

9620

**Assoziation der Tumor Necrosis Factor TNF  $\alpha$   
Genpolymorphismen (-308) und (-238) bei Pneumokoniosen  
infolge Asbestfaserstäuben und Quarz**

Von der Medizinischen Fakultät  
der Justus-Liebig-Universität Giessen  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Medizin  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von Nahid Burr geb. Aliahmadi  
aus Kerman, Iran

Gießen (2012)

Aus dem Medizinischen Zentrum für Ökologie  
Institut und Poliklinik für Arbeits- und Sozialmedizin  
Des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen

Kommissarischer Leiter: Professor Dr. med. Joachim Schneider

1.Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Joachim Schneider

2.Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Andres Günther

Tag der Disputation: 25.06.2013

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Pneumokoniosen.....	1
1.1.1	Asbest .....	1
1.1.2	Pathomechanismen bei der Entstehung von asbestinduzierten Erkrankungen der Lunge und der Pleura .....	2
1.1.2.1	Die Lungen- und Pleuraasbestose Nr. 4103 BKV .....	3
1.1.2.2	Der durch Asbestfaserstaub verursachte Lungen- oder Kehlkopfkrebs (Nr. 4104 BKV) und das diffuse maligne Mesotheliom der Pleura, des Bauchfells und des Perikards (Nr. 4105 BKV) .....	5
1.2	Die Quarzstaublungerkrankung (Silikose) Nr. 4101 BKV und der Quarzlungenkrebs Nr. 4112 BKV .....	7
1.2.1	Pathomechanismen bei der Entstehung von durch Quarzstaub verursachten Erkrankungen.....	8
1.3	Der Tumor Nekrose Faktor ( TNF $\alpha$ ) .....	8
<b>2</b>	<b>Ziel dieser Studie</b> .....	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Kollektiv und Methoden</b> .....	<b>14</b>
3.1	Patientenkollektiv und Kontrollgruppe.....	14
3.2	Geräte und Materialien .....	19
3.2.1	Geräte .....	19
3.2.2	Verbrauchsmaterialien .....	20
3.2.3	Zusammensetzung verwendeter Lösungen .....	20
3.2.4	Reagenzien .....	20
3.2.5	Kits .....	20
3.3	Methode .....	21
3.3.1	Isolierung der DNA.....	21
3.3.2	Messung der DNA- Konzentration mittels Photometrie .....	21
3.3.3	Die PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	21
3.3.3.1	Qualitative Analyse mit dem Light Cycler-Gerät.....	22
3.3.3.2	Analyse von Punktmutationen mittels LightCycler .....	23
3.3.3.3	Ansatz und Protokoll für die qualitative PCR im LightCycler.....	26
3.3.3.4	Primer und Sondensequenzen.....	26
3.3.3.5	Versuchsbedingungen .....	28

3.3.3.6	Codierung der Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse .....	29
3.3.4	Statistische Methoden .....	29
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
4.1	Polymorphismus und Genotypbeschreibung an der Stelle (-308) des TNF $\alpha$ -Gens .....	31
4.2	Polymorphismus und Genotypbeschreibung an der Stelle (-238) des TNF $\alpha$ -Gens .....	33
4.3	Risikoabschätzung mittels der Odds Ratio Analyse für gefahrstoffbedingte Erkrankungen der Lunge und der Pleura in Abhängigkeit von den Polymorphismen an der Stelle (-308) und (-238) des TNF $\alpha$ - Gens .....	36
4.3.1	Erkrankungsrisiko für gefahrstoffbedingte Erkrankungen der Lunge und der Pleura in Abhängigkeit von dem Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ -Gens .....	36
4.3.2	Erkrankungsrisiko für gefahrstoffbedingte Erkrankungen der Lunge und der Pleura in Abhängigkeit von dem Polymorphismus (-238) des TNF $\alpha$ -Gens .....	39
4.3.3	Vergleich der Erkrankungsrisiken (Asbestfaserstaub-verursachten) Lungenfibrosen mit denen eines (Asbestfaserstaub-verursachten) Bronchialkarzinoms in Abhängigkeit von den Polymorphismen (-308) und (-238) des TNF $\alpha$ - Gens .....	42
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>44</b>
5.1	Genotypenanalyse der Polymorphismen an der Stelle (-308) und (-238) des TNF $\alpha$ Gens im internationalen Vergleich.....	46
5.2	Allelfrequenzen der Polymorphismen an der Stelle (-238) und (-308) des TNF $\alpha$ - Gens im internationalen Vergleich .....	50
5.3	Die Bedeutung von TNF $\alpha$ in der Entwicklung von fibrosierenden Erkrankungen der Lunge und der Pleura .....	53
5.4	Die Bedeutung von TNF $\alpha$ in der Entwicklung von malignen Erkrankungen der Lunge und der Pleura.....	54
5.4.1	Die Rolle des TNF $\alpha$ Proteins als Tumordinhibitor.....	54
5.4.2	Die Rolle des TNF $\alpha$ Proteins als Tumorpromoter.....	55
5.5	Assoziation der Polymorphismen (-238) und (-308) des TNF $\alpha$ - Gens mit fibrosierenden Erkrankungen .....	58

5.6	Assoziation der Polymorphismen (-238) und (-308) des TNF $\alpha$ - Gens mit malignen Erkrankungen .....	62
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
<b>12</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>91</b>
<b>13</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>92</b>
13.1	Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung .....	92
13.2	Fragebogen.....	97
<b>14</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>99</b>
<b>15</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>100</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Pneumokoniosen

Unter Pneumokoniosen („pneumo“= Atem, Luft; „konis“= Staub) werden nach Zenker (1867) Lungenveränderungen nach Ablagerung von eingeatmetem Staub verstanden. Pneumokoniosen durch anorganische Stäube werden insbesondere durch Asbestfaserstäube und Quarz verursacht. Es handelt sich um die in Deutschland am häufigsten entschädigten Berufskrankheiten (BK Dok, DGUV 2012).

### 1.1.1 Asbest

Asbestfaserstäube sind natürliche, mineralische Stoffe, die bereits seit Mitte des 19. Jahrhunderts aufgrund ihrer herausragenden physikalischen Eigenschaften vielseitige Anwendung in der Industrie fanden. Asbest zeichnet sich, wie der griechische Name bereits andeutet („asbestós“= unvergänglich) insbesondere durch seine Temperaturbeständigkeit, hohe Reißfestigkeit und Elastizität aus und kommt heutzutage noch in zahlreichen alten Baumaterialien vor. Man unterscheidet sechs Unterformen von Asbest, welche in zwei Gruppen unterteilt werden: Serpentin (Chrysotil „Weißasbest“) und Amphibole. Die Amphibole werden nochmals unterteilt in Krokydolith („Blauasbest“), Amosit („Braunasbest“), Tremolith, Aktinolith und Anthophyllit (Carbone et al., 2012). Mit über 90% nahm Chrysotil den quantitativ höchsten Anteil am Asbestverbrauch der westlichen Industrienationen ein, Krokydolith und Amosit finden nur in etwa 2-3% Verwendung. Typisch für Asbest ist die Spaltbarkeit entlang der Längsachse, so dass feine, lange Fasern entstehen, die nur mittels Elektronenmikroskopie erkennbar sind. Besonders Fasern mit einer Länge von 5 µm und einem Durchmesser von 3 µm sowie einem Verhältnis Länge zu Durchmesser größer als 3:1 führen nach Inhalation zu Erkrankungen der Lunge oder des Lungenfells (Pleura) bis hin zum Krebs (Schneider et al. 1998). Das Wissen über die gesundheitliche Gefährdung durch Asbestfaserstäube ist bereits seit den 60-iger Jahren aufgrund von epidemiologischen und arbeitsmedizinisch-klinischen Erkenntnissen bekannt, (Selikoff, Worth, Woitowitz, Raithel et al.), dennoch dauerte es einige Jahrzehnte bis 1993 in Deutschland ein Asbestverbot sowohl hinsichtlich der Verarbeitung als auch der Verbreitung in Kraft gesetzt wurde (Schneider et al., 1998).

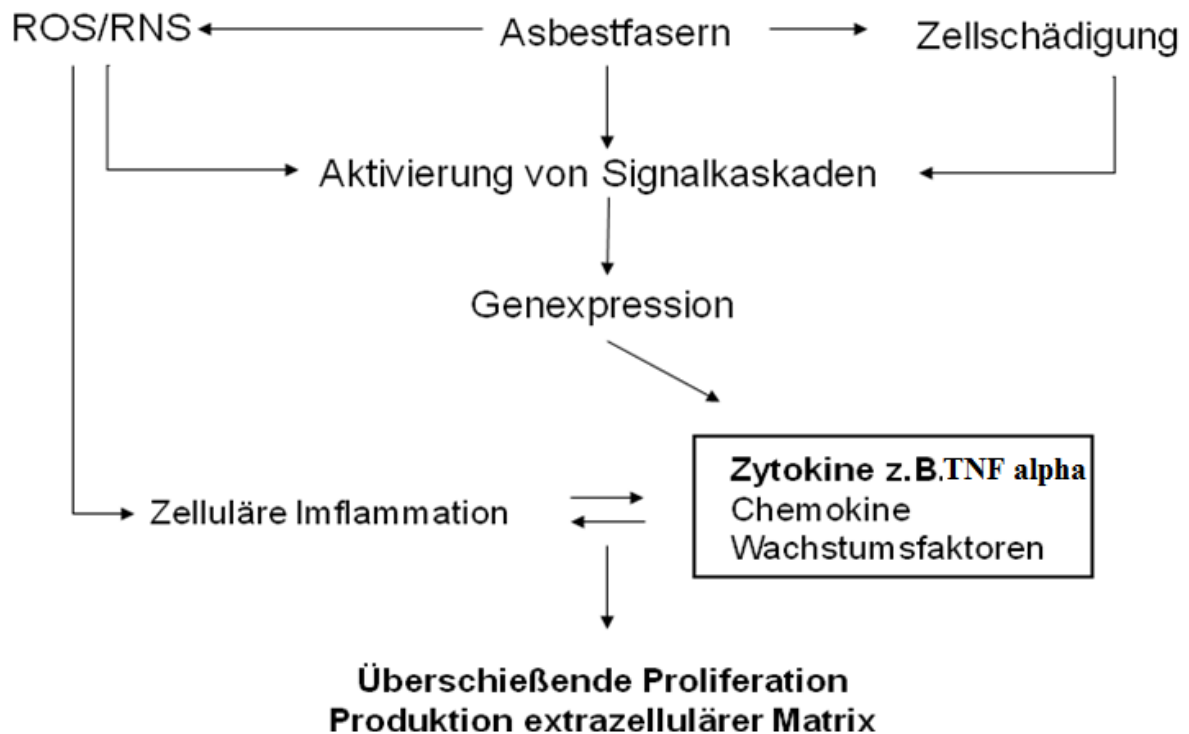
Infolge Inhalation von Asbestfaserstäuben gelangen die feinen Fasern in das Lungengewebe und über Lymphbahnen zum Rippenfell. Infolge fibrogener Effekte von Asbestfaserstäuben treten Lungen- und Pleuraasbestosen auf, infolge kanzerogener Effekte entstehen Bronchialkarzinome, Kehlkopfkarzinome oder das von den Mesothelzellen ausgehende Mesotheliom. Diese Erkrankungen sind in der Anlage 1 der Berufskrankheitenverordnung (BKV) der sog. Berufskrankheitenliste unter den Nummern 4103-4105 aufgeführt. Trotz des Asbestverbotes zählen diese Krankheiten nach der Lärmschwerhörigkeit (BK Nr. 2301) zu den am häufigsten anerkannten Berufskrankheiten. Berufskrankheiten sind nach § 9 Abs. 1 SGB VII Krankheiten, die die Bundesregierung durch Rechtsverordnung mit Zustimmung des Bundesrates als Berufskrankheiten bezeichnet und die Versicherte infolge einer den Versicherungsschutz begründenden Tätigkeit erleiden. Voraussetzung für die Aufnahme in die Berufskrankheitenverordnung (BKV) ist, dass die Erkrankung nach den Erkenntnissen der medizinischen Wissenschaft durch besondere Einwirkung verursacht sind, denen bestimmte Personengruppen durch ihre Arbeit in erheblich höherem Grade als die übrige Bevölkerung ausgesetzt sind (§ 9 Abs. 1 SGB VII). Da diese Erkrankungen erst nach einer jahrzehntelangen Latenzzeit auftreten, ist mit einem Anstieg von Berufskrankheiten auch in den nächsten Jahren zu rechnen.

### **1.1.2 Pathomechanismen bei der Entstehung von asbestinduzierten Erkrankungen der Lunge und der Pleura**

Die Inhalation von Asbestfasern führt im Lungengewebe zu einer chronischen Entzündungsreaktion mit daraus resultierender fibrosierender oder maligner Entartung im Bereich der Lungen oder der Pleura. Neben der Beschaffenheit der Fasern spielt die Expositionszeit und Ko-Faktoren wie beispielsweise das Rauchen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung dieser Krankheiten. Gelangen Asbestfasern in die Alveolen werden Makrophagen aktiviert und versuchen diese zu eliminieren. Aufgrund ihrer Länge können Asbestfasern nicht vollständig phagozytiert werden. Es kommt zu einer Akkumulation im Lungengewebe, welche einen fibrotischen Umbau in der Lunge verursacht. Mit neutronenaktivierten Krokydolithfasern konnte eine gezielte Wanderung zur Peripherie der Lunge festgestellt werden (Schneider et al., 1998). Die in den Alveolen festgesetzten Fasern gelangen innerhalb kürzester Zeit auch in die viszerale Pleura und von dort, über das Lymphsystem in den Pleuraspalt und zur parietalen Pleura.

### 1.1.2.1 Die Lungen- und Pleuraasbestose Nr. 4103 BKV

Inhalierte Asbestfasern, die länger sind als 15µm (entspricht dem Durchmesser eines Alveolarmakrophagen), können weder durch mukoziliare Klärung noch durch Phagocytose der Alveolarmakrophagen vom Organismus eliminiert werden. Sie lagern sich in den Alveolen an und können sich in zahlreiche Längsfibrillen aufspalten (Sanchez et al., 2009). Sie besitzen die Eigenschaft in Richtung der Pleura zu driften (Pleurotropie) und subpleural zu akkumulieren (Mossmann et al., 1998). Hier kommt es zu einer zellulären Entzündungsreaktion, wobei Chemokine und Zytokine, wie beispielsweise das TNF  $\alpha$ , freigesetzt werden, die weitere Makrophagen, T-Lymphozyten und Leukozyten einwandern lassen und eine zelluläre Inflammation induzieren (Mutsaers et al., 2004; Schneider et al., 1998).



**Abb. 1:** Pathomechanismus der Entstehung von Fibrose nach Einwirkung von Asbestfasern. Mod. nach Kamp & Weitzmann, 1999. ROS = Reaktive Sauerstoff Spezies; RNS = reaktive Stickstoff Spezies

Zudem setzen die aktivierten Alveolarmakrophagen 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 (Shannahan et al., 2012). Sauerstoffradikale schädigen das Alveolarepithel (Pneumozyten Typ I), was unter anderem Pneumozyten



Typ II zur Proliferation anregt (Lesur et al., 1995). Dabei sezernieren diese Wachstumsfaktoren und stimulieren so Fibroblasten zur Proliferation und Kollagensynthese sowie zur Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Mossman et al., 1998; Schneider et al., 1998). Diese Abläufe führen zu einer persistierenden Entzündungsreaktion (Manning et al., 2002). So kann eine massive Kollagensynthese und Produktion extrazellulärer Matrix induziert werden und letztendlich zur Entstehung der Lungenfibrose beitragen (Mossman et al., 1998).

Durch eine Verdickung der Alveolarmembran und des Interstitiums entsteht histologisch das Bild einer Lungenasbestose (Schneider et al., 1998). In fortgeschrittenen Fällen zeigen sich ein Symptom-Trias bestehend aus Dyspnoe, auskultatorischem Knistern über der Lunge und Zeichen einer Fibrose im Röntgenbild. Die röntgenologische Klassifikation erfolgt weltweit gemäß der Klassifizierung der International Labour Organization (ILO), wonach anhand von Standardröntgenbildern die Größe, Zahl und Lage runder oder unregelmäßiger Verschattungen und Verkalkungen auf der Röntgenthoraxaufnahme erfaßt werden. Somit lassen sich die Fibrosen in verschiedene Schweregrade entsprechend der Streuungskategorien einteilen. Lungenfunktionsanalytisch gehen die Veränderungen mit einer restriktiven Ventilationsstörung einher (Wang et al., 2006). Im lichtmikroskopischen Bild sieht man eine 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; Müller et al., 1990). Ausgedehnte fibrotische Veränderungen liegen meist nahe der viszeralen Pleura. 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 kollagenem Bindegewebe auch 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

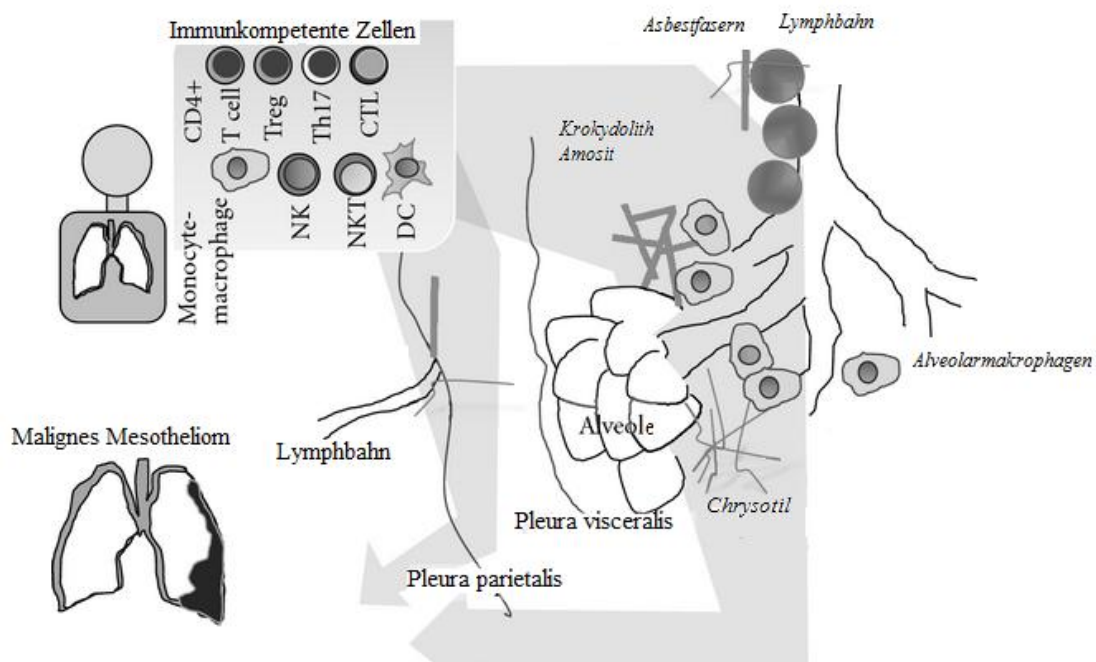
viszerale Pleuraasbestose kann zu ein- oder beidseitigen Pleuraergüssen führen. Kommt es zu einer Verschwartung beider Pleurablätter mit Adhärenz des costo-phrenischen Winkels, entsteht das Bild einer Hyalinosi complicata (Schneider et al., 1998). Asbestkörperchen finden sich im kollagenen Gewebe der Pleuraplaques nur selten (Manning et al., 2002).

### **1.1.2.2 Der durch Asbestfaserstaub verursachte Lungen- oder Kehlkopfkrebs (Nr. 4104 BKV) und das diffuse maligne Mesotheliom der Pleura, des Bauchfells und des Perikards (Nr. 4105 BKV)**

Die Exposition von Asbestfasern führt neben der oben beschriebenen fibrogenen Wirkung auch zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von malignen Erkrankungen. (Schneider et al., 1999). 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 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 et al., 1998, Kannerstein et al., 1972, Johansson et al., 1992, Churg et al., 1993); es werden jedoch sämtliche histologischen Tumortypen beobachtet.

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand sind andere umweltrelevante Ursachen als Asbest und die vergleichbar biobeständige Mineralfaser Erionit für die Entstehung des Pleuramesothelioms beim Menschen bisher nicht gesichert. Dabei steigt das Risiko für diese Erkrankung mit der Dauer der Exposition und Intensität der Belastung an. Das Maligne Mesotheliom des Rippenfells, Bauchfells und des Perikards (BK Nr. 4105 BKV) gilt als „Signaltumor“ einer Jahre zurückliegenden Asbestfaserstaub-Exposition (Roesler et al., 1993, Woitowitz et al., 1984). Es ist ein sehr aggressiver Tumor, der von Mesothelzellen der Pleura, des Peritoneums oder Perikard ausgeht. Die mediane Überlebensrate beträgt lediglich etwa 9 Monate. In den USA sterben jährlich 3000 Menschen an dieser Erkrankung, in den westlichen europäischen Ländern liegt die Mortalität bei 5000 pro Jahr (Carbone et al., 2011).

Die Asbestfasern passieren die Alveolarschranke und lagern sich auf der Pleura visceralis und parietalis ab (Brockmann, 1992, Konietzko und Teschler, 1992, Schneider et al., 1998). Der kanzerogenen Wirkung liegt eine chronische Entzündungsreaktion zugrunde. Die inhalierten Asbestfasern führen zu einer Aktivierung einer zunächst lokalen Entzündung, die zum einen mit einer erhöhten Produktion von Zytokinen (wie beispielsweise das  $TNF\alpha$ ), Wachstumsfaktoren und Sauerstoffradikalen einher geht. Weitere kanzerogenen Faktoren kommt der Interaktion mit den Zielzellen zu (Schneider et al., 1998).



**Abb. 2:** Aktivierung immunkompetenter Zellen nach Asbestinhalation ( mod. nach Matsuzaki et al., 2012)

Auf molekulargenetischer Ebene induzieren Asbestfasern die Expression des nuklearen Faktors kappa B ( $NF-\kappa B$ ) und aktivieren zelluläre Signalkaskaden (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. Tumor necrosis factor,  $TNF-\alpha$  und  $TGF-\beta$ ), 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 und Schneider et al., 1999). Insbesondere die

Bildung freier Sauerstoffradikale erhöht durch deren biologische Interaktion mit Makromolekülen wie z.B. der DNA, Signaltransduktionsproteinen und Membranlipiden im Wesentlichen 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).

### **1.2 Die Quarzstaublungerkrankung (Silikose) Nr. 4101 BKV und der Quarzlungenkrebs Nr. 4112 BKV**

Siliziumdioxid  $\text{SiO}_2$  kommt als das häufigste Mineral der Erdkruste sowohl in kristalliner als auch in amorpher Form vor. Die am weitesten verbreitete Form ist der kristalline Quarz, der sich unter extrem hohen Temperaturen in weitere Modifikationen wie Cristobalit und Tridymit umwandeln kann. Tierversuche haben gezeigt, dass kristallines Siliziumdioxid  $\text{SiO}_2$  eine fibrogene und kanzerogene Wirkung aufweist. Der Quarz kommt natürlicherweise in vielen unterschiedlichen Gesteinstypen vor, wobei der Quarzanteil stark variiert (Sandstein: ~67% Quarzanteil, Granit: ~25-40% Quarzanteil) (Leung et al., 2012). Durch seine vielfältige Verwendbarkeit stellt Quarz einen wichtigen natürlichen Rohstoff dar und wird unter anderem in der Glas-, Keramik- und Zementindustrie sowie in Form von Quarzsanden genutzt.

Die Quarzstaublungerkrankung wird verursacht durch Inhalation von alveolengängigem kristallinen  $\text{SiO}_2$ . Typisch sind intrapulmonal gelegene hyaline Knötchen, die als Granulome imponieren. Röntgenologisch finden sich kleine rundliche Schatten der Form p, q und r, die sich meist in den Ober- und Mittelfeldern finden. Diese neigen zur Konfluenz bis zum Auftreten von Schwielen (A-, B-, und C-Schwielen) Trotz arbeitsmedizinischer Präventionsmaßnahmen stellt die Silikose eine der bedeutendsten Berufskrankheiten weltweit dar, wobei in den letzten drei Jahrzehnten eine kontinuierliche Abnahme der Mortalität in den Industrieländern zu verzeichnen ist (Madl et al., 2008).

Die Quarzexposition ist assoziiert mit verschiedenen Krankheitsbildern, wobei die Tuberkulose, die chronisch obstruktive Atemwegserkrankung (COPD) und das Bronchialkarzinom die am häufigsten assoziierten Erkrankungen darstellen.

Quarzstaub zeigte im Tierversuch nach inhalativer und intratrachealer Applikation eine erhöhte Inzidenz an Lungentumoren.. Quarz-induzierte Bronchialkarzinome wurden mehrheitlich bei Arbeitern mit vorbestehender Fibrose (Silikose) beobachtet. Es ist unstrittig, dass Quarzstaub humankanzerogen wirkt. Die drei genannten Modifikationen Quarz, Cristobalit und Tridymit wurden daher 1997 von der International Agency for

Research on Cancer (IARC, 1997) und im Jahr 1999 von der Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (MAK-Kommission) als humankanzerogen eingestuft (Schneider et al., 2002).

### **1.2.1 Pathomechanismen bei der Entstehung von durch Quarzstaub verursachten Erkrankungen**

Die Fibrogenität 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 den distalen Abschnitten Lunge zur Aktivierung von Fibroblasten und Makrophagen. Diese Zellen produzieren im Anschluss vermehrt Zytokine und Wachstumsfaktoren (z.B. TNF $\alpha$ ). 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 der Anregung von Fibroblasten zur Kollagenproduktion im interstitiellen Lungengewebe.

Für die Kanzerogenität durch Quarzstaub 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- $\kappa$ B), verschiedener Onkogene und die Induktion von Mutationen in Tumorsuppressorgenen und begünstigt so die kanzerogene Wirkung von Quarzstaub (Leung et al., 2012; MAK- und BAT-Werte Liste, 1999).

### **1.3 Der Tumor Nekrose Faktor ( TNF $\alpha$ )**

Der Tumornekrosefaktor TNF $\alpha$  gehört zu der Gruppe der Tumor Nekrose Faktor / Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor- Zytokine und ist als multifunktionaler Signalstoff hauptsächlich an der Aufrechterhaltung und Homöostase des Immunsystems und an lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen im Körper beteiligt (Balkwill et al., 2006). Die frühere Bezeichnung Kachektin geht auf Experimente mit rekombinantem TNF $\alpha$  zurück, in denen es bei Versuchstieren zu Appetit- und Gewichtsverlust kam (Vasalli et al., 1992). Nach heutigen Erkenntnissen ist TNF $\alpha$  ein sehr wirksames pro-inflammatorisches Zytokin, welches als Reaktion auf Antigene, Lipopolysaccharide oder andere bakterielle Bestandteile Fieber hervorruft und in hoher Konzentration zum septischen Schock führen kann. Außerdem ist TNF $\alpha$  an der Reaktion von chronischen Entzündungen und an Autoimmunprozessen beteiligt (Fan et al., 2011).

TNF $\alpha$  ist ein Typ II-Transmembran-Protein mit einem intrazellulären N- Terminus und wirkt sowohl in membrangebundener Form als auch als frei im Zytoplasma löslicher Ligand. Das TNF $\alpha$ - Converting Enzyme (TACE) überführt dabei das 26kDA große, membrangebundene TNF $\alpha$  Molekül in die lösliche Form (Übersicht: siehe Elahi et al., 2009). Es existieren zwei TNF- Rezeptoren. Der TNF Rezeptor-1 (TNFR-1) befindet sich an der Oberfläche jeder Körperzelle und wirkt ausschließlich über das lösliche TNF $\alpha$ ; der TNF Rezeptor-2 (TNFR-2) wird von hämatopoetischen Zellen exprimiert und hauptsächlich durch das membrangebundene TNF $\alpha$  aktiviert (Balkwill et al., 2006). Der TNF-R1 ist in der Lage sowohl NF- $\kappa$ B zu aktivieren und somit proinflammatorisch zu wirken als auch über den Caspase-Weg apoptotische Prozesse in der Zelle hervorzurufen. Nachdem TNF $\alpha$  den TNFR-1 aktiviert hat, werden durch Rekrutierung zahlreicher intrazellulärer Signalstoffe (TNF-receptor 1-associated death domain protein, TRADD; Fas Associated protein with Death Domain, FADD; Receptor-interacting protein, RIP) pro-apoptotische Prozesse induziert. Der für die Apoptose bedeutende Signalweg ist die Rekrutierung verschiedener Caspasen. Die aktivierten Caspasen (auch Exekutive- Caspasen genannt) leiten den programmierten Zelltod auf verschiedene Ebenen ein: Sie zerstören wichtige Strukturproteine der Zelle wie z.B. wichtige Proteine der Kernmembran und das Aktinocytoskelett oder sie aktivieren eine DNase und lösen so die Zerstörung des nuklearen DNA aus. Auch die DNA-Reparatur-Mechanismen und das Zellzyklus-Kontrollsystem werden außer Kraft gesetzt (Wajant et al., 2003). Über den aktivierten TNFR-2 wird der NF- $\kappa$ B- Weg eingeschlagen und es kommt zu einer Regulation von Genen, die für eine frühe Abwehr- und Entzündungsreaktion verantwortlich sind und deren Produkte für das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung wichtig sind (Ortis et al., 2012). Somit spielt TNF $\alpha$  als eines der potentesten proinflammatorischen Zytokine bei der Entstehung von chronischen Entzündungen und den daraus resultierenden fibrotischen Prozesse eine entscheidende Rolle.

