$ , Mann-Whitney-Test).

### 3.8.3 Powerkalkulation zur ADCY9-Expression in der Zellkultur

Da die statistische Auswertung nicht signifikant ist, jedoch ein Trend zur Unterdrückung von ADCY9 durch die Infektionen vermutet werden kann, wurde eine Power-Kalkulation angeschlossen. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm *StatMate von GraphPad*. Unter der Annahme, dass eine Gauß-Verteilung vorliegt, wurden der Mittelwert und die Standardabweichung für die Kontrollen nach der 5. Bearbeitung (K5) und die fünffach Infizierten (RV5) berechnet. Die Power-Kalkulation zeigt, dass bei einer größeren Stichprobenzahl von 30 Proben bei einer Standardabweichung von 0,15 und Power von 95-99% ein Unterschied auf einem Signifikanzniveau von 0,05 messbar wäre (s. Tab. 14).

n=5	K5		RV5
<b>Mittelwert</b>	-6,534		-7,049
<b>Standardabweichung</b>	0,133		0,168
	0,15 (MW)		
<b>Signifikanzlevel</b>	$\alpha = 0,05$		
<b>n/Gruppe</b>	<b>99%</b>	<b>95%</b>	<b>90%</b>
20	0,21	0,18	0,16
25	0,19	0,16	0,14
<b>30</b>	<b>0,17</b>	<b>0,14</b>	0,13
35	0,16	0,13	0,12

**Tabelle 14: Power-Kalkulation Infektionsversuche.**

Berechnung mit StatMate (GraphPad). Bei einer Standardabweichung von 0,15 und einer Power von 95-99% wäre bei einer Probenanzahl von  $n=30$  ein Unterschied der RNA-Expression auf einem Signifikanzniveau von 0,05 zwischen den Kontrollen (K5) und infizierten (RV5) messbar.

## 4 Diskussion

Bereits seit einigen Jahren ist bekannt, dass eine Infektion mit Rhinoviren im Kindesalter einen signifikanten Einfluss auf die spätere Entstehung von Asthma bronchiale aufweist [25,41]. Der genaue Pathomechanismus wurde noch nicht hinreichend erklärt. Bekannt ist, dass die Pathogenese von Asthma bronchiale sowohl auf genetischen als auch exogenen Faktoren beruht, deren Zusammenhang mit epigenetischen Veränderungen aktuell genauer erforscht wird. In unserer Arbeitsgruppe wurde der Einfluss einer RVI auf die differentielle DNA-Methylierung genauer untersucht und es konnten dabei Unterschiede im Adenylatzyklase kodierenden Gen (ADCY9) festgestellt werden. Ob jedoch die Expression des Enzyms Adenylatzyklase epigenetisch durch RVI beeinflusst wird und dabei eine Rolle bei asthmarelevanten Pathomechanismen spielt, soll in dieser Arbeit eruiert werden.

Um diese Fragen zu beantworten, wurde nach aktuellem Kenntnisstand zum ersten Mal eine Analyse zur DNA-Methylierung am ADCY9-Gen und zur RNA-Expression von ADCY9 bei einer RVI kindlicher Asthmatiker und Nicht-Asthmatiker durchgeführt. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung der Methylierungsänderung am ADCY9-Gen nach wiederholten *in vitro* RV-Infektionen. Ferner wurde die Assoziation nach *in vitro* RVI differentiell methylierter CpG-Loci mit asthmarelevanten klinischen Aspekten in Nasenepithelzellen einer pädiatrischen Studienpopulation untersucht.

Die Ausgangshypothese lautete, dass eine differentielle DNA-Methylierung mit asthmarelevanten Pathomechanismen assoziiert ist und die RV-Infektion(en) durch eine differentielle Methylierung die RNA-Expression der Adenylatzyklase hemmt(en). Insgesamt konnte diese nicht bestätigt werden. Die Analyse erbrachte überwiegend keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Für einen CpG-Locus konnte eine differentielle Methylierung mit Hospitalisierung von Asthmatikern assoziiert werden, wobei kein direkter Zusammenhang mit einer RVI gezeigt werden konnte. Dennoch zeigte sich ein Trend zur höheren Expression von ADCY9 bei infizierten Asthmatikern im Vergleich zu infizierten Nicht-Asthmatikern.

Für alle Fragestellungen wurden Korrekturen angewandt, um für die Irrtumswahrscheinlichkeit zu korrigieren.

## 4.1 Methylierung und Expression von ADCY9 nach RVI in der Kohorte

Am Gen-Locus cg00834536 konnte bei nicht-hospitalisierten Asthmatikern eine stärkere Methylierung im Vergleich zu hospitalisierten Asthmatikern gemessen werden. Für diesen CpG-Locus in der Promotorregion zeigte die Korrelationsanalyse, dass die Expression von ADCY9 bei infizierten und nicht-infizierten Asthmatikern mit zunehmender Methylierung abnimmt. Bei Asthmatikern, die aufgrund einer schweren Exazerbation hospitalisiert werden mussten, kann daher auf eine höhere Genexpression von ADCY9 im Vergleich zu nicht-hospitalisierten Asthmatikern geschlossen werden. Nach der Virusinfektion zeigte sich bei infizierten Asthmatikern ein Trend zur höheren Expression von ADCY9 im Vergleich zu infizierten Nicht-Asthmatikern. Vermutet werden kann daher, dass das Gen ADCY9 bei Asthmatikern, die z.B. aufgrund einer schweren viral ausgelösten akuten Exazerbation eine stationäre Behandlung benötigten, verstärkt exprimiert wird.

In der jeweiligen Kontrollgruppe ohne Infektion bestand kein signifikanter Expressionsunterschied von ADCY9 bei Asthmatikern im Vergleich zu Nicht-Asthmatikern, sodass kein Zusammenhang zwischen der ADCY9-Expression und der Diagnose Asthma allgemein vermutet werden kann. Interessant wäre es daher, ob bei hospitalisierten Asthmatikern im Rahmen der akuten Exazerbation Rhinoviren mittels Multiplex-PCR detektiert werden konnten. Dieser Parameter ist im Rahmen der Datenerhebung jedoch nicht erfasst worden.

Eine differentielle DNA-Methylierung konnte bisher nur in wenigen Forschungsarbeiten mit einer RVI bei Asthmatikern assoziiert werden.

In einer 2018 veröffentlichten Studie von Pech et al. aus unserer Arbeitsgruppe wurden anhand von primären nasalen Epithelzellen genomweite Analysen zur DNA-Methylierung und RNA-Expression bei Kindern mit Asthma bronchiale durchgeführt und die Beeinflussung durch eine RVI im Vergleich zu Nicht-Asthmatikern untersucht. Pech et al. fanden dabei signifikante Unterschiede an 16 unterschiedlichen CpG-Loci. Diese befanden sich unter anderem an den Genen *BAT3* (*HLA-B-assoziiertes Transkript 3*) und *NEU1* (*Neuraminidase 1*), welche bei der Immunantwort eines Wirts auf virale Infektionen involviert sind [135].

In einer Studie von McErlean et al. im Jahr 2014 wurde publiziert, dass sich die DNA-Methylierung bei einer Infektion mit Rhinoviren sowohl global als auch an spezifischen Gen Loci wie zum Beispiel *SNORA12* bei Asthmatikern im Vergleich zu Nicht-Asthmatikern unterscheidet. Das RNA-Gen *SNORA12* wurde bisher mit der Pathogenese von systemischem Lupus erythematosus assoziiert und steht somit möglicherweise im immunologischen Zusammenhang mit Asthma [153]. Das Gen *ADCY9* wurde in der Arbeit von McErlean et al. nicht aufgeführt.

Von McErlean et al. wurden nasale Epithelzellen erwachsener Asthmatiker und Nicht-Asthmatiker analysiert bei denen genomweite und spezifische Anstiege der DNA-Methylierung nach RVI auftraten [134]. Auch wenn sich Epithelzellen sowohl bei Kindern, als auch bei Erwachsenen regelmäßig erneuern, sollte das biologische Alter der Probanden bei der Interpretation der Methylierungsmuster berücksichtigt werden [154].

In unserer Arbeitsgruppe konnten Nemani et al. im Jahr 2021 mehr als 30 000 differentiell methylierte CpG-Loci in einer Zellkultur (BEAS-2Bs) nach konsekutiver *in vitro* RVI identifizieren. Von diesen CpG-Loci konnten acht CpG-Loci signifikant mit der RNA-Expression einer Isoform des Kollagen Typ IV (*COL4A3*) in Zusammenhang gebracht werden, wobei insbesondere eine erhöhte Methylierung am cg11797365 mit einer verminderten RNA-Expression von *COL4A3* assoziiert war [136].

*COL4A3* ist ein wesentlicher Bestandteil der Basalmembran und wird im Lungengewebe in großen Mengen exprimiert [155]. Bekannt ist, dass Asthmatiker mit schwerer Asthmaform eine verminderte Expression dieses Proteins aufweisen, wodurch Inflammation und Angiogenese begünstigt werden [156–159].

Die Arbeitsgruppe von Kim et al. veröffentlichte im Jahr 2015 Ergebnisse aus einer Studie mit erwachsenen Asthmatikern und Nicht-Asthmatikern, in der bei Asthmatikern eine verminderte Genexpression von Interferon (IFN)- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und dem Transkriptionsfaktor *Interferon regulatory factor 7* (IRF7) in Lymphozyten im Zusammenhang mit einer RV-16 Infektion *in vitro* gefunden wurde. Diese Gene kodieren für Interferone, die eine wichtige Rolle in der Immunabwehrreaktion einer Virusinfektion spielen. Für IRF7 wurde zusätzlich die DNA-Methylierung an 16 CpG-Loci der Promotorregion untersucht, wobei keine signifikante differentielle Methylierung gefunden wurde, die eine Expressionsänderung bedingen könnte [160].

Neben der RVI wurden in dieser Arbeit weitere Indikatoren für einen hohen Schweregrad der Asthmaerkrankung wie eine notwendige orale Steroidtherapie bei Hospitalisierten, eine reduzierte Lungenfunktion und die Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Blut untersucht, wobei an den untersuchten CpG-Loci ebenfalls kein Einfluss auf eine differentielle Methylierung bei Asthmatikern und Nicht-Asthmatikern bzw. Wheezern gefunden wurde. Eine Behandlung mit SABAs und der Risikofaktor Tabakrauchexposition konnten ebenfalls nicht mit signifikanten differentiellen Methylierungsunterschieden assoziiert werden.

Der Einfluss einer Steroidtherapie auf eine differentielle DNA-Methylierung wurde ebenfalls von Xue Zhang et al. untersucht. Die Arbeitsgruppe analysierte nasale Proben von 33 Kindern mit einer akuten Asthma Exazerbation, die initial entweder ein gutes oder schlechtes Ansprechen auf die Steroidtherapie zeigten. Die Proben wurden 18-24h nach Erstvorstellung in der Notfallambulanz nochmals kontrolliert. Bei denjenigen Patienten mit gutem Ansprechen zeigte sich im zeitlichen Verlauf eine differentielle DNA-Methylierung an drei CpG-Loci in der Promotorregion von OTX2 [161].

Die Arbeit von Xue Zhang et al. zeigt, dass sich die Methylierung im Zeitintervall einiger Stunden verändern und außerdem mit einem Therapieerfolg durch Steroidapplikation assoziiert werden kann. In dieser Arbeit konnte zwar keine differentielle DNA-Methylierung mit einer Steroidtherapie assoziiert werden, es ist jedoch denkbar, dass eine Steroidtherapie kurzzeitige oder zeitlich variable Effekte auf die DNA-Methylierung aufweisen kann. Nemani et al. konnten in dem Zusammenhang zeigen, dass der Methylierungsgrad eines CpG-Locus (cg11797365) möglicherweise die transkriptionelle Antwort auf eine inhalative Steroidtherapie beeinflusst und so Auswirkungen auf das Therapieansprechen von Asthmatikern haben kann [136].

In Bezug auf eine reduzierte Lungenfunktion wurde in dieser Arbeit wiederum keine differentielle Methylierung von ADCY9 gefunden. Nemani et al. konnten dagegen eine erhöhte Methylierung am cg11797365 mit einer reduzierten Lungenfunktion bei Asthmatikern korrelieren [136]. In einer Studie von Dekker et al. wurde Nabelschnurblut von insgesamt 1688 Neugeborenen auf differentielle Methylierungsmuster untersucht und mit der Lungenfunktion im Alter von 7-13 Jahren korreliert. Dabei konnten 22 CpG-Loci identifiziert werden, die im Zusammenhang mit der Lungenfunktion standen und 18 Methylierungsstellen mit Asthma bronchiale assoziiert werden. Die betreffenden Gene, z.B.

HOXA5 wurden zuvor mit der Entwicklung der Atemwege, z.B. der Alveolarisierung, Atemwegserkrankungen allgemein und zellulärer Immunität in Verbindung gebracht [162].

Die Ergebnisse beschreiben Zusammenhänge von differentieller Methylierung und Asthma bronchiale, woraus jedoch keine Kausalität impliziert werden kann. Vielmehr besteht die Möglichkeit eines Konfundierungseffekts durch multiple Einflussfaktoren auf den Organismus. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss einer *in vitro* RVI auf die differentielle Methylierung von ADCY9 zusätzlich in einer Zellkultur untersucht.

