

Aus der V. Medizinischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Krämer

Auswirkung des Rauchens auf kardiovaskuläre und renale Risikomarker
und Mortalität unter Berücksichtigung der genetischen Prädisposition

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)

der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von

Graciela E. Delgado Gonzáles de Kleber

aus

Lima - Perú

2023

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Univ. Prof. Dr. med. Winfried März

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
2 EINLEITUNG.....	3
2.1 Rauchen – immer noch ein <i>Public Health</i> -Problem	3
2.2 Kurze Geschichte des Tabakrauchens.....	3
2.3 Nikotin und seine Wirkung im zentralen Nervensystem.....	5
2.4 Nikotinabbau	6
2.5 Genetische Aspekte	6
2.6 Auswirkungen des Rauchens auf die Gesundheit	6
2.7 Auswirkungen des Rauchens auf das Endothel und die Immunfunktion	7
2.8 Rauchen und Methylierungsstatus	9
2.9 Fragestellung.....	11
3 MATERIAL UND METHODEN.....	12
3.1 Studienkohorte	12
3.2 Laborverfahren	12
3.2.1 FACS-Analysen	12
3.2.2 DNA-Methylierungsmessung	13
3.2.3 Genotypisierung und Imputation	13
3.3 Definition der klinischen Variablen und Endpunkte	14
3.4 Statistische Methoden	15
4 ERGEBNISSE	16
4.1 Auswirkungen des Rauchens auf Marker der endothelialen Dysfunktion	16
4.1.1 Charakteristika stratifiziert nach Rauchstatus.....	16
4.1.2 Assoziation der Endothelmarker mit Mortalität	20
4.2 Auswirkungen des Rauchens auf Leukozyten und spezifische Subtypen ...	25
4.2.1 Teilnehmercharakteristika stratifiziert nach Rauchstatus.....	25
4.2.2 Assoziation von Leukozyten-Subtypen mit der Mortalität	29
4.3 Auswirkungen des Rauchens auf das DNA-Methylierungsprofil.....	33

4.4	Genomweite Assoziationsanalyse (GWAS).....	40
5	DISKUSSION	44
5.1	Rauchen und Atherosklerose	44
5.2	Auswirkungen des Rauchens auf die Endothelfunktion.....	45
5.2.1	Assoziation zwischen Rauchen und endothelialen Adhäsionsmolekülen 45	
5.2.2	Assoziation zwischen Endothelmarkern und Mortalität.....	47
5.3	Auswirkungen des Rauchens auf zirkulierende Leukozyten.....	48
5.3.1	Assoziation des Rauchens mit der Leukozytenkonzentration.....	48
5.3.2	Assoziation zwischen Leukozyten und Mortalität.....	49
5.4	Auswirkungen des Rauchens auf das DNA-Methylierungsprofil der Leukozyten	51
5.5	Genomweite Assoziationsstudien der Phänotypen Cotinin und Rauchstatus 53	
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	54
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	56
8	DANKSAGUNG	64

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1,25OH VitD	1,25-Dihydroxy-Vitamin D (Calcitriol)
25OH VitD	25-Hydroxy-Vitamin-D (Cholecalciferol)
5-HT	5-Hydroxytryptamin
AHRR	Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressor
ANOVA	Varianzanalyse (englisch: analysis of variance)
AUC	Area-under-the-ROC-curve
BMI	body mass index
CD	cluster of differentiation
CI	Konfidenzintervall (englisch: confidence interval)
CPACOR	incorporating Control Probe Adjustment and reduction of global CORrelation
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
DALY	disability-adjusted life years
DiaBP	diastolischer Blutdruck
DM	Diabetes mellitus
DNMT	DNA-Methyltransferase
EAF	Effekt-Allel-Frequenz
eGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (englisch: estimated glomerular filtration rate)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ESC	European Society of Cardiology
EVALI	e-cigarette, or vaping, product use associated lung injury
EWAS	Epigenomweite Assoziationsstudie
FACS	Durchflusszytometrie (englisch: fluorescence-activated cell sorting)
FDR	false discovery rate
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HbA1c	Hämoglobin A1c
HDL-C	Lipoprotein-hoher-Dichte-Cholesterin (englisch: high-density lipoprotein)
HRC	Haplotype Reference Consortium
hsCRP	hochsensitives C-reaktives Protein
HR	Hazard ratio
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IgE	Immunglobulin E
IL-6	Interleukin-6
KHK	koronare Herzkrankheit

LDL-C	Lipoprotein-niedriger-Dichte-Cholesterin (englisch: low-density lipoprotein cholesterol)
LURIC	Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Studie
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
nAChR	nikotinerge Acetylcholinrezeptoren
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLR	Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio
NO	Stickstoffmonoxid (englisch: nitric oxide)
NRI	net reclassification improvement
NT-proBNP	N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide
oxLDL	oxidiertes LDL-C
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCA	Hauptkomponentenanalyse (englisch: principle component analysis)
PCs	Hauptkomponenten (englisch: principle components)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (englisch: reactive oxygen species)
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SD	Standardabweichung (englisch: standard deviation)
sICAM-1	lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (englisch: single nucleotide polymorphism)
sVCAM1	lösliches vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
SysBP	systolischer Blutdruck
TG	Triglyzeride
vWF	von Willebrand Faktor
ZNS	Zentralnervensystem

2 EINLEITUNG

2.1 Rauchen – immer noch ein *Public Health*-Problem

Das Tabakrauchen stellt einen der wichtigsten vermeidbaren Risikofaktoren für Morbidität und Mortalität weltweit dar. Trotz verstärkter Aufklärung und Prävention über die gesundheitsschädigenden Folgen des Rauchens und des Passivrauchens betrug die altersbereinigte Prävalenz des Rauchens im Jahr 2019 weltweit laut der *Global Burden of Disease*-Studie immer noch 32,7% bei Männern und 6,62% bei Frauen [1]. Auch in Deutschland zeigen die Daten für das Jahr 2017, dass fast 25% der Bevölkerung rauchen, wobei die höchste Raucherprävalenz in der Altersgruppe zwischen 30 und 35 Jahren (30,7%) besteht. [2]. Aktuellere Daten des Mikrozensus geben für das Jahr 2021 einen Prozentsatz an Rauchern von 18,9% an [3].

Der Tabakkonsum steht hierzulande an erster Stelle der Risikofaktoren, die zu Sterblichkeit und Behinderung führen [4]. Weltweit gesehen steht das Rauchen als Risikofaktor für Mortalität (7,1 Millionen) und *disability-adjusted life years* (DALYs, 182 Millionen) für das Jahr 2017 auf dem zweiten Platz [5]. Zwischen den Jahren 1990 und 2017 nahm die Zahl der auf das Rauchen zurückzuführenden Todesfälle um 24,9% zu [5].

Ganz abgesehen von den verheerenden gesundheitlichen Schäden des Rauchens verursachen die Folgen der Tabaksucht auch große Belastungen für das Gesundheitssystem. Laut einer Studie des Deutschen Krebsforschungszentrums, welche im Jahr 2015 veröffentlicht wurde, verursacht das Rauchen jährlich 25,41 Mrd. Euro an direkten Kosten wie Krankheitskosten, Pflegekosten oder Rehabilitationskosten. Darüber hinaus entstehen weitere 53,68 Mrd. Euro an indirekten Kosten, zu denen z.B. Ressourcenverlust durch Mortalität, Arbeitslosigkeit oder die in Rehabilitation verbrachte Zeit zählen [6].

Eine kürzlich veröffentlichte Studie aus der Schweiz ergab, dass dort das Rauchen im Jahr 2017 für 14,4% der Todesfälle, 36,0% of the DALYs, 27,8% der Kosten im Medizinbereich sowie 27,9% der Produktivitätsverluste verantwortlich war [7].

2.2 Kurze Geschichte des Tabakrauchens

Die Pflanzen *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana rustica* aus der Familie der *Solanaceae* stammen ursprünglich aus Amerika und haben sich in den Anden um Peru/Ecuador entwickelt [8]. Vor kurzem haben Archäologen Beweise dafür entdeckt, dass Jäger und Sammler in Nordamerika bereits vor 12.300 Jahren Tabak verwendet haben [9], und damit deutlich früher als bislang vermutet (dass Tabak seit etwa 5000-3000 v. Chr. kultiviert wurde) [8]. Als Christoph Kolumbus 1492 in Nordamerika ankam, war der Gebrauch von Tabak bereits auf dem gesamten amerikanischen Kontinent verbreitet, allerdings nur für rituelle Zwecke und naturmedizinische Anwendungen. Die Praxis des Rauchens scheint aus dem Schnupfen entstanden zu sein, da Schnupfinstrumente zu den ältesten tabakbezogenen Artefakten gehören, die man gefunden hat. Wegen seiner schmerzlindernden und antiseptischen Eigenschaften wurde Tabak als Heilmittel für eine Vielzahl von Beschwerden eingesetzt, er wurde den Göttern geopfert und in religiösen Zeremonien verwendet [8].

Die ersten Europäer, die rauchten, waren Mitglieder von Kolumbus Schiffsmannschaft. Fast von Anfang an wurde das Rauchen von den Europäern als eine verderbliche und schädliche Praxis beschrieben. Der erste Tabakraucher Europas war der Spanier Rodrigo de Jerez (Abbildung 1). Er wurde der Inquisition übergeben und zu 10 Jahren Haft verurteilt, als er aus Mund und Nase qualmend auf der Straße Tabak rauchte, weil man glaubte, der Teufel sei im Spiel [10].



Abbildung 1: Rodrigo de Jerez (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rodrigo_de_Jerez.jpg)

Die angeblichen medizinischen Eigenschaften des Tabaks führten jedoch dazu, dass seine Samen nach Spanien und Portugal gebracht wurden, um sie dort anzubauen, zunächst in den Gärten der Paläste. Die erste Person von der man weiß, dass sie Tabak in Europa angebaut hat, war Jean Nicot, der französische Botschafter in Portugal. Er brachte den Tabak dann an den königlichen Hof von Frankreich. Catherine de Medici und ihr Sohn König Charles IX verwendeten ihn zur Behandlung von Migräne [11]. Es ist eine Ironie der Geschichte, dass unter den ersten Behauptungen bezüglich der medizinischen Eigenschaften des Tabaks auch seine Potenziale zur Heilung und Vorbeugung von Krebs gehörten [8]. Die Zigarette wurde in den 1850er Jahren in England zunächst teilmaschinell und später auch vollmaschinell hergestellt und ist aufgrund ihrer bequemen Anwendung heute das beliebteste Mittel zum Tabakkonsum. Der Rauch von Zigaretten ist saurer als der von Pfeifen und Zigarren. Bei einem sauren pH-Wert von 5,5-6,0 liegt Nikotin in seiner ionisierten Form vor und kann die Mundschleimhaut nicht passieren. Die Alveolarflüssigkeit der Lunge hingegen hat einen pH-Wert von 7,4, welcher eine schnelle Absorption ermöglicht [12]. Daher ist die Inhalation in die Lunge für eine effektive Aufnahme von Nikotin bei der Zigarette erforderlich, während das Nikotin von Pfeifen und Zigarren leichter über die Mundschleimhaut aufgenommen werden kann. Die Aufnahme über die Lunge verschafft dem Raucher nicht nur ein unmittelbareres Gefühl der Befriedigung, da das Nikotin über einen Umweg zum Gehirn gelangt, sondern setzt auch eine viel größere Oberfläche des Atmungsepithels dem Rauch aus, was dessen schnelle Aufnahme fördert und die süchtig machende Wirkung des Produkts verstärkt.

2.3 Nikotin und seine Wirkung im zentralen Nervensystem

Der bekannteste Inhaltsstoff des Tabaks bzw. der Tabakpflanze ist das Alkaloid Nikotin. Von den ca. 13 mg Nikotin, welche eine Zigarette enthält [13], werden beim Rauchen 1 bis 2 mg aufgenommen [14]. Die Tabakpflanze enthält aber noch eine Reihe weiterer Inhaltsstoffe. Während ihrer Verarbeitung zur Zigarette kommen noch ca. 600 weitere chemische Substanzen hinzu. Nach dem Anzünden der Zigarette unterliegen alle diese Substanzen noch einer Pyrolyse und es bildet sich eine Vielzahl von Verbrennungsstoffen, sodass mit dem Hauptstromrauch mehr als 4000 unterschiedliche Substanzen inhaliert werden, u.a. polyzyklische organische Stoffe oder auch Schwermetalle [10]. Nikotin aktiviert u.a. die Acetylcholinrezeptoren, was zur Nikotinabhängigkeit führen kann [15]. Der Genuss von Nikotin macht süchtig, das war der Tabakindustrie schon in den 1960er Jahren bekannt, wurde aber bis in die 1980er Jahre hinein von ihr geleugnet [16].

Die nikotinergen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) kommen im Zentralnervensystem (ZNS) und in peripheren Nervenstrukturen vor, wobei sich unterschiedliche nAChR in den verschiedenen Hirnregionen aufgrund ihrer Bindungskinetik für Nikotin unterscheiden [17]. Die nAChR bestehen aus 5 molekularen Untereinheiten (2x α -, β -, γ -, δ -Untereinheit) von denen jede jeweils viermal die Zellmembran durchspannt. Es handelt sich um unspezifische Kationenkanäle, die vor allem für monovalente Na^+ - und K^+ -Ionen permeabel sind, und von Nikotin geöffnet werden können. Geringe Nikotindosen, wie sie beim Zigarettenrauchen auftreten, wirken bei mehrmaliger Gabe motorisch stimulierend, ganz ähnlich wie Amphetamin oder Kokain [18]. Diese Wirkung des Nikotins wird durch eine höhere Freisetzung von Dopamin aus dem Nucleus accumbens vermittelt [18], in welchem eine hohe Dichte an nAChR nachgewiesen wurde, und in dem sich auch das Belohnungssystem befindet [19]. Das dopaminerge „Belohnungssystem“ des Körpers wird durch Nikotin bevorzugt gesteuert. Daher läuft die Nikotinabhängigkeit sehr wahrscheinlich über die gleichen Mechanismen wie bei der Abhängigkeit von Kokain und Amphetamin [20].

Nikotin fördert auch die Freisetzung von Noradrenalin aus dem Hippocampus sowie eine Abnahme der Konzentration von Serotonin (5-Hydroxytryptamin (5-HT)) [21]. Post mortem wurden im Gehirn von starken Rauchern niedrigere Konzentrationen von 5-HT und auch dessen Metaboliten 5-OH-Indolessigsäure gefunden [22].

Angstreize führen zu einer verstärkten Freisetzung von 5-HT im Gehirn, welche von Anxiolytika supprimiert wird [23]. Wie bereits oben erwähnt kommt es durch eine Nikotinaufnahme ebenfalls zu einer Minderung von 5-HT im Hippocampus, was so zumindest teilweise die bekannte anxiolytische Wirkung von Nikotin erklären könnte [24]. Das Rauchen ist unter depressiven Patienten weit verbreitet, und man kann über eine antidepressive Wirkung bei diesen Patienten spekulieren [25]. Im Übrigen ist Nikotin im Gegensatz zu anderen Drogen wie Alkohol oder Heroin kaum psychotoxisch wirksam. Daher zeigen auch stark abhängige Raucher in der Regel nur geringe soziale Auffälligkeiten.

Studien haben auch gezeigt, dass bestimmte Antidepressiva ein Potential für die Behandlung bei der Raucherentwöhnung besitzen [17]. In der Regel werden für die Raucherentwöhnung Nikotinprodukte (Pflaster, Kaugummi, Nasalspray, Sublingualtabletten, Inhaler, Pastille) verwendet. Diese erzeugen allerdings nicht den speziellen „Kick“, da die Anflutung des Nikotins langsamer als aus der Zigarette erfolgt (Inhalat > Nasalspray > Kaugummi > Pflaster) [17].

2.4 Nikotinabbau

Wie andere Xenobiotika auch wird Nikotin vor allem in der Leber (ca. 90%), aber auch in anderen Organen metabolisiert [12]. Das Nikotin hat eine relativ kurze Halbwertszeit von nur etwa 30-120 min; sein wichtigstes Abbauprodukt ist das Cotinin. Dieses wird dann weiter metabolisiert zu trans-3'-Hydroxycotinin, welches hauptsächlich über den Urin ausgeschieden wird [12]. Aufgrund seiner längeren Halbwertszeit von 19 bis 40 h ist das Cotinin ein geeigneterer Marker für die Menge des Tabakkonsums als das Nikotin selbst, wobei aber beträchtliche inter-individuelle Unterschiede sowohl hinsichtlich der Umwandlung des Nikotins in Cotinin als auch bezüglich der Exkretion des Cotinins bekannt sind [26].

2.5 Genetische Aspekte

Hinsichtlich der Nikotinabhängigkeit scheinen genetische Aspekte eine geringere Rolle zu spielen als Umwelteinflüsse wie Erziehung, Freundeskreis, Werbung [17, 27]. Anders sieht es aus was die Unfähigkeit mit dem Rauchen aufzuhören angeht, denn dafür sind sowohl biologische (medikamentöse Einflüsse, psychiatrische Störungen, Neuroadaptation) als auch genetische Effekte sehr bedeutsam [28, 29]. Ein Beispiel für einen genetischen Effekt wäre ein Polymorphismus im *CYP2A6*-Gen, dessen Produkt das Nikotinmolekül zu seinem Abbauprodukt Cotinin metabolisiert. Menschen die eine defekte Version des Enzyms geerbt haben bauen Nikotin langsamer ab und sind dadurch weniger anfällig für eine Nikotinabhängigkeit [30]. Auch für die Tyrosinhydroxylase, welche den limitierenden Schritt für die Bildung von Dopamin katalysiert, wurden Polymorphismen beschrieben, die mit dem Rauchverhalten assoziiert wurden [31, 32]. Inzwischen haben Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) noch viele weitere genetische Loci identifiziert, welche mit dem Rauchen assoziiert sind. So sind im GWAS-Katalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) im Dezember 2021 unter dem Stichwort „smoking behaviour“ 43 Studien und 999 Assoziationen registriert.

2.6 Auswirkungen des Rauchens auf die Gesundheit

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Rauchen einen wichtigen Risikofaktor für die menschliche Gesundheit darstellt. So schädigt das Rauchen unterschiedliche Organsysteme, wodurch chronische Krankheiten und vorzeitige Sterblichkeit verursacht werden (Abbildung 2). Rauchen verursacht u.a. Krebs, Lungenerkrankungen, Diabetes mellitus und erhöht das Risiko für Tuberkulose, bestimmte Augenerkrankungen sowie immunologische Probleme wie z.B. rheumatoide Arthritis [33, 34]. Weltweit stieg die Anzahl der durch das Rauchen verursachten Krebstodesfälle von 1,5 Millionen im Jahr 1990 auf 2,5 Millionen 2019 [35]. Neben den Krebserkrankungen wurden auch die Auswirkungen des Rauchens auf das Herz-Kreislaufsystem intensiv untersucht. In den letzten Jahren verzeichnen E-Zigaretten einen kontinuierlichen Anstieg, insbesondere bei den jüngeren Altersgruppen.

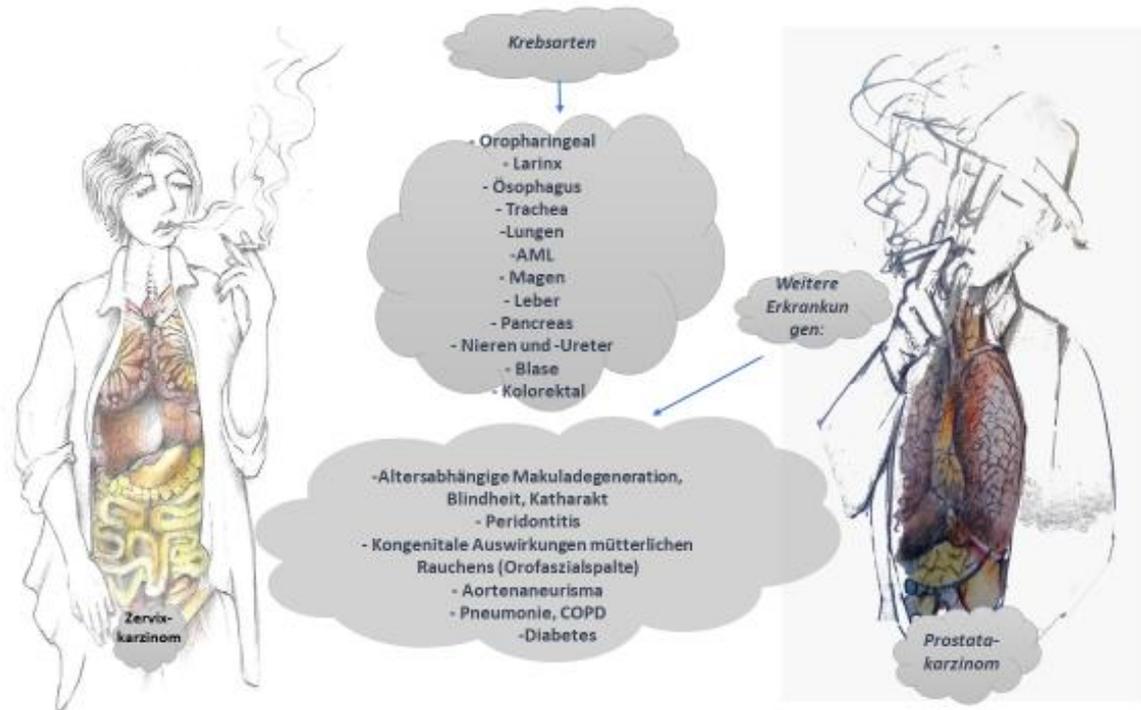


Abbildung 2: Gesundheitliche Schäden die das Rauchen verursacht. (Zeichnungen nach Sebastian Titze; Darstellung der weiblichen Organe verändert nach <https://de.dreamstime.com/stock-abbildung-weibliche-menschlicher-k%C3%B6rper-anatomie-image55303040>). Zusammenstellung der Krankheiten nach (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK179276/pdf/Bookshelf_NBK179276.pdf)

In deren Dampf finden sich zwar deutlich geringere Mengen krebserzeugender und generell gesundheitsschädlicher Stoffe als bei den regulären Zigaretten, ungefährlich sind sie aber nicht. Dies zeigen u.a. auch die vermutlich durch den Beistoff Vitamin-E-Azetat verursachten Lungenschäden, die mit dem Dampf der E-Zigaretten assoziiert waren (e-cigarette, or vaping, product use associated lung injury: EVALI) und zu 68 Todesfällen in den Vereinigten Staaten führten [36]. Die meisten E-Zigaretten enthalten zudem ebenfalls Nikotin, welches hauptverantwortlich ist für die kardiovaskulären Folgen des Rauchens, und bei der Erhitzung des Trägerstoffs Propylenglykol entstehen u.a. auch Stoffe wie Acrolein und Formaldehyd. Weitere Langzeitstudien hinsichtlich der Toxizität von E-Zigaretten sind dringend notwendig [37].

2.7 Auswirkungen des Rauchens auf das Endothel und die Immunfunktion

Weltweit stellt sowohl aktives als auch passives Rauchen einen wichtigen Risikofaktor für die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und daraus bedingter Mortalität dar. Atherosklerose ist eine entzündliche Gefäßerkrankung, betroffen sind vor allem die mittleren und großen Arterien [38]. Am Anfang der Atherosklerose steht der Funktionsverlust des Endothels, welcher bereits vor den ersten morphologisch fassbaren Veränderungen auftritt. Das Rauchen stellt einen wichtigen Risikofaktor für die Entstehung solch einer endothelialen Dysfunktion dar [39].

Eine kürzlich erschienene Studie postuliert, dass es keinen einzelnen Bestandteil oder eine Klasse von Bestandteilen im Zigarettenrauch gibt, die für die akute

Beeinträchtigung der Endothelfunktion verantwortlich sind, sondern, dass die akute Endothelfunktionsstörung als Folge der durch die Reizung der Atemwege induzierten Aktivierung des Vagusnervs auftritt [40]. In älteren Studien wurden jedoch auch eine Reihe von substanzspezifischen Effekten auf das Endothel gezeigt.

Sowohl Endothelzellen als auch vaskuläre glatte Muskelzellen exprimieren Untereinheiten des nAChR [41], sodass die Gefäße ein direkter Angriffspunkt für Nikotin darstellen. Nikotin übt hier primär einen vasokonstriktiven Effekt aus. Eine Schlüsselrolle kommt dem Stickstoffmonoxid (NO) zu, welches die Guanylatcyclase in Endothelzellen und Blutplättchen aktivieren kann. Die daraus resultierende cGMP-Freisetzung bewirkt eine Gefäßdilatation sowie eine Hemmung der Thrombozytenaggregation. Es konnte gezeigt werden, dass die NO-Synthase der Pulmonalarterien bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern deutlich verringert war, sodass von einer herabgesetzten eNOS-Expression *in vivo* und damit einer verminderten Bildung von NO ausgegangen werden kann [42]. Zellkulturexperimente konnten zeigen, dass Zigarettenrauch und das darin enthaltene Acrolein zu einer Zunahme des oxidativen Stresses und damit verbunden zu einer verringerten Syntheserate und Aktivität der eNOS führen [43]. Darüber hinaus ist das Rauchen auch mit höheren Konzentrationen an Endothelin-1 (ET-1) [44] sowie einer höheren Expression von dessen Rezeptoren ET_A und ET_B in den Pulmonalarterien assoziiert [45]. In Zellkulturstudien konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Nikotin in HUVEC-Zellen eine erhöhte Ausschüttung von ET-1 induziert [46].

Zusätzlich zu den genannten Effekten induziert das Rauchen eine Verstärkung der Adhäsion und Migration der Monozyten in den subendothelialen Spalt. Die Anheftung der Leukozyten an Endothelzellen wird in der Regel durch lösliche Mediatoren (z.B. proinflammatorische Zytokine) initiiert, welche Adhäsionsmoleküle sowohl auf den Leukozyten als auch auf dem Endothel hochregulieren können. Es folgt eine mehrstufige Kaskade, welche durch eine komplexe Reihe von Interaktionen zwischen Adhäsionsmolekülen und ihren spezifischen Liganden vermittelt wird. Zunächst kommt es zur losen Adhäsion zirkulierender Leukozyten, dann zum Rollen entlang der Gefäßwand und schließlich zur festen Adhäsion und Transmigration durch das Endothel. Die ersten Schritte (Leukozyten-*capture* und *rolling*) werden durch P-Selektin (CD62P), das von Endothelzellen exprimiert wird, L-Selektin (CD62L), das auf Leukozyten exprimiert wird, und E-Selektin (CD62E), das von beiden exprimiert wird, vermittelt, während die feste Adhäsion durch interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1; CD54) und vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1; CD106), die beide auf Endothelzellen exprimiert werden, und ihre jeweiligen Liganden vermittelt wird. Während dieses Prozesses werden lösliche Isoformen der Adhäsionsmoleküle von den Zelloberflächen in Konzentrationen abgeschieden und in die Blutbahn freigesetzt, die die Expression der membrangebundenen Adhäsionsmoleküle und den Grad der Entzündung der Gefäßwand widerspiegeln, was sie zu vielversprechenden prognostischen Biomarkern der endothelialen Entzündung macht [47, 48]. Nach der Transmigration in die Gefäßwand setzen Leukozyten verschiedene bioaktive Moleküle frei, welche die Entwicklung von Lipidablagerungen und Schaumzellen sowie die Proliferation von glatten Muskelzellen initiieren [49]. Die endotheliale Dysfunktion geht somit den morphologischen Veränderungen des Endothels voraus und gilt als Vorläufer der Atherosklerose.

Der Einfluss des Rauchens auf die Konzentrationen zirkulierender Adhäsionsmoleküle als Marker der endothelialen (Dys-)Funktion wurde schon in mehreren Studien gezeigt. So beeinflusst selbst moderates Zigarettenrauchen die Plasmakonzentrationen von löslichem ICAM-1 (sICAM-1) [50] und eine Raucherentwöhnung hat sich als

hochwirksame Maßnahme zur Senkung dieses Markers erwiesen [51, 52]. Auch eine Erhöhung von löslichem VCAM-1 (sVCAM-1) bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern wurde beobachtet [53]. Die endotheliale Dysfunktion ist eng verknüpft mit Inflammation und einer Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten. So verursacht Zigarettenrauch auch eine Zunahme der Leukozytenadhäsion an das Endothel, welche wiederum von den Adhäsionsmolekülen abhängig ist.