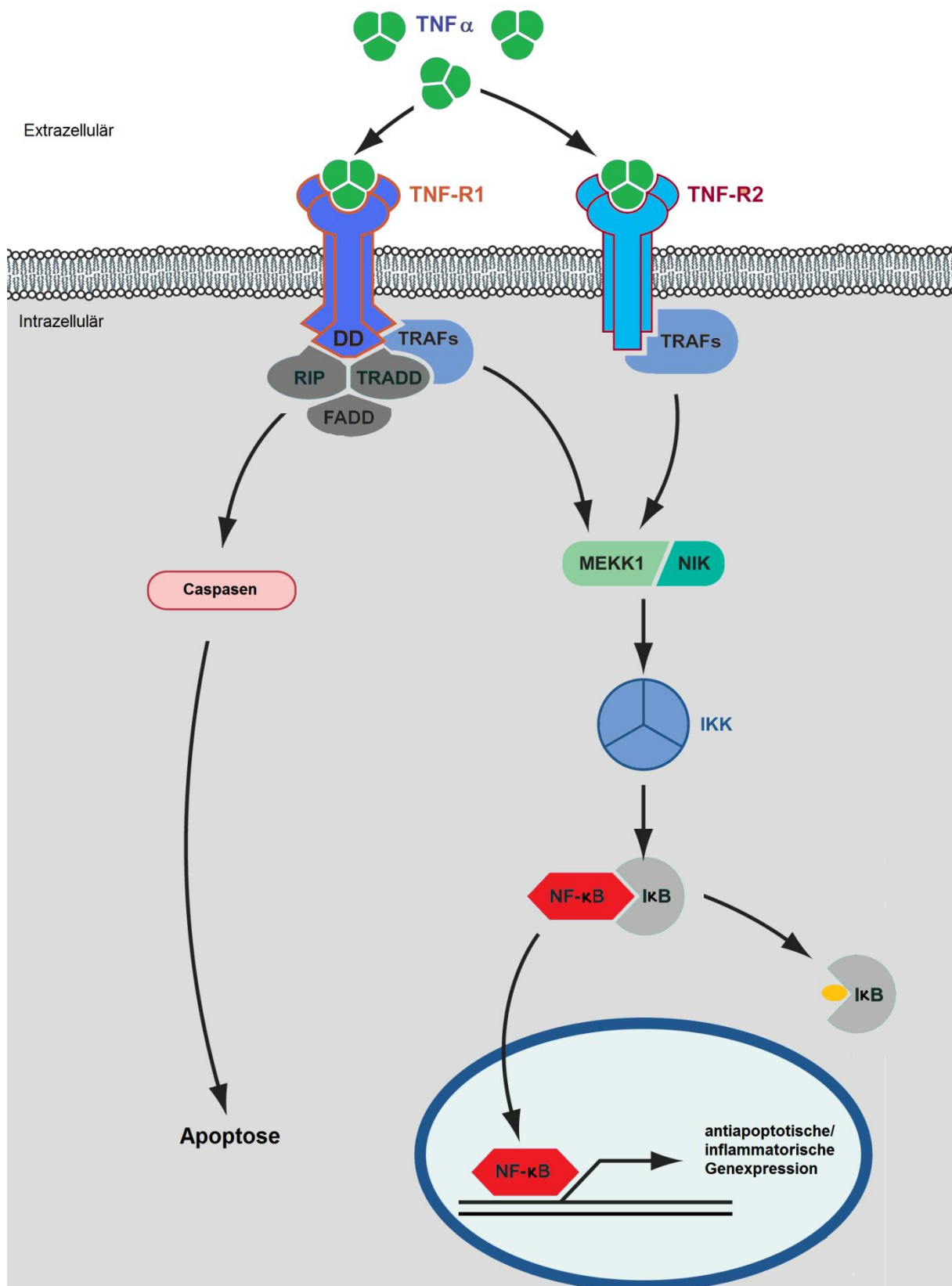


Abb. 3: Intrazelluläre Signalkaskade des TNF $\alpha$  (modifiziert nach Übersicht: siehe Rahman et al., 2006)

1985 gelang erstmals die Klonierung des menschlichen TNF $\alpha$ - Gens, welches auf dem Chromosomen 6p21.3 (Fan et al., 2011) im Zentrum des Major Histocompatibilitätskomplexes (MHC) lokalisiert ist. Die räumliche Nähe zum MHC-Gen lässt vermuten, dass TNF $\alpha$  in der Ätiologie von MHC- assoziierten Krankheiten, insbesondere in der Entstehung von entzündlichen Prozessen oder Autoimmunkrankheiten eine Schlüsselrolle spielt (Kroeger et al, 1997). In vielen Studien wurde untersucht, inwiefern sich genetische Veränderungen des TNF $\alpha$ - Gens und die daraus resultierenden unterschiedlichen Konzentrationen an TNF $\alpha$  auf die Pathophysiologie von entzündlichen und malignen Krankheiten auswirken. Besonders gut untersucht sind die Genpolymorphismen an der Stelle (-238) und (-308) des TNF $\alpha$ - Gens auf Suszeptibilität von Autoimmunkrankheiten, wie das exfoliative Glaukom, die rheumatoide Arthritis und maligne Erkrankungen wie das Lungenkarzinom, das Magenkarzinom und das Mammakarzinom (Flego et al., 2009, Yang et al., 2009 und Kohaar et al., 2009). Die in der vorliegenden Studie untersuchten Genpolymorphismen sind Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP, engl.: Single Nucleotide Polymorphism) an der Stelle (-238) und (-308) in der Promoterregion des TNF $\alpha$ - Gens. Bei beiden Genpolymorphismen handelt es sich um einen Basenaustausch von Guanin gegen Adenin (Feng et al., 2011, Liu et al., 2010). Diese Basenmutation hat einen direkten Einfluss auf die Genexpression des TNF $\alpha$  und somit potentiell auf die Suszeptibilität für fibrosierende und maligne Erkrankungen.

Unter einem Genpolymorphismus versteht man 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). Die Genpolymorphismen an der Stelle (-238) und (-308) haben aufgrund ihrer Lokalisation in der Promoterregion eine stark regulative Funktion in der Genexpression des TNF $\alpha$ . Es ist in vielen Studien nachgewiesen, dass Genpolymorphismen an dieser Stelle mit einer erhöhten Suszeptibilität diverser Lungenerkrankungen einhergehen wie beispielsweise der chronischen Bronchitis (Huang et al., 1997), der fibrosierenden Alveolitis (Whyte et al., 2000), dem Asthma (Witte et al., 2002), der Silikose (Yucesoy et al., 2001), der Grubenarbeiterpneumokoniose (Ates et al., 2008) und auch dem Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom ( Shih et al., 2006). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen den oben genannten



Genpolymorphismen und den durch Asbestfaserstaub oder Quarz verursachten fibrosierenden und malignen Lungenerkrankungen besteht.

## 2 Ziel dieser Studie

Wegen der Latenzzeit wird für die nächsten Jahre ein deutlicher Anstieg von Neuerkrankungen durch kanzerogene oder fibrogene Gefahrenstoffe am Arbeitsplatz prognostiziert. Insbesondere durch Asbest bedingte Tumorerkrankungen werden, in den kommenden Jahren an Häufigkeit zunehmen und stellen nicht zuletzt gesundheitsökonomisch ein Problem dar. Daher sind gerade auf dem Gebiet der gefahrstoffbedingten malignen und fibrosierenden Lungenerkrankungen sekundärpräventive sowie therapeutische Maßnahmen von großer Bedeutung. Arbeitsmedizinische Beobachtungen haben gezeigt, dass neben der Art und Dauer der Gefahrenstoffexposition auch individuelle Eigenschaften einen bedeutenden Einfluss auf die Entstehung und den Schweregrad der Erkrankungen haben. Als Präventivmaßnahme erscheint eine Identifizierung von Hochrisikopatienten im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen sinnvoll. Der Bestimmung von Genpolymorphismen als Suszeptibilitätsfaktoren wird eine Bedeutung zugeschrieben, die im Erkrankungsfall die Kompensation sogar erleichtern könnte.

TNF $\alpha$  gehört zu der Gruppe der Zytokine, die maßgeblich an Entzündungsreaktionen und der Tumorentstehung beteiligt sind. Die Polymorphismen (-238) und (-308) des TNF $\alpha$ - Gens können zu potentiell unterschiedlichen Empfindlichkeiten der exponierten Bevölkerung beitragen und somit die unterschiedlich ausgeprägte Suszeptibilität für Lungenerkrankungen nach Asbestfaserstaub- oder Quarzstaub- Einwirkung erklären. In der vorliegenden Studie soll das Risiko an Pneumokoniosen zu erkranken hinsichtlich des Einflusses der Genpolymorphismen (-308) und (-238) des TNF $\alpha$ - Gens als Suszeptibilitätsfaktoren geklärt werden. Es sollte insbesondere die Frage geklärt werden, inwiefern das Risiko für die Entstehung von Asbestfaserstaub verursachten Lungen- und Pleuraerkrankungen sowie den verschiedenen Schweregrade und Ausprägungsgrade der Erkrankung modifiziert wird. Dies ließe darüber hinaus weitere Einblicke in die Pathophysiologie der asbestverursachten Lungenerkrankungen zu.

## **3 Kollektiv und Methoden**

### **3.1 Patientenkollektiv und Kontrollgruppe**

Die Stichprobe bestand aus insgesamt 1196 Probanden, davon 177 gesunde Probanden sowie 1019 Patienten mit Pneumokoniosen aus dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen, vor allem waren es Patienten aus der Poliklinik für Arbeits- und Sozialmedizin, den Medizinischen Kliniken II und V sowie aus den Kliniken für Berufskrankheiten in Bad Reichenhall und Falkenstein. In die Kontrollgruppe wurden Probanden aufgenommen, die sich regelmäßig zu Vorsorgeuntersuchungen in der Poliklinik für Arbeits- und Sozialmedizin vorstellten sowie gesunde Studenten und freiwillige Mitarbeiter des Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Gießen. Zur Blutentnahme lag das Votum der Ethikkommission (AZ:75/ 06) vor. Alle freiwilligen Probanden und auch Patienten wurden ausführlich mündlich und mit Aufklärungsbögen über die Studie informiert und haben durch eine schriftliche Einverständniserklärung zur Blutentnahme sowie der anonymisierten Verwendung ihrer persönlichen Daten schriftlich zugestimmt. Das Patientenkollektiv besteht aus 944 Patienten und 75 Patientinnen, das Kontrollkollektiv aus 119 männlichen und 58 weiblichen Probanden ohne Lungenerkrankungen. Das Durchschnittsalter der Patienten beträgt 67,4 Jahre mit einer Spannweite von 29 - 91 Jahren und dem Median von 68,7 Jahren, das gesunde Kontrollkollektiv zeigt ein Durchschnittsalter von 39 Jahren bei einer Spannweite von 20 – 76 Jahren und dem Median von 39 Jahren. Hierbei ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem mittleren Alter der Patienten- und der gesunden Kontrollgruppe. Verglichen mit dem Kontrollkollektiv, das einen Raucheranteil von 58,2% darstellte, gab es im Patientenkollektiv einen deutlich höheren Anteil an Rauchern (80,6%). Insbesondere unter den an Bronchialkarzinom erkrankten Patienten waren mit 90,4% überwiegend Raucher, ein geringerer Raucheranteil zeigte sich bei den Mesotheliompatienten (42,4%).

Die 1019 Patienten wurden aufgrund der zugrundeliegenden Erkrankungen in folgende Gruppen unterteilt:

n = 395 Patienten mit Asbeststaublungenerkrankung oder durch Asbeststaub verursachte Erkrankungen der Pleura im Sinne der Berufskrankheitennummer 4103 BKV

n = 162 Patienten mit Quarzstaublungerkrankungen (Silikose) im Sinne der Berufskrankheit der Nr.4101 BKV

n = 55 Patienten mit Lungenfibrosen anderer Genese

n = 33 Patienten mit Asbestfaserstaub-verursachtem diffusen malignen Pleuramesotheliom im Sinne der Berufskrankheitennummer 4105 BKV

n = 374 Patienten mit primären histologisch gesicherten Bronchialkarzinomen, davon

n = 48 Patienten mit einem histologisch gesicherten Bronchialkarzinom im Sinne der Berufskrankheitennummer 4104 BKV „Lungenkrebs in Verbindung mit Asbeststaublungerkrankungen, mit durch Asbestfaserstaub verursachter Erkrankung der Pleura oder einer Einwirkung einer kumulativen Asbestfaserstaub-Dosis am Arbeitsplatz von mindestens 25 Faserjahren“

n = 60 Patienten mit einem Bronchialkarzinom anderer Ursachen wie beispielsweise Zigarettenrauch, die zwar potentiell einer Asbestfaserstaubbelastung ausgesetzt waren, bei denen aber die arbeitsmedizinischen Voraussetzungen zur Anerkennung einer Berufskrankheit nicht wahrscheinlich gemacht werden konnten

n= 266 Patienten mit einem histologisch gesicherten Bronchialkarzinom anderer Ursache wie beispielsweise Zigarettenrauch ohne bestehende Asbestfaserstaubeinwirkung.

Einschlusskriterien waren:

- Primäres, histologisch gesichertes Bronchialkarzinom
- Histologisch gesichertes diffuses malignes Pleuramesotheliom
- Lungenfunktionsanalytisch und radiologisch gesicherte Lungen- und/ oder Pleurafibrose

Ausschlusskriterien waren:

- Schwere Leberfunktionsstörungen
- Chronische Nierenfunktionsstörungen
- Andere maligne Tumoren

In den Tabellen 1-3 werden das Alter, das Rauchverhalten und die Geschlechtsverteilung des Patienten- und des Kontrollkollektivs dargestellt.

Tab. 1: Kontroll- und Patientenkollektiv (nach Erkrankungen) mit Darstellung des Alters

	Anzahl (n)	Alter in Jahren		
		Mittelwert	Spannweite	Median
<b>Kontrollkollektiv</b>	<b>177</b>	<b>39,1</b>	<b>20 - 75,5</b>	<b>39,4</b>
<b>Patientenkollektiv</b>	<b>1019</b>	<b>67,41</b>	<b>29,2 - 91,2</b>	<b>68,7</b>
<b>Diagnosen</b>				
<b>Lungenfibrose</b>	<b>612</b>	<b>68,14</b>	<b>29,2 - 91,2</b>	<b>69,25</b>
Silikose (BK 4101)	162	70,45	40,3 - 88,9	71,3
Asbestose (BK 4103)	395	67,84	45,7 - 91,2	68,5
<i>Lungenasbestose (BK 4103)</i>	<i>122</i>	<i>69,62</i>	<i>49,2 - 81,7</i>	<i>70,9</i>
kleine unregelmäßige Schatten (s,t,u)				
1/1 und 1/2 ILO	63	70,22	55,6 - 81,6	71,5
2/1, 2/2 und 2/3 ILO	46	68,73	49,2 - 80,0	69,75
3/2, 3/3 und 3/+ ILO	9	72,86	59,1 - 81,7	73,6
<i>Pleuraasbestose (BK 4103)</i>	<i>210</i>	<i>67,20</i>	<i>45,7 - 91,2</i>	<i>68,05</i>
verkalkende Pleuraplaques (umschrieben nach ILO)	120	68,47	51,5 - 91,2	68,7
Verbreitungsgrad				
1	35	65,67	54,3 - 91,2	65,7
2	35	69,03	57,5 - 88,0	68,7
3	46	69,79	51,5 - 87,7	71,5
hyaline Pleuraplaques (umschrieben nach ILO)	45	64,95	47,2 - 76,7	64,7
Verbreitungsgrad				
1	12	64,69	52,4 - 74,5	64,2
2	16	64,25	47,2 - 72,5	64,15
3	16	66,03	49,1 - 76,7	66,8
Hyalinosis complicata	45	66,04	45,7 - 84,4	66,9
Lungenfibrose anderer Genese	55	63,47	29,2 - 82,1	63,8
<b>Pleuramesotheliom (BK 4105)</b>	<b>33</b>	<b>65,09</b>	<b>46,3 - 75,4</b>	<b>67,0</b>
<b>Bronchialkarzinom</b>	<b>374</b>	<b>66,42</b>	<b>34,3 - 83,9</b>	<b>68,1</b>
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)	48	67,25	52,7 - 80,9	67,45
Bronchialkarzinom anderer Genese	326	66,29	34,3 - 83,9	68,1

Tab. 2: Kontroll- und Patientenkollektiv mit Darstellung des Rauchverhaltens

	Anzahl (n)	Nieraucher, n (%)	Raucher/ Ex-Raucher, n (%)
<b>Kontrollkollektiv</b>	<b>177</b>	<b>74 (42)</b>	<b>103 (58)</b>
<b>Patientenkollektiv</b>	<b>1019</b>	<b>198 (19)</b>	<b>821 (81)</b>
<b>Diagnosen</b>			
<b>Lungenfibrose</b>	<b>612</b>	<b>143 (23)</b>	<b>469 (77)</b>
Silikose (BK 4101)	162	32 (20)	130 (80)
Asbestose (BK 4103)	395	92 (23)	303 (77)
<i>Lungenasbestose (BK 4103)</i>	<i>122</i>	<i>28 (23)</i>	<i>94 (77)</i>
kleine unregelmäßige Schatten (s,t,u)			
1/1 und 1/2 ILO	63	16 (25)	47 (75)
2/1, 2/2 und 2/3 ILO	46	10 (22)	36 (78)
3/2, 3/3 und 3/+ ILO	9	1 (11)	8 (89)
<i>Pleuraasbestose (BK 4103)</i>	<i>210</i>	<i>49 (23)</i>	<i>161 (77)</i>
verkalkende Pleuraplaques (umschrieben nach ILO )	120	29 (24)	91 (76)
Verbreitungsgrad			
1	35	8 (23)	27 (77)
2	35	9 (26)	26 (74)
3	46	11 (24)	35 (76)
hyaline Pleuraplaques (umschrieben nach ILO)	45	9 (20)	36 (80)
Verbreitungsgrad			
1	12	4 (33)	8 (67)
2	16	3 (19)	13 (81)
3	16	2 (13)	14 (88)
Hyalinosis complicata	45	11 (24)	34 (76)
Lungenfibrose anderer Genese	55	19 (35)	36 (65)
<b>Pleuramesotheliom (BK 4105)</b>	<b>33</b>	<b>19 (58)</b>	<b>14 (42)</b>
<b>Bronchialkarzinom</b>	<b>374</b>	<b>36 (10)</b>	<b>338 (90)</b>
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)	48	1 (2)	47 (98)
Bronchialkarzinom anderer Genese	326	35 (11)	291 (89)

**Tab. 3: Kontroll- und Patientenkollektiv mit Darstellung der Geschlechtsverteilung**

	Geschlechtsverteilung		
	gesamt, n	männlich, n (%)	weiblich, n (%)
<b>Kontrollkollektiv</b>	<b>177</b>	<b>119 (67)</b>	<b>58 (33)</b>
<b>Patientenkollektiv</b>	<b>1019</b>	<b>944 (93)</b>	<b>75 (7)</b>
<b>Diagnosen</b>			
<b>Lungenfibrose</b>	<b>612</b>	<b>585 (96)</b>	<b>27 (4)</b>
Silikose (BK 4101)	162	160 (99)	2 (1)
Asbestose (BK 4103)	395	380 (96)	15 (4)
Lungenfibrose anderer Genese	55	45 (82)	10 (18)
<b>Pleuramesotheliom (BK 4105)</b>	<b>33</b>	<b>32 (97)</b>	<b>1 (3)</b>
<b>Bronchialkarzinom</b>	<b>374</b>	<b>327 (87)</b>	<b>47 (13)</b>
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)	48	47 (98)	1 (2)
Bronchialkarzinom anderer Genese	326	280 (86)	46 (14)

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 4 entnommen werden.

**Tab. 4: Anerkannte BK- Fälle des Patientenkollektivs**

BK- Nr.	Anzahl [n]	Bezeichnung
4101	162	Quarzstaublungerkrankungen
4103	395	Asbestfaserstaublungerkrankungen oder durch Asbeststaub verursachte Erkrankungen der Pleura
4104	48	Lungenkrebs in Verbindung mit Asbestfaserstaub verursachten Lungenerkrankungen, mit durch Asbestfaserstaub verursachten Erkrankungen der Pleura oder einer Einwirkung einer kumulativen Asbestfaserstaub- Dosis am Arbeitsplatz von mind. 25 Faserjahren
4105	33	Pleuramesotheliom durch Asbesteinwirkung

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.

### 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. Caterin Ltd, UK
Glaswaren	Schott AG, Mainz
LightCycler	Roche Diagnostic GmbH Mannheim
LightCycler Zentrifugen Adapter Kühlblock	Roche Diagnostic GmbH Mannheim
Netzgerät Consort E 835	Consort, Tumbhout, Belg
Pipetten	Gilson Inc., Middleton, USA
Thermoblock	HCL, Bovenden
Tischzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Tuttnauer Tischautoklav 2540 EL	Systeme GmbH Laborsystemtechnik, Wellenberg
Vortexer	Heidolph, Schwalbach
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen



### 3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Butterfly- Kanüle (21G)	Kabe Labortechnik, Nümbrecht- Elsenroth
Einmalhandschuhe	NOBA Verbandmaterial 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

DECP (Diethylen Pyrocarbinat) H <sub>2</sub> O	1ml DEPC ad 1000ml H <sub>2</sub> O
--	-------------------------------------

### 3.2.4 Reagenzien

Anchor 3FL	Tib- Molbiol, Berlin
-308 [G]	Tib- Molbiol, Berlin
-238 [G]	Tib- Molbiol, Berlin
TNF -396	Tib- Molbiol, Berlin
TNF -069	Tib- Molbiol, Berlin
MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid)	Roche, Mannheim
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt

### 3.2.5 Kits

Versagene <sup>TM</sup> 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 Isolierung wurden 3,5ml venöses Ethylendiamintetraacetat (EDTA)- Blut verwendet. Das Blut wurde mit den Versagene™ DNA- Isolierungskit nach Herstellerangaben behandelt. Zunächst wurden 3 ml EDTA-Blut zur Lyse der Erythrocyten mit RBC-Lysis-Solution in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 1 min bei 2000 Runden pro Minute (rpm) zentrifugiert. Die Leukocyten setzten sich als Pellet ab. Nach Verwerfen der Überstandes wurde der oben beschriebene Vorgang wiederholt. Das gewonnene Pellet wurde anschließend in 400µl Lösungspuffer gelöst. Nach Zugabe von 700µl im Kit enthaltenem Bindepuffer konnte die Lösung auf die sogenannte Purification- Säule aufgetragen werden. Der Bindepuffer war nötig, um die DNA in der Membran der Säule zu fixieren. Nachdem das Gemisch für 1 min bei 7000rpm zentrifugiert wurde, wurde das Filtrat verworfen. Nach Zugabe von 200µl der im Kit enthaltenen Waschlösung wurden alle Bestandteile des Lysats mit Ausnahme der DNA durch 2 min Zentrifugieren bei 13000rpm aus der Membran gewaschen. Zum Lösen der DNA wurde zunächst die Säule in ein neues Reagenzgefäß gebracht. Anschließend wurden 100µl im Kit enthaltene Elutions-Lösung auf die Membran gegeben. Nach 5-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur und Zentrifugation (1min bei 13000rpm) konnte die gewonnene DNA bei -20 °C gelagert werden.

#### 3.3.2 Messung der DNA- Konzentration mittels Photometrie

Für die photometrische Bestimmung der DNA- Konzentration wurden 2µl DNA- Lösung mit 198µl H<sub>2</sub>O verdünnt. Da die optische Dichte (OD)=1 bei 260nm einer DNA- Konzentration von 50ng/µl entspricht, ließ sich die DNA- Konzentration photometrisch mit folgender Formel berechnen:

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

#### 3.3.3 Die PCR (Polymerase Chain Reaction)

Mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) können bestimmte DNA- Sequenzen selektiv amplifiziert werden. Der PCR- Vorgang durchläuft mehrere Zyklen, welche grundsätzlich in drei Abschnitte unterteilt werden: die Denaturierungsphase, die Annealingphase und die Extensionsphase. In der ersten Phase wird der Reaktionsansatz auf 95°C erhitzt, so dass sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen

der DNA- Sequenzen lösen und die DNA in zwei Einzelstränge zerfällt. In der Annealingphase lagern sich die im Reaktionsansatz befindlichen Primer (zur DNA komplementäre Oligonukleotide) an die entstandene Matrize an und bilden so den Startpunkt für die weitere Komplementierung. Die Annealingtemperatur ist die primer-spezifische Temperatur, bei der sich die Primer an die DNA-Matrize anlagern. In der Extensionsphase werden komplementäre Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) dATP, dGTP, dCTP und dTTP mittels der taq- Polymerase eingesetzt bis sich ein vollständig neuer DNA- Strang gebildet hat. Die Extension fand bei einer Temperatur von 72°C und bei einer Geschwindigkeit von 75 Nukleotiden pro Sekunde von 5' zum 3' Ende statt. Das bedeutet, dass sich der DNA- Strang um 75 Nukleotide pro Sekunde verlängerte. Der neu entstandene DNA- Strang dient im darauffolgenden Zyklus ebenfalls als Matrize zur Amplifizierung, sodass die Vervielfältigung der Ziel- DNA exponentiell ansteigt.

### **3.3.3.1 Qualitative Analyse mit dem Light Cycler-Gerät**

Mit dem LightCycler-System kann man zwei oder mehrere Gensequenzen in einer Probenmischung detektieren. Die Proben benötigen dabei zwei sequenzspezifische Hybridisierungssonden, welche aus verschiedenen langen Oligonukleotiden bestehen und während der Annealing- Phase an die Basensequenz des zu amplifizierenden Genabschnittes binden. Die Detektion beruht auf das FRET- Prinzip (**F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer). Eine Hybridisierungssonde stellt die Donorsonde dar, welche am 3' Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein markiert ist. Die Akzeptorsonde ist am 5' Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Red640 oder Red705 Fluorophore markiert und zusätzlich am 3' Ende phosphoryliert, um eine Extension des DNA -Stranges durch die taq-Polymerase zu verhindern. Binden die beiden Hybridisierungssonden in räumlicher Nähe an die komplementäre DNA, kann ein Energietransfer (FRET) zwischen beiden Fluoreszenzfarbstoffen stattfinden. Während des FRET wird der Donor- Fluorophore der ersten Sonde, das Fluorescein, durch eine externe Lichtquelle angeregt und gibt einen Teil dieser Energie an das Akzeptor Fluorophore (Red640 bzw. Red705) der zweiten Sonde weiter. 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 weitergibt. Die emittierte Fluoreszenz des zweiten Fluorophores wird über eine Kombination von halbdurchlässigen Spiegeln und wellenlängenspezifischen Filtern zu den drei

Photohybriden (530nm, 640nm, 710nm) weiter. Diese wandeln das optische Signal in ein elektrisches Signal um, welches sofort über die serielle Schnittstelle zum PC übermittelt wird. Man kann so den Verlauf der PCR ohne Zeitverzögerung am Rechner verfolgen und bereits während des PCR-Laufs Aussagen über den Erfolg treffen. Nach jeder Annealing-Phase wird automatisch die momentane Fluoreszenz gemessen, deren Intensität direkt proportional zur Menge der Ziel-DNA steht. Da aber das Fluorescein auch ohne an der DNA gebunden zu sein, messbares Licht abgibt, muss dieser Fluoreszenzanstieg im Verhältnis zum Fluorescein gesehen werden ( $F2/F1$ ;  $F2 = \text{Red640}$ ,  $F1 = \text{Fluorescein}$ ).

