

UMWELT UND GESUNDHEIT

08/2023

Abschlussbericht

Epigenetische Veränderungen unterschiedlicher Zelltypen bei erhöhter Feinstaubbelastung

von:

Prof. Dr. Irina Lehmann, Dr. Saskia Trump, Matthias Klös, Marey Messingschlager
Berliner Institut für Gesundheitsforschung in der Charité -Universitätsmedizin Berlin

Dr. Dominik Lermen, Dr. Martina Bartel-Steinbach

Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT), Sulzbach/Saar

Herausgeber:

Umweltbundesamt

UMWELT UND GESUNDHEIT 08/2023

Ressortforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt,
Naturschutz und nukleare Sicherheit

Forschungskennzahl 3717 62 204 0
FB000866

Abschlussbericht

Epigenetische Veränderungen unterschiedlicher Zelltypen bei erhöhter Feinstaubbelastung

von

Prof. Dr. Irina Lehmann, Dr. Saskia Trump, Matthias Klös, Marey
Messingschlager
Berliner Institut für Gesundheitsforschung in der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

Dr. Dominik Lermen, Dr. Martina Bartel-Steinbach
Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT),
Sulzbach/Saar

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Impressum

Herausgeber

Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Roßlau
Tel: +49 340-2103-0
Fax: +49 340-2103-2285
buergerservice@uba.de
Internet: www.umweltbundesamt.de

 [/umweltbundesamt.de](https://www.facebook.com/umweltbundesamt.de)

 [/umweltbundesamt](https://twitter.com/umweltbundesamt)

Durchführung der Studie:

Berliner Institut für Gesundheitsforschung in der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Charitéplatz 1
10117 Berlin

Abschlussdatum:

April 2022

Redaktion:

Fachgebiet II 1.5 "Umweltmedizin und gesundheitliche Bewertung"
Dr. Katrin Süring; Dr. Wolfgang Straff

Publikationen als pdf:

<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen>

ISSN 1868-4340

Dessau-Roßlau, August 2023

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

Kurzbeschreibung: Epigenetische Veränderungen unterschiedlicher Zelltypen bei erhöhter Feinstaubbelastung

Eine erhöhte Feinstaubbelastung kann verschiedene negative Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen haben: So sind bereits ein erhöhtes Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, für Entzündungen der Atemwege, aber auch für Stoffwechselveränderungen mit einer erhöhten Feinstaubbelastung in Zusammenhang gebracht worden. Als vermittelnde Mechanismen auf molekularer Ebene werden epigenetische Veränderungen diskutiert. So wurden bereits Störungen auf der DNA-Methylierungsebene und bei der Expression von kurzen RNA-Molekülen, sogenannten microRNAs, durch Feinstaubexposition beschrieben. Diese Veränderungen treten zum Teil schon vor Krankheitsbeginn auf und können daher einen vorhersagenden Charakter haben, die sie für zukünftige Risikobeurteilungen anwendbar erscheinen lassen. Die Datenlage auf diesem Gebiet weist – auch aufgrund der neuen Methodik - noch erhebliche Defizite auf. Daher war das Ziel dieser Studie, die Mechanismen der Wirkung von Feinstäuben auf epigenetischer Ebene zu erfassen. Dies wurde in einer Kohortenstudie mittels einfach zu gewinnender Proben (Nasallavage) aus den oberen Atemwegen untersucht – ein Bereich des menschlichen Körpers, der in direktem Kontakt zu der Noxe Feinstaub steht. Teilnehmerinnen und Teilnehmer, die in ihrem täglichen Leben einer erhöhten Feinstaubbelastung ausgesetzt sind, wurden mit solchen mit niedriger Belastung verglichen. Die Studienteilnehmenden hatten ihr Lebensumfeld entweder im Innenstadtbereich von Stuttgart (erhöhte Belastung) oder lebten in Simmerath, einer Gemeinde in der Eifel (niedrige Belastung). In unserer Studie zeigten sich epigenetische Veränderungen im Zusammenhang mit der Feinstaubbelastung sowohl in der DNA-Methylierung als auch in der Expression von microRNAs, die die Regulation von Immunogenen beeinflussen können. Dies deutet darauf hin, dass auch Partikelkonzentrationen unterhalb des europäischen Grenzwertes Auswirkungen auf Zellen des oberen Atemwegtrakts haben können.

Abstract: Epigenetic changes upon elevated particulate matter exposure

Increased particulate matter pollution can have various negative effects on human health: For example, an increased risk of cardiovascular diseases, inflammation of the respiratory tract, but also metabolic changes have already been associated with increased particulate matter exposure. Epigenetic changes are being discussed as mediating mechanisms at the molecular level. Thus, disturbances at the DNA methylation level and in the expression of short RNA molecules, so-called microRNAs, have already been described as a result of fine dust exposure. Some of these changes occur before the onset of disease and can therefore have a predictive character that makes them applicable for prospective risk assessments. The data available in this field still show considerable deficits - also due to the new methodology. Therefore, the aim of this study was to determine the mechanisms of the effect of fine dusts at the epigenetic level. This was assessed in a cohort study using easily obtainable samples (nasal lavage) from the upper respiratory tract - an area of the human body which is in direct contact with noxious particulate matter. Participants exposed to higher levels of particulate matter in their daily lives were compared to those with lower levels of exposure. The study participants either lived in the inner city of Stuttgart (higher exposure) or in Simmerath, a municipality in district of Eifel (low exposure). In our study, epigenetic changes associated with particulate matter exposure were found in both, DNA methylation and the expression of microRNAs, which can influence the regulation of immune genes. This suggests that even particle concentrations below the European threshold can affect cells of the upper respiratory tract.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	6
Abbildungsverzeichnis.....	9
Tabellenverzeichnis.....	10
Abkürzungsverzeichnis.....	12
Zusammenfassung.....	14
Summary	20
1 Einleitung.....	26
1.1 Einfluss von Feinstaub auf die menschliche Gesundheit.....	26
1.2 Epigenetik.....	26
1.3 Was ist Feinstaub?	27
1.4 Ziel der Studie	27
2 Studiendesign	29
2.1 Auswahl der Probenahmestandorte.....	29
2.2 Rekrutierung	29
2.3 Entwicklung eines Fragebogens zur Erhebung soziodemografischer Daten	32
3 Partikelmessungen und Probenahme	34
3.1 Probenahme-Logistik	34
3.2 Probenahme Nasallavage	34
3.3 Probenahme Blut	37
3.4 Feinstaubpartikelmessungen	38
3.4.1 Messgerät und Vorgehensweise.....	38
3.4.2 Messstandorte und -zeiten.....	38
3.4.3 Auswertung der Partikelmessungen.....	40
4 Auswertung des Fragebogens zur Erhebung soziodemographischer Daten.....	42
4.1 Allgemeine Studienmerkmale.....	42
4.2 Wohnumgebung und Verkehrsexposition	43
4.3 Gesundheitszustand der Studienteilnehmenden	45
5 Methoden der Aufarbeitung biologischer Proben	47
5.1 Blutproben	47
5.1.1 Differentialblutbild.....	47
5.1.2 Nukleinsäure-Extraktion aus Blutproben.....	48
5.1.2.1 RNA-Extraktion aus PAXgene®-konservierten-Vollblutproben	48
5.1.2.2 Extraktion von genomischer DNA aus EDTA-Blut	48

5.1.2.3	MicroRNA-Isolierung aus Serum.....	48
5.2	Nasallavage	49
5.2.1	Zellkomposition	49
5.2.1.1	Durchflusszytometrie.....	49
5.2.1.2	Cytospin	50
5.2.2	Methylom-Sequenzierung aus Nasallavagezellen	51
5.2.2.1	DNA-Extraktion und Sequenzierung	51
5.2.2.2	Bestimmung differentiell methylierter Regionen.....	51
5.2.2.3	Bestimmung von Einzelnukleotid-Polymorphismen und deren Einfluss auf DNA-Methylierung	52
5.2.2.4	Annotierung der DMRs zu Genen	52
5.2.2.5	Signalweganreicherungsanalyse.....	53
5.2.3	MicroRNA-Sequenzierung aus Nasallavageüberstand	53
5.2.3.1	MicroRNA-Extraktion und Sequenzierung.....	53
5.2.3.2	Bestimmung differentiell exprimierter microRNAs und deren Ziel-Gene	54
5.2.4	Zytokinmessungen in Nasallavageüberstand	55
5.2.4.1	Zytokinmessungen mit Bead-basierten Immunoassays	55
5.2.4.2	Auswertung der Messdaten	56
6	Ergebnisse	57
6.1	Blutproben	57
6.1.1	Differentialblutbild.....	57
6.1.2	Nukleinsäure-Extraktion aus Blutproben.....	58
6.2	Nasallavage	58
6.2.1	Zellkomposition	58
6.2.1.1	Durchflusszytometrie.....	59
6.2.1.2	Cytospin	59
6.2.2	DNA-Methylierung.....	60
6.2.2.1	DNA-Extraktion und Sequenzierung	60
6.2.2.2	Eigenschaften und Verteilung der differentiell methylierten Regionen	60
6.2.2.3	Signalweganreicherungsanalyse.....	62
6.2.2.4	Interpretation der Ergebnisse.....	65
6.2.3	MicroRNAs	66
6.2.3.1	Anzahl und Art der microRNAs aus Nasallavageüberstand	66
6.2.3.2	Differentiell exprimierte microRNAs und deren Zielgene	68

6.2.3.3	Interpretation der Ergebnisse.....	70
6.2.4	Zytokinmessungen in Nasallavageüberstand	71
7	Diskussion.....	75
8	Quellenverzeichnis	80
A	Anhang	87
A.1	Fragebogen	87
A.2	Zellkomposition Nasallavage	109
A.3	Studienmerkmale der Kohorte – Fragebogenauswertung	112
A.4	Studienmerkmale der Subkohorte für epigenetische Analysen	129
A.5	Methylom-Sequenzierung	134
A.6	microRNA-Sequenzierung.....	136

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Standort und Stellplatz des epiLabs an den Studienstandorten Simmerath und Stuttgart.....	15
Abbildung 2:	Schematische Übersicht der mit Nasallavagezellen und - überstand durchgeführten Analysen.....	16
Abbildung 3:	Gemessene Partikelkonzentrationen (PM ₁₀) über drei Tage in Simmerath & Stuttgart	17
Figure 4:	Location of the epiLab at the study sites of Simmerath and Stuttgart.....	21
Figure 5:	Schematic overview of the analyses conducted with nasal lavage cells and supernatant	22
Figure 6:	Measured particle concentrations (PM ₁₀) on three consecutive days in Simmerath & Stuttgart	23
Abbildung 7:	Online-Akquise-Tool, das unter der Adresse www.feinstaub.fraunhofer.de betrieben wurde.....	31
Abbildung 8:	Nasallavage Probenahme	35
Abbildung 9:	Übersicht über die mit den Nasallavageproben durchgeführten Analysen	36
Abbildung 10:	Blutprobenentnahme	37
Abbildung 11:	Lage der Messstandorte Simmerath (links) und Stuttgart (rechts).....	39
Abbildung 12:	Vergleich der Partikelmessungen an den Standorten Simmerath und Stuttgart.....	40
Abbildung 13:	Unterteilung der DMRs in hypo- und hypermethylierte, sowie genotypassoziierte (g) und nicht genotypassoziierte (ng) DMRs	61
Abbildung 14:	Prozentuale Verteilung der 147 DMRs über verschiedene funktionelle Elemente des Genoms	62
Abbildung 15:	<i>Cytoscape</i> Netzwerkmodule aller DMR-assoziierten Gene	63
Abbildung 16:	<i>Cytoscape</i> Netzwerkmodule der ngDMR-assoziierten Gene ...	64
Abbildung 17:	Scatterplot der Ergebnisse der differentiellen miRNA- Expressionsanalyse	68
Abbildung 18:	<i>Cytoscape</i> Netzwerkmodule der Zielgene von hsa-miR-486- 5p	69
Abbildung 19:	Boxplots der CXCL5- und CCL2-Konzentrationen, Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Studienteilnehmenden	73
Abbildung 20:	Boxplot der CCL2-Konzentration in männlichen Teilnehmern, Vergleich zwischen Stuttgart (n = 17) und Simmerath (n = 20)	73
Abbildung 21:	Aktivitätsprotokoll des Fragebogens (täglich für die letzten 7 Tage vor Probennahme auszufüllen).....	109
Abbildung 22:	Protokoll Innenraum (täglich für die letzten 7 Tage vor Probennahme auszufüllen)	109

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	PM ₁₀ -Konzentrationen in den Jahren 2017 und 2018 an den für die Teilnehmerrekrutierung ausgewählten Standorten Stuttgart und Simmerath29
Tabelle 2:	Übersicht über die rekrutierten und tatsächlichen Teilnehmer an den Probennahmestandorten34
Tabelle 3:	Übersicht über die gewonnen Nasallavageproben36
Tabelle 4:	Übersicht über die gewonnen Blutproben38
Tabelle 5:	PM ₁₀ -Messstandorte und -zeiten Simmerath.....39
Tabelle 6:	PM ₁₀ -Messstandorte und -zeiten Stuttgart39
Tabelle 7:	Mittlere PM ₁₀ -Konzentrationen über alle fünf Messstandorte in Simmerath und Stuttgart über je drei Tage (Freitag bis Sonntag).....40
Tabelle 8:	Vergleich der beiden Standorte Stuttgart und Simmerath im Hinblick auf allgemeine Studienmerkmale mittels exaktem Fisher-Test. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Standorten (p-Wert < 0,05) sind fett markiert.42
Tabelle 9:	Vergleich der Wohnumgebung und Verkehrsexposition der Studienteilnehmenden aus Stuttgart und Simmerath mittels exaktem Fisher-Test. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Standorten (p-Wert< 0.05) sind fett markiert.44
Tabelle 10:	Vergleich des Gesundheitszustandes der Studienteilnehmenden aus Stuttgart und Simmerath mittels exaktem Fisher-Test. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Standorten (p-Wert< 0.05) sind fett markiert.45
Tabelle 11:	Übersicht der für die durchflusszytometrische Zelltyp-Bestimmung verwendeten Antikörper und die damit bestimmten Zelltypen50
Tabelle 12:	Differentialblutbild Ergebnisse57
Tabelle 13:	Zusammenfassung der durchflusszytometrisch bestimmten Zellanteile in der Nasallavage pro Standort59
Tabelle 14:	Übersicht der 10 stärksten exprimierten miRNAs in Nasallavageüberstand67
Tabelle 15:	Standortvergleich der Zytokin-Messungen aus Nasallavageüberstand mit dem <i>Human Proinflammatory Chemokine Panel</i> in pg/ml.....72
Tabelle 17:	Durchflusszytometrisch bestimmte Zellanteile in der Nasallavage aller Proben109
Tabelle 18:	Studienmerkmale der Kohorte – Gesamtauswertung des Fragebogens112

Tabelle 19:	Studienmerkmale der Kohorte – Auswertung Aktivitätsprotokoll und Innenraumprotokoll der vergangenen sieben Tage vor Probenentnahme128
Tabelle 20:	Vergleich von Gesamt- mit Subkohorte hinsichtlich allgemeiner Studienmerkmale mittels exaktem Fisher’s Test129
Tabelle 21:	Vergleich von Gesamt- mit Subkohorte hinsichtlich der Wohnumgebung und Verkehrsexposition mittels exaktem Fisher’s Test.....131
Tabelle 22:	Vergleich von Gesamt- mit Subkohorte hinsichtlich des Gesundheitszustandes mittels exaktem Fisher’s Test.....132
Tabelle 23:	Übersicht der Methylom-Sequenzierungs-Qualitätsparameter aller 60 Proben134
Tabelle 24:	Summe der miRNA-Reads aller 60 sequenzierten Proben136
Tabelle 25:	Zielgene von hsa-miR-486-5p137
Tabelle 26:	Übersicht der 147 differentiell methylierten Regionen (DMRs) aus dem Vergleich der DNA Methylierungsanalyse der Standorte Stuttgart und Simmerath.....139

Abkürzungsverzeichnis

AM	Arithmetisches Mittel
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BIH	Berliner Institut für Gesundheitsforschung in der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Berlin Institute of Health at Charité)
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaar (Längeneinheit eines DNA- oder RNA-Moleküls)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin Dinukleotid
DMC	Differentiell methyliertes CpG
DMR	Differentiell methylierte Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DSS	Dispersion Shrinkage for Sequencing data
epiLab	Mobiles epidemiologisches Labor
FC	Relative Veränderungsrate (engl. <i>Fold Change</i>)
FDR	Falscherkennungsrate (engl. <i>false discovery rate</i>)
gDMR	Genotypassoziierte DMR
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (engl. <i>G protein-coupled receptor</i>)
IBMT	Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik
IQA	Interquartilsabstand
kb	Kilobasen, entspricht 1000 Basenpaaren (siehe bp)
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
LUC	<i>Large unstained Cells</i> (große, ungefärbte Zellen)
µm	Mikrometer
Max	Maximum
MCH	Mean Corpuscular Haemoglobin
MCHC	Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration
MCV	Mean Corpuscular Volume
MD	Median
meQTL	Methylation quantitative trait loci
Min	Minimum
miRNA	microRNA, Mikro-Ribonukleinsäure (engl. <i>micro-ribonucleic acid</i>)
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA, Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MW	Mittelwert
n	Anzahl
ngDMR	Nicht genotypassoziierte DMR
NK	Negativ-Kontrolle
nm	Nanometer (10 ⁻⁹ m)
pg	Pikogramm (10 ⁻¹² g)
PM₁₀	Partikel mit einem mittleren aerodynamischen Durchmesser von etwa 10 Mikrometer und weniger ¹

PM_{2,5}	Partikel mit einem mittleren aerodynamischen Durchmesser von etwa 2,5 Mikrometer und weniger ¹
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
SG	Stuttgart
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. <i><u>s</u>ingle <u>n</u>ucleotide <u>p</u>olymorphism</i>)
SR	Simmerath
STD	Standardabweichung

¹als PM₁₀ bzw. PM_{2,5} sind Partikel definiert, die einen grössenselektierenden Filter passieren können, welcher für einen aerodynamischen Durchmesser von 10 bzw. 2,5 µm eine Durchlässigkeit von 50% aufweist.

Zusammenfassung

Die Weltgesundheitsorganisation (world health organisation, WHO) geht von weltweit 4,2 Millionen vorzeitigen Todesfällen pro Jahr aus, die durch Luftverschmutzung verursacht werden. Dabei geht erhöhte Feinstaubbelastung mit vermehrtem Auftreten von Herz-Kreislauf-, Tumor- und respiratorischen Erkrankungen einher (1). Auch wenn die Feinstaubkonzentrationen in Deutschland und Europa in den letzten Jahren rückläufig waren, werden die Empfehlungen der WHO vielerorts überschritten. So wurde beispielsweise der maximale Jahresmittelwert für PM_{10} im Jahr 2019 an 13 % der Messstationen in Deutschland überschritten, der für $PM_{2,5}$ an 57 % der Messorte (2). Da sich in den letzten Jahren die Indizien dafür häuften, dass auch verhältnismäßig geringe Feinstaubkonzentrationen bereits zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen können, wurden die Richtwerte mit den 2021 veröffentlichten globalen Luftqualitätsrichtlinien der WHO weiter verschärft (3).

Während die Auswirkungen von erhöhter Feinstaubbelastung bereits vielfach beschrieben wurden, sind die biologischen Mechanismen, die zu den beobachteten Gesundheitseffekten führen, noch zu großen Teilen unklar. Mit dieser Studie sollten epigenetische Veränderungen im oberen respiratorischen Trakt beschrieben werden, die bei jungen Erwachsenen unter langfristiger Exposition mit einer erhöhten Feinstaubkonzentration auftreten können. Ein Verständnis der früh einsetzenden molekularen Veränderungen kann helfen, Indikatoren für eine erhöhte Feinstaubbelastung zu ermitteln. Diese Veränderungen könnten auch dazu beitragen, Personen zu identifizieren, die ein erhöhtes Risiko haben, eine mit der Feinstaubbelastung verbundene Krankheit zu entwickeln.

Studiendesign

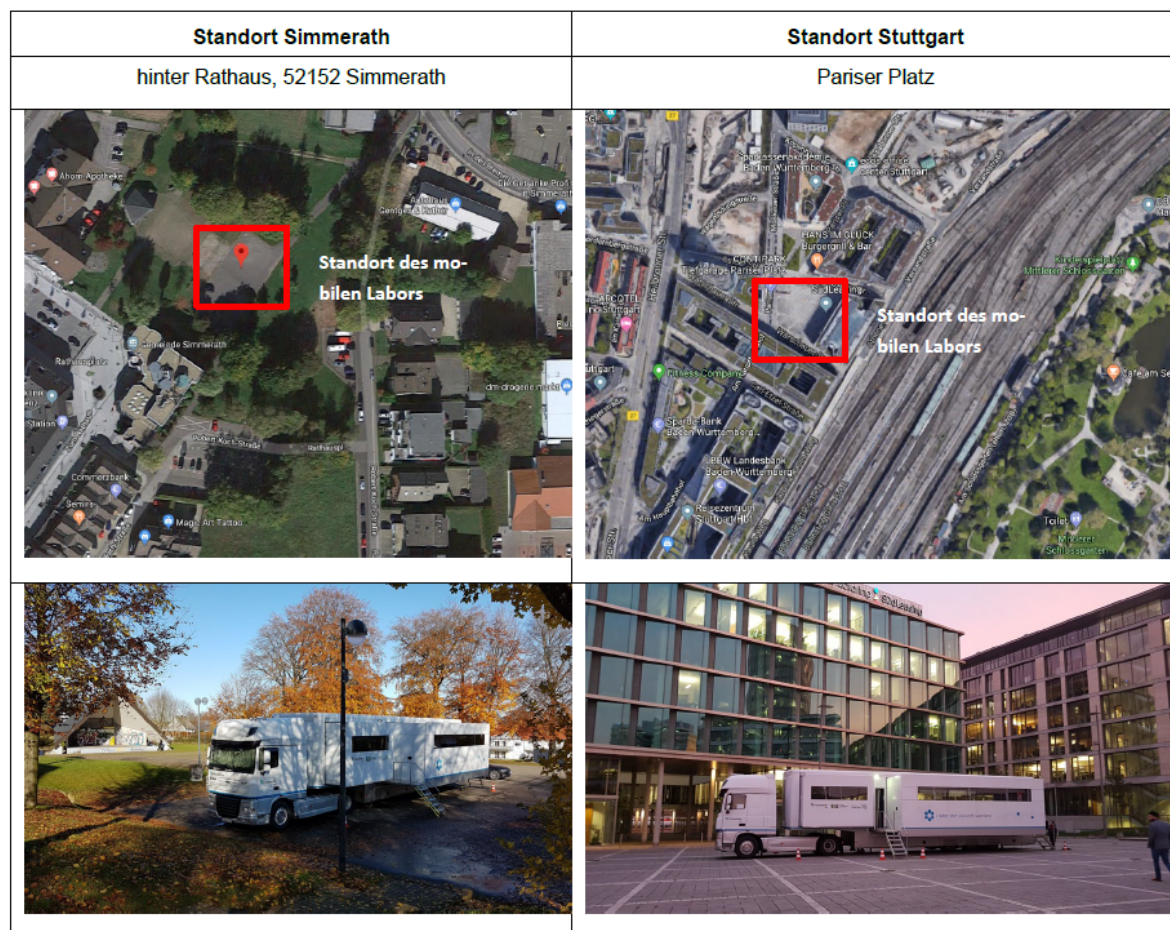
Um epigenetische Veränderungen im Zusammenhang mit erhöhter Feinstaubbelastung zu identifizieren, wurde eine Kohorte von Erwachsenen aus Stuttgart (Jahresmittelwert PM_{10} im Jahr 2018 = $29 \mu\text{g}/\text{m}^3$) mit einer vergleichbaren Kohorte aus Simmerath (Jahresmittelwert PM_{10} = $11 \mu\text{g}/\text{m}^3$) verglichen. Beide Kohorten setzten sich aus jungen, gesunden Teilnehmern und Teilnehmerinnen (20-39 Jahre) zusammen, die in demografisch ähnlichen Verhältnissen lebten und sich dennoch in ihrer Feinstaubbelastung unterschieden. Es wurden nur Personen einbezogen, die seit mindestens drei Jahren nicht geraucht hatten und nicht unter chronischen Erkrankungen (z. B. Erkrankungen der Nase oder der Nasennebenhöhlen, Allergien gegen inhalative Allergene, Asthma, Diabetes oder andere schwere Krankheiten) litten. Die Einnahme von entzündungshemmenden Medikamenten, eine Schwangerschaft oder Stillen galten als Ausschlusskriterien.

Zusätzlich zu den über vorhandene Messstationen erfassten Feinstaubkonzentrationen wurden an den Wochenenden der Probenahme Partikelmessungen an beiden Untersuchungsstandorten durchgeführt. Eine detaillierte Erfassung der soziodemographischen Charakteristika, der Wohn- und Arbeitsumgebung sowie zum Gesundheitszustand der Teilnehmenden erfolgte mittels Fragebogen.

Pro Standort sollten 50 Teilnehmende rekrutiert werden, von denen jeweils 30 für die Analyse epigenetischer Modifikationen ausgewählt wurden. Von allen Teilnehmenden wurde eine Nasallavageprobe für epigenetische Analysen gewonnen sowie Vollblut-, Serum- und Plasma-Proben für zukünftige retrospektiven Untersuchungen. Bei einer Nasallavage werden die oberen Atemwege mit Kochsalzlösung durchspült und so Zellen und zellfreie Partikel von der Nasenschleimhaut gelöst.

Alle Proben wurden an zwei aufeinanderfolgenden Wochenenden in Simmerath und Stuttgart im mobilen epidemiologischen Labor (epiLab) des Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) gewonnen. Das epiLab ermöglichte eine standardisierte Probennahme und eine Bearbeitung der Proben direkt vor Ort. Die Aufstellorte des epiLabs in Simmerath und Stuttgart zeigt Abbildung 1.

Abbildung 1: Standort und Stellplatz des epiLabs an den Studienstandorten Simmerath und Stuttgart



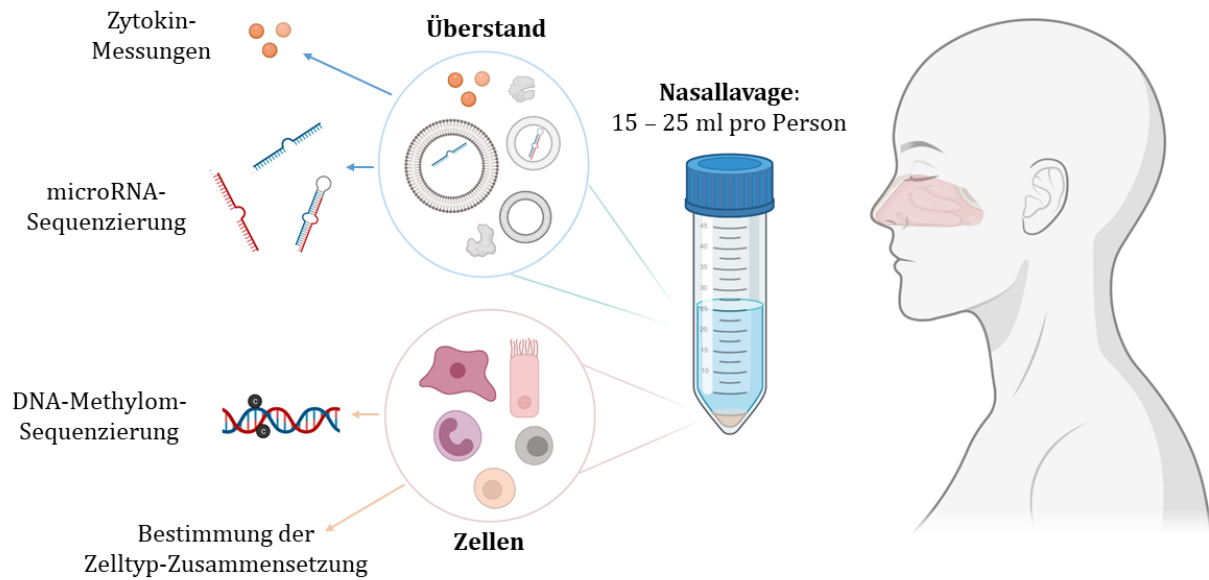
Quelle: Google Maps & eigene Darstellung, ©IBMT, M. Bartel-Steinbach

Hauptfokus dieses Vorhabens war die Identifizierung von feinstaubassoziierten, epigenetischen Veränderungen. Der Begriff Epigenetik umfasst Prozesse, die Einfluss auf die Genexpression (Transkription) - also auf die „Aktivität“ der Gene - nehmen, ohne die zugrundeliegende DNA-Sequenz zu verändern. Die Modifikation der DNA durch Methylgruppen führt zu einer Modulation der Genexpression durch eine vereinfachte oder erschwerte Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA, während microRNAs (miRNAs) inhibitorisch auf bereits gebildete *messenger* RNAs (mRNAs) wirken und so Einfluss auf die Synthese von Proteinen nehmen können. Diese beiden epigenetischen Ebenen wurden in den Zellen bzw. im zellfreien Überstand der Nasallavage untersucht (Abbildung 2).

Die Zusammensetzung der Nasallavage ist individuell verschieden und kann sich durch äußere Einflüsse verändern. Daher wurden in der Nasallavage Art und Anteile von Epithelzellen und verschiedener Immunzellpopulationen bestimmt. Die so ermittelten Zellanteile wurden für die Adjustierung der Methylomdaten herangezogen, um zellkompositionsabhängige Veränderungen berücksichtigen zu können.

Die Exposition mit Feinstaub wurde bereits als Auslöser inflammatorischer Prozesse beschrieben. Daher wurden neben den epigenetischen Parametern auch Messungen von Entzündungsmediatoren, sogenannten Zytokinen in der Nasallavage durchgeführt.

Abbildung 2: Schematische Übersicht der mit Nasallavagezellen und -überstand durchgeführten Analysen



Quelle: eigene Darstellung, BIH

Probenahme

Mit Hilfe von Flyern, durch direkte Ansprache im öffentlichen Raum und über Information in sozialen Netzwerken konnten in Simmerath n=50 und in Stuttgart n=51 Personen für die Studie gewonnen werden. Diese konnten sich über ein Online-Akquise-Tool weiter über die Studie informieren und für die Probennahme anmelden. Nur diejenigen Teilnehmenden, die im Rahmen des Anmeldeprozesses die Einschluss- und Ausschlusskriterien, die über einen Online-Fragebogen erfasst wurden, erfüllten, erhielten einen Termin für die Probennahme.

Die Anzahl der tatsächlich zur Probenahme erschienenen Personen lag etwas unter jener der ursprünglich angemeldeten, da es u.a. krankheitsbedingt zu Ausfällen kam. Dennoch konnten in Simmerath 48 und in Stuttgart 43 Nasallavageproben gewonnen werden, die zur Weiterarbeitung direkt in das Labor des epiLabs überführt wurden. Durch Zentrifugation wurden die Nasallavageproben in Nasallavagezellen und den zellfreien Überstand getrennt. Die Zellen wurden gezählt und eine vorab bestimmte Zellzahl für die Zellkompositionsanalysen abgenommen. Die verbleibenden Zellen wurden bei -80 °C gelagert und für die weitere Aufarbeitung an das BIH gesendet. Die im epiLab gewonnenen Blutproben wurden entsprechend den Empfehlungen des *Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI)* aufgearbeitet.

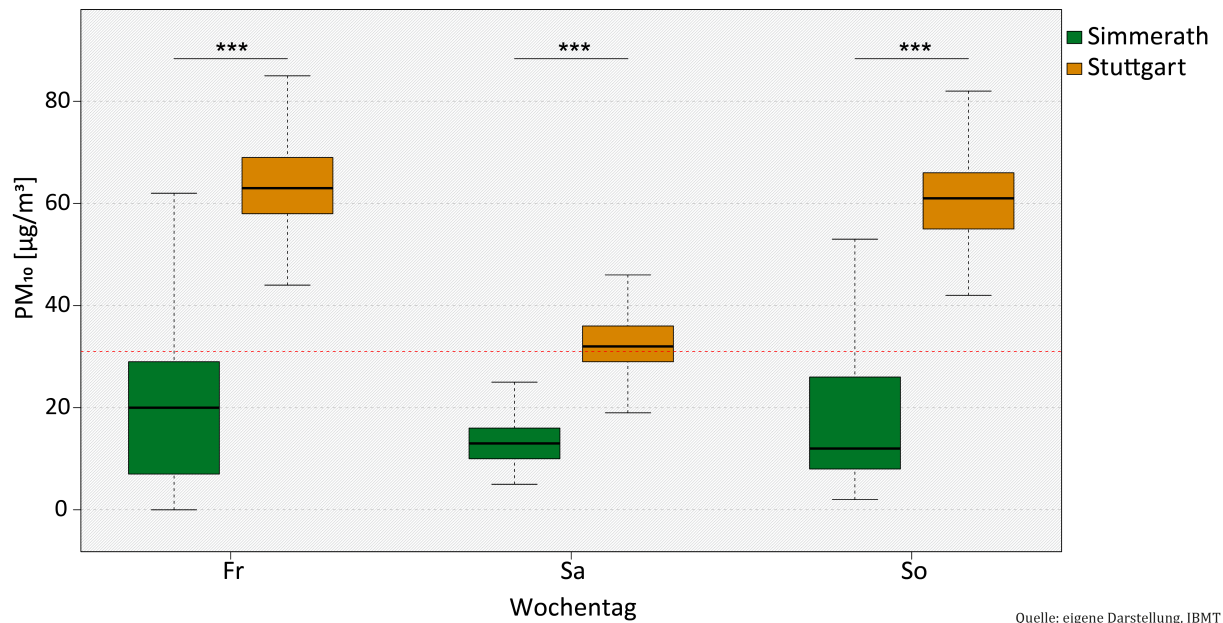
Partikelmessungen

Die Messungen der PM₁₀-Konzentrationen wurden an beiden Probenahme-Standorten an je drei aufeinanderfolgenden Tagen und an fünf verschiedenen Messstandorten, welche die

Wohnumgebung der Teilnehmenden abdeckten, durchgeführt. Die Annahme, dass die Teilnehmenden aus Stuttgart höheren Feinstaubkonzentrationen ausgesetzt sind, konnte mit den Messungen bestätigt werden. Abbildung 3 zeigt die Zusammenfassung der Tageswerte aller Messstandorte für Simmerath und Stuttgart.

Sowohl bei dem Vergleich der einzelnen Tage als auch bei übergreifender Betrachtung aller Messtage wurden in Stuttgart signifikant höhere PM₁₀-Konzentrationen gemessen (Mittelwert aller drei Tage und Standorte 53,8 µg/m³) als in Simmerath (16,5 µg/m³, vgl. Tabelle 7).

Abbildung 3: Gemessene Partikelkonzentrationen (PM₁₀) über drei Tage in Simmerath & Stuttgart



Die Boxplots zeigen die Partikelkonzentrationen an den beiden Standorten an drei aufeinanderfolgenden Tagen von Freitag bis Sonntag. Die Boxen überspannen die 25-75% Quantile, und umschließen den Median. Die Whisker über und unter der Box kennzeichnen das 1,5-Fache des Interquartilsabstands (IQA). Rot gepunktete Linie: globaler Median; *** p -Wert < 0,001 (Mann-Whitney U Test).

Fragebogenauswertung

Die Teilnehmenden beantworteten insgesamt 81 Fragen, die Angaben zu Gesundheit, Umgebung und Verhaltensweisen abdeckten. Mit der Fragebogenauswertung konnte gezeigt werden, dass die beiden Kohorten aus Simmerath und Stuttgart eine ähnliche Verteilung hinsichtlich Alter, Geschlecht, Einkommen und Body Mass Index (BMI) aufwiesen. Unterschiede zeigten sich in Charakteristika wie sie in einem Vergleich von urbaner und ländlichen Bevölkerung nicht unerwartet waren. So war beispielsweise der Anteil an verheirateten Studienteilnehmerinnen und -teilnehmern in Simmerath größer als in Stuttgart, der Anteil an Hoch- bzw. Fachhochschulabschlüssen in Simmerath niedriger als in Stuttgart.

Weitere signifikante Unterschiede wurden bei der Wohnumgebung beobachtet; so gaben beispielsweise in Stuttgart mehr Personen an, angrenzend an einer Straßenschlucht¹ zu wohnen oder Staubbildung vor der Wohnstätte zu beobachten. Differenzen wie diese hängen stark mit dem Untersuchungsparameter Feinstaubbelastung zusammen und sind vermutlich Teil der Faktoren, die zu den erhöhten Feinstaub-Konzentrationen in Stuttgart beitragen.

¹ Straßenschlucht meint eine überwiegend geschlossene Häuserzeile auf beiden Seiten der Straße von mind. 100 m Länge

DNA-Methylierung

Für die Bestimmung des Methylierungsmusters wurde genomische DNA aus den Zellen der Nasallavage isoliert und mittels eines methylierungssensitiven, enzymatischen Verfahrens aufgearbeitet, sodass mit der genomweiten Sequenzierung zwischen methylierten und nicht-methylierten Cytosinen unterschieden werden konnte. Bei der Bestimmung von Methylierungsdifferenzen zwischen den Teilnehmenden aus Stuttgart und Simmerath wurden Alter, Geschlecht und die durchflusszytometrisch ermittelte Zellkomposition als Störgrößen berücksichtigt. Es wurden zwei verschiedene Algorithmen zur Bestimmung der differenziell methylierten Regionen (DMRs) eingesetzt und letztlich die Schnittmenge beider Resultate betrachtet. So konnten insgesamt 147 DMRs identifiziert werden. Etwa die Hälfte der DMRs liegt in regulatorischen Regionen des Genoms, also Bereichen, von denen bekannt ist, dass sie Einfluss auf die Genexpression nehmen können.

Mithilfe der Signalweganreicherungsanalyse konnte gezeigt werden, dass die Gene, die im Zusammenhang mit den DMRs stehen, in verschiedene, essentielle zelluläre Vorgänge involviert sind: DNA-Reparaturmechanismen und der Regulation der Transkription, des Zellzyklus bzw. der Immunantwort. Außerdem konnten Gene, die eine Rolle bei der oxidativen Stressantwort spielen, sowie Gene, die zur Familie der HOX-Transkriptionsfaktoren gehören, identifiziert werden. Eine veränderte Methylierung von HOX-Genen wurde bereits bei Neugeborenen nach erhöhter, pränataler Feinstaubbelastung beschrieben und auch im Rahmen einer Expositionsstudie, die den Einfluss von Dieselpartikeln und Allergenen auf Epithelzellen der Bronchien untersuchte, beobachtet (4, 5). Jedoch ist noch unklar, welche Funktion HOX-Gene im Zusammenhang mit Feinstaubbelastung einnehmen. Auch die DMR-assoziierten Gene, die eine Rolle für die Regulation der Immunantwort spielen, stehen im Einklang mit anderen Studien, da systemische Entzündungsprozesse eine oftmals beschriebene Folge der Feinstaubexposition sind (6, 7).

MicroRNAs

Neben der DNA-Methylierung wurden auch miRNAs im zellfreien Teil der Nasallavage untersucht. Mittels Ultrafiltration wurden Nanopartikel in einem Größenbereich von ca. 3 bis 220 Nanometern angereichert, um extrazelluläre Vesikel zu selektieren, die als Träger von miRNA bekannt sind. Aus dem Konzentrat wurden anschließend die miRNAs isoliert und sequenziert. So konnten insgesamt 550 verschiedene miRNA-Spezies detektiert werden.

Im Vergleich der beiden Standorte zeigte sich eine signifikant geringere Expression der miRNA miR-486-5p bei den Teilnehmenden aus Stuttgart. Eine Deregulierung von miR-486-5p wurde bei verschiedenen Tumorerkrankungen beobachtet aber auch bereits im Zusammenhang mit Feinstaubexposition beschrieben. Weiterführenden Analysen zeigten, dass viele der Zielgene, die mutmaßlich von der differentiellen Expression von miR-486-5p beeinflusst werden, Teil des PI3K/AKT-Signalweges sind. PI3K/AKT ist ein intrazellulärer Signalübertragungsweg, der in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderen Molekülen Einfluss auf wesentliche zelluläre Prozesse, wie Zellwachstum, Proliferation, Apoptose oder Regulation der Immunantwort nimmt (8, 9). Diese Studie zeigt, dass erhöhte Feinstaubkonzentrationen, auch solche innerhalb der gesetzlichen Grenzwerte, zu einer differentiellen miRNA Expression führen können.

Zytokinmessungen

Im zellfreien Überstand wurden zusätzlich zur miRNA-Sequenzierung die Konzentrationen von 11 chemotaktischen, entzündungsfördernden Chemokinen (eine Untergruppe der Zytokine) bestimmt. Dazu wurde ein Bead-basiertes, durchflusszytometrisches Verfahren verwendet, welches die simultane und sensitive Bestimmung mehrerer Zytokine aus einer Probe erlaubt.

Im adjustierten linearen Regressionsmodell zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Standortes für CCL2 (MCP-1). Die tatsächliche Differenz der CCL2-Konzentrationen der Nasallavageproben von Simmerath und Stuttgart ist jedoch gering. Bei den männlichen Teilnehmern (n = 37) aus Stuttgart zeigte sich eine signifikant erhöhte CCL2-Konzentration im Vergleich zu den Proben der männlichen Teilnehmer aus Simmerath. CCL2 fördert die Rekrutierung von Monozyten als Antwort auf Entzündungssignale oder oxidativen Stress. Auch in Plasmaproben wurden unter Feinstaubbelastung bereits höhere Mengen an CCL2 verzeichnet (10).

Fazit

Mit dieser Studie wurden die Mechanismen der Wirkung von Feinstäuben auf epigenetischer Ebene erfasst. Dies wurde in einer Kohortenstudie mit Proben der Nasallavage aus den oberen Atemwegen untersucht. Dabei wurden Teilnehmende mit erhöhter Feinstaubbelastung mit niedrig belasteten Teilnehmenden verglichen. Die Ergebnisse unserer Studie zeigten epigenetische Veränderungen im Zusammenhang mit Feinstaubbelastung sowohl in den DNA-Methylierungsmustern als auch in den Expressionsprofilen der microRNAs. Außerdem wurden Abweichungen in den Zytokinprofilen der Teilnehmenden identifiziert. Die beobachteten Differenzen auf epigenetischer Ebene können Einfluss auf Gene nehmen, die in die Immunantwort, DNA-Reparatur, Autophagozytose und weitere essentielle zelluläre Prozesse involviert sind. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch Partikelkonzentrationen unterhalb der europäischen Grenzwerte Auswirkungen auf Zellen des oberen Atemwegtrakts haben können.