Bei Rauchern ist die Gesamt-Leukozytenzahl im Blut im Allgemeinen um etwa 30% erhöht, was sich auch in der Erhöhung der meisten Leukozytensubtypen widerspiegelt [54, 55]. Die Konzentration von natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) ist dagegen erniedrigt [56]. Da NK-Zellen für die Abwehr von Infektionen durch Bakterien und Viren essentiell sind, erklärt sich damit zumindest teilweise eine erhöhte Anfälligkeit von Rauchern für Infektionen. Es wurde jedoch auch eine Reihe von anderen Mechanismen vorgeschlagen, welche die durch das Rauchen verursachte Schwächung des Immunsystems erklären könnten [57]. Zigarettenrauch übt eine Vielzahl von Effekten auf alveoläre Makrophagen aus mit Veränderungen u.a. in deren Phänotyp, Phagozytosekapazität, ROS-Produktion und Fähigkeit zur Efferozytose [58]. Auch haben *in vitro*-Experimente gezeigt, dass Zigarettenrauch in *Staphylococcus aureus* ein Virulenzprofil aktiviert, welches mit einer persistenten Infektion einhergeht, einschließlich erhöhter Biofilmbildung, erhöhter Invasivität und intrazellulärer Persistenz [59].

Nikotin moduliert nachweislich die angeborenen und die adaptiven Immunantworten durch Interaktion mit nAChRs auf der Oberfläche von Immunzellen, einschließlich Makrophagen, T- und B-Lymphozyten [60], unterdrückt die Chemokin-induzierte Ca^{2+} -Reaktion in peripheren mononukleären Blutzellen und beeinträchtigt die Leukozytenmigration [61]. Es wurde auch gezeigt, dass chronisches Rauchen eine T-Zell-Anergie induzieren kann, indem es die Antigenrezeptor-vermittelten Signaltransduktionswege stört und die Inositol-1,4,5-Triphosphat-sensitiven Ca^{2+} -Speicher leert [62]. Ohne Nikotinbehandlung waren Mäuse, die mit tödlichen Dosen des Influenza-A-Virus infiziert wurden, nach elf Tagen alle verstorben, während von der nikotinbehandelten Gruppe noch 50% am Leben waren [63]. Allerdings wurde durch das Nikotin nicht die Virusproliferation gebremst (nikotinbehandelte Tiere wiesen einen 3- bis 5-fach höheren Virustiter auf), so dass sich der Effekt des Nikotins vermutlich auf eine Hemmung der starken Immunreaktion zurückführen lässt.

Auch wenn man in den letzten Jahren viel über die Auswirkungen von Zigarettenrauch auf die Immunfunktion gelernt hat, sind die genauen Mechanismen, die der tabakassoziierten Immunpathologie zugrunde liegen, noch immer nicht vollständig geklärt.

2.8 Rauchen und Methylierungsstatus

Die Epigenetik wurde von Conrad Waddington als ein Konzept eingeführt, welches den Einfluss von Umweltfaktoren auf die phänotypische Ausprägung von Merkmalen und die Weitergabe an Nachkommen beschreibt und damit eine Art der Vererbung darstellt, die über die klassische Genetik hinausgeht [64]. Heute versteht man unter Epigenetik das Studium aller vererbaren und möglicherweise reversiblen Veränderungen in der Funktion des Genoms, die keine Veränderung an der

Nukleotidsequenz darstellen. Man unterscheidet dabei im Wesentlichen drei Arten der epigenetischen Regulation: DNA-Methylierung, Histonmodifikation und die Expression nichtkodierender RNAs wie microRNAs oder long non-coding RNAs.

Einer der möglichen Mechanismen, wie das Rauchen die Funktionsweise des Immunsystems beeinflussen kann, ist der Effekt auf das Methylierungsmuster der Immunzellen. So konnte z.B. kürzlich gezeigt werden, dass Veränderungen im Methylierungsmuster eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des Immungedächtnisses spielen [65]. Bei der DNA-Methylierung wird eine Methylgruppe an einen Cytosin-Rest der DNA-Nukleotidkette gebunden. Diese Bindung erfolgt an Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpG), die im Genom zu so genannten CpG-Inseln geclustert sind [66]. Diese sind besonders häufig in den Promotorregionen von Genen und anderen regulatorischen Bereichen zu finden. Die Methylierung erfolgt durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs), die die Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf Cytosin katalysieren. Dieser Prozess kann nach zwei verschiedenen Modellen ablaufen: durch das Auftreten eines "de novo"-Methylierungsmusters, katalysiert durch die Enzyme DNMT3a und DNMT3b5, oder durch die Aufrechterhaltung eines Methylierungsmusters in aufeinanderfolgenden Zellreplikationszyklen durch DNMT1 [66]. Diese Methylierung findet während der DNA-Replikation statt, so dass, wenn eine CpG-Sequenz ein bestimmtes Methylierungsmuster erwirbt, diese Modifikation stabil wird und während der DNA-Replikation vererbt und somit in den Tochterzellen aufrechterhalten werden kann. Die Hypermethylierung von CpG-Inseln in der Promotorregion von Genen ist normalerweise ein Mechanismus der Genrepression durch Hemmung der Transkription. Diese Hemmung erfolgt grundsätzlich durch 2 Prozesse, zum einen direkt, indem die Bindung von Transkriptionsfaktoren, die Erkennungsstellen für methylierte CpGs enthalten, verhindert wird. Und der andere indirekt, durch die Blockierung des Zugangs zu den regulatorischen Elementen, die für die Bindung des Transkriptionsfaktors notwendig sind, durch die Anhaftung von Proteinkomplexen, die "methyl binding domain" (MBD) genannt werden und an die methylierten CpG-Regionen binden.

Es ist bekannt, dass Rauchen einen gravierenden Einfluss auf den Methylierungsstatus von Zellen ausübt und zu hochsignifikanten Veränderungen bei einer Vielzahl von Methylierungsstellen führt [67, 68]. In der Regel wird der Methylierungsstatus in den zirkulierenden Leukozyten bestimmt. Die höchste Evidenz für eine differenzielle Methylierung als Antwort auf Tabakkonsum zeigt eine Methylierungsstelle im Gen für den Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressor (AHRR) auf Chromosom 3 [69, 70], welche ebenfalls invers korreliert mit dem Serumcotininspiegel [69]. Nach Raucherentwöhnung bilden sich diese Veränderungen wieder zurück [71].

2.9 Fragestellung

Ziel dieser Studie war es zu analysieren, ob das Rauchen einen Einfluss auf Biomarker der kardiovaskulären Erkrankung und deren prognostische Aussagekraft in Bezug auf das Mortalitätsrisiko hat. Ins Besondere geht es um die Beantwortung der drei folgenden Fragen:

1. Welchen Einfluss hat das Rauchen auf Marker der endothelialen Dysfunktion als Anfang der Atherosklerose in einer Kohorte von Patienten mit mittlerem bis hohem kardiovaskulären Risiko und inwieweit verändert das Rauchen deren prognostische Aussagekraft?
2. Ausgehend von der endothelialen Dysfunktion stellte sich weiter die Frage, welchen Effekt das Rauchen auf zirkulierende Leukozyten und spezifische Subpopulation in der LURIC Kohorte hat und ob sich diese Marker als Risikoprädiktoren eignen?
3. Schließlich bin ich der Frage nachgegangen, ob der Einfluss des Rauchens auf den Immunstatus durch Veränderung der Methylierung von bestimmten Genen vermittelt wird.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Studienkohorte

Ziel der Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC)-Studie war es, bislang unbekannte klinische, biochemische und genetische Faktoren zu identifizieren, die eine wichtige Rolle für das individuelle Risiko für Herz- und Gefäßerkrankungen spielen. Die LURIC Studie umfasst 3316 Personen, welche in den Jahren 1997-2000 aufgrund einer Indikation für eine Koronarangiographie das Klinikum Ludwigshafen besuchten. Klinische Indikationen für eine Angiographie waren Schmerzen in der Brust oder ein positiver nicht-invasiver Stresstest, der auf eine myokardiale Ischämie hindeutete. Personen mit akuten Erkrankungen (mit Ausnahme eines akuten Koronarsyndroms), chronischen nicht primär kardiovaskulären Erkrankungen und einer Krebserkrankung innerhalb der letzten fünf Jahre vor Studienbeginn wurden ausgeschlossen. Die LURIC Studie wurde von der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz genehmigt: [LURIC, #837.255.97(1394)]. Alle Patienten unterschrieben vor Studienbeginn eine schriftliche Einverständniserklärung [72].

3.2 Laborverfahren

Nüchternblutproben wurden durch Venenpunktion am Morgen vor der Angiographie gewonnen. Die Lipoproteine wurden mit einer kombinierten Ultrazentrifugations-Fällungs-Methode aufgetrennt (beta-Quantifizierung). Cholesterin wurde dann mit enzymatischen Reagenzien von WAKO (Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss, Deutschland) auf einem WAKO 30 R oder Olympus AU640 Analysator gemessen und die Triglyzeride mit einem enzymatischen Assay auf einem Hitachi 717-Analysegerät (Roche). Das NT-pro-BNP wurde mittels Elektro-Chemilumineszenz auf einem Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) bestimmt. Cotinin wurde im Serum mit einem Radioimmunoassay (Nikotin Metabolit RIA, DPC Biermann, Bad Nauheim, Germany) quantifiziert. Das hochsensitive C-reaktive Protein (hsCRP) wurde mittels Immunonephelometrie (N-High-Sensitive CRP, Dade Behring, Marburg, Germany) gemessen. Lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (sICAM-1) und lösliches vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (sVCAM-1) wurden beide unter Verwendung von ELISA-Assays (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) bestimmt. sE-Selektin-, sP-Selektin- und sL-Selektin-Konzentrationen wurden mit den Human sE-Selektin-, sP-Selektin- bzw. sL-Selektin-Assays (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) gemessen. Das Von-Willebrand-Faktor-Antigen wurde mit dem STA Liatest vWF (Stago Diagnostica/Roche, Mannheim, Germany) bestimmt.

3.2.1 FACS-Analysen

Leukozyten wurden mittels Vollblut-Lyse-No-Wash-Methode nach Empfehlung des Herstellers (Becton-Dickinson) vorbereitet und auf dem Vierfarben-Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton-Dickinson) analysiert (73). Um die wichtigsten Leukozyten-Subsets zu identifizieren (Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) wurde die Vorwärts- vs. Seitenstreuung verwendet. Es wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) auf den Neutrophilen und Monozyten gemessen, für die Oberflächenmarker CD11b, CD18, CD31, CD40 und CD58.

Es wurden auch die Oberflächenmarker CD3, CD4, CD8, CD16/CD56 und CD19 verwendet, um die wichtigsten Lymphozyten-Subsets (zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen, natürliche Killerzellen (NK) und B-Zellen zu identifizieren. Alle Antikörper für Fluoreszenzmarkierung waren von der Firma Becton-Dickinson, der anti-CD40 Antikörper war von der Firma DiaClone.

3.2.2 DNA-Methylierungsmessung

Die DNA-Methylierung wurde mit Hilfe des Illumina HumanMethylation EPIC Beadchip (Illumina) untersucht. Die Analyse wurde aufgrund von Budgetrestriktionen in zwei Durchgängen mit ungefähr einem Jahr Abstand durchgeführt (2017/18 und 2018/19). Die Proben wurden anhand der DNA-Verfügbarkeit ausgewählt. Durchgeführt wurden die Analysen bei der Life&Brain GmbH (Bonn, Deutschland). Die Qualitätskontrolle der Methylierungsdaten erfolgte mit der CPACOR-Pipeline [73], wobei Proben mit einer Call-Rate $\leq 95\%$ und solche, die eine Geschlechtsdiskordanz aufwiesen, ausgeschlossen wurden. Es wurde auch eine CpGs-Qualitätskontrolle durchgeführt und diejenigen CpGs, die sich in unmittelbarer Nähe (1-2 bp) eines genetischen Polymorphismus befanden, welcher in der europäischen Population mit einer Häufigkeit $>0,01\%$ vorkommt, sowie kreuzreaktive Sonden entfernt. Eine Quantilsnormalisierung wurde durchgeführt. Zur Anpassung an Chargen- und technische Effekte wurde eine Hauptkomponentenanalyse (*principle component analysis*, PCA) der Intensitäten der Kontrollsonden durchgeführt und dann die ersten 30 Hauptkomponenten (PCs) als lineare Prädiktoren in die Regressionsanalyse einbezogen. Nach Qualitätskontrolle standen 1262 bzw. 1161 Proben für die Analysen zur Verfügung. Methylierungs-beta-Werte [im Bereich zwischen 0 (keine Methylierung) und 1 (vollständige Methylierung)] wurden gemäß der folgenden Gleichung berechnet: $\text{Beta} = M / (M + U + 100)$, wobei M und U das methylierte bzw. das unmethylierte Signal bezeichnen.

3.2.3 Genotypisierung und Imputation

Die Genotypisierung der Studienteilnehmer der LURIC-Studie wurde unter Verwendung des Affymetrix Human SNP Array 6.0 sowie des Illumina 200k Metabochips durchgeführt. Beide Datensätze wurden vor der Imputation vereint. SNPs mit einem Hardy-Weinberg-P $< 0,0001$, einer MAF $< 0,01$ oder einer call rate $< 0,98$ wurden ausgeschlossen. Ebenso ausgeschlossen wurden Patientenproben mit einer call rate $< 0,95$, oder wenn das von dem Array bestimmte Geschlecht nicht mit dem in der Datenbank hinterlegte Geschlecht übereinstimmte. Für die Imputation standen 774.591 SNPs und 2940 Patientenproben zur Verfügung.

Die Imputation wurde mittels Minimac und unter Verwendung des Haplotype Reference Consortium (HRC) Referenzpanels auf dem Server der Universität Michigan durchgeführt. SNPs mit einem r^2 -Wert $< 0,3$ (schlechte Qualität der Imputation) und monomorphe SNPs wurden ausgeschlossen. Nach der Qualitätskontrolle waren 7.583.231 SNPs für die Analysen verfügbar.

3.3 Definition der klinischen Variablen und Endpunkte

Das Vorhandensein einer sichtbaren luminalen Verengung ($\geq 20\%$ Stenose) in mindestens einem von 15 Koronarsegmenten wurde zur Definition der koronaren Herzkrankheit (KHK) gemäß der Klassifikation der American Heart Association verwendet. Der Glukosestoffwechsel wurde gemäß den ESC-Leitlinien 2019 zu Diabetes, Prädiabetes und kardiovaskulären Erkrankungen eingeteilt in: erhöhte Nüchtern- (≥ 126 mg/dl) oder Post-Challenge-Glukose (2h nach der 75-g-Glukosebelastung ≥ 200 mg/dl) oder erhöhtes glykiertes Hämoglobin A1C ($\geq 6,5\%$) oder bereits bekannter Diabetes mellitus definiert. Bluthochdruck wurde definiert als ein systolischer und/oder diastolischer Blutdruck ≥ 140 und/oder ≥ 90 mm Hg oder eine Hypertonie in der Vorgeschichte. Der Raucherstatus wurde anhand eines Fragebogens ermittelt und durch Messung der Serum-Cotinin-Konzentration verifiziert. Ein üblicherweise verwendeter Cut-off-Wert zur Definition von aktivem Rauchen liegt bei 15 $\mu\text{g/l}$ [74] und wir verwendeten diesen Wert, um selbstberichtete Nicht- oder Ex-Raucher als aktive Raucher zu reklassifizieren (N=123).

Information über die Medikation der Studienteilnehmer wurde über einen Fragebogen zu Studienbeginn erhoben.

Tabelle 1: Übersicht über die Teilnehmer der LURIC-Studie

Variable	Wert
Alter [Jahre]	62,7 \pm 10,6
Frauen [N (%)]	1006 (30,3)
BMI (kg/m ²)	27,5 \pm 4,08
SysBP (mmHg)	141 \pm 23,6
DiaBP (mmHg)	81,0 \pm 11,5
Hypertonus [N (%)]	2412 (72,7)
Chronische Nierenerkrankung [N (%)]	456 (13,8)
Koronare Herzerkrankung [N (%)]	2583 (77,9)
Herzinsuffizienz [NYHA 3-4, N (%)]	627 (18,9)
Diabetes mellitus [N (%)]	1324 (39,9)
Frühere Krebserkrankung [N (%)]	242 (7,3)
Aktive Raucher [N (%)]	777 (23,4)
10-Jahresmortalität [N (%)]	995 (30,0)
Spezifische Todesursachen*	
Plötzlicher Herztod [N (%)]	259 (7,9)
Myokardinfarkt [N (%)]	106 (3,2)
Herzinsuffizienz [N (%)]	148 (4,5)
Intervention zur Behandlung der KHK [N (%)]	26 (0,8)
Schlaganfall [N (%)]	61 (1,9)
Andere Todesursachen aufgrund von KHK [N (%)]	19 (0,6)
Tod durch Krebs [N (%)]	144 (4,3)
Tod durch Infektion [N (%)]	76 (2,3)
Andere Todesursache [N (%)]	135 (4,1)

* bei 21 Todesfällen konnte die Todesursache nicht geklärt werden

Die Informationen zum Vitalstatus wurden aus lokalen Registern gewonnen. Sterbeurkunden, Krankenakten lokaler Krankenhäuser und Autopsiedaten wurden unabhängig voneinander von zwei erfahrenen Klinikern überprüft, die gegenüber den

Patientenmerkmalen verblindet waren und die Todesursachen klassifizierten. In Fällen von Unstimmigkeiten oder Unsicherheiten bezüglich der Kodierung einer bestimmten Todesursache wurde die Entscheidung von einem der Studienleiter (W.M.) getroffen. Die Informationen zum Vitalstatus sind für alle Teilnehmer vollständig, aber die Todesursachen von 21 Verstorbenen waren nicht bekannt und diese Patienten wurden in die Berechnungen der Gesamt mortalität, aber nicht in die Berechnungen unter Berücksichtigung verschiedener Todesursachen einbezogen. Eine Übersicht über die Teilnehmer der Studie sowie die unterschiedlichen Kategorien der kardiovaskulären Mortalität sind in Tabelle 1 dargestellt.

3.4 Statistische Methoden

Die Normalverteilung von metrischen Variablen wurde durch visuelle Inspektion von Histogrammen sowie durch den Vergleich von Mittelwert und Median geprüft. Wenn eine angenäherte Normalverteilung vorlag wurde der Unterschied zwischen unterschiedlichen Gruppen mittels t-Test oder ANOVA verglichen. Bei nicht-normalverteilten Variablen wurde entweder vor der Analyse eine logarithmische Transformation durchgeführt oder es wurden alternativ nichtparametrische Tests (Mann-Whitney-U, Kruskal-Wallis) eingesetzt. Kategoriale Variablen wurden zwischen den Gruppen mit dem χ^2 -Test verglichen und zur Berechnung eines p-Werts für den linearen Trend wurde der Cochran-Armitage-Test verwendet.

Die Assoziation mit der Mortalität wurde mit Hilfe der Cox-Proportional-Hazard-Regression untersucht. Alle statistischen Analysen wurden mit SPSS 24.0 und 25.0 (IBM SPSS, USA) sowie R v3.6.1 und v.4.02. (<http://www.r-project.org>) durchgeführt. Geschätzte Randmittel wurden mit dem R-Paket 'emmeans' v1.4.1 berechnet und die für paarweise Vergleiche angezeigten p-Werte wurden mit der Bonferroni-Methode für multiples Testen adjustiert. Hazard-Ratio-Plots wurden mit dem R-Paket 'rms' v5.1-3.1 und Kaplan-Meier-Kurven wurden mit dem R-Paket 'survminer' v0.4.6 gezeichnet. Die Area-under-the-ROC-curve (AUC) wurde mit dem R-Paket 'pROC' v1.15.3 berechnet und der „net reclassification index“ (NRI) wurde mit dem R-Paket 'nricens' v1.6 berechnet. Fehlende Kovariaten wurden mittels Multipler Imputation imputiert unter Verwendung des R-Pakets 'rms'.

Die Epigenomweiten Assoziationsstudien (EWAS) wurden mit dem R-Paket "CpGassoc" v 2.60 durchgeführt unter Verwendung multivariabler linearer Regression. In jedem Modell wurde der Methylierungs-Beta-Wert als unabhängige Variable und der Raucherstatus als abhängige Variable betrachtet, mit Adjustierung für Geschlecht, Alter, Einnahme von lipidsenkenden Medikamenten, Diabetes mellitus, Leukozytenzahlen, Surrogatvariablen (*principle components*, PCs) zur Adjustierung für technische Artefakte und der ID-Nummer des jeweiligen Microarrays. Die Genannotation für jede Sonde basierte auf der Annotationsdatei des Herstellers.

Die GWAS für Serumcotinin wurde unter der Annahme eines additiven Modells mittels der Software PLINK2 (<https://www.cog-genomics.org/plink/2.0/>) und mit Adjustierung für die ersten drei genetischen principle components durchgeführt. Der Manhattanplot wurde unter Verwendung des R-Pakets „qqman“ und die Regionalplots unter Verwendung von Locuszoom (<http://locuszoom.org>) erstellt.

4 ERGEBNISSE

Für das in Tabelle 1 dargestellte Kollektiv von 3316 Studienteilnehmern wurden biochemische und genetische Analysen durchgeführt und dieses wurde für die in dieser Arbeit vorgestellten Analysen verwendet.

Auch in der LURIC Studie zeigt sich der erwartete Zusammenhang des Rauchens mit Mortalität (Abbildung 3). Studienteilnehmer die niemals geraucht haben, sowie die die vor mehr als 20 Jahren mit dem Rauchen aufgehört haben, weisen ein vergleichbar geringes Risiko für Mortalität auf.

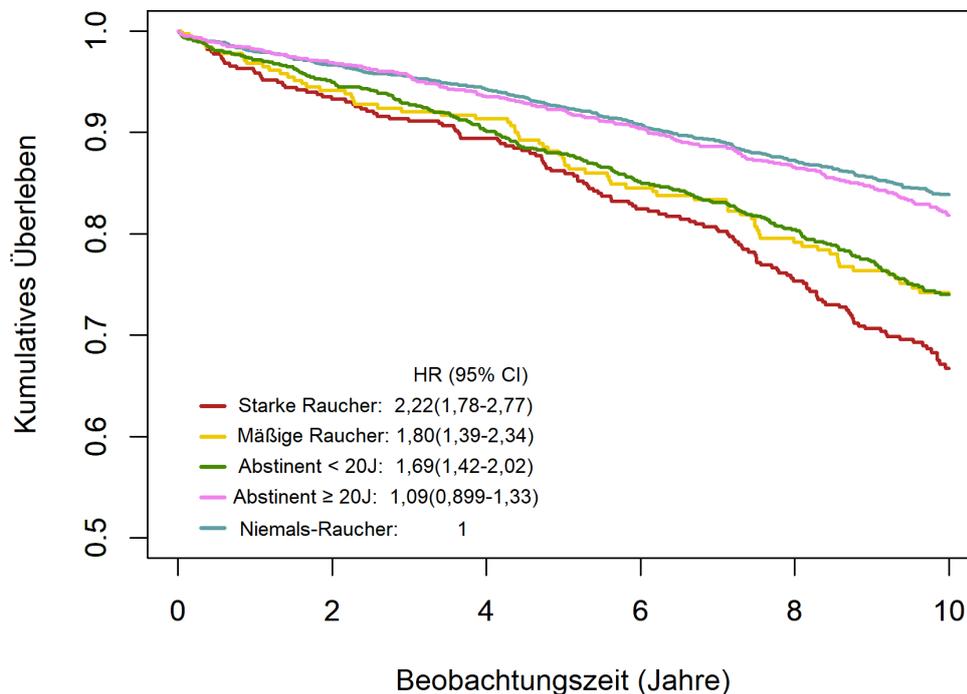


Abbildung 3: Assoziation des Rauchstatus mit Gesamt mortalität in der LURIC-Studie, adjustiert für Alter, Geschlecht, BMI, und Diabetes mellitus. Starke Raucher (≥ 20 Zigaretten pro Tag), mäßige Raucher (<20 Zigaretten pro Tag).

4.1 Auswirkungen des Rauchens auf Marker der endothelialen Dysfunktion

4.1.1 Charakteristika stratifiziert nach Rauchstatus

Als Marker der Endothelialen (Dys-)Funktion wurden in dieser Arbeit die löslichen Formen der zellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin, P-Selektin und L-Selektin sowie der von Willebrand-Faktor untersucht. Die zellulären Adhäsionsmoleküle wurden nur in einer Teilmenge der LURIC-Proben (N=1945) gemessen und diese wurden für die statistischen Analysen verwendet. Dazu wurden die Studienteilnehmer in fünf Gruppen eingeteilt: starke Raucher (definiert als Raucher, die ≥ 20 Zigaretten pro Tag rauchen), leichte Raucher (<20 Zigaretten pro

Tag), zwei Gruppen von Ex-Rauchern (Rauchverzicht vor mehr als 20 Jahren oder kürzer) sowie eine Gruppe von Studienteilnehmern, welche niemals geraucht hatten. Die Charakteristika dieser fünf Gruppen sind in Tabelle 2 dargestellt. Es fällt auf, dass die aktiven Raucher (sowohl starke als auch leichte Raucher) jünger und häufiger Männer waren als die Nichtraucher. Starke Raucher wiesen einen niedrigeren Blutdruck als die Niemals-Raucher auf. Bezüglich der Lipide war der mittlere LDL-Cholesterinwert-Wert ähnlich, starke Raucher zeigten aber signifikant höhere Konzentrationen von Triglyzeriden und niedrigere Konzentrationen von HDL-C im Vergleich zu den Niemals-Rauchern. Keine Unterschiede wurden bei den Markern für Diabetes mellitus (HbA1c) oder Herzinsuffizienz (N-terminales B-type natriuretic peptide: NT-proBNP) beobachtet. Wie erwartet war die Häufigkeit von Patienten mit koronarer Herzerkrankung (KHK) bei aktiven und ehemaligen Rauchern im Vergleich zu den Niemals-Rauchern signifikant höher. Nach Adjustierung für Alter und Geschlecht betrug das Odds Ratio (95% Konfidenzintervall) für KHK bei aktiven und ehemaligen Rauchern zusammen 2,32 (1,91-2,82) im Vergleich zu den Niemals-Rauchern.

Hinsichtlich der Entzündungsmarker war das hochsensitive C-reaktive Protein (hsCRP) bei starken Rauchern fast auf das Doppelte erhöht, und auch die Werte für IL-6 (4,15 vs. 2,79 ng/L, $p < 0,001$) sowie auch IgE (59,5 vs. 26IU/mL, $p < 0,001$) waren im Vergleich zu den Niemals-Rauchern signifikant höher. Interessanterweise waren diese drei Parameter bei Patienten, die vor mehr als 20 Jahren mit dem Rauchen aufgehört hatten, noch leicht erhöht im Vergleich zu Patienten, die nie geraucht hatten. Als „Lifestyle-Marker“ wurde Vitamin D untersucht. Bei der Speicherform, dem 25OH-Vitamin D, waren keine Unterschiede zwischen Rauchern und Niemals-Rauchern festzustellen. Bei der aktiven Form des Vitamins hingegen, dem 1,25OH-Vitamin D, wiesen die starken Raucher signifikant niedrigere Werte auf (Tabelle 2). Hinsichtlich der untersuchten Bestandteile des Renin-Aldosteron-Angiotensin-Systems wurden nur für Renin signifikante Unterschiede festgestellt. Hier wiesen sowohl die aktiven Raucher als auch die Ex-Raucher, welche vor weniger als 20 Jahren mit dem Rauchen aufgehört hatten, höhere Werte auf im Vergleich zu den Niemals-Rauchern. In Tabelle 3 sind die Unterschiede bei den Endothelmarkern dargestellt. Hinsichtlich der Endothelmarker waren die Werte für sE-Selektin, sP-Selektin und sICAM-1 bei Rauchern erhöht, die Werte sanken jedoch mit längerer Rauchabstinenz und bei Patienten, die seit mehr als 20 Jahren abstinent sind, erreichten sie fast die Konzentrationen von Niemals-Rauchern. Im Gegensatz dazu waren die sVCAM-1- und sL-Selektin-Spiegel signifikant erniedrigt (681 mg/L vs. 782 mg/L und 689 mg/L vs. 705 mg/L). Während die Konzentration von sVCAM-1 in der Gruppe der Teilnehmer mit längerer Rauchabstinenz zunahm, waren die Konzentrationen von sL-Selektin bei leichten Rauchern und Ex-Rauchern sogar noch etwas niedriger als bei den starken Rauchern oder den Niemals-Rauchern.

Da zwischen den einzelnen Rauchergruppen sehr signifikante Unterschiede in den Basischarakteristika bestanden, wurden geschätzte Randmittel der Endothelmarker berechnet, welche adjustiert waren für alle Marker die eine Assoziation zu sICAM-1 und/oder sL-Selektin gezeigt haben (Alter, Geschlecht, BMI, HDL-C, DM, eGFR, blutdrucksenkende Medikamente, Glukokortikoide, Phenprocoumon und lipidsenkende Medikamente). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt und unterschieden sich nicht wesentlich von denen der unadjustierten Analysen in Tabelle 3.

