

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel)

---

**TNF $\alpha$ -Polymorphismus bei Patienten mit Sepsis und  
Schilddrüsenkarzinomen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Christiane Roßbach

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt  
mit Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan  
Referent: Priv. Doz. Dr. med. Wilhelm Gross-Weege  
Korreferent: Prof. Dr. med. Colin MacKenzie

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>Abstract</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1. Pathophysiologie des TNF $\alpha$	9
1.1.1. Lokalisation	9
1.1.2. Sepsis	11
1.1.3. Immunmodulation	13
1.1.3.1. Angeborene unspezifische Immunantwort	13
1.1.3.2. Erworbene spezifische Immunantwort	15
1.1.3.2.1. Makrophagen	15
1.1.3.2.2. T-Helfer-Zellen	18
1.1.3.2.3. Neutrophile Granulozyten	18
1.2. Inhibitoren des TNF $\alpha$	19
1.2.1. TNF-Rezeptoren	19
1.2.2. Zytokine	20
1.3. Polymorphismus in der MHC Klasse-II	22
1.3.1. Polymorphismus des TNF $\alpha$	22
1.3.2. Polymorphismus in anderen Loci	24
1.4. Klinische Bedeutung des TNF $\alpha$ bei Infektionen	27
1.4.1. Virale Infektionen	27
1.4.2. Bakterielle Infektionen	28
1.4.3. Parasitäre Infektionen	30
1.5. Klinische Bedeutung des TNF $\alpha$ bei Malignomen	32
1.6. Therapieansätze	33
1.6.1. Antikörper gegen TNF $\alpha$	33
1.6.2. TNF $\alpha$ -Rezeptoren	38

<b>2.</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>40</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>41</b>
3.1.	Materialien	41
3.1.1.	Übersicht der Materialien	41
3.1.2.	Stammlösungen	42
3.2.	Einteilung und Definition der Probanden	43
3.3.	Methoden	45
3.3.1.	DNA-Isolation	45
3.3.2.	TNF $\alpha$ -PCR	46
3.3.3.	Entwicklung der Gele	46
3.3.4.	TNF $\alpha$ -DNA-Reinigung	47
3.3.5.	TNF $\alpha$ -Restriktion	47
3.3.6.	Darstellung der TNF $\alpha$ -Restriktion im Gel	48
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
4.1.	Modelle	50
4.2.	Statistische Ergebnisse	51
4.3.	Weitergehende Analysen	53
4.4.	Zusammenfassung	57
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
5.1.	TNF $\alpha$ -Polymorphismus in der Sepsis	58
5.1.1.	Auswirkungen des TNF $\alpha$ -308 Polymorphismus	61
5.1.2.	Assoziation des -308 Locus mit anderen Loci	62
5.2.	TNF $\alpha$ -Polymorphismus bei anderen Erkrankungen	66
5.3.	-308 Polymorphismus beim Schilddrüsenkarzinom	75
5.3.1.	Apoptose, der programmierte Zelltod	75
5.3.2.	Der Fas Ligand und die Apoptose	76
5.3.3.	TRAIL/TRAIL-Rezeptor und die Apoptose	77
5.3.4.	TNF $\alpha$ und die Apoptose	79
5.3.5.	TNF $\alpha$ und NF- $\kappa$ B	80
5.4.	TNF $\alpha$ -Polymorphismus und Karzinome	81

<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>88</b>
	<b>Anlage 1: Legende Statistik</b>	<b>99</b>
	<b>Anlage 2: Curriculum Vitae</b>	<b>103</b>



# Abstract

---

## **TNF $\alpha$ Polymorphismus bei Sepsis und Schilddrüsenkarzinomen**

Das Zytokin Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) hat einen entscheidenden Anteil an der Entwicklung schwerer Komplikationen, wie septischer Schock und Multiorganversagen nach Entwicklung einer Sepsis. Eine Assoziation des TNF2-Allels mit einem erhöhten TNF  $\alpha$  Spiegel und einer höheren Mortalitätsrate wurde in zahlreichen Studien beschrieben. Auch bei verschiedenen Karzinomen ist TNF $\alpha$  neben anderen Mediatoren durch die Steuerung des programmierten Zelltods, Apoptose, am Verlauf eines Karzinoms beteiligt. Er kann sowohl zytotoxisch als auch metastasenfördernd wirken. Außerdem gilt er verschiedentlich als guter Marker für die Prognose eines Karzinoms. In meiner Arbeit sollen die Fragen beantwortet werden, ob der –308 G/A TNF  $\alpha$  Polymorphismus beziehungsweise ein gehäuftes Auftreten des TNF2 Allels (-308A Allel) eine Aussage über die Schwere einer Sepsis zulässt und ob ein gehäuftes Auftreten des –308 TNF  $\alpha$  Polymorphismus bei Schilddrüsenkarzinomen beobachtet werden kann. Zu diesem Zweck wurden 54 Sepsis-Patienten und 31 Patienten mit Schilddrüsenkarzinom auf den –308 TNF  $\alpha$  Polymorphismus mittels PCR untersucht und mit einer Kontrollgruppe von 75 Gesunden verglichen. Es stellte sich heraus, dass in der Gruppe der Sepsis-Patienten keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung des TNF  $\alpha$  Polymorphismus für die Allele TNF1 (-308G Allel) und TNF2 (-308A Allel) gegenüber der Kontrollgruppe gefunden werden konnten. In der Gruppe der Schilddrüsenkarzinompatienten hingegen konnte eine Signifikanz bezüglich des häufigeren Auftretens des TNF2 (-308A Allels) festgestellt werden. Die Ergebnisse in der Intensiv-Gruppe zeigen, dass die erhöhten TNF  $\alpha$  Spiegel, die bei Erkrankten häufig gemessen werden können, nicht unmittelbar mit dem –308 TNF  $\alpha$  Polymorphismus in Zusammenhang stehen müssen, sondern auch in der Verlinkung des TNF  $\alpha$  zum Beispiel mit dem HLA-Molekül begründet sein kann. Zum anderen weisen die Ergebnisse der Karzinom-Gruppe auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem –308 TNF  $\alpha$  Polymorphismus und dem Vorkommen eines Schilddrüsenkarzinoms hin, welcher als Hinweis auf die Anfälligkeit, ein Schilddrüsenkarzinom zu entwickeln, dienen könnte.

# 1. Einleitung

---

Schon Ende des vergangenen Jahrhunderts (1893) vermutete der amerikanische Chirurg William Coley[40] einen Zusammenhang zwischen einer Streptokokkeninfektion bei Tumorpatienten und dem gelegentlichen Auftreten von hämorrhagischen Nekrosen des Tumors. Er versuchte durch Injektionen von abgetöteten oder lebenden Bakterien sowie Kulturfiltraten eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort zu erzielen und so das Tumorstadium zu beeinflussen. Mit einem Gemisch abgetöteter Bakterien von *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens*, das als „Coley`s Toxin“ bekannt wurde, behandelte er Tumorerkrankungen wie zum Beispiel Karzinome und Sarkome der Haut, der Mamma und des Knochens. Zu jener Zeit war es das einzige bekannte systemische Therapeutikum gegen maligne Tumoren. Mit der Entwicklung von Radio- und Chemotherapie ging das Interesse an der Toxintherapie immer weiter zurück, nicht zuletzt, da die verwendeten Präparate eine hohe Komplikationsrate aufwiesen[28],[92],[125].

Anfang der 50er Jahre gelang es nachzuweisen, dass Endotoxine Tumorzellen in vitro nicht töten können. Man führte die hämorrhagische Nekrose eines Tumors in vivo auf die hypotensive Wirkung des Endotoxins und den daraus resultierenden vaskulären Kollaps sowie die Ischämie im Tumor zurück[114].

Carswell und Mitarbeiter arbeiteten 1975 in den USA mit Mäusen, die sie erst mit Bacille-Calmette-Guérin (BCG) infizierten und anschließend mit Endotoxin behandelten. Dabei entdeckten sie ein Zytotoxin im Mäuseserum, das aufgrund seiner Eigenschaft, Tumornekrosen selektiv zu induzieren, den Namen Tumornekrosefaktor (TNF) erhielt[34]. Einige Jahre später, 1981, wurde von Kawakami und Cerami bei Versuchen mit Endotoxin behandelten Mäusen ein übertragbarer Faktor gefunden, der die Lipoproteinlipase im Fettgewebe supprimierte[90]. Wie sich später herausstellte war dieser Faktor, der eine Kachexie

hervorrufen konnte und deshalb den Namen Cachectin erhielt, mit dem Tumornekrose-Faktor  $\alpha$  identisch [17],[68].

## **1.1. Pathophysiologie des TNF $\alpha$**

### **1.1.1. Lokalisation**

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) wurde erstmals wegen seiner Beteiligung an Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen entdeckt. Er wird eingeteilt in die Klassen I bis III.

Das Gen, das TNF $\alpha$  codiert, liegt in der Klasse-III-Region des Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex; MHC) auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 zwischen 6p21.1 und 6p21.3 bzw. zwischen dem HLA-B und dem HLA-D Locus [75].

Die Moleküle der MHC-Klasse I finden sich auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen, speziell auf Zellen des lymphatischen Gewebes, weniger auf Zellen der Leber, Lunge und Nieren und noch seltener auf denen des Gehirns und der Muskulatur. Klasse I Moleküle binden auf virusinfizierten Zellen mit dem Antigen und geben auf diesem Wege den zytotoxischen T-Zellen ein Signal. Zudem spielen sie möglicherweise als Bestandteil von Hormonrezeptoren eine Rolle.

Moleküle der Klasse-II-Region finden sich insbesondere auf B-Lymphozyten, Makrophagen und Antigen-präsentierenden Zellen. Sie aktivieren auf gleiche Weise wie die Moleküle der Klasse-I-Region T-Helferzellen und unter deren Einfluss Makrophagen und B-Zellen. Basis und Innenwände der speziell gehöhlten Moleküle, sowie die Oberflächen ihrer Helices sind Bereiche, in denen der größte Austausch von Aminosäuren stattfindet, der einen Polymorphismus zur Folge hat.

Eine weitere große Anzahl verschiedener Gene, die sich in der Chromosomen-Region MHC befinden, werden unter der MHC-Klasse-III zusammengefasst. Eine Gruppe von Genen kodiert für zwei C4-Isotypen und die beiden Produkte C2 und

Faktor B, die einen Ort mit C3-Konvertase-Aktivität aufweisen.  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{TNF}\beta$ , auch Lymphotoxin genannt, stammen ebenfalls aus dieser Region, wobei diese beiden Zytokine zu etwa 30 % in ihrer Aminosäuresequenz homolog sind[72],[134].

Im TNF-Locus sind fünf Mikrosatelliten bekannt, die als (CT)<sub>n</sub> Sequenzen TNFb, c, d, und e, sowie als (CA)<sub>n</sub> Sequenz TNFa bezeichnet werden.

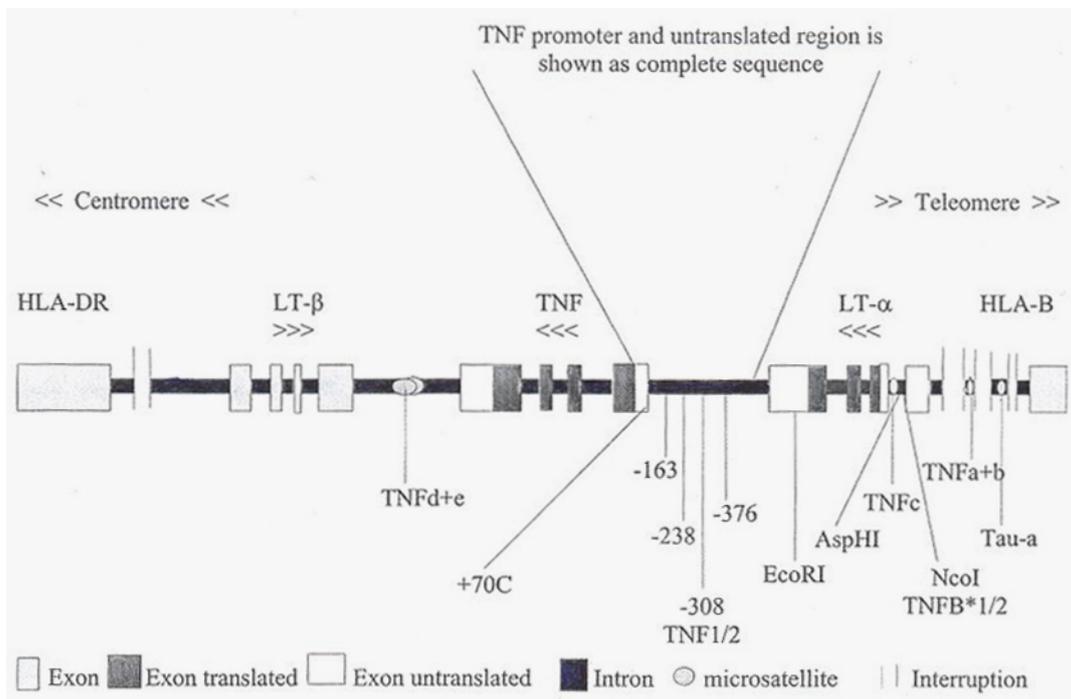


Bild 1: Polymorphismus in der Promotorregion des TNF-Gens [144]

Ein Teil des MHC Locus auf Chromosom 6 einschließlich des TNF-Gen-Komplexes. Alle TNF-Polymorphismen sind in der Genkarte aufgeführt: die (CT)<sub>n</sub> Mikrosatelliten TNFb, c, d und e, die (CA)<sub>n</sub> Mikrosatelliten TNFa, die Mikrosatelliten Tau-a (11 oder 14 GTs), die Restriktionsseiten für EcoRI, AspHI und NcoI (TNFB1/2), die einzelnen G/A Austausch in Position -163, -238, -308 (TNF1/2) und -376, und die C-Strecke (7 oder 8 Cs) bei +70.

### 1.1.2. Sepsis

Das zunächst durch die Behandlung von malignen Tumoren entdeckte  $\text{TNF}\alpha$  gewann durch zahlreiche Studien an Bedeutung. Viele Erkrankungen wurden im Hinblick auf dieses Zytokin erforscht. Nicht zuletzt aufgrund der hohen Letalität des septischen Schocks, lagen die Sepsis und mögliche neue Therapieansätze im Interesse vieler Wissenschaftler[27].

Wird durch das Zusammenwirken mehrerer Toxine, bakterieller Stoffwechselprodukte und Mediatoren eine systemische Antwort durch den Körper, wie Tachykardie, Tachypnoe, Temperaturänderungen und Leukopenie oder –zytose hervorgerufen, spricht man von einer Sepsis. Als Auslöser können gram-negative Keime im Blut verantwortlich sein, die nach ihrer Lyse Endotoxine freisetzen[124],[27]. Hier gilt als stärkster Auslöser das Lipopolysaccharid (LPS), eine Komponente gram-negativer Bakterienzellwände, die in der Zirkulation von Lipopolysaccharid-bindenden Proteinen gebunden wird. Dieser Komplex kann wiederum an CD14 gebunden werden, einem auf diesen Zellen befindlichen Zelloberflächenrezeptor, der die Makrophagen und zirkulierenden Monozyten aktiviert[133],[170]. Daneben kann auch *Streptococcus pyogenes* invasive Infektionen wie das streptococcal toxic shock syndrome (STSS) verursachen und Symptome auslösen, die denen durch LPS induzierten gleichen. Das Superantigen des *Streptococcus pyogenes*, ein Immunstimulator, induziert ebenso die Produktion des  $\text{TNF}\alpha$  wie das LPS[51].

Von einer schweren Sepsis spricht man, wenn sich während einer Sepsis eine Hypoperfusion mit Organdysfunktion entwickelt, von einem septischen Schock, wenn sich eine Hypoperfusion mit fortschreitender Hypotension manifestiert[9].

Auch hier spielt der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ) eine große Rolle. Durch Endotoxin stimuliert, gelangt  $\text{TNF}\alpha$  durch vermehrte Produktion in den Kreislauf. Im Zuge einer bakteriellen Sepsis führt er dort in großen Mengen akut produziert zu Fieber, systemischen Vasodilatation und Ödemen, einer Abnahme des Blutvolumens, Steigerung der Gefäßpermeabilität, Hypoproteinämie und Neutropenie.

TNF $\alpha$  setzt an endothelialen Zellen an, wo er für die Aktivierung des Komplementsystems und die Freisetzung von Akut-Phase-Proteinen verantwortlich ist[52]. Im weiteren Verlauf führt dies zur Bildung von Fibrin-Gerinnse[n]193]. Durch die Sekretion von tPA (tissue-type plasminogen activator) und PAI-1 (plasminogen activator inhibitor) moduliert TNF $\alpha$  außerdem das Fibrinolyse-System. So wird durch TNF $\alpha$  nicht nur die Koagulation aktiviert, sondern auch die Fibrinolyse inhibiert[97]. Es kommt zu Fibrinablagerungen, Komplementaktivierungen, Mikrothromben und letztendlich zu einer disseminierten intravasale Gerinnung (DIC = disseminated intravascular coagulation) und endothelialen Schäden, die ein Multiorganversagen (MOV) nach sich ziehen. Dies trägt zur hohen Mortalitätsrate der schweren Sepsis und des septischen Schocks bei (Konzentrationen des TNF $\alpha$  von mehr als 1 ng/ml weisen möglicherweise auf einen letalen Ausgang einer bakteriellen Sepsis hin[69]). Des weiteren führen länger bestehende niedrige TNF $\alpha$ -Spiegel zu Hepatosplenomegalie, subendokardialer Inflammation, Insulinresistenz, einer gesteigerten Rate von Tumormetastasen, Fett- und Muskelabbau bis hin zum Vollbild der Kachexie[82],[167],[131].

Nicht infektiöse Stimuli, wie zum Beispiel Verbrennungen, Pankreatitis und Intoxikationen, aktivieren die gleiche Abwehrkaskade und führen zu einem gleichartigen Syndrom, dem *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) [27].

Definition der Sepsis und SIRS:

### Sepsis

Die Consensus Conference ASSP/ACCM[18] zur Definition der Sepsis gibt vor, dass der klinische Verdacht auf eine Infektion bestehen muss. Außerdem müssen zusätzlich noch zwei der nachstehenden Parameter erfüllt sein:

1. Körpertemperatur >38,3 ° oder <35,6° C
2. Herzfrequenz >90 Schläge/min
3. Atemfrequenz >20 Atemzüge/min oder arterieller pCO<sub>2</sub> <32 mm Hg
4. Leukozytenzahl >12.000/ $\mu$ l oder <4.000/ $\mu$ l oder >10% bandförmige Granulozyten im Differentialblutbild

## SIRS

Die systemische Entzündungsreaktion bezeichnet die Körperantwort auf einen schädigenden Vorgang, wie zum Beispiel nekrotisierende Pankreatitis, Polytrauma, ausgedehnte Weichteilverletzungen oder Massenblutungen. Allein durch den fehlenden Verdacht oder Nachweis einer Infektion lässt sich die SIRS von der Sepsis abgrenzen. Mindestens zwei der nachfolgenden Parameter müssen erfüllt sein:

1. Körpertemperatur  $>38,3^{\circ}\text{C}$  oder  $<35,6^{\circ}\text{C}$
2. Herzfrequenz  $>90$  Schläge/min
3. Atemfrequenz  $>20$  Atemzüge/min oder arterieller  $\text{pCO}_2 <32$  mmHg
5. Leukozytenzahl  $>12.000/\mu\text{l}$  oder  $<4.000/\mu\text{l}$  oder  $>10\%$  bandförmige Granulozyten im Differentialblutbild

## MOV

Das Multiorganversagen ist definiert als ein gleichzeitiges oder schnell aufeinanderfolgendes Versagen von mindestens zwei vitalen Organfunktionen (zum Beispiel akutes Lungen- und akutes Nierenversagen). Es kommt vor bei Sepsis, Schock, Polytrauma, Vergiftung u.a. [141].

## Septischer Schock

Der septische Schock definiert sich als Sepsis mit anhaltendem Blutdruckabfall (systolisch  $<90$  mmHg) trotz ausreichender Volumenzufuhr.

### 1.1.3. Immunmodulation

Bakterien (LPS) oder das Protein-Exotoxin gram-positiver Bakterien sowie Entzündungsprodukte und andere invasive Stimuli, die durch bestimmte Rezeptoren erkannt werden, werden Makrophagen aktiviert[169],[82],[53]. Dies führt neben einer verstärkten Phagozytoseaktivität zur Synthese proinflammatorischer Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$ , Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) durch die Makrophagen[150],[82]. Aber auch Neutrophile, Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NK Zellen), intestinale Epithelzellen, Endothelzellen und glatte Muskelzellen gelten als Quelle für das  $\text{TNF}\alpha$ [131],[66].

$\text{TNF}\alpha$  beeinflusst die Produktion von Adhäsionsmolekülen durch Endothelzellen und deren Interaktion mit den Leukozyten durch unterschiedliche Rezeptorsysteme wie Adhäsine und Chemokine und trägt damit zur Anheftung von neutrophilen Granulozyten und später auch Monozyten und Lymphozyten an das Endothel sowie zur Migration von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten in das Entzündungsareal bei[82],[169],[53],[158].

Die Fibroblasten-Proliferation wird durch  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert, die Kollagensynthese gehemmt und die lokale Produktion anderer proinflammatorischer Zytokine gefördert. Diese Entzündungsreaktionen führen in der frühen Phase einer Infektion zu deren Einkapselung. Auf neoplastische Zellen wirken sie zytotoxisch. Ein erleichterter Gewebewiederaufbau ist gegeben[150],[169].

Diese Zytokinkaskade tritt nicht nur bei lokalen Entzündungsreaktionen auf, sondern auch bei systemischen Entzündungsprozessen. Auch multiple Traumen, Ischämie-Reperfusion-Verletzungen, antigenspezifische Immunantworten, akute Transplantationsabstoßungen und viele akute inflammatorische Zustände, wie zum Beispiel die akute Hepatitis oder Pankreatitis, lösen dieselbe Zytokinkaskade aus[53].

### 1.1.3.2. Erworbene spezifische Immunantwort

#### 1.1.3.2.1. Makrophagen

Die zunächst beobachtete angeborene unspezifische Immunantwort kann im weiteren Verlauf in eine erworbene spezifische Immunantwort münden. Ein Verbindungsglied zwischen diesen beiden bilden die Monozyten und Makrophagen, die als „professionelle“ Phagozyten gelten. Ihre Funktion, die Immunantwort einzuleiten, beinhaltet die Wiedererkennung, die Aufnahme und die Tötung einwandernder Organismen[66],[98].

Bei anhaltendem Entzündungsreiz kommt es im Rahmen eines septischen Fokus zur Invasion pathogener Keime und toxischer Keimprodukte und damit zur vermehrten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , Interferon  $\gamma$  ( $\text{IFN-}\gamma$ ), G-CSF und IL-6, die systemisch wirksame Konzentrationen erreichen und somit systemische Entzündungsreaktionen induzieren, wie in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Leber	Produktion von Akut-Phase-Proteinen
ZNS	Induktion von Fieber Induktion neuroendokriner Stressreaktion Veränderung im Appetitzentrum (Anorexie)
Knochenmark	Schnellere Ausreifung von Granulozyten und Monozyten
Fett-, Leber- und Muskelgewebe	Energie durch Wechsel von anabolem zu katabolem Stoffwechselprozess

Tab.1.1.: Systemische Entzündungsreaktionen durch Zytokine[26],[82]

Die ausgeschütteten Mediatoren sind in der Lage durch einen Mechanismus ihre eigene Synthese herunterzuregulieren, was die Homöostase wiederherstellt und eine Schädigung des Organismus durch die ausgelöste Abwehrreaktion verhindert. Man spricht dann von einem kompensatorischen antiinflammatorischen Response-Syndrom (CARS). Wird das Gleichgewicht nicht erreicht, kann es systemisch zu einer massiven proinflammatorischen Reaktion im Sinne eines systemischen inflammatorischen Reaktions-Syndroms (SIRS) kommen, welches wiederum von einer starken antiinflammatorischen Reaktion, dem CARS beantwortet wird[19],[158],[98].

Im Rahmen dieser systemischen Entzündungsreaktion werden während der sogenannten Hyperinflammationsphase große Mengen  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-12 in der Akutphase aus den Makrophagen sezerniert sowie HLA-DR, -DP, -DQ und CD80/86 zur Antigenpräsentation exprimiert. In der nachfolgenden Hypoinflammationsphase, auch Immunparalyse genannt, werden antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, IL-13 und Tumor growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) vermehrt ausgeschüttet. Dadurch werden die Makrophagen deaktiviert und die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine herunterreguliert. Durch den weiterhin bestehenden Stimulus beginnt eine erneute Aktivierung der Makrophagen. Es entsteht ein circulus vitiosus[27],[186],[98],[158].

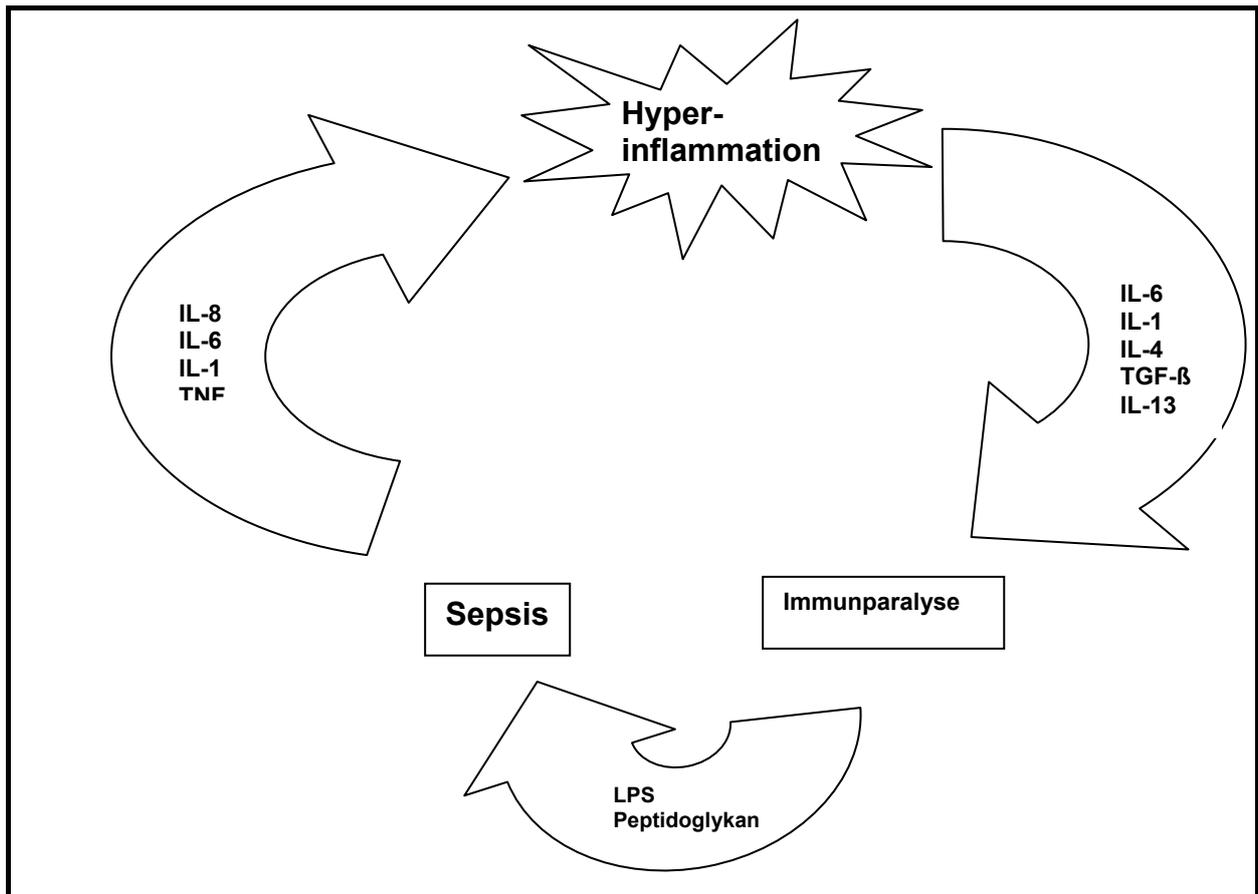


Bild 2: Hypothetischer Circulus vitiosus. Hyperinflammation und Immunparalyse in der protrahiert verlaufenden Sepsis (LPS=Lipopolysaccharid; TNF=Tumornekrosefaktor; IL=Interleukin; TGF=transforming growth factor) [27].

### **1.1.3.2.2. T-Helfer-Zellen**

In diesen Kreislauf greifen die T-Helfer-Zellen (Th-1 und 2) mit ein. Auch sie können viele verschiedene Zytokine sezernieren. So beeinflussen Th-1-Zellen die zelluläre Immunität durch die Ausschüttung von Interferon,  $\text{TNF}\beta$  und  $\text{TGF}\beta$ , während Th2-Zellen eher mit der humoralen Antikörper-medierten Immunität verbunden sind und IL-4, IL-5, IL-6 und IL-9 ausschütten sowie bei der B-Zell Antikörperproduktion helfen[66].

IL-4 und IL-10 haben antiinflammatorische Effekte. Sie wirken auf die Expression der IL-1R Antagonisten und regulieren die Ausschüttung von IL-1 und TNF durch die humanen Makrophagen herunter[153]. Außerdem inhibieren diese beiden Zytokine die Th1-Zell-Entwicklung, die mit der funktionellen Monozyten-Depression eng assoziiert ist [98],[153]. Beide Zelltypen, Th1 und Th2, produzieren IL-2, IL-3, IL-10 und IL-13 sowie  $\text{TNF}\alpha$  und den Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) [66],[21].