Summary

The world health organization (WHO) estimates that air pollution causes 4.2 million premature deaths per year worldwide. High levels of airborne particulate matter have been associated with an increased risk of cardiovascular disease, cancer and respiratory illnesses (1). Particulate matter (PM) concentrations in Germany and Europe have been declining over the past few years, however in many places the WHO recommendations are still exceeded. For example, the maximum annual mean for PM₁₀ was exceeded at 13 % of the measuring stations in Germany in 2019, and that for PM_{2.5} at 57 % of the measuring locations (2). Since there has been increasing evidence in recent years that exposure to even relatively low concentrations of particulate matter can lead to adverse health effects, the guideline values were further tightened with the WHO global air quality guidelines published in 2021 (3).

While the effects of increased particulate matter exposure have been widely described, the biological mechanisms leading to the observed health effects are still poorly understood. This study aimed to describe epigenetic changes in the upper respiratory tract that occur in young adults under long-term exposure to elevated levels of particulate matter. An understanding of early-onset molecular changes may help to identify indicators of increased particulate matter exposure. These changes could further help to identify individuals who are at increased risk of developing a disease associated with particulate matter exposure.

Design of the study

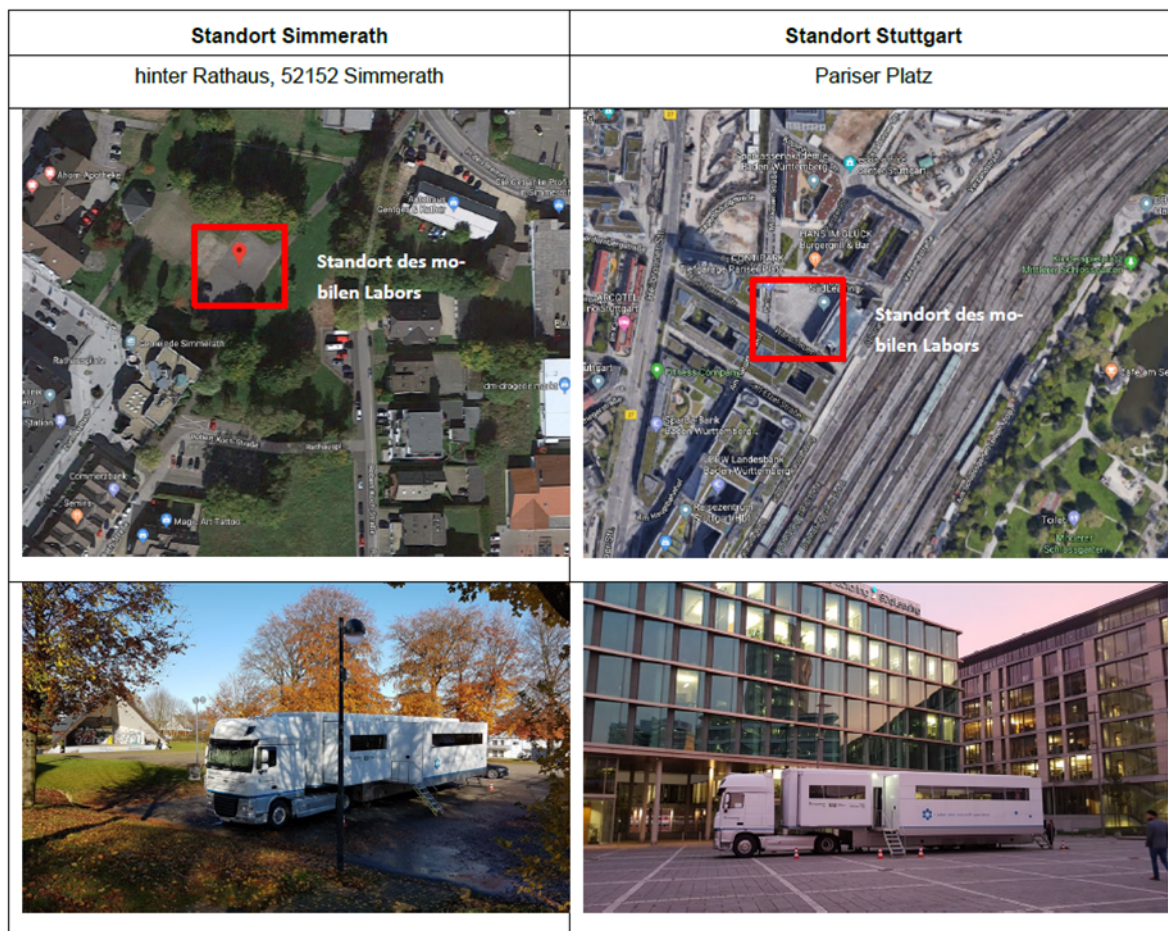
In order to identify epigenetic changes related to elevated particulate matter exposure a cohort of adults from Stuttgart (annual mean PM₁₀ in 2018 = 29 µg/m³) was compared with a similar cohort from Simmerath (annual mean PM₁₀ = 11 µg/m³). Both cohorts were comprised of young, healthy individuals (20-39 years) who live in demographically similar circumstances and yet differed in their exposure to particulate matter. Only individuals who had not smoked for at least three years and had no chronic diseases (e.g. diseases of the nose or sinuses, allergies to inhalant allergens, asthma, diabetes, or other serious diseases) were included. Treatment with anti-inflammatory drugs, pregnancy or breastfeeding were exclusion criteria.

In addition to the fine dust concentrations recorded at existing measuring stations, particle measurements were carried out at both study sites on the weekends of sampling. A detailed record of the socio-demographic characteristics, the living and working environment, as well as the health status of the participants was collected by questionnaires.

For each site, 50 participants were recruited, 30 of these were selected for the analysis of epigenetic modifications. A nasal lavage sample was obtained from all participants for epigenetic analyses. For the nasal lavage the upper airways were flushed with a saline solution to dislodge cells and cell-free particles from the nasal mucosa. In addition, blood samples were collected for future analyses.

All samples were taken on two consecutive weekends in Simmerath and Stuttgart in the mobile epidemiological laboratory (epiLab) of the Fraunhofer Institute for Biomedical Engineering (IBMT). The epiLab allowed standardized sample collection and processing on site. The locations of the epiLab in Simmerath and Stuttgart are shown in Figure 4.

Figure 4: Location of the epiLab at the study sites of Simmerath and Stuttgart



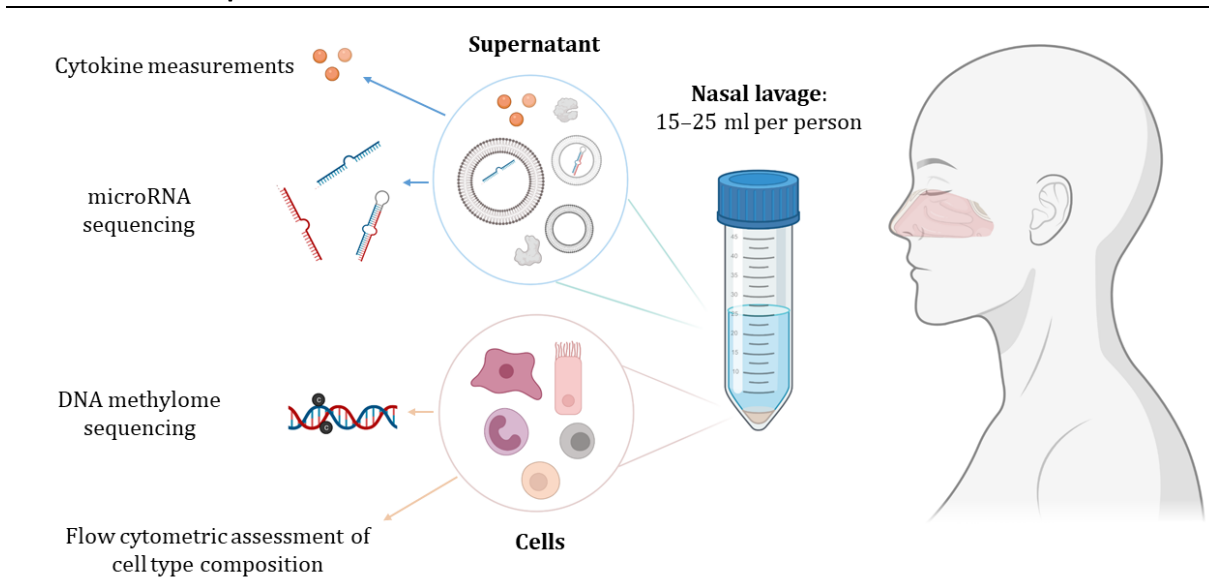
Source: Google Maps & own representation, ©IBMT, M. Bartel-Steinbach

Main focus of this project was the identification of epigenetic changes associated with particulate matter exposure. The term epigenetics refers to processes that influence gene expression (transcription) - i.e. the "activity" of genes - without changing the underlying DNA sequence. The modification of DNA by covalent binding of methyl groups leads to a modulation of gene expression through a simplified or impeded binding of transcription factors to the DNA, while microRNAs (miRNAs) have an inhibitory effect on already formed messenger RNAs (mRNAs) and can thus influence the synthesis of proteins. These two epigenetic layers were investigated in cells and in cell-free supernatant of the nasal lavage, respectively (Figure 5).

The composition of nasal lavage is individually different and can change due to external influences. Therefore, the types and proportions of epithelial cells and different immune cell populations in nasal lavage were determined. The identified cell proportions in the nasal lavage were used to adjust the methylome data to take cell composition-dependent changes into account.

Exposure to particulate matter has already been described as a trigger of inflammatory processes. Therefore, in addition to the epigenetic level, we also measured inflammatory mediators, so-called cytokines, in nasal lavage.

Figure 5: Schematic overview of the analyses conducted with nasal lavage cells and supernatant



Source: own representation, BIH

Sample collection

Flyers, direct approaches in public spaces and information in social networks were used to recruit $n=50$ people in Simmerath and $n=51$ people in Stuttgart for the study. Further information about the study and the opportunity to register for sampling were provided via an online acquisition tool. Only those participants who fulfilled the inclusion and exclusion criteria in the registration process, which were recorded via an online questionnaire, received an appointment for sampling.

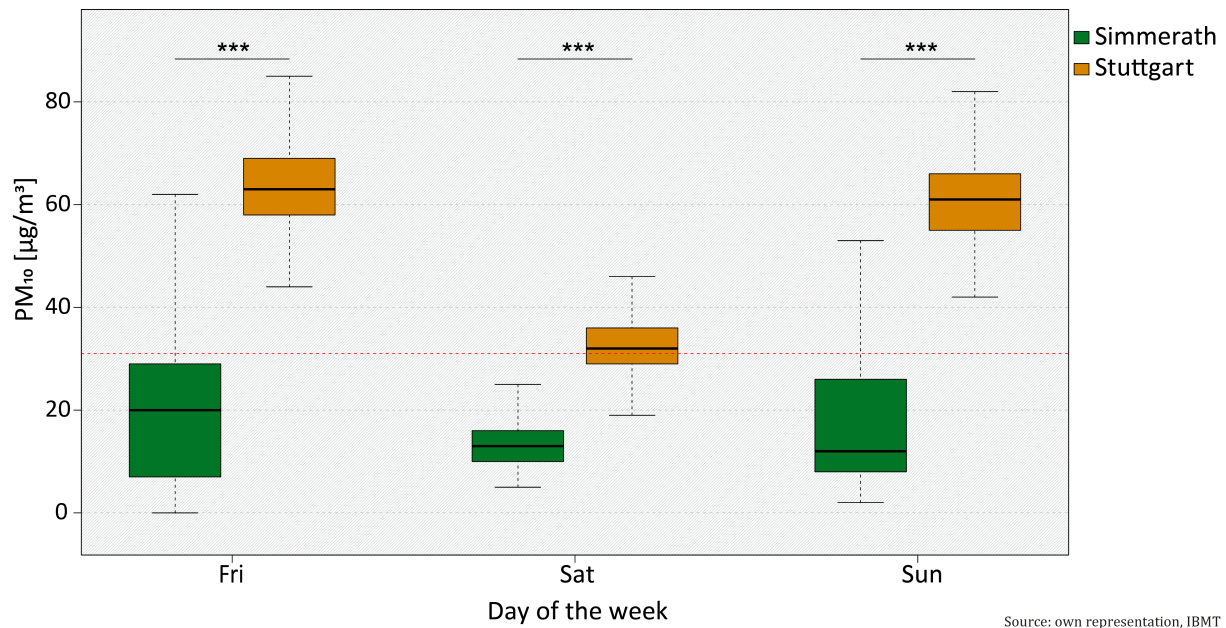
The number of people who actually appeared for sampling was slightly lower than the number who originally registered. As such 48 nasal lavage samples were obtained in Simmerath and 43 in Stuttgart. The nasal lavage samples were separated into cells and the cell-free supernatant in the epiLab. The cells were counted and a predetermined number of cells were taken for cell composition analyses. The remaining cells were stored at -80°C and sent to the Berlin Institute of Health (BIH) for further processing. The blood samples obtained in the epiLab were processed according to the recommendations of the *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* and also stored for further analyses.

Particle measurements

The measurements of PM_{10} concentrations were conducted at both sampling sites on three consecutive days each and at five different sites covering the residential environment of the participants. The assumption that participants from Stuttgart are exposed to higher concentrations of particulate matter could be confirmed with these measurements. Figure 6 shows the summary of the daily values of all measurement sites for Simmerath and Stuttgart.

Both in the comparison of the individual days and for all measurement time points, significantly higher PM_{10} concentrations were measured in Stuttgart (mean value of all three days and locations $53.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$) than in Simmerath ($16.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$, cf. Table 7).

Figure 6: Measured particle concentrations (PM₁₀) on three consecutive days in Simmerath & Stuttgart



The boxplots represent particulate matter concentrations at both study sites on three consecutive days (Friday to Sunday). The boxes represent the 25-75% quantiles and median is represented by a black line. Whiskers depict 1.5 times of the interquartile range. Red dotted line: global median; *** p -value < 0.001 (Mann-Whitney U test).

Questionnaire evaluation

The participants answered a total of 81 questions regarding their health, living environment and lifestyle. The questionnaire analysis showed that the two cohorts from Simmerath and Stuttgart had a similar distribution in terms of age, gender, income and body mass index (BMI).

Differences were found in characteristics that were not unexpected in a comparison of urban and rural populations. For example, the proportion of married study participants was higher in Simmerath than in Stuttgart, while the proportion of university or technical college graduates was lower in Simmerath than in Stuttgart.

Other significant differences were observed in the living environment; for example, more people in Stuttgart stated that they lived adjacent to a street canyon² or observed congestion in front of their home. Differences like these are strongly related to particulate matter exposure and are probably part of the factors contributing to the increased fine dust concentrations in Stuttgart.

DNA methylation

Genomic DNA was isolated from the cells of the nasal lavage and processed using a methylation-sensitive, enzymatic procedure that allowed the distinction of methylated and non-methylated cytosines by genome-wide sequencing. In order to determine methylation differences between the participants from Stuttgart and Simmerath, age, sex and the cell composition detected by flow cytometry were taken into account as confounding variables. Two different algorithms were used to examine the differentially methylated regions (DMRs). The intersection of both approaches was used for further analyses. Thus, a total of 147 DMRs could be identified. About

² Street canyon stands for a predominantly closed row of houses on both sides of the street of at least 100 m in length.

half of the DMRs were located in regulatory regions of the genome, i.e. areas that are known to influence gene expression.

Using pathway enrichment analysis, the genes associated with DMRs were shown to be involved in several essential cellular processes: DNA repair mechanisms and the regulation of transcription, cell cycle or immune response. In addition, genes that play a role in the oxidative stress response and genes that belong to the HOX transcription factor family were identified. An altered methylation of HOX genes has already been described in newborns after increased prenatal exposure to particulate matter and was also observed in the context of an exposure study investigating the influence of diesel exhaust particles and allergens on bronchial epithelial cells (4, 5). However, it is still unclear which function HOX genes assume in connection with particulate matter exposure. Further genes identified were involved in immune responses, which is in line with other studies, describing systemic inflammatory processes in relation to fine dust exposure (6, 7).

MicroRNAs

In addition to DNA methylation, miRNAs were investigated in the cell-free supernatants of the nasal lavage. Using ultrafiltration, nanoparticles in a size range of approx. 3 to 220 nm were enriched to select extracellular vesicles, which are known carriers of miRNA. The miRNAs were then isolated from the concentrate and sequenced. In total, 550 different miRNA species could be detected.

A comparison between the two study sites showed a significantly lower expression of the miRNA miR-486-5p in the participants from Stuttgart. Deregulation of miR-486-5p has been observed in various tumors but has also been described in connection with fine dust exposure. Further analyses showed that many of the target genes putatively affected by differential expression of miR-486-5p are part of the PI3K/AKT signaling pathway. PI3K/AKT is an intracellular signal transduction pathway which influences essential cellular processes, such as cell growth, proliferation, apoptosis or immune response mechanisms, in response to growth factors, cytokines and other molecules (8, 9). This study shows that elevated concentrations of particulate matter, even those within legal limits, can lead to differential miRNA expression.

Cytokine measurements

In addition to miRNA sequencing, the concentrations of 11 chemotactic, pro-inflammatory chemokines (a subgroup of cytokines) were determined in the cell-free supernatant. For this purpose, a bead-based flow cytometry based method was used, which allows for simultaneous and sensitive determination of several cytokines from one sample.

The adjusted linear regression model showed a significant influence of the location for CCL2 (MCP-1). However, the observed difference in CCL2 concentrations between the nasal lavage samples from Simmerath and Stuttgart is small. The male participants (n = 37) from Stuttgart showed significantly increased CCL2 concentrations compared to the samples of the male participants from Simmerath. CCL2 promotes the recruitment of monocytes in response to inflammatory signals or oxidative stress. Higher levels of CCL2 have also been recorded in plasma samples under particulate matter exposure (10).

Conclusion

This study assessed the mechanisms of particulate matter exposure at the epigenetic level. In a cohort study, nasal lavage samples from the upper respiratory tract were used to investigate the effects of particulate matter. Participants with increased exposure to particulate matter were compared with less exposed individuals. The results of our study showed epigenetic changes associated with particulate matter exposure in both DNA methylation patterns and microRNA expression profiles. In addition, differences in the cytokine profiles of participants were identified. The changes at the epigenetic level may influence genes involved in immune response, DNA repair, autophagy and other essential cellular processes. The results suggest that even particle concentrations below the European guidelines can have an impact on cells of the upper respiratory tract.

1 Einleitung

1.1 Einfluss von Feinstaub auf die menschliche Gesundheit

Eine erhöhte Feinstaubbelastung kann verschiedene negative Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit haben: Beeinträchtigung der Atemwege, des Herz-Kreislauf-Systems, des Stoffwechsels und auch erhöhte Sterblichkeitsraten werden im Zusammenhang mit Luftverschmutzung beobachtet. Auch die Wirkung von Langzeit-Feinstaubbelastung auf das Nervensystem, den Atemwegstrakt und die Entstehung von Tumorerkrankungen wurde in dem 2019 erschienenen *Integrated Science Assessment for Particulate Matter* der Umweltschutzbehörde der USA als *wahrscheinlich kausal* bewertet (11).

Dass Feinstäube Einfluss auf die Gesundheit des Menschen nehmen, ist kaum umstritten, noch nicht gänzlich geklärt ist jedoch, welche biologischen Mechanismen den beobachteten Krankheitsausprägungen zugrunde liegen. Die Identifikation der Mechanismen kann letztlich dazu dienen, Früherkennungsmerkmale zu bestimmen. Diese können als Marker genutzt werden, zum einen, um die Effizienz von Maßnahmen zur Feinstaubreduktion zu überprüfen und zum anderen, um eine schadhafte Auswirkung von Feinstäuben anzuzeigen, möglicherweise schon bevor gesundheitliche Beeinträchtigungen entstehen.

1.2 Epigenetik

Der Begriff Epigenetik beschreibt zelluläre Prozesse, die Einfluss auf die Aktivität von Genen nehmen ohne deren zugrundeliegende DNA-Sequenz zu verändern. Dazu gehören Histon-Modifikationen (Modifizierung der Proteine, um welche die DNA im Zellkern gewickelt ist), die DNA-Methylierung und die Expression von nicht codierenden RNAs, wie z.B. microRNAs (miRNAs) (12).

Als DNA-Methylierung wird die Modifikation von Cytosin-Basen der DNA durch die kovalente Bindung von Methylgruppen bezeichnet. Diese tritt beim Menschen und anderen Säugetieren überwiegend im Kontext von Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotiden (CpGs) auf (13). Ist der Anfangsbereich (Transkriptionsstart bzw. Promoter) eines Gens methyliert, geht das mit einer verringerten Expression des betroffenen Gens einher. Je nach dem wo im Genom sich der methylierte DNA-Abschnitt befindet, kann dies auch zu einer erhöhten Gen-Aktivität führen. So kann über DNA-Methylierung in Abhängigkeit von Umweltsignalen die Expression von Genen und somit die Synthese von Proteinen gesteuert und beeinflusst werden (14).

MiRNAs nehmen ebenfalls Einfluss auf die Menge der verfügbaren Proteine. MiRNAs können mit anderen RNAs wechselwirken und so die Translation in ein Protein verhindern. Ist die Sequenz einer miRNA zu einer *messenger* RNA (mRNA) komplementär, d.h. die Basen der beiden RNA Spezies können eine Bindung eingehen, kann dies dazu führen, dass die mRNA abgebaut wird und so das entsprechende Protein nicht mehr synthetisiert werden kann. Somit kann die Menge der verfügbaren miRNAs in einer Zelle Einfluss darauf nehmen, welche Proteine bevorzugt und welche in weniger hohen Mengen produziert werden (15). Die Menge und Art der Proteine, die sich in einer Zelle, einem Gewebe, einem Organ oder einem Organismus befinden, bestimmen den Phänotyp und können entscheidend für die Ausbildung bestimmter Krankheitsbilder sein.

Auch im Zusammenhang mit Feinstaubbelastung wurden bereits epigenetische Veränderungen beschrieben. Einige Studien zeigten epigenetische Veränderungen in humanen Blutzellen, die langfristig höheren Feinstaubkonzentrationen ausgesetzt waren (16-18). *In vitro* Versuche in Lungenepithelzellen zeigten, dass Feinstaubexposition zu einer Hypermethylierung des Gens *P53* (19), sowie zu einer differentiellen Expression von miRNAs (20) führen kann.

1.3 Was ist Feinstaub?

Feinstaub-Partikel sind Teilchen verschiedenen Ursprungs, die nicht direkt zu Boden sinken, sondern für eine gewisse Zeit als Aerosol in der Luft verbleiben. Zu den elementaren Bestandteilen von Feinstaub zählen Kohlenstoffverbindungen, Ammonium-, Sulfat- und Nitrat-Ionen sowie Schwermetalle. Feinstaub kann auf natürliche Weise entstehen, beispielsweise durch Waldbrände oder Vulkanausbrüche. Der Großteil der Feinstäube entsteht jedoch durch menschliches Handeln. Zu den Hauptentstehungsquellen zählen der Kraftfahrzeugverkehr, Industrieprozesse, Öfen und Heizungen in Wohnhäusern sowie die landwirtschaftliche Tierhaltung, bei der hohe Mengen an Ammoniak freigesetzt werden, welches mit anderen Luftschadstoffen reagiert und Feinstaub bildet (21, 22).

Feinstaub ist demnach ein komplexes Gemisch unterschiedlicher Substanzen und wird anhand der Größe der Partikel in Untergruppen unterteilt. Die Partikelgröße ist ausschlaggebend dafür, wie weit Teilchen beim Einatmen in die menschliche Lunge vordringen können. Partikel mit einem Durchmesser von 10 µm werden meist bereits in den Nasenschleimhäuten abgefangen, während Partikel < 1 µm bis in die Alveolen vordringen und von dort in den Blutkreislauf übergehen können (23). Deswegen werden Partikel meist in PM₁₀ und dessen Teilmenge PM_{2.5} unterteilt, also Partikel (engl. *particulate matter*, PM) mit einem durchschnittlichen aerodynamischen Durchmesser von 10 bzw. 2,5 µm und weniger.

1.4 Ziel der Studie

Die Feinstaubbelastung in Deutschland hat im Laufe der letzten 30 Jahre deutlich abgenommen, im Jahr 2019 konnte der PM₁₀-Grenzwert erstmals an allen Messstandorten in Deutschland eingehalten werden (24). Allerdings liegt der europäische PM₁₀-Grenzwert mit 40 µg/m³ im Jahresmittel mehr als doppelt so hoch wie der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfohlene Grenzwert. Dieser lag bei Beginn dieser Studie bei 20 µg/m³ und wurde mit den 2021 veröffentlichten Luftqualitäts-Richtlinien auf 15 µg/m³ PM₁₀ im Jahresdurchschnitt verschärft (3, 25). Zudem muss davon ausgegangen werden, dass auch Feinstaub-Konzentrationen unterhalb festgelegter Grenzwerte zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen können (26).

In Deutschland gibt es trotz der bundesweiten Einhaltung der Grenzwerte deutliche regionale Unterschiede in der Feinstaubbelastung. Dies sollte in dieser Studie genutzt werden, um zwei verschiedenen stark belastete und dennoch demografisch ähnliche Kohorten hinsichtlich ihrer potentiell feinstaubassoziierten Veränderungen zu charakterisieren.

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Auswirkung von erhöhter Feinstaubbelastung auf das menschliche Epigenom. Für die Bestimmung epigenetischer Veränderungen wurde Nasallavage von den Teilnehmenden gewonnen, um Zellen und zellfreie Partikel des oberen respiratorischen Trakts zu untersuchen – dem Bereich des Körpers, der als erstes mit der Noxe Feinstaub in Kontakt tritt.

Die Zellen der Nasallavage wurden verwendet, um mittels Methylom-Sequenzierung genomweite Unterschiede im DNA-Methylierungsmuster zwischen den zwei Personengruppen zu identifizieren. Ein zellfreier Überstand wurde nach Zentrifugation und Sedimentierung der Zellen aus der Nasallavage gewonnen, dieser kann Zytokine, zellfreie DNAs und RNAs, Proteine sowie extrazelluläre Vesikel (EVs) enthalten. EVs werden von nahezu allen Zellen produziert, enthalten Proteine, Lipide und nicht-codierende RNAs, wie z.B. miRNAs, aus ihrer Ursprungszelle und dienen mutmaßlich der Zell-Zell-Kommunikation (27). Im Rahmen dieser Studie wurden EV-assoziierte miRNAs aus Nasallavageüberständen isoliert und analysiert. Diese miRNAs können Aufschluss über eine feinstaubabhängige Modulation der Genexpression auf

mRNA-Ebene geben. Darüber hinaus wurden im zellfreien Überstand der Nasallavage Zytokine bestimmt, eine Gruppe von Proteinen, die ebenfalls der Signalübertragung zwischen Zellen dienen und Einfluss auf Zell-Differenzierung und -proliferation nehmen, vor allem im Rahmen von Entzündungsreaktionen (28). So sollten epigenetische und immunologische Unterschiede im oberen Atemtrakt der untersuchten Personen ermittelt werden, die als mögliche Indikatoren für eine hohe Feinstaubbelastung dienen können.

Zusätzlich sollten von allen Teilnehmenden Blutproben gewonnen und soweit aufgearbeitet werden, dass diese für gegebenenfalls nachfolgende (epigenetische) Analysen genutzt werden können.

2 Studiendesign

Zu Beginn des Projektes erfolgte die Rekrutierung von zwei Personenkollektiven mit ausgeglichenem Geschlechterverhältnis im Alter von 20-39 Jahren, die in ihrem täglichen Lebensumfeld einer hohen bzw. niedrigen Feinstaubbelastung ausgesetzt sind.

2.1 Auswahl der Probenahmestandorte

Der eigentlichen Rekrutierung ging die Auswahl geeigneter Probenahmestandorte voraus. Zur Auswahl der Probenahmestandorte wurden anhand der von den Messnetzen der Länder bereitgestellten Daten zur Feinstaubbelastung solche Standorte ausgewählt, die aufgrund der mittleren jährlichen Feinstaubbelastung, im Sinne dieser Studie, als belastet (PM_{10} Jahresmittelwert $> 25 \mu g/m^3$) und solche, die aufgrund einer Feinstaubbelastung als unbelastet (PM_{10} Jahresmittelwert $< 15 \mu g/m^3$) betrachtet werden können. Als Bezugsjahr der mittleren Feinstaubbelastung dienten hierbei die Jahre 2017 und 2018 (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: PM_{10} -Konzentrationen in den Jahren 2017 und 2018 an den für die Rekrutierung ausgewählten Standorten Stuttgart und Simmerath

Bundesland	Stations-code	Messnetz	Stations-umgebung	Art der Station	Jahr	Jahresmittelwert in $\mu g/m^3$	Zahl der Tageswerte $> 50 \mu g/m^3$
Baden-Württemberg	DEBW118	Stuttgart (SG) Am Neckartor	Städtisches Gebiet	Verkehr	2017	35	45
					2018	29	21
Nordrhein-Westfalen	DENW064	Simmerath (SR) (Eifel)	Ländlich regional	Hintergrund	2017	9	0
					2018	11	0

Quelle: Umweltbundesamt - Luftdaten Jahresbilanzen

In enger Abstimmung mit dem UBA wurde als Standort für die Rekrutierung hochbelasteter Teilnehmerinnen und Teilnehmer Stuttgart (Baden-Württemberg) im Bereich der Messstation am Neckartor ausgewählt mit einem Jahresmittelwert von 35 bzw. 29 $\mu g/m^3$ PM_{10} -Konzentration für die Jahre 2017 und 2018 und zur Rekrutierung niedrig belasteter Teilnehmenden die Gemeinde Simmerath (Nordrhein-Westfalen) mit einem Jahresmittelwert von 9 bzw. 11 $\mu g/m^3$ PM_{10} -Konzentration für die Jahre 2017 und 2018.

2.2 Rekrutierung

Die Teilnahme an der Studie war aufgrund der Fragestellung an Kriterien gebunden, deren Erfüllung von allen Teilnehmenden im Vorfeld zur Studie während der Online-Registrierung anhand eines „Ausschluss-Fragebogens“ erfasst wurde. Um möglichen Verzerrungen der Ergebnisse entgegenzuwirken, wurden folgende Ein- bzw. Ausschlusskriterien definiert:

► Einschlusskriterien

- Alter: 20-39 Jahre
- seit mindestens 3 Jahren nicht rauchend

- seit Anfang 2018 an der jetzigen Wohnstätte wohnhaft
 - Wege zwischen Wohnstätte und Arbeitsplatz < 30 Minuten
 - keine berufliche Exposition gegenüber Feinstäuben
- Ausschlusskriterien
- Schwangerschaft oder Stillzeit
 - Gleichzeitige Teilnahme an einer klinischen Studie
 - Allergien gegenüber Inhalationsallergenen
 - Asthma
 - Erkrankungen von Nasen und Nasennebenhöhlen
 - Therapie mit entzündungshemmenden Medikamenten in den letzten 6 Wochen
 - Diabetes
 - Erkrankungen des Herzens oder der Lunge
 - Tumorerkrankungen
 - sonstige schwerwiegende Erkrankungen

Nach Festlegung der Teilnahmekriterien erfolgte die Rekrutierung an den beiden Standorten Stuttgart und Simmerath. Um auf die geplante Studie aufmerksam zu machen, wurden ein Flyer und Poster entworfen, die zunächst im Umfeld der beiden Messstationen verteilt bzw. an geeigneten Stellen aufgehängt wurden. In Stuttgart wurde sich zunächst auf Bewohner des Kernerviertels konzentriert.

Da sich daraufhin lediglich 9 Personen in Stuttgart und 12 Personen in Simmerath über das Online-Portal angemeldet haben, wurde mehrfach durch Mitarbeiter des IBMT vor Ort rekrutiert und zusätzlich über soziale Netzwerke bzw. die Presse auf die Studie aufmerksam gemacht. Zudem wurde der Rekrutierungsbereich in Stuttgart auf folgende Viertel im Zentrum von Stuttgart ausgeweitet: Oberer Schlossgarten / Hauptbahnhof / Stöckach / Heusteigviertel. Mit Erfolg dieser Maßnahmen konnten an beiden Standorten die geforderten 50 Personen rekrutiert werden.

Zur Registrierung der Studienteilnehmenden wurde vom Fraunhofer IBMT ein Online-Akquise-Tool (siehe Abbildung 7) entwickelt und betrieben. Eine angegliederte Datenbank wurde auf dem Server des IBMT betrieben und vom IBMT gepflegt. Sie wurde so konzipiert, dass den Erfordernissen des Datenschutzes, insbesondere des §9 BDSG inklusive deren Anlage und der Datenschutz-Grundverordnung, Rechnung getragen wurde. Grundsätzlich wurden hier nur so wenige persönliche Daten erhoben wie notwendig (Prinzip der Datensparsamkeit). Aspekte zur Datenverarbeitung und -speicherung wurden jeweils in Verträgen zur Auftragsdatenverarbeitung gemäß Art. 28, DS-GVO zwischen Auftragnehmern und Auftraggebern geregelt.

Abbildung 7: Online-Akquise-Tool, das unter der Adresse www.feinstaub.fraunhofer.de betrieben wurde.

Bitte beantworten Sie die unten gestellten Fragen, um festzustellen, ob Sie die Teilnahmevoraussetzungen der Studie erfüllen.

Einschlusskriterien

- Alter: **20 - 39 Jahre** ☐ Ja ☐ Nein
- Seit mindestens 3 Jahren **Nichtraucher** ☐ Ja ☐ Nein
- Seit **Anfang 2018** an jetziger Wohnstätte wohnhaft ☐ Ja ☐ Nein
- Wege zwischen Wohnstätte und Arbeitsplatz **< 30 Min** ☐ Ja ☐ Nein
- keine berufliche Exposition** gegenüber Feinstäuben ☐ Ja ☐ Nein

Ausschlusskriterien

- Schwangerschaft oder stillend ☐ Ja ☐ Nein
- Gleichzeitige Teilnahme an klinischen Studien ☐ Ja ☐ Nein
- Allergie gegen Inhalationsallergene (z.B. Pflanzenpollen, Schimmelpilze (Sporen), Hausstaubmilben (Exkreme), Tierhaare) ☐ Ja ☐ Nein
- Erkrankungen von Nase und Nasennebenhöhlen (z.B. Nasenseidewandverkrümmung, Nasenmuschelhyperplasie, medikamentöser Schnupfen) ☐ Ja ☐ Nein
- Therapie mit **entzündungshemmenden Medikamenten** in den **letzten 6 Wochen** (z.B. mit Wirkstoffen wie Ibuprofen, Paracetamol, Naproxen, Piroxicam oder Felbinac) ☐ Ja ☐ Nein
- Diabetes ☐ Ja ☐ Nein
- Erkrankungen des Herzes ☐ Ja ☐ Nein

Interessierte Personen, die auf die Studie aufmerksam wurden, konnten auf der Homepage des Akquise-Portals generelle Informationen zu den Hintergründen und Zielen der geplanten Studie sowie Informationen zum Ablauf der Probenahme finden. Auf der Startseite dieses Tools wurde zunächst erneut über die Studie informiert. Im Anschluss wurden die dargestellten Ein- und Ausschlusskriterien abgefragt und so die Eignung der jeweiligen Person für die Studie überprüft. Erst wenn diese erfüllt wurden, war eine Registrierung zur Studie möglich.

Nach erfolgter Registrierung erhielten die Teilnehmenden im Vorfeld der Probenahme ein Paket mit Informationsmaterialien zur Studie und zum Datenschutz. Des Weiteren enthielt das Paket einen Fragebogen und Aktivitätsprotokolle, die von den Teilnehmenden im Vorfeld auszufüllen waren, diese werden unter 2.3 genauer erläutert.

Die Unterlagen zur Aufklärung der Studienteilnehmenden wurden gemeinsam von IBMT und BIH erstellt und umfassten folgende Dokumente:

- ▶ Informationsblatt zur Studie
- ▶ Einwilligungserklärung
- ▶ Erklärung zum Datenschutz
- ▶ Datenschutzrichtlinie für die Projekt-Webseite

Alle Teilnehmenden wurden über Infoblätter und Erläuterungen auf der Online-Akquise-Seite ausführlich über die Ziele und Inhalte der Studie informiert und hatten zudem die Möglichkeit über eine Hotline Fragen zu stellen. Hierzu wurden entsprechende Ansprechpartner mit Telefonnummern auf den Informationsmaterialien genannt. Um die allgemeine Teilnahmebereitschaft zu erhöhen, wurde allen Teilnehmenden eine Aufwandsentschädigung in Höhe von 100 € in bar angeboten.

Die Unterlagen für den Ethikantrag wurden gemeinsam von IBMT und BIH erstellt und durch IBMT fristgerecht am 22. Februar 2019 erstmals bei der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes eingereicht. Eine positive finale Entscheidung wurde auf der Sitzung der Ethikkommission des Saarlandes am 18.07.2019 für die Durchführung der Studie getroffen.

2.3 Entwicklung eines Fragebogens zur Erhebung soziodemografischer Daten

Um auszuschließen, dass es Verhaltens- oder Umgebungsunterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen gibt, die Einfluss auf das Studienergebnis haben könnten, wurden soziodemografische Daten der Teilnehmenden erhoben.

In enger Abstimmung zwischen IBMT, BIH und UBA wurde ein projektspezifischer Fragebogen entwickelt, der den Teilnehmenden im Vorfeld der eigentlichen Probenahme in Papierform zugesandt wurde. Die finale und komplette Fassung des Fragebogens ist im Anhang dieses Berichts unter Anhang A1 zu finden.

Der Fragebogen beinhaltete sowohl Fragen zu Verhaltensweisen und Umweltbedingungen der Teilnehmenden, als auch Fragen zu persönlichen Verhältnissen und dem Gesundheitszustand. So wurden unter anderem Geschlecht, Gewicht und Größe der Teilnehmenden erfasst, sowie Angaben zur Berufstätigkeit, Einkommen und Familienstand. Außerdem wurden Informationen zur Wohnsituation und -umgebung erhoben, wie beispielsweise die Verkehrsbelastung am Wohnort, Beschaffenheit der Böden und Wände, Art der Heizmöglichkeiten und das Vorhandensein von Haustieren. Zudem sollten Angaben zu Arbeitsweg und -ort gemacht werden (genutztes Verkehrsmittel, Länge des Arbeitsweges, Lage der Arbeitsstätte etc.). Weitere Fragen befassten sich mit dem Gesundheitszustand der Teilnehmenden und erfasste unter anderem Angaben zu früherem Rauchverhalten, Häufigkeit und Art sportlicher Aktivitäten, Anzahl von Erkältungserkrankungen in den letzten 12 Monaten und zur Einnahme von Medikamenten.

Zusätzlich zu den Fragen war von allen Teilnehmenden ein Aktivitäts- und ein Innenraumprotokoll auszufüllen. Diese enthielten Angaben für jeden der letzten 7 Tage vor der Probenahme, unter anderem zu Aufenthaltszeiten in der Arbeitsstätte, zu Hause und im Freien, sowie zu Aufsteh- und Bettgehzeiten. Im Innenraumprotokoll sollte außerdem angegeben werden, wie viel Zeit die Teilnehmenden an den jeweiligen Tagen z.B. mit Essen kochen, Staubsaugen oder dem Aufenthalt vor einem offenen Kamin bzw. mit einer brennenden Kerze im Raum verbrachten, also Tätigkeiten, die ebenfalls zur Partikelbelastung beitragen können.

Die Studienteilnehmenden wurden gebeten, den ausgefüllten Fragebogen und die Einwilligungserklärung (Informed Consent) zu Ihrem Probenahmetermin mitzubringen.

Während der Probenahme wurden die jeweiligen Fragebögen und die Einwilligungserklärungen an IBMT-Personal übergeben, auf Vollständigkeit und Plausibilität geprüft und die entsprechende Identifikationsnummer eingetragen, diese entspricht einer einzigartigen Kennung jeder Teilnehmerin und jedes Teilnehmers. Im Anschluss erfolgte die Digitalisierung der Daten durch das IBMT qualitätsgesichert im Vieraugenprinzip und die Übermittlung der pseudonymisierten Daten an das BIH zur Datenauswertung. Die Datenhaltung teilnehmerinnen- und teilnehmerbezogener Daten erfolgte getrennt von den personenbezogenen Daten (Adressdaten).

3 Partikelmessungen und Probenahme

3.1 Probenahme-Logistik

Die Durchführung der Probenahmen fand an zwei aufeinanderfolgenden Wochenenden im November 2019 statt:

- ▶ Simmerath (08.-09.11.2019)
- ▶ Stuttgart (15.-16.11.2019)

Die Probenahme wurde an beiden Standorten im mobilen epidemiologischen Labor (epiLab) des Fraunhofer IBMT durchgeführt, wodurch die Sammlung, das Einfrieren und die Erstcharakterisierung von Humanproben mit einer mobilen und hoch standardisierten Plattform realisiert werden konnten.

Zur Gewährleistung einer störungsfreien Probenahme wurden organisatorische Vorarbeiten geleistet. Für jeden Standort wurde ein Stellplatz organisiert, die notwendigen Genehmigungen eingeholt sowie die Prüfung und Organisation der technischen und logistischen Gegebenheiten vor Ort, wie Stromversorgung, durchgeführt. Zudem wurde die Entsorgung des während der Probenahme anfallenden, teils potentiell infektiösen Abfalls organisiert. Der Aufbau und die Einrichtung des epiLabs erfolgte an beiden Standorten jeweils freitags vor der eigentlichen Probenahme.

