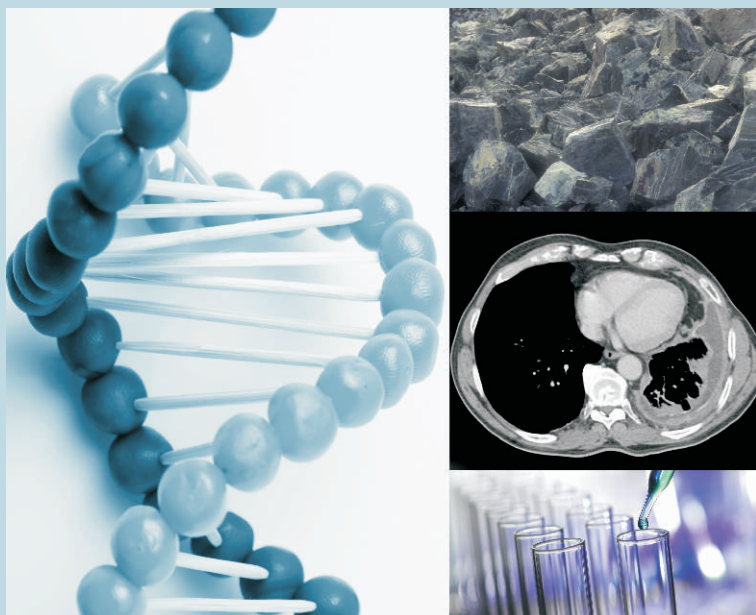


TGF- β 1 Gen-Polymorphismen als Suszeptibilitätsfaktoren Asbestfaserstaub-verursachter Lungenfibrosen und Bronchialkarzinome

Alexandra Dorothee Belwe



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

TGF- β 1 Gen-Polymorphismen als Suszeptibilitätsfaktoren Asbestfaserstaub- verursachter Lungenfibrosen und Bronchialkarzinome

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
Alexandra Dorothee Belwe
aus Frankfurt am Main

Gießen (2010)

Aus dem Medizinischen Zentrum für Ökologie
Institut und Poliklinik für Arbeits- und Sozialmedizin
Kommissarischer Leiter: Professor Dr. med. Joachim Schneider
des Universitätsklinikums Giessen und Marburg GmbH Standort Giessen

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Schneider
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Herr

Tag der Disputation: 14.07.2011

Abkürzungsverzeichnis

λ	Lambda (Wellenlänge)
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Arg	Arginin
BC	Bronchialcarcinom
BK	Berufskrankheit
BKV	Berufskrankheitenverordnung
BRD	Bundesrepublik Deutschland
C	Cytosin
c-myc	Protoonkogen
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
DEPC	Diethylen Pyrocarbonat
dGTP	Desoxy-Guanintriphosphat
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Desoxyribonucleinacid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymintriphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
for	forward
FRET	F luorescence R esonance E nergy T ransfer
G	Guanin
H ₂ O	Wasser
IL	Interleukin
ILO	Internationale Staublungenklassifikation
INF γ	Interferon gamma
kDa	Kilo Dalton

KI	Konfidenzintervall
LAP	Latency-Associated-Peptide
Leu	Leucin
LTBP	Latent TGF- β Binding Protein
MAK	maximale Arbeitsplatz Konzentration
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger Ribonucleinacid
mt	mutanter Typ
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nuklearer Faktor kappa B
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
OR	Odds Ratio
p53	Tumorsupressorgen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
Pro	Prolin
p-Wert	Signifikanz
Ras	Protoonkogen
RBC	Red blood cell
rev	reverse
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Rotations per minute
SARA	Smad Anchor for Receptor Activation
SiO ₂	Siliziumdioxid (Quarz)
sog.	sogenannt
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TGF- β	Transforming Growth Factor beta

TGFBR1	Gen des TGF- β Rezeptors 1
TGFBR2	Gen des TGF- β Rezeptors 2
SMAD	Protein der TGF- β Signalkaskade
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp
y	Jahre

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Inhaltsverzeichnis	6
1 Einleitung.....	8
1.1 Asbest-induzierte fibrosierende bzw. maligne Erkrankungen der Lunge oder der Pleura	8
1.1.1 Allgemeine Substanzbeschreibung und Aufnahme	10
1.1.2 Pathomechanismen bei der Entstehung von Asbestfaserstaub-verursachten Erkrankungen	11
1.1.2.1 Die Lungen- und Pleuraasbestose Nr. 4103 BKV.....	11
1.1.2.2 Das durch Asbestfaserstaub verursachte Bronchialkarzinom (Nr. 4104 BKV) und das diffuse maligne Mesotheliom der Pleura, des Bauchfells und des Perikards (Nr. 4105 BKV).....	14
1.2 Quarzstaublungenerkrankung (Silikose) Nr. 4101 BKV	17
1.2.1 Pathomechanismen bei der Entstehung von durch Quarzstaub verursachten Erkrankungen	18
1.3 Der Transforming Growth Factor-beta (TGF-β).....	18
1.3.1 Isoformen und Polymorphismen im TGF-β1	23
2 Fragestellung.....	27
3 Kollektiv und Methoden	29
3.1 Patientenkollektiv und Kontrollgruppe	29
3.2 Geräte und Materialien	33
3.2.1 Geräte.....	33
3.2.2 Verbrauchsmaterialien	34
3.2.3 Zusammensetzung verwendeter Lösungen	34
3.2.4 Reagenzien	34
3.2.5 Kits.....	35
3.3 Methode.....	35
3.3.1 Isolierung der DNA	35
3.3.2 Photometrische Messung der DNA-Konzentration	36
3.3.3 Die PCR (Polymerase Chain Reaction)	36
3.3.3.1 Die qualitative PCR im LightCycler	37
3.3.3.2 Ansatz und Protokoll für die qualitative PCR im LightCycler	40

3.3.3.3	Primer- und Sondensequenzen.....	41
3.3.3.4	Versuchsbedingungen.....	44
3.3.3.5	Codierung der Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse	44
3.3.4	Statistische Methoden	45
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Polymorphismus und Genotypenverteilung im Codon 10 des TGF- β 1-Gens	46
4.2	Polymorphismus und Genotypenverteilung im Codon 25 des TGF- β 1-Gens	48
4.3	Abschätzung des Risikos für Patienten mit Berufskrankheiten in Abhängigkeit von den Polymorphismen des TGF- β 1-Gens	50
4.3.1	Erkrankungsrisiko in Abhängigkeit vom Polymorphismus im Codon 10 des TGF- β 1-Gens	51
4.3.1.1	Vergleich der Risiken von (Asbestfaserstaub-verursachten) Lungenfibrosen mit denen eines (Asbestfaserstaub-verursachten) Bronchialkarzinoms.....	57
4.3.2	Erkrankungsrisiko in Abhängigkeit vom Polymorphismus im Codon 25 des TGF- β 1-Gens	59
4.3.2.1	Vergleich der Risiken von (Asbestfaserstaub-verursachten) Lungenfibrosen mit denen eines (Asbestfaserstaub-verursachten) Bronchialkarzinoms.....	65
5	Diskussion.....	67
5.1	Allelfrequenzen des TGF- β im internationalen Vergleich	68
5.2	Funktionelle Auswirkungen des TGF- β	70
5.3	Das mit den Polymorphismen des TGF- β 1 Gens assoziierte Erkrankungsrisiko ..	72
5.3.1	Fibrosierende Erkrankungen	73
5.3.2	Maligne Erkrankungen	75
6	Zusammenfassung.....	80
7	Summary.....	82
8	Literaturliste	83
	Erklärung	96
	Danksagung.....	97

1 Einleitung

Die Kombination technisch hoch erwünschter Eigenschaften war es, die Asbest in den letzten 100 Jahren eine Schlüsselrolle für die moderne Zivilisation einnehmen ließ. Er wurde zum „magischen Mineral des Jahrhunderts“ und „zum Mineral der 1000 Möglichkeiten“ erklärt. Seit dem Anwachsen der Asbestweltproduktion etwa ab 1880 war es ein langer Weg, bis es der medizinischen Wissenschaft gelang, ursächliche Zusammenhänge zwischen dem Einatmen von Asbestfaserstaub und den verschiedenen Krankheitsbildern aufzudecken, und es folgte ein langwieriger, schmerzhafter Prozess der Umsetzung bis zum Asbestverbot 1993 (Schneider et al., 1998). Eingeatmete Asbestfasern gefährden die menschliche Gesundheit durch ihre Fähigkeit, Narbengewebe (Fibrose) und bösartige Tumoren zu verursachen. Der große zeitliche Abstand zwischen dem Beginn der Einwirkung und dem Auftreten der Erkrankung stellt eine besondere Schwierigkeit der Technologiefolgenbewältigung dar. So ist Asbest heute trotz Verwendungsverbot auch weiterhin für rund 70 % aller anerkannten Berufskrebserkrankungen verantwortlich und führt zu kostenaufwendigen Innenraumsanierungen. Asbest gilt heute als das „am meisten gefürchtete“ und „kostspieligste“ Mineral der Erde (Schneider et al., 1998).

1.1 Asbest-induzierte fibrosierende bzw. maligne Erkrankungen der Lunge oder der Pleura

Asbest verursacht neben Asbeststaublungerkrankungen oder durch Asbeststaub verursachten Erkrankungen der Pleura (Nr. 4103 BKV) auch Krebserkrankungen wie Lungen- oder Kehlkopfkrebs (Nr. 4104 BKV) und das diffuse maligne Mesotheliom des Rippenfells, Bauchfells sowie des Perikards (Nr. 4105 BKV). Asbestfaserstaub-verursachte Lungen- und Pleuraerkrankungen stellen nach wie vor häufig anerkannte Berufskrankheiten

dar, vgl. Abb.1. Trotz des Asbestverbotes 1993 in Deutschland kommt den berufsbedingten Staublungenerkrankungen (Pneumokoniosen) nicht nur aus arbeitsmedizinischer, sondern auch aus sozio-ökonomischer Sicht nach wie vor eine wesentliche Bedeutung zu. Abb. 1 verdeutlicht die starke Zunahme asbestbedingter Erkrankungen seit Beginn der 80er Jahre.

Angezeigte und durch Rente entschädigte fibrogene und maligne Asbestverursachte Berufskrankheiten in Deutschland 1968-2008

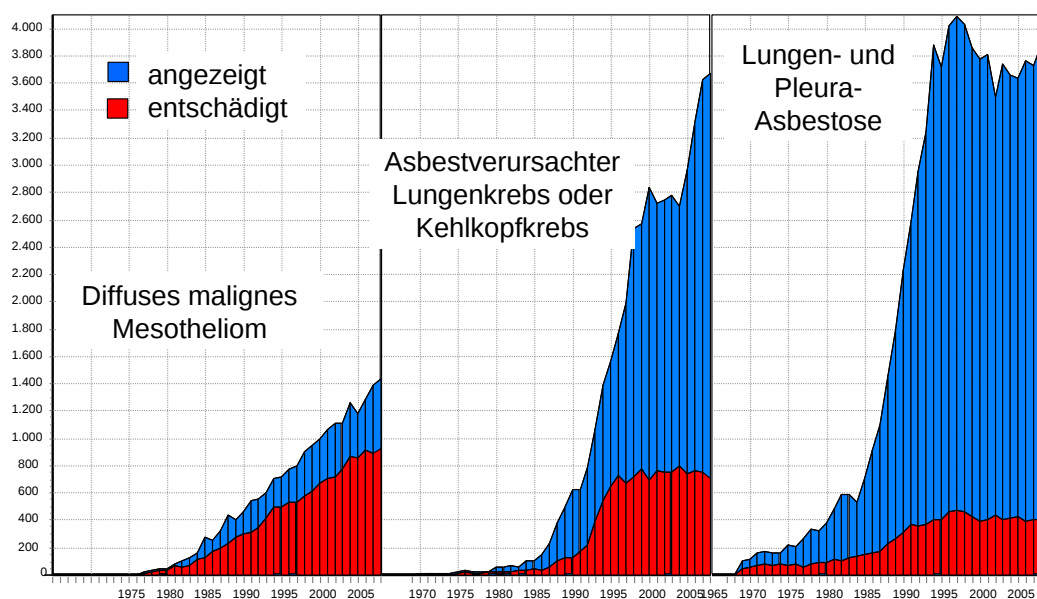


Abb.1: Angezeigte und entschädigte Berufskrankheiten der Nr. 4103 BKV („Asbeststaublungenerkrankung (Asbestose) oder durch Asbeststaub verursachte Erkrankungen der Pleura“), Nr. 4104 BKV („Asbestverursachter Lungen- oder Kehlkopfkrebs“) und Nr. 4105 BKV („Diffuses malignes Mesotheliom der Pleura, Peritoneum oder Perikard“).

Mit einem weiteren Anstieg der Prävalenz Asbestfaserstaub bedingter tödlicher Berufskrebserkrankungen wird für die nächsten 10 bis 20 Jahren gerechnet (Schneider & Weitowitz 2002).

Voraussichtlich wird in den nächsten Jahren auch die Häufigkeit asbestbedingter maligner Erkrankungen der Pleura deutlich zunehmen. Abb. 2

zeigt für die alten Bundesländer eine vergleichbare Prognose über die zukünftige Entwicklung der asbestverursachten Pleuramesotheliome (Coenen et al., 1991). Demnach wird ein Maximum der neu hinzukommenden Asbestfaserstaub-verursachten Berufskrebserkrankungen für das Jahr 2013 vorhergesagt.

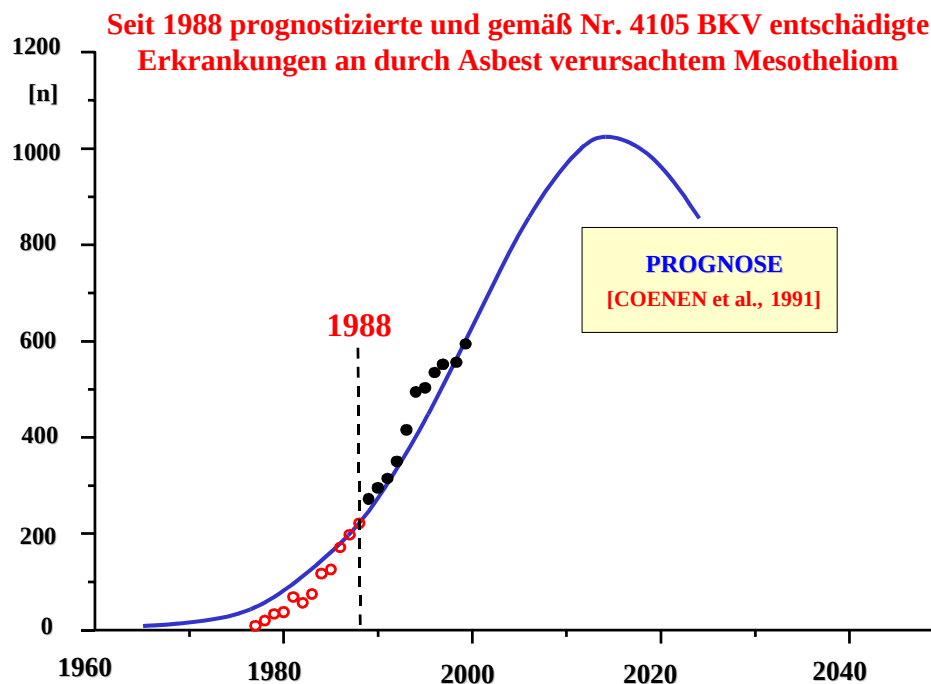


Abb.2: Darstellung der seit 1988 gemäß der Nr. 4105 BKV entschädigten Erkrankungen an durch Asbest verursachtem Mesotheliom und die Prognose der zukünftigen Prävalenz dieser Erkrankung.

Die intensiv betriebene Forschung der letzten zwei Dekaden erbrachte einen Einblick in die Pathomechanismen Asbest-induzierter Lungenerkrankungen, jedoch bleiben noch viele Fragen offen.

1.1.1 Allgemeine Substanzbeschreibung und Aufnahme

Asbestminerale zeigen bereits makroskopisch eine faserige Struktur. Als Fasern werden hierbei allgemein Partikel mit einem Verhältnis von Länge :

Durchmesser >3:1 angesehen. Bei der Aufbereitung des Rohasbestes und der Herstellung oder Verwendung von asbesthaltigen Produkten werden große Mengen von Fasern freigesetzt und gelangen in die Atemluft der Beschäftigten.

Der Mensch kann Asbestfasern über Mund und Nase einatmen. Aufnahme, Transport und Ablagerung von Partikeln im Atemtrakt hängen generell von deren Größe, Form und Dichte ab (Schneider et al., 1998). Dabei wird der für das Depositionsverhalten wichtige aerodynamische Durchmesser im Wesentlichen durch den geometrischen Durchmesser und weniger durch die Länge der Fasern bestimmt. Da Fasern in den Bronchien durch die mukoziliare Clearance aus der Lunge heraustransportiert werden, kommt es an der Bronchialwand, dem Zielorgan des Bronchialkarzinoms, nur zu einer geringen Akkumulation. Stattdessen werden die Fasern ganz überwiegend in den Alveolen und im interstitiellen Gewebe retiniert, von wo aus sie Fibrose verursachen können. Mit neutronenaktivierten Krokydolithfasern konnte eine gezielte Wanderung zur Peripherie der Lunge festgestellt werden (Schneider et al., 1998). Im Alveolarbereich abgelagerte Fasern gelangen innerhalb kürzester Zeit auch an die viszerale Pleura und von dort, etwa durch Lymphdrainage, in den Pleuraspalt und zur parietalen Pleura.

Es ist bekannt, dass eingeatmete Asbestfasern die Fähigkeit besitzen, in der menschlichen Lunge sowohl fibrogen als auch kanzerogen zu wirken.

1.1.2 Pathomechanismen bei der Entstehung von Asbestfaserstaub-verursachten Erkrankungen

1.1.2.1 Die Lungen- und Pleuraasbestose Nr. 4103 BKV

Der Pathomechanismus der Lungen- und Pleuraasbestose besteht im Wesentlichen aus einer zellvermittelten Entzündung als Reaktion auf eingedrungene Asbestfasern. In diesen Vorgang involviert sind hauptsächlich

die Systeme der Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren (z.B. *Transforming growth factor-beta*, TGF- β) sowie reaktive Sauerstoffspezies. Die gemeinsame Endstrecke der einzelnen Interaktionen bildet die Ablagerung von Kollagen und extrazellulärer Matrix mit der Entstehung einer Fibrose, vgl Abb. 3.

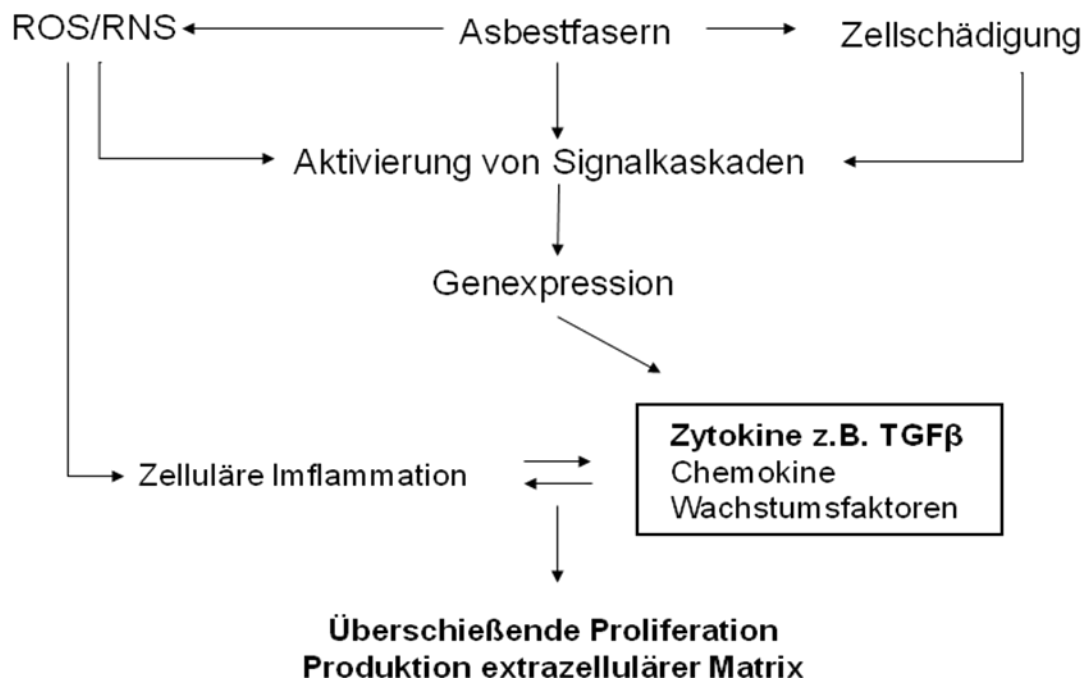


Abb. 3: Pathomechanismus der Entstehung von Fibrose nach Einwirkung von Asbestfasern. Mod. nach Kamp & Weitzmann, 1999. ROS = Reaktive Sauerstoff Spezies; RNS = reaktive Stickstoff Spezies

Die inhalierten Asbestfasern lagern sich im Alveolarbereich ab und gelangen zum Beispiel durch Lymphdrainage oder Penetration über die viszerale Pleura auch in den Pleuraspalt und zur parietalen Pleura. In diesen Regionen kommt es zu einer Auseinandersetzung von Makrophagen mit den Fasern. Auf Grund der Faserlänge führt dies zur unvollständigen Phagozytose und demzufolge zu einer Perforation der Makrophagen-Zellmembran und damit zur Freisetzung verschiedener Mediatoren. Hierbei handelt es sich um Chemokine und Zytokine, die weitere Makrophagen, T-Lymphozyten und Leukozyten

einwandern lassen und eine zelluläre Inflammation induzieren (Mutsaers et al., 2004; Schneider et al., 1998). Alveolarmakrophagen setzen zudem Sauerstoffradikale frei (Mossmann et al., 1998; Schneider et al., 1998). Diese zytotoxischen Substanzen entstehen gleichzeitig durch Redox-Reaktionen der Eisenmoleküle, die sich auf der Faseroberfläche der Asbestfasern befinden (Kamp et al., 1992; Hardy et al., 1995; Manning et al., 2002). Sauerstoffradikale schädigen das Alveolarepithel (Pneumozyten Typ I), was unter anderem Pneumozyten Typ II zur Proliferation anregt (Lesur et al., 1995). Dabei sezernieren diese Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β ; *Platelet derived growth factor*, PDGF) und stimulieren so Fibroblasten zur Proliferation und Kollagensynthese sowie wiederum zur Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Mossmann et al., 1998; Schneider et al., 1998). Diese Abläufe führen zu einer persistierenden Entzündungsreaktion (Manning et al., 2002). Sie können sowohl einzeln als auch im Zusammenspiel eine massive Kollagensynthese und Produktion extrazellulärer Matrix induzieren und darüber zur Entwicklung der Lungenfibrose beitragen (Mossmann et al., 1998).

Durch eine Verdickung der Alveolarmembranen und bronchiolären Wandstrukturen manifestiert sich schließlich histologisch das Bild einer Lungenasbestose (Schneider et al., 1998). Die klinische Symptomatik besteht aus einer restriktiven Ventilationsstörung (Wang et al., 2006) und einer Abnahme der Diffusionskapazität (American Thoracic Society, 1986). Mikroskopisch zeigt sich die Lungenasbestose als diffuse interstitielle Fibrose, die vorwiegend bilateral in den unteren zwei Dritteln der Lunge zu finden ist. An Basis und Hilus sind die Zeichen einer Fibrose am stärksten ausgeprägt (Staples et al., 1992; Muller et al., 1990). Ausgedehnte Befunde liegen meist nahe der viszeralen Pleura (Craighead et al., 1982). Radiologisch werden die kleinen, unregelmäßigen Lungenschatten nach der ILO-Klassifikation in der Fassung von 2000/BRD kodiert. Im meist progredienten Krankheitsverlauf können eine Honigwaben- (honeycomb-) Lunge (Craighead et al., 1982) sowie ein chronisches Cor pulmonale und selten auch Bronchiektasien entstehen (Schneider et al., 1998). Klinisch lässt sich die Lungenasbestose nicht von der

sog. „idiopathischen“ Lungenfibrose unterscheiden. Zur Differenzierung beider Diagnosen dient die Arbeitsanamnese mit Nachweis einer relevanten Asbestfaserstaub-Einwirkung am Arbeitsplatz.

Die Einwirkung von Asbestfasern führt zu einer Anreicherung von zellarmem kollagenen Bindegewebe im Bereich der an Brustwand, Zwerchfell, Perikard und Mediastinum grenzenden Pleura visceralis und parietalis (Schneider et al., 1998). Man unterscheidet zwischen diffusen Verdickungen der seitlichen Brustwand und röntgenologisch hyalinen Plaques, die im Verlauf verkalken können. Bei Befall der viszeralen Pleura ist meist das darunter liegende Lungenparenchym mit betroffen. Die viszerale Pleuraasbestose kann zu ein- oder beidseitigen Pleuraergüssen führen. Kommt es zu einer Verschwartung beider Pleurablätter mit Adhärenz des costo-phrenischen Winkels, entsteht das Bild einer Hyalinosi complicata (Schneider et al., 1998). Asbestkörperchen finden sich im kollagenen Gewebe der Pleuraplaques nur selten (Manning et al., 2002).