### **1.1.3.2.3. Neutrophile Granulozyten**

Eine weitere für den Verlauf der Sepsis besonders wichtige Zellgruppe bilden die neutrophilen Granulozyten. Ihre Bildung wird während einer akuten Entzündung durch das Chemokin IL-8 gesteigert[31], ist aber auch von der Menge des zirkulierenden  $\text{TNF}\alpha$  im Kreislauf abhängig. Ein niedriger  $\text{TNF}\alpha$ - Spiegel führt zu einer Neutrophilie, ein hoher  $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel zu einer Leukopenie[53]. Auch hohe Konzentrationen von Chemokinen können die Migration der Neutrophilen in das Infektionsgebiet beeinträchtigen, was im Verlauf einer schweren Sepsis negative Auswirkungen haben kann[6].

Neutrophile migrieren im Rahmen einer Infektion als erste Zellen zum Infektionsort. Sie töten pathogene Organismen durch die Freisetzung freier Radikale und Nitrogene, und sind in der Lage diese dann zu phagozytieren[31]. Außerdem schütten diese Zellen auch Zytokine und Chemokine wie zum Beispiel  $\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,

IL-6, IL-8, IL-10, IL -12 $\beta$ , IL -15, IL -18 und TNF $\alpha$ , aus, die ihre eigene Bildung und Aktivierung sowie die einiger anderer Immunzellen steigern.

Die effektive Eliminierung von pathogenen Organismen durch die von neutrophilen Granulozyten produzierten zytotoxischen Komponenten kann sich jedoch auch nachteilig auf den Wirtsorganismus auswirken, wenn Wirtsgewebe durch diese Komponenten geschädigt wird[6],[96]. Eine schnelle Clearance der neutrophilen Granulozyten durch die Gewebsmakrophagen soll in Form der Apoptose das Risiko einer Verletzung durch potentiell gefährliche Entzündungszellen limitieren[139].

## **1.2. Inhibitoren des TNF $\alpha$**

### **1.2.1. TNF-Rezeptoren**

Das Vorkommen der beiden TNF-Rezeptoren TNFR1 (p55) und TNFR2 (p75) gilt als Voraussetzung für eine biologische Reaktion des Tumornekrosefaktors, die Menge der Rezeptoren spielt dabei jedoch keine Rolle. Die beiden Rezeptortypen unterscheiden sich zum einen durch ihr Gewicht von 55kDa (TNFR55) bzw. 75kDa (TNFR75) zum anderen durch ihren Standort. Während TNFR55 vor allem auf epithelialen Zellen und Fibroblasten, aber auch auf vielen anderen Zellen vorkommt, ist TNFR75 eher auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs und Endothelzellen beschränkt. Manche extrazellulären Bestandteile von Rezeptoren, zum Beispiel der IL-1- oder TNF-Rezeptoren, können proteolytisch abgespalten werden und in Körperflüssigkeiten als lösliche Rezeptoren vorkommen.

Solche löslichen Rezeptoren können mit den zellständigen Rezeptoren konkurrieren und diese sogar inhibieren, indem sie TNF $\alpha$  binden und damit die Interaktion dieses Zytokins mit den zellständigen Rezeptoren und den damit verbundenen Effekten auf die Zellen inhibieren. Rezeptorbestandteile oder Zytokin-Bindeproteine werden auch von Viren produziert, den sogenannten Virokinen, die sich so vermutlich einen Infektionsvorteil verschaffen. Auch Antikörper im Plasma können möglicherweise Zytokine binden und inaktivieren[104],[131],[62],[179]. Lösliche TNF-Rezeptoren

sind im Rahmen einer Sepsis und im septischen Schock deutlich erhöht und gelten aufgrund ihrer längeren Halbwertszeit (HWZ) im Vergleich zum TNF als Marker für eine abgelaufene TNF-Erhöhung. Die Höhe der löslichen TNF-Rezeptoren korreliert mit Mortalität und der Schwere der Erkrankung. TNF-Rezeptoren sind in der Lage TNF zu binden. Eine protektive Wirkung durch die TNF-Bindung an seine Rezeptoren wird kontrovers diskutiert, da durch die Bindung an lösliche TNF-Rezeptoren TNF stabilisiert und so vor Proteolyse geschützt werden kann, was möglicherweise die schädigende TNF-Wirkung noch verstärken kann[65].

Der TNF-Rezeptor I triggert außerdem die apoptotische Kaskade, wirkt aber auch anti-apoptotisch zum Beispiel durch die Aktivierung des nuklearen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B.

Das TNFR<sub>II</sub> bindet wahrscheinlich TNF $\alpha$  und transferiert es zu TNFR<sub>1</sub>.

Es wurde aber auch direktes TNFR<sub>II</sub>-mediertes TNF $\alpha$  „signaling“ gezeigt. Und mehr noch kann TNFR<sub>II</sub> anti-apoptotische Proteine daran hindern die pro-apoptotische Funktion des TNFR<sub>1</sub> zu beeinträchtigen und die TNFR<sub>1</sub>-abhängige Aktivierung der Caspase-8 beschleunigen[117].

### **1.2.2. Zytokine**

TNF $\alpha$  und Interleukin 1 (IL-1) sind eng miteinander verwandt. Trotzdem unterscheiden sie sich in ihrer Struktur und ihren Rezeptoren. Sie werden gemeinsam produziert und agieren beide bei vielen lokalen aber auch systemischen Entzündungen synergistisch. Beide sind in der Lage Kinasen zu aktivieren und verschiedene Gene zu exprimieren. Beide induzieren Gene, die die Gefäßversorgung und die lokale Gewebeumgebung beeinträchtigen und bewirken die Hypotension und ein Schockgeschehen durch ihre Freisetzung bei systemischen Entzündungen. Werden beide gemeinsam geblockt, wird die Schwere einer Entzündung reduziert[53].

Ähnlich wie die Rezeptoren agiert das von Makrophagen produzierte antiinflammatorische Zytokin Interleukin 10 (IL-10). Es wird durch TNF $\alpha$  und Prostaglandine selbst induziert, und gilt als ein potenter Inhibitor für die Ausschüttung

proinflammatorischer Zytokine, wie  $\text{TNF}\alpha$ , sowie die Expression von TNF-Rezeptoren auf der Oberfläche. Die Ausschüttung von TNF-Rezeptoren in die systemische Zirkulation, die als natürliche Inhibitoren der TNF-Aktivität fungieren, wird von IL-10 gefördert.

Gegen  $\text{TNF}\alpha$  und IL-1 wirkt zum Beispiel das Interleukin 6 (IL-6) mit der Herunterregulation ihrer Synthese und der Förderung der Synthese des IL-1ra, einem spezifischen Inhibitor des IL-1  $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , sowie der Freisetzung löslicher TNF-Rezeptoren. Auch IL-13 kann die Produktion von TNF durch Monozyten herunterregulieren. IL-4 oder TGF- $\beta$  supprimieren jeweils die Genexpression und die Synthese von IL-1,  $\text{TNF}\alpha$  und anderen Zytokinen[66],[127],[53],[82].

Durch verschiedene Faktoren und ganz besonders durch bakterielle Lipopolysaccharide und Interferon wird die Produktion des Tumornekrosefaktors angeregt[93]. Der Einfluss des GM-CSF auf die Monozyten induziert die Ausschüttung von IL-1, IL-8 und TNF. Auch der Platelet activating factor (PAF) steigert die Produktion von Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 2 (IL-2) und  $\text{TNF}\alpha$  durch seinen Einfluss auf die Makrophagen. IL-2, der Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierende Faktor (GM-CSF) und der Makrophagen-Koloniestimulierende Faktor (M-CSF) induzieren ebenfalls eine TNF-Ausschüttung durch Makrophagen. IL-4 trägt durch seinen Einfluss auf die Makrophagen zur Expression von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF bei[66].

Induzierer des TNF aus Makrophagen sind *Plasmodium falciparum* infizierte rote Blutkörperchen, virale Infektionen, MHC Klasse Liganden wie bacterial superantigen toxic shock syndrom toxin 1 und Staphylokokken-Enterotoxin B,  $\text{C5}\alpha$ , 1,25-dihydroxy Vitamin D3, Röntgenbestrahlung und Uratkristalle.

Eine lange Reihe gram-positiver und gram-negativer bakterieller Pathogene, wie auch Mykobakterien, stimulieren die TNF-Produktion in Makrophagen durch toll-like-Rezeptoren. T-Zellen stimuliert mit anti-CD3 -in Gegenwart von IL-2 oder Mitogenen- und anti-CD4, häufen rasch TNF mRNA an und sezernieren Proteine. Aktivierte T-Zellen exprimieren auch transmembranes TNF[131].

### 1.3. Polymorphismus in der MHC-Klasse-III

#### 1.3.1. Polymorphismus des TNF $\alpha$

In zahlreichen Studien wurde untersucht, in wie weit die große Anzahl von Polymorphismen in der TNF $\alpha$ -Promotorregion einen Einfluss auf die Expression des TNF-Gens sowie auf Empfänglichkeit und Schweregrad einer Erkrankung haben oder ob ein Polymorphismus im menschlichen TNF $\alpha$ -Promotor rein zufällig verteilt und ohne jeglichen Effekt vorliegt[5].

Das Auftreten unterschiedlicher Basensequenzen auf allelen Loci in einer größeren Häufigkeit als dies bei Mutation zu vermuten wäre, bezeichnet man als DNA-Polymorphismus[182]. Ein Polymorphismus des TNF $\alpha$ -Gens beinhaltet eine einzelne Basensubstitution (single nucleotide polymorphism =SNP) zwischen Guanodin (G) und Adenosin (A) bei – 308 nt und zeigt zwei Allelformen für TNF $\alpha$ , das häufigere –308G Allel (TNF1) und das seltenere –308A Allel (TNF2) [189],[192],[190].

Die Promotorregion von TNF $\alpha$  ist stark mit den Haplotypen HLA-A, -B8 und -DR3 gekoppelt. HLA-Gene zeigen einen starken Polymorphismus. So zeigt zum Beispiel das HLA-DRB1-Gen über 100 Allele in der humanen Population. HLA-DR, -DQ, -DP, -A, -B und -C funktionieren als Immunantwort-Proteine, die gegen exogene Pathogene gerichtet sind. Variationen in dieser Position im Sinne eines Polymorphismus können für die Regulation der TNF $\alpha$ -Produktion wichtig sein[99],[79]. Zum Beispiel variiert die TNF $\alpha$ -Produktion jedes Individuums je nach auftretendem HLA-DR-Allel. Individuen, die HLA-DR2+-Träger sind, produzieren niedrige TNF $\alpha$ -Spiegel, während HLA-DR3+- und 4+-Individuen hohe Spiegel produzieren[26]. Hier besteht eine besonders starke Verbindung zwischen dem HLA-DR3 und dem TNF2[116].

Das TNF2-Allel, das in homozygoter Form besonders selten auftritt, ist mit der Transkription des TNF $\alpha$  und damit mit der Expression höherer TNF $\alpha$ -Spiegel als es beim TNF1 Allel der Fall ist, assoziiert [120],[191]. Der –308G/A Polymorphismus ist zum Beispiel neben vielen anderen Effekten auf verschiedenste Erkrankungen mit

dem klinischen Verlauf der zerebralen Malaria assoziiert[112]. Das TNF -308A-Allel steht beispielsweise mit dem Auftreten des Non-Hodgkin-Lymphoms in Beziehung[88].

-618	<b>TGT GAA TTC CCG</b> GTG	ATT TCA CTC CCG GCT	GTC CAG GTC TGT CCT	-574
	Kb enhancer 2/CK-1			
-573	GCT ACC CCA CCC AGC	CTT TCC TGA GGC CTC	AAG CCT GCC ACC AAG	-529
-528	CCC CCA GCT CCT TCT	CCC CGC AGG ACC CAA	ACA GAG GCC TCA GGA	-484
-483	GTC AAC ACA GTC TTT	CCC TCC AAC CCG TTT	TCT CTC CCT CAA CGG	-439
-438	ACT CAG CTT TCT GAA	GCC CCT CCC AGT TCT	AGT TCT ATC TTT TTC	-394
-393	CTG CAT CCT GTC <b>TGG</b>	<b>AAG/A TTA GAA GGA</b> AAC	AGA CCA CAG ACC TGG	-349
	KB enhancer3			
-348	TCC CCA AAA GAA ATG	GAG GCA ATA GGT TTT	GAG GGG CAT G <sub>G/A</sub> GAC	-304
-303	GGG GTT CAG CCT CCA	GGG TCC TAC ACA CAA	ATC AGT CAG TGG CCC	-259
-258	AGA <b>AGA CCC CCC TCG</b>	<b>GAA TC<sub>G/A</sub> GAG CAG GGA</b>	GGA TGG GGA GTG TGA	-214
	TNF repressor site (TRS)			
-213	GGG GTA TCC TTG ATG	CTT GTG TGT CCC CAA	CTT TCC AAA TCC <b>CCG</b>	-169
-168	<b>CCC CC<sub>G/A</sub> CGA TGG</b> AGA	AGA AAC CGA GAC AG	<b>A AGG</b> TGC AGG GCC CAC	-124
	Y-Box		Ets site	
-123	TAC CGC <b>TTC CTC CAG</b>	<b>ATG AGC TCA TGG GTT</b>	<b>TCT CCA CC</b> A AGG AAG	-79
	Ets site CK-1	AP-1/ATF	NFAT k3	
-78	TTT TCC GCT GGT TGA	ATG ATT CTT TCC <b>CCG</b>	<b>CCC</b> TCC TCT CGC CCC	-34
		SP-1		
-33	AGG GAC <b>ATA TAA AGG</b>	CAG TTG TTG GCA CAC	CCA GCC AGC AGA CGC	+12
	TATA-Box		transcription start	
+13	TCC CTC AGC AAG GAC	AGC AGA GGA CCA GCT	AAG AGG GAG AGA AGC	+57
+58	AAC TAC AGA CCC CCC <sub>(c)</sub>	CTG AAA ACA ACC CTC	AGA CGC CAC ATC CCC	+102
+103	TGA CAA GCT GCC AGG	CAG GTT CTC TTC CTC	TCA CAT ACT GAC CCA	+147
+148	CGG CTT CAC CCT CTC	TCC CCT GGA AAG GAC	ACC ATG AGC ACT GAA	+192
			Translation start	

Bild 3: Der genetische Polymorphismus des TNF-Locus[144]

### 1.3.2. Polymorphismus in anderen Loci

Ugialoro und seine Mitarbeiter haben darauf hingewiesen, dass die erwähnten –238, –244, –308, –376, –857 und – 863 Polymorphismen eigentlich in den Positionen –237, –243, –307, –375, –856 und – 862 lokalisiert sind. Um unnötigen Verwirrungen entgegenzuwirken, werden hier die Positionen so verwendet, wie sie in den jeweiligen Originalstudien bezeichnet wurden[155].

Der am häufigsten untersuchte Polymorphismus ist der in Position –308G/A, gefolgt von dem –238G/A Polymorphismus, der in einer Regulatorbox der TNF $\alpha$ -Gen-Promotor-Region identifiziert wurde. Wie der –308G/A-Polymorphismus ist auch der –238G/A-Polymorphismus mit HLA- Haplotypen verbunden (linkage disequilibrium). Außerdem wird die Assoziation des –238A/A-Allels mit einem Einfluss auf die Genexpression des TNF $\alpha$  und damit einer steigenden TNF $\alpha$ -Produktion kontrovers diskutiert. Neben einem Einfluss auf Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose (MS) und rheumatoider Arthritis (RA) und Infektionskrankheiten, wird dem –238 TNFA/A-Allel auch eine Assoziation mit der alkoholtoxischen Leberzirrhose zugeschrieben[109],[44],[86],[132],[100],[155].

Weitere Polymorphismen, die sich im proximalen Promotor des TNF $\alpha$  Gens befinden, sind in Position –857C/T und Position –863C/A sowie drei seltenere Polymorphismen in Position –163G/A, –376G/A und –574G/A[156] identifiziert worden. Der Vollständigkeit halber sollen an dieser Stelle auch noch weitere Polymorphismen in der TNF $\alpha$ -Promotorregion Erwähnung finden. Es handelt sich hierbei um die +70C7/C8-, –237G/A-, –243G/A-, –274G/A-, –1032C/T-Polymorphismen, die in der Literatur nur sehr selten beschrieben werden. Es fällt auf, dass in der Region zwischen –376 und –163 Bp eine große Anzahl von G/A Polymorphismen des TNF $\alpha$  Promotor beobachtet wurden[5].

Der –863C/A-TNF-Polymorphismus beeinflusst die Bindung des NF- $\kappa$ B p50-p50-Homodimers, einem Transkriptionsrepressor, der nach der Ankopplung an seine DNA-Bindungsdomäne im TNF $\alpha$ -Promotor aktiviert wird. Die Bindung des NF- $\kappa$ B

p50-p50-Homodimers an seine Domäne wird signifikant inhibiert durch den TNF-863A-Promotor-Polymorphismus und führt zu einem unvollständigen Herunterregulieren der TNF-Expression, woraus eine sinkende TNF $\alpha$ -Produktion resultiert. Diese Beobachtungen wurden an HepG2-Zellen in vitro und gesunden Männern in vivo vorgenommen. Eine veränderte TNF $\alpha$ -Transkription in vitro in B- und T-Zellsystemen von Ratten konnte nicht nachgewiesen werden. Dies gilt auch für -862, -856/+70, -574, -307 und -237 TNF $\alpha$ -Promotor-Polymorphismen, die im Tierversuch keine messbaren Effekte auf die TNF $\alpha$ -Genexpression hatten [74],[155],[173],[41].

Eine Assoziation zwischen dem -863 C/A-Polymorphismus und einer Thyroid-assoziierten Ophthalmopathie, Morbus Crohn und der juvenilen rheumatoiden Arthritis wurde beschrieben[77]. Ein Einfluss des -863A-Allels auf die mögliche Entwicklung eines peptischen Ulkus aufgrund einer *Helicobacter pylori*-Infektion[108] zeigte sich ebenso wie auf die Prognose eines akuten Leberversagens[171].

Ein weiterer TNF-Polymorphismus befindet sich in Position -857 in der Promotorregion des TNF-Gens und substituiert Cytosin (C) gegen Thymin (T) . Es konnte gezeigt werden, dass in den aktivierten mononukleären Blutzellen japanischer Spender die Transkription des selteneren TNF -857T höher liegt als die der herkömmlichen Allele. Eine klare Assoziation zwischen dem seltenen -857T-Allel und dem Auftreten der Sarkoidose konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Daraus kann ein „linkage disequilibrium“ zwischen dem HLA-DR11 und 14 mit dem -857T-Polymorphismus abgeleitet werden. Auch auf die Bindungsaffinität des NF- $\kappa$ B hat dieser Polymorphismus einen Einfluss[74].

Der -376G/A-TNF-Polymorphismus ist in der Promotorregion des TNF-Gens lokalisiert und gilt als ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer zerebralen Malaria[100].

Ein anderer Gen-Polymorphismus wurde in Position +489G/A im ersten Intron des TNF-Gens gefunden. Er ist mit dem Tragen von HLA-DRB1, -DQB1, B18 und B35 assoziiert[108]. Der +489G/A-Polymorphismus ist mit dem Prostatakarzinom assoziiert. Träger des TNF-+489A-Allels haben ein erhöhtes Risiko eine COPD zu

entwickeln[101], während homozygote Träger vor dem schweren Verlauf einer rheumatoiden Arthritis geschützt werden [59].

In Position -1031 der  $TNF\alpha$ -Promotorregion zeichnet sich das Allel durch den Austausch von Cytosin (C) gegen Thymin (T) aus. Träger des -1031C-Allels weisen bei einer *Helicobacter pylori*-Infektion eine schwerere gastrische Neutrophileninfiltration auf als die Träger eines homozygoten -1031TT-Allels. Das -1031C-Allel gilt als unabhängiger Risikofaktor ein gastrisches oder duodenales Ulkus zu entwickeln[109]. Außerdem liegt die Allelfrequenz des -1031C bei einer Patientengruppe mit fulminanter Hepatitis und schlechter Prognose signifikant höher als bei der gesunden Kontrolle[171].

Der -163G→A Polymorphismus ist ein sehr seltenes Phänomen, so dass er in verschiedenen Studien weder bei Patienten noch in der Kontrollgruppe gefunden werden konnte[26],[88].

Der +70 Polymorphismus besteht aus einer Cytosin-Insertion in ein C-stretch (Dehnung). Hier wird C7 in C8 verändert[26].

Die Meinungen über den Effekt, den ein  $TNF\alpha$  Polymorphismus auf bestimmte Erkrankungen hat, gehen auseinander. Manche Wissenschaftler nehmen eine Beeinflussung durch den  $TNF\alpha$ -Genotyp an, andere sprechen ihm jegliche funktionelle Konsequenz ab und vermuten, dass seine Existenz in der engen Verbindung zu den HLA-Haplotypen begründet liegt. Der am Besten untersuchte Polymorphismus ist zweifellos der -308G→A-Polymorphismus, dessen Beeinflussung einiger Autoimmunerkrankungen kontrovers diskutiert, auf eine Beziehung zu Immunerkrankungen jedoch hingewiesen wird. Sei es die Empfänglichkeit für eine zerebrale Malaria, die Schwere einer Meningokokken-Infektion oder die Entwicklung einer Tuberkulose, immer konnte ein Effekt durch den  $TNF\alpha$ -Polymorphismus nachgewiesen werden. Das Gleiche gilt für Infektionen mit *Leishmanien* und *Chlamydien*. Eine ausgeprägte Verbindung des  $TNF\alpha$ -Promotors an den MHC konnte diese Effekte nicht erklären, weshalb ein direkter Einfluss des  $TNF\alpha$ -Polymorphismus angenommen werden konnte [5],[166][162][147][22].

## 1.4. Klinische Bedeutung des TNF $\alpha$ bei Infektionen

### 1.4.1. Virale Infektionen

TNF $\alpha$  beeinflusst die Immunabwehr und die reproduktiven Prozesse bei viralen, bakteriellen und parasitären Infektionen[35].

Virale Erkrankungen unterscheiden drei Infektionsmuster. Die akute Infektion, wie die Influenza, erscheint als selbstlimitierende Erkrankung, die in der Lage ist, durch die wirtseigene Immunabwehr die Pathogene zu eliminieren.

Herpesvirusinfektionen (*Herpes simplex Typ I und II*, Ebstein-Barr-Virus und Varizella Zoster u.a.) zeichnen sich durch eine akute Primärinfektion aus, gefolgt von einer verlängerten oder lebenslangen Periode der Latenz durch die Kontrolle des Wirtsabwehrsystems über die Pathogene. Das Fehlen der immunologischen Kontrolle führt zu einer Reaktivierung, oft mit einer anderen Ausdrucksform der Erkrankung (*Herpes zoster*).

Eine kleine Anzahl viraler Agenzien sind in der Lage eine Primärinfektion zu verursachen und für den Rest des Lebens ihres Wirtes in einem persistenten replikativen Stadium zu verbleiben. Erkrankungen wie die Hepatitis B und C und HIV Typ I und II sind die Folgen[30].

Nach viralen, bakteriellen oder parasitären Infektionen kommt es zu einer verstärkten Synthese des TNF $\alpha$  durch die Makrophagen[78],[62],[131] als einer Hauptkomponente des Immunsystems. So ist bekannt, dass TNF $\alpha$  in allen Stadien der HIV-Infektionen ansteigt, besonders aber wenn zusätzlich opportunistische Infektionen wie die Tuberkulose aufgetreten sind. In Assoziation mit Interferon sollen durch direkte antivirale Aktivitäten und die Induktion der Apoptose in infizierten Zellen die Kontrolle über die virale Infektion gewonnen werden. Die Viren ihrerseits greifen in den TNF/TNFR-Stoffwechselweg ein um die Proliferation infizierter Zellen zu begünstigen (EBV), seine antiviralen Effekte durch Bindung von TNF an virale Proteine zu vermindern (Poxviren) oder das Immunsystem durch das Töten

uninfizierten T- Zellen auszulaugen (HIV). Auf diese Weise versuchen die Viren der Immunkontrolle zu entgehen und sich im Wirtsorganismus zu verbreiten[78].

Eine ausgedehnte  $\text{TNF}\alpha$ -Expression beschleunigt den Progress einer HIV-Infektion sowie den Verlust der Immunkompetenz und trägt zur klinischen Manifestation im Sinne einer Kachexie und Fieber bei. Die HIV-Infektion wird durch eine progressive Depletion (Entleerung) von  $\text{CD4}^+$  T-Zellen charakterisiert, die in einem zellulären Immunitätsmangel resultiert. Es gibt auch Zunahmen an zellulären und löslichen Markern der Immunaktivierung, die mit der Größe und Dauer der Virämie korrespondieren. Unter den Zellmarkern befindet sich unter anderem TNF, der über den Stand der Aktivierung der T-Zellen und Makrophagen Auskunft geben kann, sowie in Körperflüssigkeiten neben anderen das lösliche TNFR2. Diese beiden können als nützliche Marker für die Immunaktivierung während einer HIV Infektion fungieren[78].

Eine entsprechende Behandlung bedarf bei hohen  $\text{TNF}\alpha$ -Titern eine vorherige Behandlung mit Interferon, da diese sonst wesentlich schlechter anschlägt als bei niedrigen Titern. Patienten mit hohen Titern proinflammatorischer Zytokine, insbesondere  $\text{TNF}\alpha$ , antworten vor der Behandlung mit Interferon weniger wahrscheinlich auf eine Behandlung verglichen mit denen mit niedrigerem Level dieser Zytokine. Eine Anti-TNF-Therapie kann bei leichteren Formen der Infektion von Nutzen sein, ist jedoch bei schwer immunsupprimierten Patienten nicht empfehlenswert[30].

#### **1.4.2. Bakterielle Infektionen**

Die Gabe von  $\text{TNF}\alpha$  an gesunde Probanden ruft metabolische und hormonelle Veränderungen hervor, wie sie bei akuten Infektionen anzutreffen sind. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das frühe Auftreten von  $\text{TNF}\alpha$  bei einer Sepsis für das komplette folgenden Spektrum einer akuten Infektion den Anstoß gibt[174].

Bakterielle Infektionen, besonders solche mit gram-negativen aeroben Bakterien, sind die häufigste Ursache für einen septischen Schock[9]. Das klinische Erscheinungsbild aufgrund einer bakteriellen Infektion wird maßgeblich durch den Tumornekrosefaktor  $\alpha$  beeinflusst[164]. Die Wirtsantwort auf einen bakteriellen Infekt ist natürlicherweise ein Anstieg des  $\text{TNF}\alpha$ -Spiegels zur Abwehr der Keime. Gelingt dies nicht, kommt es zu einer überschießenden Produktion von  $\text{TNF}\alpha$ , die je nach ihrem Ausmaß mit der Schwere der Infektion, ihrem Verlauf und der Mortalitätsrate der Patienten korreliert[13],[120],[110],[85].

Verschiedene Bakterien besitzen Rezeptoren für proinflammatorische Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$  und sind in der Lage in Anwesenheit des  $\text{TNF}\alpha$  ihr Wachstum noch zu steigern[115]. Das in kleinen Mengen protektiv wirkende Zytokin kann sich in großen Mengen auf die  $\text{TNF}$ -Rezeptor tragenden Zielzellen und, als Stimulator für die Produktion anderer Zytokine und inflammatorischer Mediatoren wie reaktiver Oxygen-Arten, extrem schädlich auswirken[35]. Eine resultierende Sepsis im Sinne einer systemischen Antwort des Körpers auf eine Infektion weist Symptome wie Tachykardie, Tachypnoe, Temperaturveränderungen und Leukopenie oder -zytose auf. Die daraus erwachsenden signifikanten Komplikationen sind die Dysfunktion des zentralen Nervensystems, akute respiratorische Insuffizienz (ARDS), Leberversagen, akutes Nierenversagen, systemische Vasodilatation, Steigerung der Gefäßpermeabilität, Aktivierung des Gerinnungssystems mit Volumenmangel, die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) und schließlich ein Multiorganversagen (MOV) [124],[6],[82].

Posttraumatisch erhöhte Zytokinspiegel können als frühe Marker für infektiöse Komplikationen wie Schweregrad der Erkrankung und Mortalität gelten. Hierzu zählen  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6, die im Plasma und nach neurochirurgischen Eingriffen zusammen mit IL-8 und IL-1 $\beta$  im Liquor nachgewiesen werden können. Als ebenfalls gute Marker für die Schwere einer septischen Erkrankung gelten die  $\text{TNF}$ -Rezeptoren TNFR I und TNFR II[65].

Neben einer adäquaten antibiotischen und chirurgischen Behandlung der Sepsis wurden zahlreiche Versuche unternommen die hohe Komplikationsrate und Mortalität der Sepsis durch weitere Therapieansätze zu vermindern.

Antikörper gegen LPS, IL-1 Rezeptorantagonisten, Platelet activating factor (PAF) Antagonisten, Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper und polyklonales Immunglobulin (IG) wurden entwickelt und in zahlreichen Studien erprobt, doch ein durchschlagender Erfolg blieb aus. Neuere Studien haben gezeigt, dass eine Betrachtung sowohl der klinischen Symptome als auch der Spiegel inflammatorischer Zytokine wie dem IL-6, eine große Bedeutung für eine erfolgreiche Therapie zukommt. So konnte bei Patienten mit schwerer Sepsis und einem IL-6 Spiegel > 1000pg/mL die Mortalitätsrate und das MOV durch eine Anti-TNF-Therapie gesenkt werden[121].

### 1.4.3. Parasitäre Infektionen

Die Immunantwort auf Infektionen mit verschiedenen Protozoen wie *Toxoplasma gondii*, *Plasmodien*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* und *Encephalitozoon cuniculi* beinhaltet eine apoptotische Clearance des infizierten Bereichs durch den programmierten Zelltod. Hierbei spielt neben vielen anderen Mechanismen auch der als TNF $\alpha$ -TNF-Rezeptor 1-Komplex eine wichtige Rolle. Das TNF $\alpha$  bindet im Bereich der Infektion an den TNF-Rezeptor 1 und aktiviert hierüber die Caspase[67].

