

**Einfluss des TGF- β 2 59941 A/G Polymorphismus auf
die Entstehung einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung
(COPD)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Ann Kathrin Schnetkamp
aus Düsseldorf

2013

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. C. Grohé
2. Gutachter: Professor Dr. med. G. Baumgarten

Tag der Mündlichen Prüfung: 28.10.2013

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Bonn
Prof. Dr. med. Georg Nickenig

Meiner Familie gewidmet,
die mich in jeder Lebenslage unterstützt
und mir immer zur Seite steht.

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	7
2.	Einleitung	10
2.1	Definition	10
2.2	Ätiologie und Pathogenese.....	10
2.3	Epidemiologie.....	12
2.4	Klinik.....	13
2.4.1	Exazerbationen	14
2.4.2	Komorbiditäten	15
2.5	Diagnostik und Einteilung der COPD.....	19
2.5.1	Anamnese und körperliche Untersuchung.....	20
2.5.2	Lungenfunktionsanalyse.....	20
2.5.3	Weitere Untersuchungen.....	21
2.5.4	Stadieneinteilung.....	22
2.6	Pathophysiologie	25
2.6.1	Oxidativer Stress	26
2.6.2	Neutrophile Granulozyten.....	27
2.6.3	Inflammation.....	28
2.7	Therapie	28
2.7.1	Medikamentöse Therapie	29
2.7.2	Operative Therapie.....	33
2.7.3	Weitere Therapien.....	35
2.7.4	Prävention	36
2.8	Genetik.....	36
2.8.1	α_1 -Antitrypsin-Mangel	37
2.8.2	TGF-beta.....	38
2.9	Studienaufbau und Ziel.....	40
2.9.1	Molekularbiologischer Hintergrund der Arbeit.....	40
2.9.2	Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit.....	41
3.	Material und Methoden	42
3.1	Probanden.....	42

3.2	Materialien.....	43
3.2.1	Chemikalien.....	43
3.2.2	<i>Geräte</i>	43
3.2.3	Primer.....	43
3.2.4	DNA-Polymerase.....	44
3.2.5	LightCycler® Sonden.....	44
3.3	Durchführung der Untersuchungen.....	45
3.3.1	Blutentnahme.....	45
3.3.2	Isolierung genomischer DNA aus Vollblut nach der Aussalzmethode.....	45
3.3.3	DNA-Amplifikation durch PCR.....	46
3.4	Real-Time PCR - LightCycler® 1.5.....	47
3.4.1	Aufbau des LightCyclers®:.....	47
3.4.2	Messprinzip des LightCyclers®.....	49
3.4.3	Schmelzkurvenermittlung.....	50
3.5	Statistik.....	52
3.5.1	Statistische Verfahren.....	52
4.	Ergebnisse	54
4.1	Beschreibung des Polymorphismus.....	54
4.2	Statistische Datenanalysen.....	54
4.2.1	Demographische Basisdaten.....	55
4.2.2	Verteilung von Genotypen und Allelfrequenzen.....	57
5.	Diskussion	65
6.	Zusammenfassung	72
7.	Literaturverzeichnis	73
8.	Danksagung	93
9.	Lebenslauf	94

1. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAT	α_1 -Antitrypsin
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BLVR	bronchoskopische Lungenvolumereduktion
BMI	body mass index
BMP-4	bone morphogenetic protein-4, knochenmorphogenetisches Protein
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CAT	COPD Assessment Test
CMV	Zytomegalievirus
CO	Kohlenmonoxid
COPD	chronic obstructive pulmonary disease, chronisch obstructive Lungenerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FEV1	forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde, Einsekundenkapazität
F	Fluoreszein
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FVC	Forcierte Vitalkapazität
G	Guanin
GOLD	the Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease

GWAS	genome-wide association study, genomweite Assoziationsstudie
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDAC	Histon-Deacetylasen
I	Insertion
IKS	inhalative corticosteroid, inhalative Kortikosteroide
IL	Interleukin
iVC	inspiratory Vital Capacity, inspiratorische Vitalkapazität
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
LABA	long-acting beta-2-agonist, langwirksamer beta-2-Agonist
LAMA	long-acting muscarinic agonist, langwirksame Muscarin-Agonisten
LED	Light Emitting Diode, Leuchtdiode
LVRS	lung volume reduction surgery, chirurgische Lungenvolumenresektion
MMRC	Modified Medical Research Council
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
Nm	Nanometer
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
O ₂ ⁻	Hyperoxid-Anion
OH [·]	Hydroxylradikal
OR	Odds ratio, Quotenverhältnis
p _a CO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
p _a O ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism , Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen
RNS	reactive nitrogen species, reaktive Stickstoffspezies, Stickstoffradikale
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies, Sauerstoffradikale

rpm	Rotation Per Minute
rs	Reference SNP
SABA	short-acting beta-2-agonist, kurzwirksamer beta-2-Agonist
SAMA	short-acting muscarinic agonist, kurzwirksamer Muscarin-Agonist
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris-HCl	Trishydroxymethylaminomethan-Salzsäure
VC	Vitalkapazität
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

2. Einleitung

2.1 Definition

Bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) handelt es sich um eine komplexe Erkrankung, die durch eine progressive Einschränkung des Atemflusses in Kombination mit einer irreversiblen Destruktion der Alveoli, dem Lungenemphysem, charakterisiert ist. Die Einschränkung des Atemflusses entsteht durch eine Obstruktion der Atemwege und ist auch nach Gabe von Bronchodilatoren nicht vollständig reversibel (Wood und Stockley, 2006). Durch das Lungenemphysem kommt es zu einer Verminderung der Gasaustauschfläche und führt somit zu einer Dyspnoe. Der Bildung von Emphysemen liegt eine Störung des Enzymhaushaltes zu Grunde – es handelt sich um ein Proteasen-Antiproteasen-Ungleichgewicht. Dieses Ungleichgewicht tritt typischerweise bei Patienten mit einem α 1-Antitrypsin-Mangel auf und führt zu frühzeitigen, schweren Lungenemphysemen (Köhnlein und Welte, 2008). Der Mechanismus der Obstruktion ist der einer Hypertrophie und Überfunktion des schleimbildenden Apparates bei gleichzeitig gestörter mukoziliärer Clearance, verbunden mit einer neutrophilen Schleimhautentzündung. Die peribronchiale Fibrose mit Verengung der kleinen Luftwege führt zu einer fixierten Atemflussbehinderung (Jeffery, 1998). Typische Leitsymptome sind chronischer Husten – vor allem morgendlich – sowie eine vermehrte Sputumproduktion und Dyspnoe.

2.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Bezeichnung chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), unter der man heute ein bestimmtes Krankheitsbild versteht, tauchte 1964 erstmals in der Literatur auf (Mitchell und Filley, 1964). Während der 1970er und 1980er Jahre berief man sich auf Diagnosen wie die chronische Bronchitis, die chronisch obstruktive Bronchitis, das Lungenemphysem und die chronische Bronchitis mit einem Lungenemphysem. Später wurden internationale Leitlinien publiziert, die eine Definition der Erkrankung umfassten, die heute als COPD bekannt ist (Siafakas et al., 1995; Pauwels et al., 2001). Die Beziehung zum Tabakkonsum und die aktuelle Sichtweise auf die COPD basiert hauptsächlich auf einer klassischen Studie von Fletcher et al. (1976). Diese Arbeitsgruppe untersuchte 792 Männer aus dem Vereinigten Königreich über einen Zeitraum von acht Jahren zwi-

schen 1961 und 1969. In dieser Studie unterscheidet der Autor zwischen zwei verschiedenen Elementen der COPD: der obstruktiven und der hypersekretorischen Funktionsstörung. Während Obstruktion durch eine intrinsische Erkrankung der Luftwege und die Bildung eines Emphysems entsteht, resultiert die Hypersekretion aus einer chronischen, exzessiven bronchialen Schleimsekretion. Zusätzlich zeigte die Studie von Fletcher et al. (1976), dass der Abfall der Lungenfunktion durch den Konsum von Tabak beeinflusst wird. Patienten, die aufhörten zu rauchen, konnten die Abnahme ihrer Lungenfunktion nicht rückgängig machen. Die Verschlechterung der Lungenfunktion zeigte nach Einstellen des Tabakkonsums jedoch ähnliche Werte wie bei Nichtrauchern. Der jährliche physiologische Verlust der Lungenfunktion bei gesunden Nichtrauchern mittleren Alters beträgt 20-35 ml (Fletcher et al., 1976; Anto et al., 2001). Raucher verlieren pro Jahr zusätzlich 10-20 ml ihrer Lungenfunktion (Rijken und Britton, 1998). Auch der Grad der Dyspnoe steht prognostisch im Zusammenhang mit der Mortalität und ist sogar aussagekräftiger als die jährliche Abnahme der Lungenfunktion (Nishimura et al., 2002).

Die Pathogenese dieser multifaktoriellen Erkrankung beinhaltet zum Teil Einflüsse der Umwelt und zum Anderen genetische Faktoren. Im Zentrum der Pathogenese steht eine Entzündungsreaktion in der Lunge (Vogelmeier et al., 2006).

Zigarettenkonsum ist dabei eindeutig der wichtigste Risikofaktor unter den Umweltfaktoren (Sandford und Silverman, 2002). Trotzdem entwickeln schätzungsweise nur etwa 15-20 % aller chronischen Raucher eine symptomatische COPD. Bei weniger als zehn Prozent der COPD-Patienten handelt es sich um Nichtraucher. Weitere Umweltrisikofaktoren sind virale Infekte der Atemwege in der Kindheit, latente Infektionen mit Adenoviren sowie Luftverschmutzung (Sandford et al., 2002). Gehäufte Infekte der unteren Atemwege in der Kindheit sind mit einer Abnahme der Lungenfunktion im Erwachsenenalter assoziiert (Barker et al., 1991). Es ist zudem denkbar, dass die chronische Kolonisierung der tieferen Atemwege von COPD-Patienten durch bakterielle oder virale Pathogene für die gesteigerte inflammatorische Reaktion verantwortlich ist (Hogg et al., 2004).

Insgesamt ist jedoch noch nicht geklärt, aus welchen Gründen bestimmte Personen eine COPD entwickeln und andere nicht. Das gehäuft familiäre Auftreten der COPD weist jedoch auf das Vorhandensein einer genetischen Prädisposition hin (Tager et al., 1976). Studien zeigen, dass das familiäre Clustering nicht nur auf Umweltfaktoren, ähnliche Le-

bensweisen, Alter, Geschlecht und Rauchverhalten zurückzuführen ist. Darüber hinaus sinken die Prävalenz der COPD und Ähnlichkeiten der Lungenfunktionen mit zunehmender genetischer Unterschiedlichkeit (Tager et al., 1978; Redline et al., 1989). Aus diesem Grund liegt ein Schwerpunkt der heutigen Forschung auf dem Bereich der Genetik.

2.3 Epidemiologie

Laut Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation WHO (world health organisation) waren 2004 64 Millionen Menschen weltweit an einer COPD erkrankt. 2005 starben mehr als 3 Millionen Menschen an dieser chronischen Erkrankung - dies entsprach fünf Prozent aller Toten weltweit (WHO, 2008). Nach Angaben der WHO ist die COPD nach ischämischen Herzerkrankungen, zerebrovaskulären Erkrankungen und Infektionen der unteren Atemwege (inklusive der Pneumonie) derzeit weltweit die vierthäufigste Todesursache. In Deutschland war die COPD 2010 die fünfhäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt, 2012). Die Prävalenz betrug laut WHO 2004 in Europa 11,3 Millionen, weltweit 63,6 Millionen. Etwa 15 % der Deutschen über 40 Jahre leiden an einer COPD, bei den über 70-Jährigen sind sogar knapp 30 % erkrankt.

Auf Grund der fortgeführten Exposition von Risikofaktoren und der steigenden Lebenserwartung wird für die nächsten Jahrzehnte ein weiterer Anstieg von Prävalenz, Morbidität und Mortalität erwartet, so dass im Jahre 2030 die COPD vermutlich bereits die dritthäufigste Todesursache darstellen wird (GOLD, 2011; Knipel et al., 2012). In der Zeit von 1970 bis 2002 sank die Anzahl der Todesfälle durch Herzinfarkte, während sich die Mortalitätsrate für COPD fast verdoppelte (Jemal et al., 2005). Diese Entwicklungen korrelieren mit der steigenden Exposition gegenüber exogenen Risikofaktoren wie Zigarettenrauch und Luftverschmutzung. Weitere Gründe sind die sich verändernde demographische Struktur in vielen Ländern. In Deutschland bedeutet dies vor Allem eine kontinuierlich steigende Lebenserwartung und einen Rückgang der Sterblichkeit (Statistisches Bundesamt 2003 und 2009).

2005 wurde die sogenannte BOLD-Studie („Burden of Obstructive Lung Disease“) ins Leben gerufen. Es handelt sich um ein internationales Projekt mit dem Ziel weltweit standardisierte Daten über die Prävalenz der COPD zu gewinnen. Erfasst wurden Patienten über 40 Jahren in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Raucherstatus. 2007

konnten die Ergebnisse aus 12 teilnehmende Ländern veröffentlicht werden (Buist et al., 2007). Für Deutschland zeigte sich bei den über 40-Jährigen eine Prävalenz für alle Schweregrade zusammen von 13,2 %, wobei sie bei Männern deutlich höher war als bei Frauen (18,1 % vs. 9,3 %). Im Alter von 40-49 Jahren hingegen zeigte sich bei Frauen eine höhere Prävalenz als bei Männern (3,0 % vs. 2,2 %). Bei Patienten über 70 Jahren lag die Prävalenz über 25 % (Knipel et al., 2012). Es zeigt sich somit eine deutliche Zunahme der Prävalenz der COPD mit steigendem Lebensalter.

Während in der Vergangenheit davon ausgegangen wurde, dass Männer eher dazu neigen eine COPD zu entwickeln und auch ältere Studie zeigen, dass Männer etwa dreimal häufiger betroffen sind als Frauen (Xu et al., 1994), belegen neuere Studien, dass sowohl die Morbidität als auch die Mortalität der COPD bei Frauen im relativen Vergleich zu Männern steigt (Kennedy et al., 2007). Die Begründung dafür könnte im zunehmenden Tabakkonsum von Frauen liegen. Es wird mittlerweile angenommen, dass Frauen generell anfälliger für die Auswirkungen von eingeatmeten Schadstoffen wie Tabakrauch aber auch Luftverschmutzungen, Staubexposition am Arbeitsplatz, Rauchgase und Dämpfe sind (Kennedy et al., 2007).

In den letzten Jahren konnte neben der oben beschriebenen zunehmenden Prävalenz auch eine Zunahme der indirekten und direkten Krankheitskosten beobachten, welche mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren. Ökonomische Analysen zeigen, dass 40 bis 70 % der medizinischen Gesamtausgaben für Patienten mit COPD auf Krankenhausaufenthalte auf Grund von Exazerbationen entfallen (Knipel et al., 2012).

2.4 Klinik

Leitsymptome einer COPD sind eine chronische und progressive Dyspnoe, Husten und Sputumproduktion. Typische COPD-Patienten beschreiben die Dyspnoe im Sinne eines verstärkten Kraftaufwandes zu atmen, Lufthunger und Nach-Luft-Schnappen (Simon et al., 1990). Das Ausmaß der Belastungsdyspnoe nimmt im Verlauf der Erkrankung zu und führt zu einer zunehmenden Immobilität der Patienten.

Der chronische Husten ist meist das erste klinische Symptom. Eben dieser wird von vielen Patienten als Konsequenz des Rauchens abgetan. Anfangs handelt es sich häufig um einen intermittierenden Husten, welcher mit Fortschreiten der Erkrankung immer öfter und letztendlich täglich auftritt. Im Allgemeinen produzieren COPD-Patienten zu-

dem zähes Sputum im Rahmen der Hustenanfälle, welches meist eine bräunliche Farbe aufweist (GOLD, 2011).

Im Verlauf der Erkrankungen nimmt die Anzahl zusätzlicher Symptome deutlich zu. Patienten mit schwerer und sehr schwerer COPD leiden häufig unter Erschöpfung, Gewichtsabnahme und Appetitlosigkeit (Schols et al., 1993). In vielen Fällen wird die Diagnose einer COPD erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, wenn klinisch manifeste Symptome den Patienten zum Arzt führen (Knipel et al., 2012).

2.4.1 Exazerbationen

Unter einer Exazerbation versteht man ein akutes Geschehen, welches durch die Verschlechterung der respiratorischen Symptome wie Dyspnoe, Husten und Auswurf weit über die täglich übliche, interindividuelle Schwankungsbreite hinausgehend charakterisiert ist und eine Änderung der Medikation notwendig macht. Zu den häufigsten Ursachen gehören bakterielle oder virale Infekte der oberen Atemwege und der Bronchien (GOLD, 2011). Zusätzlich können inhalative Noxen oder Allergien eine Exazerbation auslösen. Rauchen zählt nicht zu den auslösenden Faktoren, auch wenn aktive Raucher im Vergleich zu Exrauchern eine um 30 % höhere Exazerbationsrate aufweisen (Lange et al., 2004). Im Durchschnitt erleben die Patienten zwei bis drei Exazerbationen pro Jahr (Seemungal et al., 2001). Bei bis zu drei Exazerbationen pro Jahr spricht man von einer stabilen Verlaufsform, treten mehr als 3 Exazerbationen pro Jahr auf handelt es sich um einen instabilen Verlauf. Über einen längeren Zeitraum betrachtet sind Exazerbationen am Abbau der Lungenfunktion und somit langfristig am Fortschreiten der COPD beteiligt. Außerdem treten mit Fortschreiten der Erkrankung (insbesondere ab einem $FEV_1 < 50\%$) Exazerbationen zahlenmäßig häufiger auf (Kanner et al., 2001). Etwa 10 % der Patienten, die auf Grund einer akuten Exazerbation in ein Krankenhaus aufgenommen werden, versterben während des Krankenhausaufenthalts. Laut Lange et al. (2004) sterben ein Drittel der betroffenen Patienten ein Jahr nachdem sie wegen einer akuten Exazerbation stationär in einer Klinik aufgenommen wurden. Exazerbationen stellen somit eine beachtliche gesundheitsökonomische Herausforderung dar.

2.4.2 Komorbiditäten

Auch wenn bei der COPD primär die Lunge im Vordergrund steht, nehmen die Komorbiditäten einen immer höheren Stellenwert ein. Eine Studie mit 200 COPD-Patienten wies auf, dass 94 % eben dieser Patienten unter mindestens einer weiteren chronischen Erkrankung litten (Mapel et al., 2000). Komorbiditäten treten in jedem Stadium der Erkrankung auf und können sowohl unabhängig als auch auf der Basis einer COPD entstehen. Zu den häufigsten Nebenerkrankungen zählen andere pulmonale Erkrankungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes mellitus, Osteoporose, Muskeldysfunktion, Depressionen sowie Infektionen (Koczulla et al., 2012). Sowohl Osteoporose als auch depressive Erkrankungen werden oft zu spät oder auch überhaupt nicht diagnostiziert und gehen insgesamt mit einer schlechten Prognose einher (GOLD, 2011).

Insgesamt zeigt sich im Rahmen einer Erkrankung an COPD eine hohe Prävalenz an Komorbiditäten, die mit steigendem Alter und Schweregrad der Erkrankung noch weiter ansteigt. Auch die Mortalität steht in einem engen Zusammenhang mit den jeweiligen Nebenerkrankungen (Curkendall et al., 2006; Mannino et al., 2008). Die Prävalenz für das Auftreten einer chronischen Herzinsuffizienz bei COPD-Patienten lag laut einer Studie von Schell et al. (2012) bei 21,1 %, für die koronare Herzkrankheit bei 12,7 %, für die arterielle Hypertonie bei 60,4 %, für Diabetes mellitus bei 16,3 %, für Osteoporose bei 16,9 %, für Depressionen bei 20,6 % und für Karzinome bei 16,5 %. Durch das Auftreten von verschiedenen Nebenerkrankungen sollte jedoch das Therapieregime der COPD nicht verändert werden. Vielmehr ist es essentiell, jegliche Komorbiditäten unabhängig wahrzunehmen und zu behandeln (GOLD, 2011).

Bei den *kardiovaskulären Erkrankungen* handelt es sich um die häufigsten und wahrscheinlich wichtigsten Nebenerkrankungen (Fabbri et al., 2008). Die bedeutsamsten Entitäten sind die Herzinsuffizienz, die koronare Herzerkrankung, das Vorhofflimmern und die arterielle Hypertonie. COPD-Patienten sterben häufiger an kardiovaskulären Erkrankungen als an respiratorischen Problemen. Nur 14 % der Patienten werden wegen einer typischen COPD-Exazerbation hospitalisiert, 42 % jedoch wegen kardiovaskulären Erkrankungen (Sin, 2006). Unabhängig von anderen Faktoren ist das kardiovaskuläre Risiko für COPD-Patienten laut Sin (2006) um den Faktor zwei erhöht. COPD-Patienten leiden unabhängig von Alter, Geschlecht oder Rauchgewohnheiten unter einem signifi-

kant höheren Risiko einen tödlichen Herzinfarkt zu erleiden (Sin et al., 2005). Auch der Lung Health Trial, der fast 6000 Patienten über 14 Jahre begleitete und untersuchte, konnte den FEV₁-Wert (forciertes Einsekundenvolumen, in einer Sekunde forciert ausgeatmete Volumen) als unabhängigen Prädiktor an einem Herzinfarkt zu sterben angeben (Anthonisen et al., 2005). Ergebnisse der Buffalo Health Study zeigen, dass bei Patienten mit reduzierten FEV₁-Werten im Verhältnis zu Patienten mit einem hochnormalen FEV₁-Wert das relative Risiko der kardiovaskulären Mortalität doppelt so hoch ist (Vogelmeier et al., 2011). Eine große Studie konnte außerdem zeigen, dass das Risiko für Patienten, die unter einer schweren bis sehr schweren COPD leiden ebenfalls Herz-Kreislauf Erkrankungen zu entwickeln doppelt so hoch, das Risiko an einer arteriellen Hypertonie zu erkranken 1,6 mal so hoch ist (Mannino et al., 2008). Laut Rutten et al. (2005) ist die linksventrikuläre Pumpfunktion bei etwa 20 % der COPD-Patienten eingeschränkt.

Zu den *pulmonalen Komorbiditäten* zählen das obstruktive Schlafapnoesyndrom und das Lungenkarzinom. Aus epidemiologischen Studien geht hervor, dass 20 % der Schlafapnoe-Patienten ebenfalls an einer COPD leiden. Die Prävalenz des obstruktiven Schlafapnoesyndroms unter COPD-Patienten liegt – unabhängig vom Grad der Erkrankung - bei 10 % (Fletcher, 1990).

Das gemeinsame Auftreten einer COPD und eines Lungenkarzinoms scheint vor Allem auf pathobiologischen Begebenheiten zu beruhen. Obwohl beide Erkrankungen durch das Rauchen verursacht werden, ist eine Atemwegsobstruktion mit einem höheren Risiko verbunden ein Lungenkarzinom zu entwickeln als der Nikotinkonsum (Wasswa-Kintu et al., 2005). Studien konnten zeigen, dass das Risiko an einem Lungenkarzinom zu erkranken proportional zum Schweregrad der Atemwegsobstruktion ansteigt (Mannino et al., 2003). Schon früh konnte nachgewiesen werden, dass das Lungenkarzinomrisiko bei COPD-Patienten verglichen mit Rauchern ohne Einschränkung der Lungenfunktion drei- bis vierfach erhöht ist (Tockmann et al., 1987).

Große Studien konnten - selbst in leichten Stadien der Erkrankung - eine gesteigerte *Diabetes* Prävalenz unter COPD-Patienten nachweisen. Das relative Risiko beträgt etwa 1,5 bis 1,8 (Rana et al., 2004; Mannino et al., 2008). Der genaue Zusammenhang kann-

te bis heute nicht eindeutig geklärt werden.

Verschiedene Studien weisen schon in leichten Stadien der COPD-Erkrankung eine sehr hohe Prävalenz für das Auftreten einer *Osteoporose* oder einer geringen Knochenmineraldichte auf (Jorgensen und Schwarz, 2008). Mehr als die Hälfte der 6000 für die TORCH (Towards a Revolution in COPD Health) Studie rekrutierten Patienten litten unter Osteoporose oder Osteopenie, wobei die Prävalenz für Frauen höher war als für Männer (Barnes und Celli, 2009).