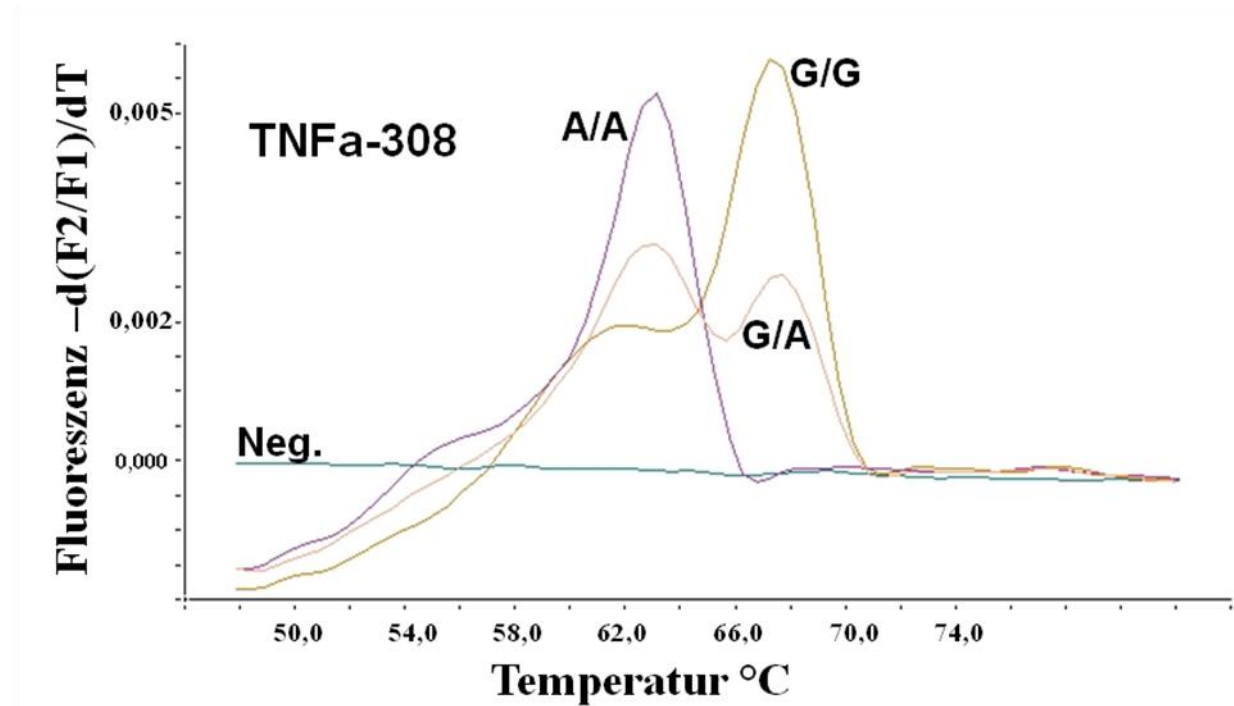
Es besteht die Möglichkeit, in einem LightCycler-Lauf zwei Sondenpaare zu verwenden und somit in einem Lauf gleichzeitig zwei Polymorphismen zu bestimmen. Dabei ist eine LC-Sonde an den Fluoreszenzfarbstoff Red640 und die andere an Red705 gebunden. Da sich aber bei der Auswertung  $F2/F1$  (Red640/ Fluorescein) und  $F3/F1$  (Red705/ Fluorescein) die Emissionsspektren der beiden gleichzeitig gemessenen Fluoreszenzfarbstoffe überlagern, erfolgt durch die Light-Cycler-Software eine Korrektur mittels eines Color Compensation Kits. Während eines Kalibrierungslaufes misst der LightCycler die Fluoreszenz aller Farbstoffe in jedem Kanal und stellt dann einen Color Compensation-Ordner her, damit später die LightCycler-Software die Fluoreszenz in jedem Kanal dem entsprechenden Farbstoff zuordnen kann. Das Resultat ist die Detektion einer einzelnen Sonde im jeweiligen Kanal.

### **3.3.3.2 Analyse von Punktmutationen mittels LightCycler**

Die Detektion von Punktmutationen mittels Hybridisierungssonden basiert auf Schmelzkurvenanalysen im LightCycler. Beim Schmelzvorgang führt die Wärmezufuhr zu einer Trennung von Sonde und Ziel-DNA. Da die Hybridisierungssonde genau im Bereich der Punktmutation an die Ziel-DNA bindet, schmilzt diese bei Vorhandensein einer Mutation (eine Basenpaarung weniger) bei niedrigerer Temperatur im Vergleich zu einer perfekt passenden Mutationsprobe. Anhand der unterschiedlichen Schmelztemperaturen kann die Punktmutation detektiert werden. In dieser Studie passte die Sonde genau auf den Wildtyp, sodass die Schmelzkurve bei höherer Temperatur dem homozygoten Wildtyp zugeordnet konnte und die Kurve bei niedrigerer Temperatur dem homozygoten Mutationstyp. Der zweigipflige Verlauf der Kurve zeigt den heterozygoten Mutationstyp an, bei dem sowohl der Wildtyp als auch die Mutation jeweils auf einem Allel vorhanden sind. Der Anstieg der Fluoreszenz ist direkt

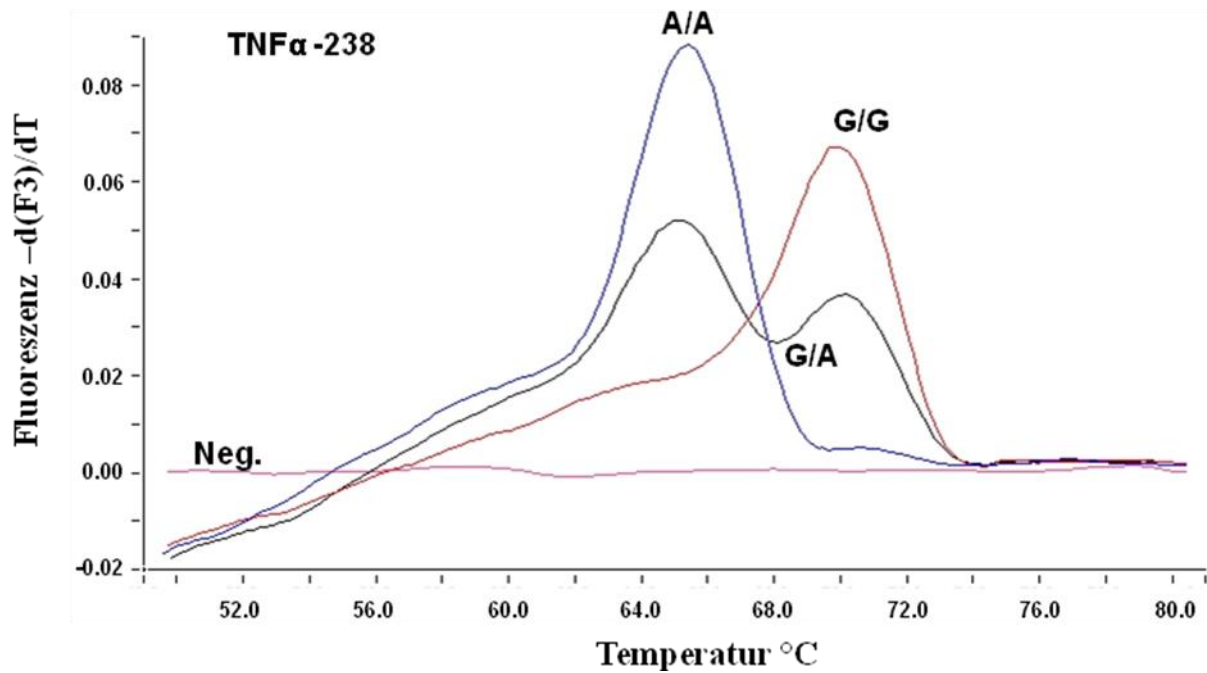
proportional zur DNA- Konzentration, bei der Ableitung der Fluoreszenz über die Zeit ( $dF/dt$ ) erhält man die in Abbildung 1-2 dargestellten Kurven:

Der Red640- Fluoreszenzfarbstoff ist im Kanal F2 dargestellt.



**Abb. 4: Schmelzkurven für die Promoterregion -308 des TNF $\alpha$  Gens**

Ableitung der Schmelzkurve ( $-dF/dt$ ) des Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens. Die Maxima der Schmelzkurven liegen für den homozygoten Mutantentyp A/A bei 64,5°C. und für den Wildtyp G/G (homozygot) bei 67°C. Der heterozygote Genotyp zeigt eine biphasische Schmelzkurve mit Temperaturen bei 64,5°C und 67°C. Neg.= Negativkontrolle



**Abb. 5: Schmelzkurven für die Promoterregion (-238) des TNF $\alpha$ - Gens**

Ableitung der Schmelzkurve ( $-dF/ -dt$ ) des Polymorphismus (-238) des TNF $\alpha$ - Gens. Die Maxima der Schmelzkurven liegen für den für den homozygoten Mutantentyp A/A bei 64,5°C. und für den Wildtyp G/G (homozygot) bei 69,5°C. Der heterozygote Genotyp zeigt eine biphasische Schmelzkurve mit Temperaturen bei 64,5°C und 69,5°C. Neg.= Negativkontrolle

### 3.3.3.3 Ansatz und Protokoll für die qualitative PCR im LightCycler

Unter sterilen Bedingungen wurde der LightCycler®-Kit (Fast Start DNA Master Hybridization Probes, Roche) nach Herstellergaben angesetzt. Das Endvolumen des Ansatzes betrug 20µl. In jedem wurden sowohl eine Negativ- als auch Positivkontrollen mitgemessen.

Tab. 5: Pipettierschema für Fast Start Master Hybridisation Probes, Roche

Reagenz	pro Probe (µl)
H <sub>2</sub> O	12
MgCl <sub>2</sub>	0,8
Mix Roche (1)	2
Sensor -238 (100µM) 1:10	0,4
Sensor -308 (100µM) 1:10	0,4
Primer TNF -396 (100µM) 1:10	1
Primer TNF -069 (100µM) 1:10	1
Anchor (100µM) 1:10	0,4
DNA Probe 1:10	2
gesamt PCR-Ansatz:	20

### 3.3.3.4 Primer und Sondensequenzen

Tab. 6: Primersequenzen und Sondensequenzen der qualitativen PCR TNFα – 396 und TNFα -238

	TNF α [G-308][G-238] Promoter
TNF -396 for	5'TTCCTgCATCCTgTCTggAA 3'
TNF -069 re	5'CAgCggAAAACCTTCCTTggT 3'
Sonde -308 [G]	AATAggTTTTgAggggCATggggACT- LC640
ANCHOR	Fl- TTCAgCCTCCAgggTCCTACACACAAATCAgTCAgTggCCC AgAAgA XT
Sonde -238 [G]	705- CCTCggAATCggAgCAgggAggA p

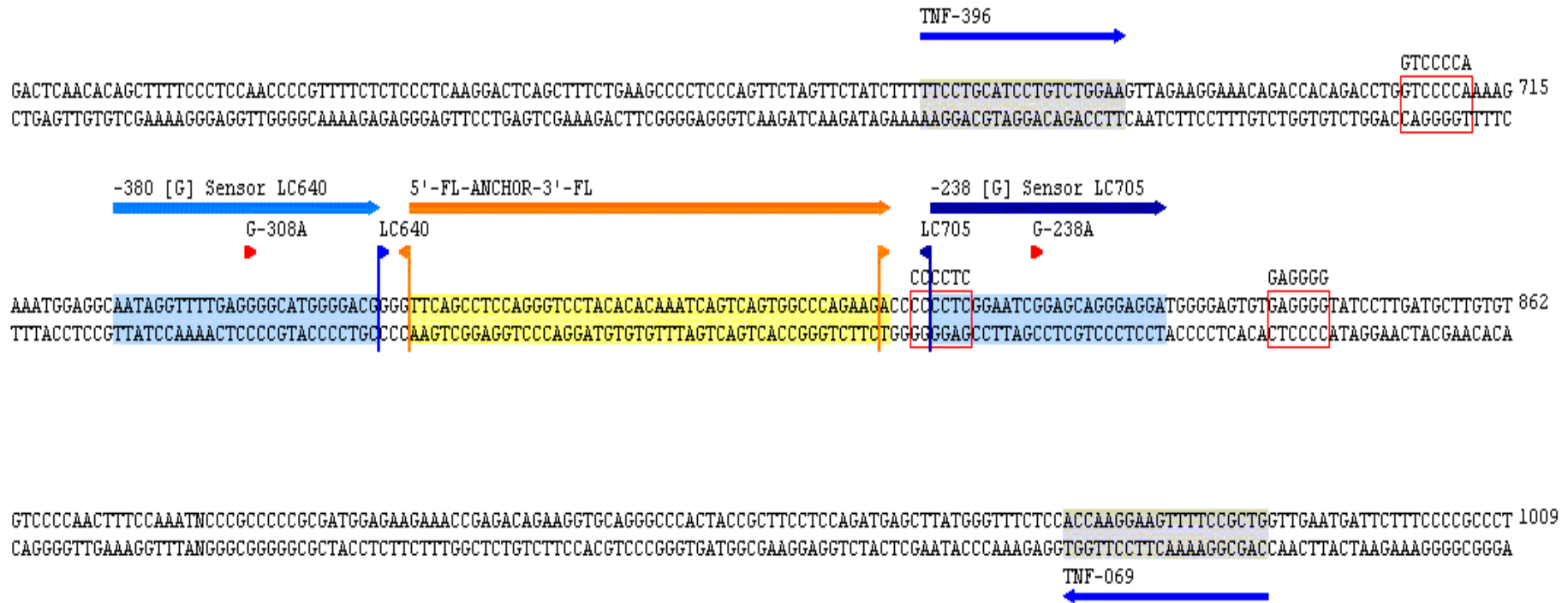


Abb. 6: Sequenz der untersuchten Genregion des TNF $\alpha$  Gens mit Markierung der Ansatzstellen für die in der Real-Time PCR bei -308 und -238 verwendeten Sonden (Sonde -308 und Sonde -238) und Primer (TNF-396 und TNF -069). An Stelle -308 und -238 befinden sich die Punktmutationen von Guanin zu Adenin, siehe kleine rote Pfeile



### 3.3.3.5 Versuchsbedingungen

Tab. 7: Programmierung der PCR. Analyse mittels LightCycler

Programm	Temperatur [°C]	Dauer [Sek.]	Slope [°C/Sek.]	Zyklen
Aktivierung	95	600	20	1
PCR				50
Denaturierung	95	5	20	
Annealing	55	10	20	
Synthese	72	15	5	
Melting	95 45 85	20 20 0	20 20 0,2	1
PCR				5
Denaturierung	95	5	20	
Annealing	57	10	20	
Synthese	72	15	5	
Melting	95 45 85	20 20 0	20 20 0,2	1
Melting	95 45 85	0 20 0	20 20 0,1	1
Melting	95 45 85	0 20 0	20 20 0,5	
Cooling	35	30	20	1

### 3.3.3.6 Codierung der Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse

Wie in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt können die verschiedenen Genotypen anhand der Schmelzkurven detektiert und mit einer Zahl kodiert werden. Zusammen mit weiteren Informationen wie beispielsweise Erkrankungen, Alter und Rauchverhalten kann eine Datenbank (dbf- Datei) mit dem Programm FoxPro2 erstellt werden. Alle Probanden mit dem homozygoten Wildtyp (wt/wt) erhielten die Codierung „1“, alle mit dem heterozygoten Genotyp (wt/mt) die Nummer „2“ und Probanden mit homozygoten Mutantallelenn (mt/mt) die Nummer „3“. Diese Kodierung wurde jeweils für den (-238) und (-308) Polymorphismus durchgeführt.

### 3.3.4 Statistische Methoden

Die Allelfrequenzen für das Wildtyp Allel wurden mit folgender Formel ermittelt:

$$p = (2AA + 1AB) / n$$

Die Allelfrequenzen für das Mutante Allel wurden mit folgender Formel ermittelt:

$$q = (AB + 2BB) / n$$

$p$  = Allelfrequenz für A

$q$  = Allelfrequenz für B

AA = homozygote Wildtypen

AB = homozygote Mutanten

BB = heterozygote

$n$  = Anzahl gesamt also  $2(AA+AB+BB)$

Nimmt man das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht einer idealen Population an, so gelten folgende Formeln:

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

$$p + q = 1$$

Die erwarteten Genotypfrequenzen wurden somit aus den beobachteten Frequenzen nach folgenden Formeln berechnet:

$$h(AA) = p^2$$

$$h(Aa) = 2pq$$

$$h(aa) = q^2$$

$h(AA)$  = erwartete Frequenz für den Genotyp AA

$h(aa)$  = erwartete Frequenz für den Genotyp BB

$h(Aa)$  = erwartete Frequenz für den Genotyp AB

$p$  = beobachtete Frequenz für Allel A

$q$  = beobachtete Frequenz für Allel B

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde mit dem Chi-Quadrat Test überprüft.

Die Odds- Ratio (geschätztes Risiko) wurde mittels binär logistischer Regression bestimmt. Dazu wurde die Software SPSS, Version 17.0 eingesetzt. Sie basiert auf folgender Vierfeldertafel:

	Fälle	Kontrollen
Wildtypen	A	B
Variante Typen	C	D

Die rohe Odds Ratio berechnet sich anhand der Formel:

$$OR = A \times D / B \times C$$

Die rohen ORs wurden mittels Vierfeldertafel ermittelt. Die Adjustierung erfolgte nach Alter, Geschlecht und Raucherstatus in Packungsjahren. Ein Packungsjahr ist definiert als die täglich gerauchte Anzahl von 20 Zigaretten (1 Packung) über die Dauer eines Jahres. 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.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Polymorphismus und Genotypbeschreibung an der Stelle (-308) des TNF $\alpha$ - Gens

Der Polymorphismus des TNF  $\alpha$ - Gens an der Stelle (-308) beruht auf eine Punktmutation, bei der Guanin (Wildtyp) gegen Adenin (Mutante) ausgetauscht wird. Die veränderte Basensequenz stellt den mutierten Genotypen dar, dieser wird in Tabelle 8 als „mt“ bezeichnet. Der Wildtyp wird als „wt“ bezeichnet.

Das Gesamtkollektiv zeigt bezüglich des Polymorphismus (-308) folgende Genotypenverteilung: Der homozygote Wildtyp (G-308G) hat mit 73,3% den höchsten Anteil am Gesamtkollektiv. 24,3% zeigen einen heterozygoten Genotyp (G-308A). Der homozygote mutante Genotyp (A-308A) hat einen geringen Anteil von 2,3%. Daraus ergibt sich eine Allelfrequenz des mutierten Allels im Gesamtkollektiv von 14,5%.

Das Patientenkollektiv zeigt eine ähnliche Genotypverteilung: Der Anteil des homozygoten Wildtyps (G-308G) ist mit 72,7% am höchsten, der heterozygote Genotyp (G-308A) weist 24,8% auf und der homozygot mutante Genotyp (A-308A) nur 2,45%. Daraus ergibt sich eine Allelfrequenz des mutierten Allels im Patientenkollektiv von 14,8%. Die Genotypverteilung für den Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens hinsichtlich der verschiedenen Erkrankungen ist Tabelle 8 zu entnehmen.

Auch für das Kontrollkollektiv ist die Genotypverteilung ähnlich: Der homozygote Wildtyp (G-308G) ist mit 76,8% vertreten, 21,5% haben einen heterozygoten Genotyp (G-308A) und 1,7% weisen den homozygot mutanten Genotyp (A-308A) auf. Daraus ergibt sich eine Allelfrequenz des mutierten Allels im Kontrollkollektiv von 12,4%. Genaue Angaben zur Genotypverteilung zeigen die Tabellen 8 und 11.

Für den Polymorphismus (-308) zeigen sich im Vergleich zum Kontrollkollektiv unter den an einer Asbestose erkrankten Patienten mit der BK Nr. 4103 (0,180), insbesondere unter den an einer Lungenasbestose der ILO- Streuung 2/1, 2/2 und 2/3 erkrankten Patienten (0,278) und den an hyalinen Pleuraplaques erkrankten Patienten (0,244) (Ausprägungsgrad 1: 0,375, Ausprägungsgrad 2: 0,219 und Ausprägungsgrad 3:0,188) höhere Allelfrequenzen für das mutierte Allel A auf. Die Gruppe der asbestinduzierten Bronchialkarzinompatienten mit der BK Nr. 4104 (0,063) und die der Mesotheliompatienten (0,091) zeigten dagegen niedrigere Allelfrequenzen.

Tab. 8: Genotypverteilung für den Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens

	Anzahl (n)	Genotypenverteilung, n (%)		
		wt/wt n (%)	wt/mt n (%)	mt/mt n (%)
<b>Kontrollkollektiv</b>	<b>177</b>	<b>136 (76,8)</b>	<b>38 (21,5)</b>	<b>3 (1,7)</b>
<b>Patientenkollektiv</b>	<b>1019</b>	<b>741 (72,7)</b>	<b>253 (24,8)</b>	<b>25 (2,5)</b>
<b>Diagnosen</b>				
<b>Lungenfibrose</b>	<b>612</b>	<b>424 (69,3)</b>	<b>168 (27,5)</b>	<b>20 (3,3)</b>
Silikose (BK 4101)	162	117 (72,2)	41 (25,3)	4 (2,5)
Asbestose (BK 4103)	395	268 (67,8)	112 (28,4)	15 (3,8)
<i>Lungenasbestose (BK 4103)</i> kleine unregelmäßige Schatten (s,t,u)	122	84 (68,9)	37 (30,3)	1 (0,8)
1/1 und 1/2 ILO	63	44 (69,8)	19 (30,2)	0 (0)
2/1, 2/2 und 2/3 ILO	46	32 (69,6)	13 (28,3)	1 (2,2)
3/2, 3/3 und 3/+ ILO	9	4 (44,4)	5 (55,6)	0 (0)
<i>Pleuraasbestose (BK 4103)</i>	210	144 (68,6)	56 (26,7)	10 (4,8)
verkalkende Pleuraplaques (umschrieben nach ILO ) Verbreitungsgrad	120	86 (71,7)	30 (25)	4 (3,3)
1	35	24 (68,6)	11 (31,4)	0 (0)
2	35	27 (77,1)	7 (20)	1 (0,8)
3	46	31 (67,4)	12 (26,1)	3 (6,5)
hyaline Pleuraplaques (umschrieben nach ILO) Verbreitungsgrad	45	27 (60)	14 (31,1)	4 (8,9)
1	12	5 (41,7)	5 (41,7)	2 (16,6)
2	16	10 (62,5)	5 (31,3)	1 (6,2)
3	16	11 (68,8)	4 (25)	1 (6,2)
Hyalinosis complicata	45	31 (68,9)	12 (26,7)	2 (4,4)
Lungenfibrose anderer Genese	55	39 (70,9)	15 (27,3)	1 (1,8)
<b>Pleuraesotheliom (BK 4105)</b>	<b>33</b>	<b>27 (81,8)</b>	<b>6 (18,2)</b>	<b>0 (0)</b>
<b>Bronchialkarzinom</b>	<b>374</b>	<b>290 (77,5)</b>	<b>79 (21,1)</b>	<b>5 (1,4)</b>
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)	48	43 (89,6)	4 (8,3)	1 (2,1)
Bronchialkarzinom anderer Genese	326	247 (75,8)	75 (23)	4 (1,2)

## **4.2 Polymorphismus und Genotypbeschreibung an der Stelle (-238) des TNF $\alpha$ - Gens**

Der Polymorphismus (-238) des TNF  $\alpha$ - Gens beruht auf eine Punktmutation, bei der Guanin (Wildtyp) gegen Adenin ausgetauscht wird. Die veränderte Basensequenz stellt den mutierten Genotyp dar und wird in Tabelle 9 mit „mt“ bezeichnet. Der Wildtyp wird als „wt“ bezeichnet.

Das Gesamtkollektiv zeigt bezüglich des Polymorphismus (-238) folgende Genotypenverteilung: Die Mehrzahl der Fälle weist einen homozygoten Wildtyp (G-238G) auf (90,3%), der heterozygoter Genotyp (G-238A) hat einen Anteil von 9,6% und nur 0,1% zeigen einen homozygot mutanten Genotyp (A-238A). Daraus ergibt sich eine Allelfrequenz des mutierten Allels im Gesamtkollektiv von 4,8%.

Für das Patientenkollektiv und das Kontrollkollektiv sind die Genotypverteilungen annähernd gleich. Auffallend ist in allen drei Gruppen (wt/wt, wt/mt und mt/mt) der sehr geringe Anteil an homozygoten Mutanten (A-238A). Im Kontrollkollektiv beträgt dieser 0%. Die Allelfrequenz des mutierten Allels ergibt für das Patientenkollektiv lediglich 5% und für das Kontrollkollektiv 4,2%. Genaue Angaben zur Genotypverteilung zeigen die Tabellen 9 und 10.

Im Vergleich zum Kontrollkollektiv ergeben sich für den Polymorphismus (-238) unter den an Asbestose erkrankten Patienten mit einer Berufskrankheit der Nr. 4103 BKV (0,098) und den an Pleuraasbestose mit hyalinen Pleuraplaques Grad 3 erkrankten Patienten (0,094) erhöhte Allelfrequenzen für das mutierte Allel A. Dagegen weisen die an asbestbedingtem Bronchialkarzinom erkrankten Patienten (Nr. 4104 BKV) niedrigere Allelfrequenzen auf (0,021).

Die Gesamtstichprobe findet sich bezüglich beider Polymorphismen im Hardy-Weinberg- Gleichgewicht:  $\chi^2=2,395$  für den TNF $\alpha$  Polymorphismus (-238) und  $\chi^2=0,49$  für den TNF $\alpha$  Polymorphismus (-308).

Tab. 9: Genotypverteilung für den Polymorphismus (-238) des TNF $\alpha$ - Gens

	Anzahl (n)	Genotypenverteilung, n (%)		
		wt/wt n (%)	wt/mt n (%)	mt/mt n (%)
<b>Kontrollkollektiv</b>	<b>177</b>	<b>162 (91,5)</b>	<b>15 (8,5)</b>	<b>0 (0)</b>
<b>Patientenkollektiv</b>	<b>1019</b>	<b>918 (90,1)</b>	<b>100 (9,8)</b>	<b>104 (0,1)</b>
<b>Diagnosen</b>				
<b>Lungenfibrose</b>	<b>612</b>	<b>550 (89,9)</b>	<b>61 (9,9)</b>	<b>1 (0,2)</b>
Silikose (BK 4101)	162	144 (88,9)	17 (10,5)	1 (0,6)
Asbestose (BK 4103)	395	356 (90,1)	39 (9,9)	0 (0)
<i>Lungenasbestose (BK 4103)</i> kleine unregelmäßige Schatten (s,t,u)	122	110 (90,2)	12 (9,8)	0 (0)
1/1 und 1/2 ILO	63	58 (92,1)	5 (7,9)	0 (0)
2/1, 2/2 und 2/3 ILO	46	41 (89,1)	5 (10,9)	0 (0)
3/2, 3/3 und 3/+ ILO	9	8 (88,9)	1 (11,1)	0 (0)
<i>Pleuraasbestose (BK 4103)</i>	210	188 (89,5)	22 (10,5)	0 (0)
verkalkende Pleuraplaques (umschrieben nach ILO ) Verbreitungsgrad	120	108 (90)	12 (10)	0 (0)
1	35	30 (85,7)	5 (14,3)	0 (0)
2	35	34 (97,1)	1 (2,9)	0 (0)
3	46	40 (86,9)	6 (13,1)	0 (0)
hyaline Pleuraplaques (umschrieben nach ILO) Verbreitungsgrad	45	40 (88,9)	5 (11,1)	0 (0)
1	12	11 (91,7)	1 (8,3)	0 (0)
2	16	15 (93,8)	1 (6,2)	0 (0)
3	16	13 (81,2)	3 (18,8)	0 (0)
Hyalinosis complicata	45	40 (88,9)	5 (11,1)	0 (0)
Lungenfibrose anderer Genese	55	50 (90,9)	5 (9,1)	0 (0)
<b>Pleuramesotheliom (BK 4105)</b>	<b>33</b>	<b>30 (90,9)</b>	<b>3 (9,1)</b>	<b>0 (0)</b>
<b>Bronchialkarzinom</b>	<b>374</b>	<b>338 (90,4)</b>	<b>36 (9,6)</b>	<b>0 (0)</b>
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)	48	46 (95,8)	2 (4,2)	0 (0)
Bronchialkarzinom anderer Genese	326	292 (89,6)	34 (10,4)	0 (0)

**Tab. 10: Genotypverteilung und Allelfrequenzdarstellung für den Polymorphismus (-308) und (-238) des TNF $\alpha$ -Gens (Synopsis)**

TNF- $\alpha$ Genotypen	TNF- $\alpha$ (-238)			q(A) =	TNF- $\alpha$ (-308)			q(A) =
	G/G	G/A	A/A		G/G	G/A	A/A	
<b>Kontrollkollektiv</b>	<b>162</b>	<b>15</b>	<b>0</b>	<b>0,042</b>	<b>136</b>	<b>38</b>	<b>3</b>	<b>0,124</b>
<b>Lungenfibrose</b>	<b>550</b>	<b>61</b>	<b>1</b>	<b>0,051</b>	<b>424</b>	<b>168</b>	<b>20</b>	<b>0,169</b>
Asbestose (BK 4103)	356	39	0	0,098	268	112	15	0,180
Silicose (BK 4101)	144	17	1	0,059	117	41	4	0,151
Lungenfibrose anderer Genese	50	5	0	0,045	39	15	1	0,155
Lungenasbestose	110	12	0	0,049	84	37	1	0,160
1/1 und 1/2 ILO	58	5	0	0,039	44	19	0	0,151
2/1, 2/2 und 2/3 ILO	41	5	0	0,054	32	13	1	0,167
3/2, 3/3 und 3/+ ILO	8	1	0	0,055	4	5	0	0,278
Pleuraasbestose	188	22	0	0,052	144	56	10	0,181
verkalkende Pleuraplaques								
insgesamt	108	12	0	0,050	86	30	4	0,158
Verbreitungsgrad 1	30	5	0	0,071	24	11	0	0,157
Verbreitungsgrad 2	34	1	0	0,014	27	7	1	0,129
Verbreitungsgrad 3	40	6	0	0,065	31	12	3	0,196
hyaline Pleuraplaques								
insgesamt	40	5	0	0,055	27	14	4	0,244
Verbreitungsgrad 1	11	1	0	0,042	5	5	2	0,375
Verbreitungsgrad 2	15	1	0	0,031	10	5	1	0,219
Verbreitungsgrad 3	13	3	0	0,094	11	4	1	0,188
Hyalinosis complicata	40	5	0	0,055	31	12	2	0,177
<b>Bronchialkarzinom</b>	<b>338</b>	<b>36</b>	<b>0</b>	<b>0,048</b>	<b>290</b>	<b>79</b>	<b>5</b>	<b>0,119</b>
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom	46	2	0	0,021	43	4	1	0,063
Bronchialkarzinom anderer Genese	292	34	0	0,052	247	75	4	0,127
<b>Mesotheliom (BK 4105)</b>	<b>30</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0,045</b>	<b>27</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0,091</b>



### **4.3 Risikoabschätzung mittels der Odds Ratio Analyse für gefahrstoffbedingte Erkrankungen der Lunge und der Pleura in Abhängigkeit von den Polymorphismen an der Stelle (-308) und (-238) des TNF $\alpha$ - Gens**

Inwieweit das Risiko einer gefahrstoffbedingten Erkrankung der Lunge oder der Pleura von den beschriebenen Polymorphismen an der Stelle (-308) und (-238) des TNF $\alpha$ -Gens abhängt, sollen anhand der Ergebnisse der Odds Ratio Analyse dargestellt werden. Hierbei wurden die Patienten mit den jeweiligen Erkrankungen und Gefahrstoffeinwirkungen den gesunden Kontrollpersonen ohne Gefahrstoffeinwirkung gegenübergestellt. Bezüglich des Polymorphismus wurden alle Personen mit mindestens einem mutierten Allel (wt/mt oder mt/mt) den Probanden mit dem homozygoten Wildtyp (wt/wt) gegenübergestellt. Zunächst wurden die rohen Odds Ratios für die einzelnen Diagnosen errechnet, anschließend wurden Adjustierungen in Bezug auf das Alter, das Geschlecht und das Rauchverhalten vorgenommen. Somit kann der Einfluss dieser Parameter auf das Erkrankungsrisiko eliminiert werden.