An beiden oben genannten Tagen wurde jeweils im Zeitraum von 9-14 Uhr im 20 Minuten-Takt von je 2 Studienteilnehmenden Nasallavage- und Blutproben gewonnen. Zudem wurden einige Aspekte zum aktuellen Gesundheitszustand mit einem Kurzfragebogen ermittelt. Hierbei wurde erfasst, ob eine aktuelle Erkältung besteht, ob momentan ein Nasenspray verwendet wird und ob bzw. welche Medikamente derzeit oder in den vorausgehenden Wochen eingenommen wurden. Außerdem wurden die Fragebögen, die den Teilnehmenden im Vorfeld zugesendet wurden (siehe 2.3), am Tag der Probenahme entgegengenommen und von wissenschaftlichen Mitarbeitenden des IBMT auf Vollständigkeit und Plausibilität geprüft.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Anzahl an rekrutierten und tatsächlichen Teilnehmenden der jeweiligen Probenahmestandorte.

Tabelle 2: Übersicht über die rekrutierten und tatsächlichen Teilnehmenden an den Probenahmestandorten

Ort	Datum der Probenahme	Anzahl angemeldeter Personen	Tatsächliche Anzahl an Teilnehmenden	Anzahl Frauen	Anzahl Männer
Simmerath (SR)	09.-10.11.2019	50	48	22	26
Stuttgart (SG)	16.-17.11.2019	51	43	19	24

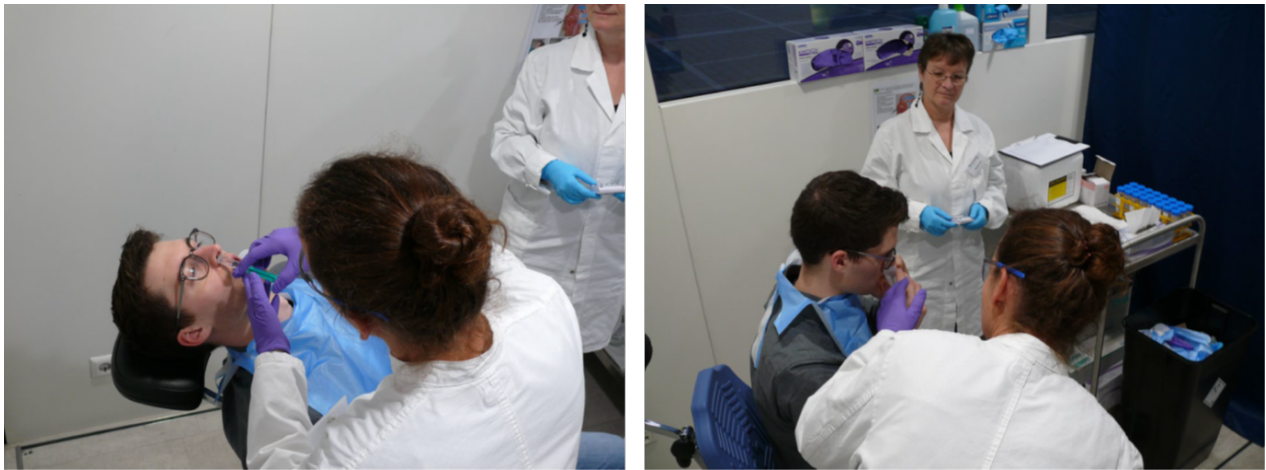
3.2 Probenahme Nasallavage

Die Nasallavage Probenahme erfolgte in einem abgetrennten, nicht einsehbaren Bereich des epiLabs. Mit Hilfe eines Schaubildes wurden die Teilnehmenden mit dem Verfahren der Probenahme vertraut gemacht und auf mögliche Risiken (leichte Verletzungen der Nasenschleimhaut) hingewiesen. Der Ablauf der Probenahme wurde mit jeder Teilnehmerin und

jedem Teilnehmer durchgesprochen und die Möglichkeit gegeben, Fragen zu stellen. Zudem wurde mit den Teilnehmenden vereinbart, dass durch ein Handzeichen die Natriumchlorid-Injektion unterbrochen werden kann, falls die Lösung nicht mehr in der Nase gehalten werden kann und ein Verschlucken der Kochsalzlösung droht.

Zur Probengewinnung wurden die entsprechenden Probengefäße bereitgestellt und die Probandin oder der Proband aufgefordert, den Kopf um etwa 45° nach hinten (siehe Abbildung 8) zu neigen und den Rachen mit dem Gaumensegel durch das Bilden von K-Lauten zu verschließen, um das Abfließen von Spülflüssigkeit zu verhindern. Anschließend wurden nacheinander in jedes Nasenloch 5 ml isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) langsam und stetig injiziert, während das andere Nasenloch von der beprobten Person zugehalten wurde. Nach etwa 10 Sekunden wurde die Flüssigkeit durch kräftiges Schnäuzen in ein 50 ml Röhrchen entleert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt und so im Mittel 22,6 ml Nasallavage pro Person gesammelt.

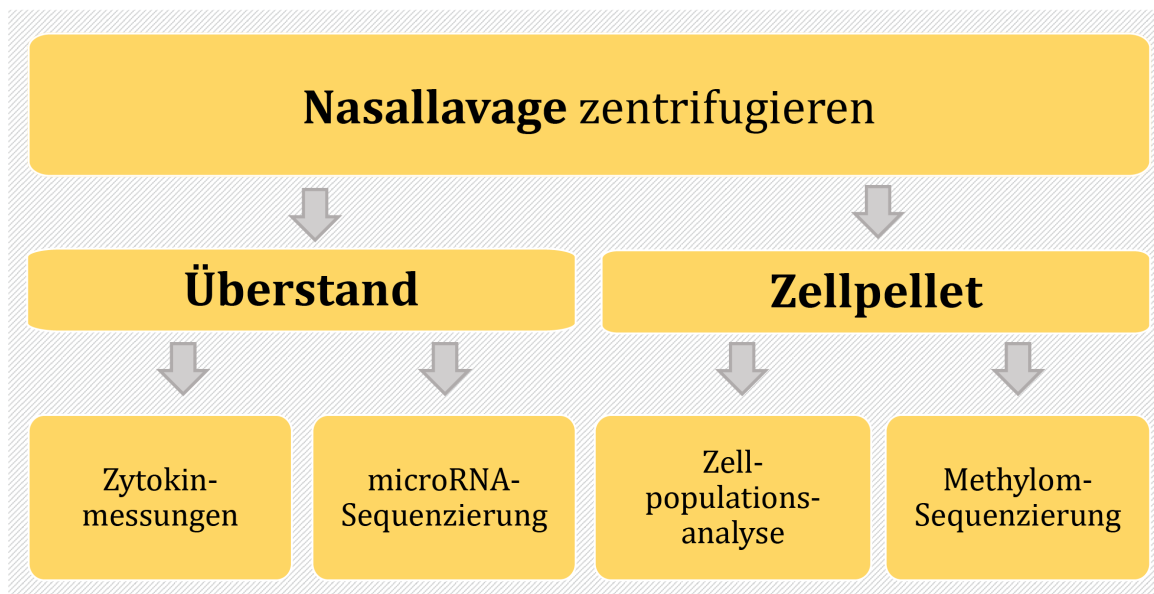
Abbildung 8: Nasallavage Probenahme



Quelle: eigene Darstellung, ©IBMT, Dominik Lermen

Die gewonnene Nasallavage wurde direkt zur Weiterbearbeitung in das Labor überführt, sodass die Proben in einer für die nachfolgenden Analysen geeigneten Art gelagert und transportiert werden konnten. Zunächst wurde der Nasallavageprobe Sputolysin zugegeben (1x konzentriert) und die Probe für 15 min bei 350 rpm geschüttelt. Alle 5 min wurde die Probe vom Schüttler genommen und mit einer Pipette gemischt, um Schleim und die darin befindlichen Zellen zu lösen. Zur Sedimentierung der Zellen aus der Nasallavage wurde anschließend für 15 min bei 4 °C und 300 x g zentrifugiert. So konnten die Zellen für die nachfolgenden Analysen von dem zellfreien Überstand getrennt werden (vgl. Abbildung 9).

Abbildung 9: Übersicht über die mit den Nasallavageproben durchgeführten Analysen



Quelle: eigene Darstellung, BIH

Der Nasallavageüberstand (ca. 15–25 ml zellfreie Flüssigkeit) wurde abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren. Das Zellpellet wurde in 0,5 ml PBS aufgenommen und mit einer 1 ml Transferpipette homogen resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 1 µl Trypanblau gemischt und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer (C-Chip) bestimmt. Anschließend wurden 40.000 Zellen für die durchflusszytometrische Analyse (5.2.1.1), und 20.000 Zellen für den Cytospin (5.2.1.2) entnommen. Die verbleibenden Zellen wurden nochmals für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und das resultierende Zellpellet für die spätere DNA-Isolation und Methylom-Sequenzierung (5.2.2) bei -80 °C eingefroren.

Die Gesamtzellzahl in der Nasallavage schwankte stark zwischen den beprobten Personen. Von den meisten Teilnehmenden konnten ausreichend hohe Zellzahlen gewonnen werden, bei manchen Proben waren jedoch nach Abnahme der Zellen für die Zellkompositionsbestimmung kaum mehr Zellen übrig. Daher ist die Anzahl der Zellpellets, die für die Isolierung genomischer DNA gewonnen werden konnten, geringer als die Gesamtzahl an Nasallavageproben (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht über die gewonnenen Nasallavageproben

Ort	Nasallavageproben insgesamt	Überstand für Isolation der miRNA	Zellpellet für Isolation der gDNA
SR	48	48	43
SG	43	43	33

3.3 Probenahme Blut

Ergänzend zur Nasallavage wurden von allen Studienteilnehmenden Blutproben gewonnen und im direkten Anschluss im BSL2-Labor des epiLabs weiterverarbeitet. Hierfür wurden die benötigten, unten aufgeführten Monovetten und Probengefäße probenspezifisch etikettiert bereitgestellt.

Die Probenahme erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI) „Collection of Diagnostic Venous Blood Specimens, 6th Edition“ (29). Pro Person wurden die folgenden Blutproben entnommen:

- ▶ 1x S-Monovette® Serum-Gel 9 ml (Sarstedt, 02.1388.001)
- ▶ 1x S-Monovette® LH 2,6 ml (Sarstedt, 04.1906.001)
- ▶ 1x S-Monovette® LH 7,5 ml (Sarstedt, 01.1608.001)
- ▶ 3x S-Monovette® K3 EDTA 1,6 ml (Sarstedt, 05.1081.001)
- ▶ 1x PAXgene®Blood RNA 2,5 ml (PreAnalytiX, 762.165)

Das Vorgehen bei der Blutentnahme ist beispielhaft in Abbildung 10 dargestellt.

Abbildung 10: Blutprobenentnahme



Quelle: eigene Darstellung, ©IBMT, M. Bartel-Steinbach

Zur vollständigen Gerinnung wurden die Serum-Monovetten nach der Probenahme 30 min aufrechtstehend bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden die Röhrchen bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert und die obere Serumphase in Kryoröhrchen (Greiner Bio-One, 127263) überführt.

Die 2,6 ml Heparin-Monovetten wurden nach der Probenahme 8-10-mal vorsichtig geschwenkt, anschließend 2 ml Heparin-Vollblut in Kryoröhrchen transferiert und bei -80 °C eingefroren. Die 7,5 ml Heparin-Monovetten wurden zentrifugiert, die obere Plasma-Phase für die weitere Lagerung in Kryoröhrchen überführt und ebenfalls bei -80 °C eingefroren.

Je eine EDTA-Monovette wurde für die Erstellung des Differentialblutbildes an das beauftragte Labor weitergeleitet (siehe 5.1.1). Je eine EDTA-Monovette war für die Isolierung genomischer DNA bestimmt und wurde direkt bei -80 °C eingefroren.

Die PAXgene®-Röhrchen wurden entsprechend den Hersteller-Angaben zwei Stunden bei Raumtemperatur aufrecht gelagert bevor sie bei -80 °C eingefroren wurden. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der Anzahl der gewonnenen Blutproben.

Tabelle 4: Übersicht über die gewonnenen Blutproben

Ort	Serum	EDTA-Vollblut	Heparin-Vollblut	Heparin-Plasma	PAXgene
SR	47	48	47	46	46
SG	43	43	43	43	43

Die Serum-, EDTA-Blut- sowie die PAXgene®-Röhrchen wurden zusammen mit den Nasallavagezellpellets und Nasallavageüberständen wenige Tage nach der Probenahme an das BIH übersendet und dort bis zur weiteren Aufarbeitung ebenfalls bei -80 °C gelagert.

3.4 Feinstaubpartikelmessungen

Um die tagesaktuelle Feinstaubbelastung der Probenahmestandorte zu erfassen, wurden an den Wochenenden der Probenahme in Simmerath und Stuttgart Partikelmessungen durchgeführt. Durch die Messungen konnten die Wohnbereiche der Teilnehmenden abgedeckt und auf lokale oder temporale Unterschiede hin untersucht werden. Vergleichend wurden die bestimmten Feinstaubkonzentrationen auch den Tagesdurchschnittswerten der lokalen PM₁₀-Messstationen gegenübergestellt.

3.4.1 Messgerät und Vorgehensweise

Die Partikelmessungen wurden sowohl in Simmerath als auch in Stuttgart mit dem vom Umweltbundesamt zur Verfügung gestellten *DustTrack Aerosol Monitor* der Firma TSI (Modellnummer 8532) durchgeführt.

Vor jeder Messreihe wurde das Messgerät gemäß den Anweisungen des Herstellerhandbuchs kalibriert (Null-Filter Kalibrierung). Um eine Beeinflussung der Messungen durch große Partikel zu verhindern, wurde vor der eigentlichen Messung ein Filter, der Partikel größer als 10 µm ausschließt, auf das Einlassventil aufgesetzt.

Vor den eigentlichen Messungen wurden die Messstandorte und die Dauer der Messungen festgelegt. Am jeweiligen Standort, der für eine Messung ausgewählt wurde, wurde das Einsatzfahrzeug möglichst in 2 m Abstand vom Rand der Fahrbahn geparkt und der Motor abgestellt. Das Messgerät wurde auf dem Dach des Einsatzfahrzeugs mit dem Einlassventil in Fahrtrichtung der nächsten befahrenen Straße platziert (Höhe über dem Boden ca. 1,5 m). Im Anschluss wurde eine Serie von drei sukzessiven Messungen über je 10 Minuten durchgeführt (Gesamtmessdauer je Serie: 30 Minuten). Während diesen 10 Minuten wurde jeweils jede Sekunde die Konzentration (in µg/m³) gemessen.

3.4.2 Messstandorte und -zeiten

Die Auswahl der Messstandorte orientierte sich sowohl in Simmerath als auch in Stuttgart an der Wohnlage der Studienteilnehmenden. Die ausgewählten Messstandorte für Simmerath und Stuttgart sind in Abbildung 11 gezeigt.

Abbildung 11: Lage der Messstandorte Simmerath (links) und Stuttgart (rechts)



Quelle: Google Maps für die Kartenausschnitte von Simmerath und Stuttgart

Am Vortag der Probenahme (Freitag) und an beiden Probenahmetagen (Samstag und Sonntag) wurde in beiden Untersuchungsgebieten an jedem Messstandort (am Standort des epiLabs sowie an vier weiteren Messstandorten) je eine Messreihe (= 3 Messungen von jeweils 10 min) durchgeführt. Tabelle 5 zeigt die Messstandorte und -zeiten der Partikelmessungen in Simmerath, die Messungen für Stuttgart sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 5: PM₁₀-Messstandorte und -zeiten Simmerath

Messstandort	Breite (Dezimalgrad)	Länge (Dezimalgrad)	Messzeiten 8.11.2019	Messzeiten 9.11.2019	Messzeiten 10.11.2019
Rathaus *	50.606850	6.303325	14:55	12:15	9:10
Eicherscheid	50.580075	6.303710	15:40	11:35	9:50
Schmidt	50.659393	6.409013	16:30	10:15	10:55
Lammersdorf	50.631470	6.278340	17:15	09:30	12:00
Messstation	50.653320	6.314343	fehlt	15:40	12:45

Tabelle 6: PM₁₀-Messstandorte und -zeiten Stuttgart

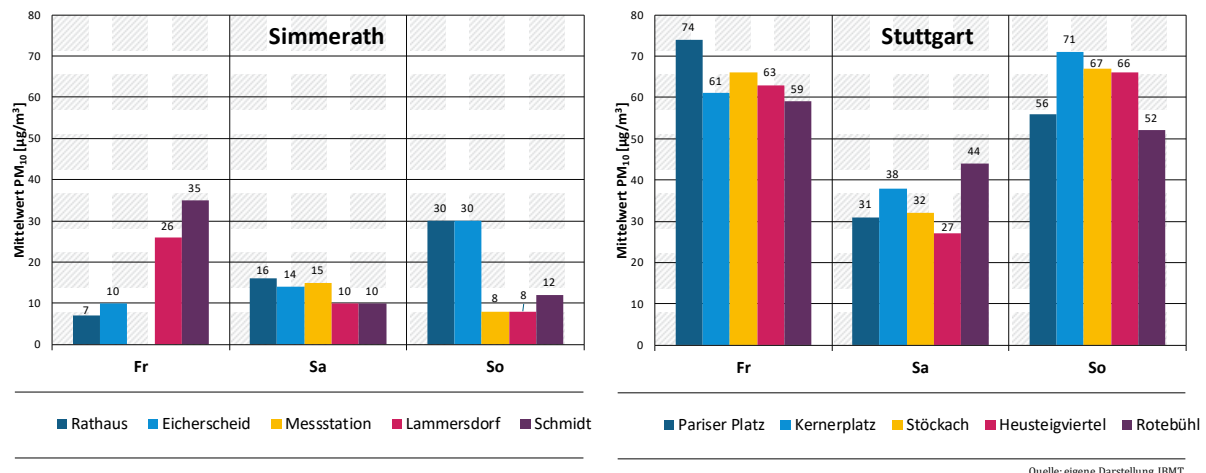
Messstandort	Breite (Dezimalgrad)	Länge (Dezimalgrad)	Messzeiten 15.11.2019	Messzeiten 16.11.2019	Messzeiten 17.11.2019
Pariser Platz *	48.7885273	9.1829881	14:10	13:10	12:10
Kernerplatz	48.7838577	9.1908601	15:30	14:10	12:45
Stöckach	48.7878614	9.1936875	16:20	14:45	13:30
Heusteigviertel	48.7707623	9.1797783	17:10	15:30	14:10
Rotebühl	48.7752037	9.1568422	17:55	16:20	14:55

* Standort des epiLabs

3.4.3 Auswertung der Partikelmessungen

Im Vorfeld der Probennahmen wurde Stuttgart aufgrund der mittleren jährlichen Feinstaubbelastung in den Jahren 2017 und 2018 im Sinne dieser Studie als hoch belasteter Untersuchungsraum und Simmerath als niedrig belasteter Untersuchungsraum ausgewählt. Diese Einstufung konnte durch die im November 2019 durchgeführten Messreihen bestätigt werden. Abbildung 12 zeigt die gemessenen Tagesmittelwerte aller fünf Messstandorte in Simmerath und Stuttgart.

Abbildung 12: Vergleich der Partikelmessungen an den Standorten Simmerath und Stuttgart



Mittlere Partikelkonzentrationen (PM₁₀) über je 30 Minuten an 3 aufeinanderfolgenden Tagen (Fr - So) an den verschiedenen Messstandorten in Simmerath (links) & Stuttgart (rechts)

Die Konzentrationen in den beiden Untersuchungsräumen unterscheiden sich signifikant (p -Wert $\leq 0,001$). Während in Stuttgart für die Partikelklasse PM₁₀ im Mittel aller Messstandorte und Tage $53,8 \pm 24,7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ gemessen wurde, liegt dieser Wert in Simmerath mit $16,5 \pm 12,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ deutlich niedriger (Tabelle 7), wobei der Vergleich durch die unterschiedlichen Messzeiträume (8.-10.11.2019 in Simmerath und 15.-17.11. 2019 in Stuttgart) limitiert ist.

Tabelle 7: Mittlere PM₁₀-Konzentrationen über alle fünf Messstandorte in Simmerath und Stuttgart über je drei Tage (Freitag bis Sonntag)

Simmerath			Stuttgart			p-Wert
Datum	AM $\pm$ STD	MD	Datum	AM $\pm$ STD	MD	
08.11.2019	19,3 $\pm$ 13,3	20	15.11.2019	64,5 $\pm$ 12,4	63	< 0,001
09.11.2019	13,1 $\pm$ 3,7	13	16.11.2019	34,4 $\pm$ 10,4	32	< 0,001
10.11.2019	17,5 $\pm$ 15,7	12	17.11.2019	62,5 $\pm$ 31,6	61	< 0,001
Gesamt	16,5 $\pm$ 12,3	13	Gesamt	53,8 $\pm$ 24,7	57	< 0,001

p-Werte bestimmt mittels Mann-Whitney-U- Test; AM = arithmetisches Mittel; STD = Standardabweichung; MD = Median

Zum Schutz der menschlichen Gesundheit ist am 1. Januar 2005 der Tagesgrenzwert für PM₁₀ in Kraft getreten (EU-Richtlinien 1999/30/EG und 2008/50/EG). Er beträgt $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Dieser Wert darf nicht öfter als 35-mal im Jahr überschritten werden (Umweltbundesamt | Für Mensch und Umwelt).

Laut den Messungen der *Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg* wurde der Tagesgrenzwert an der Messstation am Neckartor im November 2019 lediglich am 21.11. (gravimetrische Messung) überschritten (Stadtklima Stuttgart - Feinstaubwerte 2019). Die Messungen mit dem vom UBA zur Verfügung gestellten Messgerät (*DustTrack Aerosol Monitor*) stellen eine Momentaufnahme von 30 min (3 Messungen von je 10 min) dar und zeigen, dass temporär und lokal höhere Werte gemessen wurden. In Simmerath liegen die im November 2019 gemessenen PM₁₀-Werte deutlich unter diesem Tagesgrenzwert, aber im Mittel über den Tagesmittelwerten, die an der Messstation Simmerath erhoben wurden (LANUV - Immissionsuntersuchungen 2019). Der PM₁₀-Jahresmittelwert lag 2019 an der Messstation Simmerath (DENW064) bei 9 µg/m³ (LANUV - Luftqualitätsüberwachung). An der Messstation Neckartor in Stuttgart lag dieser Wert bei 28 µg/m³ (Stadtklima Stuttgart - NO₂ und PM₁₀ 2005-2019) und damit auch unter dem zulässigen Jahresmittelwert von 40 µg/m³.

Abschließend sei nochmals darauf hingewiesen, dass sich die dargestellten PM₁₀-Messergebnisse auf ein Zeitfenster von 3 Tagen, an denen pro Messstandort je eine Messreihe von jeweils 3 x 10 min durchgeführt wurde, beziehen und damit ein Vergleich mit Tages- oder Jahresmittelwerten nur begrenzt möglich ist. Zudem ist beim Vergleich der beiden Untersuchungsräume zu beachten, dass aus organisatorischen Gründen die Probenahmen und damit auch die Messungen der PM₁₀-Konzentrationen an zwei aufeinanderfolgenden Wochenenden im November 2019 erfolgt sind und daher kein identisches Zeitfenster repräsentieren.

Es wird davon ausgegangen, dass nicht die Partikelkonzentration allein ausschlaggebend für die gesundheitlichen Auswirkungen von Feinstaub ist, sondern auch der Ursprung der Partikel und im Zusammenhang damit deren Bestandteile (30-32). In dieser Studie wurden nur die PM₁₀-Konzentrationen selber bestimmt, so dass keine Aussagen über die genaue Zusammensetzung der Partikel gemacht werden können. Allerdings erfassen die örtlichen Messstationen in Stuttgart und Simmerath (Stationscodes DEBW118 und DENW064) neben PM₁₀ und PM_{2,5}, einige weitere gesundheitsschädliche Substanzen, wie Benzo[a]pyren, Stickstoffdioxid (NO₂) und Benzol (C₆H₆) (UBA - Jahresbilanzen). Hinsichtlich dieser Parameter wurden im Jahresmittel 2019 für Stuttgart ebenfalls deutlich höhere Konzentrationen verzeichnet als in Simmerath. Auch wenn dies nur einen Ausschnitt aller Partikelbestandteile beschreibt, zeigen die derzeit routinemäßig erfassten Messgrößen, dass die Teilnehmenden aus Stuttgart höhere Partikelgesamtkonzentrationen erfahren und höheren Mengen an toxischen Partikelbestandteilen ausgesetzt sind.

4 Auswertung des Fragebogens zur Erhebung soziodemographischer Daten

Im Anschluss an die Digitalisierung und Übermittlung der Daten vom IBMT an das BIH erfolgte eine vergleichende Analyse der Angaben aus den Fragebögen zwischen den beiden Standorten Stuttgart und Simmerath. Im Folgenden sind die Hauptcharakteristika der Kohorten aus Simmerath und Stuttgart gezeigt; die entsprechenden Merkmale der Untergruppe, bei denen die epigenetischen Analysen durchgeführt wurden ($n = 60$), ist im Anhang unter A.4 zu finden. Die vollständige Fragebogenauswertung und die Ergebnisse des Aktivitätsprotokolls sind ebenfalls im Anhang aufgeführt (A.3).

4.1 Allgemeine Studienmerkmale

Ein Vergleich charakteristischer Merkmale der Studienteilnehmenden an den beiden Standorte Stuttgart und Simmerath ist in Tabelle 8 zusammengefasst. Hinsichtlich der Variablen Geschlecht, Alter, Body Mass Index (BMI), Erwerbstätigkeit, Nebentätigkeit und Einkommen gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Untersuchungsräumen Stuttgart und Simmerath. Unterschiede zwischen den Untersuchungsräumen bestehen in Bezug auf den Familienstand (p -Wert 0,02), mit einem höheren Anteil an Verheirateten in Simmerath, im mittleren Bildungsstand (p -Wert 0,001), mit einem höheren Anteil in Simmerath, sowie bei dem Berufsabschluss (p -Wert 0,0006), mit einem höheren Anteil an universitären Abschlüssen in Stuttgart.

Tabelle 8: Vergleich der beiden Standorte Stuttgart und Simmerath im Hinblick auf allgemeine Studienmerkmale mittels exaktem Fisher-Test. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Standorten (p -Wert < 0,05) sind fett markiert.

	Stuttgart, $n = 43$ N(%)	Simmerath, $n = 48$ N(%)	Fisher-Test [p -Wert]
Geschlecht			1,00
Weiblich	19 (44,2)	22 (45,8)	
Männlich	24 (55,8)	26 (54,2)	
Alter			0,25*
Mittelwert (Spanne)	27,8 (20-36)	27,2 (20-39)	
BMI^b			0,64
Untergewicht	2 (4,7)	0 (0)	
Normalgewicht	27 (62,8)	33 (68,8)	
Übergewicht	11 (25,6)	12 (25,0)	
Adipositas	3 (6,9)	3 (6,2)	
Familienstand			0,02
Ledig	39 (90,7)	34 (70,8)	
Verheiratet	4 (9,3)	14 (29,2)	

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
Schulabschluss			0,001
niedrig	0 (0)	1 (2,1)	
mittel	1 (2,3)	13 (27,1)	
hoch	42 (97,7)	34 (70,8)	
Berufsabschluss			0,0006
keinen	8 (18,6)	11 (22,9)	
Ausbildung/Lehre	4 (9,3)	24 (50,0)	
Universität/Fachhochschule	31 (72,1)	13 (27,0)	
Erwerbstätigkeit			0,80
geringfügig	5 (11,6)	9 (18,7)	
gelegentlich	3 (7,0)	2 (4,2)	
Teilzeit	9 (20,9)	11 (22,9)	
Vollzeit	24 (55,8)	26 (54,2)	
Keine Angabe	2 (4,6)	0 (0)	
Nebentätigkeit			0,31
Ja	7 (16,3)	13 (27,1)	
Nein	36 (83,7)	35 (72,9)	
Einkommen			0,60
Keine Angabe	4 (9,3)	10 (20,8)	
< 500 €	6 (14,0)	7 (14,6)	
500 bis unter 2000€	16 (37,2)	17 (35,4)	
2000 bis unter 4000€	15 (34,9)	12 (25,0)	
> 4000 €	2 (4,6)	2 (4,2)	

* p-Wert mittels Mann-Whitney U Test

^a Untergewicht BMI <18,5; Normalgewicht BMI 18,5-24,9; Übergewicht BMI 25-29,9; Adipositas BMI >30

^b niedrig = 9 Schuljahre ('Hauptschulabschluss'); Mittel = 10 Schuljahre ('Mittlere Reife'); hoch = 12 Schuljahre oder mehr ('(Fach-) Hochschulreife')

4.2 Wohnumgebung und Verkehrsexposition

Die Wohnumgebung und Verkehrsexposition können für die Partikelbelastung eine wichtige Rolle spielen. Der Vergleich der Variablen zur Wohnumgebung und Verkehrsbelastung sind in Tabelle 9 dargestellt.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Standorten bestand im Vorhandensein eines offenen Kamins. Während in Stuttgart bei keiner Person ein Kamin in der Wohnung vorhanden war,

gaben etwa die Hälfte der untersuchten Personen aus Simmerath an, einen Kamin zu haben, der in den letzten 7 Tagen vor der Erhebung des Fragebogens in 39,1% der Fälle auch genutzt wurde. Da sich im Aktivitätsprotokoll zeigte, dass auch Teilnehmende aus Stuttgart einen Kamin nutzten (obwohl sie keinen eigenen hatten), sind die Standortunterschiede hinsichtlich der Kaminnutzung nicht signifikant (vgl. Tabelle 18 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, Punkt 12 im Anhang).

Weitere Unterschiede bestehen hinsichtlich der Distanz der Wohnstätte zu der nächstgelegenen Straße (p-Wert 0,02) mit einer geringeren Distanz in Stuttgart im Vergleich zu Simmerath. Eine höhere Staubbildung auf der nächstgelegenen Straße vor der Wohnstätte (p-Wert 0,01) sowie eine größere Häufigkeit des Wohnens in einer Straßenschlucht (p-Wert < 0,00001) wurden in Stuttgart beobachtet. Die Nutzung des öffentlichen Personennahverkehrs (ÖPNV, p-Wert < 0,00001) für den Weg zur Arbeitsstätte wird in Stuttgart bevorzugt, in Simmerath hingegen das Auto. Keine Unterschiede bestehen bei der Verkehrsbelastung vor der Wohnstätte, der Entfernung von Wohnstätte zum Arbeitsplatz und der Verkehrsbelastung auf dem Weg zur Arbeit.

Tabelle 9: Vergleich der Wohnumgebung und Verkehrsexposition der Studienteilnehmenden aus Stuttgart und Simmerath mittels exaktem Fisher-Test. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Standorten (p-Wert < 0.05) sind fett markiert.

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	[Fisher-Test] p-Wert
Kamin (offen)			< 0,001
Ja	-	23 (47,9)	
Nein	43 (100)	25 (52,1)	
Distanz Wohnstätte Straße			0,02
< 10 m	12 (27,9)	13 (27,1)	
11-50 m	14 (32,6)	8 (16,7)	
51-150 m	11 (25,6)	7 (14,6)	
> 150 m	6 (13,9)	20 (41,7)	
Staubbildung vor Wohnstätte			0,01
Ja	11 (25,6)	3 (6,3)	
Nein	32 (74,4)	45 (93,7)	
Straßenschlucht			< 0,00001
Ja	27 (62,8)	8 (16,7)	
Nein	16 (37,2)	40 (83,3)	
Verkehr Wohnstätte (Mehrfachnennungen möglich)			0,22
Anwohnerverkehr	32 (74,4)	35 (72,9)	

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	[Fisher-Test] <i>p-Wert</i>
Durchgangsverkehr	21 (48,8)	16 (33,3)	0,75
Berufsverkehr	12 (28,0)	5 (10,4)	
Entfernung Wohn- und Arbeitsstätte			
< 1 km	4 (9,3)	6 (12,5)	
1-3 km	6 (14,0)	5 (10,4)	
3-5 km	6 (14,0)	4 (8,3)	< 0,00001
≥ 5 km	26 (60,5)	33 (68,8)	
Keine Angabe	1 (2,3)	0 (0)	
Arbeitsweg per			
ÖPNV	23 (53,5)	4 (8,3)	
Fuß/Fahrrad	15 (34,9)	8 (16,7)	0,52
Auto	4 (9,3)	36 (75,0)	
Keine Angabe	1 (2,3)	0 (0)	
Arbeitsweg verkehrsreich			
Ja	34 (79,1)	38 (79,2)	
Nein	8 (18,6)	10 (20,8)	
Keine Angabe	1 (2,3)	0 (0)	

4.3 Gesundheitszustand der Studienteilnehmenden

Hinsichtlich des Gesundheitszustandes zeigten Studienteilnehmende beider Standorte eine weitestgehend ähnliche Verteilung (Tabelle 10). Jedoch gaben Teilnehmende aus Stuttgart an, innerhalb des letzten Jahres öfter an Nasenbeschwerden gelitten zu haben, als Teilnehmende aus Simmerath. Personen mit chronischen Erkrankungen der Atemwege, wie z.B. Asthma, waren von der Studienteilnahme ausgeschlossen.

Tabelle 10: Vergleich des Gesundheitszustandes der Studienteilnehmenden aus Stuttgart und Simmerath mittels exaktem Fisher-Test. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Standorten (p -Wert < 0.05) sind fett markiert.

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [<i>p-Wert</i>]
Allergie			0,54
Ja	21 (48,8)	24 (50,0)	
Nein	22 (51,2)	24 (50,0)	
<i>Erkältung und Husten</i>			

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
Erkältungen mit Husten letzte 12 Monate (> 2 Wochen anhaltend)			0,59
Ja	6 (14,0)	7 (14,6)	
Nein	37 (86,0)	41 (85,4)	
Kurzatmigkeit, Atemnot in den letzten 12 Monate			0,21
nein	39 (90,7)	44 (91,7)	
1 mal	0 (0)	1 (2,1)	
1-3 mal	4 (9,3)	1 (2,1)	
4-12 mal	0 (0)	1 (2,1)	
> 12 mal	0 (0)	1 (2,1)	
Pfeifgeräusche beim Atmen jemals			0,56
Ja	12 (27,9)	13 (27,1)	
Nein	31 (72,1)	35 (72,9)	
Pfeifgeräusche beim Atmen letzte 12 Monate			0,41
Ja	7 (16,3)	6 (12,5)	
Nein	36 (83,7)	42 (87,5)	
<i>Augen und Nase</i>			
Nasenbeschwerden jemals			0,06
Ja	25 (58,1)	19 (39,6)	
Nein	18 (41,9)	29 (60,4)	
Nasenbeschwerden letzte 12 Monate			0,02
>12 mal	11 (25,6)	4 (8,3)	
4-12 mal	4 (9,3)	3 (6,2)	
1-3 mal	8 (18,6)	3 (6,2)	
1 mal	2 (4,6)	2 (4,2)	
Nein	18 (41,9)	36 (75,0)	
Aktuelle Erkältung (bei Probenahme abgefragt)Keine Angabe			0,21
Ja	3 (7,0)	8 (16,7)	

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
Nein	40 (93,0)	40 (83,3)	

Eine vollständige Auswertung des Fragebogens ist im Anhang unter A.3 beigelegt.

Im Rahmen der Aktivitätsprotokolle erfassten die Teilnehmenden, wie viel Zeit pro Tag sie mit Tätigkeiten verbrachten, bei denen ebenfalls Feinstäube entstehen können (komplette Auswertung siehe Tabelle 18 im Anhang). Für den Großteil der Aktivitäten wurden keine Verhaltensunterschiede beobachtet. Bei den Tätigkeiten Drucken, Toasten und Staubsaugen ergaben sich bei Teilnehmenden aus Simmerath über die Woche gemittelt längere Zeiträume im Vergleich zu Stuttgart. Bei Nutzung der Heizung wurden für die Teilnehmenden aus Stuttgart signifikant längere Zeitangaben verzeichnet. Die verringerte Heizungsnutzung in Simmerath spiegelt möglicherweise die höhere Anzahl an vorhandenen Kaminen wider. Für alle Tätigkeiten sind die tatsächlichen zeitlichen Unterschiede gering, sodass deren Auswirkungen auf die Nasenschleimhaut als gering eingeschätzt werden.

5 Methoden der Aufarbeitung biologischer Proben

5.1 Blutproben

Von allen Teilnehmenden wurden Blutproben gewonnen, um zu einem späteren Zeitpunkt weitere, hämatogene Parameter der Kohorte charakterisieren zu können. Die Heparin-Vollblutprobe wurde direkt eingelagert. Nach Zentrifugation und Abnahme von Serum bzw. Plasma wurden auch diese eingelagert und teilweise bereits für spätere Analysen aufgearbeitet. So wurde genomische DNA aus EDTA-Blut, Gesamt-RNA aus PAXgene-Röhrchen und miRNA aus Serum isoliert. Im Folgenden sind die Vorgehensweisen der Nukleinsäureisolation beschrieben. Die aufgereinigte DNA bzw. RNA kann mittels weiterer molekularbiologischer Methoden analysiert werden.

Des Weiteren wurde auf Basis des gewonnenen EDTA-Bluts ein Differentialblutbild jeder Teilnehmerin und jedes Teilnehmers erstellt, um potentielle Unterschiede zwischen den Standorten in der Zellzusammensetzung des Blutes zu identifizieren. Die Zell-Zusammensetzung des Blutes kann zudem für nachfolgende Analysen der Blut-Proben relevant sein.

5.1.1 Differentialblutbild

Bei der Erstellung eines Differentialblutbildes werden die verschiedenen Zelltypen der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) bestimmt und gezählt. Wenn die prozentualen Anteile der Leukozyten-Subpopulationen vom Erwartungswert abweichen, kann dies ein Indikator für Infektions-, Entzündungs- oder Blutkrankheiten sein. Um potentielle Anomalien im Blutbild der untersuchten Personen erkennen zu können, wurde von allen Teilnehmenden ein Differentialblutbild bei einem externen Labor in Auftrag gegeben.

Hierfür wurde jeweils eine EDTA-Blutprobe aller Teilnehmenden im direkten Anschluss an die Probenahme an die Analyselabore Synlab MVZ - Leverkusen GmbH (Simmerath) bzw. Leinfelden GmbH (Stuttgart) übergeben.

5.1.2 Nukleinsäure-Extraktion aus Blutproben

Aus einem Teil der Blutproben wurden DNA, RNA und miRNAs isoliert, um diese für nachfolgende zukünftige Analysen einsetzen zu können. Die Aufarbeitung erfolgte stets randomisiert, um Batch-Effekte zu vermeiden.

5.1.2.1 RNA-Extraktion aus PAXgene®-konservierten-Vollblutproben

Aus den PAXgene konservierten Vollblutproben wurde mit dem *PAXgene Blood miRNA Kit* (QIAGEN) die Gesamt-RNA isoliert. Die PAXgene-Röhrchen, in denen das Blut gesammelt wird, enthalten ein Reagenz, das die Blutzellen lysiert und intrazelluläre RNA stabilisiert. So konnte aus der Gesamt-RNA durch Bindung an eine Silikamembran die miRNA isoliert werden.

In Kürze lässt sich das Verfahren der miRNA Isolation auf Basis PAXgene Systems wie folgt beschreiben. Die Blutprobe in den PAXgene Röhrchen wurde zentrifugiert, das dadurch entstehende Pellet mit Wasser gewaschen und in einer zum Kit gehörenden Pufferlösung resuspendiert. Anschließend erfolgte ein Proteinverdau durch Proteinase K. Die Probe wurde zur Homogenisierung auf eine sogenannte Shredder-Säule gegeben und zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit Isopropanol versetzt und auf eine Silikamembran gegeben. Die an die Membran gebundene RNA, wurde durch Zugabe von DNase von möglichen DNA-Verunreinigungen befreit und sukzessiv mit zwei ethanolbasierten Puffern gewaschen. Im finalen Schritt wurde die aufgereinigte RNA (inklusive miRNA) bei 65 °C in 80 µl Elutionspuffer aufgenommen.

Die Aufarbeitung erfolgte mit Hilfe des *QIAcube* (QIAGEN), dieser ermöglicht eine weitestgehend automatisierte säulenbasierte Extraktion in Batches von bis zu 12 Proben. Die RNA-Konzentrationen wurden anschließend photometrisch bestimmt.

5.1.2.2 Extraktion von genomischer DNA aus EDTA-Blut

Genomische DNA (gDNA) wurde aus insgesamt je dreimal 200 µl EDTA-Vollblut aller Studienteilnehmenden isoliert. Hierfür wurde das *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN), ebenfalls in Kombination mit dem *QIAcube* verwendet (33). Das Prinzip der Isolation besteht aus Lyse und Proteaseverdau der Zellmembran und anschließendem Binden der freigesetzten DNA an die Silikamembran einer Spinsäule ähnlich der beschriebenen RNA Isolation. Nach zwei Waschschritten und dem Trocknen der Membran wurde die gebundene DNA in 100 µl Puffer eluiert. Die 100 µl Eluate der drei Replikate wurden letztlich vereint, sodass pro Teilnehmerin oder Teilnehmer 300 µl isolierte DNA aus EDTA-Blut gewonnen wurden.

5.1.2.3 MicroRNA-Isolierung aus Serum

MicroRNAs wurden aus je 200 µl Serum unter Verwendung des *miRNeasy Micro Kit* (QIAGEN) isoliert (34). Das Kit vereint Guanidin-Phenol-Chloroform-Extraktion mit Silikamembran-basierter RNA-Aufreinigung und ermöglicht die Extraktion von Gesamt-RNA ab einer Länge von 18 Nucleotiden, somit auch miRNAs. Die miRNA-Isolierung wurde ebenfalls mit DNase-Verdau durchgeführt, um zu verhindern, dass DNA Rückstände Einfluss auf nachfolgende Analysen nehmen können. Hierfür wurde das zugehörige *RNase-Free DNase-Set* (QIAGEN) verwendet.

Die Konzentrationen der isolierten miRNA aus Serum lagen in Vortests oft unter 1 ng/µl. Auch gemäß den Herstellerangaben und der Literatur sind die zu erwarteten miRNA Mengen aus Serum oder Plasma vergleichsweise gering (35-37). Um jedoch sicher zu gehen, dass die erzielten Konzentrationen ausreichend hoch für nachfolgende Analysen, wie z.B. Sequenzierung sind, wurde mit einer Serumprobe der *QIAseq miRNA Library Prep* durchgeführt (analog zu 5.2.3.1), inklusive anschließender Qualitätskontrolle. Hierbei wurden die Library-Konzentration, die durchschnittliche Fragmentlänge, sowie die Molarität mittels real-time PCR bestimmt. All

diese Parameter lagen im Erwartungsbereich. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass mit dem angewandten Protokoll ausreichend hohe miRNA Konzentrationen für Sequenzierungsanalysen erzielt wurden.