Tabelle 2: Studiencharakteristika stratifiziert nach Rauchstatus angegeben als Mittelwert (SD) oder Median (25.-75. Perzentile)

Variable	Starke Raucher (n=260)	Leichte Raucher (n=157)	Ex-Raucher < 20J (n=481)	Ex-Raucher ≥ 20J (n=346)	Niemals-Raucher (n=682)	p ^a	p ^b
Alter (Jahre)	54,2(10,1)	58,1(9,8)	60,8(10,5)	67,6(7,86)	64,8(10,3)	<0,001	<0,001
Frauen (%)	20,0	28,0	18,5	6,94	53,2	<0,001	<0,001
BMI (kg/m ²)	26,8(4,09)	26,5(3,82)	27,6(3,89)	27,7(3,7)	27,1(4,09)	0,147	0,262
SysBP (mmHg)	133(23,5)	139(24,3)	140(23,6)	146(22,6)	144(23,4)	<0,001	<0,001
DiaBP (mmHg)	77,9(11,5)	80,3(11)	80,9(11,6)	81,6(10,7)	81,4(11,4)	<0,001	<0,001
Pack-years	37,5(29-50)	13,5(7,5-20)	30(13,3-45)	14,5(5-25)	-	<0,001	<0,001
eGFR (ml/min/1,73m ²)	90,7 (20,6)	87,1(20,4)	84,7(20,8)	79,1(18,7)	80,8(19,2)	<0,001	<0,001
KHK (%)	81,2	76,4	86,9	89,3	68,9	<0,001	<0,001
Hypertonus (%)	59,2	68,2	70,9	79,2	76,7	<0,001	<0,001
Diabetes mellitus (%)	31,5	35,0	38,3	45,7	36,4	0,127	0,517
oxLDL (U/L)	82,8(66,5-96,2)	80,0(60,6-90,4)	78,7(60,8-92,5)	76,0(51,7-89,8)	76,7(54,1-90,5)	<0,001	<0,001
LDL-C (mg/dl)	119(30,9)	123(33,4)	116(31,9)	116(31,6)	121(34,8)	0,852	0,760
HDL-C (mg/dl)	34,9(9,21)	38,2(11,8)	37,3(9,95)	37,7(11)	41,1(10,8)	<0,001	<0,001
TG (mg/dl)	158(116-230)	150(111-205)	156(115-208)	146(106-200)	135(101-191)	<0,001	<0,001
HbA1c (%)	6,10(1,24)	6,09(1,1)	6,20(1,31)	6,23(1,15)	6,22(1,25)	0,137	0,217
hsCRP (mg/L)	5,66(2,08-10,4)	5,39(1,84-9,72)	3,46(1,38-8,68)	3,5(1,25-8,66)	2,66(1,12-6,81)	<0,001	<0,001
IL-6 (ng/L)	4,15(2,17-8,32)	3,76(2,09-7,14)	3,17(1,88-5,89)	3,45(1,95-7,12)	2,79(1,56-5,34)	<0,001	<0,001
IgE (IU/ml)	59,5(18,5-200)	40(16,0-110)	35(15,0-93)	35(12-87)	26(11-70)	<0,001	<0,001
NT-proBNP (pg/mL)	272(77,8-752)	332(114-1190)	286(94,5-866)	337(124-993)	246(107-738)	0,271	0,169
25OH VitD (µg/L)	12,2(7,8-19)	14,5(9,0-21,5)	15,5(9,9-22,9)	15,4(9,93-21,2)	13,7(9,0-20,1)	0,443	0,071
1,25OH VitD (ng/L)	30,2(22,8-37,9)	31,3(25,0-41,1)	33,3(25,1-43,8)	33,3(25,2-42,4)	32,6(25,5-42,5)	0,040	0,002
Renin (pg/mL)	21,0(11,8-45,2)	20,0(9,0-36,0)	24,0(12,0-49,5)	19,0(10,0-43,0)	17,0(9,0-33,0)	<0,001	<0,001
Aldosteron (ng/L)	76,5(49,8-127)	84,5(51,0-133)	84,5(52,0-134)	80,0(49,8-123)	82,0(52,0-129)	0,677	0,672
Angiotensin-2 (ng/L)	26,0(16,0-46,8)	26,5(16,2-45)	28,0(16,0-48,0)	26,0(15,2-46,0)	26,0(16,0-43,0)	0,334	0,778

^a Test für linearen Trend, ^b t-Test Starke Raucher vs Niemals-Raucher

Starke Raucher (≥ 20 Zigaretten pro Tag), leichte Raucher (<20 Zigaretten pro Tag)

Tabelle 3: Marker der Endothelfunktion stratifiziert nach Rauchstatus angegeben als Median (25-75 Perzentile)

Variable	Starke Raucher (n=260)	Leichte Raucher (n=157)	Ex-Raucher < 20y (n=481)	Ex-Raucher ≥ 20y (n=346)	Niemals-Raucher (n=682)	p ^a	p ^b
sICAM-1 (mg/L)	285(237-336)	261(223-323)	240(204-281)	228(198-275)	227(197-269)	<0,001	<0,001
sVCAM-1 (mg/L)	681(566-850)	709(596-879)	761(631-933)	775(650-948)	782(638-957)	<0,001	<0,001
vWF (U/dL)	150(110-196)	157(118-198)	156(116-200)	166(126-210)	152(118-201)	0,135	0,228
sE-Selectin (mg/L)	38,2(26,8-50,1)	34,2(25-44,3)	34,4(25-46,7)	32,1(23,7-42,7)	31(22,7-42,3)	<0,001	<0,001
sP-Selectin (mg/L)	55,5(45,2-70,7)	54,6(44,6-66)	52,1(40-66)	49,9(39,5-62,2)	47,9(38,4-60,3)	<0,001	<0,001
sL-Selectin (mg/L)	689(574-791)	654(535-773)	648(560-753)	643(554-751)	705(602-807)	0,001	0,019

^a Test für linearen Trend, ^b t-Test Starke Raucher vs Niemals-Raucher; Starke Raucher (≥ 20 Zigaretten pro Tag), leichte Raucher (<20 Zigaretten pro Tag)

Tabelle 4: Geschätzte Randmittel (95% KI) der Endothelmarker adjustiert für Alter, Geschlecht, BMI, HDL-C, DM, eGFR, blutdrucksenkende Medikamente, Glukokortikoide, Phenprocoumon und lipidsenkende Medikamente

	Starke Raucher	Leichte Raucher	Ex-Raucher < 20y	Ex-Raucher ≥ 20y	Niemals-Raucher	p ^a	p ^b
sICAM-1 (mg/L)	322 (295-350)	301 (271-331)	272 (247-297)	269 (241-296)	258 (232-283)	<0,001	<0,001
sVCAM-1 (mg/L)	796 (724-869)	817 (737-896)	832 (766-898)	821 (749-894)	853 (787-920)	0,017	0,248
sE-Selectin (mg/L)	42,3 (36,3-48,4)	42,0 (35,4-48,7)	39,7 (34,2-45,3)	36,9 (30,8-43,0)	37,7 (32,1-43,3)	0,032	0,495
sP-Selectin (mg/L)	57,8 (51,7-64,0)	58,4 (51,7-65,1)	55,3 (49,7-61,0)	52,3 (46,1-58,4)	52,4 (46,8-58,1)	0,011	0,017
sL-Selectin (mg/L)	682 (636-728)	680 (630-731)	701 (659-743)	711 (665-757)	730 (688-772)	0,001	0,005
vWF (U/dL)	208 (193-222)	206 (190-222)	201 (188-215)	195 (180-210)	197 (183-210)	0,051	0,261

^a Starke Raucher vs Niemals-Raucher; ^b Leichte Raucher vs Niemals-Raucher; Starke Raucher (≥ 20 Zigaretten pro Tag), leichte Raucher (<20 Zigaretten pro Tag)

4.1.2 Assoziation der Endothelmarker mit Mortalität

Unter den 1926 Teilnehmern, die in die Analysen der endothelialen Marker eingeschlossen wurden, ereigneten sich während des im Median 10-jährigen Follow-up 626 Todesfälle, davon 391 durch kardiovaskuläre Ursachen.

Bei der Analyse der Assoziation der Endothelmarker mit der Gesamtmortalität (adjustiert für Alter, Geschlecht, LDL-C, HDL-C, BMI, Hypertonus, Diabetes mellitus, Einnahme von Medikamenten: lipid- und/oder blutdrucksenkende, Aspirin, Phenprocoumon, Glukokortikoide), waren steigende Konzentrationen von sICAM-1, sVCAM-1 und vWF sowohl bei aktiven Rauchern als auch bei Niemals-Rauchern mit einem erhöhten Risiko für die Gesamtmortalität assoziiert (Abbildung 4).

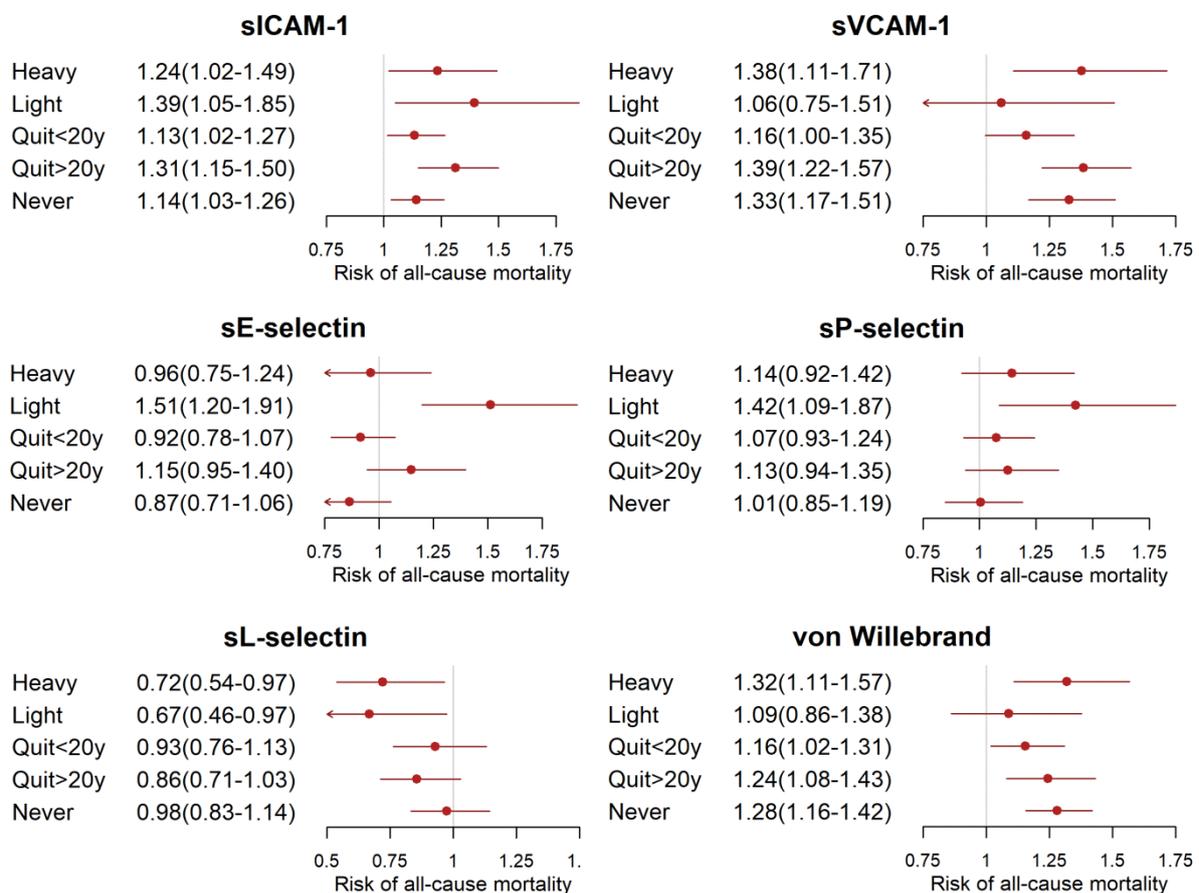


Abbildung 4: Assoziation der Endothelmarker mit Gesamtmortalität. Die Cox-Regressionsmodelle zeigen die Zunahme der Gesamtmortalität pro Zunahme des jeweiligen Markers um eine Standardabweichung, adjustiert für Alter, Geschlecht, LDL-C, HDL-C, BMI, Hypertonus, DM, Medikation (Lipidsenker, Blutdrucksenker, Aspirin, Phenprocoumon und Glukokortikoide); Heavy: Raucher, die ≥ 20 Zigaretten pro Tag rauchen, Light: Raucher, die <20 Zigaretten pro Tag rauchen, Quit<20y: Ex-Raucher, die vor weniger als 20 Jahren aufgehört haben, Quit>20y: Ex-Raucher, die vor mehr als 20 Jahren aufgehört haben, Never: Niemals-Raucher.

Die HRs (95% CI) pro Anstieg des jeweiligen Markers um eine Standardabweichung betragen bei den starken Rauchern 1,24 (1,02-1,49), 1,38 (1,11-1,71) und 1,32 (1,11-1,57) für sICAM-1, sVCAM-1 bzw. vWF. Für die leichten Rauchern ergaben sich HR von 1,39 (1,05-1,85), 1,06 (0,75-1,51) und 1,09 (0,86-1,38). sE-Selektin und sP-Selektin waren nur bei den leichten Rauchern mit HRs von 1,51 (1,20-1,91) und 1,42 (1,09-1,87) mit einem erhöhten Risiko verbunden. Für sL-Selektin zeigte sich eine inverse Assoziation mit dem Mortalitätsrisiko [0,72 (0,54-0,97) und 0,67 (0,46-0,97)] für starke bzw. leichte Raucher. Bezüglich der kardiovaskulären Mortalität waren die Assoziationen ähnlich wie bei der Gesamtmortalität (Abbildung 5). Auch hier zeigten die sL-Selektin-Werte nur bei Rauchern eine inverse Assoziation mit dem Risiko.

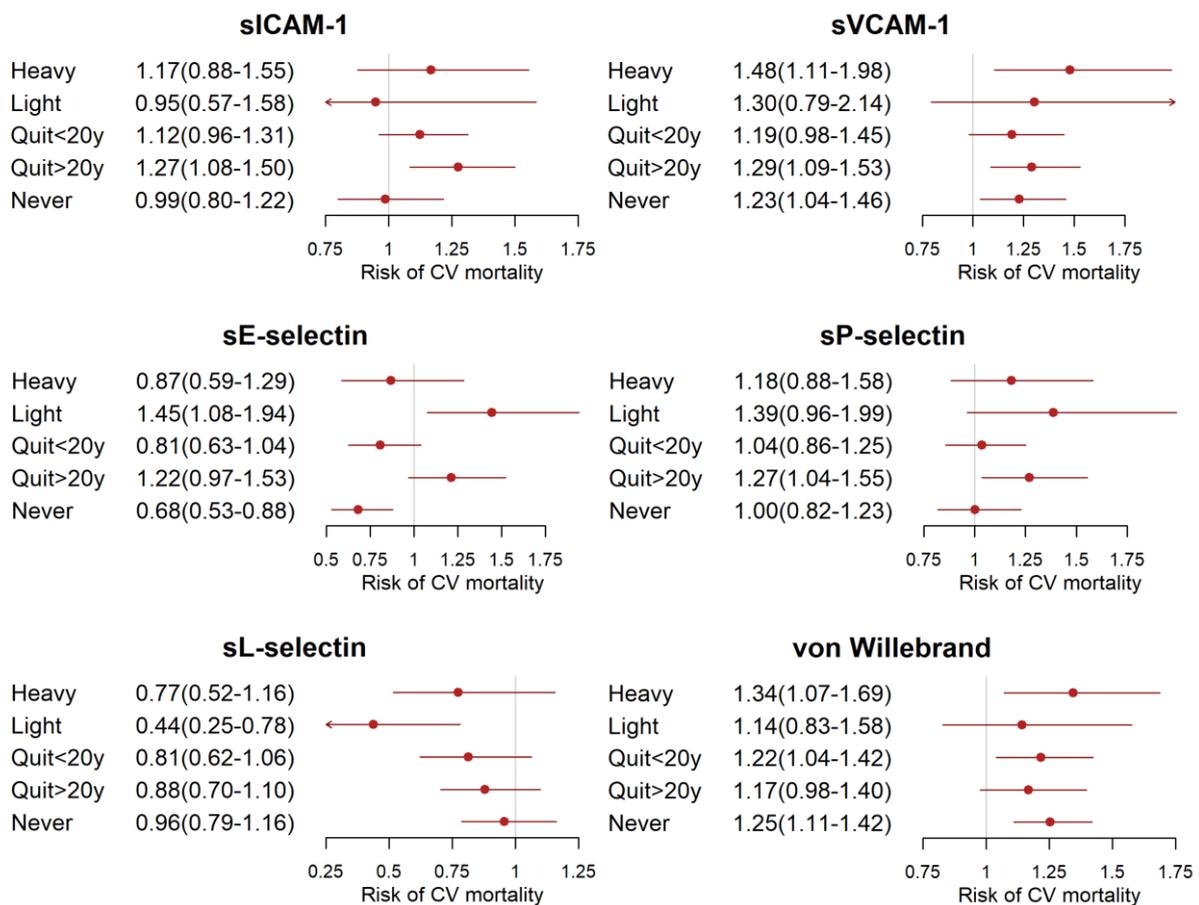


Abbildung 5: Assoziation der Endothelmarker mit kardiovaskulärer Mortalität. Die Cox-Regressionsmodelle zeigen die Zunahme der Gesamtmortalität pro Zunahme des jeweiligen Markers um eine Standardabweichung, adjustiert für Alter, Geschlecht, LDL-C, HDL-C, BMI, Hypertonus, DM, Medikation (Lipidsenker, Blutdrucksenker, Aspirin, Phenprocoumon und Glukokortikoide); Heavy: Raucher, die ≥ 20 Zigaretten pro Tag rauchen, Light: Raucher, die <20 Zigaretten pro Tag rauchen, Quit<20y: Ex-Raucher, die vor weniger als 20 Jahren aufgehört haben, Quit>20y: Ex-Raucher, die vor mehr als 20 Jahren aufgehört haben, Never: Niemals-Raucher.

In Abbildung 6 sind Hazard-Ratio-Plots dargestellt, für welche die sechs endothelialen Marker als *restricted cubic splines* modelliert und für Alter und Geschlecht adjustiert wurden. Hier zeigten sICAM-1, sVCAM-1, sP-Selektin und vWF für alle Gruppen eine direkte Assoziation mit dem Risiko für Mortalität, sE-Selektin zeigte keine Assoziation außer für die Gruppe der Langzeit-Abstinenten und sL-Selektin zeigte eine inverse Assoziation mit dem Risiko für alle Gruppen außer für die Niemals-Raucher.

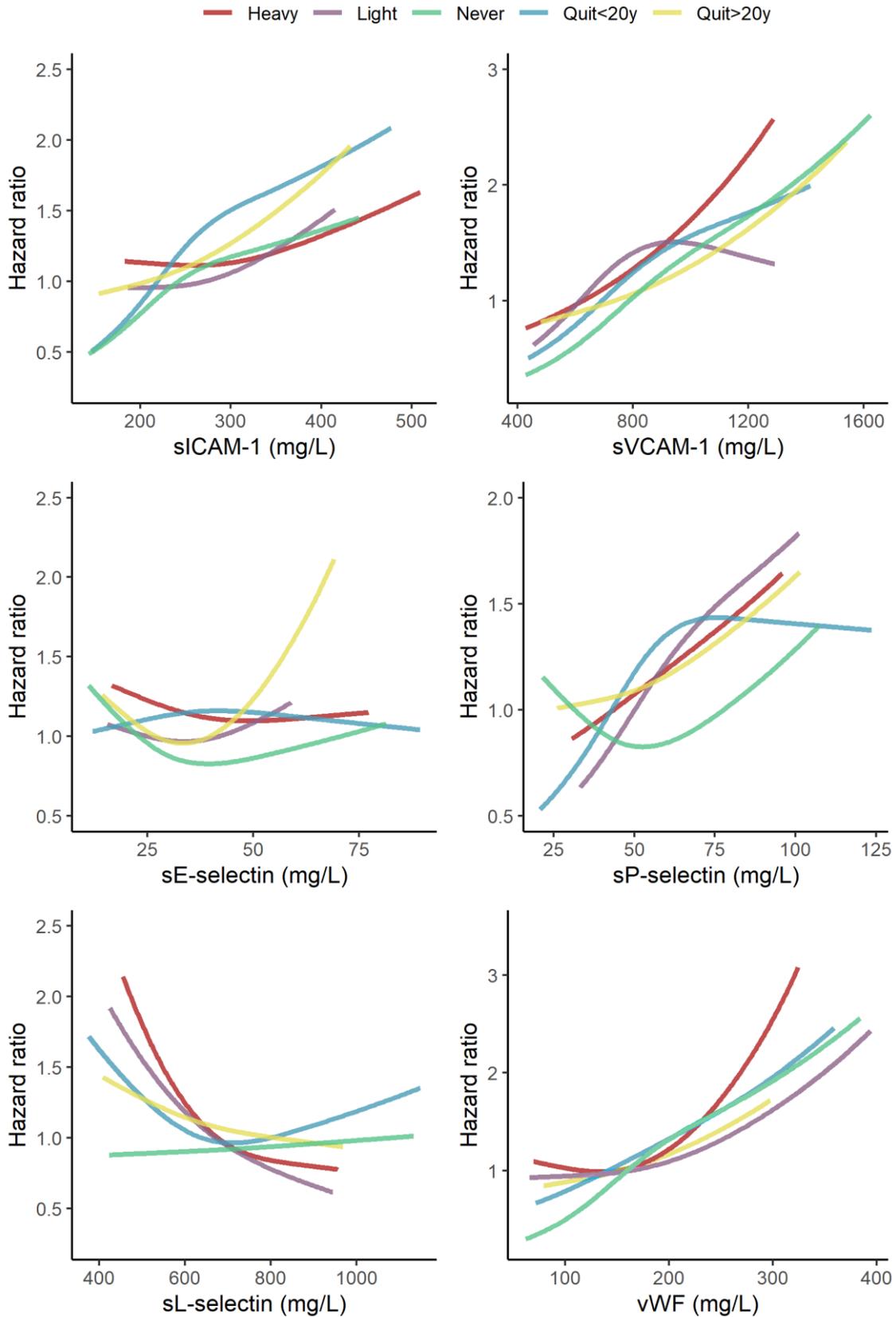


Abbildung 6: Hazard ratio plots der Assoziation von Endothelmarkern mit Gesamtmortalität. Endothelmarker modelliert als *restricted cubic splines* und adjustiert für Alter und Geschlecht. Starke Raucher (≥ 20 Zigaretten pro Tag), leichte Raucher (<20 Zigaretten pro Tag)

Insgesamt gesehen kann man sagen, dass die sVCAM-1- und vWF-Werte bei Rauchern und Niemals-Rauchern konsistent mit einer erhöhten Mortalität assoziiert waren, während die sE-Selektin-Werte nur bei leichten Rauchern mit einem erhöhten Risiko verbunden waren und sL-Selektin bei Rauchern sogar eine inverse Assoziation zeigte.

Des Weiteren habe ich die Assoziation der endothelialen Marker mit der Mortalität in einem Cox-Regressions-Modell berechnet, das alle Marker gleichzeitig beinhaltet. Die Analysen zeigten, dass sVCAM-1 ein unabhängiger Prädiktor für ein erhöhtes Risiko in allen Gruppen mit Ausnahme der leichten Raucher war (Tabelle 5). Bei den aktiven Rauchern, sowohl bei den starken als auch bei den leichten Rauchern, war zu beobachten, dass sL-Selektin unabhängig mit dem Risiko assoziiert war. Bemerkenswert ist, dass sL-Selektin der bei weitem stärkste, wenn auch inverse Prädiktor bei den Rauchern war mit HRs (95%CI) von 0,62 (0,45-0,85) und 0,52 (0,34-0,78) pro Anstieg des sL-Selectins um eine Standardabweichung für starke bzw. leichte Raucher.

Um weiter zu untersuchen, ob durch eine Hinzunahme von sL-Selektin in Risikomodelle eine Verbesserung der Risikovorhersage möglich ist, habe ich den Harrell's C, die *area-under-the-ROC-curve* (AUC) und den *net-reclassification-index* (NRI) für ein Basismodell bestehend aus Alter, Geschlecht, LDL-C, HDL-C, BMI, Hypertonus und DM mit und ohne sL-Selektin berechnet (Tabelle 6). Hier zeigte sich, dass das Hinzufügen von sL-Selektin zu dem Basismodell nur für die Gruppe der aktiven Raucher zu einer signifikanten Verbesserung der Risikoprädiktion führte.

Tabelle 6: Hinzunahme von sL-Selektin zu Risikoprädiktionsmodellen

	Aktive Raucher		Ex-Raucher		Niemals-Raucher	
	Harrell's C*	AUC	Harrell's C*	AUC	Harrell's C*	AUC
Basismodell	0,686	0,725 (0,674-0,775)	0,716	0,770 (0,738-0,803)	0,735	0,778 (0,739-0,816)
Basismodell + sL-selectin	0,708	0,752 (0,702-0,801)	0,717	0,771 (0,738-0,803)	0,735	0,778 (0,739-0,816)
<i>p</i> Basis vs Basis + sL-selectin		0,034		0,838		0,756
Kontinuierlicher NRI	0,434	(0,169 - 0,623)	0,074	(-0,048 - 0,260)	-0,074	(-0,169 - 0,268)

*Harrell's-C-Index (Concordance-Index): Goodness-of-fit Test für Risikomodelle, welche auf Time-to-event Daten beruhen, z.B. Überlebensanalysen; Basismodell: Alter, Geschlecht, LDL-C, HDL-C, BMI, Hypertonus und DM

Tabelle 5: Multivariate Cox-Regression für Gesamtmortalität*

	Starke Raucher		Leichte Raucher		Ex-Raucher < 20y		Ex-Raucher ≥ 20y		Niemals-Raucher	
	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p
Alter (Jahre)	1,19 (0,90-1,58)	0,221	1,76 (1,16-2,69)	0,008	1,96 (1,55-2,47)	<0,001	1,97 (1,57-2,48)	<0,001	1,99 (1,61-2,47)	<0,001
Frauen (%)	0,43 (0,19-0,98)	0,044	1,23 (0,57-2,66)	0,591	0,73 (0,47-1,14)	0,166	0,97 (0,48-1,97)	0,931	0,73 (0,52-1,03)	0,078
LDL-C (mg/dl)	0,90 (0,71-1,15)	0,414	0,98 (0,69-1,41)	0,926	1,11 (0,94-1,32)	0,219	0,94 (0,77-1,15)	0,532	1,18 (0,99-1,41)	0,066
HDL-C (mg/dl)	1,03 (0,80-1,32)	0,816	1,03 (0,71-1,47)	0,892	1,05 (0,89-1,24)	0,552	0,92 (0,75-1,13)	0,448	0,87 (0,73-1,05)	0,150
BMI (kg/m ²)	0,88 (0,66-1,17)	0,377	1,02 (0,69-1,52)	0,904	0,87 (0,73-1,03)	0,112	1,14 (0,93-1,38)	0,200	1,06 (0,90-1,25)	0,463
Hypertension (%)	1,16 (0,66-2,04)	0,596	0,83 (0,36-1,91)	0,659	1,12 (0,75-1,66)	0,586	0,78 (0,49-1,24)	0,289	1,20 (0,78-1,86)	0,410
Diabetes mellitus (%)	1,90 (1,12-3,23)	0,018	1,36 (0,73-2,55)	0,333	1,81 (1,29-2,52)	0,001	1,36 (0,94-1,98)	0,105	1,65 (1,19-2,28)	0,003
Antihypertensive medikation (%)	1,16 (0,55-2,46)	0,702	0,67 (0,22-2,02)	0,481	1,38 (0,75-2,54)	0,298	1,39 (0,68-2,86)	0,367	1,66 (0,88-3,16)	0,119
Plättchenaggregationshemmer (%)	0,89 (0,49-1,63)	0,716	1,86 (0,79-4,35)	0,154	1,11 (0,72-1,71)	0,629	0,59 (0,38-0,91)	0,017	0,95 (0,65-1,39)	0,794
Phenprocumon (%)	1,15 (0,26-5,20)	0,853	3,35 (0,79-14,2)	0,101	2,24 (1,33-3,77)	0,002	1,23 (0,63-2,38)	0,547	0,93 (0,54-1,60)	0,795
Glukokorticoide (%)	1,27 (0,24-6,64)	0,779	1,68 (0,34-8,35)	0,528	1,49 (0,63-3,50)	0,364	1,32 (0,51-3,38)	0,566	1,45 (0,52-4,05)	0,478
Lipidsenker (%)	0,69 (0,41-1,15)	0,152	0,80 (0,40-1,62)	0,539	1,06 (0,76-1,48)	0,730	1,02 (0,69-1,49)	0,934	1,17 (0,84-1,61)	0,351
sICAM-1 (mg/L)	1,43 (1,03-2,00)	0,032	1,18 (0,81-1,74)	0,389	1,03 (0,87-1,22)	0,713	1,16 (0,96-1,39)	0,118	1,01 (0,86-1,17)	0,941
sVCAM-1 (mg/L)	1,34 (1,02-1,75)	0,034	1,12 (0,79-1,61)	0,522	1,25 (1,02-1,54)	0,036	1,35 (1,13-1,62)	0,001	1,39 (1,16-1,66)	<0,001
sE-Selectin (mg/L)	0,68 (0,48-0,97)	0,035	1,28 (0,95-1,74)	0,107	0,89 (0,73-1,09)	0,255	0,98 (0,79-1,22)	0,864	0,87 (0,67-1,13)	0,304
sL-Selectin (mg/L)	0,62 (0,45-0,85)	0,003	0,52 (0,34-0,78)	0,002	0,83 (0,67-1,03)	0,085	0,73 (0,60-0,90)	0,004	0,91 (0,77-1,08)	0,301
sP-Selectin (mg/L)	1,33 (1,03-1,73)	0,029	1,38 (1,01-1,89)	0,043	1,15 (0,98-1,34)	0,081	1,21 (0,99-1,47)	0,056	0,99 (0,82-1,19)	0,910
vWF (U/dL)	1,22 (0,92-1,61)	0,170	1,11 (0,81-1,52)	0,516	1,16 (0,98-1,38)	0,088	0,99 (0,82-1,21)	0,959	1,25 (1,08-1,45)	0,003

*Kontinuierliche Variablen wurden vor der Analyse Z-transformiert; Starke Raucher (≥ 20 Zigaretten pro Tag), leichte Raucher (<20 Zigaretten pro Tag)

4.2 Auswirkungen des Rauchens auf Leukozyten und spezifische Subtypen

Die Leukozyten-Differenzialanalysen lagen nur für 2301 Studienteilnehmer vollständig vor. Des Weiteren wurden 128 Studienteilnehmer von der Analyse ausgeschlossen (66 mit entzündlichen Erkrankungen, 71 die Glukokortikoide erhielten und ein Teilnehmer mit einer chronischen lymphatischen Leukämie). Die Stichprobengröße für die folgenden Analysen betrug daher 2173. Fehlende Kovariaten für die Überlebensanalysen wurden imputiert.