#### **4.3.1 Erkrankungsrisiko für gefahrstoffbedingte Erkrankungen der Lunge und der Pleura in Abhängigkeit von dem Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens**

Die Ergebnisse der Odds Ratio Analyse bei Patienten mit mindestens einem mutierten Allel (A) des Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens ergeben ein grenzwertig signifikant erhöhtes Risiko für die fibrotisierenden Erkrankungen der Lunge und der Pleura ( $OR_{roh} = 1,472$ ; 95%-KI: 0,99-2,17;  $p=0,05$ ). Signifikant hohe Risiken zeigen sich für Asbestosen ( $OR_{roh} = 1,57$ ; 95%-KI: 1,05-2,36;  $p=0,03$ ), insbesondere für die an einer schwerwiegenden Lungenasbestose leidenden Patienten mit einer ILO- Streuung von 3/2, 3/3 und 3+ ( $OR_{roh} = 4,15$ ; 95%-KI: 1,06-16,16;  $p=0,04$ ). Ebenso kann ein signifikant erhöhtes Risiko für hyaline Pleuraplaques ( $OR_{roh} = 2,21$ ; 95%-KI: 1,11-4,1;  $p=0,02$  und  $OR_{adjustiert} = 2,90$ ; 95%-KI: 1,08-7,78;  $p=0,03$ ), besonders für den Ausprägungsgrad 1 nach ILO nachgewiesen werden ( $OR_{roh} = 4,64$ ; 95%-KI: 1,40-15,41;  $p=0,01$  und  $OR_{adjustiert} = 5,32$ ; 95%-KI: 1,22-23,34;  $p=0,03$ ). Ein nicht signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko weist die Gruppe der Silikosen auf ( $OR_{roh} = 1,28$ ; 95%-KI: 0,78-2,08;  $p=0,33$  und  $OR_{adjustiert} = 1,23$ ; 95%-KI: 0,527-2,88;  $p=0,63$ ). Im Gegensatz zu

den fibrosierenden Lungenerkrankungen ist das Risiko für asbestinduzierte Bronchialkarzinome (BK Nr. 4104) vermindert ( $OR_{roh} = 0,39$ ; 95%-KI: 0,14-1,04).

**Tab. 11: Rohe Odds Ratios der einzelnen Diagnosen in Bezug auf das Kontrollkollektiv in Abhängigkeit von dem Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens**

	Genotypen		Univariate Analyse		
	wt/wt n (%)	wt/mt o. mt/mt n (%)	OR	95 % KI	p-Wert
<b>Kontrollkollektiv</b>	<b>136 (76,8)</b>	<b>41 (23,2)</b>			
<b>Patientenkollektiv</b>	<b>741 (72,7)</b>	<b>278 (27,3)</b>			
<b>Diagnosen</b>					
<b>Lungenfibrose</b>	<b>424 (69,3)</b>	<b>188 (30,7)</b>	<b>1,47</b>	<b>0,99 - 2,17</b>	<b>0,05</b>
Silikose (BK 4101)	117 (72,2)	45 (27,8)	1,28	0,78 - 2,08	0,33
Asbestose (BK 4103)	268 (67,8)	127 (32,2)	1,57	1,05 - 2,36	0,03
<i>Lungenasbestose (BK 4103)</i>	<i>84 (68,9)</i>	<i>38 (31,1)</i>	<i>1,5</i>	<i>0,89 - 2,52</i>	<i>0,13</i>
Kleine unregelmäßige Schatten (s,t,u)					
1/1 und 1/2 ILO	44 (69,8)	19 (30,2)	1,43	0,75 - 2,72	0,27
2/1, 2/2 und 2/3 ILO	32 (69,6)	14 (30,4)	1,45	0,71 - 2,98	0,31
3/2, 3/3 und 3/+ ILO	4 (44,4)	5 (55,6)	4,15	1,06 - 16,16	0,04
<i>Pleuraasbestose (BK 4103)</i>	<i>144 (68,6)</i>	<i>66 (31,4)</i>	<i>1,52</i>	<i>0,97 - 2,39</i>	<i>0,07</i>
verkalkende Pleuraplaques (umschrieben nach ILO )	86 (71,7)	34 (38,3)	1,311	0,77 - 2,225	0,315
Verbreitungsgrad					
1	24 (68,6)	11 (31,4)	1,52	0,69 - 3,37	0,3
2	27 (77,1)	8 (22,9)	0,98	0,42 - 2,33	0,97
3	31 (67,4)	15 (32,6)	1,61	0,79 - 3,26	0,19
hyaline Pleuraplaques (umschrieben nach ILO)	27 (60)	18 (40)	2,21	1,108 - 4,414	0,024
Verbreitungsgrad					
1	5 (41,7)	7 (58,3)	4,64	1,40 - 15,41	0,01
2	10 (62,5)	6 (37,5)	1,99	0,68 - 5,81	0,21
3	11 (68,8)	5 (31,2)	1,51	0,50 - 4,59	0,47
Hyalinosis complicata	31 (68,9)	14 (31,1)	1,5	0,73 - 3,08	0,27
Lungenfibrose anderer Genese	39 (70,9)	16 (29,1)	1,36	0,69 - 2,68	0,37
<b>Pleuramesotheliom (BK 4105)</b>	<b>27 (81,8)</b>	<b>6 (18,2)</b>	<b>0,74</b>	<b>0,29 - 1,91</b>	<b>0,53</b>
<b>Bronchialkarzinom</b>	<b>290 (77,6)</b>	<b>84 (22,4)</b>	<b>0,96</b>	<b>0,63 - 1,47</b>	<b>0,85</b>
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)	43 (89,6)	5 (10,4)	0,39	0,14 - 1,04	0,06
Bronchialkarzinom anderer Genese	247 (75,8)	79 (24,2)	1,06	0,69 - 1,63	0,79

**Tab. 12: Auf Alter, Rauchverhalten und Geschlecht adjustierte Risikoabschätzungen (Odds Ratios) der Kollektive in Abhängigkeit von dem Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens**

	Genotypen		Multivariate Analyse		
	wt/wt n (%)	wt/mt o. mt/mt n (%)	OR	95 % KI	p-Wert
<b>Kontrollkollektiv</b>	<b>136 (76,8)</b>	<b>41 (23,2)</b>			
<b>Patientenkollektiv</b>	<b>741 (72,7)</b>	<b>278 (27,3)</b>			
<b>Diagnosen</b>					
<b>Lungenfibrose</b>	<b>424 (69,3)</b>	<b>188 (30,7)</b>	<b>1,415</b>	<b>0,759 - 2,636</b>	<b>0,274</b>
Silikose (BK 4101)	117 (72,2)	45 (27,8)	1,232	0,527 - 2,88	0,63
Asbestose (BK 4103)	268 (67,8)	127 (32,2)	1,622	0,819 - 3,21	0,165
<i>Lungenasbestose (BK 4103)</i>	<i>84 (68,9)</i>	<i>38 (31,1)</i>	<i>1,599</i>	<i>0,661 - 3,87</i>	<i>0,298</i>
Kleine unregelmäßige Schatten (s,t,u)					
1/1 und 1/2 ILO	44 (69,8)	19 (30,2)	1,636	0,605 - 4,426	0,333
2/1, 2/2 und 2/3 ILO	32 (69,6)	14 (30,4)	1,649	0,581 - 4,679	0,348
3/2, 3/3 und 3/+ ILO	4 (44,4)	5 (55,6)	5,552	0,914 - 33,723	0,063
<i>Pleuraasbestose (BK 4103)</i>	<i>144 (68,6)</i>	<i>66 (31,4)</i>	<i>1,518</i>	<i>0,721 - 3,1979</i>	<i>0,272</i>
verkalkende Pleuraplaques (umschrieben nach ILO ) Verbreitungsgrad	86 (71,7)	34 (38,3)	1,191	0,517 - 2,744	0,682
1	24 (68,6)	11 (31,4)	1,562	0,558 - 4,376	0,396
2	27 (77,1)	8 (22,9)	1,062	0,339 - 3,328	0,918
3	31 (67,4)	15 (32,6)	1,558	0,569 - 4,267	0,388
hyaline Pleuraplaques (umschrieben nach ILO) Verbreitungsgrad	27 (60)	18 (40)	2,902	1,083 - 7,777	0,034
1	5 (41,7)	7 (58,3)	5,316	1,215 - 23,254	0,026
2	10 (62,5)	6 (37,5)	2,48	0,685 - 9,041	0,166
3	11 (68,8)	5 (31,2)	1,771	0,456 - 6,878	0,409
Hyalinosis complicata	31 (68,9)	14 (31,1)	1,676	0,626 - 4,485	0,27
Lungenfibrose anderer Genese	39 (70,9)	16 (29,1)	1,245	0,509 - 3,047	0,631
<b>Pleuramesotheliom (BK 4105)</b>	<b>27 (81,8)</b>	<b>6 (18,2)</b>	<b>0,61</b>	<b>0,188 - 1,979</b>	<b>0,41</b>
<b>Bronchialkarzinom</b>	<b>290 (77,6)</b>	<b>84 (22,4)</b>	<b>1,193</b>	<b>0,587 - 2,424</b>	<b>0,625</b>
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)	43 (89,6)	5 (10,4)	0,446	0,124 - 1,607	0,217
Bronchialkarzinom anderer Genese	247 (75,8)	79 (24,2)	1,372	0,67 - 2,81	0,39

#### **4.3.2 Erkrankungsrisiko für gefahrstoffbedingte Erkrankungen der Lunge und der Pleura in Abhängigkeit von dem Polymorphismus (-238) des TNF $\alpha$ - Gens**

Die Ergebnisse der Odds Ratio Analyse bei Patienten mit mindestens einem mutierten Allel (A) des Polymorphismus (-238) in der Promoterregion des TNF $\alpha$ - Gens ergeben ein erhöhtes Risiko für fibrosierende Erkrankungen der Lunge und der Pleura ( $OR_{roh} = 1,22$ ; 95%-KI: 0,67-2,20 and  $OR_{adjustiert} = 1,77$ ; 95%-KI: 0,67-4,98). Dies zeigt sich insbesondere bei den Patienten, die an einer Asbestose oder einer Silikose erkrankten ( $OR_{roh} = 1,18$ ; 95%-KI: 0,63-2,21 und  $OR_{adjustiert} = 2,12$ ; 95%-KI: 0,64-6,96 für Asbestose und  $OR_{roh} = 1,35$ ; 95%-KI: 0,66-2,78 und  $OR_{adjustiert} = 1,95$ ; 95%-KI: 0,46-8,23 für Silikose). Ein erniedrigtes Risiko kann für asbestinduziertes Bronchialkarzinom ( $OR_{roh} = 0,47$ ; 95%-KI: 0,10-2,13 und  $OR_{adjustiert} = 0,72$ ; 95%-KI: 0,09-5,56) nachgewiesen werden. Das Risiko für Bronchialkarzinome anderer Genese zeigt ebenfalls ein erniedrigtes Risiko ( $OR_{adjustiert} = 0,75$ ; 95%-KI: 0,26-2,18). Jedoch weisen die Ergebnisse für diesen Polymorphismus keine Signifikanz auf.

Insgesamt zeigen die Risikoabschätzungen anhand der OR, dass Patienten mit einem mutierten Allel A des Polymorphismus (-238) des TNF $\alpha$ - Gens ein höheres Erkrankungsrisiko an fibrosierenden Erkrankungen der Lunge und der Pleura haben.

**Tab. 13: Rohe Odds Ratios der einzelnen Diagnosen in Bezug auf das Kontrollkollektiv in Abhängigkeit von dem Polymorphismus (-238) des TNF $\alpha$ - Gens**

	Genotypen		Univariate Analyse		
	wt/wt n (%)	wt/mt o. mt/mt n (%)	OR	95 % KI	p-Wert
<b>Kontrollkollektiv</b>	<b>162 (91,5)</b>	<b>15 (8,5)</b>			
<b>Patientenkollektiv</b>	<b>918 (90,1)</b>	<b>101 (9,9)</b>			
<b>Diagnosen</b>					
<b>Lungenfibrose</b>	<b>550 (89,9)</b>	<b>62 (10,1)</b>	<b>1,22</b>	<b>0,67 - 2,20</b>	<b>0,51</b>
Silikose (BK 4101)	144 (88,9)	18 (11,1)	1,35	0,66 - 2,78	0,42
Asbestose (BK 4103)	356 (90,1)	39 (9,9)	1,18	0,63 - 2,21	0,59
<i>Lungenasbestose (BK 4103)</i>	<i>110 (90,2)</i>	<i>12 (9,8)</i>	<i>1,18</i>	<i>0,53 - 2,61</i>	<i>0,002</i>
Kleine unregelmäßige Schatten (s,t,u)					
1/1 und 1/2 ILO	58 (92,1)	5 (7,9)	0,93	0,32 - 2,68	0,89
2/1, 2/2 und 2/3 ILO	41 (89,1)	5 (10,9)	1,32	0,45 - 3,83	0,61
3/2, 3/3 und 3/+ ILO	8 (88,9)	1 (11,1)	1,35	0,16 - 11,5	0,78
<i>Pleuraasbestose (BK 4103)</i>	<i>188 (89,5)</i>	<i>22 (10,5)</i>	<i>1,28</i>	<i>0,63 - 2,52</i>	<i>0,51</i>
verkalkende Pleuraplaques (umschrieben nach ILO ) Verbreitungsgrad	108 (90)	12 (10)	1,2	0,54 - 2,66	0,66
1	30 (85,7)	5 (14,3)	1,8	0,61 - 5,32	2,88
2	34 (97,1)	1 (2,9)	0,32	0,04 - 2,49	0,28
3	40 (87,0)	6 (13)	1,62	0,59 - 4,44	0,35
hyaline Pleuraplaques (umschrieben nach ILO) Verbreitungsgrad	40 (88,9)	5 (11,1)	1,35	0,46 - 3,93	0,58
1	11 (91,7)	1 (8,3)	0,98	0,12 - 8,13	0,99
2	15 (93,7)	1 (6,3)	0,72	0,09 - 5,83	0,76
3	13 (81,2)	3 (18,8)	2,49	0,64 - 9,73	0,19
Hyalinosis complicata	40 (88,9)	5 (11,1)	1,35	0,46 - 3,93	0,58
Lungenfibrose anderer Genese	50 (90,9)	5 (9,1)	1,08	0,37 - 3,12	0,89
<b>Pleuramesotheliom (BK 4105)</b>	<b>30 (90,9)</b>	<b>3 (9,1)</b>	<b>1,08</b>	<b>0,29 - 3,96</b>	<b>0,91</b>
<b>Bronchialkarzinom</b>	<b>338 (90,4)</b>	<b>36 (9,6)</b>	<b>1,15</b>	<b>0,61 - 2,16</b>	<b>0,66</b>
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)	46 (95,8)	2 (4,2)	0,47	0,10 - 2,13	0,33
Bronchialkarzinom anderer Genese	292 (89,6)	34 (10,4)	1,26	0,67 - 2,38	0,48

**Tab. 14: Auf Alter, Rauchverhalten und Geschlecht adjustierte Risikoabschätzungen (Odds Ratios) der Kollektive in Abhängigkeit von dem Polymorphismus (-238) des TNF $\alpha$ - Gens**

	Genotypen		Multivariate Analyse		
	wt/wt n (%)	wt/mt o. mt/mt n (%)	OR	95 % KI	p-Wert
<b>Kontrollkollektiv</b>	<b>162 (91,5)</b>	<b>15 (8,5)</b>			
<b>Patientenkollektiv</b>	<b>918 (90,1)</b>	<b>101 (9,9)</b>			
<b>Diagnosen</b>					
<b>Lungenfibrose</b>	<b>550 (89,9)</b>	<b>62 (10,1)</b>	<b>1,767</b>	<b>0,672 - 4,98</b>	<b>0,281</b>
Silikose (BK 4101)	144 (88,9)	18 (11,1)	1,946	0,46 - 8,234	0,366
Asbestose (BK 4103)	356 (90,1)	39 (9,9)	2,105	0,636 - 6,961	0,223
<i>Lungenasbestose (BK 4103)</i>	<i>110 (90,2)</i>	<i>12 (9,8)</i>	<i>2,145</i>	<i>0,463 - 9,934</i>	<i>0,329</i>
Kleine unregelmäßige Schatten (s,t,u)					
1/1 und 1/2 ILO	58 (92,1)	5 (7,9)	0,93	0,32 - 2,68	0,89
2/1, 2/2 und 2/3 ILO	41 (89,1)	5 (10,9)	1,724	0,331 - 8,982	0,518
3/2, 3/3 und 3/+ ILO	8 (88,9)	1 (11,1)	1,613	0,115 - 22,655	0,723
<i>Pleuraasbestose (BK 4103)</i>	<i>188 (89,5)</i>	<i>22 (10,5)</i>	<i>2,034</i>	<i>0,555 - 7,46</i>	<i>0,284</i>
verkalkende Pleuraplaques (umschrieben nach ILO )	108 (90)	12 (10)	2,237	0,482 - 10,382	0,304
Verbreitungsgrad					
1	30 (85,7)	5 (14,3)	2,97	0,58 - 15,211	0,192
2	34 (97,1)	1 (2,9)	0,32	0,033 - 4,371	0,439
3	40 (87,0)	6 (13)	2,096	0,38 - 11,549	0,395
hyaline Pleuraplaques (umschrieben nach ILO)	40 (88,9)	5 (11,1)	1,827	0,387 - 8,62	0,447
Verbreitungsgrad					
1	11 (91,7)	1 (8,3)	1,958	0,139 - 17,909	0,713
2	15 (93,7)	1 (6,3)	0,942	0,085 - 10,478	0,961
3	13 (81,2)	3 (18,8)	5,718	0,811 - 40,313	0,08
Hyalinosis complicata	40 (88,9)	5 (11,1)	1,866	0,38 - 9,171	0,443
Lungenfibrose anderer Genese	50 (90,9)	5 (9,1)	1,257	0,304 - 5,204	0,752
<b>Pleuramesotheliom (BK 4105)</b>	<b>30 (90,9)</b>	<b>3 (9,1)</b>	<b>1,977</b>	<b>0,399 - 11,535</b>	<b>0,449</b>
<b>Bronchialkarzinom</b>	<b>338 (90,4)</b>	<b>36 (9,6)</b>	<b>0,709</b>	<b>0,245 - 2,054</b>	<b>0,526</b>
Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)	46 (95,8)	2 (4,2)	0,715	0,092 - 5,561	0,749
Bronchialkarzinom anderer Genese	247 (75,8)	79 (24,2)	0,75	0,26 - 2,18	0,59

### **4.3.3 Vergleich der Erkrankungsrisiken (Asbestfaserstaub-verursachten) Lungenfibrosen mit denen eines (Asbestfaserstaub-verursachten) Bronchialkarzinoms in Abhängigkeit von den Polymorphismen (-308) und (-238) des TNF $\alpha$ - Gens**

Da sich nach unseren Ergebnissen die Erkrankungsrisiken für fibrosierende und maligne Lungenkrankheiten gegenläufig verhielten, wurden zusätzlich zur Odds Ratio Analyse im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe auch die Odds Ratios für Lungenfibrosen in direktem Vergleich zu den Bronchialkarzinomen durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei Trägern des A-Allels des (-308) Polymorphismus des TNF $\alpha$ - Gens ein höheres Risiko für Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen ( $OR_{roh} = 1,53$ ; 95%-KI: 1,14-2,06;  $p=0,050$  und  $OR_{adjustiert} = 1,75$ ; 95%-KI: 1,25-2,45;  $p=0,001$ ). Der Vergleich zwischen Asbestosen und asbestinduzierten Bronchialkarzinomen macht deutlich, dass Patienten mit einem mutierten Allel (A) des Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens ein signifikant erhöhtes Risiko haben, an Asbestosen zu erkranken ( $OR_{roh}= 4,08$ ; 95%-KI: 1,53-10,54;  $p=0,004$  und  $OR_{adjustiert} = 3,89$ ; 95%-KI: 1,49-10,17;  $p=0,006$ ). Ebenfalls wurden Lungenfibrosen, die nicht durch Asbestfaserstaub verursacht wurden, den nicht asbestinduzierten Bronchialkarzinomen gegenübergestellt. Hierbei zeigt sich ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die fibrosierende Lungenerkrankungen ( $OR_{adjustiert} = 1,58$ ; 95%-KI: 1,00-2,5;  $p=0,049$ ). Für das A-Allel des (-238) Polymorphismus des TNF $\alpha$ - Gens zeigte der Vergleich zwischen Lungenfibrosepatienten und Bronchialkarzinompatienten keine signifikanten Ergebnisse ( $OR_{roh} = 1,06$ ; 95%-KI: 0,69-1,63;  $p=0,79$  und  $OR_{adjustiert} = 1,056$ ; 95%-KI: 0,65-1,72;  $p=0,83$ ). Die Tabelle 15 zeigt die Auswertung des direkten Vergleichs zwischen fibrosierenden und malignen Lungenerkrankungen für die Polymorphismen (-238) und (-308) des TNF $\alpha$ - Gens.

Tab. 15: Vergleich der Risiken Asbestfaserstaubverursachter Lungenfibrosen mit denen eines Asbestfaserstaubverursachen Bronchialkarzinoms

TNF $\alpha$ (-238)	Rohe Odds Ratio			Odds Ratio adjustiert		
	OR	95% KI	p-Wert	OR	95% KI	p- Wert
<b>Lungenfibrose gegenüber Bronchialkarzinom</b>	1,058	0,687 - 1,631	0,797	1,056	0,650 - 1,716	0,826
<b>Asbestose ( BK 4103 ) gegenüber Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)</b>	1,018	0,582 - 1,782	0,950	1,157	0,607 - 2,208	0,657
<b>Lungenfibrose anderer Genese gegenüber Bronchialkarzinom anderer Genese</b>	2,520	0,589 - 10,782	0,213	2,003	0,457 - 8,792	0,357

TNF $\alpha$ (-308)	Rohe Odds Ratio			Odds Ratio adjustiert		
	OR	95% KI	p- Wert	OR	95% KI	p Wert
<b>Lungenfibrose gegenüber Bronchialkarzinom</b>	1,531	1,137 - 2,061	0,050	1,753	1,252 - 2,454	0,001
<b>Asbestose ( BK 4103 ) gegenüber Asbestinduziertes Bronchialkarzinom (BK 4104)</b>	4,075	1,526 - 10,536	0,004	3,891	1,488 - 10,172	0,006
<b>Lungenfibrose anderer Genese gegenüber Bronchialkarzinom anderer Genese</b>	1,223	0,828 - 1,805	0,312	1,583	1,002 - 2,500	0,049



## 5 Diskussion

In dieser Studie werden fibrosierende und maligne Tumorerkrankungen der Lunge oder der Pleura untersucht, die auf die Exposition von Asbestfasern oder Quarzstaub am Arbeitsplatz zurückzuführen sind. Ziel der Studie war es herauszufinden, ob die Genpolymorphismen (-238) und (-308) des TNF $\alpha$ - Gens mit einem veränderten Erkrankungsrisiko für fibrosierende oder maligne Erkrankungen der Lunge oder der Pleura assoziiert sind. Die Risikoberechnungen erfolgten im Fall-Kontroll Ansatz.

Infolge Asbestverbot hat zwar die Zahl der an Lungenasbestose erkrankten Personen insgesamt im Vergleich zum Jahr 1995 abgenommen, wegen der langen Latenzzeiten bis zum Ausbruch des Mesothelioms muss man jedoch auch in Zukunft mit einem weiteren Anstieg der asbestbedingten Todesfälle zu rechnen.

In dieser Studie wurden 395 Patienten mit Asbestosen (Nr. 4103 BKV), 33 Patienten mit Pleuramesotheliom (Nr. 4105 BKV) und 48 Patienten mit Asbestfaserstaub verursachtem Bronchialkarzinom (Nr. 4104 BKV) aufgenommen.

Silikosen (Nr. 4101 BKV), Silikotuberkulosen (Nr. 4102 BKV) sowie durch Quarzstaub verursachte Bronchialkarzinome (Nr. 4112 BKV) können Folge langjähriger Quarzstaub- Exposition sein. Durch verbesserte Arbeitsschutzmaßnahmen ist der Anteil an Patienten mit Quarzstaublungerkrankungen in Deutschland in den letzten Jahren gesunken. Dennoch sind weiterhin, aufgrund der ebenfalls langen Latenzzeiten von 20-40 Jahren, in Deutschland Neuerkrankungen zu verzeichnen. 2008 wurden in Deutschland 559 Silikosen als Berufskrankheit anerkannt. 1995 waren es noch 2655 Anerkennungen (Brett et al., 2005).

In unserer Studie wurden 162 Patienten mit einer Silikose (Nr. 4101 BKV) aufgenommen.

In der Primärprävention nehmen Arbeitsschutzmaßnahmen zur Vorbeugung der Gefahrenstoffexposition eine bedeutende Stellung ein. Dabei sei beispielsweise das Asbestverbot in Deutschland seit 1993 genannt (Schneider et al., 1998). Dennoch kann eine Asbestexposition, z.B. bei Abbruch- Sanierungs- und Instandhaltungsarbeiten auch heute noch bestehen. Nach Einwirkung gesundheitsschädigender Gefahrstoffe kommt der Früherkennung maligner Erkrankungen (Sekundärprävention) eine besondere Bedeutung zu. Tumorerkrankungen in Anfangsstadium zeigen eine deutlich bessere Überlebensrate, daher sind Screeninguntersuchungen bei besonders gefährdeten

Personengruppen unverzichtbar. Beobachtungen zeigen, dass interindividuell unterschiedliche Merkmale der gefährdeten Personen die Latenzzeit, den Schweregrad sowie das Auftreten der Erkrankungen beeinflussen.

Für die Arbeitsmedizin bedeutsam ist die Untersuchung der interindividuellen Eigenschaften gefahrenstoffexponierter Personen, um bei prädisponierten Patienten engmaschigere Vorsorgeuntersuchungen anzubieten und im Erkrankungsfall die Kompensation zu erleichtern.