Das gehäufte Auftreten von Wirbelkörperfrakturen (vertebrale Kompressionsfrakturen) kann durch eine konsekutive Kyphosenbildung die Lungenfunktion zusätzlich beeinträchtigen (Carter et al., 2008). Als mögliche Ursachen für dieses gehäufte Auftreten kommen ein hohes Alter, eine eingeschränkte Mobilität, Rauchen, Ernährungsprobleme und ein niedriger BMI (body mass index, entspricht dem Gewicht in kg geteilt durch die Größe in cm im Quadrat) in Frage (Kozculla et al., 2012).

Des Weiteren zählt eine *Schwäche der Skelettmuskulatur* zählt zu den häufigsten systemischen Effekten der COPD und ist laut Agusti und Soriano (2008) meist mit einem Verlust der fettfreien Körpermasse vergesellschaftet. Durch die Atrophie und einen Umbau der Skelettmuskulatur kommt es zu einer Kraftminderung der Muskulatur, verminderter Funktion und schnellerer Ermüdbarkeit, was wiederum zu einer abnehmenden körperlichen Belastbarkeit und - unabhängig von der Lungenfunktion, dem Rauchen und dem BMI - einer gesteigerten Mortalität führt (Montes de Oca et al., 2006; Swallow et al., 2007).

Im Gegensatz zu bisherigen Annahmen konnten jüngste Studien vor Allem bei Patienten in fortgeschrittenen Stadien der COPD eine mit 15 – 30 % hohe Prävalenz für die Entwicklung einer *Anämie* nachweisen, wobei es sich in der Regel um eine *normochrome, normozytäre Anämie* handelt. Eine Polyglobulie tritt nur bei etwa 6 % der Patienten auf (John et al., 2006; Shorr et al., 2008). Similowski et al. (2006) geben die Anämie sogar als unabhängigen Prädiktor der Mortalität an. Untersuchungen, inwieweit die Behandlung der Anämie zu einer Verbesserungen des Patientenwohls führt, stehen noch aus. Es zeigt sich eine eindeutige Assoziation zwischen der funktionellen Dyspnoe und dem

verminderten Aktivitätslevel der Patienten und erniedrigten Hämoglobinwerten (Krishnan et al., 2006).

Darüber hinaus kommt es bei COPD-Patienten es auf Grund ihrer physischen Einschränkungen oft zu einer sozialen Isolation - eine Teilnahme an sozialen Aktivitäten ist häufig nicht möglich (Barnes und Celli, 2009). Eben diese Abschirmung von der Gesellschaft führt zu einem vermehrten Auftreten von *Depressionen und Angstzuständen* bei COPD-Patienten. Symptome wie Abgeschlagenheit, schnelle Ermüdung oder soziale Isolation werden zu oft als reine Krankheitszeichen der COPD gedeutet, so dass die Diagnose Depression nicht gestellt oder in Betracht gezogen und somit auch nicht behandelt wird (Barnes und Celli, 2009). Eine interventionsbedürftige Depression tritt laut Yohannes et al. (2006) und Hill et al. (2008) bei 19 – 42 % aller COPD-Patienten auf.

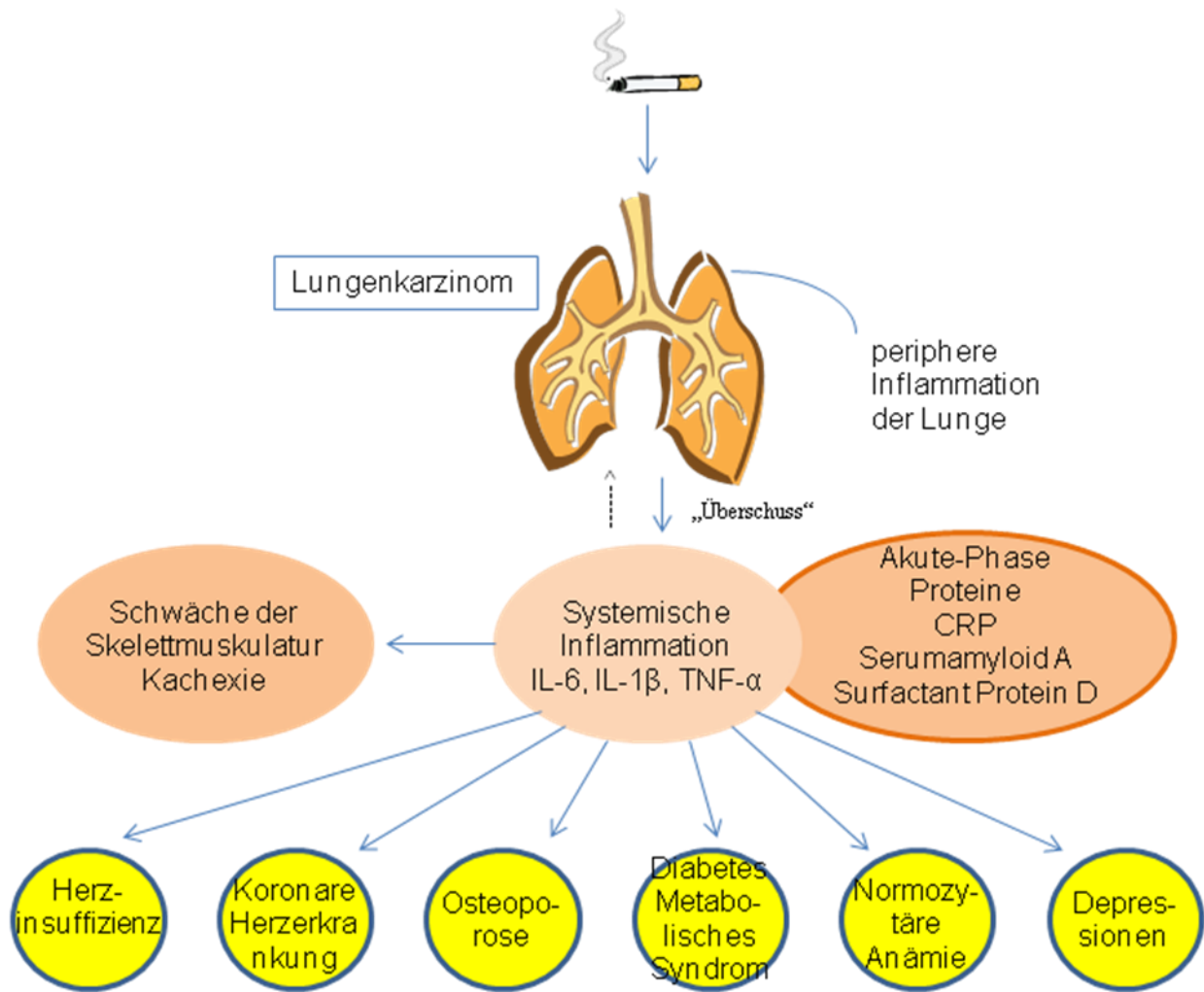


Abb. 1: Systemische Effekte und Komorbiditäten der COPD.

Die inflammatorischen Vorgänge im Bereich der Lungenperipherie verursachen einen Überschuss an Zytokinen wie Interleukin (IL)-6, IL-1b und dem Tumornekrosefaktor (TNF)- α im großen Kreislauf. Dies kann zu einer Erhöhung von Akute-Phase-Proteinen wie dem C-reaktiven Protein (CRP) führen. Die daraus entstehende systemische Inflammation kann wiederum eine Atrophie der Skelettmuskulatur und Kachexie bedingen und Komorbiditäten provozieren oder verschlechtern. Eben diese systemische Inflammation kann außerdem die Entwicklung eines Lungenkarzinoms beschleunigen (Barnes und Celli, 2009, überarbeitet).

2.5 Diagnostik und Einteilung der COPD

Das wesentliche Charakteristikum der COPD ist eine chronische expiratorische Atemflussbehinderung, die sich lungenfunktionell durch einen persistierend unter 70 % verminderten Tiffeneau-Quotienten (forciertes Einsekundenvolumen im Verhältnis zur Vitalkapazität, FEV_1/VC) manifestiert. Der Schweregrad im Rahmen der GOLD Stadien wird dagegen mit Hilfe des FEV_1 (% Soll) beurteilt.

Als wichtigste Differentialdiagnose sollte dabei eine asthmatische Erkrankung ausgeschlossen werden. Erste Anhaltspunkte können hierbei im Rahmen der Anamnese erhoben werden. Das Ausmaß der Reversibilität und der bronchialen Hyperreaktivität sind außerdem für die Diagnose entscheidend (Vogelmeier et al., 2007).

2.5.1 Anamnese und körperliche Untersuchung

Die Anamnese sollte die Exposition gegenüber exogenen Risikofaktoren und die aktuellen Beschwerden umfassen. Dazu gehören frühere und aktuelle Rauchgewohnheiten angegeben in „pack years“ („pack years“ entsprechen der Zahl der täglich konsumierten Zigarettenpackungen - Inhalt ca. 20 Stück - multipliziert mit der Zahl der Raucherjahre), andere inhalative Noxen, Passivrauchen, der Grad einer eventuellen Dyspnoe, Leistungsfähigkeit, Sputumproduktion sowie Infekthinweise (purulentes Sputum, Fieber, vermehrte Dyspnoe). Es ist zu beachten, dass Atemnot eine subjektive Empfindung ist und nur ungenügend mit der objektiv gemessenen Lungenfunktion korreliert. Auch Nebenerkrankungen sollten wie bereits oben beschrieben hinreichend erfasst werden, um diese gezielt behandeln zu können.

Die körperliche Untersuchung sollte grundsätzlich im Rahmen der ärztlichen Behandlung erfolgen, ist jedoch in Zusammenhang mit der Erkrankung nicht hinweisend auf die Diagnose. Physische Zeichen einer Atemflussbehinderung treten meist erst auf, wenn eine signifikante Beeinträchtigung der Lungenfunktion bereits eingetreten ist (Kesten und Chapman, 1993).

2.5.2 Lungenfunktionsanalyse

Bei der Spirometrie handelt es sich um ein Verfahren zur Messung und Aufzeichnung des Lungen- bzw. Atemvolumens und der Luftflussgeschwindigkeiten zur Beurteilung der Lungenfunktion. Dabei können das gesamte Lungenvolumen und einzelne Teile, sowie seine Änderungen im Laufe des Atemzyklus bestimmt werden.

Für die Diagnosestellung und die Abschätzung des Schweregrades ist die Spirometrie die am besten validierte, objektivierbare lungenfunktionsanalytische Methode. In allen Verdachtsfällen und bei allen Schweregraden der COPD sowie zur Differenzialdiagnose der Dyspnoe sollte eine Lungenfunktionsanalyse durchgeführt werden. Bei der Vitalkapazität (VC) handelt es sich um das Volumen, das nach maximaler Inspiration maximal

ausgeatmet werden kann. Die forcierte Vitalkapazität beschreibt das Lungenvolumen, das nach maximaler Inspiration forciert ausgeatmet werden kann. Das in einer Sekunde forciert ausgeatmete Volumen stellt dabei die sogenannte Einsekundenkapazität (FEV_1) dar. Das Vorliegen einer Obstruktion wird vereinfachend aber in Anlehnung an die meisten nationalen und internationalen Empfehlungen festgestellt, wenn der Quotient aus FEV_1 und VC (FEV_1/VC , Tiffeneau-Index) kleiner als 70 % ist (Empfehlungsgrad A, Evidenzgrad D). Bei dieser Definition wird jedoch nicht berücksichtigt, dass der Wert alters- und geschlechtsabhängig ist (Vogelmeier et al., 2007)

Die Messung der Peak-Flow-Werte (maximale Atemstromstärke bei forcierter Ausatmung in Litern pro Sekunde) ist für das Monitoring der COPD weniger geeignet als für das Asthma. Peak-Flow-Werte von mehr als 80 % des Sollwertes schließen eine leichtgradige COPD nicht aus. Im Allgemeinen resultiert aus der Peak-Flow-Messung eine Unterschätzung des Schweregrades der COPD (Vogelmeier et al., 2007). Bei Exazerbationen der COPD geht die Zunahme der Beschwerden dem Abfall der Peak-Flow-Werte voran (Seemungal et al., 2000).

2.5.3 Weitere Untersuchungen

Neben den oben genannten Untersuchungen gibt es weitere, die helfen können das Ausmaß der COPD einzuschätzen.

Eine *Röntgenuntersuchung der Thoraxorgane* ist bei der Erstdiagnostik sinnvoll und sollte in zwei Ebenen durchgeführt werden. Sie dient vor Allem der Identifizierung wichtiger anderer Ursachen der Dyspnoe wie z. B. dem Lungenkarzinom oder einer Lungenstauung. Auch Emphyseblasen können mittels Röntgendarstellung erkannt werden. Zur Beurteilung eines Emphysems ist eine Computertomographie (CT) jedoch überlegen. Das Röntgen-Thorax-Bild ist somit eine wegweisende Untersuchung zur Darstellung eines Emphysemthorax und dient zudem dem Ausschluss anderer Ursachen einer Dyspnoe. Zur Diagnostik einer COPD eignet sich das Röntgen allerdings nicht (Vogelmeier et al., 2007).

Die *kapilläre Blutgasanalyse* erlaubt die Diagnose einer respiratorischen Partialinsuffizienz bei einer arterieller Hypoxämie mit $p_aO_2 < 60$ mmHg (P_aO_2 = Sauerstoffpartialdruck) bzw. einer respiratorischen Globalinsuffizienz bei zusätzlich gleichzeitig vorliegender

Hyperkapnie mit $p_aO_2 > 45$ mmHg.

Zusätzlich ermöglicht die *Echokardiographie* eine Abschätzung der pulmonalen Hypertonie und der Rechtsherzbelastung (Cor pulmonale). Außerdem können mittels Echokardiographie mögliche Differentialdiagnosen diagnostiziert bzw. beurteilt werden.

Daneben dienen *Laboruntersuchungen* der Bestimmung der Entzündungsparameter bei Exazerbationen, einer Polyglobulie bei chronischer arterieller Hypoxämie und eines eventuellen Alpha-1-Proteaseninhibitormangels.

Eine *mikrobiologische Sputumuntersuchung* wird bei akuten Exazerbationen sowie bei bakteriellen Fehlbesiedlungen eingesetzt.

2.5.4 Stadieneinteilung

Die Einteilung von COPD-Patienten erfolgte bisher ausschließlich anhand ihrer Lungenfunktion. Nach dem GOLD Update 2011 geht jedoch die Tendenz nun hin zu einer multi-dimensionalen Krankheitsbetrachtung. Dabei gewinnt sowohl das Exazerbationsrisiko als auch die individuelle Symptomatik an Bedeutung. Die Patienten werden unter Berücksichtigung folgender Faktoren in vier Gruppen (A - D) eingeteilt:

- GOLD-Stadien,
- MMRC/CAT-Score und
- Zahl der bereits stattgehabten Exazerbationen.

Der CAT Score (COPD Assessment Test) erfasst die individuelle Beeinträchtigung und ermöglicht es auch in der hausärztlichen Praxis den Schweregrad der Exazerbationen einzuschätzen. Durch die Beantwortung von acht Fragen wird ein Wert zwischen 0 und 40 ermittelt. Höhere Werte sprechen dabei für eine stärkere Beeinträchtigung der Patienten im Alltag (www.catestonline.org).

Bei dem MMRC (Modified Medical Research Council) - Fragebogen wird die Beeinträchtigung der Patienten im Sinne der Dyspnoe beim Gehen beurteilt. Hier wird ein Wert von 1 bis 5 ermittelt, wobei 1 für „nie Atemnot, außer bei starker Anstrengung“ und 5 für „zu kurzatmig um das Haus zu verlassen oder sich an- und auszuziehen“ steht.

Schweregradeinteilung der COPD basierend auf der Spirometrie GOLD-Stadien		
FEV₁/VC < 70 %		
GOLD 1:	leichtgradig	FEV ₁ ≥ 80 % vom Soll
GOLD 2:	mittelgradig	50 % ≤ FEV ₁ < 80 % vom Soll
GOLD 3:	schwer	30 % ≤ FEV ₁ < 50 % vom Soll
GOLD 4:	sehr schwer	FEV ₁ < 30 % vom Soll

Abb. 3: Klassifikation der COPD Patienten anhand der Lungenfunktion

Schweregrad I: *leichtgradige COPD* - charakterisiert durch eine leichte Atemwegsobstruktion. Die Symptomatik des chronisch produktiven Hustens kann bereits vorliegen. Zu diesem Zeitpunkt sind sich die Patienten ihrer eingeschränkten Lungenfunktion häufig noch nicht bewusst.

Schweregrad II: *mittelgradige COPD* - charakterisiert durch eine zunehmende Atemwegsobstruktion, Dyspnoe unter körperlicher Belastung und produktiven Husten. Zu diesem Zeitpunkt suchen die Patienten in Folge der pulmonalen Symptomatik oder der COPD-Exazerbationen häufig ärztlichen Rat auf.

Schweregrad III: *schwere COPD* - charakterisiert durch eine weiter zunehmende Atemwegsobstruktion, stärkere Dyspnoe, verminderte Belastbarkeit, Leistungsabfall, Müdigkeit und rezidivierende Exazerbationen, die die Lebensqualität der Patienten deutlich einschränken.

Schweregrad IV: *sehr schwere COPD* - charakterisiert durch eine schwere, fixierte Atemwegsobstruktion und respiratorische Insuffizienz. Pulmonale Hypertonie und die Entwicklung eines Cor pulmonale mit Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz (Ödeme, Halsvenenstauung) sind die Folge. Beim Vorliegen dieser Komplikationen ist der Schwere-

grad IV auch dann erreicht, wenn das FEV₁ über 30 % des Sollwertes beträgt.

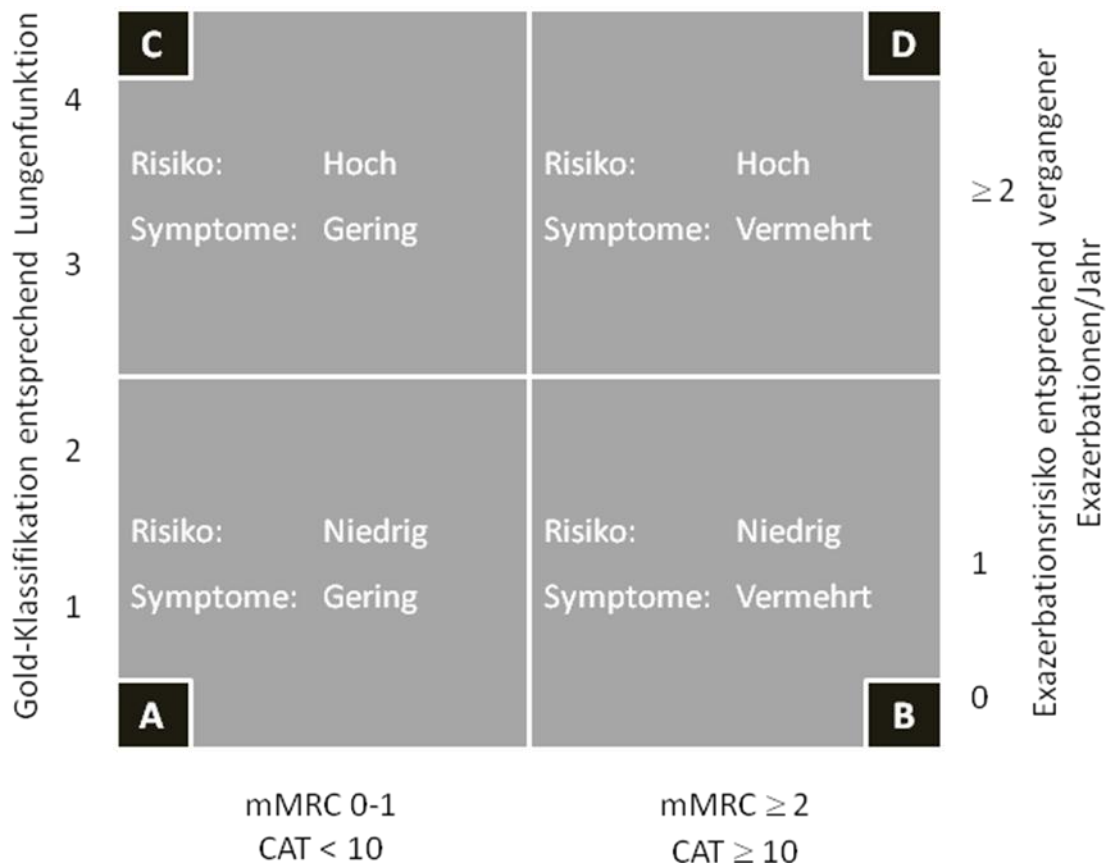


Abb. 4: Klassifikation von COPD Patienten nach dem Vorschlag der GOLD-Kommission 2011

Patientengruppe A: niedriges Risiko, wenige Symptome

Patientengruppe B: niedriges Risiko, vermehrte Symptome

Patientengruppe C: hohes Risiko, wenige Symptome

Patientengruppe D: hohes Risiko, vermehrte Symptome

Der neuen Einteilung nach haben COPD-Patienten der Gruppe C und D ein höheres Risiko für Symptom-Verschlechterungen durch besondere Berücksichtigung der Anzahl an vorausgegangenen Exazerbationen.

2.6 Pathophysiologie

Typische pathologische Veränderungen, die charakteristisch für eine COPD-Erkrankung sind, findet man in den Atemwegen, dem Lungenparenchym und den pulmonalen Blutgefäßen (Hogg, 2004). Im Zentrum der Erkrankung stehen entzündliche Veränderungen der Bronchien, welche schon in einem sehr frühen Stadium der Erkrankung viele Jahre vor Ausbruch der ersten klinischen Symptome beginnen und durch inhalierte Partikel und Gase ausgelöst werden (Niewoehner et al., 1974). Autopsien zeigten schon bei jungen gesunden Rauchern eine beginnende Bronchiolitis (Niewoehner et al., 1974). Demzufolge schreitet die Erkrankung der kleinen Atemwege über viele Jahre fort, ohne dass Symptome für eine Beeinträchtigung der Lungenfunktion gegeben sind (Hogg et al., 1968).

Die Entzündungsprozesse, die mit der Verengung peripherer Atemwege einhergehen, führen zu einer Abnahme des FEV₁-Wertes. Die Zerstörung parenchymalen Gewebes durch das typische Emphysem trägt außerdem zur Atemwegsobstruktion und einer Verschlechterung des Gasaustausches bei und führt so zu den typischen physiologischen Auffälligkeiten und Symptomen der COPD. Ein Proteasen-Antiproteasen-Ungleichgewicht begünstigt die Ausbildung eines Lungenemphysems.

Die Pathophysiologie der COPD beinhaltet inflammatorische Zellen, Mediatoren und oxidativen Stress hervorgerufen durch die zunehmende Atemwegsobstruktion und den chronischen Nikotinkonsum. Der Konsum von Nikotin dient als Aktivator bzw. Trigger für oxidativen Stress und Inflammation.