Die Anwesenheit des Tumornekrosefaktors  $\alpha$  hat jedoch auch klinische Bedeutung, was am Beispiel der Malaria verdeutlicht werden soll. Durch die Gabe von rekombinantem TNF $\alpha$  (rTNF) im Tiermodell aber auch an humanen Probanden konnten Malaria-ähnliche Symptome ausgelöst werden. Hierbei zeigten sich neben einer fehlerhaften Erythropoese und Erythrophagozytose zunehmende Serumlaktatspiegel, Hypotension, adrenale medulläre Nekrose, renale tubuläre Nekrose und Hepatomegalie. Allgemeine Symptome wie sie unter anderem auch bei der Malaria auftreten können (Müdigkeit, Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Thrombozytopenie, Anorexie, Myalgie, Nausea, Vomitus und Diarrhoe) konnten durch die Gabe von TNF ebenfalls ausgelöst werden. Es konnte gezeigt werden, dass TNF $\alpha$  als Mediator des Malariafiebers im Rahmen der Schizontenruptur von humanen Monozyten ausgeschüttet wird und zu diesem Zeitpunkt in der Zirkulation erhöht messbar ist. TNF $\alpha$  ist außerdem in der Lage die Pathogenese der zerebralen Malaria mit zu bestimmen, in dem es den gestörten Metabolismus des Patienten durch Hypoglykämie und Laktatazidose weiter beeinträchtigt. Durch die Stimulation

des Gefäßendothels trägt es zur Produktion von Stickoxyd bei, welches in das umliegende Hirngewebe diffundiert und durch Inhibierung des Glutamat-induzierten Calciumeintritts in postsynaptische Neuronen zum Koma führt. Des Weiteren kann ein Einfluss auf die Malariaanämie durch  $TNF\alpha$  angenommen werden[101]. Laborchemische Veränderungen wie Hypertriglyzeridämie und niedrige Serumeisenspiegel traten auf. Eine Aktivierung der Gerinnungskaskade, wie es oft bei Malariapatienten vorkommt, konnte ausgelöst werden. Sowohl durch die Verabreichung von rTNF als auch durch IL-2, dass TNF induziert, veränderte sich der mentale Status der Patienten. Es kam zu Verhaltensveränderungen und schweren kognitiven Schäden[38]. Eine immunmodulatorische Therapie durch einen monoklonalen Antikörper gegen  $TNF\alpha$  zeigte einen schnelleren Rückgang des Fiebers, konnte die Mortalitätsrate oder zerebrale Komplikationen jedoch nicht vermindern. Lösliche TNF-Rezeptoren gelten als Inhibitoren des  $TNF\alpha$ , können aber auch durch eine unvollständige Hemmung seine biologische Aktivität auf das Gefäßendothel verlängern, was im weiteren zur Erhöhung von zerebralen Komplikationen führen kann. Die kombinierte Gabe herkömmlicher Malariatherapeutika, wie Quinine, mit Pentoxifyllin, einem Xanthinderivat, deutet auf eine Verbesserung der Prognose der zerebralen Malaria beim Erwachsenen hin[45],[101].

Die Artemisinin Derivate reduzieren die *Plasmodium falciparum*-Parasitämie erheblich rascher als die Quinine. Durch die Gabe von Artemether, dem Methylether des Dihydroartemesin (der aktive Metabolit des Artemesins), konnte erreicht werden, dass Kinder mit zerebraler Malaria schneller aus dem Koma erwachten als wenn sie mit Quininen behandelt waren. Eine Interaktion zwischen der Gabe von Artemether kombiniert mit einem Anti-TNF-Antikörper konnte nicht nachgewiesen werden[175].

Die Schwere der Malaria ist mit den zirkulierenden  $TNF\alpha$ -Spiegeln assoziiert. Kinder, die an den zerebralen Folgen einer Malaria starben, hatten eine 10-fach höhere  $TNF\alpha$ -Plasmakonzentration als jene mit einer unkomplizierten Malaria und eine zweifach höhere als jene, die die zerebrale Malaria überlebten[120],[151].

## 1.5. Klinische Bedeutung des TNF $\alpha$ bei Malignomen

Verschiedene Tumorzelllinien produzieren TNF $\alpha$ [131]. So schütten die neoplastischen Lymphozyten der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) in vitro spontan TNF $\alpha$  aus, das als autokriner Wachstumsfaktor bei der CLL wirkt. In Bezug auf die Haarzell-Leukämie wird ebenfalls eine autokrine und auch parakrine Wachstumsstimulation durch TNF $\alpha$  diskutiert. Auch werden von einigen Tumoren vermehrt Zytokinrezeptoren ausgeschüttet, die zum Wachstum des Tumors beitragen. Im Rahmen der Abwehrreaktion können in den Tumor eingewanderte Makrophagen inflammatorische Zytokine freisetzen. Einige Tumorzellen werden durch TNF $\alpha$  zur Metastasierung angeregt.

Durch eine hohe Affinität zu den TNF $\alpha$  Rezeptoren zeigen thyreoidale Tumoren andere Ergebnisse. Klinisch sind die humanen papillären Thyroidzellen gewöhnlich mit lymphatischen Metastasen assoziiert, aber selten mit Fernmetastasen. Es gibt Hinweise darauf, dass die kontinuierliche Interaktion humaner papillärer Tumorzellen mit den Immunzellen und ihren Zytokinprodukten dazu dienen die Ausbreitung der Erkrankung auf die Lymphknoten zu limitieren. Eine zytotoxische und zytostatische Aktivität des TNF $\alpha$  wurde auch gegenüber vielen anderen -auch metastasierenden- Tumoren in vitro festgestellt.

Patienten, die einen gesteigerten TNF $\alpha$ -Spiegel haben, zeigen eine signifikante Anämie und Thrombozytopenie, die als direkte suppressive Effekte des TNF $\alpha$  auf die Erythrozyten- und Thrombozytenlinien zurückgeführt werden können. Auch wurden bei Erkrankungen wie malignen Tumoren, die mit einer Kachexie assoziiert sind, erhöhte Serum-TNF-Spiegel gemessen. Allerdings konnte von der Höhe der Spiegel nicht auf die Schwere des Gewichtsverlustes geschlossen werden. Im peripheren Gewebe triggert es neben der Kachexie und Anämie den Verlust von Proteinen und Fettgewebe[32].

Ansteigende TNF $\alpha$ -Plasmaspiegel bei CLL-Patienten korrelieren mit bekannten prognostischen Effekten wie erhöhtem CD38 oder  $\beta$ 2M und treten zusammen mit genomischen Aberrationen auf. Geltend für solide und einige hämatologische Tumoren kann man vom TNF $\alpha$ -Spiegel als einem Prädiktor der Prognose und des

Verlaufs sprechen. Die klinische Bewertung von Tumorerkrankungen durch Zytokine ist allerdings nur im infektionsfreien Intervall sinnvoll.

Es ist möglich, dass Tumor-Patienten, die einen gesteigerten  $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel haben von einer therapeutischen Behandlung mit spezifischen  $\text{TNF}\alpha$ -Inhibitoren, wie dem löslichen  $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptor 75 und dem monoklonalen Anti- $\text{TNF}\alpha$  Antikörper infliximab profitieren können[61],[65],[168],[128],[95],[47],[148],[144],[11].

Der „TNF-related apoptosis-inducing ligand“ TRAIL, ein Transmembranprotein aus der TNF-Familie, induziert mittels zweier Zelloberflächen-Rezeptoren, die von thyreoidalen Karzinomen und thyreoidalen Karzinomzelllinien exprimiert werden, die Apoptose in veränderten und malignen Zellen, nicht jedoch in normalen. TRAIL tötet die meisten getesteten thyreoidalen Zelllinien effektiv. Daher ist es ein vielversprechendes neues Agens gegen thyreoidale Karzinome, die die Resistenz gegenüber laufenden therapeutischen Modalitäten überwinden könnte.

Die systemische Gabe von  $\text{TNF}\alpha$  und FasL, dem Fas Liganden, auf den an anderer Stelle noch näher eingegangen wird, wird wahrscheinlich therapeutisch beim Schilddrüsenkarzinom nicht genutzt, passend zu seiner niedrigen, wenn überhaupt vorhandenen Antitumor-Aktivität und hohen Toxizität[117].

## **1.6. Therapieansätze**

### **1.6.1. Antikörper gegen $\text{TNF}\alpha$**

Seit die wichtige Rolle des  $\text{TNF}\alpha$  bei der schweren Sepsis in zahlreiche Studien bewiesen werden konnte, beschäftigen sich viele Wissenschaftler mit der Frage der Therapie. Es wurden im Tierversuch, bei Gesunden und bei septischen Patienten eine Vielzahl möglicher Behandlungen untersucht. Im Versuch zeigte sich, dass der  $\text{TNF}$ -Rezeptor 1 (TNFR1) in erster Linie für eine letale  $\text{TNF}$ -Toxizität verantwortlich ist, da Mäuse mit TNFR1-Mangel aber intaktem TNFR2 gegen einen

Endotoxinschock resistent waren[136]. Die Erkenntnis, dass ein einzelner Rezeptor für die Schwere eines Sepsisverlaufs verantwortlich ist, führte zur Entwicklung verschiedenster Anti-TNF monoklonaler Antikörper und löslicher TNF-Rezeptoren[51]. Es zeigte sich immer wieder, dass Patienten mit verschiedensten Erkrankungen von einer TNF-Blockade profitierten[60],[76].

#### p55-IgG:

Das dimere rekombinante chimäre Protein p55-IgG ist von der eukaryoten Zellexpression gereinigt. Das Monomer ist eine Verschmelzung von humanem löslichem p55 TNF-Rezeptor und IgG1 Schwer-Ketten Sequenzen. Die TNF-Rezeptorsequenz im Expressionskonstrukt vom p55 wurde der vom p75 Rezeptor vorgezogen, da zwar beide TNF-Rezeptor-Typen im Gleichgewicht TNF mit ähnlich hoher Affinität binden, das p55-TNF-Rezeptorkonstrukt jedoch eine signifikant höhere kinetische Stabilität hat. Einen nicht-signifikanten Trend zur Reduktion der 28-Tage Mortalität durch die Behandlung von Patienten mit einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock mit p55-IgG konnte nachgewiesen werden[1].

#### BAY x 1351:

Es handelt sich hierbei um einen IgG1 murinen monoklonalen TNF $\alpha$ -Antikörper, von dem Schockpatienten und solche mit septischem Syndrom in verschiedenen Testreihen profitiert haben.

Die INTERSEPT Studie[39] zeigt, dass die Behandlung von Patienten mit septischem Schock mit Anti-TNF $\alpha$ -monoklonalen Antikörpern innerhalb der Beobachtungszeit von 28 Tagen die Mortalitätsrate nicht signifikant senken konnte, auch wenn der Trend in diese Richtung ging. Jedoch kam es während der Behandlungszeit zu einer signifikanten Reduktion der Zeit bis zur Umkehr des Schocks, einer signifikanten Reduktion bei der Entwicklung des Organversagens und einer signifikanten Verzögerung des Beginns des ersten Organversagens.

#### CDP 571:

CDP 571 ist ein Antikörper gegen TNF, der dosisabhängig die TNF-Konzentration, dosisunabhängig die IL-1 und IL-6 Plasma-Konzentration beeinflusst. 42 Patienten mit rasch entwickeltem septischem Schock erhielten außer der Standardbehandlung Intravenös entweder Placebo oder eine Einzeldosis CDP571 unterschiedlicher Höhe.

Die 28-Tage Mortalität lag bei 62%. Die Mortalitäts- Raten waren in der Placebo und Medikamenten Gruppe gleich. 30 Minuten nach CDP571-Gabe konnte ein Abfall der zirkulierenden  $TNF\alpha$ -Konzentration bei allen Patienten nachgewiesen werden. Während die Konzentrationen des Interleukin 1 $\beta$  und IL-6 mit der Zeit in allen Dosierungsgruppen abnahmen, nahmen die Zytokin-Konzentrationen während der ersten 24 Stunden schneller in den Medikamenten-Gruppen als in der Placebogruppe ab[49].

Eine Gruppe von 31 Patienten wurde einmalig mit einem humanisierten monoklonalen Antikörper gegen TNF( CDP 571; IgG4) behandelt. Innerhalb eines Beobachtungszeitraums von zwei Wochen wurde bei 20 Patienten ein geringer aber signifikanter Abfall des Crohn-Aktivitätsindex festgestellt, 30 % der Patienten erreichten die Remission. Der therapeutische Effekt war gegenüber der Placebo-Gruppe aber passager, da nach 4-8 Wochen kein Unterschied mehr zur Placebogruppe festgestellt werden konnte.

Der Wirkmechanismus von CDP571 ist nicht hinreichend bekannt. IgG4 bindet kein Komplement, kann daher nicht zur antikörpervermittelten Zellyse führen. Es wird vermutet, dass der Therapieeffekt von CDP571 weniger anhaltend ist als der von Infliximab[157].

MAK195F :

Das Fab 2 Fragment eines monoklonalen Anti-TNF-Antikörpers senkt ebenfalls den IL-6 Plasmaspiegel[142].

$TNF\alpha$  MAb:

$TNF\alpha$  MAb ist ein muriner IgG1 monoklonaler Antikörper der gegen das humane  $TNF\alpha$  produziert wird[2]. In der hier angeführten Studie wurden insgesamt 994 Patienten mit Sepsis und septischem Schock mit  $TNF\alpha$  MAb oder Placebo behandelt. Das Gesamtergebnis und auch das Ergebnis in der Schock-Gruppe zeigte keinen signifikanten Abfall der Mortalität zwischen den mit  $TNF\alpha$  MAb und den mit Placebo behandelten Patienten.

CB0006:

Der murine Immunglobulin (IgG) monoklonale Antikörper gegen das humane TNF, wurde als erster an septischen Patienten erprobt und brachte in hohen Dosen einen Nutzen für Patienten mit hohen TNF-Plasmaspiegeln, wie sie zu Beginn einer Sepsis auftreten[63]. Dieser monoklonale Antikörper hat, wie Kwiatkowski und seine Mitarbeiter nachwies, eine fieberreduzierende Eigenschaft[102]. So wurde der TNF-Antikörper in einer Gruppe von Patienten mit zerebraler Malaria eingesetzt und senkte das Fieber schneller im Gegensatz zur Kontrollgruppe, die keine Anti-TNF-Therapie erhielten. Jedoch wiesen die mit Antikörpern behandelten Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine vergleichbare Mortalitätsrate auf.

BC-7:

Eine schneller fiebersenkende Wirkung hat das BC-7, ein muriner monoklonaler Antikörper gegen das humane TNF, bei gambischen Kindern mit zerebraler Malaria im Gegensatz zur Kontrollgruppe gezeigt. Somit kann eine teilweise Inhibition der fieberinduzierenden Wirkung des TNF angenommen werden, eine verringerte Mortalität konnte jedoch nicht beobachtet werden (19,9% vs.20,8%), es kam sogar zu einem signifikanten Anstieg residualer neurologischer Folgeerkrankungen (6,8% vs. 2,2%). Man spricht in diesem Zusammenhang dem BC-7 eine Verlängerung der Bioaktivität des TNF zu. So kann das BC-7 TNF teilweise inhibieren und gleichzeitig seine biologische Aktivität auf das Gefäßendothel verlängern, was dann zu den häufigeren neurologischen Folgeerkrankungen führt[101].

Die Ergebnisse zeigen beispielhaft die praktischen Probleme mit monoklonalen Antikörpern die Wirkungen zirkulierender Zytokine zu unterdrücken[102],[175]. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse einiger Arbeiten zu diesem Thema zusammengefasst:

Substanz	Indikation	Mortalitätsrate	
		Wirkstoff	Placebo
CB0006[63]	Schwere Sepsis/ septischer Schock	41%(0,1mg/kg) 41%(1,0mg/kg) 41%(10mg/kg) 41%(2x 1mg/kg im Abst. v.24Std.)	
CDP571[49]	Septischer Schock	62%(0,1mg/kg) 62%(0,3mg/kg) 62% (1mg/kg) [100% (3mg/kg)]	62%
MAK195F[143]	Sepsis/ septischer Schock	56% (0,1mg/kg) 47% (0,3mg/kg) 38% (1mg/kg)	41%
TNF $\alpha$ MAB[2]	Septisches Syndrom	31,3% (15mg/kg) 29,5% (7,5mg/kg)	33,1%
P55-IgG[1]	schwere Sepsis/	37%(0,042mg/kg) 23%(0,083mg/kg)	36%
	septischer Schock	37% (0,042mg/kg) 44% (0,083mg/kg)	42%
BAYx1351[39]	Schock/septisches Syndrom	42,4% (15 mg/kg) 31,5 % (3 mg/kg)	39,5 %
BC-7[102]	Sepsis bei zerebraler Malaria	19,9%	20,8%

Tab.1.2.: TNF $\alpha$ -Antikörper

### 1.6.2. TNF $\alpha$ -Rezeptoren

Neben den Antikörpern existieren zwei natürlich vorkommende lösliche TNF-Rezeptoren: sTNFR I und sTNFR II, die in der Lage sind, die TNF $\alpha$ -Aktivität zu inhibieren. Sie wurden im Urin und Serum des Menschen entdeckt und werden offenbar als Antwort auf viele inflammatorische Stimuli wie zum Beispiel physiologische (Poly)peptide (FMLP, C5a, CSF-GM) oder pharmakologische Agonisten (PMN, Kaliumionophore A23187), die auch für die Stimulation der TNF-Produktion bekannt sind, von der Zelloberfläche abgegeben[138]. Durch diese Freisetzung und die daraus resultierende verminderte Anzahl von Rezeptoren auf der Zelloberfläche, kann es zu einer vorübergehenden Desensibilisierung der Zellen auf TNF $\alpha$  kommen und so seine Aktivität inhibiert werden.

Dieser Prozess hat zusätzliche Bedeutung in vivo. Als freigesetzte lösliche Rezeptoren könnten sie die Bioaktivität des TNF $\alpha$  durch die Bindung an das Molekül inhibieren und eine Ligandenbindung an das zelluläre TNFR verhindern. Daher führt das Erscheinen solcher extrazellulären löslichen Rezeptoren zu einem Regulationsmechanismus für die Modulation einer exzessiven TNF $\alpha$ -Aktivität, die als Antwort auf schwere Verletzungen oder Infektionen entsteht.

Im Tierversuch wurde gezeigt, dass der lösliche TNFR I in der Lage ist den Verlauf eines Endotoxinschocks bei Pavianen günstig zu beeinflussen. Der TNFR II hatte, obwohl in sehr hohen Mengen angewendet, eine wesentlich geringere Wirkung[178]. Messungen beim septischen Patienten ergaben besonders bei den schwer Erkrankten einen früher ansteigenden und viel höheren TNF $\alpha$ -Spiegel im Vergleich zu dem der Rezeptoren. Außerdem wies der limitierte Anstieg der TNFR-Spiegel auf einen begrenzten Pool hin. Ein verspäteter Anstieg und eine unzureichende Konzentration der Antagonisten des TNF $\alpha$  könnten mitverantwortlich für die Entwicklung einer Sepsis sein[123].

Um eine längere Halbwertszeit zu erreichen, wurde in Anlehnung an diese Rezeptoren aus zwei extrazellulären Anteilen des TNF Typ I bzw. Typ II Rezeptors, kovalent verbunden mit dem Komplement-bindenden Anteil des IgG, ein Molekül

konstruiert, das in der Lage ist zwei TNF-Moleküle zu binden. Neben dem Vorteil einer beinahe bis vollständig nicht-antigenen Wirkung, liegt die Halbwertszeit dieser Moleküle bei mindestens 48 Stunden. Die Moleküle, die 55kDa umfassen, besitzen eine höhere kinetische Stabilität als jene mit 75 kDa[50].

## 2. Fragestellung

---

Aufgrund der interindividuellen Unterschiede der einzelnen Patienten bezüglich der Schwere einer Sepsis oder dem Auftreten eines Karzinoms stellt sich die Frage, ob genetische Hinweise auf eine Prädisposition des Patienten gegenüber einer solchen Erkrankung gegeben sind.

In dieser Arbeit wird der Frage nachgegangen, ob bei Patienten, die eine Sepsis entwickelt haben, vermehrt das TNF2-Allel nachweisbar ist und ebenso ob bei Patienten mit einem Schilddrüsen Karzinom ein gehäufter TNF2-Polymorphismus nachgewiesen werden kann.

Somit könnte der TNF $\alpha$ -Polymorphismus einen zusätzlichen Hinweis auf einen Hochrisikopatienten darstellen, vorausgesetzt er steht in Korrelation mit dem Auftreten einer Erkrankung. In diesem Fall wäre es möglich durch Bestimmung der Allelverteilung der einzelnen Patienten, solche mit erhöhtem Risiko zu erfassen und entsprechende Vorkehrungen bezüglich der Prophylaxe zu treffen.

## 3. Material und Methoden

---

### 3.1. Materialien

#### 3.1.1. Übersicht der Materialien

Cytidintriphosphat (CTP) (Promega Corp)

Adenosintriphosphat (ATP) (Promega Corp)

Guanosintriphosphat (GTP) (Promega Corp)

Thymidintriphosphat (TTP) (Promega Corp)

Nucleasefreies Wasser (NFW) (Promega Corp.)

Acrylamid für die Elektrophorese (SIGMA)

N-N-Methylen-Bisacrylamid (SIGMA)

5 x Tris Borate Puffer (SIGMA)

Glycerol (SIGMA)

H<sub>2</sub>O aqua ad injectabilia (delta infusion)

Amberlite (Serva)

Ethydiumbromid solution (SIGMA)

Quia amp Blood Kit (Qiagen)

Ampli-Taq-D N A-Polymerase (Perkin Elmer Roche)

Universal Buffer (Promega Corp.)

TNA Primer :

Sense 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3'

Antisense 5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3' (GIBCO BRL)

Ethanol (100%) Allied Signal (Riedel de Häen)

Filterpapier (Schleicher & Schüll)

Mineralöl (SIGMA)

Restriktionsenzym NCOI (Stratagene)

Hinf Kontrollmarker

### 3.1.2. Stammlösungen

Nukleotidtriphosphat ( dNTP )

920µl nucleasefreies Wasser, 20 µl dCTP, 20 µl dTTP, 20 µl dATP, 20 µl dGTP

Acrylamid / Bisacrylamid

Acrylamid/ Bisacrylamid 30 : 0,5 53,3 ml

5 x Tris Borate Puffer 40 ml

Glycerol 40 % 10 ml

H<sub>2</sub>O ( aqua ad injectabilia) 94,2 ml

Acrylamid / Bisacrylamid Stammlösung 30 : 0,5

In einem 1 l - Messzylinder wird zusammengegeben

150 g Acrylamid

2,5 g Bisacrylamid

2,5 g Amberlite

Auffüllen mit H<sub>2</sub>O auf 500 ml

Auf dem Magnetrührer für 1 h bei Raumtemperatur und mittlerer Geschwindigkeit rühren und durch einen Schleicher & Schüll - Filter in eine dunkle Flasche filtrieren.

Lagerung bei 4 °C

Polyacrylamid–Gel (PAG – Gel)

Ansatz für 8 %ige PAG - Lösung für 200 ml

Acrylamid/ Bisacrylamid 30 : 0,5 53,3 ml

5 x Tris Borate Puffer 40 ml

Glycerol 40 % 10 ml

H<sub>2</sub>O ( aqua ad injectabilia) 94,2 ml

150 g Acrylamid

2,5 g Bisacrylamid

2,5 g Amberlite

Auffüllen mit H<sub>2</sub>O auf 500 ml

Auf dem Magnetrührer für 1 h bei Raumtemperatur und mittlerer Geschwindigkeit rühren und durch einen Schleicher & Schüll - Filter in eine dunkle Flasche filtrieren. Lagerung bei 4 °C.

Ethydiumbromid-Lösung (Promega Corp)

300 ml H<sub>2</sub>O mit 60 ml Ethydiumbromid solution mischen.

**3.2. Einteilung und Definition der Probanden**

In die Untersuchung einbezogen wurden:

**Kontrollgruppe**

Diese Testgruppe setzt sich aus n= 75 gesunden Studenten zusammen, die wie folgt aufgeteilt sind:

	Kontrollgruppe
TNF1/1	52
TNF1/2	19
TNF2/2	4
Gesamt	75

Tab. 3.1.: Kontrollgruppe

**Intensiv-Gruppe**

Die erste untersuchte Gruppe besteht aus n=54 Patienten, die alle nach verschiedenen chirurgischen Eingriffen auf der Intensiv-Station der Universitäten Ulm oder Düsseldorf gelegen habe. Dabei handelt es sich um 17 Frauen und 37 Männer.

	Intensiv-Patienten
TNF1/1	41
TNF1/2	10
TNF2/2	3
Gesamt	54

Tab. 3.2.: Intensiv-Patienten

Diese Gruppe setzt sich mit Blick auf eine Sepsis wie folgt zusammen:

	SIRS	Sepsis	MOV	Tod	Infekt	Gesamt
TNF1/1	9	24	8	10	34	41
TNF1/2	3	6	1	3	8	10
TNF2/2	3	0	0	0	0	3
Summe	15	30	9	13	42	54

Tab.3.3.: Intensiv-Patienten Verteilung

Die Erkrankungsbilder der chirurgischen Patienten reichen von abdominellen Baucharterienaneurysmen (4), Ischämien der unteren(1) und oberen(1) Extremitäten, ischämischer Colitis bei Kolonperforation(1) und perforierten Ulcera duodeni(2) bis hin zu iatrogener Magenperforation(1). Biliäre nekrotisierende Pankreatitiden(5), Gallenblasenperforation(1) und noduläre Lebertransformation(1) kamen ebenso vor, wie Peritonitiden(2), ein Glutealinfekt(1), ein TEP-Infekt(1) oder eine Lungenblutung(1). Ein Patient wies ein Milzabszess(1), andere ein Pleuraempyem(1) oder ein Hautempyem des Halses und des Thorax bei COPD(1) auf. Außerdem fanden sich eine Nachblutung bei Z.n. Carotis TEA(1), eine intraperitoneale Blutung(1) und ein postoperativer Platzbauch(1) sowie eine Leberverletzung(1). Acht Patienten waren mit Polytrauma aufgenommen worden. Weitere siebzehn Patienten mit Karzinomen, die sich aus einer Gastrektomie und LK-Dissektion bei Cardia-Karzinom,(4), eines in Verbindung mit einem Kehlkopf-Karzinom, Bronchial-Karzinomen(1), Zustand nach selektiver Embolisation und Korporektomie des LWK 4 bei metastasierendem embryonalem Hodenteratom(1), Prostata-Resektion bei Prostata-Karzinom(1), Perikard-Teilresektion und Zwerchfell-Resektion bei Pleuramesotheliom(1) und abdominoperineale Rektumextirpation bei metastasierendem Rektum-Karzinom(2) sowie sechs Oesophagus-Karzinomen und einem Pankreaskopf-Karzinom zusammensetzt, gehörten ebenfalls zur Intensiv-Gruppe.

### 1.) Karzinom-Gruppe

Eine dritte Gruppe, die ausschließlich Karzinom-Patienten der Uni-Klinik Düsseldorf umfasst, soll hier separat betrachtet werden. Es handelt sich dabei um eine große Gruppe von Schilddrüsen-Karzinom-Patienten die am C-Zell-Karzinom(13),

papillären Karzinom(12) oder follikulären Karzinom(6) verschiedener Stadien operiert worden waren.

	Schilddrüsenkarzinom-Patienten
TNF1/1	15
TNF1/2	15
TNF2/2	1
Gesamt	31

Tab.3.4.: Schilddrüsenkarzinom-Patienten

Es wurden folgende Parameter erfasst: Diagnose, Art und Häufigkeit der Operationen, Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation, Entwicklung eines SIRS, einer Sepsis oder eines Multiorgan-Versagens (MOV) nach der unten aufgeführten Definition der ASSP/ACCM, Bakteriennachweis.

Bei den Karzinom-Patienten wurde die Art des Tumors erfasst, wobei es sich hier um C-Zell-, papilläre und follikuläre Schilddrüsenkarzinome unterschiedlicher Stadien handelt.

### **3.3. Methoden**

#### **3.3.1. DNA-Isolation**

Es wurden jeweils insgesamt 3 ml Vollblut in EDTA-Röhrchen abgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Etwa 200  $\mu\text{l}$  Blut der jeweiligen Probe werden in 1,5 ml Röhrchen pipettiert. 25  $\mu\text{l}$  Proteinase K und 200  $\mu\text{l}$  Buffer AL werden zugegeben und für 15 Sekunden gevortext bis sich alles aufgelöst hat. Die Röhrchen werden in einem Wasserbad zur Denaturierung bei  $70^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten belassen. 210  $\mu\text{l}$  reines Ethanol (100%) wird zugegeben und die Röhrchen werden erneut gevortext. Die Waschsäulen werden in 2 ml Sammelröhrchen gesteckt und die Mixtur aus den 1,5 ml Röhrchen vorsichtig ohne Berührung des Inneren der Gefäße hineingegeben. Nachdem die Röhrchen für

1 Minute bei 8.000 rpm/RT zentrifugiert wurden, werden die Waschsäulen wieder in neue 2 ml Sammelröhrchen gesteckt und geöffnet. 500 µl Buffer AW werden zugeben und bei 8.000 rpm/RT für 1 Minute zentrifugiert. Die 2 ml Sammelröhrchen werden erneut gewechselt. Wieder werden 500 µl Buffer AW hinzugegeben und bei 8.000 rpm/RT 1 Minute und anschließend bei 15.000 rpm/RT für 2 Minuten zentrifugiert. Die Waschsäulen werden nun in eigene 1,5 ml „microfuge“ Röhrchen gesteckt. Die DNA wird mit 200 µl 70°C heißem destilliertem Wasser herausgespült und für 1 Minute stehen gelassen. Dann werden die Röhrchen samt Waschsäulen nochmals für 1 Minute bei 8.000 rpm/RT zentrifugiert.