Die vorliegende Studie untersucht einen möglichen Zusammenhang zwischen den Genpolymorphismen (-308) und (-238) des TNF $\alpha$ - Gens und den fibrosierenden und malignen Erkrankungen der Lunge und der Pleura. Wie aus Tabelle 12 und 13 ersichtlich wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens und der Entstehung von fibrosierenden Lungenerkrankungen nachgewiesen. Patienten mit einer Mutation an dieser Stelle des Genoms haben ein erhöhtes Risiko an einer Lungenfibrose zu erkranken ( $OR_{roh} = 1,472$ ; 95%-KI: 0,99-2,17;  $p=0,05$ ) und ( $OR_{adjustiert} = 1,415$ ; 95%-KI: 0,759-2,636;  $p=0,274$ ). Vergleicht man die Ergebnisse der OR-Analyse für fibrosierende und maligne Lungenerkrankungen miteinander, so stellt man fest, dass das TNF- $\alpha$  (-308) A-Allel mit einem erhöhten Risiko für fibrosierende Lungenerkrankungen verbunden ist ( $OR_{roh} = 1,531$ ; 95%-KI: 1,137-2,061;  $p=0,05$ ) und ( $OR_{adjustiert} = 1,753$ ; 95%-KI: 1,252-2,454;  $p=0,001$ ). Ein signifikantes Ergebnis erzielten wir bei dem Vergleich von Asbestosen mit asbestinduziertem Bronchialkarzinom. Hier konnten wir bei Trägern des A-Allels des TNF $\alpha$  (-308) Polymorphismus ein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko für Asbestose-Patienten nachweisen ( $OR_{roh} = 4,075$ ; 95%-KI: 1,526-10,536;  $p=0,004$ ) und ( $OR_{adjustiert} = 3,891$ ; 95%-KI: 1,488-10,172;  $p=0,006$ ). Die Ergebnisse der Risikoabschätzung für das TNF- $\alpha$  (-238) A-Allel zeigen ebenfalls die Tendenz zu einem erhöhten Risiko für fibrosierende Lungen- bzw. Pleuraerkrankungen ( $OR_{roh} = 1,22$ ; 95%-KI: 0,67-2,20;  $p=0,51$ ) und ( $OR_{adjustiert} = 1,76$ ; 95%-KI: 0,672-4,98;  $p=0,281$ ). Bei Trägern des A-Allels des TNF $\alpha$  (-238) Polymorphismus konnten wir bezüglich der asbestinduzierten Bronchialkarzinome einen tendenziell protektiven Effekt nachweisen ( $OR_{roh} = 0,47$ ; 95%-KI: 0,10-2,13;  $p=0,33$ ) und ( $OR_{adjustiert} = 0,715$ ; 95%-KI: 0,092-5,561;  $p=0,749$ ). Für das A-Allel des (-238) Polymorphismus konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden, auch nach Gegenüberstellung von fibrosierenden und malignen Lungenerkrankungen waren lediglich tendenziell Risikoveränderungen zu verzeichnen. Hierbei zeigte sich ein erhöhtes Risiko für

fibrosierende Lungenerkrankungen ( $OR_{roh} = 1,058$ ; 95%-KI: 0,687-1,631;  $p=0,797$ ) und ( $OR_{adjustiert} = 1,056$ ; 95%-KI: 0,65-1,716;  $p=0,826$ ).

### **5.1 Genotypenanalyse der Polymorphismen an der Stelle (-308) und (-238) des TNF $\alpha$ Gens im internationalen Vergleich**

Bei den insgesamt 1196 Probanden wurde eine Genotypenanalyse durchgeführt und das TNF $\alpha$ - Gen auf die Polymorphismen (-308) und (-238) untersucht. Um nun die Repräsentanz dieser Assoziationsstudie zu überprüfen, wurden die in den Tabelle 16 (Genotypfrequenzen TNF $\alpha$  an Stelle -308) und Tabelle 17 (Genotypfrequenzen TNF $\alpha$  an Stelle -238) aufgeführten Genotypverteilungen an Gesunden mit internationalen Studien verglichen. Potentielle ethnische Unterschiede sollten berücksichtigt werden.

**Tab. 16: Genotypfrequenzen TNF $\alpha$  an Stelle (-308) im internationalen Vergleich**

Erstautor (Jahr)	Ethnische Herkunft	n	Gesunde - n (%)			
			G/G	G/A	A/A	G/A o. A/A
<b>Ergebnisse dieser Studie</b>	<b>Deutschland</b>	<b>177</b>	<b>136 (76,8)</b>	<b>38 (21,5)</b>	<b>3 (1,7)</b>	
Caballero (2000)	Spanien	160	134 (84)	24 (15)	2 (1)	
Azmy (2004)	England	498	313 (62,9)	167 (33,5)	18 (3,6)	
Castro-Santos(2006)	Spanien	343	265 (77,3)	71 (20,7)	7 (2,0)	
Boraska (2008)	Kroatien	144	100 (69,4)	40 (27,8)	4 (2,8)	
<b>Mittelwert (Spannweite) europäischer Studien</b>		<b>1322</b>	<b>73,4 (62,9-84)</b>	<b>24,2 (15-33,5)</b>	<b>2,4 (1-3,5)</b>	
Jang (2001)	Südkorea	92	85 (92,4)	7 (7,6)	0	
Yucesoy (2002)	Türkei	154	75 (48,7)			79 (51,3)
Ho (2004)	Taiwan	289	225 (77,9)	62 (21,5)	2 (0,6)	
Wang (2005)	Japan	122	117 (96)	5 (4)	0	
Shih (2006)	Taiwan	205	169 (82,4)	34 (16,6)	2 (1,0)	
Ates (2008)	Türkei	92	47 (51,1)	32 (34,8)	13 (14,1)	
Gu (2009)	China	315	263 (83,5)	51 (16,2)	1 (0,3)	
Merza(2009)	Iran	60	56 (93,3)	4 (6,6)	0	
Özhan (2009)	Türkei	92	21 (22,8)	34 (37)	37 (40,2)	
Park (2009)	Südkorea	89	77 (86,5)	10 (11,2)	2 (2,3)	
Du (2010)	China	218	170 (78)	48 (22,0)	0	
Singhal (2010)	Indien	60	46 (76,7)	13 (21,6)	1 (1,6)	
<b>Mittelwert (Spannweite) asiatischer Studien</b>		<b>1788</b>	<b>76,4 (22,8-96)</b>	<b>18,1 (4-37)</b>	<b>5,5 (0-40,2)</b>	
Grove (1997)	USA	145	87 (60)	49 (33,8)	9 (6,2)	
Camarena (2000)	Mexiko	55	54 (98,2)	1 (1,8)	0	
Sanchez (2009)	Kanada	94	66 (70)	27 (29,0)	1 (1,0)	
<b>Mittelwert % (Spannweite) amerikanischer Studien</b>		<b>294</b>	<b>76,1 (60-98,2)</b>	<b>21,5 (1,8-33,8)</b>	<b>2,4 (0-6,2)</b>	
Corbett (2002)	Afrika	120	73 (60,8)	36 (30,0)	11 (9,2)	
Ferguson (2008)	Neuseeland	415	282 (67,9)	123 (29,6)	10 (2,5)	

Die Genotypfrequenzen für den (-308) Polymorphismus sind in unserer gesunden Kontrollgruppe wie folgt ermittelt worden: 76,8% G/G, 21,5% G/A und 1,7% A/A. In anderen europäischen Studien sind im Durchschnitt 73,4% Träger des G/G Genotyps (Spannweite 62,9%-84%), 24,3% tragen den Genotyp G/A (Spannweite 15%-33,5%) und 2,4% den homozygoten Genotyp A/A (Spannweite 1%-3,5%). Am meisten unterschied sich innerhalb der europäischen Studien der prozentuale Anteil der englischen Studie von Azmy et al. 2004 mit 62,9% G/G, 33,5% G/A und 3,6% A/A. Wenn man diese Werte mit der vorliegenden Studie vergleicht, liegt in unserem Kontrollkollektiv der prozentuale Anteil des seltenen Genotyps A/A mit 1,7% innerhalb der Spannweite europäischer Studien. Vergleicht man die Verteilung der Genotypenfrequenzen unterschiedlicher Bevölkerungsgruppen miteinander, so ist ein eindeutiger Einfluss der ethnischen Herkunft auf die Verteilung der Genotypen erkennbar. Die in Tabelle 16 aufgeführten asiatischen Studien zeichnen sich mit einer Genotypenfrequenz folgender Verteilung G/G 76,4% (Spannweite 22,8%-96%), G/A 18,1% (Spannweite 4%-37%), A/A 5,5% (Spannweite 0-40,2%) durch einen hohen Anteil des Genotyps A/A aus. Diese Auffälligkeit ist ebenfalls in der südafrikanischen Studie (G/G 60,8%, G/A 30,0%, A/A 9,2%) zu verzeichnen. Im Vergleich zu den europäischen Studien ist der homozygote mutante Genotyps A/A in asiatischen und südafrikanischen Studien deutlich häufiger zu beobachten.

Tab. 17: Genotypfrequenzen TNF $\alpha$  an Stelle (-238) im internationalen Vergleich

Erstautor (Jahr)	Ethnische Herkunft	n	Gesunde -n (%)			G/A o. A/A
			G/G	G/A	A/A	
<b>Ergebnisse dieser Studie</b>	<b>Deutschland</b>	<b>177</b>	<b>162 (91,5)</b>	<b>15 (8,5)</b>	<b>0</b>	
Caballero (2000)	Spanien	160	132 (82,5)	28 (17,5)	0	
Azmy (2004)	England	495	434 (87,7)	59 (11,9)	2 (0,4)	
Boraska (2008)	Kroatien	144	134 (93)	10 (7)	0	
Trajkov (2009)	Mazedonien	125	107 (85,6)	16 (12,8)	2 (1,6)	
<b>Mittelwert % (Spannweite) europäischer Studien</b>		<b>1101</b>	<b>88,1 (82,5-93)</b>	<b>11,5 (7-17,5)</b>	<b>0,4 (0-1,6)</b>	
Jang (2001)	Südkorea	92	80 (87)	11 (12)	1 (1)	
Yucesoy (2002)	Türkei	160	87 (54,4)			73 (45,6)
Wang (2005)	Japan	121	116 (95,9)	5 (4,1)	0	
Shih (2006)	Taiwan	205	161 (78,5)	44 (21,5)	0	
Ates (2008)	Türkei	92	86 (93,5)	6 (6,5)	0	
Gu (2009)	China	315	281 (89,2)	34 (10,8)	0	
Merza (2009)	Iran	60	57 (95)	3 (5)	0	
Özhan (2009)	Türkei	92	73 (79,3)	18 (19,6)	1 (1,1)	
Du (2010)	China	218	199 (91,3)	19 (8,7)	0	
Park (2010)	Südkorea	89	85 (95,5)	4 (4,5)	0	
<b>Mittelwert % (Spannweite) asiatischer Studien</b>		<b>2581</b>	<b>89,5 (54,4-95,9)</b>	<b>10,3 (4,1-24,5)</b>	<b>0,2 (0-1,1)</b>	
Grove(1997)	USA	163	153 (93,9)			10 (6,1)
Camarena (2000)	Mexiko	55	51 (92,7)	3 (5,4)	1 (1,8)	
Sanchez (2009)	Kanada	89	80 (90,0)	7 (8,0)	2 (2,0)	
<b>Mittelwert % (Spannweite) amerikanischer Studien</b>		<b>307</b>	<b>91,4 (90-93,9)</b>	<b>6,7 (5,4-8)</b>	<b>1,9 (1,8-2)</b>	
Corbett(2002)	Afrika	120	113 (94,2)	5 (4,2)	2 (1,6)	
Ferguson (2008)	Neuseeland	415	365 (88,0)	50 (12,0)	0	

Der (-238) Polymorphismus des TNF  $\alpha$ - Gens zeigt im von uns untersuchten Kontrollkollektiv eine Genotypenverteilung von 91,5 % G/G und 8,5% G/A. Der Genotyp A/A ist in unserem Kollektiv nicht vertreten. Betrachtet man die durchschnittliche Genotypenverteilung europäischer Studien, ist ein ähnliches Ergebnis zu erkennen: 88,1% G/G (Spannweite 82,5%-93%), 11,5% G/A (Spannweite 7%-17,5%) und 0,4% A/A (Spannweite 0%-0,7%). In einer südafrikanischen Studie von Corbett et al. (Corbett et al. 2002) zeigte sich folgende Verteilung: 94,2% G/G, 4,2% G/A, 1,6% A/A (Corbett et al., 2002). Im Vergleich dazu fand sich als Durchschnittswert von Studien amerikanischer Länder (Mexiko, Kanada, USA) die Häufigkeit von 91,4% G/G (Spannweite 90%-93,9%), 6,7% G/A (Spannweite 5,4%-8%) und 1,9% A/A (Spannweite 1,8%-2,0%) und als gemittelter Wert neun asiatischer Studien aus sechs verschiedenen Ländern eine Verteilung von 89,5% G/G (Spannweite 54,4%- 95,9%), 10,3% G/A (Spannweite 4,1%- 24,5%) und 0,2% A/A (Spannweite 0%-1,1%). Die Genotypenverteilung der vorliegenden Studie ist somit mit Ergebnissen europäischer und weltweiter Studien vergleichbar.

### **5.2 Allelfrequenzen der Polymorphismen an der Stelle (-238) und (-308) des TNF $\alpha$ - Gens im internationalen Vergleich**

Aus der Genotypverteilung internationaler Studien wurden die Allelfrequenzen für die Polymorphismen (-238) und (-308) des TNF- $\alpha$  Gens errechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 synoptisch dargestellt. Das A-Allel des (-238) Polymorphismus des TNF $\alpha$ -Gens ist in unserer Studie mit einem prozentualen Anteil von 4,2% vertreten. Die Durchschnittswerte für europäische Studien ergaben 7,9% (Spannweite 3,6%-16,4%) und für asiatische Studien 6,9% (Spannweite 2,1%-24%). Eine ähnliche Allelfrequenz zeigte sich in den Studien aus Mexiko und Kanada mit einem durchschnittlichen prozentualen Anteil von 5,3% (Spannweite 4,5%-6,1%). Im weltweiten Vergleich liegt der ermittelte Wert für die A-Allelfrequenz des (-238) Polymorphismus des TNF $\alpha$ -Gens unserer Studie innerhalb der Spannweite aller hier aufgeführten Studien.

Die Allelfrequenz für das A-Allel des (-308) Polymorphismus liegt in der vorliegenden Studie bei 12,4%. Betrachtet man die Durchschnittswerte europäischer und asiatischer Studien (Europa 14,1% mit einer Spannweite 8,8% bis 16,7% und Asien 12,7% mit einer Spannweite von 2,1 bis 43) liegt der prozentuale Anteil des A-Allels unserer Studie mit 12,4% im Mittelfeld der Spannweite europäischer und asiatischer Studien. Infolge der ethnischen Vielfalt innerhalb der asiatischen Studien (Türken, Iraner, Inder,

Südostasiaten) ergibt sich für die A-Allelfrequenz hierbei eine große Spannweite. Die A-Allelfrequenz der drei aufgeführten Länder aus dem amerikanischen Kontinent (USA, Kanada und Mexiko) liegt im Mittel bei 13,1% (Spannweite 0,9%-23.1%). Zum Vergleich konnte in der südafrikanischen Studie von Corbett et al. (Corbett et al., 2002) in einem gesunden Kollektiv von 120 Probanden eine Allelfrequenz (A) von 24,2% ermittelt werden.



**Tab. 18: Allelfrequenzen der Polymorphismen an Stelle (-238) und (-308) des TNF $\alpha$ - Gens in Abhängigkeit von der ethnischen Herkunft**

Erstautor (Jahr)	Ethnische Herkunft	Allelfrequenzen (%)					
		PM (-238)			PM (-308)		
		Kontroll kollektiv	A	G	Kontroll- kollektiv	A	G
<b>Vorliegende Studie</b>	<b>Deutschland</b>	<b>177</b>	<b>4,2</b>	<b>95,8</b>	<b>177</b>	<b>12,4</b>	<b>87,6</b>
<b>Europäische Studien</b>							
Caballero (2000)	Spanien	160	8,8	91,2	160	8,8	91,2
Azmy (2004)	England	495	6,4	93,6	-	-	-
Boraska (2008)	Kroatien	144	3,6	96,4	144	16,7	83,3
Garcia Gonzales (2009)	Spanien	24	16,4	83,6	24	16,7	83,3
Trajkov (2009)	Makedonien	301	4,5	95,5	-	-	-
<b>Asiatische Studien</b>							
Jang (2001)	Südkorea	92	7,1	92,9	92	3,8	96,2
Yucesoy (2001)	Türkei	160	24	76	154	27	73
Ho (2004)	Taiwan	-	-	-	289	11,3	88,7
Wang (2005)	Japan	121	2,1	97,7	122	2,1	97,9
Shih (2006)	Taiwan	205	11	89	205	9,2	90,8
Ates (2008)	Türkei	92	3	97	92	43	57
Gu (2009)	China	315	5,4	94,6	315	8,4	91,6
Merza (2009)	Iran	60	2,5	97,5	60	3,3	96,7
Park (2009)	Südkorea	89	2,2	97,8	89	7,9	92,1
Singhal(2009)	Indien	-	-	-	60	12,5	87,5
Du (2010)	China	218	4,4	95,6	218	11	89
<b>Amerikanische Studien</b>							
Grove(1997)	USA	-	-	-	145	23,1	76,9
Camarena (2000)	Mexiko	55	4,5	95,5	55	0,9	99,1
Sanchez (2009)	Kanada	89	6,1	93,9	94	15,4	84,6
<b>Afrikanische Studie</b>							
Corbett(2002)	Südafrika	120	3,8	96,2	120	24,2	75,8
<b>Australische Studie</b>							
Ferguson (2008)	Neuseeland	415	6,0	94	415	17,2	82,8

Zusammenfassend kann man anhand der in Tabelle 18 aufgeführten Studien erkennen, dass die Allelfrequenz des seltenen A-Allels des (-238) Polymorphismus in der vorliegenden Studie mit einem prozentualen Anteil von 4,2% sowohl innerhalb des Bereiches der europäischen Bevölkerung (Spannweite 3,6%-16,4%) als auch im internationalen Vergleich innerhalb der Spannweite von 2,2%- 24% liegt.

Das A-Allel des (-308) Polymorphismus ist unabhängig von der ethnischen Zugehörigkeit wesentlich häufiger vertreten als im (-238) Polymorphismus. Die Allelfrequenz für den (-308) Polymorphismus von 177 Gesunden in unserer Studie liegt mit einer durchschnittlichen Häufigkeit von 12,4% im Bereich europäischer, asiatischer und amerikanischer Studien.

### **5.3 Die Bedeutung von TNF $\alpha$ in der Entwicklung von fibrosierenden Erkrankungen der Lunge und der Pleura**

An der Pathogenese der fibrosierenden Erkrankungen sind Entzündungsreaktionen beteiligt. Im Entzündungsprozess der Lunge spielt TNF $\alpha$  als proinflammatorisches Zytokin eine entscheidende Rolle. Zytokine sind lösliche Peptide und Proteine, die im Organismus überwiegend von Immunzellen synthetisiert und sezerniert werden (Uceyler et al., 2008c). Triggersubstanzen wie Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien, Bakterientoxine wie das Shigatoxin oder Asbestfasern aktivieren proinflammatorische Zellen wie Makrophagen, Fibroblasten, Astrozyten, Keratinocyten oder glatte Muskelzellen. Über intrazelluläre Signalwege kommt es zu einer erhöhten Genexpression des zunächst membrangebundenen TNF $\alpha$ - Moleküls ( Szlosarek et al., 2006a). Das TNF $\alpha$ - Converting Enzyme (TACE) aktiviert das 26kDA große TNF $\alpha$  Molekül, das nun als löslicher Ligand an TNF $\alpha$  Rezeptoren binden kann (Übersicht: siehe Elahi et al., 2009). Die meisten Zellen besitzen zwei Rezeptoren für das TNF $\alpha$ , den TNFR1 (p55) und TNFR2 (p75). Während der TNFR1 an allen Körperzellen exprimiert wird, befindet sich der TNFR2 nur an Endothelzellen und Immunzellen. Diese können auch als lösliche Rezeptoren im Blut zirkulieren (Driscoll et al., 2000). Bindet das TNF $\alpha$  an den zellgebundenen Rezeptor werden unterschiedliche Signalkaskaden innerhalb der Zelle in Gang gesetzt, welche die Genexpression verschiedener Proteine zur Folge haben, die einerseits den Zelluntergang fördern aber gleichzeitig für das Überleben der Zelle wichtige Signalwege aktivieren. In der Akutphase der Entzündung führt die Expression von Adhäsionsmolekülen in

endothelialen Zellen zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und ermöglicht so vor allem den neutrophilen Granulozyten und den Makrophagen den Zugang in das entzündete Areal. Zudem wird die Produktion verschiedener Entzündungsmediatoren, wie beispielsweise IL-1, IL-6, PDGF und TGF $\alpha$  angeregt (Driscoll et al., 2000). Die Induktion von IL-1 und IL-6 führt zu einer erhöhten Körpertemperatur, Müdigkeit und der vermehrten Ausschüttung von Glukokortikoiden, die wiederum Teil der Immunantwort sind (für Review siehe Elahi et al., 2009).

Im Entzündungsgeschehen hat TNF $\alpha$  eine duale Funktion, zum einen wirkt es vor allem in der Akutphase proinflammatorisch und in der Spätphase der Entzündung zum anderen immunmodulatorisch (Übersicht: siehe Elahi et al., 2009),

Der Lungenfibrose liegt eine chronische Entzündung des Lungengewebes zu Grunde. Eine über längere Zeit erhöhte TNF $\alpha$  Proteinkonzentration hält das Entzündungsgeschehen aufrecht und führt zu einem fibrosierenden Umbau des Lungengewebes. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen mit der Beobachtung überein, dass das TNF $\alpha$  mit der Entstehung von fibrosierenden Erkrankungen assoziiert ist. Wir konnten zeigen, dass Patienten mit einer A-Allel Mutation des (-308) Polymorphismus des TNF  $\alpha$ - Gens ein signifikant erhöhtes Risiko haben an einer Lungenfibrose (OR<sub>roh</sub> = 1,472; 95%-KI: 0,99-2,17; p=0,05) und insbesondere an einer Lungenasbestose zu erkranken (OR<sub>roh</sub> = 1,57; 95%-KI: 1,05-2,36; p=0,03). Für die Silikose konnten wir ebenfalls eine Risikoerhöhung nachweisen (OR<sub>roh</sub> = 1,28; 95%-KI: 0,78-2,08; p=0,33). Bei Trägern des seltenen A-Allels des (-238) Polymorphismus des TNF  $\alpha$ - Gens ist ebenfalls eine tendenzielle Risikoerhöhung sowohl für Lungenfibrosen (OR<sub>roh</sub> = 1,22; 95%-KI: 0,67-2,20; p=0,51) als auch für Silikosen (OR<sub>roh</sub> = 1,35; 95%-KI: 0,66-2,78; p=0,42) nachweisbar.

## **5.4 Die Bedeutung von TNF $\alpha$ in der Entwicklung von malignen Erkrankungen der Lunge und der Pleura**

### **5.4.1 Die Rolle des TNF $\alpha$ Proteins als Tumoringhibitor**

Im Prozess der Entstehung und Aufrechterhaltung maligner Erkrankungen wird die Rolle des TNF $\alpha$  kontrovers diskutiert. Die Tumorbildung ist ein multifaktorielles Geschehen, wobei die Rolle des TNF $\alpha$  gegensätzliche Effekte zeigt. Eins der wichtigen Merkmale für TNF $\alpha$  ist der Antitumor-Effekt. In der vorliegenden Studie konnte ein protektiver Effekt des A-Allels beider Polymorphismen des TNF $\alpha$ - Gens für maligne Erkrankungen der Lunge und Pleura nachgewiesen werden. Das asbestinduzierte

Bronchialkarzinom war bei Trägern des A-Allels des (-308) Polymorphismus des TNF  $\alpha$ - Gens mit einer Risikominderung von  $OR_{roh} = 0,39$ ; 95%-KI: 0,14-1,04;  $p=0,06$  und bei Trägern des A-Allels des (-238) Polymorphismus des TNF  $\alpha$ - Gens mit einer Risikominderung von  $OR_{roh} = 0,47$ ; 95%-KI: 0,10-2,13;  $p=0,33$  assoziiert. Die Entstehung eines malignen Prozesses ist jedoch von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren abhängig. Daher kann das A-Allel der TNF $\alpha$ - Genpolymorphismen (-308) und (-238) als Marker für den protektiven Effekt und nicht als alleiniger Risikofaktor gewertet werden. In der Studie von Carswell et al. (Carswell et al., 1975) konnte eine erhöhte TNF- $\alpha$  Proteinkonzentration im Serum von Mäusen nachgewiesen werden, die vorher mit Calmette-Guerin-Bakterien infiziert wurden. Das TNF $\alpha$  Protein wurde anschließend Fibrosarkom erkrankten Mäusen verabreicht, was eine hämorrhagische Tumornekrose zur Folge hatte. Dieser ursprünglich angenommenen Hauptfunktion hat TNF $\alpha$  seinen Namen zu verdanken. Nach der Studie Havell et al. (Havell et al., 1988) induziert TNF $\alpha$  die hämorrhagische Tumornekrose, indem es die Endothelzellapoptose der den Tumor versorgenden Blutgefäße unterstützt und so zu einer Tumorschämie führte. Der Anti-Tumoreffekt von TNF $\alpha$  benötigt jedoch pharmakologisch hohe Dosen, welche mit einer schweren Zytotoxizität einhergehen (Havell et al., 1988).

Hinsichtlich der Tumovaskularisation bestehen somit, abhängig von der TNF $\alpha$ -Konzentration, unterschiedliche Effekte:

1. chronisch niedrige TNF $\alpha$ -Konzentrationen begünstigen die Tumorangio-genese und führen zu einem Tumorwachstum
2. akut hoch dosierte Konzentrationen triggern die Thrombosierung der den Tumor versorgenden Blutgefäße (Weichselbaum et al., 2002 und Leibovich et al., 1987) und führen somit zu einer Tumorschämie.

### **5.4.2 Die Rolle des TNF $\alpha$ Proteins als Tumorpromoter**

Chronisch entzündetes Gewebe ist die Vorstufe vieler Tumorarten. Szlosarek et al. bezeichnen die Entzündung als einen wichtigen Tumorinitiator und- promotor (Szlosarek et al., 2006). In diesem frühen Prozess nimmt TNF $\alpha$  als proinflammatorisches Zytokin eine Schlüsselrolle ein. So konnten Untersuchungen zeigen, dass bösartige Ovarialzellen das Zytokin M-CSF (Makrophage colony stimulating factor) produzieren und auf diesem Weg die endogene TNF- $\alpha$  Protein-Konzentration erhöhen (Wu et al., 1993). Dies wiederum führt zu einer Stimulation des Tumorzellwachstums. Diverse Studien über TNF $\alpha$  Gen- bzw. Proteinexpression in

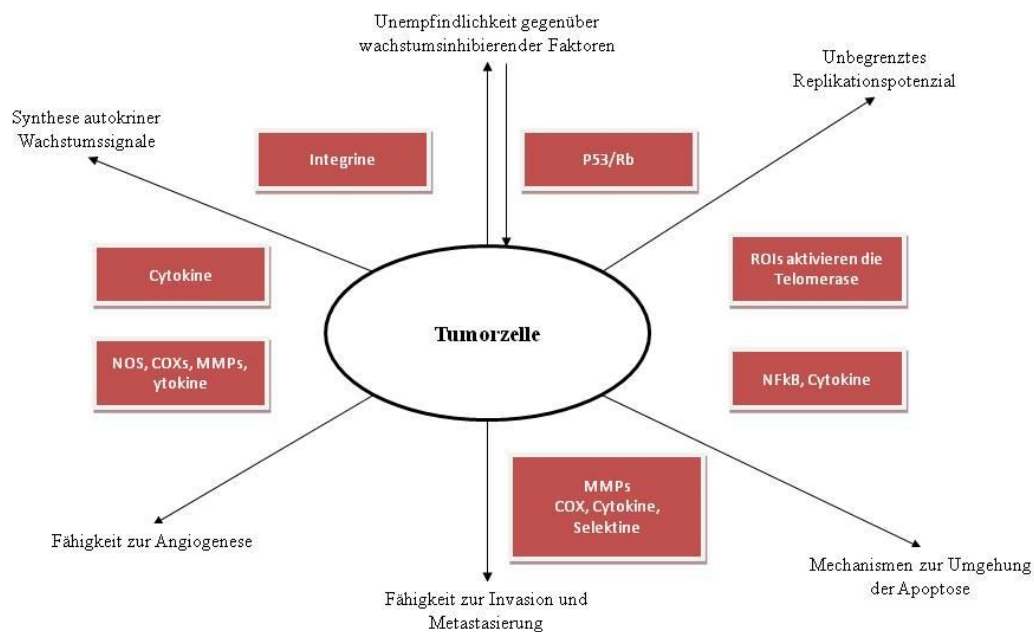
präneoplastischen Läsionen wie beispielsweise die Barrett- Metaplasie der Speiseröhre ( Szlosarek et al., 2006) zeigen ebenfalls eine deutlich erhöhte TNF $\alpha$ - Konzentration im entzündeten Areal. Auch die mit Helicobacter- Pylori infizierte Magenschleimhaut zeigt eine erhöhte TNF $\alpha$  Proteinproduktion, welche den Entzündungsprozess fördert und damit die Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung erhöht (Noach et al., 1994). Die zytokingesteuerte Interaktion zwischen Entzündungszellen und Tumorzellen im Mikroumfeld des Tumorgewebes fördert das Tumorwachstum, dessen Invasivität und Metastasierungsprozess (Szlosarek et al., 2006). Scott und et al. (Scott et al., 2003) haben in ihrer präklinischen Studie mit Mäusen, bei denen sie das TNF $\alpha$ - Gen ausgeschaltet haben, die Rolle des TNF $\alpha$  als frühen Tumorpromoter bestätigen können. Nach Behandlung mit Papillom-induzierenden Agenzien zeigten TNF $\alpha$  -knockout Mäuse eine signifikant höhere Resistenz gegenüber Hauttumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Somit konnte nachgewiesen werden, dass TNF $\alpha$  im frühen Stadium der Tumorentwicklung als Tumorpromoter eine bedeutende Rolle besitzt. Die Studie von Yang und Et al.n ( Yang et al., 2006) erklärt den TNF- $\alpha$  vermittelten Weg zur asbestinduzierten malignen Entartung von humanen Mesothelzellen in Zellkulturen mithilfe der NF $\kappa$ B-Aktivierung. Dabei wurde neben der zytotoxischen Wirkung von Krokydolith auf humane Mesothelzellen der antizytotoxische Effekt von TNF- $\alpha$  durch Aktivierung des NF $\kappa$ B-Weges nachgewiesen. Mit TNF $\alpha$  vorbehandelte humane Mesothelzellen wurden Krokydolithfasern ausgesetzt, dabei zeigte sich eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber Asbestfasern. Somit konnte gezeigt werden, dass durch TNF- $\alpha$  die zytotoxische Wirkung von Asbestfasern herabgesetzt wird. Die erhöhte karzinogene Wirkung von Asbestfasern wird damit erklärt, dass asbestgeschädigte Mesothelzellen durch den erhöhten TNF $\alpha$  Spiegel widerstandsfähiger bleiben und eine verlängerte Überlebensdauer zeigen, außerdem fördert die durch TNF $\alpha$  induzierte NF $\kappa$ B- Aktivierung die Zellproliferation und verhindert die Zellapoptose, sodass das Risiko für eine maligne Transformation insgesamt erhöht wird (Yang et al, 2006).