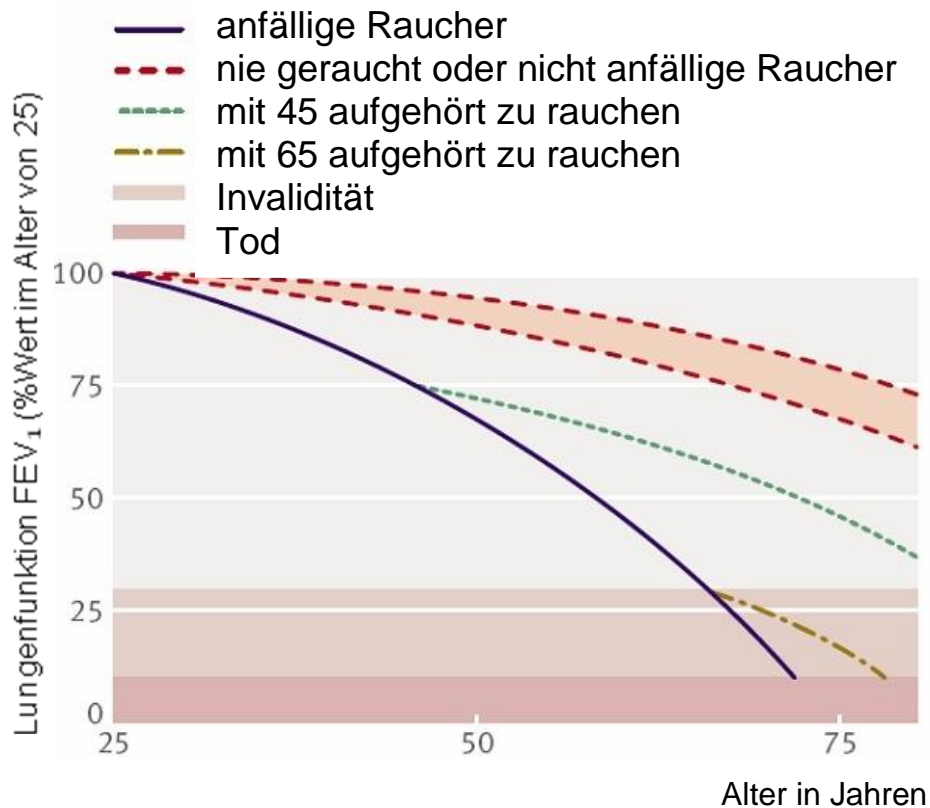


Abb. 5: Graphische Darstellung der Lungenfunktion über das Alter, welche aufzeigt wie Rauchen die altersbedingte Verschlechterung der Lungenfunktion beschleunigt (Fletcher und Peto, 1977, überarbeitet)

2.6.1 Oxidativer Stress

Bei oxidativem Stress handelt es sich um ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien. Bei COPD-Patienten ist diese Disbalance, insbesondere während akuter Exazerbationen, pulmonal aber auch systemisch verstärkt (Biernacki et al., 2003) und führt zu inflammatorischen Reaktionen in der Lunge. Bei den Oxidantien handelt es sich um sogenannte ROS (reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies, Sauerstoffradikale). ROS ist ein Sammelbegriff, der eine große Anzahl freier Sauerstoffradikale wie Hyperoxid-Anion (O_2^-) und Hydroxylradikale (OH^\cdot) einschließt. Bei Rauchern und rauchenden COPD-Patienten findet man vor Allem bedeutend höhere H_2O_2 - (Wasserstoffperoxid) Konzentration im Exhalat als bei ehemaligen Rauchern mit einer COPD oder Nichtrauchern (Dekhuijzen et al., 1996). Während einer akuten Exazerbation steigt die H_2O_2 -Konzentration nochmals weiter an.

Oxidativer Stress entsteht durch inflammatorische Zellen wie Neutrophile und Makrophagen, die nach ihrer Aktivierung ROS bilden. Zusammen mit ROS, die über die Atem-

luft (Umweltgifte) aufgenommen werden, und RNS (reactive nitrogen species, reaktive Stickstoffspezies), welche in großen Mengen in Zigarettenrauch enthalten sind, erzeugen diese endogenen Oxidantien eine bedeutende oxidative Belastung für die Lunge. Bei gesunden Individuen ist die Balance zwischen Oxidantien und Antioxidantien ausgeglichen, so dass die extrazelluläre Umgebung von geringerer Bedeutung ist (Mac, 2008).

Durch die Produktion inflammatorischer Zytokine und Chemokine, werden die Inflammation und der oxidative Stress zusätzlich provoziert (Mac, 2008). Die bei COPD auftretenden endogenen und exogenen Oxidantien inaktivieren Antiproteinasen, wie beispielsweise α_1 -Antitrypsin. Dies führt wiederum zu einem beschleunigten Abbau des Elastins im Lungenparenchym und resultierend daraus zu einer beschleunigten Emphysementwicklung (Mac, 2008). Laut Rahman (2005) stellt oxidativer Stress einen wesentlichen Verstärker der pulmonalen Entzündungsreaktion bei COPD dar. Es scheint, dass oxidativer Stress zudem ein beschleunigtes Altern der Lunge durch inhibitorische Effekte auf sogenannte „anti-aging-Moleküle“ und somit eine verstärkte Abnahme der Lungenfunktion bewirkt (Ito und Barnes, 2009). Zusätzlich wird durch eine Reduktion der Aktivität und Expression von Histon-Deacetylasen (HDAC), insbesondere HDAC2, die Empfindlichkeit auf Steroide vermindert (Barnes, 2006).

2.6.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten stellen mit einem Anteil von 50 - 65 % die größte Subpopulation der Leukozyten. Als Phagozyten sind sie Teil der angeborenen Immunabwehr und dienen der Identifizierung und Zerstörung von Mikroorganismen.

In Studien konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit einer COPD eine vermehrte Anzahl von neutrophilen Granulozyten in den Luftwegen zu finden ist (Hunninghake und Crystal, 1983) und dass diese Zellen für die inflammatorische Reaktion von Bedeutung sind. Um vom Blut in das umliegende Gewebe einzuwandern, müssen sich neutrophile Granulozyten deformieren. Das Rauchen von Zigaretten reduziert diese Verformbarkeit der Neutrophilen. Dies mag die verlangsamte Migration der Granulozyten in Lungen von Rauchern erklären (MacNee, 1989).

Im Sputum von COPD-Patienten, bei denen zusätzlich ein α_1 -Antitrypsinmangel nachgewiesen wurde, konnte im Vergleich zu COPD-Patienten mit einem normalen α_1 -

Antitrypsin-Spiegel eine gesteigerte neutrophile Aktivität festgestellt werden (Wollhouse et al., 2002). Sowohl der Tumornekrosefaktor (TNF) als auch Interleukin (IL)-1 β üben zwar keine direkte chemotaktische Aktivität auf neutrophile Granulozyten aus, dennoch sind diese Zytokine in der Lage Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten hochzuregulieren (Butcher, 1991). Somit tragen sie indirekt zu einer Anreicherung der neutrophilen Granulozyten in den Luftwegen bei.

Des Weiteren scheint der Verlust der Lungenfunktion über die Zeit mit der Menge von neutrophilen Granulozyten im Sputum zu korrelieren (Stanescu et al., 1996). Im Vergleich zu gesunden Nichtrauchern konnte bei Patienten mit einer COPD außerdem eine Erhöhung der Neutrophilen im Blut festgestellt werden (Gillum, 1991) und ein Zusammenhang zwischen dem Abfall der Lungenfunktion und der Anzahl zirkulierender neutrophiler Granulozyten bestätigt werden (Sparrow et al., 1984).

2.6.3 Inflammation

Im Rahmen der Erkrankung treten Entzündungsmediatoren aus der Lunge in den Blutkreislauf über und verursachen pathologische Veränderungen in lungenfernen Organen (Koczulla et al., 2012).

Die Inflammation stellt keine separate Entität an sich dar - vielmehr steht sie in direkter Verbindung zum oxidativen Stress und dem Proteasen-Anti-Proteasen Ungleichgewicht. Die Modellerkrankung für dieses Ungleichgewicht ist der genetische α 1-Antitrypsin-Mangel. Hier fehlt α 1-Antitrypsin als wichtige Antiprotease, so dass als Folge der Zersetzung des normalen Lungengewebes frühzeitig ein schweres Lungenemphysem auftritt. COPD-Patienten erleben deutlich verstärkte systemische Entzündungsprozesse im Vergleich zu Kontrollpersonen. Dies kann durch Biomarker wie Zytokine oder Stickstoffoxide, welche im Rahmen der Exazerbation weiter ansteigen, nachgewiesen werden.

2.7 Therapie

Die COPD ist eine behandelbare aber nicht heilbare Erkrankung. Die Therapie besteht aus verschiedenen Ansatzpunkten und orientiert sich an der Einteilung in die Gruppen A bis D. Ziel der Therapie ist ein weiteres Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern und den Patienten eine verbesserte Lebensqualität zu bieten. Der Nikotinkonsum sollte bei rauchenden Patienten schnellstmöglich eingestellt werden. Ziel einer adäquaten medi-

kamentösen Therapie ist eine Reduktion sowohl der chronischen Symptome als auch der Häufigkeit und Schwere von Exazerbationen, eine Verbesserung der Leistungsfähigkeit und Lebensqualität, eine Verlangsamung des Krankheitsverlaufes und eine Verminderung der Mortalität (Vogelmeier et al., 2007). Zudem führt sie bestenfalls zu einer Verbesserung des allgemeinen Gesundheitszustandes und Steigerung der körperlichen Belastbarkeit. Wie bereits erwähnt, ist eine Evaluierung eventueller Nebendiagnosen nicht nur zur Einschätzung der Prognose, sondern auch für eine multidimensionale Therapie unabdingbar. Das Therapieregime beinhaltet nicht nur inhalative Medikamente sondern auch die Behandlung etwaiger Komorbiditäten, wodurch es wiederum zu einem positiveren Verlauf der COPD selbst kommen kann (Nussbaumer-Ochsner und Rabe, 2011). Neben der medikamentösen Therapie stehen die Sauerstofftherapie, die Trainingstherapie und operative Therapien zu Verfügung. Bis heute ist es jedoch nicht möglich die Abnahme der Lungenfunktion langfristig zu verbessern (GOLD, 2011).

2.7.1 Medikamentöse Therapie

Basis der medikamentösen Therapie ist eine Bronchodilatation. Nach den neuen GOLD Richtlinien von 2011 werden Erstlinientherapeutika und alternative Therapien in Abhängigkeit von der Einteilung der Patienten in die Gruppen A bis D eingeteilt (siehe Abb. 4 und Tab. 1). Die Empfehlungen gelten für diejenigen Patienten, die bisher noch nicht behandelt wurden. Zusammenfassend sollte die Erstlinientherapie bei Patienten in der Gruppe A mit kurz wirksamen Bronchodilatoren bei Bedarf begonnen werden, Patienten der Gruppen B und C können das langwirksame Anticholinergikum Tiotropium erhalten und Patienten, die eine fortgeschrittene Einschränkung der Lungenfunktion oder eine hohe Häufigkeit an Exazerbationen aufweisen, sollten mittels inhalativer Kortikosteroide behandelt werden (Greulich et al., 2012).

Da Kortikosteroide nicht zu einer effektive Unterdrückung der systemischen Inflammation führen, werden derzeit alternative anti-inflammatorische Verfahren untersucht. Ziel ist es Medikamente zu entwickeln, die durch eine systemische Wirkweise auch die systemische Inflammation reduzieren und somit zusätzliche systemische Manifestationen wie Muskeldysfunktion oder Osteoporose zu behandeln (Barnes, 2008 a).

Bronchodilatoren

Die Wirkstoffgruppe der β -Adrenozeptor-Agonisten bewirkt über die Stimulation von β_2 -Adrenozeptoren der glatten Muskelzellen eine Bronchodilatation. Üblicherweise erfolgt die Aufnahme mittels Inhalatoren. Hier ist auf gutes Training der Patienten für eine korrekte und effektive Nutzung der Inhalatoren zu achten. Bei der medikamentösen Therapie der COPD kommen neben kurzwirksamen β_2 -Mimetika (Fenoterol, Salbutamol, Terbutalin) auch langwirksame β_2 -Mimetika (Formoterol, Salmeterol) und das ultralang wirksame Indacaterol (24 Stunden) zum Einsatz. Lang wirksame Bronchodilatoren gehören ab Gruppe B zur Basistherapie. Hier können sie zu einer signifikanten Verbesserung des FEV₁ führen. Zusätzlich haben sie einen positiven Einfluss auf die Lebensqualität, die körperliche Belastbarkeit und die Exazerbationsrate (Greulich et al., 2012).

Anticholinergika funktionieren über eine Unterdrückung der Wirkung von Acetylcholin durch eine kompetitive Hemmung der Muscarin Rezeptoren. Auch diese Wirkstoffgruppe ist als unterschiedlich lang wirkende Mittel inhalativ einsetzbar. Ipratropiumbromid und Exytropiumbromid haben dabei eine Wirkdauer von 6 bis 9 Stunden, während Tiotropium etwa 24 Stunden wirkt. Taylor et al. (1985) konnten zeigen, dass eine Kombinationstherapie aus kurz wirksamen β_2 -Mimetika und einem Anticholinergikum die Lungenfunktion, die Exazerbationsrate und den Gesundheitszustand deutlich positiver beeinflusst, als eine Monotherapie. Laut Greulich et al. (2012) erhöht Tiotropium das FEV₁, verringert Symptome, verbessert die Lebensqualität, steigert die körperliche Belastbarkeit und reduziert die Rate an Exazerbationen.

Zwei der größten Langzeitmedikamentenstudien sind die TORCH- (Towards a Revolution in COPD Health) und die UPLIFT®-Studie (Understanding Potential Long-Term Impacts on Function with Tiotropium). Der Schwerpunkt dieser Studien liegt auf dem Einfluss von Medikamenten auf das Fortschreiten der COPD. Bei TORCH handelt es sich um eine 3 Jahre andauernde, doppelblinde und placebokontrollierte Studie mit 6184 Patienten, die randomisiert Salmeterol oder Fluticasonepropionat oder eine Kombination beider Medikamente erhielten. Die UPLIFT®-Studie untersuchte über 4 Jahre 5993 Patienten in einem doppelblinden, placebokontrollierten Parallelgruppenversuch. Die Patienten hatten eine nachgewiesene mittelschwere bis schwere COPD und erhielten randomisiert Tiotropium oder ein Placebo. Darüber hinaus bekamen die teilnehmenden Patienten weiterhin ihre übliche bronchodilatatorische Medikation. Beide Studien konnten

nachweisen, dass langwirksame Bronchodilatoren in Form von Tiotropium und Salmeterol (in Kombination mit Fluticasonpropionat) tatsächlich die Lungenfunktion verbessern können und das Fortschreiten der COPD verzögern.

Kortikosteroide

Die Unterdrückung der Inflammation durch Kortikosteroide gelingt bei der COPD im Gegensatz zum Einsatz in der Therapie bei Asthma bronchiale nur selten (Barnes, 2008 b). Kortikosteroide können oral oder inhalativ eingenommen werden. Typische Vertreter inhalativer Kortikosteroide sind Beclometason, Budesonid und Fluticason. Diese Wirkstoffklasse kommt zur Therapie in den Gruppen C und D zum Einsatz. Neben einer Verminderung der Symptome und einer verbesserten Lebensqualität führt eine Dauertherapie zu einer verbesserten Lungenfunktion sowie zu einer sinkenden Exazerbationsrate (Greulich et al., 2012). Eine Monotherapie führt nicht zu den gewünschten Ergebnissen. Die Einnahme systemischer Steroide kommt vor Allem im Rahmen der akuten Exazerbation zum Einsatz. Als Dauermedikation eignen sie sich auf Grund zahlreicher Nebeneffekte wie der Verschlechterung eines Diabetes oder einer arteriellen Hypertonie oder der Entwicklung einer Steroidmyopathie nicht (Walters et al., 2005).

Zurzeit gehören fixe Kombinationen aus lang wirksamen β -Mimetika und Steroiden zur Standardtherapie. Die Kombination von Fluticason und Salmeterol konnte keine signifikante Senkung der Exazerbationsrate im Vergleich zu den Einzelsubstanzen zeigen (Calverley et al., 2003 a). Budesonid und Formoterol senken diese hingegen in Kombination signifikant im Vergleich zur Monotherapie (Calverley et al., 2003 b).

PDE-4-Hemmer

Bei den PDE (Phosphodiesterase)-4-Hemmern handelt es sich um die bisher meist untersuchten und ständig weiterentwickelten der neuen antiinflammatorischen Medikamente. Roflumilast – ein hoch selektiver Phosphodiesterasehemmer – war in der Lage bei Mäusen sowohl inflammatorische Vorgänge im Bereich der Lunge als auch die Bildung von Emphysemen zu verhindern (Martorana et al., 2005). Roflumilast ist seit 2010 als tägliche Einmalgabe bei fortgeschrittenen Stadien in Deutschland zugelassen. Nach einer vierwöchigen Einnahme konnte eine mit 36 % signifikante Verminderung von Neutrophilen im Sputum nachgewiesen werden (Grootendorst et al., 2007). Bei einer Gabe

über sechs oder zwölf Monate konnte eine leichte Verbesserung der Lungenfunktion (der FEV₁-Werte) bei COPD-Patienten und eine Reduzierung der Exazerbationshäufigkeit gezeigt werden. Unerwünschte Nebenwirkungen sind Übelkeit, Bauch- und Kopfschmerzen. Roflumilast ist vor Allem als Begleittherapie zu Bronchodilatoren oder inhalativen Steroiden effektiv und stellt somit eine wichtige Ergänzung zu den bisherigen therapeutischen Optionen dar (Rabe, 2011). Roflumilast wird als Zweitlinientherapie für die Gruppe D empfohlen.

Methyxanthine

Theophyllin ist das meist verwendete Präparat aus der Gruppe der Methylxanthine und ist nach wie vor in der Therapie der COPD umstritten. Es handelt sich um einen nicht-selektiven Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitor, welcher einen mäßigen bronchodilatatorischen Effekt hervorruft. Verglichen mit den verfügbaren langwirksamen inhalativen Bronchodilatoren ist dieser jedoch deutlich geringer. Zusätzlich zeigt sich ein enger therapeutischer Bereich, so dass Effekte oft erst im annähernd toxischen Bereich eintreten (Ram, 2006).

Antibiotika

Eine antibiotische Dauertherapie (zum Beispiel mit Azithromycin) wird derzeit trotz signifikanter Besserung sowohl der Exazerbationsrate als auch der Lebensqualität auf Grund zunehmender Makrolid-Resistenzbildung nicht empfohlen. Zu diesem Ergebnis kam eine 2011 von Albert et al. veröffentlichte doppelblinde randomisierte Studie, welche über ein Jahr 570 COPD-Patienten mit Azithromycin und 572 COPD-Patienten mit einem Placebo zusätzlich zur Standardtherapie behandelte.

Sauerstoff

Durch eine Sauerstofflangzeitbehandlung von über 15 Stunde pro Tag konnte die Überlebensrate von hypoxämischen Patienten gesteigert werden. Ein Anstieg der Sauerstoffsättigung um mehr als 10 mmHg unter nasaler O₂-Gabe ist dabei die Voraussetzung für eine effektive Behandlung. Die Indikation zur Sauerstofftherapie besteht bei Patienten mit einem P_aO₂ ≤ 55 mmHg mit oder ohne Hyperkapnie oder einem P_aO₂ zwischen 55 und 60 mmHg bei einem zusätzlichen Nachweis für eine pulmonale Hypertonie, periphe-

re Ödeme durch eine Herzinsuffizienz oder einer Polyglobulie (Hämatokrit > 55 %) (GOLD, 2011)

Therapie der COPD nach Schweregrad			
Gruppe	Erstlinientherapie	Zweitlinientherapie	Alternative
A	SABA oder SAMA	LABA oder LAMA oder SABA plus SAMA	Theophyllin
B	LABA oder LAMA	LABA plus LAMA	Theophyllin oder SABA+/oder SAMA
C	ICS plus LABA oder LAMA	LABA plus LAMA	Theophyllin oder SABA+/oder SAMA
D	ICS plus LABA oder LAMA	ICS plus LABA plus LAMA oder ICS plus LABA plus PDE4-Hemmer oder LABA plus PDE4-Hemmer oder ICS plus LAMA oder LABA plus LAMA	Theophyllin SABA+/oder SAMA, evtl. auch PDE4- Hemmer
<p>ICS „inhalative corticosteroid“, LABA „long-acting beta-2-agonist“, SABA “short-acting beta-2-agonist”; LAMA “long-acting muscarinic agonist”, SAMA “short-acting muscarinic agonist”</p>			

Tab. 1: Aktuelle Therapieempfehlungen der COPD in Abhängigkeit der Risikogruppe

2.7.2 Operative Therapie

Bei den operativen bzw. invasiven Therapieverfahren muss man zwischen drei Optionen unterscheiden: der chirurgischen Lungenvolumenresektion, der bronchoskopischen oder endoskopische Lungenvolumenresektion und der Lungentransplantation. Die Bullektomie ist inzwischen in den Hintergrund gerückt. Es wurde nachgewiesen, dass die Entfernung großer Bullae nicht zu einem verbesserten Gasaustausch führt.

Ziel einer *chirurgischen Lungenvolumenresektion* (LVRS) ist es, durch Resektion von Lungenanteilen eine Hyperinflation zu reduzieren und somit eine effektivere Atemmechanik zu erreichen (Cooper et al., 1995). Zusätzlich kommt es zu einer Verbesserung expiratorischer Flussraten und einer geringeren Exazerbationsrate. Allerdings lässt sich nicht bei jeder Patientengruppe mit diesem chirurgischen Verfahren eine Besserung erzielen. Diese Therapieoption kommt für Patienten mit einem überwiegendem Befall der oberen Lungenabschnitte und einem (trotz Reha-Bemühungen) schlechten Ergebnis in der Ergometrie in Frage. Der National Emphysema Treatment Trial konnten bei mehr als 1200 Patienten postoperativ nicht nur eine Verbesserung der Lungenfunktion sondern zudem eine deutlich gesteigerte Lebensqualität nachweisen. Dennoch ist nicht zu vernachlässigen, dass die Mortalität bei Patienten nach einer Lungenvolumenreduktion im Vergleich zu Patienten mit einer rein medikamentösen Therapie mit 7,9 % statt 1,3 % deutlich höher liegt (The National Emphysema Treatment Trial Research Group, 1999).

Die bronchoskopische oder *endoskopische Lungenvolumereduktion* (BLVR) ist ein weniger invasives Verfahren und umfasst verschiedene Varianten. Durch Implantation von Einwegventilen in ausgesuchten Bronchien in emphysematösen Lungenfeldern wird ein Luftstrom in diese Abschnitte verhindert. Ziel ist eine iatrogene Atelektase herbeizuführen. Der VENT Trial konnte 6 Monate nach Ventilimplantation einer Verbesserung der FEV₁ um 4.3 % und eine Zunahme der 6-Minuten Gehstrecke nachweisen (Sciurba et al., 2010).

Ein weiteres Verfahren arbeitet mit einem Hydrogelschaum. Durch bronchoskopische Instillation des Polymers in das gewünschte Lungensegment führt es durch Inflamationsreize zu einer Narbenbildung und somit zu einer Parenchymschrumpfung. Bei zum Teil ausgeprägten Entzündungsreaktionen kann eine Therapie mit Antibiotika und Steroiden notwendig sein.

Auch die Vaporisierung arbeitet über Zerstörung des erkrankten Gewebes. Die entstehende Narbenbildung und die darauffolgende Schrumpfung dieses Lungengewebes können zu einer Verbesserung der Lungenfunktion und Belastbarkeit führen. Bei der Vaporisierung wird heißer Wasserdampf mittels eines speziellen Katheters in den betroffenen Lungenabschnitt geleitet.

Bei der Implantation von sogenannten Coils handelt es sich um Spiralen aus Ni-

tinoldraht, welche in gestrecktem Zustand die emphysematösen Lungenareale eingebracht werden. Die Coils rollen sich im Körper spiralförmig ein, was eine Raffung des umliegenden Gewebes zur Folge hat.

Die *Lungentransplantation* kann für Patienten mit einer weit fortgeschrittenen Erkrankung eine Option sein. Sie konnte nachweislich für ausgewählte Patienten mit einer schweren COPD zu einer Verbesserung der Lebensqualität führen. Nicht zu vernachlässigen sind hier jedoch postoperative Komplikationen wie eine akute Abstoßung des transplantierten Organs, opportunistische Infektionen wie CMV (Zytomegalievirus), bakterielle (Pseudomonas, Staphylokokken) oder mykotische (Candida, Aspergillus, Pneumocystis) Infektionen (Theodore und Lewiston, 1990). Nach einer 13-jährigen Studie konnten Cassivi et al. (2002) ein besseres Langzeitergebnis nach einer bilateralen als nach einer einseitigen Lungentransplantation erreichen. Patienten mit einer progredienten Verschlechterung der COPD wird bei FEV₁-Werten < 20 % und P_aCO₂-Werten > 50 mmHg zu einer Kontaktaufnahme mit einem Transplantationszentrum geraten. Eine hohe Compliance der Patienten ist für eine Transplantation unabdingbar.

2.7.3 Weitere Therapien

Körperliche Betätigung ist für COPD-Patienten unabdingbar. Für die Gruppen B und D gilt zusätzliche eine Rehabilitation als essentieller Inhalt der multidimensionalen Therapie. Neben körperlichem Training, Physio- und Ergotherapie umfasst dieses Konzept auch Ernährungsberatung und Tabakentwöhnung sowie eine psychosoziale Betreuung. Eine umfassende Rehabilitation kann zu einem gesteigertem Trainingslevel, einer Abnahme der Dyspnoe und Angst, einem gesteigerten Selbstvertrauen und einer gesteigert Lebensqualität in Bezug auf die Grunderkrankung führen (Nici et al., 2010). Generell führt körperliches Training zu einer zunehmenden Vaskularisierung der Muskulatur. Dies wiederum wirkt freien Sauerstoffmetaboliten entgegen und vermindert somit die systemische Inflammation (Handschin und Spiegelman, 2008). Laut Troosters et al. (2010) stellt vor Allem auch Krafttraining, das während einer akuten Exazerbation erfolgt, eine sichere und effektive Strategie zur Kompensation des Verlusts von Skelettmuskulatur dar. Körperliches Training sollte bei COPD-Patienten lebenslang erfolgen.