### **3.3.2. TNF $\alpha$ -PCR**

10 µl Universal Buffer, 10 µl Standard NTP , 1µl Primer TNA A, 1 µl Primer TNA S, 0,5 µl Taq Polymerase und 77,5 µl nucleasefreies Wasser werden in einem Ansatz zusammengegeben. 5 µl der Patienten-Probe werden hinzugefügt. In der PCR-Maschine werden die so vorbereiteten Proben wie folgt weiter behandelt:

1 Zyklus: 94 °C für 3 min, 60°C für 1 min, 72 °C für 1 min

35 Zyklen: 94 °C für 1 min, 60°C für 1 min, 72 °C für 1 min

1 Zyklus: 94 °C für 1 min, 60°C für 1 min, 72 °C für 5 min

Abkühlen auf 4 °C

Als Nachweis für das Vorhandensein der DNA in der Probe wird diese in einem 8% PAG-Gel in der Elektrophorese dargestellt. Dazu werden jeweils 2µl Gel Loading solution mit 10 µl der Proben gemischt und in das Gel pipettiert. Mit ca. 120 Volt läuft das Gel für ca. 30 Minuten.

### **3.3.3. Entwicklung der Gele**

Zur Färbung werden die Gele für 6 Minuten in einer Ethydiumbromid-Lösung auf dem Schüttler bei mittlerer Geschwindigkeit belassen und danach zweimal mit zweifach

destilliertem Wasser jeweils für 6 Minuten gespült. Anschließend wird das Gel auf einem UV-Projektor fotografiert.

#### **3.3.4. TNF $\alpha$ -DNA-Reinigung**

Die Proben der PCR-Ansätze (jetzt noch ca. 90  $\mu$ l) werden mit jeweils 270  $\mu$ l 100 %igem (im Kühlschrank bei -20 °C aufbewahrt) Ethanol gemischt und für mindestens 30 Minuten bei -70 °C gelagert. Anschließend werden die Proben bei 13.000 rpm/RT für 10 Minuten zentrifugiert. Das Ethanol wird weitgehend abpipettiert und dann ca. 80-90  $\mu$ l 70 %iges Ethanol (aus dem -20 °C Kühlschrank) zugegeben. Nachdem die Proben wiederum bei 13.000 rpm/RT für 10 Minuten zentrifugiert wurden, sollten „pallets“ am Grunde der Röhrrchen zu erkennen sein.

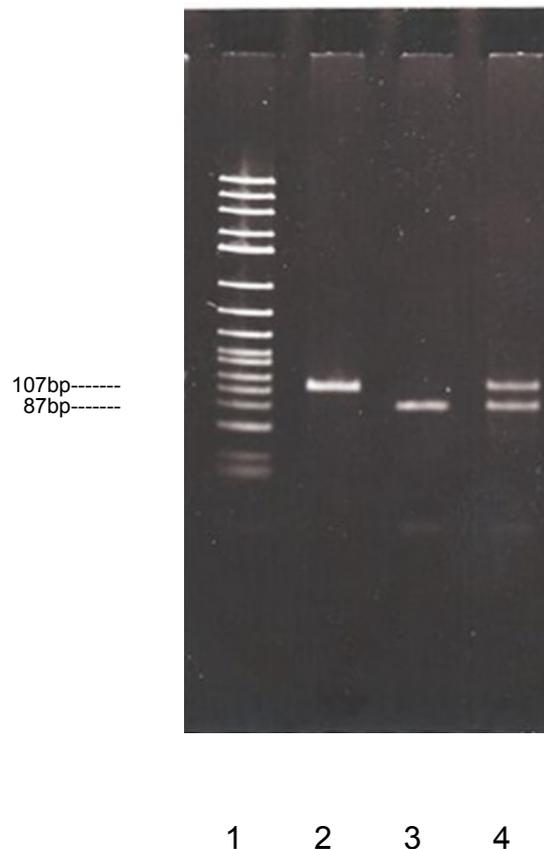
Die Flüssigkeit wird bis auf einen kleinen Rest abpipettiert und die restliche Flüssigkeit mit spitz zugeschnittenen Filterpapierstreifen (Schleicher & Schüll) entfernt. Die DNA trocknet in den geöffneten Röhrrchen für ca. 20 Minuten. Dann werden ca. 40  $\mu$ l nucleasefreies Wasser zugegeben und die „DNA-pallets“ darin aufgelöst.

#### **3.3.5. TNF $\alpha$ -Restriktion**

20  $\mu$ l nucleasefreies Wasser werden in die Röhrrchen gegeben, dann werden 2  $\mu$ l Buffer hinzugefügt und schließlich fünf Units des NCO I (8 U/ $\mu$ l) Enzyms hinzugegeben. 10  $\mu$ l der DNA werden hineinpipettiert und gut vermischt. Während des ganzen Arbeitsvorganges wird das Restriktionsenzym in einem Kühlaggregat aufbewahrt. Nachdem das Gemisch angefertigt wurde, sollte ein Tropfen gefiltertes Mineralöl darauf gegeben werden. Bei 37° C werden die Röhrrchen dann für mindestens eineinhalb Stunden im Wasserbad belassen. Vor der weiteren Behandlung sollte die Flüssigkeit unter dem Öl herauspipettiert und in saubere Röhrrchen gegeben werden.

### 3.3.6. Darstellung der TNF $\alpha$ -Restriktion im Gel

Zur Darstellung werden die gewonnenen DNA-Fragmente erneut in ein Gel pipettiert. Das wie oben beschrieben entwickelt wird. Es zeigen sich verschiedene Banden-Positionen mit den Längen 87 und 107 bp. Allel 1 zeigt Produkte von 87 und Allel 2 Produkte von 107 bp[36].



1= HINF Kontrollmarker; 2=TNFA2/A2; 3=TNFA1/A1; 4=TNFA 1/A2

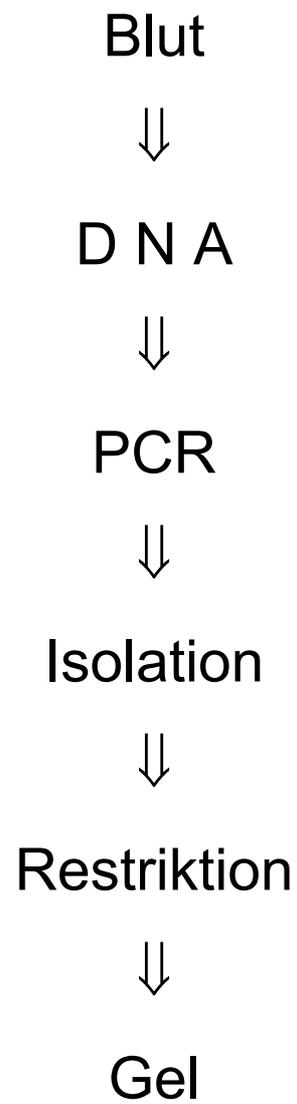


Bild 4: Versuchsablauf in der Übersicht

## 4. Ergebnisse

---

### 4.1. Modelle

Die experimentellen Daten wurden in einer Tabelle zusammengefasst.

Allel	Anzahl der Patienten		
	Kontrolle	Karzinome	Intensiv
TNF1/1	52 (69,3%)	15 (48,4%)	41 (75,9%)
TNF1/2	19 (25,3%)	15 (48,4%)	10 (18,5%)
TNF2/2	4 (5,3%)	1 (3,2%)	3 (5,6%)
Gesamt (n)	75 (100%)	31 (100%)	54 (100%)

Tabelle 4.1.: Daten

Zur Analyse der Daten in der Tabelle 4.1 wurde ein logistisches Regressionsmodell benutzt[104]. Die Berechnungen selbst wurden mittels der Software R Version 1.6.0 Funktion GLM, die unter [www.cran.r-project.org](http://www.cran.r-project.org) im Internet zu finden ist, durchgeführt. Als Grundlinienbegrenzung wurde die Kontrollgruppe für den Spalteneffekt und Allel TNFA1/A1 für den Reiheneffekt verwendet. Zwei Modelle wurden hinzugezogen.

Modell I entspricht:

$$\log (v_{ij}) = \mu + \theta_i + \phi_j$$

$i = 1,2$  entspricht hier der Gruppe und  $j = 1, 2$  den Allelen.

Dieses Modell berechnet die Spalten und Reihen als fixe Größen, es repräsentiert die Unabhängigkeit zwischen Spalten und Reihen.

Modell II

$$\log(v_{ij}) = \mu + \theta_i + \phi_j + \gamma_{ij}$$

schließt den Begriff der Interaktion in ein gesättigtes Modell mit ein.

Hier bezieht sich  $\gamma_{ij}$  auf eine Matrix von Parametern, die die ganze abhängige Beziehung zwischen Gruppen und Allelen beschreibt.

## 4.2. Statistische Ergebnisse

Koeffizienten:

Analyse nach Modell I: Unabhängigkeit

	Schätzwert	Standardfehler	Standardnormalverteilung	p-Wert
$\gamma$ (Intercept)	3.9244	0.1278	30.699	< 2e-16 ***
$\theta_1$ (Gr CA)	-0.8835	0.2135	-4.138	3.51e-05 ***
$\theta_2$ (Gr Int)	-0.3285	0.1785	-1.841	0.0657
$\phi_1$ (Allel A1/2)	-0.8979	0.1788	-5.021	5.15e-07 ***
$\phi_2$ (Allel A2/2)	-2.6027	0.3664	-7.103	1.22e-12 ***

Tab.4.2.:

Variablen:  $\theta_1$ (Gr CA) = Gruppe der Karzinom-Patienten;  $\theta_2$ (Gr Int) = Gruppe der Intensivpatienten;  $\phi_1$ (Allel A1/2)

= TNF 1/2;  $\phi_2$ (Allel A2/2) = TNF 2/2

Signifikanz: 0 \*\*\*\* 0.001 \*\*\* 0.01 \*\* 0.05 \* 0.1 . 1

(Streuungsparameter der Poisson-Familie wird als 1 angenommen)

Nulldevianz: 132.6039 auf 8 Freiheitsgrade, Residualdevianz: 8.6425 auf 4 Freiheitsgrade

AIC:56.31, Anzahl der Fisher Scoring Iterations: 4

Nach dem Einsetzen der Daten in Modell 1 ergibt sich eine Residualdevianz von 8,64 mit 4 Freiheitsgraden, was bedeutet, dass sich die Daten nicht sehr gut in das Modell einfügen.

Aufgrund der Abweichungen werden nun die Daten im Modell II analysiert.

Analyse nach Modell II: alle Interaktionen

Koeffizienten:

	Schätzwert	Standardfehler	Standardnormalverteilung	p-Wert
$\gamma$ (Intercept)	3.95124	0.13868	28.493	<2e – 16 ***
$\theta_1$ (Gr CA)	-1.24319	0.29308	-4.242	2.22e-05 ***
$\theta_2$ (Gr Int)	-0.23767	0.20886	-1.138	0.255134
$\phi_1$ (Allel A1/2)	-1.00680	0.26807	-3.756	0.000173***
$\phi_2$ (Allel A2/2)	-2.56495	0.51887	-4.943	7.68e-07***
$\gamma$ (Gr CA Allel A1/2)	1.00680	0.45299	2.223	0.026243 *
$\gamma$ (Gr Int Allel A1/2)	-0.40418	0.44300	-0.912	0.361576
$\gamma$ (Gr CA Allel A2/2)	-0.14310	1.15581	-0.124	0.901465
$\gamma$ (Gr Int Allel A2/2)	-0.05001	0.79180	-0.063	0.949639

Tab.4.3.:

- $\gamma$  (Gr CA Allel A1/2) = Berechnung der Interaktion zwischen den Gruppen Karzinom-Patienten und TNF 1/2
- $\gamma$  (Gr Int Allel A1/2) = Berechnung der Interaktion zwischen den Gruppen Intensivpatienten und TNF 1/2
- $\gamma$  (Gr CA Allel A2/2) = Berechnung der Interaktion zwischen den Gruppen Karzinom-Patienten und TNF 2/2
- $\gamma$  (Gr Int Allel A2/2) = Berechnung der Interaktion zwischen den Gruppen Intensivpatienten und TNF 2/2

Signifikanz: 0 \*\*\*\* 0.001 \*\*\* 0.01 \*\* 0.05 \* 0.1 1

(Streuungsparameter der Poisson-Familie wird als 1 angenommen)

Nulldevianz: 1.3260e+02 auf 8 Freiheitsgrade, Residualdevianz 9.9920e-15 auf 0 Freiheitsgrade

AIC: 55.668, Anzahl der Fisher Scoring Iterations: 3

Bei Modell II handelt es sich um ein gesättigtes Modell, daher passen die Daten perfekt, die Residualdevianz ist 0.

1. Dieses Modell weist auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen

- a. Kontrolle vs. Karzinome
- b. A1/A2 vs. A1/A1
- c. A2/A2 vs. A1/A1

hin.

2. Es wurden statistisch signifikante Wechselwirkungen zwischen der Gruppe der Karzinome und der Allelverteilung A1/A2 gefunden.

Die Gruppen, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, nämlich Kontrolle und Intensiv-Patientengruppe, wurden zusammengefasst und die vorangegangenen Berechnungen erneut durchgeführt.

### 4.3. Weitergehende Analysen

Zunächst wurden die Daten mit Modell I analysiert:

Koeffizienten:

	Schätzwert	Standardfehler	Standardnormalverteilung	p-Wert
$\gamma$ (Intercept)	3.7736	0.1037	36.377	< 2e-16 ***
$\theta_1$ (Gr CA)	-0.7327	0.2000	-3.663	0.000249 ***
$\phi_1$ (Gr.CA Allel A1/2)	-0.8979	0.1788	-5.021	5.15e-07 ***
$\phi_2$ (Gr.CA Allel A2/2)	-2.6027	0.3664	-7.103	1.22e-12 ***

Tab. 4.4.:

Variabel:  $\phi_1$ (Gr CA, Allel A1/2) = TN1/2 aus der Gruppe der Karzinompatienten;  $\phi_2$  (Gr.CA Allel A2/2) = TN2/2 aus der Gruppe der Karzinompatienten

Signifikanz: 0 `\*\*\*\*` 0.001 `\*\*\*` 0.01 `\*\*` 0.05 `.` 0.1 `.` 1 ;

(Streuungsparameter der Poisson-Familie wird als 1 angenommen)

Nulldevianz: 132.604 bei 8 Freiheitsgrade; Residualdevianz: 12.076 bei 5 Freiheitsgraden

AIC: 57.744

Es zeigte sich, dass Modell I mit einer Residualdevianz von 12 bei 5 Freiheitsgraden nicht plausibel ist.

Also wurden die Daten erneut mit Modell II analysiert:

Koeffizient:

	Schätzwert	Standardfehler	Standardnormalverteilung	p-Wert
$\gamma$ (Intercept)	3.8395	0.1037	37.026	< 2e-16 ***
$\theta_1$ (Gr CA)	-1.1314	0.2782	-4.066	4.78e-05 ***
$\phi_1$ (Allel A1/1 vs.A1/2)	-1.1653	0.2127	-5.479	4.28e-08 ***
$\phi_2$ (Allel A1/2 vs.A2/2)	-2.5867	0.3919	-6.600	4.12e-11 ***
$\gamma_{11}$ (Gr CA Allel A1/1 vs A1/2)	1.1653	0.4226	2.758	0.00582 **
$\gamma_{12}$ (Gr CA Allel A1/2 vs A2/2)	-0.1214	1.1047	-0.110	0.91252

Tab.4.5.

Variablen:

$\phi_1$  (Allel A1/1 vs.A1/2)=TNF1/1 vs. TNF 1/2

$\phi_2$  (Allel A1/2 vs.A2/2)= TNF1/2 vs. TNF 2/2

$\gamma_{11}$  (Gr CA Allel A1/1 vs A1/2)=Interaktion zwischen den Trägern des Allel 1/1 und 1/2 in der Karzinomgruppe

$\gamma_{12}$  (Gr CA Allel A1/2 vs A2/2)= Interaktion zwischen den Trägern des Allel 1/2 und 2/2 in der Karzinomgruppe

Signifikanz: 0 \*\*\*\* 0.001 \*\*\* 0.01 \*\* 0.05 \* 0.1 ' 1 ;

(Streuungsparameter der Poisson-Familie wird als 1 angenommen)

Nulldevianz: 132.6039 bei 8 Freiheitsgraden; Residualdevianz: 4.2872 bei 3 Freiheitsgraden;

AIC: 53.955

Anzahl der Fisher Scoring Iterations: 4

Es zeigte sich:

Modell II weist auf Unterschiede zwischen der Karzinom-Gruppe und der Kontrolle + Intensiv-Patientengruppe hin.

Es gibt Unterschiede bei den Trägern der Allele

A1/A2 vs A1/A1 sowie

A2/A2 vs. A1/A1

Bei der Interaktion zeigen die Träger der Allele A1/A2 aus der Karzinom-Gruppe signifikante Unterschiede bei einem Level von 1%.

Die Odds Ratio mit 95%-Konfidenzintervall soll für die signifikanten Werte wie folgt, berechnet werden.

Die verwendeten Formeln können im Internet unter [www.medizin.uni-tuebingen.de/lehre/Hp\\_Allgemeinmedizin/Mosshammer/Odds%20Ratio.doc](http://www.medizin.uni-tuebingen.de/lehre/Hp_Allgemeinmedizin/Mosshammer/Odds%20Ratio.doc) heruntergeladen werden.

Odds Ratio:

$$OR = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$$

95%-Konfidenzintervall:

$$[\ln(OR) - 1,96 \times s, \ln(OR) + 1,96 \times s]$$

$$\text{mit } s = s_{\ln(OR)} = \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}$$

Patienten	TNF 1/1	TNF 2/2	Odds Ratio / KI - 95%	
Karzinom	15	1	1,13	0,94;1,35
Intensiv+Kontr.	93	7		

Tab.4.6

Die Träger des Allels TNF 1/1 in der Karzinomgruppe zeigen im Gegensatz zu den Trägern des Allels 2/2 kein erhöhtes Chancenverhältnis ein Karzinom zu entwickeln. Die Odds Ratio liegt hier bei 1,13 mit einem 95%-Konfidenzintervall von (0,94;1,35).

Patienten	TNF1/2	TNF 1/1	Odds Ratio / KI - 95%	
Karzinom	15	15	3,2	2,74;4,42
Intensiv+Kontr.	29	93		

Tab.4.7

Die Odds Ratio für die Allele TNF 1/2 vs TNF 1/1 in der Karzinomgruppe liegt bei 3,2 mit einem 95%-Konfidenzintervall von (2,74;4,42) . Dies spricht für ein häufigeres Auftreten von Karzinomen bei den TNF1/2-Trägern.

Patienten	TNF1/2	TNF 2/2	Odds Ratio / KI - 95%	
Karzinom	15	1	3,6	2,74/4,7
Intensiv+Kontr.	29	7		

Tab.4.8

Die Odds Ratio für die Allele TNF 2/2 vs TNF 1/1 liegt bei 3,6 mit einem 95%-Konfidenzintervall von (2,74;4,7). Auch hier weisen die Ergebnisse auf eine größere Chance hin, als Träger des TNF-Allels 1/2 ein Karzinom zu entwickeln.

#### **4.4. Zusammenfassung**

Die Gruppe der Intensiv-Patienten, die eine SIRS, eine Sepsis oder einen septischen Schock bis hin zum Multiorganversagen entwickelten, zeigten in Bezug auf die Allelverteilung keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Daher wurde sie mit der Kontrollgruppe zusammengelegt.

Die Karzinompatienten zeigten hingegen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Unterschiede. Eine weiterführende Berechnung wurde durchgeführt. Hier ergaben sich nun signifikante Unterschiede bei den Trägern des Allels A1/A2 aus der Gruppe der Karzinompatienten im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Mit anderen Worten lag die Anzahl der Träger des A1/A2 Allels in der Gruppe der Karzinompatienten über der der Gesunden.

## 5. Diskussion

---

### 5.1. TNF $\alpha$ -Polymorphismus in der Sepsis

Ein signifikanter Unterschied in der TNF $\alpha$ -Allelverteilung zwischen Patienten, die eine SIRS, eine Sepsis oder einen septischen Schock bis hin zum Multiorganversagen entwickelten und der Kontrollgruppe konnte hier nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Stüber und Mitarbeitern[160], die in ihrer Arbeit ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz des TNF2-Allels bei septischen Patienten im Vergleich mit einer Kontrollgruppe nachweisen konnten.

Und auch Tang und Mitarbeiter[164] beschreiben keine signifikanten Unterschiede in der Allelverteilung zwischen Sepsis-Patienten und der Kontrollgruppe. Jedoch zeigen sie auf, dass ein TNF2-Allel bei Patienten, die einen septischen Schock entwickelt haben, mit einem signifikant höheren TNF $\alpha$ -Spiegel und einer höheren Mortalitätsrate assoziiert ist. Dennoch zeigen Patienten mit TNF2-Allel weder eine höhere Inzidenz einen septischen Schock zu entwickeln, noch einen höheren TNF $\alpha$ -Basis-Spiegel nach Ablauf einer Infektion.

Mira und Mitarbeiter[116] hingegen sehen eine Assoziation zwischen dem TNF2-Allel des TNF $\alpha$ -Promotors und dem Verlauf des septischen Schocks. Das Vorkommen des TNF2-Polymorphismus war in Ihrer Arbeit in der Patientengruppe, die einen septischen Schock entwickelt und eine erhöhte Mortalitätsrate gezeigt hatte, signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Die Gruppe um Simon Nadels[120], die 98 Kinder untersuchte, die an Meningokokkensepsis erkrankt waren, fand hingegen heraus, dass die Präsenz des TNF2-Allels das Risiko eine invasive Meningokokkenerkrankung zu entwickeln nicht erhöhte, bei einem einmal mit dem Erreger infizierten Individuum jedoch die

Anwesenheit des Allels die Gefahr einer fulminanten Erkrankung steigerte. Neben dem schwereren Krankheitsverlauf starben solche Kinder häufiger, die ein TNF2-Allel besaßen, als jene ohne ein solches Allel. Nadel wies auch darauf hin, dass die Verbindung zwischen TNF $\alpha$  und anderen HLA-Molekülen für die TNF $\alpha$  Produktion bedeutend sein könnte.

Book und Mitarbeiter[20] bezeichneten in ihrer Studie den Anteil der heterozygoten für TNF $\alpha$ , die eine schwere Sepsis entwickelten, im Vergleich zur Normalbevölkerung als erhöht. Bei 70 Patienten mit schwerer Sepsis wich die Allelhäufigkeit der Allele TNF1 und TNF2 und die Verteilung des Genotyps von der Normalbevölkerung ab.

<b>Autor</b>	<b>Meßmethode</b>	<b>Patienten/Material</b>	<b>Ergebnisse</b>
Mira et al. Association of TNF2, ...,with septic shock susceptibility and mortality[116]		89 Patienten mit septischem Schock, 87 Kontrollen Vollblut	Korrelation zwischen TNF2 und der Empfänglichkeit für einen septischen Schock
Tang et al. TNF-Gene polymorphism and septic shock[164].	Leukozyten-Präparation und PCR Ethyidium-bromid-Färbung	112 kritisch kranke postop. Pat. mit SIRS (pos. Blutkultur); Definiert mit Apache II score 24h nach Aufnahme auf die ICU erste Blutprobe, 2h innerhalb Entwicklung einer Sepsis in der ICU zweite Probe	TNF2-Träger entwickelten weder häufiger einen septischen Schock noch eine höhere Mortalitätsrate. Bei Entwicklung eines septischen Schocks zeigten TNF2-Träger eine signifikant höhere Mortalitätsrate als homozygote Träger des TNF1. Hier war das TNF2-Allels mit signifikant höherem TNF $\alpha$ - Spiegel assoziiert.

Nadel et al. Variation in the TNF $\alpha$ gene promotor region may be associated with death from meningococcal disease[120].	PCR	98 Kinder mit milder oder schwerer MD, definiert nach PRISM score; Citrat-Vollblutprobe nach Eintritt einer akuten MD	Homozygote für TNF2 zeigen höhere Mortalitätsrate
Stüber et al, A genomic polymorphism within the TNF locus influences plasma TNF $\alpha$ concentration and outcome of patients with severe sepsis [161]	PCR	40 Patienten mit schwerer Sepsis infektiöser Ursache, Vollblut-Proben alle 2h über zwei Tage nach Diagnosestellung, dann alle 12h	Auftreten des TNFB-Allels ist mit schlechter Prognose und hoher TNF $\alpha$ -Konzentration assoziiert
M.Book, ...Polymorphismus des TNF $\alpha$ Promotors bei Patienten mit schwerer Sepsis[20]	PCR	70 Patienten mit schwerer Sepsis	Der Anteil Heterozygoter für TNF $\alpha$ zeigte sich im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht

Tab. 5.1.: TNF $\alpha$  Polymorphismus und TNF $\alpha$ -Spiegel bei Sepsis-Patienten, Studien-Übersicht.

Die dargestellten kontroversen Ergebnisse lassen viele Fragen offen. Warum gibt es so unterschiedliche Ergebnisse? Was unterscheidet die Untersuchungen voneinander?

Zum einen verwenden nicht alle Wissenschaftler dieselben Kriterien zur Einteilung der Patienten in Gruppen. Die einen gehen nach dem Apache II score, andere nach den klinischen und mikrobiologischen Kriterien vor. Die Patienten sind zwar randomisiert jedoch deren Anzahl niemals gleich. Ethnische Besonderheiten werden nicht in allen Arbeiten berücksichtigt.

TNF $\alpha$  sollte nicht nur separat betrachtet werden. Die Allelverteilung als solche ist nicht der Grund für einen vermeintlich schlechteren Verlauf einer Erkrankung, sondern der daraus resultierende TNF $\alpha$ -Spiegel, der vielfältige Wirkungen auf den Organismus ausübt. So beschäftigen sich viele Studien mit der Verlinkung des TNF $\alpha$  mit anderen Zytokinen, wie zum Beispiel dem HLA-DR, dem TNF $\beta$  oder den

Haplotypen des TNF. Und nicht zuletzt können auch genetische Faktoren und geschlechtspezifische Unterschiede einen Einfluss auf Krankheitsverläufe haben.

### **5.1.1. Auswirkungen des TNF $\alpha$ –308 Polymorphismus**

Die Frage nach den Auswirkungen der unterschiedlichen Allelkonstellationen bzw. dem Polymorphismus des TNF $\alpha$  soll hier zunächst noch einmal betrachtet werden. In vorangegangenen Untersuchungen wurde berichtet, dass das TNF2-Allel mit einer sechs mal höheren Expression der basalen als auch der induzierten messengerRNA von TNF assoziiert ist. Das bedeutet, dass der Träger eines TNF2-Allels einen signifikant höheren TNF $\alpha$ -Spiegel im Serum entwickeln kann[164],[183].

Das TNF2-Allel des TNF $\alpha$ -Promotors ist mit dem Verlauf des septischen Schocks assoziiert. Studien zeigen, dass die Frequenz des TNF2-Polymorphismus und die Mortalitätsrate in der Gruppe der Patienten liegt, die einen septischen Schock entwickelt hatte, im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant höher lagen [116]. Jedoch zeigen Patienten mit TNF2-Allel weder eine höhere Inzidenz einen septischen Schock zu entwickeln noch einen höheren TNF $\alpha$  Basis-Spiegel nach Ablauf einer Infektion[164]. Kornelissen und seine Mitarbeiter [97] erklären solche Ergebnisse damit, dass bei schwerer Sepsis auch die Menge der in Umlauf befindlichen Bakterien und damit die LPS höher liegen. Dadurch besteht eine stärkere Stimulation für die Produktion von TNF $\alpha$ .

Eine Einflussnahme durch den TNF $\alpha$  Polymorphismus in Position –308 also verschiedene Deletionsmuster auf die LPS-Aktivität besteht laut Stüber und Mitarbeiter[160] nicht. Die Größenordnung in der TNF $\alpha$  und auch andere proinflammatorische Zytokine auftreten, wird auch durch den Zeitpunkt bestimmt, an dem die Blutproben abgenommen werden, vielleicht weil diese Zytokine während der akuten Phase eines septischen Schocks nur für eine begrenzte Zeit auftreten. Es besteht eine negative Korrelation zwischen initialen Zytokin-Spiegeln und dem Intervall zwischen dem Auftreten von Purpura und der Blutabnahmen[97].

### 5.1.2. Assoziation des –308 Locus mit anderen Loci

Stüber und Mitarbeiter[161] kamen zu dem Ergebnis, dass bei einer schweren Sepsis das TNFB-Allel mit einer schlechten Prognose und hoher TNF $\alpha$ -Konzentration assoziiert ist. Untersuchungen des Materials vierzig schwer erkrankter Sepsis-Patienten ergaben eine Assoziation zwischen dem TNFB-Allel und einer schlechten Prognose sowie einer hohen TNF $\alpha$ -Konzentration.

In einer weiteren Arbeit von Stüber[160], in der das Auftreten von –308 und NcoI Polymorphismen und Genotyp-Verteilung sowie eine dadurch bedingte Verknüpfung mit der Anfälligkeit für eine schweren Sepsis verglichen wird, findet sich kein signifikanter Unterschied in der Frequenz des TNF2-Allels bei septischen Patienten im Vergleich zur Kontrolle. Eine Assoziation zwischen dem –308 TNF-Polymorphismus und der Erkrankungsinzidenz konnte nicht gezeigt werden. Stüber erklärte sich die Diskrepanz der Ergebnisse seiner beiden Studie mit der engen Nachbarschaft zwischen dem TNFB2 (NcoI) Allel und dem TNF1(-308) Allel, aus der eine bemerkenswerte Korrelation zwischen dem Auftreten von TNFB2/2 und TNFA1/1 und einer erhöhten Mortalitätsrate resultiert. Er beschreibt die Lage des NcoI Markers im Intron 1 des menschlichen TNF $\beta$  Gens 2708 Bp oberhalb des –308 Markers.