Zur Differenzierung unterschiedlicher Leukozytensubgruppen wurde die Expression bestimmter Oberflächenproteine¹ in der FACS-Analyse bestimmt. Als Marker für T-Zellen im Allgemeinen wurde CD3 verwendet, T-Helferzellen wurden durch die Expression von CD4 und zytotoxische T-Zellen durch CD8 bestimmt. CD19 ist ein charakteristisches Oberflächenmolekül von B-Zellen. CD11a wird von Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen exprimiert, seine Funktion ist die Adhäsion der Zellen und die Vermittlung der Phagozytose. CD11b wird von myeloiden Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert, bindet an die extrazelluläre Matrix und ist wichtig für die Zellmigration, -adhäsion und -transmigration durch die Blutgefäße. CD16 wird von NK-Zellen, neutrophilen Zellen und Makrophagen exprimiert und spielt eine Rolle für die Phagozytose und Zytotoxizität. CD18 bindet an CD11a/b/c. CD14 gehört zu den Pattern-Recognition-Rezeptoren, erkennt den Komplex aus LPS und LBP, und wird vor allem von Monozyten und Makrophagen exprimiert. CD31 (andere Bezeichnung PECAM-1) funktioniert als Adhäsionsmolekül und wird von einer Reihe unterschiedlicher Zellen exprimiert, darunter Monozyten, Granulozyten und B-Zellen. CD40 wird exprimiert auf B-Zellen, Makrophagen, Dendritische Zellen und Basalzellen des Epithels. Der Rezeptor funktioniert als Ko-Rezeptor, der aktiviert werden muss um eine adaptive Immunantwort auszulösen. CD80 wird von antigepräsentierenden Zellen exprimiert, z.B. Makrophagen und Dendritischen Zellen, und stimuliert die Immunantwort durch Aktivierung von T-Zellen. CD56 stellt einen Marker für Natürliche Killerzellen dar.

4.2.1 Teilnehmercharakteristika stratifiziert nach Rauchstatus

Aktive Raucher waren im Vergleich zu Niemals-Rauchern deutlich jünger und seltener weiblichen Geschlechts (Tabelle 7). Der Prozentsatz der Teilnehmer, die an Bluthochdruck oder Diabetes mellitus litten, war in der Gruppe der aktiven Raucher im Vergleich zu den Niemals-Rauchern geringer, während der Prozentsatz der KHK-Patienten höher war. Aktive Raucher wiesen höhere hsCRP-Werte auf, aber einen niedrigeren BMI und einen niedrigeren Blutdruck. Ich beobachtete auch erhöhte Konzentrationen von oxidiertem LDL (oxLDL) bei den aktiven Rauchern. Die Gesamtleukozytenzahl war bei aktiven Rauchern höher als bei Ex-Rauchern und Niemals-Rauchern, was auf eine erhöhte Anzahl von Neutrophilen und Monozyten zurückzuführen war. Bei Ex-Rauchern nahm die Leukozytenzahl mit zunehmender Zeit seit dem Rauchverzicht ab (Tabelle 8). Für Alter und Geschlecht adjustierte geschätzte Randmittel sind in Tabelle 9 dargestellt.

¹ Die Information über die CD Antigene stammen aus dem Lehrbuch: Immunologie, Charles A. Janeway und Paul Travers (2 Auflage), Spektrum Verlag.

Tabelle 7: Studiencharakteristika stratifiziert nach Rauchstatus angegeben als Mittelwert (SD) oder Median (25. und 75. Perzentile).

Variable	Rauchstatus					p ^a	p ^b
	Aktive Raucher (N=477)	Ex-Raucher < 2 Jahre (N=125)	Ex-Raucher 2-10 Jahre (N=189)	Ex-Raucher 10-20 Jahre (N=210)	Ex-Raucher > 20 Jahre (N=384)		
Alter (Jahre)	55,9(10,4)	58,0(11,6)	59,8(9,52)	64,0(9,36)	67,3(7,98)	65,0(10,4)	<0,001 <0,001
Frauen (%)	21,8	24,0	17,5	16,7	7,29	54,4	<0,001 <0,001
BMI (kg/m ²)	26,5(4)	26,6(3,78)	27,6(3,85)	28(3,56)	27,8(3,58)	27,2(4)	0,002 0,003
Koronare Herz-							
krankheit (%)	78,0	88,0	83,6	89,5	87,5	68,5	<0,001 <0,001
Hypertonus (%)	61,2	56,8	73,5	78,1	79,4	76,8	<0,001 <0,001
DM (%)	31,4	36,0	38,6	41,9	42,4	37,3	0,020 0,019
Systolischer							
Blutdruck (mmHg)	134(23,7)	137(25,6)	140(21,4)	143(22,9)	147(23,2)	143(23,5)	<0,001 <0,001
Diastolischer							
Blutdruck (mmHg)	78,4(11,2)	80,7(13,4)	80,7(10,2)	81,2(11,5)	81,7(11,1)	81,1(11,6)	<0,001 <0,001
hsCRP (mg/L)	5,05(1,83-10,3)	2,83(1,18-8,3)	3,33(1,26-7,37)	4,27(1,28-9,3)	3,26(1,21-8,5)	2,7(1,13-7,21)	<0,001 <0,001
Leukozyten (µl)	7920(2160)	7210(1910)	7060(2050)	6960(1810)	6620(1950)	6560(1950)	<0,001 <0,001

^a ANOVA, ^b Test für linearen Trend

Tabelle 8: Leukozytensubtypen nach Rauchstatus angegeben als Median (25. und 75. Perzentile).

Variable	Rauchstatus						p ^a	p ^b
	Aktive (N=477)	Ex-Raucher < 2 Jahre (N=125)	Ex-Raucher 2-10 Jahre (N=189)	Ex-Raucher 10-20 Jahre (N=210)	Ex-Raucher 20 Jahre (N=384)	Niemals- Raucher (N=788)		
Gesamt-T- Zellen (CD3+, /µl)	1660 (1320-2030)	1530 (1220-1990)	1430 (1130-1710)	1350 (1100-1640)	1300 (1040-1620)	1340 (1060-1660)	<0,001	<0,001
aktivierte T- Zellen (CD3+, /µl)	251 (179-343)	251 (184-356)	235 (150-327)	235 (156-360)	234 (153-347)	222 (151-336)	0,220	0,204
T-Helfer- Zellen(CD3+CD4+, /µl)	1120 (869-1400)	976 (777-1280)	920 (687-1130)	872 (684-1070)	818 (625-1020)	864 (658-1100)	<0,001	<0,001
zytotoxische T-Zellen Zellen(CD3+CD8+, /µl)	498 (364-683)	461 (339-695)	452 (329-653)	444 (312-588)	416 (282-560)	412 (281-569)	<0,001	<0,001
T-Helfer / zytotoxische T- Zellen (Quotient)	2,25 (1,63-3,01)	2,12 (1,45-2,83)	2,00 (1,38-2,90)	1,94 (1,33-2,76)	2,00 (1,34-2,78)	2,10 (1,50-2,90)	0,220	0,213
Gesamt-B- Zellen(CD19+, /µl)	281 (193-387)	223 (162-318)	228 (157-317)	208 (148-284)	174 (124-258)	209 (149-296)	<0,001	<0,001
total NK-Zellen (CD16+CD56+, /µl)	238 (161-331)	237 (149-363)	263 (177-365)	272 (183-373)	269 (180-380)	269 (181-380)	<0,001	<0,001

^a ANOVA, ^b Test für linearen Trend

Tabelle 9: Geschätzte Randmittel adjustiert für Alter und Geschlecht (Mittelwert und 95% KI)

Variable	Rauchstatus					
	Aktive Raucher (N=477)	Ex-Raucher < 2 Jahre (N=125)	Ex-Raucher 2-10 Jahre (N=189)	Ex-Raucher 10-20 Jahre (N=210)	Ex-Raucher >20 Jahre (N=384)	Niemals-Raucher (N=788)
hsCRP (mg/L)	11,9 (9,63-14,3)	6,84 (2,70-11,0)*	6,04 (2,52-9,56)**	7,91 (4,49-11,3)	6,99 (4,10-9,89)*	4,42 (2,43-6,42)**
IL-6 (ng/L)	6,07 (5,24-6,90)	4,32 (2,83-5,81)*	4,23 (2,96-5,49)*	4,32 (3,09-5,55)*	4,11 (3,07-5,15)**	3,70 (2,98-4,41)**
Leukozyten (/nL)	7793 (7521-8065)	699 (6507-7582)**	6921 (6508-7335)**	6814 (6412-7216)**	6434 (6094-6775)**	6478 (6243-6712)**
Gesamt-T-Zellen (CD3+, / μ l)	1737 (1671-1806)	1654 (1533-1775)**	1506 (1404-1609)**	1485 (1385-1585)**	1450 (1365-1534)**	1434 (1376-1493)**
Aktivierte T- Zellen (CD3+, / μ l)	274 (250-297)	291 (248-333)	245 (209-282)	265 (230-300)	252 (222-282)	253 (233-274)
T-Helferzellen (CD3+CD4+, / μ l)	1165 (1116-1215)	1091 (1003-1180)**	975 (900-1050)**	946 (873-1019)**	928 (866-989)**	922 (880-965)**
Zytotoxische T- Zellen						
(CD3+CD8+, / μ l)	547 (512-583)	545 (482-609)	512 (458-567)	507 (455-560)	490 (446-535)*	480 (450-511)**
Gesamt-B-Zellen (CD19+, / μ l)	317 (285-350)	265 (207-324)	336 (286-385)	265 (217-313)	239 (199-280)**	259 (231-287)*
Natürliche Killerzellen (CD16+CD56+, / μ l)	254 (231-277)	256 (215-257)	283 (248-318)	281 (247-315)	280 (251-309)	296 (276-316)*

*P vs active Raucher <0,05; ** P vs aktive Raucher <0,001

4.2.2 Assoziation von Leukozyten-Subtypen mit der Mortalität

Im Laufe einer Nachbeobachtungszeit von 10,4 Jahren starben 683 (31,4%) Patienten; 430 Todesfälle waren auf kardiovaskuläre Ursachen zurückzuführen. Eine Mediationsanalyse unter Verwendung eines logistischen Regressionsmodells mit dem Raucherstatus als Exposition und der Leukozytenzahl als Mediator zeigte keinen Hinweis darauf, dass die Leukozyten die Assoziation des Rauchens mit der Mortalität vermitteln (Tabelle 9). Während sich für den Rauchstatus ein signifikanter direkter Effekt mit einem Odds ratio von 1,6 ergab zeigte sich kein signifikanter indirekter Effekt und es wird geschätzt, dass nur 4% des Effekts des Rauchens auf die Mortalität über dessen Einfluss auf die Leukozyten erklärt werden kann.

Tabelle 10: Mediationsanalyse

	Estimate	SE	OR	P
natural direct effect	0,47	0,13	1,60	0,0002
natural indirect effect	0,02	0,01	1,02	0,100
total effect	0,49	0,13	1,63	0,0001
mediated proportion	0,04			

OR: odds ratio, SE: Standardfehler (standard error)

Bei den aktiven Rauchern fand ich nach Korrektur für multiples Testen weder für die Gesamtmortalität noch für die kardiovaskuläre Mortalität eine signifikante Assoziation mit den Leukozytensubtypen (Abbildung 7). In der Gruppe der Niemals-Raucher waren jedoch die Gesamt-Lymphozytenzahl sowie die Gesamt-T-Zellzahl, CD4- und CD8-T-Zellzahl invers mit dem Risiko für die Gesamtmortalität assoziiert. Die Hazard Ratios (95% CI) betragen 0,82 (0,72-0,92), 0,71 (0,63-0,81), 0,74 (0,65-0,84) bzw. 0,78 (0,68-0,89) (Tabelle 10). Direkte Assoziationen mit der Mortalität wurden für die Neutrophilenzahl und die neutrophilen Subtypen CD11b+/CD18+ und CD31+/CD40-beobachtet, mit HRs von 1,32 (1,14-1,53), 1,67(1,28-2,19) bzw. 1,43(1,10-1,88). In Bezug auf die kardiovaskuläre Mortalität wurden die einzigen signifikanten Assoziationen für die Zahl der Neutrophilen Granulozyten und CD11b+/CD18+ Neutrophile Granulozyten beobachtet.

Sieben Leukozyten-Subtypen mit signifikanten Assoziationen zur Mortalität im alters- und geschlechtsadjustierten Modell für weitere Analysen wurden ausgewählt und zusätzlich der Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio (NLR) berechnet. Eine Adjustierung für kardiovaskuläre Risikofaktoren einschließlich hsCRP veränderte die Ergebnisse für die einzelnen Marker nur geringfügig. Der NLR zeigte dabei die stärkste Assoziation bei Niemals-Rauchern mit einer HR von 1,43 (1,26-1,61; $p=9,32 \times 10^{-09}$) (Abbildung 8, Tabelle 11). Die Ergebnisse für die Leukozyten-Subtypen, modelliert als *restricted cubic splines*, sind in der Abbildung 9 dargestellt und auch hier zeigt sich keine erkennbare Assoziation bei den aktiven Rauchern.

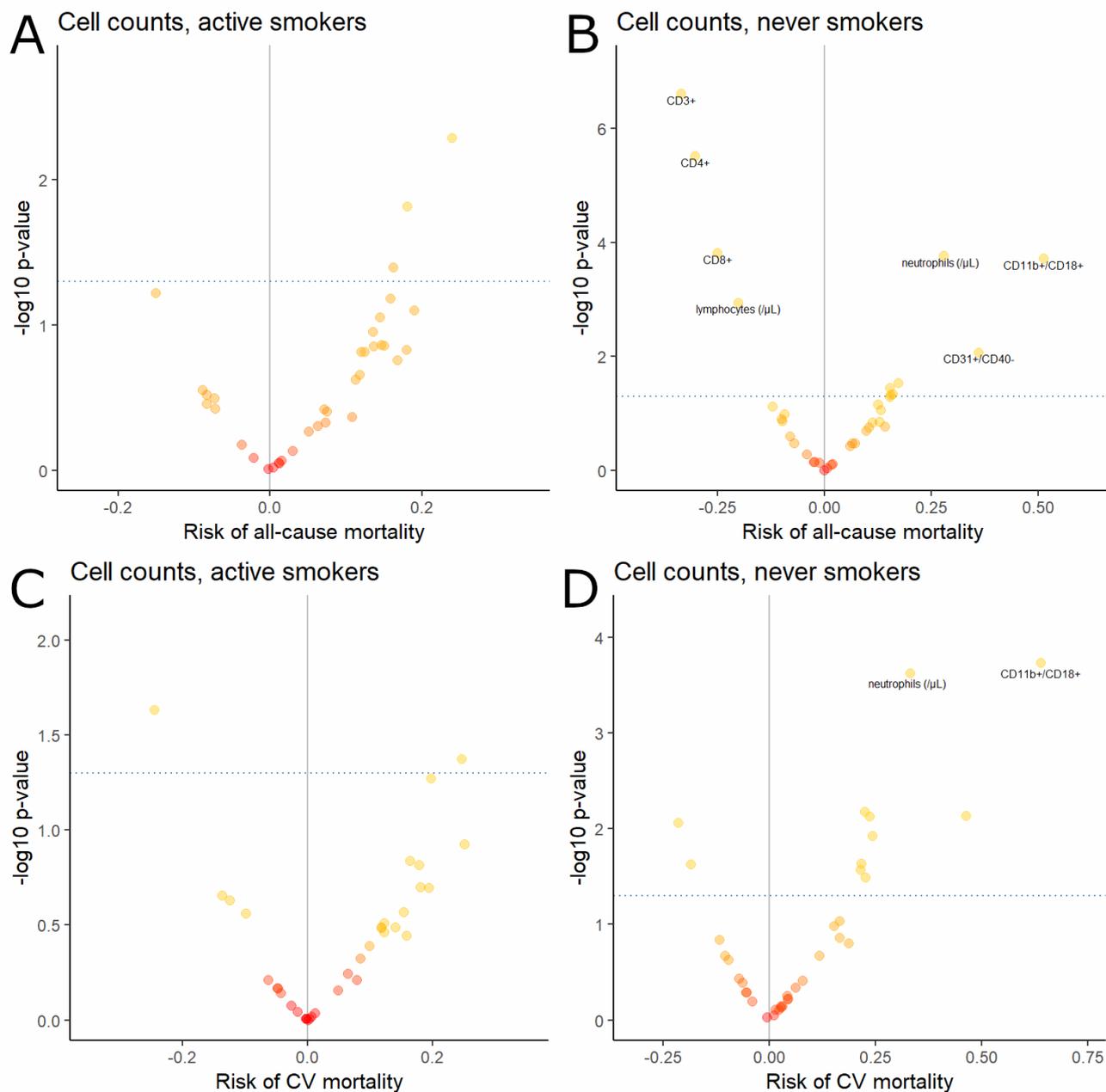


Abbildung 7: Assoziation zwischen Leukozytensubgruppen und Mortalität. Die Volcanoplots zeigen den Betakoeffizienten auf der X-Achse und den negativen dekadischen Logarithmus des P-Werts auf der Y-Achse. Das Risiko wurde mittels Cox-Regression von logarithmisch-transformierten Werten pro Zunahme des jeweiligen Markers um eine SD berechnet, adjustiert für Alter und Geschlecht. Gesamtmortalität (A+B) und kardiovaskuläre Mortalität (C+D) für aktive Raucher (A+C) und Niemals-Raucher (B+D). Nur diejenigen Leukozytentypen, welche nach Korrektur für multiples Testen einen signifikanten P-Wert aufwiesen, sind in der Abbildung beschriftet.

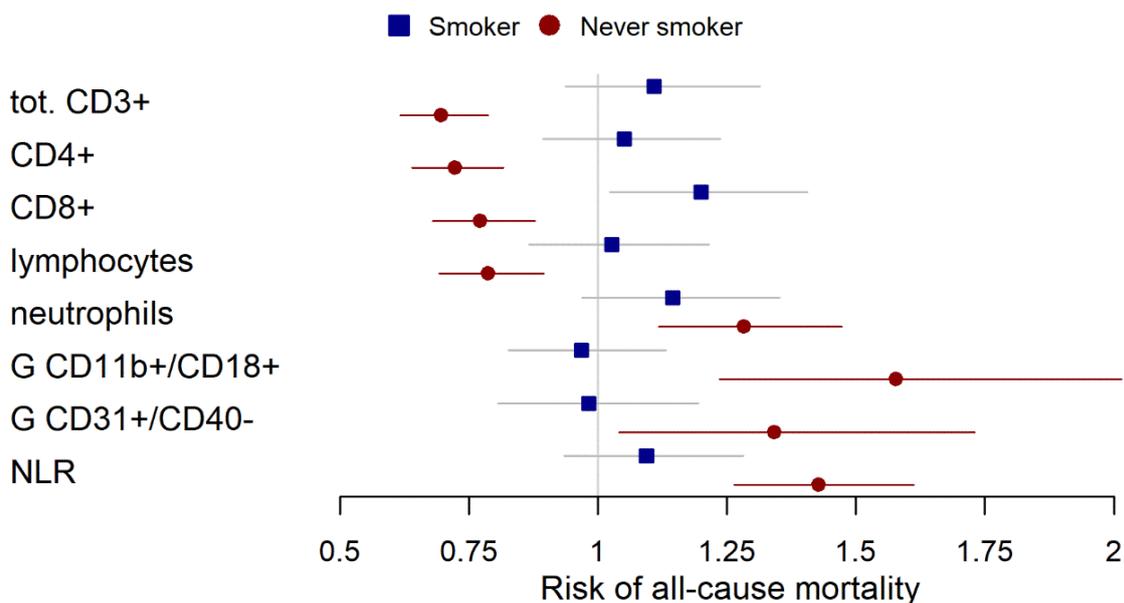


Abbildung 8: Assoziation von Leukozytensubgruppen mit Gesamtmortalität stratifiziert für den Rauchstatus. Coxregression für Gesamtmortalität adjustiert für Alter, Geschlecht, BMI, LDL-C, HDL-C Hypertonus, DM, hsCRP

Tabelle 11: Coxregression für Gesamtmortalität adjustiert für Alter, Geschlecht, BMI, LDL-C, HDL-C Hypertonus, DM, CRP

	Aktive Raucher		Niemals-Raucher	
	HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
Gesamt CD3+	1,13(0,96-1,34)	0,142	0,70(0,62-0,80)	1,96x10 ⁻⁰⁸
CD4+	1,06(0,90-1,25)	0,478	0,73(0,64-0,82)	2,21x10 ⁻⁰⁷
CD8+	1,21(1,03-1,42)	0,019	0,78(0,68-0,88)	8,53x10 ⁻⁰⁵
Lymphozyten	1,10(0,93-1,31)	0,266	0,80(0,70-0,91)	0,001
Neutrophile Granulozyten	1,07(0,90-1,28)	0,423	1,23(1,06-1,44)	0,008
G CD11b+/CD18+	0,92(0,80-1,06)	0,231	1,50(1,14-1,97)	0,004
G CD31+/CD40-	0,96(0,80-1,13)	0,604	1,24(0,95-1,61)	0,111
NLR*	1,09(0,93-1,28)	0,263	1,43(1,26-1,61)	9,32x10 ⁻⁰⁹

*Neutrophilen/Leukozyten Ratio

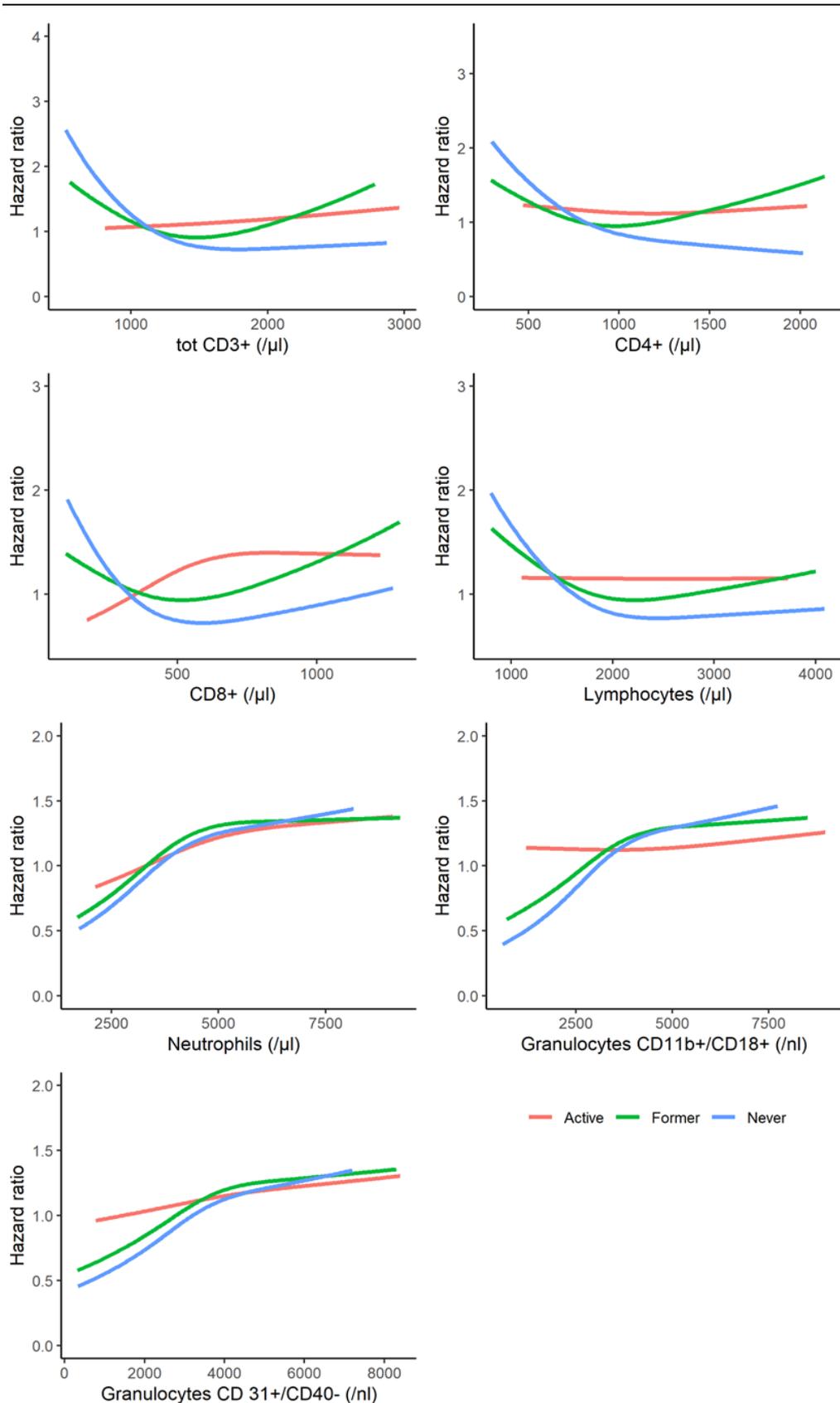


Abbildung 9: Assoziation von Leukozyten-Subgruppen mit der Gesamtmortalität bei aktiven Rauchern (rot), Ex-Rauchern (grün) und Niemals-Rauchern (blau). Cell counts modelliert als *restricted cubic splines* mit drei Knoten und Adjustierung für Alter und Geschlecht.

4.3 Auswirkungen des Rauchens auf das DNA-Methylierungsprofil

Das DNA-Methylierungsprofil der LURIC-Teilnehmer wurde bestimmt unter Verwendung des EPIC-Arrays der Firma Illumina, welcher Sonden für 865859 CpGs enthält. Die Analyse wurde aufgrund von Budgetrestriktionen in zwei Durchgängen mit ungefähr einem Jahr Abstand durchgeführt (2017/18 und 2018/19). Nach Qualitätskontrolle standen 1262 bzw. 1161 Proben für die Analysen zur Verfügung. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die Charakteristika der beiden Gruppen, welche sich in einigen Merkmalen wie z.B. dem LDL-C, der eGFR oder dem Prozentsatz der Patienten mit KHK unterscheiden, allerdings nicht im Anteil der aktiven Raucher und in den *pack-years*.

Tabelle 12: Charakteristika der beiden Methylierungsgruppen.

Variable	1. Messung (N=1262)	2. Messung (N=1161)	P*
Alter (Jahre)	62,3(10,8)	63,4(10,4)	0,012
Frauen (%)	28,2	34,1	0,002
BMI (kg/m ²)	27,4(4,15)	27,6(4,05)	0,227
LDL-C (mg/dL)	119(32,3)	110(34,8)	<0,001
HDL-C (mg/dL)	38,2(10,7)	39,1(11,0)	0,039
TG (mg/dL)	152(112-206)	145(107-196)	0,087
Nüchtern glukose (mg/dL)	101(92,7-117)	103(94,6-118)	0,076
Systolischer Blutdruck (mmHg)	142(23,5)	141(23,6)	0,501
eGFR (ml/min/1.73m ²)	83,3(19,6)	80,2(20,5)	<0,001
hsCRP (mg/L)	3,45(1,30-8,76)	3,31(1,29-8,50)	0,921
NT-proBNP (pg/mL)	295(109-868)	310(108-917)	0,662
Koronare Herzerkrankung (%)	81,6	74,1	<0,001
Hypertonus (%)	73,1	73,0	0,955
Raucher (%)	20,1	17,8	0,165
Pack-years	25,0(11,6-40,0)	24,0(10,0-43,0)	0,984

* t-Test für kontinuierliche Variablen, Chi quadrat Test für kategoriale Variablen.