1.1.2.2 Das durch Asbestfaserstaub verursachte Bronchialkarzinom (Nr. 4104 BKV) und das diffuse maligne Mesotheliom der Pleura, des Bauchfells und des Perikards (Nr. 4105 BKV)

Neben der beschriebenen fibrogenen Wirkung besitzen Asbestfasern auch ein kanzerogenes Potential (Schneider et al., 1998). Die Hauptursache des Bronchialkarzinoms ist weiterhin die Inhalation von Zigarettenrauch. Der wichtigste Risikofaktor im beruflichen Umfeld bleibt wegen des Latenzphänomens jedoch der Asbestfaserstaub. Ein multiplikativer Effekt auf das Erkrankungsrisiko eines Lungenkarzinoms bei gleichzeitiger oder nacheinander folgender Einwirkung der beiden Noxen ist sowohl tierexperimentell als auch epidemiologisch gesichert (Schneider et al., 1999).

Das maligne Pleuramesotheliom gilt als „Signaltumor“ einer Jahre zurückliegenden Asbestfaserstaub-Exposition (Rösler et al., 1993; Woitowitz

et al., 1984). Schon geringe Mengen an Asbestfasern können zur Ausbildung der Erkrankung führen (Chen et al., 1978). Bezüglich des malignen Pleuramesothelioms ist der Pleuradrift mit folgender subpleuraler Faserakkumulation von besonderer Bedeutung (Schneider et al., 1995; Schneider et al., 1998).

Die kanzerogene Wirkung von Asbestfasern bestehen in der Stimulierung des Zellwachstums, Mitosestörungen und strukturellen Chromosomenaberrationen. Diese Vorgänge verlaufen zum einen indirekt über den Weg der zellulären Inflammation mit Produktion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Sauerstoffradikalen, zum anderen durch direkte Interaktion mit den Zielzellen (Makrophagen, Mesothelzellen und Bronchialepithelzellen) (Schneider et al., 1998), vgl. Abb. 4.

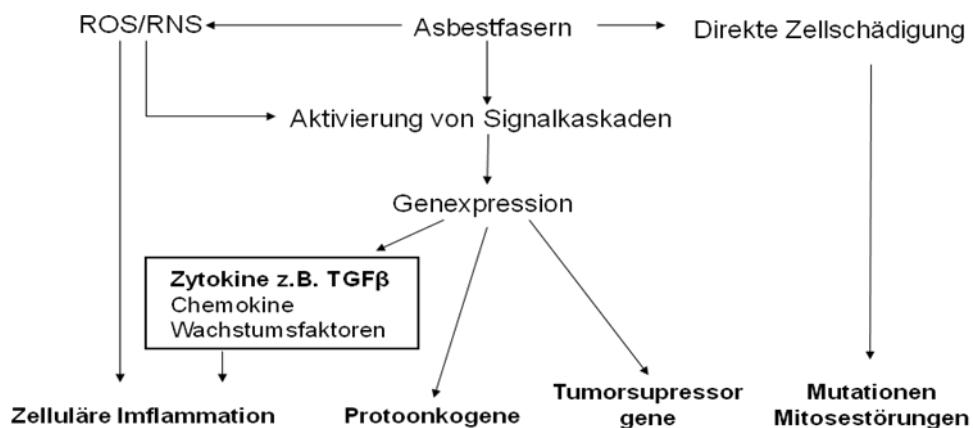


Abb. 4: Faktoren der Kanzerogenese nach Asbestfasereinwirkung. Mod. nach Kamp & Weitzmann, 1999. ROS = reaktive Sauerstoffspezies; RNS = reaktive Stickstoff Spezies

Studien haben ergeben, dass Asbestfasern die Expression des *nuklearen Faktors kappa B* (NF-κB) induzieren und zelluläre Signalkaskaden aktivieren (Mossman et al., 1998). Auf diesem Weg wird die Transkription verschiedener Gene stimuliert. Zu diesen zählen unter anderem Gene für Zytokine und

Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β ; *Tumor necrosis factor-alpha*, TNF- α), Protoonkogenen (z.B. *c-myc*) und Tumorsuppressorgenen (z.B. p53) (Kamp et al., 1999). Das Gleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation auf der einen und die Aktivierung von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen auf der anderen Seite spielen eine zentrale Rolle in der Kanzerogenese (Kamp et al., 1999; Schneider et al., 1995). Insbesondere die Bildung freier Sauerstoffradikale erhöht durch deren biologische Interaktion mit Makromolekülen wie z.B. der DNA, Signaltransduktionsproteinen und Membranlipiden das Risiko einer malignen Entartung (Bhattacharya et al., 2005; Kamp et al., 1992; Mossman et al., 1998; Hardy et al., 1995; Manning et al., 2002).

Das asbestinduzierte Bronchialkarzinom zeigt klinisch und diagnostisch keine wesentlichen Unterschiede zu anderen primären Bronchialkarzinomen. Auch histologisch entspricht es einem Lungenkrebs anderer Ätiologie. In manchen Studien fiel eine Häufung von Adenokarzinomen auf (Rom, 1998; Kannerstein et al., 1972; Johansson et al., 1992; Churg et al., 1993).

Für die Entstehung des Pleuramesothelioms beim Menschen hingegen sind nach dem derzeitigen Kenntnisstand keine anderen umweltrelevanten Ursachen außer Asbest und der vergleichbar biobeständigen Mineralfaser Erionit bekannt (International Agency for Research on Cancer, 1987). Beim diffusen malignen Mesotheliom handelt es sich um einen Tumor der serösen Körperhöhlen. Er kann neben der Pleura auch Peritoneum und Pericard betreffen. Bei den maligne entarteten Zellen handelt es sich um Mesothelzellen, die das viszerale und parietale Blatt der Pleura invasiv durchwachsen (Brockmann, 1992; Konietzko et al., 1992; Schneider et al., 1998).

1.2 Quarzstaublungenenerkrankung (Silikose) Nr. 4101 BKV

Siliziumdioxid SiO_2 (Quarz) ist das zweithäufigste Mineral der Erdkruste und stellt durch seine vielfältige Verwendbarkeit einen wichtigen natürlichen Rohstoff dar. Er wird unter anderem in der Glas-, Keramik- und Zementindustrie sowie in Form von Quarzsand genutzt.

Quarz ist in vielen unterschiedlichen Gesteinstypen enthalten, wobei der Quarzgehalt stark differiert.

Abhängig von Temperatur und Druck treten weitere Modifikationen des Siliziumdioxids auf. Arbeitsmedizinisch relevant sind hierbei die Hochtemperaturmodifikationen Cristobalit und Tridymit. Quarzstaub zeigte im Tierversuch nach inhalativer und intratrachealer Applikation eine erhöhte Inzidenz von Lungentumoren. Die drei genannten Modifikationen wurden 1999 von der Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (MAK-Kommission) als humankanzerogen eingestuft (Schneider & Woitowitz, 2002). Es ist zu berücksichtigen, dass Quarz-induzierte Bronchialkarzinome mehrheitlich bei Arbeitern mit vorbestehender Fibrose (Silikose) beobachtet werden. Es ist unstrittig, dass Quarzstaub kanzerogen wirkt.

Die Prävention hinsichtlich der Entstehung der Silikose und damit der Vermeidung einer pathogenetisch relevanten Exposition gegenüber Quarzstaub steht im Mittelpunkt.

Ähnlich den Asbestfaserstaub-verursachten Erkrankungen besteht auch für die Silikose eine Latenz zwischen Exposition und Erkrankung von 20 bis 40 Jahren. In den letzten drei Jahrzehnten ist die Prävalenz der Silikosen und Silikotuberkulosen um die Hälfte gesunken. Gleichzeitig konnte ein Anstieg der Einhaltung des MAK-Wertes von 50% um 1970 auf 90% um 2000 beobachtet werden (Ulm & Waschulzik, 1998).

1.2.1 Pathomechanismen bei der Entstehung von durch Quarzstaub verursachten Erkrankungen

Die Toxizität des Quarzstaubes beruht hauptsächlich auf Wechselwirkungen der Quarzoberfläche mit Zellmembranen und Zellflüssigkeiten. Ähnlich der Pathogenese asbestinduzierter Lungenfibrose bzw. Malignomen führt die Deposition von Quarzstaub in der Lunge zur Aktivierung von Fibroblasten und Makrophagen. Diese Zellen produzieren im Anschluss vermehrt Zytokine und Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β). Im Zusammenspiel mit reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies wird eine persistierende entzündliche Reaktion induziert. Diese führt erneut zur Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Die Vorgänge münden in die Anregung von Fibroblasten zur Kollagenproduktion im interstitiellen Lungengewebe.

Für Tumorentstehung durch Quarz wurde anhand von Versuchen mit Ratten eine Hypothese aufgestellt. Durch den oxidativen Stress der Sauerstoff- und Stickstoffradikale wird zum einen die DNA auf direktem Weg geschädigt. Zum anderen erfolgt eine Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B) und verschiedener Onkogene und die Induktion von Mutationen in Tumorsuppressorgenen.

Über diese Mechanismen zeigt Quarzstaub sein fibrogenes und kanzerogenes Potenzial (MAK- und BAT-Werte Liste, 1999).

1.3 Der Transforming Growth Factor-beta (TGF- β)

In der Pathogenese fibrosierender und maligner Erkrankungen nimmt eine Dysregulation auf der Zytokin-Ebene einen zentralen Stellenwert ein (Bhattacharya et al., 2005; Lasky et al., 2000; Allen et al., 2002).

Das Zytokin *Transforming growth factor-beta* (TGF- β) ist ein Wachstumsfaktor und Bestandteil eines komplexen Systems aus profibrotischen und antifibrotischen Wechselwirkungen (Leask et al., 2004), vgl. Abb.5. Insbesondere im Hinblick auf die Entstehung fibrosierender und maligner Lungenerkrankungen spielt dieses Zytokin eine zentrale Rolle. Eine Veränderung seiner biologischen Aktivität, Konzentration oder Funktion könnte

die Gewebshomöostase entscheidend beeinflussen. TGF- β reguliert die mesenchymale und epitheliale Zellproliferation und –differenzierung sowie zelluläre Entzündungsreaktionen und die Bildung extrazellulärer Matrix (Mossman et al., 1996; Mossman et al., 1998; Goldstein et al., 1995). Neben seiner Rolle als potentester profibrotischer Mediator (Lc Roy et al., 1990; Jagirdar et al., 1997) kann TGF- β ebenso die Zellproliferation hemmen, indem er deren Differenzierung oder Apoptose fördert (Blobe et al., 2000). Er wirkt chemotaktisch auf Fibroblasten, Makrophagen und andere Mesenchymzellen (Kamp et al., 1999) und regt diese wiederum zur Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren an (Mossman et al., 1998). Über eine Beeinflussung der Cyclinaktivität greift TGF- β in den Zellzyklus ein und wirkt so als Tumorsuppressor (Kopnin et al., 2000).

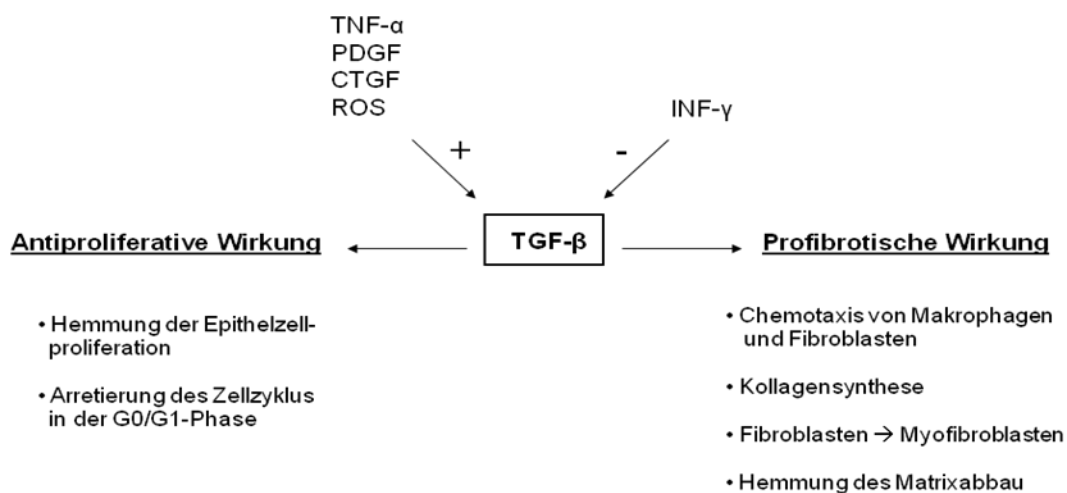


Abb. 5: Regulation der TGF- β Aktivität durch andere Mediatoren und Einfluss von TGF- β auf die Gewebshomöostase. TNF- α = Tumor necrosis factor alpha, PDGF = Platelet derived growth factor, CTGF = Connective tissue growth factor, ROS = reactive Sauerstoff Spezies, INF- γ = Interferon gamma

In der Lunge wird TGF- β vorwiegend von Alveolarmakrophagen und Pneumozyten Typ II sowie Lymphozyten und Fibrozyten sezerniert (Kamp et al., 1999; Simeonova et al., 1996; Driscoll et al., 1997; Lehnert et al., 1993; Oberdorster, 1994). Diese Zellen produzieren gleichzeitig andere

profibrotische (*Platelet derived growth factor*, PDGF; *Connective tissue growth factor*, CTGF; Fibronectin) und antifibrotische Mediatoren (z.B. *Tumor necrosis factor-alpha*, TNF- α ; *Interferon-gamma*, INF- γ ; *Interleukine*, IL-1, IL-6, IL-8) (Leask et al., 2004) sowie freie Sauerstoffradikale.

Eine Steigerung der biologischen Aktivität und Konzentration von TGF- β erfolgt durch TNF- α , PDGF (Bhattacharya et al., 2005; Kolb et al., 2003; O’Kane et al., 1997; Border et al., 1994), CTGF (Abreu et al., 2002) und *reaktive Sauerstoffspezies* (ROS) (Mutsears et al. 2004; Pociask et al., 2004). INF- γ hingegen inhibiert über den Weg der TGF- β -Signalkaskade dessen fibrosierenden Effekt und stellt eine wichtige Komponente in der Gewebshomöostase dar (Leask et al., 2004; Ulloa et al., 1999; Bienowski et al., 1995; Gurujeyalakshmi et al., 1995).

Die einzelnen Mediatoren aktivieren sich gleichzeitig gegenseitig, wodurch es zu einem schnellen und starken Effekt auf die Funktion von TGF- β kommen kann.

TGF- β besitzt eine Vielfalt an Aufgaben im menschlichen Körper. Seine profibrotische Wirkung entfaltet er durch die Chemotaxis von Makrophagen und Fibroblasten (Kamp et al., 1999). In diesen Zellen induziert TGF- β die Produktion anderer profibrotischer Mediatoren wie z.B. PDGF (Mutsears et al., 1997), CTGF und Fibronectin (Leask et al., 2004) sowie die eigene Expression (Kamp et al., 1999). Aber auch antifibrotische Mediatoren wie TNF- α , Interleukine und INF- γ werden unter Einfluss von TGF- β vermehrt ausgeschüttet.

CTGF unterstützt TGF- β in seiner Wirkung auf die Fibroblastenproliferation, Gewebsadhäsion und die Produktion extrazellulärer Matrix (Kollagen Typ I und Fibronectin). Fibronectin seinerseits steigert die Kollagen Typ I-Synthese (Leask et al., 2004). TGF- β induziert außerdem die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten (Gauldie et al., 1999), die kontraktile Elemente enthalten und so das Narbengewebe zusammenziehen können (Lc Roy et al., 1990).

Die Anreicherung extrazellulärer Matrix erfolgt auf der einen Seite durch Steigerung der Expression von Genen zur Bildung der Matrixproteine (Kamp et al., 1999). Auf der anderen Seite verändert TGF- β das Gleichgewicht zwischen Kollagenasen (Metalloproteinase) und Kollagenase-Inhibitoren (tissue inhibitor of metalloproteinase) und hemmt so den Matrixabbau (O’Kane et al., 1997).

Seine tumorsuppressive Wirkung vermittelt TGF- β vor allem über die Hemmung der Proliferation von Epithelzellen (Kamp et al., 1999). Es steigert den Spiegel an p21 und p53 (Kamp et al., 1999), was einen Übergang der Zelle von der G0/G1 in die S-Phase des Zellzyklus verhindert (Kopnin et al., 2000). Dieser Vorgang wird durch den Einfluss einiger zellulärer Proteine wie z.B. p53, Myc und Ras limitiert. Sie können die Signalkaskade von TGF- β und damit seine antiproliferative Wirkung hemmen (Blobe et al., 2000).

In seiner biologisch aktiven Form bindet TGF- β als extrazellulärer Ligand (Baştürk et al., 2005) an einen heterodimeren Rezeptorkomplex, bestehend aus zwei Untereinheiten, dem TGF- β -Rezeptor I und dem TGF- β -Rezeptor II (Roberts, 1999). Beide Rezeptoruntereinheiten enthalten eine extrazelluläre globuläre Domäne (Greenwald et al., 1999; Kirsch et al., 2000b) und auf der zytoplasmatischen Seite ein juxtamembranäres Segment sowie eine Serin/Threonin Kinase Domäne (Massagué et al., 1997; Huse et al., 1999). Ligand für diese Art von Rezeptor ist meist ein Homodimer, verbunden durch Disulfidbrücken, wobei jedes Monomer an eine Untereinheit des Rezeptors bindet (Kirsch et al., 2000a).

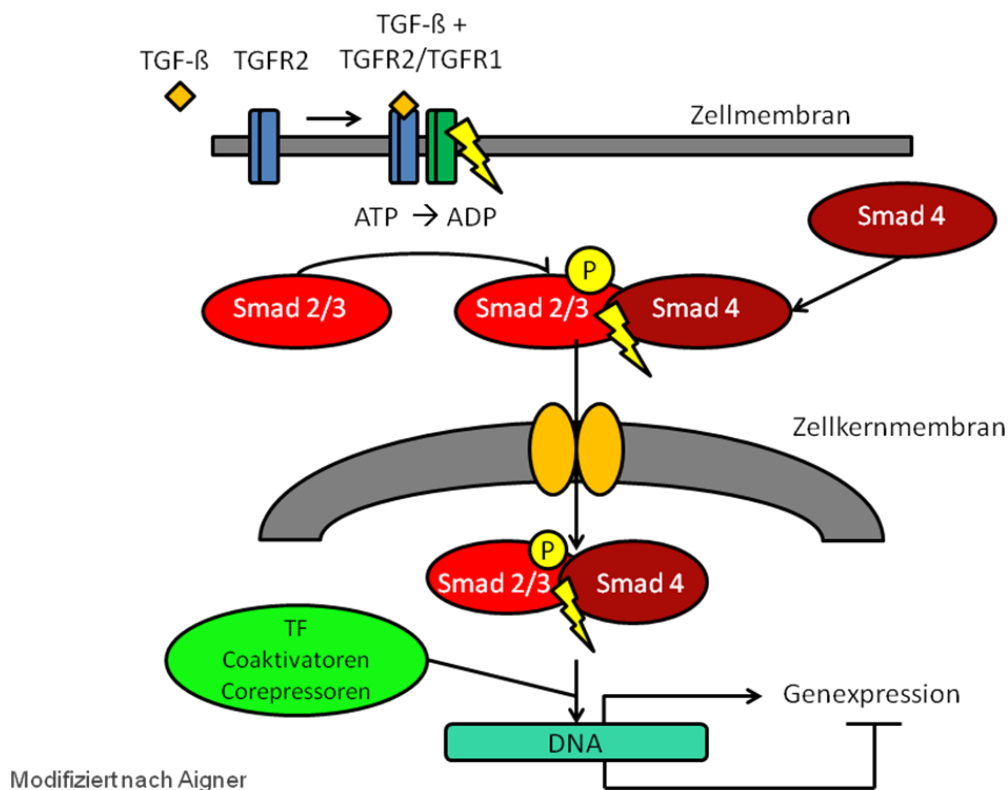


Abb. 6: Schematische Darstellung der TGF- β Signalkaskade. TGFR1 = TGF- β Rezeptor I; TGFR2 = TGF- β Rezeptor II; TF = Transkriptionsfaktoren; Gelber Blitz = aktivierter Zustand; P = Phosphat. Coaktivatoren aktivieren, Corepressoren hemmen die Genexpression.

Aktives TGF- β bindet zunächst an den TGF- β -Rezeptor II, wodurch der TGF- β -Rezeptor I rekrutiert und mit ihm ein tetramerer Komplex gebildet wird (Massagué et al., 1998). Durch die Bindung von TGF- β an den Rezeptor werden sogenannte Smad-Proteine im Zellinneren durch die Serin/Threonin Kinase des TGF- β -Rezeptors I phosphoryliert (Leask et al. 2004; Zawel et al. 1998). Smad Proteine sind die einzigen bekannten Rezeptorsubstrate für TGF- β (Shi et al., 1997, 1998). Sie liegen im Zytoplasma gebunden an den SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) vor (Tsukazaki et al., 1998). Der durch Phosphorylierung aktivierte Komplex aus Smad2 und Smad3 (R-Smads) (Massagué et al., 2000; Xu et al., 2000) bildet einen heteromeren Komplex (Massagué et al., 1997; Heldin et al., 1998) mit Smad4 (Co-Smad) (Massagué et al., 2000; Xu et al., 2000). Es erfolgt eine Translokation in den Zellkern (Leask et al. 2004; Zawel et al., 1998).

Dort bindet der Komplex aus Smad 2/3 und Smad 4 alleine oder in Assoziation mit Cofaktoren wie z.B. dem transkriptionalen Cofaktor p300 (Shen et al., 1998) an die spezifischen Promotorregionen von Zielgenen der zellulären DNA (Massagué et al., 1997; Heldin et al., 1998). Der Smad-Komplex kann auf der DNA sowohl an Coaktivatoren als auch an Corepressoren der Transkription binden und so durch das TGF- β -Signal die Expression bestimmter Gene aktivieren bzw. hemmen (Luo et al., 1999; Sun et al., 1999; Wotton et al., 1999). Der Effekt von TGF- β auf die Zielzelle ist konzentrationsabhängig (Heldin et al., 1998).

Eine negative Rückkopplung erfährt die Signalkaskade durch den inhibitorischen Einfluss von Smad6/7, die beide die Bindungsstelle für Smad2/3 am TGF- β -Rezeptor I blockieren (Piek et al., 1999; Heldin et al., 1998). Die Expression von Smad7 wird durch INF- γ (Ulloa et al., 1999) und TNF- α (Blitzer et al., 2000) induziert.

1.3.1 Isoformen und Polymorphismen im TGF- β 1 Gen

Beim Menschen sind zur Zeit drei Isoformen des TGF- β Proteins bekannt (TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3), die eine 60-80%ige Homologie aufweisen (Massagué, 1998). Im Plasma liegt überwiegend TGF- β 1 vor (Wakefield et al., 1995).

Die Gene dieser Proteine liegen auf den Chromosomen 19q13.1-q13.3 (TGF- β 1) (Fujii et al., 1986), 1q41 (TGF- β 2) und 14q23-24 (TGF- β 3) (Barton et al., 1988) und enthalten jeweils sieben Exons (Fujii et al., 1986; Barton et al., 1988).

Durch Anlagerung von Bindungsproteinen an die Promotorregionen werden diese Gene in *messenger RNA* (mRNA) umgeschrieben (Massagué, 1998). Anschließend entstehen durch Translation der mRNA zunächst Vorläufermoleküle, die das TGF- β -Protein am carboxyterminalen Ende tragen. Nach proteolytischer Spaltung erfolgt die Sekretion des 25kDa (Grainger et al., 1999) TGF- β -Homodimers in inaktiver Form, nicht kovalent gebunden

(Pociask et al. 2004), an ein *Latency-Associated-Peptide* (LAP) (Beers et al., 1998). Dieser Komplex kann in Assoziation mit einem *Latent TGF- β Binding Protein* (LTBP) vorliegen. Dieses bindet unter Ausbildung von Disulfidbrücken über Cysteinreste an das LAP (Saharinen et al., 1996; Lawrence et al., 1984). Das aminoternale Ende des LTBP geht kovalente Bindungen mit Proteinen der extrazellulären Matrix ein (Werb, 1997).

Bevor TGF- β mit seinem Rezeptor interagieren kann, muss er von den Bindeproteinen abgespalten und dadurch aktiviert werden (Beers et al., 1998). Die Entfernung des LAP vom TGF- β Protein stellt den wichtigsten Kontrollpunkt in der Regulation der biologischen Aktivität von TGF- β dar (Pociask et al., 2004). Dies geschieht durch Ansäuerung, Proteasen (z.B. Plasmin und Cathepsin) und Substanzen, die eine Konformationsänderung verursachen (z.B. Thrombospondin-1 aus Fibroblasten) (Morishima et al., 2001; Murphy-Ullrich et al., 2000).