5.2 Nasallavage

Hauptfokus dieser Studie war die Charakterisierung von Nasallavage hinsichtlich möglicher feinstaubinduzierter, epigenetischer Veränderungen. In den folgenden Abschnitten sind die Bestimmung der Zelltypzusammensetzung, die Methylom- und miRNA-Sequenzierung, sowie die Messung von Zytokinen in Nasallavagezellen bzw. zellfreiem Nasallavageüberstand beschrieben.

5.2.1 Zellkomposition

Im oberen Atemtrakt des Menschen befindet sich eine Vielzahl von Zellen verschiedenen Ursprungs. Zum einen gibt es Zellen des respiratorischen Epitheliums (Epithelzellen), das eine physische Barriere gegenüber Fremdpartikeln darstellt. Zugleich befinden sich im Atemtrakt zahlreiche Immunzellen, die sowohl Funktionen der adaptiven als auch der angeborenen Immunantwort erfüllen (38).

Die Zusammensetzung dieser Zellen, auch bedingt durch verschiedene Umwelteinflüsse, ist individuell verschieden. Aus diesem Grund war die Identifikation der Zellpopulationen in der Nasallavage im Hinblick auf die Partikelbelastung von Interesse. Ebenfalls relevant war die Zellzusammensetzung für die Methylom-Analysen, denn verschiedene Zelltypen können sich an spezifischen Stellen im Genom in ihrem Methylierungsmuster unterscheiden (39). Um bei der Methylom-Sequenzierung den Beitrag durch Zellpopulationsunterschiede berücksichtigen zu können war es wichtig, die Zellarten bzw. -anteile in den einzelnen Proben zu kennen, um dies später als Einflussvariable berücksichtigen zu können (siehe 5.2.2.2).

Die Zusammensetzung der Zellpopulationen in den Nasallavageproben sollte mittels zwei verschiedener Methoden evaluiert werden, um möglichst verlässliche Werte zu erhalten. So wurden bereits bei der Probenahme im epiLab zum einen Zellen für durchflusszytometrische Messungen, als auch Zellen für die Charakterisierung mittels Cytospin vorbereitet.

5.2.1.1 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Oberflächenproteine auf den Zellen durch Antikörper gebunden, die wiederum an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. So kann im Durchflusszytometer das Fluoreszenzsignal einzelner Zellen bestimmt und diese dadurch einem Zelltyp zugeordnet werden. Zusätzlich werden die Zellen hinsichtlich ihrer Größe und Oberflächeneigenschaften charakterisiert, was weitere Hinweise auf die Art der Zelle geben kann. Die Zellen werden hierbei einzeln durch einen oder sukzessive durch mehrere Laserstrahlen geleitet und die entsprechenden Signale detektiert. Die Durchflusszytometrie ermöglicht somit die Analyse vieler verschiedener Parameter einer großen Anzahl von Zellen in sehr kurzer Zeit (40).

Für die Bestimmung der Zellen in der Nasallavage, wurden direkt im epiLab 40.000 Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt und anschließend fixiert. In Tabelle 11 sind die Antikörper aufgeführt, die zur Zelltypbestimmung in der Nasallavage verwendet wurden unter Angabe der Oberflächenproteinen, die von diesen Antikörpern erkannt werden.

Tabelle 11: Übersicht der für die durchflusszytometrische Zelltyp-Bestimmung verwendeten Antikörper und die damit bestimmten Zelltypen

Von Antikörper gebundenes Zell-Oberflächenantigen (Antikörper-Hersteller, Artikelnummer)	Zelltyp
MUC1 (BD Biosciences, 747649)	Epithelzellen
CD45 (BD Biosciences, 563716)	Leukozyten
CD66b (BD Biosciences, 564679)	Granulozyten
CD14 (BD Biosciences, 563079)	Monozyten
CD19 (BD Biosciences, 563038)	B-Lymphozyten
CD3 (BD Biosciences, 561027)	T-Lymphozyten

Die Messungen der Nasallavageproben erfolgten mit dem Durchflusszytometer *FACSAria II* der Firma BD Biosciences.

5.2.1.2 Cytospin

Cytospins (auch Zytozentrifugen genannt) werden herkömmlicherweise dafür genutzt die verschiedenen Blutzellanteile zu charakterisieren bzw. zu quantifizieren. Generell kann jegliche Zellsuspension mit dieser Methode mikroskopisch untersucht werden. Hierzu wird die Zellsuspension durch einen Trichter gegeben, der auf einem speziellen Objektträger (Single Cytofunnel) befestigt ist. Durch Zentrifugation im Cytospin, einer für diese Objektträger spezifischen Zentrifuge, werden die Zellen auf den Objektträger befördert, während die Flüssigkeit durch ein Filterpapier absorbiert wird. Dadurch entsteht auf dem Objektträger eine Einzelzellschicht, die nachfolgend fixiert und gefärbt werden kann, um die Identifikation verschiedener Zelltypen zu erleichtern (41).

Die Objektträger wurden mit der jeweiligen Proben-ID beschriftet, in den Einweg-Single Cytofunnel eingelegt und in die Cytospin-Zentrifuge eingesetzt. Anschließend wurden je 500 µl Zellsuspension mit 20.000 Zellen in den Trichter des Cytofunnels mit der entsprechenden Teilnehmenden ID pipettiert und 5 min mit 1000 rpm zentrifugiert. Zur Fixierung der Zellen wurden die Präparate im Anschluss mit *Shandon Cell-Fixx Spray Fixative* (Thermo Fisher Scientific) besprüht und unter einer Sicherheitswerkbank bei Raumtemperatur getrocknet.

Für die Pappenheim-Färbung (May-Grünwald & Giemsa) wurden die Präparate zunächst in einer Färbeküvette für 15 min in 95%igem Ethanol vorsichtig geschwenkt, um die Bestandteile des *Shandon Cell-Fixx Spray Fixative* zu entfernen. Anschließend wurden die Präparate getrocknet und eine May Grünwald Eosin Färbung durchgeführt.

Zur Auswertung der Präparate wurden die fixierten Zellen unter Nutzung eines 40x Objektives von zwei verschiedenen Personen ausgezählt. Hierbei wurde zunächst jedes Präparat auf gleichmäßige Ausbringung der Zellen geprüft und anschließend jeweils 5 Gesichtsfelder ausgezählt, bzw. so viele, dass mindestens 100 Zellen pro Präparat gezählt wurden. Die Zelltypen, die hierbei unterschieden wurden, waren Epithelzellen, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten (unterteilt in Neutrophile, Eosinophile, Basophile). Letztlich wurden die Ergebnisse beider Zählungen gegenübergestellt und auf Plausibilität geprüft.

5.2.2 Methylo-Seq-Sequenzierung aus Nasallavagezellen

Die Bestimmung des Methylo-Seqs von Zellen aus der Nasallavage war, zusammen mit der miRNA-Sequenzierung, Hauptfokus dieser Arbeit. Im Folgenden sind die Abläufe der DNA-Isolierung, Sequenzierung und Analyse der Sequenzierdaten beschrieben. Aus den 76 Nasallavage Zellpellets (siehe 3.2) wurden, wie im Folgenden beschrieben, in Abhängigkeit von der Menge der isolierten gDNA und weiteren Probencharakteristika insgesamt 60 Proben für die Methylo-Seq-Sequenzierung ausgewählt.

5.2.2.1 DNA-Extraktion und Sequenzierung

In Vorbereitung auf die Methylo-Seq-Sequenzierung wurde aus den Nasallavage Zellpellets gDNA unter Nutzung des *QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)* isoliert (33). Für die weitere Aufarbeitung wurden drei Proben, bei denen die gDNA-Menge unter 100 ng lag, ausgeschlossen. Zwar ermöglicht das eingesetzte Library-Prep Verfahren auch den Einsatz geringerer DNA-Mengen, jedoch sollte sichergestellt werden, dass die angestrebte Sequenziertiefe von mind. 30x für alle Proben erreicht wird. Zudem wurden Proben, bei denen sich Blut im Zellpellet befand, sowie die Proben von Teilnehmenden, die zum Zeitpunkt der Probenahme Nasenspray verwendeten, von weiteren Analysen ausgeschlossen. So sollte ein Einfluss von inflammatorischen Prozessen im Nasalbereich bzw. deren medikamentöse Behandlung auf das nasale Methylo-Seq minimiert werden. Mit diesen Kriterien ergaben sich 31 Proben aus Simmerath und 29 Proben aus Stuttgart, aus denen Libraries für die Methylo-Seq-Sequenzierung generiert wurden.

Zur Vorbereitung auf die Sequenzierung wurden aus allen DNA-Proben Sequenzier-Libraries erstellt, die DNA-Moleküle also derartig modifiziert, dass sie mittels Standardsequenzierverfahren analysiert werden können. Zunächst wurde die DNA mittels Ultraschall in 350-400 bp lange Fragmente gespalten. Anschließend wurden unter Nutzung des *NEBNext® Enzymatic Methyl-seq Kit (New England Biolabs)* Adaptermoleküle an die Enden der DNA ligiert (42). Im nächsten Protokollschritt des Kits werden unmethylierte Cytosine enzymatisch in Thymin-Basen umgewandelt, während methylierte Cytosine weiterhin als Cytosin verbleiben. So können später in der Auswertung methylierte von unmethylierten Cytosinen unterschieden werden. Die so entstandenen Libraries wurden amplifiziert und die resultierenden Nukleotidstränge größenselektiert. Die anschließende Qualitätskontrolle beinhaltete die Bestimmung der Konzentration, der Fragmentlänge und der Molarität.

Die Sequenzierung erfolgte auf dem *NovaSeq 6000 Sequenziersystem (Illumina)* unter Nutzung des Standard-Workflows mit S4 Flow Cells mit jeweils 12 Proben pro Sequenzierlauf.

5.2.2.2 Bestimmung differentiell methylierter Regionen

Nach der Sequenzierung der 60 DNA-Proben, dem Alignment sowie der Qualitätskontrolle der Daten erfolgte die Identifizierung differentiell methylierter CpGs (DMCs) und der daraus resultierenden differentiell methylierten Regionen (DMRs) im Vergleich der beiden Standorte Simmerath und Stuttgart. Für eine DMR wurde das Vorhandensein von mindestens drei aufeinanderfolgenden differentiell methylierten CpGs gefordert, mit maximal 100 bp Abstand zwischen den CpGs und einer Gesamt-Mindestlänge von 50 bp. Die Identifizierung der DMRs erfolgte durch den Einsatz von zwei verschiedenen Algorithmen: *DSS (Dispersion Shrinkage for Sequencing data)* (43) und *metilene* (44).

Unter Nutzung von *DSS* kann auf verschiedene Einflussfaktoren, die die DNA-Methylierung beeinflussen können, adjustiert werden. Das bedeutet, es wird versucht den Einfluss einer bekannten Störgröße (beispielsweise des Geschlechts) rechnerisch zu eliminieren, um nur Unterschiede zu berücksichtigen, die durch den untersuchten Effekt (Feinstaubexposition) verursacht werden. In die Adjustierung miteinbezogen wurden das Geschlecht und das Alter der Teilnehmenden sowie die mittels Durchflusszytometrie ermittelten Anteile der verschiedenen Zellpopulationen in der Nasallavage (myeloider, lymphoider und Epithelzellanteile, siehe 6.2.1). Der Schwellenwert für *p*-Werte bei der Bestimmung der DMCs mittels *DSS* betrug 0,01.

Ergänzend wurde mit *metilene* ein weiterer Algorithmus verwendet, da dieser die Korrektur für multiples Testen (statistische Tests für hohe Anzahl genomischer Regionen) ermöglicht. So wurde mit *metilene* eine Falscherkennungsrate (FDR) von $\leq 0,01$ gewählt, um die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Ergebnissen zu minimieren.

Um letztlich nur DMR-Regionen zu erhalten, die sowohl auf Störgrößen adjustiert sind als auch unter die konservative FDR von $\leq 0,01$ fallen, wurden nur jene Regionen berücksichtigt, die mit beiden Algorithmen identifiziert werden konnten, also die Überlappung der DMRs zwischen *DSS* und *metilene*.

5.2.2.3 Bestimmung von Einzelnukleotid-Polymorphismen und deren Einfluss auf DNA-Methylierung

Ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) meint das Auftreten verschiedener Varianten von Basenpaaren an spezifischen Stellen im menschlichen Genom, also eine bekannte genetische Variation. Es ist bekannt, dass solche Variationen auch Einfluss auf die DNA-Methylierung haben können, daher sollte innerhalb der identifizierten DMRs unterschieden werden, ob die Methylierungsunterschiede durch den Genotyp, also ein SNP, beeinflusst sind (genotypassoziierte, gDMRs) oder nicht (nicht genotypassoziierte, ngDMRs).

Dafür wurde eine Korrelationsanalyse zwischen DNA-Methylierung und allen beobachteten SNPs durchgeführt. SNPs, die einen Abstand von maximal 5 kb in beiden Richtungen relativ zur DMR aufwiesen und die signifikant mit der DNA Methylierung korrelieren (FDR von 10%), wurden als *methylation quantitative trait loci* (meQTL) definiert und die korrespondierende DMR folglich als gDMR bezeichnet. Alle DMRs, die nicht signifikant mit einem SNP korrelieren und somit wahrscheinlich nicht vom Genotyp beeinflusst werden, wurden als ngDMRs klassifiziert. Diese ngDMRs können durch Umwelt- und Lebensstilfaktoren, aber auch Erkrankungen beeinflusst sein.

5.2.2.4 Annotierung der DMRs zu Genen

Um Aussagen darüber treffen zu können, welche Signalwege durch eine differentielle Methylierung beeinflusst werden können, müssen den DMRs zunächst ihre potentiellen Zielgene zugeordnet werden. Diese Gene sind die Basis weiterer Analysen zur biologischen/physiologischen Interpretierbarkeit der Ergebnisse.

Für die Annotierung eines Gens zu einer DMR gab es zwei Szenarien; entweder die DMR lag nahe der Transkriptionsstartstelle eines Gens oder die DMR überlappt mit einem Enhancer, der wiederum die Expression von Genen beeinflusst. Enhancer (engl. *enhance* = verstärken) sind relativ kurze DNA-Sequenzen, die Bindestellen für bestimmte Proteine (sogenannte Transkriptionsfaktoren) enthalten. Das Binden der Proteine an einen Enhancer führt meist dazu,

dass die Transkription von nahegelegenen Genen verstärkt bzw. initiiert wird (45). Weist die DNA in einer Enhancer-Region beispielsweise eine höhere Methylierung auf, so kann dies dazu führen, dass Proteine weniger effizient binden können und die entsprechenden Zielgene vermindert exprimiert werden. Jedoch muss eine erhöhte Methylierung nicht immer mit einer verringerten Expression einhergehen; andere Faktoren, wie die Art des Transkriptionsfaktors, Anzahl der CpGs, Beschaffenheit des Chromatins und die Lage im Genom nehmen ebenfalls Einfluss auf die Transkription (46, 47).

Für die Annotierung wurden also Gene berücksichtigt, die von einem Enhancer beeinflusst werden, mit dem die DMR überlappt (Enhancer-Gen Interaktionen basierend auf der *GeneHancer* Datenbank) (48) und falls keine Überlappung mit einem Enhancer vorlag, wurde jenes Gen zugeordnet, dessen Transkriptionsstartpunkt in einem Intervall von maximal 1 Mio bp der DMR am nächsten lag.

5.2.2.5 Signalwegenreicherungsanalyse

Basierend auf den zu den DMRs annotierten Genen wurde eine Netzwerkanalyse mit *Cytoscape*, Version 3.7.1 unter Nutzung des *Reactome Functional Interaction Plugins*, Version 2020 durchgeführt (49, 50). *Cytoscape* erstellt Netzwerk aus den gefundenen Genen auf der Basis von physikalischen, experimentell nachgewiesenen und indirekten, funktionellen Proteininteraktionen. Das Programm greift hierfür auf definierte Gensets aus verschiedenen Datenbanken (z.B. *Reactome* (51) oder *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (52)) zurück. Das Gennetzwerk kann anhand der Anzahl und Verteilung der Proteininteraktionen in Module gruppiert werden, also Gruppen von Genen, die mutmaßlich miteinander im gleichen biologischen Kontext interagieren. Innerhalb der Module werden Anreicherungsanalysen durchgeführt, die biologische Signalwege identifizieren, die innerhalb eines Moduls überrepräsentiert sind. Dadurch lassen sich Aussagen darüber treffen, welche biologischen Auswirkungen sich aus der veränderten DNA-Methylierung der betroffenen Gene ergeben können.

5.2.3 MicroRNA-Sequenzierung aus Nasallavageüberstand

Zu den 60 Proben, von denen Methylom-Daten generiert werden konnten, wurden ergänzend miRNAs aus Nasallavageüberstand mittels Sequenzierung bestimmt. In den folgenden Abschnitten sind die Schritte der miRNA-Isolierung, Sequenzierung und Datenanalyse beschrieben.

5.2.3.1 MicroRNA-Extraktion und Sequenzierung

Der Ansatz der miRNA-Isolation aus dem Nasallavageüberstand basiert auf der Annahme, dass sich extrazelluläre miRNAs überwiegend in extrazellulären Vesikeln (EVs) befinden und so vor dem Abbau durch Ribonukleasen geschützt sind (53, 54). EVs haben eine Größe von 50 bis zu einigen hundert Nanometern (nm) und sind somit deutlich kleiner und leichter als Zellen (55). Diese Unterschiede wurden in der Aufarbeitung genutzt, um EVs und die darin befindlichen miRNAs zu isolieren. Neben dem Einschluss in EVs können extrazelluläre miRNAs auch mit Proteinen assoziiert sein (53), auch diese können aufgrund ihrer Größe im Nanometer-Bereich mit den hier angewendeten Methoden angereichert werden (56).

Im ersten Schritt wurde der Nasallavageüberstand bei 2.500 x g zentrifugiert, um verbleibende Zellreste zu sedimentieren. Nach dem Transfer des Überstandes in neue Röhrchen wurden von jeder Probe vier 100 µl Aliquote für Zytokinmessungen abgenommen (siehe 5.2.4). Diese wurden mit Protease-Inhibitor versetzt und bis zur Messung wieder bei -80 °C eingefroren.

Der verbleibende Nasallavageüberstand wurde durch einen 0,22 µm-Filter filtriert, um weitere größere Bestandteile abzutrennen. Anschließend wurde das Volumen der Nasallavage mittels Ultrafiltration unter Nutzung von *Amicon® Ultra-15 Filter Unit 10 kDa* Zentrifugalfiltern reduziert (57). Hierbei können Partikel ab einer Größe von etwa 3 nm angereichert werden, während sich Flüssigkeit und alle kleineren Bestandteile im Filtrat sammeln. So konnte das Volumen von 15-25 ml auf etwa 200 µl reduziert und aus dem deutlich kleineren Volumen mit herkömmlichen Methoden miRNAs extrahiert werden.

Für die miRNA-Extraktion aus dem Retentat wurde das *miRNeasy Micro Kit* (QIAGEN) verwendet (34). Analog zur miRNA-Isolation aus Serum wurde auch hier ein DNase-Verdauungsschritt eingeschlossen, um das Risiko der Verschleppung zellulärer DNA-Rückstände zu minimieren.

Bei Generierung der Sequenzier-Libraries wurden auch hier Adapter an die Enden der Nukleinsäuremoleküle angefügt, die miRNA wurde in DNA umgeschrieben, die dann vervielfältigt und ebenfalls hinsichtlich ihrer Größe selektiert wurde, um letztlich nur Moleküle, die der Größe von miRNAs entsprechen, zu sequenzieren. Nach erfolgreicher Qualitätskontrolle (Bestimmung von Konzentration, Größe und Molarität der Libraries) wurden die Proben mit dem *NextSeq500 Sequenziersystem* (Illumina) unter Nutzung des *NextSeq500/550 High Output Kits* (Illumina) sequenziert (58).

5.2.3.2 Bestimmung differentiell exprimierter microRNAs und deren Ziel-Gene

Im Anschluss an die Sequenzierung erfolgten die Qualitätskontrolle der Sequenzierdaten und die Identifizierung von miRNAs durch den Abgleich mit dem humanen Genom (hg19) und einer Datenbank an bekannten miRNAs (*miRBase v20*) (59). Um eine vergleichbare Qualität aller Proben zu gewährleisten, sollten für weitere Analysen nur solche Proben berücksichtigt werden, in denen insgesamt mindestens 50.000 miRNA Moleküle (Reads) detektiert wurden.

Das Ziel der miRNA-Sequenzierung war es, miRNAs zu identifizieren, die sich in ihrer Expression zwischen den zwei Standorten unterschieden. Die Bestimmung und Visualisierung der differentiell exprimierten miRNAs wurden mit dem R-Package *DESeq2* durchgeführt (60). Dieses ermöglicht die Bestimmung von differentiell exprimierten miRNAs auf der Basis von normalisierten Expressionswerten, unter Verwendung des Wald-Tests und mit Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiples Testen (61).

Für die Identifizierung von Genen, deren Expression mutmaßlich von einer bestimmten miRNA beeinflusst wird, gibt es viele verschiedene Programme und Algorithmen. Diese lassen sich meist in zwei Untergruppen unterteilen: solche, die eine miRNA-mRNA-Wechselwirkung anhand vordefinierter Eigenschaften prognostizieren und andere, die Zielgene mittels maschinellem Lernen vorhersagen (62). Um Zielgene möglichst verlässlich zu bestimmen und sich beide Ansätze zu Nutze zu machen, wurde die Schnittmenge zweier verschiedener Algorithmen verwendet.

So wurde zum einen die *miRDB* Datenbank eingesetzt, diese basiert auf einem Algorithmus des maschinellen Lernens, welcher mit experimentellen Daten trainiert wurde (63, 64). Die Daten beruhen zum einen auf *chross-linking immunoprecipitation sequencing*, mit welchen eine miRNA-

mRNA-Interaktion experimentell nachgewiesen werden kann. Um auch einen funktionellen Einfluss der ermittelten Wechselwirkungen nachzuweisen, wurden die Daten mit *in vitro* Assays komplementiert, bei welchen durch Überexpression von miRNAs die korrespondierenden reprimierten Zielgene ermittelt wurden. Beide Datensätze wurden letztlich integriert und für das Training eines Algorithmus und die Erstellung des Modells verwendet, welches *miRDB* zugrunde liegt.

Parallel zu *miRDB* wurden Zielgene mittels *TargetScan*, v7.2 identifiziert (65). *TargetScan* bestimmt Zielgene anhand definierter Charakteristika der miRNA-mRNA-Duplex. Zum Beispiel werden hier die Sequenzkomplementarität oder die thermodynamische Stabilität des miRNA-mRNA-Komplexes berücksichtigt. Letztlich wurde die Schnittmenge der mit *miRDB* und der mittels *TargetScan* ermittelten miRNA Zielgene verwendet.

Um die Funktionen der Zielgene und damit die möglichen Auswirkungen der veränderten miRNA-Expression zu erfassen, wurde auch hier *Cytoscape* für die Identifizierung von angereicherten Signalwegen angewendet (vgl. 5.2.2.5).

5.2.4 Zytokinmessungen in Nasallavageüberstand

Zusätzlich zu den epigenetischen Analysen wurde das Zytokinprofil in den Nasallavageüberständen bestimmt, um mögliche Anzeichen für potentielle Entzündungsprozesse im Nasenbereich zu identifizieren.

5.2.4.1 Zytokinmessungen mit Bead-basierten Immunoassays

Für die Messung der Zytokine wurden Bead-basierte Immunoassays verwendet. Diese Methode erlaubt die simultane Quantifizierung einer Vielzahl von Zytokinen auf Basis einer durchflusszytometrischen Analyse. Hierbei werden Zytokine über Antikörper spezifisch an Beads mit definierter Größe und Fluoreszenzintensität gebunden. Je eine Bead-Population bindet ein bestimmtes Zytokin. Mit einem zweiten an ein Fluorochrom gekoppelten Antikörper werden die gebundenen Zytokine nachgewiesen. Bei der durchflusszytometrischen Messung können verschiedene Bead-Populationen entsprechend ihrer Fluoreszenzintensitäten unterschieden und so die Menge des gebundenen Analyten über einen dritten Fluoreszenzkanal ermittelt werden.

Für die Messungen wurden die bei der Nasallavageüberstand-Aufarbeitung (siehe 5.2.3.1) abgenommenen Aliquote verwendet. Die entsprechenden Aliquote wurden am Tag der Messung auf Eis aufgetaut, um eine Degradierung der temperaturempfindlichen Zytokine zu vermeiden. Die Zytokinmessungen wurden, unter Verwendung des *Human Proinflammatory Chemokine Panels* der Firma *BioLegend* (66) an einem *FACSlyric™* Durchflusszytometer (BD) durchgeführt. Dieser Assay deckt 13 entzündungsfördernde, chemotaktische Zytokine ab (CCL2, CCL5, CXCL10, CCL11, CCL17, CCL3, CXCL9, CCL20, CXCL5, CXCL1, CXCL11 und CXCL8).

Zusätzlich zu den Nasallavageüberständen wurde eine Negativ-Kontrolle (NK) mitgeführt, die aus der für die Nasallavage verwendeten Kochsalzlösung, dem später hinzugegebenen Sputolysin, sowie dem Protease-Inhibitor, der bei der Aliquotierung zugegeben wurde (siehe 3.2 und 5.2.3.1), bestand. So sollte ausgeschlossen werden, dass die Probenmatrix die Proteinkonzentrationsbestimmung der Zytokine beeinflusste.

5.2.4.2 Auswertung der Messdaten

Die primäre Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der *LEGENDplex™ Data Analysis Software Suite* (67). Diese ermöglicht das Überprüfen und Anpassen der zur Abgrenzung der Bead-Populationen definierten Gates und die Berechnung der Protein-Konzentrationen jeder Probe auf Basis der Standardreihen. Außerdem können anhand der Standardreihen die Nachweis- und Bestimmungsgrenze jedes Analyten ermittelt werden, also die niedrigsten Konzentrationen eines Zytokins, die noch zuverlässig nachgewiesen bzw. quantifiziert werden können.

Im nächsten Schritt wurden die Werte der Negativ Kontrollen (NKs) überprüft. Diese wurden bei jedem Assay in Doppelbestimmung mitgemessen. Bei manchen Zytokinen war dennoch ein Signal in den NKs messbar. Deswegen wurde, je nach Intensität des Signals, entweder das höchste NK-Signal von allen anderen Messwerten subtrahiert, oder, wenn der Wert der NK mehr als 10% des durchschnittlichen Signals der Proben betrug, das entsprechende Zytokin von weiteren Analysen ausgeschlossen.

Da unter den Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nur beschränkt Aussagen über die exakten Analyten-Konzentrationen getroffen werden können, wurden alle Messwerte, die unter der Bestimmungsgrenze lagen auf $\frac{1}{2}$ dieser gesetzt und alle Werte unter der Nachweisgrenze entsprechend als die Hälfte dieser definiert. Um den Einfluss von extrem hohen oder niedrigen Werten bei der nachfolgenden Regressions-Analyse zu reduzieren, wurden die Werte außerdem logtransformiert und winsorisiert. Im Rahmen der Winsorisierung wurden alle Werte, die größer bzw. kleiner als das arithmetische Mittel zu- bzw. abzüglich der dreifachen Standardabweichung waren, diesem Wert gleichgesetzt. Dies war letztlich bei maximal zwei Messwerten pro Zytokin der Fall.

Für die Ermittlung von Unterschieden in den Zytokinkonzentrationen zwischen den Standorten, wurde der Mann-Whitney-U Rangsummentest durchgeführt. Außerdem wurde multiple lineare Regression angewendet, um den Einfluss von Störgrößen bei dem Standortvergleich berücksichtigen zu können. *P*-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

6 Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Charakterisierung und Analyse der biologischen Proben dargestellt. Zunächst wird auf die Ergebnisse der Blutproben (Differentialblutbild und Nukleinsäure-Extraktionen) eingegangen und anschließend auf die zellulären, epigenetischen und immunologischen Analysen der Nasallavage.

6.1 Blutproben

6.1.1 Differentialblutbild

Ein Differentialblutbild stellt die zelluläre Zusammensetzung des Blutes dar und kann Hinweise auf Mangelerscheinungen oder hämatologische Erkrankungen geben. Um auszuschließen, dass es schwerwiegende gesundheitliche Unterschiede zwischen den untersuchten Personen gibt, wurde von allen Teilnehmenden ein Differentialblutbild erstellt.

Tabelle 12 zeigt die Mittelwerte sowie den Vergleich der beiden Standorte über alle gemessenen Parameter des Differentialblutbildes. Signifikante Unterschiede zwischen den Standorten wurden für den prozentualen Anteil an Erythrozyten, Monozyten, Basophilen, großen ungefärbten Zellen (LUC) und Hämoglobin beobachtet sowie für das mittlere Erythrozyten-Volumen (MCV) und den mittleren Hämoglobin-Anteil eines Erythrozyten (MCHC).

Trotz der zum Teil sehr kleinen p -Werte sind die Unterschiede zwischen den Standorten gering und liegen, außer im Falle der LUCs, innerhalb der Standardabweichung. LUC beschreibt Zellen, die mit den verwendeten Färbemethoden nicht angefärbt werden können. Es kann sich hierbei um Plasmazellen oder atypische Lymphozyten handeln. Da keine sichere Aussage über die Art der zugrundeliegenden Zellen getroffen werden kann, ist auch die Interpretation der beobachteten Unterschiede stark limitiert.

Tabelle 12: Differentialblutbild Ergebnisse

	Simmerath		Stuttgart		
	MW	± STW	MW	± STW	p -Wert
Leukozyten [%]	6,33	2,09	6,19	1,81	0,952
Erythrozyten [%]	5,14	0,52	4,92	0,44	0,058
Hämoglobin [%]	15,08	1,42	14,35	1,18	0,009
Hämatokrit [%]	43,66	3,63	43,45	3,38	0,718
MCV [%]	85,28	5,10	88,58	3,71	0,001
MCH [%]	29,46	2,12	29,24	1,37	0,187
MCHC [%]	34,53	1,12	33,01	0,71	< 0,001
Thrombozyten [%]	285,71	61,92	270,53	57,69	0,225
Neutrophile [%]	57,46	8,83	56,60	8,01	0,622
Lymphozyten [%]	30,62	6,92	32,08	7,67	0,424
Monozyten [%]	7,03	1,56	5,75	1,36	< 0,001
Eosinophile [%]	2,63	1,64	2,52	1,57	0,504

	Simmerath		Stuttgart		
Basophile [%]	0,65	0,29	0,79	0,29	0,014
LUC [%]	1,63	0,53	2,26	0,56	< 0,001
Neutrophile abs. pro μL	3731,3	1789,7	3570,3	1377,2	0,981
Lymphozyten abs. pro μL	1867,0	473,6	1927,0	543,4	0,861
Monozyten abs. pro μL	434,5	133,1	353,1	116,5	0,004
Eosinophile abs. pro μL	159,0	92,5	156,2	108,2	0,509
Basophile abs. pro μL	39,92	17,60	48,42	22,59	0,063

p-Wert berechnet mit Mann-Whitney-U Rangsummentest, MW = Mittelwert, STW = Standardabweichung, MCV = mittleres Volumen eines Erythrozyten (engl. *mean corpuscular volume*), MCH = durchschnittlicher Haemoglobingehalt eines Erythrozyten (engl. *mean corpuscular haemoglobin*), MCHC = durchschnittlicher Anteil des Haemoglobins an der Gesamtmasse eines Erythrozyten (engl. *mean corpuscular haemoglobin concentration*), LUC = große ungefärbte Zellen (engl. *large unstained cells*)

6.1.2 Nukleinsäure-Extraktion aus Blutproben

Wie unter 5.1.2 beschrieben, wurde ein Teil der Blutproben aufgearbeitet, um für nachfolgende epigenetische Analysen eingesetzt werden zu können.

Bei der Aufarbeitung der PAXgene-Röhrchen mit dem *PAXgene Blood miRNA* Kit wurden Gesamt-RNA Mengen zwischen 1,7–18 μg pro Probe erhalten (im Durchschnitt 5,0 μg pro 80 μL Eluat).

Die DNA-Konzentrationen, die aus 600 μL EDTA-Blut isoliert werden konnten, lagen zwischen 4,9–15,3 μg , durchschnittlich bei 8,5 μg .

Die isolierten RNA-Proben wurden fortan bei -80°C und die DNA-Proben bei -20°C gelagert.

6.2 Nasallavage

Die Nasallavage wurde als zentrale Untersuchungsmatrix ausgewählt, um die Zellen untersuchen zu können, die primär mit eingeatmeten Feinstaubpartikeln in Kontakt treten. Neben den epigenetischen Analysen wurden Zytokinprofile erstellt und die Zellzusammensetzung der Nasallavage bestimmt. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Analysen der Nasallavagezellen (Zellkomposition und Methylom-Sequenzierung) und des zellfreien Überstandes (miRNA-Sequenzierung und Zytokinmessungen) aufgeführt.

6.2.1 Zellkomposition

Die Bestimmung der Zelltypzusammensetzung war für die späteren Methylierungsanalysen von essentieller Bedeutung und sollte mittels zwei verschiedener Methoden erfolgen. Hierfür wurden direkt bei der Probenahme im epiLab von jeder Nasallavageprobe 40.000 Zellen für die Durchflusszytometrie und weitere 10.000 Zellen für die Cytospinanalyse abgenommen und entsprechend weiterverarbeitet. Die Ergebnisse der Zellkompositionsanalysen sind in den zwei folgenden Abschnitten dargestellt.

6.2.1.1 Durchflusszytometrie

Insgesamt konnten aus Simmerath 46 und aus Stuttgart 37 Nasallavageproben durchflusszytometrisch analysiert werden. Die generierten Messdaten wurden mittels *FlowJo* Software analysiert. Für die Auswertung wurde die Summe von Epithel- und Leukozyten-Events als Gesamtheit betrachtet und auf 100 % gesetzt. Der sich daraus ergebende prozentuale Anteil dieser beiden Populationen ist in Tabelle 13 angegeben. Der Anteil der Granulozyten, B- und T-Lymphozyten sowie Monozyten wurden als Anteile der Leukozyten berechnet. Da mit den verwendeten Antikörpern (vgl. 5.2.1.1) nicht alle Untergruppen der Leukozyten erfasst wurden (beispielsweise keine natürlichen Killerzellen), ergänzen sich die Anteile der Leukozyten Subpopulationen nicht zu 100 %. Tabelle 13 fasst die Anteile der ermittelten Zellpopulationen pro Standort zusammen, die Zellpopulationsanteile pro Probe sind im Anhang unter A.2 zu finden.

Tabelle 13: Zusammenfassung der durchflusszytometrisch bestimmten Zellanteile in der Nasallavage pro Standort

	Simmerath (n=46)			Stuttgart (n=37)			
	MD	MW	± STW	MD	MW	± STW	p-Wert
Epithelzellen [%]	19,8	22,3	16,3	14,4	26,9	26,0	0,90
Leukozyten [%]	80,3	77,6	16,3	85,6	73,0	25,9	0,89
Granulozyten [%]	86,7	82,3	14,7	90,3	81,2	18,8	0,31
Monozyten [%]	0,3	0,6	0,8	0,0	0,8	2,1	0,03
B-Lymphozyten [%]	0,4	2,3	7,1	0,2	4,9	11,9	0,84
T-Lymphozyten [%]	0,0	0,4	1,2	0,0	0,6	1,5	0,32

p-Wert berechnet mit Mann-Whitney-U Rangsummentest, p-Werte < 0,05 sind fett gedruckt, MD = Median, MW = Mittelwert, STW = Standardabweichung

An beiden Standorten befinden sich im Mittel mehr Immun- als Epithelzellen in der Nasallavage und der Immunzellanteil wiederum besteht überwiegend aus Granulozyten. Die weiteren Subpopulationen der Leukozyten machen nur einen kleinen Teil der Zellen aus. Für den Anteil der Monozyten ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Standorten, allerdings sind die tatsächlichen Differenzen der Mittelwerte gering und die Monozytenanteile fast aller Proben unter 1 %, sodass die biologische Bedeutung des Unterschieds als gering einzuschätzen ist.

6.2.1.2 Cytospin

Cytospin-Präparate konnten von 46 Proben aus Simmerath und 42 Proben aus Stuttgart erstellt werden. Die Präparate wurden von zwei verschiedenen Personen unter Nutzung von Objektiven verschiedener Vergrößerung ausgewertet. Jedoch befanden sich in den meisten Fällen zu wenige Zellen auf dem Präparat, um eine verlässliche Zellzahlenbestimmung durchführen zu können.

Cytospins werden oft für die Bestimmung von Zelltypen in Blut eingesetzt. Da sich in der Nasallavage mit durchschnittlich 18.800 Zellen pro ml deutlich weniger Zellen als in Blut (4 – 11 Millionen Zellen pro ml (68)) befanden, führte dies letztlich dazu, dass die Ergebnisse der Cytospin Analysen als nicht zuverlässig erachtet werden mussten.

Für die Zellkompositionsadjustierung bei der Bestimmung differentiell methylierter Regionen (siehe 5.2.2.2) wurden deshalb nur die mittels Durchflusszytometrie ermittelten Werte berücksichtigt. Hierfür wurden die Zellpopulationsanteile (Ermittlung wie in Abschnitt 6.2.1.1 detailliert beschrieben) in ihre Abstammungslinien gruppiert, also in Epithel-, myeloide (Granulozyten und Monozyten) und lymphoide Zellen (B- und T-Zellen).

6.2.2 DNA-Methylierung

Veränderungen des Methyloms wurden bereits im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen und Umwelteinflüssen beschrieben, so auch in Bezug auf Feinstaubexposition (14). Typischerweise wurden hierbei Blutproben mittels Array-Technologie oder Pyrosequenzierung untersucht (69, 70). Diese Methoden ermöglichen die Bestimmung von Methylierungsmustern eines durch den Assay vorgegebenen Sets an CpG Dinukleotiden.

Im Gegensatz dazu sollten im Rahmen dieser Studie genomweite Methylierungsveränderungen in Zellen der Nasopharynx untersucht werden. Durch den Fokus auf die Zellen, die Feinstäuben dauerhaft ausgesetzt sind, und die Analyse des gesamten Methyloms sollte die Möglichkeit geschaffen werden, Methylierungsveränderungen zu erfassen, die bereits bei vergleichsweise geringen Feinstaubbelastungen eintreten. Im Folgenden sind die Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalyse von Zellen aus der Nasallavage dargestellt.

6.2.2.1 DNA-Extraktion und Sequenzierung

Es gab deutliche Unterschiede in den Mengen an isolierter gDNA aus den Zellen der Nasallavage, von 44 ng bis hin zu 13,0 µg gDNA. Im Mittel wurden 2,1 µg gDNA pro Zellpellet isoliert

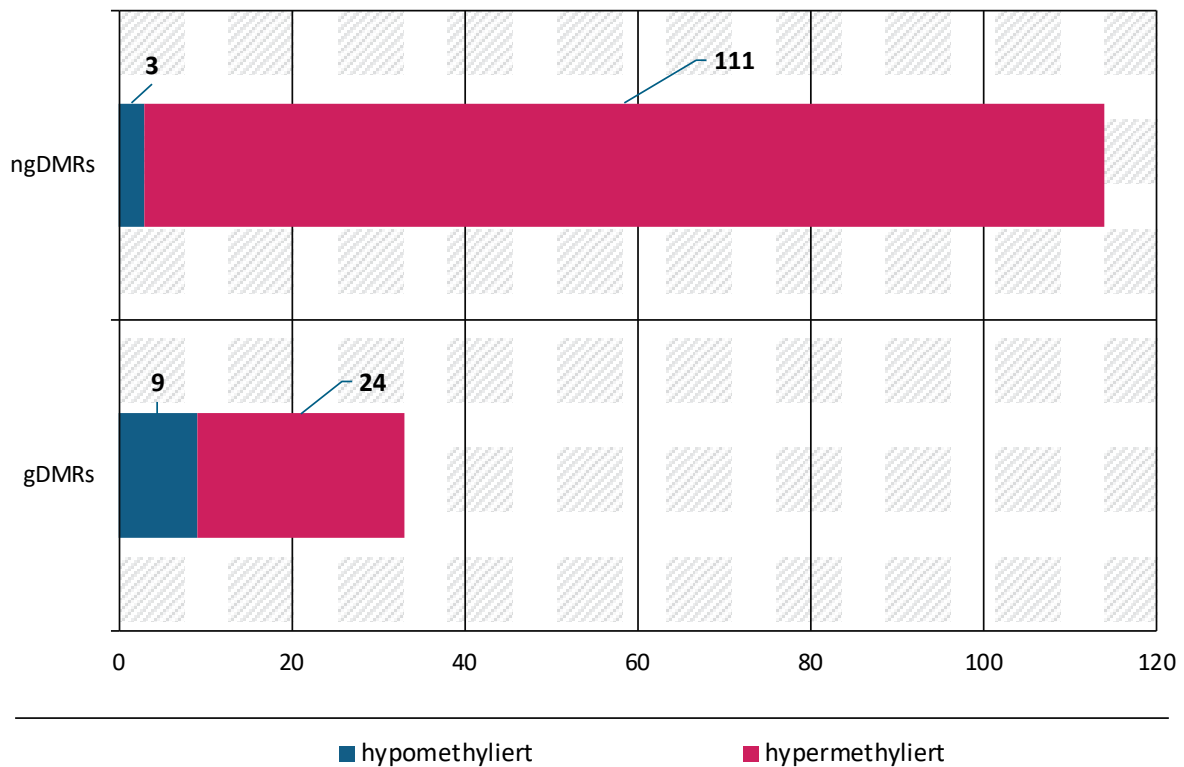
Die angestrebte Sequenziertiefe von mind. 30x wurde bei allen Proben erreicht. Im Mittel lag die erzielte genomweite Sequenziertiefe bei 69,7x (Minimum 52x). Eine Tabelle der Sequenzierqualitätsparameter aller Proben befindet sich im Anhang (Tabelle 22).