2.7.4 Prävention

In den aktuellen Leitlinien hat die Prävention einen sehr bedeutsamen Stellenwert, wobei die effektivste Maßnahme der Verzicht auf Nikotinkonsum ist. Eine einmalige Impfung gegen Pneumokokken und die jährliche Influenza Impfung wird allen COPD-Patienten empfohlen, da eine Infektion der unteren Atemwege zur Hospitalisierung und sogar zum Tod führen kann (Wongsurakiat et al., 2003). Die Vermeidung weiterer Noxen ist meist nicht vollständig möglich, sollte jedoch so gut es geht umgesetzt werden. Dies gilt besonders für berufsbedingte Noxen und die Arbeitsplatzhygiene.

2.8 Genetik

Das gehäuft familiäre Auftreten der COPD weist auf das Vorhandensein einer genetischen Prädisposition hin (Tager et al., 1976). Studien zeigen, dass das familiäre Clustering nicht nur auf Umweltfaktoren, ähnliche Lebensweisen, Alter, Geschlecht und Rauchverhalten zurückzuführen ist. Darüber hinaus sinken die Prävalenz der COPD und Ähnlichkeiten der Lungenfunktionen mit zunehmender genetischer Unterschiedlichkeit (Tager et al., 1978; Redline et al., 1989).

Aktuelle Zwillingsstudien haben gezeigt, dass der genetische Hintergrund einen moderaten Einfluss auf die Entwicklung einer chronischen Bronchitis hat (Hallberg et al., 2008). Die dabei involvierten Gene stehen großenteils nicht in Verbindung zu Genen, die mit Rauchgewohnheiten in Zusammenhang gebracht werden. Die Studie von Hallberg et al. zeigte außerdem, dass Frauen häufiger von einer chronischen Bronchitis betroffen sind als Männer, obwohl die durchschnittliche Anzahl der „pack years“ der Männer die der Frauen übersteigt. Auch bei den untersuchten, verschiedengeschlechtlichen Zwillingspaaren entwickelten mehr weibliche Patienten eine chronische Bronchitis als männliche Probanden. Generell ist bekannt, dass Frauen anfälliger für Umweltfaktoren wie Tabakrauch sind als Männer (Langhammer et al., 2003, Dransfield et al., 2006). Die untersuchte Kohorte wäre auch für eine Studie zur Untersuchung genetischer Marker für die Entwicklung einer COPD geeignet, es fehlen jedoch Spirometriewerte, um die Diagnose der COPD an Hand klinisch objektivierbarer Parameter zu stellen.

Eine der bedeutendsten Kopplungsanalysen zur COPD ist die „Boston Early-Onset Cohort“ (Palmer et al., 2003; Silverman et al., 2002 a; Silverman et al., 2002 b; DeMeo et al., 2004). Sie führt eine genomweite Kopplungsanalyse bei 585 Mitgliedern verschie-

dener Familien mit einer frühen Manifestation der COPD in der Familie durch.

Unter einer Kopplungsanalyse versteht man ein Kartierungsverfahren für Gene. Wenn eine Krankheit zusammen mit einem genetischen Marker überzufällig häufig vererbt wird, spricht man von Kopplung. Dabei ist ein genetischer Marker definiert als eine polymorphe DNA Sequenz, die in mindestens zwei Varianten vorkommt und deren Varianten nicht seltene Allele sind. Als Marker kommen Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), Mikrosatelliten und Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP) zur Anwendung (Klein und Rost, 2012). Bei der Analyse werden die entsprechenden genetischen Marker bei betroffenen und gesunden Familienmitgliedern analysiert. Der Vergleich zwischen genetischen Merkmalen innerhalb der Familie erlaubt die Identifizierung eines chromosomalen Abschnittes, der gemeinsam mit der Erkrankung an betroffene, nicht aber an gesunde Nachkommen vererbt wird. Innerhalb einer solch gekoppelten Region kann dann die krankheitsverursachende Mutation durch die Sequenzanalyse von Kandidatengenomen ermittelt werden.

In der „Boston Early-Onset Cohort“ wurden auf den Chromosomen 1, 2 und 17 Areale mit einer Assoziation zum Tiffeneau-Index gefunden. Der Bereich auf Chromosom 2 enthält die Gene für SERPINE2 (als SERPINE werden bestimmte untereinander ähnliche Proteine bezeichnet, die in der Lage sind die Enzymaktivität von Serinproteinasen zu blockieren) und den IL8-Rezeptor (IL8 ist an der neutrophilen Chemotaxis der Lunge beteiligt), welche potentiell für die Entwicklung einer COPD von Bedeutung sein könnten (Beeth et al., 2003). FEV₁ steht in Verbindung zu Arealen auf den Chromosomen 12 und 19 (Palmer et al., 2003). Das Chromosom 1 umfasst Gene von TGF- β („transforming growth factor-beta“).

2.8.1 α_1 -Antitrypsin-Mangel

Bei dem Alpha-1-Antitrypsin-Mangel handelt es sich um eine genetische Prädisposition zur Entwicklung einer COPD. Ein schwerwiegender AAT-(α_1 -Antitrypsin) Mangel ist nachgewiesenermaßen ein monogen vererbter Risikofaktor für die Entwicklung einer COPD (Hersh et al., 2004). Dennoch kann man nur etwa 1 - 3 % aller COPD-Fälle auf einen AAT-Mangel zurückführen (Lomas und Silverman, 2001). AAT ist ein Akute-Phasen-Protein und einer der wichtigsten Proteinaseninhibitoren im Serum. Es wirkt, indem es Trypsin und andere Serinproteasen hemmt und wird durch den polymorphen

PI Lokus auf dem Chromosom 14q32.1 codiert. Ein gravierender AAT-Mangel tritt im Allgemeinen bei Homozygotie für das Z Allel (PI-ZZ) auf (Hersh et al., 2004). Auch das Risiko für PI-MZ heterozygote Patienten wurde in verschiedenen Studien untersucht. Die Ergebnisse waren jedoch nicht einheitlich (Mittman, 1978; Sandford, 1997). Generell haben Fall-Kontroll-Studien eine steigende Prävalenz für PI-MZ Heterozygotie bei COPD-Patienten beobachten können. Allerdings konnte bei einer Stichprobenuntersuchung der Bevölkerung bei PI-MZ Personen keine konsequent höhere Atemwegsobstruktion festgestellt werden als bei PI-MM Personen (Hersh et al., 2004).

In verschiedenen Studien konnte bei Patienten mit einer homozygoten Mutation die Exazerbationsrate und der Abfall der Lungenfunktion durch eine Substitutionstherapie mit Alpha-1-Antitrypsin positiv beeinflusst werden (The Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group 1998; Wencker et al., 1998). Greulich et al. (2012) beschreiben eine Metaanalyse von 1509 Patienten. Diese zeigt eine Reduktion des jährlichen FEV₁-Verlustes um durchschnittlich 23 % nach Substitution von Alpha-1-Antitrypsin. Dennoch ist die Therapie auf Grund des hohen Kostenfaktors und bisher fehlender Reproduzierbarkeit der Studie umstritten.

2.8.2 TGF-beta

Bei TGF handelt es sich um einen sogenannten „transforming growth factor“. Die TGF- β -Familie reguliert Wachstum, Differenzierung, Apoptose und Migration einer Vielzahl verschiedener Zellen, die an der Morphogenese, Wundheilung, Tumorsuppression und Immunregulation beteiligt sind. Zudem beeinflusst sie die Sekretion wichtiger Moleküle wie Bestandteile der extrazellulären Matrix, Adhäsionsmoleküle, Hormone und Zytokine. (Oomizu et al., 2004). Bis heute sind über 30 Mitglieder dieser Gruppe bekannt. Sie beinhaltet unter anderem TGF- β , Activin, Inhibin und BMP-4 (bone morphogenic protein) (Giacomini et al., 2006; Renner et al., 2004).

Der „transforming growth factor- β “ selber ist ein Zytokin, das ubiquitär im Körper vorkommt und auch von bronchoepithelialen Zellen sezerniert wird (Arinir et al., 2009). Bis heute sind drei Isoformen bekannt: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3, welche als multifunktionale Regulatoren für Zellwachstum und –differenzierung agieren. Jede einzelne dieser Isoformen wird in der Lunge exprimiert und übt Einfluss auf die Lungenentwicklung aus (Gatherer et al., 1990; Coker et al., 1996). In der gesunden Lunge wird

TGF- β vor Allem in Epithelzellen und alveolären Makrophagen (Aubert et al., 1994) sowie in Endothel- und mesenchymalen Zellen exprimiert (Coker et al., 1996).

Der Wachstumsfaktor ist durch eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine und die Rekrutierung von Fibroblasten in der Lage Wundheilungsprozesse des Lungenparenchyms zu steuern (Lasky und Brody, 2000). Insofern liegt die Überlegung nahe, dass alle TGF- β Formen an chronischen Lungenerkrankungen beteiligt sind.

TGF- β -Isoformen entfalten ihre Wirkung über transmembrane Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren, welche einen heterodimeren Komplex aus TGF- β -Rezeptor Typ I und II bilden und ubiquitär vorhanden sind. Der TGF- β -Rezeptor Typ I ist für die Signaltransduktion unabdingbar und scheint den TGF- β -Rezeptor Typ II für die Ligenbindung zu benötigen (D'Abronz et al., 1999; Moustakas et al., 2001). Dahingegen zeigt der TGF- β -Rezeptor Typ III eine deutlich höhere Bindungsaffinität zu TGF- β 2 als zu TGF- β 1 oder TGF- β 3 (Brown et al., 1999). Während TGF- β 1 die Proliferation und Funktion verschiedener Zellen hemmt, fördert TGF- β 3 diese. Die unterschiedliche Affinität der TGF- β -Isoformen zu den Rezeptoren erklärt diese antagonistische Wirkungsweise. TGF- β kann somit sowohl als ein potenter Immunsuppressor als auch proinflammatorisch wirken.

Es wurde gezeigt, dass sowohl der Hauptrisikofaktor der COPD – das Zigarettenrauchen – als auch die begleitende rauchinduzierte Inflammation die TGF- β Produktion und Freisetzung induzieren (Königshoff et al., 2009). Die Mechanismen, über die TGF- β seine komplexen, zum Teil gegensätzlichen regulierenden und modulierenden Wirkungen entfaltet, sind noch nicht vollständig geklärt. Die TGF- β -Isoformen sind an zahlreichen physiologischen wie auch pathologischen Prozessen in unterschiedlichsten Geweben beteiligt.

Bisher lag der Fokus der meisten Studien auf TGF- β 1. TGF- β 1 wird ubiquitär exprimiert und durch verschiedenste Zelltypen wie Endothel-, Epithel- oder glatte Muskelzellen sowie Fibroblasten und andere Zellarten des Immunsystems sezerniert (Königshoff et al., 2009). 2004 wurde durch Wu et al. erstmals eine mögliche Verbindung zwischen dem Wachstumsfaktor und einer Prädisposition für COPD diskutiert. Verschiedene Studien haben eine verstärkte Expression von TGF- β 1 in den Epithelzellen der Atemwege von Rauchern, ebenso wie bei Patienten mit einer chronischen Bronchitis oder COPD nachweisen können (Königshoff et al., 2009).

Insgesamt kommen die bisher durchgeführten Studien jedoch zu verschiedenen Ergebnissen. Als mögliche Ursachen kommen neben ethnischen Faktoren die Heterogenität und der interindividuelle Schweregrad der COPD Erkrankung in Frage (Königshoff et al., 2009).

TGF- β 2 wurde bisher unter Anderem im Bezug auf Asthma untersucht. Bottoms et al. konnten 2010 nachweisen, dass sowohl TGF- β 1, als auch TGF- β 2 eine wichtige Rolle in der Regulierung der allergeninduzierten Inflammation und den damit assoziierten Umbauvorgängen der Epithelzellen vor Allem beim Asthma bronchiale spielen. Auch Balzar et al. (2005) konnten einen Zusammenhang zwischen der Expression von TGF- β 2 und der eosinophilen Inflammation bei Asthma-Patienten aufzeigen.

Auf Grund seiner multiplen Funktionen im Rahmen der Inflammation, der Zellreparatur, der Proliferation und Differenzierung bleibt die Rolle von TGF- β in der Pathogenese der COPD und im Bereich der Reparaturmechanismen des Lungenepithels komplex und kontrovers und erfordert weitere Forschungsarbeit. Da es nachgewiesenermaßen einen Zusammenhang zwischen Atemwegserkrankungen, Inflammation und TGF- β 2 gibt, liegt es nahe diesen Faktor bei COPD-Patienten genauer zu untersuchen.

2.9 Studienaufbau und Ziel

2.9.1 Molekularbiologischer Hintergrund der Arbeit

Das menschliche Genom setzt sich aus etwa 3,2 Milliarden DNA Bausteinen zusammen und bis heute sind ungefähr 30.000 bis 40.000 Gene identifiziert was etwa 90 Prozent der euchromatischen Bereiche entspricht. Die exakte Kenntnis von Basenabfolgen macht es möglich, bestimmte Zielsequenzen beispielsweise mit Hilfe von DNA-Markern genauer zu untersuchen. SNPs stellen eine etablierte Methode zur Identifikation eben solcher Zielsequenzen in möglichen Kandidatengenen dar. Da sie sowohl in kodierenden als auch in nichtkodierenden Bereichen vorkommen, ermöglichen sie die Darstellung von Mutationen eines einzelnen Basenpaares (Einzelbasentausch) in allen Regionen. Mit etwa 90 Prozent sind SNPs der mit Abstand häufigste Typ interindividueller genetischer Variabilität beim Menschen. Ihr durchschnittliches Auftreten wird auf alle 290 Basenpaare, ihr Vorkommen auf insgesamt etwa 11 Millionen geschätzt (Cichon et al., 2002). Bis heute sind mehr als zwei Millionen SNPs bekannt.

2.9.2 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Diese Studie verfolgt den Ansatz einer Analyse des Genpolymorphismus TGF- β 2 (59941 A/G rs1891467) und seines möglichen Bezugs zur COPD. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es den Einfluss eines Einzelbasentausches (SNP) im TGF- β 2-Gen auf den Krankheitsverlauf der COPD darzustellen. Dieser Überlegung liegt die Tatsache zu Grunde, dass die Gründe für eine Erkrankung an einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung bislang nicht endgültig geklärt werden konnten. Neben Umwelteinflüssen tragen nach aktuellem Stand der Forschung genetische Dispositionen gleichermaßen zur Entstehung dieser multifaktoriellen Erkrankung bei, so dass Untersuchungen weiterer möglicher genetischer Risikofaktoren notwendig sind. Die durchgeführten Untersuchungen in dieser Arbeit sollen einen möglichen Bezug des genannten SNPs zur Entstehung einer COPD nachweisen bzw. widerlegen. Es handelt sich dabei um einen SNP des TGF- β 2-Gens, das bis jetzt in keiner bekannten Studie in Zusammenhang mit der COPD genauer untersucht wurde. Die Wahl dieses Polymorphismus basiert neben der Tatsache, dass ein Einfluss auf im Lungengewebe stattfindende Umbauvorgänge bereits nachgewiesen werden konnte auch auf der Erkenntnis, dass ein definitiver Zusammenhang zwischen den Wachstumsfaktoren und chronischen Lungenerkrankungen besteht.

Im Rahmen der hier durchgeführten Fall-Kontrollstudie werden zunächst die beiden Hauptkollektive, das heißt das COPD-Gesamtkollektiv und das Vergleichskollektiv, unter dem Aspekt der Geno-/Phänotypanalyse gegenübergestellt. Zur besseren Differenzierung werden im Folgenden auch die Subkollektive analysiert und sowohl einander als auch der Kontrollkohorte gegenübergestellt. Hierbei spielen besonders das Rauchverhalten und das Geschlecht eine wichtige Rolle.

3. Material und Methoden

3.1 Probanden

Wir untersuchten ein COPD-Kollektiv kaukasischer Herkunft aus dem Bonner Raum, welches insgesamt 212 Patienten mit einer klinisch gesicherten Diagnose umfasst. 73 der teilnehmenden COPD-Patienten waren weiblich und 139 männlich. Das Kontrollkollektiv bestand aus 213 Personen, die dem Patientenkollektiv in Alter, Geschlecht, ethnischer Herkunft und Rauchgewohnheiten angepasst wurden. Zudem wurde eine COPD sowie maligne Erkrankungen ausgeschlossen. Ein α_1 -Antitrypsin-Mangel wurde bei allen Patienten dieser Studie ausgeschlossen. Einige der teilnehmenden Personen wurde von uns selber rekrutiert und zu einem schon vorbestehenden Kollektiv zugefügt. Dies geschah vor Allem in der Pneumologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik II und auf den verschiedenen internistischen Stationen der Universitätsklinik Bonn. Weitere Personen konnten im Rahmen von Informationsveranstaltungen wie dem Lungentag an der Universitätsklinik rekrutiert werden, oder wurden von uns nach Absprache zu Hause besucht.

Abgesehen von der Blutabnahme zur genetischen Untersuchung erfolgte bei den Patienten mit Hilfe von Fragebögen eine ausführliche Anamnese und eine Evaluation des Gesamtstatus. Zudem führten wir bei allen COPD-Patienten eine Lungenfunktion zur Erhebung der aktuellen Lungenfunktionsparameter durch. Bei den durch uns rekrutierten Patienten geschah dies in der Pneumologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik II. Bei anderen Patienten konnte die Lungenfunktionsanalyse bereits im Rahmen der Untersuchung durch niedergelassene Kollegen erfolgen.

Die Studiendurchführung fand mit schriftlichem Einverständnis aller teilnehmenden Probanden statt und wurde auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt. Das Projekt wurde durch die Ethikkommission der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn bewilligt.

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien

Chemikalien für die DNA-Extraktion:

Lysis-Puffer (Natriumchloridlösung, EDTA, Aqua dest.)

0,1 % Triton X 100-Lösung

10 % Natrium-Dodecyl-Sulfat-Lösung

20mg/ml Proteinase-K-Lösung

6M Natriumchlorid-Lösung

TE8-Puffer (Tris-HCl, Aqua dest.)

Chemikalien für die Real-Time- PCR (LightCycler):

LC MasterMix (enthält dNTPs, Puffer sowie Taq-DNA-Polymerase)

20pmol/ µl Primer

2mmol/µl Magnesiumchlorid

H₂O(aqua dest.)

3pmol/ µl Anchor/Sensor Sonden

200 µg/ml DNA

3.2.2 Geräte

Zentrifuge: Mikrofuge E™ (Firma Beckmann, München, Deutschland)

Überkopfschüttler

Wasserbad/Inkubator

Vortexgerät: Vortex Genie (Firma Bender &Hobein AG, Zürich, Schweiz)

LightCycler® Roche1.5. Instrument (Firma Roche, Mannheim, Deutschland)

LightCycler® Software 3.5. (Firma Roche, Mannheim, Deutschland)

3.2.3 Primer

Primer sind Oligonukleotide, die als Startstück für die Replikation bestimmter DNA Abschnitte dienen. Dies erfolgt mittels amplifizierender Enzyme. Das Enzym - hier die DNA-Polymerase – benötigt als Startpunkt für ihre erste Verknüpfungsreaktion die Hydroxylgruppe der Primer. Bei der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain

reaction, PCR) lässt sich das zu amplifizierende DNA-Fragment durch die Wahl der Forward- und Reverse-Primer festlegen, die am komplementären Doppelstrang exakt die zu amplifizierende Nukleotidsequenz beschreiben.

Für eine optimale Arbeitsgrundlage und einen reibungslosen Reaktionsablauf ist ein entsprechendes Primerdesign unabdingbar. Ziel ist es eine Primerschmelztemperaturen zwischen 60°C und 75°C zu erreichen. Aus diesem Grund sollte die Länge der Primersequenzen zwischen 18 und 30 Nukleotiden liegen und das Verhältnis von GC- zu AT- Baasenpaaren beider Primer sich ähneln.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer für TGF-β2 stammen von der Firma TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH Berlin (Deutschland).

Primer für TGF-β2 (59941 A/G rs1891467):

1. 5'gTAAACAggCAACTTAAATACA 3' F
2. 5'CACTCTACACACTATCTTTggA 3' R

3.2.4 DNA-Polymerase

Die DNA-Polymerase ermöglicht die chemische Verknüpfung einzelner Desoxy-Nukleosidtriphosphat Monomere (dNTPs) zu einem Desoxyribonukleinsäure Polymer (DNA) und ist somit für die DNA Replikation essentiell. Biotechnologisch werden sie zur Amplifikation eines bestimmten DNA-Fragments eingesetzt, das vorher durch die entsprechenden Primer festgelegt wird. Die hier verwendete Taq-Polymerase ist ein thermostabiles Enzym, welches aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt und in *E. coli* Bakterien gentechnisch angezüchtet werden kann.

3.2.5 LightCycler® Sonden

Zur sequenzspezifischen Detektion von Polymorphismen werden mit Farbstoff markierte Oligonukleotide in Form von Sonden benötigt. In dieser Arbeit wurden Sonden mit Markierung des Sensors durch Fluoreszein und Markierung des Anchors durch LightCycler® Red 640 verwendet.

Sonden für TGF-β2 (59941 A/G rs1891467):

1. Sensor A : 5'- GCTGACATTTTGATGAGGCC--FL'3

2. Anchor TGF- β 2 : 5'- LC640-TGAGACGTATCTATTAAAACCTGATGGGGG--PH - '3

3.3 Durchführung der Untersuchungen

3.3.1 Blutentnahme

Jedem Patienten aus dem Patienten- und Kontrollpersonen-Kollektiv wurde unter Routinelaborbedingungen mittels des Vacutainer Systems venöses Blut abgenommen. Die 9 ml EDTA Vollblutproben wurden folgend zur DNA Extraktion verwendet. Vor der Abnahme war jeder Patient verpflichtet, eine Einverständniserklärung zu unterschreiben, welche die genetische Untersuchung der DNA durch unser Labor, mit Bewilligung der Ethikkommission, erlaubte.

3.3.2 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut nach der Aussalzmethode

Zur Gewinnung der DNA wurden 9 ml EDTA-Blut mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt. Nach einer 30 minütigen Ruhephase bei 4°C erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation des Ansatzes bei 3000 rpm ($r = 20\text{cm}$, 3500 \times g). Der Überstand wurde anschließend abdekantiert (bzw. abpipettiert) und verworfen. In einem zweiten, analogen Durchgang wurde daraufhin das Sediment entsprechend mit Aqua dest. lysiert, zentrifugiert und vom Überstand getrennt. Das erhaltene Pellet aus Leukozyten wurde mit 30 ml einer 0,1 %igen Triton-Lösung versetzt und durchmischt. Das Gemisch wurde erneut zentrifugiert. Nach anschließender Separation des Rückstands wurde dieser mit 5 ml Lysis-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 250 μ l 10 % Natrium-Dodecyl-Sulfat wurden die Zellkerne zur Fragmentation gebracht. Der Reaktionsansatz wurde im Anschluss bei 37°C im Wasserbad über Nacht inkubiert und durch Zusatz von 100 μ l Proteinase-K-Lösung enzymatisch gespalten. Um die in der Probe enthaltenen Proteine „auszusalzen“ (= auszufällen), wurde der Ansatz am Folgetag in eine 15 ml Falcon-Tube überführt, mit 1,5 ml 6M NaCl-Lösung versetzt und 90 Minuten lang auf einem Überkopfschüttler durchmischt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in eine 50 ml Falcon-Tube überführt. Durch Zugabe von 25 ml 100 % EtOH wurde die DNA gefällt. Die nun fadenförmige DNA wurde aus dem Ansatz entnommen, in 70 % EtOH gewaschen und abschließend in 250 μ l TE8-Puffer gelöst. Es handelt sich hierbei um die Aussalzmethode nach Miller et al. (1988).