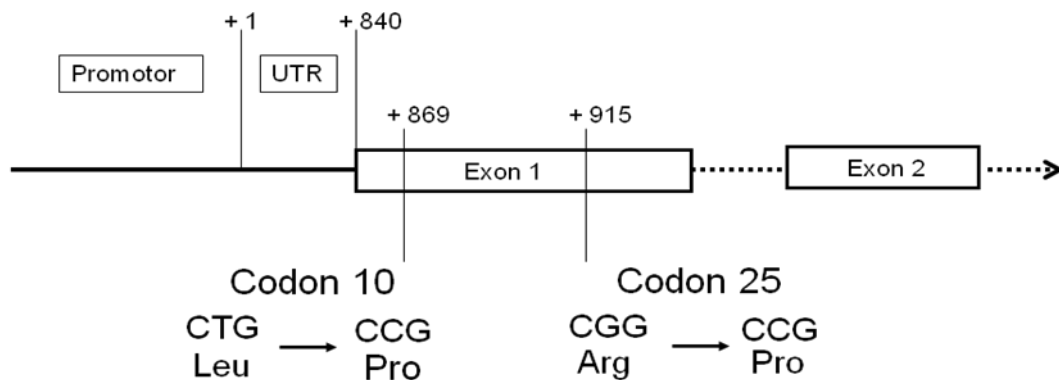
Es wurde beobachtet, dass Alter, Geschlecht und geographischer Aufenthaltsort keinen Einfluss auf die Konzentration von TGF- β 1 haben (Grainger et al., 2000).

Dennoch variiert die TGF- β 1-Produktion zwischen Individuen (Grainger et al., 1999). Studien zufolge wird Polymorphismen im TGF- β 1-Gen diesbezüglich ein großer Stellenwert zugeschrieben (Awad et al., 1998; El-Gamel et al., 1999; Grainger et al., 1999).

Ein Polymorphismus beschreibt eine Variante im Genom einer Population, die bei mehr als 1% der Population auftritt. Sie manifestiert sich als Insertion, Deletion oder Substitution einzelner oder mehrerer Nukleotide. Betroffen sind sowohl Keim- als auch Stromazellen (Krawczak et al., 1994; Löffler & Petrides, 1997).

Im Gen von TGF- β 1 sind bisher acht Polymorphismen identifiziert worden. Davon liegen drei im Bereich der codierenden Sequenz, im Codon 10 und 25

(Exon 1) (vgl. Abb. 7) sowie im Codon 263 (Exon 5). Insbesondere die Polymorphismen im Codon 10 und 25 stehen in engem Zusammenhang mit der Produktion und der Aktivität von TGF- β 1 (Grainger et al., 1999). Es handelt sich hierbei um die Substitution einer Base (Codon 10 T>C, Codon 25 G>C). Dadurch kommt es bei der Translation zu einer Änderung in der Primärstruktur des Proteins (Codon 10 Leu>Pro, Codon 25 Arg>Pro) (Cambien et al., 1996). Die Ergebnisse darüber, ob die Anwesenheit von Prolin die Produktion von TGF- β 1 steigert oder hemmt, sind kontrovers (Baan et al., 2000; Powell et al., 2000; Gewaltig et al., 2002).



UTR = untranslated region

Abb. 7: Ausschnitt des TGF- β 1 Gens. Darstellung der Lokalisation von Codon 10 und 25 und deren Polymorphismen im Exon 1 mit daraus folgenden Änderungen der translatierten Aminosäure.

Die Suszeptibilität für fibrotische und maligne Erkrankungen in Abhängigkeit von diesen Polymorphismen ist bereits für mehrere Organsysteme (Leberfibrose, Hepatozelluläres Karzinom, Nierenzellkarzinom, idiopathische Lungenfibrose) untersucht worden. Auch hierbei unterscheiden sich die Ergebnisse hinsichtlich einer induzierenden oder protektiven Wirkung der einzelnen Genotypen im Codon 10 und 25.

Ein Polymorphismus im Codon 25 des TGF- β codierenden Gens führt zu einem Austausch der Aminosäure Arginin gegen Prolin. Der homozygote Genotyp (Arg25Arg) wird mit einer höheren TGF- β Produktion („*High-Producer*“) assoziiert als der heterozygote Genotyp (Arg25Pro). Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass eine genetische Prädisposition hinsichtlich einer Fibroseentwicklung aufgrund einer erhöhten TGF- β Synthese besteht. So waren bei Patienten, die nach einer Knochenmarkstransplantation eine Leber- oder Lungenfibrose entwickelten, bereits vor der OP die Plasma TGF- β Level signifikant erhöht (Anscher et al., 1993). Patienten, die sich einer Lungentransplantation aufgrund von Lungenfibrose oder zystischer Fibrose unterziehen mussten, gehörten zum größeren Teil zu der Gruppe mit dem TGF- β „*High-Producer*“ Genotyp (Awad et al., 1998; El-Gamel et al., 1999). Der Genotyp Arg25Pro konnte mit einer Reihe weiterer Erkrankungen mit Bindegewebsvermehrung in Zusammenhang gebracht werden.

2 Fragestellung

Für die nächsten Jahre ist ein Anstieg der Inzidenz im Bereich der Erkrankungen durch kanzerogene oder fibrogene Gefahrstoffe am Arbeitsplatz zu vermuten. Es erfolgten primärpräventive Maßnahmen wie z.B. das Asbestverbot im Jahr 1993. Wegen der meist langjährigen Latenz der Krankheitsentstehung sind sekundärpräventive und therapeutische Maßnahmen auf dem Gebiet der gefahrstoffbedingten malignen und fibrosierenden Lungenerkrankungen von besonderer Bedeutung. Es zeigen sich unterschiedliche Risiken in Abhängigkeit von der Gefahrstoffdosis. Humankanzerogene Stoffe haben keine Schwellendosis. Für die Anerkennung des asbestinduzierten Bronchialkarzinoms als Berufskrankheit wird eine kumulative Dosis von 25 Faserjahren als „Grenz-Dosis“, bei der eine Risikoverdopplung epidemiologisch abgeleitet wurde, in die Legaldefinition der Nr. 4104 BKV aufgenommen.

Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass interindividuell unterschiedliche Eigenschaften der exponierten Personen die Latenzzeit, den Schweregrad sowie die eigentliche Entstehung der Erkrankungen modifizieren. Arbeitsmedizinisch ist die Eingrenzung von Hochrisikogruppen relevant.

Könnte geklärt werden, welche individuellen Merkmale eine Rolle spielen, bestünde die Option, Vorsorgeuntersuchungen den prädisponierten Personengruppen engmaschiger anzubieten und im Erkrankungsfall die Kompensation ggf. zu erleichtern.

Das Zytokin *Transforming Growth Factor-beta1* (TGF- β 1) stellt einen Wachstumsfaktor mit sowohl profibrotischer als auch antiproliferativer Funktion dar, der potentiell zu unterschiedlichen Empfindlichkeiten der exponierten Bevölkerung beiträgt.

Welche Mechanismen die Konzentration von TGF- β und die damit verbunden fibrosierenden oder malignen Gewebeveränderungen beeinflussen, ist derzeit nicht abschließend geklärt (Grainger et al., 2000). Genetische

Polymorphismen in der codierenden Sequenz des TGF- β 1 Genes werden in diesem Zusammenhang als eine mögliche Ursache betrachtet (Awad et al., 1998; El-Gamel et al., 1999; Grainger et al., 1999).

Insbesondere Polymorphismen im Codon 10 (Leu>Pro) und Codon 25 (Arg>Pro) im Exon 1 des TGF- β 1 Gens wurden hinsichtlich des Bronchialkarzinoms und der Lungenfibrose bereits mehrfach untersucht. Jedoch sind die Ergebnisse kontrovers. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der Aminosäure Prolin und der Veränderung der TGF- β 1 Konzentration sowie konsekutiv der Erkrankungshäufigkeit konnte bisweilen nicht dargestellt werden. Auch liegen keine Arbeiten vor, die sich im Speziellen mit asbestinduzierten Lungenerkrankungen beschäftigen.

Der Hintergrund dieser Studie ist die Frage nach einem Zusammenhang zwischen der Suszeptibilität gegenüber gefahrstoffbedingten Lungen- bzw. Pleuraerkrankungen maligner oder fibrosierender Dignität und der genetischen Polymorphismen in Codon 10 und 25 im Exon1 des Gens für TGF- β 1. Es sollte insbesondere geklärt werden, wie sich das Risiko für Asbestfaserstaub-verursachte Erkrankungen in Abhängigkeit der vorgenannten Polymorphismen erhöht. In die Analysen sollten auch die unterschiedlichen Schweregrade und Ausprägungsgrade der fibrogenen Erkrankungen berücksichtigt werden. Dies ließe weitere Einblicke in die Pathophysiologie der asbestverursachten Erkrankungen zu.

3 Kollektiv und Methoden

3.1 Patientenkollektiv und Kontrollgruppe

In diese Untersuchungen wurden insgesamt 850 Männer aufgenommen. Es handelt sich einerseits um Patienten aus dem Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH Standort Giessen, insbesondere um Patienten aus der Poliklinik für Arbeits- und Sozialmedizin, den Medizinischen Kliniken II und V sowie der Kliniken für Berufskrankheiten in Bad Reichenhall und in Falkenstein und andererseits um eine Gruppe gesunder Vergleichspersonen. Zur Blutentnahme lag das Votum der Ethikkommission (AZ: 75/06) vor. Alle freiwilligen Probanden und Patienten wurden ausführlich mündlich und mit Aufklärungsbögen über die Studie informiert und haben in einer Einverständniserklärung der Blutentnahme sowie der anonymisierten Verwendung ihrer persönlichen Daten schriftlich zugestimmt.

In die Studie eingeschlossen wurden 767 Patienten mit fibrosierenden bzw. malignen Erkrankungen der Lunge und Pleura und 83 gesunde Kontrollpersonen. Auf Grund eines geringen Anteils weiblicher Patienten mit Berufskrankheiten wurden keine Frauen in die Studie einbezogen.

Einschlusskriterien waren:

- Männer
- Patienten mit primärem, histologisch gesichertem Bronchialkarzinom
- Patienten mit histologisch gesichertem diffusem malignem Pleuramesotheliom
- Patienten mit radiologisch und lungenfunktionsanalytisch gesicherter Lungen- und/oder Pleurafibrose

Als Ausschlusskriterien dienten

- Frauen
- Patienten mit schweren Leberfunktionsstörungen
- Patienten mit chronischen Nierenfunktionsstörungen
- Patienten mit anderen malignen Tumoren

Das Durchschnittsalter des Patientenkollektives beträgt 67,27 Jahre bei einer Spannweite von 39 bis 91 Jahren und dem Median bei 68,14 Jahren. Im gesunden Kontrollkollektiv liegt das mittlere Alter bei 44,8 Jahren mit einer Spannweite von 20 bis 75 Jahren und einem Median von 45,05 Jahren. Das mittlere Alter der Patienten und der Kontrollen ist signifikant unterschiedlich ($p < 0,01$).

Die 767 Patienten wurden aufgrund der zugrundeliegenden Erkrankungen in folgende Untergruppen aufgeteilt:

Patienten mit fibrosierenden Lungen- und Pleuraerkrankungen:

n= 401 Patienten mit Asbeststaublungerkrankung oder durch Asbeststaub verursachte Erkrankung der Pleura im Sinne der Berufskrankheit der Nr. 4103 BKV

n= 156 Patienten mit Quarzstaublungerkrankung (Silikose) im Sinne der Berufskrankheit der Nr. 4101 BKV

n= 34 Patienten mit Lungenfibrosen anderer Genese

sowie in Patienten mit bösartigen Lungen- und Pleuraerkrankungen:

n= 29 Patienten mit diffusem malignen Pleuramesotheliom durch Asbesteinwirkung im Sinne der Berufskrankheit der Nr. 4105 BKV und

n= 147 Patienten mit primären histologisch gesicherten Bronchialkarzinomen, davon litten

n= 32 Patienten an einem histologisch gesicherten Bronchialkarzinom im Sinne der Berufskrankheit der Nr. 4104 BKV „Lungenkrebs in Verbindung mit Asbeststaub-Lungenerkrankungen, mit durch Asbestfaserstaub verursachter Erkrankung der Pleura oder einer Einwirkung einer kumulativen Asbestfaserstaub-Dosis am Arbeitsplatz von mind. 25 Faserjahren“ und

n= 115 Bronchialkarzinome anderer Ursachen wie zum Beispiel Tabakrauch

Bei Patienten mit Berufskrankheiten konnten die arbeitsmedizinischen Voraussetzungen zur Anerkennung einer Berufskrankheit nach der BKV wahrscheinlich gemacht werden, bzw. waren bereits mit Bescheid der

Unfallversicherungsträger als solche anerkannt worden. Die Zuordnung zu den BK Nummern kann Tabelle 2 entnommen werden.

Die Diagnose und Einteilung der Schweregrade bei Patienten mit Asbeststaublungenenerkrankungen und asbestverursachten Erkrankungen der Pleura erfolgte gemäß der Internationalen Staublungenklassifikation (ILO 1980/2000 BRD). Danach werden kleine unregelmäßige Lungenschatten der Form s, t und u beschrieben sowie die Streuung (Dichte der Schatten) in einer 12-stufigen Skala beschrieben. Ab einer Streuung von 1/1 im Röntgen-Thorax Übersichtsbild in Hartstrahltechnik ist die Diagnose einer Lungenasbestose ausreichend begründet. In dieser Studie wurde der Schweregrad der Lungenasbestose in Anlehnung an die 12-stufige Skala nach ILO wie folgt abgeschätzt: Streuung nach 1/1 und 1/2 beginnende Lungenasbestose, 2/1, 2/2 und 2/3 mittelschwere Lungenasbestose, 3/1, 3/2 und 3/+ schwere Lungenasbestose. Bezüglich des Vorliegens einer Pleuraasbestose werden die umschriebenen hyalinen oder verkalkenden Pleuraplaques entsprechend ihrer Gesamtlänge und Verdickungen kodiert. Die Verbreitung ergibt sich aufgrund der Summe der maximalen Längen nach der ILO mit „1“ $< \frac{1}{4}$ der lateralen Brustwand, „2“ $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ der lateralen Brustwand und „3“ $> \frac{1}{2}$ der lateralen Brustwand.

Bei den Kontrollpersonen handelte es sich um gesunde Probanden ohne bisherige Belastung durch Gefahrstoffe wie Asbest- oder Quarzstäube.

Die Blutentnahme erfolgte zum einen im Rahmen der arbeitsmedizinischen Vorsorgeuntersuchungen bzw. Berufskrankheiten-Feststellungsverfahren. Zum anderen wurden Blutspenden von freiwilligen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie bzw. für Anatomie und Zellbiologie der Universität Giessen und von freiwilligen Studenten abgenommen.

In Tabelle 1 sind die Diagnosen, das Alter und das Rauchverhalten der rekrutierten Probanden beschrieben.

Tabelle 1: Gesamtkollektiv mit Darstellung des Alters und des Rauchverhaltens

	Patienten, n	Alter, y		Rauchverhalten, n	
		Mittelwert	Spannweite	Median	Nieraucher > Raucher/ Ex-Raucher
Kontrollkollektiv	83	44,8	20-75	45,05	40 41
Patientenkollektiv	767	67,27	39-91	68,14	119 577
Lungenfibrose	591	68,06	40-91	68,81	102 436
Silikose (BK 4101)	156	70,19	40-88	71,03	27 126
Asbestose (BK 4103)	401	67,59	45-91	67,96	66 285
Lungenasbestose (BK 4103)	179	70,05	55-81	71,26	13 85
Kleine unregelmäßige Schatten (s.t.u)					
1/1 and 1/2 ILO	71	70,09	55-81	71,53	9 48
2/1, 2/2 and 2/3 ILO	39	69,29	56-80	70,32	4 29
3/2, 3/3 and 3/+ ILO	7	75,41	68-81	75,61	0 7
Pleuraasbestose (BK 4103)	282	66,54	45-91	66,75	53 200
verkalkende Pleuraplaques (umschrieben)					
Verbreitungsgrad					
1	34	64,83	51-91	63,47	10 24
2	51	66,28	53-80	66,74	11 36
3	48	69,39	51-80	71,04	10 35
hyaline Pleuraplaques (umschrieben)					
Verbreitungsgrad					
1	17	63,67	51-74	66,01	5 12
2	16	64,36	56-71	63,94	3 13
3	23	66,98	49-77	67,34	2 19
Hyalinosis complicata	54	65,4	45-84	65,03	8 46
Lungenfibrose anderer Genese	34	63,87	40-80	63,16	9 25
Pleuraesotheliom (BK 4105)	29	65,82	46-75	67,86	13 11
Bronchialkarzinom	147	64,38	39-83	65,34	4 130
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)	32	65,54	50-80	65,32	0 26
Bronchialkarzinom anderer Genese	115	64,1	39	65,34	4 104

Tabelle 2: Anerkannte BK-Fälle des Patientenkollektives

BK-Nr.	Anzahl, n	Bezeichnung
4101	156	Quarzstaublungenenerkrankung
4103	401	Asbeststaublungenenerkrankung oder durch Asbeststaub verursachte Erkrankung der Pleura
4104	32	Lungenkrebs in Verbindung mit Asbeststaub-Lungenenerkrankungen, mit durch Asbestfaserstaub verursachter Erkrankung der Pleura oder einer Einwirkung einer kumulativen Asbestfaserstaub-Dosis am Arbeitsplatz von mind. 25 Faserjahren
4105	29	Diffuses malignes (Pleura)mesotheliom durch Asbesteinwirkung

3.2 Geräte und Materialien

3.2.1 Geräte

-20°C Gefrierschrank:	Bosch GmbH, Stuttgart
4°C Kühlschrank:	Bosch GmbH, Stuttgart
BioPhotometer :	Eppendorf AG; Hamburg
Eismaschine (Scotsman® AF 10):	K.B. Catering Ltd, Suffolk, UK
Glaswaren:	Schott AG, Mainz
LightCycler:	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
LightCycler Zentrifugen Adapter in Aluminium-Kühlblock :	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Netzgerät Consort E835:	Consort, Tumhout, Belgium
Pipetten:	Gilson Inc., Middleton, USA
Thermoblock:	HCL, Bovenden
Tischzentrifuge:	Hettich, Tuttlingen
Tuttnauer Tischautoklav 2540 EL :	Systec GmbH Labor-

Vortexer:	Systemtechnik, Wellenberg
Zentrifuge:	Heidolph, Schwalbach Hettich, Tuttlingen

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Butterfly-Kanüle (21 G):	Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth
Einmalhandschuhe:	NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Co KG, Wetter
Einmalpipetten 10ml:	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
LightCycler Kapillaren:	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pipettenspitzen:	Gentra Systems, Minneapolis, USA
Reaktionsgefäße:	Eppendorf AG, Hamburg
SafeLock Tubes:	Eppendorf AG, Hamburg
UV-Küvetten:	Eppendorf AG, Hamburg

3.2.3 Zusammensetzung verwendeter Lösungen

DEPC (Diethylen Pyrocarbonat) H ₂ O:	1ml DEPC ad 1000ml H ₂ O
---	--

3.2.4 Reagenzien

Anchor10 5LC:	TIB-MOLBIOL, Berlin
Arg25Pro-anchor 3FL:	TIB-MOLBIOL, Berlin
Arg25Pro-sensor 5LC:	TIB-MOLBIOL, Berlin
DEPC (Diethylen Pyrocarbonat):	Roth, Karlsruhe
DMSO (Dimethyl Sulfoxide):	Sigma-Aldrich, Steinheim

EDTA (Ethylendiamintetraacetat):	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	
50mM:	Quiagen GmbH, Hilden
25mM:	Roche, Mannheim
NaCl (Natriumchlorid):	Merck, Darmstadt
PCR-Sonden:	TIB-MOLBIOL, Berlin
Primer Arg25Pro-for:	TIB-MOLBIOL, Berlin
Primer Arg25Pro-rev:	TIB-MOLBIOL, Berlin
Primer TGFβ-B:	TIB-MOLBIOL, Berlin
Primer TGFβ-S:	TIB-MOLBIOL, Berlin
Pro10 3FL:	TIB-MOLBIOL, Berlin

3.2.5 Kits

Versagene™ DNA Purification Kit	Gentra Systems, Minneapolis, USA
LightCycler-Kit: FastStart DNA Master Hybridization Probes	Roche, Mannheim

3.3 Methode

3.3.1 Isolierung der DNA

Für die DNA-Extraktion wurden 3,5ml venöses Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Blut verwendet. Das Blut wurde mit dem Versagene™ DNA-Isolierungs-Kit nach Herstellerangaben behandelt. Zunächst werden 3 ml EDTA-Blut zur Lyse der Erythrozyten mit RBC-Lysis-Solution in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die Inkubationszeit beträgt 10 Minuten (min) bei Raumtemperatur. Anschließend wird 1 min bei 2000 Runden pro Minute (rpm) zentrifugiert. Die Leukozyten setzen sich als Pellet ab. Nach Verwerfen des Überstands wird der oben beschriebene Vorgang wiederholt. Das gewonnene Pellet wird anschließend in 400 µl Lösungspuffer gelöst. Nach Zugabe von

700 µl im Kit enthaltenem Bindepuffer kann die Lösung auf die sogenannte Purification-Säule aufgetragen werden. Der Bindepuffer ist nötig, um die DNA in der Membran der Säule zu fixieren. Nachdem das Gemisch für 1 min bei 7000 rpm zentrifugiert wurde, wird das Filtrat verworfen. Nach Zugabe von 200 µl der im Kit enthaltenen Wasch-Lösung werden alle Bestandteile des Lysats mit Ausnahme der DNA durch 2 min zentrifugieren bei 13000 rpm aus der Membran gewaschen. Zum Lösen der DNA wird zunächst die Säule in ein neues Reagenzgefäß gebracht. Anschließend werden 100 µl im Kit enthaltene Elutions-Lösung auf die Membran gegeben. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min und Zentrifugation (1 min bei 13000 rpm) kann die gewonnene DNA bei -20°C gelagert werden.

3.3.2 Photometrische Messung der DNA-Konzentration

Für die photometrische Bestimmung wurden 2 µl DNA-Lösung mit 198 µl H₂O verdünnt und die Extinktion bei $\lambda=260\text{nm}$ (DNA) und $\lambda=280\text{nm}$ (Proteine) gemessen. Ist der Koeffizient kleiner als 1,8 bis 2, ist die Präparation mit Protein und/oder aromatischen Substanzen (z.B. Phenol) kontaminiert. In diesem Fall wurde die DNA erneut gereinigt. Da die optische Dichte (OD) =1 bei 260nm einer DNA-Konzentration von 50ng/µl entspricht, lässt sich die DNA-Konzentration photometrisch wie folgt bestimmen:

$$\text{Konzentration [ng/µl]} = E_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50$$

3.3.3 Die PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von selektiven DNA-Sequenzen. Ein sogenannter Zyklus gliedert sich grundsätzlich in drei Abschnitte. Er beginnt mit der Denaturierung, in diesem Abschnitt wird der Reaktionsansatz auf 95°C erhitzt, sodass sich die Wasserstoffbrücken zwischen den Doppelsträngen der DNA in zwei Einzelstränge aufspalten. Im nächsten Abschnitt, der Primerhybridisierung,

lagern sich Primer, komplementäre Oligonukleotide, an die entstandene Matrize an. Die spezifische Temperatur, bei der sich die Primer an die Ausgangs-DNA anlagern wird als Annealing Temperatur bezeichnet. Im darauf folgenden Abschnitt, der Extension, werden durch Taq-Polymerasen komplementäre Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) dATP, dGTP, dCTP und dTTP eingesetzt, bis sich ein neuer DNA-Strang bildet. Die Primer bilden dabei den Startpunkt und bleiben als Teil des neuen Stranges bestehen. Dieser letzte Abschnitt findet bei einer Temperatur von 72°C und bei einer Geschwindigkeit von 75 Nukleotiden pro Sekunde von 5' (an der 5'-Position befindet sich ein Kohlenstoffatom) nach 3' (an der 3'-Position befindet sich eine OH-Gruppe) statt. Das bedeutet, dass sich der DNA-Strang pro Sekunde um 75 Nukleotide verlängert.

Die nun entstandene neue DNA wird im nächsten Zyklus ebenfalls als Matrize zur Amplifizierung verwendet, so dass die Vervielfältigung der Ziel-DNA exponentiell ansteigt.

3.3.3.1 Die qualitative PCR im LightCycler

Bei dieser Studie kamen Hybridisierungs sonden zum Einsatz. Die Sonden sind Oligonukleotide, die in direkter Nachbarschaft zueinander, maximal fünf Nukleotide voneinander entfernt, an die Ziel-DNA binden. Diese Hybridisierungs sonden sind mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (z. B. Fluoreszein, LC Red 640). Die Detektion basiert auf dem FRET-Prinzip (**F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer). Binden die beiden Hybridisierungs sonden an der gesuchten Ziel-DNA in räumlicher Nähe und regt man gleichzeitig das Fluoreszein der ersten Hybridisierungs sonde an, emittiert diese keine Fluoreszenz, sondern überträgt die Energie auf den benachbarten zweiten Fluoreszenzfarbstoff (LC Red 640). Dieser emittiert nun rote Fluoreszenz, deren Intensität in der Summe direkt proportional der Menge an Ziel-DNA ist. Die Messung des Signals erfolgt einmal pro Zyklus nach dem Primer Annealing (zu diesem Zeitpunkt sind beide Hybridisierungs sonden an

die Ziel-DNA gebunden und es erfolgt ein Energietransfer). Ungebundene Hybridisierungs sonden geben auf Grund der fehlenden räumlichen Nähe (sie diffundieren frei in der Lösung) kein Signal ab. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt durch ein LED über die Spitze der Kapillare, welche als optische Einheit wirkt und die emittierte Fluoreszenz gebündelt nach unten wieder abgibt. Eine Kombination von halbdurchlässigen Spiegeln und wellenlängenspezifischen Filtern leitet die emittierte Fluoreszenzstrahlung zu den drei Photozellen (530 nm, 640 nm, 710 nm) weiter. Diese wandeln das optische Signal in ein elektrisches Signal um, welches sofort über die serielle Schnittstelle zum PC übermittelt wird. Man kann somit den Verlauf der PCR ohne Zeitverzögerung am Rechner verfolgen und bereits während des PCR - Laufs Aussagen über den Erfolg treffen.