Um den Effekt des Rauchens auf die Methylierung zu untersuchen, habe ich die aktiven Raucher mit denjenigen Studienteilnehmern verglichen, die niemals geraucht haben, den Ex-Rauchern, welche vor mehr als 10 Jahren schon auf das Rauchen verzichtet haben, und mit den Ex-Rauchern, bei denen der Rauchverzicht weniger als 10 Jahre zurückliegt.

Die Epigenomweiten-Assoziationsstudien (EWAS) wurden unter Verwendung multivariabler linearer Regression durchgeführt, bei welcher der Methylierungs-Beta-Wert als unabhängige Variable und der Raucherstatus als abhängige Variable eingesetzt wurde, mit Adjustierung für Geschlecht, Alter, die Einnahme von lipidsenkenden Medikamenten, Diabetes mellitus, das Leukozytenprofil, Surrogatvariablen zur Adjustierung für mögliche technische Varianz und Artefakte sowie der ID-Nummer des jeweiligen Microarrays. Die Ergebnisse für die Proben der ersten Methylierungsmessung sind in Abbildung 10 sowie Tabelle 13 dargestellt.

Im Vergleich der aktiven Raucher (N=300) mit den Niemals-Rauchern (N=423) war eine große Zahl differenziell methylierter CpGs festzustellen. Unter Verwendung der

Bonferroni-Holm-Methode zur Adjustierung für multiples Testen waren 1071 CpGs signifikant unterschiedlich methyliert.

Tabelle 13: Unterschiedlich methylierte CpGs, 1. Messung

Sonde	Chr	Position	Gen	P _{unadjustiert}	P _{Bonferroni-Holm}	P _{FDR}
<i>aktive Raucher vs Niemals-Raucher</i>						
cg05575921	5	373378	AHRR	4,51x10 ⁻¹¹³	3,35x10 ⁻¹⁰⁷	3,35x10 ⁻¹⁰⁷
cg21566642	2	233284661	ALPPL2	5,95x10 ⁻⁹⁶	4,42x10 ⁻⁹⁰	2,21x10 ⁻⁹⁰
cg01940273	2	233284934	ALPPL2	2,27x10 ⁻⁸⁴	1,69x10 ⁻⁷⁸	5,62x10 ⁻⁷⁹
cg03636183	19	17000585	F2RL3	3,75x10 ⁻⁸⁴	2,78x10 ⁻⁷⁸	6,96x10 ⁻⁷⁹
cg14391737	11	86513429	PRSS23	3,41x10 ⁻⁷²	2,53x10 ⁻⁶⁶	5,06x10 ⁻⁶⁷
cg17739917	17	38477572	RARA	3,15x10 ⁻⁶²	2,34x10 ⁻⁵⁶	3,89x10 ⁻⁵⁷
cg21911711	19	16998668	F2RL3	4,69x10 ⁻⁵⁴	3,48x10 ⁻⁴⁸	4,98x10 ⁻⁴⁹
cg17087741	2	233283010	ALPPL2	8,99x10 ⁻⁵⁰	6,67x10 ⁻⁴⁴	8,34x10 ⁻⁴⁵
cg26703534	5	377358	AHRR	3,87x10 ⁻⁴⁷	2,87x10 ⁻⁴¹	3,19x10 ⁻⁴²
cg25648203	5	395444	AHRR	5,37x10 ⁻⁴⁷	3,98x10 ⁻⁴¹	3,98x10 ⁻⁴²
cg15342087	6	30720209	IER3	1,84x10 ⁻⁴⁴	1,36x10 ⁻³⁸	1,24x10 ⁻³⁹
cg03329539	2	233283329	ALPPL2	2,26x10 ⁻⁴⁴	1,68x10 ⁻³⁸	1,40x10 ⁻³⁹
<i>aktive Raucher vs Ex-Raucher > 10 Jahre</i>						
cg05575921	5	373378	AHRR	1,04x10 ⁻⁵⁶	7,70x10 ⁻⁵¹	7,70x10 ⁻⁵¹
cg01940273	2	233284934	ALPPL2	2,90x10 ⁻⁴⁵	2,16x10 ⁻³⁹	1,08x10 ⁻³⁹
cg21566642	2	233284661	ALPPL2	2,75x10 ⁻⁴¹	2,04x10 ⁻³⁵	6,80x10 ⁻³⁶
cg03636183	19	17000585	F2RL3	2,11x10 ⁻³⁸	1,57x10 ⁻³²	3,92x10 ⁻³³
cg26703534	5	377358	AHRR	1,51x10 ⁻³⁷	1,12x10 ⁻³¹	2,24x10 ⁻³²
cg17739917	17	38477572	RARA	1,16x10 ⁻³¹	8,59x10 ⁻²⁶	1,43x10 ⁻²⁶
cg03329539	2	233283329	ALPPL2	6,75x10 ⁻²⁹	5,01x10 ⁻²³	7,16x10 ⁻²⁴
cg25648203	5	395444	AHRR	1,11x10 ⁻²⁸	8,22x10 ⁻²³	1,03x10 ⁻²³
cg17087741	2	233283010	ALPPL2	1,88x10 ⁻²⁷	1,39x10 ⁻²¹	1,55x10 ⁻²²
cg02738868	14	74221164	ELMSAN1	2,49x10 ⁻²⁶	1,85x10 ⁻²⁰	1,85x10 ⁻²¹
cg05086879	22	39861490	MGAT3	1,94x10 ⁻²⁵	1,44x10 ⁻¹⁹	1,31x10 ⁻²⁰
cg07986378	12	11898284	ETV6	4,00x10 ⁻²⁴	2,97x10 ⁻¹⁸	2,48x10 ⁻¹⁹
<i>aktive Raucher vs Ex-Raucher < 10 Jahre</i>						
cg26703534	5	377358	AHRR	3,25x10 ⁻²¹	2,42x10 ⁻¹⁵	2,42x10 ⁻¹⁵
cg01940273	2	233284934	ALPPL2	5,72x10 ⁻¹⁶	4,25x10 ⁻¹⁰	2,12x10 ⁻¹⁰
cg05157376	1	92781750	RPAP2	1,48x10 ⁻¹³	1,10x10 ⁻⁰⁷	3,65x10 ⁻⁰⁸
cg05575921	5	373378	AHRR	2,39x10 ⁻¹³	1,77x10 ⁻⁰⁷	4,43x10 ⁻⁰⁸
cg21566642	2	233284661	ALPPL2	2,87x10 ⁻¹²	2,13x10 ⁻⁰⁶	4,27x10 ⁻⁰⁷
cg05086879	22	39861490	MGAT3	8,26x10 ⁻¹¹	6,13x10 ⁻⁰⁵	1,02x10 ⁻⁰⁵
cg04551776	5	393366	AHRR	2,15x10 ⁻¹⁰	1,60x10 ⁻⁰⁴	2,29x10 ⁻⁰⁵
cg17739917	17	38477572	RARA	5,63x10 ⁻¹⁰	4,18x10 ⁻⁰⁴	5,10x10 ⁻⁰⁵
cg03329539	2	233283329	ALPPL2	6,19x10 ⁻¹⁰	4,59x10 ⁻⁰⁴	5,10x10 ⁻⁰⁵
cg07390844	18	72935911	TSHZ1	1,71x10 ⁻⁰⁹	1,27x10 ⁻⁰³	1,27x10 ⁻⁰⁴
cg26673040	2	67157193	LOC101060019	1,97x10 ⁻⁰⁹	1,47x10 ⁻⁰³	1,33x10 ⁻⁰⁴
cg02738868	14	74221164	ELMSAN1	2,65x10 ⁻⁰⁹	1,97x10 ⁻⁰³	1,64x10 ⁻⁰⁴

Methylierungs-Beta-Wert als unabhängige Variable und der Raucherstatus als abhängige Variable, Adjustierung für Geschlecht, Alter, Einnahme von lipidsenkenden Medikamenten, Diabetes mellitus. P Bonferroni-Holm: Adjustierung für multiples testen. FDR: False discovery rate.

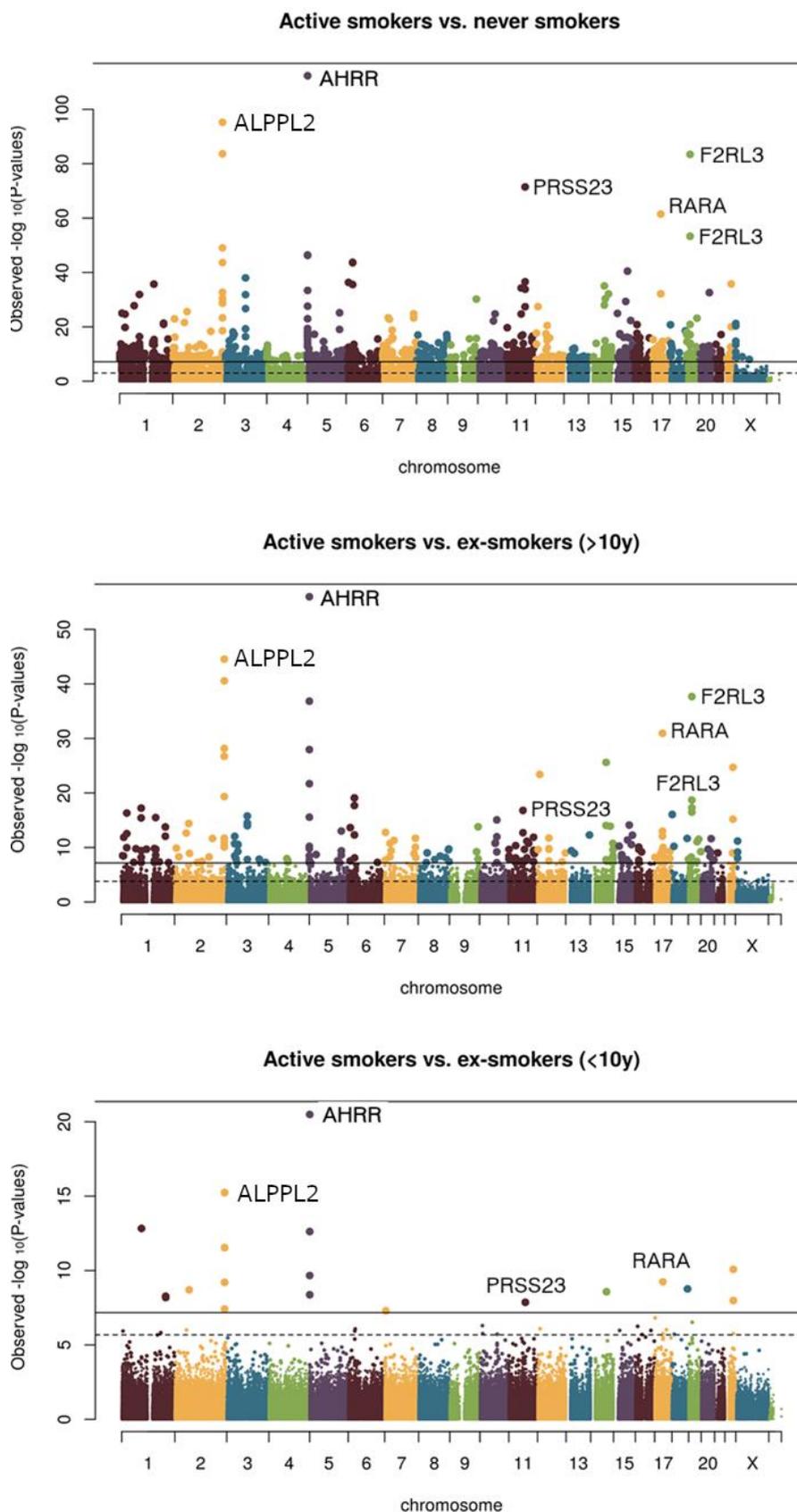


Abbildung 10: Manhattan plots der EWAS zwischen aktiven Rauchern, Niemals-Rauchern und Ex-Rauchern. Die Methylierungsstellen mit den insgesamt niedrigsten P-Werten sind mit dem Namen des benachbarten Gens beschriftet. Die durchgezogene Linie kennzeichnet die Signifikanzgrenze nach FDR-Korrektur für multiples Testen, die gestrichelte Linie kennzeichnet die Signifikanzgrenze nach Bonferroni-Holm-Korrektur.

Tabelle 14: Unterschiedlich methylierte CpGs, 2. Messung

Sonde	Chr	Position	Gen	P _{unadjustiert}	P _{Bonferroni-Holm}	P _{FDR}
<i>aktive Raucher vs Niemals-Raucher</i>						
cg05575921	5	373378	AHRR	7,12x10 ⁻¹⁰⁰	5,78x10 ⁻⁹⁴	5,78x10 ⁻⁹⁴
cg21566642	2	233284661	ALPPL2	5,16x10 ⁻⁷⁸	4,19x10 ⁻⁷²	2,09x10 ⁻⁷²
cg01940273	2	233284934	ALPPL2	2,00x10 ⁻⁶⁹	1,62x10 ⁻⁶³	5,39x10 ⁻⁶⁴
cg03636183	19	17000585	F2RL3	3,92x10 ⁻⁶⁷	3,19x10 ⁻⁶¹	7,97x10 ⁻⁶²
cg21911711	19	16998668	F2RL3	5,90x10 ⁻⁵⁰	4,80x10 ⁻⁴⁴	9,59x10 ⁻⁴⁵
cg17739917	17	38477572	RARA	6,77x10 ⁻⁴⁹	5,50x10 ⁻⁴³	9,16x10 ⁻⁴⁴
cg26703534	5	377358	AHRR	9,28x10 ⁻⁴⁹	7,54x10 ⁻⁴³	1,08x10 ⁻⁴³
cg14391737	11	86513429	PRSS23	1,98x10 ⁻⁴⁷	1,61x10 ⁻⁴¹	2,01x10 ⁻⁴²
cg17087741	2	233283010	ALPPL2	1,64x10 ⁻⁴⁶	1,33x10 ⁻⁴⁰	1,48x10 ⁻⁴¹
cg25648203	5	395444	AHRR	5,44x10 ⁻⁴³	4,42x10 ⁻³⁷	4,41x10 ⁻³⁸
cg00475490	11	86517110	PRSS23	4,90x10 ⁻⁴⁰	3,98x10 ⁻³⁴	3,62x10 ⁻³⁵
cg24859433	6	30720203	IER3	3,83x10 ⁻³⁹	3,11x10 ⁻³³	2,59x10 ⁻³⁴
<i>aktive Raucher vs Ex-Raucher > 10 Jahre</i>						
cg05575921	5	373378	AHRR	2,21x10 ⁻⁴⁶	1,79x10 ⁻⁴⁰	1,79x10 ⁻⁴⁰
cg21566642	2	233284661	ALPPL2	3,66x10 ⁻³⁷	2,97x10 ⁻³¹	1,49x10 ⁻³¹
cg01940273	2	233284934	ALPPL2	3,02x10 ⁻³⁴	2,45x10 ⁻²⁸	8,18x10 ⁻²⁹
cg26703534	5	377358	AHRR	1,21x10 ⁻²⁹	9,80x10 ⁻²⁴	2,45x10 ⁻²⁴
cg03636183	19	17000585	F2RL3	2,04x10 ⁻²⁹	1,66x10 ⁻²³	3,31x10 ⁻²⁴
cg17739917	17	38477572	RARA	1,69x10 ⁻²⁷	1,37x10 ⁻²¹	2,28x10 ⁻²²
cg25648203	5	395444	AHRR	2,40x10 ⁻²⁴	1,95x10 ⁻¹⁸	2,78x10 ⁻¹⁹
cg02738868	14	74221164	ELMSAN1	6,31x10 ⁻²³	5,12x10 ⁻¹⁷	6,40x10 ⁻¹⁸
cg05086879	22	39861490	MGAT3	9,51x10 ⁻²²	7,72x10 ⁻¹⁶	8,58x10 ⁻¹⁷
cg17087741	2	233283010	ALPPL2	7,91x10 ⁻²⁰	6,43x10 ⁻¹⁴	6,43x10 ⁻¹⁵
cg09935388	1	92947588	GFI1	8,06x10 ⁻¹⁹	6,55x10 ⁻¹³	5,95x10 ⁻¹⁴
cg18110140	15	75350380	-	3,14x10 ⁻¹⁸	2,55x10 ⁻¹²	2,13x10 ⁻¹³
<i>aktive Raucher vs Ex-Raucher < 10 Jahre</i>						
cg26703534	5	377358	AHRR	5,29x10 ⁻²⁰	4,29x10 ⁻¹⁴	4,29x10 ⁻¹⁴
cg01940273	2	233284934	ALPPL2	1,23x10 ⁻¹⁷	1,00x10 ⁻¹¹	5,00x10 ⁻¹²
cg21566642	2	233284661	ALPPL2	2,60x10 ⁻¹⁷	2,11x10 ⁻¹¹	7,03x10 ⁻¹²
cg05575921	5	373378	AHRR	5,50x10 ⁻¹⁶	4,46x10 ⁻¹⁰	1,12x10 ⁻¹⁰
cg05086879	22	39861490	MGAT3	1,66x10 ⁻¹¹	1,34x10 ⁻⁰⁵	2,69x10 ⁻⁰⁶
cg17739917	17	38477572	RARA	2,14x10 ⁻¹¹	1,74x10 ⁻⁰⁵	2,90x10 ⁻⁰⁶
cg02738868	14	74221164	ELMSAN1	5,33x10 ⁻¹¹	4,32x10 ⁻⁰⁵	6,17x10 ⁻⁰⁶
cg05157376	1	92781750	RPAP2	7,05x10 ⁻¹¹	5,72x10 ⁻⁰⁵	7,15x10 ⁻⁰⁶
cg25648203	5	395444	AHRR	7,23x10 ⁻¹⁰	5,86x10 ⁻⁰⁴	6,52x10 ⁻⁰⁵
cg09022230	7	5457225	TNRC18	1,49x10 ⁻⁰⁹	2,07x10 ⁻⁰⁴	1,21x10 ⁻⁰⁴
cg21611682	11	68138269	LRP5	2,46x10 ⁻⁰⁹	2,00x10 ⁻⁰⁴	1,81x10 ⁻⁰⁴
cg00045592	1	160714299	SLAMF7	1,48x10 ⁻⁰⁸	1,20x10 ⁻⁰²	9,98x10 ⁻⁰⁴

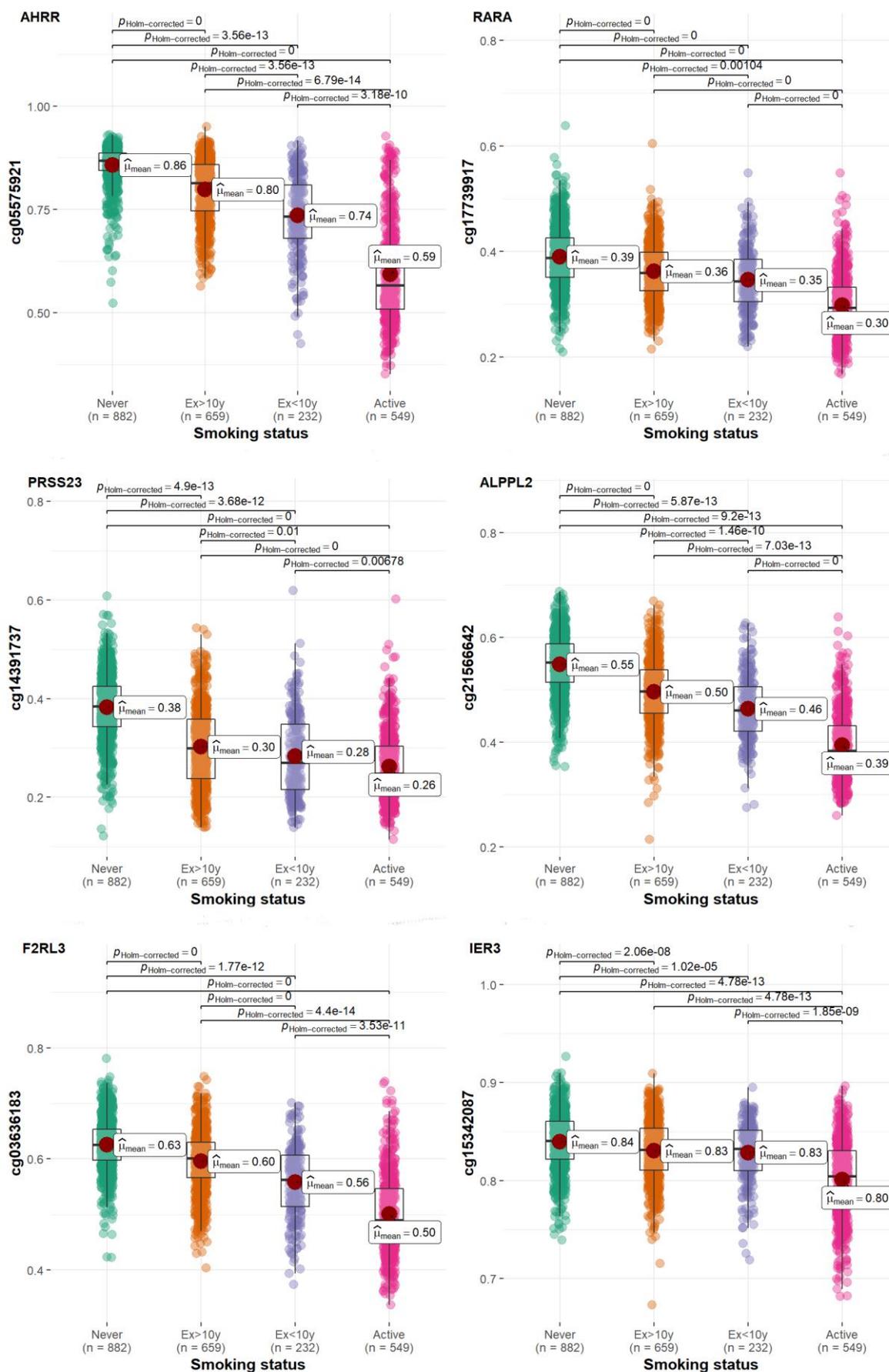
Methylierungs-Beta-Wert als unabhängige Variable und der Raucherstatus als abhängige Variable, Adjustierung für Geschlecht, Alter, Einnahme von lipidsenkenden Medikamenten, Diabetes mellitus. P Bonferroni-Holm: Adjustierung für multiples testen. P FDR: False discovery rate

Beim Vergleich der aktiven Raucher mit denjenigen Ex-Rauchern, welche schon vor mehr als 10 Jahren mit dem Rauchen aufgehört haben (N=138), nahm die Zahl der signifikanten CpGs deutlich ab und betrug 231. Zwischen den aktiven Rauchern und denjenigen Ex-Rauchern, deren Rauchverzicht weniger als 10 Jahre zurücklag

(N=347), waren die Unterschiede in der Methylierung nur gering mit 20 signifikant unterschiedlich methylierten CpGs.

Die Ergebnisse der Methylierungsuntersuchung mit den Proben der 2ten Messung sind in Tabelle 14 dargestellt und bestätigen die mit den ersten Proben gewonnenen Ergebnisse im Sinne einer internen Validierung.

In der Abbildung 11 sind die Verteilungen der Methylierungs-Beta-Werte an den zwölf signifikantesten Loci dargestellt. Bei allen zwölf Loci war der Grad der Methylierung bei den aktiven Rauchern niedriger im Vergleich zu den Niemals-Rauchern.



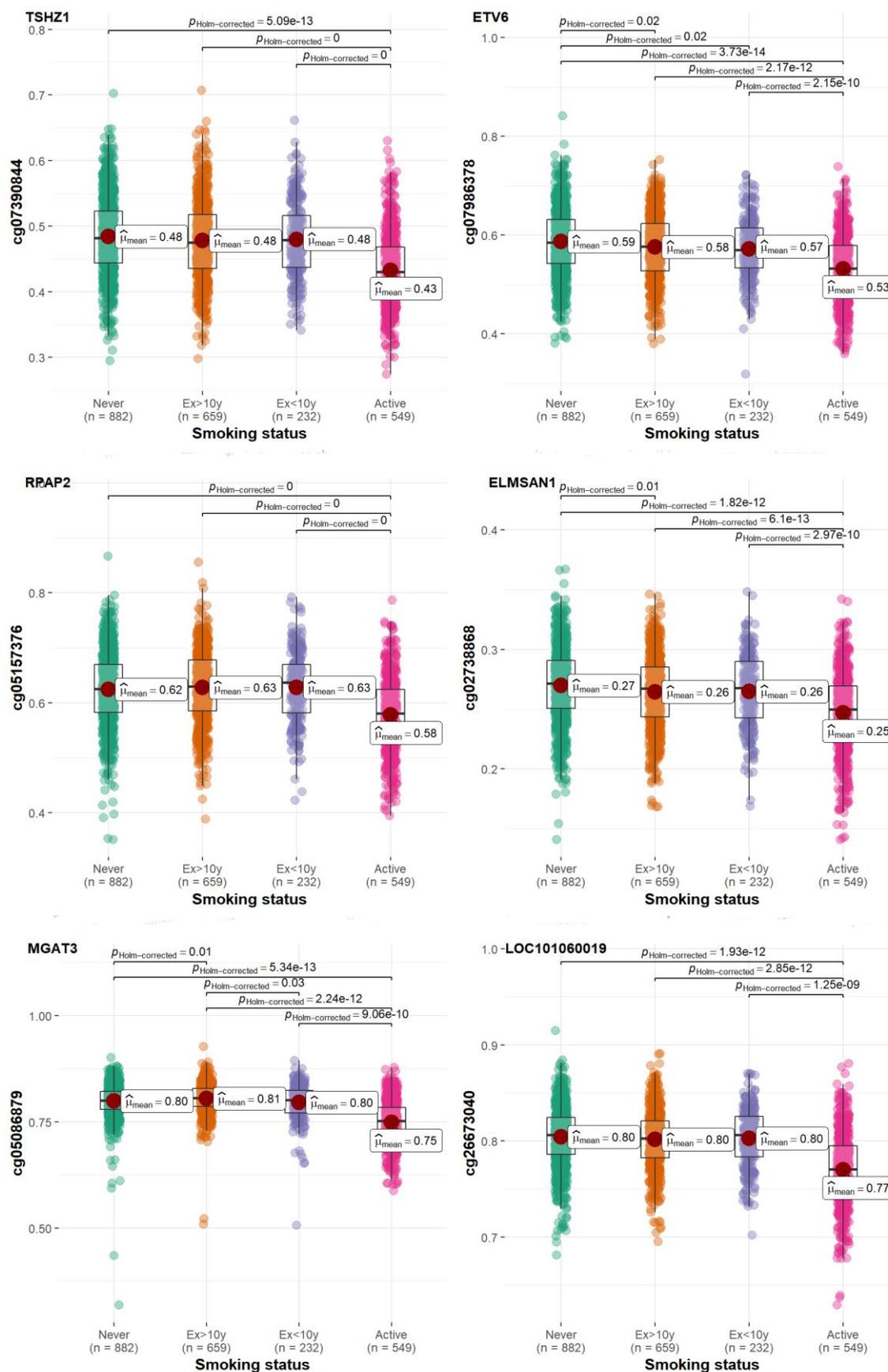


Abbildung 11: Verteilung der Methylierungs-Betawerte von CpGs an 12 der signifikantesten Loci in den unterschiedlichen analysierten Gruppen (1. und 2. Messung kombiniert). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nach Adjustierung für multiples Testen sind jeweils am oberen Rand dargestellt.

4.4 Genomweite Assoziationsanalyse (GWAS)

Nach der Fertigstellung des ersten Entwurfs des humanen Genoms im Jahr 2003 wurde die Methode der genomweiten Assoziationsanalyse angewandt um das gesamte Genom nach neuen Assoziationen an neuen genetischen Loci zu screenen. Auch für das Rauchen als kategorielle Variable wurde eine Reihe von GWAS durchgeführt. GWAS hinsichtlich kontinuierlicher, mit dem Rauchen assoziierter Phänotypen wie Cotinin wurden aber noch nicht so häufig durchgeführt. Das Ergebnis in der Gruppe der aktiven Raucher ist in Abbildung 12A dargestellt. Es wurden drei genomweit signifikante Loci auf den Chromosomen 2, 13 und 14 in oder in der Nähe der Gene *CTAGE11P*, *LRRTM4* und *TTC8* identifiziert. Auf Chromosom 8 gab es einen weiteren Locus (Gen *RUNX1T1*), dessen P-Wert in der Assoziationsanalyse nur knapp unter der genomweiten Signifikanz lag. Die SNPs sind in Tabelle 15 aufgeführt und die genomischen Loci in Abbildung 13 dargestellt. Alle SNPs sind selten (MAF < 2%) und das seltene Allel ist jeweils mit einer niedrigeren Serumkonzentration von Cotinin assoziiert.