## 4.2 Methylierung und Expression von ADCY9 nach multipler RVI in der Zellkultur

Um eine schwere wiederholte virale Infektion zu simulieren, erfolgte eine fünffache RVI humaner bronchialer Epithelzellen (Beas-2B) in einer Zellkultur. Hierdurch lässt sich der Einfluss der Virusinfektion auf die differentielle Methylierung sowie deren Auswirkungen auf die Genexpression unabhängig untersuchen, da multiple Einflussfaktoren, welche *in vivo* epigenetische Veränderungen hervorrufen können, deutlich reduziert werden.

Die Grundlage für die Messungen und Analyse zum Gen ADCY9 dieser Arbeit beruhte auf Experimenten unserer Arbeitsgruppe, in denen Methylierungsgrade von mehrfach *in vitro* RV-16 infizierten Beas-2Bs bestimmt wurden. Mittels Human Methylation450 BeadChip Kit (Illumina) wurden hierbei signifikante Veränderungen der DNA-Methylierung an den in dieser Arbeit untersuchten CpG-Loci gemessen.

Die Ergebnisse konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

In der Zellkultur mit Beas-2Bs zeigte die Expression von ADCY9 innerhalb der geringen Stichprobenzahl keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen (n=5) und infizierten Zellen (n=5). Insgesamt zeigte sich bei den Kontrollen jedoch ein Trend zur Zunahme der RNA-Expression von ADCY9 mit zunehmender Passage der Zellen, während die mehrfache RVI scheinbar diesem Trend entgegenwirkt.

Da aufgrund des Trends geringe Unterschiede wahrscheinlich sind, erfolgte eine Power-Kalkulation für die Ergebnisse der Zellkultur. Hier konnte berechnet werden, dass es bei einer größeren Anzahl an Proben von n=30 einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den fünffach infizierten Proben geben würde. In diesem Fall stellt sich

jedoch die Frage, ob es sich bei dem beschriebenen Effekt um ein Zellkulturartefakt handelt und ob diese Unterschiede biologisch für den Organismus relevant wären.

Auffällig ist, dass sich die Methylierung *in vivo* scheinbar nicht entsprechend den experimentellen Daten aus der Zellkultur verhält.

Während in der Zellkultur tendenziell ein hemmender Effekt auf die RNA-Expression von ADCY9 durch die RVI besteht, zeigte sich in der Kohorte ein gegensätzlicher Trend zur höheren RNA-Expression von ADCY9 nach RVI bei Asthmatikern im Vergleich zu Nicht-Asthmatikern. Überträgt man die Beobachtungen der Zellkultur auf die Kohorte, würden Asthmatiker demnach einen geringeren Effekt durch die RVI als Nicht-Asthmatiker zeigen. Hierfür könnte eine verminderte Methylierung bei Asthmatikern im Vergleich zu Nicht-Asthmatikern verantwortlich sein, welche allerdings in den Ergebnissen zur Methylierung an den untersuchten CpG-Loci nicht bestätigt werden konnte.

Insgesamt liegt daher innerhalb der Studienpopulation eher die Vermutung nahe, dass Asthmatiker in Situationen mit höherer Krankheitsaktivität, hier am Beispiel der notwendigen stationären Behandlung z.B. durch Infektexazerbation, vermehrt ADCY9 exprimieren, um den Energiebedarf der Zellen zu decken. Ob dieser Bedarf epigenetisch durch die Methylierung reguliert wird, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Wenn Asthmatiker bei einem Infekt mit Rhinoviren mehr ADCY9 exprimieren als Nicht-Asthmatiker, spricht dieses für einen erhöhten Energiebedarf der Zelle bei erhöhter Krankheitsaktivität. Daraus könnte geschlossen werden, dass Asthmatiker bei einer RVI mehr cAMP in der Zelle benötigen als Nicht-Asthmatiker. Bleibt die Vermutung bestehen, dass die Funktion der Adenylatzyklase durch den viralen Infekt eingeschränkt wird, könnte eine erhöhte RNA-Expression von ADCY9 einen Mechanismus zur Gegenregulation bei Asthmatikern bilden.

Andere Arbeiten haben in dem Zusammenhang Proteine untersucht, deren regulatorische Funktion für die Entzündungsmediation bei Asthmatikern über eine ADCY-cAMP Signalkaskade vermittelt wird und die zellulären Effekte daher indirekt die Funktion der Adenylatzyklase involvieren. In verschiedenen Experimenten *in vivo* und *in vitro* wurde herausgefunden, dass z.B. der Transkriptionsfaktor CREM in den CD4-positiven T-Zellen herunterreguliert ist und so eine Entzündungsreaktion bei Kindern mit Asthma bronchiale verstärkt wird [163]. Eine Isoform von CREM (CREM $\alpha$ ), die durch alternatives splicing generiert wird, reguliert außerdem die Zytokinausschüttung, z.B. von IL-5. Neben der

regulatorischen Funktion auf Promotorregionen in T-Lymphozyten verändert CREM $\alpha$  zusätzlich die epigenetische Konformation von Zytokingenen, unter anderem durch DNA-Methylierung [164].

Da der Einfluss von CREM über eine Signalkaskade mit Adenylatzyklase und cAMP vermittelt wird, besteht die Möglichkeit, dass auch eine Verminderung von cAMP ähnliche Effekte auf die Zytokinausschüttung haben könnte und somit die Pathogenese von Asthma positiv beeinflussen könnte. Umgekehrt könnte eine Erniedrigung von CREM einen Mechanismus zur Gegenregulation in der Zelle auslösen und zu einer Hochregulierung von ADCY9 führen, um mehr cAMP zu generieren.

Der in der Kontrollgruppe vorliegende Trend zur Zunahme der RNA-Expression von ADCY9 mit zunehmender Passage der Zellen, konnte in anderen Forschungsarbeiten ebenfalls beobachtet werden. Horvath zeigte in den letzten Jahren, dass die DNA-Methylierung einen Biomarker für die biologische Uhr eines Organismus darstellt und eine Korrelation mit der Anzahl einer Zellpassage vorliegt [154,165]. Ebenfalls konnte in epigenomweiten Assoziationsstudien ein erhöhtes epigenetisches Alter nasaler Epithelzellen mit Asthma und Allergie korreliert werden [125].

In dieser Arbeit konnte am Gen-Locus cg27066052 ebenfalls eine leicht positive Korrelation der Methylierung mit dem Alter der Studienteilnehmer gezeigt werden. Hieraus wurde jedoch nicht auf eine kausale Beziehung zwischen den Parametern geschlossen und es sollte für weitere Analysen eine Korrektur erfolgen. Im Datensatz von Horvath wurde dieses CpG nicht aufgeführt.

Die DNA-Methylierung weiterer untersuchten CpG-Loci innerhalb der Kohorte zeigte keine Beeinflussung durch die Merkmale Alter und Geschlecht und es wurde somit ein Konfundierungseffekt hierdurch für die Analysen ausgeschlossen.

### 4.3 Methodenkritik

Die Stärken dieser Arbeit liegen in der Erforschung von Grundlagen eines aktuellen Themas, zu dem bisher nur wenige Daten veröffentlicht wurden. Die Arbeit profitiert von der Kombination der Analysen aus einer Kohorte mit denen einer Zellkultur. Die gewonnenen

Informationen anhand von Probanden schaffen einen Bezug von Grundlagenforschung zum klinischen Alltag, während mit Hilfe der Zellkultur konkrete Fragestellungen, hier am Beispiel des Einflusses einer multiplen RVI auf die DNA-Methylierung und Genexpression von ADCY9, untersucht werden konnten.

Die Zellkultur mit Beas-2Bs stellt hier eine einfache Methode dar, um anhand von leicht zugänglichen menschlichen Zellen, einfach reproduzierbare Experimente durchzuführen. Komplexe Zusammenhänge *in vivo* lassen sich *in vitro* auf bestimmte Fragestellungen reduzieren, da die Zellen nicht in Kommunikation mit dem gesamten Organismus stehen und äußere Einflüsse, wie zum Beispiel die Temperatur und das Nährstoffangebot, reguliert werden können. Dadurch lässt sich die Analyse im Hinblick auf einen Fokus, hier am Beispiel ADCY9, vereinfachen und Störgrößen deutlich reduzieren.

Die Limitation dieser Arbeit besteht umgekehrt darin, dass Ergebnisse von Zellkulturen grundsätzlich nur bedingt auf Organismen *in vivo* übertragen werden können. Um diese Limitation zu reduzieren, wurden Beas-2Bs verwendet. Die humanen bronchialen Epithelzellen Beas-2B nähern sich der *in vivo* Situation eng an und werden schon viele Jahre für die Asthma Forschung verwendet [166].

Da die nasalen Zellen aus der Kohorte im Gegensatz zu den Beas-2Bs maximal 3-5 Passagen überlebt haben, konnte in der Kohorte nur eine einfache Infektion mit dem RV16 durchgeführt werden. Aufgrund der geringeren Viruslast in der Kohorte im Vergleich zur höheren Viruslast in der Zellkultur (fünffache RVI) ist daher ein geringerer Effekt auf Methylierungsänderungen in der Kohorte denkbar.

Zu berücksichtigen ist außerdem, dass bei den humanen Proben nasale Epithelzellen und keine bronchialen Epithelzellen untersucht wurden, da diese bei Kindern nur unzulänglich gewonnen werden können. Obwohl gezeigt wurde, dass nasale Epithelzellen ein vergleichbares Expressionsmuster wie bronchiale Epithelzellen aufweisen, ist denkbar, dass die Analysen durch Entzündungsreaktionen bei allergischer Rhinitis je nach Jahreszeit und Atopie beeinflusst werden könnten [167]. In einer Studie von 2013 mit 17 erwachsenen Asthmatikern und Nicht-Asthmatikern konnte diese Überlegung bestätigt und eine differentielle Methylierung in 52 Genen bronchialer Mukosazellen mit Atopie assoziiert werden [168]. In einer genomweiten Untersuchung nasaler Epithelzellen von 483 Kindern aus Puerto Rico konnten Forno et al. im Jahr 2019 ebenfalls Methylierungsmuster ausfindig machen, die eine Assoziation mit Atopie darstellten. Hierbei waren vor allem CpG-Loci

betroffen, deren nahegelegenen Gene mit epithelialer Barrierefunktion, z.B. CDHR3 und CDH26 oder Immunregulation, z.B. FBXL7, NTRK1 und SLC9A3 assoziiert werden [124].

In dieser Arbeit konnte dagegen kein Effekt von Atopie auf die DNA-Methylierung gezeigt werden. Auch Stefanowicz et al. untersuchten 2012 die Methylierung von 1027 CpG-Loci in 671 Genen bronchialer Epithelzellen von kindlichen Asthmatikern und Nicht-Asthmatikern und konnten ebenfalls keinen Effekt durch Atopie beobachten [169].

Weitere Arbeiten haben gezeigt, dass nasale Zellen für epigenetische DNA-Analysen gut geeignet sind [170].

Für die Interpretation der Ergebnisse zur DNA-Methylierung wurden ausschließlich Daten der Methylierungs-Analyse mit dem *Human Methylation450 BeadChip Kit* und *EPIC (Illumina)* verwendet. Obwohl mit dieser Messmethode in etwa 480.000 CpG-Loci des menschlichen Genoms abgedeckt werden, berücksichtigt diese Methode insbesondere Regionen mit einem hohen CpG Gehalt, wie sie zum Beispiel in der Promotorregion gehäuft vorkommen. Dadurch werden wichtige Genregionen, wie zum Beispiel Enhancer durch die Illumina CHIP-Messung stark unterrepräsentiert [171]. Mit dem UCSC Gnome Browser erfolgte eine Lagebestimmung der untersuchten CpG-Loci. Demnach befinden sich das cg04737885, cg00834536 und cg27066052 in der Promotorregion, während das cg05765011 im Intron 2/10 mittig gelegen ist. Viele Studien in der Literatur haben gezeigt, dass sich die Methylierung in der Promotorregion umgekehrt proportional zur Transkription verhält und eine starke Methylierung die Transkription vermindert. Ergänzend dazu wurde ebenfalls in der Literatur beschrieben, dass auch Introns eine wichtige funktionell relevante Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren bilden und durch Methylierung reguliert werden können [172,173]. Dieser Effekt wurde ebenfalls in dieser Arbeit für die in der Promotorregion liegenden Loci cg04737885 und cg00834536 bei Asthmatikern beobachtet. In der Korrelationsanalyse zeigte sich bei Asthmatikern jeweils eine Abnahme der mRNA-Expression von ADCY9 mit zunehmender DNA-Methylierung.

Der Methylierungsgrad lag am cg00834536 für alle Werte im Bereich der Teilmethylierung und am cg04737885 für alle Werte im Bereich der Vollmethylierung. Hieraus ergibt sich die Frage aus welcher Quantität der differentiellen Methylierung eine Expressionsänderung resultiert und ob eine Unterteilung in differenziertere Methylierungsgrade sinnvoll und erforderlich ist.

Eine weitere Limitation der experimentellen Arbeit stellen die Labormethoden dar.