Will man nun mit Hybridisierungs sonden Punktmutationen detektieren, nimmt man nach der PCR eine Schmelzkurve auf. Da die Hybridisierungs sonde komplementär zu der Punktmutation an die Ziel-DNA bindet, schmilzt diese bei Fehlen einer Mutation (eine Basenpaarung weniger) bei niedrigerer Temperatur (einige °C) im Vergleich zu einem Basentriplet mit Mutation. Bei Ableitung der Fluoreszenz über die Zeit (dF/dt) erhält man die in der Abbildung 8-10 dargestellten Kurven. Handelt es sich um einen Heterozygoten, erhält man zwei Peaks, einen bei niedrigerer Temperatur (Schmelzpunkt ohne Punktmutation) und einen bei höherer Temperatur (Schmelzpunkt mit Punktmutation). Diese Zusammenhänge sind in den Abb. 8-10 dargestellt.

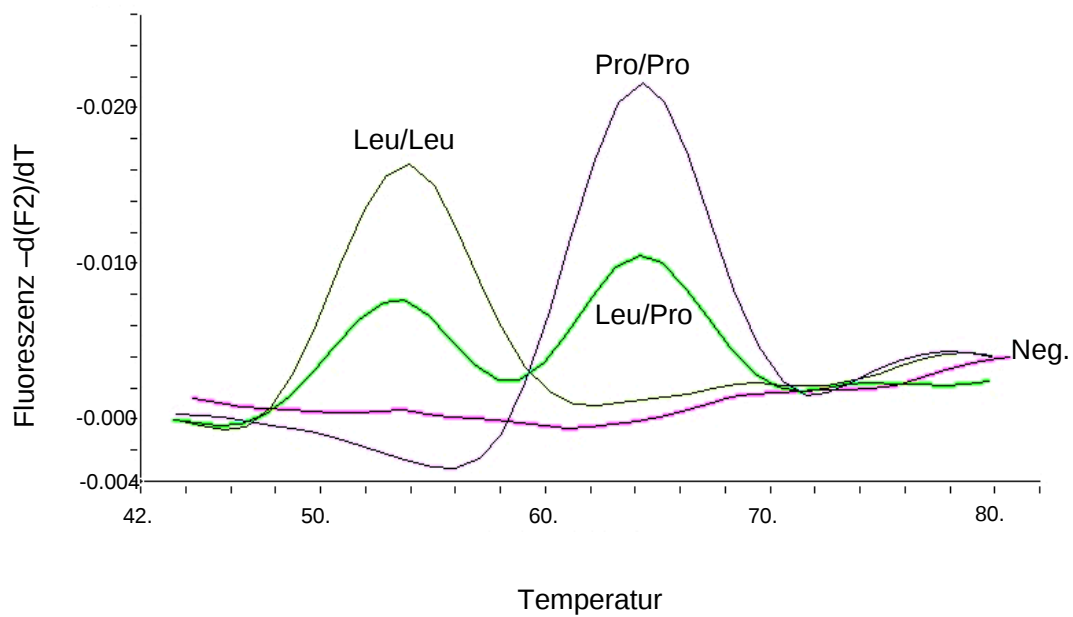


Abb. 8: Schmelzkurve des TGF- β Polymorphismus am Codon 10
 Die Aminosäure Leucin (Leu) entspricht dem Allel ohne Punktmutation, die Aminosäure Prolin (Pro) dem Allel mit Punktmutation. Leu/Leu=homozygoter Genotyp; Pro/Pro=homozygoter Genotyp; Leu/Pro=heterozygoter Genotyp; Neg.=Negativ-Kontrolle

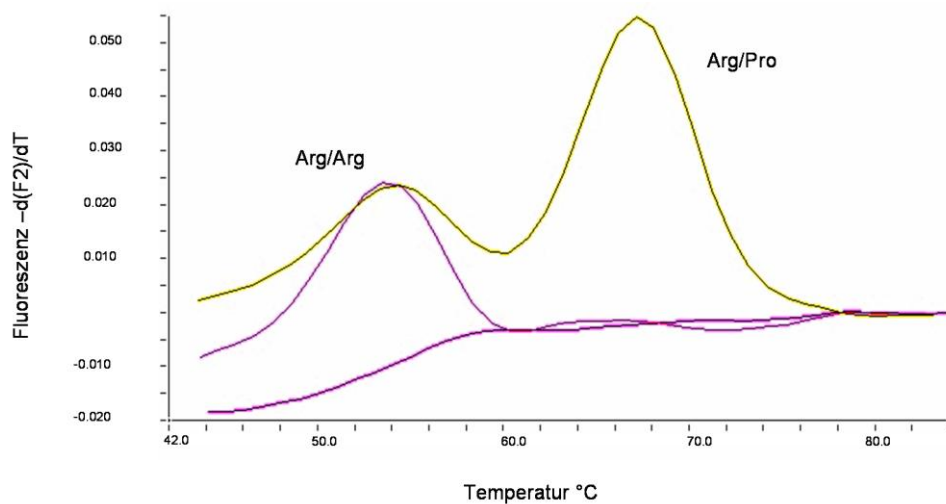


Abb. 9: Schmelzkurve des TGF- β Polymorphismus am Codon 25
 Die Aminosäure Arginin (Arg) entspricht dem Allel ohne Punktmutation, die Aminosäure Prolin (Pro) dem Allel mit Punktmutation. Arg/Arg=homozygoter Genotyp; Arg/Pro=heterozygoter Genotyp; Neg.=Negativ-Kontrolle

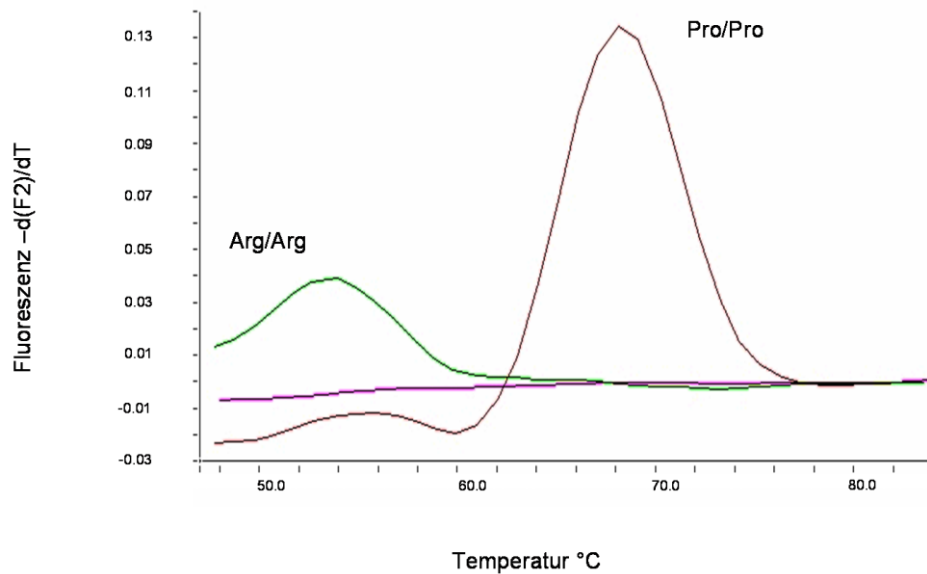


Abb. 10: Schmelzkurve des TGF- β Polymorphismus am Codon 25
 Die Aminosäure Arginin (Arg) entspricht dem Allel ohne Punktmutation, die Aminosäure Prolin (Pro) dem Allel mit Punktmutation. Arg/Arg=homozygoter Genotyp; Pro/Pro=homozygoter Genotyp; Neg.=Negativ-Kontrolle

3.3.3.2 Ansatz und Protokoll für die qualitative PCR im LightCycler

Unter sterilen Bedingungen wurde der LightCycler®-Kit (FastStart DNA Master Hybridization Probes, Roche) nach Herstellerangaben angesetzt. Das Endvolumen des Ansatzes betrug 20 μ l. In jedem Lauf wurde sowohl eine Negativ- als auch Positiv-Kontrolle mitgeführt.

Pipettierschema für FastStart DNA Master Hybridisation Probes, Roche

Mix Roche	2 μ l
Primer (100 μ M) 1:10	2 μ l
Sensor (100 μ M) 1:10	0,4 μ l
Anchor (100 μ M) 1:10	0,4 μ l
MgCl ₂ (25nM)	2,4 μ l
DMSO	1 μ l
H ₂ O DEPC	9,8 μ l
DNA-Probe 1:10	2 μ l
	20 μ l

3.3.3.3 Primer- und Sondensequenzen

Tabelle 3: Primersequenzen der qualitativen PCR TGF β Codon 10

	TGF β B 5'-3'	TGF β S
TGF β Codon 10	CTGTTGTACAGGGCGAGCAC	AGACACCCCCGGTCCAAG

Tabelle 4: Primersequenzen der qualitativen PCR TGF β Codon 25

	Arg25Pro-for 5'-3'	Arg25Pro-rev 5'-3'
TGF β Codon 25	CTAGGTTATTTCCGTGGG	CCTGGCGTAGTAGTCG

Tabelle 5: Sondensequenzen der qualitativen PCR TGF β Codon 10

	Pro10 3FL 5'-3'	Anchor10 5LC 5'-3'
TGF β Codon 10	CTGCTGCCGCTGCTGC-FL	LC640-CGCTGCTGTGGCTACTGGTGCTGACGCCT-p

Tabelle 6: Sondensequenzen der qualitativen PCR TGF β Codon 25

	Arg25Pro-sensor	Arg25Pro-anchor
TGF β Codon 25	LC640-ACGCCTGGCCCGCCG-p	GCTACCGCTGCTGTGGCTACTGGTGCT-FL

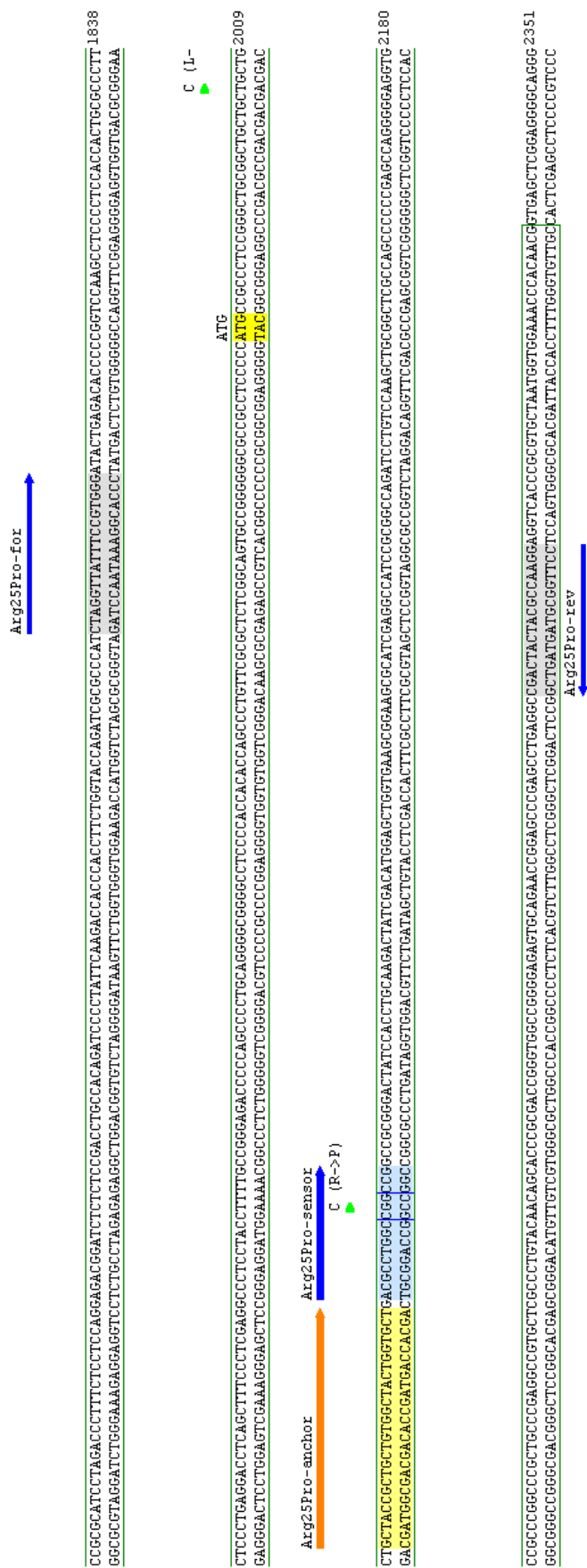


Abb. 12: Sequenz der untersuchten Genregion des TGF- β 1 Gens. Die Ansatzstellen für die in der Real Time PCR bei Codon 25 verwendeten Sonden (Arg25Pro-anchor, Arg25Pro-sensor) und Primer (Arg25Pro-for, Arg25Pro-rev) sind markiert. An Stelle 2050 befindet sich der untersuchte Polymorphismus, ein Austausch von Guanin zu Cytosin (unterer grüner Pfeil). Quelle: TIB-MOLBIOL, Berlin

3.3.3.4 Versuchsbedingungen

Tabelle 7: Bedingungen für die qualitative PCR mit TGF- β Codon 10 und TGF- β Codon 25

Programm	Temperatur [°C]	Dauer [Sek.]	Slope [°C/Sek.]	Zyklen
Aktivierung	95	600	20	1
PCR				
Denaturierung	95	10	20	45
Annealing TGF 10	57	20		
TGF 25	59	20		
Synthese	72	30		
Melting	95	60	20	1
	40	30	20	
	90	0	0,2	
Cooling	35	60	20	1

3.3.3.5 Codierung der Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse

Wie in den Abbildungen 8-10 dargestellt, wurden die verschiedenen Genotypen detektiert. Diese wurden mit einer Zahl kodiert. Zusammen mit den weiteren Informationen wie zum Beispiel Erkrankungen, Alter und Rauchverhalten wurde eine Datenbank (dbf-Datei) mit dem Programm (FoxPro2) erstellt. Probanden ohne Punktmutation auf beiden Allelen (Leu10Leu; Arg25Arg) erhielten die Nummer „1“, alle mit heterozygotem Genotyp (Leu10Pro; Arg25Pro) die Nummer „2“ und Probanden mit Punktmutation auf beiden Allelen (Pro10Pro; Pro25Pro) die Nummer „3“. Diese Codierung wurde jeweils für Codon 10 und Codon 25 durchgeführt.

3.3.4 Statistische Methoden

Die Allelfrequenzen wurden mit folgender Formel ermittelt:

$$p = (2D+1H)/2N \text{ bzw. } p = (2R+1H)/2N; q = 1-p$$

(D=homozygote Wildtypen; R=homozygote Mutanten; H=heterozygote;
N=D+H bzw. N=R+H)

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der Genotypen in der Stichprobe wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Die Odds-Ratio (geschätztes Risiko) wurde mittels binär logistischer Regression bestimmt. Dazu wurde die Software SPSS, Version 15.0, eingesetzt. Sie basiert auf folgender Vierfeldertafel:

	Wildtypen	Variante Typen
Kontrollen	A	B
Fälle	C	D

Die rohe Odds Ratio berechnet sich an Hand der Formel: $OR = A \times D / B \times C$

Die OR Analysen wurden mittels logistischer Regression ermittelt. Es erfolgte eine Adjustierung nach Alter, Geschlecht und Rauchverhalten in Packungsjahren¹. Eine Signifikanzbestimmung wurde durch 95% - Konfidenzintervalle erreicht. Die Bestimmung der p-Werte erfolgte durch den Chi-Quadrat-Test, bei einer erwarteten Häufigkeit kleiner als fünf wurde der exakte Test nach Fischer durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

¹ Ein Packungsjahr ist die täglich gerauchte Anzahl von 20 Zigaretten (eine Packung) über die Dauer eines Jahres.

4 Ergebnisse

4.1 Polymorphismus und Genotypenverteilung im Codon 10 des TGF- β 1-Gens

Bei dem Polymorphismus des TGF- β 1 Gens im Codon 10 handelt es sich um eine Punktmutation in Exon 1 an der Position +869, bei der Thymin gegen Cytosin ausgetauscht wird. Dies führt zu einem Einbau der Aminosäure Prolin statt Leucin in das Protein und somit zu einer Veränderung seiner Primärstruktur. Die Genotypen werden unterschieden in Leu10Leu (homozygot fehlende Punktmutation), Leu10Pro (heterozygot) und Pro10Pro (homozygot vorliegende Punktmutation).

Bezüglich des Polymorphismus im Exon 1 von Codon 10 fanden sich im Patientenkollektiv n=267 (34,81%) Leu10Leu, n=379 (49,41%) Leu10Pro und n=121 (15,78%) Pro10Pro Genotypen. Daraus ergibt sich eine Allelfrequenz des Prolin-codierenden Allels im Patientenkollektiv von 0,405. Im Kontrollkollektiv fanden sich n=32 (38,5%) Leu10Leu, n=36 (43,4%) Leu10Pro und n=15 (18,1%) Pro10Pro Genotypen. Daraus ergibt sich eine Allelfrequenz des Prolin-codierenden Allels im Kontrollkollektiv von 0,397. Die Stichprobe befindet sich bezüglich dieses Polymorphismus im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Tabelle 8 zeigt die Genotypverteilung im Codon 10 (Exon 1, Position +869) in Abhängigkeit der Erkrankungen im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv.

Tabelle 8: Genotypenverteilung von TGF- β 1 Codon 10 bei Männern

	Patienten, n	Genotypenverteilung, n (%)		
		Leu10Leu	Leu10Pro	Pro10Pro
Kontrollkollektiv	83	32 (38,5)	36 (43,4)	15 (18,1)
Lungenfibrose	591	197 (33,3)	302 (51,1)	92 (15,6)
Silikose (BK 4101)	156	58 (37,2)	66 (42,3)	32 (20,5)
Asbestose (BK 4103)	401	131 (32,7)	213 (53,1)	57 (14,2)
Lungenasbestose (BK 4103)	119	38 (32,5)	67 (56,3)	14 (11,8)
kleine unregelmäßige Schatten				
1/1 und 1 1/2 ILO	71	23 (32,4)	40 (56,4)	8 (11,2)
2/1, 2/2 und 2/3 ILO	39	13 (33,3)	22 (56,4)	4 (10,3)
3/2, 3/3 und 3/+ ILO	7	2 (28,6)	3 (42,8)	2 (28,6)
Pleuraasbestose (BK 4103)	282	93 (32,9)	146 (51,8)	43 (15,2)
Verkalkende Pleuraplaques				
Verbreitungsgrad				
1	34	9 (26,5)	17 (50)	8 (23,5)
2	51	22 (43,1)	25 (49,0)	4 (7,9)
3	48	14 (29,2)	28 (58,3)	6 (12,5)
hyaline Pleuraplaques				
Verbreitungsgrad				
1	17	2 (11,8)	10 (58,8)	5 (29,4)
2	16	3 (18,7)	9 (26,3)	4 (25,0)
3	23	6 (26,1)	17 (73,9)	0 (0,0)
Hyalinosis complicata	54	19 (35,2)	26 (48,2)	9 (16,6)
Lungenfibrose anderer Genese	34	8 (23,5)	23 (67,7)	3 (8,8)
Pleuramesotheliom (BK 4105)	29	8 (27,6)	15 (51,7)	6 (20,7)
Bronchialkarzinom	147	62 (42,2)	62 (42,2)	23 (15,6)
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)	32	19 (59,4)	9 (28,1)	4 (12,5)
Bronchialkarzinom anderer Genese	115	43 (37,4)	53 (46,1)	19 (16,5)

Bei der Betrachtung des Codon 10 überwiegt der heterozygote Genotyp. Der Anteil der heterozygoten Probanden liegt für alle Gruppen durchschnittlich bei 49,4%. Individuen, die die Punktmutation in beiden Allelen des Codon 10 tragen, sind insgesamt mit durchschnittlich 15,8% seltener vertreten. In bestimmten Personengruppen wie z.B. bei Patienten mit hyalinen Pleuraplaques mit dem röntgenologisch nachweisbaren Verbreitungsgrad 3 fand sich kein Patient mit dem homozygoten Genotypes Pro10Pro.

4.2 Polymorphismus und Genotypenverteilung im Codon 25 des TGF- β 1-Gens

Beim Polymorphismus des TGF β 1-Gens im Codon 25 handelt es sich um eine Punktmutation in Exon 1 an der Position +915, bei der Guanin gegen Cytosin ausgetauscht wird. Dies führt zu einem Einbau der Aminosäure Prolin statt Arginin in das Protein und somit zu einer Veränderung seiner Primärstruktur. Die Genotypen werden unterschieden in Arg25Arg (homozygot fehlende Punktmutation), Arg25Pro (heterozygot) und Pro25Pro (homozygot vorliegende Punktmutation).

Bezüglich des Polymorphismus im Exon 1 von Codon 25 fanden sich im Patientenkollektiv n=659 (85,92%) Arg25Arg, n=105 (13,69%) Arg25Pro und n=3 (0,39%) Pro25Pro Genotypen. Daraus ergibt sich eine Allelfrequenz des Prolin-codierenden Allels im Patientenkollektiv von 0,072. Im Kontrollkollektiv fanden sich n=73 (87,9%) Arg25Arg, n=10 (12,1%) Arg25Pro und n=0 (0,0%) Pro25Pro Genotypen. Daraus ergibt sich eine Allelfrequenz des Prolin-codierenden Allels im Kontrollkollektiv von 0,06. Die Stichprobe befindet sich bezüglich dieses Polymorphismus im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Tabelle 9 zeigt die Genotypverteilung im Codon 25 (Exon 1, Position +915) in Abhängigkeit der Erkrankungen im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv.

Tabelle 9: Genotypenverteilung von TGF-β1 Codon 25 bei Männern

	Patienten, n	Genotypenverteilung, n (%)		
		Arg25Arg	Arg25Pro	Pro25Pro
Kontrollkollektiv	83	73 (87,9)	10 (12,1)	0 (0,0)
Lungenfibrose	591	497 (84,1)	93 (15,7)	1 (0,2)
Silikose (BK 4101)	156	132 (84,6)	24 (15,4)	0 (0,0)
Asbestose (BK 4103)	401	337 (84,0)	63 (15,7)	1 (0,3)
Lungenasbestose (BK 4103)	119	99 (83,2)	20 (16,8)	0 (0,0)
kleine unregelmäßige Schatten				
1/1 und 1/2 ILO	71	62 (87,3)	9 (12,7)	0 (0,0)
2/1, 2/2 und 2/3 ILO	39	30 (76,9)	9 (23,1)	0 (0,0)
3/2, 3/3 und 3/+ ILO	7	6 (85,7)	1 (14,3)	0 (0,0)
Pleuraasbestose (BK 4103)	282	238 (84,4)	43 (15,2)	1 (0,4)
verkalkende Pleuraplaques				
Verbreitungsgrad				
1	34	26 (76,5)	8 (23,5)	0 (0,0)
2	51	43 (84,3)	8 (15,7)	0 (0,0)
3	48	42 (87,5)	5 (10,4)	1 (2,1)
hyaline Pleuraplaques				
Verbreitungsgrad				
1	17	12 (70,6)	5 (29,4)	0 (0,0)
2	16	14 (87,5)	2 (12,5)	0 (0,0)
3	23	18 (78,3)	5 (21,7)	0 (0,0)
Hyalinosis complicata	54	48 (88,9)	6 (11,1)	0 (0,0)
Lungenfibrose anderer Genese	34	28 (82,4)	6 (17,6)	0 (0,0)
Pleuraesotheliom (BK 4105)	29	27 (93,1)	2 (6,9)	0 (0,0)
Bronchialkarzinom	147	135 (91,8)	10 (6,8)	2 (1,2)
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)	32	31 (96,9)	1 (3,1)	0 (0,0)
Bronchialkarzinom anderer Genese	115	104 (90,4)	9 (7,8)	2 (1,8)

Bezüglich des Codon 25 ist der größte Anteil der Probanden homozygot Arg25Arg. Insgesamt besitzen durchschnittlich 85,9% der Studienteilnehmer diesen Genotyp. Homozygote Träger der Punktmutation in Codon 25 sind hingegen bei nur 3 Patienten (zwei Patienten mit Bronchialkarziomen und ein Patient mit einer Pleuraasbestose) vertreten.

4.3 Abschätzung des Risikos für Patienten mit Berufskrankheiten in Abhängigkeit von den Polymorphismen des TGF- β 1-Gens

Im Folgenden soll das mit dem Polymorphismus assoziierte Erkrankungsrisiko abgeschätzt werden. Aufgrund der geringen Fallzahlen von Patienten mit homozygot Prolin-codierenden Allelen (Pro10Pro; Pro25Pro) wurden sie mit den Patienten mit mindestens einem Prolin-codierenden Allel (Leu10Pro; Arg25Pro) für die Auswertung zusammengefasst. Die Risiko-Kalkulationen (Odds Ratio) wurden durchgeführt gegenüber den Wildtypen Leu10Leu bzw. Arg25Arg.