3.3.3 DNA-Amplifikation durch PCR

Das so gewonnene genetische Material muss nun mittels der PCR Methode amplifiziert werden, um weitere Untersuchungen der Genpolymorphismen anschließen zu können. Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine von K.B. Mullis (Mullis und Faloona, 1987) entwickelte Methode. Sie ermöglicht eine exponentielle Verfielfältigung kurzer DNA-Sequenzen (meist 100 bis 600 Basen) innerhalb eines längeren doppelsträngigen DNA-Moleküls in vitro mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerasen. Um dies umzusetzen, muss ein aus drei Phasen bestehender Mechanismus zyklisch repetiert werden.

1. Hitzedenaturierung des DNA-Doppelstrangs

Durch Erhitzen der DNA auf ca. 94-96° lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen beider Stränge, so dass zwei einzelsträngige DNA-Moleküle entstehen. Diese initiale Denaturierung ist Grundlage für die nachfolgenden Amplifikationszyklen.

2. Anlagerung (Annealing) der Oligonukleotidprimer

Durch ein Abkühlen des Reaktionsansatzes auf eine Temperatur zwischen 50°C und 70°C findet die Anlagerung der beiden spezifischen Oligonukleotidprimer an das zu amplifizierende DNA-Fragment statt. Diese Annealing-Temperatur wird entscheidend durch die Schmelztemperatur der Primer bestimmt und muss je nach Ansatz individuell bestimmt werden.

3. Elongation der Oligonukleotidprimer durch die hitzestabile DNA-Polymerase

Die einzelsträngige Matrizen-DNA wird nun nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung durch Anlagerung der jeweils komplementären dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate: dATP, dGTP, dCTP und dTTP) mittels der DNA-Polymerase verlängert. Die Primer dienen hierbei, durch Bereitstellung ihrer Hydroxylgruppe, als Initiatoren. Abhängig vom Arbeitsoptimum der verwendeten Polymerase muss die Temperatur in diesem Schritt angepasst werden. Eine im Konzentrationsverhältnis angepasste Zugabe von Magnesiumchlorid und Pufferlösung dient der Optimierung der Reaktionsbedingungen. Nun beginnt der Zyklus mit Schritt 1 von Neuem.

Um eine Kontamination der Proben und somit falsche Ergebnisse auszuschließen, wur-

de eine Referenzprobe, die statt DNA nur H₂O enthielt, zugefügt.

Reagenzien	[μ l]
LC- MasterMix	1,0
Magnesiumchlorid	0,4
Foward Primer	0,5
Reverse Primer	0,5
H ₂ O	5,6
Anchor LC 640	0,5
Sensor FL	0,5
DANN	1,0

Tab. 2: LightCycler[®]-Reaktionsansatz (10 μ l) für TGF- β 2 (59941 A/G rs1891467)

3.4 Real-Time PCR - LightCycler[®] 1.5.

Der LightCycler vereint die klassische Methodik der PCR und Gelelektrophorese in einem Gerät. Er ist geeignet für wiederholbare kinetische Quantifikationen von DNA, cDNA und RNA. Die Real-Time PCR ermöglicht es, eine PCR in vergleichbar kurzer Zeit durchzuführen (40 Zyklen in ca. 60 Minuten) und dabei zeitgleich die Amplifikation auf einem Monitor zu verfolgen (daher die Namensgebung Real-Time PCR). Der PCR Vorgang wird wie oben beschrieben durchgeführt. In einem zweiten Schritt werden mittels Schmelzkurvenanalyse mögliche Polymorphismen erfasst und dargestellt.

3.4.1 Aufbau des LightCyclers[®]:

Der Aufbau des LightCycler[®] 1.5 setzt sich aus vier Elementen zusammen:

- einer thermostatisierten Reaktionskammer
- einem Probenrotor
- einer Heiz- bzw. Kühlvorrichtung
- einem Fluorimeter

Durch diesen Aufbau ergibt sich eine Kombination aus PCR-Cycler und Fluoreszenzphotometer (Wittwer et al., 1997 a).

Sowohl Reaktionskammer als auch Probenrotor sind aus Materialien mit geringer Wärmekapazität hergestellt. Dies und der funktionale Aufbau des LightCyclers, bestehend aus einem Temperatursensor im Inneren der Reaktionskammer, einer Heizspirale und einem Ventilator, ermöglicht extrem schnelle Aufheiz- und Abkühlraten von bis zu 20°C pro Sekunde. Der Ventilator dient zudem der homogenen Temperaturverteilung in der Kammer.

Die speziell angefertigten Glaskapillaren mit einem optimalen Volumen-Oberflächen-Verhältnis ermöglichen eine rasche Anpassung an wechselnde Temperaturen und bewirken somit einen extrem schnellen Wärmetransport in das nur 10 bis 20 µl betragende Reaktionsgemisch. Aufheiz- und Abkühlphasen werden so auf ein Minimum gekürzt. Pro Lauf können bis zu 32 Kapillaren analysiert werden. Die Kapillaren befinden sich in einem Proben-Karussell, welches innerhalb der Reaktionskammer rotiert

Das optische System besteht aus einer blauen High-Performance-Diode (LED) als Energiequelle, die mit einer Wellenlänge von 470 nm \pm 40 die Proben zur Fluoreszenz anregt. Das Fluorimeter (Fluoreszenzphotometer) ist aus halbdurchlässigen Spiegeln und wellenlängenspezifischen Filtern konstruiert. Das emittierte Licht der Proben wird über eben diese Spiegel und einen Photomultiplier zu einem der drei Photohybriden (530 nm, 640 nm, 705 nm) geleitet. Hier wird die emittierte Wellenlänge der Probe analysiert und von optischen in elektrische Signale umgewandelt, welche anschließend mithilfe des Computers übermittelt werden (Wittwer et al., 1997 a; Wittwer et al., 1997 b). Da die Fluoreszenzzeit synchron über alle Arbeitsphasen des LightCyclers[®] hin gemessen wird, ist der Arbeitsprozess während der gesamten Laufzeit ohne Zeitverzögerung am PC verfolgbar und daher in Echtzeit („Realtime“) beurteilbar. (Wittwer et al., 1997 a).

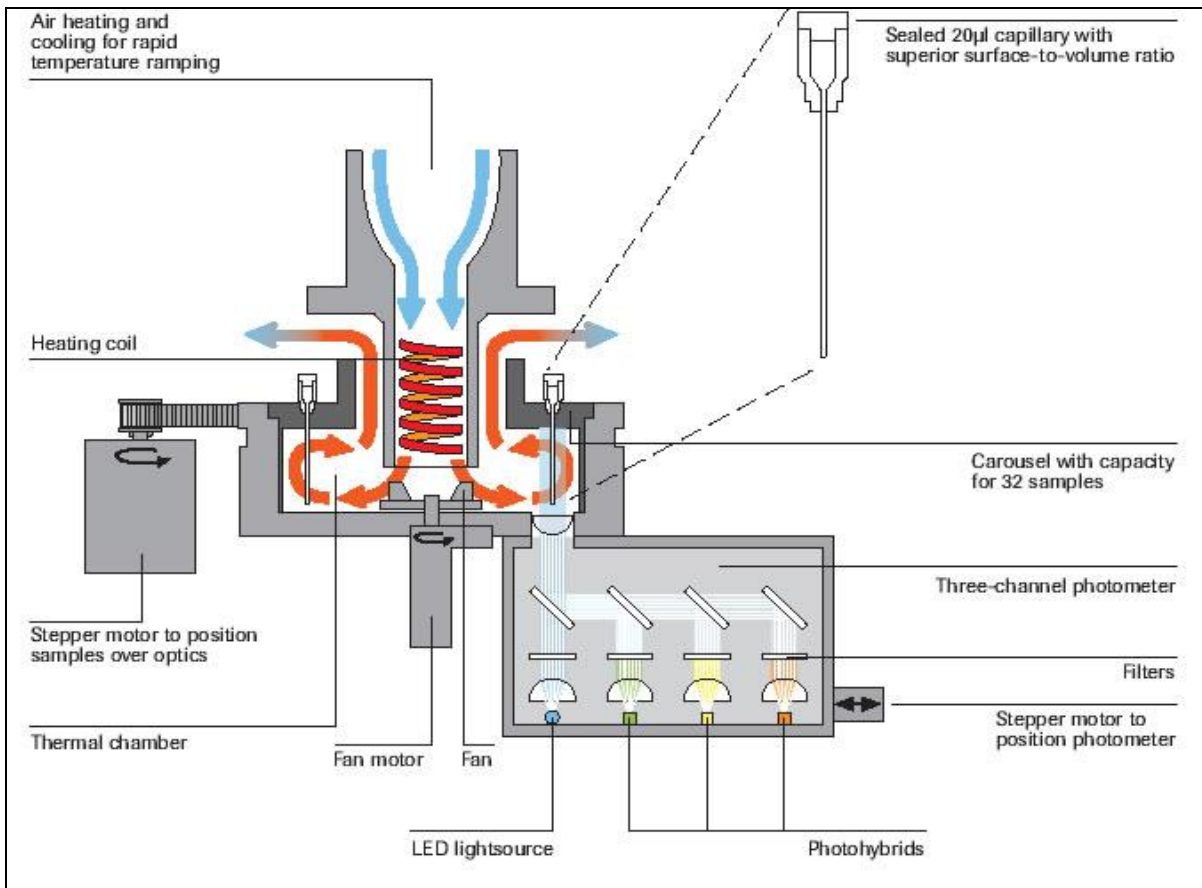


Abb.6: Schematische Abbildung eines 3-Kanal-Photometers

3.4.2 Messprinzip des LightCyclers®

Für die Messung der DNA Proben mit dem LightCycler® ist es notwendig mit speziellen Markern und Sonden zu arbeiten. Die Detektion spezifischer Nukleotidsequenzen beruht auf dem FRET-Prinzip (Fluoreszenz Resonance Energy Transfer). Dabei wird der Donor-Farbstoff von einem Photon der blauen Leuchtdiode angeregt. Dies erregt bestimmte Elektronen im Donormolekül auf ein höheres Energielevel. Diese gewonnene Energie wird durch Energietransfer auf den Akzeptor-Farbstoff übertragen. Dieser FRET-Prozess wurde in diesem Fall mithilfe von LightCycler®-Sonden durchgeführt. In diesem Fall wurden zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Hybridization Probes) zum normalen PCR-Ansatz zugefügt. Die Sonden sind mit zwei unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoffen markiert (Donor und Akzeptor). In diesem Fall ist der Donor am 3'-Ende mit Fluoreszin markiert, der Akzeptor am 5'-Ende mit LightCycler® Red 640. Durch Anregung des Fluoreszeins der Donor-Sonde, mit Licht der Wellenlänge 470 nm, überträgt diese statt zu fluoreszieren, mindestens 50 % ihrer Energie durch Dipol-Dipol-

Kräfte auf die benachbarte Akzeptor-Sonde. Durch diesen Energietransfer wird der Fluoreszenzfarbstoff der Akzeptor-Probe angeregt. Diese emittiert nun eine Fluoreszenz der Wellenlänge 640 nm, die durch das Fluorimeter registriert werden kann. Diese Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge der Ziel-DNA, welche während der PCR erzeugt wurde. Die Fluoreszenz jeder Probe wird einmal pro PCR-Zyklus direkt nach Abschluss der Primeranlagerung gemessen, da dann beide Hybridisations Sonden an die DNA gebunden sind und der Energietransfer zwischen ihnen stattfinden kann. Ungebundene Sonden erzeugen kein Fluoreszenzsignal, da das FRET Prinzip keine Wirkung hat.

3.4.3 Schmelzkurvenermittlung

Im Anschluss an die PCR wird mit Hilfe der LightCycler[®] Software 3.5 eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Sie dient der Identifizierung und Genotypisierung der DNA-Produkte.

Durch eine schrittweise und kontinuierliche Temperaturerhöhung werden die DNA Abschnitte bei produktspezifischen Temperaturen zum Schmelzen gebracht. Ein plötzlicher Fluoreszenzabfall deutet auf das Schmelzen des DNA-Strangs und somit auf das Ablösen der Sonden hin. Die Farbstoffmoleküle entfernen sich hierbei räumlich so weit voneinander, dass ein FRET nicht mehr möglich ist und das Fluoreszenzsignal erlischt.

Bei Übereinstimmung der Zielsequenz mit der Sondensequenz bleiben die Hybridisations Sonden maximal lange an den DNA-Strang gebunden. Liegt jedoch eine Mutation in Form eines Basenaustausches in dem Bereich vor, schwächt dies die Bindung in diesen Sequenzabschnitt. Somit löst sich die Sonde in Abhängigkeit von der Basenübereinstimmung zwischen DNA und Sondensequenz zu unterschiedlichen Zeit- und bei verschiedenen Schmelzpunkten. Da in dieser Arbeit der Sensor A den Wildtyp repräsentierte, konnte sich die Sonde bei vorhandener Mutation in Form eines Basenaustausches A/G nicht optimal der Ziel-DNA anlagern. Somit sprang sie schon früher, d.h. bei niedrigeren Temperaturen, ab als bei mutationsfreien DNA-Sequenzen.

Durch dieses Funktionsprinzip kann eine sehr zuverlässige Genotypisierung vorgenommen werden.

1. PCR

	TGF-β2
Initiale Denaturierung	95°C – 5 min
Denaturierung	95°C – 3 sec
Anlagerung	54°C – 20 sec
Elongation	72°C – 25 sec
Zyklenanzahl	45

Mit jedem Amplifikationszyklus findet eine Verdopplung der DNA-Moleküle statt, wodurch es zu einer exponentiellen Vermehrung der Sequenz kommt.

2. Schmelzkurve

1. Schmelzpunkt	95°C – 5 sec
2. Schmelzpunkt	45°C – 60 sec
3. Schmelzpunkt	80°C – 0 sec
Zyklenzahl	1

3. Abkühlphase

Kühlen	40°C – 30 sec
Zyklen	1

Tab. 3: LightCycler[®]-Programm für den untersuchten Polymorphismus TGF- β 2 (59941 A/G rs1891467)

Mit Hilfe der LightCycler[®] Software 3.5. ist es möglich, die Genotypisierung der Polymorphismen direkt nach dem Realtime-PCR-Lauf elektronisch auszuwerten. So kann anhand der Schmelzpunkttemperatur, bei der das Fluoreszenzsignal aufgrund von abspringenden Sonden schwächer wird, zwischen homozygotem Wildtyp, Heterozygotie und homozygotem Mutanten unterschieden werden. Bei dem hier untersuchten Polymorphismus für TGF- β 2 (59941 A/G rs1891467) stellte sich der homozygote Wildtyp mit einer Schmelztemperatur von ca. 64,2°C und der homozygote Mutant mit einem Schmelzpunkt bei ca. 56,1°C dar. Die Schmelzkurve des heterozygoten Typs wies zwei

Peaks, jeweils bei den oben genannten Temperaturen, auf.

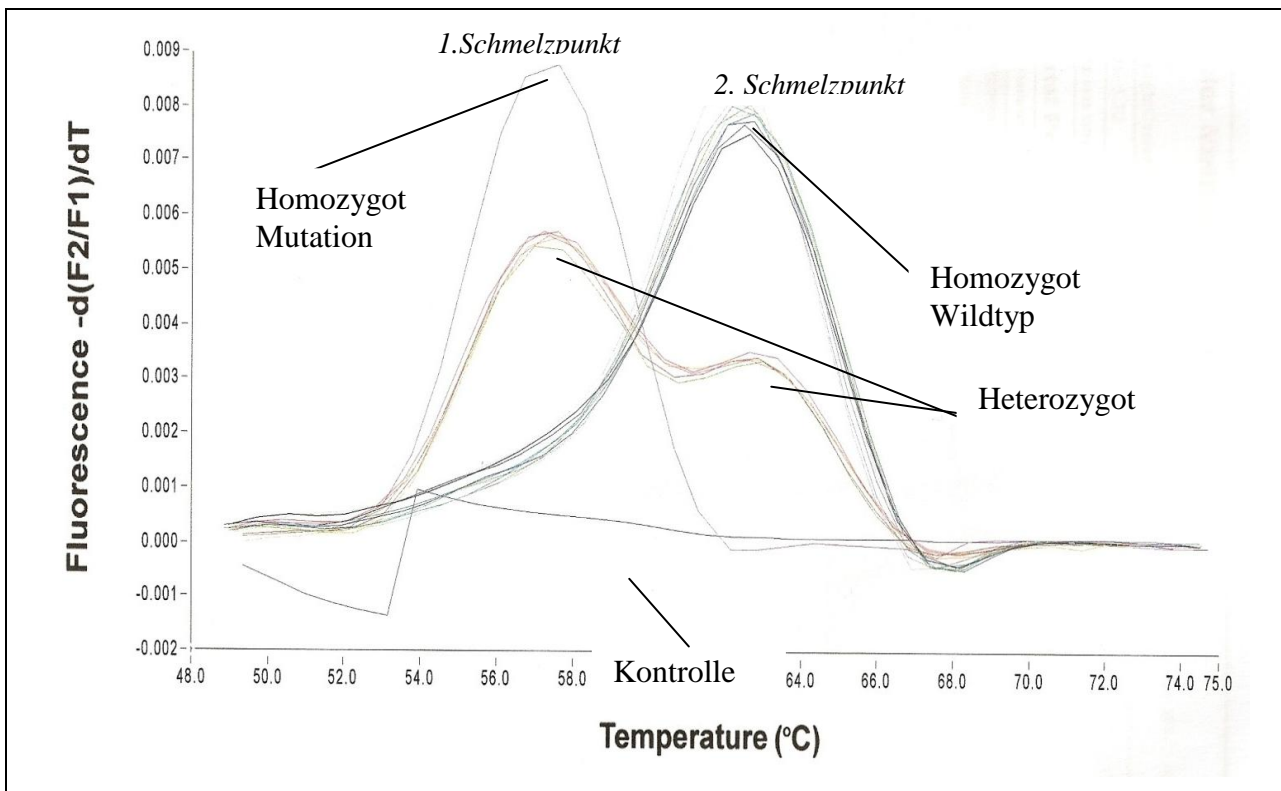


Abb. 7: Schmelzkurvendarstellung mit Genotypenverteilung

3.5 Statistik

Die statistische Datenanalyse wurde mit Hilfe des Programmsystems SPSS 21 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) durchgeführt.

Die Charakterisierung des vorliegenden Kollektivs erfolgte anhand verschiedener Merkmale (Variablen). Die Gruppe der qualitativen, diskreten Variablen mit nominalem Messniveau umfasst neben dem Geschlecht auch die Rauchgewohnheiten sowie Genotyp und Allelfrequenz des untersuchten SNPs. Zu den quantitativen, stetigen Variablen mit metrischem Messniveau gehört das Alter der Probanden bei Blutabnahme, die verschiedenen Lungenfunktionsparameter (FEV_1 , FEV_1 in Prozentsoll und FEV_1/FVC) und die Angabe der „pack years“.

3.5.1 Statistische Verfahren

Deskriptive Statistik: Anhand von Kreuztabellen lassen sich Zusammenhänge zwischen nominalen und ordinalen Variablen darstellen. Hier können verschiedene Kollektive ei-

einander gegenübergestellt und dann unter dem Aspekt der unterschiedlichen Häufigkeitsverteilung verglichen werden.

Analytische Statistik: Anhand des T-Tests können Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und diese dann für alle Kollektive analysiert werden.

Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson ermittelt. Dabei wurde die Unabhängigkeit der Variablen und damit indirekt der Zusammenhang der Merkmale überprüft. Der Chi-Quadrat-Wert χ^2 berechnet sich aus der Differenz zwischen beobachteten und erwarteten Ereignissen:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Beobachtungswert} - \text{Erwartungswert})^2}{\text{Erwartungswert}}$$

Statistische Signifikanz wird bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 0,05$ d.h. einem Chi-Quadrat-Wert $\chi^2 \leq 0,05$ erreicht.

4. Ergebnisse

4.1 Beschreibung des Polymorphismus

Der in dieser Arbeit untersuchte Einzel-Nukleotid-Polymorphismus für TGF- β 2 (59941 A/G rs1891467) befindet sich auf dem Chromosom 1 im Intron 2 (*1q41*). Die Größe der zu amplifizierenden Basensequenz umfasst 281 Basenpaare.

```
5'TTGTAAACAGGCAACTTAAATACATCCTGATGCCATATGAATAGTGGTACTTGC
ATATAGGGTATAGGCGGGGAAATTTACCAGGGAGCTGACATTTTATGAGGCC
TTGAGACGTATCTATTAACCTGATGGGGGATCATCATTCTTGGCAGGAAGGG
CAGGCACTGCAAAGACAGTCTTGAATGGGCTTGCTGAGGGTACCTGATGCATAG
CGCTCAGTGCCTGGAGGTGAGGAGAGACTGGGGAGAAGGTGGCCCTCCAAAGA
TAGTGTGTAGAGTGACACTACAGAGGATT'3
```

Abb. 8: DNA-Sequenz im Bereich des untersuchten rs1891467-Polymorphismus. Der Basenaustausch von Adenin zu Guanin bei vorhandener Mutation ist hier fett und vergrößert dargestellt, die Ansatzstellen der Primer sind unterstrichen und die Sensor- und Anchorsequenzen kursiv dargestellt.

4.2 Statistische Datenanalysen

Die beiden Kollektive (COPD-Patienten und Normalpersonen) wurden sowohl in ihrer Gesamtheit, als auch differenziert einander gegenüber gestellt. Dabei wird auf Grund des wichtigen Risikofaktors Rauchen sowohl auf die Rauchgewohnheiten als auch die Lungenfunktion eingegangen. Die Verteilungen zeigen sich in den folgenden Tabellen 6 und 7. In Bezug auf die seit 2011 bestehende neue Stadieneinteilung der COPD (siehe Kapitel 1.5.4) wäre diese auch für das hier untersuchte Kollektiv sinnvoll gewesen. Rückwirkend ist dies jedoch auf Grund fehlender Daten nicht mehr möglich.

Bei den stetigen Variablen werden im Folgenden der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben, die diskreten Variablen sind Absolutwerte bzw. Prozentsätze. Das Rauchverhalten wurde bei der Untersuchung der Kollektive in die Kategorien Raucher, Ex-Raucher und Nieraucher eingeteilt und der Tabakkonsum in „pack years“ dargestellt. Zudem wurde eine Lungenfunktion durchgeführt und durch die Werte für die FEV₁ und

den Tiffeneau-Index (FEV_1/VC) objektiviert.

4.2.1 Demographische Basisdaten

Insgesamt wurden 425 Probanden untersucht. Das COPD-Gesamtkollektiv umfasst 212 Patienten mit einer klinisch gesicherten Diagnose der COPD. Demgegenüber steht ein Kontrollkollektiv aus 213 Personen. Beide Kohorten formierten sich ausschließlich aus Teilnehmern kaukasischer Herkunft, davon war der überwiegende Anteil deutschstämmig und die übrigen Teilnehmer sonstiger europäischer Abstammung.

	COPD- Gesamtkollektiv	COPD stabil¹	COPD instabil²	Kontrollkollektiv
Gesamtzahl	212	82	97	213
Geschlecht	w: 73 (34,43%)	w: 28 (34,15%)	w: 33 (34,02%)	w: 51 (23,94%)
	m: 139 (65,57%)	m: 54 (65,85%)	m: 64 (65,98%)	m: 162 (76,06%)
Alter bei Blutabnahme	63,79 ± 11,29	62,71 ± 11,63	62,45 ± 9,36	62,0 ± 8,49

¹ < 3 COPD-bedingte Hospitalisierung im vorausgegangenen Kalenderjahr

² ≥ 3 COPD-bedingte Hospitalisierung im vorausgegangenen Kalenderjahr

Tab. 4: Demographische Basisdaten der Patienten- und Kontrollkohorte (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen und die Mittelwerte ± Standardabweichungen der stetigen Variablen)

Bei Studieneintritt wiesen beide Gruppen einen mit $63,79 \pm 11,29$ bzw. $62,0 \pm 8,49$ Jahren ähnlichen Altersdurchschnitt auf. In beiden Kollektiven zeigt sich ein Überwiegen des männlichen Geschlechts - bei den COPD-Patienten sind es knapp 66 % und bei den gesunden Teilnehmern 76 %. Die Auswahl der in die Kontrollgruppe eingeschlossenen Personen wurde bestmöglich auf die COPD-Patienten abgestimmt.