Durch Pyrosequenzierung sollte eine Quantifizierung des Methylierungsgrades an den untersuchten CpG-Loci durchgeführt werden, um möglicherweise durch das Illumina Verfahren falsch erhöht gemessene Methylierungswerte zu überprüfen. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Amplifikation des ADCY9-Gens konnten die Methylierungsänderungen jedoch nicht durch Pyrosequenzierung validiert werden und daher keine präzise Quantifizierung des Methylierungsgrades an den untersuchten CpG-Loci erfolgen. Mithilfe der Software Pyromark Assay Design 2.0 (Qiagen) wurden bestmögliche Primer ausgewählt, wobei nicht alle Kriterien für hochqualitative Primer für die jeweilige Zielregion berücksichtigt werden konnten. Daraus resultierten unspezifische PCR-Produkte in der Gelelektrophorese durch Schlierenbildung und schwache Banden. Ursächlich hierfür können die Ausbildung von Sekundärstrukturen wie Primer-Dimere und Hairpin-Strukturen innerhalb der Zielregion sein [174].

Die Ergebnisse dieser Arbeit würden außerdem von einer noch größeren Stichprobenzahl profitieren, um aus Tendenzen signifikante Werte zu erzielen. Leider handelt es sich bei der RNA-Sequenzierung und den Chip-Messungen zur Methylierung um sehr teure Verfahren, die im Rahmen der Laborarbeit nicht unbegrenzt verfügbar waren.

#### 4.4 Mögliche Folgeexperimente

Um festzustellen, ob die Methylierung einen biologisch relevanten Einfluss auf die Enzymfunktion und somit auch auf den Energiehaushalt der Zelle haben könnte, besteht die Möglichkeit das cAMP-Level in Abhängigkeit von RVI und der mRNA-Menge der ADCY9 zu messen. Dazu ist ein Versuchs-Kit im Handel erhältlich (z.B. *das AlphaScreen cAMP Assay Kit*). Der Einfluss der mRNA-Menge von ADCY9 auf eine Entzündung und die Pathogenese von Asthma, könnte anhand von immunologisch relevante Signal- und Botenstoffe in Abhängigkeit der mRNA-Menge der ADCY9 untersucht werden. Hierfür eignen sich z.B. Messungen zum Level asthmarelevanter proinflammatorischer Zytokine wie IL4, IL5 und IL13 im Serum bzw. Zellüberstand [27,175].

Klinische Beobachtungen haben gezeigt, dass Asthmatiker bei einer viralen Asthma-Exazerbation ein verschlechtertes Ansprechen auf inhalative SABAs und LABAs aufweisen, welches experimentell mit einer RVI induzierten Reduktion der Beta-2-Rezeptor Funktion an glatten Muskelzellen in den Atemwegen assoziiert werden konnte [151]. Um zusätzlich den Effekt einer RVI auf die Expression der Adenylatzyklase zu untersuchen, könnten die Infektionsversuche in der Zellkultur durch eine Behandlung mit Salbutamol erweitert werden. Weiterhin bleibt die Frage offen, welche Rolle das Gen ADCY9 für die Funktion des Enzyms spielt, da es insgesamt zehn Isoformen des Enzyms gibt, von denen zum Beispiel die Isoform ADCY2 primär in der Lunge exprimiert wird. Die Isoform ADCY9 und andere Isoformen wie ADCY4 und ADCY6 werden dagegen weit verbreitet exprimiert [176].

Durch Transfektion mit siRNA (engl. *small interfering RNA*) besteht die Möglichkeit ein kurzzeitiges „Abschalten“ des ADCY9-Gens zu simulieren, um herauszufinden wie die Zelle auf eine deutliche Verminderung der Expression von ADCY9 reagieren würde. Hier könnten ebenfalls Messungen zur cAMP-Funktion angeschlossen werden, um zu überprüfen, ob die Funktion der Adenylatzyklase reduziert wurde. Außerdem wäre auch in diesem Versuch eine Messung asthmarelevanter Zytokine sinnvoll, um einen Zusammenhang zur Asthmapathogenese durch einen reduzierten Energiehaushalt der Zelle bilden zu können. Ergänzend dazu kann eine Überexpression der ADCY9 mit einem Expressionsvektor induziert werden und erneut die mRNA-Menge der ADCY9, von cAMP und immunologischen Signalen gemessen werden.

Eine weitere Möglichkeit auch langfristig bestimmte Gene hoch- bzw. herunter zu regulieren bietet die Induktion einer spezifischen Methylierung in der Promotorregion oder bestimmten Steuerelementen in Form von epigenetischem *silencing* [177–179]. Das Grundprinzip beruht auf dem CRISPR-/cas9 – System wodurch ein bestimmter DNA-Abschnitt erkannt und zerschnitten werden kann. Viele Bakterien schützen sich mit diesem Mechanismus vor fremden Nukleinsäuren wie Viren oder Plasmiden. CRISPR (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) sind sich wiederholende DNA-Abschnitte. Bei den Bakterien wird fremde DNA zunächst in die CRISPR integriert. Die Transkripte der CRISPR liefern dann sogenannte crRNA (CRISPR-RNA). Die crRNA bildet zusammen mit einer komplementären tracrRNA (trans-activating RNA) einen Komplex mit der Endonuklease Cas9 (*CRISPR associated Protein*). Bei erneutem Kontakt mit der fremden DNA wird diese wiedererkannt und durch die Cas9 zerschnitten [180–183].

Für das epigenetische *silencing* wurden Fusionsproteine konzipiert, die eine Bindung einer 5-Methyl-Cytosin-Methyltransferase an eine bestimmte DNA-Stelle schaffen, um dort eine Methylierung anzufügen. Gen-Editierung mit CRISPR/Cas9 ermöglicht außerdem die Inaktivierung von katalytisch aktiven DNA-Methyltransferasen, um die Zielregionen dieser Enzyme genau zu untersuchen. Es wird vermutet, dass eine Kaskade von Veränderungen an der DNA-Struktur bewirkt wird und das Zielgen in ein repressives Chromatin Stadium übergeht [184,185]. Das epigenetische *silencing* kann langfristig Einfluss nehmen auf die Genexpression, wodurch offene biologische Fragen beantwortet werden könnten. Ferner könnte sich hieraus ein Therapieansatz für genetische Erkrankungen entwickeln [185,186].

#### 4.5 Botschaft für die Asthmapathogenese

Das zentrale Ziel aktueller Forschung ist die Identifizierung von sogenannten *Asthma Endotypen*. Dabei sollen Patientengruppen gebildet werden, denen der gleiche zelluläre Pathomechanismus zugrunde liegt und bei denen molekulargenetische Merkmale mit der klinischen Symptomatik von Wheezern bzw. Asthmatikern korreliert werden können [21,48,187]. Anhand der *All Age Asthma Cohort* (ALLIANCE) sollen aktuell unter anderem molekulare Prädiktoren und Biomarker identifiziert werden, die insbesondere den Verlauf und das Therapieansprechen von Wheezern bzw. Asthmatikern vom Kindesalter bis hin zu Erwachsenen charakterisieren, wodurch die individuelle Behandlung für alle Lebensphasen verbessert werden könnte [140].

Bisher konnten in epigenomweiten Analysen schon eine Vielzahl von epigenetischen Veränderungen mit Asthma, Allergie, Lungenfunktion und viral induzierter Inflammation assoziiert werden. Es ist allerdings noch nicht gelungen spezifische Methylierungsmuster für einzelne Asthmatiker zu identifizieren und einem bestimmten Endotyp zuzuordnen [125].

Besonders im Hinblick auf die Patientengruppe mit schwerem therapierefraktärem Asthma stellt sich die Frage, ob sich gemeinsame DNA-Methylierungssignaturen identifizieren lassen, die zum einen eine Erklärung für die unzureichende Symptomkontrolle unter den aktuellen Therapieoptionen liefern können und zum anderen ob Methylierungsänderungen an bestimmten CpG-Loci Prädiktoren für Krankheitsverläufe und Biomarker als Wegweiser für Therapieentscheidungen darstellen.

Eine systematische Überprüfung von epigenomweiten Assoziationsstudien bei denen differentielle Methylierungen und Asthma von 2005 bis 2019 untersucht wurden, zeigte, dass bei Kindern bisher mehr als 400 und bei Erwachsenen bereits Tausende CpG-Loci identifiziert wurden, jedoch noch weitere große Studien notwendig sind, um diese mit asthmarelevanten Pathomechanismen zu korrelieren, Patientenkollektive zu klassifizieren und Vorhersagekonstellationen zu identifizieren [188].

Ob sowohl die genetische Prädisposition ein Asthma bronchiale zu entwickeln als auch die Exposition gegenüber exogenen Pathogenen wie die RVI oder Umwelttoxinen wie Tabakrauch über eine differentielle Methylierung an der Asthmapathogenese beteiligt sind, konnte anhand der untersuchten CpG-Loci nicht beantwortet werden. Interessant wäre es daher ob zukünftig andere Methylierungsstellen oder CpG-Konstellationen mit diesen Merkmalen assoziiert werden können.

#### 4.6 Ausblick für die Asthmatherapie

In der medikamentösen Asthmatherapie spielt die Funktion der Adenylatzyklase eine wichtige Rolle in der Signalkaskade bei der Behandlung mit Beta-2-Sympathomimetika. Bei Kindern und Jugendlichen sind kurzwirksame Beta-2-Mimetika (SABAs) wesentlicher Bestandteil der Bedarfsmedikation aller Behandlungsstufen und langwirksame Beta-2-Mimetika (LABAs) in Kombination mit inhalativen Glucocorticoiden zur Langzeittherapie ab Behandlungsstufe 4 empfohlen [13].

Bekannt ist ein individuell sehr unterschiedliches Ansprechen auf eine Therapie mit Beta-2-Sympathomimetika, wobei genetische Polymorphismen partiell ursächlich für diese klinischen Beobachtungen erachtet und aktuell genauer erforscht werden [189–191].

Im Hinblick auf eine personalisierte Asthmatherapie ist insbesondere die Identifikation von pharmakogenetischen Biomarkern Forschungsziel genomweiter Assoziationsstudien. In diesem Studiendesign wurden bereits potentielle Einzelnukleotid-Polymorphismen identifiziert, die mit Asthmarisiko oder einer verbesserten Lungenfunktion nach Glucocorticoid Behandlung assoziiert werden konnten [192,193]. Mehrfach beschrieben wurde auch ein Polymorphismus im ADCY9-Gen (Met-772-Ile), welcher mit dem Therapieansprechen auf inhalatives Salbutamol bei Patienten, die seit der Kindheit mit

inhalativen Corticosteroiden behandelt wurden, assoziiert werden kann [194,195]. Ob die Kenntnis dieser Polymorphismen zur Verbesserung der individuellen Asthmatherapie darstellt, bleibt noch offen [193].

Für die Altersgruppe der Wheezer sind Biomarker und Prädiktoren von besonderem Interesse, um eine frühe Asthmatherapie gezielt bei denjenigen Kindern einzuleiten, die davon profitieren und allgemein das Nebenwirkungsrisiko so gering wie möglich zu halten. Diese Gruppe zu identifizieren ist schwierig. Anhand der aktuellen Studienlage besteht Konsens innerhalb der Fachgesellschaft, dass bei Wheezern mit „multitrigger-wheeze“ Symptomatik, bei denen Exazerbationen durch Umwelteinflüsse ausgelöst werden und zwischen den Exazerbationen eine Symptompersistenz fortbesteht, eine hohe Asthmagefährdung vorliegt und daher eine Dauertherapie mit inhalativem Corticosteroid sinnvoll ist. Unter der Therapie sollte in jedem Fall nach 2-3 Monaten eine Verlaufskontrolle erfolgen [17].

Zur Verbesserung der Evidenz sind diesbezüglich weitere Studien erforderlich.

Unter den bisher untersuchten Biomarkern, wie z.B. dem fraktionierten exhalierten Stickstoffmonoxid (FeNo), dem Leukotrien E4-Level im Urin und dem eosinophil-cationic-protein (ECP) im Serum, eignen sich bisher keine für die klinische Anwendung bei Wheezern. In experimentellen Studien konnte jedoch das eosinophile-derived neurotoxin (EDN), ein Marker auf eosinophilen Granulozyten, als geeigneter Biomarker für eine wiederkehrende wheezing Symptomatik bei Vorschulkindern bestimmt werden [196,197]. In unserer Arbeitsgruppe konnten Weckmann et. al. vor kurzem einen Biomarker als Vorhersageparameter für das Ansprechen auf eine anti-IgE Therapie mit Omalizumab identifizieren. Dabei handelt es sich um den serologischen COL4A3 (engl. *inflammation-protective collagen 4*) Abbaumarker C4Ma3, welcher im Patientenblut gemessen werden kann [198].