6.2.2.2 Eigenschaften und Verteilung der differentiell methylierten Regionen

Mit den Kriterien zur Bestimmung der DMRs (*DSS* mit Adjustierung auf Zellkomposition, Alter und Geschlecht: *DMC* *p*-Wert < 0,01; *metilene*: FDR < 0,01 für DMRs, siehe 5.2.2.2) konnten insgesamt 147 DMRs identifiziert werden. Eine Liste mit allen DMRs, deren Einteilung in gDMRs/ngDMRs und den assoziierten Zielgenen befindet sich im Anhang unter Tabelle 25.

Die identifizierten DMRs lassen sich in hypermethylierte - stärker methyliert in Stuttgart - und in hypomethylierte, jene, die eine geringere Methylierung im Vergleich zu Simmerath aufweisen, unterteilen. Von den insgesamt 147 DMRs waren 12 hypomethyliert, während der Rest der DMRs hypermethyliert war (92%). Ein Einfluss des genetischen Hintergrunds auf die DNA Methylierung (siehe 5.2.2.3) war nur bei 33 DMRs (33 gDMRs) zu beobachten. Die verbleibenden DMRs zeigten keine Korrelation zu einem SNP in dem gewählten Abstandsbereich (114 ngDMRs). Die Verteilung der DMRs in hypo- und hypermethylierte, bzw. genotypassoziierte und nicht genotypassoziierte DMRs ist in Abbildung 13 dargestellt.

Abbildung 13: Unterteilung der DMRs in hypo- und hypermethylierte, sowie genotypassoziierte (g) und nicht genotypassoziierte (ng) DMRs

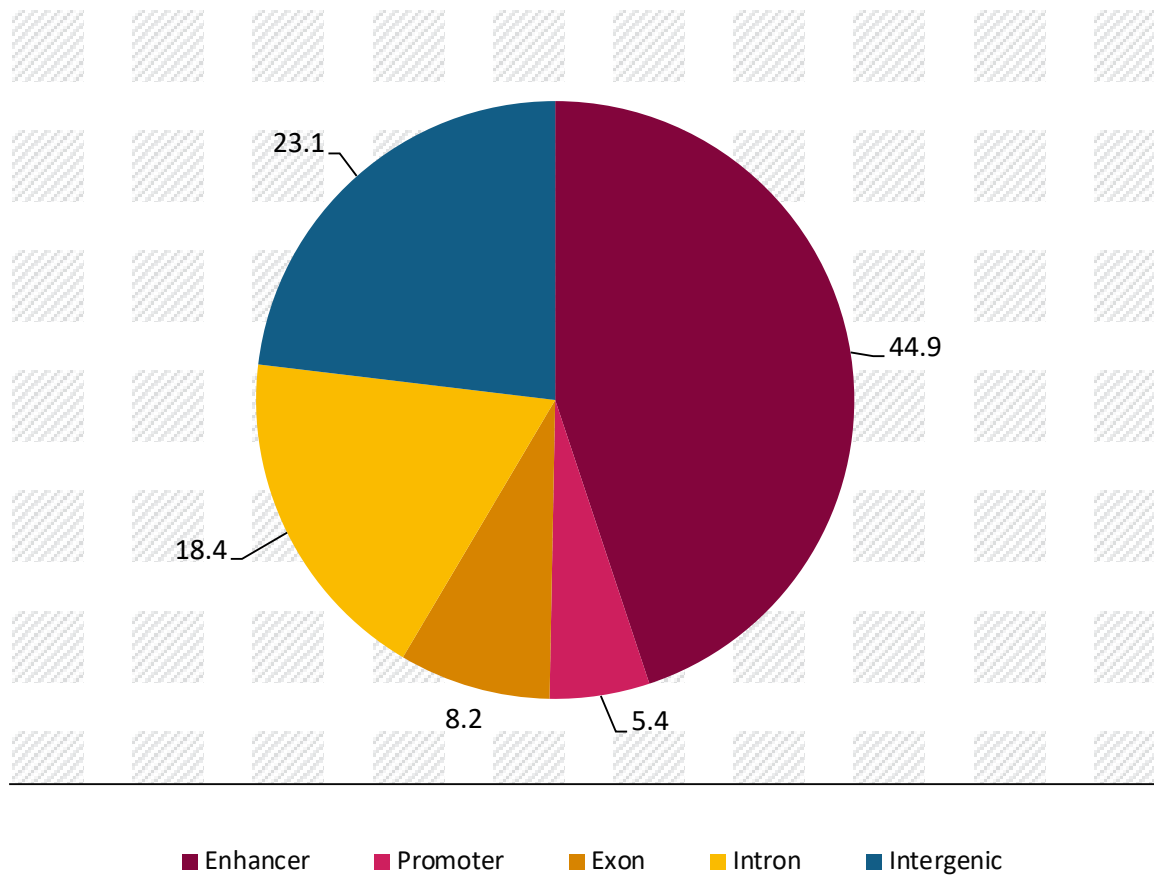


Quelle: eigene Darstellung, BIH

Die DMRs waren über alle Autosomen des Genoms verteilt. Die größte DMR befand sich auf Chromosom 9 mit einer Gesamtlänge von 834 bp und insgesamt 63 CpGs. Im Durchschnitt waren die DMRs 146 bp lang und umfassten 13 CpGs.

Etwa die Hälfte der DMRs (50,3%) lag in *Enhancer*- oder *Promoter*-Regionen, also genetischen Elementen, die regulatorischen Einfluss auf die Transkription, also die „Aktivierung“ der Gene haben (Abbildung 14) (71). Die andere Hälfte der DMRs lag entweder innerhalb eines Gens oder in dem Bereich zwischen zwei Genen (*Intergenic*), dem bislang keine bekannte Funktion zugewiesen wurde. Befand sich ein DMR innerhalb eines Gens, so wurde zwischen *Exons* und *Introns* unterschieden. *Exons* beschreiben den Bereich eines Gens, der letztlich in eine Aminosäure-Sequenz, also ein Protein übersetzt wird. *Introns* sind Genabschnitte, die nach dem Ablesen eines Gens, beim sogenannten *Splicing*, wieder entfernt werden. Somit werden *Introns* nicht in Protein-Sequenzen übersetzt, sind aber dennoch relevant für das korrekte Ablesen eines Gens (72).

Abbildung 14: Prozentuale Verteilung der 147 DMRs über verschiedene funktionelle Elemente des Genoms



Quelle: eigene Darstellung, BIH

Enhancer = Transkriptions-Verstärkungselement, *Promoter* = Startbereich eines Gens (transkriptionsregulierend), *Exon* = Genabschnitt, der in eine Proteinsequenz übersetzt wird, *Intron* = nicht proteincodierender Abschnitt innerhalb eines Gens, *Intergenic* = Bereich zwischen Genen, der keine bekannten funktionellen Elemente enthält. Etwa die Hälfte der DMRs liegt in Enhancer- und Promoter-Regionen, welche regulatorischen Einfluss auf die Expression von Genen nehmen können.

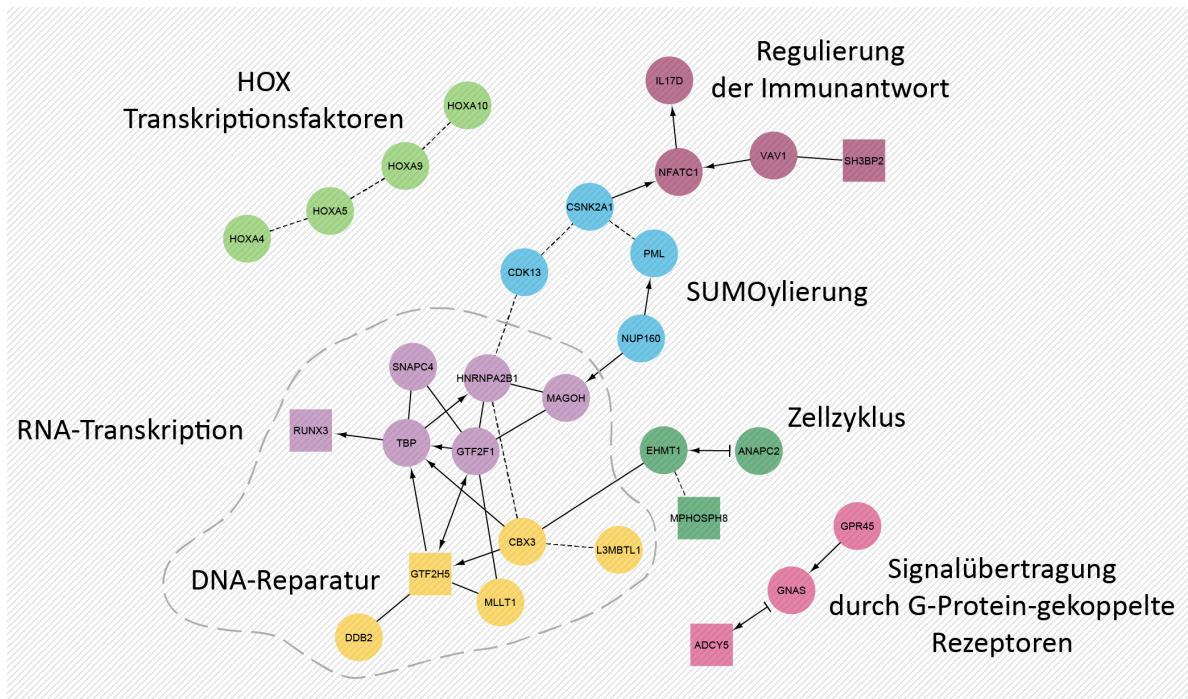
6.2.2.3 Signalweganreicherungsanalyse

Um den biologischen Hintergrund der ermittelten DMRs besser zu verstehen, wurden den DMRs Gene zugeordnet, die potentiell durch die veränderte Methylierung beeinflusst werden. Hierfür wurden entweder die Zielgene eines *Enhancers* mit dem eine DMR überlappt oder alternativ das nächstgelegene Gen zu einer DMR annotiert. Somit ergaben sich insgesamt 308 Gene, die im Zusammenhang mit den 147 DMRs stehen.

Mit diesem Set an Genen wurde ein Modul-Netzwerk mittels *Cytoscape* generiert (49). Dabei konnten sieben Module erfasst werden, bestehend aus insgesamt 29 Genen (siehe Abbildung 15). Innerhalb jedes Moduls wurde eine Signalweganreicherungsanalyse durchgeführt, um biologische Prozesse zu ermitteln, die im Zusammenhang mit den darin enthaltenen Genen stehen können. Für die in Abbildung 15 gezeigte Netzwerkanalyse wurden sowohl ngDMRs als auch gDMRs berücksichtigt. Auch wenn gDMRs im Zusammenhang mit dem Genotyp stehen, können diese zusätzlich durch Umweltfaktoren beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurden

auch die mit gDMRs assoziierten Gene in die Netzwerkanalyse einbezogen. Sie sind in der Abbildung als Quadrate hervorgehoben.

Abbildung 15: Cytoscape Netzwerkmole alle DMR-assozierten Gene



Quelle: eigene Darstellung, BIH

Gen-Netzwerk basierend auf den DMR-assozierten Genen, erstellt mit *Cytoscape* v3.8.2 und dem *Functional Interaction Plugin* v2020. Gezeigt sind Module mit mindestens drei Genen. Die verschiedenen Module sind farblich gekennzeichnet, die Modulthemen basieren auf den Modul-spezifischen signifikant angereicherten Signalwegen (FDR < 0,05). Gestrichelte Gen-Verbindungslinien = vorhergesagte Protein-Interaktionen, durchgehende Linien = experimentell nachgewiesene Protein-Interaktionen. Mit einem Kreis hinterlegte Gene sind mit ngDMRs assoziiert; die fünf mit einem Quadrat hinterlegten Gene, stehen im Zusammenhang mit gDMRs.

Die Ergebnisse der Netzwerkanalyse geben Aufschluss darüber, welche Signalwege von den DNA-Methylierungs-Veränderungen mutmaßlich betroffen sind. Die zwei größten Module enthielten Gene, die an der Regulierung der RNA-Transkription beteiligt sind. Eines davon wurde zusätzlich mit DNA Reparaturmechanismen in Verbindung gebracht. Mit diesen Modulen verbunden war eine Gruppe aus vier Genen, die in SUMOylierungs-Prozesse involviert sind. SUMOylierung meint die kovalente Bindung von SUMO-Proteinen an Lysin-Reste anderer Proteine. Dadurch kann die Lokalisierung und Interaktion von Proteinen mit Bindungspartnern beeinflusst werden. SUMOylierung von Proteinen ist relevant für den korrekten Ablauf von Mitose, Transkription und DNA-Reparatur (73).

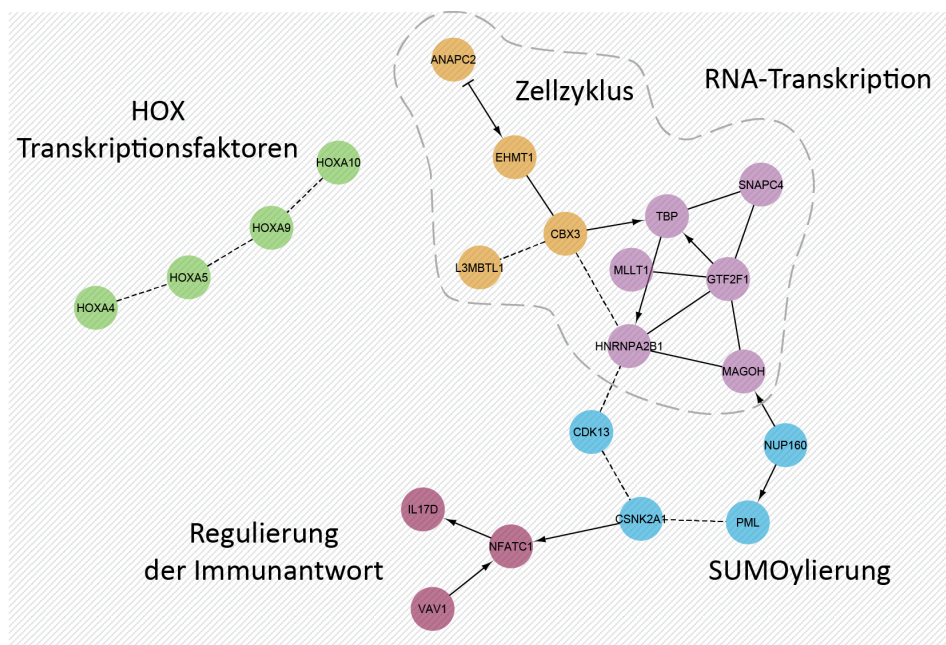
Zwei Module, die sich jeweils aus drei Genen zusammensetzen, waren mit der Regulierung des Zellzyklus und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (engl. *G protein-coupled receptor*, GPCR) assoziiert. GPCRs sind eine große Familie von Membranproteinen, die Signale von außen ins Zellinnere weiterleiten und in eine Vielzahl an Prozessen involviert sind: Weiterleitung von Geruchs- und Geschmackssignalen, Zelldifferenzierung, Hormon-vermittelte Signaltransduktion und die Regulierung von Entzündungsprozessen. Die Rolle von GPCRs in der Immunantwort besteht unter anderem darin, Immunzellen über Chemokine zum Ort des Entzündungsgeschehens zu rekrutieren (74, 75).

Ein weiteres Modul enthielt Gene, die ebenfalls mit der Regulation der Immunantwort in Verbindung stehen. *VAV1* zum Beispiel wird fast ausschließlich in Immunzellen exprimiert und vermittelt deren Oberflächenrezeptor induzierte Aktivierung. *NFATC1* codiert für ein Protein, das Teil eines Komplexes ist (NFAT, engl. *nuclear factor of activated T cells*), der in T-, B- und anderen Zellen nach Rezeptor-Stimulierung in den Zellkern wandert und dort spezifisch die Transkription von Genen initiiert (76). In T-Zellen wurde bereits gezeigt, dass für die gezielte Aktivierung des NFAT-Komplexes auch die Expression von *VAV1* essentiell ist (77).

Darüber hinaus wurde ein Modul identifiziert, das aus vier *HOXA*-Genen besteht. *HOX*-Gene codieren für eine Familie von Transkriptionsfaktoren, also Proteine, die regulatorischen Einfluss auf die RNA-Transkription nehmen. Ihren Namen tragen *HOX*-Gene, weil sie eine DNA-Sequenz enthalten, die für eine Homöodomäne codiert – eine Proteindomäne, die an DNA binden kann. Menschen und andere Säugetiere besitzen insgesamt 39 *HOX*-Gene, die sich auf vier *HOX*-Gen-Cluster (A-D) verteilen. Die Annotation der *HOXA*-Gene zu den DMRs beruhte auf zwei hypermethylierten DMRs, die beide im Bereich eines Enhancers liegen, der Einfluss auf die Expression der vier abgebildeten und sieben weiterer *HOXA*-Gene nimmt. *HOX*-Gene sind bekannt für ihre Rolle in der Embryonalentwicklung. Bei der Morphogenese in Wirbeltieren nehmen sie, abhängig von der zellulären Lokalisation, Einfluss auf Zellteilung, -differenzierung und -apoptose und definieren dadurch die Gliederung des Embryos entlang der Körperlängsachse. Aber auch nach abgeschlossener Entwicklung nehmen *HOX*-Gene wesentliche Funktionen ein, wie zum Beispiel bei der Bildung der Zellen des Blutes. Außerdem wurde eine abnormale Expression von *HOX*-Genen in Tumorerkrankungen beobachtet (78, 79).

Abbildung 16 zeigt das Cytoscape Netzwerk unter Ausschluss der gDMRs. Bei ausschließlicher Verwendung der 252 Gene, die von ngDMRs abgeleitet wurden, zeigt sich ein etwas kleineres Netzwerk, bei dem jedoch der Großteil der Module erhalten bleibt.

Abbildung 16: Cytoscape Netzwerkmodule der ngDMR-assoziierten Gene



Quelle: eigene Darstellung, BIH

Analog zu ist das Cytoscape Gen-Netzwerk gezeigt. Allerdings wurden hier nur Gene miteinbezogen, die mit ngDMRs assoziiert sind.

Cytoscape ermöglicht die Signalweganreicherungsanalyse von Genen, deren resultierendes Protein funktionell mit mindestens einem anderen Protein des entsprechenden Gen-Sets verbunden ist. Um weitere Gene zu identifizieren, die im Zusammenhang mit Feinstaubbelastung stehen könnten, aber nicht direkt funktionell miteinander verbunden sind, wurden die DMR-assoziierten Gene auch mittels Literaturrecherche potentiell relevanten Signalwegen zugeordnet. So konnten sechs Gene identifiziert werden, die in die Regulierung der oxidativen Stress-Antwort bzw. in den Metabolismus von Xenobiotika, also körperfremden Substanzen, involviert sind (*AKR7A3*, *AKR7A2*, *PXDN*, *NOX5*, *SRXN1* und *CES1*) (80, 81).

6.2.2.4 Interpretation der Ergebnisse

Insgesamt konnten in 147 Regionen des Genoms signifikante Methylierungsunterschiede in den Zellen der Nasallavage zwischen den Teilnehmenden aus Stuttgart und Simmerath ermittelt werden. In einem Großteil der DMRs (n = 135) wurde in den stärker feinstaubbelasteten Personen eine höhere Methylierung beobachtet. Durch die Zielgen Analyse mittels *Cytoscape* sowie mit Hilfe von Literaturrecherchen konnten zelluläre Funktionen und Signalwege identifiziert werden, die potentiell von den Methylierungsveränderungen betroffen sind. So konnte mit der Signalweganreicherungsanalyse gezeigt werden, dass zelluläre Prozesse wie DNA-Reparatur, Transkription sowie die Regulierung des Zellzyklus und der Immunantwort im Zusammenhang mit den 308 Zielgenen der DMRs standen.

Molekulare Veränderungen, die bei Feinstaubbelastung beobachtet wurden, umfassen entzündliche Reaktionen sowie Veränderungen in Signalwegen der oxidativen Stress-Antwort, verursacht durch das erhöhte Aufkommen an reaktiven Sauerstoffspezies (82). Somit könnten insbesondere die Gene und Signalwege, die im Zusammenhang mit einer veränderten Aktivierung von Immunzellen und der Reaktion auf oxidativen Stress stehen, eine pathophysiologische Bedeutung haben.

Insbesondere die hier beobachteten Methylierungsveränderungen der *HOXA*-Gene stehen im Einklang mit Ergebnissen aus vorangegangenen Studien; So identifizierte eine Expositionsstudie, die den Einfluss von Dieselpartikeln und Allergenen auf das humane Bronchialepithelium untersuchte, ebenfalls DNA-Methylierungsveränderungen, die verschiedene *HOX*-Gene betreffen (4). Des Weiteren wurden in einer Metaanalyse mit Fokus auf dem Einfluss pränataler Partikelbelastung Methylierungsveränderungen im *HOXA4*-Gen bei Neugeborenen mit erhöhter Feinstaubbelastung während der Schwangerschaft in Verbindung gebracht (5). Zuletzt konnte auch in einer Arbeit, die den Einfluss von Langzeit PM_{2.5}-Exposition auf Monozyten aus Blutproben untersuchte, eine DMR ermittelt werden, die im Zusammenhang mit den Genen *HOXA5*, *HOXA9* und *HOXA10* stand (83). Somit unterstützen die hier identifizierten DMRs, welche Einfluss auf das *HOXA*-Gen-Cluster nehmen, die Annahme, dass erhöhte Feinstaubkonzentrationen Einfluss auf diese für die Zellentwicklung wichtige Gruppe von Genen nehmen.

Im Rahmen dieser Studie war es nicht möglich, die beobachteten Methylierungsunterschiede direkt in Verbindung mit den Krankheitsbildern, die unter Feinstaubbelastung beobachtet werden, zu bringen. Jedoch können die beobachteten Veränderungen Hinweise auf frühe, feinstaubinduzierte epigenetische Modifikationen sein, die die Entstehung dieser Krankheiten fördern.

6.2.3 MicroRNAs

Neben der Regulierung durch DNA-Methylierung kann die Genexpression auch über miRNAs beeinflusst und gesteuert werden. Diese wirken posttranskriptionell, durch die Wechselwirkung mit mRNA-Molekülen. Diese Wechselwirkung kann dazu führen, dass ein mRNA-Molekül abgebaut oder dessen Übersetzung in eine Protein-Sequenz (Translation) inhibiert wird (15).

MicroRNAs können ihre Wirkung einerseits innerhalb ihrer Ursprungszelle entfalten, aber auch aus Zellen exportiert, von anderen Zellen wiederaufgenommen werden und so der Zell-Zell-Kommunikation dienen. So wurden extrazelluläre miRNAs bereits in Plasma, Urin, Speichel und weiteren Körperflüssigkeiten beschrieben (84). Extrazelluläre miRNAs bewegen sich nicht frei im Organismus, sondern sind meist mit Proteinen assoziiert oder befinden sich in extrazellulären Vesikeln (EVs), wodurch sie vor dem enzymatischen Abbau durch Ribonukleasen geschützt sind (53, 54).

Viele Veröffentlichungen haben bereits gezeigt, dass sich die Zusammensetzung extrazellulärer miRNAs in Serum oder anderen Körperflüssigkeiten in Abhängigkeit von Krankheiten und Umwelteinflüssen ändern kann (85). Auch im Zusammenhang mit Feinstaubbelastung wurden bereits veränderte miRNA-Profile in Serum oder Plasma beobachtet (86).

Im Rahmen dieser Studie wurden extrazelluläre miRNAs aus Nasallavage untersucht, um ergänzend zur DNA-Methylierung das miRNA-Milieu des oberen respiratorischen Trakts unter erhöhter Feinstaubbelastung zu erfassen. Hierfür wurden die Zellen aus der Nasallavage sedimentiert, Nanopartikel angereichert und letztlich miRNAs isoliert und sequenziert. Die folgenden Abschnitte beschreiben die Zusammensetzung der miRNAs aus dem Nasallavageüberstand und die Unterschiede der miRNA-Komposition zwischen höher und niedrig feinstaubbelasteten Personen.

6.2.3.1 Anzahl und Art der microRNAs aus Nasallavageüberstand

Die isolierten miRNA-Konzentrationen betrugen im Mittel der 60 Proben 12,8 µg/µl (zwischen 1,2 – 53,0 ng/µl in 12 µl Elutionsvolumen) und lagen somit alle über der empfohlenen Input-Menge des für die Library-Herstellung verwendeten *QIAseq miRNA Library Kits* (35).

Mit der miRNA-Sequenzierung konnten im Durchschnitt 230.272 miRNA-Reads pro Probe erfasst werden. Ein Read entspricht hierbei einem miRNA-Molekül, das aus der Probe isoliert und mittels Sequenzierung identifiziert wurde. Eine Übersicht der Summe aller miRNA-Reads pro Probe ist in Tabelle 23 im Anhang zu finden.

Eine Probe (SR19), für die insgesamt nur 5.074 Reads detektiert wurden, fiel deutlich unter den zur Qualitätssicherung festgelegten Grenzwert von mindestens 50.000 Reads pro Probe und wurde von weiteren Analysen ausgeschlossen. Somit blieben für die differentielle miRNA-Expressionsanalyse 59 Proben (Simmerath, n = 30; Stuttgart, n = 29).

Insgesamt wurden mittels Sequenzierung 550 verschiedene miRNAs im Nasallavageüberstand identifiziert. Die Top 10 miRNAs mit den höchsten Read-Anzahlen sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Übersicht der 10 stärksten exprimierten miRNAs in Nasallavageüberstand

miRNA Identifier	Durchschnittliche Reads pro Probe	Summe der Reads über alle Proben
hsa-miR-423-5p	27.502	1.622.609
hsa-let-7b-5p	20.813	1.227.985
hsa-miR-205-5p	18.452	1.088.691
hsa-miR-16-5p	13.399	790.547
hsa-miR-30d-5p	12.843	757.732
hsa-miR-200c-3p	12.080	712.704
hsa-miR-223-3p	10.603	625.563
hsa-let-7a-5p	7.886	465.297
hsa-miR-191-5p	7.519	443.647
hsa-miR-23a-3p	6.532	385.389

MicroRNA Identifier setzen sich meist aus vier Elementen zusammen: die ersten drei Buchstaben definieren den Organismus (hsa = *Homo Sapiens*). „miR“ gibt an, dass es sich um eine *mature miRNA*, also das reife miRNA-Endprodukt, handelt. Danach folgt eine fortlaufende Nummer. Ein Kleinbuchstabe nach der Nummer deutet darauf hin, dass die miRNA Teil einer miRNA-Familie mit sehr ähnlichen Sequenzen ist. Die Endung „-5p“ oder „-3p“ gibt an, ob die reife miRNA vom 5'- oder 3'-Ende der Vorläufer (prä-) miRNA abgeleitet ist. Die miRNAs der let-7-Familie weichen von diesem Schema ab, da sie bereits vor der Einführung der miRNA-Nomenklatur entdeckt und benannt wurden.

Zur Einordnung und Beurteilung der miRNA-Expressionsdaten wurden die stark exprimierten miRNAs mit Werten aus der Literatur abgeglichen. In einer Veröffentlichung, bei der miRNAs aus Gewebe des Nasopharynx sequenziert wurden, befanden sich let-7b-5p, miR-205-5p, miR-16-5p, miR-191-5p, wie auch in diesem Datensatz, mit unter den am stärksten exprimierten miRNAs in naso-respiratorischem Gewebe (87, 88). Auch in bronchoalveolärer Lavage (BAL) wurden miR-423-5p, let-7b-5p, miR-200c-3p, miR-23a-3p und let-7a-5p durch Sequenzierung in hohen Mengen detektiert (89). BAL wird ebenfalls durch das Einbringen von Spülflüssigkeit in den Atemtrakt gewonnen, allerdings werden hierbei die tiefen Atemwege durchspült.

Insgesamt sind zwei Mitglieder der let-7-miRNA-Familie unter den hoch exprimierten miRNAs der Nasallavageüberstände. Die miRNA let-7 wurde zunächst im Fadenfurm *Caenorhabditis elegans* beschrieben und kurz danach als erste miRNA auch im Menschen nachgewiesen. MicroRNAs der let-7-Familie sind über eine große Anzahl an Spezies konserviert und nehmen Einfluss auf Zellteilung und Differenzierung (90). Let-7a-5p, wie auch drei weitere der am stärksten exprimierten miRNAs (miR-223-3p, miR-16-5p und miR-191-5p), wurden auch in EVs aus Serum und Plasma bereits in vergleichsweise hohen Mengen detektiert (91).

Da beobachtet wurde, dass sich die miRNA-Komposition in EVs von der miRNA-Zusammensetzung der Ursprungszellen unterscheidet, wird davon ausgegangen, dass miRNAs nicht zufällig in EVs eingeschlossen werden, sondern mittels eines selektiven Mechanismus aus der Zelle exportiert werden (92). Die im zellfreien Nasallavageüberstand am stärksten exprimierte miRNA, miR-423-5p, wurde in einer Meta-Analyse von Guduric-Fuchs *et al.* bereits

als eine der miRNAs identifiziert, die von verschiedenen Zelltypen bevorzugt durch EVs ausgeschleust wird (93). Auch miR-191-5p und miR-23a-3p wurden, abhängig vom Zelltyp, ebenfalls verstärkt in EVs im Vergleich zu den Ursprungszellen detektiert.

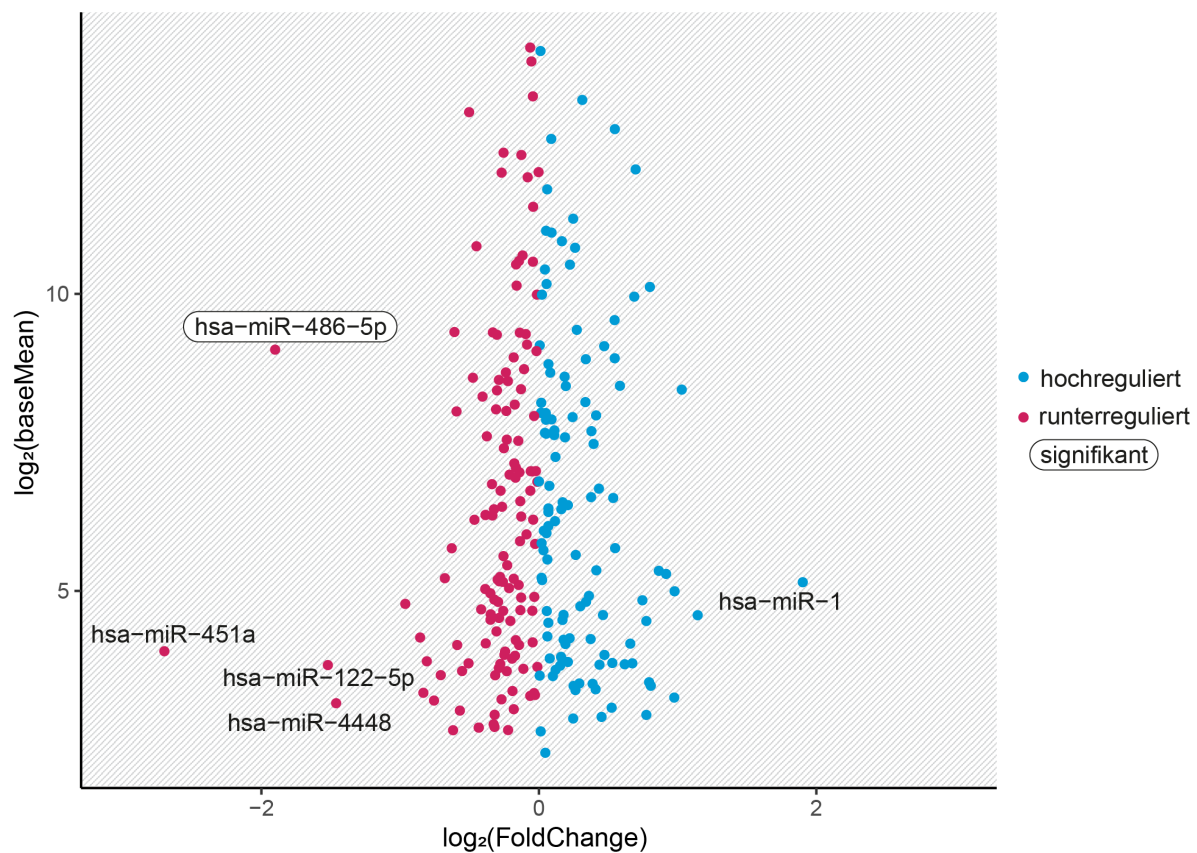
6.2.3.2 Differentiell exprimierte microRNAs und deren Zielgene

Das Ziel der miRNA-Sequenzierung war die Identifizierung von Unterschieden in der miRNA-Expression zwischen Teilnehmenden aus Stuttgart und Simmerath. Für die differentielle Expressionsanalyse wurden nur moderat bis hoch exprimierte miRNAs berücksichtigt, die einen miRNA-Expressionsschwellenwert von mindestens 10 Reads in allen 59 Proben erreichten. 250 der 550 detektierten miRNAs überschritten diesen Grenzwert.

Die Expressionsunterschiede wurden mittels $\log_2$ Fold Changes (FC) verglichen. Ein positiver $\log_2$ FC zeigt dabei eine in den Stuttgarter Proben stärker exprimierte miRNA an, während negative Werte eine niedrigere Expression im Vergleich zu Simmerath angeben. Ein $\log_2(\text{FC})$ von -1 entspricht einer Halbierung und ein $\log_2(\text{FC})$ von +1 einer Verdopplung der Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Eine grafische Darstellung der Ergebnisse der differentiellen Expressionsanalyse zwischen den beiden Standorten zeigt Abbildung 17. Bei der relativen Expressionsveränderung im Vergleich zwischen Stuttgart und Simmerath stechen fünf miRNAs mit $\log_2(\text{FC})$ -Werten größer 1,2 bzw. kleiner -1,2 hervor.

Abbildung 17: Scatterplot der Ergebnisse der differentiellen miRNA-Expressionsanalyse

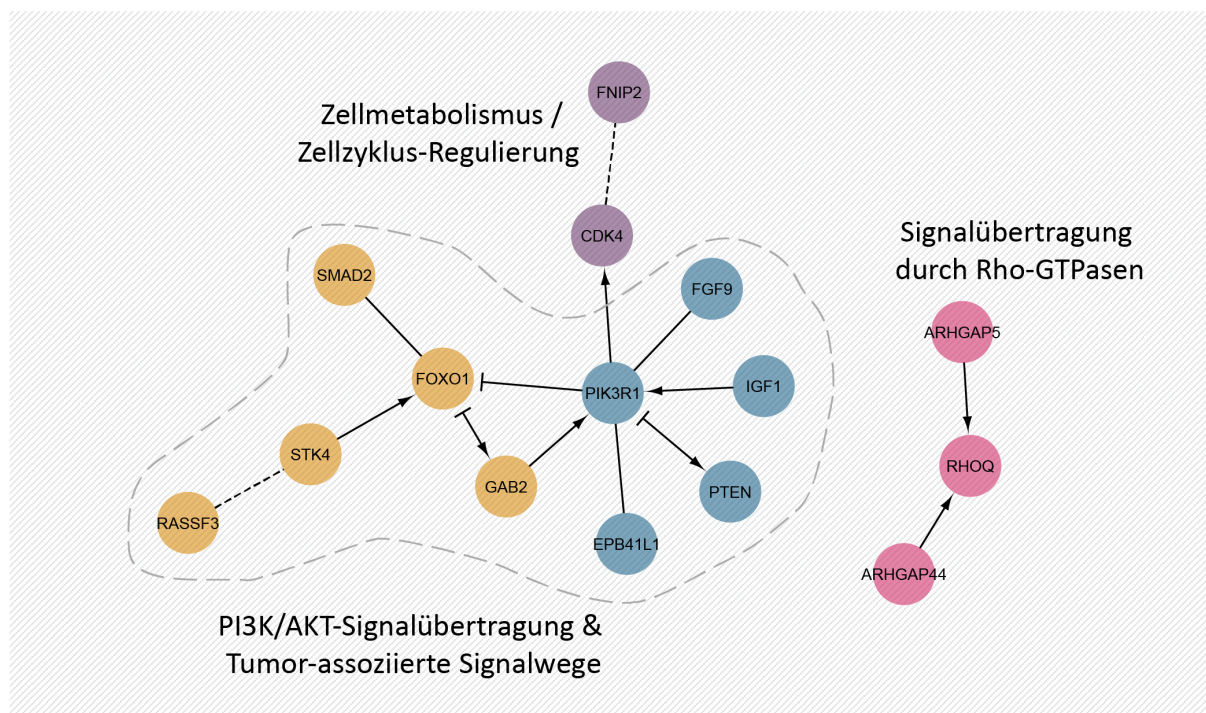


Gezeigt sind die $\log_2(\text{FC})$ -Werte der 250 moderat bis stark exprimierten miRNAs. $\log_2(\text{baseMean})$ = normalisierter Expressionswert, $\log_2\text{FoldChange}$ = Logarithmus des Verhältnisses der miRNA-Expression von Proben aus Stuttgart zu Simmerath; miRNAs mit einem $\log_2\text{FoldChange} > 1,2$ bzw. $< -1,2$ sind namentlich hervorgehoben.

Den höchsten absoluten $\log_2(\text{FC})$ -Wert zeigt miR-451a. Jedoch ist dieser Expressions-Unterschied, wie auch die Unterschiede bei miR-1, miR-4448 und miR-122-5p statistisch nicht signifikant ($\text{FDR} > 0,1$), was vermutlich an der geringeren Expression und dadurch meist höheren relativen Streuung der Werte liegt. Die einzige miRNA, für die ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Standorten festgestellt werden konnte, ist miR-486-5p mit einem $\log_2(\text{FC})$ von -1,90 und einer FDR von 0,03. Die miRNA ist demnach in den Nasallavageproben der Teilnehmenden aus Stuttgart signifikant geringer exprimiert als in jenen aus Simmerath.

MiR-486-5p wurde als eine selektiv in EVs exportierte miRNA beschrieben (93) und wird sowohl in Serum, Plasma als auch im Nasopharynx in hohen Mengen exprimiert (88, 91, 94). Um die potentiellen biologischen Auswirkungen der differentiellen Expression zu ermitteln, wurden die Zielgene von miR-486-5p bestimmt, also jene Gene, deren Expression mutmaßlich von dieser miRNA beeinflusst werden kann. Für die Bestimmung der Zielgene wurden zwei verschiedene Methoden verwendet und nur die mit beiden Ansätzen gefundenen Gene ($n=95$) weiter analysiert (siehe Anhang, Tabelle 24). Auch hier wurde *Cytoscape* eingesetzt, um Signalwege zu identifizieren, die im Zusammenhang mit diesen Genen stehen können. Das daraus resultierende Netzwerk ist in Abbildung 18 gezeigt.

Abbildung 18: Cytoscape Netzwerkmodule der Zielgene von hsa-miR-486-5p



Quelle: eigene Darstellung, BIH

Gennetzwerk basierend auf den Zielgenen von hsa-miR-486-5p, erstellt mit *Cytoscape* v3.8.2 und dem *Functional Interaction Plugin* v2020. Gezeigt sind Module mit mindestens drei Genen sowie damit verbundene Module. Die verschiedenen Module sind farblich gekennzeichnet, die Modulthemen basieren auf den Modul-spezifischen signifikant angereicherten Signalwegen ($\text{FDR} < 0,05$). Gestrichelte Gen-Verbindungslinien = vorhergesagte Protein-Interaktionen, durchgehende Linien = experimentell nachgewiesene Protein-Interaktionen

In dem *Cytoscape* Netzwerk befinden sich, aufgeteilt auf zwei Module, sechs Gene, die in den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) /AKT-Signalweg involviert sind (*FGF9*, *PTEN*, *PI3KR1*, *IGF1*, *GAB2*, *FOXO1*). PI3K/AKT beschreibt einen Signalübertragungsweg, der Zellproliferation und -wachstum reguliert und in vielen Tumorerkrankungen konstitutiv aktiv ist (95). Somit führen die gleichen sechs Gene auch zur Anreicherung der tumorassoziierten Signalwege. Ein weiteres Modul besteht aus drei Genen, die in Signalübertragungsmechanismen durch Rho-GTPasen involviert sind. Die Signalweiterleitung von Rho-GTPasen beruht, wie auch bei GPCRs (vgl. 6.2.2.3), auf der Bindung von Guanosintriphosphat (GTP). Zelluläre Prozesse, an denen Rho-GTPasen beteiligt sind, umfassen Zelladhäsion und -migration, Vesikeltransport und Proliferation (96).

Verschiedene Publikationen konnten einige der theoretisch ermittelten Zielgene von miR-486-5p bereits experimentell validieren. So wurde unter anderem *in vitro* gezeigt, dass miR-486-5p Einfluss auf die Transkript-Mengen der Gene *PI3KR1* (97, 98), *PTEN* (99), *FOXO1* (100), *IGF1* (101) und *GAB2* (102) nehmen kann – fünf der Gene, die in den PI3K/AKT-Signalweg involviert sind.

Eine verringerte Expression von miR-486-5p wurde zudem auch bereits unter Feinstaubexposition beobachtet (100). Li *et al.* untersuchten die Expression von miR-486-5p in A549-Zellen, einer humanen Lungen Adenokarzinom Zelllinie. Hierbei wurde zum einen eine verminderte miR-486-5p-Expression unter Feinstaubexposition verzeichnet, als auch eine höhere Expression von zwei potentiellen Zielgenen, *PTEN* und *FOXO1*. Diese Beobachtung sowie weiterführende, funktionelle Experimente deuteten auf eine fehlende Inhibierung der Expression von *PTEN* und *FOXO1* durch eine verringerte miR-486-5p Expression hin.

6.2.3.3 Interpretation der Ergebnisse

In dieser Studie wurden miRNA-Expressionsunterschiede zwischen zwei Standorten verglichen, um Hinweise auf eine veränderte Genexpressionsregulation unter Feinstaubbelastung zu gewinnen. Außerdem konnte das bislang nur eingeschränkt untersuchte miRNA-Milieu in der Nasallavage weiter charakterisiert werden.

Unter den am stärksten exprimierten miRNAs in der zellfreien Nasallavage (Tabelle 14) fanden sich sowohl miRNAs, die bereits in hohen Mengen in nasorespiratorischem Gewebe oder der BAL detektiert wurden, als auch solche, für die ein verstärkter Export in EVs bekannt ist. Somit unterstreichen die gefundenen miRNAs, dass mit der Sequenzierung auch gewebetypische miRNAs erfasst werden konnten.