Auch Jude Fitzgibbon und Mitarbeiter[64] beschreiben eine starke Verbindung zwischen TNF $\alpha$  und TNF $\beta$ . Beim Auftreten von TNF2 und TNF $\beta$  5.5kbp steigt die Zytokinproduktion an. Sowohl TNF2 als auch TNF $\beta$  5.5kbp sind an den HLA Haplotyp A1-B8-DR3-DQ2 gebunden. Eine schlechtere Prognose für Patienten, die homozygot für TNF $\beta$  2 sind, widerspricht demnach nicht einer fehlenden Verbindung zwischen einem –308 Polymorphismus und einem schlechten Erkrankungsverlauf, da ein Vorkommen von TNFB2 mit einer erhöhten Freisetzung von TNF $\alpha$  korreliert[135].

Im Gegensatz dazu konnten Weitkamp und seine Mitarbeiter[185] die Ergebnisse der oben angeführten Arbeiten nicht bestätigen. Ihre Studie über intensivpflichtige Neugeborene mit Sepsis, die multifaktorielle Risiken aufwies, zeigte keine eindeutigen Assoziationen des TNFB-Polymorphismus mit dem Erkrankungsverlauf.

Der Autor geht davon aus, dass nur eine Studie mit extrem hoher Anzahl von Patienten einen Vergleich mit den Ergebnissen bei Erwachsenen zulässt.

Mit diesen Arbeiten kann man eine Einflussnahme auf die Produktion des  $TNF\alpha$  durch bestimmte Allelkonstellationen nicht nur des  $TNF\alpha$ , sondern auch des  $TNF\beta$  annehmen.

Wie schon oben erwähnt, sind  $TNF2$  und  $TNF\beta$  an den HLA-Haplotypen gebunden. Jacob und Mitarbeiter[87] zeigten, dass HLA-DR2 und DQw1-positive Individuen weniger  $TNF\alpha$  produzieren, als HLA-DR3 oder- DR4 positive Individuen. Ähnliche Beobachtungen führt auch die Arbeitsgruppen um Abraham[3] und Wilson[192]an. Möglicherweise beeinflussen die HLA-Klasse II Gene die Regulation der  $TNF\alpha$ -Sekretion.

D. Huang und Mitarbeiter[84] beschreiben eine enge Verknüpfung zwischen HLA-B8 und  $TNF\alpha$  -308 Allel 2 bei der Myasthenia gravis. Weniger stark ist das HLA-DR3 mit dem  $TNF\alpha$ -Allel verbunden, was auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass das humane TNF-Gen dem HLA-B enger benachbart ist als dem HLA-DR[122],[33].

In der Studie von Stefano Sotigu und Mitarbeitern[156], die auf der Beobachtung von Marrosu und Mitarbeitern[111]aufbaut , wonach das Auftreten der Multiplen Sklerose (MS) auf Sardinien mit dem HLA-DR3 und -DR4 verknüpft ist, wurde eine Überproduktion von  $TNF\alpha$  durch Mitogen-induzierte periphere Lymphomonozyten bei HLA-DR4 positiven sardinischen MS-Patienten beobachtet. Andererseits findet sich keine signifikante Verbindung zwischen  $TNF$ -Allel 2 und der  $TNF\alpha$ -Produktion. Eine pathogene Rolle des  $TNF\alpha$  wird angenommen.

G. Chen und Mitarbeiter[35] verglichen gesunde schwangere Frauen mit solchen, die eine Präeklampsie entwickelt hatten und mit nicht schwangeren Frauen. Sie stellten dabei eine erhöhte Homozygotie für das Allel  $TNF\alpha 1$  bei den Patientinnen mit Präeklampsie im Gegensatz zu den gesunden schwangeren und nicht schwangeren Frauen fest. Eine weitere Untersuchung der Proben, geordnet nach der Allelverteilung, ergab, dass  $TNF\alpha$  mRNA in der Gruppe der Homozygoten für das

Allel 1 signifikant häufiger zu finden war als in den anderen Gruppen. Die mit anderen Studien nicht übereinstimmenden Resultate erklärt sich der Autor mit den bioreaktiven oder immunoreaktiven Methoden, die dort angewendet wurden. Er ist der Ansicht, dass fehlerhafte Ergebnisse, zum Beispiel aufgrund einer geringen Halbwertszeit von  $\text{TNF}\alpha$ , durch die Untersuchung von  $\text{TNF mRNA}$  umgangen werden können.

Es wurde in früheren Arbeiten gezeigt, dass das Maß der  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion mit der MHC-Klasse-II assoziiert ist. HLA-DR3 and DR4 positive Personen produzieren höhere  $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel, während DR2 und DQw1-positive Individuen eine geringere  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion zeigen. Da vaskulär bekannterweise endotheliale Schäden eine Rolle im pathophysiologischen Mechanismus der Präeklampsie spielen und  $\text{TNF}\alpha$  diesen Mechanismus beeinflusst, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass  $\text{TNF}\alpha$  einen Vermittler für die endotheliale Dysfunktion darstellt.

Diese Studien und ihre teilweise bemerkenswerten Ergebnisse deuten auf Faktoren hin, die neben der ausschließlichen Betrachtung des  $\text{TNF}\alpha$ -Polymorphismus in Bezug auf seinen Einfluss auf Krankheitsentstehung und -verlauf noch in Betracht gezogen werden müssen.

Wie bereits oben erwähnt schrieben Kornelissen und seine Mitarbeiter[97] über die Meningokokkeninfektion, dass die anfängliche Konzentration von  $\text{TNF}\alpha$  bei solchen Patienten signifikant höher lag, die an einer Meningokokkensepsis verstorben waren, als bei jenen, die diese Sepsis überlebten. Er erklärt sich dieses Phänomen damit, dass bei schwerer Sepsis auch die Menge der in Umlauf befindlichen Bakterien und damit die LPS höher lagen. Dadurch bestand eine stärkere Stimulation für die Produktion von  $\text{TNF}\alpha$ . Die Präsenz genetischer Variationen in der Promotorregion des  $\text{TNF}$ -Gens ( $\text{TNF2}$ -Allel) tragen ebenfalls zu einer erhöhten Produktion des  $\text{TNF}\alpha$  bei, wie schon bei Patienten mit zerebraler Malaria beobachtet. Das  $\text{TNF2}$ -Allel ist mit höherer natürlicher Expression und größerer Sekretion des  $\text{TNF}\alpha$  nach Induktion assoziiert. Die Schwere der Erkrankung und Ausprägung stehen in Beziehung zur Konzentration des  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-10 und sTNFR-55 und sTNFR-75.

E. Louis und seine Mitarbeiter[105], die im Hinblick auf die Untergruppen des Morbus Crohn ein vermehrtes Auftreten von TNF2 bei Steroid-induzierten M.Crohn feststellen konnten, halten eine Verbindung zu einem anderen Genpolymorphismus in einem „Verknüpfungsungleichgewicht“(in linkage disequilibrium) mit TNF2 für möglich und weisen auf die beschriebene Verbindung zwischen dem TAP Transportergen Polymorphismus, der nahe dem TNF-Gen liegt, und der Reaktion auf Steroid-Behandlung bei M.Crohn hin.

Das Alter des Patienten könnte ebenfalls eine große Rolle bei Morbidität und Mortalität verschiedener Erkrankungen spielen, da mit zunehmendem Alter der TNF $\alpha$ -Plasma-Spiegel ansteigt[149]. Chorinchat und Mitarbeiter[36] konnten im Tierversuch nachweisen, dass alternde Mäuse zehnmal sensitiver auf LPS reagieren und höhere TNF $\alpha$ -Spiegel produzieren als junge Mäuse. Spätere Arbeiten[119] dokumentieren ebenfalls einen signifikant erhöhten TNF $\alpha$ -Spiegel älterer Probanden (57-70 Jahre) mit einer geringen Aktivität der natürlichen Killerzellen im Gegensatz zur jungen Kontrollgruppe (19-35 Jahre).

Nicht zuletzt können auch geschlechtsspezifische Unterschiede eine große Rolle bei der Höhe des TNF $\alpha$ -Spiegels spielen. So existieren zahlreiche Arbeiten, die erhöhte TNF $\alpha$ -Spiegel beim Mann verglichen mit einer weiblichen Kontrolle gefunden haben. Sowohl im Tierversuch mit septischen Mäusen [55] als auch in Versuchsreihen mit gesunden [8] oder postoperativ Probanden [126] wurden die Ergebnisse bestätigt. Man sieht hier einen Zusammenhang zwischen steigenden Östrogen-Spiegeln und dem günstigeren Verlauf schwerer Erkrankungen bei weiblichen Patienten.

Schließlich sprechen die genetischen Gegebenheiten eine Rolle. Die Vererbbarkeit der Zytokin-Produktion wurde in Relation zum Krankheitsverlauf von Westendorp und Mitarbeitern[187] anhand der Zytokin-Produktion von Verwandten ersten Grades und von eineiigen Zwillingsgeschwistern, der an einer Meningokokkeninfektion erkrankten Patienten untersucht. Dabei zeigte sich, dass Familien mit niedriger TNF-Produktion ein zehnmal höheres Risiko für eine lebensbedrohliche Meningokokken-Erkrankung aufwiesen als jene mit einer hohen TNF-Produktion. Zwischen den Verwandten von Überlebenden und nicht Überlebenden einer Meningokokken-Erkrankung konnten keine Unterschiede bezüglich des TNF $\alpha$  -308 Polymorphismus gefunden werden

und nur ein geringer Unterschied bezüglich des TNF  $-238$  Polymorphismus. Eine Infektion wird nicht aufgrund genetischer Gegebenheiten entwickelt, jedoch führt eine genetische Variation der inflammatorischen Antwort zu signifikanten Unterschieden im Verlauf einer Infektionserkrankung[83].

## 5.2. TNF $\alpha$ -Polymorphismus bei anderen Erkrankungen

Wenn Untersuchungen über den TNF $\alpha$ -Polymorphismus bei Sepsis-Patienten solche unterschiedlichen Ergebnisse hervorbringen, wie verhält es sich dann bei der Betrachtung anderer Erkrankungen in Bezug auf den TNF $\alpha$ -Polymorphismus. Treten auch hier differente Ergebnisse auf? Korreliert auch hier ein hoher TNF $\alpha$ -Spiegel mit einem schlechten Verlauf?

Wissenschaftliche Arbeiten mit verschiedenen Populationen haben eine Korrelation zwischen hohen TNF-Konzentrationen im Kreislauf und der Schwere einer zerebralen Malaria ergeben. McGuire und Mitarbeiter[112] untersuchten in ihrer Studie gambische Kinder, die an Malaria erkrankt waren. Sie wiesen darauf hin, dass die Patienten, welche eine zerebrale Malaria entwickelt hatten, in signifikant höherer Frequenz homozygote Träger des TNF2-Allels waren als die Probanden der Kontroll-Gruppe. Die Frequenz derer, die starben oder neurologische Folgen entwickelten, lag sogar noch höher. Und all jene mit zerebraler Malaria und besonders jene die starben oder eine neurologische Folge entwickelten, hatten, ebenso wie bei Kern und Mitarbeitern[94] beschrieben, höhere TNF $\alpha$ -Spiegel als die Patienten mit einer milden Malaria. Dies entspricht auch der Studie von Grau und Mitarbeitern[71], die eine Assoziation zwischen der Konzentration des TNF $\alpha$ -Spiegels und der Schwere der Erkrankung bzw. der Mortalität nachweisen konnte. Das TNF2-Allel existiert bei den Gambiern in einer Genfrequenz von 0.16 trotz seiner Assoziation mit der zerebralen Malaria. McGuire geht davon aus, dass der Nachteil für die TNF2-Homozygoten durch biologische Vorteile ausgeglichen wird, da TNF $\alpha$  bei Malaria und anderen Infektionen eine Anzahl antimikrobieller Mechanismen fördert.

Stirnadel und Mitarbeiter[159] wiesen mit ihrer Studie über Malaria-Infektionen in Tanzania ein selteneres Auftreten von Fieber bei nicht mit *Plasmodium falciparum*

infizierten Kindern und Heterozygotie für  $TNF\alpha$  nach. Sie erklärten, dass ein mittlerer  $TNF\alpha$ -Spiegel gegen eine ganze Reihe von Infektionen schützen kann und daher heterozygote Träger für das  $TNF2$ -Allel eine Infektion besser kontrollieren können als homozygote Träger des  $TNF1$ - oder  $TNF2$ -Allels. Ein ausgeglichener Polymorphismus kann somit erklären, wie das  $TNF2$ -Allel in der Population bleiben konnte. Die Hypothese wird dadurch bestärkt, dass weniger Fieberepisoden als erwartet bei für das  $TNF\alpha$ -Promotor-Gen heterozygoten Kindern ohne Parasitämie beobachtet wurden. Dies bestätigt damit die Ergebnisse von Kwiatkowski und Mitarbeitern[101], die durch Inhibition des Pyrogens  $TNF\alpha$  das Fieber von gambischen an Malaria erkrankten Kindern verringern konnten.

Diese Beobachtungen legen eine Beeinträchtigung der Malariainfektion durch die  $TNF\alpha$ -Promotorgenotypen nahe. Die Wissenschaftler fanden nicht signifikante Unterschiede in der Parasitendichte zwischen den  $TNF\alpha$ -Promotorgenotypen, wobei die homozygoten Träger des  $TNF2$  die höchste Dichte aufwiesen.

Im Gegensatz zu McGuires Studie fanden Wattavidanage und Mitarbeiter[184] nicht nur bei den Homozygoten Trägern des  $TNF2$  einen schwereren Verlauf und häufigere Komplikationen vor. Untersuchungen ergaben in einer Sri Lanka-Population unter den Individuen mit einer schweren Infektionskrankheit, einschließlich Malaria, eine mehr als zweimal so hohe  $TNF2$ -Frequenz als in der Kontroll-Gruppe oder unter Individuen mit einer klinisch milden Malariainfektion. Außerdem waren die Individuen, die sowohl ein  $TNF\alpha$  2- als auch ein  $TNF\beta$  2-Allel trugen, in der Gruppe der Schwerkranken überrepräsentiert relativ zu den Individuen denen eins dieser Allele fehlte. Bei den Gesunden oder leicht Erkrankten war eine solche Allelkonstellation unterrepräsentiert. Die teilweise gegensätzlichen Ergebnisse der Studie im Vergleich zu McGuires Ergebnissen, erklärte er sich durch eine unterschiedliche Pathologie und Epidemiologie der Westafrikanischen und der Sri Lankesischen Malariainfektion.

Dennoch könnten die Ergebnisse darauf hindeuten, dass die Kombination  $TNF\alpha2/TNF\beta2$  einen Einfluss auf die Schwere einer Erkrankung wie Malaria hat. Wattavidanage stellt die Frage nach der Vererbbarkeit solcher Kombinationen. Warum besteht diese Allel-Kombination, die doch offenbar einen höchst schädlichen

Einfluss auf den Verlauf der Malaria hat, weiterhin und ist nicht in der Evolutionsgeschichte eliminiert worden. Ein kompensierender Vorteil durch eine solche Kombination liegt nahe, wie Bouma und Mitarbeiter[23] nachwiesen, als sie niederländische Patienten mit entzündlicher Darmerkrankung auf den TNF $\alpha$ -Polymorphismus untersuchten. Sie fanden viele Kombinationen des TNF $\alpha$  und TNF $\beta$ , die in die Haplotypen TNFC, E, I und P eingeteilt wurden, jedoch keine TNF $\alpha$ 2/ $\beta$ 2-Kombination. Es zeigte sich, dass die Träger des TNFC-Haplotypen nur geringe Mengen TNF $\alpha$  produzierten, während die TNFE-Träger sehr hohe TNF $\alpha$ -Spiegel produzierten. Ein signifikanter Unterschied in der TNF $\alpha$ -Produktion zwischen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn-Patienten sowie der gesunden Kontrolle bestand nicht.

In einer weiteren Studie sprechen G. Bouma und Mitarbeiter[24] von einer kleinen aber statistisch signifikanten Assoziation zwischen einem Polymorphismus in Position -308 in der Promotorregion des TNF $\alpha$ -Gens und Colitis ulcerosa. Das seltener vorkommende Allel 2 findet sich in verringertem Maße bei Colitis ulcerosa Patienten als bei Gesunden. Wegen der Stärke der Assoziation glaubt Bouma nicht daran, dass TNF $\alpha$  ein Marker für eine Prädisposition der Colitis ulcerosa oder des Morbus Crohn's ist. Andererseits fand Bouma interindividuelle Unterschiede in Verlauf und Prognose der entzündlichen Darmerkrankungen, und konnte das Ansprechen auf medizinische Behandlung nachweisen. Es wurden große Unterschiede in der Menge der produzierten Zytokine beobachtet. Da gezeigt werden konnte, dass die Sekretion von TNF $\alpha$  und TNF $\beta$  streng mit den TNF-Haplotypen korreliert, ließ sich daraus schließen, dass ein unterschiedlicher genetischer Background das Maß der Immunantwort bestimmt und für die verschiedenen Manifestationsarten der einzelnen Erkrankungen im Rahmen der entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle spielt.

Die Studie von E. Louis und Mitarbeitern[105] über TNF $\alpha$ -Polymorphismus bei Morbus Crohn betrachtet zudem die Untergruppen der Erkrankung. Es zeigt sich ein Unterschied zwischen Steroid- (vermehrtes Auftreten von TNF2) und nicht Steroid-induziertem M.Crohn, zwischen dem vermehrten Auftreten von Fisteln und Strikturen sowie zwischen dem Befall des Kolon und dem abgegrenzten Befall eines Darmanteils. Ob der Darmanteil nun entzündet oder nicht entzündet ist, hat auf das

gehäufte Auftreten von TNF1 oder TNF2 keinen Einfluss. Ein erhöhtes Vorkommen von TNF2 in entzündeten Arealen beinhaltet aber immer eine höhere TNF $\alpha$ -Produktion als dies bei TNF1/1-Trägern der Fall wäre. Dabei merkt der Autor an, dass sich das unterschiedliche Vorkommen von TNF2 in den verschiedenen Untergruppen in einem nur wenig markanten Bereich abspielt und daher angenommen werden muss, dass noch andere Faktoren eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang sollten die früheren Ergebnisse von Louis und Mitarbeitern[106] genannt werden. Dort wurde ein Abfall von TNF2-Allel-Vorkommen bei Patienten mit Morbus Crohn gemessen und dieses überraschende Ergebnis mit der Verknüpfung zwischen TNF $\alpha$  und dem HLA A1 DR DQ2-Haplotyp erklärt, die in die Regulation der TNF $\alpha$ -Transkription eingreift und bei Frauen mit distaler Colitis und Patienten mit M.Crohn des Kolons vermindert vorliegt.

Ross Mc Manus und seine Mitarbeiter[113] untersuchten 52 Patienten, welche an Zöliakie erkrankt waren und wiesen ein vermehrtes Vorkommen von TNF2 in der Zöliakie-Population nach.

Die Gruppe um DeRen Huang[84] studierte die polymorphen Unterschiede des TNF $\alpha$ -Gens in Position -308 im Vergleich zum HLA-DR3 und B8 bei Patienten mit Myasthenia gravis sowie die Sekretion von TNF $\alpha$  bei anti-CD3 stimulierten peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) in Relation zum Polymorphismus. Das untersuchte Patientenkollektiv zeigt einen Anstieg von TNF2 im Unterschied zur gesunden Kontrollgruppe, wobei die Patienten mit Hyperplasie des Thymus einen Anstieg von TNF2 aufweisen, diejenigen mit Thymom jedoch nicht. Außerdem lässt sich bei Patienten mit frühem Beginn der Erkrankung und bei Frauen eine stärkere Verbindung zu TNF2 und Myasthenia gravis feststellen. Im Gegenzug kann eine protektive Wirkung des TNF1-Allels angenommen werden. Ähnliche Ergebnisse zeigt die Studie von Skeie und Mitarbeitern[154]. Neben dem Vorkommen des TNF2-Allels in Korrelation mit einem frühen Beginn der Erkrankung und ohne Titin-Antikörper, konnte bei diesen Patienten auch vermehrt TNFB1 gemessen werden. Im Gegensatz dazu, wiesen Patienten mit Thymom und Titin-Antikörpern vermehrt TNF $\alpha$ 1 und TNFB2-Allele auf.

M. Cabrera und Mitarbeiter[29] fanden bei Patienten mit einer mucocutanen Leishmaniose (MCL) erhöhtes Vorkommen von TNFA2 und höhere zirkulierende TNF $\alpha$ -Spiegel. Daraus schlossen sie, dass die funktionelle Basis der Assoziation zwischen dem Krankheitsphänotyp und der HLA-Klasse-I- und -III-Gene, die hier beobachtet wurden, eventuell mit einer Verknüpfung der TNF $\alpha$  transkribierenden Elemente einhergeht. Der -308 bp Polymorphismus des TNF $\alpha$ -Gens wurde bereits als ein funktionell wichtiges Element der Promotorregion beschrieben, das die TNF $\alpha$ -Transkription beeinflusst. Dieser Polymorphismus ist daher wahrscheinlich direkt verantwortlich für die MCL, und dies bereits, wenn das Individuum nur ein TNF2-Allel besitzt.

Die Studie von Atsushi Tanaka und Mitarbeitern[163] über das Fortschreiten von primär billiärer Zirrhose in Korrelation mit dem Polymorphismus der TNF $\alpha$ -Promotorregion zeigte zwar keine Unterschiede, was die Verteilung der TNF $\alpha$ -Allele betraf, jedoch zeigte sich bei den Patienten mit TNF2-Allelen ein höherer Mayo – score und somit auch ein fortgeschritteneres klinisches Stadium. Diese Ergebnisse interpretierte die Arbeitsgruppe dahingehend, dass das Vorkommen von TNF2 mit einer schlechteren Prognose einhergeht.

Bernal und Mitarbeiter[16] konnten in ihrer Studie über den Verlauf von Acetaminophen-induziertem akutem Leberversagen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verteilung des TNF $\alpha$ -Genotyps und der Schwere der Leberschädigung, des Multiorganversagens (MOV) oder der Enzephalopathie im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Sie nahmen aufgrund der Ergebnisse anderer Studien an, dass die Entwicklung eines MOV, das sich aus einem acetoaminophen-induziertem akutem Leberversagen entwickelt hat, sowohl von toxikologischen als auch von immunchemischen Einflüssen bestimmt wird. Ein nicht nachweisbarer Anstieg von TNF $\alpha$  muss in diesem Zusammenhang jedoch nicht bedeuten, dass die Immunreaktion als signifikante Komponente wegfällt. Sie kann durchaus auch durch andere Komponenten wie andere Polymorphismen innerhalb des TNF-Locus oder andere Zytokine Einfluss haben.

Im Gegensatz zur engen Verbindung zwischen TNFB-Genotyp-Vorkommen und MOV bei schwerer Sepsis, zeigt das Nicht-Vorhandensein erhöhter TNFB-Genotyp-

Spiegel in dieser Studie, dass ein MOV in diesem Fall nicht durch eine schwere Sepsis ausgelöst worden ist. Auch zwischen der schwere des Leberschadens und TNF-Genotypen zeigte sich keine Verbindung. Andererseits wurde eine signifikante jedoch schwache Verbindung zwischen dem TNFB-Genotyp und der schwere der Enzephalopathie bei Patienten mit Acetaminophen-induziertem akutem Leberversagen gefunden. Da nun ein erhöhtes Vorkommen von TNFB1/1 mit einem niedrigen Spiegel von  $TNF\alpha$  gekoppelt ist, lässt das den Schluss zu, dass ein niedriger  $TNF\alpha$ -Spiegel eine protektive Wirkung auf den Schweregrad der Enzephalopathie beinhaltet. Diese Vermutung geben auch Rolando und Mitarbeiter[146] in ihrer Arbeit zum Ausdruck, als sie darauf hinwiesen, dass Patienten mit einem akuten Leberversagen und anhaltend hohen  $TNF\alpha$ -Spiegeln eher dazu neigen eine schwere Enzephalopathie zu entwickeln, als solche bei denen der  $TNF\alpha$ -Spiegel nach kurzer Zeit wieder absinkt.

Melita Gordon und ihre Mitarbeiter[70] zeigen in ihrer Arbeit über die Primär biliäre Zirrhose (PBC), dass die an PBC erkrankten Patienten im Gegensatz zur Kontrollgruppe seltener ein TNF2-Allel-Polymorphismus in Position -308 aufweisen als die gesunde Kontrollgruppe.  $TNF\alpha 1$  ist hingegen sehr häufig anzutreffen, so dass dieses als Risikofaktor für die PBC angesehen werden kann. Es konnte keine Verbindung zwischen dem Vorkommen von TNF2 und dem Schweregrad der Erkrankung hergestellt werden. Dies könnte bedeuten, dass ein hoher  $TNF\alpha$ -Spiegel eine protektive Wirkung auf diese Autoimmunerkrankung hat.

Aosasa und Mitarbeiter[7] beschreiben einen Anstieg der  $TNF\alpha$ -Produktion bei Patienten nach Oesophagektomie im Vergleich zu Patienten bei Zustand nach Gastrektomie, die nur einen geringen  $TNF\alpha$ -Anstieg aufweisen. Da die Gruppe der Oesophagektomierten postoperativ eine SIRS entwickelt haben, die Gastrektomierten jedoch nicht, lässt das den Schluss zu, dass  $TNF\alpha$ -Einfluss nimmt auf den postoperativen Verlauf einer schweren Operation. Andere Arbeiten konnten nach schweren Polytraumen oder elektiven chirurgischen Eingriffen verschiedenster Art keine erhöhten  $TNF\alpha$ -Spiegel nachweisen[81]. Im Gegenteil zeigte sich sogar eine Trauma-induzierte Reduktion des  $TNF\alpha$ -Plasma-Spiegels[58].

Es folgen die oben angeführten Studien im Überblick:

<b>Autor</b>	<b>Meßmethode</b>	<b>Patienten/Material</b>	<b>Ergebnisse</b>
McGuire et al, Variation in the TNF $\alpha$ promotor region associated with susceptibility to cerebral malaria, [112]	PCR	376 gambische Kinder mit zerebraler Malaria verglichen mit zwei Kontrollgruppen	Patienten mit zerebraler Malaria zeigen signifikant höhere Frequenz des TNF2-Allels
Grau et al, Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria[71]	TNF $\alpha$ -Konzentrationsmessung	65 Kinder aus Malawi mit Malaria falciparum, Serum und zerebrospinale Flüssigkeit	Assoziation zwischen Konzentration des TNF $\alpha$ -Spiegels und der Schwere der Erkrankung bzw. Mortalität
Mc Manus et al, TNF2, a polymorphism of the TNF $\alpha$ gene promotor... [113]	PCR	52 Patienten definiert nach Histologie und glutenfreier Diät 52 Kontrollen	Vermehrtes Vorkommen von TNFA2 in Zöliakie-Population
Kern et al, elevated TNF $\alpha$ ..as marker for complicated plasmodium falciparum malaria[94]	Immunoradiometric assay	40 Patienten mit Malaria	Korrelation zwischen TNF-Konzentration und Schweregrad der zerebralen Malaria
Wattavidanage et al, TNF $\alpha$ 2 marks high risk of severe disease during Plasmodium falciparum malaria[184]	PCR	Patienten mit Malaria definiert nach pos. Blutfilm, nach selbst entwickeltem score in Schweregrade eingeteilt Vollblutproben	mehr als zweifach erhöhte Auftreten des TNF $\alpha$ 2-Allels bei Patienten vs. Kontrolle
Stirnadel et al. Malaria infection and morbidity...in relation to genetic polymorphism [159]	PCR	204 Kinder Blutproben während Hausbesuche zusätzlich bei Fieber dicke und dünne Giemsa gefärbte Blutfilme	Keine signifikanten Unterschiede z.B. zwischen Parasitendichte, und den TNF $\alpha$ -Promotorgenotypen.
Cabrera et al, Polymorphism in TNF-Genes associated with mucocutaneous Leishmaniasis[29]	PCR	49 ACL (american cutaneous leishmaniasis) unterteilt in MCL (mucocutaneous leishmaniasis) und LCL (localized cutaneous	erhöhtes Vorkommen von TNFA2 in der Patientengruppe und höhere zirkulierende TNF $\alpha$ -

		Leishmaniasis). Definiert nach Klinik, Histopathologie und Parasitologie. Routinemäßige Blutproben bei der klinischen Behandlung 43 Kontrollen	Spiegel
Tanaka et al, The TNF $\alpha$ correlates with progression of primary biliary cirrhosis[163]	PCR/ RFLP	71 Patienten mit PBC (primär biliärer Zhirrose) definiert nach standardisierten Kriterien und Mayo scores 133 Kontrollen, Vollblut-Proben	Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Jedoch geht TNF2 mit schlechterer Prognose einher.
Bernal et al, TNF-genomic Polymorphism and outcome of... acute liver failure[16]	PCR	97 Patienten mit akuter Acetaminophen-induzierter Hepatotoxizität und 109 Kontrollen Definition nach Apache III scores für MOF und neurologischer Dysfunktion EDTA-Vollblut	Keine signifikanten Unterschiede zwischen TNF $\alpha$ und dem Verlauf oder TNF-Genotyp und dem Leberschaden
Gordon et al, Primary biliary cirrhosis shows association... [70]	PCR	91 Patienten mit primärer biliärer Zhirrose definiert durch Labor, Endoskopie und Histologie mittlerer Mayo score 213 Kontrollen EDTA-Vollblut	TNF2-Allel-Polymorphismus in-308 seltener bei Patienten als in der Kontrolle, dafür überdurchschnittliches Vorkommen des TNF1/1 bei den PBC Patienten
Louis et al, TNF-Gene polymorphism in Crohn's disease[105]	PCR	193 Patienten mit Morbus Crohn Definiert nach klinischen, radiologischen und histologischen Daten 98 Kontrollen Vollblut	Nicht signifikante Abnahme des Vorkommens von TNF2 in den verschiedenen Untergruppen. Ein signifikanter Anstieg der TNF2-Allelfrequenz bei Patienten mit Steroid-abhängigem M.Crohn
Louis et al, Zytokine gene polymorphisms in inflammatory	PCR	129 Patienten mit Collitis ulzerosa, 120 Pat. mit M. Crohn. Definiert nach	Leichter Abfall von TNF2-Allel-Vorkommen bei M.Crohn Patienten

bowel disease[106]		klinischen, radiologischen und histologischen Daten 89 Kontrollen Vollblut	verglichen mit den Patienten mit Colitis ulcerosa und der Kontrollgruppe
Huang et al, TNF $\alpha$ polymorphism and secretion in myasthenia gravis[84]	PCR	33 Patienten und 20 Kontrollen EDTA-Vollblut	Anstieg von TNF2 bei Patienten mit Hyperplasie des Thymus
Skeie et al, TNFA und TNFB polymorphisms in myasthenia gravis[90]	PCR	30 Patienten mit Myasthenia gravis. Definiert nach Klinik sowie, Labor und neurophysiologischen Kriterien 92 Kontrollen Vollblut	Keine Korrelation zwischen der schwere der MG und TNF $\alpha$ -Genotyp. TNF2-Allel korreliert mit dem früheren Beginn der Erkrankung
Aosasa et al, Activation of monocytes and endothelial cells depends on the severity of surgical stress[7]	ELISA	12 Patienten postop. bei Z.n. distaler Gastrektomie(6) oder Oesophagektomie (6), Vollblutproben vor sowie unmittelbar nach OP und am dritten postop. Tag	TNF $\alpha$ -Anstieg bei Z.n. Oesophagektomie
Bouma et al, Secretion of TNF $\alpha$ and LT $\alpha$ in relation to polymorphism in the genes and HLA-DR alleles.... [23]	PCR	30 Patienten mit entzündlicher Darmerkrankung (15 M.Crohn, 15 Collitis ulcerosa) 12 Kontrollen. Definiert nach klinischen radiologischen, endoskopischen und pathologischen Kriterien (Lennard-Jones und Sutherland score) Vollblut-Proben	TNFA2-Träger produzieren im Gegensatz zu TNFA2-Nichtträgern TNF $\alpha$ im verstärkten Maß
Bouma et al. Distribution of four polymorphisms in the TNF-Genes in patients with inflammatory bowel disease[24]	PCR	153 Patienten mit M.Crohn (64)und Colitis ulcerosa (89). Definiert nach klinischen radiologischen, endoskopischen und pathologischen Kriterien (Lennard-Jones) 54 Kontrollen Vollblut-Proben	TNF2-Allel findet sich Colitis ulcerosa Patienten seltener als bei Gesunden

Tab. 5.2. :TNF $\alpha$ -Polymorphismus und TNF $\alpha$ -Spiegel bei verschiedenen Erkrankungen, Studien-Übersicht

Zusammenfassend kann eine Einflussnahme des  $\text{TNF}\alpha$ -Spiegels auf die oben aufgeführten Erkrankungen festgestellt werden. Jedoch wirkt sich der hohe  $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel je nach Erkrankungsbild einmal negativ auf den Verlauf aus, wie zum Beispiel bei der Schwere einer Enzephalopathie bei akutem Leberversagen, ein anderes Mal protektiv wie bei der primär biliären Zirrhose. Eine pauschale Aussage über alle Erkrankungen ist nicht zu machen, zumal sie sich hier auch in ihrer Ätiologie massiv unterscheiden.