Die rohen Odds Ratios wurden mit Hilfe der Vierfeldertafel errechnet. Hierbei sollte geprüft werden, inwieweit das Risiko, an einer durch Gefahrstoffeinwirkung am Arbeitsplatz verursachten Veränderung der Lunge oder der Pleura zu erkranken, von den beschriebenen Polymorphismen in Codon 10 und Codon 25 des TGF- β 1-Gens abhängen. Hierbei wurden die Patienten mit den unterschiedlichen Erkrankungen und Schweregraden den gesunden Kontrollpersonen ohne jegliche Gefahrstoffeinwirkung am Arbeitsplatz gegenübergestellt. Im Bezug auf den Polymorphismus wurden alle Probanden mit mindestens einem mutierten Allel (Leu10Pro, Pro10Pro; Arg25Pro, Pro25Pro) den Probanden mit dem Genotyp Leu10Leu bzw. Arg25Arg gegenübergestellt.

Neben den rohen Odds Ratios wurde auch auf das Alter und das Rauchverhalten der Probanden adjustiert, um den potentiellen Einfluss dieser Parameter auf das Erkrankungsrisiko zu berücksichtigen.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind im Folgenden jeweils tabellarisch und graphisch dargestellt. Bei den Abbildungen werden die ermittelten Odds Ratios inklusive der 95%-Konfidenzintervalle für die untersuchten Erkrankungsgruppen dargestellt. Speziell für die Gruppe der Asbestosen erfolgte eine Unterteilung nach dem Röntgenbefund in Lungenasbestosen oder Pleuraasbestose unter besonderer Berücksichtigung des Schweregrades hinsichtlich der Ausprägung des Befundes.

4.3.1 Erkrankungsrisiko in Abhängigkeit vom Polymorphismus im Codon 10 des TGF- β 1-Gens

Die einzelnen Odds Ratios aller untersuchten Erkrankungsgruppen sind Tabelle 10 zu entnehmen. Für den Polymorphismus des Codon 10 lagen die ermittelten Odds Ratio (OR) zwischen den signifikanten Werten von OR=0,43 (95%-KI=0,19-0,99; p=0,047) bei asbestbedingten Bronchialkarzinomen (BK Nr. 4104) und OR=4,71 (95%-KI=1,01-21,90; p=0,049) bei hyaliner Pleuraasbestose des Verbreitungsgrades 1 (BK Nr. 4103).

Für Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen errechnete sich ein erhöhtes Risiko von OR=1,26 (95%-KI 0,78-2,02). In dieser Gruppe lag das höchste Risiko für idiopathische Lungenfibrose bei OR=2,04 (95%-KI KI=0,82-5,05), das niedrigste für die Silikose (BK Nr. 4101) bei OR= 1,06 (95%-KI KI=0,61-1,84). Für Patienten mit Asbestosen (BK Nr. 4103) errechnete sich eine OR=1,29 (95%-KI=0,79-2,11). Es fällt auf, dass sich die höchsten Risiken innerhalb der Gruppe der Asbestosen bei den Patienten mit hyalinen Pleuraplaques des Ausprägungsgrades 1 befinden OR=4,71 (95%KI=1,01-21,9), vgl. Abb. 14.

Im Gegensatz zu den fibrosierenden Lungenerkrankungen ist das Risiko für asbestinduzierte Bronchialkarzinome (BK Nr. 4104) bei Trägern des Prolin-codierenden Allels signifikant auf OR=0,43 (95%-KI=0,19-0,99; p=0,047) vermindert.

Bezüglich der Bronchialkarzinome, die nicht auf Asbestfaserstaub-Einwirkungen zurückgeführt werden können, ergab sich kein verändertes Risiko infolge des Polymorphismus im Codon 10 des TGF- β 1-Gens (OR=1,05; 95%-KI=0,59-1,88), vgl. Abb 13.

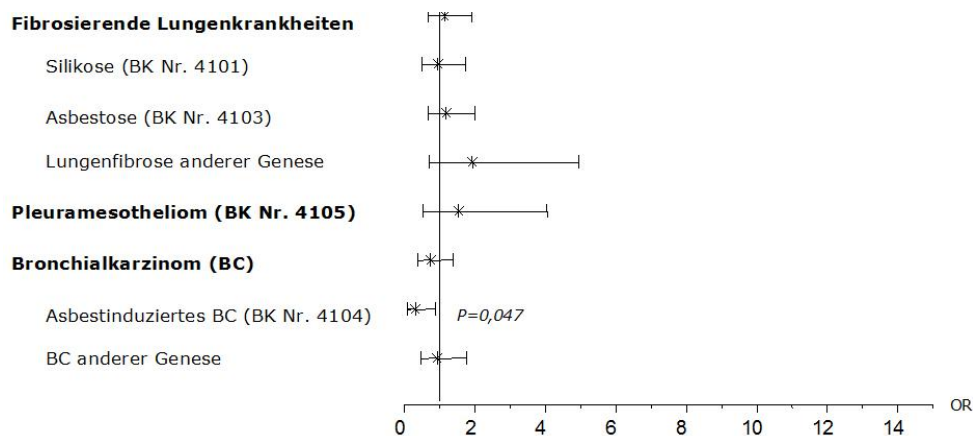


Abb. 13: Darstellung der Odds Ratios (*) incl. der 95%-Konfidenzintervalle für den Polymorphismus TGF- β 1 im Codon 10. Für signifikante Ergebnisse sind die P-Werte angegeben. Die Odds Ratio von 1 ist mit einer senkrechten Linie markiert.

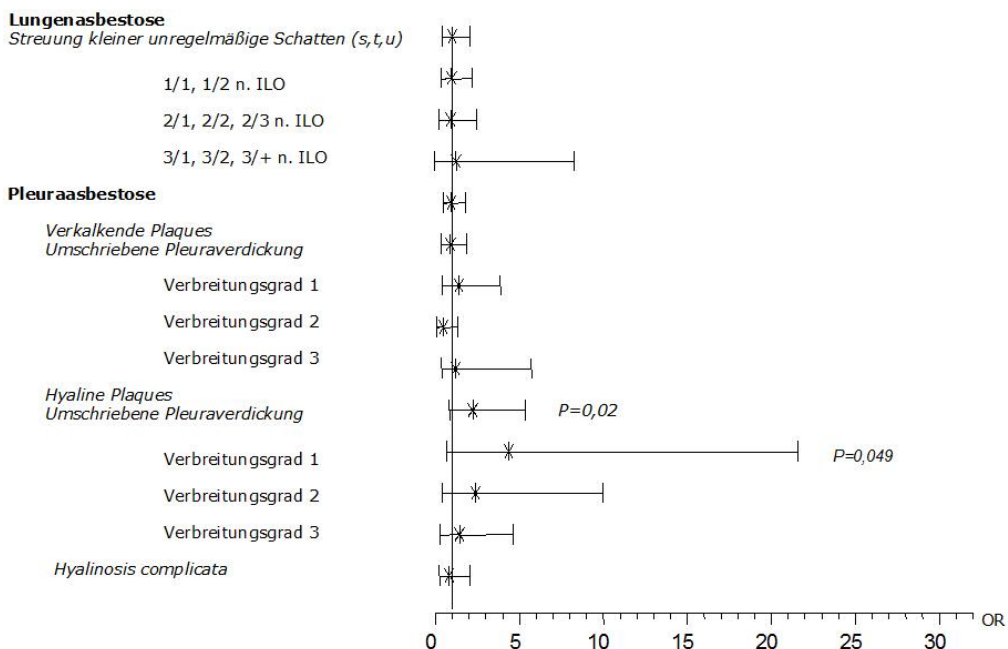


Abb. 14: Darstellung der Odds Ratios (*) incl. der 95%-Konfidenzintervalle für den Polymorphismus des TGF- β 1 im Codon 10. Für signifikante Ergebnisse sind die P-Werte angegeben. Die Odds Ratio von 1 ist mit einer senkrechten Linie markiert.

Tabelle 10: Risikoabschätzungen (Odds Ratios) der Patientenkollektive in Abhängigkeit von dem Polymorphismus TGF-β1 im Codon 10

	Genotypen		Univariate Analysis	
	Leu10Leu, n (%)	Leu10Pro/Pro10Pro, n (%)	OR	95% KI
Kontrollkollektiv	32 (38,5)	51 (61,4)	1	
Lungenfibrose	197 (33,3)	394 (66,7)	1,255	0,78 - 2,02
Silikose (BK 4101)	58 (37,2)	98 (62,8)	1,06	0,61 - 1,84
Asbestose (BK 4103)	131 (32,7)	270 (67,3)	1,293	0,79 - 2,11
Lungenasbestose (BK 4103)	38 (32,5)	81 (68,1)	1,337	0,74 - 2,40
kleine unregelmäßige Schatten				
1/1 und 1/2 ILO	23 (32,4)	48 (67,6)	1,309	0,67 - 2,55
2/1, 2/2 und 2/3 ILO	13 (33,3)	26 (66,7)	1,255	0,56 - 2,79
3/2, 3/3 und 3/+ ILO	2 (28,6)	5 (71,4)	1,569	0,29 - 8,57
Pleuraasbestose (BK 4103)	93 (32,9)	189 (67,1)	1,275	0,77 - 2,12
verkalkende Pleuraplaques	45 (34,6)	88 (65,4)	1,23	0,67 - 2,17
Verbreitungsgrad				
1	9 (26,5)	25 (73,5)	1,743	0,72 - 4,21
2	22 (43,1)	29 (56,9)	0,827	0,41 - 1,68
3	14 (29,2)	34 (70,8)	1,524	0,71 - 3,27
hyaline Pleuraplaques	11 (19,6)	45 (80,4)	2,57	1,16 - 5,67
Verbreitungsgrad				
1	2 (11,8)	15 (88,2)	4,706	1,01 - 21,90
2	3 (18,7)	13 (81,3)	2,719	0,72 - 10,29
3	6 (26,1)	17 (73,9)	1,778	0,63 - 4,98
Hyalinosis complicata	19 (35,2)	35 (64,8)	1,156	0,57 - 2,36
Lungenfibrose anderer Genese	8 (23,5)	26 (76,5)	2,039	0,82 - 5,05
Pleuraesotheliom (BK 4105)	8 (27,6)	21 (72,4)	1,647	0,65 - 4,16
Bronchialkarzinom	62 (42,2)	85 (57,8)	0,86	0,50 - 1,49
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)	19 (59,4)	13 (40,6)	0,429	0,19 - 0,99
Bronchialkarzinom anderer Genese	43 (37,4)	72 (62,6)	1,05	0,59 - 1,88

Mit zunehmendem Alter verkalken die Pleuraplaques. Das Risiko an einem Bronchialkarzinom zu erkranken, nimmt mit dem Rauchkonsum zu.

Um einen Einfluss des Alters und des Rauchverhaltens auf das Risiko für ein Entstehen der einzelnen Erkrankungen zu prüfen, wurden ergänzend die Risikoabschätzungen (Odds Ratios) auf das Alter und das Rauchverhalten in Packungsjahren adjustiert.

Dies hatte auf die Ergebnisse für die einzelnen Diagnosegruppen einen modifizierenden Einfluss.

Die auf das Alter und das Rauchverhalten adjustierten Risikoabschätzungen sind in Tabelle 11 dargestellt. Nach Adjustierung lag die OR bei $OR=2,53$ ($95\%-KI=0,97-6,59$) für Patienten mit einer hyalinen und bei $OR=0,66$ ($95\%-KI=0,29-1,50$) für Patienten mit verkalkenden Pleuraplaques (Verbreitungsgrad 2), vgl. Abb. 16.

Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen hatten eine nach Alter und Rauchverhalten adjustierte OR von $1,30$ ($95\%-KI=0,73-2,32$). Auch hinsichtlich des Ausprägungsgrades in den Untergruppen aller fibrosierender Lungenerkrankungen führte die Adjustierung zu keiner wesentlichen Veränderung.

Für das asbestinduzierte Bronchialkarzinom errechnete sich eine nach Alter und Rauchverhalten adjustierte OR von $OR=0,72$ ($95\%-KI=0,19-2,79$), welche sich von der nicht adjustierten OR nicht wesentlich unterschied. Für die Gesamtheit der Patienten mit Bronchialkarzinomen ergibt sich eine Odds Ratio von $OR=0,81$ ($95\%-KI=0,38-1,73$).

Das Risiko, an einem Pleuramesotheliom zu erkranken, lag nach der Adjustierung bei $OR=1,23$ ($95\%-KI=0,42-3,56$) im Vergleich zur rohen $OR=1,65$ ($95\%-KI=0,65 - 4,16$) und unterschied sich somit nicht wesentlich, vgl. Abb. 15.

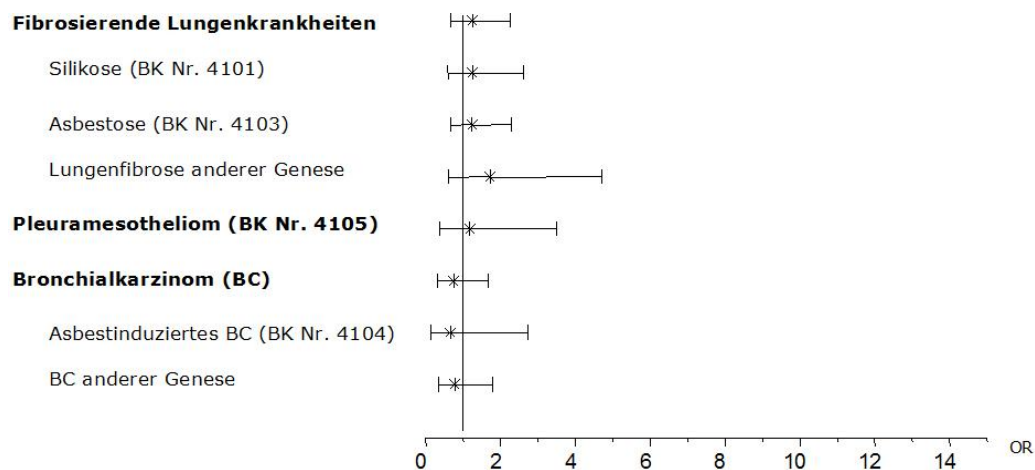


Abb. 15: Darstellung der *adjustierten* Odds Ratios (*) incl. der 95%-Konfidenzintervalle für den Polymorphismus TGF- β 1 im Codon 10. Die Odds Ratio von 1 ist mit einer senkrechten Linie markiert.

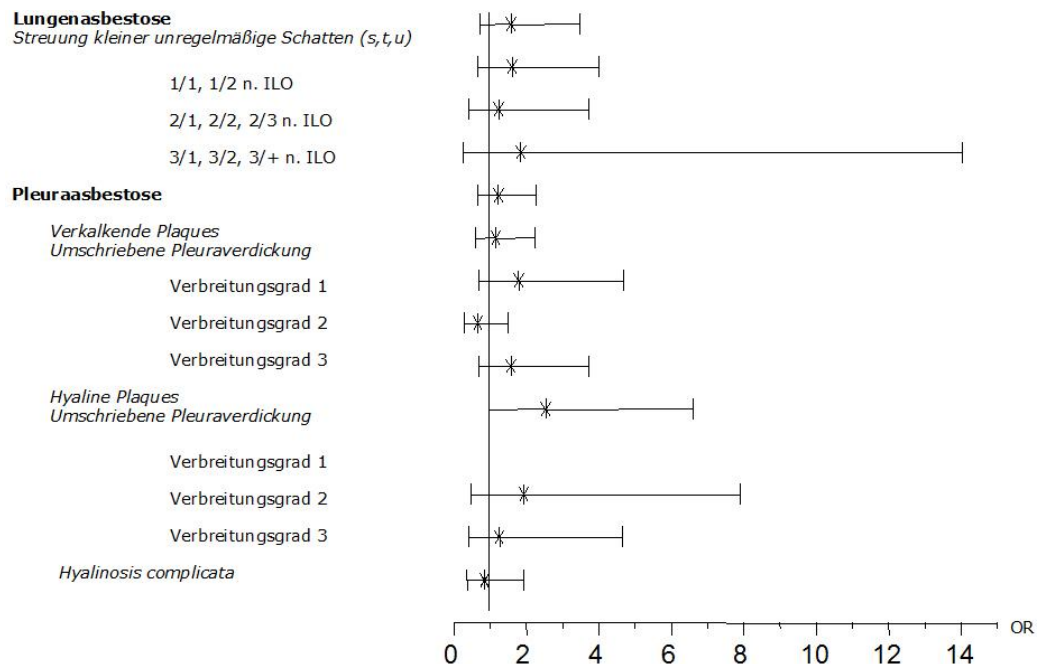


Abb. 16: Darstellung der *adjustierten* Odds Ratios (*) incl. der 95%-Konfidenzintervalle für den Polymorphismus TGF- β 1 im Codon 10. Die Odds Ratio von 1 ist mit einer senkrechten Linie markiert.

Tabelle 11: Auf Alter und Rauchverhalten adjustierte Risikoabschätzungen (Odds Ratios) der Patientenkollektive in Abhängigkeit von dem Polymorphismus TGF-β1 im Codon 10

	Genotypen		Multivariate Analysis		
	Leu10Leu, n (%)	Leu10Pro/Pro10Pro, n (%)	OR	95% KI	p-Wert
Kontrollkollektiv	32 (38,5)	51 (61,4)	1		
Lungenfibrose	197 (33,3)	394 (66,7)	1,30	0,73 - 2,32	0,378
Silikose (BK 4101)	58 (37,2)	98 (62,8)	1,31	0,65 - 2,67	0,454
Asbestose (BK 4103)	131 (32,7)	270 (67,3)	1,29	0,71 - 2,35	0,409
Lungenasbestose (BK 4103)	38 (32,5)	81 (68,1)	1,57	0,71 - 3,46	0,263
kleine unregelmäßige Schatten					
1/1 und 1/2 ILO	23 (32,4)	48 (67,6)	1,60	0,64 - 4,00	0,315
2/1, 2/2 und 2/3 ILO	13 (33,3)	26 (66,7)	1,23	0,41 - 3,72	0,708
3/2, 3/3 und 3/+ ILO	2 (28,6)	5 (71,4)	1,84	0,24 - 14,04	0,559
Pleuraasbestose (BK 4103)	93 (32,9)	189 (67,1)	1,22	0,66 - 2,26	0,519
verkalkende Pleuraplaques	45 (34,6)	88 (65,4)	1,15	0,59 - 2,22	0,688
Verbreitungsgrad					
1	9 (26,5)	25 (73,5)	1,78	0,67 - 4,68	0,246
2	22 (43,1)	29 (56,9)	0,66	0,29 - 1,50	0,323
3	14 (29,2)	34 (70,8)	1,57	0,67 - 3,72	0,302
hyaline Pleuraplaques	11 (19,6)	45 (80,4)	2,53	0,97 - 6,59	0,058
Verbreitungsgrad					
1	2 (11,8)	15 (88,2)	x	x	x
2	3 (18,7)	13 (81,3)	1,92	0,47 - 7,89	0,367
3	6 (26,1)	17 (73,9)	1,25	0,39 - 4,65	0,636
19 (35,2)		35 (64,8)	0,84	0,36 - 1,92	0,673
Hyalinosis complicata					
8 (23,5)		26 (76,5)	1,78	0,66 - 4,77	0,251
Lungenfibrose anderer Genese					
Pleura mesotheliom (BK 4105)	8 (27,6)	21 (72,4)	1,23	0,42 - 3,56	0,708
Bronchialkarzinom	62 (42,2)	85 (57,8)	0,81	0,38 - 1,73	0,591
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)	19 (59,4)	13 (40,6)	0,72	0,19 - 2,79	0,635
Bronchialkarzinom anderer Genese	43 (37,4)	72 (62,6)	0,84	0,39 - 1,85	0,673

4.3.1.1 Vergleich der Risiken von (Asbestfaserstaub-verursachten) Lungenfibrosen mit denen eines (Asbestfaserstaub-verursachten) Bronchialkarzinoms

Die Auswertungen zeigten, dass sich die Risiken für eine Erkrankung an Lungenfibrosen und Lungenkrebs gegenläufig verhalten.

Zusätzlich zur Berechnung des Erkrankungsrisikos im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe sollten daher die Odds Ratios für Lungenfibrosen in direktem Vergleich zu den Bronchialkarzinomen bestimmt werden.

Bei Gegenüberstellung aller Lungenfibrosen und Bronchialkarzinome unabhängig von der zugrunde liegenden Ursache ergab sich für Lungenfibrosen eine OR=1,46 (95%-KI=1,01-2,11, p=0,045), für Bronchialkarzinome eine OR=0,66 (95%-KI=0,47-0,99, p=0,045). Für den Anteil der Asbestosen lag die OR bei OR=3,012 (95%-KI=1,44-6,289, p=0,003), für den der asbestverursachten Bronchialkarzinome bei OR=0,33 (95%-KI=0,16-0,69, p=0,003). Bei Probanden, deren Erkrankung nicht auf eine Asbesteinwirkung zurückgeführt wurde, errechnete sich hingegen kein signifikantes Ergebnis.

Die Ergebnisse der OR-Analysen vor und nach Adjustierung auf das Alter und das Rauchverhalten der Probanden sind Tabelle 12 zu entnehmen.

Nach Adjustierung auf Alter und Rauchverhalten bestätigten sich die Ergebnisse. Das Risiko für die Patienten mit Lungenfibrosen gegenüber denen mit Bronchialkarzinomen war signifikant erhöht (OR=1,76; 95%-KI=1,14-2,72, p=0,011).

Tabelle 12: Risikoabschätzungen (Odds Ratios) der Patienten mit Lungenfibrosen gegenüber Patienten mit Bronchialkarzinom in Abhängigkeit von dem Polymorphismus TGF-β1 im Codon 10

	Genotypen		Rohe Odds Ratio			Adjustierte Odds Ratio		
	Leu10Leu, n (%)	Leu10Pro/Pro10Pro, n (%)	OR	95% KI	p-Wert	OR	95% KI	p-Wert
Lungenfibrose gegenüber Bronchialkarzinom	197 (33,3)	394 (66,7)						
	62 (42,2)	85 (57,8)	1,46	1,01 - 2,11	0,045	1,76	1,14 - 2,72	0,011
Bronchialkarzinom gegenüber Lungenfibrose	62 (42,2)	85 (57,8)						
	197 (33,3)	394 (66,7)	0,66	0,47-0,99	0,045	0,56	0,36-0,87	0,009
Asbestose (BK 4103) gegenüber Asbestinduziertem Bronchialkarzinom (BK 4104)	131 (32,7)	270 (67,3)						
	19 (59,4)	13 (40,6)	3,01	1,44 - 6,29	0,003	3,72	1,56 - 8,85	0,003
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104) gegenüber Asbestose (BK 4103)	19 (59,4)	13 (40,6)						
	131 (32,7)	270 (67,3)	0,33	0,16-0,69	0,003	0,27	0,11-0,66	0,004
Lungenfibrose anderer Genese gegenüber Bronchialkarzinom anderer Genese	8 (23,5)	26 (76,5)						
	43 (37,4)	72 (62,6)	1,94	0,81 - 4,67	0,139	2,09	0,81 - 5,38	0,125

4.3.2 Erkrankungsrisiko in Abhängigkeit vom Polymorphismus im Codon 25 des TGF- β 1-Gens

Die Erkrankungsrisiken in Abhängigkeit vom Polymorphismus im Codon 25 des TGF- β 1-Gens sind Tabelle 13 zu entnehmen.

Die Odds Ratio der Bronchialkarzinome wird auf unter 1 berechnet. Anders als beim Codon 10 ergab sich im Codon 25 auch für das Pleuramesotheliom ein tendenziell vermindertes Risiko mit $OR=0,65$ (95%-KI=0,27 - 1,57).

Für den Polymorphismus des Codon 25 errechneten sich Odds Ratios zwischen $OR=0,24$ (95%-KI=0,03-1,92) bei Patienten mit asbestbedingten Bronchialkarzinomen (BK Nr. 4104) und $OR=3,04$ (95%-KI=0,89-10,46) bei Patienten mit hyalinen Pleuraplaques der Nr. 4103 BKV (Verbreitungsgrad 1).

Das Risiko in Abhängigkeit des Polymorphismus mit Nachweis mindestens eines Prolin-codierenden Allels ergab für die Gesamtheit der Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen ein nicht signifikant erhöhtes Risiko von $OR=1,38$ (95%-KI=0,69-2,77). In dieser Gruppe ergab sich das höchste Risiko vergleichbar mit Codon 10 für Patienten mit einer idiopathischen Lungenfibrose ($OR=1,56$; 95%-KI=0,52-4,71) und das niedrigste für Patienten mit einer Silikose (BK Nr. 4101) mit $OR=1,33$ (95%-KI=0,60-2,93). Patienten mit einer Asbestose (BK Nr. 4103) und mindestens einem Prolin-codierenden Allel wiesen ein Risiko von $OR=1,39$ (95%-KI=0,79-2,11) auf. Die höchsten OR wurden bei Patienten mit hyalinen $OR=3,04$ (95%KI=0,89-10,46) und verkalkenden $OR=2,25$ (95%KI=0,80-6,30) Pleuraplaques ermittelt, vgl. Abb. 18.