Die experimentelle Asthmaforschung widmet sich neben der Exploration von molekulargenetischen Biomarkern auch molekularen und epigenetischen Therapieansätzen. Einen Ansatz stellt beispielsweise das proinflammatorische Zytokin Interleukin-9 (IL9) dar. In der Lunge beeinflusst IL9 direkt die Induktion von Genen zur Schleimbildung und hat indirekte Effekte auf allergische Reaktionen über IL13 [199]. Es wird vermutet, dass bei Asthmatikern eine Subgruppe von CD4 T-Zellen (Th9-Zellen) hauptsächlich für die Freisetzung von IL9

verantwortlich ist und bei Allergikern erhöht nachgewiesen werden können. Xiao et al. haben im Mausmodell die epigenetische Beeinflussung durch die Ausbildung von Super-Enhancern bei der Differenzierung von Th9-Zellen untersucht. Super-Enhancer unterstützen die Gen-Expression und stehen im Zusammenhang mit bestimmten Histon-Proteinen, die ebenfalls die Gen-Expression regulieren und Einfluss auf die Chromatinstruktur nehmen. Das Verständnis zur Regulation und Expression der IL9- exprimierenden Zellen schafft neue Überlegungen für die Asthmatherapie. Im Mausmodell von Xiao et al. wurde beispielsweise die CRISPR/Cas-Methode verwendet, um Super-Enhancer zu entfernen [200,201].

Ob das Gen ADCY9 ebenfalls einen Angriffspunkt für epigenetisches *silencing* bietet, müsste in Zukunft noch näher untersucht werden. Eventuell könnte eine Inaktivierung von katalytisch aktiven DNA-Methyltransferasen durch Gen-Editierung mit dem CRISPR/Cas9 – System dazu beitragen eine erhöhte Methylierung durch virale Infektionen zu reduzieren oder zu verhindern.

Biomarker-Panels würden Indikatoren für bestmögliche Therapieoptionen mit höchster Effektivität und dem geringsten Nebenwirkungsrisiko für Asthmapatienten eines Endotyps bilden und in Zukunft möglicherweise den Weg von der experimentellen Forschung in die klinische Praxis finden.

Eine individualisierte Therapie würde dann für die Betroffenen zu einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität beitragen und die Belastung für unser Gesundheitssystem reduzieren.

## 5 Zusammenfassung

Die Atemwegsinfektion durch Rhinoviren stellt einen der stärksten Risikofaktoren für die Entstehung von virus-assoziiertem Asthma bronchiale dar. Neue Erkenntnisse der Asthmapathogenese zeigen, dass epigenetische Modifikationen wie die DNA-Methylierung positiv mit dem Schweregrad der Asthmaerkrankung korrelieren. Rhinoviren können einen Anstieg der DNA-Methylierung an bestimmten Genen, wie zum Beispiel ADCY9 bewirken und dadurch die Genexpression und Zellfunktion im Hinblick auf Asthma beeinflussen.

In dieser Arbeit wurden die *in vitro* RVI assoziierte differentielle DNA-Methylierung und RNA-Expression von ADCY9 in einer Kohorte von Asthmatikern und Nicht-Asthmatikern analysiert, eine Assoziation mit klinischen Aspekten des Asthma bronchiale hergestellt und die RNA-Expression von ADCY9 einer Zellkultur mehrfach infizierter BEAS-2Bs untersucht.

In der Kohorte zeigte sich bei hospitalisierten Asthmatikern eine verminderte Methylierung eines CpG-Locus im Vergleich zu nicht hospitalisierten Asthmatikern. Zusätzlich bestand eine abnehmende RNA-Expression von ADCY9 bei infizierten und nicht infizierten Asthmatikern bei zunehmender Methylierung. Bei infizierten Asthmatikern bestand ein Trend zur höheren RNA-Expression von ADCY9 im Vergleich zu infizierten Nicht-Asthmatikern. Dieses könnte bedeuten, dass Asthmatiker, die einer stationäre Behandlung bedürfen, mehr cAMP zur intrazellulären Signalverarbeitung benötigen. Für den Fall, dass die Funktion der Adenylatzyklase durch den viralen Infekt vermindert ist, könnte eine erhöhte RNA-Expression von ADCY9 einen Mechanismus zur Gegenregulation bei Asthmatikern darstellen. In der Zellkultur zeigt sich die Tendenz eines hemmenden Effekts durch die RVI auf die RNA-Expression von ADCY9. In Folgeexperimenten könnte untersucht werden, welchen Effekt eine Reduktion der RNA-Expression von ADCY9 auf die Funktion des Enzyms Adenylatzyklase hat und ob epigenetische Modifikationen für die Asthmathherapie in Frage kommen. Weitere große Studien sind erforderlich, um Methylierungsmuster mit asthmarelevanten Pathomechanismen zu korrelieren und Biomarker für die Definition von Asthma Endotypen zu identifizieren.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Asthma. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma> (Zugriff am 20.02.2022)
2. Asthma-Level 3 cause. <https://www.thelancet.com/pb-assets/Lancet/gbd/summaries/diseases/asthma.pdf> (Zugriff am 20.02.2022)
3. Global Asthma Network. The Global Asthma Report. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 26, pp. 1-102, 2022.
4. Loftus PA, Wise SK. Epidemiology of asthma. *Current opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 24(3), pp. 245-249, 2016.
5. Makadia LD, Roper PJ, Andrews JO, Tingen MS. Tobacco Use and Smoke Exposure in Children: New Trends, Harm, and Strategies to Improve Health Outcomes. *Current allergy and asthma reports*, 17(8), p. 55, 2017.
6. Lemanske RF, Jackson DJ, Gangnon RE, et al. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(3), pp. 571-577, 2005.
7. Lange M, Hoffmann R, Mauz E, et al. Längsschnitterhebung von KiGGS Welle 2 – Erhebungsdesign und Fallzahlentwicklung der KiGGS-Kohorte. *Journal of Health Monitoring*, 3(1), 2018.
8. Thamm R, Poethko-Müller C, Hüther A, Thamm M. Allergische Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland – Querschnittergebnisse aus KiGGS Welle 2 und Trends. *Journal of Health Monitoring*, 3(3), 2018.
9. Krause L, Vogelgesang F, Thamm R, et al. Individuelle Verläufe von Asthma, Adipositas und ADHS beim Übergang von Kindheit und Jugend ins junge Erwachsenenalter. *Journal of Health Monitoring*, 6(S5), 2021.
10. Serebrisky D, Wiznia A. Pediatric Asthma: A Global Epidemic. *Annals of Global Health*, 85(1), p. 6, 2019.
11. Akinbami LJ, Simon AE, Rossen LM. Changing Trends in Asthma Prevalence Among Children. *Pediatrics*, 137(1), pp. 1-7, 2016.
12. Lawson JA, Brozek G, Shpakou A, et al. An international comparison of asthma, wheeze, and breathing medication use among children. *Respiratory Medicine*, 133, pp. 22-28, 2017.
13. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Asthma – Langfassung, 4. Auflage. Version 1. 2020. [www.asthma.versorgungsleitlinien.de](http://www.asthma.versorgungsleitlinien.de) (Zugriff am 04.09.2022)
14. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2022. <https://ginasthma.org/gina-reports/> (Zugriff am 04.09.2022)
15. Taussig LM, Wright AL, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, Martinez FD. Tucson Children's Respiratory Study: 1980 to present. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(4), pp. 661-676, 2003. h
16. Sly PD, Boner AL, Björkstén B, et al. Early identification of atopy in the prediction of persistent asthma in children. *The Lancet*, 372(9643), pp. 1100-1106, 2008.
17. Brand PLP, Caudri D, Eber E, et al. Classification and pharmacological treatment of preschool wheezing: Changes since 2008. In: *European Respiratory Journal*, 43, pp. 1172-1177, 2014.

18. Criée CP, Baur X, Berdel D, et al. Leitlinie zur Spirometrie. *Pneumologie*, 69(03), pp. 147-164, 2015.
19. Hekking PPW, Wener RR, Amelink M, Zwinderman AH, Bouvy ML, Bel EH. The prevalence of severe refractory asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(4), pp. 896-902, 2015.
20. Bel EH. Clinical phenotypes of asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 10(1), pp. 44-50, 2004.
21. Wenzel SE. Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches. *Nature Medicine*, 18(5), pp. 716-725, 2012.
22. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(4), pp. 315-323, 2010.
23. Brand PLP, Baraldi E, Bisgaard H, et al. Definition, assessment and treatment of wheezing disorders in preschool children: an evidence-based approach. *European Respiratory Journal*, 32(4), pp. 1096-1110, 2008.
24. Raaymakers MJA, Brand PLP, Landstra AM, et al. Episodic viral wheeze and multiple-trigger wheeze in preschool children are neither distinct nor constant patterns. A prospective multicenter cohort study in secondary care. *Pediatric Pulmonology*, 54(9), pp. 1439-1446, 2019.
25. Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, et al. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 178(7), pp. 667-672, 2008.
26. Sly PD, Kusel M, Holt PG. Do early-life viral infections cause asthma? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(6), pp. 1202-1205, 2010.
27. Finotto S, Galle PR, Neurath MF. Zur Immunpathogenese des Asthma bronchiale. *Pneumologie*, 54(9), pp. 412-418, 2000.
28. Matucci A, Vultaggio A, Maggi E, Kasujee I. Is IgE or eosinophils the key player in allergic asthma pathogenesis? Are we asking the right question? *Respiratory Research*, 19(1), p. 113, 2018.
29. Kuruvilla ME, Lee FEH, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 56(2), pp. 219-233, 2019.
30. Poon AH, Eidelman DH, Martin JG, Laprise C, Hamid Q. Pathogenesis of severe asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, 42(5), pp. 625-637, 2012.
31. Zuccaro L, Cox A, Pray C, et al. Histone deacetylase activity and recurrent bacterial bronchitis in severe eosinophilic asthma. *Allergy European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 71(4), pp. 571-575, 2016.
32. Ran J, Zhou J. Targeted inhibition of histone deacetylase 6 in inflammatory diseases. *Thoracic Cancer*, 10(3), pp. 405-412, 2019.
33. Bégin P, Nadeau KC. Epigenetic regulation of asthma and allergic disease. *Allergy Asthma and Clinical Immunology*, 10, p. 27, 2014.
34. Illi S, von Mutius E, Lau S, Niggemann B, Grüber C, Wahn U. Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study. *Lancet*, 368(9537), pp. 763-770, 2006.
35. Michel O, Kips J, Duchateau J, et al. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 154(6.1), pp. 1641-1646, 1996.
36. Lane J, Siebers R, Pene G, Howden-Chapman P, Crane J. Tokelau: A unique low allergen environment at sea level. *Clinical and Experimental Allergy*, 35(4), pp. 405-548, 2005.
37. Camargo L do N, Righetti RF, Aristóteles LR de CRB, et al. Effects of Anti-IL-17 on Inflammation, Remodeling, and Oxidative Stress in an Experimental Model of Asthma Exacerbated by LPS. *Frontiers in Immunology*, 8, p. 1835, 2018.

38. Qian G, Jiang W, Zou B, et al. LPS inactivation by a host lipase allows lung epithelial cell sensitization for allergic asthma. *Journal of Experimental Medicine*, 215(9), pp. 2397-2412, 2018.
39. Ding F, Liu B, Zou W, et al. LPS Exposure in Early Life Protects Against Mucus Hypersecretion in Ovalbumin-Induced Asthma by Down-Regulation of the IL-13 and JAK-STAT6 Pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46, pp. 1263-1274, 2018.
40. Hassan MZ, Chowdhury MAB, Hassan I, Chowdhury F, Schaefer N, Chisti MJ. Respiratory viral infection in early life and development of asthma in childhood. *Medicine*, 98(18), p. e15419, 2019.
41. Kusel MMH, de Klerk NH, Kebabdz T, et al. Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(5), pp. 1105-1110, 2007.
42. Esper F, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. *Journal of Infectious Diseases*, 191(4), pp. 492-498, 2005.
43. Holt PG, Upham JW, Sly PD. Contemporaneous maturation of immunologic and respiratory functions during early childhood: Implications for development of asthma prevention strategies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(1), pp. 16-24, 2005.
44. Holt PG, Macaubas C. Development of long term tolerance versus sensitisation to environmental allergens during the perinatal period. *Current Opinion in Immunology*, 9(6), pp. 782-787, 1997.
45. Burgess JK. The role of the extracellular matrix and specific growth factors in the regulation of inflammation and remodelling in asthma. *Pharmacology & Therapeutics*, 122(1), pp. 19-29, 2009.
46. McDonald DM. Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(10.2), pp. 39-45, 2001.
47. Hirota N, Martin JG. Mechanisms of airway remodeling. *Chest*, 144(3), pp. 1026-1032, 2013.
48. Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, et al. Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(2), pp. 355-360, 2011.
49. Ortega HG, Liu MC, Pavord ID, et al. Mepolizumab Treatment in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. *New England Journal of Medicine*, 371(13), pp. 1198-1207, 2014.
50. Cantero-Recasens G, Fandos C, Rubio-Moscardo F, Valverde MA, Vicente R. The asthma-associated ORMDL3 gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress. *Human Molecular Genetics*, 19(1), pp. 111-121, 2010.
51. Zhao CN, Fan Y, Huang JJ, et al. The Association of GSDMB and ORMDL3 Gene Polymorphisms With Asthma: A Meta-Analysis. *Allergy Asthma & Immunology Research*, 7(2), pp. 175-185, 2015.
52. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, et al. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ*, 310(6989), pp. 1225-1229, 1995.
53. Lee WM, Kiesner C, Pappas T, et al. A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants. *PLoS ONE*, 2(10), p. e966, 2007.
54. Monto AS, Bryan ER, Ohmit S. Rhinovirus Infections in Tecumseh, Michigan: Frequency of Illness and Number of Serotypes. *Journal of Infectious Diseases*, 156(1), pp. 43-49, 1987.
55. Falsey AR, Branche AR. Rhinoviruses. *International Encyclopedia of Public Health*, pp. 363-369, 2016.