Nach Hanahan und Weinberg (Hanahan et al., 2000) gibt es neben der genetischen Mutation sechs weitere Kennzeichen, die der mutierten Tumorzelle einen Überlebensvorteil bieten:

- Synthese autokriner Wachstumssignale,
- die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Faktoren,
- die Fähigkeit zur Angiogenese,
- Mechanismen zur Umgehung der Apoptose,
- die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung,
- sowie das unbegrenzte Replikationspotenzial

Zytokine wie das TNF $\alpha$  besitzen ein enormes Repertoire an Aktivitäten, womit sie die Zell-Zellkommunikation auf lokaler Ebene ermöglichen. Das von malignen Zellen sezernierte TNF $\alpha$  triggert die Produktion von Mediatoren, Zytokinen und anderen Stoffen wie die Nitric Oxide Synthase (NOS) oder Reactive Oxygen Intermediates (ROIs), wie sie in Abbildung 7 dargestellt sind und führt zu den sechs genannten Charakteristika maligner Prozesse.

**Chronische Entzündung**



**Abb. 7: Zusammenspiel zwischen TNF $\alpha$  und den sechs Kennzeichen der Malignität (modifiziert nach Szlosarek et al., 2006)**

## 5.5 Assoziation der Polymorphismen (-238) und (-308) des TNF $\alpha$ -Gens mit fibrosierenden Erkrankungen

In verschiedenen Studien ist nachgewiesen worden, dass TNF $\alpha$ - Polymorphismen überdurchschnittlich häufig mit Autoimmun- bzw. Infektionskrankheiten assoziiert sind wie beispielsweise der Malaria, der Leishmaniose, der Zöliakie, chronische Bronchitiden, der Psoriasis, des systemischen Lupus erythematodes und auch der Coal Workers' Pneumokoniosen (McGuire et al., 1994, Cabrera et al., 1995, McManus et al., 1996, Huang et al., 1997, Arias et al., 1997, Ates et al., 2008 und Sullivan et al., 1997). Beim Menschen liegt das TNF $\alpha$ - Gen auf Chromosom 6 zwischen dem HLAB (Human Leukocyte Antigen-B) - und dem DR-Gen inmitten der Klasse III Region des Major Histocompatibility Complex (MHC) Moleküls (Wilson et al., 1997). Diese Lokalisation lässt Wilson und Et al. ( Wilson et al., 1997) vermuten, dass Polymorphismen des TNF $\alpha$ - Gens MHC-assoziierte Autoimmunerkrankungen oder Infektionskrankheiten beeinflussen können. Entsprechende Ergebnisse sind aus der vorliegenden Studie zu eruieren: Für fibrosierende Lungenerkrankungen, insbesondere für die Lungenasbestose konnten wir bei Trägern des A-Allels des Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens eine signifikante Risikoerhöhung nachweisen ( $OR_{roh} = 1,57$ ; 95%-KI: 1,05-2,36;  $p=0,03$ ). Das A-Allel des Polymorphismus (-238) ist mit einem erhöhten Risiko für fibrosierende Lungenerkrankungen assoziiert ( $OR_{roh} = 1,22$ ; 95%-KI: 0,67-2,20 und  $OR_{adjustiert} = 1,77$ ; 95%-KI: 0,67-4,98), für Lungenasbestosen ( $OR_{roh} = 1,18$ ; 95%-KI: 0,63-2,21 und  $OR_{adjustiert} = 2,12$ ; 95%-KI: 0,64-6,96) und für Silikosen ( $OR_{roh} = 1,35$ ; 95%-KI: 0,66-2,78 und  $OR_{adjustiert} = 1,95$ ; 95%-KI: 0,46-8,23). Somit stellen nach unseren Ergebnissen die Punktmutation an der Stelle (-238) und (-308) des TNF $\alpha$  Promotergens einen Risikofaktor für das Auftreten von fibrosierenden Lungenerkrankungen dar. Wilson et al (Wilson et al., 1997) zeigten in ihrer Studie, dass das A-Allel des (-308) Polymorphismus des TNF $\alpha$ - Gens mit einer erhöhten Transkriptionsaktivität und somit einer erhöhten TNF $\alpha$  Proteinproduktion verbunden ist. Auch in anderen Studien wurde nachgewiesen, dass das seltene A-Allel des Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens mit einer erhöhten TNF $\alpha$  Proteinproduktion assoziiert ist und mit einem erhöhten Risiko für die schwere Sepsis, Asbestose und andere Erkrankungen einhergeht ( Übersicht: siehe Elahi et al., 2009). Die erhöhte TNF $\alpha$  Protein-Konzentration im chronisch

entzündeten Gewebe trägt zur Entstehung von fibrosierenden Prozessen im Lungengewebe bei (Lawson et al., 2006). In einer Studie unserer Arbeitsgruppe wurde der Einfluss des TNF $\alpha$ - Genpolymorphismus (-308) auf die TNF $\alpha$ - mRNA-Genexpression in menschlichen Leukozyten untersucht (Helmig et al., 2010). Im untersuchten Kollektiv war eine signifikant erhöhte TNF $\alpha$  mRNA-Genexpression bei Trägern des homozygoten Wildtyps G/G verglichen mit dem heterozygoten Genotyp G/A oder dem homozygoten Genotyp A/A nachzuweisen. Somit konnte gezeigt werden, dass das G-Allel des Polymorphismus (-308) im Vergleich zu dem seltenen A-Allel des Polymorphismus (-308) mit einer signifikant erhöhten TNF $\alpha$  Genexpression assoziiert ist. Vermutlich lässt sich die Diskrepanz zwischen der ermittelten mRNA-Expressionsrate und der Höhe des Proteinspiegels auf die unterschiedliche Sensitivität der Methoden zur Quantifizierung von Proteinspiegel bzw. mRNA- Expression zurückführen (O'Dwyer et al., 2008) und macht die Studien untereinander schwer vergleichbar. Die unterschiedlichen Ergebnisse spiegeln außerdem die komplexe Rolle des TNF $\alpha$ - Proteins im gesamten Entzündungsgeschehen wider. Während TNF $\alpha$  in der initialen Entzündungsphase eine starke proinflammatorische Potenz besitzt, wirkt es in der späten Entzündungsphase eher anti-inflammatorisch, um eine unkontrollierte Immunantwort zu verhindern und so vor einer schweren Entzündungsreaktion zu schützen (für Review siehe Elahi et al., 2009).

Bei Patienten mit Asbeststaublungenenerkrankungen und asbestverursachten Erkrankungen der Pleura führten wir gemäß der Internationalen Staublungenklassifikation (ILO 1980/2000 BRD) eine Einteilung in die verschiedenen Schweregrade durch. Die kleinen, unregelmäßigen Lungenschattierungen der Lungenasbestose werden radiologisch nach der ILO- Klassifikation in Größe und Anzahl kodiert. Bei den Pleuraasbestosen unterscheidet man zwischen diffusen Verdickungen der seitlichen Brustwand und röntgenologisch hyalinen Plaques, die im Verlauf verkalken können. Bei Befall der viszeralen Pleura (dem Lungengewebe aufliegendes Lungenfell) 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 costophrenischen Winkels, entsteht das Bild einer Hyalinosi complicata (Schneider et al., 1998). In unserer Studie haben wir für die Gesamtheit der Asbestosen, insbesondere für die hyaline Form der Pleuraasbestosen eine Assoziation mit dem A-Allel des Polymorphismus (-238) feststellen können. Ein erhöhtes aber nicht signifikantes Risiko



wurde für die fortgeschrittenen Lungenasbestosen nach ILO 2/3, 3/3 oder 3/+ mit  $OR=1,35$ ; 95%  $KI=0,16-11,53$ ,  $p=0,78$  gefunden. Weiterhin konnte ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für die hyaline Form der Pleuraasbestosen mit dem A-Allel des Polymorphismus (-238) ( $OR_{roh}= 1,35$ ; 95%- $KI: 0,46-3,93$ ;  $p=0,58$ ) und  $OR_{adjustiert}= 1,83$ ; 95%- $KI: 0,39-8,62$ ;  $p=0,45$ ) nachgewiesen werden. Unsere Assoziationsstudie ist bislang die einzige, welche den Polymorphismus (-238) des  $TNF\alpha$ - Gens in Zusammenhang mit den unterschiedlichen Ausprägungsgraden der Lungen- und Pleuraasbestosen untersucht hat. Wir haben weiterhin das fibrogene Potential bei 162 Silikosepatienten auf das Erkrankungsrisiko in Abhängigkeit mit dem A-Allel des Polymorphismus (-238) des  $TNF\alpha$ - Gens überprüft und konnten nachweisen, dass das A-Allel des Polymorphismus (-238) mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko an einer Quarzstaublungenerkrankung einhergeht ( $OR_{roh}= 1,35$ ; 95%- $KI= 0,66-2,78$  und  $OR_{adjustiert}= 1,95$ ; 95%- $KI: 0,46-8,23$ ). Auch bei Trägern des seltenen A-Allels des Polymorphismus (-308) konnten wir eine Risikoerhöhung für eine Silikose feststellen ( $OR=1,28$ ; 95% $KI=0,78-2,08$ ,  $p=0,33$ ). Yucesoy und et al. (Yucesoy et al., 2001a) haben in ihrer im Jahr 2001 veröffentlichten Fall-Kontroll-Studie ähnliche Ergebnisse zu verzeichnen. Sie haben 164 gesunde amerikanische Probanden mit 325 an Silikose erkrankten Probanden verglichen. Von diesen litten 140 Patienten an einer moderaten Form und 185 Patienten an einer schweren Form der Silikose. Yucesoy et al. (2001) stellten bei Trägern des A-Allels des Polymorphismus (-238) des  $TNF\alpha$ - Gens ein signifikant erhöhtes Risiko für die schwerwiegende Form der Silikose ( $OR= 4,00$ ; 95% $KI= 2,5-6,4$ ;  $p< 0,05$ ) fest. Bei der moderaten Form der Silikose war diese Genotypvariante allerdings mit einem signifikant reduzierten Risiko assoziiert ( $OR_{adjustiert}= 0,52$ ; 95%  $KI= 0,3-0,9$ ,  $p<0,05$ ). Nach Ansicht von Yucesoy und et al. (Yucesoy et al., 2001) führt das Vorhandensein des A-Allels zu einer rascheren und schwerwiegenderen Krankheitsentwicklung. Weiterhin haben die Autoren nachgewiesen, dass nach Adjustierung der Expositionsdauer Träger des A-Allels des Polymorphismus (-308) des  $TNF\alpha$ - Gens ein erhöhtes Risiko haben sowohl an der moderaten Form ( $OR_{adjustiert}=3,59$ ; 95% $KI=2,0-6,4$ ,  $p<0,05$ ) als auch an der schweren Form ( $OR_{adjustiert}=1,61$ ; 95% $KI=0,9-2,8$ ,  $p<0,05$ ) der Silikose zu erkranken (Yucesoy et al., 2001). In unserer Studie wurden die Schweregrade der Silikose nicht differenziert; für die Gesamtheit der Silikosepatienten konnten wir in Übereinstimmung mit der Studie von Yucesoy et al. (2001) ebenfalls eine Risikoerhöhung für beide Polymorphismen nachweisen. Untersuchungen von Ates et al. (Ates et al., 2008)

verdeutlichen den engen Zusammenhang zwischen den Polymorphismen (-238) und (-308) des TNF $\alpha$ - Gens und der Entwicklung von „Coal Worker’s Pneumokoniosis“ bzw. Silikosen. Die „Coal Workers Pneumokoniosis“ ist eine fibrosierende Lungenerkrankung, die unter den Kohle-Grubenarbeitern beobachtet wird. Ates et al. konnten zeigen, dass bei türkischen Kohle-Grubenarbeitern das A-Allel des Polymorphismus (-238) mit einem signifikant erhöhten Risiko für die Entstehung und Entwicklung von Pneumokoniosen einherging (OR= 3,47; 95%KI= 1,12-10,77,  $p < 0,05$ ), das A-Allel des Polymorphismus (-308) hingegen nur mit dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert war. In der 2002 veröffentlichten Fall-Kontrollstudie von Corbett und et al. (Corbett et al., 2002) wurden 121 gesunden Probanden und 120 an Silikose erkrankte Kohle-Grubenarbeiter gegenübergestellt und auf Suszeptibilitätsunterschiede hin untersucht. Die Probanden waren schwarzafrikanischer Herkunft. Die Silikose wurde unterteilt in eine schwer und eine moderate Form. Es konnte eine signifikante Risikoerhöhung bei Trägern des A-Allel des Polymorphismus (-238) für die schwere Form der Silikose gefunden werden. In unserer Studie konnte für die Silikose ebenfalls ein erhöhtes Risiko für das A-Allel des Polymorphismus (-238) nachgewiesen werden (  $OR_{roh} = 1,35$ ; 95%-KI: 0,66-2,78 und  $OR_{adjustiert} = 1,95$ ; 95%-KI: 0,46-8,23). Eine Studie von Wang et al. (Wang et al., 2005) konnte bei japanischen Bergleuten jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem A-Allel des Polymorphismus (-238) und der Silikose erkennen lassen. Die A- Allelfrequenz des Polymorphismus (-308) unter den Pneumokoniosefällen war im japanischen Kollektiv von Wang et al. (Wang et al., 2005) signifikant erhöht. Unter den 126 Pneumokoniosepatienten lag die A-Allelfrequenz bei 6,35%, im gesunden Kontrollkollektiv hingegen bei 2,05%,  $p < 0,001$ . Im Artikel von Wang et al. finden sich allerdings keine Angaben zu OR und KI, da nur die Genotypen und die Allelfrequenz angegeben wurden. Die Risikoerhöhung wird durch unsere Ergebnisse bestätigt, wonach Träger des A-Allels des Polymorphismus (-308) ein nicht signifikant erhöhtes Risiko für Silikose haben ( $OR_{roh} = 1,28$ ; 95%-KI: 0,78-2,08 und  $OR_{adjustiert} = 1,23$ ; 95%-KI: 0,53-2,88).

Eine erhöhte Suszeptibilität für die Chagaskrankheit, einer Infektionserkrankung mit dem Parasiten Trypanosoma Cruzi, konnten Pissetti und Mitarbeiter (Pissetti et al., 2011) bei Trägern des A-Allels des Polymorphismus (-238) nachweisen. Nach Infektion mit Trypanosoma Cruzi konnte bei Trägern der Genotypvariante TNF $\alpha$  (A-238-A) oder (G-238-A) ein deutlich erhöhter TNF $\alpha$ - Spiegel nachwiesen werden im Vergleich zu der

Genotypvariante TNF $\alpha$  (G-238-G) (Pissetti et al., 2011). In der Assoziationsstudie von Whyte et al. (Whyte et al., 2000) wurde bei englischen und italienischen Probanden mit einer fibrosierenden Alveolitis eine TNF $\alpha$  (-308) Genotypisierung durchgeführt und das Erkrankungsrisiko ermittelt. Träger des A-Allels des Polymorphismus (-308) hatten demnach ein erhöhtes Risiko an einer fibrosierenden Alveolitis zu erkranken. Für die englischen Patienten ergab die Risikoabschätzung einen Wert von OR=1,85; 95%-KI=0,94-3,63, p=0,075, für die italienischen Patienten ergab die Risikoabschätzung einen Wert von OR=2,50; 95%KI=1,14-5,47, p=0,022. Für die Genotypverteilung zeigten sich keine demographischen Differenzen. Das A-Allel des Polymorphismus (-308) war nach den Untersuchungen von Riha et al. (Riha et al., 2004) bei australischen Patienten mit einer idiopathischen Lungenfibrose (IPF) überdurchschnittlich häufig vorhanden. Für den heterozygoten Genotyp (-308) G/A konnte ein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko für die IPF nachgewiesen werden (OR=2,9; 95%KI=1,2-7,2, p=0,02), für den homozygoten Genotyp (-308) A/A lag die Risikoabschätzung bei OR=13,9; 95%KI=1,2-160, p=0,04. Somit konnte die Studie von Riha et al. (Riha et al., 2004) für die IPF eine signifikante Risikoerhöhung in Zusammenhang mit dem A-Allel des Polymorphismus (-308) nachweisen.

### **5.6 Assoziation der Polymorphismen (-238) und (-308) des TNF $\alpha$ -Gens mit malignen Erkrankungen**

Die komplexe Rolle des TNF $\alpha$  in malignen Prozessen spiegelt sich in den unterschiedlichen Ergebnissen der analysierten Studien wider, die den Einfluss der TNF $\alpha$  Genpolymorphismen (-238) und (-308) auf maligne Erkrankungen verschiedener Organe untersucht haben. Diese lieferten zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. In unserer Studie wurde das Bronchialkarzinom unterteilt in die Gruppe der durch Asbestfaserstaub verursachten Bronchialkarzinome und die Gruppe der Bronchialkarzinome anderer Genese, bei denen die Ursache für die Entstehung vor allem das Zigarettenrauchen waren. Wir konnten zeigen, dass Träger des A- Allels des Polymorphismus (-308) ein erniedrigtes Risiko haben, an einem asbestinduziertem Bronchialkarzinom zu erkranken (OR<sub>roh</sub>= 0,39; 95%-KI: 0,14-1,04).

Das Risiko für Träger des A-Allels des Polymorphismus (-238) an einem Bronchialkarzinom zu erkranken führte zu einem vergleichbaren Ergebnis: Das A-Allel des Polymorphismus (-238) geht mit einem erniedrigten Risiko sowohl für das asbestinduzierte (OR<sub>roh</sub>=0,47; 95%-KI: 0,10-2,13 und OR<sub>adjustiert</sub>=0,72; 95%-KI: 0,09-

5,56) als für das Bronchialkarzinom anderer Genese ( $OR_{\text{adjustiert}}=0,75$ ; 95%-KI: 0,26-2,18) einher. In einer südkoreanischen Studie (Jang et al., 2001) wurde für das seltene A-Allel des Polymorphismus (-238) ebenfalls ein protektiver Effekt hinsichtlich der Suszeptibilität von Tumorerkrankungen wie das Magenkarzinom, Zervixkarzinom, Kolorektales Karzinom und Nierenzellkarzinom nachgewiesen. Die Autoren konnten zeigen, dass das A-Allels des Polymorphismus (-238) bei Tumoren seltener vertreten war als in der gesunden Kontrollgruppe und das Risiko mit einer  $OR=0,25$ ; 95%-KI: 0,10-0,64) signifikant reduziert war. Die Funktion des A-Allels des Polymorphismus (-238) in Bezug auf maligne Erkrankungen ist allerdings noch nicht einheitlich geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass diese Genotypvariante die Genexpression des  $TNF\alpha$  herunterreguliert. Wie Kaluza et al. (2000) berichten, ist das A-Allels des Polymorphismus (-238) mit einer verminderten Transkriptionrate des  $TNF\alpha$ - Gens und einer erniedrigten Proteinkonzentration assoziiert. Dies könnte als Erklärung für den protektiven Effekt dienen. Shih et al. (Shih et al., 2006) untersuchten 202 Bronchialkarzinompatienten und 205 gesunde Patienten chinesischer Herkunft. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen ( $OR_{\text{adjustiert}}=0,71$ ; 95%-KI: 0,09-5,56) konnten sie ebenfalls ein reduziertes Risiko ( $OR=0,26$ ; 95%-KI=0,13-0,5,  $p<0,0001$ ) für das Bronchialkarzinom bei Trägern des A-Allels des Polymorphismus (-238) feststellen. Die Fall-Kontrollstudie von Liu et al. (Liu et al., 2005) untersuchte an 192 Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom und 146 gesunden Probanden die Suszeptibilität in Abhängigkeit mit dem A-Allel des Polymorphismus (-238). Hierbei stellten auch sie eine protektive Wirkung dieser Genotypvariante in Hinblick auf das Erkrankungsrisiko eines Plattenepithelkarzinoms des Mundes fest ( $OR=0,26$ ; 95%-KI=0,08-0,8,  $p=0,02$ ). Bei der Gegenüberstellung von nicht asbestinduzierten Lungenfibrose und Bronchialkarzinomen anderer Genese haben wir bei Trägern des A-Allels des Polymorphismus (-238) ebenso eine Risikoreduktion für das Bronchialkarzinom ermittelt ( $OR=2,520$ ; 95%-KI=0,589-10,782,  $p=0,213$ ). Aus unseren Ergebnissen geht demnach hervor, dass das A-Allel des Polymorphismus (-238) eine protektive Wirkung auf maligne Lungenerkrankungen aufweist. Wird die Risikoabschätzung zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Lungenkreberkrankungen verglichen, so zeigen unsere Ergebnisse, dass hier ebenfalls eine tendenziell protektive Wirkung des A-Allels des Polymorphismus (-238) auf das asbestinduzierte Bronchialkarzinom ( $OR_{\text{roh}}=0,47$ ; 95%-KI: 0,10-2,13 und  $OR_{\text{adjustiert}}=0,72$ ; 95%-KI: 0,09-5,56) und das Bronchialkarzinom anderer Genese ( $OR_{\text{adjustiert}}=0,75$ ; 95%-KI: 0,26-2,18) zu erkennen

ist. Der „schützende“ Effekt des Polymorphismus (-238) gegenüber malignen Erkrankungen geht einher mit der Erkenntnis, dass bei Trägern des A-Allels des Polymorphismus (-238) eine relativ niedrige TNF $\alpha$  Protein-Konzentration nachzuweisen ist (Kaluza et al., 2000). Die Tabelle 20 zeigt eine Übersicht von Risikoabschätzungen für den Polymorphismus (-238) im internationalen Vergleich in Zusammenhang mit malignen und fibrosierenden Erkrankungen.

In Anbetracht der komplexen Rolle von TNF $\alpha$  sowohl bezüglich maligner Erkrankungen als auch hinsichtlich ethnischer Zugehörigkeit finden sich in der Fachliteratur differente Angaben zwischen dem A-Allel des Polymorphismus (-308) und der Entstehung von malignen Tumorerkrankungen. In der vorliegenden Studie konnten wir für das A-Allel des Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens eine Risikominderung in Bezug auf asbestinduzierte Bronchialkarzinom nachweisen (OR<sub>roh</sub>= 0,39; 95%-KI: 0,14-1,04). Eine positive Korrelation zwischen dem Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens und der Entwicklung von Non Hodgkin Lymphomen, dem Endometriumkarzinom der Gebärmutter und des Prostatakarzinoms konnten die Assoziationstudien von Skibola et al. (Skibola et al., 2010), Sasaki et al. (Sasaki et al., 2000) und Oh et al. (Oh et al., 2000) nachweisen. Gegenläufige Effekte zeigten der TNF $\alpha$  Polymorphismus (-308) und (-238) in Bezug auf nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome in der Studie von Shih et al. (Shih et al., 2006) mit 202 taiwanesischen Patienten. Das A-Allel des Polymorphismus (-308) war hierbei mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert (OR=3,75; 95% KI=2,38-5,92, p<0,0001), wohingegen das A-Allel des Polymorphismus (-238) einen protektiven Effekt auf die Entwicklung von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen hatte (OR=0,26; 95% KI=0,13-0,5, p<0,0001). Liu et al. (Liu et al., 2005) haben in ihren Untersuchungen mit an einem oralem Plattenepithelkarzinom erkrankten Patienten festgestellt, dass bei diesen die Frequenz des G-Allels im Polymorphismus (-308) höher lag als in der gesunden Kontrollgruppe (91,2% vs. 82,2%, p=0,02). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das seltene A-Allel des Polymorphismus (-308) eine protektive Wirkung auf die untersuchte Erkrankung hat. In der Studie von Guo et al. (Guo et al., 2005) wurde bei 555 Patienten und 437 gesunden Probanden aus Nord-China das Erkrankungsrisiko von ösophagealem Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen im Bereich der Kardia in Zusammenhang mit den TNF $\alpha$  und TNF $\beta$  Genpolymorphismen untersucht. Dabei ergab die Kombination beider

Genpolymorphismen ein signifikantes Ergebnis bezüglich der Suszeptibilität dieser beiden histologischen Tumortypen. Die Frequenz des A-Allels im Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens war unter den Patienten seltener als in der gesunden Kontrollgruppe. Die Träger der Genotypen TNF $\alpha$  (-308) G/A und A/A hatten ein reduziertes Risiko an ösophagealem Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomem im Bereich der Kardia zu erkranken. Diese kontroversen Erkenntnisse verdeutlichen die komplexe Rolle des TNF $\alpha$  in der Entwicklung von Tumoren. Dies kann einerseits mit der Tumorart andererseits mit dem unterschiedlichen Differenzierungsgrad des Tumors zusammenhängen, aber auch die ethnischen Zugehörigkeiten könnte diese Diskrepanz erklären.

Die Tabellen 19 und 20 zeigen eine Übersicht von Risikoabschätzungen internationaler für den Polymorphismen (-308) und (-238) in Zusammenhang mit malignen und fibrosierenden Erkrankungen.