Unter den 250 moderat bis hoch exprimierten miRNAs war miR-486-5p in den Proben der Teilnehmenden aus Stuttgart signifikant geringer exprimiert als bei jenen aus Simmerath. Diese Reprimierung kann zu einer verstärkten Synthese der Proteine der entsprechenden Zielgene führen.

Die Zielgene der miR-486-5p sind in die Signaltransduktion der PI3K/AKT und GPCRs – Signalwege, die auf eine Vielzahl an essentiellen zellulären Prozessen Einfluss nehmen, involviert. Der PI3K/AKT Signalweg ist unter anderem für Proliferation, Differenzierung, Apoptose und die Immunantwort von Bedeutung. MiR-486-5p kann sowohl Einfluss auf PI3K/AKT-aktivierende Proteine nehmen (*GAB2* (103), *IGF1* (104)) als auch auf Proteine, die inhibierend auf die PI3K/AKT vermittelte Signalübertragung wirken (*PTEN*) bzw. bei aktiver PI3K/AKT-Signalübertragung inhibiert werden (*FOXO1*) (100).

Bisherige Studien zeigen widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des Effekts von Feinstaubbelastung auf den PI3K/AKT-Signalweg. So wurde von Li et al. in Einklang mit unseren Ergebnissen eine verringerte miR-486-5p Expression durch Feinstaubexposition beobachtet (100). Dies ging mit einer erhöhten Expression von *PTEN* und *FOXO1* sowie einer verstärkten Apoptose einher, was auf eine unterdrückte PI3K/AKT-Signalvermittlung durch erhöhte Feinstaubbelastung hindeutet. Demgegenüber beobachteten Mondal *et al.* in Atemwegszellen aus Sputum eine verstärkte Phosphorylierung des AKT-Proteins einhergehend mit einer erhöhten Feinstaubexposition. Als Tyrosinkinase stellt die phosphorylierte Form von AKT die aktivierte Form dar, die die Phosphorylierung nachgeschalteter Proteine des Signalweges bedingt. Daher sprechen diese Ergebnisse für eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs. Allerdings liegen die in der Studie gemessenen PM₁₀-Konzentrationen im Bereich von 70 bis über 500 µg/m³, also um ein vielfaches höher als die in Stuttgart gemessenen Konzentrationen (105).

Auch wenn die molekularen Mechanismen, die eine verringerte Expression von miR-486-5p zur Folge haben könnten, durch diese Studie nicht geklärt werden konnten, legt eine Deregulation in der PI3K/AKT-Signalübertragung eine feinstaubvermittelte Modulation der Autophagozytose nahe (106-108). Die PI3K/AKT Signaltransduktion ist ein zentraler Vermittler der Autophagozytose (108). Dieser zelluläre Prozess beschreibt den Abbau von zellulären Bestandteilen, wie Proteinen oder ganzen Organellen, und ist essentiell für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen neuen und alten Zellbestandteilen. Die Rate, mit der die Autophagozytose in einer Zelle abläuft, ist zudem abhängig von Umwelteinflüssen, wie beispielsweise der Sauerstoff- oder Nährstoffversorgung (109). Oxidativer Stress, wie er durch Feinstaubbelastung begünstigt ist, ist ebenfalls ein Auslöser der Autophagozytose (110). Daher überrascht es nicht, dass Veränderungen in autophagischen Prozessen auch im Zusammenhang mit Krankheiten, wie Tumor- oder neurodegenerativen Erkrankungen, beobachtet werden (111).

Inwiefern die differentielle Expression von miR-486-5p tatsächlich Einfluss auf die PI3K/AKT-vermittelte Signalübertragung und im Zusammenhang damit, auf Autophagozytose nimmt, bleibt offen und muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Dass sich unter 250 miRNAs bei lediglich einer ein Expressionsunterschied zwischen den Standorten zeigte, spiegelt womöglich wider, dass hier zwei junge Personenkollektive ohne bekannte Vorerkrankungen verglichen wurden. Die Unterschiede der gemessenen Feinstaubkonzentrationen zwischen Simmerath und Stuttgart sind deutlich und signifikant (siehe 3.4.3), jedoch liegen auch die Konzentrationen des höher belasteten Standortes Stuttgart unterhalb der aktuellen europäischen Grenzwerte für PM₁₀. Somit konnten im Rahmen dieser Studie bereits bei moderat erhöhten Feinstaubkonzentrationen unterhalb der gesetzlich festgelegten Grenzwerte Veränderungen der miRNA-Expression im oberen respiratorischen Trakt beobachtet werden.

6.2.4 Zytokinmessungen in Nasallavageüberstand

Um potentielle Unterschiede der Zytokin-Zusammensetzung zwischen den Teilnehmenden aus Stuttgart und Simmerath zu erfassen, wurden Zytokinmessungen im Nasallavageüberstand durchgeführt.

Tabelle 15 zeigt den Vergleich der Standorte anhand der Median-Konzentrationen der gemessenen Chemokine, sowie die 25%- und 75%-Quantile. Der Vergleich zwischen den Proben aus Stuttgart und Simmerath wurde sowohl mit dem Mann-Whitney-U Test als auch mittels

multipler linearer Regression durchgeführt, um auch den Einfluss weiterer Parameter auf die Chemokinkonzentrationen zu erfassen. Lediglich für CCL2 (MCP-1) ergab sich im linearen Regressionsmodell (abhängige Variablen: Standort und Geschlecht, aktuell bestehende Erkältung als Kovariaten) ein signifikanter Unterschied zwischen den hoch und niedrig feinstaubbelasteten Personen. Jedoch fällt die tatsächliche Differenz der Mediane für CCL2 über alle Proben hinweg gering aus (22,9 für Simmerath und 23,2 in Stuttgart).

Tabelle 15: Standortvergleich der Zytokin-Messungen aus Nasallavageüberstand mit dem Human Proinflammatory Chemokine Panel in pg/ml

Protein	Gen	MD	Q1	Q3	MD	Q1	Q3	p-Wert*	p-Wert adj.**
		Simmerath (n=31)			Stuttgart (n=29)				
IP-10	CXCL10	191,4	88,1	383,2	163,6	87,8	264,7	0,918	0,224
Eotaxin	CCL11	3,2	2,6	4,2	2,8	2,5	3,6	0,216	0,223
TARC	CCL17	5,7	3,1	8,6	5,8	3,4	9,4	0,918	0,847
MCP-1	CCL2	22,9	18,1	28,8	23,2	16,3	41,9	0,427	0,048
RANTES	CCL5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,736	0,119
MIG	CXCL9	9,3	2,8	28,9	4,0	2,1	10,8	0,239	0,999
ENA-78	CXCL5	93,4	30,1	216,1	142,5	20,9	223,6	0,918	0,988
I-TAC	CXCL11	10,8	3,8	31,8	7,5	4,6	18,7	0,567	0,681
MIP-1β	CCL4	19,8	13,9	23,4	17,6	10,4	27,7	1,000	0,973
GRO-α	CXCL1	809,9	588,6	1243,9	968,6	637,4	1989,5	0,276	0,106
IL-8	CXCL8	831,4	457,6	1199,0	721,5	382,5	1804,8	0,826	0,604

MD = Median, Q1 = 25%-Perzentil, Q3 = 75%-Perzentil

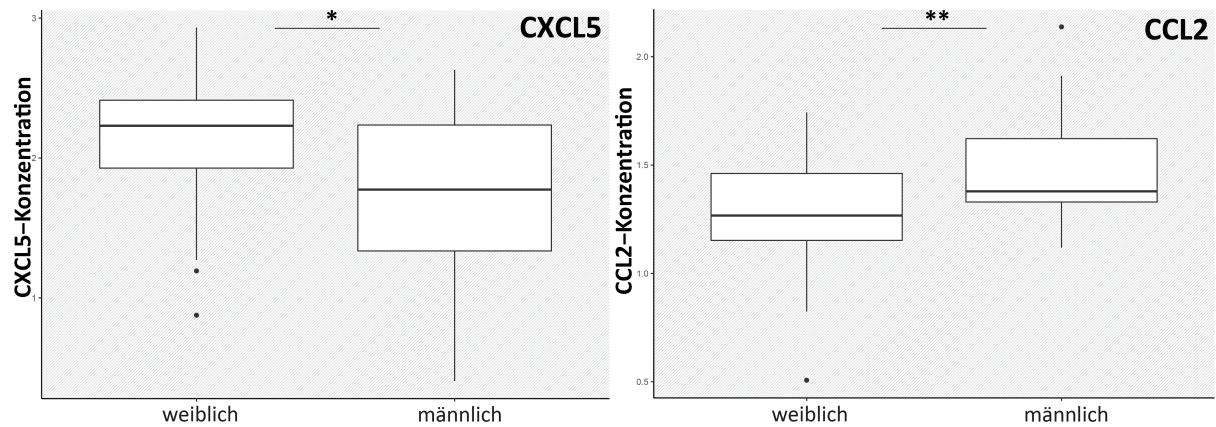
* Mann-Whitney-U Test

** Adjustierter p-Wert, bestimmt mittels multipler linearer Regression, basierend auf den log-Transformierten und winsorisierten Werten für den Vergleich der Standorte, adjustiert auf das Geschlecht und eine aktuell bestehende Erkältung, p-Werte < 0,05 sind fett gedruckt

Zytokinkonzentrationen können geschlechtsspezifische Unterschiede aufweisen (112). So wurden beispielsweise im Serum von Frauen höhere CXCL5-Konzentrationen gemessen als bei Männern (113). Auch für CCL2 ist ein geschlechtsabhängiger Konzentrationsunterschied bekannt. Bei im Tagesverlaufs stündlich über 26 h genommenen Blutproben zeigten sich in männlichen Probanden höhere CCL2-Konzentrationen als bei Frauen (114). Dies ist in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen in der Nasallavage. Im linearen Regressionsmodell

wurde für CCL2 und CXCL5 ein signifikanter Einfluss des Geschlechts beobachtet (p -Wert $< 0,05$). In Abbildung 19 sind die Konzentrationen der beiden Zytokine im Vergleich dargestellt.

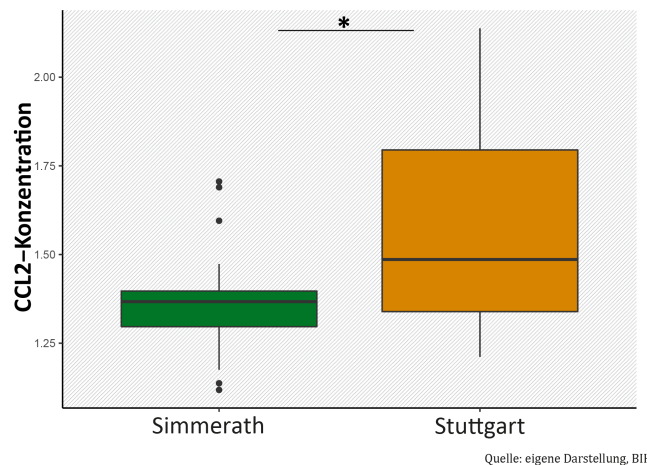
Abbildung 19: Boxplots der CXCL5- und CCL2-Konzentrationen, Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Studienteilnehmenden



Gezeigt sind der Median sowie die unteren und oberen Quartile der log-transformierten und winsorisierten Daten; Fehlerbalken zeigen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands, * $p=0,025$, ** $p=0,009$ bestimmt mittels Mann-Whitney-U Rangsummentest

Für CCL2 zeigte sich darüber hinaus bei den männlichen Teilnehmern aus Stuttgart eine signifikante Erhöhung der Konzentration im Vergleich zu den Teilnehmern aus Simmerath (Abbildung 20), welche bei den Teilnehmerinnen nicht beobachtet wurde. CCL2 gehört zu den proinflammatorischen Chemokinen, ist an der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen beteiligt und könnte so ein Indikator für eine vorherrschende Inflammation sein. Dies wird auch durch unabhängige Untersuchungen bestätigt, die eine mit Feinstaubbelastung assoziierte CCL2 Erhöhung im Plasma beschreiben (10).

Abbildung 20: Boxplot der CCL2-Konzentration in männlichen Teilnehmern, Vergleich zwischen Stuttgart (n = 17) und Simmerath (n = 20)



Gezeigt sind der Median sowie die unteren und oberen Quartile der log-transformierten und winsorisierten Daten; Fehlerbalken zeigen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands, * $p=0,026$, bestimmt mittels Mann-Whitney-U Rangsummentest

Insgesamt zeigte sich bei Betrachtung aller 60 Proben und unter Einbezug von Kovariaten ausschließlich für CCL2 ein signifikanter Unterschied zwischen hoch und weniger stark feinstaubbelasteten Studienteilnehmenden.

7 Diskussion

In dieser Studie wurden epigenetische Merkmale von Zellen des oberen Atemtrakts unter Feinstaubbelastung untersucht. Epigenetische Modifikationen, wie DNA-Methylierung, haben Einfluss auf die Expression von Genen und dadurch wiederum auf die von einer Zelle produzierten Proteine (14). Somit können epigenetische Veränderungen erste Hinweise auf eine veränderte zelluläre Funktion geben, wie sie bereits im Zusammenhang mit Feinstaubbelastung (116) und auch bei Krankheitsbildern, die durch Feinstaubbelastung begünstigt werden, beschrieben wurden (117). Dass epigenetische Merkmale auch durch Umweltfaktoren beeinflusst werden, wurde bereits mehrfach beschrieben (118-120). Im Fall von DNA-Methylierung konnte zudem gezeigt werden, dass umweltinduzierte Veränderungen über Generationen hinweg weitergegeben werden und sich auf die Gesundheit der Nachkommen auswirken können (121, 122) (123).

DNA und ihre kovalent gebundenen Methylgruppen stellen, im Gegensatz zu RNA oder Proteinen, ein relativ stabiles Biomolekül dar, das aus Zellen isoliert, bei vergleichsweise milden Temperaturen eingefroren, transportiert und zu gegebenem Zeitpunkt analysiert werden kann. Die Vorteile der Handhabung bei zugleich hohem Informationsgehalt (>28 Millionen CpGs im humanen Genom (124)) machen die DNA-Methylierung zu einem attraktiven Untersuchungsgegenstand bei der Suche nach Biomarkern und möglichen Ursachen für feinstaubinduzierte Krankheitsentstehung. Aus diesem Grund lag auch in dieser Studie der Fokus auf Feinstaub-assoziierten DNA-Methylierungsmustern. Indizien dafür, dass DNA-Methylierung durch Feinstaubexposition beeinflusst wird, liegen bereits aus früheren Studien vor (69). Die meisten Arbeiten untersuchten dabei Zellen des Blutes mittels Array-Methoden. Diese ermöglichen die Detektion von Methylierungsveränderungen in einem vorbestimmten Set an CpGs (meist einige hunderttausend). Im Gegensatz dazu erfasste unsere Studie die Methylierung aller CpGs im Genom (Methylom) mittels Sequenzierung in Zellen des oberen Atemtrakts. Mit diesem Ansatz sollten die genomweiten Veränderungen in den Zellen untersucht werden, die im initialen und konstanten Kontakt mit Feinstäuben stehen.

Da auf Sequenzierung basierende Analysen immer noch sehr teuer sind, musste die Studie auf ein kleines Personenkollektiv von insgesamt 60 Studienteilnehmenden beschränkt werden. Um in so einem kleinen Kollektiv tatsächlich Feinstaub-assoziierte Veränderungen im Epigenom nachweisen zu können, musste eine sehr homogene Gruppe von Studienteilnehmenden ausgewählt werden. Es wurden deshalb nur gesunde, junge Erwachsenen eingeschlossen, die ihr Lebensumfeld in Stuttgart bzw. in Simmerath in der Eifel hatten und somit verschieden starker Feinstaubbelastung ausgesetzt waren. Beide Gruppen wurden so ausgewählt, dass sie hinsichtlich ihres Alters, Geschlechts, BMIs und weiteren demografischen Parametern eine ähnliche Verteilung zwischen den Untersuchungsstandorten aufwiesen. Die Probennahme erfolgte an beiden Standorten zeitlich eng aufeinander im November 2019 unter Einsatz des mobilen epidemiologischen Labors (epiLab) des Fraunhofer-Instituts für Biomedizinische Technik (IBMT). Durch den Einsatz des epiLabs konnten Probenahme und Probenaufarbeitung an den zwei verschiedenen Standorten unter identischen Bedingungen erfolgen. Zusätzlich zu den über vorhandene Messstationen erfassten Feinstaubkonzentrationen wurden an den Wochenenden der Probenahme Partikelmessungen an beiden Untersuchungsstandorten durchgeführt. Diese bestätigten die deutlich höhere Feinstaubbelastung in Stuttgart im Vergleich zu Simmerath.

Es ist davon auszugehen, dass mögliche epigenetische Veränderungen insbesondere in den Zellen der oberen Atemwege stattfinden, die initial mit eingeatmetem Feinstaub in Berührung kommen. Um diese Zellen erfassen zu können, wurde bei allen Studienteilnehmenden eine

Nasallavage durchgeführt. Aus den so gewonnen Zellen wurde genomische DNA für die Methylom-Sequenzierung isoliert. Zusätzlich wurden aus dem zellfreien Überstand der Lavage miRNAs isoliert und deren Expression ebenfalls über Sequenzierung analysiert.

Im Hinblick auf die DNA-Methylierung der nasalen Zellen konnten klare Unterschiede zwischen Stuttgart und Simmerath detektiert werden. Es wurden 147 Regionen (DMRs) identifiziert, die sich in ihrer Methylierung im Vergleich zwischen den Standorten signifikant unterschieden. Etwa die Hälfte der DMRs lag in regulatorischen Regionen des Genoms, also Bereichen, von denen bekannt ist, dass sie einerseits Einfluss auf die Genexpression nehmen können und andererseits sensitiv auf Umweltreize reagieren. Daher könnten vor allem diese DMRs eine funktionelle Rolle in der Entstehung von feinstaubassoziierten Erkrankungen spielen. In dem Großteil der DMRs ($n = 135$) wurde in den stärker feinstaubbelasteten Personen eine höhere Methylierung beobachtet. Auch andere Studien, die Methylierungsveränderungen unter Langzeitexposition gegenüber Luftschadstoffen mittels Array-Technologie in Blutproben untersuchten, brachten eine Partikel-Exposition mit überwiegend stärkerer Methylierung in Verbindung (83, 125-128). Bei dem Vergleich mit vorhergehenden Studien stechen vor allem zwei hypermethylierte DMRs in einer regulatorischen Region der *HOXA*-Gene hervor, denn feinstaubinduzierte Methylierungsveränderungen in *HOXA*-Genen wurden bereits in früheren Veröffentlichungen beschrieben (4, 5, 83). In der Arbeit von Gloria Chi (83) wurden Monozyten aus Blutproben von 1207 Personen untersucht und $PM_{2.5}$ - sowie Stickoxid- (NO_x) Konzentrationen im Bereich der Wohnumgebung der Teilnehmenden für den Zeitraum von einem Jahr vor Zeitpunkt der Probenahme modelliert. Mit diesem Ansatz konnten fünf DMRs identifiziert werden, darunter eine hypermethylierte DMR, die ebenfalls im Bereich der *HOXA*-Gene lag und zudem mit differentieller Expression von *HOXA5*, *HOXA9* und *HOXA10* in Verbindung gebracht wurde (83). Dass wir ähnliche Veränderungen bereits bei geringerer Feinstaubbelastung beobachteten (Stuttgart verzeichnete im Jahr 2019 im Mittel $13 \mu g/m^3 PM_{2.5}$ [UBA - Jahresbilanzen] während die Teilnehmenden in Chis Studie teils über $18 \mu g/m^3 PM_{2.5}$ im Jahresdurchschnitt ausgesetzt waren), bekräftigt die Annahme, dass auch Feinstaubkonzentrationen unterhalb der bisherigen europäischen Grenzwerte von $25 \mu g/m^3 PM_{2.5}$ im Jahresmittel (2008/50/EG) Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit haben können (129). Da in den Nasallavageproben der Teilnehmenden unserer Kohorte nur ein kleiner Anteil an Monozyten gefunden wurde, wie es bei Gesunden zu erwarten ist, scheinen Methylierungsveränderungen an *HOXA*-Genen nicht spezifisch für diese Zellpopulation zu sein, sondern spielen möglicherweise in weiteren Immun- oder Epithelzellen eine Rolle. Letzteres wurde auch von Clifford *et al.* (4) gezeigt, die von einer veränderten Methylierung der *HOXA*-Gene unter Allergen- und Dieselabgasexposition in Bronchialepithelzellen berichteten. Welche Bedeutung die differentielle Methylierung und eine folglich mögliche differentielle Expression von *HOXA*-Genen hat, bleibt unklar. Die Hypermethylierung von *HOXA*- (und anderen *HOX*-) Genen wurde bereits bei Tumorerkrankungen beschrieben. Allgemein wird angenommen, dass eine verstärkte DNA-Methylierung mit einer verringerten Expression einhergeht. Daher vermuteten Paço *et al.*, dass Zielgene der *HOX*-Transkriptionsfaktoren als Tumorsuppressoren fungieren. Die durch die Hypermethylierung verminderte Expression der *HOX*-Transkriptionsfaktoren und damit einhergehend die reduzierte Expression von Tumorsuppressoren könnten so der Entstehung und Verbreitung von Tumoren weniger effizient entgegenwirken (130). Wie sich die auch unter Feinstaubbelastung beobachtete differentielle Methylierung jedoch konkret auf die Genexpression und zelluläre Signalwege auswirkt, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Durch die *Cytoscape* Analyse werden funktionell miteinander in Verbindung stehende Gene identifiziert und in einem Netzwerk dargestellt. So konnten neben den *HOX*-Genen noch weitere zelluläre Funktionen und Signalwege ermittelt werden, die potentiell von den Feinstaub-

assoziierten Methylierungsveränderungen betroffen sind. So scheinen im Besonderen zelluläre Prozesse wie die DNA-Reparatur, Transkription, Zellzyklusregulation und die Regulation der Immunantwort durch die veränderte DNA-Methylierung beeinflusst.

In dieser Studie wurden außerdem hypermethylierte DMRs in Genen, die mit der oxidativen Stressantwort assoziiert sind, wie Peroxidasin Homolog (*PXDN*) und Sulfiredoxin 1 (*SRXN1*), gefunden. Frühere Studien zeigen, dass Feinstaub zu oxidativem Stress in den exponierten Zellen führt. Eine Hypermethylierung von Genen, die einen Schutz gegenüber oxidativem Stress vermitteln, würde bedeuten, dass die Zellen dem durch Feinstaub induzierten Zellstress nicht entgegenwirken können, was zu Zellschädigungen führen kann.

Neben der DNA-Methylierung wurden miRNAs als weitere Ebene der epigenetischen Regulation in den Überständen der Nasallavage untersucht. Bei der miRNA-Expressionsanalyse zeigte sich im Vergleich zwischen den beiden Standorten eine signifikant geringere Expression der miRNA miR-486-5p in den Proben der Teilnehmenden aus Stuttgart. Eine Deregulierung von miR-486-5p wurde bei verschiedenen Tumorerkrankungen beobachtet, aber auch bereits im Zusammenhang mit Feinstaubexposition beschrieben. Weiterführende Analysen zeigten, dass viele der Zielgene, die mutmaßlich von der differentiellen Expression von miR-486-5p beeinflusst werden, Teil des PI3K/AKT-Signalweges sind. PI3K/AKT ist ein intrazellulärer Signalübertragungsweg, der in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderen Molekülen Einfluss auf wesentliche zelluläre Prozesse, wie Zellwachstum, Proliferation, Apoptose oder Mechanismen der Immunantwort nimmt (8, 9).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen also deutliche epigenetische Veränderungen im Zusammenhang mit Feinstaubbelastung sowohl im DNA-Methylierungsmuster als auch im Expressionsprofil der microRNAs in Zellen und zellfreien Überständen der Nasallavage. Da epigenetische Modifikationen einen Einfluss auf die Ablesbarkeit der Gene und damit auf deren Aktivierung oder Inaktivierung haben, muss davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Modifikationen auf epigenetischer Ebene auch einen Einfluss haben auf die Expression von Genen, die in die Immunantwort, in DNA-Reparatur-Mechanismen, in Autophagozytose und in weitere essentielle zelluläre Prozesse involviert sind. Insbesondere Veränderungen der Immun- und oxidativen Stressantwort wurden bereits bei Belastung mit hohen Feinstaubkonzentrationen beobachtet (82).

Schwieriger ist die Beantwortung der Frage, ob die beobachteten epigenetischen Modifikationen tatsächlich auch Gesundheitsrelevanz besitzen, insbesondere da hier ein Kollektiv von gesunden Erwachsenen untersucht worden ist. Grundsätzlich können epigenetische Veränderungen langfristig und teilweise auch lebenslang bestehen bleiben und über eine Fehlsteuerung von pathophysiologisch bedeutsamen Genen, die zum Beispiel im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen der Atemwege eine Rolle spielen, auch zu einem späteren Zeitpunkt noch Erkrankungsrelevanz besitzen. Leider ist eine Nachbeobachtung der für die in epigenetische Analysen eingeschlossenen Probanden nicht möglich, da deren Kontaktdaten gelöscht werden mussten. Basierend auf dem vorgegebenen Design dieser Studie war es auch nicht möglich, die Bedeutung der beobachteten epigenetischen Modifikationen im Zusammenhang mit einer Feinstaubbelastung für eine veränderte Genexpression zu analysieren. Die durch eine Nasallavage gewonnene sehr limitierte Zellzahl war zwar für die Isolation genomischer DNA für die Sequenzierung der DNA-Methylierung ausreichend, nicht aber zusätzlich für die Analyse der Genexpression. Soll diese im Hinblick auf die Zellen der oberen Atemwege beurteilt werden, wären weitere Probennahmen und Sequenzierung der RNA-Expression erforderlich. Um außerdem zu überprüfen, ob die beschriebenen Veränderungen auf das nasorespiratorische Gewebe begrenzt sind oder möglicherweise systemisch auftreten, könnten Genexpressions-Analysen zudem in Blutproben durchgeführt werden.

Eine differentielle Genexpression infolge von Feinstaubbelastung könnte einerseits global, also über alle Zellen hinweg auftreten, andererseits ist es auch vorstellbar, vielleicht sogar wahrscheinlicher, dass funktionelle Veränderungen nur in bestimmten Zellpopulationen auftreten. Um dies zu differenzieren, eignen sich Einzelzellanalysen. Im Fall von Einzelzell-RNA-Sequenzierung (engl. *single cell RNA sequencing*, scRNA-seq) werden Transkriptionsprofile von mehreren hundert bis tausend einzelner Zellen erstellt und so simultan RNA-Expressionsveränderungen verschiedener Zellpopulationen detektierbar. Zum Zeitpunkt des Studiendesigns und dem Beginn der Studie war die Methode der Einzelzellsequenzierung noch verhältnismäßig neu und konnte daher nicht in der Planung berücksichtigt werden. Kommerzielle Assays mit entsprechenden Geräten und Analyseprogrammen, die innerhalb der letzten Jahre entwickelt wurden (134), ermöglichen heute eine breite Anwendung der Einzelzellsequenzierung und stellen eine weitere Möglichkeit dar, die Auswirkungen der hier beschriebenen epigenetischen Veränderungen unter Feinstaubbelastung auf die verschiedenen Zelltypen im Nasenepithel zu untersuchen.

In Hinblick auf die Nutzung von DNA-Methylierungsmustern als potentielle Biomarker, die feinstaubinduzierte Veränderungen bereits frühzeitig anzeigen können, spielen die funktionellen Auswirkungen der Methylierung jedoch eine untergeordnete Rolle. Hierfür wären vielmehr die Spezifität, Sensitivität und Robustheit der differentiellen Methylierung von Bedeutung. So könnten, basierend auf den hier beschriebenen DMRs, Regionen für Validierungsexperimente in größeren Kohorten ausgewählt werden. Durch die Eingrenzung der untersuchten Regionen könnten Nachfolgestudien die Methylierungsveränderungen durch Feinstaub mittels kostengünstiger, zielgerichteter Methoden, wie beispielsweise Pyrosequenzierung, bei einer größeren Anzahl an Personen validieren und so jene genomische Regionen aufzeigen, die spezifisch und robust bei Langzeitexposition gegenüber erhöhten Feinstaubkonzentrationen auftreten. Zwar sollte mit dem hier angewendeten Studiendesign und den stringenten Analysekriterien die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Ergebnisse minimal gehalten werden, jedoch konnte nur eine begrenzte Anzahl von 60 Personen zweier Standorte untersucht werden. Validierungsexperimente in größeren Kohorten mit Personen verschiedener geografischer Herkunft sind erforderlich, um die Eignung der ermittelten DMRs als Biomarker zu überprüfen.

Sollte es möglich sein, einige der ermittelten DMRs in Nachfolgeuntersuchungen als geeignete Marker für feinstaubinduzierte Methylierungsveränderungen zu identifizieren, so wäre mit der Messung von DNA-Methylierung in Zellen der Nasallavage, oder auch von Zellen aus den nunmehr allseits bekannten Nasalabstrichen, die Möglichkeit eines Biomarkers geschaffen, der in einfach zu gewinnenden Proben bestimmt werden kann. Solche Merkmale, die frühzeitige Effekte von Feinstaubbelastung anzeigen, können dabei helfen, die Effizienz von Maßnahmen zur Feinstaubreduktion zu überprüfen. Außerdem könnte mithilfe dieser Marker – falls diese mit der Entstehung von Krankheiten in Verbindung gebracht werden können – die Entwicklung von feinstaubinduzierten pathologischen Veränderungen schon vor Krankheitsentstehung angezeigt werden.

Zusätzlich zu den epigenetischen Analysen wurden Zytokinmessungen aus dem Überstand der Nasallavage durchgeführt. Hierbei zeigte sich, trotz geringer Differenzen der Medianwerte, für CCL2 ein standortabhängiger Effekt mit höheren Konzentrationen bei den Teilnehmenden aus Stuttgart. Für weitere Entzündungsmarker, die bereits in vorherigen Studien beschrieben worden waren, konnten jedoch keine Unterschiede zwischen Simmerath und Stuttgart gefunden werden. Hier muss jedoch einschränkend darauf hingewiesen werden, dass die Proteinanalytik in Ermangelung anderen Untersuchungsmaterials aus den Überständen der Nasallavage

erfolgen musste, die mit Sputolysin versetzt waren. Vermutlich hat dies die Nachweismöglichkeit für Proteine beeinträchtigt.

Ein Faktor, der hier nur begrenzt berücksichtigt werden konnte, ist die Zusammensetzung der Feinstaubpartikel. Die Auswahl der Probennamestandorte erfolgte auf Basis von PM₁₀-Konzentrationen der örtlichen Messstationen, die mit selbst durchgeführten Partikelmessungen zusätzlich validiert wurden. Da PM₁₀ jedoch ausschließlich über die Partikelgröße definiert ist, können keine Aussagen über den Einfluss einzelner Luftschadstoffbestandteile gemacht werden. Wie unter 3.4.3 erläutert, unterscheiden sich die beiden Standorte gleichermaßen in den Konzentrationen von Benzo[a]pyren, Stickstoffdioxid und Benzol. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe wie Benzo[a]pyren können an Feinstaubpartikel binden und sind somit oft Bestandteil von PM₁₀ (UBA - Luftschadstoffe im Überblick). Neben der Außenluft kann auch Partikelbelastung in Innenräumen eine Rolle spielen, da bestimmte häusliche Aktivitäten (beispielsweise Kochen, Staubwischen oder Renovierungsarbeiten) die Entstehung von Feinstaub fördern. Um die Innenraumpartikelbelastung abzuschätzen, wurden von den Teilnehmenden Aktivitätsprotokolle geführt. Hier zeigten sich geringfügige Unterschiede (vgl. 4.3), deren Einfluss als vernachlässigbar eingeschätzt wurde. Auch wenn unsere Studie keine genaue Differenzierung von Partikeleffekten selbst und möglichen gebundenen Schadstoffen erlaubt, legt sie nahe dass die beobachteten biologischen Effekte mit den höheren Außenluftkonzentrationen schädlicher aerogener Substanzen im Zusammenhang stehen.

Zusammenfassend ist also festzustellen, dass in dieser Studie erstmals genomweite epigenetische Veränderungen in Zellen aus der Nasallavage unter Feinstaubbelastung beschrieben wurden. Die identifizierten Unterschiede zwischen hoch und gering belasteten Personen erlauben zwar keinen Rückschluss auf die Entstehung von feinstaubassoziierten Krankheitsbildern, können jedoch erste Anzeichen für solche darstellen und als Basis für die Entwicklung von Frühindikatoren erhöhter Feinstaubbelastung dienen.

8 Quellenverzeichnis

1. Organization WH. Ambient (outdoor) air pollution 2021 [updated 22 September 2021]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health).
2. Luftqualität 2019 - Vorläufige Auswertung. 2020.
3. WHO global air quality guidelines: particulate matter (PM_{2.5} and PM₁₀), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide: executive summary. World Health Organization; 2021.
4. Clifford RL, Jones MJ, MacIsaac JL, McEwen LM, Goodman SJ, Mostafavi S, et al. Inhalation of diesel exhaust and allergen alters human bronchial epithelium DNA methylation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017;139(1):112-21.
5. Gruziova O, Xu CJ, Yousefi P, Relton C, Merid SK, Breton CV, et al. Prenatal Particulate Air Pollution and DNA Methylation in Newborns: An Epigenome-Wide Meta-Analysis. *Environmental health perspectives*. 2019;127(5):57012.
6. Wu W, Jin Y, Carlsten C. Inflammatory health effects of indoor and outdoor particulate matter. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2018;141(3):833-44.
7. De Grove KC, Provoost S, Brusselle GG, Joos GF, Maes T. Insights in particulate matter-induced allergic airway inflammation: Focus on the epithelium. *Clin Exp Allergy*. 2018;48(7):773-86.
8. Hoxhaj G, Manning BD. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*. 2020;20(2):74-88.
9. Weichhart T, Säemann MD. The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2008;67(Suppl 3):iii70-iii4.
10. Pope CA, 3rd, Bhatnagar A, McCracken JP, Abplanalp W, Conklin DJ, O'Toole T. Exposure to Fine Particulate Air Pollution Is Associated With Endothelial Injury and Systemic Inflammation. *Circulation research*. 2016;119(11):1204-14.
11. U.S. E. Integrated Science Assessment (ISA) for Particulate Matter (Final Report, Dec 2019). US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 2019;EPA/600/R-19/188.
12. Villota-Salazar NA, Mendoza-Mendoza A, González-Prieto JM. Epigenetics: from the past to the present. *Frontiers in Life Science*. 2016;9(4):347-70.
13. Hernando-Herraez I, Garcia-Perez R, Sharp AJ, Marques-Bonet T. DNA Methylation: Insights into Human Evolution. *PLoS Genet*. 2015;11(12):e1005661.
14. Bommarito PA, Fry RC. Chapter 2-1 - The Role of DNA Methylation in Gene Regulation. In: McCullough SD, Dolinoy DC, editors. *Toxicoepigenetics*: Academic Press; 2019. p. 127-51.
15. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics*. 2015;16(7):421-33.
16. Chi GC, Liu Y, MacDonald JW, Barr RG, Donohue KM, Hensley MD, et al. Long-term outdoor air pollution and DNA methylation in circulating monocytes: results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Environ Health*. 2016;15(1):119.
17. de F C Lichtenfels AJ, van der Plaat DA, de Jong K, van Diemen CC, Postma DS, Nedeljkovic I, et al. Long-term Air Pollution Exposure, Genome-wide DNA Methylation and Lung Function in the LifeLines Cohort Study. *Environmental health perspectives*. 2018;126(2):027004-.
18. Chen R, Li H, Cai J, Wang C, Lin Z, Liu C, et al. Fine Particulate Air Pollution and the Expression of microRNAs and Circulating Cytokines Relevant to Inflammation, Coagulation, and Vasoconstriction. *Environmental health perspectives*. 2018;126(1):017007.
19. Zhou W, Tian D, He J, Wang Y, Zhang L, Cui L, et al. Repeated PM_{2.5} exposure inhibits BEAS-2B cell P53 expression through ROS-Akt-DNMT3B pathway-mediated promoter hypermethylation. *Oncotarget*. 2016;7(15):20691-703.
20. Bollati V, Angelici L, Rizzo G, Pergoli L, Rota F, Hoxha M, et al. Microvesicle-associated microRNA expression is altered upon particulate matter exposure in healthy workers and in A549 cells. *J Appl Toxicol*. 2015;35(1):59-67.

21. Untersuchungen zur Zusammensetzung des Feinstaubes in Hamburg und Schleswig-Holstein. Hamburger Institut für Hygiene und Umwelt und Staatliches Umweltamt Itzehoe; 2008.
22. Luftqualität unter der Lupe. Deutscher Wetterdienst; 2017. Contract No.: DWD 1. Auflage 3.000 / 03.17.
23. Carvalho TC, Peters JI, Williams RO, 3rd. Influence of particle size on regional lung deposition--what evidence is there? *Int J Pharm.* 2011;406(1-2):1-10.
24. Umweltbundesamt. Feinstaub-Belastung 2021 [Available from: <https://www.umweltbundesamt.de/daten/luft/feinstaub-belastung#feinstaubkonzentrationen-in-deutschland>].
25. Air quality guidelines: global update 2005: particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. World Health Organization. Regional Office for Europe; 2006. Report No.: EUR/05/5046029.
26. Schulz H, Karrasch S, Bölke G, Cyrys J, Hornberg C, Pickford R, et al. [Breathing: Ambient Air Pollution and Health - Part III]. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*. 2019;73(7):407-29.
27. Hargett LA, Bauer NN. On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication. *Pulm Circ.* 2013;3(2):329-40.
28. Robert-Koch-Institut. [Significance of cytokine determinations in general environmental practice. Report of the "Methods and Quality Assurance Committee of Environmental Medicine"]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2004;47(1):73-9.
29. (CLSI) CaLSI. Collection of Diagnostic Venous Blood Specimens 6th Edition ed.
30. Park M, Joo HS, Lee K, Jang M, Kim SD, Kim I, et al. Differential toxicities of fine particulate matters from various sources. *Scientific Reports*. 2018;8(1):17007.
31. Hampel R, Peters A, Beelen R, Brunekreef B, Cyrys J, de Faire U, et al. Long-term effects of elemental composition of particulate matter on inflammatory blood markers in European cohorts. *Environ Int.* 2015;82:76-84.
32. Steenhof M, Mudway IS, Gosens I, Hoek G, Godri KJ, Kelly FJ, et al. Acute nasal pro-inflammatory response to air pollution depends on characteristics other than particle mass concentration or oxidative potential: the RAPTES project. *Occupational and environmental medicine*. 2013;70(5):341-8.
33. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. 2016. 2016. Report No.: 1102728.
34. miRNeasy Micro Handbook 03/2021 2021. Report No.: HB-1001-004
35. QIAseq miRNA Library Kit Handbook. 2020. Report No.: HB-2157-007.
36. Mompeón A, Ortega-Paz L, Vidal-Gómez X, Costa TJ, Pérez-Cremades D, Garcia-Blas S, et al. Disparate miRNA expression in serum and plasma of patients with acute myocardial infarction: a systematic and paired comparative analysis. *Scientific Reports*. 2020;10(1):5373.
37. Garcia-Elias A, Alloza L, Puigdecanet E, Nonell L, Tajés M, Curado J, et al. Defining quantification methods and optimizing protocols for microarray hybridization of circulating microRNAs. *Scientific Reports*. 2017;7(1):7725.
38. T. W. Langefeld JM, J. Engel, H. Harbach, and T. Chakraborty Teil 3: Das Immunsystem und die Lunge. *Anesthesiol und Intensivmed*. 2009;vol. 50(no. 3): pp. 132–41.
39. Khavari DA, Sen GL, Rinn JL. DNA methylation and epigenetic control of cellular differentiation. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2010;9(19):3880-3.
40. Sack U TA, Rothe G Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflussszytometrie. : Basel,Karger, ; 2007.
41. Scientific TF. Thermo Scientific Cytology Solutions Brochure 2021. Report No.: HB-1001-004 Contract No.: 1494306793.
42. Biolabs NE. Instruction Manual NEBNext Enzymatic Methyl-seq Kit. . 2020. Report No.: Report No.: Version 5.0_2/20.
43. Wu H, Xu T, Feng H, Chen L, Li B, Yao B, et al. Detection of differentially methylated regions from whole-genome bisulfite sequencing data without replicates. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(21):e141.
44. Juhling F, Kretzmer H, Bernhart SH, Otto C, Stadler PF, Hoffmann S. metilene: fast and sensitive calling of differentially methylated regions from bisulfite sequencing data. *Genome Res.* 2016;26(2):256-62.

45. Gasperini M, Tome JM, Shendure J. Towards a comprehensive catalogue of validated and target-linked human enhancers. *Nature Reviews Genetics*. 2020;21(5):292-310.
46. Lea AJ, Vockley CM, Johnston RA, Del Carpio CA, Barreiro LB, Reddy TE, et al. Genome-wide quantification of the effects of DNA methylation on human gene regulation. *eLife*. 2018;7.
47. Angeloni A, Bogdanovic O. Enhancer DNA methylation: implications for gene regulation. *Essays in Biochemistry*. 2019;63(6):707-15.
48. Fishilevich S, Nudel R, Rappaport N, Hadar R, Plaschkes I, Iny Stein T, et al. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. *Database : the journal of biological databases and curation*. 2017;2017.
49. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*. 2003;13.
50. Wu G, Haw R. Functional Interaction Network Construction and Analysis for Disease Discovery. *Methods Mol Biol*. 2017;1558:235-53.
51. Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, Fabregat A, et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D498-d503.
52. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D353-d61.
53. Geekiyanage H, Rayatpisheh S, Wohlschlegel JA, Brown R, Ambros V. Extracellular microRNAs in human circulation are associated with miRISC complexes that are accessible to anti-AGO2 antibody and can bind target mimic oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(39):24213-23.
54. Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell*. 2019;177(2):428-45.e18.
55. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018;19(4):213-28.
56. Erickson HP. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biological procedures online*. 2009;11:32-51.
57. Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devised User Guide. 2018. Report No.: Report No.: PR05035.
58. Illumina. NextSeq 500 Systemhandbuch. 2019. Contract No.: Dokument-Nr. 15046563 v06 DEU.
59. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(D1):D155-D62.
60. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*. 2014;15(12):550.
61. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289-300.
62. Riolo G, Cantara S, Marzocchi C, Ricci C. miRNA Targets: From Prediction Tools to Experimental Validation. *Methods Protoc*. 2020;4(1):1.
63. Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic acids research*. 2020;48(D1):D127-D31.
64. Liu W, Wang X. Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. *Genome biology*. 2019;20(1):18-.
65. Garcia DM, Baek D, Shin C, Bell GW, Grimson A, Bartel DP. Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsi-6 and other microRNAs. *Nature structural & molecular biology*. 2011;18(10):1139-46.
66. Biolegend. Human Proinflammatory Chemokine Panels 2022 [Available from: <https://www.biolegend.com/en-us/products/legendplex-human-proinflammatory-chemokine-panel-13-plex-9700>].
67. Biolegend. LEGENDplex™ Data Analysis Software Suite 2022 [Available from: <https://www.biolegend.com/en-us/legendplex/software>].