56. Blaas D, Fuchs R. Mechanism of human rhinovirus infections. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3(1), p. 21, 2016.
57. Mackay IM. Human rhinoviruses. In: Schuller M, Sloots T, James G, Halliday C, Carter I, eds. *PCR for Clinical Microbiology: An Australian and International Perspective*, pp. 299-301, Springer, Dordrecht, 2010.
58. Pappas DE, Hendley JO, Hayden FG, Winther B. Symptom profile of common colds in school-aged children. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 39(6), pp. 469-477, 2008.
59. Gern JE. The ABCs of Rhinoviruses, Wheezing, and Asthma. *Journal of Virology*, 84(15), pp. 7418-7426, 2010.
60. Jackson DJ, Gern JE, Lemanske RF. The contributions of allergic sensitization and respiratory pathogens to asthma inception. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(3), pp. 659-665, 2016.
61. Iwane MK, Prill MM, Lu X, et al. Human rhinovirus species associated with hospitalizations for acute respiratory illness in young US children. *Journal of Infectious Diseases*, 204(11), pp. 1702-1710, 2011.
62. Bønnelykke K, Sleiman P, Nielsen K, et al. A genome-wide association study identifies CDHR3 as a susceptibility locus for early childhood asthma with severe exacerbations. *Nature Genetics*, 46, pp. 51-55, 2014.
63. Bochkov YA, Watters K, Ashraf S, et al. Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. *Proceedings of the National Academy of Science*, 112(17), pp. 5485-5490, 2015.
64. Peltola V, Jartti T, Putto-Laurila A, et al. Rhinovirus infections in children: A retrospective and prospective hospital-based study. *Journal of Medical Virology*, 81(10), pp. 1831-1838, 2009.
65. Hall GL, Hantos Z, Sly PD. Altered respiratory tissue mechanics in asymptomatic wheezy infants. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(8.1), pp. 1387-1391, 2001.
66. Kozyrskiy AL, Bahreinian S, Azad MB. Early life exposures: Impact on asthma and allergic disease. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 11(5), pp. 400-406, 2011.
67. Murphy K, Weaver C. Grundbegriffe der Immunologie. *Janeway Immunologie*, 9. Auflage, pp. 3-46, Springer Spektrum, Berlin-Heidelberg, 2018.
68. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nature Reviews Immunology*, 8(3), pp. 193-204, 2008.
69. Willart M a. M, Lambrecht BN. The danger within: endogenous danger signals, atopy and asthma. *Clinical and Experimental Allergy Journal of British Society for Allergy & Clinical Immunology*, 39(1), pp. 12-19, 2009.
70. Appak Ö, Duman M, Belet N, Sayiner AA. Viral respiratory infections diagnosed by multiplex polymerase chain reaction in pediatric patients. *Journal of Medical Virology*, 91(5), pp. 731-737, 2019.
71. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The IMPact-RSV Study Group. *Pediatrics*, 102(3.1), pp. 531-537, 1998.
72. Groothuis JR, Simoes EA, Levin MJ, et al. Prophylactic administration of respiratory syncytial virus immune globulin to high-risk infants and young children. The Respiratory Syncytial Virus Immune Globulin Study Group. *New England Journal of Medicine*, 329(21), pp. 1524-1530, 1993.
73. Anzueto A, Niederman MS. Diagnosis and Treatment of Rhinovirus Respiratory Infections. *Chest*, 123(5), pp. 1664-1672, 2003.

74. Rohde G, Schultze-Werninghaus G, Bauer TT. Therapie viraler Atemwegsinfekte. *Internist*, 45(4), pp. 468-475, 2004.
75. Bassler J, Schultz JE, Lupas AN. Adenylate cyclases: Receivers, transducers, and generators of signals. *Cellular Signaling*, 46, pp. 135-144, 2018.
76. Montminy M. Transcriptional Regulation by cyclic AMP. *Annual Reviews of Biochemistry*, 66(1), pp. 807-822, 1997.
77. Taussig R, Tang WJ, Hepler JR, Gilman AG. Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases. *Journal of Biological Chemistry*, 269(8), pp. 6093-6100, 1994.
78. Taussig R, Gilman AG. Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *Journal of Biological Chemistry*, 270(1), pp. 1-4, 1995.
79. Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, et al. Adenylyl cyclase amino acid sequence: Possible channel- or transporter-like structure. *Science*, 244(4912), pp. 1558-1564, 1989.
80. Sunahara RK. Complexity and Diversity of Mammalian Adenylyl Cyclases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36, pp. 461-480, 2002.
81. Nelson DL, Cox MM. Biologische Signale. In: Nelson D, Cox M, eds. *Lehninger Biochemie*, 4. Auflage, Springer, Berlin-Heidelberg, pp. 559-566, 2011.
82. Tissue expression of ADCY9 - Staining in lung - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000162104-ADCY9/tissue/lung> (Zugriff am 26.08.2022)
83. Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 279(3), pp. 400-416, 2017.
84. Masada N, Ciruela A, MacDougall DA, Cooper DMF. Distinct mechanisms of regulation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin of type 1 and 8 adenylyl cyclases support their different physiological roles. *Journal of Biological Chemistry*, 284(7), pp. 4451-4463, 2009.
85. Hanoune J, Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41, pp. 145-174, 2001.
86. Zhang F, Zhang L, Qi Y, Xu H. Mitochondrial cAMP signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(24), pp. 4577-4590, 2016.
87. Valsecchi F, Konrad C, Manfredi G. Role of soluble adenylyl cyclase in mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(12), pp. 2555-2560, 2014.
88. Papa S, Sardanelli AM, Cocco T, Speranza F, Scacco SC, Technikova-Dobrova Z. The nuclear-encoded 18 kDa (IP) AQRD subunit of bovine heart complex I is phosphorylated by the mitochondrial cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Letters*, 379(3), pp. 299-301, 1996.
89. Chen R, Fearnley IM, Peak-Chew SY, Walker JE. The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), pp. 26036-26045, 2004.
90. Neves-Zaph SR. Phosphodiesterase Diversity and Signal Processing Within cAMP Signaling Networks. *Advances in Neurobiology*, 17, pp. 3-14, 2017.
91. De Rasmio D, Signorile A, Santeramo A, et al. Intramitochondrial adenylyl cyclase controls the turnover of nuclear-encoded subunits and activity of mammalian complex I of the respiratory chain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1853(1), pp. 183-191, 2015.
92. De Rasmio D, Micelli L, Santeramo A, Signorile A, Lattanzio P, Papa S. cAMP regulates the functional activity, coupling efficiency and structural organization of mammalian FOF1 ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1857(4), pp. 350-358, 2016.
93. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 298, pp. 229-317, 2012.

94. Kumar S, Kostin S, Flacke JP, Reusch HP, Ladilov Y. Soluble adenylyl cyclase controls mitochondria-dependent apoptosis in coronary endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(22), pp. 14760-14768, 2009.
95. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion. *Comprehensive Physiology*, 7(1), pp. 113-170, 2016.
96. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), pp. 495-516, 2007.
97. Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(6), pp. 329-344, 2015.
98. Harada H, Becknell B, Wilm M, et al. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Molecular Cell*, 3(4), pp. 413-422, 1999.
99. Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, et al. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*, 424(6951), pp. 952-956, 2003.
100. Appukuttan A, Kasseckert SA, Micoogullari M, et al. Type 10 adenylyl cyclase mediates mitochondrial Bax translocation and apoptosis of adult rat cardiomyocytes under simulated ischaemia/reperfusion. *Cardiovascular Research*, 93(2), pp. 340-349, 2012.
101. Signorile A, Santeramo A, Tamma G, et al. Mitochondrial cAMP prevents apoptosis modulating Sirt3 protein level and OPA1 processing in cardiac myoblast cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(2), pp. 355-366, 2017.
102. Zifa E, Daniil Z, Skoumi E, et al. Mitochondrial genetic background plays a role in increasing risk to asthma. *Molecular Biology Reports*, 39(4), pp. 4697-4708, 2012.
103. Henricks PAJ, Nijkamp FP. Reactive Oxygen Species as Mediators in Asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 14(6), pp. 409-421, 2001.
104. Aguilera-Aguirre L, Bacsı A, Saavedra-Molina A, Kurosky A, Sur S, Boldogh I. Mitochondrial dysfunction increases allergic airway inflammation. *Journal of Immunology Baltimore, Md: 1950*, 183(8), pp. 5379-5387, 2009.
105. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), pp. 9-19, 2012.
106. Aravamudan B, Thompson MA, Pabelick CM, Prakash YS. Mitochondria in Lung Diseases. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 7(6), pp. 631-646, 2013.
107. Roberts RA, Laskin DL, Smith CV, et al. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicological Sciences*, 112(1), pp. 4-16, 2019.
108. Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *Journal of Experimental Medicine*, 208(3), pp. 417-420, 2011.
109. Reddy PH. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Asthma: Implications for Mitochondria-Targeted Antioxidant Therapeutics. *Pharmaceuticals*, 4(3), pp. 429-456, 2011.
110. Nathan C, Cunningham-Bussel A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature Reviews Immunology*, 13(5), pp. 349-361, 2013.
111. Wang D. The essential role of G protein-coupled receptor (GPCR) signaling in regulating T cell immunity. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 40(3), pp. 187-192, 2018.
112. Zhiming W, Luman W, Tingting Q, Yiwei C. Chemokines and receptors in intestinal B lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 103(5), pp. 807-819, 2018.
113. Riemekasten G, Petersen F, Heidecke H. What Makes Antibodies Against G Protein-Coupled Receptors so Special? A Novel Concept to Understand Chronic Diseases. *Frontiers in Immunology*, 11, p. 564526, 2020.

114. Rajarathnam K, Schnoor M, Richardson RM, Rajagopal S. How do chemokines navigate neutrophils to the target site: Dissecting the structural mechanisms and signaling pathways. *Cellular Signaling*, 54, pp. 69-80, 2019.
115. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS Journal*, 285(16), pp. 2944-2971, 2018.
116. Wu B xuan, Zhao L dan, Zhang X. CXCR4 and CXCR5 orchestrate dynamic germinal center reactions and may contribute to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Cellular and Molecular Immunology*, 16(8), pp. 724-726, 2019.
117. Offermanns S. Pharmaka mit Wirkung auf das respiratorische System. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S, eds. *Pharmakologie und Toxikologie*, Springer, Heidelberg, pp. 478-479, 2012.
118. Edwards MR, Haas J, Panettieri RA, Johnson M, Johnston SL. Corticosteroids and  $\beta$ 2 Agonists Differentially Regulate Rhinovirus-induced Interleukin-6 via Distinct Cis-acting Elements\*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21), pp. 15366-15375, 2007.
119. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33(S3), pp. 245-254, 2003.
120. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Review Genetics*, 8(4), pp. 253-262, 2007.
121. DeVries A, Vercelli D. Epigenetic Mechanisms in Asthma. *Annals of the American Thoracic Society*, 13(Supplement 1), pp. 48-50, 2016.
122. Potaczek DP, Harb H, Michel S, Alhamwe BA, Renz H, Tost J. Epigenetics and allergy: From basic mechanisms to clinical applications. *Epigenomics*, 9(4), pp. 539-571, 2017.
123. Nicodemus-Johnson J, Myers RA, Sakabe NJ, et al. DNA methylation in lung cells is associated with asthma endotypes and genetic risk. *JCI Insight*, 1(20), p. e90151, 2016.
124. Forno E, Wang T, Qi C, et al. DNA methylation in nasal epithelium, atopy, and atopic asthma in children: a genome-wide study. *Lancet Respiratory Medicine*, 7(4), pp. 336-346, 2019.
125. Cardenas A, Sordillo JE, Rifas-Shiman SL, et al. The nasal methylome as a biomarker of asthma and airway inflammation in children. *Nature Communications*, 10, p. 3095, 2019.
126. Alaskhar Alhamwe B, Khalaila R, Wolf J, et al. Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy Asthma & Clinical Immunology*, 14, p. 39, 2018.
127. Rothbart SB, Strahl BD. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1839(8), pp. 627-643, 2014.
128. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, pp. 509-524, 2014.
129. Eulalio A, Mano M. MicroRNA Screening and the Quest for Biologically Relevant Targets. *Journal of Biomolecular Screening*, 20(8), pp. 929-1051, 2015.
130. Wostenberg C, Lary JW, Sahu D, et al. The Role of Human Dicer-dsRBD in Processing Small Regulatory RNAs. *PLoS ONE*, 7(12), p. e51829, 2012.
131. Xu CJ, Söderhäll C, Bustamante M, et al. DNA methylation in childhood asthma: an epigenome-wide meta-analysis. *Lancet Respiratory Medicine*, 6(5), pp. 379-388, 2018.
132. Xu CJ, Gruziova O, Qi C, et al. Shared DNA methylation signatures in childhood allergy: The MeDALL study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 147(3), pp. 1031-1040, 2021.
133. Peng C, Van Meel ER, Cardenas A, et al. Epigenome-wide association study reveals methylation pathways associated with childhood allergic sensitization. *Epigenetics*, 14(5), pp. 445-466, 2019.