Für Träger des Prolin-codierenden Allels im Codon 25 ist im Vergleich zu dem Arg25Arg-Genotyp das Risiko sowohl für asbestinduzierte Bronchialkarzinome (BK 4104) auf $OR=0,24$ (95%-KI=0,03-1,92) als auch für Bronchialkarzinome anderer Genese auf $OR=0,77$ (95%-KI=0,31-1,91) vermindert.

Das Risiko für eine Pleuramesotheliom-Erkrankung errechnet sich zu einer $OR=0,54$ (95%-KI=0,11-2,63). Der tendenzielle Einfluss des Prolin-codierenden Allels im Codon 25 ist für diese Erkrankung somit gegensätzlich zu dem für Codon 10, vgl. Abb. 17.

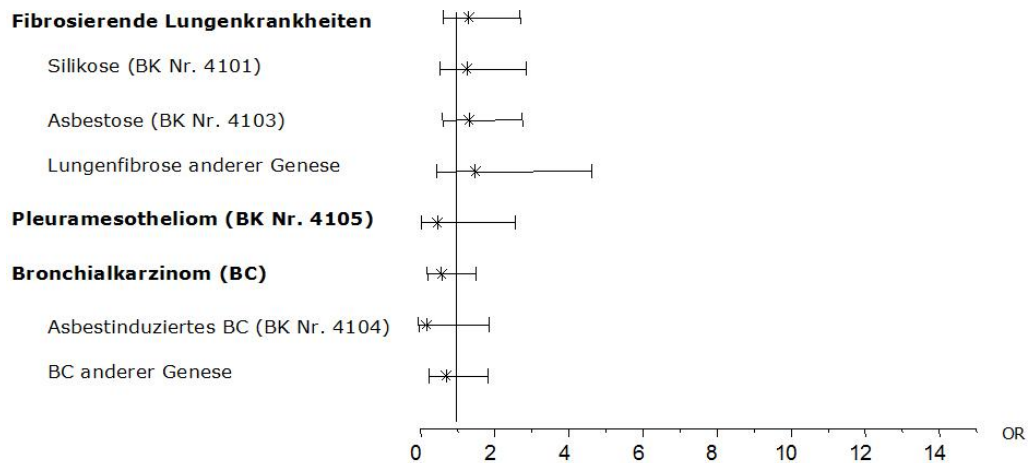


Abb. 17: Darstellung der Odds Ratios (*) incl. der 95%-Konfidenzintervalle für den Polymorphismus des TGF- β 1 im Codon 25. Die Odds Ratio von 1 ist mit einer senkrechten Linie markiert.

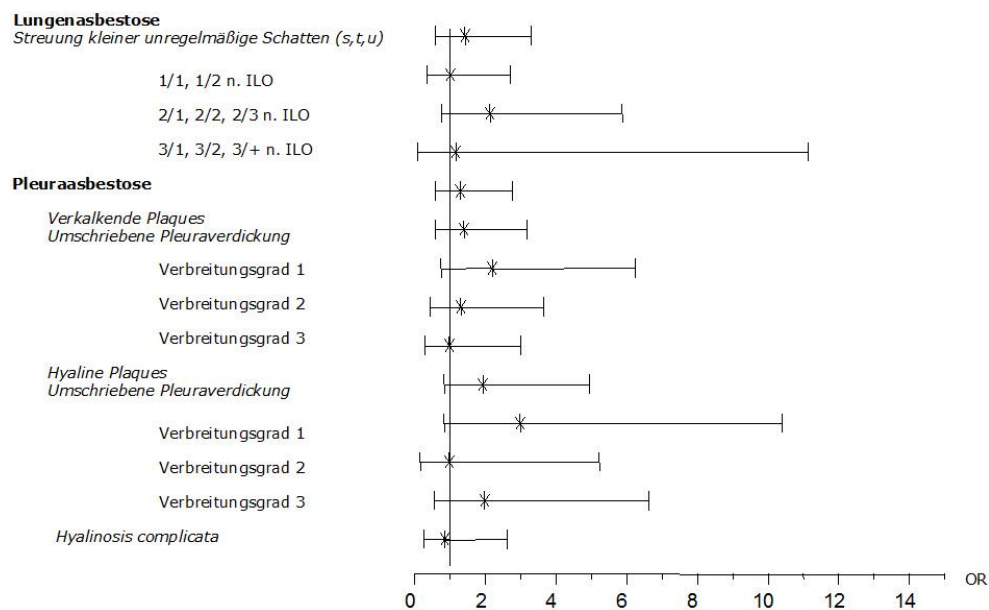


Abb. 18: Darstellung der Odds Ratios (*) incl. der 95%-Konfidenzintervalle für den Polymorphismus des TGF- β 1 im Codon 25. Für signifikante Ergebnisse sind die P-Werte angegeben. Die Odds Ratio von 1 ist mit einer senkrechten Linie markiert.

Tabelle 13: Risikoabschätzungen (Odds Ratios) der Patientenkollektive in Abhängigkeit von dem Polymorphismus TGF-β1 im Codon 25

	Genotypen		Univariate Analysis		
	Arg25Arg, n (%)	Arg25Pro/Pro25Pro, n (%)	OR	95% KI	p-Wert
Kontrollkollektiv	73 (87,9)	10 (12,1)	1		
Lungenfibrose	497 (84,1)	94 (15,9)	1,38	0,69 - 2,77	0,364
Silikose (BK 4101)	132 (84,6)	24 (15,4)	1,33	0,60 - 2,93	0,483
Asbestose (BK 4103)	337 (84,0)	64 (16)	1,39	0,68 - 2,83	0,386
<i>Lungenasbestose (BK 4103)</i>	99 (83,2)	20 (16,8)	1,48	0,65 - 3,34	0,351
kleine unregelmäßige Schatten					
1/1 und 1/2 ILO	62 (87,3)	9 (12,7)	1,06	0,41 - 2,77	0,906
2/1, 2/2 und 2/3 ILO	30 (76,9)	9 (23,1)	2,19	0,81 - 5,93	0,123
3/2, 3/3 und 3/+ ILO	6 (85,7)	1 (14,3)	1,22	0,13 - 11,18	0,862
<i>Pleuraasbestose (BK 4103)</i>	238 (84,4)	44 (15,6)	1,35	0,65 - 2,82	0,424
verkalkende Pleuraplaques	111 (83,5)	22 (16,5)	1,45	0,65 - 3,23	0,368
Verbreitungsgrad					
1	26 (76,5)	8 (23,5)	2,25	0,80 - 6,30	0,124
2	43 (84,3)	8 (15,7)	1,36	0,50 - 3,70	0,550
3	42 (87,5)	6 (12,5)	1,04	0,35 - 3,07	0,939
hyaline Pleuraplaques	92 (83,6)	18 (16,4)	1,99	0,79 - 4,99	0,142
Verbreitungsgrad					
1	12 (70,6)	5 (29,4)	3,04	0,89 - 10,46	0,077
2	14 (87,5)	2 (12,5)	1,04	0,21 - 5,28	0,960
3	18 (78,3)	5 (21,7)	2,03	0,62 - 6,67	0,245
Hyalinosis complicata	48 (88,9)	6 (11,1)	0,91	0,31 - 2,68	0,867
Lungenfibrose anderer Genese	28 (82,4)	6 (17,6)	1,56	0,52 - 4,71	0,426
Pleuraesotheliom (BK 4105)	27 (93,1)	2 (6,9)	0,54	0,11 - 2,63	0,446
Bronchialkarzinom	135 (91,8)	12 (8,2)	0,65	0,27 - 1,57	0,339
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)	31 (96,9)	1 (3,1)	0,24	0,03 - 1,92	0,177
Bronchialkarzinom anderer Genese	104 (90,4)	11 (9,6)	0,77	0,31 - 1,91	0,576

Mit zunehmendem Alter verkalken die Pleuraplaques. Das Risiko an einem Bronchialkarzinom zu erkranken nimmt mit dem Rauchkonsum zu.

Um einen Einfluss des Alters und des Rauchverhaltens auf das Risiko für ein Entstehen der einzelnen Erkrankungen zu prüfen, wurden ergänzend die Risikoabschätzungen (Odds Ratios) auf das Alter und das Rauchverhalten in Packungsjahren adjustiert. Die Ergebnisse sind Tabelle 14 zu entnehmen.

Für Patienten mit hyalinen Pleuraplaques (Verbreitungsgrad 1) ergab sich unter der Voraussetzung des Arg25Pro-/Pro25Pro-Genotyps ein signifikant erhöhtes Risiko von $OR=5,16$ ($p=0,023$; 95%-KI=1,26-21,2), vgl. Abb. 20. Die niedrigste OR wurde bei Träger des Prolin-codierenden Allels für asbestinduzierte Bronchialkarzinome ($OR=0,31$; 95%-KI=0,02-5,77) errechnet. Die OR für Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen beträgt $OR=1,65$ (95%-KI=0,68-4,03). Die OR bei Patienten mit einer Silikose (Nr. 4101 BKV) lag bei $OR=1,93$ (95%-KI=0,69-5,43) und für Patienten mit einer Asbestose bei $OR=1,65$ (95%-KI=0,66-4,08).

Die Kalkulation der Odds Ratio für Patienten mit Bronchialkarzinomen ergab unverändert Risiken unter 1 ($OR=0,69$; 95%-KI=0,19-2,45).

Das adjustierte Risiko für Pleuramesotheliom-Erkrankungen lag bei $OR=0,43$ (95%-KI=0,05-3,83) im Vergleich zur rohen $OR=0,54$ (95%-KI=0,11-2,63).

Damit ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede, vgl. Abb. 19.

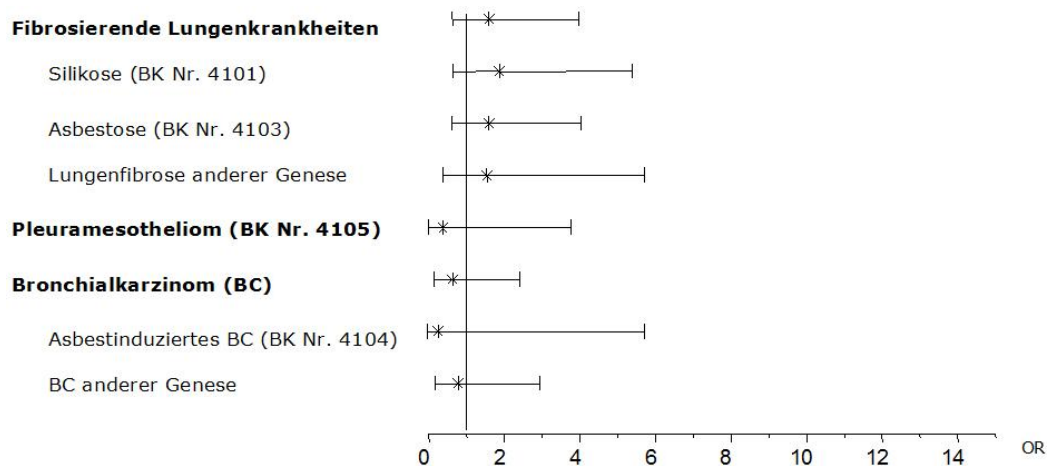


Abb. 19: Darstellung der *adjustierten* Odds Ratios (*) incl. der 95%-Konfidenzintervalle für den Polymorphismus TGF- β 1 im Codon 25. Die Odds Ratio von 1 ist mit einer senkrechten Linie markiert.

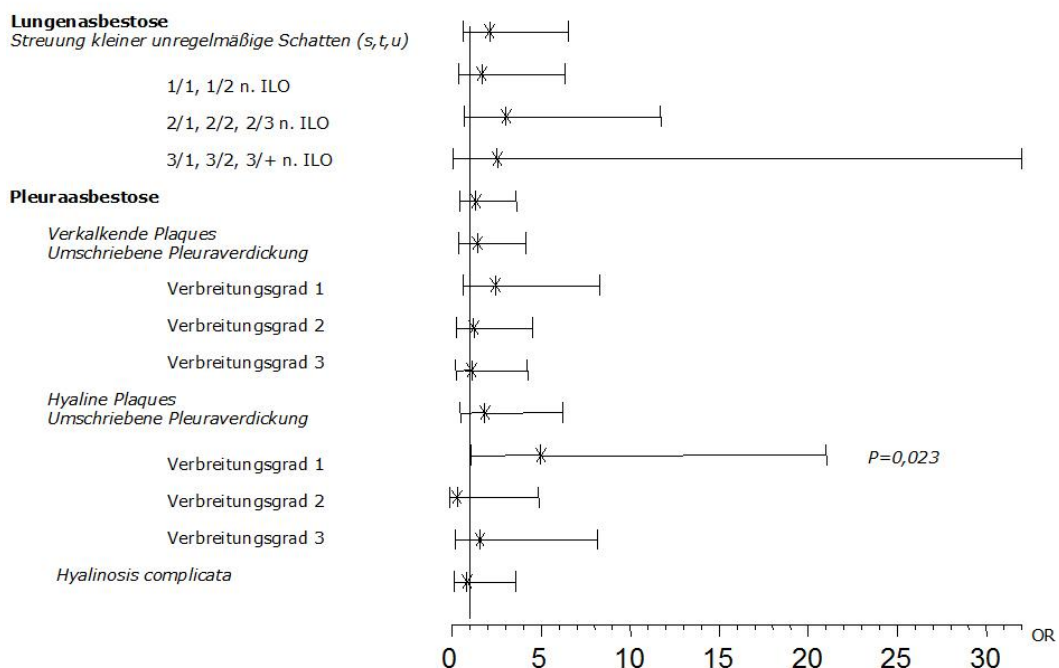


Abb. 20: Darstellung der *adjustierten* Odds Ratios (*) incl. der 95%-Konfidenzintervalle für den Polymorphismus TGF- β 1 im Codon 25. Die Odds Ratio von 1 ist mit einer senkrechten Linie markiert.

Tabelle 14: Auf Alter und Rauchverhalten adjustierte Risikoabschätzungen (Odds Ratios) der Patientenkollektive in Abhängigkeit von dem Polymorphismus TGF-β1 im Codon 25

	Genotypen		Multivariate Analysis		
	Arg25Arg, n (%)	Arg25Pro/Pro25Pro, n (%)	OR	95% KI	p-Wert
Kontrollkollektiv	73 (87,9)	10 (12,1)	1		
Lungenfibrose	497 (84,1)	94 (15,9)	1,65	0,68 - 4,03	0,268
Silikose (BK 4101)	132 (84,6)	24 (15,4)	1,93	0,69 - 5,43	0,211
Asbestose (BK 4103)	337 (84,0)	64 (16)	1,65	0,66 - 4,08	0,282
<i>Lungenasbestose (BK 4103)</i>	99 (83,2)	20 (16,8)	2,29	0,78 - 6,73	0,131
kleine unregelmäßige Schatten					
1/1 und 1/2 ILO	62 (87,3)	9 (12,7)	1,86	0,53 - 6,55	0,335
2/1, 2/2 und 2/3 ILO	30 (76,9)	9 (23,1)	3,20	0,86 - 11,9	0,083
3/2, 3/3 und 3/+ ILO	6 (85,7)	1 (14,3)	2,72	0,23 - 32,2	0,427
<i>Pleuraasbestose (BK 4103)</i>	238 (84,4)	44 (15,6)	1,50	0,59 - 3,79	0,392
verkalkende Pleuraplaques	111 (83,5)	22 (16,5)	1,62	0,61 - 4,31	0,335
Verbreitungsgrad					
1	26 (76,5)	8 (23,5)	2,63	0,82 - 8,46	0,105
2	43 (84,3)	8 (15,7)	1,40	0,42 - 4,69	0,588
3	42 (87,5)	6 (12,5)	1,30	0,39 - 4,42	0,664
hyaline Pleuraplaques	92 (83,6)	18 (16,4)	2,02	0,64 - 6,40	0,23
Verbreitungsgrad					
1	12 (70,6)	5 (29,4)	5,16	1,26 - 21,2	0,023
2	14 (87,5)	2 (12,5)	0,47	0,043 - 5,05	0,53
3	18 (78,3)	5 (21,7)	1,75	0,37 - 8,34	0,485
Hyalinosis complicata	48 (88,9)	6 (11,1)	1,01	0,27 - 3,77	0,991
Lungenfibrose anderer Genese	28 (82,4)	6 (17,6)	1,59	0,44 - 5,76	0,477
Pleuromesotheliom (BK 4105)	27 (93,1)	2 (6,9)	0,43	0,05 - 3,83	0,449
Bronchialkarzinom	135 (91,8)	12 (8,2)	0,69	0,19 - 2,45	0,564
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)	31 (96,9)	1 (3,1)	0,31	0,02 - 5,77	0,434
Bronchialkarzinom anderer Genese	104 (90,4)	11 (9,6)	0,83	0,23 - 2,99	0,778

4.3.2.1 Vergleich der Risiken von (Asbestfaserstaub-verursachten) Lungenfibrosen mit denen eines (Asbestfaserstaub-verursachten) Bronchialkarzinoms

Wie bei Codon 10 waren auch in Abhängigkeit des Codon 25 die Erkrankungsrisiken für Lungenfibrosen gegenläufig zu denen für Bronchialkarzinome. Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurden neben dem Vergleich von Patienten und Kontrollpersonen die Lungenfibrosen den Bronchialkarzinomen direkt gegenübergestellt und das Erkrankungsrisiko evaluiert. Die Ergebnisse der OR-Analysen vor und nach Adjustierung auf Alter und Rauchverhalten sind Tabelle 15 zu entnehmen.

Für Patienten des Genotyps Arg25Pro und Pro25Pro zeigte sich dabei ein signifikant erhöhtes Risiko für die Erkrankung an Lungenfibrosen mit $OR=2,13$ ($p=0,019$; 95%-KI=1,13 - 3,40) gegenüber der Erkrankung an Bronchialkarzinomen $OR=0,47$ (95%-KI=0,25-0,88, $p=0,019$).

Dieser Zusammenhang stellt sich tendenziell ebenfalls für die asbestbedingten Lungenfibrosen und Bronchialkarzinome dar. Im Codon 25 konnten diesbezüglich jedoch keine signifikanten Ergebnisse ermittelt werden.

Das Risiko für eine nachweislich durch Asbest verursachte Lungenfibrose lag bei $OR=5,887$ (95%-KI=0,79-43,90), für asbestinduzierte Bronchialkarzinome bei $OR=0,17$ (95%-KI=0,23-1,27, $p=0,084$).

Tabelle 15: Risikoabschätzungen (Odds Ratios) der Patienten mit Lungenfibrose gegenüber Patienten mit Bronchialkarzinom in Abhängigkeit von dem Polymorphismus TGF-β1 im Codon 25

	Genotypen		Rohe Odds Ratio			Adjustierte Odds Ratio		
	Arg25Arg, n (%)	Arg25Pro/Pro25Pro, n (%)	OR	95% KI	p-Wert	OR	95% KI	p-Wert
Lungenfibrose gegenüber Bronchialkarzinom	497 (84,1)	94 (15,9)						
	135 (91,8)	12 (8,2)	2,13	1,13 - 3,40	0,019	2,27	1,14 - 4,52	0,02
Bronchialkarzinom gegenüber Lungenfibrose	135 (91,8)	12 (8,2)						
	497 (84,1)	94 (15,9)	0,47	0,25-0,88	0,019	0,47	0,24-0,94	0,032
Asbestose (BK 4103) gegenüber Asbestinduziertem Bronchialkarzinom (BK 4104)	337 (84,0)	64 (16)						
	31 (96,9)	1 (3,1)	5,88	0,79 - 43,90	0,084	5,114	0,66 - 39,42	0,117
Asbestinduziertem Bronchialkarzinom (BK 4104) gegenüber Asbestose (BK 4103)	31 (96,9)	1 (3,1)						
	337 (84,0)	64 (16)	0,17	0,23-1,27	0,084	0,225	0,29-1,72	0,151
Lungenfibrose anderer Genese gegenüber Bronchialkarzinom anderer Genese	28 (82,4)	6 (17,6)						
	104 (90,4)	11 (9,6)	2,03	0,69 - 5,96	0,2	2,665	0,78 - 9,14	0,119

5 Diskussion

Durch Asbestfaserstaub verursachte Lungen- und Pleuraerkrankungen stellen nach wie vor häufig anerkannte Berufskrankheiten dar. Trotz des generellen Asbestverbotes im Jahre 1993 ist wegen der Latenzzeit ein weiterer Anstieg der Asbestfaserstaub-verursachten Berufskrankheiten in den nächsten 10 bis 20 Jahren zu erwarten.

Diese Tatsache stellt weiter wachsende Anforderungen an präventive Maßnahmen für Personen, die zum Beispiel am Arbeitsplatz solchen kanzerogenen Stoffen wie Asbestfasern ausgesetzt sind. Zur Vermeidung gefahrstoffbedingter Berufskrankheiten kommt der Primärprävention, dem Schutz vor direkter Exposition gegenüber definierten Kanzerogenen, die größte Bedeutung zu. Im Fall der Asbestexposition ist der Großteil der Exposition jedoch bereits erfolgt. Die gesundheitlichen Folgen dieser Exposition stellen aufgrund einer etwa 30-jährigen Latenz zwischen Exposition und den Krankheitsbildern einer Asbestose, eines Bronchialkarzinoms oder eines Pleuramesothelioms eine aktuelle und zukünftige arbeitsmedizinische und sozialmedizinische Problematik dar.

Der Sekundärprävention kommt an dieser Stelle eine große Bedeutung zu. Voraussetzungen für effektive Screening- Untersuchungen bei durch Exposition gegenüber humankanzerogenen Stoffen gefährdeten Personengruppen sind:

- die Eingrenzung von Hochrisikogruppen
- ein diagnostizierbares präklinisches Stadium der (Tumor)-Erkrankungen
- eine valide Methode zur Früherkennung der effektiven Therapie zugänglicher Tumorstadien
- ein akzeptables Kosten-Nutzen-Verhältnis

Die genetische Prädisposition kann in Zukunft ein wichtiger Marker zur Eingrenzung von Risikogruppen sein. Mithilfe moderner Untersuchungsmethoden zur Identifikation von einzelnen Genen und

Gensequenzen kann deren Einfluss auf die Suszeptibilität unterschiedlicher Erkrankungen dargestellt werden.

In der vorliegenden Studie wurden unter Verwendung der real-time PCR-Methode Polymorphismen im Codon 10 und 25 des TGF- β 1 Gens untersucht. TGF- β spielt in der Pathophysiologie fibrosierender und maligner Lungenerkrankungen eine zentrale Rolle. Es sollte in dieser Studie untersucht werden, inwiefern Punktmutationen im Gen dieses Zytokins mit einer Risikomodifikation Asbest-induzierter Lungenerkrankungen einhergehen.

5.1 Allelfrequenzen des TGF- β im internationalen Vergleich

Aus der Genotypverteilung internationaler Studien wurden die Allelfrequenzen für Leucin und Prolin im Codon 10 sowie Arginin und Prolin im Codon 25 berechnet und in Tabelle 16 aufgelistet.

Besonders im Codon 25 liegt in der kaukasischen Bevölkerung eine sehr geringe Allelfrequenz von durchschnittlich 7,5% (Spannweite 4,6% - 10%) für das Prolin-codierende Allel vor. In der vorliegenden Studie beträgt die Frequenz des Prolin-codierenden Allels im Codon 25 6% und liegt somit nahe dem kaukasischen Durchschnitt. In der arabischen Bevölkerung ist das Prolin-codierende Allel im Codon 25 mit durchschnittlich 4,5% (Spannweite 2,1% - 6,9%) etwas geringer frequentiert. In Asien konnte der Polymorphismus Arg25Pro bisher nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 16).

Im Codon 10 liegt die durchschnittliche Häufigkeit des Prolin-codierenden Allels für Kaukasier bei 37,7% (Spannweite 33% - 41,8%). Die vorliegende Studie befindet sich mit einer Allelfrequenz von 39,7% innerhalb dieses Bereiches. Für die arabische Bevölkerung liegt nur ein Einzelwert von 55,4% vor. Auch für die asiatische Bevölkerung liegt nur eine einzelne Frequenz für das Prolin-codierende Allel im Codon 10 von 48,6% vor (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Allelfrequenzen der Polymorphismen im Codon 10 und 25 des TGF- β 1 Gens in Abhängigkeit von der ethnischen Herkunft

Autor (Jahr)	Ethnische Herkunft	Kontroll-kollektiv (n)	Allelfrequenzen (%)			
			Codon 10		Codon 25	
			Leu	Pro	Arg	Pro
Kaukasier						
Cambien (1996)	Nordirland, Frankreich	629	59,4	40,6	93,2	6,8
Awad (1998)	UK	107	65	35	90	10
El-Gamel (1999)	UK	96	67	33	90,5	9,5
Baan (2000)	Niederlande	94	62	38	92	8
Gewaltig (2002)	Deutschland	97	64,4	35,6	94,3	5,7
Xaubet (2003)	Spanien	140	58,2	41,8	95,4	4,6
Riha (2004)	Australien	280	-	-	93	7
Patel (2005)	UK	410	62,9	37,1	-	-
Patel (2005)	UK	313	-	-	93,6	6,4
Wang (2005)	Deutschland	50	65	35	92	8
Baştürk (2005)	Türkei	50	59	41	90	10
Vorliegende Studie	Deutschland	83	60,3	39,7	94	6
Araber						
Frossard (2000)	Vereinigte Arabische Emirate	142	-	-	97,9	2,1
Frossard (2001)	Vereinigte Arabische Emirate	72	-	-	93,1	6,9
Omrani (2009)	Iran	101	44,6	55,4	-	-
Asiaten						
Powell (2000)	Japan	110	-	-	100	0
Ohtsuka (2002)	Japan	47	-	-	100	0
Wang (2005)	China	104	51,4	48,6	100	0

5.2 Funktionelle Auswirkungen des TGF- β

In vielen Studien wird über TGF- β „*High-Producer*“ und „*Low-Producer*“ berichtet. Diese Begriffe beschreiben den Zusammenhang zwischen Genotyp und quantitativer TGF- β 1 Protein-Produktion.