Es wurde ebenfalls eine GWAS durchgeführt, bei der aktive Raucher (N=680) und Niemals-Raucher (N=1048) verglichen wurden. Wie dem in Abbildung 12B dargestellten Manhattanplot zu entnehmen ist wurde hier keine signifikante Assoziation gefunden.

Tabelle 15: SNPs mit den niedrigsten P-Werten aus der Assoziationsanalyse

SNP ID	Chr	Position	Effekt-Allel / nicht Effekt-Allel	EAF	Beta	SE	P	Gen
13:75640642	13	75640642	C/G	0,0155	-2,263	0,389	1,06x10 ⁻⁰⁸	CTAGE11P
2:77092062	2	77092062	C/T	0,0116	-2,508	0,449	3,65x10 ⁻⁰⁸	LRRTM4
14:89316662	14	89316662	G/A	0,0145	-2,239	0,402	4,31x10 ⁻⁰⁸	TTC8
8:92904580	8	92904580	A/T	0,0194	-1,912	0,351	7,84x10 ⁻⁰⁸	RUNX1T1

EAF: Effekt-Allel-Frequenz, SE: Standard Error.

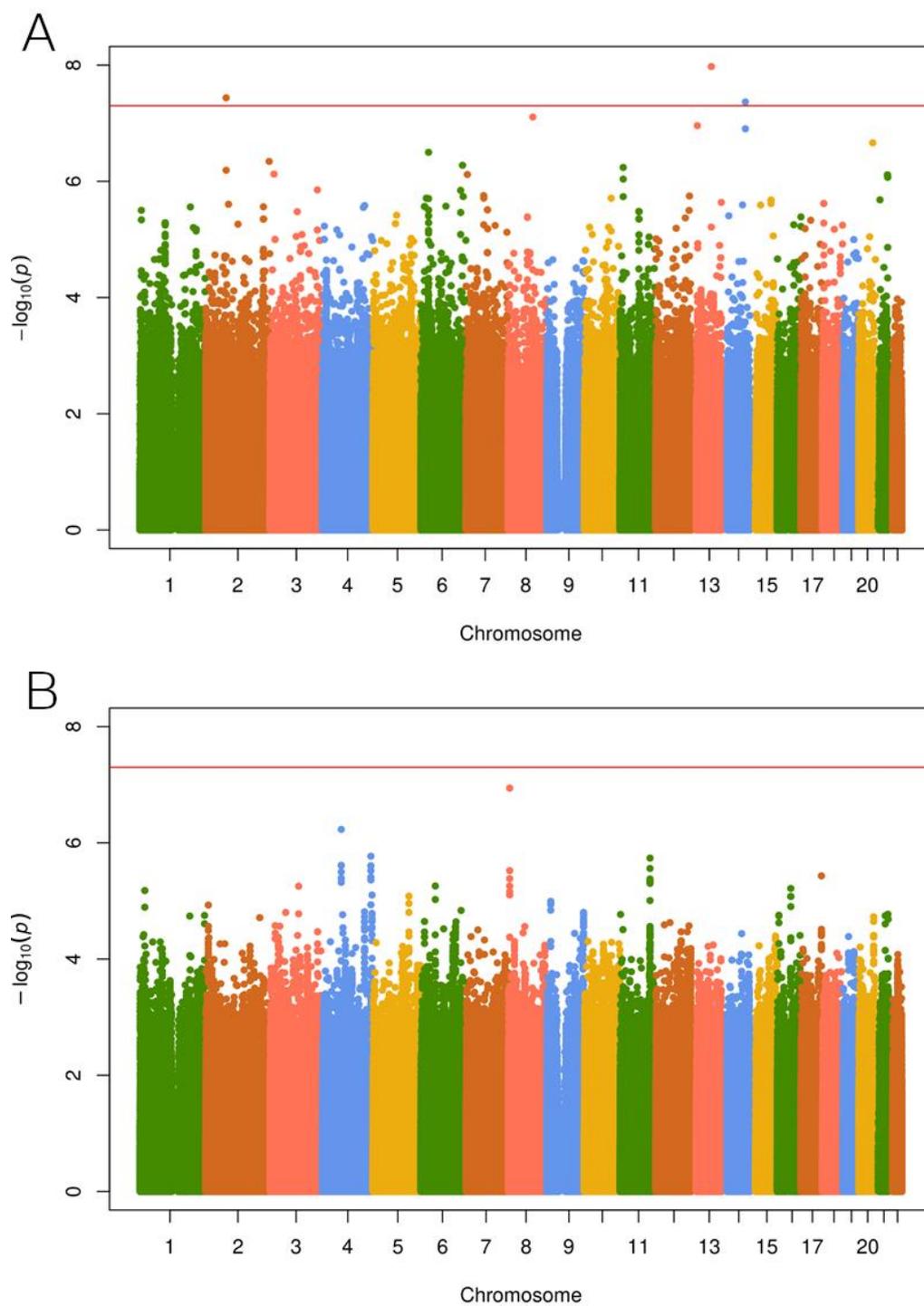
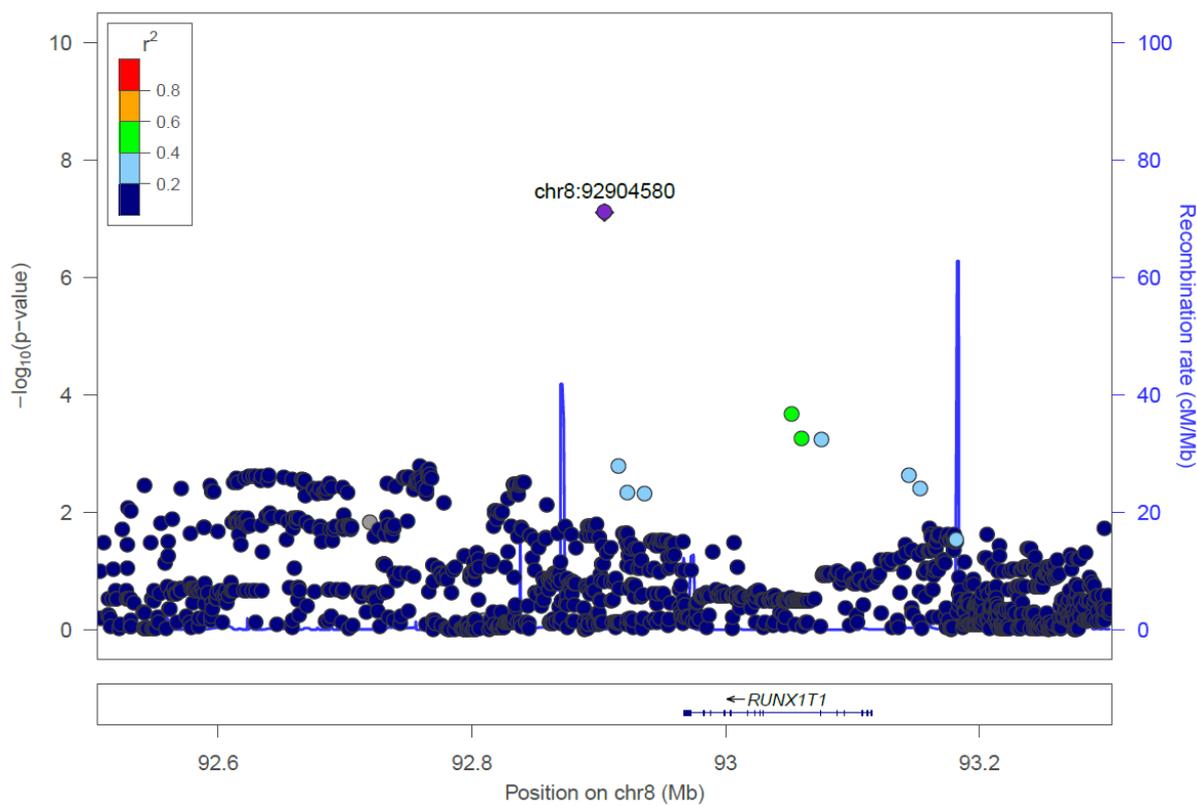
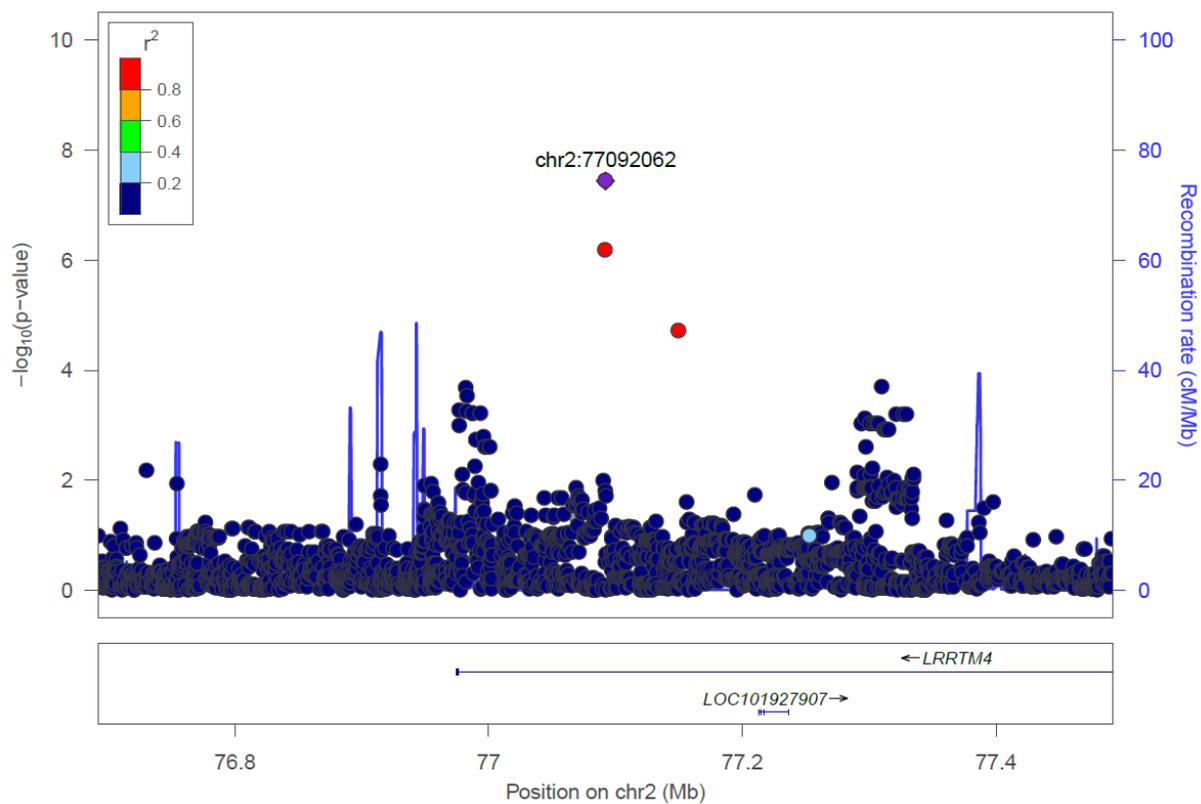


Abbildung 12: Manhattanplot der GWAS für die Phänotypen Cotinin (nur aktive Raucher: A) und Rauchstatus (aktiv vs niemals: B). Jeder Punkt stellt einen SNP dar. X-Achse: chromosomale Position, Y-Achse: negativer dekadischer Logarithmus des P-Werts aus der Assoziationsanalyse.



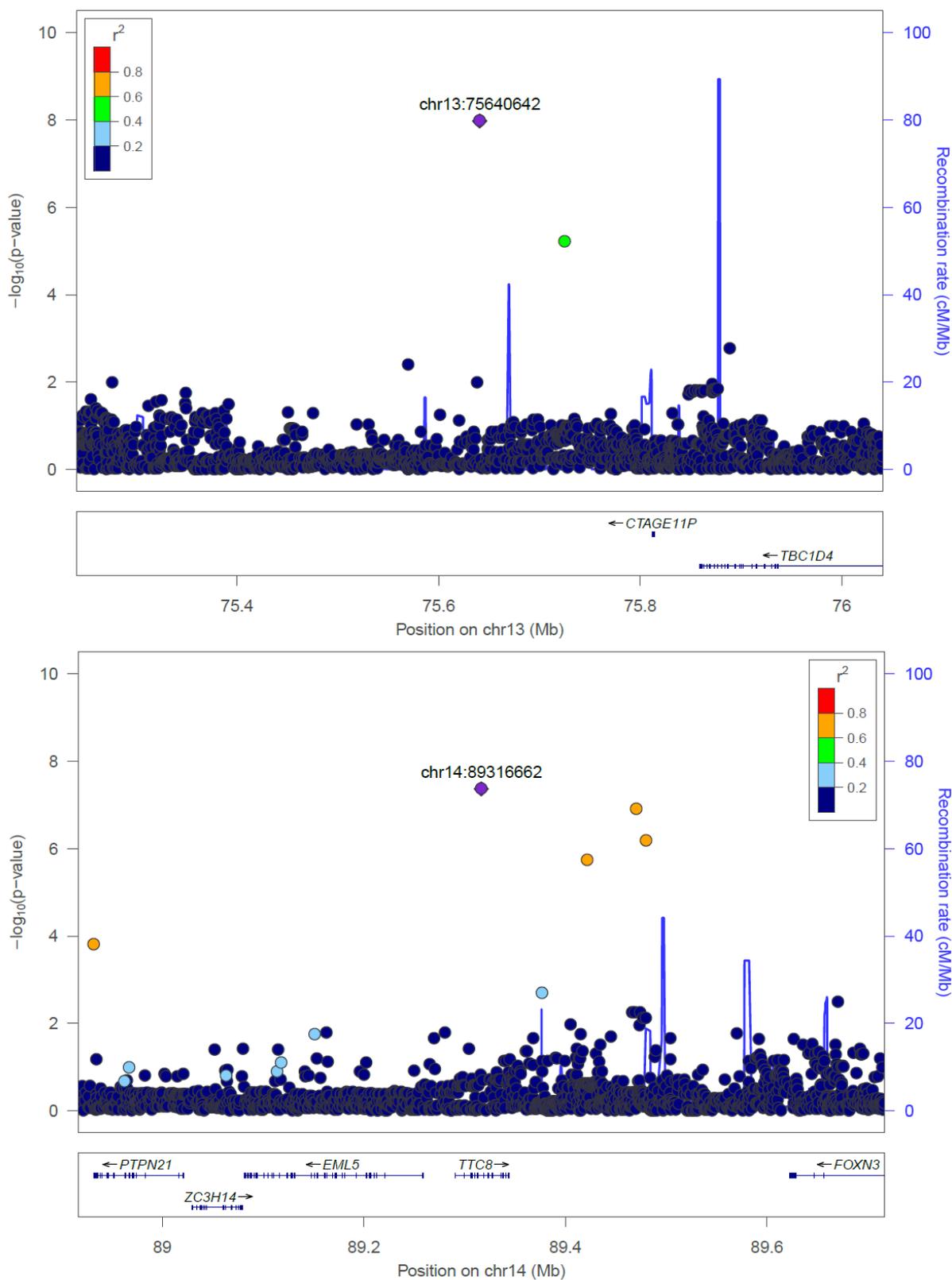


Abbildung 13: Regionalplots der vier significantesten SNPs aus der GWAS für Cotinin. Jeder Punkt stellt einen SNP dar. X-Achse: chromosomale Position, Y-Achse: negativer dekadischer Logarithmus des P-Werts aus der Assoziationsanalyse.

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung des Rauchens auf verschiedene Risikomarker für kardiovaskuläre Mortalität sowie auf die epigenetische Veränderung der zirkulierenden Immunzellen untersucht. Das besondere Augenmerk lag hier auf der Analyse der Assoziation des Rauchens mit der Endothelialen Dysfunktion als erstem Stadium der Arteriosklerose und mit der Konzentration unterschiedlicher Leukozytensubtypen sowie mit dem Methylierungsprofil der Leukozyten.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind:

- 1) Bei aktiven Rauchern sind die Konzentrationen mancher Endothelmarker erhöht, andere aber erniedrigt, und nicht bei allen Markern erreichen die Konzentrationen auch 20 Jahre nach dem Rauchstopp dasselbe Niveau wie bei denjenigen Studienteilnehmern, welche niemals geraucht haben
- 2) Höhere Konzentrationen von sICAM-1, sVCAM-1 und vWF waren mit einem höheren Mortalitätsrisiko assoziiert, während sL-Selektin invers mit der Mortalität assoziiert war, allerdings nur in der Gruppe der aktiven Raucher.
- 3) Die Anzahl an Leukozyten war bei aktiven Rauchern erhöht, insbesondere aufgrund einer Erhöhung der Neutrophilen Granulozyten und der Monozyten, die Werte glichen sich aber mit zunehmender Zeit nach dem Rauchverzicht wieder denen der Niemals-Raucher an.
- 4) In der Gruppe der Niemals-Raucher waren die Lymphozyten invers mit dem Mortalitätsrisiko assoziiert, bei den Rauchern gab es diese Beziehung nicht.
- 5) Beim Vergleich der Raucher mit den Niemals-Rauchern waren eine große Zahl an CpGs unterschiedlich methyliert. Bei den Ex-Rauchern hing die Zahl der unterschiedlich methylierten CpGs von der Dauer des Rauchverzichts ab. Das Methylierungsprofil von Ex-Rauchern, deren Rauchverzicht weniger als 10 Jahre zurücklag, wies vergleichsweise wenige Unterschiede zu dem der aktiven Raucher auf.

5.1 Rauchen und Atherosklerose

Bereits in der Framingham-Studie wurde das Rauchen als einer von fünf Risikofaktoren für Atherosklerose identifiziert, die anderen vier waren der Bluthochdruck, ein hoher Serumcholesterinspiegel, Glukoseintoleranz und eine linksventrikuläre Hypertrophie in der Elektrokardiographie. Dabei war das Rauchen am prädiktivsten für die Entwicklung von *claudicatio intermittens* [75].

Das Rauchen beschleunigt insbesondere die Atherosklerose in den Koronararterien, der Aorta, der Carotiden und den großen Arterien des peripheren Kreislaufs [76]. Eine detaillierte Zusammenfassung der Rolle des Rauchens, und im Besonderen des Nikotins, im Hinblick auf die Atheroskleroseentstehung kann einer Reihe von Übersichtsartikeln entnommen werden [77, 78]. Abbildung 14 fasst die wesentlichen Erkenntnisse zusammen.

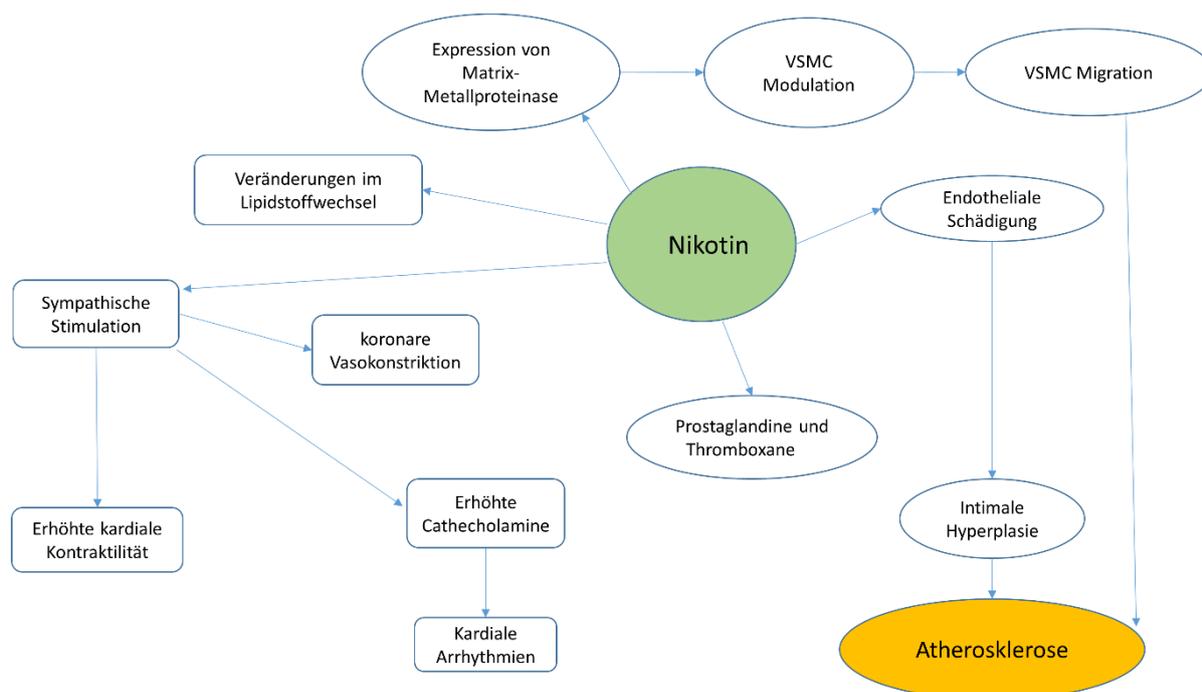


Abbildung 14: Rolle von Nikotin bei Atherosklerose.; VSMC, vascular smooth muscle cells.) modifiziert nach S. Kilaru et al. doi: 10.1016/s1072-7515(01)01059-6.

5.2 Auswirkungen des Rauchens auf die Endothelfunktion

5.2.1 Assoziation zwischen Rauchen und endothelialen Adhäsionsmolekülen

Das Rauchen ist assoziiert mit vaskulärer Entzündung und schädigt die lungenepithelialen *tight junctions*, wodurch sie durchlässiger werden [79]. In ihrem Effekt auf die Funktion des Endothels gleichen sich im Übrigen unterschiedliche Formen des Rauchens wie Zigaretten, Wasserpfeife oder die in den letzten Jahren in Mode gekommene E-Zigarette, wie einem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel zu entnehmen ist [80]. Maßgebliche Mechanismen bei allen diesen Varianten des Rauchens sind der oxidative Stress und Entzündungsprozesse. Es wurde gezeigt, dass bereits ein moderater Zigarettenkonsum die Plasmakonzentration von Zelladhäsionsmolekülen wie z.B. sICAM-1 beeinflusst [50]. Darüber hinaus hat eine Reihe von Studien gezeigt, dass die Rauchentwöhnung eine hochwirksame Maßnahme zur Senkung der Konzentration des sICAM-1 darstellt [51, 52, 81]. Dabei haben einige Studien auch den Effekt einer Nikotinersatztherapie auf die Endothelfunktion untersucht und eine Verbesserung der Endothelfunktion und eine Verringerung der sICAM-1-Konzentration zeigen können [82, 83]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es nicht ausschließlich das Nikotin ist, welches das Endothel schädigt, sondern andere schädliche Substanzen im Tabakrauch zu den Schädigungen beitragen.

In Übereinstimmung mit diesen publizierten Ergebnissen beobachtete ich deutlich erhöhte Konzentrationen von sICAM-1 bei aktiven Rauchern (auch dosisabhängig höher bei starken als bei leichten Rauchern), welche bei den Ex-Rauchern mit zunehmender Zeit seit dem Rauchstopp allmählich wieder abnahmen, bis sie ein mit den Niemals-Rauchern vergleichbares Niveau erreichten. Ähnliche Trends habe ich auch für sE-Selektin und sP-Selektin beobachtet (Abbildung 15). Dies stimmt in

gewisser Weise mit Beobachtungen bei kardiovaskulären Hochrisikopatienten überein, die zeigten, dass Reduzierung oder Beendigung des Rauchens (zusammen mit anderen Maßnahmen des kardiovaskulären Risikomanagements) mit einer Verringerung von sP-Selektin verbunden waren [84]. Bezüglich sE-Selektin wurden erhöhte Serumspiegel bei diabetischen und nicht-diabetischen Rauchern mit einer positiven Korrelation mit den *pack-years* beschrieben [85], obwohl andere Studien mit kleineren Fallzahlen keine Unterschiede fanden [86].

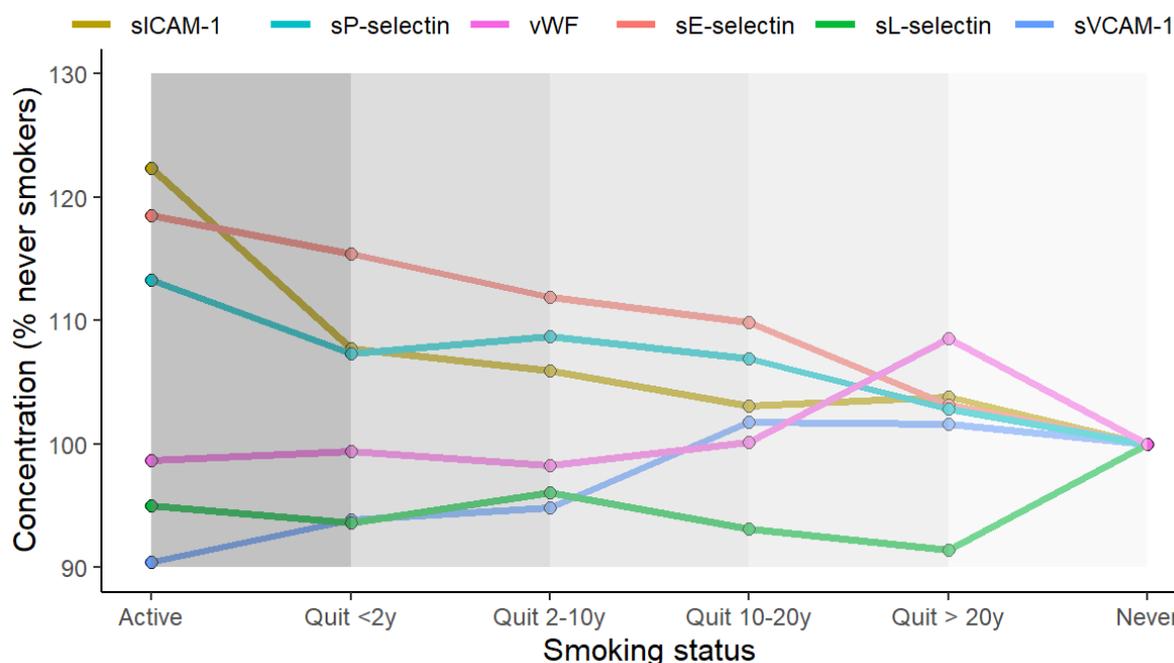


Abbildung 15: Mittelwerte unterschiedlicher endothelialer Marker bei aktiven Rauchern, Ex-Rauchern und Niemals-Rauchern. Die Konzentration bei den Niemals-Rauchern wurde jeweils als 100% definiert.

Im Gegensatz zu sE-Selektin und sP-Selektin wiesen die aktiven Raucher niedrigere Konzentrationen von sVCAM-1 und sL-Selektin auf. Diese Unterschiede blieben nach Adjustierung für *confounder* im Wesentlichen unverändert. Während andere endotheliale Marker wie sICAM-1 mit längerer Zeit seit dem Rauchstopp in etwa das gleiche Niveau erreichten wie bei den Niemals-Rauchern blieb die Konzentration des sL-Selektins erniedrigt und war bei den Ex-Rauchern im Vergleich zu den aktiven Rauchern sogar noch niedriger. Dies könnte auf einen direkten oder indirekten nachhaltigen und irreversiblen Effekt des Rauchens auf die Konzentration dieses Adhäsionsmoleküls hinweisen. Im Gegensatz zu den anderen Selektinen sowie ICAM-1, deren Expression durch Zytokine wie TNF α , IL-1 oder auch Lipopolysaccharid stark stimuliert wird, wird L-Selektin konstitutiv exprimiert. Ein Wegfall der Entzündungsreize beim Rauchstopp könnte daher den relativ schnellen Rückgang der sICAM-1-, sE-Selektin- und sP-Selektin-Konzentrationen erklären, während dies auf sL-Selektin weniger Einfluss haben sollte. Diese Ergebnisse stimmen teilweise mit den Daten einer großen Kohortenstudie aus den USA, der Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA), überein, welche ebenfalls niedrigere sL-Selektin-Werte bei aktuellen Rauchern zeigen konnte [87]. Allerdings wiesen in der MESA-Studie die Ex-Raucher ähnlich niedrige Spiegel an sL-Selektin wie die aktiven Raucher auf und nicht niedrigere wie in der LURIC-Studie. Dieser Unterschied könnte auf unterschiedliche

Charakteristika der Studienpopulationen zurückzuführen sein. So wurden z.B. in die MESA-Studie Patienten ohne eine Vorgeschichte klinischer kardiovaskulärer Erkrankungen eingeschlossen. Ähnlich wie für sL-Selektin wies in der MESA-Studie auch das sVCAM-1 niedrigere Konzentrationen bei aktiven Rauchern auf. Ältere Studien hinsichtlich der Assoziation des Rauchens mit sVCAM-1 zeigten widersprüchliche Ergebnisse, wobei einige Studien eine höhere Expression bei Rauchern (mit peripherer Arterienerkrankung), einige eine niedrigere Expression und andere überhaupt keinen Unterschied beobachteten [88].