	COPD-Gesamtkollektiv	COPD stabil¹	COPD instabil²	Kontrollkollektiv
Gesamtzahl	212	82	97	213
Raucher	98 (46,23%)	44 (53,66%)	43 (44,33%)	88 (41,31%)
	w: 33 (15,57%)	w: 18 (21,95%)	w: 13 (13,4%)	w: 28 (13,15%)
	m: 65 (30,66%)	m: 26 (31,71%)	m: 30 (30,93%)	m: 60 (28,17%)
Nichtraucher	16 (7,55%)	2 (2,44%)	14 (14,43%)	1 (0,47%)
	w: 13 (6,13%)	w: 2 (2,44%)	w: 11 (11,34%)	w: 1 (0,47%)
	m: 5 (2,36%)	m: 0 (0%)	m: 3 (3,09%)	m: 0 (0%)
Ex-Raucher	66 (31,13%)	25 (30,49%)	40 (41,24%)	122 (57,28%)
	w: 15 (7,08%)	w: 6 (7,32%)	w: 9 (9,28%)	w: 20 (9,39%)
	m: 51 (24,06%)	m: 19 (23,17%)	m: 31 (31,96%)	m: 102 (47,89%)
"pack years"	32,84 ± 22,66	30,22 ± 16	33,32 ± 26,3	23,98 ± 23,51
	w: 23,41 ± 19,82	w: 24,28 ± 16,45	w: 21,12 ± 22,1	w: 16,67 ± 14,56
	m: 37,6 ± 22,59	m: 33,73 ± 14,82	m: 39,23 ± 26,28	m: 25,64 ± 24,85
Ruhe FEV₁ (l/s)	1,52 ± 0,7	1,77 ± 0,71	1,31 ± 0,63	3,1 ± 0,96
FEV₁ (% des Sollwerts)	52,77 ± 21,53	59,75 ± 19,3	47,0 ± 21,56	95,37 ± 24,12
FEV₁/FVC	60,97 ± 16,64	62,23 ± 15,83	58,21 ± 16,0	101,15 ± 22,86
	w: 64,36 ± 15,81	w: 66,76 ± 16,18	w: 61,95 ± 15,4	w: 95,39 ± 27,62
	m: 59,29 ± 16,85	m: 60,02 ± 15,34	m: 56,2 ± 16,08	m: 102,61 ± 21,36

¹ < 3 COPD-bedingte Hospitalisierung im vorausgegangenen Kalenderjahr

² ≥ 3 COPD-bedingte Hospitalisierung im vorausgegangenen Kalenderjahr

Tab. 5: Verlaufparameter und Rauchverhalten der Patienten- und Kontrollkohorte aufgeteilt nach Geschlecht (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen und die Mittelwerte ± Standardabweichungen der stetigen Variablen)

Beim Vergleich der Verlaufparameter und des Rauchverhaltens der Kollektive zeigt

sich ein im COPD-Gesamtkollektiv mit 32,84 „pack years“ im Vergleich zu 23,98 „pack years“, in der Kontrollkohorte deutlich höherer Nikotinkonsum. Die Lungenfunktionsparameter der COPD-Patienten weisen schlechtere Werte, als die der gesunden Probanden auf. So liegt die Einsekundenkapazität FEV₁ des COPD-Kollektivs mit einem Mittelwert von 52,77 % weit unter dem Mittelwert des Kontrollkollektivs (95,37 %). Die Patienten, die einen instabilen Verlauf aufweisen zeigen mit nur 47 % nochmals schlechtere Werte.

4.2.2 Verteilung von Genotypen und Allelfrequenzen

Jeder Proband wurde an dem untersuchten polymorphen Genort genotypisiert. Mit Hilfe der SPSS-Software konnten Aussagen zur Verteilung der Genotypen und Allelfrequenzen des G-Trägertyps in den einzelnen Kollektiven getroffen werden. Anhand des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson konnte die Verteilungsmuster der Genotypen zwischen den Patientenkohorten verglichen und auf signifikante Unterschiede hin untersucht werden (Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$).

Die Tabelle 6 und die Abbildung 9 geben eine Übersicht über die Genotypverteilungen und die Mutationsallelfrequenzen und -prävalenzen im Bereich des TGF- β 2 Polymorphismus (59941 A/G) und die erfolgte statistische Auswertung.

TGF- β 2 (59941 A/G rs1891467)	COPD-Gesamtkollektiv			Kontrollkollektiv		
	weiblich	männlich	Σ	weiblich	männlich	Σ
	73	139	212	51	162	213
Homozygot Wildtyp AA	50 (68,49%)	100 (71,94%)	150 (70,75%)	34 (66,67%)	113 (69,75%)	147 (69,01%)
Heterozygot AG	20 (27,4%)	32 (23,02%)	52 (24,53%)	12 (23,53%)	35 (21,6%)	47 (22,07%)
Homozygot GG	3 (4,11%)	7 (5,04%)	10 (4,72%)	5 (9,8%)	14 (8,64%)	19 (8,92%)
Allelfrequenz G	0,178 (26/146)	0,165 (46/278)	0,340 (72/424)	0,216 (22/102)	0,194 (63/324)	0,399 (85/426)
Allelprävalenz G	0,315 (23/73)	0,28 (39/139)	0,292 (62/212)	0,333 (17/51)	0,302 (49/162)	0,31 (66/213)
P-Wert (der Genotypen in Bezug auf das Normalkollektiv)	0,428	0,469	0,215			

Tab.6: Genotypverteilung des COPD- und Normalpersonenkollektivs, Allelfrequenz, Prävalenz und p-Wert des TGF- β 2 (59941 A/G rs1891467) – Polymorphismus (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen)

In beiden Kohorten zeigt sich ein mit 70,8 % der 212 COPD-Patienten und 69 % der 213 Kontrollpersonen deutliches Überwiegen des homozygoten Wildtyps (A/A). Den heterozygoten AG-Genotyp am genannten Genort weisen 24,5 % des COPD-Gesamtkollektivs und 22,1 % der Vergleichsgruppe auf. Homozygot für den Mutant (G/G) sind 4,7 % der COPD-Patienten und 8,9 % der Kontrollgruppe. Der Vergleich des COPD-Gesamtkollektivs mit dem Kontrollkollektiv ergibt wie in Tabelle 6 zu erkennen ist bezüglich der Häufigkeitsverteilung des Polymorphismus TGF- β 2 (59941 A/G rs1891467) mit einem p-Wert von 0,215 kein statistisch signifikantes Ergebnis. Auch mit Hilfe der aus den Absolutwerten ermittelten Prozentangaben lassen sich kaum Unterschiede bei der Gegenüberstellung der beiden Gruppen erkennen. Die Prävalenz des Mutationsallels G

liegt im Patientenkollektiv bei 29,2 %, während im Normalkollektiv eine Prävalenz von 31,0 % erreicht wird. Die Frequenz des Mutationsallels zeigt mit 34,0 % bzw. 39,9 % im Patienten- bzw. Vergleichskollektiv nah beieinander liegende Werte und ist Ausdruck der fehlenden Assoziation mit dem betrachteten SNP im TGF- β 2-Gen.

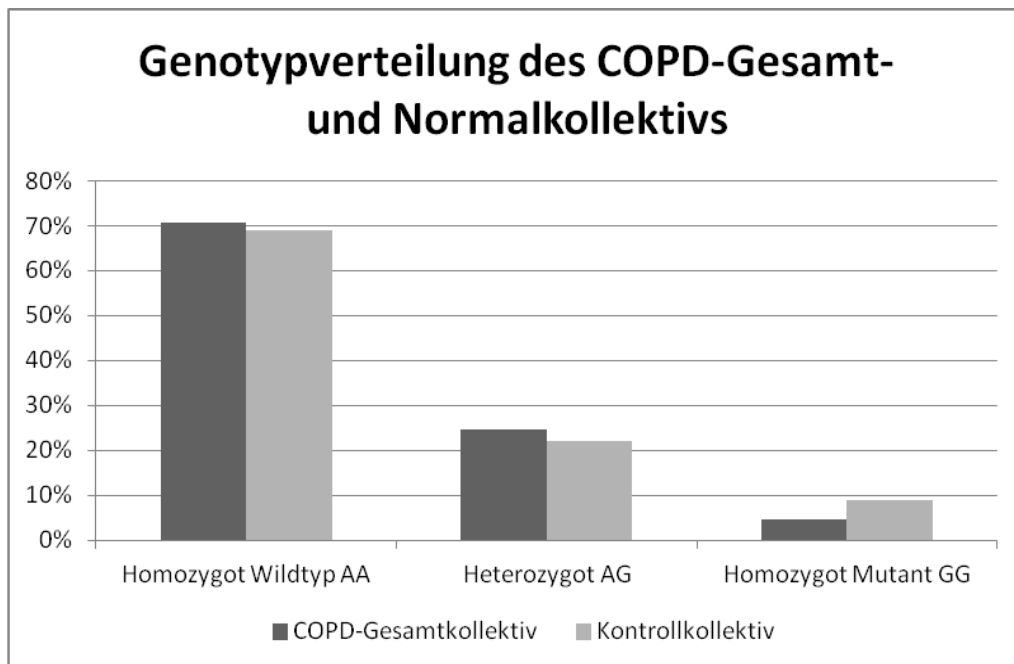


Abb. 9: Graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung des TGF- β 2 (59941 A/G rs1891467) Polymorphismus: COPD-Gesamtkollektiv vs. Kontrollkollektiv

TGF- β 2 (59941 A/G rs1891467)	COPD stabil ¹			COPD instabil ²		
	weiblich	männlich	Σ	weiblich	männlich	Σ
	28	54	82	33	64	97
Homozygot Wildtyp AA	22 (78,57%)	43 (79,63%)	65 (79,27%)	20 (60,61%)	43 (67,19%)	63 (64,95%)
Heterozygot AG	5 (17,86%)	6 (11,11%)	11 (13,41%)	11 (33,33%)	20 (31,25%)	31 (31,96%)
Homozygot GG	1 (3,57%)	5 (9,26%)	6 (7,32%)	2 (6,06%)	1 (1,56%)	3 (3,09%)
Allelfrequenz G	0,125 (7/56)	0,148 (16/108)	0,140 (23/164)	0,227 (15/66)	0,172 (22/128)	0,191 (37/194)
Allelprävalenz G	0,214 (6/28)	0,204 (11/54)	0,207 (17/82)	0,394 (13/33)	0,328 (21/64)	0,351 (34/97)
P-Wert (der Genotypen in Bezug auf das Normalkollektiv)	0,251	0,255	0,192	0,164	0,061	0,051

¹ < 3 COPD-bedingte Hospitalisierung im vorausgegangenen Kalenderjahr

² \geq 3 COPD-bedingte Hospitalisierung im vorausgegangenen Kalenderjahr

Tab. 7: Genotypverteilung des COPD-Kollektivs unterteilt in Verlaufsformen, Allelfrequenz, Prävalenz und p-Wert des TGF- β 2 (59941 A/G rs1891467) – Polymorphismus (dargestellt sind jeweils die Absolutwerte bzw. Prozentsätze der diskreten Variablen)

Nach Differenzierung des COPD-Gesamtkollektiv nach Verlaufsformen (stabil und instabil), konnten die Subgruppen ebenfalls dem Kontrollkollektiv gegenüber gestellt werden. Auch hier zeigt sich in beiden Subgruppen ein deutliches Überwiegen des homozygoten Wildtypen (A/A). Während sich in der Gruppe der stabilen Verlaufsform mit einem p-Wert von 0,192 und auch nach Aufteilung des Kollektivs nach dem Geschlecht keine Signifikanz erkennen lässt, zeichnet sich bei einem p-Wert von 0,051 bei Patienten mit einer stabilen Verlaufsform ein deutlicher Trend ab. Der homozygote Mutant (G/G) ist hierbei mit nur 3,09 % vertreten, den homozygoten Wildtypen hingegen weisen 64,95 %

der Patienten auf. Die weitere geschlechtsspezifische Unterteilung ergibt keine weiteren Signifikanzen.

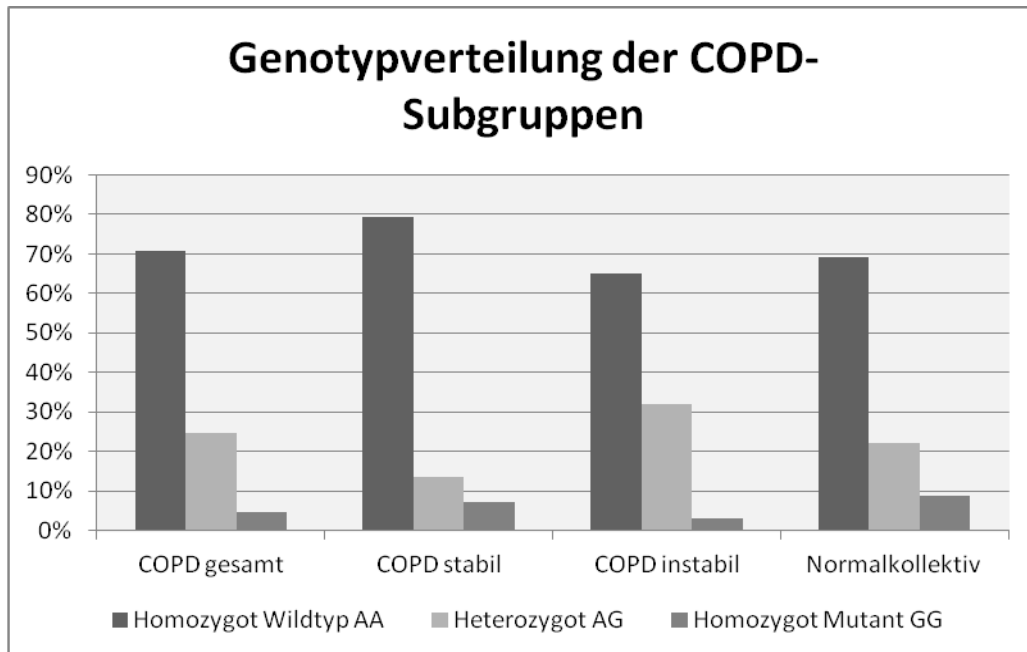


Abb. 10: Graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung des TGF- β 2 (59941 A/G rs1891467) Polymorphismus: COPD-Gesamtkollektiv vs. COPD-Subgruppen vs. Kontrollkollektiv

Zur Untersuchung möglicher geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Genotypverteilung wurden die betrachteten Kollektive dem Merkmal Geschlecht nach differenziert. Nach Aufteilung des Normalkollektivs in Männer und Frauen konnte die Genotypverteilung zwischen den Geschlechtern im Normalkollektiv untersucht werden, um geschlechtsspezifische Verteilungsunterschiede bereits bei Gesunden zu erkennen. Ein P-Wert von 0,915 zeigt ein nahezu identisches Genotypverteilungsmuster. Für das COPD-Kollektiv ergab sich nach derselben Differenzierung ein p-Wert von 0,763. Vergleicht man das weibliche COPD-Kollektiv mit dem weiblichen Kontrollkollektiv ergibt sich bei einem p-Wert von 0,428 ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Auch für die männlichen Kohorten lässt sich keine Signifikanz nachweisen (p-Wert = 0,469). Die Allelprävalenz für das Mutationsallel G liegt bei Männern mit 28 % und Frauen 31,5 % ebenso eng beieinander.

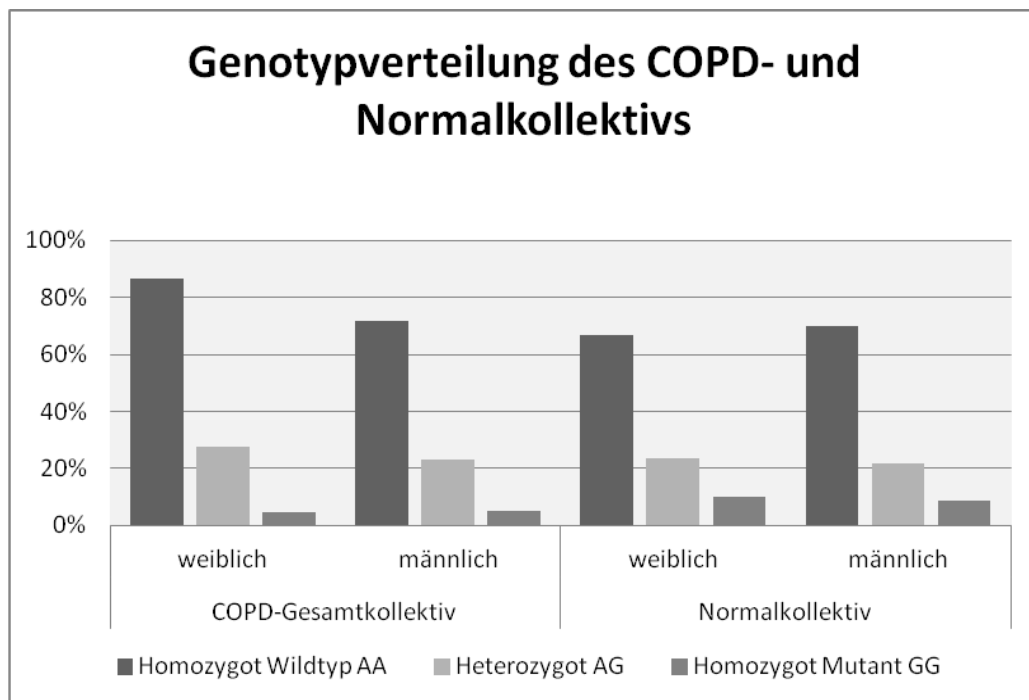


Abb. 11: Graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung des TGF- β 2 (59941 A/G rs1891467) Polymorphismus: COPD-Gesamtkollektiv vs. Kontrollkollektiv aufgeteilt nach Geschlecht

Eine spezifische Betrachtung der Kollektive mit Patienten mit höchstens 25 „pack years“ in der Anamnese und einem Alter von mindestens 45 Jahren zeigen Tabelle 8 und Abbildung 12. Hier ergab sich zunächst eine ähnliche Verteilungen für den homozygoten Wildtyp sowie für den heterozygoten Mutationstypen. Während der homozygote Wildtyp bei 64,41 % der COPD- und bei 69,09 % der Kontrollpersonen auftritt, ist der heterozygote Mutationstyp mit 33,9 % (COPD-Patienten) bzw. 19,09 % (Normalkollektiv) vertreten. Die Gegenüberstellung dieser beiden Gruppen zeigt weiter mit einer Signifikanz von 0,015 ein Überwiegen des homozygoten Mutationstyps mit 11,82 % unter den Normalpersonen mit im Vergleich 1,69 % des COPD-Kollektivs.

		COPD-Patienten	Normalpersonen
	169	59	110
TGF-β2 (59941 A/G rs1891467)	Homozygot Wildtyp AA	38 (64,41%)	76 (69,09%)
	Heterozygot AG	20 (33,9%)	21 (19,09%)
	Homozygot Mu- tant GG	1 (1,69%)	13 (11,82%)
	Allelfrequenz G	0,186 (22/118)	0,214 (47/220)
	Allelprävalenz G	0,356 (21/59)	0,309 (34/110)
	P-Wert	0,015	

Tab. 8: Teilnehmer des COPD-Gesamtkollektivs und des Normalkollektivs mit ≤ 25 „pack years“ in der Anamnese und ≥ 45 Jahre: Genotypverteilung, Allelfrequenz, Prävalenz und p-Wert des TGF-β2 (59941 A/G rs1891467) – Polymorphismus

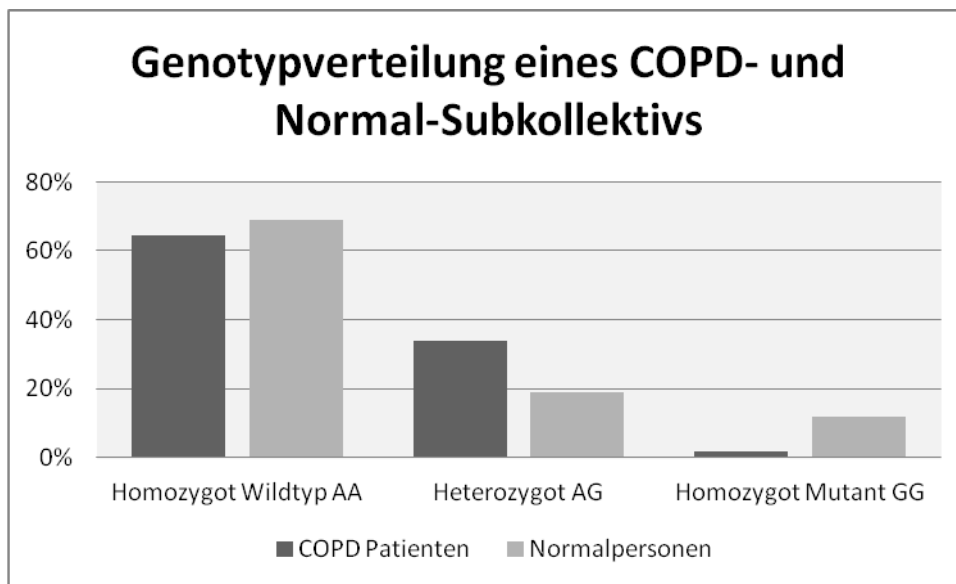


Abb. 12: Graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung des TGF- β 2 (59941 A/G rs1891467) Polymorphismus: Teilnehmer des COPD-Gesamtkollektivs und des Normalkollektivs mit ≤ 25 „packyears“ in der Anamnese und ≥ 45 Jahre

5. Diskussion

Basierend auf der Überlegung, dass die Gründe für die Erkrankung an einer COPD bis heute nicht hinreichend verstanden sind, untersucht die vorliegende Studie einen möglichen genetischen Hintergrund. Hierzu wurde der TGF- β 2 59941 A/G Polymorphismus, der in Zusammenhang mit Lungenfibrose und einem „remodeling“ der Lunge steht, auf seinen potentiellen Einfluss auf die Entstehung einer COPD durchleuchtet.

Bei dem in dieser Studie untersuchten Kollektiv handelt es sich nicht um ein „real-life Kollektiv“, wie es sich beispielsweise in deutschen Hausarztpraxen findet. Auch ist eine Einteilung im Rahmen der neuen GOLD-Richtlinien von 2011 auf Grund fehlender Daten rückwirkend nicht möglich. Eine solche Einordnung wäre zur Untersuchung weiterer definierter Untergruppen sinnvoll gewesen. Zudem zeichnet sich das Kontrollkollektiv durch einen deutlich niedrigeren Tabakkonsum aus. Dieses Problem spiegelt sich auch in anderen Studien wie beispielsweise der genomweiten Assoziationsstudie von Pillai et al. (2009) wieder. Auch hier weisen die Kontrollgruppen einen eindeutig niedrigeren Tabakkonsum auf (beispielsweise 19,4 zu 31,83 „pack years“). Insgesamt handelt es sich in dieser Studie jedoch um ein gutes, ausgewogenes Kollektiv mit adäquaten Fallzahlen. Auch die demographischen Daten weisen nur marginale Differenzen auf. Dies stellt die Voraussetzung für eine gute Vergleichbarkeit der beiden Gruppen dar. TGF- β 2 „Expressionlevel“ wurden für diese Studie nicht bestimmt. Auch das wäre rückblickend durchaus sinnvoll gewesen.

Für den in dieser Studie untersuchten TGF- β 2 59941 A/G Polymorphismus konnte eine signifikante Assoziation zwischen einer definierten Untergruppen nachgewiesen werden. Diese Untergruppe umfasst Patienten mit einem Alter von mindestens 45 Jahren und einem Maximum von 25 „pack years“ in der Raucheranamnese. Mit einem p-Wert von 0,015 zeigt sich in der Gegenüberstellung ein mit 11,8 % deutliches Überwiegen des homozygoten Mutationstypen (G/G) unter den Kontrollpersonen im Vergleich zu den COPD-Patienten (1,7 %). Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass dem TGF- β 2 G/G Genotyp des untersuchten Polymorphismus möglicherweise im Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf bei COPD-Patienten als Baustein eines multifaktoriellen Geschehens eine protektive Funktion zukommen könnte. Die Anzahl der „pack years“ wurde hierbei willkürlich gewählt. Es gibt jedoch Studien die beispielsweise das Rauchverhal-

ten in Bezug auf Nierentransplantationen (Kasiske und Klinger, 2000) oder die Entwicklung eines metabolischen Syndroms (Ge et al., 2012) untersucht haben, welche ebenfalls mit einer Grenze von 25 „pack years“ arbeiteten. Es zeigten sich ansonsten keine weiteren Assoziationen zwischen bestimmten Phänotypen und dem TGF- β 2 59941 A/G Polymorphismus. Es konnte eine ähnliche Frequenzverteilung des Polymorphismus im COPD-Gesamtkollektiv und im Kontrollkollektiv nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen dem untersuchten Polymorphismus und den im Voraus untersuchten Variablen wie Lungenfunktionswerte, Geschlecht, Alter sowie Raucherstatus konnte nicht festgestellt werden. Des Weiteren zeigte die vorliegende Untersuchung keinen signifikanten Einfluss des TGF- β 2 59941 A/G (rs1891467)-Polymorphismus auf einen stabilen oder instabilen Verlauf. Unsere Ergebnisse zeigten mit einem p-Wert von 0,051 lediglich einen Trend im Zusammenhang von Polymorphismus und einem instabilen Krankheitsverlauf. Es zeigen sich jedoch insgesamt nur geringe Abweichungen bei der Allelfrequenz des G-Allels und der Genotypverteilung in den COPD- und Kontrollkollektiven. Auch der Vergleich von Patienten mit einem stabilen bzw. instabilen Verlauf untereinander weist eine ähnliche Genotypverteilung auf.