134. McErlean P, Jr SF, Costa FF, et al. Human rhinovirus infection causes different DNA methylation changes in nasal epithelial cells from healthy and asthmatic subjects. *BMC Medical Genomics*, 7, p. 37, 2014.
135. Pech M, Weckmann M, König IR, et al. Rhinovirus infections change DNA methylation and mRNA expression in children with asthma. *Plos One*, 13(11), p. e0205275, 2018.
136. Nemani SSP, Vermeulen CJ, Pech M, et al. COL4A3 expression in asthmatic epithelium depends on intronic methylation and ZNF263 binding. *ERJ Open Research*, 7, p. 00802-2020, 2021
137. Wang IJ, Chen SL, Lu TP, Chuang EY, Chen PC. Prenatal smoke exposure, DNA methylation, and childhood atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy Journal of the British Society of Allergy & Clinical Immunology*, 43(5), pp. 535-543, 2013.
138. Martino D, Joo JE, Sexton-Oates A, et al. Epigenome-wide association study reveals longitudinally stable DNA methylation differences in CD4+ T cells from children with IgE-mediated food allergy. *Epigenetics*, 9(7), pp. 998-1006, 2014.
139. Nadeau K, McDonald-Hyman C, Noth EM, et al. Ambient air pollution impairs regulatory T-cell function in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(4), pp. 845-852.e10, 2010.
140. Fuchs O, Bahmer T, Weckmann M, et al. The all age asthma cohort (ALLIANCE) - from early beginnings to chronic disease: A longitudinal cohort study. *BMC Pulmonary Medicine*, 18, p. 140, 2018.
141. Solomon O, Maclsaac J, Quach H, et al. Comparison of DNA methylation measured by Illumina 450K and EPIC BeadChips in blood of newborns and 14-year-old children. *Epigenetics*, 13(6), pp. 655-664, 2018.
142. Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, et al. Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells by Infection with SV40 or Adenovirus-12 SV40 Hybrid Virus, or Transfection via Strontium Phosphate Coprecipitation with a Plasmid Containing SV40 Early Region Genes. *Cancer Research*, 48(7), pp. 1904-1909, 1988.
143. Ganske F. UV absorbance DNA quantitation. *BMG Labtech*, 2006. <https://www.bmglabtech.com/en/application-notes/uv-absorbance-dna-quantitation/> (Zugriff am 11.11.2020)
144. Bergauer A, Sopel N, Kroß B, et al. IFN- $\alpha$ /IFN- $\lambda$  responses to respiratory viruses in paediatric asthma. *European Respiratory Journal*, 49(2), p. 1600969, 2017.
145. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1), pp. 289-300, 1995.
146. Yancey SW, Keene ON, Albers FC, et al. Biomarkers for severe eosinophilic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 140(6), pp. 1509-1518, 2017.
147. Ortega HG, Yancey SW, Mayer B, et al. Severe eosinophilic asthma treated with mepolizumab stratified by baseline eosinophil thresholds: a secondary analysis of the DREAM and MENSA studies. *Lancet Respiratory Medicine*, 4(7), pp. 549-556, 2016.
148. Grünberg K, Timmers MC, Smits HH, et al. Effect of experimental rhinovirus 16 colds on airway hyperresponsiveness to histamine and interleukin-8 in nasal lavage in asthmatic subjects in vivo. *Clinical and Experimental Allergy*, 27(1), pp. 36-45, 1997.
149. Esposito S, Ierardi V, Daleno C, et al. Genetic polymorphisms and risk of recurrent wheezing in pediatric age. *BMC Pulmonary Medicine*, 14, p. 162, 2014.
150. Hashimoto S, Matsumoto K, Gon Y, Ichiwata T, Takahashi N, Kobayashi T. Viral infection in asthma. *Allergology International Off Journal of Japanese Society of Allergology*, 57(1), pp. 21-31, 2008.

151. Trian T, Moir LM, Ge Q, et al. Rhinovirus-induced exacerbations of asthma: How is the Beta2-adrenoceptor implicated? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 43(2), pp. 227-233, 2010.
152. Gern JE, Busse WW. The role of viral infections in the natural history of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(2), pp. 201-212, 2000.
153. Lai NS, Yu HC, Huang KY, Tung CH, Huang HB, Lu MC. Decreased T cell expression of H/ACA box small nucleolar RNA 12 promotes lupus pathogenesis in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 27(9), pp. 1499-1508, 2018.
154. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology*, 14(10), p. R115, 2013.
155. Dunsmore SE. Treatment of COPD: A matrix perspective. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 3(1), pp. 113-122, 2008.
156. Johnson PRA, Burgess JK, Underwood PA, et al. Extracellular matrix proteins modulate asthmatic airway smooth muscle cell proliferation via an autocrine mechanism. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(4), pp. 690-696, 2004.
157. Van der Velden J, Harkness LM, Barker DM, et al. The Effects of Tumstatin on Vascularity, Airway Inflammation and Lung Function in an Experimental Sheep Model of Chronic Asthma. *Scientific Reports*, 6, p. 26309, 2016.
158. Burgess JK, Boustany S, Moir LM, et al. Reduction of tumstatin in asthmatic airways contributes to angiogenesis, inflammation, and hyperresponsiveness. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 181(2), pp. 106-115, 2010.
159. Harkness LM, Weckmann M, Kopp M, Becker T, Ashton AW, Burgess JK. Tumstatin regulates the angiogenic and inflammatory potential of airway smooth muscle extracellular matrix. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(12), pp. 3288-3297, 2017.
160. Kim SH, Lim KH, Park HK, et al. Reduced IRF7 response to rhinovirus unrelated with DNA methylation in peripheral mononuclear cells of adult asthmatics. *Asia Pacific Allergy*, 5(2), p.114-122, 2015.
161. Zhang X, Biagini Myers JM, Yadagiri VK, et al. Nasal DNA methylation differentiates corticosteroid treatment response in pediatric asthma: A pilot study. *PLoS ONE*, 12(10), p. e0186150, 2017.
162. den Dekker HT, Burrows K, Felix JF, et al. Newborn DNA-methylation, childhood lung function, and the risks of asthma and COPD across the life course. *European Respiratory Journal*, 53(4), p. 1801795, 2019.
163. Verjans E, Ohl K, Reiss LK, et al. The cAMP response element modulator (CREM) regulates T<sub>H</sub>2 mediated inflammation. *Oncotarget*, 6(36), pp. 38538-38551, 2015.
164. Rauen T, Hedrich CM, Tenbrock K, Tsokos GC. CAMP responsive element modulator: A critical regulator of cytokine production. *Trends in Molecular Medicine*, 19(4), pp. 262-269, 2013.
165. Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nature Review Genetics*, 19(6), pp. 371-384, 2018.
166. Zhao F, Klimecki WT. Culture conditions profoundly impact phenotype in BEAS-2B, a human pulmonary epithelial model. *Journal of Applied Toxicology*, 35(8), pp. 945-951, 2015.
167. Poole A, Urbanek C, Eng C, et al. Dissecting childhood asthma with nasal transcriptomics distinguishes subphenotypes of disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(3), pp. 670-678.e12, 2014.
168. Kim YJ, Park SW, Kim TH, et al. Genome-wide methylation profiling of the bronchial mucosa of

- asthmatics: Relationship to atopy. *BMC Medical Genetics*, 14(1), p.39, 2013.
169. Stefanowicz D, Hackett TL, Garmaroudi FS, et al. DNA Methylation Profiles of Airway Epithelial Cells and PBMCs from Healthy, Atopic and Asthmatic Children. *PLoS ONE*, 7(9), p. e44213, 2012.
  170. Baccarelli A, Rusconi F, Bollati V, et al. Nasal cell DNA methylation, inflammation, lung function and wheezing in children with asthma. *Epigenomics*, 4(1), pp. 1-113, 2012.
  171. Allum F, Shao X, Guénard F, et al. Characterization of functional methylomes by next-generation capture sequencing identifies novel disease-associated variants. *Nature Communications*, 6, p. 7211, 2015.
  172. Xue Q, Xu Y, Yang H, et al. Methylation of a novel CpG island of intron 1 is associated with steroidogenic factor 1 expression in endometriotic stromal cells. *Reproductive Science*, 21(3), pp. 395-400, 2014.
  173. Ceccarelli V, Nocentini G, Billi M, et al. Eicosapentaenoic Acid Activates RAS/ERK/C/EBP $\beta$  Pathway through H-Ras Intron 1 CpG Island Demethylation in U937 Leukemia Cells. Guillou H, ed. *PLoS ONE*, 9(1), p. e85025, 2014.
  174. Bustin S, Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, 14, pp. 19-28, 2017.
  175. Ray A, Raundhal M, Oriss TB, Ray P, Wenzel SE. Current concepts of severe asthma. *Journal of Clinical Investigation*, 126(7), pp. 2394-2403, 2016.
  176. Cooper DMF. Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochemical Journal*, 375(3), pp. 517-529, 2003.
  177. Xiong T, Rohm D, Workman RE, et al. Protein engineering strategies for improving the selective methylation of target CpG sites by a dCas9-directed cytosine methyltransferase in bacteria. *PLoS ONE*, 13(12), p. e0209408, 2018.
  178. Laufer BI, Singh SM. Strategies for precision modulation of gene expression by epigenome editing: An overview. *Epigenetics & Chromatin*, 8, p.34, 2015.
  179. Vojta A, Dobrinic P, Tadic V, et al. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 44(12), pp. 5615-5628, 2016.
  180. Yau EH, Rana TM. Next Generation Sequencing of Genome-Wide CRISPR Screens. *Methods in molecular biology*, 1712, pp. 203-216, 2018.
  181. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, 32, pp. 347-355, 2014.
  182. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), pp. 1262-1278, 2014.
  183. Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), pp. 819-823, 2013.
  184. Liao J, Karnik R, Gu H, et al. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. *Nature Genetics*, 47, pp. 469-478, 2015.
  185. De Groote ML, Verschure PJ, Rots MG. Epigenetic Editing: Targeted rewriting of epigenetic marks to modulate expression of selected target genes. *Nucleic Acids Research*, 40(21), pp. 10596-10613, 2012.
  186. Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, et al. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature*, 452, pp. 591-597, 2008.
  187. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *The Lancet*, 372(9643), pp. 1107-1119, 2008.
  188. Edris A, den Dekker HT, Melén E, Lahousse L. Epigenome-wide association studies in asthma: A

- systematic review. *Clinical and Experimental Allergy*, 49(7), pp. 953-968, 2019.
189. Bandaru S, Tarigopula P, Akka J, et al. Association of Beta 2 adrenergic receptor (Thr164Ile) polymorphism with Salbutamol refractoriness in severe asthmatics from Indian population. *Gene*, 592(1), pp. 15-22, 2016.
  190. Tamesis GP, Krawiec ME. Heterogeneity in response to asthma medications. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 7(2), pp. 185-189, 2007.
  191. Turner SW. Genetic predictors of response to therapy in childhood asthma. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 13(2), pp. 127-135, 2009.
  192. Perin P, Potočnik U. Polymorphisms in recent GWA identified asthma genes CA10, SGK493, and CTNNA3 are associated with disease severity and treatment response in childhood asthma. *Immunogenetics*, 66(3), pp. 143-151, 2014.
  193. Miller SM, Ortega VE. Pharmacogenetics and the development of personalized approaches for combination therapy in asthma. *Current Allergy and Asthma Reports*, 13, pp. 443-452, 2013.
  194. Kim SH, Ye YM, Lee HY, Sin HJ, Park HS. Combined pharmacogenetic effect of ADCY9 and ADRB2 gene polymorphisms on the bronchodilator response to inhaled combination therapy. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 36(3), pp. 399-405, 2011.
  195. Tantisira KG, Small KM, Litonjua AA, Weiss ST, Liggett SB. Molecular properties and pharmacogenetics of a polymorphism of adenylyl cyclase type 9 in asthma: Interaction between  $\beta$ -agonist and corticosteroid pathways. *Human Molecular Genetics*, 14(12), pp. 1671-1677, 2005.
  196. Lee YJ, Fujisawa T, Kim CK. Biomarkers for Recurrent Wheezing and Asthma in Preschool Children. *Allergy Asthma & Immunology Research*, 11(1), pp. 16-28, 2018.
  197. Kim CK. Eosinophil-derived neurotoxin: a novel biomarker for diagnosis and monitoring of asthma. *Korean Journal of Pediatrics*, 56(1), pp. 8-12, 2013.
  198. Weckmann M, Bahmer T, Sand JM, et al. COL4A3 is degraded in allergic asthma and degradation predicts response to anti-IgE therapy. *European Respiratory Journal*, 58(6), p. 2003969, 2021.
  199. Goswami R, Kaplan MH. A Brief History of IL-9. *Journal of Immunology*, 186(6), pp. 3283-3288, 2011.
  200. Xiao X, Fan Y, Li J, et al. Guidance of super-enhancers in regulation of IL-9 induction and airway inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 215(2), pp. 559-574, 2018.
  201. Lloyd CM, Harker JA. Epigenetic Control of Interleukin-9 in Asthma. *New England Journal of Medicine*, 379, pp. 87-89, 2018.