### **5.3. –308 Polymorphismus beim Schilddrüsenkarzinom**

Untersucht wurde eine Gruppe von Patienten mit einem C-Zell- einem follikulären oder papillären Schilddrüsen-Karzinom unterschiedlichen Stadiums. Die Ergebnisse meiner Untersuchungen über die Verteilung des  $\text{TNF}\alpha$ -Polymorphismus ergaben eine signifikant erhöhte Frequenz von  $\text{TNF}1/2$ -Trägern bei den Schilddrüsen-Karzinom-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Man kann davon ausgehen, dass bei diesen Patienten ein höherer  $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel gemessen werden kann.

In wieweit beeinflusst  $\text{TNF}\alpha$  einen malignen Prozess? Wie wirkt sich dieses Zytokin auf die Entstehung eines Karzinoms und dessen Verlauf aus, wie auf die Therapie mit entsprechenden Medikamenten?

#### **5.3.1. Apoptose, der programmierte Zelltod**

Im menschlichen Organismus kann die Homöostase des Gewebes nur dadurch gewahrt werden, dass eine Balance zwischen Zellproliferation und Zelltod besteht[166]. Schon während einiger Stadien der fetalen Entwicklung, ist der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, entscheidend für die natürliche Rückbildung von Zellen und Strukturen, die nicht länger für die embryonale Entwicklung nötig sind. Nach der Geburt trägt ungenügender Zelltod, mit steigender Zellproliferation zur Entstehung der Hyperplasie und Neoplasie bei[117].

Die Apoptose dient der systemischen Zellreinigung durch ihren physiologischen Mechanismus, der übermäßig gebildete, beschädigte oder gefährliche Zellen eines Organismus ohne das umliegende Zellgewebe zu schädigen, eliminiert und die normale Entwicklung eines multizellulären Organismus aufrecht erhält[137].

Der Zelltod in lebenden Organismen kann sich nicht nur als Apoptose, dem programmierten Zelltod, sondern auch als Nekrose zeigen. Beide haben kennzeichnende morphologische und biochemische Charakteristika. Die Nekrose ist ein spontaner und unregulierter Prozess, der in einem Zerfall der Zellmembran und ihrer Organellen resultiert. Die Apoptose ist im Gegensatz dazu ein programmiertes genreguliertes Phänomen, in welchem die Gewebearchitektur erhalten bleibt und die Inflammation minimiert ist[14]. Sie zeigt zu Beginn eine Zellschrumpfung und Fragmentierung von DNA sowie eine Chromatinkondensation. Dies führt zu pyknotischen Nuklei und dem kontrollierten Zerfall der Zelle in apoptotische Körper, die dann phagozytiert werden können[25].

Die Apoptose kann stimuliert oder inhibiert werden durch unterschiedliche Signale oder Zytokine. Dazu zählen  $TNF\alpha$ , intrazellulären Proteasen wie die Mitglieder der Caspase-Familie oder Zell-Zyklus Arrestproteine wie dem p53[14]. Außerdem konnte beobachtet werden, dass apoptotische Stimuli wie Chemotherapeutika, Bestrahlung und TNF zwei unterschiedliche „signaling pathways“ einleiten: einen der zur Aktivierung der Apoptose führt und einen anderen, der zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B und damit zur Auslösung einer Überlebensantwort der Zelle führt, die die Apoptose inhibiert [43].

### **5.3.2. Der Fas Ligand und die Apoptose**

Betrachten wir die Mechanismen in Hinblick auf den Einfluss des  $TNF\alpha$  auf Schilddrüsenkarzinomzellen und seine Umgebung einmal genauer:

Innerhalb der TNF Zytokin-Familie befindet sich neben  $TNF\alpha$  eine Gruppe von Proteinen, die als Inhibitoren und Aktivatoren der Apoptose funktionieren. Der Fas Ligand (FasL), ein Typ II-Membran-Protein und wichtiger proapoptotischer Regulator,

ist ein biologisch aktives Molekül, das durch aktivierte T-Zellen, Neutrophile und Monozyten als Antwort auf physiologische Stimuli freigesetzt wird. Es bindet an Fas, einem Rezeptor auf den Targetzellen, einschließlich alveolären Epithelzellen und Fibroblasten. Die Aktivierung des Fas durch FasL ist ein Hauptmediator des programmierten Zelltods während der Inflammation[14].

Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Tumorzelllinien und primären Zellen nicht nur resistent gegenüber einer Fas-medierte Apoptose sind, sondern in vielen Fällen die Fähigkeit entwickelt haben, diesen „Fas-pathway“ zu ihrem Vorteil zu nutzen. Dies geschieht durch das Starten eines Fas-Gegenangriffs gegen das Wirtsimmunsystem. Und so wird aufgrund der Tatsache, dass aktivierte Lymphozyten sensibel auf die Fas-medierte Apoptose reagieren, gegen die den Tumor infiltrierenden Immunzellen eine Apoptose induziert. Außerdem wird über eine Korrelation zwischen einer starken FasL-Expression und einer steigenden Aggressivität sowie Metastasierung verschiedener histologischer Karzinomtypen berichtet[117] . So stellte Maccon und seine Mitarbeiter fest, dass Fas-Rezeptoren auf der Zellmembran der Mammakarzinomzellen vorkommen. Der Fas-Stoffwechselweg kann aktiviert werden um in vitro die Apoptose der Mammakarzinomzellen zu induzieren. Der therapeutische Nutzen des Fas Stoffwechselwegs wird allerdings durch die Fas-Expression auf den Hepatozyten zunichte gemacht, da eine letale hepatische Apoptose hervorgerufen wird, wenn der Stoffwechselweg aktiviert werden würde[91].

### **5.3.3. TRAIL/TRAIL-Rezeptor und die Apoptose**

Des Weiteren existiert als Mitglied der TNF-Familie der TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), gleichfalls ein Typ II-Membranprotein wie dem FasL, jedoch mit dem einzigartigen Charakteristikum nur gegenüber den Tumorzellen zytotoxisch zu wirken. Er interagiert mit seinen vier Rezeptoren, TRAIL-R1(DR4) und TRAIL-R2 (DR5), zwei Typ I transmembranen Proteinen, die zelltodinduzierende Fähigkeiten besitzen und die Apoptose in Verbindung mit TRAIL medieren können, sowie TRAIL-R3 (TRID), einem Glykosylphosphatidylinositol-gebundenem Rezeptor und TRAIL-

R4 (DcR2), einem Typ I transmembranem Protein, die beide über jeweils andere Mechanismen wirken[73].

Die beiden Rezeptoren, TRAIL-R1 und -R2, werden durch die Bindung des Liganden TRAIL aktiviert und kontrollieren mit der Menge ihres Auftretens die Sensitivität der TRAIL-induzierten Apoptose. Sie werden von thyreoidalen Karzinomen und thyreoidalen Karzinomzelllinien in großer Anzahl exprimiert. Aber auch in normalem Gewebe und anderen malignen Zelllinien wird die Expression von DR4 und DR5 gleichermaßen beobachtet[91].

Bemerkenswerterweise eliminiert TRAIL die meisten getesteten thyreoidalen Zelllinien, einschließlich solcher, die von anaplastischen Karzinomen abstammen, ebenso effektiv wie schlecht differenzierte Zellen. Daher wird TRAIL als ein vielversprechendes Agens gegen thyreoidale Karzinome gehandelt, das die Resistenz gegenüber bisherigen Therapien überwinden könnte[117].

Diesen proapoptotischen Effekten des TRAIL wird durch DcRs 1 und 2 entgegengewirkt, die in ihrer Struktur homolog zu den TRAIL-R1 und 2 sind. Ihnen fehlt jedoch die sogenannte „death domain“ (DcR1) oder sie ist nur mangelhaft ausgebildet und funktionsuntüchtig (DcR2). Beide Rezeptoren binden TRAIL, sind aber nicht in der Lage sich mit den intrazellulären Signalmolekülen der Apoptose zu verbinden. Normales Gewebe exprimiert normalerweise alle vier TRAIL-Rezeptoren und diese Balance schützt vor der TRAIL-induzierten Apoptose. Tumorzellen jedoch exprimieren häufig keine DcRs. Das daraus entstehende Ungleichgewicht zugunsten der proapoptotischen Rezeptoren, führt zur steigenden Sensitivität gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose. Die Expression des DcR1 in Melanomzellen beispielsweise, denen endogen DcR1 fehlte, veranlasste sie zu einer Änderung ihres TRAIL-sensitiven Phenotyps in einen TRAIL-resistenten. Im Gegensatz dazu konnte in anderen Studien, die mit multiplen Tumorzelllinien verschiedenen Ursprungs sowie Leukämieproben von Patienten arbeiteten, keine Korrelation zwischen der Down-Regulation der DcRs und der TRAIL Sensitivität festgestellt werden[177].

#### 5.3.4. TNF $\alpha$ und die Apoptose

TNF $\alpha$  wirkt sowohl pro- als auch anti-apoptotisch auf thyreoidale Karzinomzellen[117]. Es induziert TGF- $\beta$  (transforming-growth-factor- $\beta$ ) mRNA und das latente TGF- $\beta$ 1. Durch einen Rezeptor-medierten Mechanismus wirken nun das TNF ebenso wie der TGF- $\beta$ 1 inhibierend auf die Poliferation humaner papillärer Schilddrüsen-Karzinom-Zellen. Diese antiproliferative Funktion des TNF $\alpha$  ist jedoch unabhängig von der autokrinen Aktion des TGF  $\beta$ 1 in den Karzinom-Zellen[130].

TNF $\alpha$  induziert sowohl einen Anstieg der messengerRNA als auch des Proteins der Mangansuperoxiddismutase (MnSOD). Dies führt zu einem zytoprotektiven Effekt, da das MnSOD , ein in der mitochondrialen Matrix lokalisiertes vitales antioxidantes Enzym, die Dismutase der Sauerstoffanionen O<sup>2-</sup> zu Wasserstoff H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert und somit dem zellulären Schutz dient, indem es diese Sauerstoffanionen O<sup>2-</sup> unschädlich macht[145].

Die löslichen TNF-Rezeptoren p55 und p75 vermitteln unabhängig voneinander Signale zur Proliferation. Verschiedene Zellen, wie zum Beispiel Karzinomzellen des Gastrointestinaltraktes, der Brust, der Lunge und anderer Lokalisationen, exprimieren steigende Mengen von TNF-Rezeptoren, die die TNF induzierte Zellproliferation erleichtern. Die Anwesenheit der löslichen Rezeptoren im Serum haben eine endogene TNF-neutralisierende Aktivität zur Folge, die der Proliferation entgegenwirkt[180].

Die Inzidenz und der Umfang des Anstiegs der löslichen TNF-Rezeptoren p55 und p75 korreliert mit dem Staging der Erkrankung ebenso wie die TNF $\alpha$  Spiegel, die außerdem mit einer kürzeren Überlebensdauer korrelieren.

Die Konzentrationen beider löslicher Rezeptoren Typ I (p55) und Typ II (p75) waren in der Studie von Aderka und Mitarbeitern[4] signifikant höher bei den Karzinompatienten als bei den gesunden Kontrollen. Die Sera der Karzinompatienten zeigten durch die *in vitro* zelltoxischen Aktivität des TNF einen deutlich hemmenden Effekt. Diese Inhibition lag proportional zum Vorkommen löslicher TNF-Rezeptoren. Die TNFR p75 Expression ist auf hämatopoetische und endotheliale Zellen

beschränkt und mediiert eine begrenzte Anzahl biologischer Aktivitäten des  $\text{TNF}\alpha$ , einschließlich Thymozyten und T-Zell-Proliferation. Im Gegensatz dazu wird  $\text{TNFRp55}$  auf fast allen Zelltypen exprimiert und mediiert die verschiedenen Aktivitäten des  $\text{TNF}\alpha$ , wie zum Beispiel den antiproliferativen Effekt des  $\text{TNF}\alpha$  in den NP-Zellen[129].

Dass die Behandlung mit  $\text{TNF}\alpha$  teilweise eine Wirksamkeit gegen die metastatische Ausdehnung zeigt, in anderen Modellen die Gabe von  $\text{TNF}\alpha$  in Tumorzellen die Inzidenz von Metastasen aber steigert und zum Beispiel bei der CLL als ein signifikanter Wachstumsfaktor gilt[176], kann dadurch erklärt werden, dass in jedem Experiment unterschiedliche Zelltypen verwendet werden[95]. Eine Studie von Amy Cullinan und ihren Mitarbeitern[42] zeigt, dass die Reaktion von Retinoblastomzellen auf eine  $\text{TNF}$ -Exposition mit der Induktion der zum Zelltod führenden Apoptose verbunden ist. Andererseits ist  $\text{TNF}$  unter anderem dafür bekannt, die Expression von Adhäsionsmolekülen zu induzieren, von denen angenommen wird, dass sie in die steigende Mortalität und das invasive, metastatische Verhalten von Tumorzellen involviert sind.

### **5.3.5. $\text{TNF}\alpha$ und $\text{NF-}\kappa\text{B}$**

Des Weiteren aktiviert  $\text{TNF}\alpha$  den nuklearen Transkriptionsfaktor  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  in humanen papillären Schilddrüsenkarzinom-Zellen, sowie bei anderen malignen Erkrankungen wie zum Beispiel der CLL[89], und reguliert mit dessen Hilfe in Form eines second messengers die Transkription verschiedener Gene. Der  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  erhielt seinen Namen durch seine Fähigkeit, ein Gen regulierendes Element des  $\kappa$  Leicht-Ketten-Immunglobulins zu erkennen. Seither wird er häufiger als Teil der Regulation einer Reihe von Genen gefunden[128]. Er reguliert die Expression der Gene, die für die Entwicklung und das Fortschreiten eines Karzinoms wie zum Beispiel Proliferation, Migration und Apoptosis von Bedeutung sind[56].

$\text{TNF}\alpha$ , Chemotherapeutika und Ionenbestrahlung rufen gleichzeitig zwei gegensätzliche Effekte hervor. Zum einen die Einleitung der Apoptose, zum anderen

die Transkription antiapoptotischer Gene, wie NF- $\kappa$ B und das Aktivatorprotein 1. In einigen Zelltypen können unter bestimmten Voraussetzungen TNF $\alpha$  und verschiedene Chemotherapeutika und Strahlen die Apoptose induzieren. Der klinische Nutzen des TNF $\alpha$  alleine ist begrenzt, weil zahlreiche Tumorzellen natürlicherweise resistent gegen die TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose sind. Eine gleichzeitige Behandlung von Chemotherapeutika und TNF $\alpha$  kann bestimmte Zelllinien für die TNF-induzierte Apoptose sensibilisieren[57],[43].

Allerdings, so berichten Wand und Mitarbeiter[182], kann die Aktivierung des NF- $\kappa$ B durch TNF $\alpha$ , Ionenstrahlung und bestimmte Chemotherapeutika auch zu einer Inhibition der apoptotischen Antwort führen, die durch diese Stimuli in Fibrosarkomzellen induziert wurden. Gleiche Ergebnisse wurden durch andere Forscher bezüglich TNF $\alpha$  erlangt. Basierend auf verschiedenen Vorstudien wurde darauf geschlossen, dass die apoptotische Antwort auf konventionelle Chemotherapeutika und Bestrahlung durch die Hemmung der NF- $\kappa$ B Aktivierung in resistenten Tumorzellen signifikant gesteigert werden kann[43]. Hierzu zeigten Berman und Mitarbeiter, dass durch Zusätzliche Gabe eines NSAID die durch Chemotherapeutika und TNF $\alpha$  hervorgerufene Aktivierung des NF- $\kappa$ B gehemmt und damit die Wirksamkeit der Antitumorthherapie dramatisch gesteigert werden kann. Dies gelingt durch die so erreichte Blockierung der verschiedenen Funktionen des NF- $\kappa$ B, wie die Induktion von Apoptose- blockenden Genen oder die Heraufregulation von für die Tumorpheriferation und Metastasierung wichtigen Genen[15].

#### **5.4. TNF $\alpha$ -Polymorphismus und Karzinome**

Welchen Einfluss der TNF $\alpha$ -Polymorphismus auf verschiedene Karzinom-Typen hat, ist in zahlreichen Studien beschrieben worden. Es zeigt sich jedoch auch hier kein einheitliches Bild, sondern gegensätzliche Ergebnisse je nach Karzinomtyp.

Bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom wurde in der Studie von Azmy und Mitarbeitern zwar keine Assoziation zwischen dem TNF-Polymorphismus in Position

–238 und –308 und dem Mammakarzinom gefunden, eine Assoziation zwischen dem TNF –308 Polymorphismus und der Präsenz einer vaskulären Invasion in Tumoren konnte jedoch demonstriert werden. Diese Beobachtung legt nahe, dass ein Träger des –308A Polymorphismus für aggressivere Erkrankungen prädisponiert sein könnte, möglicherweise als Resultat steigender TNF-Proteinspiegel[10]. Beim hepatozellulären Karzinom (HCC) wird ein TNF2-Allel für einen „signifikanten Vorhersager“ gehalten und die Überlegung angestellt, ihn als Biomarker für die Empfänglichkeit einer HCC zu nutzen[80].

Zheng und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie über den TNF $\alpha$  -308 Polymorphismus keine Verbindung zum multiplen Myelom oder der monoklonalen Gammopathie unbestimmter Signifikanz feststellen[194]. Die Arbeitsgruppe um J. Demeter[47] erklärte in ihrer Arbeit, dass es keinen signifikanten Unterschiede zwischen ihrem untersuchten Patientenkollektiv mit Haarzelleukämie (HCL) und der Kontrollgruppe gibt. Jedoch beschreibt sie in einer früheren Studie[49] einen signifikanten Anstieg des Allels TNF1 bei CLL-Patienten.

Christel Wihlborg und ihre Mitarbeiter[189] sehen in ihrer Arbeit über den TNF $\alpha$  - Polymorphismus bei Morbus Hodgkin und chronisch lymphatischer Leukämie keine Verbindung zwischen diesen Erkrankungen in Bezug auf Patientenalter, Überlebenszeit oder B-Symptomatik und dem –308 TNF $\alpha$ -Promotorgen-Polymorphismus. M.D. Barber und Mitarbeiter[12] berichten in ihrer Arbeit über den Polymorphismus von TNF $\alpha$  bei Pankreas-Karzinom-Patienten darüber, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der TNF-Genotyp-Verteilung der Karzinompatienten und der Kontrollgruppe bestehe.

Fitzgibbon und Mitarbeiter[64] erklären in Ihrer Arbeit über den TNF $\alpha$  Polymorphismus und die Empfindlichkeit auf follikuläre Lymphome, dass es zwischen TNF-Haplotyp-Verteilung und anderen prognostischen Variablen, wie zum Beispiel Geschlecht, Alter, Vorhandensein von extranodalen Erkrankungen oder Knochenmarksinfiltration, keine Verbindung gibt. Die Art der TNF-Haplotyp-Verteilung nimmt zwar Einfluss auf die Zytokin-Ausschüttung, eine Verknüpfung zwischen stark oder schwach sezernierenden Haplotyp-Verteilung und Krankheitsverlauf konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Die Arbeitsgruppe um Lotfi Chouchane[37] untersuchte 124 Patienten mit malignen Tumoren, wie zum Beispiel Non-Hodgkin-Lymphomen und Mammakarzinomen in Bezug auf einen TNF $\alpha$ -Polymorphismus. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg vom TNF2-Allel bei Patienten, die an einem Malignom erkrankt waren im Vergleich mit der Kontrollgruppe von 106 gesunden Probanden. Da wiederum das TNF1-Allel in der Patientengruppe abnimmt, nimmt der Autor an, dass sich eine Allelverteilung wie TNF1/1 protektiv auf eine maligne Erkrankung auswirkt.

Auch in der Studie von Davies und Mitarbeitern konnte bei Patienten mit monoklonaler Gammopathie und Myelomen festgestellt werden, dass die erhöhte Produktion von TNF $\alpha$ /TNF $\beta$ , die mit einem entsprechenden Polymorphismus assoziiert ist, zu einem erhöhten Risiko bezüglich des Auftretens der monoklonalen Gammopathie und des Myeloms führt[46].

Moldawer und Mitarbeiter[118] erklären in ihrer Arbeit, dass Monozyten im Blut von Patienten mit Karzinomen, Patienten mit bakteriellen Infektionen und Fieber und der gesunden Kontrollgruppe nur messbare TNF-Konzentrationen produzieren, wenn sie *in vitro* stimuliert worden sind. Werden diese Zellen aber durch Endotoxine zur Produktion angeregt, zeigen sich keine statistischen Unterschiede zwischen den oben genannte Gruppen.

Und auch Selby und Mitarbeiter[152] konnten in ihrer Untersuchung von Serumproben von Karzinompatienten keinen zirkulierenden TNF-Spiegel im Blut nachweisen. Die Gegensätzlichkeit zu den Ergebnissen von Balkwill und seinen Mitarbeitern[11], die an verschiedenen im aktiven Stadium befindlichen Malignomen wie Karzinomen der Ovarien, der Mamma, der Lunge, des Kolons, des Magens sowie Non-Hodgkin-Lymphomen und Myelomen einen erhöhten Anstieg des TNF-Serumspiegels nachweisen konnten, erklärten sie sich durch die unterschiedliche Behandlung der Proben und die Nutzung verschiedener Methode. Sie merkten aber gleichzeitig an, dass sie bei der Untersuchung kleinzelliger Bronchialkarzinome ähnliche Ergebnisse erzielten.

<b>Autor</b>	<b>Meßmethode</b>	<b>Patienten/Material</b>	<b>Ergebnisse</b>
Sotigu et al. TNF2-Allel does not contribute to increase TNF $\alpha$ production in Sardinian multiple sclerosis[156]	ELISA	20 Patienten mit Multipler Sklerose 8 Kontrollen	Überproduktion von TNF $\alpha$ bei MS-Patienten Keine Assoziation zwischen TNF-Allelen und TNF $\alpha$ -Produktion oder zwischen TNF2-Polymorphismus und Schwere der Erkrankung
Demeter et al, Polymorphism of the TNF $\alpha$ and LT $\alpha$ genes in hairy cell leukaemia[47]		63 Patienten mit B-Haarzell-Leukämie 117 Kontrollen Vollblut	Keine signifikanten Unterschiede
Demeter et al. Polymorphism of the TNF $\alpha$ and LT $\alpha$ genes in chronic lymphocytic leukemia[48]	PCR	73 Patienten mit B-CLL Staging nach Rai und Binet 117 Kontrollen Vollblut	Signifikanter Anstieg von TNF1 bei CLL-Patienten im Vergleich zur Kontrolle
Wihlborg et al. TNF $\alpha$ Zytokine promotor gene polymorphism in Hodgkin`s disease and chronic lymphocytic leukaemia[188]	PCR	49 CLL Patienten 36 Patienten mit Hodgkin Lymphom in kompletter Remission 51 Kontrollen Vollblut. Definiert nach Klinik und Histologie	Keine signifikanten Unterschiede der Allelverteilung mit den Patienten- oder Kontrollgruppen
Chouchane et al, Polymorphism in the TNF $\alpha$ Promotor region.. [37]	PCR	124 Patienten mit malignen Tumoren, Definiert nach Histopathologie 106 Kontrollen Vollblut	Signifikanter Anstieg von TNF2-Allel bei Patienten vs Kontrolle
Barber et al, Two polymorphism of the TNF-Gene do not influence survival in pancreatic cancer[12]	PCR	64 Patienten mit inoperablem Pankreas-CA, diagnostiziert nach histologischem, radiologischem oder operativem Befund 101 Kontrollen Vollblut	Keine signifikanten Unterschiede in der Genotyp-Verteilung bei Patienten im Vergleich zur Kontrolle

Davies et al, High-producer haplotypes of TNF $\alpha$ are associated with an increased risk of myeloma... [46]	PCR	63 Patienten mit monoklonaler Gammopathie (MG) 198 Patienten mit multiplem Myelom (MM) 250 Kontrollen Vollblut und Knochenmark	Signifikant gehäuftes Vorkommen des TNF2-Allels bei den MM-Patienten und denen mit MG im Vergleich zur Kontrollgruppe. Assoziation mit erhöhtem Risiko bzgl. des Auftretens einer MG und eines MMs
Moldawer et al, Monocytic production and plasma bioactivities of interleukin-1 and TNF in human cancer[118]	Endotoxin- stimulierte Monozyten des Blutes	23 Patienten mit verschiedenen NPL und Kachexie 6 Patienten mit bakteriellem Infekt 6 Kontrollen Vollblut	In keiner Probe wurde TNF im Plasma entdeckt
Selby et al, Endogenous TNF in cancer patients[152]	Doppelte monoklonale Antikörper- Methode	19 Patienten mit aktivem kleinzelligem Bronchial-CA Vollblut	Keine zirkulierenden TNF-Spiegel im Blut
Fitzgibbon et al, TNF polymorphisms and susceptibility to follicular lymphoma[64]	PCR	121 mit follikulärem Lymphom 88 Kontrollen	Starke Verbindung zwischen TNF2 und LT $\alpha$ . TNF2 ist mit höheren TNF $\alpha$ - Leveln assoziiert. Die Frequenz der viel exprimierenden Haplotypen sind bei Patienten mit follikulärem Lymphom signifikant reduziert.

Zheng et al, Il-6, TNF $\alpha$ , Il-1 $\beta$ and Il-1 receptor antagonist Promotor or coding gene polymorphisms in multiple myeloma [194]	PCR	73 Patienten mit multiple Myelom (MM) Staging nach Durie & Salmon 27 Patienten mit monoclonaler Gammopathie (MGUS) 129 Kontrollen EDTA-Vollblut	Keine Association zwischen TNF $\alpha$ - Polymorphismus und MM oder MGUS
---	-----	---	---

Tab.5.3.: TNF $\alpha$ -Polymorphismus und TNF $\alpha$ -Spiegel bei verschiedenen Karzinomen, Studien-Übersicht

Auch hier gilt die gleiche Überlegung wie bei den Sepsis-Patienten. Die Untersuchungen weisen zwar unterschiedliche Ergebnisse auf, die Probanden, Meßmethoden, sonstigen genetischen Faktoren, das Alter der Patienten und im Falle der Karzinome auch die Lebensumstände, wie die Umgebung, in der die Patienten leben und die Umweltbelastungen, der sie tagtäglich ausgesetzt sind, Ernährung, Handhabung von Genussmitteln und so weiter, spielen eine nicht unerhebliche Rolle[172]. Nicht außer acht gelassen werden darf natürlich auch die Vielzahl und Unterschiedlichkeit der Karzinome, die untersucht wurden und die Stadien in denen sie sich befinden.