Im peripheren Blut 36 gesunder Probanden konnte mittels ELISA eine signifikant gesteigerte Protein-Produktion von TGF- β 1 (Median: 10,037 +/- 0,745ng/ml, $p < 0,02$) bei dem homozygoten Genotyp Arg25Arg festgestellt werden. Der Genotyp Arg25Pro hingegen wird als „*Low-Producer*“ (Median: 6,729 +/- 0,883ng/ml) bezeichnet (Awad et al., 1998).

Bei Patienten mit Leberfibrose konnten mittels Sandwich-ELISA in thrombozytenfreiem Blutplasma höhere TGF- β 1 Protein-Konzentrationen gemessen werden, wenn es sich um homozygote Träger des Arginin-codierenden Allels handelte (Median der TGF- β 1-Konzentration: 21,3 μ g/l), im Vergleich zu heterozygoten Genotypen (Median der TGF- β 1-Konzentration: 13,8 μ g/l). Für das Codon 10 ergaben sich keine wesentlichen TGF- β 1 Konzentrationsunterschiede zwischen dem Genotyp Leu10Leu (Median: 20,4 μ g/l) und Pro10Pro (Median: 21,6 μ g/l). Bei dem heterozygoten Genotyp Leu10Pro ergab sich eine geringere TGF- β 1 Protein-Konzentration (Median: 13,8 μ g/l) (Gewaltig et al., 2002).

Die physiologische Funktion von TGF- β besteht in der Regulation der Zellproliferation und –differenzierung sowie zellulärer Entzündungsreaktionen und der Bildung extrazellulärer Matrix (Mossman et al., 1996; Mossman et al., 1998; Goldstein et al., 1995). TGF- β ist der potenteste profibrotische Mediator (Lc Roy et al., 1990; Jagirdar et al., 1997), kann aber ebenso die Zellproliferation hemmen, indem er deren Differenzierung oder Apoptose fördert (Blobe et al., 2000).

Betrachtet man diese profibrotische Funktion von TGF- β , wäre zu erwarten, dass die „*High-Producer*“ Genotypen Arg25Arg und Leu10Leu mit einem höheren Risiko bezüglich fibrosierender Erkrankungen verbunden sind.

Gewaltig et al. (2002) und Tag et al. (2003) assoziieren zwar den Genotyp Arg25Arg und Leu10Leu mit einer höheren TGF- β 1 Plasmakonzentration als

die heterozygoten Genotypen Arg25Pro und Leu10Pro. Gleichzeitig stellen sie aber fest, dass die homozygoten Genotypen (Arg25Arg und Leu10Leu) bei Patienten mit schwerer Leberfibrose infolge Hepatitis C signifikant seltener vorkommen (Gewaltig et al. 2002, Tag et al. 2003).

Es muss berücksichtigt werden, dass eine vermehrte Produktion von TGF- β 1 nicht mit einer erhöhten Bioaktivität gleichzusetzen ist (Grainger et al., 1999). Awad et al. (1998) bestimmt für den Genotyp Arg25Arg eine höhere TGF- β 1 Protein-Produktion als für den Genotyp Arg25Pro. Dabei bezieht er sich auf die totale TGF- β 1 Konzentration, welche sowohl den biologisch aktiven als auch den inaktiven Protein-gebundenen Anteil des Zytokins umfasst (Gewaltig et al., 2002).

Unter inflammatorischen Bedingungen kann die TGF- β 1 Synthese am Ort der Fibroseentstehung von der in Leukozyten des peripheren Blutes abweichen (Tag et al., 2003). Die Wirkung dieses Zytokins zeigt sich zudem hauptsächlich auf parakrinem Weg direkt am Ort der Sekretion (Gewaltig et al., 2002). Die im peripheren Blutplasma gemessene TGF- β Konzentration kann sich daher von den Konzentrationen innerhalb anderer Kompartimente und Gewebe, wie dem Lungengewebe, unterscheiden. (Tag et al., 2003; Gewaltig et al., 2002).

Der Wirkungsmechanismus von TGF- β 1, an dem eine Vielzahl von weiteren regulativen Faktoren beteiligt ist, ist außerordentlich komplex. Beispielsweise konnten in Alveolarepithelzellen von Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose Mikrosatelliten-Instabilitäten in dem Gen des TGF- β 1 Rezeptors Typ II festgestellt werden (Xaubet et al. 2003). Andere Polymorphismen im Bereich von Co-Faktoren und Proteinen der TGF- β Signalkaskade wurden in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt. Watanabe et al. 2002 identifizierten 106 Polymorphismen und 11 andere Genvarianten in sieben Genen für Proteine der TGF- β Signalkaskade (TGFB1, TGFB2, SMAD2, SMAD3, SMAD4 und SMAD7), davon 9 in codierenden Regionen. Verwendet wurde DNA aus peripheren Lymphozyten

von 48 gesunden japanischen Probanden (Watanabe et al. 2002). Eines von vielen Enzymen, über die TGF- β seine Wirkung entfaltet, ist beispielsweise Arginase-1, welches die Kollagensynthese in Lungenfibroblasten beeinflusst. Wird es gehemmt, reduziert sich die TGF- β -induzierte Kollagenproduktion signifikant (Kitowska et al. 2008). Ein Basenaustausch, der die Funktion von Arginase-1 moduliert, wäre hierbei von großer Bedeutung.

Es bleibt zu bedenken, welchen Effekt der Austausch der Aminosäuren Arginin bzw. Leucin gegen Prolin auf die biologische Aktivität, die Funktion und die Konzentration von TGF- β 1 hat. Beide Polymorphismen befinden sich am 5'-Ende der Sequenz von TGF- β 1, die vermutlich bei der posttranslationalen Modifizierung des Proteins im endoplasmatischen Retikulum eine Rolle spielt (Gewaltig et al., 2002).

Der Austausch von Leucin zu Prolin könnte zu einer veränderten Funktion des Enzyms führen und die Synthese oder Aktivierung des Proteins dadurch modifizieren (Wang et al. 2005). Ein indirekter Effekt auf die Enzymkonzentration (Wang et al. 2005) und eine dreidimensionale Konformationsänderung des Proteins nach Einbau von Prolin (Gewaltig et al., 2002) wären denkbar.

5.3 Das mit den Polymorphismen des TGF- β 1 Gens assoziierte Erkrankungsrisiko

In unserer Studie konnte ein Zusammenhang zwischen den untersuchten TGF- β 1 Polymorphismen an den Stellen TGF- β 1 +869 Codon 10 (T>C bzw. Leu>Pro) und TGF- β 1 +915 Codon 25 (G>C bzw. Arg>Pro) und dem Erkrankungsrisiko für fibrosierende sowie maligne Lungenerkrankungen ermittelt werden. Das Prolin-codierende Allel war in beiden Codons mit einem erhöhten Risiko (*Codon 10*: OR=1,76, 95%-KI=1,14-2,72, p=0,011; *Codon 25*: OR=2,27, 95%-KI=1,14-4,52, p=0,02) für fibrosierende und im Gegensatz dazu mit einem verminderten Risiko für maligne Lungenerkrankungen assoziiert (*Codon 10*: OR=0,56, 95%-KI=0,36-0,87, p=0,009; *Codon 25*: OR=0,47, 95%-KI=0,24-0,94, p=0,032).

Diese Beobachtung deckt sich mit der bisher in der Fachliteratur beschriebenen physiologischen Funktion von TGF- β .

5.3.1 Fibrosierende Erkrankungen

Die Risiken in der vorliegenden Studie, ermittelt aufgrund der Odds Ratio Analysen für Patienten mit Lungenfibrosen und Bronchialkarzinomen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe, lassen einen Trend erkennen, der Prolin eine protektive Rolle bezüglich maligner (*Codon 10*: OR=0,81, 95%-KI=0,38-1,73; *Codon 25*: OR=0,69, 95%-KI=0,19-2,45) und die eines Risikofaktors in Bezug auf fibrosierende Lungenerkrankungen zuschreibt (*Codon 10*: OR=1,3, 95%-KI=0,73-2,32; *Codon 25*: OR=1,65, 95%-KI=0,68-4,03).

Die Gegenüberstellung von Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen und Patienten mit Bronchialkarzinomen zeigt signifikante Ergebnisse. Demnach besteht für die Genotypen Leu10Pro, Pro10Pro, Arg25Pro und Pro25Pro ein signifikant erhöhtes Risiko, an Lungenfibrose zu erkranken (*Codon 10*: OR=1,76, 95%-KI=1,14-2,72, $p=0,011$; *Codon 25*: OR=2,27, 95%-KI=1,14-4,52, $p=0,02$), für Bronchialkarzinome eine signifikante Risikoreduktion (*Codon 10*: OR=0,56, 95%-KI=0,36-0,87, $p=0,009$; *Codon 25*: OR=0,47, 95%-KI=0,24-0,94, $p=0,032$).

Dieses Risikoverhältnis ist besonders deutlich bei Trägern des Prolin-codierenden Allels in Codon 10, deren Erkrankungen auf Asbesteinwirkung beruhen (BK Nr. 4103: OR=3,72, 95%-KI=1,56-8,85, $p=0,003$ und BK Nr. 4104: OR=0,27, 95%-KI=0,11-0,66, $p=0,004$).

Nach Adjustierung auf Alter und Rauchverhalten der Probanden bleibt dieser Trend in allen Erkrankungsgruppen erhalten.

Das Prolin-codierende Allel im Codon 10 wurde bereits mit einer Verschlechterung der Sauerstoff-Diffusionskapazität in der Lunge in einer Studie über 128 Patienten mit IPF (Idiopathische Lungenfibrose) in Zusammenhang gebracht. Über einen Zeitraum von mehreren Monate ($30,3 \pm$

25 Monate) zeigte sich bei Trägern des Prolin-codierenden Allels im Codon 10 eine Veränderung der alveolär-arteriellen Sauerstoffdifferenz von $+0,42 \pm 0,68$ mmHg/Monat, bei homozygoten Patienten des Genotyps Leu10Leu dagegen $-0,17 \pm 0,8$ mmHg/Monat ($p=0,002$) (Xaubet et al. 2003).

Eine Gruppe von 48 Patienten mit hepatischer Fibrose durch chronische Hepatitis C wurde mit 97 gesunden Kontrollen verglichen. Es fanden sich dabei signifikant häufiger schwere Fibrosen unter Trägern des Genotyps Leu10Pro (METAVIR-Score 3, $p=0,0236$) und Arg25Pro (METAVIR-Score 3, $p=0,0236$). Zusätzlich wurde eine schnellere Fibroseprogression unter Einfluss von Prolin sowohl im Codon 10 (Leu10Pro: Median: 0,16 units/year, Pro10Pro: Median: 0,18 units/year, $p<0,02$) als auch im Codon 25 (Arg25Pro: Median: 0,23 units/year, $p=0,0318$) beschrieben ($1,0$ units/year = +1 im METAVIR-Score/Jahr) (Gewaltig et al., 2002).

Unter Verwendung der LightCycler Methode konnten Wang et al. (2005) für die Genotypen Leu10Pro und Pro10Pro ein erhöhtes Fibroserisiko ($X^2=4,39$, $p=0,036$) in einer Gruppe von 210 kaukasischen Patienten mit chronischer Hepatitis C beobachten. Zusätzlich zeigten sich unter Patienten mit den Genotypen Arg25Pro und Pro25Pro höhere Schweregrade der Fibrose ($X^2=5,97$, $p=0,015$).

Mit Hilfe der gleichen Technik demonstrierten Tag et al. (2003) die Abhängigkeit des Schweregrades der Leberfibrose bei chronischer Hepatitis C von dem Prolin-codierenden Allel im Codon 25. Bei 44 Patienten mit schwerer Leberfibrose (METAVIR-Score 3-4) konnte dieses Allel im Vergleich zu 162 Patienten mit leichter Leberfibrose (METAVIR-Score 0-2) doppelt so häufig nachgewiesen werden ($X^2=4,9$; $p=0,027$).

Awad et al. (1998) und El-Gamel et al. (1999) jedoch beschrieben im Zusammenhang mit dem Genotyp Arg25Arg und Leu10Leu einen beschleunigten fibrotischen Umbau von Lungengewebe sowohl vor einer Transplantation als auch danach im allogenen Lungentransplantat. Bei der Genotypisierung von 95 lungentransplantierten Patienten fällt auf, dass

diejenigen mit einer ursprünglichen Lungenfibrose signifikant häufiger Träger des Arginin-codierenden Allels im Codon 25 (99% vs. 87%, $p=0,004$) und des Leucin-codierenden Allels im Codon 10 (79% vs. 59%, $p=0,005$) waren. Ebenso verhielt es sich im Falle neu entstandener Fibrose im allogenen Transplantat (*Codon 25*: 97% vs. 84%, $p=0,01$; *Codon 10*: 74% vs. 59%, $p>0,05$). In der gleichen Studie konnte beobachtet werden, dass 23 Patienten mit zystischer Fibrose zu 100% den Genotyp Arg25Arg und zu 70% den Genotyp Leu10Leu trugen (Awad et al. 1998). Eine Studie mit 91 Probanden zeigte vergleichbare Ergebnisse. Der Anteil an Patienten mit Lungenfibrose als Transplantationsindikation war zu 98% homozygot für Arginin im Codon 25 ($p<0,05$). In 39 Fällen entstand eine erneute Fibrose im Transplantat. Von diesen Patienten hatten 92,3% ($p<0,001$) den Genotyp Arg25Arg. Die geringste Überlebensrate nach Transplantation zeigten Patienten mit dem kombinierten Genotyp Leu10Leu-Arg25Arg ($p<0,03$) (El-Gamel et al. 1999). Patel et al. (2005) beobachteten bei 420 Patienten mit Typ I Diabetes mellitus und Nephropathie den Genotyp Leu10Leu signifikant häufiger ($X^2 = 9,94$, $p=0,007$) verglichen mit 410 Patienten mit Typ I Diabetes mellitus ohne Folgeerkrankungen wie Nephropathie oder Angiopathie (Patel et al. 2005).

5.3.2 Maligne Erkrankungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen eine Risikoreduktion für Bronchialkarzinome (*Codon 10*: OR=0,56, 95%-KI=0,36-0,87, $p=0,009$; *Codon 25*: OR=0,47, 95%-KI=0,24-0,94, $p=0,032$) bei Trägern von mindestens einem Prolin-codierenden Allel im Codon 10 und Codon 25 des TGF- β 1 Gens (Helmig et al. 2009) im Vergleich zu Probanden mit den Genotypen Leu10Leu und Arg25Arg.

Bezüglich des Nierenzellkarzinoms konnte in einer Studie mit 29 Patienten für Probanden des Haplotyps Pro10Pro-Arg25Arg im Vergleich zu gesunden Kontrollen keine Risikoerhöhung festgestellt werden (OR=0,0; $p=0,024$; 95%-KI=0,0-0,93). Für den Haplotyp Leu10Leu-Arg25Pro liegt ein signifikant

erhöhtes Risiko vor (OR=10,21; $p=0,014$; 95%-KI=1,03-492,38) (Bastürk et al. 2005). Omrani et al. berechnete für eine Stichprobe von 41 Patienten mit Prostatakarzinom im Vergleich zu 101 gesunden Probanden iranischer Herkunft ein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko für Träger des Genotyps Leu10Leu (OR=1,67; 95%-KI=1,49–1,87; $p=0,009$). Das Gleiche ergab sich für 193 Patienten mit benigner Prostatahyperplasie, die homozygote Träger des Leucin-codierenden Allels waren (OR=1,54; 95%-KI=1,40–1,67; $p=0,005$) (Omrani et al. 2009).

Vor allem die Größe der Stichproben der einzelnen Studien muss kritisch betrachtet werden. Die vorliegende Studie enthält 591 Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen, 176 Patienten mit malignen Lungenerkrankungen sowie 83 gesunde Kontrollpersonen. Damit handelt es sich um eine umfangreiche Studie mit dem größten Kollektiv. Die Fallzahlen anderer Studien zu den Polymorphismen im Exon 1 des TGF- β 1 Gens sind teilweise deutlich geringer und können Tabellen 17a bis 17c entnommen werden.

Tabelle 17a: Genotypverteilung von Patienten unterschiedlicher Erkrankungen und Kontrollen im internationalen Vergleich im Exon 1 (Codon 10) des TGF- β 1 Gens

Autor (Jahr)	Patienten/ Kontrollen (n)	Genotypfrequenzen (%)					
		Patienten			Kontrollen		
		Leu10Leu	Leu10Pro	Pro10Pro	Leu10Leu	Leu10Pro	Pro10Pro
Studien mit Lungenfibrosen							
Awad (1998) (Kaukasier)	45/107	60	37,8	2,2	41,1	47,7	11,2
El-Gamel (1999) (Kaukasier)	42/96	43	46	11	44	46	10
Xaubet (2003) (Kaukasier)	128/140	38,3	42,2	19,5	33,6	49,3	17,1
Vorliegende Studie (Kaukasier)	591/83	33,3	51,1	15,6	38,5	43,4	18,1
Studien mit Lungenfibrosen nach allogener Lungentransplantation							
Awad (1998) (Kaukasier)	68/107	51,5	44,1	4,4	41,1	47,7	11,2
El-Gamel (1999) (Kaukasier)	39/96	40	46	14	44	46	10
Studien mit Cystischer Fibrose							
Awad (1998) (Kaukasier)	23/107	69,6	30,4	0	41,1	47,7	11,2
El-Gamel (1999) (Kaukasier)	27/96	86	14	0	44	46	10
Studien mit Leberfibrosen							
Gewaltig (2002) (Kaukasier)	48/97	37,5	41,7	20,8	45,4	38,1	16,5
Wang (2005) (Asiaten)	90/104	23,3	42,2	34,5	27,9	47,1	25
Wang (2005) (Kaukasier)	210/50	41,4	47,6	11	38	54	8
Studien mit CsA-induziertem Nierenversagen							
Baan (2000) (Kaukasier)	131/94	32,1	63,4	4,5	39	46	15
Studien mit diabetischer Nephropathie							
Patel (2005) (Kaukasier)	420/410	48,1	40	11,9	37,8	50,2	11,9
Studien mit benigner Prostatahyperplasie							
Omrani (2009) (Iraner)	193/101	29	46,1	24,9	18,8	51,5	29,7
Studien mit Myocardinfarkt							
Cambien (1996) (Kaukasier)	563/629	32,1	49,2	18,6	35,8	47,2	17
Studien mit asbestinduzierten malignen Lungenerkrankungen							
Vorliegende Studie (Kaukasier)	176/83	39,8	43,8	16,4	38,5	43,4	18,1
Studien mit Nierenzellkarzinomen							
Baştürk (2005) (Kaukasier)	29/50	34,5	58,6	6,9	36	46	18
Studien mit Prostatakarzinomen							
Omrani (2009) (Iraner)	41/101	31,7	47,8	19,5	18,8	51,5	29,7

Tabelle 17b: Genotypverteilung von Patienten unterschiedlicher Erkrankungen und Kontrollen im internationalen Vergleich im Exon 1 (Codon 25) des TGF- β 1 Gens.

Autor (Jahr)	Patienten/ Kontrollen (n)	Genotypfrequenzen (%)					
		Patienten			Kontrollen		
		Arg25Arg	Arg25Pro	Pro25Pro	Arg25Arg	Arg25Pro	Pro25Pro
Studien mit Lungenfibrosen							
Awad (1998) (Kaukasier)	45/107	97,8	0,2	0	81,3	17,8	0,9
El-Gamel (1999) (Kaukasier)	42/96	98	2	0	81	19	0
Xaubet (2003) (Kaukasier)	128/140	85,1	14,1	0,8	92,2	6,4	1,4
Vorliegende Studie (Kaukasier)	591/83	84,1	15,7	0,2	73	10	0
Studien mit Lungenfibrosen nach allogener Lungentransplantation							
Awad (1998) (Kaukasier)	68/107	94,1	5,9	0	81,3	17,8	0,9
El-Gamel (1999) (Kaukasier)	39/96	92,3	7,6	0	81	19	0
Studien mit Cystischer Fibrose							
Awad (1998) (Kaukasier)	23/107	100	0	0	81,3	17,8	0,9
El-Gamel (1999) (Kaukasier)	27/96	100	0	0	81	19	0
Studien mit Leberfibrosen							
Tag (2003) (Kaukasier)	206/0	85,4	14,6	0	0	0	0
Gewaltig (2002) (Kaukasier)	48/97	79,2	20,8	0	90,7	7,2	2,1
Wang (2005) (Asiaten)	90/104	100	0	0	100	0	0
Wang (2005) (Kaukasier)	210/50	84,8	15,2	0	84	16	0
Studien mit Systemischer Sklerose							
Powell (2000) (Asiaten)	59/110	100	0	0	100	0	0
Studien mit CsA-induziertem Nierenversagen							
Baan (2000) (Kaukasier)	131/94	85,5	12,2	0,3	84	16	0
Studien mit diabetischer Nephropathie							
Patel (2005) (Kaukasier)	420/313	89,5	9,5	1	87,6	38	0,3
Studien mit autosomal dominanter polyzystischer Nierenerkrankung							
Ohtsuka (2002) (Asiaten)	125/47	100	0	0	100	0	0
Studien mit Primär arterieller Hypertonie							
Frossard (2000) (Araber)	140/142	95,71	4,29	0	95,78	4,22	0
Frossard (2001) (Araber)	72/72	86,1	12,5	1,4	86,1	13,9	0
Studien mit Myocardinfarkt							
Cambien (1996) (Kaukasier)	563/629	82,4	16,3	1,2	86,8	12,9	0,3
Studien mit asbestinduzierten malignen Lungenerkrankungen							
Vorliegende Studie (Kaukasier)	176/83	92	7	1	73	10	0
Studien mit Nierenzellkarzinomen							
Baştürk (2005) (Kaukasier)	29/50	58,6	41,4	0	86	8	6

Tabelle 17c: Genotypverteilung von Patienten unterschiedlicher Erkrankungen und Kontrollen im internationalen Vergleich im Exon 1 (Codon 263) des TGF- β 1 Gens.

Autor (Jahr)	Patienten/ Kontrollen (n)	Genotypfrequenzen (%)					
		Patienten			Kontrollen		
		Thr263Thr	Thr263Ile	Ile263Ile	Thr263Thr	Thr263Ile	Ile263Ile
Studien mit Leberfibrosen							
Wang (2005) (Asiaten)	90/104	100	0	0	100	0	0
Wang (2005) (Kaukasier)	210/50	93,3	6,7	0	90	10	0
Studien mit diabetischer Nephropathie							
Patel (2005) (Kaukasier)	420/347	93,2	6	0,8	94,8	5,2	0
Studien mit Myocardinfarkt							
Cambien (1996) (Kaukasier)	563/629	95,2	4,8	0	93	6,7	0,3

Zusammenfassend betrachtet zeigt die vorliegende Studie den Einfluss genetischer TGF- β 1 Polymorphismen auf die Entwicklung asbestinduzierter Lungenerkrankungen. Es besteht eine Assoziation der Genotypen Leu10Pro und Pro10Pro sowie Arg25Pro, Pro25Pro mit einem erhöhten Risiko für Lungenfibrosen (Codon 10: OR=1,3, 95%-KI=0,73-2,32; Codon 25: OR=1,65, 95%-KI=0,68-4,03). Demgegenüber steht ein vermindertes Risiko für Bronchialkarzinome bei Trägern dieser Genotypen (Codon 10: OR=0,56, 95%-KI=0,36-0,87, p=0,009; Codon 25: OR=0,47, 95%-KI=0,24-0,94, p=0,032) (Helmig et al., 2009). Verschiedene andere Studien, die den Einfluss dieser Punktmutationen im Codon 10 und Codon 25 des TGF- β 1 Gens sowohl auf die Lunge als auch auf andere Organe untersuchten, lieferten unterschiedliche, zum Teil gegenläufige Ergebnisse. In Bezug auf Lungenerkrankungen infolge Asbestfaserstaub-Einwirkung, konnten wir jedoch einen profibrotischen, aber auch tumorprotektiven Effekt der Aminosäure Prolin im TGF β 1-Protein beobachten.

6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Darstellung eines möglichen Zusammenhangs zwischen den Polymorphismen +869 Leu10Pro (CTG>CCG) und +915 Arg25Pro (CGG>CCG) im Exon 1 des TGF- β 1 Gens und der Suszeptibilität für Asbest-induzierte fibrosierende und maligne Lungenerkrankungen.