68. Technologies S. Frequencies of Cell Types in Human Peripheral Blood. 2019. Report No.: DOCUMENT #23629 | VERSION 4.1.0.
69. Rider CF, Carlsten C. Air pollution and DNA methylation: effects of exposure in humans. *Clinical epigenetics*. 2019;11(1):131.
70. Alfano R, Herceg Z, Nawrot TS, Chadeau-Hyam M, Ghantous A, Plusquin M. The Impact of Air Pollution on Our Epigenome: How Far Is the Evidence? (A Systematic Review). *Current environmental health reports*. 2018;5(4):544-78.
71. Ray-Jones H, Spivakov M. Transcriptional enhancers and their communication with gene promoters. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2021;78(19):6453-85.
72. Carmel L, Chorev M. The Function of Introns. *Frontiers in genetics*. 2012;3.
73. Gareau JR, Lima CD. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(12):861-71.
74. Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2009;459(7245):356-63.
75. Sun L, Ye RD. Role of G protein-coupled receptors in inflammation. *Acta pharmacologica Sinica*. 2012;33(3):342-50.
76. Katzav S. Vav1: A hematopoietic signal transduction molecule involved in human malignancies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2009;41(6):1245-8.
77. Katzav S. Vav1: an oncogene that regulates specific transcriptional activation of T cells. *Blood*. 2004;103(7):2443-51.
78. Mark M, Rijli FM, Chambon P. Homeobox Genes in Embryogenesis and Pathogenesis. *Pediatric Research*. 1997;42(4):421-9.
79. Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *The Journal of Pathology*. 2005;205(2):154-71.
80. Curjuric I, Imboden M, Nadif R, Kumar A, Schindler C, Haun M, et al. Different genes interact with particulate matter and tobacco smoke exposure in affecting lung function decline in the general population. *PloS one*. 2012;7(7):e40175.
81. Rasmussen HB, Bjerre D, Linnet K, Jürgens G, Dalhoff K, Stefansson H, et al. Individualization of treatments with drugs metabolized by CES1: combining genetics and metabolomics. *Pharmacogenomics*. 2015;16(6):649-65.
82. Leikauf GD, Kim S-H, Jang A-S. Mechanisms of ultrafine particle-induced respiratory health effects. *Experimental & molecular medicine*. 2020;52(3):329-37.
83. Chi GC, editor *Methylomic and Transcriptomic Insights Linking Air Pollution and Atherosclerosis* 2016.
84. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry*. 2010;56(11):1733-41.
85. Mori MA, Ludwig RG, Garcia-Martin R, Brandão BB, Kahn CR. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metabolism*. 2019;30(4):656-73.
86. Sima M, Rossnerova A, Simova Z, Rossner P, Jr. The Impact of Air Pollution Exposure on the MicroRNA Machinery and Lung Cancer Development. *Journal of personalized medicine*. 2021;11(1).
87. Panwar B, Omenn GS, Guan Y. miRmine: a database of human miRNA expression profiles. *Bioinformatics*. 2017;33(10):1554-60.
88. Plieskatt JL, Rinaldi G, Feng Y, Levine PH, Easley S, Martinez E, et al. Methods and matrices: approaches to identifying miRNAs for Nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Translational Medicine*. 2014;12(1):3.
89. Godoy PM, Bhakta NR, Barczak AJ, Cakmak H, Fisher S, MacKenzie TC, et al. Large Differences in Small RNA Composition Between Human Biofluids. *Cell Rep*. 2018;25(5):1346-58.
90. Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends in cell biology*. 2008;18(10):505-16.
91. Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, Hill AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014;3(1):23743.

92. Janas T, Janas MM, Sapoń K, Janas T. Mechanisms of RNA loading into exosomes. *FEBS letters*. 2015;589(13):1391-8.
93. Guduric-Fuchs J, O'Connor A, Camp B, O'Neill CL, Medina RJ, Simpson DA. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics*. 2012;13(1):357.
94. Krauskopf J, Caiment F, van Veldhoven K, Chadeau-Hyam M, Sinharay R, Chung KF, et al. The human circulating miRNome reflects multiple organ disease risks in association with short-term exposure to traffic-related air pollution. *Environ Int*. 2018;113:26-34.
95. Jiang N, Dai Q, Su X, Fu J, Feng X, Peng J. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(6):4587-629.
96. Hodge RG, Ridley AJ. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2016;17(8):496-510.
97. Huang X-P, Hou J, Shen X-Y, Huang C-Y, Zhang X-H, Xie Y-A, et al. MicroRNA-486-5p, which is downregulated in hepatocellular carcinoma, suppresses tumor growth by targeting PIK3R1. *The FEBS Journal*. 2015;282(3):579-94.
98. Tian F, Wang J, Ouyang T, Lu N, Lu J, Shen Y, et al. MiR-486-5p Serves as a Good Biomarker in Non-small Cell Lung Cancer and Suppresses Cell Growth With the Involvement of a Target PIK3R1. *Frontiers in genetics*. 2019;10(688).
99. Gao Z-j, Yuan W-d, Yuan J-q, Yuan K, Wang Y. miR-486-5p functions as an oncogene by targeting PTEN in non-small cell lung cancer. *Pathology - Research and Practice*. 2018;214(5):700-5.
100. Li J, Zhou Q, Liang Y, Pan W, Bei Y, Zhang Y, et al. miR-486 inhibits PM2.5-induced apoptosis and oxidative stress in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Annals of translational medicine*. 2018;6(11):209.
101. Xiao Y. MiR-486-5p inhibits the hyperproliferation and production of collagen in hypertrophic scar fibroblasts via IGF1/PI3K/AKT pathway. *Journal of Dermatological Treatment*. 2021;32(8):973-82.
102. Yu S, Geng S, Hu Y. miR-486-5p inhibits cell proliferation and invasion through repressing GAB2 in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2018;16(3):3525-30.
103. Gu H, Maeda H, Moon JJ, Lord JD, Yoakim M, Nelson BH, et al. New Role for Shc in Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 2000;20(19):7109-20.
104. Ma X, Bai Y. IGF-1 activates the P13K/AKT signaling pathway via upregulation of secretory clusterin. *Mol Med Rep*. 2012;6(6):1433-7.
105. Mondal NK, Roy A, Mukherjee B, Das D, Ray MR. Indoor air pollution from biomass burning activates Akt in airway cells and peripheral blood lymphocytes: a study among premenopausal women in rural India. *Toxicologic pathology*. 2010;38(7):1085-98.
106. Su R, Jin X, Zhang W, Li Z, Liu X, Ren J. Particulate matter exposure induces the autophagy of macrophages via oxidative stress-mediated PI3K/AKT/mTOR pathway. *Chemosphere*. 2017;167:444-53.
107. Liu T, Wu B, Wang Y, He H, Lin Z, Tan J, et al. Particulate matter 2.5 induces autophagy via inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin kinase signaling pathway in human bronchial epithelial cells. *Mol Med Rep*. 2015;12(2):1914-22.
108. Kma L, Baruah TJ. The interplay of ROS and the PI3K/Akt pathway in autophagy regulation. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2021.
109. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018;19(6):349-64.
110. Gangwar RS, Bevan GH, Palanivel R, Das L, Rajagopalan S. Oxidative stress pathways of air pollution mediated toxicity: Recent insights. *Redox Biology*. 2020;34:101545.
111. Yang Y, Klionsky DJ. Autophagy and disease: unanswered questions. *Cell Death & Differentiation*. 2020;27(3):858-71.
112. Shin HH, Maquiling A, Thomson EM, Park I-W, Stieb DM, Dehghani P. Sex-difference in air pollution-related acute circulatory and respiratory mortality and hospitalization. *Science of The Total Environment*. 2022;806:150515.

113. Kawamura M, Toiyama Y, Tanaka K, Saigusa S, Okugawa Y, Hiro J, et al. CXCL5, a promoter of cell proliferation, migration and invasion, is a novel serum prognostic marker in patients with colorectal cancer. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990). 2012;48(14):2244-51.
114. Dalgard C, Eidelman O, Jozwik C, Olsen CH, Srivastava M, Biswas R, et al. The MCP-4/MCP-1 ratio in plasma is a candidate circadian biomarker for chronic post-traumatic stress disorder. *Translational Psychiatry*. 2017;7(2):e1025-e.
115. Fromm H.J. HMS. Enzyme Kinetics. Chapter in: *Essentials of Biochemistry*. 2012.
116. Yan Z, Jin Y, An Z, Liu Y, Samet JM, Wu W. Inflammatory cell signaling following exposures to particulate matter and ozone. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1860(12):2826-34.
117. Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *Eur Respir J*. 2009;33(6):1485-97.
118. Wolf EJ, Maniates H, Nugent N, Maihofer AX, Armstrong D, Ratanatharathorn A, et al. Traumatic stress and accelerated DNA methylation age: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2018;92:123-34.
119. Martin EM, Fry RC. Environmental Influences on the Epigenome: Exposure- Associated DNA Methylation in Human Populations. *Annual Review of Public Health*. 2018;39(1):309-33.
120. Ruiz-Hernandez A, Kuo C-C, Rentero-Garrido P, Tang W-Y, Redon J, Ordovas JM, et al. Environmental chemicals and DNA methylation in adults: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Clinical epigenetics*. 2015;7(1):55.
121. Trump S, Bieg M, Gu Z, Thurmann L, Bauer T, Bauer M, et al. Prenatal maternal stress and wheeze in children: novel insights into epigenetic regulation. *Sci Rep*. 2016;6:28616.
122. Bauer T, Trump S, Ishaque N, Thurmann L, Gu L, Bauer M, et al. Environment-induced epigenetic reprogramming in genomic regulatory elements in smoking mothers and their children. *Mol Syst Biol*. 2016;12(3):861.
123. Radford EJ, Ito M, Shi H, Corish JA, Yamazawa K, Isganaitis E, et al. In utero effects. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. *Science*. 2014;345(6198):1255903.
124. Luo Y, Lu X, Xie H. Dynamic *Alu* Methylation during Normal Development, Aging, and Tumorigenesis. *BioMed Research International*. 2014;2014:784706.
125. Panni T, Mehta Amar J, Schwartz Joel D, Baccarelli Andrea A, Just Allan C, Wolf K, et al. Genome-Wide Analysis of DNA Methylation and Fine Particulate Matter Air Pollution in Three Study Populations: KORA F3, KORA F4, and the Normative Aging Study. *Environmental health perspectives*. 2016;124(7):983-90.
126. Lee MK, Xu C-J, Carnes MU, Nichols CE, Ward JM, Kwon SO, et al. Genome-wide DNA methylation and long-term ambient air pollution exposure in Korean adults. *Clinical epigenetics*. 2019;11(1):37.
127. Dai L, Mehta A, Mordukhovich I, Just AC, Shen J, Hou L, et al. Differential DNA methylation and PM2.5 species in a 450K epigenome-wide association study. *Epigenetics*. 2017;12(2):139-48.
128. Eze IC, Jeong A, Schaffner E, Rezwan FI, Ghantous A, Foraster M, et al. Genome-Wide DNA Methylation in Peripheral Blood and Long-Term Exposure to Source-Specific Transportation Noise and Air Pollution: The SAPALDIA Study. *Environmental health perspectives*. 2020;128(6):067003.
129. Brunekreef BS, Maciej ; Chen, Jie ; Andersen, Zorana Jovanovic ; Atkinson, Richard ; Bauwelinck, Mariska ; Bellander, Tom ; Boutron-Ruault, Marie-Christine ; Brandt, Jørgen ; Carey, Iain ; Cesaroni, Giulia ; Forastiere, Francesco ; Fecht, Daniela ; Gulliver, John ; Hertel, Ole ; Hoffmann, Barbara ; de Hoogh, Kees ; Houthuijs, Danny ; Hvidtfeldt, Ulla A. ; Janssen, Nicole ; Jørgensen, Jeanette Therning ; Katsouyanni, Klea ; Ketzel, Matthias ; Klompmaker, Jochem ; Krog, Norun Hjertager ; Liu, Shuo ; Ljungman, Petter L.S. ; Mehta, Amar Jayant ; Nagel, Gabriele ; Oftedal, Bente M. ; Pershagen, Göran ; Peters, Annette ; Raaschou-Nielsen, Ole ; Renzi, Matteo ; Rodopoulou, Sophia ; Samoli, Evi ; Schwarze, Per Everhard ; Sigsgaard, Torben ; Stafoggia, Massimo ; Vienneau, Danielle ; Weinmayr, Gudrun ; Wolf, Kathrin ; Hoek, Gerard. Mortality and

Morbidity Effects of Long-Term Exposure to Low-Level PM2.5, BC, NO2, and O3: An Analysis of European Cohorts in the ELAPSE Project. 2021. Report No.: 2688-6855.

130. Paço A, de Bessa Garcia SA, Freitas R. Methylation in HOX Clusters and Its Applications in Cancer Therapy. *Cells*. 2020;9(7):1613.

131. Abbas K, Breton J, Planson AG, Bouton C, Bignon J, Seguin C, et al. Nitric oxide activates an Nrf2/sulfinedoxin antioxidant pathway in macrophages. *Free radical biology & medicine*. 2011;51(1):107-14.

132. Hanmer KL, Mavri-Damelin D. Peroxidasin is a novel target of the redox-sensitive transcription factor Nrf2. *Gene*. 2018;674:104-14.

133. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(13):4777.

134. Svensson V, Vento-Tormo R, Teichmann SA. Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade. *Nature Protocols*. 2018;13(4):599-604.

135. Kamińska K, Nalejska E, Kubiak M, Wojtysiak J, Żoła Ł, Kowalewski J, et al. Prognostic and Predictive Epigenetic Biomarkers in Oncology. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2019;23(1):83-95.

A Anhang

A.1 Fragebogen

Nachfolgend sind alle Fragen des Fragebogens, der den Teilnehmenden im Voraus zugesandt wurde, im Originalwortlaut aufgeführt. Fragen sind fett bzw. als Überschrift hervorgehoben und Antwortmöglichkeiten als Stichpunkte aufgeführt. Soweit nicht anders angegeben, konnte je eine Antwortmöglichkeit ausgewählt oder als Freitext ausgefüllt werden.

1 Persönliche Daten

Geschlecht:

- ▶ männlich
- ▶ weiblich

Geburtsdatum (Monat/Jahr)

Größe (in cm)

Gewicht (in kg)

Geburtsort und ggf. bis wann dort wohnhaft (Postleitzahl Ort (falls Ausland, bitte Land angeben))

Nächstgelegene Stadt zu Geburtsort (Postleitzahl, Stadt)

Familienstand:

- ▶ verheiratet oder eingetragene Lebensgemeinschaft
- ▶ ledig
- ▶ geschieden
- ▶ verwitwet

Höchster allgemein bildender Schulabschluss:

- ▶ Volksschule/Hauptschule
- ▶ Realschulabschluss/Mittlere Reife/Fachhochschulreife
- ▶ POS (Polytechn. Oberschule) bzw. 10. Klasse (vor 1965: 8. Klasse)
- ▶ Fachhochschulreife/Abschluss einer Fachoberschule
- ▶ Abitur (allgemeine oder fachgebundene Hochschulreife)
- ▶ anderen Schulabschluss (z. B. im Ausland erworben)
- ▶ Schule beendet ohne Schulabschluss

Höchster beruflicher Ausbildungsabschluss bzw. Hochschulabschluss:

- ▶ keinen Berufsabschluss
- ▶ berufliche-betriebliche Ausbildung (Lehre) abgeschlossen
- ▶ beruflich-schulische Ausbildung (Berufsfachschule, Handelsschule, Vorbereitungsdienst für den Mittleren Dienst in der öffentlichen Verwaltung) abgeschlossen
- ▶ Ausbildung an einer Fachschule, Meister-, Technikerschule, Berufs- oder Fachakademie abgeschlossen
- ▶ Abschluss an einer Fachhochschule oder Ingenieurschule
- ▶ Abschluss an einer Universität oder Hochschule
- ▶ anderen Ausbildungsabschluss

Zurzeit erwerbstätig (Unter Erwerbstätigkeit wird jede bezahlte bzw. mit einem Einkommen verbundene Tätigkeit verstanden, egal welchen zeitlichen Umfang sie hat.)

- ▶ Vollzeit erwerbstätig
- ▶ Teilzeit erwerbstätig, ich arbeite (Wochenstunden)
- ▶ geringfügig erwerbstätig (400€- oder Mini-Job)
- ▶ gelegentlich oder unregelmäßig beschäftigt

Zurzeit ausgeübte berufliche Tätigkeit:

Berufsbezeichnung (Zuordnung Wirtschaftszweig (Branche)):

- ▶ Chemische Industrie
- ▶ Baugewerbe
- ▶ Metallerzeugung
- ▶ Sonstige produzierende Industrie
- ▶ Metallbearbeitung, Metallverarbeitung, Maschinenbau
- ▶ Handwerk und sonstiges produzierendes Gewerbe
- ▶ Elektrotechnik
- ▶ Sonstiger Dienstleistungsbereich
- ▶ Verbrennungsanlagen
- ▶ Behörden, Öffentlicher Dienst
- ▶ Papier-, Zellstoff- und Druckindustrie
- ▶ Organisation, Verwaltung, Büro, Management, Administration

- ▶ Lederherstellung, Leder- und Fellverarbeitung
- ▶ Kultureller bzw. künstlerischer Bereich
- ▶ Textil- und Bekleidungsindustrie
- ▶ Erziehung, Ausbildung
- ▶ Land-/Forstwirtschaft, Holzwirtschaft, Gärtnerei
- ▶ Medizinische Bereiche, Gesundheitsdienst, Sozialbereiche
- ▶ Nahrungs- und Genußmittelindustrie
- ▶ Wissenschaft, Forschung, Technik
- ▶ Energiewirtschaft
- ▶ Sonstige Tätigkeit im nichtproduzierenden Bereich
- ▶ Bergbau

Üben Sie zurzeit eine Nebentätigkeit aus?

- ▶ nein
- ▶ ja

Wenn 'JA', welche?

Wie viele Stunden pro Woche üben Sie diese Tätigkeit aus? (h/Woche)

Wie hoch war Ihr Einkommen (Nettoverdienst), d.h. Lohn oder Gehalt nach Abzug von Steuern und Sozialversicherungsbeiträgen, im letzten Monat?

- ▶ keine Angabe
- ▶ unter 500 €
- ▶ 500 bis unter 1000 €
- ▶ 1000 bis unter 1500 €
- ▶ 1500 bis unter 2000 €
- ▶ 2000 bis unter 3000 €
- ▶ 3000 bis unter 4000 €
- ▶ 4000 und mehr

2 Wohnsituation

Seit wann wohnen Sie an ihrer jetzigen Wohnstätte?

Um was für einen Typ Haus handelt es sich?

- ▶ Ein- oder Zweifamilienhaus, freistehend
- ▶ Ein- oder Zweifamilienhaus, nicht freistehend
- ▶ Mehrfamilienhaus bis 5 Etagen
- ▶ Mehrfamilienhaus mit mehr als 5 Etagen

Wie viele Quadratmeter hat die Wohnstätte?

Wann wurde das Haus erbaut, in dem Sie wohnen?

- ▶ bis 1949
- ▶ 1950 bis 1980
- ▶ 1981 oder später
- ▶ weiß nicht

In welchem Stockwerk befindet sich das/die Zimmer, in dem/denen Sie sich überwiegend aufhalten?

- ▶ Erdgeschoss/Parterre, Hochparterre
- ▶ 1.Stock
- ▶ 2.Stock
- ▶ 3.Stock
- ▶ 4.Stock oder höher

Wie viele Personen leben in der Wohnstätte?

Art der Kochstelle (Mehrere Antworten sind möglich)

- ▶ Gasherd
- ▶ Elektroherd
- ▶ Mikrowelle
- ▶ Sonstige

Womit ist der Fußboden der Wohnstätte hauptsächlich belegt?

- ▶ mit Teppichboden / großflächigen Teppichen (> Hälfte der Fläche)
- ▶ wischbarer Boden mit kleinflächigen losen Teppichen (< Hälfte der Fläche)
- ▶ wischbarer Boden ohne lose Teppiche

Womit ist der Fußboden, in dem Zimmer belegt, in dem Sie sich hauptsächlich aufhalten?

- ▶ Teppichboden, Teppiche, Läufer aus Kunstfaser
- ▶ Teppichboden, Teppiche, Läufer aus Naturfaser (z. B. Wolle, Tierhaarmischung)
- ▶ Teppichboden, Teppiche, Läufer aus unbekanntem Material (u.a. Mischfaser)
- ▶ Holzparkett
- ▶ Holzdielen
- ▶ Laminat
- ▶ PVC
- ▶ Linoleum
- ▶ Fliesen, Steinfußboden, Marmor, Beton, Estrich, Kacheln
- ▶ Kork
- ▶ Sonstige abwischbare Bodenbeläge und zwar:

Womit ist der Fußboden in ihrem Schlafzimmer belegt?

- ▶ Teppichboden, Teppiche, Läufer aus Kunstfaser
- ▶ Teppichboden, Teppiche, Läufer aus Naturfaser (z. B. Wolle, Tierhaarmischung)
- ▶ Teppichboden, Teppiche, Läufer aus unbekanntem Material (u.a. Mischfaser)
- ▶ Holzparkett
- ▶ Holzdielen
- ▶ Laminat
- ▶ PVC
- ▶ Linoleum
- ▶ Fliesen, Steinfußboden, Marmor, Beton, Estrich, Kacheln
- ▶ Kork
- ▶ Sonstige abwischbare Bodenbeläge und zwar:

Wurden bei Ihnen zuhause in den letzten 2 Jahren größere Renovierungsarbeiten durchgeführt (z.B. Malern, neue Fußbodenbeläge, neue Möbel)?

- ▶ nein
- ▶ ja

Wurden Malerarbeiten durchgeführt?

- ▶ nein
- ▶ ja

Wenn 'JA', wann?

Wenn 'JA', welche Farben wurden verwendet?

- ▶ Nein
- ▶ Nicht bekannt
- ▶ Dispersionsfarbe
- ▶ Silikatfarbe
- ▶ Leimfarbe
- ▶ Kaseinfarbe

Wurde Fußbodenbelag neu verlegt?

- ▶ nein
- ▶ ja

Wenn 'JA', wann?

Wenn 'JA', welcher Fußbodenbelag?

Wurde der Fußbodenbelag verklebt?

- ▶ Ja
- ▶ Nein
- ▶ nicht bekannt

Wurde Parkett/Laminat/Holzfußboden versiegelt?

- ▶ Ja
- ▶ Nein
- ▶ nicht bekannt

Wurden neue Möbel aufgestellt?

- ▶ nein
- ▶ ja

Wenn 'JA', wann?

Wenn 'JA', woraus bestehen die Möbel?

Würden Sie Ihre Wohnung als feucht bezeichnen?

- ▶ nein
- ▶ ja

Gibt es Schimmel- oder Stockflecken in folgenden Räumen (außer auf Nahrungsmitteln)?

- ▶ Schlafzimmer
- ▶ Übrige Wohnung
- ▶ Bad
- ▶ Keller
- ▶ Keine Schimmel- oder Stockflecken

Wenn 'JA', wie groß sind die Schimmelflecken insgesamt?

- ▶ Punktuell, besonders an Silikonfugen
- ▶ Kleiner als 15 cm²
- ▶ Größer als 15 cm²

Halten Sie zurzeit Haustiere?

- ▶ nein
- ▶ ja

Wenn 'JA', welche? (Mehrere Antworten sind möglich)

- ▶ Hund
- ▶ Katze
- ▶ Nagetiere (z.B. Hamster, Meerschweinchen; Ratten, Kaninchen; Mäuse)
- ▶ Vögel (z.B. Wellensittiche, Papageien)
- ▶ Sonstige

Welche?

3 Heizung und Lüftung

Sind alle Räume beheizbar?

- ▶ ja
- ▶ nein

Wenn ‚NEIN‘, welche nicht?

- ▶ Fern-/Zentralheizung (kein Brenner in den Räumen, sondern Heizkörper oder Fußbodenheizung, die von außerhalb der Räume (z.B. Keller) mit Wärme versorgt werden)
- ▶ Etagenheizung (ein Brenner in den Wohnräumen, über den eventuell mehrere Heizkörper mit Wärme versorgt werden)

Wenn ‚JA‘, wo befindet sich der Brenner? (Mehrere Antworten sind möglich)

- ▶ Küche, Bad
- ▶ Wohnzimmer
- ▶ gesonderter Raum
- ▶ Einzelraumheizung (mehrere Öfen in der Wohnstätte)

Falls Sie Etagen- oder Einzelraumheizung haben, womit heizen Sie überwiegend?

- ▶ Holz/Koks/Kohle/Briketts
- ▶ Gas
- ▶ Öl
- ▶ Strom
- ▶ Sonstiges und zwar:
- ▶ Fußbodenheizung

Treten bei Ihnen in der Wohnstätte Schwarzfärbungen an Wänden, Fenstern oder Kunststoffteilen auf?

- ▶ nein
- ▶ ja

Wenn ‚JA‘, wo und in wie vielen Räumen?

Haben Sie in ihrer Wohnstätte einen offenen Kamin, Kaminofen oder Beistellherd?

- ▶ nein
- ▶ ja

Wenn ‚JA‘, wo befindet sich der Kamin?

und wie oft nutzen Sie diesen von Oktober bis April?

- ▶ (fast) nie
- ▶ 1-2 mal im Monat
- ▶ 1-2 mal in der Woche

- ▶ (fast) täglich

4 Wohnumgebung

In welcher Umgebung befindet sich Ihre Wohnstätte (< 2 km)? (Mehrere Antworten sind möglich)

- ▶ ländlich
- ▶ städtisch (Vorort)
- ▶ städtisch (Zentrum)
- ▶ schwacher Verkehr
- ▶ starker Verkehr
- ▶ Schwerindustrie
- ▶ Chemische Industrie
- ▶ Industriegebiet

Gibt es in der Umgebung Ihrer Wohnstätte folgende Einrichtungen (< 2 km)? (Mehrere Antworten sind möglich)

- ▶ Gärtnerei
- ▶ Bauernhof
- ▶ Kompostierung
- ▶ Lederverarbeitung
- ▶ Archiv
- ▶ Bibliothek
- ▶ Deponie
- ▶ Abfallsortierung
- ▶ Lebensmittelabfälle (Betriebe)
- ▶ Sägewerk/Schreinerei
- ▶ Kfz-Werkstatt
- ▶ Sonstige, welche:

Wie weit liegt Ihre Wohnstätte (Luftlinie) von einer verkehrsreichen Straße (Berufs-/Durchgangsverkehr) entfernt?

- ▶ bis zu 10 Meter

- ▶ 11 bis 50 Meter
- ▶ 51 bis 150 Meter
- ▶ mehr als 150 Meter
- ▶ An welcher Straße wohnen Sie?
- ▶ Spielstraße, Sackgasse, Verkehrsberuhigte Zone, Fußgängerzone
- ▶ Nebenstraße mit Tempo 30-Limit
- ▶ Nebenstraße ohne Tempo 30-Limit
- ▶ Hauptstraße / Bundesstraße

Wie viele Fahrstreifen hat diese Straße?

- ▶ 1-spurig
- ▶ 2-spurig
- ▶ 3-spurig
- ▶ 4-spurig oder mehr

Wie breit schätzen Sie die gesamte Fahrbahn? (in m)

Welchen Fahrbahnbelag hat die Straße?

- ▶ Asphalt
- ▶ Beton
- ▶ ebenes Pflaster (ebene Oberfläche, Fugenbreite weniger als 1 cm)
- ▶ unebenes Pflaster (Kopfsteinpflaster, große Fugen größer 1 cm)

Wie würden Sie den Verkehr in der Straße, in der Sie wohnen, beschreiben? (Mehrere Antworten sind möglich)

- ▶ Anwohnerverkehr (in Wohngebieten)
- ▶ Durchgangsverkehr
- ▶ Berufsverkehr

Kommt es in den Hauptverkehrszeiten regelmäßig zur Staubildung?

- ▶ nein
- ▶ ja

Befindet sich das Haus, in dem Sie wohnen, in einer Straßenschlucht von mindestens 100 Metern Länge? (Mit Straßenschlucht ist gemeint: überwiegend geschlossene Häuserzeilen auf beiden Seiten der Straße. Querstraßen, einzelne Hauseingänge und Hofeinfahrten sind erlaubt.)

- ▶ ja
- ▶ nein

Wenn 'NEIN', was trifft zu?

- ▶ Straßenschlucht von weniger als 100 m
- ▶ nur auf einer Straßenseite geschlossene Häuserzeile
- ▶ auf mindestens einer Straßenseite Häuser mit Gärten
- ▶ anders

5 Verkehrsbelastung

Wie oft pro Woche sind Sie an ihrer Arbeitsstätte?

- ▶ weniger als 3 mal
- ▶ 3-4 mal
- ▶ 5-6 mal
- ▶ 7 mal und öfter

Wie groß ist die Entfernung von Ihrem Wohnort zu ihrer Arbeitsstätte?

- ▶ weniger als 1 km
- ▶ 1-3 km
- ▶ 3-5 km
- ▶ 5 km und mehr

Wie gelangen Sie zur Arbeit?

- ▶ zu Fuß/mit dem Fahrrad
- ▶ Mit öffentlichen Verkehrsmitteln
- ▶ Mit dem Auto

Führt der Weg zur Arbeit durch verkehrsreiche Straßen?

- ▶ nein
- ▶ ja

Wie lange sind Sie täglich im Straßenverkehr Autoabgasen ausgesetzt? (auch zu Fuß, mit dem Rad, beim Sport)

- ▶ Weniger als 1 Stunde
- ▶ 1-2 Stunden
- ▶ 2-3 Stunden
- ▶ Mehr als 3 Stunden

6 Umgebung der Arbeitsstätte

In welcher Umgebung befindet sich Ihre Arbeitsstätte (< 2 km)? (Mehrere Antworten sind möglich)

- ▶ ländlich
- ▶ städtisch (Vorort)
- ▶ städtisch (Zentrum)
- ▶ schwacher Verkehr
- ▶ starker Verkehr
- ▶ Schwerindustrie
- ▶ Chemische Industrie
- ▶ Industriegebiet

Gibt es in der Umgebung Ihrer Arbeitsstätte folgende Einrichtungen (< 2 km)? (Mehrere Antworten sind möglich)

- ▶ Gärtnerei
- ▶ Bauernhof
- ▶ Kompostierung
- ▶ Lederverarbeitung
- ▶ Archiv
- ▶ Bibliothek
- ▶ Deponie
- ▶ Abfallsortierung
- ▶ Lebensmittelabfälle (Betriebe)
- ▶ Sägewerk/Schreinerei
- ▶ Kfz-Werkstatt

- ▶ Sonstige, welche:

Wie weit liegt Ihre Arbeitsstätte (Luftlinie) von einer verkehrsreichen Straße (Berufs-/Durchgangsverkehr) entfernt?

- ▶ bis zu 10 Meter
- ▶ 11 bis 50 Meter
- ▶ 51 bis 150 Meter
- ▶ mehr als 150 Meter

An welcher Straße liegt ihre Arbeitsstätte?

- ▶ Spielstraße, Sackgasse, Verkehrsberuhigte Zone, Fußgängerzone
- ▶ Nebenstraße mit Tempo 30-Limit
- ▶ Nebenstraße ohne Tempo 30-Limit
- ▶ Hauptstraße / Bundesstraße

Wie viele Fahrstreifen hat diese Straße?

- ▶ 1-spurig
- ▶ 2-spurig
- ▶ 3-spurig
- ▶ 4-spurig oder mehr

Wie breit schätzen Sie die gesamte Fahrbahn? (in m)

Welchen Fahrbahnbelag hat die Straße?

- ▶ Asphalt
- ▶ Beton
- ▶ ebenes Pflaster (ebene Oberfläche, Fugenbreite weniger als 1 cm)
- ▶ unebenes Pflaster (Kopfsteinpflaster, große Fugen größer 1 cm)

Wie würden Sie den Verkehr in der Straße, in der Sie arbeiten, beschreiben? (Mehrere Antworten sind möglich)

- ▶ Anwohnerverkehr (in Wohngebieten)
- ▶ Durchgangsverkehr
- ▶ Berufsverkehr

Kommt es in den Hauptverkehrszeiten regelmäßig zur Staubbildung?

- ▶ nein
- ▶ ja

Befindet sich ihre Arbeitsstätte in einer Straßenschlucht von mindestens 100 Metern Länge? (Mit Straßenschlucht ist gemeint: überwiegend geschlossene Häuserzeilen auf beiden Seiten der Straße. Querstraßen, einzelne Hauseingänge und Hofeinfahrten sind erlaubt.)

- ▶ ja
- ▶ nein

Wenn 'NEIN', was trifft zu?

- ▶ Straßenschlucht von weniger als 100 m
- ▶ nur auf einer Straßenseite geschlossene Häuserzeile
- ▶ auf mindestens einer Straßenseite Häuser mit Gärten
- ▶ anders

7 Fragen für Ex-Raucher

Haben Sie irgendwann einmal in ihrem Leben über einen Zeitraum von mehr als 6 Monaten regelmäßig geraucht?

Unter regelmäßig verstehen wir:

1 Zigarette pro Tag oder mindestens 5 Zigaretten pro Woche oder mindestens 1 Packung Zigaretten pro Monat oder

1 Zigarrillo pro Tag oder mindestens 5 pro Woche oder

2 Zigarren pro Woche oder

2 Pfeifen pro Woche

(Wenn mindestens eins zutrifft, dann ‚JA‘ ankreuzen!)

- ▶ nein
- ▶ ja

Wenn 'JA', wann haben Sie angefangen, regelmäßig zu rauchen?

Im Alter von (Jahren oder Jahreszahl)

Wann haben Sie aufgehört, regelmäßig zu rauchen? (Jahren oder Jahreszahl)

Wie viel haben Sie früher gewöhnlich geraucht?

Bitte geben Sie die Anzahl pro Tag oder Gramm pro Woche an! Wenn Sie gelegentlich Zigaretten rauchen, geben Sie bitte die Anzahl pro Woche an.

- ▶ Filterzigaretten (fabrikfertig):
- ▶ Anzahl pro Tag oder Anzahl pro Woche
- ▶ Filterlose Zigaretten (fabrikfertig):
- ▶ Anzahl pro Tag oder Anzahl pro Woche
- ▶ Zigarren, Zigarillos, Stumpen:
- ▶ Anzahl pro Tag oder Anzahl pro Woche
- ▶ Selbstgedrehte oder selbstgestopfte Zigaretten:
- ▶ Anzahl pro Tag oder Gramm pro Woche
- ▶ Pfeifen: (Anzahl pro Tag oder Gramm pro Woche)

Wie oft haben Sie in den letzten 12 Monaten eine E-Zigarette oder ein ähnliches Produkt verwendet?

- ▶ mehrmals täglich
- ▶ täglich
- ▶ mindestens 1 mal pro Woche
- ▶ seltener
- ▶ nie

8 Fragen für Nichtraucher (auch Ex-Raucher)

An wie vielen Tagen in der Woche sind Sie in geschlossenen Räumen Tabakrauch ausgesetzt? Mit geschlossenen Räumen meinen wir zum Beispiel: zu Hause, auf der Arbeit, in öffentlichen Gebäuden oder im Restaurant.

- ▶ (fast) nie
- ▶ 1-3 Tage
- ▶ 4-6 Tage
- ▶ täglich oder fast täglich

An einem solchen Tag, wie viele Stunden sind Sie dann Tabakrauch ausgesetzt?

- ▶ weniger als 1 Stunde
- ▶ 1 bis 3 Stunden

- ▶ 3 bis 5 Stunden
- ▶ mehr als 5 Stunden

Und wo ist das der Fall?

- ▶ bei der Arbeit
- ▶ zu Hause
- ▶ in Kneipen, Cafés, Bars oder Discos
- ▶ in Restaurants
- ▶ bei Freunden oder Bekannten
- ▶ an anderen Orten

9 Sportliche Aktivitäten

An wie vielen Tagen und wie lange haben Sie die folgenden Aktivitäten in den letzten 4 Wochen ausgeübt?

Zu Fuß zur Arbeit gehen (auch längere Teilstrecken)

- ▶ An wie vielen Tagen während der letzten 4 Wochen?
- ▶ Für wie viele Minuten pro Tag?
- ▶ nicht gemacht

Zu Fuß zum Einkaufen gehen

- ▶ An wie vielen Tagen während der letzten 4 Wochen?
- ▶ Für wie viele Minuten pro Tag?
- ▶ nicht gemacht

Radfahren zur Arbeit

- ▶ An wie vielen Tagen während der letzten 4 Wochen?
- ▶ Für wie viele Minuten pro Tag?
- ▶ nicht gemacht

Spaziergehen

- ▶ An wie vielen Tagen während der letzten 4 Wochen?
- ▶ Für wie viele Minuten pro Tag?
- ▶ nicht gemacht

Gartenarbeit (z. B. Rasen mähen, Hecke schneiden)

► An wie vielen Tagen während der letzten 4 Wochen?

► Für wie viele Minuten pro Tag?

► nicht gemacht

Körperlich anstrengende Hausarbeit (z. B. Putzen, Aufräumen)

► An wie vielen Tagen während der letzten 4 Wochen?

► Für wie viele Minuten pro Tag?

► nicht gemacht

Körperlich anstrengende Pflegearbeit (z. B. Kinder betreuen, Kranke pflegen)

► An wie vielen Tagen während der letzten 4 Wochen?

► Für wie viele Minuten pro Tag?

► nicht gemacht

Haben Sie in den letzten 4 Wochen regelmäßig sportliche Aktivitäten betrieben?

► nein

► ja

Wenn 'JA', wie oft?

► weniger als 1 Stunde in der Woche

► regelmäßig, 1–2 Stunden in der Woche

► regelmäßig, 2–4 Stunden in der Woche

► regelmäßig, mehr als 4 Stunden in der Woche

10 Gesundheitszustand

Haben oder hatten Sie irgendwann einmal in Ihrem Leben eine Allergie?

► nein

► ja

Wenn 'JA', wogegen? (Mehrere Antworten sind möglich)

► Nahrungsmittel

► Hausstaub/Milben

► Chemische Lebensmittelzusätze

► Federn

- ▶ Waschmittel
- ▶ Metalle (z.B. Uhren, Schmuck, Ohrringe)
- ▶ Tiere
- ▶ Insektenstiche (Bienen, Wespen)
- ▶ Blütenstaub, Gras-, Baumpollen
- ▶ Medikamente
- ▶ Sonstiges

Wenn 'JA', wann traten diese zuletzt auf?

- ▶ Im Vorschulalter
- ▶ Im Schulalter
- ▶ Danach

Erkältungen und Husten

Wie viele Erkältungen (Husten, Schnupfen, Halsweh mit oder ohne Fieber) hatten Sie etwa in den letzten 12 Monaten? (Angabe 0-99)

Hatten Sie während der letzten 12 Monate bei einer Erkältung Husten der länger als 14 Tage anhielt?

- ▶ nein
- ▶ ja

Haben Sie in den letzten 12 Monaten wiederholt gehustet?

- ▶ nein
- ▶ ja

Wenn 'JA', kam dies vor? (Mehrere Antworten sind möglich)

- ▶ bei Erkältung
- ▶ ohne Erkältung
- ▶ nach Anstrengung
- ▶ bei kalter Luft oder Nebel
- ▶ weiß nicht

Haben Sie in den letzten 12 Monaten wiederholt nachts gehustet?

- ▶ nein

- ▶ nur bei Erkältung
- ▶ auch ohne Erkältung
- ▶ weiß nicht

Atembeschwerden

Hatten Sie in den letzten 12 Monaten einmal einen Anfall von Kurzatmigkeit oder Atemnot?

- ▶ nein
- ▶ ja, einmal
- ▶ ja, 1-3 mal
- ▶ ja, 4-12 mal
- ▶ ja, mehr als 12 mal

Wenn 'JA', kam dies vor? (Mehrere Antworten sind möglich)

- ▶ nachts
- ▶ bei Erkältung
- ▶ während oder nach Anstrengung
- ▶ bei Kontakt mit Tieren
- ▶ bei Kontakt mit Gras, Blumen
- ▶ bei Kontakt mit Hausstaub
- ▶ weiß nicht

Traten diese Beschwerden in bestimmten Monaten auf?

- ▶ nein
- ▶ ja

Wenn 'JA', wann kam dies vor? (Mehrere Antworten sind möglich)

JAN FEB MÄR APR MAI JUN JUL AUG SEP OKT NOV DEZ

Hatten Sie irgendwann einmal in ihrem Leben beim Atmen pfeifende oder keuchende Atemgeräusche?

- ▶ nein
- ▶ ja

Wenn 'JA', wann trat dies zuletzt auf?

- ▶ im Vorschulalter

▶ im Schulalter

▶ danach

Hatten Sie in den letzten 12 Monaten beim Atmen pfeifende oder keuchende Atemgeräusche?

▶ nein

▶ ja

Wenn 'JA', kam dies vor? (Mehrere Antworten sind möglich)

▶ 1-3 mal

▶ 4-12 mal

▶ mehr als 12 mal

Kamen die Beschwerden vor? (Mehrere Antworten sind möglich)

▶ bei Erkältung

▶ während oder nach Anstrengung

▶ bei Kontakt mit Tieren

▶ bei Kontakt mit Gras, Blumen

▶ bei Kontakt mit Hausstaub

▶ keiner der benannten Gründe

▶ weiß nicht

Traten die Beschwerden in bestimmten Monaten auf?