## 6. Zusammenfassung

---

In meiner Arbeit wurden zunächst Patienten untersucht, die im Rahmen eines chirurgischen Eingriffs ein systemisches inflammatorisches Reaktions-Syndrom (SIRS), eine Sepsis oder einen septischen Schock bis hin zum Multiorganversagen entwickelt hatten. Mittels Polymerasekettenreaktion konnte der jeweilige -308 TNF $\alpha$ -Polymorphismus ermittelt werden.

Ein signifikanter Unterschied in der TNF $\alpha$ -Allelverteilung zwischen den Patienten und der Kontrollgruppe konnte hier nicht nachgewiesen werden. In Bezug auf meine Ergebnisse bei Sepsis-Patienten ist die fortgesetzte und standardisierte Untersuchung vergleichbarer und größerer Gruppen zu fordern.

In der Gruppe der Schilddrüsenkarzinom-Patienten wurden solche mit einem C-Zell-, follikulären oder papillären Schilddrüsen-Karzinom unterschiedlichen Stadiums untersucht. Die Ergebnisse meiner Untersuchungen über die Verteilung des TNF $\alpha$ -Polymorphismus ergaben eine signifikant erhöhte Frequenz von TNF1/2-Trägern bei den Schilddrüsen-Karzinom-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Eine Assoziation zwischen dem TNF2-Allel und einem höheren TNF $\alpha$ -Spiegel konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden[120],[191].

Ein von der Normalbevölkerung abweichendes Auftreten der TNF-Allelverteilung bei Schilddrüsen-Karzinomen, birgt die Möglichkeit einer Früherkennung dieser malignen Erkrankung. Durch die Abklärung der Allelverteilung eines Individuum, können gezielt diejenigen mit einem erhöhten Risiko ein Schilddrüsenkarzinom zu entwickeln, engmaschiger kontrolliert werden. Screening-Untersuchungen mit einfachen bildgebenden Verfahren wie zum Beispiel der Schilddrüsen-Sonographie, können hier Anwendung finden. Aufgrund oben genannter Studien, können auf diese Weise Hinweise auf alternative Therapieansätze bzw. die Prognose erlangt werden.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- [1] Abraham E., M.P. Glauser, Th. Butler, J. Garbino, D. Gelmont, P.F. Laterre, K. Kudsk, H.A. Bruining, Ch. Otto, E. Tobin, Ch. Zwingelstein, W. Lesslauer, A. Leighton; p55 Tumor necrosis Factor Receptor Fusion Protein in the Treatment of Patients with severe Sepsis and septic Shock; JAMA may 1997, 277 (19) 1531-8
- [2] Abraham E., R. Wunderink, H. Silverman, T.M. Perl, St. Nasraway. H. Levy, R. Bone, R.P. Wenzel, R. Balk, R. Allred, J.E. Pennington, J.C. Wherry; Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor  $\alpha$  in patients with sepsis syndrom, JAMA 1995, 273 (12) 934-41
- [3] Abraham L.J., M. A. H. French, R. L. Dawkins; Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumour necrosis factor- $\alpha$  ; Clin Exp Immunol 1993; 92: 14-18
- [4] Aderka D, Englemann H, Hornik V, Skornick Y, Levo Y, Wallach D, Kushtai G; Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients; Cancer Res. 1991 Oct 15;51 (20): 5602-7
- [5] Allen Ruth D.; Polymorphism of the human TNF-alpha Promotor- random variation or functional diversity?; Molecular immunology 36 (1999) 1017-1027
- [6] Alves-Filho José Carlos, Claudia Benjamim, Beatriz Martins Tavares-Murta, Fernando Q Cunha; Failure of the neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis :a critical event for the outcome of this syndrome; Mem Inst Oswaldo Cruz; Rio de Janeiro, 2005, Vol. 100 (Suppl. 1): 223-226
- [7] Aosasa S., S. Ono, H. Mochizuki, H. Tsujimoto, Sh. Osada, E. Takayama, S. Seki, H. Hiraide; Activation of Monocytes and endothelial cells depends on the severity of surgical Stress; World Journal of surgery,24, 2000, 10-16
- [8] Asai K, Hiki N, Mimura Y, Ogawa T, Unou K, Kaminishi M; gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: role of estrogen in modulating LPS-induced Cytokine secretion in an ex vivo septic model; Shock 2001; 16(5): 340-3
- [9] Astiz M.E., E.C. Rackow; Septic Shock; The Lancet,1998; Vol. 351,S.1501-1505
- [10] Azmy Iman AF, Saba P Balasubramanian, Anthony G Wilson, Timothy J Stephenson, Angela Cox, Nicola J Brown, Malcom WR Reed; Role of tumour necrosis factor gene polymorphisms (-308 and -238) in breast cancer susceptibility and severity; Breast Cancer Res 2004, 6: R395-R400
- [11] Balkwill F., F. Burke, D. Talbot, J. Tavernier, R. Osborne, St. Naylor, H. Durbin, W. Fiers; Evidence for Tumour necrosis factor/cachectin Production in Cancer;The Lancet, Nov. 28,1987;1229-1232
- [12] Barber M.D.;J.J. Powell, S.F. Lynch, N.J. Gough, K.C.H. Fearon& J.A. Ross; Two polymorphisms of the tumor necrosis factor gene do not influence survival in pancreatic cancer; Clinical and Experimental Immunology 1999;117: 425- 429
- [13] Baud L., J. Cadranel, G. Offenstadt, L. Luquel, B. Guidet, P. Amstutz; Tumor Necrosis Factor and Septic Shock, Crit Care Med, 1990,Vol.18, No.3, S.349-350
- [14] Behnia Mehrdad, Kent A. Robertson, William J. Martin; Role of Apoptosis in host defence and pathogenesis of disease; Chest 2000; 117:1771-1777
- [15] Berman Kevin S., Udit N. Verma, Gwyndolen Harburg, John D. Minna, Melanie H. Cobb, Richard B. Gaynor; Sulindac enhances tumor necrosis factor- $\alpha$  mediated apoptosis of lung cancer cell lines by inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B; Clinical cancer research, Feb. 2002; Vol. 8, 354-360
- [16] Bernal William, Peter Donaldson, James Underhill, Julia Wendon , Roger Williams; Tumor necrosis factor genomic Polymorphism and outcome of Acetaminophen (paracetamol)-induced acute liver failure; Journal of Hepatology 1998; 29: 53-59

- [17] Beutler B., D. Greenwald, J.D. Hulmes, M. Chang, Y.-C. E. Pan, J. Mathison, R. Ulevitch, A. Cerami; Identity of tumor necrosis factor and macrophage-secreted factor cachectin, *Nature*, Aug. 1985, 316, 552-54
- [18] Bone RC, members of the American college of chest physicians/society of critical care medicine consensus conference committee: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-874
- [19] Bone Roger C.; Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS and CARS; *Crit Care Med* 1996, Vol 24, No 7;1125-1128
- [20] Book M., M. Petersen, E.U. Schade und F.Stüber; ein Polymorphismus des TNF $\alpha$  Promotors bei Patienten mit schwerer Sepsis; *Intensivmedizin und Notfallmedizin*, Band 32, Suppl.1 (1995)
- [21] Borish Larry C., John W. Steinke; Cytokines and chemokines; *J Allergy Clin Immunol*, 2003 Feb; 111 (Suppl 2):460-75
- [22] Bougacha-Elleuch N, Rebai A, Mnif M, Makni H, Bellassouad M, Jouida J, Abid M, Hammadi A; Analysis of MHC genes in a Tunisian isolate with autoimmune thyroid disease: implication of TNF -308 gene polymorphism; *J Autoimmun.* 2004 Aug;23(1):75-80
- [23] Bouma G., J.B.A. Crusius, M. Oudkerk Pool, J.J. Kolkman, B.M.E. von Blomberg, P.J. Kostense, M.J. Giphart, G.M.Th. Schreuder, S.G.M. Meuwissen, A.S. Pena; Secretion of tumor necrosis factor  $\alpha$  and Lymphotoxin  $\alpha$  in relation to Polymorphism in the genes and HLA-DR alleles. Relevance for Inflammatory Bowel disease; *Scand. J. Immunol.* 43, 456-463, 1996
- [24] Bouma G., B. Xia, J.B.A. Crusius, G. Bioque, I. Koutroubakis, B.M.E. von Blomberg, S.G.M. Meuwissen, A.S. Pena; Distribution of four polymorphisms in the tumor necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD); *Clin Exp Immunol* 1996;103:391-396
- [25] Bras M., B. Queenan, S.A. Susin ; Programmed cell death via mitochondria : different modes of dying ; *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 70, No. 2, 2005, pp. 231-239
- [26] Brinkman B.M.N., T.W.J. Huizinga, S.S. Kurban, E.A. van der Velde, G.M.Th. Schreuder, J.M.W. Hazes, F.C. Breedveld und C.L. Verweij; Tumour necrosis factor  $\alpha$  gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease?; *British Journal of Rheumatology* 1997; 36:516-521
- [27] Burdon Dan, Peter Zabel; Akutphase-Reaktion und Immunkompetenz in Sepsis und SIRS; *Wien Klin Wochenschr* (2002) 114 (Suppl 1): 1-8
- [28] Burmester, Pezutta; *Taschenatlas der Immunologie*, Thieme 1998
- [29] Cabrera M., M.-A. Shaw, C. Sharples, H. Williams, M. Castes, J. Convit, J.M. Blackwell; Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis; *J. Exp. Med* 182 Nov. 1995, 1259-1264
- [30] Calabrese L.H., N. Zein und D. Vassilopoulos; Safety of antitumour necrosis factor (anti-TNF) therapy in patients with chronic viral infections: hepatitis C, hepatitis B, and HIV infection; *Ann Rheum Dis* 2004; 63;18-24
- [31] Call Douglas Ruben, Jean Ann Nemzek, Samuel John Ebong, Gerald Lee Bolgos, David Eric Newcomb, Daniel George Remick; Ratio of local to systemic chemokine concentrations regulates neutrophil recruitment; *American journal of pathology*; Vol. 158, No. 2, Feb. 2001:715-721
- [32] Carbó N., P. Costelli, L. Tessitore, G.J. Bagby, F.J. López-Soriano, F.M. Baccino, J.M. Argilés; Anti-Tumor necrosis factor  $\alpha$  treatment interferes with changes in lipid metabolism in a tumor cachexia model; *Clinical Science*, 1994,87,349-355
- [33] Carroll M. C., P. Katzmann, E. M. Alicot, B. H. Koller, D. E. Geraghty, H. T. Orr, J.L. Strominger, T. Spies; Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes, *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 84,1987;8535-8539
- [ 34] Carswell E.A., L.J. Old, R.L. Kassel, S. Green, N. Fiore, B. Williamson; An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors, *Proceedings of the Nat. Acad. Of Sciences of the U.S.A.*, Sep. 1975, 72(9): 3666-70

- [35] Chen G., R. Wilson, S. H. Wang, H. Z. Zheng, J. J. Walker, J. H. Mc Killop; Tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) gene polymorphism and expression in pre-eclampsia; *Clin Exp Immunol*, 1996;104; S. 154-159
- [36] Chorinchath B. B., L-Y. Kong, L. Mao, R. E. McCallum; Age-associated differences in TNF- $\alpha$  and nitric oxide production in endotoxic mice; *The journal of Immunology*, 1996, 156: S. 1525- 1530
- [37] Chouchane L., Slim Ben Ahmed, Sami Baccouche, Sami Remadi; Polymorphism in the tumor necrosis factor- $\alpha$  promotor region and in the heat shock Protein 70 genes associated with malignant Tumors; *American cancer society*, October 1997, Volume 80/ No.8 1489-1496
- [38] Clark Ian A., Lisa M. Alleva, Alison C. Mills and William B. Cowden; Pathogenesis of Malaria and Clinically Similar Conditions; *Clinical Microbiology Reviews*, July 2004, Vol. 17, No. 3:p 509-539
- [39] Cohen J., MB, FRCP; Jean Carlet; for the INTERSEPT study group; An international, multicenter, placebocontrolled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor -  $\alpha$  in patients with sepsis; *Critical care medicine* Sep 1996, 24 (9) 1431-40
- [40] Coley W.B.; The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas, with a report of ten original cases; *American Journal of medicine and science*, 105:487-511, 1893
- [41] Costa A., Fernandez-Real JM., Vendrell J., Broch M., Casamitjana R., Ricart W., Conget I.; Lower rate of tumor necrosis factor- $\alpha$  - 863A allele and higher concentration of tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor 2 in first degree relatives of subjects with type 2 diabetes; *Metabolism*. 2003 Aug; 52(8): 1068-71
- [42] Cullinan Amy E., Curtis R. Brandt; Cytokine induced apoptosis in human retinoblastom cells; *Molecular vision* 2004; 10:315-22
- [43] Cusack James C., Jr.; Overcoming antiapoptotic responses to promote chemosensitivity in metastatic colorectal cancer to the liver; *annals of surgical oncology*, 2002, 10(8):852-862
- [44] D'Alfonso S, Momigliano Richiardi P. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNF promotor region. *Immunogenetics* 1994; 39: 150-4
- [45] Das BK, Mishra S, Padhi PK, Manish R, Tripathy R, Sahoo PK, Ravindran B; Pentoxifylline adjunct improves prognosis of human cerebral malaria in adults; *Trop Med Int Health*. 2003 Aug; 8(8):680-4
- [46] Davies F.E., S.J. Rollinson, A.C. Rawstron, E. Roman, St. Richards, M. Drayson, J.A. Child, G.J. Morgan; High-producer haplotypes of tumor necrosis factor  $\alpha$  are associated with an increased risk of myeloma and have an improved progression-free survival after treatment; *Journal of clinical oncology*, Aug. 2000, Vol.18, No. 15, 2843-2851
- [47] Demeter J., F.Porzolt, St. Rämisch, M. Schmid, G. Messer; Polymorphism of the tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes in hairy cell leukaemia; *British Journal of Haematology*, 1997; 97, S.132-134
- [48] Demeter J., F. Porzolt, St. Rämisch, D. Schmidt, M. Schmid, G. Messer; Polymorphism of the tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin- alpha genes in chronic lymphocytic leukaemia; *British Journal of Haematology*, 1997; 97, S.: 107-112
- [49] Dhainaut JF, Vincent JL, Richard C, Lejeune P, Martin C, Fierobe L, Stephens S, Ney UM, Sopwith M.; CDP571, a humanized antibody to human tumor necrosis factor- $\alpha$  : safety, pharmacokinetics, immune response, and influence of the antibody on cytokine concentrations in patients with septic shock. CPD571 Sepsis Study Group; *Crit Care Med* 1995 Sep; 23(9): 1461-9
- [50] Dhainaut J.-F., J.P. Mira and F. Brunet; Investigational therapy of sepsis: Anti-TNF, IL-1ra, Anti-PAF and G-CSF; *Clinical trials for the treatment of sepsis*. Springer (1995);267-282
- [51] Diao Hongyan, Masashi Kohanawa, Yimin, Hirofumi Nakajima, Yuichiro Sato, Tomonori Minagawa, Akio Nakane; Lipopolysaccharide triggers invasive streptococcal disease in mice through a tumour necrosis factor- $\alpha$  dependent mechanism; *Immunology* 2002, 105, pp344-349
- [52] Dimmeler S., H. Troidl; Mediatorensystem und Sepsis; *Chirurg* 1995; 66:S.2-10
- [53] Dinarello CA; Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock; *Chest* 1997; 112:321-9
- [54] Dinarello CA; Proinflammatory Cytokines; *Chest* 2000; 118:503-8

- [55] Diodato MD, Knoferl MW, Schwacha MG, bland KI, Chaudry ICH; gender differences in the inflammatory response and survival following haemorrhage and subsequent sepsis; *Cytokine*, 2001 May 7; 14(3): 162-169
- [56] Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X; NF-kappaB in development and progression of human cancer; *Virchows Arch*. 2005 May;446(5):475-82
- [57] Duan Lian, Masaru Aoyagi, Masashi Tamaki, Yoshikazu Yoshino, Takashi Morimoto, Hiroaki Wakimoto, Yasuhiko Nagasaka, Kimiyoshi Hirakawa, Kikuo Ohno, Kiyotaka Yamamoto; Impairment of both apoptotic and cytoprotective signalings in glioma cells resistant to the combined use of Cisplatin and Tumor necrosis factor  $\alpha$ ; *Clinical Cancer Research*, Jan. 1, 2004; Vol. 10, 234-243
- [58] Fabian T.C., Croce M.A., Fabian M.J., Trentham L.L., Yockey J.M., Boscarino R., Proctor K.G.; Reduced tumor necrosis factor production in endotoxin- spiked whole blood after trauma: Experimental results and clinical correlation; *Surgery*, July 1995;63-72
- [59] Fabris M, Di PE, D'Elia A, Damante G, Sinigaglia L, Ferraccioli G; Tumor necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphism in severe and mild-moderate rheumatoid arthritis; *J Rheumatol*. 2002 Jan; 29(1):29-33
- [60] Feldmann M., Bondeson J., Brennan F.M., Foxwell B.M.J., Maini R.N.; The rationale for the current boom in anti-TNF $\alpha$  treatment. Is there an effective means to define therapeutic targets for drugs that provide all the benefits of anti-TNF $\alpha$  and minimise hazards?; *Ann Rheum Dis* 1999; 58 (Suppl 1)I27-I31
- [61] Ferrajoli Alessandra, Michael J. Keating, Taghi Manshouri, Francis J. Giles, Amanda Dey, Zeev Estrov, Charles A. Koller, Razelle Kurzrock, Deborah, A. Thomas, Stefan Faderl, Susan Lerner, Susan O'Brien, Maher Albitar; The clinical significance of tumor necrosis factor- $\alpha$  plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia; *Blood*; 15 Aug 2002, Vol. 100, No.4:pp 1215-1219
- [62] Fiers W., Tumor necrosis factor, Characterization at the molecular, cellular and in vivo level; *FEBS letters*, 1991, Vol.285, No.2, S 199- 212.
- [63] Fisher C.J., Opal S.M., Dhainaut J.F., et al. (1993); Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis; *Crit Care Med* 21; 318-327
- [64] Fitzgibbon Jude, D. Grenzeliass, J. Matthews, T. A. Lister, R.K. Gupta; Tumor necrosis factor polymorphisms and susceptibility to follicular lymphoma; *British Journal of Haematology*; Nov/1999, 107, 388-391
- [65] Fraunberger P., A.K. Walli, D. Seidel; *Zytokinanalytik*; *Internist* 2001,42; S 35-46
- [66] Galley H.F., N.R. Webster; The immuno-inflammatory cascade; *British Journal of Anaesthesia* 1996; 77:11-16
- [67] Gavrilescu L. Christian, Eric Y. Denkers; Apoptosis and the Balance of Homeostatic and Pathologic Responses to Protozoan Infection; *Infection and Immunity*, Nov. 2003, p 6109-6115
- [68] Gemsa, Kalden, Resch; *Immunologie*, Thieme, 1991
- [69] Girardin E., G.E. Grau, J-M. Dayer, P. Roux-Lombard, The J5 Study group, P.-H. Lambert; Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious Purpura, *New Engl. J. Med*, 319 (1988) 397-400
- [70] Gordon Melita A., Emia Oppenheim, Nicola J. Camp, Francesco S. di Giovine, Gordon W. Duff and Dermot Gleeson; Primary biliary cirrhosis shows association with genetic polymorphism of tumour necrosis factor  $\alpha$  Promotor region; *Journal of hepatology* 1999;31:242-247
- [71] Grau G.E., T.E. Taylor, M.E. Molyneux, J.J. Wirima, P. Vassalli, M. Hommel, P.H. Lambert; 1989; Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria.; *New England Journal of medicine*, 320, 1586-1591
- [72] Gray P.W., B.B. Aggarwal, C.V. Benton, T.S. Bringman, W.J. Henzel, J.A. Jarrett, D.W. Leung, B. Moffat, P. Ng, L.P. Svedersky, M.A. Palladino, G.E. Nedwin; Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumor necrosis activity; *Nature*, Dec.1984, Vol 312, 721-724

- [73] Griffith Thomas S., Wilson A. Chin, Glenn C. Jackson, David H. Lynch, Marek Z. Kubin; Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells; *The journal of immunology*, 1998, 161:2833-2840
- [74] Grutters Jan C., Hiroe Sato, Panagiotis Pantelidis, Anna L. Lagan, Deirdre S. McGrath, Jan-Willem J. Lammers, Jules M. M. van den Bosch, Athol U. Wells, Roland M. du Bois, Kenneth I. Welsh; Increased frequency of the uncommon tumor necrosis factor -857T Allele in british and dutch patients with sarcoidosis; *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, Vol. 165: pp 1119-1124
- [75] Hamblin AS: *Cytokines and Cytokine Receptors*. Oxford, IRL Press, 1993
- [76] Harriman G., Harper L.K., Schaible T.F.; Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti- TNF $\alpha$  treatment; *Ann Rheum Dis* 1999; 58 (Suppl I) I61-I64
- [77] Heesen Michael, Dagmar Kunz, Martina Wessiepe, Tom van der Poll, Aeilko H. Zwinderman, Brunhilde Blomeke; Rapid genotyping for tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) -863 C/A promotor polymorphism that determines TNF- $\alpha$  response; *Clinical chemistry*, 2004, 50, No.1:226-228
- [78] Herbein Georges, William A. O'Brien; Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and TNF receptors in viral pathogenesis; *P.S.E.B.M.* 2000, Vol 223:241-257
- [79] Hirayama Kenji; Genetic factors associated with development of cerebral malaria and fibrotic schistosomiasis; *The Korean Journal of Parasitology*; Dec. 2002, Vol.40, No.4:165-172
- [80] Ho Sy, Wang YJ, Chen HL, Chen CH, Chang CJ, Wang PJ, Chen HH, Guo HR; Increased risk of developing hepatocellular carcinoma associated with carriage of the TNF2-Allele of the -308 tumor necrosis factor- $\alpha$  Promotor gene; *Cancer causes control.*, 2004 Sep;15(7):657-63
- [81] Hoch R.C., Rodriguez R., Manning Th., Bishop M., Mead P., Shoemaker W.C., Abraham E., Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production; *Crit Care Med*; 1993, Vol 21 No.6, 839-845
- [82] Höflich C., H-D Volk; Immunmodulation in der Sepsis; *Chirurg* 2002, 73: 1100-1104
- [83] Holmes Cheryl L., James A. Russell, Keith R. Walley; Genetic Polymorphisms in Sepsis and Septic Shock: Role in Prognosis and Potential for Therapy; *Chest* 2003; 124; 1103-1115
- [84] Huang DeRen, Ritva Pirskanen, Georg Matell, Ann Kari Lefvert; Tumor necrosis factor  $\alpha$  polymorphism and secretion in myasthenia gravis; *Journal of Neuroimmunology* 94 (1999);165-171
- [85] Huang S-L., C-H. Su, S-C. Chang; Tumor necrosis factor  $\alpha$  gene polymorphism in chronic bronchitis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 156, 1436- 1439
- [86] Huizinga T.W., R.G. Westendorp, E.L. Bollen, V. Keijsers, B.M. Brinkman, J.A. Langermans, F.C. Breedveld, C.L. Verweij, L. van der Gaer, L. Dams, J.B. Crusius, A. Garcia-Gonzales, B.W. van Oosten, C.H. Polman, A.S. Pena; TNF- $\alpha$  promotor polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients; *Journal of Neuroimmunology* 1997 Feb;72(2):149-153
- [87] Jacob Chaim O., Zdenka Fronek, Gail D. Lewis, May Koo, John A. Hansen, Hugh O. McDevitt; Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor  $\alpha$ : Relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, February 1990, Vol.87, 1233-1237
- [88] Juszczyński Przemysław, Ewa Kalinka, Jaques Bienvenu, Grzegorz Woszczek, Maciej Borowiec, Marek Kowalski, Ewa Ōech-Maranda, Lucile Baseggio, Bertrand Coiffier, Gilles Salles und Krzysztof Warzocha; Human leukocyte antigens class II and tumor necrosis factor genetic polymorphisms are independent predictors of non-Hodgkin lymphoma outcome; *Blood*, 15 Oct 2002, Vol.100, No.8:pp3037-3040
- [89] Kast Richard E., Eric L. Altschuler; Anti-apoptosis function of TNF $\alpha$  in chronic lymphocytic leukaemia: lessons from Crohn's disease and the therapeutic potential of bupropion to loxer TNF $\alpha$ ; *Arch Immunol Ther Exp*, 2005, 53, 143-147
- [90] Kawakami M., A. Cerami; Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity, *J. Exp. Med.*, Sep. 1981, 154, 631-37
- [91] Keane Maccon M., Seth A. Ettenberg, Marion M. Nau, Edward K. Russell, Stan Lipkowitz; Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines; *Cancer research* 59, Feb 1, 1999; 734-41

- [92] Keller, Immunologie und Immunpathologie; Thieme 1994
- [93] Keller R., Immunologie und Immunopathologie; Thieme 1995
- [94] Kern P., C.J. Hemmer, J. Van Damme, H.J. Gruss, M. Dietrich; 1989; Elevated tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-6 serum levels as markers for complicated plasmodium falciparum malaria.; American Journal of medicine, 1989 Aug; 87(2): 139-143.
- [95] Kitakata Hidekazu, Yoko Nemoto-Sasaki, Yutaka Takahashi, Toshikazu Kondo, Masayoshi Mai, Naofumi Mukaida; Essential roles of Tumor necrosis factor receptor p55 in liver metastasis of intrasplenic administration of Colon 26 cells, Cancer research, November 15, 2002; 62, 6682-87
- [96] Kobayashi Scott D., Jovanka M. Voyich, Christopher Burlak, Frank R DeLeo; Neutrophils in the innate immune response; Arch Immunol Ther Exp; 2005, 53, 505-517
- [97] Kornelisse R.F., J.A. Hazelzet, H.F. J. Savelkoul, W.C.J. Hop, M.H. Suur, A.N.J. Borsboom, I.M. Risseuw-Appel, E. van der Voort, R. de Groot; The relationship between Plasminogen activator inhibitor-1 and proinflammatory and counterinflammatory mediators in children with meningococcal septic shock; Journal of infectious diseases; 1996; 173:1148-56
- [98] Kox W.J., T. Volk, S. N. Kox, H.-D. Volk; Immunomodulatory therapies in sepsis; Intensive care Med (2000) 26: S124-128
- [99] Kroeger K.M., K.S. Carville, L.J. Abraham; The -308 Tumor necrosis factor  $\alpha$  Promotor polymorphism effects transcription; Molecular Immunology, 1997, Vol.34, No. 5, 391-399
- [100] Küçükaycan Mehmet, Michiel Van Krugten, Herman-Jan Pennings, Tom WJ Huizinga, Wim A Buurman, Mieke A Dentener, Emiel FM Wouters; Tumor necrosis factor- $\alpha$  +489G/A gene polymorphism is associated with chronic obstructive pulmonary disease; Respir Res 2002, Vol. 3, No.1: 29, Epub 2002 Nov. 29
- [101] Kwiatkowski D., C. A. W. Bate, I. G. Scragg, P. Beattie, I. Udalova, J. C. Knight; The malaria fever response - pathogenesis, polymorphism and prospects for intervention; Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 1997; Vol. 91, No.: 5, S. 533-542
- [102] Kwiatkowski D., Molyneux M.E., Stephens S, Curtis N, Klein N, Pointaire P, Smit M, Allan R, Brewster DR, Grau GE, et al. Anti-TNF Therapy inhibits fever in cerebral malaria; Q J Med 1993 Feb; 86(2):91-8
- [103] Lindsey J.K.; Modelling Frequency and Count Data; 1995, Oxford University Press
- [104] Loppnow H.; Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen, Internist, 2001, 42, S. 13-27
- [105] Louis E., M. Peeters, D. Franchimont, L. Seidel, F. Fontaine, G. Demolin, F. Croes, P. Dupont, L. Davin, S. Omri, P. Rutgeerts, J. Belaiche; Tumor necrosis factor gene polymorphism in Crohn's disease: influence on disease behaviour?; Clinical and experimental Immunology 2000; 119:64-68
- [106] Louis E., J. Satsangi, M. Roussomoustakaki, M. Parkes, G. Fanning, K. Welsh, D. Jewell; Cytokine gene Polymorphisms in inflammatory bowel disease; Gut 1996; 39: 705-710
- [107] Low AS, Azmy I, Sharaf , Cannings C, Wilson AG; Association between two tumour necrosis factor intronic polymorphisms and HLA alleles; Eur J Immunogenet. 2002 Feb; 29(1):31-4
- [108] Lu CC, Sheu BS, Chen TW, Yang HB, Hung KH, Kao AW, Chuang CH, Wu JJ; Host TNF $\alpha$  -1031 and -863 Promotor single nucleotide polymorphisms determine the risk of benign ulceration after H-Pylori infection; Am J Gastroenterol. 2005 Jun; 100(6): 1274-82
- [109] Lu Liang-Ping, Xiang-Wang Li, Ying Liu, Guo-Chang Sun, Xue-Ping Wang, Xi-Lin Zhu, Quan-You Hu, Hui Li; Association of -238G/A Polymorphism of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene Promotor region with outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese han population; World J Gastroenterol 2004; 10(12):1810-1814
- [110] Marks J.D., C.B. Marks, J.M. Luce, A.B. Montgomery, J. Turner, C.A. Mietz, J.F. Murray; Plasma Tumor necrosis factor in patients with septic Shock; Am. Rev. Respir. Dis. 1990; 141: 94-97
- [111] Marrosu M. G., M. R. Murru, G. Costa et al. ,Multiple sclerosis in Sardinia is associated and in linkage disequilibrium with HLA-DR3 and -DR4 alleles; American Journal of Hum Genet 1997; 61:454-457