## 7 Anhang

### 7.1 Materialverzeichnis

#### Verbrauchsmaterial

AllPrep DNA Mini Spin Column (1032507)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Adhäsive qPCR-Folie (951999)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biopur 0,5, 1,5, 2,0ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Biosphere® SafeSeal Tube 1,5 ml (72706200)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser (10513234)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Falcon-Röhrchen, 15ml, 50ml (62554002)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filtertips 0,5-20µl, 2-100µl, 100-1000µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Flachboden 24-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
MultiPLY®-PCR-Platte (721984202)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
MultiPLY®-Pro Gefäß 0,5 ml (72735002)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
MultiPLY®-µStrip Pro 8er-Kette (72991002)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nasenbürste IDB-G	Top Caredent AG, Zürich, Schweiz
Parafilm M® (PM996)	Laboratory Film, Bemis, USA
Pasteurpipetten	Karl Hecht GmbH, Sondheim/Rhön, Deutschland
PCR-Tubes 50µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 10, 100, 1000µl	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Reagiergefäß 0,5 ml Low Binding (72704600)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 5/10/25 ml (861253001)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen T75, T175 (833912)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur Multiwell-Platte (833920)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

## **Zellkultur**

Bronchial Epithelial Cell Basal Medium™ (BEBM™, CC-3171)	LONZA Clonetics®, Basel, Schweiz
Bovines Serum Albumin (11930.04)	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Bovines Kollagen Typ 1 (A10644-01)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bronchial Epithelial SingleQuots™ (CC-4175): Cryo-SFM (C-29910)	LONZA Clonetics®, Basel, Schweiz PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS, 2-01F10-I)	Amimed Direct, London, UK
Fibronektin (F0895)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
PBS pH 7,2 1x (20012019)	Gibco® by life technologies™, UK
RPMI-Medium 1640 1x (27016021)	Gibco® by life technologies™, USA
Trypan-Blau-Lösung 0,4 % (CI23850)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA 10x (L11003)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland

## **Infektion**

Human rhinovirus 16 (ATCC® VR-283™)	American Type Culture Collection, Manassas, USA
RLT Lyse Puffer (1015750) aus AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit (80004)	Qiagen, Hilden, Deutschland
2-Mercaptoethanol 99 % (4227.3)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TE-Puffer (A25751000)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

## **DNA, RNA und Qualitätsprüfung**

Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
AllPrep® DNA/RNA/Protein-Kit (80004)	Qiagen, Hilden, Deutschland
ALO Protein loading buffer (1045809)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Elution buffer (EB) 10 mM Tris-Cl, pH 8,5 (1014608)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ethanol for molecular biology (1.08543.0250)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
RNase-freies Wasser (1017979)	Qiagen, Hilden, Deutschland

## **Quantitative Echtzeit-PCR**

PrimeTimeMini qPCR Assay (68836406)	IDT – Integrated DNA Technologies, Coralville, USA
SuperScript™VILO™ cDNA Synthesis Kit (11754050)	Life technologies, Carlsbad, USA
TaqMan® Universal PCR Master Mix (4304437)	Applied Biosystems, Waltham, USA

## Geräte

Absaugpumpe	Neuberger KNF, Freiburg, Deutschland
Absorptions-Microplate Reader FLUOstar	BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland
Omega-System	
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Brutschrank Forma Scientific	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham, USA
Flow Biohazard Clean Air	Contained Air Solutions, Manchester, UK
Laboklav HSP	WEBECO, Selmsdorf, Deutschland
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Magnetrührer lab disc white	IKA®, Staufen im Breisgau, Deutschland
Mikroplatte LVis-Plate	BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht „Assistent“ GmbH, Sondheim, Deutschland
Pipetten research plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank Biological Safety Cabinet Class	NUAIRE, Plymouth, USA
Thermocycler PeqStar 2x	VWR Life Science Competence Center, Erlangen, Deutschland
Thermoblock UNITEK HB-130	Schweizer Engineering Laboratories, Pullman, Deutschland
<i>Timelapse</i> -Mikroskop EVOS fl Cell Imaging System (AMF4300)	AMG, Mill Creek, USA
Vacuum Prep. Station	Qiagen, Hilden, Deutschland
Vakuumpumpe	Welch®, Fürstfeldbruck, Deutschland
Varioklav Dampfsterilisator	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Vortexer MS3 basic	IKA®, Staufen, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

## Software

2100 Expert Software 2.6	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
GraphPad Prism 7 für Mac OS X	GraphPad Software, Kalifornien, USA
JMP® 13.2	SAS, Cary, USA
<i>MARS data analysis 5.2R</i>	BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland
Pyromark Assay Design SW 2.0	Qiagen, Hilden, Deutschland
SDS 2.4	Applied Biosystems, Waltham, USA
<i>GraphPad StatMate</i>	GraphPad Software, Kalifornien, USA

## 7.2 Ethikvotum

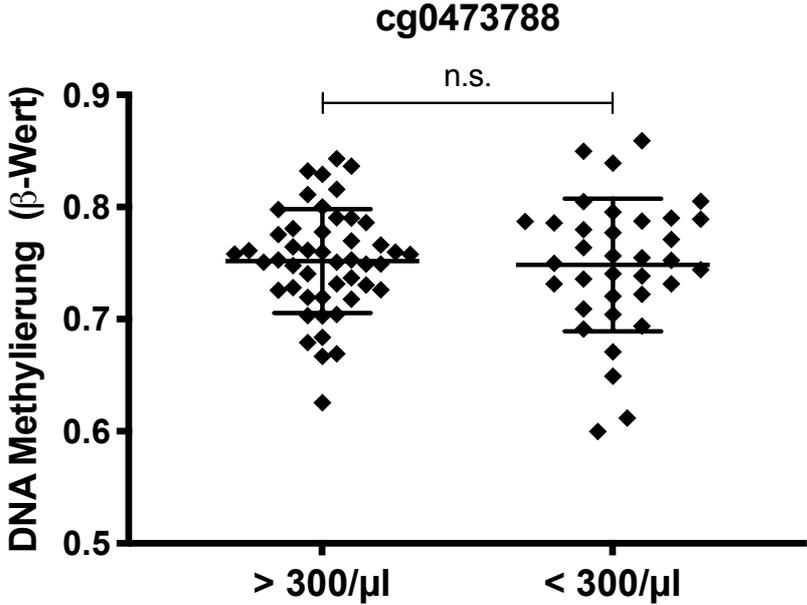
Die Ethik-Kommission der Universität zu Lübeck genehmigte Prof. Dr. Matthias Kopp am 18. Dezember 2012 die Studien des pädiatrischen Arms der *all age asthma cohort* (ALLIANCE) des Deutschen Zentrums für Lungenforschung (DZL) unter dem Aktenzeichen 12-215. Diese wurden am 14. Juli 2015 erstmals auf der Internetseite *clinicaltrials.gov* unter der Identifikationsnummer NCT02496468 veröffentlicht.

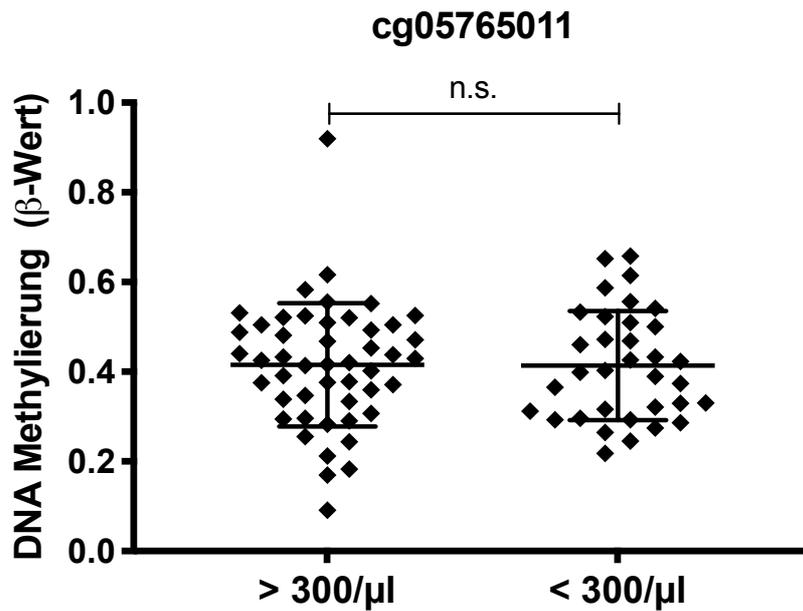
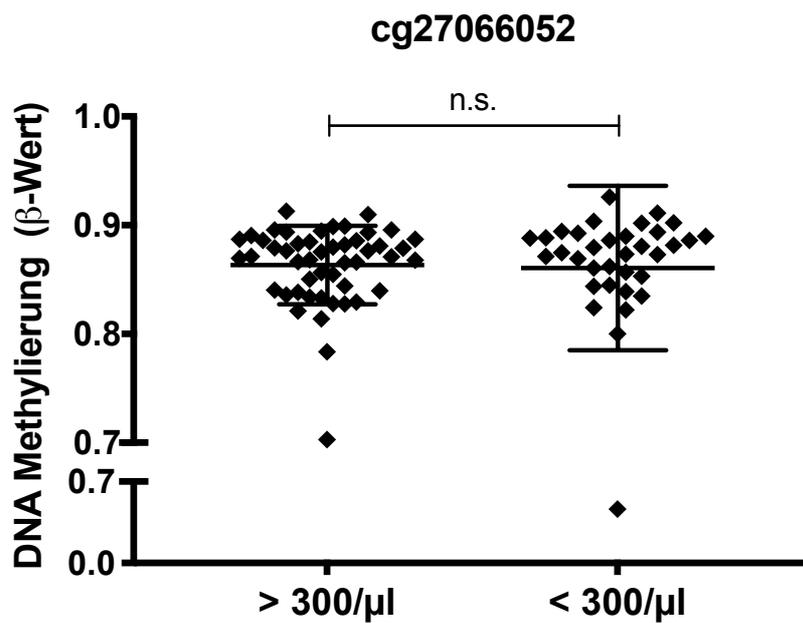
 <p>UNIVERSITÄT ZU LÜBECK</p> <p>Universität zu Lübeck - Ratzeburger Allee 160 - 23538 Lübeck</p>	<p><b>Ethik-Kommission</b> Vorsitzender: Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic Universität zu Lübeck Stellv. Vorsitzender: Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler Ratzeburger Allee 160 23538 Lübeck</p> <p>Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann Tel.: +49 451 500 4639 Fax: +49 451 500 3026 ethikkommission@uni-luebeck.de</p>
<p>Herrn Prof. Dr. med. Kopp Klinik für Kinder- und Jugendmedizin</p> <p>im Hause</p> <p>CC Prof. Zabel, PD Dr. Drömann Med. Klinik III im Haus</p>	<p>Aktenzeichen: 12-215 Datum: 05. Dezember 2013</p> <p>7</p>
<p><b>Kinder Register Asthma (KIRA-Studie) - Deutsche Asthmakohorte im Deutschen Zentrum für Lungenforschung (DZL)</b> Hier: Amendment – Ihr Schreiben vom 02. Dezember 2013</p> <p>Sehr geehrter Herr Prof. Kopp,</p> <p>das Amendment vom 02. Dezember 2013 mit der beschriebenen Erweiterung des KIRA Registers um erwachsene Patienten mit bekannter Asthmaerkrankung (Erwachsenen Register Asthma ERA-Studie) nehme ich zustimmend zur Kenntnis.</p> <p>Folgende Unterlagen lagen vor:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Anlage 1 – Verantwortlicher Leiter, beteiligte Ärzte und Wissenschaftler, Prüfstellen</li><li>- Anlage 2 – Studienpopulation, Ein- und Ausschlusskriterien</li><li>- Anlage 3 – Änderung des Untersuchungsplans</li><li>- Anlage 4 – Aufklärungsmaterialien</li><li>- Anlage 5 – Anamnesefragebogen Basis und Follow Up</li><li>- Anlage 6 – Asthma Control Test, Asthma Control Questionnaire, Asthma Quality of Life Questionnaire</li><li>- Anlage 7 – Versicherungsunterlagen.</li></ul> <p>Es bedarf keiner weiteren Begutachtung durch die Kommission.</p> <p>Mit freundlichem Gruß bin ich</p> <p> Prof. Dr. med. Alexander Katalinic Vorsitzender</p>	