In die Untersuchung eingeschlossen waren 767 männliche Patienten, im Einzelnen 401 Patienten mit Asbestose (BK 4103), 156 mit Silikose (BK 4101), 34 mit Lungenfibrose anderer Genese, 29 mit Pleuramesotheliom (BK 4105), 32 mit Asbest-induziertem Bronchialkarzinom (BK 4104) und 115 mit Bronchialkarzinom anderer Genese. Als Kontrollgruppe dienten 83 gesunde männliche Probanden.

Die DNA aller Probanden wurde aus Lymphozyten des peripheren Blutes extrahiert und anschließend mittels qualitativer PCR und Schmelzkurvenanalyse im LightCycler im Hinblick auf die Genotypen in den Codons 10 und 25 des TGF- β 1 Gens untersucht.

Ein Ergebnis der vorliegenden Studie ist ein signifikant erhöhtes Risiko für Patienten mit den Genotypen Leu10Pro, Pro10Pro, Arg25Pro und Pro25Pro, an einer Lungenfibrose zu erkranken (*Codon 10*: OR=1,76, 95%-KI=1,14-2,72, $p=0,011$; *Codon 25*: OR=2,27, 95%-KI=1,14-4,52, $p=0,02$), wenn man diese Patienten mit Bronchialkarzinomen gegenüberstellt. Das Risiko, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken, ist für Patienten der oben genannten Genotypen signifikant vermindert (*Codon 10*: OR=0,56, 95%-KI=0,36-0,87, $p=0,009$; *Codon 25*: OR=0,47, 95%-KI=0,24-0,94, $p=0,032$).

Besonders deutlich ist diese Assoziation im Falle Asbest-induzierter Lungen- oder Pleura-Erkrankungen (BK Nr. 4103: OR=3,72, 95%-KI=1,56-8,85, $p=0,003$) und asbestverursachter Lungenkrebserkrankungen (BK Nr. 4104: OR=0,27, 95%-KI=0,11-0,66, $p=0,004$).

Bezogen auf die gesunde Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Ergebnisse errechnet werden, jedoch zeigt das Risikoverhältnis hier die gleiche Tendenz.

7 Summary

The major aim of the study was to demonstrate a potential correlation between the polymorphisms +869 Leu10Pro (CTG>CCG) and +915 Arg25Pro (CGG>CCG) in Exon 1 of the TGF- β 1 gene and the susceptibility for asbestos induced fibrosis and malignant lung diseases in human.

The Study included 767 male patients involving 401 patients with asbestosis, 156 with silicosis, 34 with lung fibrosis of other origin, 29 with pleural mesothelioma, 32 with asbestos induced bronchial carcinoma, and 115 with bronchial carcinoma of other origin. 83 healthy male volunteers were used as controls.

Genotyping in reference to codon 10 and 25 of the TGF- β 1 gene was performed on DNA extracted from peripheral blood lymphocytes using qualitative PCR and true melting curve analysis by LightCycler[®].

Patients with Leu10Pro, Pro10Pro, Arg25Pro and Pro25Pro genotype showed a significantly higher risk to develop lung fibrosis compared to bronchial carcinoma (*Codon 10*: OR=1,76, 95%-CI=1,14-2,72, p=0,011; *Codon 25*: OR=2,27, 95%-CI=1,14-4,52, p=0,02). Whereas the potential risk to contract bronchial carcinoma was significantly lower (*Codon 10*: OR=0,56, 95%-CI=0,36-0,87, p=0,009; *Codon 25*: OR=0,47, 95%-CI=0,24-0,94, p=0,032).

These findings appear especially distinct in case of asbestos induced diseases of the lung or pleura (BK Nr. 4103: OR=3,72, 95%-CI=1,56-8,85, p=0,003) and asbestos induced bronchial carcinoma (BK Nr. 4104: OR=0,27, 95%-CI=0,11-0,66, p=0,004).

Related to healthy controls no significant results could be demonstrated. However the risk ratio showed the same tendency.

8 Literaturliste

ABREU, J.G., KETPURA, N.I., REVERSADE, B., DE ROBERTIS, E.M. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signaling by BMP and TGF-beta. Nat Cell Biol 2002 ; 4: 599-604.

ALLEN, J.T., SPITERI, M.A. Growth factors in idiopathic pulmonary fibrosis: relative roles. Respir Res 2002; 3: 13.

American Thoracic Society. Diagnosis of nonmalignant diseases related to asbestos. Am Rev Respir Dis 1986; 134: 363-368.

ANSCHER, M. S., PETERS, W. P., REISENBICHLER, H., PETROS, W. P. & JIRTLE, R. L. Transforming growth factor beta as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer. N Engl J Med 1993; 328: 1592-1598.

AWAD, M.R., EL-GAMEL, A., HASLETON, P., TURNER, D.M., SINNOTT, P.J., HUTCHINSON, I.V. Genotypic variation in the transforming growth factor- β 1 gene: association with transforming growth factor- β 1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. Transplantation 1998; 66: 1014-1020.

BAAN, C.C., BALK, A .H.M.M., HOLWEG, C.T.J., RIEMSDIJK, I.C., MAAT, L.P.W.M., VANTRIMPONT, P.J.M.J., NIESTERS, H.G.M., WEIMAR, W. Renal failure after clinical heart transplantation is associated with the TGF- β 1 codon 10 gene polymorphism. J Heart Lung Transplant 2000; 19: 866-872.

BARTON, D.E., FOELLMER, B.E., DU, J., et al. Chromosomal mapping of genes for transforming growth factors β 2 and β 3 in man and mouse: dispersion of TGF- β gene family. Oncogen Res 1988; 3: 323-331.

BASTÜRK, B., YAVASCAOGLU, I., VURUSKAN, H., GÖRAL, G., OKTAY, B., ORAL, H.B. Cytokine gene polymorphisms as potential risk and protective factors in renal cell carcinoma. *Cytokine* 2005; 20: 41-45.

BEERS, M.F., SOLARIN, K.O., GUTTENTAG, S.H., et al. TGF- β 1 inhibits surfactant component expression and epithelial cell maturation in cultured human fetal lung. *Am J Physiol* 1998; 275: L950-L960.

BHATTACHARYA, K., DOPP, E., KAKKAR, P., JAFFERY, F.N., SCHIFFMANN, D., JAURAND, M.-C., RAHMAN, I., RAHMAN, Q. Biomarkers in risk assessment of asbestos exposure. *Mutation Research* 2005; 579: 6-21.

BIENKOWSKI, R.S., GOTKIN, M.G. Control of collagen deposition in mammalian lung. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 209: 118-140.

BITZER, M. et al. A mechanism of suppression of TGF- β /SMAD signaling by NF κ B/RelA. *Genes Dev* 2000; 14: 187-197.

BLOBE, G.C., SCHIEMANN, W.P., LODISH, H.F. Mechanisms of Disease: Role of Transforming Growth Factor (beta) in Human Disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1350-1358.

BORDER, W.A., NOBLE, N.A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331:1286-1292.

BROCKMANN, M. Malignes diffuses Pleuramesotheliom. Schriftreihe des Hauptverbandes der gewerblichen Bundesgenossenschaften, Sankt Augustin 1992.

CAMBIEN, F., RICARD, S., TROESCH, A., MALLET, C., GENERENAZ, L., EVANS, A., ARVELIER, D., LUC, G.RUIDAVETS, J.B., POIRER, O. Polymorphisms of transforming growth factor- β 1 gene in relation to myocardial

infarction and blood pressure: The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. Hypertension 1996; 28: 881-887.

CHEN, W., MOTTET, N.K. Malignant mesothelioma with minimal asbestos exposure. Human Pathology 1978; 9: 253-257.

CHURG, A., WRIGHT, J.L., VEDAL, S. Fiber burden and patterns of disease in long-term chrysotile miners and millers. Am Rev Respir Dis 1993; 148: 25-31.

COENEN, W., SCHENK, H. Ermittlung differenzierter Vorsorgegruppen bei Asbestexponierten. Schriftenreihe des Hauptverbandes der gewerblichen Berufsgenossenschaften. Sankt Augustin. BIA-Report 1991.

CRAIGHEAD, J.E., ABRAHAM, J.L., CHURG, A., GREEN, F.H.Y., KLEINERMANN, J., PRATT, P.C., SEEMAYER, T.A., VALLYATHAN, V., WEILL, H. The pathology of asbestos-associated diseases of the lungs and pleural cavities: diagnostic criteria and proposed grading schema. Arch Pathol Lab Med 1982; 106: 544-596.

DRISCOLL, K.E., CARTER, J.M., HASSENBEIN, D.G, et al. Cytokine and particle-induced inflammatory cell recruitment. Environ Health Perspect 1997; 105 (Suppl 1): 1159-1164.

EL-GAMEL, A., AWAD, M.R., HASLETON, P.S., YONAN, N.A., HUTCHINSON, J.A., CAMPBELL, C.S. et al. Transforming growth factor-beta (TGF- β 1) genotype and lung allograft fibrosis. J Heart Lung Transplant 1999; 18: 517-523.

FROSSARD, P.M., PRAVICA, V., PERREY, C., HUTCHINSON, I.V., LUKIC, M.L. Lack of association between human TGF- β 1 gene variants and primary hypertension. Am J Hypertens 2000; 13: 944-945.

FROSSARD, P.M., GUPTA, A., PRAVICA, V., PERREY, C., HUTCHINSON, I.V., LUKIC, M.L. A study of five human cytokine genes in human essential hypertension. *Mol Immunol* 2001; 38: 969-976.

FUJII, D., BRISSENDEN, J.E., DERYNCK, R., FRANCKE, U. Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet* 1986; 12: 281-288.

GAULDIE, J., SIME, P.J., XING, Z. et al. Transforming growth factor-beta gene transfer to the lung induces myofibroblast presence and pulmonary fibrosis. *Curr Top Pathol* 1999 ; 93: 35-45.

GEWALTIG, J., MANGASSER-STEPHAN, K., GARTUNG, C., BIESTERFELD, S., GRESSNER, A.M. Association of polymorphisms in the transforming growth factor- β 1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2002; 316: 83-94.

GOLDSTEIN, R.H., FINE, A. Potential therapeutic initiatives for fibrogenic lung disease. *Chest* 1995; 108: 848-855.

GRAINGER, D.J., HEATHCOTE, K., CHIANO, M., SNIEDER, H., KEM, P.R., METCALFE, J.C., CARTER, N.D., SPECTOR, T.D. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type β 1. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 93-97.

GRAINGER, D.J., MOSSDALE, D.E., METCALFE, J.C. TGF-beta in blood: a complex problem. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 133-145.

GREENWALD, J., FSCHER, W.H., VALE, W.W., CHOE, S. Threefinger toxin fold for the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor serine kinase. *Nat Struct Biol* 1999; 6: 18-22.

GURUJEYALAKSHMI, G., GIRI, S.N. Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: downregulation of TGF-beta and procollagen I and III gene expression. *Exp Lung Res* 1995; 21: 791-808.

HARDY, J.A., AUST, A.E. Iron in asbestos chemistry and carcinogenicity. *Chem Rev* 1995; 95: 97-118

HELDIN, C.H., MIYAZONO, K., TEN DIJKE, P. TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1998; 390: 465-471.

HELMIG, S., BELWE, A., SCHNEIDER, J. Association of transforming growth factor beta1 gene polymorphisms and asbestos-induced fibrosis and tumors. *J Invest Med* 2009; 57: 655-661.

HUSE, M., CHEN, Y.-G., MASSAGUE, J., KURIYAN, J. Crystal structure of the cytoplasmatic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* 1999; 96: 425-436.

International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man: Silicia and some silicates. IARC-Monographs 1987; 42, Lyon.

JAGIRDAR, J., LEE, T.C., REIBMAN, J. et al. Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta isoforms in asbestos-related diseases. *Environ. Health Perspect Suppl.* 1997; 105: 1197-203.

JOHANNSON, L., ALBIN, M., JAKOBSSON, K., MOKOCZY, Z. Histological type of lung cancer among asbestose exposed patients with or without diffuse interstitial fibrosis. *Scan J Ind Med* 1992; 49: 626-630.

KAMP, D.W., GRACEFFA, P., PRIOR, W.A., et al. The role of free radicals in asbestos induced disease. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 293-315.

KAMP, D.W., WEITZMANN, S.A. The molecular basis of asbestos induced lung injury. *Thorax* 1999; 54: 638-652.

KANNERSTEIN, M., CHURG, J. Pathology of carcinoma associated with asbestos exposure. *Cancer* 1972; 30: 14-18.

KIRSCH, T., NICKEL, J., SEBALD, W. 2000a. BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *EMBO J* 2000; 19: 3314-3324.

KIRSCH, T., SEBALD, W., DREYER, M.K. 2000b. Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 492-496.

KITOWSKA, K., ZAKRZEWICZ, D., KÖNIGSHOFF, M., CHROBAK, I., GRIMMINGER, F., SEEGER, W., BULAU, P., EICKELBERG, O. Functional role and species-specific contribution of arginases in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294: L34-L45.

KOLB, M., SCHMIDT, M. Die Bedeutung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren bei fibrosierenden Lungenerkrankungen. *Pneumologie* 2003; 57: 91-97.

KONIETZKO, N., TESCHLER, H. Asbest und Lunge. Steinkopff-Verlag, Darmstadt 1992.

KOPNIN, B.P. Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: Key for Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)* 2000; 65: 2-27.

KRAWCZAK, M. SCHMIDTKE, J. DNA-Fingerprinting. Heidelberg, Berlin, Oxford; Spektrum Akademischer Verlag 1994.

LASKY, J.A., BRODY, A.R. Interstitial fibrosis and growth factors. Environ. Health Perspect 108 Suppl 2000; 4: 751-762.

LAWRENCE, D.A., PIRCHER, R., KRYCEVC-MARTINERIE, C., JULLIEN, P. Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form. J Cell Physiol 1984; 121: 184-188.

LC ROY, E.C., TROJANOWSKA, M.I., SMITH, E.A. Cytokines and human fibrosis. Eur Cytokine Netw 1990; 1: 215-219.

LEASK, A., ABRAHAM, D.J. TGF- β signaling and the fibrotic response. FASEB J (The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal) 2004; 18: 816-827.

LEHNERT, B.E. Defense mechanisms against inhaled particles and associated particle-cell interactions. In: G.D. Guthrie, Jr. And B.T. Mossman, editors. Health Effects of Mineral Dusts. Reviews in Mineralogy 1993; 28. Mineralogical Society of America, Washington, DC. 427-470.

LESUR, O., BOUHADIBA, T., MELLONI, B., CANTIN, A., WHITSETT, J.A., BEGIN, R. Alterations of surfactant lipid turnover in silicosis: evidence of a role for surfactant-associated protein A (SP-A). Int J Exp Pathol 1995; 76: 287-298.

LÖFFLER, PETRIDES Biochemie und Pathobiochemie. 5 ed. Berlin, Heidelberg, New York; Springer 1997.

LUO, K., STROSCHEIN, S.L., WANG, W., CHEN, D., MARTENS, E., ZHOU, S., ZHOU, Q. The ski oncoprotein interacts with the smad proteins to repress TGFbeta signaling. Genes Dev 1999; 13: 2196-2206.

MANNING, C.B., VALLYATHAN, V., MOSSMAN, B.T. 2002 Diseases caused by asbestos: mechanisms of injury and disease development. *Int. Immunopharmacology* 2002; 2: 191-200.

MASSAGUE, J., HATA, A., LIU, F. TGF β signalling through the Smad pathway. *Trends Cell Biol* 1997; 7: 187-192.

MASSAGUE, J. TGF β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791.

MASSAGUE, J., BLAIN, S.W., LO, R.S. TGF β signaling in growth control, cancer and heritable disorders. *Cell* 2000; 103: 295-309.

MORISHIMA, Y., NOMURA, A., UCHIDA, Y., NOGUCHI, Y., SAKAMOTO, T., ISHII, Y., GOTO, Y., MASUYAMA, K., ZHANG, M.J., HIRANO, K., MOCHIZUKI, M., OHTSUKA, M., SEKIZAWA, K. Triggering the induction of myofibroblast and fibrogenesis by airway epithelial shedding. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24: 1-11.

MOSSMAN, B.T., KAMP, D.W., WEITZMANN, S.A. Mechanisms of carcinogenesis and clinical features of asbestos-associated cancers. *Cancer Invest* 1996; 14: 464-478.

MOSSMAN, B.T., CHURG, A. Mechanisms in the Pathogenesis of Asbestosis and Silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1666-1680.

MULLER, N.L., and MILLER, R.R. Computed tomography of chronic diffuse infiltrative lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 1206-1215, 1440-1448.

MURPHY-ULLRICH, J.E., PO CZATEK, M. Activation of latent TGF- β by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 59-69.

MUTSAERS, S.E., BISHOP, J.E., MC GROUTHER, G. et al. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 5-17.

MUTSAERS, S.E., PRELE, C.M., BRODY, A.R., IDELL, S. Pathogenesis of pleural fibrosis. *Respirology* 2004; 9: 428-440.

OBERDORSTER, G. Macrophage-associated response to chrysotile. *Ann Occup Hyg* 1994; 38: 601-615.

OHTSUKA, T., YAMAKAGE, A., YAMAZAKI, S. The polymorphism of transforming growth factor- β 1 gene in Japanese patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 2002; 147: 458-463.

O'KANE, S., FERGUSON, M.W. Transforming growth factor β s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 63-78.

PATEL, A., SCOTT, W.R., LYMPANY, P.A., RIPPIN, J.D., GILL, G.V., THE WARREN 3/UK GOKIND STUDY GROUP, BARNETT, A.H., BAIN, S.C. The TGF- β 1 gene codon 10 polymorphism contributes to the genetic predisposition to nephropathy in Type 1 diabetes. *Diabetic Med.* 2005; 22: 69-73.

PIEK, E., HELDIN, C.H., DIJKE, P.T. Specificity, diversity and regulation of TGF- β superfamily signaling. *FASEB J (The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal)* 1999; 13: 2105-2124.

POCIASK, D.A., SIME, P.J., BRODY, A.R. Asbestos-derived reactive oxygen species activate TGF- β 1. *Lab. Invest.* 2004; 84: 1013-1023.

POWELL, E.E., EDWARDS-SMITH, C.J., HAY, J.L., CLOUSTON, A.D., CRAWFORD, D.H., SHORTHOUSE, C. et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 31: 828-833.

RIHA, R.L., YANG, I.A., RABNOTT, G.C., TUNNICLIFFE, A.M., FONG, K.M., ZIMMERMAN, P.V. Cytokine gene polymorphisms in idiopathic pulmonary fibrosis. *Intern Med J* 2004; 34: 126-129.

ROBERTS, A.B. TGF-beta signaling from receptors to the nucleus. *Microbes Infect* 1999; 1: 1265-1273.

ROM, W.N., *Environmental and occupational medicine*. 3rd ed. New York, NY: Lippincott-Raven; 1998.

RÖSLER, J.A., WOITOWITZ, H.-J., LANGE, H.-J., ULM, K., WOITOWITZ, R.H., RÖDELSPERGER, K. Forschungsbericht Asbest IV. Asbesteinwirkungen am Arbeitsplatz und Sterblichkeit an bösartigen Tumoren in der Bundesrepublik Deutschland. Schriftreihe des Hauptverbandes der gewerblichen Bundesgenossenschaften e.V., Sankt Augustin 1993.

SAHARINEN, J., TAIPALE, J., KESKI-OJA, J. Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cystein repeat of its binding protein LTBP-1. *EMBO J* 1996; 15: 245-253.

SCHNEIDER, J., WOITOWITZ, H.-J. 1995 Pleuramesotheliom. In: Wichmann, Schlipkoeter, Fülgraff (Hrsg.) *Handbuch für Umweltmedizin*, 7. Erg.Lfg. 11/95

SCHNEIDER, J., Rödelisperger, K., WOITOWITZ, H.-J. 1998 Staub und Staubinhaltsstoffe/Asbest. In: Wichmann, Schlipkoeter, Fülgraff (Hrsg.) *Handbuch für Umweltmedizin*, 13. Erg.Lfg. 5/98

SCHNEIDER, J., ERDOGAN, S., WOITOWITZ, H.-J.: PAH-assoziierte Lungenkrebserkrankungen – ein Beitrag zum Problem der synergistischen Synkanzerogenese. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 1999; 34: 476-482.

SCHNEIDER, J., WOITOWITZ, H.-J.: Quarz und Lungenkrebs aus arbeitsmedizinischer Sicht, *Atemw-Lungenkrkh* 2002; 28: 195-199.

SHEN, X., HU, P.P., LIBERATI, N.T., DATTO, M.B., FREDERICK, J.P., WANG, X.F. TGF-beta-induced phosphorylation of Smad3 regulates its interaction with coactivator p300/CREB-binding protein. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 3309-3319.

SHI, Y., HATA, A., LO, R.S., MASSAGUE, J., PAVLETICH, N.P. A structural basis for mutational inactivation of the tumor suppressor Smad4. *Nature* 1997; 388: 87-93.

SHI, Y., WANG, Y.-F., JAYARAMAN, L., YANG, H., MASSAGUE, J., PAVLETICH, N. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: Insights on DNA-binding in TGF- β signaling. *Cell* 1998; 94: 585-594.

SIMEONOVA, P.P., LUSTER, M.I. Asbestos induction of nuclear transcription factors and interleukin 8 gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15: 787-795.

STAPLES, C.A. Computed tomography in the evaluation of benign asbestos-related disease. *Radiol Clin North Am* 1992; 30: 1191-1207.

SUN, Y., LIU, X., NG-EATON, E., LODISH, H.F., WEINBERG, R.A. SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 12442-12447.

TAG, C.G., MENGSTEAB, S., HELLERBRAND, C., LAMMERT, F., GRESSNER, A.M., WEISKIRCHEN, R. Analysis of the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) codon 25 gene polymorphism by LightCycler-analysis in patients with chronic hepatitis C infection. Cytokine 2003; 24: 173-181.

TSUKAZAKI, T., CHIANG, T.A., DAVISON, A.F., ATTISANO, L., WRANA, J.L. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. Cell 1998; 95: 779-791.

ULLOA, L., DOODY, J., MASSAGUE, J. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signaling by the interferon-gamma/STAT pathway. Nature (London) 1999. 397: 710-713.

ULM, K., WASCHULZIK, B. Quarzfeinstaub und Lungenkarzinom – Ergebnisse einer Fallkontrollstudie zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen einer Exposition gegenüber lungengängigem Quarzfeinstaub und dem Auftreten von Lungenkarzinomen. 1998; Hrsg. Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften. Meckenheim

WAKEFIELD, L.M. LETTERIO J.J., CHEN, T. et al. Transforming growth factor-beta 1 circulates in normal human plasma and is unchanged in advanced metastatic breast cancer. Clin Cancer Res 1995; 1: 129-136.

WANG, H., MENGSTEAB, S., TAG, C.G., GAO, C.-F., HELLERBRAND, C., LAMMERT, F., GRESSNER, A.M., WEISKIRCHEN, R. Transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. World J Gastroenterol 2005; 11 (13): 1929-1936.

WANG, X., YANO, E., WANG, Z., WANG, M., CHRISTIANI, D.C. Adverse Effects of Asbestos Exposure and Smoking on Lung Function. Am J Ind Med 2006; 49: 337-342.

WATANABE, Y., KINOSHITA, A., YAMADA, T., OHTA, T., KISHINO, T., MATSUMOTO, N., ISHIKAWA, M., NIIKAWA, N., YOSHIURA, K. A catalog of 106 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and 11 other types of variation in genes for transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and its signalling pathway. J Hum Genet 2002; 47: 478-483.

WERB, Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. Cell 1997; 91: 439-442.

WOITOWITZ, H.-J., PAUR, R., RÖDELSPERGER, K. Das Mesotheliom, ein Signaltumor der beruflichen Asbeststaubgefährdung. Dtsch Med Wschr 1984; 109: 363-368.

WOTTON, D., LO, R.S., MASSAGUE, J. A Smad Transcriptional Corepressor. Cell 1999; 97: 29-39.

XAUBET A. et al. Transforming Growth Factor- β 1 Gene Polymorphisms Are Associated with Disease Progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2003; 168: 431-435.

XU, L., CHEN, Y.G., MASSAGUE, J. The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGF β -dependent phosphorylation. Nat Cell Biol 2000; 2: 559-562.

ZAWEL, L., DAI, J.L., BUCKHAULTS, P., ZHOU, S., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B., KERN, S.E. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. Mol Cell 1998; 1: 611-617.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Joachim Schneider für die Überlassung des Themas und die Betreuung beim Schreiben meiner Arbeit;

bei meiner Betreuerin Dr. med. vet. Simone Helmig für die Betreuung der Experimente und die intensive Unterstützung und Förderung;

bei den Mitarbeitern des Labors Juliane Döhrel, Anika Seipp und Monika Philipp-Gehlhaar für ihr Hilfsbereitschaft bei Labortätigkeiten;

bei meinen Eltern für die Ermöglichung meiner beruflichen Ausbildung und die stetige Unterstützung im geistigen sowie im finanziellen Sinn, meinem Bruder für die Hilfe im Bereich der Computertechnik

und bei meinen Freunden für die treue Begleitung und moralische Unterstützung.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5817-3



9 17838351958173

Cover photos:

© Olivier - Fotolia.com
© fox17 - Fotolia.com
© Brasil2 - iStockphoto
© WILLISIE - iStockphoto