Bisher wurde ein Zusammenhang des beschriebenen Polymorphismus mit der Entwicklung einer COPD in keiner veröffentlichten Studie untersucht. Eine Assoziation des TGF- β 2-Polymorphismus mit chronischen, entzündlichen Erkrankungen wie Asthma (Bottoms et al., 2010) oder Sarkoidose (Pabst et al., 2011) konnte jedoch in anderen Arbeiten aufgezeigt werden. Dies spricht für eine Beteiligung von TGF- β 2 an der Modulation chronischer Entzündungsprozesse.

TGF- β wird von bronchoepithelialen Zellen sezerniert und reguliert unter Anderem die Bildung der extrazellulären Matrix, Zellwachstum und -reifung (Arinir et al., 2009). In Mausmodellen konnte durch eine mangelnde Aktivierung von TGF- β und der konsekutiven Entwicklung eines Lungenemphysems eine mögliche protektive Funktion von TGF- β aufgezeigt werden (Morris et al., 2003). Im TGF- β -Gen gehen zwei der bisher untersuchten SNPs mit einer Erhöhung des TGF- β -Spiegels einher (\pm 509, C/T und + 613, C/T). Der erste SNP verstärkt die Promotorfunktion (Grainger et al., 1999), der zweite SNP wirkt über einen Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz (Leu613Pro) (Suthanthiran et al., 2000).

Die bisherigen Untersuchungen im Rahmen der TGF-Familie in Zusammenhang mit der COPD konzentrierten sich vor Allem auf TGF- β 1. Eine neuseeländische Studie von Wu et al. diskutierte 2004 einen protektiven Effekt des Prolin-Allels mit häufigerem Vorkommen bei Kontrollpersonen im Vergleich zu COPD-Patienten. Bei dieser Studie wurde eine Genotypisierung eines TGF- β 1 Polymorphismus (T869C) durchgeführt. Eine 2010 von Liu et al. veröffentlichte Studie untersucht den 869T/C Polymorphismus im TGF- β 1-Gen in einem Kollektiv chinesischer Herkunft. Sie zeigten eine signifikante Assoziation zwischen dem C-Allel und der Erkrankung an einer COPD, wobei der homozygote Wildtyp C/C des TGF- β 1-869T/C Polymorphismus ein prädisponierender Faktor für die Entwicklung einer COPD sein könnte. Celedon et al. (2004) stellten in der Boston early-onset COPD-Studie eine Assoziation zwischen drei TGF- β 1 SNPs (rs2241712, rs1800469 in der Promoterregion und rs1982073 im Exon 1) und COPD-Patienten kaukasischer Herkunft dar. Im Gegenzug konnte eine Studie von van Diemen et al. 2006 beobachten, dass der TGF- β 1 SNP rs6957 mit einer COPD assoziiert ist, eine Assoziation mit den anderen beiden SNPs (rs1800469 und rs1982073) und der COPD konnte bei Kaukasiern niederländischer Herkunft nicht reproduziert werden.

Im Rahmen der COPD kommt es zu einem sogenannten „remodeling“ der Atemwege, wobei es sich um eine unmittelbare Folge der mit der COPD einhergehenden Entzündungsreaktion handelt. Dies wiederum führt zu einer Verengung der Atemwege. Als Hauptfaktoren tragen hierzu eine peribronchiale Fibrose, die Ausbildung von Narbengewebe im Anschluss an eine Gewebeschädigung in den Atemwegen und eine gesteigerte Teilungsrates des respiratorischen Epithels bei (Chung, 2005). Somit spielen Fibrosierungsprozesse auch bei einer Erkrankung an einer COPD eine Rolle. Der in dieser Studie untersuchte TGF- β 2 (59941 A/G rs1891467) Polymorphismus wurde ebenfalls in einer Arbeit von Pabst et al. (2011) im Zusammenhang mit Fibrosierungsprozessen im Rahmen der Sarkoidose erforscht. Die Studie kommt zu dem Ergebnis, dass der 59941 A/G (rs1891467) Polymorphismus im TGF- β 2 Gen bei vorhandener Mutation auch hier eine protektive Funktion haben könnte.

In bisherigen Studien konnten erhöhte Raten von Wachstumsfaktoren, vor Allem auch TGF- β , in aus fibrotischen Lungen isolierten Fibroblasten im Vergleich zu gesundem Lungengewebe nachgewiesen werden. Hierbei wurden Expressionslevel von TGF- β be-

stimmt. Durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Auslösung von Entzündungskaskaden, kommt es zu einer bindegewebigen Umstrukturierung des Lungengewebes. Neben der Sarkoidose hat der Wachstumsfaktor auch bei Erkrankungen wie der Idiopathischen Lungenfibrose, der Bronchopulmonalen Dysplasie, der Systemischen Sklerose oder der Rheumatoiden Arthritis einen großen Einfluss auf bestehende Fibrosierungsprozesse (Krein und Winston, 2002). Schon 1997 konnten Coker et al., in einer *in vitro* Studie zeigen, dass durch eine Fibroblastenstimulation und der folgenden Prokollagensynthese alle drei TGF- β Isoformen zu einer Fibrosierung beitragen können. In der selben Studie konnte eine deutlich variierende Potenz der drei Isoformen nachgewiesen werden. Laut Coker et al. ist TGF- β 3 zehn Mal potenter als die beiden anderen Isoformen.

In einer Studie von 2006 untersuchten Garrett et al. die modulierende Rolle von TGF- β 2 auf die Homöostase der subepithelialen, extrazellulären Matrix mittels eines *in vitro* Modells des Bronchialepithels und des darunter liegenden Mesenchyms. Die Ergebnisse zeigen, dass der Wachstumsfaktor die Expression des Proteins Tenascin-C, welches Bestandteil der extrazellulären Matrix ist und deren Zellfunktion und Aufbau beeinflusst, und die Organisation der Kollagenbestandteile der Zellmatrix reguliert. Zudem konnten sie eine um etwa das doppelte gesteigerte TGF- β 2-Konzentration bei einer Verletzung des Bronchialepithels demonstrieren.

In einer 2000 erschienenen Arbeit untersuchten Liu et al. den Einfluss der drei Wachstumsfaktoren auf die frühe Verzweigung des Lungenepithels bei Ratten. In den angelegten Kulturen resultierte eine Hemmung von TGF- β 2 aber nicht von β 1 oder β 3 in einer signifikanten Inhibition der Verzweigung von Lungenepithel. Wurden anschließend wieder geringe Mengen von exogenem TGF- β 2 hinzugegeben, hob sich dieser Effekt wieder auf. Zu hohe Konzentrationen hatten wiederum einen weiteren hemmenden Effekt. Die Studie konnte zudem zeigen, dass TGF- β 2 die mesenchymale Hyaluronsynthese vermindert.

Howat et al. (2002) hingegen untersuchte die drei Isoformen β 1, β 2 und β 3 der TGF-Superfamilie im Rahmen der Wundheilung des Bronchialepithels. Die Wachstumsfaktoren wurden zuvor umfangreich im Zusammenhang mit der Wundheilung der Haut untersucht, wobei im Gegensatz zu TGF- β 3, TGF- β 1 und TGF- β 2 durch ihre profibrotische Funktion zu einer schnelleren Wundheilung, jedoch auch zu einer zunehmenden Narbenbildung

führen. Durch Addition neutralisierender Antikörper von TGF- β 1 und TGF- β 2 reduzierte sich der Narbenanteil bei der dermalen Wundheilung (Shah et al., 1995). Während der Wundheilung des Bronchialepithels hingegen werden aktive Formen von TGF- β 1 und β 2 produziert. Ausschließlich TGF- β 1 führt jedoch zu einer Beschleunigung epithelialer Reparaturvorgänge (Howat et al., 2002). Das Gleichgewicht der drei Isoformen des Wachstumsfaktors in der Wundheilung wurde auch von O’Kane und Ferguson (1997) untersucht. Sie reduzierten die Fibrosierung durch eine manipulative Reduktion von TGF- β 1 und TGF- β 2, beispielsweise durch Antikörper. Gleichzeitig zeigten sie einen inhibitorischen Effekt von TGF- β 3 auf TGF- β 1 und auf die Extrazellulärmatrixproduktion auf. Somit scheint das Gleichgewicht der drei Isoformen eine wichtige Rolle in der Wundheilung und der damit verbundenen Fibrosierung zu spielen.

Bei einer Erkrankung an Asthma spielt – wie bei der COPD – die Inflammation der Luftwege eine bedeutende Rolle. Erhöhte NO-Werte in der Atemluft erkrankter Personen gelten als potentielle Biomarker für die Inflammation (Kharitonov, 1994). Die Freisetzung von NO aus Epithelzellen der Atemorgane erfolgt durch proinflammatorische Stimuli und Zytokine wie IL-13, TNF- α oder IFN- γ . Zusätzlich kommt es auch hier zu einem „remodeling“ der Luftwege – hierbei handelt es sich um strukturelle Veränderungen der Zellwände durch Zellproliferationen und Kollagensynthese. TGF- β 2 gilt als nachgewiesener Mediator beider biologischer Vorgänge. Der Wachstumsfaktor stimuliert außerdem die Kollagensynthese in Fibroblasten, so dass es zu einer subepithelialen Fibrose kommt. Zusätzlich steigert TGF- β 2 die Expression und Aktivität der Arginase I, welche wiederum zu einer Verminderung der Zytokin induzierten NO Produktion führt (Jiang und George, 2011). Somit spielt TGF- β 2 auch im Zusammenhang mit NO induzierter Inflammation eine protektive Rolle.

Insgesamt scheint TGF- β 2 im Rahmen von Fibrosierungsprozessen und der Inflammation protektive Funktionen zu übernehmen. Der Einfluss von TGF- β 2 ist jedoch vom Verhältnis der Isoformen zueinander abhängig, so dass hier noch weitere Forschungsarbeit von Nöten ist.

Seitdem 2005 die erste genomweite Assoziationsstudie (GWAS, engl. genome-wide association study) veröffentlicht wurde, konnte sich diese Methode als eine sinnvolle Strategie zur Untersuchung der genetischen Basis komplexer Krankheiten durchsetzen

(Todd et al., 2011). Es handelt sich hierbei um epidemiologische Untersuchungen der genetischen Variation des menschlichen Genoms. Ziel dieser Studien ist es, einen bestimmten Phänotyp (meist eine Krankheit) mit bestimmten Allelen (bzw. Haplotypen, also der Kombination verschiedener Allele) zu assoziieren. In den durchgeführten Analysen wird mittels DNA-Proben nach Unterschieden in der Variation zwischen den Gruppen mit erkrankten und gesunden Probanden gesucht. Tritt eine Häufung eines bestimmten Markers in der Gruppe des Phänotyps von Interesse auf, stellt dies eine Assoziation dar. GWAS ermöglichen somit die Untersuchung des gesamten Genoms auch bei sehr großer Probandengruppen (mehrere Tausend), so dass es hierbei zu sehr aussagekräftigen Ergebnissen kommt. Bis 2011 konnten drei dieser Assoziationsstudien prädisponierende Loci in Zusammenhang mit der Erkrankung an einer COPD ausmachen. Zwei Studien (Pillai et al., 2009; Cho et al., 2010) verglichen COPD-Patienten mit rauchenden Kontrollpersonen mit normaler Lungenfunktion nordeuropäischer Herkunft. Die Größe der Kohorten variierte bei Pillai et al. (2009) zwischen 127 bis 823 COPD-Patienten und 472 bis 822 Kontrollpersonen, während Cho et al. (2010) 2940 erkrankte mit 1380 gesunden Personen verglichen. Zu erwähnen ist, dass sich in der Studie von Pillai et al. alle untersuchten Kontrollgruppen im Vergleich zu den COPD-Patienten durch einen deutlich niedrigeren Tabakkonsum auszeichnen. In beiden Arbeiten konnten SNPs im Chromosom 15 identifiziert werden. Neben dem CHRNA3-5 (cholinergic nicotine receptor alpha 3-5) Locus, welches zuvor bereits mit dem Rauchverhalten assoziiert wurde (Thorgeirsson, 2008), und IREB2 (Iron-Responsive Element-Binding Protein 2) konnte in der größeren Studie von Cho et al. auch FAM13A als potentieller Kandidatengen aufgezeigt werden (Todd et al., 2011). Auch neueste Arbeiten von Siedlinsky et al. (2011) zeigten eine bestehende Assoziation zwischen CHRNA3/CHRNA5 und dem Rauchverhalten. Bei CHRNA3/5 handelt es sich zudem um den selben Locus, der auch mit dem Risiko an einem Lungenkarzinom zu erkranken in Verbindung gebracht werden konnte (Amos et al., 2008). Zusätzlich konnten Pillai et al. eine Assoziation zwischen CHRNA3/5 und dem FEV₁-Wert darstellen. Die dritte veröffentlichte GWAS im Zusammenhang mit der COPD von Kong et al. (2011) untersuchte über 2500 Probanden europäischer Herkunft und konnte BICD1 als weiteres Kandidatengen identifizieren. Die Ergebnisse der Studie suggerieren eine Assoziation zwischen genetischen Abweichungen bei BICD1 und der Pathogenese von Emphysemen. Abweichungen im ersten

Intron des BICD1-Gens sind mit Telomerlängen assoziiert, was wiederum zu einem beschleunigten Alterungsprozess führt. Ein Zusammenhang mit der Bildung einer Fibrose oder dem „remodeling“ des Lungengewebes konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Abschließend zeigt sich, dass die genetische Seite der multifaktoriellen Erkrankung COPD weitere Forschungen benötigt. Im weiteren Verlauf wäre es durchaus sinnvoll TGF- β 2 im Zusammenhang mit der COPD in weiteren Studien mit größeren Kollektiven, bestehend aus Patienten unterschiedlicher Ethnizität, erneut zu untersuchen. Zudem ist eine Bestimmung der Protein- bzw. mRNA-Level der Isoformen aus BAL (bronchoalveoläre Lavage) oder Blut wichtig. Eine Expressionsanalyse könnte unter anderem das quantitative Verhältnis der verschiedenen Isoformen zueinander und die daraus entstehenden möglichen Hemm- und Potenzierungsmechanismen der Isoformen untereinander darstellen. Die unterschiedlichen Spiegel der Isoformen im epithelialen Lungengewebe könnten so mit ihrer jeweiligen Funktion in Zusammenhang gebracht werden. Eine weitere offene Frage ist, inwieweit auch das Verhältnis der verschiedenen Entzündungsmediatoren, welche die bei der COPD entstehende inflammatorische Reaktion hervorrufen, einen Einfluss auf die Expression von TGF- β 2 ausübt. Neben diesem funktionellen Ansatz sind außerdem weitere Genotyp-Phänotyp-Untersuchungen notwendig.

Ziel der Identifizierung potentieller Kandidatengene, die die Entstehung einer COPD verhindern oder fördern, ist eine genetische Testung aller Patienten sowie die Entwicklung neuer Therapieansätze. Sollten weitere Studien zu ähnlichen Ergebnissen kommen wie die vorliegende Arbeit, wäre eine genetische Testung von COPD Patienten, die die entsprechenden Kriterien erfüllen, sinnvoll.

6. Zusammenfassung

Bei der COPD handelt es sich um eine Erkrankung der Lunge, welche mit einer nicht reversiblen Beeinträchtigung der Lungenfunktion einhergeht. Neben dem Rauchen als wichtigster Risikofaktor und dem genetischen α_1 -Antitrypsinmangel ist die Ätiologie der COPD weitestgehend ungeklärt. Nach heutigem Wissenstand tragen Umwelteinflüsse und genetische Dispositionen gleichermaßen zur Entstehung dieser multifaktoriellen Erkrankung bei.

Ziel dieser Arbeit war es einen möglichen Zusammenhang des 59941 A/G (rs1891467) Einzelnukleotid-Polymorphismus des TGF- β 2 Gens mit der Entwicklung einer COPD darzustellen. Der Polymorphismus wurde hinsichtlich seines Einflusses auf die Entstehung der Erkrankung sowie auf den Krankheitsverlauf untersucht. TGF- β 2 wurde bislang im Rahmen der COPD in keiner veröffentlichten Studie erforscht. Das in dieser Arbeit verwendete Kollektiv formierte sich aus insgesamt 212 Patienten mit einer klinisch gesicherten Diagnose sowie einem Kontrollkollektiv bestehend aus 213 Personen, die dem Patientenkollektiv in Alter, Geschlecht, ethnischer Herkunft und Rauchgewohnheiten angepasst wurden. Ein α_1 -Antitrypsin-Mangel wurde bei allen Patienten dieser Studie ausgeschlossen. Alle Teilnehmer wurden für den 59941 A/G (rs1891467) Polymorphismus genotypisiert. Assoziationsanalysen ergaben keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der erkrankten zu gesunden Probanden. Auch auf einen stabilen bzw. instabilen Verlauf scheint der beschriebene Polymorphismus keinen Einfluss zu haben. Hier zeichnet sich bei Patienten mit einem instabilen Verlauf lediglich ein Trend ab. Mit einem p-Wert von 0,015 zeigte sich in einer definierten Untergruppe mit einem Maximum von 25 „pack years“ und einem Alter von mindestens 45 Jahren eine Signifikanz. Hierbei war das Vorkommen des homozygoten Wildtyps bei gesunden Patienten im Vergleich zu COPD-Patienten deutlich höher. Vor dem Hintergrund der hier erarbeiteten Daten kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der 59941 A/G (rs1891467) Polymorphismus im TGF- β 2 Gen, als Teil eines multifaktoriellen Geschehens, bei vorhandener Mutation bei Patienten mit nicht mehr als 25 „pack years“ in der Raucheranamnese eine protektive Funktion haben könnte. Die Rolle des 59941 A/G (rs1891467) Polymorphismus sowie Expressionslevel der Isoformen sollten in Zukunft in weiteren groß angelegten Studien weiter untersucht werden.

7. Literaturverzeichnis

Agusti A, Soriano JB. COPD as a systemic disease. *COPD* 2008; 5: 133–138

Albert RK, Connett J, Bailey WC, Casaburi R, Cooper JA Jr, Criner GJ, Curtis JL, Dransfield MT, Han MK, Lazarus SC, Make B, Marchetti N, Martinez FJ, Madinger NE, McEvoy C, Niewoehner DE, Porsasz J, Price CS, Reilly J, Scanlon PD, Sciurba FC, Scharf SM, Washko GR, Woodruff PG, Anthonisen NR; COPD Clinical Research Network. Azithromycin for prevention of exacerbations of COPD. *N Engl J Med* 2011; 365: 689–698

Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, Dong Q, Zhang Q, Gu X, Vijayakrishnan J, Sullivan K, Matakidou A, Wang Y, Mills G, Doheny K, Tsai YY, Chen WV, Shete S, Spitz MR, Houlston RS. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet* 2008; 40: 616–622

Anto JM, Vermeire P, Vestbo J, Sunyer J. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001; 17: 982-994

Anthonisen NR, Connett JE, Enright PL, Manfreda J. Hospitalizations and mortality in the Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 333-339

Anthonisen NR, Skeans MA, Wise RA, Manfreda J, Kanner RE, Connett JE. Lung Health Study Research Group. The effects of a smoking cessation intervention on 14.5-year mortality: a randomized clinical trial. *Ann Intern Med* 2005; 142: 233-239

Arinir U, Hoffjan S, Knoop H, Schultze–Werninghaus G, Epplen JT, Rohde G. Zur Genetik der chronisch–obstruktiven Lungenerkrankung. *Pneumologie* 2009; 63: 41-48

Aubert, J.D., Dalal, B.I., Bai, T.R., Roberts, C.R., Hayashi, S., and Hogg, J.C. Transforming growth factor beta 1 gene expression in human airways. *Thorax* 1994; 49: 225-232

Balzar S, Chu HW, Silkoff P, Cundall M, Trudeau JB, Strand M, and Wenzel S. Increased TGF-beta2 in severe asthma with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 110–117

Barker DJ, Godfrey KM, Fall C, Osmond C, Winter PD, Shaheen SO. Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive pulmonary disease. *BMJ* 1991; 303: 671-675

Barnes PJ. Reduced histone deacetylase in COPD: clinical implication. *Chest* 2006; 129: 151-155

Barnes PJ. Emerging pharmacotherapies for COPD. *Chest* 2008 a; 134: 1278–1286

Barnes PJ. Frontrunners in novel pharmacotherapy of COPD. *Curr Opin Pharmacol* 2008 b; 8: 300-307

Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2009; 33: 1165–1185

Beeth KM, Kornmann O, Buhl R, Culpitt SV, Giembycz MA, Barnes PJ. Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: role of interleukin 8 and leukotriene B4. *Chest* 2003; 123: 1240-1247

Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbation of COPD. *Thorax* 2003; 58: 294-298

Bottoms SE, Howell JE, Reinhardt AK, Evans IC, McAnulty RJ. TGF- β Isoform Specific Regulation of Airway Inflammation and Remodelling in a Murine Model of Asthma. *PLoS ONE* 2010; 5: e9674

Broekhuizen BDL, Sachs APE, Hoes AW, Verheij TJM, Moons KGM. Diagnostic management of chronic obstructive pulmonary disease. *Neth J Med* 2012; 70: 6-11

Brown CB, Boyer AS, Runyan RB, Barnett JV. Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* 1999; 283: 2080–2082

Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AM, Sullivan SD, Lee TA, Weiss KB, Jensen RL, Marks GB, Gulsvik A, Nizankowska-Mogilnicka E; BOLD Collaborative Research Group. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD-Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 2007; 370: 741–750

Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; 67: 1033-1036

Calverley PM, Pauwels R, Vestbo J et al. Combined salmeterol and fluticasone in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003 a; 361: 449-456

Calverley PM, Boonsawat W, Cseke Z, Zhong N, Peterson S, Olsson H. Maintenance therapy with budesonide and formoterol in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003 b; 22: 912-919

Carter JD, Patel S, Sultan FL, Thompson ZJ, Margaux H, Sterrett A, Carney G, Murphy N, Huang Y, Valeriano J, Vasey FB. The recognition and treatment of vertebral fractures in males with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2008; 102: 1165–1172

Cassivi SD, Meyers BF, Battafarano RJ, Guthrie TJ, Trulock EP, Lynch JP, Cooper JD, Patterson GA. Thirteen-year experience in lung transplantation for emphysema. *Ann Thorac Surg* 2002; 74: 1663-1669

Celedón JC, Lange C, Raby BA, Litonjua AA, Palmer LJ, DeMeo DL, Reilly JJ, Kwiatkowski DJ, Chapman HA, Laird N, Sylvia JS, Hernandez M, Speizer FE, Weiss ST, Silverman EK. The transforming growth factor-beta1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1649-1656

Cho MH, Boutaoui N, Klanderman BJ, Sylvia JS, Ziniti JP, Hersh CP, DeMeo DL, Hunninghake GM, Litonjua AA, Sparrow D, Lange C, Won S, Murphy JR, Beaty TH, Regan EA, Make BJ, Hokanson JE, Crapo JD, Kong X, Anderson WH, Tal-Singer R, Lomas DA, Bakke P, Gulsvik A, Pillai SG, Silverman EK. Variants in FAM13A are associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Genet* 2010; 42: 200–202

Chung KF. The role of airway smooth muscle in the pathogenesis of airway remodelling in COPD. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 347-354

Cichon S, Freudenberg J, Propping P, Nöthen MM. Variabilität im menschlichen Genom. *Dtsch Ärztebl* 2002; 46: 3091-3101

Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S, Hernandez-Rodriguez NA, Pantelidis P, du Bois RM, Jeffery PK, McAnulty RJ. Diverse cellular TGF-beta 1 and TGF-beta 3 gene expression in normal human and murine lung. *Eur Respir J* 1996; 9: 2501–2507

Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S, Lympny PA, du Bois RM, Jeffery PK, McAnulty RJ. Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Pathol* 1997; 150: 981-991

Cooper JD, Trulock EP, Triantafillou AN, Patterson GA, Pohl MS, Deloney PA, Sundaresan RS, Roper CL. Bilateral pneumectomy (volume reduction) for chronic obstructive pulmonary disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 109: 106-116

Curkendall SM, Lanes S, de Luise C, Stang MR, Jones JK, She D, Goehring E Jr. Chronic obstructive pulmonary disease severity and cardiovascular outcomes. *Eur J Epidemiol* 2006; 21: 803–813

D'Abronz FH, Swearingen B, Klibanski A, Alexander JM: Mutational Analysis of Activin/Transforming Growth Factor β Type I and II Receptor Kinases in Human Pituitary Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1716-1721

Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, Aarts LP, Wielders PL, van Herwaarden CL, Bast A. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 813-816

DeMeo DL, Celedon JC, Lange C, Reilly JJ, Chapman HA, Sylvia JS, Speizer FE, Weiss ST, Siverman EK. Genome-wide linkage of forced mid-expiratory flow in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 170: 1294-1301

Dransfield MT, Davis JJ, Gerald LB, Bailey WC. Racial and gender differences in susceptibility to tobacco smoke among patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2006; 100: 1110–1116

Fabbri LM, Luppi F, Beghe B, Rabe KF. Complex chronic comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2008; 31: 204-212

Fletcher C, Peto R, Tinker R, Speizer FE. *The Natural History of Chronic Bronchitis and Emphysema*. Oxford: Oxford University Press, 1976

Fletcher C, Peto R. The natural history of COPD. *BMJ* 1977: 1645-1648

Fletcher C. Chronic lung disease in the sleep apnea syndrome. *Lung* 1990; 168: Suppl., 751–761

Gatherer D, Ten Dijke P, Baird DT, Akhurst RJ. Expression of TGF-beta isoforms during first trimester human embryogenesis. *Development* 1990; 110: 445–460

Ge J, Ding Z, Song Y, Wang F. Smoking Dose Modifies the Association between C242T Polymorphism and Prevalence of Metabolic Syndrome in a Chinese Population. *PLoS One* 2012; 7: e31926

Giacomini D, Páez-Pereda M, Theodoropoulou M, Labeur M, Refojo D, Gerez J, Chervin A, Berner S, Losa M, Buchfelder M, Renner U, Stalla GK, Arzt E. Bone morphogenetic protein-4 inhibits corticotroph tumor cells: involvement in the retinoic acid inhibitory action. *Endocrinology* 2006; 147: 247-256

Gillum RF. Peripheral leukocyte count and pulmonary function in a national sample of women and men. *Ann Epidemiol* 1991; 1: 525-531

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Updated 2011 <http://www.gold-copd.com> (04.10.2012)

Greulich T, Koczulla AR, Vogelmeier C. Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung. Neue Optionen in der Arzneimitteltherapie. *Internist* 2012; 53: 1364-1375

Grootendorst DC, Gauw SA, Verhoosel RM, Sterk PJ, Hoppers JJ, Bredenbröker D, Bethke TD, Hiemstra PS, Rabe KF. Reduction in sputum neutrophil and eosinophil numbers by the PDE4 inhibitor roflumilast in patients with COPD. *Thorax* 2007; 62: 1081–1087

Hallberg J, Dominicus A, Eriksson UK, Gerhardsson de Verdier M, Pedersen NL, Dahlba M, Nihle U, Higenbottam T, Svartengren M. Interaction between smoking and genetic factors in the development of chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 486–490

Handschin C, Spiegelman BM. The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. *Nature* 2008; 454: 463–469

Hersh C, Dahl M, Ly N, Berkey C, Nordestgaard B, Silverman E. Chronic obstructive pulmonary disease in α_1 -antitrypsin PI MZ heterozygotes: a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59: 843–849

Hill K, Geist R, Goldstein RS, Lacasse Y. Anxiety and depression in end-stage COPD. *Eur Respir J* 2008; 31: 667–677

Hogg JC, Macklem PT, Thurlbeck WM. Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1968; 278: 1355-1360

Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004; 364: 709–721

Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The nature of small-airways obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2645-2653

Howat WJ, Holgate AT, Lackie PM. TGF- β isoform release and activation during in vitro bronchial epithelial wound repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L115-L123

Hunninghake GW, Crystal RG. Cigarette smoking and lung destruction. Accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 833-838

Ito K, Barnes PJ. COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest* 2009; 135: 173-180

Jeffery PK. Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma. *Thorax* 1998; 53: 129-136

Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M. Trends in the leading causes of death in the United States, 1970–2002. *JAMA* 2005; 294: 1255–1259

John M, Lange A, Hoernig S, Witt C, Anker SD. Prevalence of anemia in chronic obstructive pulmonary disease: comparison to other chronic diseases. *Int J Cardiol* 2006; 111: 365–370

Jiang J, George SC. TGF- β_2 reduces nitric oxide synthase mRNA through a ROCK-dependent pathway in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011; 301: L361–L367

Jorgensen NR, Schwarz P. Osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14: 122–127

Kanner RE, Anthonisen NR, Connett JE. Lower respiratory illnesses promote FEV(1) decline in current smokers but not ex-smokers with mild chronic obstructive pulmonary disease: results from the lung health study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 358-364

Kasiske BL, Klinger D. Cigarette smoking in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 753-759

Kennedy SM, Chambers R, Du W, Dimich-Ward H. Environmental and Occupational Exposures. Do they Effect Chronic Obstructive Pulmonary Disease Differently in Men and Women? *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 692-694

Kesten S, Chapman KR. Physician perceptions and management of COPD. *Chest* 1993; 104: 254-258

Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994; 343: 133–135

Klein HG, Rost , 2012: Kopplungsanalysen. <http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=7129> (12.10.2012)

Knipel V, Windisch W, Bayarassou AH. Epidemiologie von Lungenkrankheiten. *Pneumologie* 2012; 9: 321–330

Koczulla AR, Greulich T, Schmid S, Kenn K, Heinzelmann I, Vogelmeier C. COPD-Update, Aktuelle Leitlinien, Informationen und Therapieempfehlungen. *CME* 2012; 9: 64-72

Köhnlein T, Welte T. Alpha-1 antitrypsin deficiency: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and treatment. *Am J Med* 2008; 121: 3-9

Königshoff M, Kneidinger N, Eickelberg O. TGF- β signalling in COPD: deciphering genetic and cellular susceptibilities for future therapeutic regimens. *Swiss Med Wkly* 2009; 139: 554–563

Kong X, Cho MH, Anderson W, Coxson HO, Muller N, Washko G, Hoffman EA, Bakke P, Gulsvik A, Lomas DA, Silverman EK, Pillai SG; ECLIPSE Study NETT Investigators. Genome-wide association study identifies BICD1 as a susceptibility gene for emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 43–49

Krein PM, Winston BW. Roles for insulin-like growth factor I and transforming growth factor-beta in fibrotic lung disease. *Chest* 2002; 122: 289-293

Krishnan G, Grant BJ, Muti PC, Mishra A, Ochs-Balcom HM, Freudenheim JL, Trevisan M, Schünemann HJ. Association between anemia and quality of life in a population sample of individuals with chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulm Med* 2006; 6: 23

Lange CG, Scheuerer B, Zabel P. Akute Exazerbation der COPD. *Internist* 2004; 45: 527–539

Langhammer A, Johnsen R, Gulsvik A, Holmen TL, Bjermer L. Sex differences in lung vulnerability to tobacco smoking. *Eur Respir J* 2003; 21: 1017–1023

Lasky JA, Brody AR. Interstitial fibrosis and growth factors. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 751-762

Liu J, Tseu I, Wang J, Tanswell K, Post M. Transforming growth factor beta2, but not beta1 and beta3, is critical for early rat lung branching. *Dev Dyn* 2000; 217: 343-360

Liu DS, Li XO, Ying BW, Chen L, Wang T, Xu D, Wen FQ. Effects of single nucleotide polymorphisms 869 T/C and 915 G/C in the exon 1 locus of transforming growth factor-beta1 gene on chronic obstructive pulmonary disease susceptibility in Chinese. *Chin Med J (Engl)* 2010; 123: 390-394

Lomas DA, Silverman EK. The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2001, 2: 20–26

Mac JCW. Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12: 368-374

MacNee W, Wiggs B, Belzberg AS, Hogg JC. The effect of cigarette smoking and neutrophil kinetics in human lungs. *N Engl J Med* 1989; 321: 924-928

Mannino DM, Aguayo SM, Petty TL, Redd SC. Low lung function and incident lung cancer in the United States: data From the First National Health and Nutrition Examination Survey follow-up. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1475–1480

Mannino DM, Thorn D, Swensen A, Holguin F Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD. *Eur Respir J* 2008; 32: 962–969

Mapel DW, Hurley JS, Frost FJ, Petersen HV, Picchi MA, Coultas DB. Health care utilization in chronic obstructive pulmonary disease. A case-control study in a health maintenance organization. *Arch Intern Med* 2000; 160: 2653–2658

Martorana PA, Beume R, Lucattelli M, Wollin L, Lungarella G. Roflumilast fully prevents emphysema in mice chronically exposed to cigarette smoke. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 848–853

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988; 16: 1215

Mitchell RS, Filley GF. Chronic obstructive bronchopulmonary disease. I. Clinical features. *Am Rev Respir Dis* 1964; 89: 360-371

Mittman C. The PiMZ phenotype: is it a significant risk factor for the development of chronic obstructive lung disease? *Am Rev Respir Dis* 1978; 118: 649–652

Montes de Oca M, Torres SH, Gonzalez Y, Romero E, Hernández N, Mata A, Tálamo C. Peripheral muscle composition and health status in patients with COPD. *Respir Med* 2006; 100: 1800–1806

Morris DG, Huang X, Kaminski N, Wang Y, Shapiro SD, Dolganov G, Glick A, Sheppard D. Loss of integrin $\alpha(v)\beta6$ -mediated TGF- β activation causes MMP12-dependent emphysema. *Nature* 2003; 422: 169-173

Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin C-H: Smad regulation in TGF- β signal transduction. *J Cell Sci* 2001; 114: 4359-4369

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350

Nici L, Lareau S, ZuWallack. Pulmonary Rehabilitation in the Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am Fam Physician* 2010; 82: 655-660

Niewoehner DE, Kleinermann J, Rice DB. Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers. *N Engl J Med* 1974; 291: 755-758

Nishimura K, Izumi T, Tsukino M, Oga T. Dyspnea is a better predictor of 5-year survival than airway obstruction in patients with COPD. *Chest* 2002; 121: 1434-1440

Nussbaumer-Ochsner Y, Rabe KF. Systemic manifestations of COPD. *Chest* 2011; 139: 165-173

O'Kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 63-78

Oomizu S, Chatrvedi K, Sarkar DK. Folliculostellate cells determine the susceptibility of lactotropes to estradiol's mitogenic action. *Endocrinology* 2004; 145: 1473-1480

Pabst S, Fränken T, Schönau J, Stier S, Nickenig G, Meyer R, Skowasch D, Grohé C. Transforming growth factor- β gene polymorphisms in different phenotypes of sarcoidosis. *Eur Respir J* 2011; 38: 169–175

Palmer LJ, Celedon JC, Chapman HA, Speizer FE, Weiss FT, Silverman EK. Genome-wide linkage analysis of bronchodilator responsiveness and post-bronchodilator spirometric phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Mol Genet* 2003, 12: 1199-1210

Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163: 1256-1276

Pillai SG, Ge D, Zhu G, Kong X, Shianna KV, Need AC, Feng S, Hersh CP, Bakke P, Gulsvik A, Ruppert A, Lødrup Carlsen KC, Roses A, Anderson W, Rennard SI, Lomas DA, Silverman EK, Goldstein DB; ICGN Investigators. A genome-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of two major susceptibility loci. *PLoS Genet* 2009; 5: e1000421

Rabe KF. Update on roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Br J Pharmacol* 2011; 163: 53–67

Rahman I. Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms. *Cell Biochem Biophys* 2005; 43: 167-188

Ram FS. Use of theophylline in chronic obstructive pulmonary disease: examining the evidence. *Curr Opin Pulm Med* 2006; 12: 132–139

Rana JS, Mittleman MA, Sheikh J, Hu FB, Manson JE, Colditz GA, Speizer FE, Barr RG, Camargo CA Jr. Chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 2004; 27: 2478–2484

Redline S, Tishler PV, Rosner B, Lewitter FI, Vandenberg M, Weiss ST, Speizer FE. Genotypic and phenotypic similarities in pulmonary function among family members of adult monozygotic and dizygotic twins. *Am J Epidemiol* 1989; 129: 827-836

Renner U, Paez-Pereda M, Arzt E, Stalla GK. Growth factors and cytokines: function and molecular regulation in pituitary adenomas. *Front Horm Res* 2004; 32: 96-109

Rijcken B, Britton J. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Monogr* 1998; 7: 41–73

Rutten FH, Kramer MJ, Grobbee DE, Sachs AP, Kirkels JH, Lammers JW, Hoes AW. Unrecognized heart failure in elderly patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Heart J* 2005; 26: 1887-1894

Sandford AJ, Weir TD, Paré PD. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1997; 10: 1380–1391

Sandford AJ, Silverman EK. Chronic obstructive pulmonary disease 1: Susceptibility factors of COPD the genotype-environment interaction. *Thorax* 2002, 57: 736-741

Sandford AJ, Joos L, Paré PD. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Med* 2002, 8: 87-94

Schols AM, Soeters PB, Dingemans AM, Mostert R, Frantzen PJ, Wouters EF. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1151-1156

Sciruba FC, Ernst A, Herth FJ, Strange C, Criner GJ, Marquette CH, Kovitz KL, Chiacchierini RP, Goldin J, McLennan G. VENT Study Research Group. A randomized study of endobronchial valves for advanced emphysema. *N Engl J Med* 2010; 363: 1233-1244

Seemungal TA, Donaldson GC, Bhowmik A, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Time course and recovery of exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1608-1613

Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, Maccallum P, Meade TW, Jeffries DJ, Johnston SL, Wedzicha JA. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1618–1623

Shah M, Foreman DM, Ferguson MWJ. Neutralisation of TGF 1 and TGF 2 or exogenous addition of TGF-3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci* 1995; 108: 985–1002

Shorr AF, Doyle J, Stern L, Dolgitsers M, Zilberberg MD. Anemia in chronic obstructive pulmonary disease: epidemiology and economic implications. *Curr Med Res Opin* 2008; 24: 1123–1130

Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, Howard P, Yernault JC, Decramer M, Higenbottam T, Postma TS, Rees J. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease(COPD). The European Respiratory Society Task Force. *Eur Respir J* 1995; 8: 1398-1420

Silverman EK, Mosley JD, Palmer LJ, Barth M, Senter JM, Brown A, Drazen JM, Kwiatkowski DJ, Chapman HA, Campbell EJ, Province MA, Rao DC, Reilly JJ, Ginns LC, Speizer FE, Weiss ST. Genome-wide linkage analysis of severe, early-onset, chronic obstructive pulmonary disease: airflow obstruction and chronic bronchitis phenotypes. *Hum Mol Genet* 2002 a, 11: 623-632

Silverman EK, Palmer LJ, Mosley JD, Barth M, Senter JM, Brown A, Drazen JM, Kwiatkowski DJ, Chapman HA, Campbell EJ, Province MA, Rao DC, Reilly JJ, Ginns LC, Speizer FE, Weiss ST. Genome-wide linkage analysis of quantitative spirometric phenotypes in severe early onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Hum Genet* 2002 b 70: 1229-1239

Simon PM, Schwartzstein RM, Weiss JW, Fencel V, Teghtsoonian M, Weinberger SE. Distinguishable types of dyspnea in patients with shortness of breath. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 1009-1014

Sin D, Wu L, Man SF. The relationship between reduced lung function and cardiovascular mortality: a population-based study and a systematic review of the literature. *Chest* 2005; 127: 1952–1959

Sin D, 2006: COPD und kardiovaskuläres Risiko.

http://www.tellmed.ch/tellmed/Kongresse/Tagungen/Kongressberichte/COPD_und_Komorbidaeten.php (19.01.2009)

Sparrow D, Glynn RJ, Cohen M, Weiss ST. The relationship of the peripheral leukocyte count and cigarette smoking to pulmonary function among adult men. *Chest* 1984; 86: 383-386

Stănescu D, Sanna A, Veriter C, Kostianev S, Calcagni PG, Fabbri LM, Maestrelli P. Airways obstruction, chronic expectoration and rapid decline of FEV₁ in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax* 1996; 51: 267-271

Statistisches Bundesamt. Bevölkerung Deutschlands bis 2050. 10. Koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung 2003, Wiesbaden und Statistisches Bundesamt. Bevölkerung Deutschlands bis 2060. 12. Koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung 2009, Wiesbaden

Statistisches Bundesamt (o J) Todesursachen. Sterbefälle insgesamt 2010 nach den 10 häufigsten Todesursachen der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10)

<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html> (22.10.2012)

Swallow EB, Reyes D, Hopkinson NS, Man WD, Porcher R, Cetti EJ, Moore AJ, Moxham J, Polkey MI. Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2007; 62: 115–120

Tager IB, Rosner B, Tishler PV, Speizer FE, Kass EH. Household aggregation of pulmonary function and chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1976, 114: 485-492

Tager I, Tishler PV, Rosner B, Speizer FE, Litt M. Studies of the familial aggregation of chronic bronchitis and obstructive airway disease. *Int J Epidemiol* 1978, 7: 55-62

Taylor DR, Buick B, Kinney C, Lowry RC, McDevitt DG. The efficacy of orally administered theophylline, inhaled salbutamol, and a combination of the two as chronic therapy in the management of chronic bronchitis with reversible air-flow obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 747-751

The Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. Survival and FEV1 decline in individuals with severe deficiency of alpha1-antitrypsin. The Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 49–59

The National Emphysema Treatment Trial Research Group. Rationale and design of the National Emphysema Treatment Trial. A prospective randomized trial of lung volume reduction surgery. *Chest* 1999; 116: 1750-1761

Theodore L, Lewiston N. Lung transplantation comes of age. *N Eng J Med* 1990; 322: 772-774

Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, Manolescu A, Thorleifsson G, Stefansson H, Ingason A, Stacey SN, Bergthorsson JT, Thorlacius S, Gudmundsson J, Jonsson T, Jakobsdottir M, Saemundsdottir J, Olafsdottir O, Gudmundsson LJ, Bjornsdottir G, Kristjansson K, Skuladottir H, Isaksson HJ, Gudbjartsson T, Jones GT, Mueller T, Gottsäter A, Flex A, Aben KK, de Vegt F, Mulders PF, Isla D, Vidal MJ, Asin L, Saez B, Murillo L, Blondal T, Kolbeinsson H, Stefansson JG, Hansdottir I, Runarsdottir V, Pola R, Lindblad B, van Rij AM, Dieplinger B, Haltmayer M, Mayordomo JI, Kiemenev LA, Matthiasson SE, Oskarsson H, Tyrfingsson T, Gudbjartsson DF, Gulcher JR, Jonsson S, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 2008; 452: 638–642

Tockman MS, Anthonisen NR, Wright EC, Donithan MG. Airways obstruction and the risk for lung cancer. *Ann Intern Med* 1987; 106: 512-518

Todd JL, Goldstein DB, Ge D, Christie J, Palmer SM. The state of genome-wide association studies in pulmonary disease: a new perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 873–880

Troosters T, Probst VS, Crul T, Pitta F, Gayan-Ramirez G, Decramer M, Gosselink R. Resistance training prevents deterioration in quadriceps muscle function during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 1072-1077

van Diemen CC, Postma DS, Vonk JM, Bruinenberg M, Nolte IM, Boezen HM. Decorin and TGF beta 1 polymorphisms and development of COPD in a general population. *Respir Res* 2006; 7: 89

Vogelmeier C, Koczulla R, Fehrenbach H, Bals R. Pathogenese der COPD. *Internist* 2006; 47: 885–894

Vogelmeier C, Buhl R, Criée CP, Gillissen A, Kardos P, Köhler D, Magnussen H, Morr H, Nowak D, Pfeiffer–Kascha D, Petro W, Rabe K, Schultz K, Sitter H, Teschler H, Welte T, Wettengel R, Worth H. Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD). *Pneumologie* 2007; 61: e1-e40

Vogelmeier C, Hederer B, Glaab T, Schmidt H, Rutten-van Mölken MP, Beeh KM, Rabe KF, Fabbri LM; POET-COPD Investigators. Tiotropium versus salmeterol for the prevention of exacerbations of COPD. *N Eng J Med* 2011; 364: 1093-1103

Walters JA, Walters EH, Wood-Baker R. Oral corticosteroids for stable chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; CD005374

Wasswa-Kintu S, Gan WQ, Man SF, Pare PD, Sin DD. Relationship between reduced forced expiratory volume in one second and the risk of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2005; 60: 570–575

Watz H, Waschki B, Magnussen H. Emphysema, airflow obstruction, and left ventricular filling. *N Engl J Med* 2010; 362: 1638-1639

Wencker M, Banik N, Buhl R, Seidel R, Konietzko N. Long-term treatment of alpha1-antitrypsin deficiency-related pulmonary emphysema with human alpha1-antitrypsin. Wissenschaftliche Arbeitsgemeinschaft zur Therapie von Lungenerkrankungen (WATL)-alpha1-AT-study group. *Eur Respir J* 1998; 11: 428–433

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid DNA amplification. *Bio Techniques* 1997 a; 22: 130-138

Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Bio Techniques* 1997 b; 22: 176-181

Wongsurakiat P, Lertakyamanee J, Maranetra KN, Jongriratanakul S, Sangkaew S. Economic evaluation of influenza vaccination in Thai chronic obstructive pulmonary disease patients. *J Med Assoc Thai* 2003; 86: 497-508

Wood AM and Stockley RA. The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Resp Res* 2006, 7: 130

World Health Organization (WHO), 2004: The global burden of disease: 2004 update. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/index.html (04.12.2012)

World Health Organization (WHO).2008: Fact sheet N° 310, updated June 2011: The top 10 causes of death. The 10 leading causes of death by broad income group. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html> (22.10.2012)

Wu L, Chau J, Young RP, Pokorny V, Mills GD, Hopkins R, McLean L, Black PN. Transforming growth factor-beta1 genotype and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2004; 59: 126–129

Xu X, Weiss ST, Rijcken B, Schouten JP. Smoking, changes in smoking habits and rate of decline in FEV₁: new insight into gender differences. *Eur Respir J* 1994; 7: 1056–1061

Yohannes AM, Baldwin RC, Connolly MJ. Depression and anxiety in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Age Ageing* 2006; 35: 457–459

8. Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich während der Entstehung dieser Arbeit unterstützt, gefördert und ermutigt haben.

An erster Stelle geht mein Dank an meinem Doktorvater Herrn Professor C. Grohé für sein Engagement, seine Anmerkungen und die Überlassung des Dissertationsthemas. Herrn Prof. G. Nickenig danke ich als Klinikdirektor für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und die Genehmigung der Dissertation.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn PD Dr. Stefan Pabst, der mir während der gesamten Zeit unserer Zusammenarbeit immer wieder als Ansprechpartner bei Fragen und Problemen zur Verfügung stand, mir stets mit Denkanstöße geholfen und das Korrekturlesen der gesamten Arbeit mit konstruktiver Kritik und vielen Ideen übernommen hat.

Auch allen Mitarbeitern der Poliklinik und den anderen Doktoranden möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken. Vor Allem zu erwähnen ist Frau Martina Lennarz. Ohne ihre engagierte Anleitung und ihre Geduld, wäre der experimentelle Teil dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ein großer Dank gilt besonders auch allen freiwilligen Probanden, den COPD-Patienten der Klinik aber auch alle Mitglieder der Sarkoidose-selbsthilfegruppen, die sich freundlicherweise bereit erklärt haben an unserer Studie teilzunehmen. Ohne ihre Bereitwilligkeit wäre diese Arbeit niemals entstanden.

Danke Andi für deine endlose Geduld, Liebe und Unterstützung.

Ganz besonders hat mir in all der Zeit meine Familie geholfen, indem sie mich in jeder Phase motiviert und mir ausnahmslos Rückhalt gegeben hat. Ich danke euch aus tiefstem Herzen.