In der LURIC-Studie waren auch bei langjährigen Ex-Rauchern im Vergleich mit den Niemals-Rauchern noch immer leicht erhöhte Konzentrationen der Entzündungsmarker hsCRP und IL-6 zu beobachten. Erhöhte hsCRP-Werte bei aktiven Rauchern wurden bereits in der LURIC-Studie und in anderen Studien gezeigt [89, 90]. Diejenigen Studien, welche die Veränderungen im Laufe der Zeit bei Ex-Rauchern untersuchten, berichten in der Regel keine kurzfristigen Auswirkungen auf das hsCRP, sondern eine anhaltende Erhöhung bis zu 20 Jahre nach dem Rauchstopp [90, 91]. In ähnlicher Weise wurde auch eine persistierende Leukozytose bei Personen gezeigt, die mit dem Rauchen aufgehört hatten [92, 93].

5.2.2 Assoziation zwischen Endothelmarkern und Mortalität

Studien haben Assoziationen zwischen dem Vorhandensein einer koronaren und systemischen endothelialen Dysfunktion und einem erhöhten Risiko für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse und Mortalität gezeigt [94]. Bei kritisch kranken Patienten, die während der Nachbeobachtung verstarben, wurden, im Vergleich zu den Überlebenden, höhere Konzentrationen von sICAM-1 und sVCAM-1 berichtet [95]. Höhere Konzentrationen an sVCAM-1 erwiesen sich in einer Kohorte mit bereits älteren Teilnehmern als Prädiktor für die Mortalität [96]. In der LURIC-Studie waren steigende Konzentrationen von sVCAM-1, sICAM-1 und des von Willebrand-Faktors sowohl bei aktiven Rauchern als auch bei den Niemals-Rauchern mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert. Für sL-Selektin war eine inverse Assoziation mit dem Mortalitätsrisiko zu beobachten, aber nur bei den aktiven Rauchern. Bei der Modellierung von sL-Selektin als *restricted cubic spline* war die Assoziation von sL-Selektin mit der Mortalität ebenfalls nur bei den aktiven Rauchern offensichtlich, wobei das Mortalitätsrisiko mit steigender sL-Selektin-Konzentration bei leichten Rauchern fast linear abnahm und bei starken Rauchern eine leicht gekrümmte Assoziation zu sehen war. Dementsprechend verbesserte das Hinzufügen von sL-Selektin zu einem grundlegenden Risikovorhersagemodell nur für aktive Raucher die Genauigkeit der Risikovorhersage. Studien, welche die Rolle von sL-Selektin als Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen und als Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse untersuchten, haben widersprüchliche Ergebnisse berichtet. In Tiermodellen wurde eine schützende Rolle nachgewiesen [97], und in Übereinstimmung damit wurden bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren [98], KHK [99] und peripherer arterieller Verschlusskrankheit (PAVK) [100] niedrigere Serum-L-Selektin-Spiegel beobachtet. In Studien mit dem Multiple-Sklerose-Medikament Natalizumab wurde bei Patienten mit niedrigen L-Selektin-Spiegeln ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Natalizumab-assoziierten progressiven multifokalen Leukoenzephalopathie festgestellt [101], wobei dieser Zusammenhang in einer anderen Studie aber nicht repliziert werden konnte [102]. Andere Studien hingegen zeigten eine Assoziation von höheren L-Selektin-Spiegeln mit akutem Schlaganfall [103] und instabiler *angina pectoris* [104].

Zusammenfassend fand ich, dass Raucher im Vergleich zu den Niemals-Rauchern Veränderungen in der Konzentration löslicher Zelladhäsionsmoleküle aufweisen, welche unabhängig von möglichen *confoundern* waren. Hohe Konzentrationen von sICAM-1, sVCAM-1 und vWF waren sowohl bei aktiven Rauchern als auch bei Nichtrauchern mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert. Diese Assoziationen blieben nach Adjustierung für kardiovaskuläre Risikofaktoren weitgehend unverändert. Für sL-Selektin wurden bei aktiven Rauchern verminderte Konzentrationen und eine inverse Assoziation mit der Mortalität beobachtet, nicht jedoch bei Nichtrauchern. Bei aktiven Rauchern war sL-Selektin der stärkste Risikoprädiktor, selbst nach Adjustierung für alle anderen Marker der Endothelfunktion. Die Messung von sL-Selektin könnte damit die Vorhersage des kardiovaskulären Risikos in dieser Gruppe von Personen mit bereits hohem kardiovaskulärem Risiko verbessern.

5.3 Auswirkungen des Rauchens auf zirkulierende Leukozyten

5.3.1 Assoziation des Rauchens mit der Leukozytenkonzentration

Zigarettenrauch übt eine doppelte Wirkung auf das Immunsystem aus: die Immunität gegen Infektionen wird geschwächt, wohingegen das Risiko für eine Autoimmunität gefördert wird. Ich habe in der LURIC-Studie mögliche Unterschiede der Konzentrationen von Leukozyten und Leukozytensubgruppen zwischen Studienteilnehmern mit unterschiedlichem Raucherstatus untersucht. Bei aktiven Rauchern beobachtete ich eine erhöhte Anzahl an Gesamtleukozyten, hauptsächlich aufgrund einer erhöhten Anzahl an Monozyten und Neutrophilen Granulozyten. Verschiedene Monozyten-Subtypen, einschließlich CD14/HLADR+, CD11-/CD18+, CD80-/CD58+ und CD31+/CD40+, waren bei den aktiven Rauchern erhöht. Unter den Granulozyten-Subtypen waren CD11+/CD18+, CD80-/CD58- und CD80-/CD58+ bei Rauchern erhöht. Über eine erhöhte Expression von CD18 in Neutrophilen im Sputum von Rauchern, die eine chronische Atemwegsobstruktion entwickelten, wurde bereits berichtet [105]. Der Anstieg der meisten Leukozyten-Subtypen könnte eine chronische Entzündungsreaktion bei aktiven Rauchern widerspiegeln, die sich auch in erhöhten Konzentrationen von hsCRP oder IL-6 zeigt. Im Gegensatz dazu wiesen aktive Raucher eine geringere Anzahl an Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen, CD16+/CD56+) auf. Einige Studien haben über eine Verringerung der NK-Zellen im peripheren Blut von gesunden Rauchern und von Rauchern, welche beruflich organischen Lösungsmitteln ausgesetzt sind, berichtet [106, 107]. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass Zigarettenrauch sowohl die Aktivierung als auch die zytolytische Kapazität humaner NK-Zellen abschwächt und ihr Potenzial zur Abtötung von K562-Krebszellen deutlich beeinträchtigt [108]. Dies kann teilweise durch die Hemmung der antiviralen Wirkung von IFN- γ durch Tabakrauch erklärt werden [109]. Eine Unterdrückung der angeborenen Immunantwort durch Rauchen wurde in einer Reihe von Studien gezeigt [57, 110]. Dafür sprechen auch die bei aktiven Rauchern erniedrigten Konzentrationen von sVCAM-1 und sL-Selektin, welche nach dem Rauchstopp zwar wieder anstiegen, aber auch bei Ex-Rauchern, die vor mehr als 20 Jahren aufgehört hatten zu rauchen, nicht vollständig die Werte von Niemals-Rauchern erreichten. sVCAM-1 und sL-Selektin sind bekanntermaßen essentiell für die Initiierung der angeborenen Immunantwort, und die bei Rauchern beobachteten niedrigeren Spiegel könnten zur Hemmung der angeborenen Immunität beitragen. Eine persistierende Leukozytose wurde bei Personen gezeigt, die mit dem Rauchen aufgehört haben [92, 93]. Interessanterweise kehrten die Werte aller Leukozyten-

Untergruppen parallel zu einer längeren Rauchabstinenz auf ein Niveau zurück, das mit dem der Niemals-Raucher in LURIC vergleichbar war (Abbildung 16).

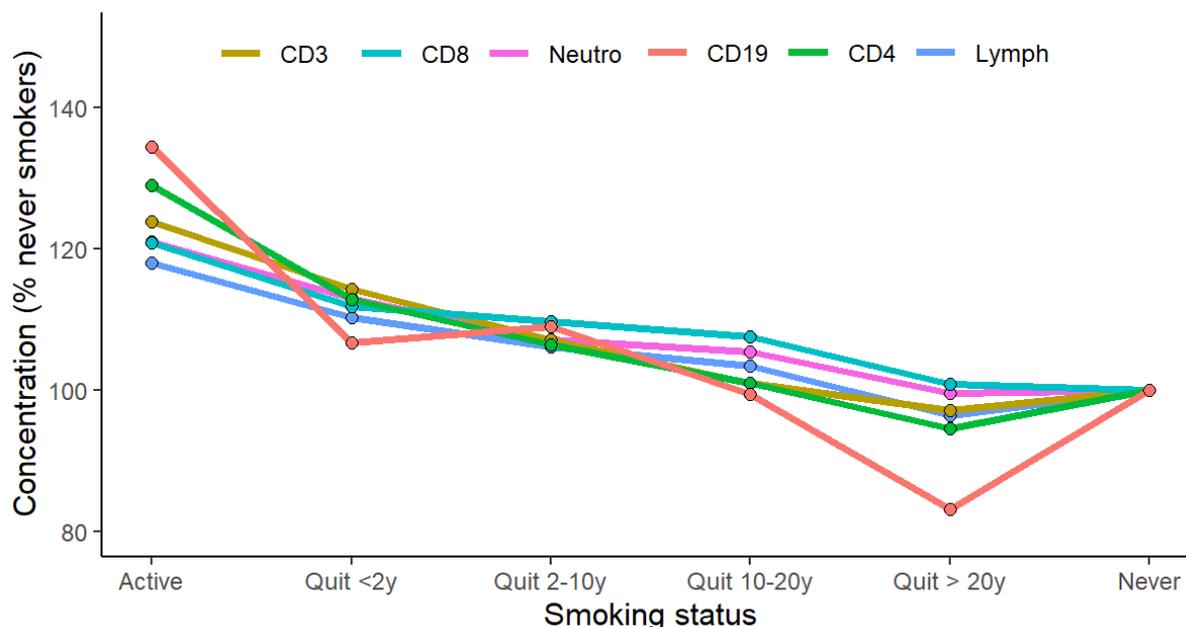


Abbildung 16: Mittelwerte unterschiedlicher Leukozytensubgruppen bei aktiven Rauchern, Ex-Rauchern und Niemals-Rauchern. Die Konzentration bei den Niemals-Rauchern wurde jeweils als 100% definiert.

Die Zellen des adaptiven Immunsystems, T- und B-Zellen, waren bei den Rauchern höher als bei den Nichtrauchern. Die Daten stimmen mit früheren Studien überein, die über höhere Zahlen von CD4- und CD8-T-Zellen im peripheren Blut oder in der bronchoalveolären Lavage berichten [111].

5.3.2 Assoziation zwischen Leukozyten und Mortalität

In einer großen Kohortenstudie konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Assoziation der Leukozytenzahl und spezifischer Leukozytenuntergruppen mit der Mortalität bei aktiven Rauchern stärker war, und es wurde weiter gezeigt, dass die Leukozyten teilweise die Assoziation zwischen dem Rauchen und der Mortalität vermittelten [112].

In der Women's Health Initiative (WHI) wurde dagegen gezeigt, dass die Assoziation der Leukozytenzahl mit der Mortalität unabhängig vom Rauchen ist [113]. Daher habe ich eine Mediationsanalyse in LURIC durchgeführt. Sie zeigte keine Hinweise darauf, dass die Leukozytenzahl die Assoziation von Rauchen und Mortalität in dieser Kohorte vermittelt.

Weiterhin konnte ich eine inverse Assoziation mit dem Mortalitätsrisiko sowohl für die Gesamtlymphozytenzahl als auch für spezifische Lymphozyten-Subtypen bei den Niemals-Rauchern zeigen. Marker der angeborenen Immunität, nämlich die Gesamtzahl der Neutrophilen sowie die CD11b+/CD18+ und CD31+/CD40-

Granulozyten, waren direkt mit der Mortalität assoziiert. CD11b+/CD18+ repräsentiert den Komplementrezeptor 3 (CR3, auch bekannt als Mac-1), einen Scavenger-Rezeptor, der eine Vielzahl verschiedener Liganden binden kann [114]. CR3 bildet eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Er wird in neutrophilen Granula gespeichert und bei Aktivierung der Neutrophilen zur Zellmembran transportiert, was zu einer etwa ~17-fachen Hochregulierung der Expression in der Membran führt [115]. Ich konnte in der LURIC-Studie eine hochsignifikante Hochregulierung von CD11b+/CD18+ Zellen bei aktiven Rauchern beobachten, und die bereits erhöhten Konzentrationen dieser Zellen könnten das Fehlen einer Assoziation mit der Mortalität bei Rauchern erklären.

Ich habe auch den Neutrophilen-zu-Lymphozyten-Ratio (NLR) berechnet, welcher einen einfachen Parameter zur Beurteilung des Entzündungsstatus eines Patienten darstellt. Unter physiologischem Stress erhöht sich die Zahl der Neutrophilen wohingegen sich die Zahl der Lymphozyten verringert. Die Interpretation des NLR hängt vom klinischen Kontext ab. Grob kann man jedoch davon ausgehen, dass ein Wert ≤ 3 normal ist, ein Wert zwischen 6-9 zeigt einen milden Stress an, bei kritisch Kranken ist der NLR oft >9 und kann in Einzelfällen sogar bis zu 100 betragen. Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass der NLR ein starker prognostischer Marker für Patienten mit KHK [116] oder Krebs [117] ist. In der LURIC-Studie war ein erhöhter NLR ein starker Marker für ein erhöhtes Mortalitätsrisiko bei den Niemals-Rauchern. Kürzlich wurde der NLR als starker und unabhängiger Risikoindikator für die Mortalität bei 8715 älteren Personen aus der allgemeinen Bevölkerung in den Niederlanden beschrieben [118].

Raucher sind anfälliger für Infektionen als Nichtraucher, und es wurde eine Vielzahl verschiedener Mechanismen vorgeschlagen, wie Zigarettenrauch die Immunfunktion unterdrücken könnte [57]. Während Zigarettenrauch pathologische Immunreaktionen aggraviert, schwächt er die normale Abwehrfunktion des Immunsystems ab. Nikotin moduliert nachweislich angeborene und adaptive Immunantworten durch Interaktion mit nAChRs auf der Oberfläche von Immunzellen, einschließlich Makrophagen, T- und B-Lymphozyten [60], unterdrückt die Chemokin-induzierte Ca^{2+} -Reaktion in peripheren mononukleären Blutzellen und beeinträchtigt die Leukozytenmigration [61]. Es wurde auch gezeigt, dass chronisches Rauchen eine T-Zell-Anergie induzieren kann, indem es die Antigenrezeptor-vermittelten Signaltransduktionswege beeinträchtigt und zu einer Leerung der Inositol-1,4,5-Trisphosphat-sensitiven Ca^{2+} -Speicher führt [62]. Mäuse allerdings, die mit tödlichen Dosen des Influenza-A-Virus infiziert wurden, überleben länger nach einer Nikotinbehandlung trotz erhöhter Virustiter in der Lunge [63]. Obwohl man in den letzten Jahren viel über die Auswirkungen von Zigarettenrauch auf die Immunfunktion geforscht und gelernt hat, sind die genauen Mechanismen, die der rauchassoziierten Immunpathologie zugrunde liegen, noch immer nicht vollständig geklärt.

Zusammenfassend kann ich sagen, dass die Anzahl an Leukozyten bei aktiven Rauchern erhöht war, was insbesondere auf eine Erhöhung der Neutrophilen Granulozyten und der Monozyten zurückzuführen war. Die Werte glichen sich aber mit zunehmender Zeit nach dem Rauchverzicht wieder denen der Niemals-Raucher an. Zudem konnte ich zeigen, dass die Anzahl der Lymphozyten bei Nichtrauchern invers mit der Mortalität assoziiert war, nicht aber bei aktiven Rauchern. Marker der angeborenen Immunität, die Gesamtzahl der Neutrophilen Granulozyten und der

CD11b+/CD18+ und CD31+/CD40- Granulozyten, waren direkt mit der Mortalität assoziiert.

5.4 Auswirkungen des Rauchens auf das DNA-Methylierungsprofil der Leukozyten

Der Tabakkonsum stellt ein langfristiges Krankheitsrisiko dar, auch noch Jahrzehnte nach einer Raucherentwöhnung, und die Ursachen dieser persistierenden Risikoerhöhung sind noch nicht vollständig verstanden. Ein Mechanismus, der diskutiert wird, sind langanhaltende, durch das Rauchen induzierte Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters [68]. Auch durch das Rauchen einer werdenden Mutter kann der Methylierungsgrad bestimmter CpGs beeinflusst werden [119]. In einer Studie wurden CD4+ Zellen aus Nabelschnurblut von 10 Kindern, deren Mütter geraucht hatten, und von 10 Kindern nichtrauchender Mütter verglichen [120]. Mehr als 10.000 CpGs zeigten dabei unterschiedliche Methylierungsmuster aufgrund des Rauchverhaltens der Mutter.

Studien haben eine Reihe von epigenetischen Veränderungen, darunter auch Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters, im Hinblick auf inflammatorische Prozesse beschrieben [121]. So konnten Ergebnisse aus einer Meta-Analyse von EWAS zu Serum-CRP zeigen, dass eine erhöhte DNA-Methylierung an cg10636246 (in der Nähe von *absent in melanoma 2 (AIM2)*, welches an der Inflammation-Antwort beteiligt ist) mit niedrigerer Expression von AIM2 und niedrigeren CRP-Werten assoziiert war. Eine Hypomethylierung an den CpGs cg18181703 (Suppressor der Zytokin-Signalisierung 3, *SOCS3*), cg06126421 (Tubulin beta, *TUBB*), und cg05575921 (Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor-Repressor, *AHRR*) war assoziiert mit höheren CRP-Werten und einem erhöhten Risiko für zukünftige KHK [122]. Eine Hypomethylierung des AHRR ist wiederum das signifikanteste Signal in EWAS zu dem Effekt des Rauchens auf die DNA-Methylierung [119].

Eine offene Frage ist, ob Veränderungen in der DNA-Methylierung eine Ursache oder eine Folge der durch Zigarettenrauch induzierten inflammatorischen Prozesse sind. In einer Studie mit Patienten mit Morbus Crohn wurde eine Korrelation der DNA-Methylierungsmuster mit der akuten Entzündung festgestellt [123]. Durch die Behandlung glichen sich diese Methylierungsmuster allerdings denen gesunder Probanden an, sodass die DNA-Methylierungsmuster, die mit entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert sind, vermutlich eher eine Folge der entzündlichen Merkmale der Erkrankung darstellen und keine Ursache [123].

In dieser Arbeit wurden 1071 CpGs identifiziert, welche nach Bonferroni-Holm-Korrektur signifikant unterschiedliche Methylierungsgrade aufwiesen im Vergleich der aktiven Raucher mit den Niemals-Rauchern. Die signifikantesten Loci in der Nähe der Gene *AHRR*, *ALPPL2* (in früheren Publikationen als Region 2q37.1 beschrieben), *F2RL3*, *RARA*, *PRSS23* und *IER3*, wurden bereits in früheren EWAS mit dem Rauchen in Verbindung gebracht [68, 124-126] und konnten in der internen Validierung anhand der zweiten Methylierungsmessung bestätigt werden.

Das *AHRR*-Gen² kodiert einen Repressor für den Arylhydrocarbonrezeptor (AHR), welcher eine Rolle bei der Dioxintoxizität und bei der Regulation von Zellwachstum

² Allgemeine Informationen über die beschriebenen Gene wurden der Internetseite www.genecards.org entnommen

und Zelldifferenzierung spielt. Der AHR wird sowohl durch exogene als auch durch endogene Liganden aktiviert und transloziert in den Nukleus, wo er einen Komplex mit AHR nuclear translocator (ARNT) bildet und über die Bindung an Dioxin-Response-Elemente die Transkription von Genen aktiviert, eines der wichtigsten *CYP1A1* [127]. Durch seine Eigenschaft als Sensor für Umweltreize spielt er eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Homöostase u.a. im Darm und ist dort ein bedeutender Regulator des Immunsystems [127]. Die Hypomethylierung an der Stelle cg05575921 im *AHRR*-Gen, welche auch in der vorliegenden EWAS die signifikanteste CpG war, wurde auch bereits mit durch das Rauchen bedingter Morbidität und Mortalität assoziiert [128].

Das *ALPPL2*-Gen (alias ALPG: *alkaline phosphatase, germ cell*) kodiert für eine membrangebundene Alkalische Phosphatase, welche in Testis, Thymus und bestimmten Keimzelltumoren lokalisiert ist. Es wurde bereits mit Krebs assoziiert [129]. Der F2R Like Thrombin Or Trypsin Receptor 3 (*F2RL3*) wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert mit der höchsten Expression in Lungen, Pankreas, Schilddrüse, Testes, Dünndarm und Blutplättchen und könnte eine Rolle bei der Plättchenaktivierung spielen. Die Hypomethylierung an diesem Locus wurde ebenfalls bereits mit Morbidität und Mortalität in Verbindung gebracht [127].

Die Serineprotease 23, kodiert vom *PRSS23*-Gen, wird besonders stark in der Gallen- und der Harnblase exprimiert und auch für dieses Gen wurde eine Verbindung zur Krebsentstehung gezeigt [128].

Das *RARA*-Gen kodiert für den retinoic acid receptor alpha, ein Transkriptionsfaktor, welcher mit der Regulation von Entwicklung, Differenzierung, Apoptose, Granulopoese und der Transkription von clock genes in Verbindung gebracht wird. *IER3* (immediate early response 3) schützt Zellen vor einer Fas- oder TNFalpha-induzierten Apoptose. *TSHZ1* (Teashirt Zinc Finger Homeobox 1), auch bekannt als Serologically Defined Colon Cancer Antigen 33, gehört zur Familie der Zink-Finger-Proteine vom Typ Teashirt C2H2 und ist möglicherweise an der Transkriptionsregulation von Entwicklungsprozessen beteiligt. Das Produkt des *ETV6*-Gens (ETS Variant Transcription Factor 6), auch bekannt als EL1 Onkogen, wirkt als starker transkriptioneller Repressor in unterschiedlichen biologischen Prozessen, u.a. Zellwachstum und Zelldifferenzierung [130]. Darüberhinaus wirkt es als Aktivator des ETS-related gene (ERG), welches einen bedeutenden Regulator der Hämatopoese darstellt und stark exprimiert wird bei Leukämie. *ETV6* wird mit unterschiedlichen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht und spielt eine Rolle bei der Tumorangiogenese [131]. *RPAP2* (RNA Polymerase II Associated Protein 2) ist beteiligt an der Dephosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II und der snRNA-Transkription. Es wird postuliert, dass es durch seine Bindung an die RNA-Polymerase die Bildung des Präinitiationskomplexes und damit den Start der Transkription inhibiert [132]. Für *ELMSAN1*, auch bekannt als Mitotic Deacetylase Associated SANT Domain Protein (MIDEAS), wird eine Rolle bei der Histondeacetylierung und bei der Regulierung der Transkription durch die RNA-Polymerase II postuliert. *MGAT3* (Beta-1,4-Manosyl-glycoprotein-4-beta-N-acetylglukosaminyltransferase) ist eines der wichtigsten Enzyme bei der Biosynthese der Glycoprotein-Oligosaccharide und wurde schon mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht, so z.B. Pancreaskarzinom [133], Ovarialkarzinom [134] oder Mammakarzinom [135]. Für den Locus *LOC101060019* wurde keine Information gefunden.

Für alle Genloci war eine Hypomethylierung bei den aktiven Rauchern im Vergleich zu den Niemals-Rauchern zu beobachten. Bei einigen Loci war auch eine kontinuierliche Abnahme des Methylierungsgrades ausgehend von den Niemals-Rauchern über die

Ex-Raucher bis zu den aktiven Rauchern zu beobachten. Auch bei den Ex-Rauchern, die bereits vor mehr als 10 Jahren mit dem Rauchen aufgehört hatten, war der Methylierungsgrad hier noch deutlich (*PRSS23*, *AHRR*, *ALPPL2*) oder zumindest tendenziell (*F2RL3*, *RARA*, *IER3*) niedriger verglichen mit den Studienteilnehmern, welche niemals geraucht haben.

Die Existenz dieser langanhaltenden Änderungen im Methylierungsstatus von Leukozyten wurde auch bereits in ein paar Studien festgestellt. So klassifizierten Guida et al. zwischen Rauchern und Nichtrauchern differenziell methylierte CpG in zwei Gruppen: bei der ersten Gruppe „normalisierte“ sich der Methylierungsgrad nach dem Rauchverzicht (Spanne von 0-35 Jahre) und erreichte wieder vergleichbare Werte wie bei Niemals-Rauchern während der Methylierungsgrad der CpGs in der zweiten Gruppe auch mehr als 35 Jahre nach der Rauchabstinenz noch verändert blieb [125]. Die Autoren postulierten, dass sich dieser Unterschied zumindest im Wesentlichen durch das Ausmaß der durch das Rauchen induzierten Veränderung der Methylierung erklären lässt. Bei denjenigen CpGs, bei denen durch das Rauchen die größten Veränderungen in der Methylierung beobachtet wurden, blieben diese Veränderungen auch länger erhalten als bei CpGs, bei denen die Veränderung geringer gewesen war. Mittlerweile wurde DNA-Methylierungsmessung von unterschiedlichen Arbeitsgruppen dazu verwendet, das Rauchverhalten von Personen verlässlicher zu bestimmen als z.B. die Messung von Nikotin oder Cotinin [136].

5.5 Genomweite Assoziationsstudien der Phänotypen Cotinin und Rauchstatus

In einer GWAS-Analyse des Nikotinmetaboliten Cotinin bei aktiven Rauchern konnten drei SNPs identifiziert werden, welche genomweit signifikant mit dem Phänotyp assoziiert waren. Die Cotinin-erhöhenden Allele aller drei SNPs waren selten und sie sind nicht im GWAS-Katalog hinsichtlich einer Assoziation mit Cotinin verzeichnet. Die SNPs sind in der Nähe der Gene *CTAGE11P*, *LRRTM4* und *TTC8* lokalisiert, ein weiterer SNP auf Chromosom 8 nahe des *RUNX1T1*-Gens erreicht fast genomweite Signifikanz. Bei *CTAGE11P* handelt es sich um ein Pseudogen ohne bekannte Funktion. *LRRTM4* (Leucine Rich Repeat Transmembrane Neuronal 4) wird mit Protein-Protein-Interaktionen an Synapsen sowie der Signalübertragung an chemischen Synapsen in Verbindung gebracht. *TTC8* (Tetratricopeptide Repeat Domain 8) ist mit Retinitis Pigmentosa 51 und Bardet-Biedl-Syndrom assoziiert und wird u.a. mit Organellenbiogenese in Verbindung gebracht. *RUNX1T1* (RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor 1) wird u.a. mit NF-kappaB Signaling assoziiert. Keines dieser Gene wurde in bislang publizierten Studien mit gemessenem Cotinin in Verbindung gebracht. Umgekehrt konnte in meiner GWAS keines der bislang beschriebenen Gene, auch nicht *CYP2A6*, signifikant mit Cotinin assoziiert werden. Ich schliesse daraus, dass die Fallzahl an aktiven Rauchern in LURIC für diese Analyse wohl zu niedrig war und nachgewiesenen Loci falsch positiv sein könnten. Aus diesem Grund habe ich diese SNPs nicht für weitere Auswertungen verwendet. Auch hinsichtlich des Vergleichs der aktiven Raucher mit den Niemals-Rauchern konnte ich keine signifikante Assoziation nachweisen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Rauchen ist einer der wichtigsten vermeidbaren Risikofaktoren für Morbidität und Mortalität weltweit. Der Konsum von Tabak ist dabei mit einer Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen assoziiert, u.a. der Entstehung von Atherosklerose. Zigarettenrauchen ist assoziiert mit vaskulärer Entzündung und beschleunigt dabei insbesondere die Atherosklerose in den Koronararterien, der Aorta, der Carotiden und den großen Arterien des peripheren Kreislaufs. Maßgebliche Mechanismen sind der oxidative Stress und Entzündungsprozesse. Am Anfang der Atherosklerose steht der Funktionsverlust des Endothels und das Rauchen stellt einen wichtigen Risikofaktor für die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion dar.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Raucher im Vergleich zu den Teilnehmern die niemals geraucht hatten (Niemals-Raucher) Veränderungen in der Konzentration löslicher Zelladhäsionsmoleküle aufwiesen, welche unabhängig von möglichen *confoundern* waren. Hohe Konzentrationen von den Adhäsionsmolekülen sICAM-1, sVCAM-1 und vWF waren sowohl bei aktiven Rauchern als auch bei Niemals-Rauchern mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert. Für sL-Selektin konnte beobachtet werden, dass aktive Raucher verminderte Konzentrationen aufwiesen und eine inverse Assoziation mit der Mortalität vorlag, nicht jedoch bei Niemals-Rauchern. Bei aktiven Rauchern war sL-Selektin der stärkste Risikoprädiktor und konnte die Vorhersage des kardiovaskulären Risikos in dieser Gruppe von Personen mit bereits hohem kardiovaskulärem Risiko verbessern. Während andere Marker wie sICAM-1 mit längerer Zeit seit dem Rauchstopp in etwa das gleiche Niveau erreichten wie bei den Niemals-Rauchern blieb die Konzentration des sL-Selektins erniedrigt. sVCAM-1 und sL-Selektin sind essentiell für die Aktivierung der angeborenen Immunantwort und entsprechend wiesen aktive Raucher eine geringere Anzahl an Natürlichen Killerzellen auf. Die Gesamtleukozytenzahl war bei aktiven Rauchern dagegen deutlich erhöht, hauptsächlich aufgrund einer erhöhten Anzahl an Monozyten und Neutrophilen, jedoch war auch die Anzahl der Zellen des adaptiven Immunsystems (T- und B-Zellen) bei den Rauchern höher als bei den Nichtrauchern. Hinsichtlich des Mortalitätsrisikos waren Neutrophile Granulozyten direkt und Lymphozyten invers assoziiert, jedoch nur bei den Niemals-Rauchern und nicht bei den Rauchern. Insbesondere ein erhöhter Neutrophilen-zu-Lymphozyten Ratio (NLR) war in der LURIC-Kohorte ein starker Marker für ein erhöhtes Mortalitätsrisiko, jedoch ebenfalls nur bei den Niemals-Rauchern. Mögliche Gründe für diesen Unterschied könnten die bei Rauchern bereits erhöhten Leukozytenwerte sein, die dadurch keine prognostische Aussagekraft mehr aufweisen, oder direkte immunmodulatorische Effekte des Tabakkonsums.