- [112] McGuire W., A.V.S. Hill, C.E.M. Allsopp, B.M. Greenwood, D. Kwiatkowski; Variation in the TNF- $\alpha$  promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria, *Nature*, Vol 371, Oct. 1994, 508-511
- [113] Mc Manus R., A.G. Wilson, J. Mansfield, D.G. Weir, G.W. Duff, D. Kelleher; TNF2, a polymorphism of the tumour necrosis-a gene Promotor, is a component of the celiac disease major histocompatibility complex haplotype, *Eur. J. Immunol.* 1996.26: 2113-2118
- [114] Meager A.; *Cytokines*, Open university press, 1990
- [115] Meduri G Umberto; Clinical review: A paradigm shift: the bidirectional effect of inflammation on bacterial growth. Clinical implications for patients with acute respiratory distress syndrome; *Critical care*; Feb 2002, Vol 6, No. 1:24-29
- [116] Mira J.-P., A. Cariou, F. Grall, Chr. Delclaux, M.-R. Losser, F. Heshmati, Chr. Cheval, M. Monchi, J.-L. Teboul, F. Riché, G. Leleu, L. Arbibe, A. Mignon, M. Delpéch, J.-F. Dhainaut, Association of TNF2, a TNF- $\alpha$  Promotor Polymorphism, With Septic Shock Susceptibility and Mortality, *JAMA*, 1999, Vol.282, No.6, S.561-568
- [117] Mitsiades C S, V Poulaki, N Mitsiades; The role of apoptosis-inducing receptors of the tumor necrosis factor family in thyroid cancer; *Journal of Endocrinology* (2003) 178, 205-216
- [118] Moldawer L.L., C. Drott, K. Lundholm; Monocytic production and plasma bioactivities of interleukin-1 and tumour necrosis factor in human cancer; *European Journal of Clinical Investigation* (1988) 18, 486-492
- [119] Mysliwska Jolanta, Ewa Bryl, Piotr Trzonkowski, Andrzej Mysliwski; Compensatory effect of TNF $\alpha$  on low natural killer activity in the elderly; *Acta Biochemica Polonica*, No.2/2000, Vol.47; 301-311
- [120] Nadel S., M. J. Newport, R. Booy, M. Levin; Variation in the Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Gene Promotor Region May Be Associated with Death from Meningococcal Disease, 1996; *The Journal of Infectious Diseases*, 174: S. 878-880
- [121] Nasraway Stanley A; The Problems and Challenges of Immunotherapy in Sepsis; *Chest* 2003; 123; 451-459
- [122] Nedwin G. E., S. L. Naylor, A.Y. Sakaguchi, D. Smith, J. Jarret-Nedwin, D. Pennica, D.V. Goeddel, P. W. Gray; Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization; *Nucleic.Acids.Res.*1985;13,6361-6373
- [123] Neilson D, Kavanagh JP, Rao PN; Kinetics of circulating TNF- $\alpha$  and TNF soluble receptors following surgery in a clinical model of sepsis; *Cytokine*, 1996 Dec.; 8(12): 938-43
- [124] Neugebauer E., S. Dimmeler, H. Troidl; Mediatorensystem und Sepsis; *Chirurg* 1995; 66:S.2-10
- [125] Old L.J.; Tumor necrosis Factor (TNF), *Science*, Nov. 1985, 230, 630-32
- [126] Ono S, Tsujimoto H, Hiraki S, Takahata R, Kinoshita M, Mochizuki H, Sex differences in cytokine production and surface antigen expression of peripheral blood mononuclear cells after surgery; *Am J Surg* 2005 Sep; 190(3): 439-44
- [127] Opal Steven M., DePalo Vera A.; Anti-inflammatory Cytokines; *Chest* 2000; 117: 1162-72
- [128] Pang Xuan-Ping, Nathan S. Ross, Minha Park, Guy J.F. Julliard, Thomas M. Stanley , Jerome M. Hershman; Tumor necrosis factor- $\alpha$  activates nuclear factor  $\kappa$  and induces Manganous Superoxide Dismutase and Phosphodiesterase mRNA in human papillary thyroid Carcinoma Cells; *The Journal of Biological Chemistry* 1992; Vol.267, No.18, Issue June 25;12826-12830
- [129] Pang XP, Ross NS, Hershman JM; Alterations in TNF- $\alpha$  signal transduction in resistant human papillary thyroid carcinoma cells; *Thyroid* 1996 Aug;6(4):313-7
- [130] Pang XP, Yoshimura M, Wang J, Dubinett SM; TNF $\alpha$ -induced antiproliferation is not dependent on the autocrine action of TGF- $\beta$  1 in a thyroid cancer cell line; *Lymphokine Cytokine Res.* 1994 Apr;13(2):93-7
- [131] Papadakis Konstantinos A., Stephan R. Targan; Tumor necrosis factor: Biology and therapeutic inhibitors; *Gastroenterology* 2000; 119:1148-1157

- [132] Pastor J.J., Laso F.J., Romero A., Gonzalez-Sarmiento R.; -238 G>A polymorphism of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene (TNFA) is associated with alcoholic liver cirrhosis in alcoholic Spanish men; *Alcohol Clin Exp Res.* 2005 Nov; 29(11): 1928-31
- [133] Paterson R.L., N.R. Webster; Sepsis and systemic inflammatory response syndrome; *J. R. Coll. Surg. Edinb.*, 45, June 2000, 178-182
- [134] Pennica D., G.E. Nedwin, J.S. Hayflick, P.H. Seeburg, R. Derynck, M.A. Palladino, W.J. Kohr, B.B. Aggarwal, D.V. Goeddel; Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin; *Nature*, Dec. 1984, Vol 312, 724-729
- [135] Petersen M., F. Bokelmann, U.F. Schade, F. Stüber; TNFB 2 Homozygote sind Risikopatienten in der schweren Sepsis; *Intensivmedizin und Notfallmedizin*, Band 32, Supplement 1 1995
- [136] Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig T.M. et al. (1993); Mice deficient for the 55-kd TNF receptor are resistant to endotoxin shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73:457-467
- [137] Philchenkov A; Caspase: potential targets for regulating cell death; *J. Cell. Mol. Med.* Vol. 8, No.4, 2004 pp 432-444
- [138] Porteu Françoise, Carl Nathan; Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human Neutrophils; *J. Exp. Med.*, Aug. 1990, Vol. 172, 599-607
- [139] Prince Lynne R., Lucy Allen, Elizabeth C. Jones, Paul G. Hellewell, Steven K. Dower, Moira K.B. Whyte, Ian Sabroe; The role of Interleukin-1 $\beta$  in direct and Toll-like receptor 4-mediated neutrophil activation and survival: *American Journal of pathology*, Vol. 165, No. 5, Nov. 2004: 1819-26
- [140] Przemyslaw Juszczyński, Ewa Kalinka, Jaques Bienvenu, Grzegorz Woszczek, Maciej Borowiec, Marek Kowalski, Ewa Öech-Maranda, Lucile Baseggio, Bertrand Coiffier, Gilles Salles und Krzysztof Warzocha; Human leukocyte antigens class II and tumor necrosis factor genetic polymorphisms are independent predictors of non-Hodgkin lymphoma outcome; *Blood*, 15 Oct 2002, Vol.100, No.8:pp3037-3040
- [141] Pschyrembel, 257. Auflage, 1994
- [142] Reinhart K., Wiegand C., Kaul M.(1994); Anti-TNF strategies with monoclonal antibody. Preliminary results with the specific monoclonal antibody MAK 195F. *Intensive Care Med* 20 (Suppl.1): S151
- [143] Reinhart K., C. Wiegand-Löhnert, F. Grimminger, M. Kaul, St. Withington, D. Treacher, J. Eckart, Sh. Willatts, C. Bouza, D. Krausch, F. Stockenhuber, J. Eiselstein, L. Daum, J. Kempeni; Assessment of the safety and efficacy of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody fragment, MAK 195F, in patients with sepsis and septic shock: A multicenter, randomized, placebocontrolled, dose – ranging study, *Critical care medicine*, May 1996, 24 (5) 733-42
- [144] Rink L., H. Kirchner; Recent Progress in the Tumor necrosis Factor –  $\alpha$  Field, *Int Arch Allergy Immunology* 1996;111:199-209
- [145] Rogers Richard J., Joan M. Monnier, Harry S. Nick; Tumor necrosis factor  $\alpha$  selectively induces MnSOD expression via Mitochondria-to-nucleus signalling, whereas Interleukin-1  $\beta$  utilizes an alternative pathway; *the journal of biological chemistry*, Vol.276, No.23 Issue June 8 2001, pp:20419-27
- [146] Rolando N., Ellis A., Groote DD., Wendon J., Williams R., Correlation of serial cytokine levels with progression to coma (grade IV) in patients with acute liver failure; *Hepatology* 1995, 22 Suppl. 366
- [147] Rudwaleit M, Tikly M, Khamashta M, Gibson K, Klinke J, Hughes G, Wordsworth P; Interethnic differences in the association of tumor necrosis factor Promotor polymorphisms with systemic lupus erythematosus; *J Rheumatol.* 1996 Oct; 23(10): 1725-8
- [148] Saarinen U.M., E.-K. Koskelo, A.-M. Teppo, M. A. Siimes; Tumor necrosis factor in children with Malignancies; *Cancer Research* 50,592-595, Feb/1990
- [149] Sandmand M., Bruunsgaard H., Kemp K., Andersen-Ranberg K., Schroll M., Jeune B.; High circulating levels of tumor necrosis factor-  $\alpha$  in centenarians are not associated with increased production in T Lymphocytes; *Gerontology*, 2003 May-June; 49(3): 155-60
- [150] Schäffer M., H.-D. Becker; Immunregulation der Wundheilung; *Chirurg*, 1999; 70: S 897-908

- [151] Scuderi Ph., K.S. Lam, K.J. Ryan, E. Petersen, K.E. Sterling, P.R. Finley, C. G. Ray, D.J. Slymen, S.E. Salmon; Raised serum levels of tumour necrosis factor in parasitic infections; *The Lancet*, Dec. 1986,1364-1365
- [152] Selby P.J., S. Hobbs, C. Viner, E. Jackson, I.E. Smith, T.J. McElwain; Endogenous Tumour necrosis factor in cancer patients, *Lancet* Feb/27,1988;483
- [153] Skapenko Alla, Gerald U. Niedobitek, Joachim R. Kalden, Peter E. Lipsky, Hendrik Schulze-Koops; Generation and Regulation of Human Th1-Biased Immune Response In Vivo: A Critical Role for IL-4 and IL-10; *The Journal of Immunology*; 2004, 172: 6427-34
- [154] Skeie G.O., J.P. Pandey, J.A. Aarli, N.E. Gilhus; TNFA and TNFB Polymorphisms in myasthenia gravis; *Arch neurol*, Apr. 1999, Vol 56, 457-461
- [155] Skoog Tiina, Ferdinand M van't Hooft, Bengt Kallin, Stefan Jovinge, Susanna Boquist, Jan Nilsson, Per Eriksson, Anders Hamsten; A common functional polymorphism (C→A substitution at position -863) in the promotor region of the tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gene associated with reduced circulating levels of TNF- $\alpha$ ; *Human Molecular Genetics*, 1999, Vol. 8, No.8, 1443-1449
- [156] Sotgiu St., M. Pugliatti, C. Serra, G. Rosati, A. Dolei, M.G. Marrosu; Tumor necrosis factor2 allele does not contribute to increase tumor necrosis factor  $\alpha$  production in Sardinian multiple Sclerosis,1999,*Annals of Neurology* Vol 46,No 5, 799-800
- [157] Stack W. H., S. D. Mann, A. J. Roy, P. Heath, M. Sopwith, J. Freeman, G. Holmes, R. Long, A. Kamm; Randomised controlled trial of CDP571 antibody to tumour necrosis factor- $\alpha$  in Crohn's disease; *Lancet* 1997; 349: S. 521-524
- [158] Stadler J., C.D. Heidecke, H. Bartels, B. Holzmann, H. Wagner, J.R. Siebert, Immunsuppression und Sepsis, *Chirurg* 1995; 66: S. 11-16
- [159] Stirnadel H.A., M. Stöckle, I. Felger, T. Smith, M. Tanner, H-P. Beck; Malaria infection and morbidity in infants in relation to genetic polymorphisms in Tanzania; *Tropical Medicine and international health*; 1999, Vol.4, No. 3, 187-193
- [160] Stüber F., I.A. Udalova, M. Book, L. N. Drutskaya, D. V. Kuprash, R. L. Turetskaya, F. U. Schade, S. A. Nedospasov; -308 Tumor necrosis Factor (TNF) Polymorphism is not Associated With Survival in Severe Sepsis and is Unrelated to Lipopolysaccharide Inducibility of the Human TNF Promotor; *Journal of Inflammation*, 1996; 46; S. 42-50
- [161] Stüber F., M. Petersen, F. Bokelmann, U.Schade; A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor- $\alpha$  concentrations and outcome of patients with severe sepsis; *Crit. Care Med.* 1996, Vol.24, No.3; S 381-384
- [162] Suarez A; Lopez P, Mozo L, Gutierrez C; Differential effect of IL 10 and TNF $\alpha$  genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic Lupus erythematosus; *Ann Rheum Dis.* 2005 Nov;64(11): 1605-10
- [163] Tanaka Atsushi; Stefano Quaranta, Alberto Mattalia, Ross Coppel, Floriano Rosina, Michael Manns, M. Eric Gershwin; The tumor necrosis  $\alpha$  correlates with progression of primary biliary cirrhosis ;*Journal of hepatology*, 1999; 30, 826-829
- [164] Tang Gau-Jun, Song-Lih Huang, Huey-Wen Yien, Wie-Shone Chen, Chin-Wen Chi, Chew-Wun Wu, Wing-Yiu Lui, Jen-Hwey Chiu, Tak Yu Lee; Tumor necrosis factor gene polymorphism and septic shock in surgical infection, in: *Crit Care Med* 2000, Vol. 28, No. 8, S. 2733-2736
- [165] Thompson CB; Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease; *Science*, 1995 Mar 10;267(5203):1456-62
- [166] Tobon GJ, Correa PA, Gomez LM, Anaya JM; Lack of association between TNF -308 Polymorphism and the clinical and immunological characteristics of systemic lupus erythematosus and primary Sjogren's syndrome; *Clin Exp Rheumatol.* 2005 May-Jun: 23(3): 339-44
- [167] Tracey K.J., St.F. Lowry, The Role of Cytokine Mediators in Septic Shock,*Adv.Surg*,1990; 23, S. 21-56
- [168] Tracey K.J., S. Morgello, B. Koblin, T.J. Fahey III, J. Fox, A. Aledo,K. R. Manogue, A. Cerami; Metabolic Effects of Cachectin/ Tumor Necrosis Factor Are Modified by Site of Production;*J. Clin. Invest*, 1990; Vol.86: S 2014-2024

- [169] Tracey K.J., A. Cerami; Tumor necrosis factor: A Pleiotropic Cytokine and Therapeutic Target; *Annu. Rev. Med.* 1994; 45, S. 491- 503
- [170] Tracey K.J., A. Cerami; Tumor necrosis factor: An updated review of its biology, *Crit Care Med*, 1993, Vol.21, No.10: S.415-422
- [171] Tsuchiya N, Tokushige K, Yamaguchi N, Hasegawa K, Hashimoto E, Yamauchi K, Shiratori K; Influence of TNF-Gene polymorphism in patients with acute and fulminant hepatitis; *J Gastroenterol.* 2004 Sep; 39(9):859-66
- [172] Uauy R, Solomons N, Diet, nutrition, and the life-course approach to cancer prevention; *J. Nutr.* 2005 Dec; 135(12 Suppl):2934S-2945S
- [173] Ugliarolo A.M., D. Turbay, P.A. Pesavento, J.C. Delgado, F.E. McKenzie, J.G. Gribben, D. Hartl, E.J. Yunis, A.E. Goldfeld; Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor  $\alpha$  gene promoter; *Tissue Antigens* 1998; 52:359-367
- [174] van der Poll T., J.A. Romijn, E. Endert, J.J.J. Borm, H.R. Büller, H.P. Sauerwein; Tumor necrosis factor mimics the metabolic response to acute infection in healthy humans, *The American Physiological Society* 1991, E457-E465
- [175] van Hensbroek Boele, E. Onyiorah, S. Jaffar, G. Schneider, A. Palmer, J. Frenkel, G. Enwere, S. Forck, A. Nusmeijer, S. Bennett, B. Greenwood, D. Kwiatkowski; 1996; A trial of artemether or quinine in children with cerebral malaria; *New England Journal of medicine*; 335, 69-75.
- [176] Van Kooten C., Rensink I., Aarden L., van Oers R.; Cytokines and intracellular signals involved in the regulation of B-CLL proliferation; *Leuk. Lymphoma*, 1993, 12, 27-33
- [177] van Noesel Max M, Saskia van Bezouw, Gajja S. Salomons, P. A. Voute, Rob Pieters, Steve B. Baylin, James G. Herman, Rogier Versteeg; Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing Ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense Promotor Hypermethylation; *Cancer Research* 62, April 1, 2002; 2157-2161
- [178] van Zee K.J., Kohno T., Fischer E., et al. (1992) TNF soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive TNF in vitro and in vivo; *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4845-4849
- [179] van Zee Kimberly J., Tadahiko Kohno, Eva Fischer, Craig S. Rock, Lyle L. Moldawer, Stephen F. Lowry; Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 89, pp. 4845-4849, June 1992
- [180] Waage Anders, Nina Liabakk, Egli Lien, Jon, Lamvik, Terje Espevik; p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in patients with chronic lymphocytic leukemia; *Blood*, Vol.80, No.10 (November 15), 1992: pp 2577-2583
- [181] Wagener Christoph; Einführung in die molekulare Onkologie; Thieme 1995
- [182] Wang C-Y, Cusack JC, Liu R, Baldwin ASJ; Control of inducible chemoresistance: enhanced antitumor efficacy via increased apoptosis by inhibition of NF- $\kappa$  B. *Nat Med* 1999; 5:412-7
- [183] Warzocha Krzysztof, Patricia Ribeiro, Jacques Bienvenu, Pascal Roy, Carole Charlot, Dominique Rigal, Bertrand Coiffier, Gilles Salles; Genetic Polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence Non-Hodgkin's lymphoma outcome; *Blood*, Vol. 91, No. 10 (May 15), 1998:3574-3581
- [184] Wattavidanage J., R. Carter, K.L.R.L. Perera, A. Munasingha, S. Bandara, D. McGuinness, A.R. Wickramasinghe, H.K. Alles, K.N. Mendis, S. Premawansa; TNF alpha2 marks high risk of severe disease during *Plasmodium falciparum* malaria and other infections in Sri Lankans; *Clin Exp. Immunol* 1999; 115: 350-355
- [185] Weitkamp J.H., F. Stüber, P. Bartmann; Pilot study assessing TNF-Gene polymorphism as a prognostic marker for disease progression in neonates with sepsis; *Infection* 28, 2000, No.2, 92-96
- [186] Welte T.; Zytokine und obstruktive Atemwegserkrankungen, *Internist*, 2001; 42, S: 64-74

- [187] Westendorp R.G.J., J.A. Langermans, T.W. Huizinga, C.L. Verweij, A. Sturk; 1997; Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease., *Lancet*, 349, 170-173
- [188] Wihlborg Christel, Jan Sjöberg, Monica Intaglietta, Ulla Axdorph, Eva K .Pisa and Pavel Pisa; Tumor necrosis Factor- $\alpha$  cytokine Promotor gene polymorphism in Hodgkin's disease and chronic lymphocytic leukaemia; *British Journal of Haematology* 1999,104,346-349
- [189] Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AIF, Duff GW.; Single base polymorphism in the human Tumor Necrosis Factor (TNF)  $\alpha$  gene detectable by NCOI restriction of PCR product. *Hum Mol Gen* 1992;1:353
- [190] Wilson A.G., J.A. Symons, T.L. McDowell, H.O. McDevitt, G.W. Duff; Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor  $\alpha$  Promotor on transcriptional activation; *Proc. Natl. Acad. USA*, April 1997, Vol.94, 3195-3199
- [191] Wilson AG, di Giovine FS, Duff GW: Genetics of tumor necrosis factor- $\alpha$  in autoimmune, infectious and neoplastic disease. *J Inflamm* 1995; 48:1-12
- [192] Wilson A.G., N. de Vries, F. Pociot, F. S. di Giovine, L. B. A. van der Putte, G. W. Duff; An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor  $\alpha$  Promotor region is strongly assoziated with HLA A1, B8 and DR3 alleles; *J. Exp. Med.* 1993, Vol. 177; S.: 557- 560
- [193] Zeerleder S., Ch. Caliezi, M. Redondo, J. Devay, W.A. Wuillemin; Aktivierung des plasmatischen Kaskadensystems bei Sepsis: Rolle von C1-Inhibitoren; *Schweiz Med Wochenschrift*, 1999; 129:1410-1417
- [194] Zheng C., Huang D., Bergenbrant S., Sundblad A., Österborg A., Björkholm M. Holm G., Yi Q.; Interleukin 6, tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1 $\beta$  and interleukin 1 receptor antagonist Promotor or coding gene polymorphisms in multiple myeloma; *British journal of haematology* 2000, 109,39-45

# Anlage 1

## Legende Statistik

### **$\gamma$ -Intercept**

Schnittstelle mit der y-Achse

Lineare Regression und Varianzanalyse, Prof. Dr. Pokropp, Oldenbourg, 1994, S.6

### **Schätzwert**

Die Parameter einer Grundgesamtheit können durch die entsprechenden Kenngrößen einer zufälligen Stichprobe geschätzt werden. Der Mittelwert kann als Schätzwert für den Erwartungswert herangezogen werden. Wird ein unbekannter Parameter durch einen einzigen Wert geschätzt, spricht man von Punktschätzung. Eine Schätzfunktion ist eine Vorschrift, nach der aus den Daten einer Stichprobe des Umfangs  $n$  ein angenäherter Wert für den unbekannt Parameter berechnet wird. Die Werte, die die Schätzfunktion in Abhängigkeit von der jeweiligen Stichprobe annimmt, nennt man Schätzwerte.

Basiswissen medizinische Statistik, Christel Weiß, Springer 1999, S.183

### **Standardfehler**

Das zufällige Zustandekommen des Mittelwertes und seine Variabilität werden durch den Wert Streuung  $\sigma - \bar{x}$  ausgedrückt und auch als Standardfehler des Mittelwertes bezeichnet.

Basiswissen medizinische Statistik, Christel Weiß, Springer 1999, S.123

### **p-Wert**

Gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der man das vorliegende Testergebnis oder ein noch extremeres Ergebnis unter der Nullhypothese erhalten würde. Wenn der p-Wert kleiner ist als  $\alpha$  ist das Testergebnis signifikant.

Basiswissen medizinische Statistik, Christel Weiß, Springer 1999, S.253

## Signifikanz

Wenn die Prüfgröße im kritischen Bereich liegt, entscheidet man sich für die Alternativhypothese. Ein solches Ergebnis heißt in Abhängigkeit von  $\alpha$  schwach-signifikant ( $\alpha=10\%$ ), signifikant ( $\alpha=5\%$ ), hoch-signifikant ( $\alpha=1\%$ ) oder höchst-signifikant ( $\alpha=0,1\%$ ).

Basiswissen medizinische Statistik, Christel Weiß, Springer 1999, S.207

## Interaktion

Die Interaktion ist ein Parameter der angibt, welche Zellen in der Tabelle statistisch gesehen verbunden sind und welche nicht.

Pablo Verde, Institut für Biostatistik der HHU Düsseldorf

## Nulldevianz

Die Devianz für das Nullmodell ist vergleichbar mit dem Begriff Devianz. Die Devianz ist die Abweichung vom Idealwert, was im linearen Modell mit der Fehlerquadratsumme vergleichbar ist. Bei einer perfekten Modellanpassung ergibt sich eine Devianz von 0.

Logistische Regression; ausgewählte Kapitel der Forschungsmethoden und Evaluation; Marina Seidel, Thomas Wagner unter [user.uni-frankfurt.de](mailto:user.uni-frankfurt.de)

## Freiheitsgrade

Bei metrischen Merkmalen ist der Mittelwert das am häufigsten benutzte Längenmaß. Es liegt deshalb nahe, ein Streuungsmaß zu definieren, das die Abweichung der Messwerte vom Mittelwert quantifiziert. Ein solches Maß ist die Varianz, die mittlere quadratische Abweichung der Messwerte vom Mittelwert.

Bei der Berechnung der Varianz legt man die Summe der Abstandsquadrate zugrunde.

$$v = s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Die Division durch  $n-1$  ist dadurch begründet, dass nur  $n-1$  Summanden des Zählers eine Information beinhalten. Wenn  $n-1$  Messwerte und der Mittelwert

bekannt sind, lässt sich aus diesen Angaben der noch fehlende Summand ermitteln. Die Zahl  $f = n - 1$  wird auch als die Anzahl der Freiheitsgrade bezeichnet. Das bedeutet: man hat die Freiheit  $n - 1$  Messwerte nach belieben zu verändern und den letzten Wert entsprechend anzupassen, ohne das sich dabei der Wert der Varianz ändert.

Basiswissen medizinische Statistik, Christel Weiß, Springer 1999, S.53  
[www.statistics4u.com/fundstat\\_germ/cc\\_degree\\_of\\_freedom.html](http://www.statistics4u.com/fundstat_germ/cc_degree_of_freedom.html)

### **Residualdevianz**

Residuen sind das wichtigste statistische Werkzeug um herauszufinden, wie gut ein Modell die Daten anpasst. Bei Regressionsmodellen benutzt man die Residuen um Aussagen über die Wichtigkeit und Beziehung eines Terms im Modell zu treffen, aber auch um Ausreißer zu entdecken. Bei den GLM's (generalisierten linearen Modellen) haben Residuen die zusätzliche Aufgabe, die Form der Varianz als Funktion des mittleren Response (Zielvariable) zu überprüfen. GLM's benötigen eine Verallgemeinerung des Residuums, so dass man es wie die Gaußschen Residuen in einem linearen Modell benutzen kann. Darum definiert man verschiedene Residuen um herauszufinden, wie gut ein GLM die Daten anpasst um die Form der Varianzfunktion zu bestimmen und um problematische Beobachtungen zu erkennen. Ein großes Devianzresiduum gehört zu einer Beobachtung die das Modell nicht gut anpasst.

Die Residualdevianz ist die Differenz zwischen der Nulldevianz und der Devianz für das passende Modell. Wenn das Modell die Daten anpasst, ist die Residualdevianz kleiner als die Anzahl der Freiheitsgrade. Ist die Residualdeviance größer, passt es die Daten nicht an.

(Z.B. Residualdevianz =100,Freiheitsgrade=10; das Modell passt die Daten nicht an;  
Residualdevianz =10,Freiheitsgrade=12; das Model passt die Daten an)

[www-m4.ma.tum.de/nbu1/modreg/](http://www-m4.ma.tum.de/nbu1/modreg/)  
Pablo Verde, Institut für Biostatistik der HHU Düsseldorf

### **AIC-Kriterium**

Mit Hilfe des AIC-Kriteriums sucht man nach dem optimalen Modell in R. Gesucht wird die adäquate Beschreibung der beobachteten Daten durch ein Modell mit möglichst wenigen Parametern. Wenige Parameter erhöhen das Risiko wichtige Effekte oder Zusammenhänge zu übergehen (underfit). Zu viele Parameter führen zu

Pseudoeffekten oder Artefakten (overfit). Das AIC-Kriterium bietet Balance zwischen beiden Fehlermöglichkeiten in der Modellbildung. Es ist ohne theoretische Rechtfertigung, hat sich in der Anwendung aber als praktisch erwiesen. Ziel der Modellbildung ist es, einen möglichst kleinen Wert für das AIC zu erhalten.

Angewandte Statistik, Lothar Sachs, Jürgen Hedderich, Springer Verlag, 12. Auflage, 2006

### **Fisher Scoring Iterations**

Der Fisher-scoring Algorithmus wird im Rahmen der generalisierten linearen Modelle zur iterativen Bestimmung der ML-Schätzung (ML=Maximum-likelihood oder maximale Stichprobenwahrscheinlichkeit) verwendet. Es handelt sich hierbei um die Annäherung an die exakte Lösung.

Helge Toutenburg, Lineare Modelle Theorie und Anwendung, 2.Aufl.,Physica-Verlag, 2003

Josef Naas, Hermann Ludwig Schmid; Mathematisches Wörterbuch Band I und II, Akademie-Verlag GmbH 1961

### **Standardnormalverteilung**

Der Begriff Normalverteilung bezeichnet eine ganze Klasse von symmetrischen glockenförmigen Verteilungen, die sich in ihrem Mittelwert (Erwartungswert)  $\mu$  und in ihrer Streuung  $\sigma$  unterscheiden. Mithilfe dieser Parameter in der Funktionsgleichung der Normalverteilung kann geprüft werden ob sich empirisch gemessene Merkmale annähernd normal verteilen. Fehlertoleranz und Fehlerrisiko können unter anderem berechnet werden. Zur Standardisierung dieser Werte wird durch die z-Transformation jede Normalverteilung in eine Standardnormalverteilung überführt.

Statistik, Skript zur Einführung, Peter Hautz, 2004; unter [psydok.sulb.uni-saarl](http://psydok.sulb.uni-saarl)

## Anlage 2

### Curriculum Vitae Christiane Rossbach

Geboren	29.04.1967 in Düsseldorf
1977-1987	Humboldt-Gymnasium in Düsseldorf
1987-1990	Kaufmännische Ausbildung
1991-1992	Freiwilliges soziales Jahr
1992-1999	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
1999	III. Staatsexamen, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
1999- 2001	Abteilung für Gefäß- und Allgemein Chirurgie Augusta-Krankenhaus, Düsseldorf
2001-2004	Abteilung für Kardiologie und Innere Medizin Johanniter-Krankenhaus Duisburg-Rheinhausen
2004-2006	Elternzeit
2006-2008	Allgemeinmedizinische Praxis M. Hentschel Düsseldorf
10.12.2008	Examen zur Fachärztin der Allgemeinmedizin