7.3 Abbildungen

7.3.1 Assoziation der differentiellen Methylierung mit der Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Blut

A



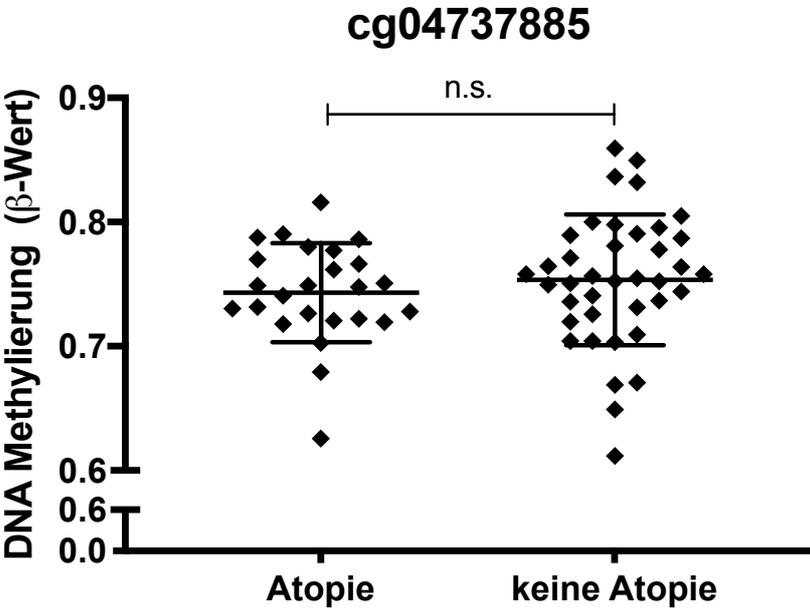
**B****C**

**Abbildung 12: Assoziation der DNA-Methylierung weiterer CpG-Loci mit der Anzahl der eosinophilen Granulozyten.**

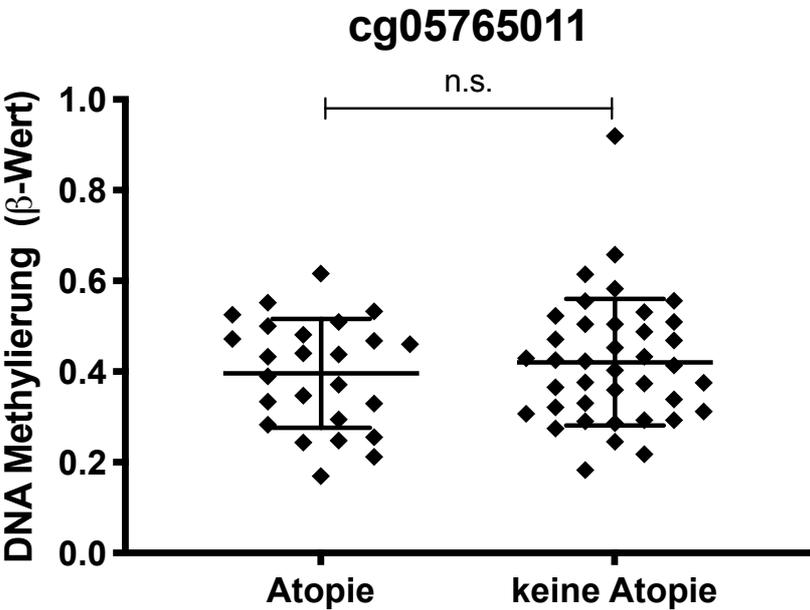
Darstellung der untersuchten CpG-Loci (A-C). Unterscheidung von Eosinophilenzahlen von > 300/ $\mu$ l und < 300/ $\mu$ l im Blut. Darstellung des Methylierungsgrades durch  $\beta$ -Werte (0=unmethyliert, 1=vollständig methyliert) und Darstellung der Anzahl der Messwerte je Gruppe mit Berechnung der Mittelwerte und entsprechender Standardabweichung (SD). Berechnung des p-Wertes mittels nicht parametrischem t-Test, Mann-Whitney-Test. Skalierungsunterbrechung der y-Achse zur besseren Übersicht (C).

7.3.2 Assoziation der differentiellen Methylierung mit Atopie

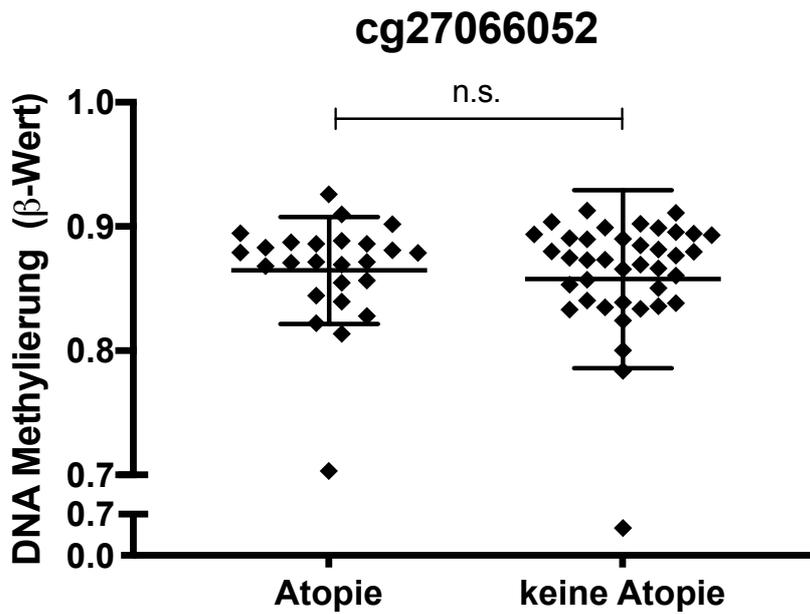
A



B



c



**Abbildung 13: Assoziation der DNA-Methylierung weiterer CpG-Loci mit Atopie.**

Darstellung der untersuchten CpG-Loci (A-C). Unterscheidung Abwesenheit oder Vorliegen einer Atopie.

Darstellung des Methylierungsgrades durch  $\beta$ -Werte (0=unmethyliert, 1=vollständig methyliert) und

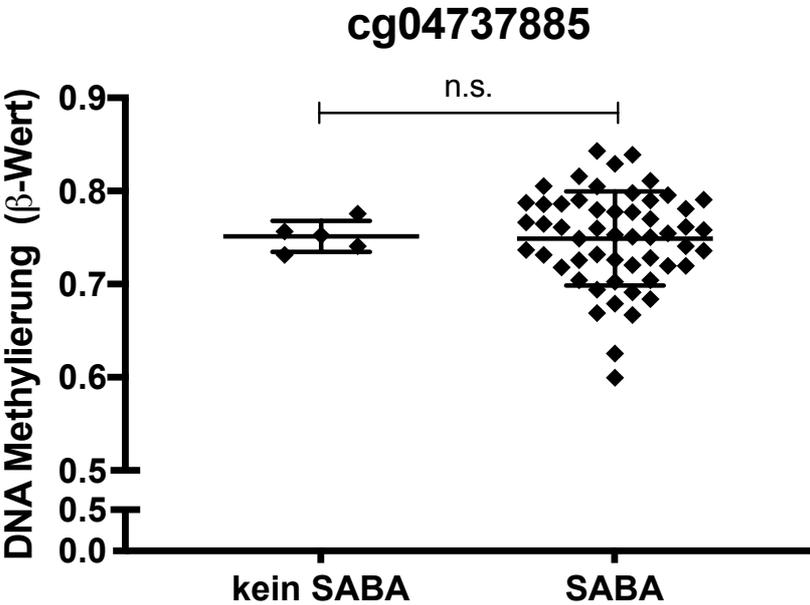
Darstellung der Anzahl der Messwerte je Gruppe mit Berechnung der Mittelwerte und entsprechender

Standardabweichung (SD). Berechnung des p-Wertes mittels nicht parametrischem t-Test, Mann-Whitney-

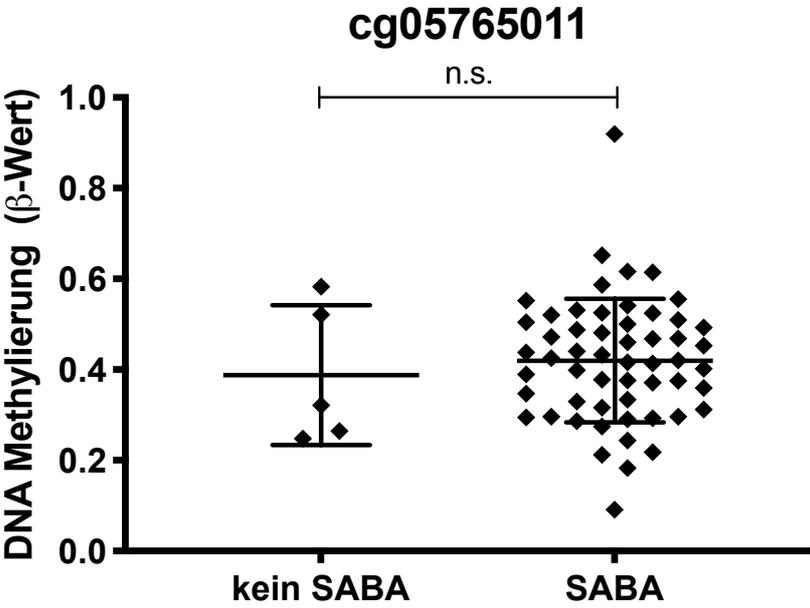
Test. Skalierungsunterbrechung der y-Achse zur besseren Übersicht (A,C).

7.3.3 Assoziation der differentiellen Methylierung mit einer SABA-Therapie

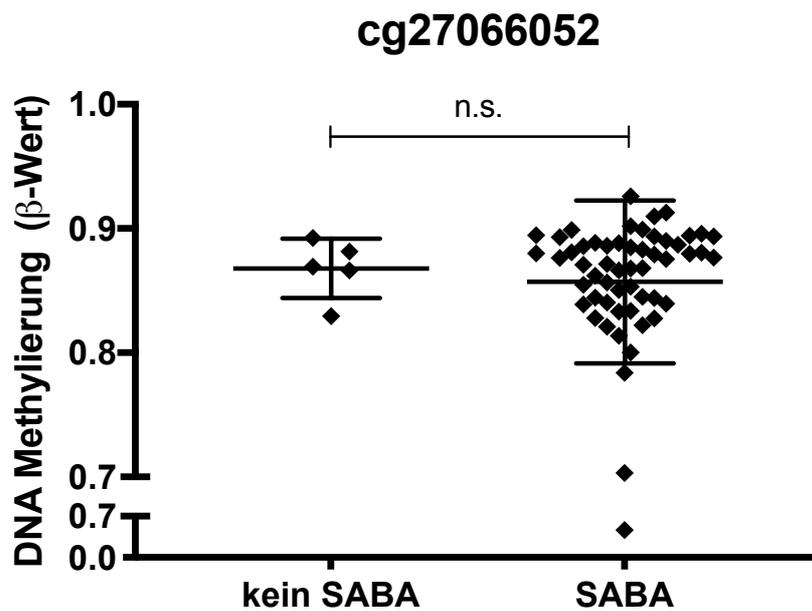
A



B



c



**Abbildung 14: Assoziation der DNA-Methylierung weiterer CpG-Loci mit einer SABA Therapie.**

Darstellung der untersuchten CpG-Loci (A-C). Unterscheidung von Probanden ohne SABA Therapie (kein SABA) und Probanden mit SABA Therapie (SABA). Darstellung des Methylierungsgrades durch  $\beta$ -Werte (0=unmethyliert, 1=vollständig methyliert) und Darstellung der Anzahl der Messwerte je Gruppe mit Berechnung der Mittelwerte (MW) und entsprechender Standardabweichung (SD). Berechnung des p-Wertes mittels nicht parametrischem t-Test, Mann-Whitney-Test. Skalierungsunterbrechung der y-Achse zur besseren Übersicht (A,C).

## 8 Danksagungen

Für die Unterstützung zum Gelingen dieser Doktorarbeit möchte ich mich bei einigen Menschen bedanken, die mich mit fachlicher Kompetenz und Motivation durch die Höhen und Tiefen auf dem Weg begleitet haben.

Mein Dank gilt insbesondere Prof. Dr. Egbert Herting für die Möglichkeit der Promotion in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin und Begeisterung für dieses Fachgebiet.

Für die Betreuung bei der experimentellen Arbeit und Verfassung dieser Dissertation bedanke ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Weckmann, der mich als hervorragender Wissenschaftler, Lehrer und Mentor stets kompetent beraten und mir viel in der Grundlagenforschung beigebracht hat.

Bei unserem ehemaligen Leiter der Sektion für pädiatrische Pneumo- und Allergologie, Prof. Dr. Matthias Volkmar Kopp, möchte ich mich ausdrücklich für das Heranführen an wissenschaftliches Arbeiten und die Begleitung meiner Promotion mit wichtigen Ratschlägen und konstruktiver Kritik bedanken.

Mein Dank gilt außerdem der gesamten Arbeitsgruppe, ohne die eine Umsetzung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Für die Unterstützung und angenehme Zusammenarbeit im Labor bedanke ich mich bei Dr. Martin Pech, Elvira Jeske, Nadine Weissheimer und Ceri Wiedling sowie der Arbeitsgruppe von Ralph Werner für die Bereitstellung einiger Geräte und Unterstützung bei deren Anwendung.

Ein besonderer Dank gilt außerdem meinen Eltern und guten Freunden, die mir stets aufmunternd zur Seite standen und mir viel Kraft zum Durchhalten gegeben haben.