Verschiedene Studien haben eine persistierende Leukozytose bei Personen gezeigt, die mit dem Rauchen aufgehört haben. In der LURIC-Studie kehrten die Werte aller Leukozyten-Untergruppen parallel zu einer längeren Rauchabstinenz auf ein Niveau zurück, welches mit dem der Niemals-Raucher vergleichbar war. Es wird diskutiert, dass die langanhaltende Wirkung des Rauchens zumindest teilweise auf Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters zurückgeführt werden kann. In meiner Analyse fand ich 1071 CpGs, welche nach Bonferroni-Holm-Korrektur signifikant unterschiedliche Methylierungsgrade aufwiesen im Vergleich der aktiven Raucher mit den Niemals-Rauchern. Die signifikantesten Loci waren dabei in der Nähe von Genen lokalisiert, welche u.a. mit der Regulation von Zellzyklus und Apoptose assoziiert sind und damit auch mit der Entstehung von Krebs. Für alle Genloci war eine Abnahme des Methylierungsgrades ausgehend von den Niemals-Rauchern über die

Ex-Raucher bis zu den aktiven Rauchern zu beobachten. Auch bei den Ex-Rauchern, die bereits vor mehr als 20 Jahren mit dem Rauchen aufgehört hatten, war der Methylierungsgrad noch niedriger verglichen mit den Studienteilnehmern, welche niemals geraucht hatten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Rauchen mit unterschiedlichen kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert ist und deren Assoziation mit der Mortalität beeinflusst. Veränderungen in den Markerprofilen sind teilweise langhaltend und Jahre nach dem Rauchverzicht noch unterschiedlich im Vergleich zu Teilnehmern, welche niemals geraucht hatten. Eine mögliche Erklärung für die persistierenden Effekte könnte eine Veränderung des Methylierungsmusters sein. Eine solche Veränderung, Hypomethylierung bei der Mehrzahl der Loci, war teilweise auch bei langjährigen Ex-Rauchern noch zu beobachten.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Collaborators, G.B.D.T., *Spatial, temporal, and demographic patterns in prevalence of smoking tobacco use and attributable disease burden in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019*. Lancet, 2021. **397**(10292): p. 2337-2360.
2. DESTATIS. *Rauchgewohnheiten nach Altersgruppen und Geschlecht*. 2019 [cited 2019 20.11.]; Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Gesundheitszustand-Relevantes-Verhalten/Tabellen/liste-rauchverhalten.html>.
3. DESTATIS. *Rauchgewohnheiten nach Altersgruppen und Geschlecht*. 2023 [cited 2023 26.04.]; Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Gesundheitszustand-Relevantes-Verhalten/Tabellen/rauchverhalten-insgesamt.html>.
4. IHME. 2019 [cited 2019 20.11.]; Available from: <http://www.healthdata.org/germany>.
5. Collaborators, G.B.D.R.F., *Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017*. Lancet, 2018. **392**(10159): p. 1923-1994.
6. *Die Kosten des Rauchens in Deutschland*. Aus der Wissenschaft – für die Politik, 2015.
7. Farcher, R., et al., *Burden of smoking on disease-specific mortality, DALYs, costs: the case of a high-income European country*. BMC Public Health, 2023. **23**(1): p. 698.
8. Musk, A.W. and N.H. de Klerk, *History of tobacco and health*. Respirology, 2003. **8**(3): p. 286-90.
9. Duke, D., et al., *Earliest evidence for human use of tobacco in the Pleistocene Americas*. Nat Hum Behav, 2022. **6**(2): p. 183-192.
10. KO, H. and G. D., *Tabakabhängigkeit - Gesundheitliche Schäden durch das Rauchen*. 2. Auflage ed. 2008, Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
11. Jeffers, H.P. and K. Gordon, *Good Cigar : A Celebration of the Art of Cigar Smoking*. 2002: The Lyons Press.
12. Hukkanen, J., P. Jacob, 3rd, and N.L. Benowitz, *Metabolism and disposition kinetics of nicotine*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(1): p. 79-115.
13. Connolly, G.N., et al., *Trends in nicotine yield in smoke and its relationship with design characteristics among popular US cigarette brands, 1997-2005*. Tob Control, 2007. **16**(5): p. e5.
14. DKFZ. *Nikotin. Pharmakologische Wirkung und Entstehung der Abhängigkeit*. 2008 [cited 2022; Available from: https://www.dkfz.de/de/rauchertelefon/download/FzR_Nikotin.pdf.
15. Dani, J.A., D. Ji, and F.M. Zhou, *Synaptic plasticity and nicotine addiction*. Neuron, 2001. **31**(3): p. 349-52.
16. Slade, J., et al., *Nicotine and addiction. The Brown and Williamson documents*. JAMA, 1995. **274**(3): p. 225-33.
17. Hausteil, K.-O., *Tabakabhängigkeit*. 2008: Springer, Berlin, Heidelberg.

18. Clarke, P.B., *Dopaminergic mechanisms in the locomotor stimulant effects of nicotine*. *Biochem Pharmacol*, 1990. **40**(7): p. 1427-32.
19. Corrigan, W.A., et al., *The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1992. **107**(2-3): p. 285-9.
20. Wise, R.A. and M.A. Bozarth, *A psychomotor stimulant theory of addiction*. *Psychol Rev*, 1987. **94**(4): p. 469-92.
21. Benwell, M.E. and D.J. Balfour, *Effects of nicotine administration and its withdrawal on plasma corticosterone and brain 5-hydroxyindoles*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1979. **63**(1): p. 7-11.
22. Benwell, M.E., D.J. Balfour, and J.M. Anderson, *Smoking-associated changes in the serotonergic systems of discrete regions of human brain*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1990. **102**(1): p. 68-72.
23. Graeff, F.G., et al., *Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996. **54**(1): p. 129-41.
24. Costall, B., et al., *The actions of nicotine and cocaine in a mouse model of anxiety*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1989. **33**(1): p. 197-203.
25. Breslau, N., M.M. Kilbey, and P. Andreski, *Nicotine dependence and major depression. New evidence from a prospective investigation*. *Arch Gen Psychiatry*, 1993. **50**(1): p. 31-5.
26. Benowitz, N.L., *Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure*. *Epidemiol Rev*, 1996. **18**(2): p. 188-204.
27. Bailey, S.L., S.T. Ennett, and C.L. Ringwalt, *Potential mediators, moderators, or independent effects in the relationship between parents' former and current cigarette use and their children's cigarette use*. *Addict Behav*, 1993. **18**(6): p. 601-21.
28. Hannah, M.C., J.L. Hopper, and J.D. Mathews, *Twin concordance for a binary trait. II. Nested analysis of ever-smoking and ex-smoking traits and unnested analysis of a "committed-smoking" trait*. *Am J Hum Genet*, 1985. **37**(1): p. 153-65.
29. Heath, A.C., et al., *Personality and the inheritance of smoking behavior: a genetic perspective*. *Behav Genet*, 1995. **25**(2): p. 103-17.
30. Tyndale, R.F. and E.M. Sellers, *Variable CYP2A6-mediated nicotine metabolism alters smoking behavior and risk*. *Drug Metab Dispos*, 2001. **29**(4 Pt 2): p. 548-52.
31. Reuter, M. and J. Hennig, *Pleiotropic effect of the TPH A779C polymorphism on nicotine dependence and personality*. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2005. **134B**(1): p. 20-4.
32. Anney, R.J., et al., *Nicotine dependence in a prospective population-based study of adolescents: the protective role of a functional tyrosine hydroxylase polymorphism*. *Pharmacogenetics*, 2004. **14**(2): p. 73-81.
33. National Center for Chronic Disease, P., S. Health Promotion Office on, and Health, *Reports of the Surgeon General, in The Health Consequences of Smoking-50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General*. 2014, Centers for Disease Control and Prevention (US): Atlanta (GA).
34. Kopp, W., *Pathogenesis of (smoking-related) non-communicable diseases-Evidence for a common underlying pathophysiological pattern*. *Front Physiol*, 2022. **13**: p. 1037750.
35. Sharma, R. and B. Rakshit, *Global burden of cancers attributable to tobacco smoking, 1990-2019: an ecological study*. *EPMA J*, 2023. **14**(1): p. 167-182.

36. Klein, A.P., K. Yarbrough, and J.W. Cole, *Stroke, Smoking and Vaping: The No-Good, the Bad and the Ugly*. Ann Public Health Res, 2021. **8**(1).
37. Pipe, A.L. and H. Mir, *E-Cigarettes Reexamined: Product Toxicity*. Can J Cardiol, 2022. **38**(9): p. 1395-1405.
38. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
39. Whitehead, A.K., A.P. Erwin, and X. Yue, *Nicotine and vascular dysfunction*. Acta Physiol (Oxf), 2021. **231**(4): p. e13631.
40. Nabavizadeh, P., et al., *Impairment of Endothelial Function by Cigarette Smoke Is Not Caused by a Specific Smoke Constituent, but by Vagal Input From the Airway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2022. **42**(11): p. 1324-1332.
41. Bruggmann, D., et al., *Rat arteries contain multiple nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits*. Life Sci, 2003. **72**(18-19): p. 2095-9.
42. Barbera, J.A., et al., *Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arteries of smokers*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(4): p. 709-13.
43. Horinouchi, T., et al., *Cigarette Smoke Extract and Its Cytotoxic Factor Acrolein Inhibit Nitric Oxide Production in Human Vascular Endothelial Cells*. Biol Pharm Bull, 2020. **43**(11): p. 1804-1809.
44. Haak, T., et al., *Elevated endothelin-1 levels after cigarette smoking*. Metabolism, 1994. **43**(3): p. 267-9.
45. Milara, J., et al., *Bosentan inhibits cigarette smoke-induced endothelin receptor expression in pulmonary arteries*. Eur Respir J, 2012. **39**(4): p. 927-38.
46. Lee, W.O. and S.M. Wright, *Production of endothelin by cultured human endothelial cells following exposure to nicotine or caffeine*. Metabolism, 1999. **48**(7): p. 845-8.
47. Garton, K.J., P.J. Gough, and E.W. Raines, *Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(6): p. 1105-16.
48. Gearing, A.J. and W. Newman, *Circulating adhesion molecules in disease*. Immunol Today, 1993. **14**(10): p. 506-12.
49. Swirski, F.K. and M. Nahrendorf, *Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure*. Science, 2013. **339**(6116): p. 161-6.
50. Bergmann, S., et al., *Even moderate cigarette smoking influences the pattern of circulating monocytes and the concentration of sICAM-1*. Respir Physiol, 1998. **114**(3): p. 269-75.
51. Halvorsen, B., et al., *Effect of smoking cessation on markers of inflammation and endothelial cell activation among individuals with high risk for cardiovascular disease*. Scand J Clin Lab Invest, 2007. **67**(6): p. 604-11.
52. Scott, D.A., et al., *Dramatic decline in circulating intercellular adhesion molecule-1 concentration on quitting tobacco smoking*. Blood Cells Mol Dis, 2000. **26**(3): p. 255-8.
53. Cavusoglu, Y., et al., *Cigarette smoking increases plasma concentrations of vascular cell adhesion molecule-1 in patients with coronary artery disease*. Angiology, 2004. **55**(4): p. 397-402.
54. Tollerud, D.J., et al., *The effects of cigarette smoking on T cell subsets. A population-based survey of healthy caucasians*. Am Rev Respir Dis, 1989. **139**(6): p. 1446-51.
55. Mili, F., et al., *The associations of race, cigarette smoking, and smoking cessation to measures of the immune system in middle-aged men*. Clin Immunol Immunopathol, 1991. **59**(2): p. 187-200.

56. Ferson, M., et al., *Low natural killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects*. *Int J Cancer*, 1979. **23**(5): p. 603-9.
57. Qiu, F., et al., *Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down?* *Oncotarget*, 2017. **8**(1): p. 268-284.
58. Lugg, S.T., et al., *Cigarette smoke exposure and alveolar macrophages: mechanisms for lung disease*. *Thorax*, 2022. **77**(1): p. 94-101.
59. Lacoma, A., et al., *Cigarette smoke exposure redirects Staphylococcus aureus to a virulence profile associated with persistent infection*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 10798.
60. Cloez-Tayarani, I. and J.P. Changeux, *Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(3): p. 599-606.
61. Razani-Boroujerdi, S., et al., *Chronic nicotine inhibits inflammation and promotes influenza infection*. *Cell Immunol*, 2004. **230**(1): p. 1-9.
62. Kalra, R., et al., *Effects of cigarette smoke on immune response: chronic exposure to cigarette smoke impairs antigen-mediated signaling in T cells and depletes IP3-sensitive Ca(2+) stores*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000. **293**(1): p. 166-71.
63. Sopori, M.L., et al., *Nicotine-induced modulation of T Cell function. Implications for inflammation and infection*. *Adv Exp Med Biol*, 1998. **437**: p. 279-89.
64. Noble, D., *Conrad Waddington and the origin of epigenetics*. *J Exp Biol*, 2015. **218**(Pt 6): p. 816-8.
65. Mittelstaedt, N.N., et al., *DNA Methylation and Immune Memory Response*. *Cells*, 2021. **10**(11).
66. Law, J.A. and S.E. Jacobsen, *Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals*. *Nat Rev Genet*, 2010. **11**(3): p. 204-20.
67. Zeilinger, S., et al., *Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e63812.
68. Joehanes, R., et al., *Epigenetic Signatures of Cigarette Smoking*. *Circ Cardiovasc Genet*, 2016. **9**(5): p. 436-447.
69. Philibert, R.A., et al., *Changes in DNA methylation at the aryl hydrocarbon receptor repressor may be a new biomarker for smoking*. *Clin Epigenetics*, 2013. **5**(1): p. 19.
70. Gao, X., et al., *DNA methylation changes of whole blood cells in response to active smoking exposure in adults: a systematic review of DNA methylation studies*. *Clin Epigenetics*, 2015. **7**: p. 113.
71. Philibert, R., et al., *Reversion of AHRR Demethylation Is a Quantitative Biomarker of Smoking Cessation*. *Front Psychiatry*, 2016. **7**: p. 55.
72. Winkelmann, B.R., et al., *Rationale and design of the LURIC study--a resource for functional genomics, pharmacogenomics and long-term prognosis of cardiovascular disease*. *Pharmacogenomics*, 2001. **2**(1 Suppl 1): p. S1-73.
73. Lehne, B., et al., *A coherent approach for analysis of the Illumina HumanMethylation450 BeadChip improves data quality and performance in epigenome-wide association studies*. *Genome Biol*, 2015. **16**(1): p. 37.
74. Kim, S., *Overview of Cotinine Cutoff Values for Smoking Status Classification*. *Int J Environ Res Public Health*, 2016. **13**(12): p. 1236.
75. Kannel, W.B., D. McGee, and T. Gordon, *A general cardiovascular risk profile: the Framingham Study*. *Am J Cardiol*, 1976. **38**(1): p. 46-51.

76. McBride, P.E., *The health consequences of smoking. Cardiovascular diseases.* Med Clin North Am, 1992. **76**(2): p. 333-53.
77. Kilaru, S., et al., *Nicotine: a review of its role in atherosclerosis.* J Am Coll Surg, 2001. **193**(5): p. 538-46.
78. Centner, A.M., P.G. Bhide, and G. Salazar, *Nicotine in Senescence and Atherosclerosis.* Cells, 2020. **9**(4).
79. Olivera, D.S., et al., *Cellular mechanisms of mainstream cigarette smoke-induced lung epithelial tight junction permeability changes in vitro.* Inhal Toxicol, 2007. **19**(1): p. 13-22.
80. Munzel, T., et al., *Effects of tobacco cigarettes, e-cigarettes, and waterpipe smoking on endothelial function and clinical outcomes.* Eur Heart J, 2020. **41**(41): p. 4057-4070.
81. Tsai, J.S., et al., *Changes of serum adiponectin and soluble intercellular adhesion molecule-1 concentrations after smoking cessation.* Clin Chem Lab Med, 2012. **50**(6): p. 1063-9.
82. Palmer, R.M., et al., *Effect of nicotine replacement and quitting smoking on circulating adhesion molecule profiles (sICAM-1, sCD44v5, sCD44v6).* Eur J Clin Invest, 2002. **32**(11): p. 852-7.
83. Xue, C., et al., *Effects of Smoking Cessation with Nicotine Replacement Therapy on Vascular Endothelial Function, Arterial Stiffness, and Inflammation Response in Healthy Smokers.* Angiology, 2019. **70**(8): p. 719-725.
84. Spencer, C.G., et al., *Von Willebrand factor, soluble P-selectin, and target organ damage in hypertension: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT).* Hypertension, 2002. **40**(1): p. 61-6.
85. Takeuchi, N., et al., *The effect of cigarette smoking on soluble adhesion molecules in middle-aged patients with Type 2 diabetes mellitus.* Diabet Med, 2002. **19**(1): p. 57-64.
86. Roldan, V., et al., *Soluble E-selectin in cardiovascular disease and its risk factors. A review of the literature.* Thromb Haemost, 2003. **90**(6): p. 1007-20.
87. Berardi, C., et al., *Plasma and serum L-selectin and clinical and subclinical cardiovascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA).* Transl Res, 2014. **163**(6): p. 585-92.
88. Scott, D.A. and R.M. Palmer, *The influence of tobacco smoking on adhesion molecule profiles.* Tob Induc Dis, 2002. **1**(1): p. 7-25.
89. Kleber, M.E., et al., *C-reactive protein and lipoprotein-associated phospholipase A2 in smokers and nonsmokers of the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study.* Adv Exp Med Biol, 2015. **832**: p. 15-23.
90. Wannamethee, S.G., et al., *Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease.* Eur Heart J, 2005. **26**(17): p. 1765-73.
91. Gallus, S., et al., *Effect of Tobacco Smoking Cessation on C-Reactive Protein Levels in A Cohort of Low-Dose Computed Tomography Screening Participants.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 12908.
92. Kawada, T., *Smoking-induced leukocytosis can persist after cessation of smoking.* Arch Med Res, 2004. **35**(3): p. 246-50.
93. Pedersen, K.M., et al., *Smoking and Increased White and Red Blood Cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019. **39**(5): p. 965-977.
94. Bonetti, P.O., L.O. Lerman, and A. Lerman, *Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(2): p. 168-75.

95. Boldt, J., et al., *Do plasma levels of circulating soluble adhesion molecules differ between surviving and nonsurviving critically ill patients?* Chest, 1995. **107**(3): p. 787-92.
96. Tchalla, A., et al., *High levels of an endothelial dysfunction marker (sVCAM-1) are associated with injurious and recurrent falls and mortality over a 5-year interval in an older population.* Exp Gerontol, 2018. **106**: p. 1-7.
97. Rozenberg, I., et al., *Deletion of L-selectin increases atherosclerosis development in ApoE^{-/-} mice.* PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21675.
98. Fassbender, K., et al., *Circulating selectin- and immunoglobulin-type adhesion molecules in acute ischemic stroke.* Stroke, 1995. **26**(8): p. 1361-4.
99. Albertini, J.P., et al., *Soluble L-selectin level is a marker for coronary artery disease in type 2 diabetic patients.* Diabetes Care, 1999. **22**(12): p. 2044-8.
100. Patiar, S., et al., *Smoking causes a dose-dependent increase in granulocyte-bound L-selectin.* Thromb Res, 2002. **106**(1): p. 1-6.
101. Schwab, N., et al., *L-selectin is a possible biomarker for individual PML risk in natalizumab-treated MS patients.* Neurology, 2013. **81**(10): p. 865-71.
102. Lieberman, L.A., et al., *CD62L is not a reliable biomarker for predicting PML risk in natalizumab-treated R-MS patients.* Neurology, 2016. **86**(4): p. 375-81.
103. Wei, Y.S., et al., *The association of L-selectin polymorphisms with L-selectin serum levels and risk of ischemic stroke.* J Thromb Thrombolysis, 2011. **32**(1): p. 110-5.
104. Siminiak, T., et al., *Increased release of the soluble form of the adhesion molecules L-selectin and ICAM-1 but not E-selectin during attacks of angina pectoris.* Heart Vessels, 1998. **13**(4): p. 189-94.
105. Maestrelli, P., et al., *Integrin upregulation on sputum neutrophils in smokers with chronic airway obstruction.* Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(5): p. 1296-300.
106. Moszczynski, P., J. Rutowski, and S. Slowinski, *The effect of cigarettes smoking on the blood counts of T and NK cells in subjects with occupational exposure to organic solvents.* Cent Eur J Public Health, 1996. **4**(3): p. 164-8.
107. Tollerud, D.J., et al., *Association of cigarette smoking with decreased numbers of circulating natural killer cells.* Am Rev Respir Dis, 1989. **139**(1): p. 194-8.
108. Mian, M.F., et al., *Exposure to cigarette smoke suppresses IL-15 generation and its regulatory NK cell functions in poly I:C-augmented human PBMCs.* Mol Immunol, 2009. **46**(15): p. 3108-16.
109. Modestou, M.A., et al., *Inhibition of IFN-gamma-dependent antiviral airway epithelial defense by cigarette smoke.* Respir Res, 2010. **11**(1): p. 64.
110. Mehta, H., K. Nazzal, and R.T. Sadikot, *Cigarette smoking and innate immunity.* Inflamm Res, 2008. **57**(11): p. 497-503.
111. Forsslund, H., et al., *Distribution of T-cell subsets in BAL fluid of patients with mild to moderate COPD depends on current smoking status and not airway obstruction.* Chest, 2014. **145**(4): p. 711-722.
112. Abete, I., et al., *White cell counts in relation to mortality in a general population of cohort study in the Netherlands: a mediating effect or not?* BMJ Open, 2019. **9**(10): p. e030949.
113. Kabat, G.C., et al., *White Blood Cell Count and Total and Cause-Specific Mortality in the Women's Health Initiative.* Am J Epidemiol, 2017. **186**(1): p. 63-72.
114. Vorup-Jensen, T. and R.K. Jensen, *Structural Immunology of Complement Receptors 3 and 4.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 2716.

115. Sengelov, H., et al., *Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils*. J Clin Invest, 1993. **92**(3): p. 1467-76.
116. Nunez, J., et al., *Usefulness of the neutrophil to lymphocyte ratio in predicting long-term mortality in ST segment elevation myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2008. **101**(6): p. 747-52.
117. Azab, B., et al., *Usefulness of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting short- and long-term mortality in breast cancer patients*. Ann Surg Oncol, 2012. **19**(1): p. 217-24.
118. Fest, J., et al., *The neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with mortality in the general population: The Rotterdam Study*. Eur J Epidemiol, 2019. **34**(5): p. 463-470.
119. Bergens, M.A., et al., *Smoking-associated AHRH demethylation in cord blood DNA: impact of CD235a+ nucleated red blood cells*. Clin Epigenetics, 2019. **11**(1): p. 87.
120. Howe, C.G., et al., *Associations between Maternal Tobacco Smoke Exposure and the Cord Blood [Formula: see text] DNA Methylome*. Environ Health Perspect, 2019. **127**(4): p. 47009.
121. Zong, D., et al., *The role of cigarette smoke-induced epigenetic alterations in inflammation*. Epigenetics Chromatin, 2019. **12**(1): p. 65.
122. Ligthart, S., et al., *DNA methylation signatures of chronic low-grade inflammation are associated with complex diseases*. Genome Biol, 2016. **17**(1): p. 255.
123. Somineni, H.K., et al., *Blood-Derived DNA Methylation Signatures of Crohn's Disease and Severity of Intestinal Inflammation*. Gastroenterology, 2019. **156**(8): p. 2254-2265 e3.
124. Lee, M.K., et al., *DNA methylation and smoking in Korean adults: epigenome-wide association study*. Clin Epigenetics, 2016. **8**: p. 103.
125. Guida, F., et al., *Dynamics of smoking-induced genome-wide methylation changes with time since smoking cessation*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(8): p. 2349-59.
126. Nagamatsu, S.T., et al., *Dissecting the epigenomic differences between smoking and nicotine dependence in a veteran cohort*. Addict Biol, 2023. **28**(1): p. e13259.
127. Stockinger, B., et al., *The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 403-32.
128. Bojesen, S.E., et al., *AHRH (cg05575921) hypomethylation marks smoking behaviour, morbidity and mortality*. Thorax, 2017. **72**(7): p. 646-653.
129. Su, Y., et al., *ALPPL2 Is a Highly Specific and Targetable Tumor Cell Surface Antigen*. Cancer Res, 2020. **80**(20): p. 4552-4564.
130. Oikawa, T. and T. Yamada, *Molecular biology of the Ets family of transcription factors*. Gene, 2003. **303**: p. 11-34.
131. Oettgen, P., *The role of ets factors in tumor angiogenesis*. J Oncol, 2010. **2010**: p. 767384.
132. Wang, X., et al., *RPAP2 regulates a transcription initiation checkpoint by inhibiting assembly of pre-initiation complex*. Cell Rep, 2022. **39**(4): p. 110732.
133. Gupta, R., et al., *Global analysis of human glycosyltransferases reveals novel targets for pancreatic cancer pathogenesis*. Br J Cancer, 2020. **122**(11): p. 1661-1672.
134. Li, J., et al., *MGAT3-mediated glycosylation of tetraspanin CD82 at asparagine 157 suppresses ovarian cancer metastasis by inhibiting the integrin signaling pathway*. Theranostics, 2020. **10**(14): p. 6467-6482.

-
135. Cheng, L., et al., *Bisecting N-Acetylglucosamine on EGFR Inhibits Malignant Phenotype of Breast Cancer via Down-Regulation of EGFR/Erk Signaling*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 929.
 136. Heikkinen, A., S. Bollepalli, and M. Ollikainen, *The potential of DNA methylation as a biomarker for obesity and smoking*. *J Intern Med*, 2022. **292**(3): p. 390-408.

8 DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Herrn Professor Winfried März bedanken für die Möglichkeit, mit seiner LURIC Studie das Thema meiner Dissertation zu bearbeiten und auch für die gute Betreuung, sowie für die aufbauenden Gespräche. Prof März hat mir die Tür zum spannenden Feld der medizinischen Forschung geöffnet.

Besonders möchte ich Herrn Professor Bernhard Krämer aus der V. Medizinischen Klinik danken, weil er mir zum Verständnis vieler Aspekte meiner Arbeit verhalf und wichtige sachliche Hinweise gab. Für die Ratschläge und die Unterstützung bei meinen Forschungsarbeiten möchte ich ihm Danke sagen.

Meinem lieben Ehemann Marcus danke ich von ganzem Herzen für die unermüdlichen Gespräche, Anmerkungen und konstruktive Kritik, die mir geholfen haben neue Perspektiven in dieser Arbeit zu entdecken. Schön, dass du da bist.

Ich möchte an dieser Stelle auch meinen lieben Kindern Angela, Robert, Gabriela und Victor danken, weil sie mich immer moralisch unterstützen. Ich habe euch sehr lieb. Auch meinen Eltern und Geschwistern in Perú und der Familie in Deutschland möchte ich Danke sagen, weil sie immer für uns da sind.

Bei meinen Kollegen Jan Leipe, Julian Marinez und Babak Yazdani bedanke ich mich für die freundlichen Gespräche und die gute Zusammenarbeit.

Dem Team der Dialyse-Station im Haus 10 möchte ich danken für die freundliche und angenehme Atmosphäre.