**Tab. 19: Assoziationsstudien für den Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens im internationalen Vergleich**

Autor, Jahr	Ethnische Herkunft	Studienpopulation	Erkrankung	Ergebnis der OR-Analyse für PM (-308)
<b>Europäische Studien</b>				
Milicic (2000)	Deutschland	N=96 Patienten n=309 Gesunde	Spondylitis ankylans	OR=0,4; 95% KI= 0,2–0,9; p= 0,03
Milicic (2000)	England	N=306 Patienten n=204 Gesunde	Spondylitis ankylans	Keine Assoziation p=0,05
Whyte (2000)	England	N=88 Patienten N=88 Gesunde	Fibrosierende Alveolitis	OR=1,85; 95% KI:0,94-3,63; p=0,075
Whyte (2000)	Italien	N=61 Patienten N=103	Fibrosierende Alveolitis	OR=2,50; 95% KI:1,14-5,47; p=0,022
<b>Asiatische Studien</b>				
Shih (2006)	Taiwan	N=202 Patienten N=205 GESunde	Bronchialkarzinom	OR=3,75, 95% KI: 2,38-5,92; p < 0.0001
Wang (2005)	Japan	N=126 männl. Patienten N=122 Gesunde	Coal Workers´ Pneumokoniose	Signifikant erhöhtes Risiko s(p<0,01)
Mahdaviani (2008)	Iran	N=60 Patienten N=140 Gesunde	Asthma	Erhöhtes Risiko p=0,001
Ates (2008)	Türkei	N=67 Patienten N=92 Gesunde	Coal Workers´ Pneumokoniose	OR=2,84; 95% KI, 1,08–7,39
<b>Afrikanische Studien</b>				
Corbett (2000)	Afrika	N=121 Patienten N=120 Gesunde	Silikose	Tendenziell erhöhtes Risiko p=0,034
Aidoo (2001)	Kenia	N=1048	Malaria	OR=7,3, 95% KI=2,85–18,9, P = 0,002
<b>Amerikanische Studien</b>				
Yee (2000)	USA	N=30 Patienten N=114 Kontrollgruppe	Leberzirrhose	OR = 2,3; 95% KI: 1,0–5,6; P = 0,0477
Yee (2000)	USA	N=30HCV <sup>+</sup> Patienten mit Leberzirrhose N=114HCV <sup>-</sup> Patienten ohne Leberzirrhose	Leberzirrhose( HCV)	OR=3,2 95% KI:0,9–9,9 p=0,033

**Tab. 20: Assoziationsstudien für den Polymorphismus (-238) des TNF $\alpha$ - Gens im internationalen Vergleich**

Autor, Jahr	Ethnische Herkunft	Studienpopulation	Erkrankung	Ergebnis der OR-Analyse für PM (-238)
<b>Europäische Studien</b>				
Milicic (2000)	Deutschland	N=96 Patienten n=309 Gesunde	Spondylitis ankylans	Keine Assoziation p=0,05
Milicic (2000)	England	N=306 Patienten n=204 Gesunde	Spondylitis ankylans	Keine Assoziation p=0,05
<b>Amerikanische Studien</b>				
Yee (2000)	USA	N=30 Patienten N=114 Kontrollgruppe	Leberzirrhose	OR = 3,8; 95% KI: 1,2–12,3; P = 0,0198
Yee (2000)	USA	N=30HCV <sup>+</sup> Patienten mit Leberzirrhose N=114HCV <sup>-</sup> Patienten ohne Leberzirrhose	Leberzirrhose (Hepatitis C)	OR=5,1 95% KI:1,1–16,1 p=0,035
<b>Asiatische Studien</b>				
Liu (2005)	Taiwan	N=192 Patienten N=146 Gesunde	Orales Squamosazell-Karzinom	OR=0,26 95% KI: 0,08–0,8, p=0,02
Shih (2005)	Taiwan	N=202 Patienten N=205 Gesunde	Bronchialkarzinom	OR=0,26, 95% KI 0,13–0,50; p < 0,0001
Wang (2005)	Japan	N=127 Patienten N=121 Gesunde	Coal Workers' Pneumokoniose	Keine Assoziation zum PM -238
Ates (2008)	Türkei	N=67 Patienten N=92 Gesunde	Coal Workers' Pneumokoniose	OR=3,79 (95% KI: 1,37–10,46)
<b>Afrikanische Studie</b>				
Corbett (2000)	Afrika	N=121 Patienten N=120 Gesunde	Silikose	Erhöhtes Risiko p=0,022



## 6 Zusammenfassung

TNF $\alpha$  spielt als eines der bedeutendsten proinflammatorischen Zytokine eine Schlüsselrolle in der Pathogenese entzündlicher und maligner Erkrankungen. Für die Promoterregion des TNF $\alpha$ - Gens sind die Einzelnukleotidpolymorphismen an der Stelle (-238) und (-308) bisher am besten untersucht und korrelieren mit einer veränderten TNF $\alpha$  Protein-Konzentration *in vitro*. Diese beiden Einzelnukleotidpolymorphismen wurden hier im Rahmen einer Assoziationsstudie untersucht. Die Bestimmung der Genotypen erfolgte mit Hilfe der qualitativen PCR.

Das Patientenkollektiv bestand aus n=1019 Probanden, welches sich aus n=162 Silikosen (Nr. 4101 BKV), n=395 Asbestosen (Nr. 4103 BKV), n=33 asbestverursachten Pleuramesotheliomen (Nr. 4105 BKV) und n=374 Bronchialkarzinomen (davon n=48 Asbestinduzierte Bronchialkarzinome (Nr. 4104 BKV) zusammensetzte. Das Kontrollkollektiv bestand aus 177 gesunden Probanden.

Wir konnten zeigen, dass das A-Allel des Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens mit einer signifikanten Risikoerhöhung für Asbestosen ( $OR_{roh} = 1,57$ ; 95%-KI: 1,05-2,36;  $p=0,03$ ), insbesondere für die an einer schwerwiegenden Lungenasbestose leidenden Patienten mit der ILO- Klassifikation 3/2, 3/3 und 3+ ( $OR_{roh} = 4,15$ ; 95%-KI: 1,06-16,16;  $p=0,04$ ) assoziiert war. Der Vergleich von Patienten mit Asbestose und Patienten mit asbestinduzierten Bronchialkarzinomen zeigt ebenfalls signifikante Ergebnisse ( $OR_{roh} = 4,08$ ; 95%-KI: 1,53-10,54;  $p=0,004$  und  $OR_{adjustiert} = 3,89$ ; 95%-KI: 1,49-10,17;  $p=0,006$ ). Das A-Allel des TNF $\alpha$  Polymorphismus (-238) ist bezüglich der asbestinduzierten Bronchialkarzinome mit einem tendenziell protektiven Effekt assoziiert ( $OR_{roh} = 0,47$ ; 95%-KI: 0,10-2,13;  $p=0,33$ ) und ( $OR_{adjustiert} = 0,715$ ; 95%-KI: 0,092-5,561;  $p=0,749$ ). Für das A-Allel des TNF $\alpha$  Polymorphismus (-238) konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden, auch der direkte Vergleich zwischen fibrosierenden und malignen Lungenerkrankungen ließ lediglich eine tendenziell Risikoveränderungen nachweisen. Hierbei zeigte sich ein erhöhtes Risiko für fibrosierende Lungenerkrankungen ( $OR_{roh} = 1,058$ ; 95%-KI: 0,687-1,631;  $p=0,797$ ) und ( $OR_{adjustiert} = 1,056$ ; 95%-KI: 0,65-1,716;  $p=0,826$ ). Insgesamt haben Träger des A-Allels der Polymorphismen (-308) und (-238) ein deutlich erhöhtes Risiko an fibrosierenden Lungenerkrankungen zu erkranken und ein erniedrigtes Risiko für Tumorerkrankungen. Diese genetische Variabilität könnte einen Teil der

interindividuell unterschiedlichen Suszeptibilität erklären. In der weltweiten Literatur finden sich wenige Studien, die den Zusammenhang zwischen den Einzelnukleotidpolymorphismen an der Stelle -238 und -308 des TNF $\alpha$  und Pneumokoniosen untersucht haben.

## 7 Summary

Tumour Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ) is one of the most potent proinflammatory cytokine and has been suggested to play an important role in the pathogenesis of inflammable diseases as well of various malignant diseases. The best examined single nucleotid polymorphisms (SNPs) in the promoter of TNF $\alpha$  gene is the (-238) and (-308) SNP. They are associated with a modified TNF $\alpha$  level in vitro. Both SNPs were examined in a case control study.

We defined the genotypes via a qualitative polymerase chain reaction. We genotyped the TNF $\alpha$  gene in 1019 patients and 177 healthy controls. The patient population is composed of following occupational diseases: 162 silicosis (no. 4101 BKV), 395 asbestosis (no. 4103 BKV), 33 pleural mesothelioma (no. 4105 BKV) and 374 bronchial carcinoma (48 due to asbestos, no. 4104 BKV).

The A-Allele of the (-308) polymorphism was found to be significantly associated with a higher risk for asbestosis (OR<sub>crude</sub> = 1.57; 95%-CI: 1.05-2.36; p=0.03), especially for severe asbestosis (OR<sub>crude</sub>= 4.15; 95%-CI: 1.06-16.16; p=0.04). We further demonstrated for lung fibrosis patients vs. lung cancer patients that an A allele at -308 of the TNF $\alpha$  promoter was significantly associated with a higher risk for fibrotic lung diseases (OR<sub>crude</sub>= 4.08; 95%-CI: 1.53-10.54; p=0.004 and OR<sub>adj.</sub> = 3.89; 95%-CI: 1.49-10.17; p=0.006). An A allele at (-238) of the TNF $\alpha$  promoter was found to have an protective effect on asbestos induced lung cancer (OR<sub>crude</sub> = 0.47; 95%-CI: 0.10-2.13; p=0.33 and OR<sub>adj.</sub> = 0.715; 95%-CI: 0.092-5.561; p=0.749). These results did not gain any significance, even when OR was performed for lung fibrosis patients versus lung cancer patients. The lung fibrosos patients were at a higher risk when carrying the A allele but significane remained to be achieved (OR<sub>crude</sub> = 1.058; 95%-CI: 0.687-1.631; p=0.797 and OR<sub>adj.</sub> = 1.056; 95%-CI: 0.65-1.716; p=0.826).

In summary, the A-Allele of the (-238) and (-308) polymorphisms are associated with a higher risk for fibrotic lung diseases and a lower risk for malignant lung cancers. These genetic variations could explain the interindividuel susceptibility to lung diseases. Examinations, like this study, that relate significant diseases in the domain of occupational medicine to TNF $\alpha$  SNPs, are rare to find in worldwide literature, and can barely be compared to the high number of cases in the examined population.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

$\Lambda$	Lambda (Wellenlänge)
A	Adenosin
Arg	Arginin
BC	Bronchialcarcinom
BK	Berufskrankheit
BKV	Berufskrankheitenverordnung
BRD	Bundesrepublik Deutschland
C	Cytosin
CD4+	Cluster of Differentiation 4 tragender T- Lymphozyt
COX	Cyclooxygenase
CTL	cytotoxischer T-Lymphozyt
DC	Dendritische Zelle
DD	Death Domaine
DEPC	Diethylen Pyrocarbonat
DANN	Desoxyribonucleinacid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FADD	Fas Associated protein with Death Domain
For	forward
FRET	<b>F</b> luorescence <b>R</b> esonance <b>E</b> nergy <b>T</b> ransfer
G	Guanin
H <sub>2</sub> O	Wasser
IKK	IkappaB kinase
IKB	Inhibitor of NF- $\kappa$ B
ILO	Internationale Staublungenklassifikation
INF $\gamma$	Interferon gamma
kDa	Kilo Dalton
KI	Konfidenzintervall
LED	Leuchtdiode (engl. <u>L</u> ight <u>E</u> mitting <u>D</u> iode)
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharid

LC	LightCycler
MEKK	MEK- Kinase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonucleinacid
mt	mutanter Typ
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nuklearer Faktor kappa B
NIK	NF-κB-inducing kinase
NK	Natürliche Killerzelle
NKT	Natürliche Killer T-Zelle
NOS	Nitric oxide synthase
OD	Optische Dichte
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase Chain Reaction
PJ	<u>P</u> ackungsjahr
PM	Polymorphismus
p-Wert	Signifikanz
RIP	Receptor-interacting protein
ROI	reactive oxygen intermediate
Rpm	Rotations per minute
T	Thymin
Taq	Thermophilus aquaticus
TGFβ	Transforming Growth Factor beta
Th 17	T- Helferzelle 17
TNFα	Tumor Nekrose Faktor alpha
TNFR1	TNF Rezeptor 1
TNFR2	TNF Rezeptor 2
Treg	regulatorische T-Zelle
TRADD	TNF-receptor 1-associated death domain protein
TRAF	TNF-receptor-associated Factor
UV	Ultraviolett

WHO	World Health Organisation
Wt	Wildtyp

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Pathomechanismus der Entstehung von Fibrose nach Einwirkung von Asbestfasern. Mod. nach Kamp & Weitzmann, 1999. ROS = Reaktive Sauerstoff Spezies; RNS = reaktive Stickstoff Spezies .....	3
Abb. 2: Aktivierung immunkompetenter Zellen nach Asbestinhalation ( mod. nach Matsuzaki et al., 2012).....	6
Abb. 3: Intrazelluläre Signalkaskade des TNF $\alpha$ ( modifiziert nach Übersicht: siehe Rahman et al., 2006).....	10
Abb. 4: Schmelzkurven für die Promoterregion -308 des TNF $\alpha$ Gens.....	24
Abb. 5: Schmelzkurven für die Promoterregion (-238) des TNF $\alpha$ - Gens .....	25
Abb. 6: Sequenz der untersuchten Genregion des TNF $\alpha$ Gens mit Markierung der Ansatzstellen für die in der Real-Time PCR bei -308 und -238 verwendeten Sonden (Sonde -308 und Sonde -238) und Primer (TNF-396 und TNF -069). An Stelle -308 und -238 befinden sich die Punktmutationen von Guanin zu Adenin, siehe kleine rote Pfeile .....	27
Abb. 7: Zusammenspiel zwischen TNF $\alpha$ und den sechs Kennzeichen der Malignität (modifiziert nach Szlosarek et al., 2006) .....	57

## 10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Kontroll- und Patientenkollektiv (nach Erkrankungen) mit Darstellung des Alters.....	16
Tab. 2: Kontroll- und Patientenkollektiv mit Darstellung des Rauchverhaltens .....	17
Tab. 3: Kontroll- und Patientenkollektiv mit Darstellung der Geschlechtsverteilung .....	18
Tab. 4: Anerkannte BK- Fälle des Patientenkollektivs .....	18
Tab. 5: Pipettierschema für Fast Start Master Hybridisation Probes, Roche .....	26
Tab. 6: Primersequenzen und Sondensequenzen der qualitativen PCR TNF $\alpha$ – 396 und TNF $\alpha$ -238.....	26
Tab. 7: Programmierung der PCR. Analyse mittels LightCycler .....	28
Tab. 8: Genotypverteilung für den Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens .....	32

Tab. 9: Genotypverteilung für den Polymorphismus (-238) des TNF $\alpha$ - Gens .....	34
Tab. 10: Genotypverteilung und Allelfrequenzdarstellung für den Polymorphismus (-308) und (-238) des TNF $\alpha$ - Gens (Synopsis).....	35
Tab. 11: Rohe Odds Ratios der einzelnen Diagnosen in Bezug auf das Kontrollkollektiv in Abhängigkeit von dem Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens .....	37
Tab. 12: Auf Alter, Rauchverhalten und Geschlecht adjustierte Risikoabschätzungen (Odds Ratios) der Kollektive in Abhängigkeit von dem Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens .....	38
Tab. 13: Rohe Odds Ratios der einzelnen Diagnosen in Bezug auf das Kontrollkollektiv in Abhängigkeit von dem Polymorphismus (-238) des TNF $\alpha$ - Gens .....	40
Tab. 14: Auf Alter, Rauchverhalten und Geschlecht adjustierte Risikoabschätzungen (Odds Ratios) der Kollektive in Abhängigkeit von dem Polymorphismus (-238) des TNF $\alpha$ - Gens .....	41
Tab. 15: Vergleich der Risiken Asbestfaserstaubverursachter Lungenfibrosen mit denen eines Asbestfaserstaubverursachen Bronchialkarzinoms .....	43
Tab. 16: Genotypfrequenzen TNF $\alpha$ an Stelle (-308) im internationalen Vergleich.....	47
Tab. 17: Genotypfrequenzen TNF $\alpha$ an Stelle (-238) im internationalen Vergleich.....	49
Tab. 18: Allelfrequenzen der Polymorphismen an Stelle (-238) und (-308) des TNF $\alpha$ - Gens in Abhängigkeit von der ethnischen Herkunft .....	52
Tab. 19: Assoziationsstudien für den Polymorphismus (-308) des TNF $\alpha$ - Gens im internationalen Vergleich.....	66
Tab. 20: Assoziationsstudien für den Polymorphismus (-238) des TNF $\alpha$ - Gens im internationalen Vergleich.....	67

## 11 Literaturverzeichnis

1. Aidoo, M., McElroy, P.D., Kolczak, M.S., Terlouw, D.J., ter Kuile, F.O., Nahlen, B., Lal, A.A. & Udhayakumar, V. *Tumor necrosis factor-alpha promoter variant 2 (TNF2) is associated with pre-term delivery, infant mortality, and malaria morbidity in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project IX.* Genet Epidemiol 21, (2001) 201-211
2. Arias, A.I., Giles, B., Eiermann, T.H., Sterry, W. & Pandey, J.P. *Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in psoriasis.* Exp Clin Immunogenet 14, (1997) 118-122
3. Ates, I., Suzen, H.S., Yucesoy, B., Tekin, I.O. & Karakaya, A. *Association of cytokine gene polymorphisms in CWP and its severity in Turkish coal workers.* Am J Ind Med 51, (2008) 741-747
4. Azmy, I.A.F., Balasubramanian, S.P., Wilson, A.G., Stephenson, T.J., Cox, A., Brown, N.J. & Reed, M.W.R. *Role of tumour necrosis factor gene polymorphisms (-308 and -238) in breast cancer susceptibility and severity.* Breast Cancer Res 6, (2004) R395-R400
5. Balkwill, F. *TNF-alpha in promotion and progression of cancer.* Cancer Metastasis Rev 25, (2006) 409-416
6. 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.* Mutat Res 579, (2005) 6-21
7. Boraska, V., Skrabi, V., Culi, V.C., Beci, K., Kapitanovi, S. & Zemunik, T. *Association of TNF promoter polymorphisms with type 1 diabetes in the South Croatian population.* Biol Res 41, (2008) 157-163
8. Brett, P.M., Z.P.G.G.S.T.M.P.M.D.F. & Tonetti, M. *Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis.* J Dent Res 84, (2005) 1149-53



9. Brockmann, M.  
*Brockmann, M. 1992. Malignes diffuses Pleuramesotheliom*  
Schriftreihe des Hauptverbandes der gewerblichen Bundesgenossenschaften.  
(1992)
10. Brown, T.  
*Silica exposure, smoking, silicosis and lung cancer--complex interactions.*  
Occup Med 59, (2009) 89-95
11. Burton, E.R. & Libutti, S.K.  
*Targeting TNF-alpha for cancer therapy.*  
J Biol 8, (2009) 8, 85
12. Caballero, A., Bravo, M.J., Nieto, A., Colmenero, J.D., Alonso, A. & Martín, J.  
*TNFA promoter polymorphism and susceptibility to brucellosis.*  
Clin Exp Immunol 121, (2000) 480-483
13. Cabrera, M., Shaw, M.A., Sharples, C., Williams, H., Castes, M., Convit, J. & Blackwell, J.M.  
*Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis.*  
J Exp Med 182, (1995) 1259-1264
14. Camarena, A., Juárez, A., Mejía, M., Estrada, A., Carrillo, G., Falfán, R., Zuñiga, J., Navarro, C., Granados, J. & Selman, M.  
*Major histocompatibility complex and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in pigeon breeder's disease.*  
Am J Respir Crit Care Med 163, (2001) 1528-1533
15. Carbone, M., Baris, Y.I., Bertino, P., Brass, B., Comertpay, S., Dogan, A.U., Gaudino, G., Jube, S., Kanodia, S., Partridge, C.R., Pass, H.I., Rivera, Z.S., Steele, I., Tuncer, M., Way, S., Yang, H. & Miller, A.  
*Erionite exposure in North Dakota and Turkish villages with mesothelioma.*  
Proc Natl Acad Sci U S A 108, (2011) 13618-13623
16. Carbone, M. & Yang, H.  
*Molecular pathways: targeting mechanisms of asbestos and erionite carcinogenesis in mesothelioma.*  
Clin Cancer Res 18, (2012) 598-604

17. Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N. & Williamson, B.  
*An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.*  
Proc Natl Acad Sci U S A 72, (1975) 3666-3670
18. Castro-Santos, P., Mozo, L., Gutiérrez, C. & Suárez, A.  
*TNFalpha genotype influences development of IgA-ASCA antibodies in Crohn's disease patients with CARD15 wild type.*  
Clin Immunol 121, (2006) 305-313
19. Chen, W.J. & Mottet, N.K.  
*Malignant mesothelioma with minimal asbestos exposure.*  
Hum Pathol 9, (1978) 253-258
20. Churg, A., Wright, J.L. & Vedal, S.  
*Fiber burden and patterns of asbestos-related disease in chrysotile miners and millers.*  
Am Rev Respir Dis 148, (1993) 25-31
21. Corbett, E.L., Mozzato-Chamay, N., Butterworth, A.E., Cock, K.M.D., Williams, B.G., Churchyard, G.J. & Conway, D.J.  
*Polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter may predispose to severe silicosis in black South African miners.*  
Am J Respir Crit Care Med 165, (2002) 690-693
22. Craighead, J.E., Abraham, J.L., Churg, A., Green, F.H., Kleinerman, 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. Report of the Pneumoconiosis Committee of the College of American Pathologists and the National Institute for Occupational Safety and Health.*  
Arch Pathol Lab Med 106, (1982) 544-596
23. DGUV  
*DGUV Statistics 2010*  
Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung e.V. BK-Dok, Sankt Augustin, (2012)
24. Driscoll, K.E.  
*TNFalpha and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress.*  
Toxicol Lett 112-113, (2000) 177-183

25. Du, J., Yuan, Z., Zhang, C., Fu, W., Jiang, H., Chen, B. & Hou, J.  
*Role of the TNF $\alpha$  promoter polymorphisms for development of multiple myeloma and clinical outcome in thalidomide plus dexamethasone.*  
Leuk Res 34, (2010) 1453-1458
26. Elahi, M.M., Asotra, K., Matata, B.M. & Mastana, S.S.  
*Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease.*  
Biochim Biophys Acta 1792, (2009) 163-172
27. Fan, W., Maoqing, W., Wangyang, C., Fulan, H., Dandan, L., Jiaojiao, R., Xinshu, D., Binbin, C. & Yashuang, Z.  
*Relationship between the polymorphism of tumor necrosis factor- $\alpha$ -308 G>A and susceptibility to inflammatory bowel diseases and colorectal cancer: a meta-analysis.*  
Eur J Hum Genet 19, (2011) 432-437
28. Feng, R.-N., Zhao, C., Sun, C.-H. & Li, Y.  
*Meta-analysis of TNF 308 G/A polymorphism and type 2 diabetes mellitus.*  
PLoS One 6, (2011) e18480
29. Ferguson, L.R., Huebner, C., Petermann, I., Gearry, R.B., Barclay, M.L., Demmers, P., McCulloch, A. & Han, D.Y.  
*Single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene affects inflammatory bowel diseases risk.*  
World J Gastroenterol 14, (2008) 4652-4661
30. Flego, V., Badovinac, A.R., Bulat-Kardum, L., Matani, D., Crni-Martinovi, M., Kapovi, M. & Risti, S.  
*Primary lung cancer and TNF-alpha gene polymorphisms: a case-control study in a Croatian population.*  
Med Sci Monit 15, (2009) CR361-CR365
31. García-González, M.A., Aísa, M.A.P., Strunk, M., Benito, R., Piazuelo, E., Jiménez, P., Sopena, F. & Lanas, A.  
*Relevance of IL-1 and TNF gene polymorphisms on interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha gastric mucosal production.*  
Hum Immunol 70, (2009) 935-945
32. Grove, J., Daly, A.K., Bassendine, M.F. & Day, C.P.  
*Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility*

- to alcoholic steatohepatitis.*  
Hepatology 26, (1997) 143-146
33. Gu, L.-Q., Zhu, W., Pan, C.-M., Zhao, L., Zhang, M.-J., Liu, J.-M., Song, H.-D., Ning, G. & Zhao, Y.-J.  
*Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) polymorphisms in Chinese patients with Graves' disease.*  
Clin Biochem 43, (2009) 223-227
34. Guo, W., Wang, N., Li, Y. & Zhang, J.-H.  
*Polymorphisms in tumor necrosis factor genes and susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardiac adenocarcinoma in a population of high incidence region of North China.*  
Chin Med J (Engl) 118, (2005) 1870-1878
35. Hanahan, D. & Weinberg, R.A.  
*The hallmarks of cancer.*  
Cell 100, (2000) 57-70
36. Hardy, J.A. & Aust, A.E.  
*The effect of iron binding on the ability of crocidolite asbestos to catalyze DNA single-strand breaks.*  
Carcinogenesis 16, (1995) 319-325
37. Havell, E.A., Fiers, W. & North, R.J.  
*The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF), I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity.*  
J Exp Med 167, (1988) 1067-1085
38. Helmig, S., Aliahmadi, N. & Schneider, J.  
*Tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms in asbestos-induced diseases.*  
Biomarkers 15, (2010) 400-409
39. Helmig, S., Aliahmadi, N., Stephan, P., Döhrel, J. & Schneider, J.  
*TNF- $\alpha$  -308 genotypes are associated with TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  mRNA expression in blood leucocytes of humans.*  
Cytokine 53, (2011) 306-310
40. Ho, S.-Y., Wang, Y.-J., Chen, H.-L., Chen, C.-H., Chang, C.-J., Wang, P.-J., Chen, H.H.W. & Guo, H.-R.  
*Increased risk of developing hepatocellular carcinoma associated with carriage*

- of the TNF2 allele of the -308 tumor necrosis factor-alpha promoter gene.*  
Cancer Causes Control 15, (2004) 657-663
41. Huang, S.L., Su, C.H. & Chang, S.C.  
*Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis.*  
Am J Respir Crit Care Med 156, (1997) 1436-1439
42. IARC International Agency for Research on Cancer  
*Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man: Silicia and some silicates.*  
IARC-Monographs 1987; 42, Lyon.
43. Jang, W.H., Yang, Y.I., Yea, S.S., Lee, Y.J., Chun, J.H., Kim, H.I., Kim, M.S. & Paik, K.H.  
*The -238 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers.*  
Cancer Lett 166, (2001) 41-46
44. Johansson, L., Albin, M., Jakobsson, K. & Mikoczy, Z.  
*Histological type of lung carcinoma in asbestos cement workers and matched controls.*  
Br J Ind Med 49(9), (1992) 626-630
45. Kaluza, W., Reuss, E., Grossmann, S., Hug, R., Schopf, R.E., Galle, P.R., Maerker-Hermann, E. & Hoehler, T.  
*Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism.*  
J Invest Dermatol 114, (2000) 1180-1183
46. Kamp, D.W., Graceffa, P., Pryor, W.A. & Weitzman, S.A.  
*The role of free radicals in asbestos-induced diseases.*  
Free Radic Biol Med 12, (1992) 293-315
47. Kamp, D.W., W.S.  
*The molecular basis of asbestos induced lung injury.*  
Thorax 54, (1999) 638-652
48. Kannerstein, M. & Churg, J.  
*Pathology of carcinoma of the lung associated with asbestos exposure.*  
Cancer 30, (1972) 14-21
49. Kohaar, I., Tiwari, P., Kumar, R., Nasare, V., Thakur, N., Das, B.C. & Bharadwaj, M.

- Association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in TNF-LTA locus with breast cancer risk in Indian population.*  
Breast Cancer Res Treat 114, (2009)347-355
50. Konietzko, N. und Teschler, H.  
*Asbest und Lunge*  
Darmstadt, Steinkopff-Verlag (1992)
51. Krawczak, M. Schmidtke, J.  
*DNA-Fingerprinting*  
Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag (1994)
52. Kroeger, K.M., Carville, K.S. & Abraham, L.J.  
*The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription.*  
Mol Immunol 34, (1997) 391-399
53. Lacasse, Y., Martin, S., Gagné, D. & Lakhil, L.  
*Dose-response meta-analysis of silica and lung cancer.*  
Cancer Causes Control 20, (2009) 925-933
54. Lawson, W.E. & Loyd, J.E.  
*The genetic approach in pulmonary fibrosis: can it provide clues to this complex disease?*  
Proc Am Thorac Soc 3, (2006) 345-349
55. Leibovich, S.J., Polverini, P.J., Shepard, H.M., Wiseman, D.M., Shively, V. & Nuseir, N.  
*Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha.*  
Nature 329, (1987) 630-632
56. Lesur, O., Bouhadiba, T., Melloni, B., Cantin, A., Whitsett, J.A. & Bégin, R.  
*Alterations of surfactant lipid turnover in silicosis: evidence of a role for surfactant-associated protein A (SP-A).*  
Int J Exp Patho 76, (1995) 287-298
57. Leung, C.C., Yu, I.T.S. & Chen, W.  
*Silicosis.*  
Lancet 379, (2012) 2008-2018
58. Liu, C., Wang, J., Zhou, S., Wang, B. & Ma, X.  
*Association between -238 but not -308 polymorphism of Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)v and unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) in*

- Chinese population.*  
Reprod Biol Endocrinol 8, (2010) 114
59. Liu, C.-J., Wong, Y.-K., Chang, K.-W., Chang, H.-C., Liu, H.-F. & Lee, Y.-J.  
*Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with susceptibility to oral squamous cell carcinoma.*  
J Oral Pathol Med 34, (2005) 608-612
60. Löffler & Petrides  
*Biochemie und Pathobiochemie*  
Heidelberg, Springer (1997)
61. Madl, A.K., Donovan, E.P., Gaffney, S.H., McKinley, M.A., Moody, E.C., Henshaw, J.L. & Paustenbach, D.J.  
*State-of-the-science review of the occupational health hazards of crystalline silica in abrasive blasting operations and related requirements for respiratory protection.*  
J Toxicol 11 (2008) 548-608
62. Mahdavian, S.A., Rezaei, N., Moradi, B., Dorkhosh, S., Amirzargar, A.A. & Movahedi, M.  
*Proinflammatory cytokine gene polymorphisms among Iranian patients with asthma.*  
J Clin Immunol 29 (2009) 57-62
63. Manning, C.B., Vallyathan, V. & Mossman, B.T.  
*Diseases caused by asbestos: mechanisms of injury and disease development.*  
Int Immunopharmacol 2, (2002) 191-200
64. Matsuzaki, H., Maeda, M., Lee, S., Nishimura, Y., Kumagai-Takei, N., Hayashi, H., Yamamoto, S., Hatayama, T., Kojima, Y., Tabata, R., Kishimoto, T., Hiratsuka, J. & Otsuki, T.  
*Asbestos-induced cellular and molecular alteration of immunocompetent cells and their relationship with chronic inflammation and carcinogenesis.*  
J Biomed Biotechnol 2012, (2012) 492-608
65. McGuire, W., Hill, A.V., Allsopp, C.E., Greenwood, B.M. & Kwiatkowski, D.  
*Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria.*  
Nature 371, (1994) 508-510

66. McManus, R., Wilson, A.G., Mansfield, J., Weir, D.G., Duff, G.W. & Kelleher, D.  
*TNF2, a polymorphism of the tumour necrosis-alpha gene promoter, is a component of the celiac disease major histocompatibility complex haplotype.*  
Eur J Immunol 26 (1996) 2113-2118
67. Merza, M., Farnia, P., Anoosheh, S., Varahram, M., Kazampour, M., Pajand, O., Saeif, S., Mirsaeidi, M., Masjedi, M.R., Velayati, A.A. & Hoffner, S.  
*The NRAMPI, VDR and TNF-alpha gene polymorphisms in Iranian tuberculosis patients: the study on host susceptibility.*  
Braz J Infect Dis 13 (2009) 252-256
68. Milicic, A., Lindheimer, F., Laval, S., Rudwaleit, M., Ackerman, H., Wordsworth, P., Hohler, T. & Brown, M.A.  
*Interethnic studies of TNF polymorphisms confirm the likely presence of a second MHC susceptibility locus in ankylosing spondylitis.*  
Genes Immun 1, (2000) 418-422
69. Mossman, B.T. & Churg, A.  
*Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis.*  
Am J Respir Crit Care Med 157, (1998) 1666-1680
70. Mossman, B.T., Kamp, D.W. & Weitzman, S.A.  
*Mechanisms of carcinogenesis and clinical features of asbestos-associated cancers.*  
Cancer Invest 14, (1996) 466-480
71. Mossman, B.T., Lippmann, M., Hesterberg, T.W., Kelsey, K.T., Barchowsky, A. & Bonner, J.C.  
*Pulmonary endpoints (lung carcinomas and asbestosis) following inhalation exposure to asbestos.*  
J Toxicol Environ Health B Crit Rev 14, (2011) 76-121
72. Movahedi, M., Mahdavian, S.A., Rezaei, N., Moradi, B., Dorkhosh, S. & Amirzargar, A.A.  
*IL-10, TGF-beta, IL-2, IL-12, and IFN-gamma cytokine gene polymorphisms in asthma.*  
J Asthma 45, (2008) 790-794
73. Mundt, A.J., Vijayakumar, S., Nemunaitis, J., Sandler, A., Schwartz, H., Hanna, N., Peabody, T., Senzer, N., Chu, K., Rasmussen, C.S., Kessler, P.D., Rasmussen,



- H.S., Warso, M., Kufe, D.W., Gupta, T.D. & Weichselbaum, R.R.  
*A Phase I trial of TNFerade biologic in patients with soft tissue sarcoma in the extremities.*  
Clin Cancer Res 10, (2004) 5747-5753
74. Mutsaers, S.E., Prele, C.M., Brody, A.R. & Idell, S.  
*Pathogenesis of pleural fibrosis.*  
Respirology 9, (2004) 428-440
75. Müller, N.L. & Miller, R.R.  
*Computed tomography of chronic diffuse infiltrative lung disease. Part 2.*  
Am Rev Respir Dis 142, (1990) 1440-1448
76. Noach, L.A., Bosma, N.B., Jansen, J., Hoek, F.J., van Deventer, S.J. & Tytgat, G.N.  
*Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with Helicobacter pylori infection.*  
Scand J Gastroenterol 29, (1994) 425-429
77. O'Dwyer, M.J., Mankan, A.K., Ryan, A.W., Lawless, M.W., Stordeur, P., Kelleher, D., McManus, R. & Ryan, T.  
*Characterization of tumour necrosis factor-alpha genetic variants and mRNA expression in patients with severe sepsis.*  
Int J Immunogenet 35, (2008) 279-285
78. Oh, B.R., Sasaki, M., Perinchery, G., Ryu, S.B., Park, Y.I., Carroll, P. & Dahiya, R.  
*Frequent genotype changes at -308, and 488 regions of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene in patients with prostate cancer.*  
J Urol 163, (2000) 1584-1587
79. Ortis, F., Miani, M., Colli, M.L., Cunha, D.A., Gurzov, E.N., Allagnat, F., Chariot, A. & Eizirik, D.L.  
*Differential usage of NF-kB activating signals by IL-1 and TNF-alpha in pancreatic beta cells.*  
FEBS Lett 586, (2012) 984-989
80. Ozhan, G., Yanar, T.H., Ertekin, C. & Alpertunga, B.  
*The effect of genetic polymorphisms of cyclooxygenase 2 on acute pancreatitis in Turkey.*  
Pancreas 39, (2009) 371-376

81. Park, Y.K., Lee, J.M., Kim, D.Y., Chang, H.Y., Kim, J.K., Lee, C.K., Park, J.Y., Ahn, S.H., Lee, K.S. & Han, K.H.  
*Association between polymorphism of tumor necrosis factor-alpha promoter and response to lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B.*  
Dig Dis Sci 55, (2010) 2043-2048
82. Pissetti, C.W., Correia, D., de Oliveira, R.F., Llaguno, M.M., Balarin, M.A.S., Silva-Grecco, R.L. & Rodrigues, V.  
*Genetic and functional role of TNF-alpha in the development Trypanosoma cruzi infection.*  
PLoS Negl Trop Dis 5, (2011) 976
83. Rahman, M.  
*Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens*  
PLoS Pathog. 2 (2006)
84. 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 34, (2004) 126-129
85. Rom, W.  
*Environmental and occupational medicine.*  
Philadelphia, Lippincott-Raven (1998)
86. Rösler, J.A., Woitowitz, H.-J., Lange, H.-J., Ulm, K., 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)
87. Sanchez, V.C., Pietruska, J.R., Miselis, N.R., Hurt, R.H. & Kane, A.B.  
*Biopersistence and potential adverse health impacts of fibrous nanomaterials: what have we learned from asbestos?*  
Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 1, (2009) 511-529
88. Sasaki, M., Nakajima, K., Perinchery, G., Fujino, T., Oh, B.R., Fujimoto, S. & Dahiya, R.  
*Frequent genotype changes at -308 of the human tumor necrosis factor-alpha promoter region in human uterine endometrial cancer.*  
Oncol Rep 7, (2000) 369-373

89. Schneider, J., Erdogan, S., Woitowitz, H.-J.  
*PAH-assoziierte Lungenkrebskrankungen – ein Beitrag zum Problem der synergistischen Synkanzerogenese.*  
Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed 34, (1999) 476-482
90. Schneider, J., Rödelsperger, K., Woitowitz, H.-J.  
*Staub und Staubinhaltsstoffe/Asbest. Handbuch für Umweltmedizin, 13. Erg.Lfg.*  
Wichmann, Schlipkoeter, Fülgraff (1998)
91. Schneider, J., Woitowitz, H.-J.  
*Quarz und Lungenkrebs aus arbeitsmedizinischer Sicht,*  
Atemw-Lungenkrkh; 2, (2002) 195-199.
92. Schneider, J., Woitowitz, H.-J.  
*Pleuramesotheliom*  
Wichmann, Schlipkoeter, Fülgraff, Handbuch für Umweltmedizin 7, (1995)
93. Scott, K.A., Moore, R.J., Arnott, C.H., East, N., Thompson, R.G., Scallon, B.J.,  
Shealy, D.J. & Balkwill, F.R.  
*An anti-tumor necrosis factor-alpha antibody inhibits the development of experimental skin tumors.*  
Mol Cancer Ther 2, (2003) 445-451
94. Sethi, G., Sung, B. & Aggarwal, B.B.  
*TNF: a master switch for inflammation to cancer.*  
Front Biosci 13, (2008) 5094-5107
95. Shannahan, J.H., Nyska, A., Cesta, M., Schladweiler, M.C.J., Vallant, B.D.,  
Ward, W.O., Ghio, A.J., Gavett, S.H. & Kodavanti, U.P.  
*Subchronic pulmonary pathology, iron overload, and transcriptional activity after Libby amphibole exposure in rat models of cardiovascular disease.*  
Environ Health Perspect 120, (2012) 85-91
96. Shih, C.-M., Lee, Y.-L., Chiou, H.-L., Chen, W., Chang, G.-C., Chou, M.-C. &  
Lin, L.-Y.  
*Association of TNF-alpha polymorphism with susceptibility to and severity of non-small cell lung cancer.*  
Lung Cancer 52, (2006) 15-20
97. Singhal, S., Kohaar, I., Bharadwaj, M., Shukla, D.K., Das, B.C. & Kar, P.  
*Association of tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms with*

- acute viral hepatitis in the Indian population.*  
Dig Dis Sci 55, (2010) 1106-1112
98. Skibola, C.F., Bracci, P.M., Nieters, A., Brooks-Wilson, A., de Sanjosé, S., Hughes, A.M., Cerhan, J.R., Skibola, D.R., Purdue, M., Kane, E., Lan, Q., Foretova, L., Schenk, M., Spinelli, J.J., Slager, S.L., Roos, A.J.D., Smith, M.T., Roman, E., Cozen, W., Boffetta, P., Krickler, A., Zheng, T., Lightfoot, T., Cocco, P., Benavente, Y., Zhang, Y., Hartge, P., Linet, M.S., Becker, N., Brennan, P., Zhang, L., Armstrong, B., Smith, A., Shiao, R., Novak, A.J., Maynadie, M., Chanock, S.J., Staines, A., Holford, T.R., Holly, E.A., Rothman, N. & Wang, S.S. *Tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin-alpha (LTA) polymorphisms and risk of non-Hodgkin lymphoma in the InterLymph Consortium.*  
Am J Epidemiol 171, (2010) 267-276
99. Society, A.T. *Diagnosis and initial management of nonmalignant diseases related to asbestos.*  
Am J Respir Crit Care Med 170, (2004) 691-715
100. Staples, C.A. *Computed tomography in the evaluation of benign asbestos-related disorders.*  
Radiol Clin North Am 30, (1992) 1191-1207
101. Sullivan, K.E., Wooten, C., Schmeckpeper, B.J., Goldman, D. & Petri, M.A. *A promoter polymorphism of tumor necrosis factor alpha associated with systemic lupus erythematosus in African-Americans.*  
Arthritis Rheum 40, (1997) 2207-2211
102. Szlosarek, P., Charles, K.A. & Balkwill, F.R. *Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter.*  
Eur J Cancer 42, (2006) 745-750
103. Trajkov, D., Mishevskaja-Perchinkova, S., Karadzova-Stojanoska, A., Petlichkovski, A., Strezova, A. & Spiroski, M. *Association of 22 cytokine gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in population of ethnic Macedonians.*  
Clin Rheumatol 28, (2009) 1291-1300
104. Ulm, K., W.B. *Quarzfeinstaub und Lungenkarzinom – Ergebnisse einer Fallkontrollstudie zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen einer Exposition gegenüber lungengängigem Quarzfeinstaub und dem Auftreten von Lungenkarzinomen.*

- Hrsg. Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften. Meckenheim, (1998)
105. Uçeyler, N. & Sommer, C.  
*Cytokine regulation and pain. Results of experimental and clinical research*  
Schmerz 22, (2008) 652-664
106. Vassalli, P.  
*The pathophysiology of tumor necrosis factors.*  
Annu Rev Immunol 10, (1992), 411-452
107. Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P.  
*Tumor necrosis factor signaling.*  
Cell Death Differ 10, (2003) 45-65
108. 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 49, (2006) 337-342
109. Wang, X.-T., Ohtsuka, Y., Kimura, K., Muroi, M., Ishida, T., Saito, J. & Munakata, M.  
*Antithetical effect of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism on coal workers' pneumoconiosis (CWP).*  
Am J Ind Med 48, (2005) 24-29
110. Weichselbaum, R.R., Kufe, D.W., Hellman, S., Rasmussen, H.S., King, C.R., Fischer, P.H. & Mauceri, H.J.  
*Radiation-induced tumor necrosis factor-alpha expression: clinical application of transcriptional and physical targeting of gene therapy.*  
Lancet Oncol 3, (2002) 665-671
111. Whyte, M., Hubbard, R., Meliconi, R., Whidborne, M., Eaton, V., Bingle, C., Timms, J., Duff, G., Facchini, A., Pacilli, A., Fabbri, M., Hall, I., Britton, J., Johnston, I. & Giovine, F.D.  
*Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms.*  
Am J Respir Crit Care Med 162, (2000) 755-758
112. Wilson, A.G., Symons, J.A., McDowell, T.L., McDevitt, H.O. & Duff, G.W.  
*Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation.*  
Proc Natl Acad Sci U S A 94, (1997) 3195-3199

113. Witte, J.S., Palmer L.J., O'Connor, R.D., Hopkins, P.J., Hall, J.M.,  
*Relation between tumour necrosis factor polymorphism TNFalpha-308 and risk of asthma*  
Eur J Hum 10 (2002) 82-85
114. Woitowitz, H.-J., Paur, R., Rödelsperger, K.  
*Das Mesotheliom, ein Signaltumor der beruflichen Asbeststaubgefährdung.*  
Dtsch Med Wschr 109 (1984) 363-368
115. Wu, S., Boyer, C.M., Whitaker, R.S., Berchuck, A., Wiener, J.R., Weinberg, J.B.  
& Bast, R.C.  
*Tumor necrosis factor alpha as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor alpha expression.*  
Cancer Res 53, (1993) 1939-1944
116. Yang, H., Bocchetta, M., Kroczyńska, B., Elmishad, A.G., Chen, Y., Liu, Z.,  
Bubici, C., Mossman, B.T., Pass, H.I., Testa, J.R., Franzoso, G. & Carbone, M.  
*TNF-alpha inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF-kappaB-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis.*  
Proc Natl Acad Sci U S A 103, (2006) 10397-10402
117. Yee, L.J., Tang, J., Herrera, J., Kaslow, R.A. & van Leeuwen, D.J.  
*Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection.*  
Genes Immun 1, (2000) 386-390
118. Yucesoy, B., Vallyathan, V., Landsittel, D.P., Sharp, D.S., Matheson, J.,  
Burleson, F. & Luster, M.I.  
*Polymorphisms of the IL-1 gene complex in coal miners with silicosis.*  
Am J Ind Med 39, (2001) 286-291
119. Yucesoy, B., Vallyathan, V., Landsittel, D.P., Sharp, D.S., Weston, A., Burleson,  
G.R., Simeonova, P., McKinstry, M. & Luster, M.I.  
*Association of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 gene polymorphisms with silicosis.*  
Toxicol Appl Pharmacol 172, (2001) 75-82
120. Yucesoy, B., Vallyathan, V., Landsittel, D.P., Simeonova, P. & Luster, M.I.  
*Cytokine polymorphisms in silicosis and other pneumoconioses.*  
Mol Cell Biochem 235-235, (2002) 219-224

121. Zhai, R., Jetten, M., Schins, R.P., Franssen, H. & Borm, P.J.

*Polymorphisms in the promoter of the tumor necrosis factor-alpha gene in coal miners.*

Am J Ind Med 34, (1998) 318-324

## 12 Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

.....  
Ort, Datum

.....  
Unterschrift



## 13 Anhang

### 13.1 Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung

#### **Einwirkung von Fremdstoffen und genetischen Eigenschaften auf die Aktivität von Enzymen im Hinblick auf Lungenerkrankungen**

##### **Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung**

Vollständige Bezeichnung des Forschungsvorhabens:

Genexpressions- und Proteinexpressionsanalysen von am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Enzymen sowie Cytokinen unter dem Einfluß von endogenen und exogenen Faktoren.

Verantwortlicher Träger und Leiter des Forschungsvorhabens:

Herr Prof. Dr. Schneider, Frau Dr. Helmig

Proband/in (Name, Vorname):

....., geb. am ..... Teiln.-Nr. ....

##### **Sehr geehrte Probandin, sehr geehrter Proband,**

unsere Arbeitsgruppe ist sehr daran interessiert, neue wissenschaftliche Erkenntnisse in dem oben genannten Forschungsvorhaben zu gewinnen. Wir wären Ihnen daher sehr dankbar, wenn Sie sich zu einer Teilnahme bereit erklären würden. Diese ist selbstverständlich freiwillig, Sie werden in dieses Forschungsvorhaben also nur dann einbezogen, wenn Sie Ihre Einwilligung erklären. Um Sie über das Vorhaben und über die etwaigen Vorteile und Risiken Ihrer Teilnahme zu informieren, wird der verantwortliche Arzt ein ausführliches Gespräch mit Ihnen führen. Vor diesem Gespräch möchten wir Sie bitten, die nachfolgenden Ausführungen zu lesen. Sie können sich dadurch bereits einen eingehenden Überblick verschaffen.

## Das Forschungsvorhaben

### Worum geht es?

Im Rahmen des Vorhabens ist geplant, bei Ihnen einmalig ca. 40 ml Blut venös (aus dem Arm) zu entnehmen. Aus diesem Blut wird dann im weiteren die RNA und die DNA gewonnen, um so eine Aussage über die Aktivität von Enzymen und über die individuellen genetische Eigenschaften machen zu können. Wir wollen herausfinden inwiefern sich die Aktivität von Enzymen durch äußere Einwirkungen z.B. Rauchen ändert und welchen Einfluss genetische Eigenschaften auf die Aktivität dieser Enzyme haben. So kann zukünftig ein individuelles Lungenkrebsrisiko besser abgeschätzt werden und bei der Vorsorge sowie der Diagnosestellung berücksichtigt werden.

### Bringt mir die Teilnahme persönliche Vorteile?

Ihre Teilnahme ist mit **keinerlei persönlichen Vorteilen** für Sie verbunden. Ihre Teilnahme ermöglicht uns jedoch den Gewinn neuer Erkenntnisse durch Forschung zum Nutzen zukünftiger Patienten. Mit Ihrer Teilnahme leisten Sie also einen uneigennütigen Beitrag zur Förderung des medizinischen Fortschritts.

### Welche Risiken und Belastungen sind zu befürchten?

Das zu untersuchende Blut wird aus einer Vene des Unterarms (V. cubitalis) entnommen. Der kleine Einstich (Punktion) ist in der Regel harmlos und verursacht keine Probleme.

Es ist nicht auszuschließen, dass es im Rahmen der Blutentnahme zur Entstehung von **Hämatomen** (blauen Flecken) an der Entnahmestelle kommen kann.

In sehr seltenen Fällen kann es zu einer **Thrombophlebitis** (Entzündung des Blutgefäßes) kommen.

Eine **verlängerte Blutung** ist nur bei Gerinnungsstörungen oder bei der Einnahme blutverdünnender Medikamente zu befürchten.

Um diese Risiken zu minimieren, werden wir besondere Sorgfaltspflicht walten lassen. Die Blutentnahme wird fachgerecht durchgeführt werden. Vor der Entnahme wird das betroffene Gebiet sorgfältig desinfiziert um so Infektionen und Entzündungen vorzubeugen. Nach der Entnahme wird mit einem sterilen Tupfer Druck auf die Entnahmestelle ausgeübt werden, um eine Blutung sowie der Entstehung von Hämatomen vorzubeugen.

Bei fachgerechter Blutentnahme sind Risiken und Nebenwirkungen eigentlich selten. Kleinere Blutergüsse (Hämatome) sind zumeist harmlos und verschwinden in der Regel nach kurzer Zeit. Stärkere Blutungen oder Infektionen der Punktionsstelle treten äußerst selten auf. Kreislaufempfindliche oder ängstliche Patienten sollten während der Blutentnahme liegen.

Patienten, die mit gerinnungshemmenden Medikamenten (wie Cumarine oder Heparin) dauerbehandelt werden, sollten vor einer Blutentnahme darauf hinweisen. In diesem Fall ist eine längere Kompressionszeit der Vene nach der Punktion sinnvoll. Bei einigen Erkrankungen (z. B. Lähmungen, Hauterkrankungen) sollten Blutentnahmen in den betroffenen Bereichen vermieden werden.

### **Woran ist noch zu denken?**

#### **Ihre persönlichen Daten werden geschützt.**

Die Durchführung des Forschungsvorhabens erfordert es, dass von Ihnen personenbezogene Daten, insbesondere Angaben über Ihre Gesundheit, erhoben, aufgezeichnet und verarbeitet werden. Die erhobenen Daten werden für die **wissenschaftliche Auswertung** des Forschungsvorhabens verwendet, für die **Überwachung** des Forschungsvorhabens durch die zuständigen Überwachungsbehörden sowie für die **Archivierung** der Forschungsergebnisse. Die Verwendung der Daten kann darüber hinaus auch für einen **Antrag auf Zulassung eines Arzneimittels** bei der zuständigen Arzneimittelzulassungsbehörde erforderlich sein oder für eine **Veröffentlichung** der Forschungsergebnisse (beispielsweise in medizinischen Fachzeitschriften).

Die Erhebung, Verarbeitung, Weitergabe und Speicherung der Daten unterliegt strengen **spezialgesetzlichen Bestimmungen**, die restriktiv eingehalten werden. Dementsprechend erfolgt eine Weitergabe und Einsichtnahme Ihrer personenbezogenen Daten nur durch die zuständigen Überwachungsbehörden und durch zur Verschwiegenheit verpflichtete Mitarbeiter der Einrichtung, die die Durchführung des Forschungsvorhabens finanziell fördert. Im übrigen unterliegen Ihre Daten den allgemeinen Bestimmungen des **hessischen Datenschutzgesetzes**. Insbesondere eine Veröffentlichung der Daten in wissenschaftlichen Publikationen erfolgt nur, wenn zuvor jeder Bezug zu Ihrer Person unkenntlich gemacht worden ist, entweder durch **Anonymisierung** oder durch Verwendung eines anderen Namens, also eines **Pseudonyms**.

Ansprechpartner für die Verwaltung Ihrer Daten ist: Frau Dr. Helmig, Institut für Arbeits- und Sozialmedizin, Aulweg 129, 35392 Giessen, Tel.: 06419941315, Fax: 06419941309, email: [simone.helmig@arbmed.med.uni-giessen.de](mailto:simone.helmig@arbmed.med.uni-giessen.de)

## **Es besteht Versicherungsschutz.**

Um den gesetzlichen Vorgaben zu genügen, wurde für die Studie **rein vorsorglich** eine Versicherung abgeschlossen, die im Interesse der Teilnehmer etwaige Schäden abdeckt. Bitte beachten Sie, dass Sie **bei Auftreten einer Gesundheitsschädigung**, die Folge des Forschungsvorhabens sein könnte, gehalten sind, diesen Schaden dem Versicherer unverzüglich anzuzeigen. In einem solchen Fall sind Sie zudem gehalten, zweckmäßige Maßnahme zu treffen, die der Aufklärung der Ursache und des Umfangs des eingetretenen Schadens und der Minderung dieses Schadens dienen. Ausführlichere Informationen hierüber erhalten Sie im Arztgespräch, auch darüber, wie Sie sich verhalten müssen, um Ihren Versicherungsschutz nicht zu gefährden. Auf Wunsch können Sie auch gerne Einsicht in die Versicherungsbedingungen nehmen.

## **Sie können Ihre Teilnahme jederzeit beenden.**

Wenn Sie aus dem Forschungsvorhaben ausscheiden möchten, können Sie Ihre Einwilligung jederzeit und **ohne Angabe von Gründen** widerrufen. Durch den Widerruf entstehen Ihnen **keinerlei Nachteile**.

Zum Zeitpunkt Ihres Widerrufs bereits erhobene **personenbezogene Daten** werden von Ihrem Widerruf jedoch nur dann erfasst, wenn deren weitere Verwendung nicht erforderlich ist. Häufig ist eine solche **weitere Verwendung** der bereits erhobenen Daten jedoch erforderlich, um die **wissenschaftliche Auswertung** des Forschungsvorhabens nicht zu gefährden. Sollten bei Ihrem Ausscheiden aus dem Forschungsvorhaben bereits einzelne Maßnahmen bei Ihnen durchgeführt worden sein, läge eine Löschung der bereits erhobenen Daten auch gar nicht **in Ihrem eigenen Interesse**. Denn sollten im Nachhinein Risiken oder Nebenwirkungen dieser Maßnahmen bekannt werden, können wir Sie nur dann über eine medizinische Nachsorge informieren, wenn uns zu diesem Zeitpunkt Ihre Daten noch vorliegen.

Wir werden daher im Fall eines Widerrufs **unverzüglich prüfen**, ob Ihre Daten aus den genannten Gründen weiter benötigt werden. Sollte dies nicht der Fall sein, werden Ihre Daten je nach den technischen Gegebenheiten umgehend gesperrt, gelöscht oder vernichtet. Anderenfalls werden Ihre Daten erst mit Wegfall der genannten längerfristigen Verwendungszwecke gelöscht, unabhängig hiervon jedoch spätestens mit Ablauf der vorgeschriebenen Aufbewahrungsfrist.

## Einwilligungserklärung

Ich habe mir anhand des ausgehändigten Aufklärungsbogens einen Überblick über das Forschungsvorhaben verschafft.

Anschließend hat Dr. .... am ..... um ..... Uhr ein ausführliches Gespräch mit mir geführt. Gegenstand des Gesprächs war insbesondere

- der nähere Inhalt und der praktische Ablauf des Vorhabens, vor allem .....

die Fragestellung des Projektes.....;

- die Frage, inwieweit Vorteile, Risiken oder Belastungen zu erwarten sind, vor allem .....

die Blutentnahme betreffend .....

- Fragen des Daten- und Versicherungsschutzes sowie der Hinweis auf mein jederzeitiges Widerrufsrecht.

Ich hatte Gelegenheit, Fragen zu stellen, und habe eine Kopie der vorliegenden Unterlagen erhalten. Anschließend wurde mir ausreichend Zeit gewährt, um in Ruhe über meine Teilnahme nachzudenken. Derzeit habe ich keine weiteren Fragen.

**Mit der Teilnahme an dem Forschungsvorhaben bin ich einverstanden.**

**Meine Einwilligung umfasst auch die beschriebene Verwendung meiner personenbezogenen Daten, insbesondere die Erhebung und Verarbeitung von Angaben über meine Gesundheit.**

.....  
(Ort, Datum)

.....  
(Unterschrift Proband/in)

**Vielen Dank für Ihre Hilfe!** Selbstverständlich werden wir Sie umgehend informieren, falls im Verlauf des Forschungsvorhabens Informationen bekannt werden, die Ihre Bereitschaft zur weiteren Mitwirkung beeinflussen könnten.

.....  
(Ort, Datum)

.....  
(Unterschrift Untersuchungsleiter / Stellvertreter)

## 13.2 Fragebogen

### Fragebogen

Blutentnahme am: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Röhrchenbeschriftung: \_\_\_\_\_

#### Patienten-Daten:

Name: \_\_\_\_\_

Geschlecht: m  w

Vorname: \_\_\_\_\_

Größe \_\_\_\_\_

Geburtsdatum: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Gewicht \_\_\_\_\_

#### Rauchverhalten – Zutreffendes bitte ankreuzen

Ex-Raucher  Raucher  Nieraucher

Sind Sie passivem Rauchen durch Familie oder Beruf ausgesetzt? Ja  Nein

#### **Rauchgewohnheiten** – Raucher / Ex-Raucher

Wieviele Zigaretten rauchen Sie pro Tag/  
haben Sie pro Tag geraucht?

\_\_\_\_\_  
Seit wievielen Jahren rauchen Sie/  
über welchen Zeitraum haben Sie geraucht?

\_\_\_\_\_  
Hatten Sie zwischenzeitlich raucherfreie Zeit? Wenn ja, wie lang?

\_\_\_\_\_  
Wann genau haben Sie die letzte Zigarette geraucht?

**Arbeitsplatz:**

Beruf:

---

Arbeitszeit in Stunden pro Tag:

---

Gefahrstoffeinwirkung am Arbeitsplatz:

---

**Erkrankungen – Zutreffendes bitte ankreuzen**

Sind Erkrankungen bekannt?      Ja     Nein

Wenn ja, welche?

---

Welche Medikamente nehmen Sie?

---

Gibt es familiär gehäufte Erkrankungen?      Ja     Nein

Wenn ja, welche?

---

Krebserkrankungen in der Familie:

---

## **14 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Joachim Schneider danke ich für die Bereitstellung des Themas, seine große Hilfestellung und seine außerordentliche Geduld während der Entstehung meiner Arbeit.

Frau Dr. Simone Helmig danke ich für ihre kritischen und konstruktiven Auswertungen bei der Ausarbeitung meiner Arbeit, ihre freundliche und kompetente Betreuung bei der praktischen Durchführung und ihre außerordentlichen Geduld während der Entstehung meiner Arbeit.

Anika Seipp, Juliane Döhrel und Monika Philipp-Gehlhaar danke ich für die labortechnische Unterstützung.

Ich danke meinem lieben Mann Ole für seine motivierenden Worte und verständisvolle Hilfe während der Anfertigung meiner Arbeit und während des gesamten Studiums.

Meinen lieben Eltern, meinem Bruder und meiner Freundin Dr. Vida Nezhat danke ich für ihre moralische Unterstützung und aufbauenden Worte.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Probanden, die an dieser Studie teilgenommen haben und so die Arbeit erst ermöglicht haben.