▶ nein

▶ ja

Wenn 'JA', wann kam dies vor? (Mehrere Antworten sind möglich)

JAN FEB MÄR APR MAI JUN JUL AUG SEP OKT NOV DEZ

Augen und Nase

Hatten Sie irgendwann einmal in ihrem Leben Niesanfälle oder eine laufende verstopfte oder juckende Nase ohne erkältet zu sein?

▶ nein

▶ ja

Wenn 'JA', wann trat dies zuletzt auf?

▶ im Vorschulalter

▶ im Schulalter

▶ danach

Hatten Sie in den letzten 12 Monaten Niesanfälle oder eine laufende verstopfte oder juckende Nase ohne erkältet zu sein?

▶ nein

▶ ja, einmal

▶ ja, 1-3 mal

▶ ja, 4-12 mal

▶ ja, mehr als 12 mal

Wenn 'JA', hatten Sie mit diesen Nasenbeschwerden gleichzeitig juckende, tränende Augen?

▶ ja

▶ nein

Wann traten die Beschwerden auf? (Mehrere Antworten sind möglich)

JAN FEB MÄR APR MAI JUN JUL AUG SEP OKT NOV DEZ

Traten die Beschwerden auf bei Kontakt mit?

▶ Tieren

▶ Gras, Blumen

▶ Hausstaub

▶ weiß nicht

Wie stark waren Sie in den letzten 12 Monaten durch diese Nasenbeschwerden in ihren Aktivitäten eingeschränkt?

▶ stark

▶ mittel

▶ wenig

▶ gar nicht

Hatten Sie in den letzten 12 Monaten irgendwann einmal gerötete oder juckende Augen ohne gleichzeitige Nasenbeschwerden (nicht durch gechlortes Wasser)?

▶ nein

▶ ja

Haut

Hatten Sie irgendwann einmal in Ihrem Leben einen juckenden Hautausschlag, der stärker oder schwächer während mindestens 6 Monaten auftrat?

- ▶ nein
- ▶ ja

Wenn 'JA', wann trat dies zuletzt auf?

- ▶ im Vorschulalter
- ▶ im Schulalter
- ▶ danach

Trat dieser Hautausschlag in den letzten 12 Monaten auf?

- ▶ nein
- ▶ ja

Wenn 'JA', trat dieser juckende Hautausschlag jemals an einer der folgenden Körperstellen auf: In der Ellenbeuge oder Kniekehle, am Handgelenk, im Nacken, um die Augen oder Ohren?

- ▶ ja
- ▶ nein

Hatten Sie irgendwann einmal in Ihrem Leben Neurodermitis, endogenes Ekzem oder atopische Dermatitis?

- ▶ nein
- ▶ ja

Wenn 'JA', wann trat dies zuletzt auf?

- ▶ im Vorschulalter
- ▶ im Schulalter
- ▶ danach

Medikamente

Nehmen Sie zurzeit Medikamente ein, bekommen Sie Medikamente gespritzt?

- ▶ nein
- ▶ ja

Wenn 'JA', bitte tragen Sie Medikamente ein die Sie ständig einnehmen oder spritzen

Neben den aufgeführten Fragen, war von allen Teilnehmenden ein Aktivitätsprotokoll auszufüllen, diese sind in den Abbildung 21/Abbildung 22 aufgeführt.

Abbildung 21: Aktivitätsprotokoll des Fragebogens (täglich für die letzten 7 Tage vor Probennahme auszufüllen)

	Datum (tt.mm.jj)	Um welche Uhrzeit sind Sie aufgestanden? (HH:MM)	Um welche Uhrzeit sind Sie zu Bett gegangen? (HH:MM)	Wie lange waren Sie dazwischen... (SS:MM)				
				... zu Hause	... an der Arbeitsstelle	... unterwegs im Straßenverkehr	... im Freien	... in anderen Wohnungen, Häusern
1.Tag		um Uhr	um Uhr	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten
2.Tag		um Uhr	um Uhr	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten
3.Tag		um Uhr	um Uhr	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten
4. Tag		um Uhr	um Uhr	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten
5.Tag		um Uhr	um Uhr	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten
6. Tag		um Uhr	um Uhr	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten
7. Tag		um Uhr	um Uhr	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten	 Stunden Minuten

Abbildung 22: Protokoll Innenraum (täglich für die letzten 7 Tage vor Probennahme auszufüllen)

	06-07	07-08	08-09	09-10	10-11	11-12	12-13	13-14	14-15	15-16	16-17	17-18	18-19	19-20	20-21	21-22	22-23
Essen kochen																	
Backen und Braten am Herd																	
Backen und Braten mit der Mikrowelle																	
Toasten																	
Staubsaugen																	
Staubwischen																	
Lüften																	
Betten machen																	
Drucken																	
Heizung																	
lokaler Raumluft heater																	
offener Kamin																	
Aktivität bei der viel Staub entsteht Welche?																	
Handwerkertätigkeit Welche?																	
Brennende Kerze																	
Raucherstäbchen																	
Duftlampe																	
Tätigkeit mit großer Dampfentwicklung Welche?																	

A.2 Zellkomposition Nasallavage

Tabelle 16: Durchflusszytometrisch bestimmte Zellanteile in der Nasallavage aller Proben

Proben-ID	Epithel [% aller Events]	Leukozyten [% aller Events]	Granulozyten [% aller Leukozyten]	B-Lymphozyten [% aller Leukozyten]	T-Lymphozyten [% aller Leukozyten]	Monozyten [% aller Leukozyten]
SR01	21,5	78,5	81,4	0,1	0,0	1,3
SR02	16,2	83,8	90,2	0,8	0,0	0,3
SR03	4,6	95,4	87,7	0,9	0,0	1,4
SR04	65,5	34,5	87,5	0,2	0,0	0,3

Proben -ID	Epithel [% aller Events]	Leukozyten [% aller Events]	Granulozyten [% aller Leukozyten]	B-Lymphozyten [% aller Leukozyten]	T-Lymphozyten [% aller Leukozyten]	Monozyten [% aller Leukozyten]
SR05	29,5	70,5	72,7	5,0	0,0	2,1
SR06	0,8	99,2	98,2	0,2	0,0	0,5
SR07	4,8	95,2	98,3	0,2	0,0	0,3
SR08	34,8	65,2	90,3	0,6	0,0	0,9
SR09	52,5	47,5	88,7	0,7	0,0	0,9
SR11	10,5	89,5	72,9	2,3	0,0	0,9
SR12	24,0	76,0	64,6	15,0	3,1	1,2
SR13	9,1	90,9	90,8	0,0	0,0	0,3
SR14	47,0	53,0	82,6	0,1	0,0	0,0
SR15	18,1	81,9	74,3	0,1	0,0	0,0
SR16	9,0	91,0	86,3	3,5	0,0	1,7
SR17	33,3	66,7	87,8	0,3	0,0	0,0
SR18	2,0	98,0	94,5	0,1	0,0	0,8
SR19	40,8	59,2	30,2	0,3	0,0	0,0
SR20	5,2	94,8	88,0	0,9	0,0	0,1
SR21	34,7	65,3	43,6	0,8	0,7	0,0
SR22	50,8	49,2	84,5	0,1	0,0	0,2
SR23	43,9	56,1	80,8	2,7	0,0	0,0
SR24	28,8	71,2	77,5	1,4	5,0	3,9
SR25	26,1	73,9	79,3	3,5	0,0	0,0
SR26	20,3	79,7	69,5	3,3	0,0	0,2
SR27	49,5	50,5	80,5	0,1	0,0	0,2
SR28	40,1	59,9	79,3	4,7	4,8	0,3
SR29	6,4	93,6	34,8	46,4	3,5	0,3
SR30	19,2	80,8	88,6	2,2	0,0	0,7
SR31	12,3	87,7	80,8	0,4	0,0	0,9
SR32	24,6	75,4	85,3	0,6	0,1	1,1
SR33	13,8	86,2	87,1	0,1	0,0	0,7
SR34	3,9	96,1	94,8	0,0	0,0	0,0
SR35	1,1	98,9	98,7	0,2	0,0	0,1
SR36	7,8	92,2	97,0	0,4	0,0	0,4

Proben -ID	Epithel [% aller Events]	Leukozyten [% aller Events]	Granulozyten [% aller Leukozyten]	B-Lymphozyten [% aller Leukozyten]	T-Lymphozyten [% aller Leukozyten]	Monozyten [% aller Leukozyten]
SR37	33,4	66,6	81,0	2,2	0,3	2,8
SR38	6,1	93,9	89,9	0,0	0,0	0,1
SR39	12,7	87,3	86,4	0,1	0,0	0,5
SR40	32,8	67,2	88,6	0,4	0,0	0,0
SR41	5,3	94,7	98,0	0,1	0,0	0,2
SR42	11,5	88,5	87,0	0,2	0,0	0,5
SR43	11,0	89,0	78,4	0,0	0,0	0,0
SR44	35,2	64,8	74,8	2,9	0,0	0,1
SR45	34,8	65,2	92,1	0,1	0,0	0,0
SR46	11,8	88,2	91,4	0,1	0,0	0,0
SR47	21,9	78,1	89,1	0,1	0,0	1,7
SG01	4,2	95,8	89,3	1,8	0,0	2,5
SG02	19,1	80,9	89,2	0,5	0,0	0,0
SG03	1,9	98,1	97,3	0,3	0,0	0,0
SG04	47,5	52,5	97,4	0,1	0,1	0,0
SG05	59,9	40,1	92,9	0,1	0,0	0,0
SG06	5,0	95,0	97,7	0,1	0,0	0,0
SG07	29,7	70,3	90,4	0,2	0,0	0,0
SG08	6,6	93,4	90,3	1,2	0,0	0,0
SG09	22,7	77,3	82,0	5,9	0,0	0,1
SG10	2,4	97,6	93,6	0,1	0,0	1,0
SG12	64,6	35,4	79,1	0,7	0,0	0,9
SG13	13,6	86,4	27,4	63,7	0,0	0,0
SG14	48,1	51,9	59,7	19,4	0,0	0,9
SG15	0,3	99,7	95,1	0,1	0,4	0,3
SG16	15,8	84,2	46,5	19,7	6,4	8,8
SG17	29,6	70,4	91,9	0,2	0,0	0,6
SG19	84,3	15,7	50,0	5,0	0,0	0,0
SG20	4,3	95,7	97,1	0,1	0,0	0,0
SG21	2,1	97,9	91,0	0,1	0,4	2,0
SG22	61,1	38,9	77,7	0,1	0,1	0,0

Proben-ID	Epithel [% aller Events]	Leukozyten [% aller Events]	Granulozyten [% aller Leukozyten]	B-Lymphozyten [% aller Leukozyten]	T-Lymphozyten [% aller Leukozyten]	Monozyten [% aller Leukozyten]
SG23	0,9	99,1	92,2	0,7	0,0	0,1
SG24	12,7	87,3	88,6	0,1	0,0	0,0
SG25	1,5	98,5	94,2	0,3	0,0	2,2
SG26	13,5	86,5	69,7	19,4	1,6	0,3
SG27	21,0	79,0	93,2	0,8	0,0	0,2
SG28	42,3	57,7	73,0	8,1	5,0	0,0
SG29	9,3	90,7	79,8	5,1	2,1	0,0
SG30	9,3	90,7	88,6	0,0	0,0	0,0
SG31	12,3	87,7	95,4	0,2	0,0	0,1
SG32	14,4	85,6	97,0	0,1	0,0	0,0
SG33	54,1	45,9	94,4	0,1	0,0	0,1
SG34	92,3	7,7	61,5	0,2	0,0	0,2
SG35	11,1	88,9	95,9	0,1	0,0	0,0
SG36	59,4	40,6	38,5	0,0	0,0	0,0
SG38	10,5	89,5	55,8	3,1	4,1	9,2
SG41	49,3	50,7	58,3	24,7	0,0	0,0
SG43	63,5	36,5	93,9	0,1	0,0	0,0

A.3 Studienmerkmale der Kohorte – Fragebogenauswertung

Tabelle 17: Studienmerkmale der Kohorte – Gesamtauswertung des Fragebogens

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
1. Allgemeine Daten			
Geschlecht			1,0
Weiblich	19 (44,2)	22 (45,8)	
Männlich	24 (55,8)	26 (54,2)	
Alter [in Jahren (Spanne)]			
	27,8 (20-36)	27,2 (20-39)	
BMI			0,64
Untergewicht	2 (4,7)	0 (0)	

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
Normalgewicht	27 (62,8)	33 (68,8)	
Übergewicht	11 (25,6)	12 (25,0)	
Adipositas	3 (6,9)	3 (6,2)	
Familienstand			0,02
Ledig	39 (90,7)	34 (70,8)	
Verheiratet	4 (9,3)	14 (29,2)	
Bildungsstand			0,001
Gering	0 (0)	1 (2,1)	
Mittel	1 (2,3)	13 (27,1)	
Hoch	42 (97,7)	34 (70,8)	
Berufsabschluss			0,00001
keinen	8 (18,6)	11 (22,9)	
Ausbildung/Lehre	4 (9,3)	24 (50,0)	
Universität/Fachhochschule	31 (72,1)	13 (27,0)	
Erwerbstätigkeit			0,80
geringfügig	5 (11,6)	9 (18,7)	
gelegentlich	3 (7,0)	2 (4,2)	
Teilzeit	9 (20,9)	11 (22,9)	
Vollzeit	24 (55,8)	26 (54,2)	
Keine Angabe	2 (4,6)	0 (0)	
Nebentätigkeit			0,31
Ja	7 (16,3)	13 (27,1)	
Nein	36 (83,7)	35 (72,9)	
Einkommen			0,60
Keine Angabe	4 (9,3)	10 (20,8)	
<500€	6 (14,0)	7 (14,6)	
500-2000€	16 (37,2)	17 (35,4)	
2000-4000€	15 (34,9)	12 (25,0)	
>4000€	2 (4,6)	2 (4,2)	

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
2. Wohnsituation			
Wohnend in Wohnstätte [Jahren (Spanne)]			
	3,4 (<1-32)	10,2 (<1-38)	
Haustyp der Wohnstätte			<0,00001
Ein/Zweifamilienhaus frei	1 (2,3)	39 (81,2)	
Mehrfamilienhaus <5 Etagen	36 (83,7)	9 (18,8)	
Mehrfamilienhaus > 5 Etagen	6 (14,0)	-	
Stockwerk Hauptzimmer			<0,00001
Erdgeschoss	7 (16,3)	20 (41,7)	
1. Stockwerk	3 (7,0)	21 (43,7)	
2. Stockwerk	15 (34,9)	5 (10,4)	
3. Stockwerk	9 (20,9)	1 (2,1)	
>=4. Stockwerk	9 (20,9)	1 (2,1)	
Art der Kochstelle			0,00006
Gas	6 (14,0)	0 (0)	
Elektro	34 (79,1)	48 (100)	
Mikrowelle	11 (25,6)	32 (66,7)	
Personen Wohnstätte			0,003
1 Person	4 (9,3)	2 (4,2)	
2 Personen	23 (53,5)	10 (20,8)	
3 Personen	9 (20,9)	15 (31,2)	
>=4 Personen	7 (16,3)	21 (43,8)	
Bodenbelag Wohnstätte			0,94
Keine Teppiche (wischbar)	22 (51,2)	26 (54,2)	
Lose Teppiche (wischbar)	19 (44,2)	20 (41,2)	
Teppich	2 (4,7)	2 (4,2)	
Bodenbelag Hauptzimmer			0,005
Laminat	23 (53,5)	14 (29,2)	

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
Teppich (Naturfaser)	1 (2,3)	0 (0)	
Fliesen	1 (2,3)	11 (22,9)	
Parkett	9 (20,9)	8 (16,7)	
PVC	3 (7,0)	7 (14,6)	
Teppich (Kunstfaser)	2 (4,7)	4 (8,3)	
Linoleum	3 (7,0)	0 (0)	
Dielen	1 (2,3)	2 (4,2)	
Teppich (unbekannt)	0 (0)	2 (4,2)	
Bodenbelag Schlafzimmer			0,26
Laminat	24 (55,8)	27 (56,3)	
Parkett	8 (18,6)	4 (8,3)	
Teppich (Kunstfaser)	4 (9,3)	5 (10,4)	
PVC	3 (7,0)	5 (10,4)	
Linoleum	3 (7,0)	0 (0)	
Fliesen	1 (2,3)	2 (4,2)	
Kork	0 (0)	1 (2,1)	
Teppich (unbekannt)	0 (0)	3 (6,3)	
Dielen	0 (0)	1 (2,1)	
Renovierung			0,44
Ja	28 (65,1)	33 (68,7)	
Nein	15 (34,9)	15 (31,3)	
Möbel aufgestellt			0,51
Ja	25 (58,1)	27 (56,3)	
Nein	17 (39,5)	20 (41,7)	
Keine Angabe	1 (2,3)	1 (2,1)	
Malerarbeiten			0,28
Ja	15 (34,9)	23 (47,9))	
Nein	19 (44,2)	20 (41,7)	
Keine Angabe	9 (20,9)	5 (10,4)	

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
Fußboden verlegt			0,09
Ja	6 (14,0)	13 (27,1)	
Nein	37 (86,0)	34 (70,8)	
Keine Angabe	-	1 (2,1)	
Wohnung feucht			0,54
Ja	1 (2,3)	2 (4,2)	
Nein	42 (97,7)	46 (95,8)	
Schimmel			0,30
Ja	9 (20,9)	7 (14,6)	
Nein	34 (79,1)	41 (85,4)	
Haustiere			0,003
Ja	4 (9,3)	17 (35,4)	
Nein	39 (90,7)	31 (64,6)	
3. Heizung und Lüftung			
Alle Räume beheizbar			0,002
Ja	27 (62,8)	43 (89,6)	
Nein	16 (37,2)	5 (10,4)	
Heizstoff			0,002
Gas	14 (32,6)	0 (0)	
Holz	1 (2,3)	1 (2,1)	
Strom	0 (0)	2 (4,2)	
Öl	0 (0)	1 (2,1)	
Sonstiges	1 (2,3)	0 (0)	
Keine Angabe	27 (62,8)	44 (91,7)	
Black Dust			0,08
Ja	5 (11,6)	1 (2,1)	
Nein	38 (88,4)	47 (97,9)	
Kamin (offen)			<0,00001
Ja	0 (0)	23 (47,9)	

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
Nein	43 (100)	25 (52,1)	
Nutzung des Kamins			n.a.
täglich	0 (0)	16 (33,3)	
1-2 mal pro Woche	0 (0)	3 (6,3)	
1-2 mal pro Monat	0 (0)	2 (4,2)	
selten	0 (0)	2 (4,2)	
Keine Angabe	43 (100)	25 (52,1)	
Standort Kamin			n.a.
Wohnzimmer	0 (0)	23 (47,9)	
Wintergarten	0 (0)	1 (2,1)	
Flur	0 (0)	1 (2,1)	
Esszimmer	0 (0)	1 (2,1)	
Keine Angabe	43 (100)	25 (52,1)	
4. Wohnumgebung			
Distanz Wohnstätte Straße			0,02
<10m	12 (27,9)	13 (27,1)	
11-50m	14 (32,6)	8 (16,7)	
51-150m	11 (25,6)	7 (14,6)	
>150m	6 (13,9)	20 (41,7)	
Straßenbreite [m (Spanne)]			
	12,7 (3-200)	5,9 (3-20)	
Straßenbelag			0,22
Asphalt	41 (95,3)	48 (100)	
Pflaster eben	1 (2,3)	0 (0)	
Pflaster uneben	1 (2,3)	0 (0)	
Staubildung			0,01
Ja	11 (25,6)	3 (6,3)	
Nein	32 (74,4)	45 (93,7)	
Straßenschlucht			<0,00001

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
Ja	27 (62,8)	8 (16,7)	
Nein	16 (37,2)	40 (83,3)	
Umgebung der Wohnstätte			<0,00001
Zentrum	12 (27,9)	1 (2,1)	
Zentrum, starker Verkehr	18 (41,9)	0 (0)	
Zentrum, schwacher Verkehr	6 (14,0)	0 (0)	
Vorort	3 (7,0)	0 (0)	
Vorort, starker Verkehr	2 (4,6)	0 (0)	
Vorort, schwacher Verkehr	2 (4,6)	0 (0)	
Land	0 (0)	28 (58,3)	
Land, starker Verkehr	0 (0)	3 (6,3)	
Land, schwacher Verkehr	0 (0)	16 (33,3)	
Straßentyp an der Wohnstätte			0,001
Spielstraße	4 (9,3)	5 (10,4)	
Nebenstraße (Tempo 30)	20 (46,5)	29 (60,4)	
Nebenstraße	13 (30,2)	1 (2,1)	
Hauptstraße	6 (14,0)	13 (27,1)	
Fahrstreifen an der Wohnstätte			0,04
1-spurig	34 (79,1)	29 (60,4)	
2-spurig	8 (18,6)	19 (39,6)	
>2-spurig	1 (2,3)	0 (0)	
Verkehr Wohnstätte			0,22
Anwohnerverkehr	32 (74,4)	35 (72,9)	
Durchgangsverkehr	21 (48,8)	16 (33,3)	
Berufsverkehr	12 (28,0)	5 (10,4)	
5. Verkehrsbelastung			
Aufenthalt Arbeitsstätte			0,26
<3/Woche	5 (11,6)	12 (25,0)	
3-4/Woche	10 (23,3)	12 (25,0)	

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
5-6/Woche	26 (60,5)	24 (50,0)	
>=7/Woche	1 (2,3)	0 (0)	
Keine Angabe	1 (2,3)	0 (0)	
Entfernung Wohn- und Arbeitsstätte			0,75
<1km	4 (9,3)	6 (12,5)	
1-3km	6 (14,0)	5 (10,4)	
3-5km	6 (14,0)	4 (8,3)	
>=5km	26 (60,5)	33 (68,8)	
Keine Angabe	1 (2,3)	0 (0)	
Arbeitsweg per			< 0,00001
ÖPNV	23 (53,5)	4 (8,3)	
Fuß/Fahrrad	15 (34,9)	8 (16,7)	
Auto	4 (9,3)	36 (75,0)	
Keine Angabe	1 (2,3)	0 (0)	
Arbeitsweg verkehrsreich			0,52
Ja	34 (79,1)	38 (79,2)	
Nein	8 (18,6)	10 (20,8)	
Keine Angabe	1 (2,3)	0 (0)	
Aussetzung Autoabgase Samstag			0,43
<1h	26 (60,5)	34 (70,8)	
1-2h	12 (27,9)	10 (20,8)	
2-3h	4 (9,3)	2 (4,2)	
Keine Angabe	1 (2,3)	2 (4,2)	
Aussetzung Autoabgase Sonntag			0,71
<1h	33 (76,7)	36 (75,0)	
1-2h	8 (18,6)	7 (14,6)	
2-3h	1 (2,3)	3 (6,3)	
Keine Angabe	1 (2,3)	2 (4,2)	
Aussetzung Autoabgase werktags			0,84

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
<1h	19 (44,2)	19 (39,6)	
1-2h	18 (41,9)	22 (45,8)	
2-3h	5 (11,6)	7 (14,6)	
>3h	1 (2,3)	0 (0)	
6. Umgebung Arbeitsstätte			
Umgebung der Arbeitsstätte			0,00004
Zentrum	11 (25,6)	6 (12,5)	
Zentrum, starker Verkehr	10 (23,2)	1 (2,1)	
Zentrum, schwacher Verkehr	6 (14,0)	1 (2,1)	
Vorort	4 (9,3)	7 (14,6)	
Vorort, starker Verkehr	3 (7,0)	4 (8,3)	
Vorort, schwacher Verkehr	3 (7,0)	4 (8,3)	
Industriegebiet	5 (11,6)	8 (16,7)	
Land	0 (0)	9 (18,7)	
Land, starker Verkehr	0 (0)	2 (4,2)	
Land, schwacher Verkehr	0 (0)	6 (12,5)	
Keine Angabe	1 (2,3)	0 (0)	
Distanz Arbeitsstätte/Straße			0,86
<10m	13 (30,2)	15 (31,3)	
11-50m	10 (23,3)	14 (29,2)	
51-150m	12 (27,9)	10 (20,8)	
>150m	7 (16,3)	9 (18,7)	
Straßentyp an der Arbeitsstätte			0,65
Spielstraße	2 (4,7)	4 (8,3)	
Nebenstraße (Tempo 30)	8 (18,6)	12 (25,0)	
Nebenstraße	16 (37,2)	13 (27,1)	
Hauptstraße	16 (37,2)	19 (39,6)	
Keine Angabe	1 (2,3)	0 (0)	
Fahrstreifen an der Arbeitsstätte			0,06

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
1-spurig	10 (23,3)	19 (39,6)	
2-spurig	22 (51,2)	26 (54,2)	
3-spurig	3 (6,2)	3 (6,2)	
>3-spurig	7 (16,7)	3 (6,2)	
Keine Angabe	1 (2,3)	0 (0)	
Straßenbreite nahe Arbeitsstätte [m (Spanne)]			
	15,8 (5-150)	9,2 (3-55)	
Straßenbelag			0,17
Asphalt	40 (93,0)	46 (95,8)	
Beton	2 (4,7)	0 (0)	
Pflaster (eben)	0 (0)	2 (4,2)	
Keine Angabe	1 (2,3)	0 (0)	
Verkehr Wohnstätte			0,51
Anwohnerverkehr	12 (27,9)	14 (29,2)	
Durchgangsverkehr	22 (51,2)	28 (58,)	
Berufsverkehr	23 (53,5)	18 (37,7)	
Staubildung Arbeitsstätte			0,07
Ja	18 (41,9)	12 (25,0)	
Nein	24 (55,8)	35 (72,9)	
Keine Angabe	1 (2,3)	1 (2,1)	
Straßenschlucht			0,21
Ja	13 (30,2)	10 (20,8)	
Nein	29 (67,4)	37 (77,1)	
Keine Angabe	1 (2,3)	1 (2,1)	
7.-8. (Nicht-); (Ex-) Raucher			
Raucher (jemals)			0,41
Ja	8 (18,6)	7 (14,6)	
Nein	35 (81,4)	41 (85,4)	

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
E-Zigarette letzte 12 Monate			0,30
Ja	4 (9,3)	2 (4,2)	
Nein	39 (90,7)	45 (93,7)	
Keine Angabe	0 (0)	1 (2,1)	
Passivrauch Tage/Woche			0,004
Nie	35 (81,4)	44 (91,7)	
1-3	6 (14,0)	0 (0)	
4-6	1 (2,3)	0 (0)	
täglich	1 (2,3)	4 (8,3)	
Passivrauch h/Tag			0,13
<1	32 (74,4)	42 (87,5)	
1-3	9 (20,9)	6 (12,5)	
3-5	2 (4,7)	0 (0)	
9. Sportliche Aktivität			
Sport regelmäßig (letzte 4 Wochen)			0,45
Ja	31 (72,1)	33 (68,8)	
Nein	12 (27,9)	15 (31,2)	
Dauer pro Woche			0,22
nicht regelmäßig	12 (28,6)	15 (31,3)	
<1h	1 (2,3)	0 (0)	
1-2h	9 (20,9)	4 (8,3)	
2-4h	12 (27,9)	13 (27,1)	
>4h	8 (18,6)	16 (33,3)	
Keine Angabe	1 (2,3)	0 (0)	
10. Gesundheitszustand			
Allergie			0,54
Ja	21 (48,8)	24 (50,0)	
Nein	22 (51,2)	24 (50,0)	

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
Allergie wann zuletzt			0,12
Vorschulalter	5 (11,6)	1 (2,1)	
Schulalter	8 (18,6)	15 (31,2)	
Danach	8 (18,6)	8 (16,7)	
Keine Angabe	22 (51,2)	24 (50,0)	
<u>Erkältung und Husten</u>			
Anzahl Erkältungen letzte 12 Monate			
	3 (0-10)	3 (1-24)	
Erkältungen mit Husten (>2 Wochen anhaltend)			0,59
Ja	6 (14,0)	7 (14,6)	
Nein	37 (86,0)	41 (85,4)	
Wiederholt Husten			0,52
Ja	24 (55,8)	26 (54,2)	
Nein	19 (44,2)	22 (45,8)	
Wann?			0,13
bei Erkältung	21 (48,8)	24 (45,8)	
ohne Erkältung	6 (14,0)	2 (4,2)	
nach Anstrengung	4 (9,3)	1 (2,1)	
bei kalter Luft oder Nebel	8 (18,6)	2 (4,2)	
weiß nicht	1 (2,3)	0 (0)	
Keine Angabe	19 (44,2)	22 (45,8)	
Wiederholt Husten Nachts			0,50
nein	21 (48,8)	26 (54,2)	
nur bei Erkältung	18(41,9)	21 (43,7)	
auch ohne Erkältung	1 (2,3)	0 (0)	
weiß nicht	3 (7,0)	1 (2,1)	
<u>Atembeschwerden</u>			

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
Kurzatmigkeit, Atemnot letzte 12 Monate			0,21
nein	39 (90,7)	44 (91,7)	
1 mal	0 (0)	1 (2,1)	
1-3 mal	4 (9,3)	1 (2,1)	
4-12 mal	0 (0)	1 (2,1)	
>12 mal	0 (0)	1 (2,1)	
Wann?			1,0
nachts	1 (2,3)	1 (2,1)	
Bei Erkältung	1 (2,3)	4 (8,3)	
Während oder nach Anstrengung	1 (2,3)	2 (4,2)	
Bei Kontakt mit Tieren	0 (0)	0 (0)	
Bei Kontakt mit Gras, Blumen	0 (0)	1 (2,1)	
Bei Kontakt mit Hausstaub	2 (4,7)	0 (0)	
Weiß nicht	0 (0)	0 (0)	
Keine Angabe	39 (90,7)	44 (91,7)	
Bestimmte Monate			0,79
Ja	1 (2,3)	1 (2,1)	
Nein	3 (7,0)	3 (6,2)	
Keine Angabe	39 (90,7)	44 (91,7)	
Jahreszeit			0,5
März-September	1 (2,3)	1 (2,1)	
Oktober-Februar	0 (0)	0 (0)	
Keine Angabe	42 (97,7)	47 (97,9)	
Pfeifgeräusche jemals			0,56
Ja	12 (27,9)	13 (27,1)	
Nein	31 (72,1)	35 (72,9)	
Wann zuletzt			0,29
Im Vorschulalter	0 (0)	3 (6,2)	
Im Schulalter	3 (7,0)	2 (4,2)	

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
danach	9 (20,9)	8 (16,7)	
Keine Angabe	31 (72,1)	35 (72,9)	
Pfeifgeräusche letzte 12 Monate			0,41
Ja	7 (16,3)	6 (12,5)	
Nein	36 (83,7)	42 (87,5)	
Häufigkeit Pfeifgeräusche			0,34
1-3 mal	6 (14,0)	3 (6,2)	
4-12 mal	1 (2,3)	2 (4,2)	
>12 mal	0 (0)	1 (2,1)	
Keine Angabe	36 (83,7)	42 (87,5)	
Auftreten			1,0
bei Erkältung	4 (9,3)	4 (8,3)	
während oder nach Anstrengung	3 (7,0)	2 (4,2)	
bei Kontakt mit Tieren	0 (0)	1 (2,1)	
bei Kontakt mit Gras, Blumen	1 (2,3)	2 (4,2)	
bei Kontakt mit Hausstaub	1 (2,3)	0 (0)	
keiner der benannten Gründe	0 (0)	1 (2,1)	
weiß nicht	0 (0)	0 (0)	
Keine Angabe	36 (83,7)	42 (87,5)	
Bestimmte Monate			0,34
Ja	3 (7,0)	1 (2,1)	
Nein	4 (9,3)	5 (10,4)	
Keine Angabe	36 (83,7)	42 (87,5)	
Jahreszeit			1,0
März-September	1 (2,3)	1 (2,1)	
Oktober-Februar	2 (4,7)	0 (0)	
Keine Angabe	40 (93,0)	47 (97,9)	
<u>Augen und Nase</u>			
Nasenbeschwerden jemals			0,06

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
Ja	25 (58,1)	19 (39,6)	0,43
Nein	18 (41,9)	29 (60,4)	
Wann zuletzt			
Im Vorschulalter	1 (2,3)	0 (0)	0,02
Im Schulalter	3 (7,0)	5 (10,4)	
danach	21 (48,8)	14 (29,2)	
Keine Angabe	18 (41,9)	29 (60,4)	0,61
Nasenbeschwerden letzte 12 Monate			
Nein	18 (41,9)	36 (75,0)	
1 mal	2 (4,6)	2 (4,2)	0,10
1-3 mal	8 (18,6)	3 (6,2)	
4-12 mal	4 (9,3)	3 (6,2)	
>12 mal	11 (25,6)	4 (8,3)	0,22
Keine Angabe	0 (0)	0 (0)	
Nasenbeschwerden und juckende tränende Augen			
Ja	9 (20,9)	5 (10,4)	0,22
Nein	17 (39,5)	9 (18,8)	
Keine Angabe	17 (39,5)	34 (70,8)	
Jahreszeit			0,22
März-September	15 (34,9)	7 (14,6)	
Oktober-Februar	12 (27,9)	1 (2,1)	
Keine Angabe	26 (60,5)	41 (85,4)	0,22
Wann Kontakt mit			
Tieren	2 (4,7))	1 (2,1)	
Gras, Blumen	7 (16,3)	7 (14,6)	0,22
Hausstaub	5 (11,6)	0 (0)	
weiß nicht	13 (30,2)	8 (16,7)	
Keine Angabe	20 (46,5)	33 (68,7)	

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
Einschränkung letzte 12 Monate			0,35
stark	2 (4,7)	0 (0)	
mittel	5 (11,6)	2 (4,2)	
wenig	6 (14,0)	8 (16,7)	
gar nicht	14 (32,6)	7 (14,6)	
Keine Angabe	16 (37,2)	31 (64,6)	
Gerötete Augen ohne Nase letzte 12 Monate			0,10
Ja	12 (27,9)	7 (14,6)	
Nein	31 (71,1)	41 (85,4)	
<u>Haut</u>			
Hautbeschwerden jemals			0,41
Ja	7 (16,3)	6 (12,5)	
Nein	36 (83,7)	42 (87,5)	
Wann zuletzt			1,0
Im Vorschulalter	1 (2,3)	2 (4,2)	
Im Schulalter	2 (4,7)	1 (2,1)	
danach	4 (9,3)	3 (6,2)	
Keine Angabe	36 (83,7)	42 (87,5)	
Hautausschlag letzte 12 Monate			0,56
Ja	3 (7,0)	3 (6,2)	
Nein	5 (11,6)	7 (14,6)	
Keine Angabe	35 (81,4)	38 (79,2)	
Hautausschlag Elle/Knie			0,80
Ja	2 (4,7)	2 (4,2)	
Nein	1 (2,3)	1 (2,1)	
Keine Angabe	40 (93,0)	45 (93,7)	
Neurodermitis jemals			0,48
Ja	6 (14,0)	8 (16,7)	

	Stuttgart, n = 43 N(%)	Simmerath, n = 48 N(%)	Fisher-Test [p-Wert]
Nein	37 (86,0)	40 (83,3)	
Wann zuletzt			0,79
Im Vorschulalter	1 (2,3)	2 (4,2)	
Im Schulalter	1 (2,3)	3 (6,2)	
danach	4 (9,3)	3 (6,2)	
Keine Angabe	37 (86,0)	40 (83,3)	
<u>Medikamente</u>			
Medikamente			0,53
Ja	11 (25,6)	13 (27,1)	
Nein	32 (74,4)	35 (72,9)	

Tabelle 18: Studienmerkmale der Kohorte – Auswertung Aktivitätsprotokoll und Innenraumprotokoll der vergangenen sieben Tage vor Probenentnahme

	Stuttgart, n = 43 [MD (Spanne)]	Simmerath, n = 48 [MD (Spanne)]	MWU [p-Wert]
11. Aktivitätsprotokoll der letzten 7 Tage vor Probenahme in h			
Mittlere Zeit zwischen Aufstehen und zu Bett gehen in	108,7 (92,5-121,5)	110,6 (57,3)	0,46
Wie lange waren Sie dazwischen...			
...zu Hause	47,6 (14-122)	43,6 (15-114)	0,39
...an der Arbeitsstelle	34,5 (0-60)	39,1 (0-73)	0,80
...unterwegs im Straßenverkehr	7,8 (2,2-29)	7,6 (2-25,8)	0,36
...im Freien	7,2 (0-36)	8 (0,8-32)	0,27
...in anderen Wohnungen, Häusern	13,5 (0-63)	15,5 (0-55)	0,78
12. Protokoll Innenraum der letzten 7 Tage vor Probenahme (wie oft)			
Essen kochen	5 (0-20)	5 (0-14)	0,10
Backen und Braten am Herd	3 (0-8)	3 (0-9)	0,38
Backen und Braten mit der Mikrowelle	0 (0-13)	0 (0-6)	0,52

	Stuttgart, n = 43 [MD (Spanne)]	Simmerath, n = 48 [MD (Spanne)]	MWU [p-Wert]
Toasten	0 (0-7)	1 (0-13)	0,02
Staubsaugen	1 (0-12)	1,5 (0-8)	0,047
Staubwischen	1 (0-5)	1 (0-8)	0,57
Lüften	10 (0-42)	8 (0-119)	0,83
Betten machen	4 (0-7)	6 (0-7)	0,07
Drucken	0 (0-24)	2 (0-45)	0,02
Heizung	30 (0-121)	11,5 (0-119)	0,04
Lokaler Raumlufterhitzer	0 (0-23)	0 (0-3)	0,78
Offener Kamin	0 (0-15)	0 (0-59)	0,33
Aktivität bei der viel Staub entsteht	0 (0-14)	0 (0-31)	0,85
Welche?			
Handwerkertätigkeit	0 (0-10)	0 (0-47)	0,09
Welche?	Haus- und Gartenarbeit (Lampe befestigen, Bohren, Holz sägen/spalten etc.)		
Brennende Kerze	2 (0-16)	2 (0-27)	0,78
Räucherstäbchen	0 (0-2)	0 (0)	0,71
Duftlampe	0 (0-10)	0 (0-27)	0,43
Tätigkeit mit großer Dampfentwicklung	0 (0-7)	0 (0-7)	0,58
Welche?	Duschen, Dampfbad, Bügeln		

MD = Median; MWU = Mann-Whitney-U-Test, h = Stunden

A.4 Studienmerkmale der Subkohorte für epigenetische Analysen

Tabelle 19: Vergleich von Gesamt- mit Subkohorte hinsichtlich allgemeiner Studienmerkmale mittels exaktem Fisher's Test

	Gesamtkohorte, N = 91, N (%)	Subkohorte für epigenetische Analysen, n = 60, n (%)	Fisher-Test [p-Wert]
Geschlecht			0,08
Weiblich	41 (45,1)	23 (38,3)	
Männlich	50 (55,0)	37 (61,7)	

	Gesamtkohorte, N = 91, N (%)	Subkohorte für epigenetische Analysen, n = 60, n (%)	Fisher-Test [p-Wert]
Alter			0,61*
Mittelwert (Spanne)	27,5 (20-39)	27,3 (20-39)	
BMI^a			0,48
Untergewicht	2 (2,2)	1 (1,7)	
Normalgewicht	60 (65,9)	37 (61,7)	
Übergewicht	23 (25,3)	17 (28,3)	
Adipositas	6 (6,6)	5 (8,3)	
Familienstand			0,28
Ledig	73 (80,2)	46 (76,7)	
Verheiratet	18 (19,8)	14 (23,3)	
Schulabschluss^b			0,58
gering	1 (1,1)	1 (1,7)	
mittel	14 (15,4)	11 (18,3)	
hoch	76 (83,5)	48 (80,0)	
Berufsabschluss			0,55
keinen	19 (20,9)	14 (23,3)	
Beruflich/schulisch/anderer	4 (4,4)	3 (5,0)	
Lehre/Fachschule	24 (26,4)	14 (23,3)	
Universität/Fachhochschule	44 (48,4)	28 (46,7)	
Erwerbstätigkeit			0,41
geringfügig	14 (15,4)	9 (15,0)	
gelegentlich	5 (5,5)	4 (6,7)	
Teilzeit	20 (22,0)	10 (16,7)	
Vollzeit	50 (54,9)	36 (60,0)	
Keine Angabe	2 (2,2)	1 (1,7)	
Nebentätigkeit			1,00
Ja	20 (22,0)	13 (21,7)	
Nein	71 (78,0)	47 (78,3)	
Einkommen			0,82

	Gesamtkohorte, N = 91, N (%)	Subkohorte für epigenetische Analysen, n = 60, n (%)	Fisher-Test [p-Wert]
Keine Angabe	14 (15,4)	8 (13,3)	
< 500 €	13 (14,3)	8 (13,3)	
500 bis unter 2000€	33 (36,3)	24 (40,0)	
2000 bis unter 4000€	27 (29,7)	17 (28,3)	
> 4000 €	4 (4,4)	3 (5,0)	

*p-Wert mittels Mann-Whitney-U Test

^a Untergewicht BMI <18,5; Normalgewicht BMI 18,5-24,9; Übergewicht BMI 25-29,9; Adipositas BMI >30

^b Gering = 8 Schuljahre ('Hauptschulabschluss'); Mittel = 10 Schuljahre ('Mittlere Reife'); hoch = 12 Schuljahre oder mehr ('(Fach-) Hochschulreife')

Tabelle 20: Vergleich von Gesamt- mit Subkohorte hinsichtlich der Wohnumgebung und Verkehrsexposition mittels exaktem Fisher's Test

	Gesamtkohorte, N = 91, N (%)	Subkohorte für epigenetische Analysen, n = 60, n (%)	Fisher-Test [p-Wert]
Kamin (offen)			0,80
Ja	23 (25,3)	16 (26,7)	
Nein	68 (74,4)	44 (73,3)	
Kamin in vergangener Woche genutzt			0,75
Ja	12 (13,2)	9 (15,0)	
Nein	79 (86,8)	51 (85,0)	
Distanz Wohnstätte Straße			0,46
< 10 m	25 (27,5)	15 (25,0)	
11-50 m	22 (24,2)	17 (28,3)	
51-150 m	18 (19,8)	10 (16,7)	
> 150 m	26 (28,6)	18 (30,0)	
Staubildung vor Wohnstätte			0,77
Ja	14 (15,4)	10 (16,7)	
Nein	77 (84,6)	50 (83,3)	
Straßenschlucht			0,82
Ja	35 (28,5)	24 (40,0)	

	Gesamtkohorte, N = 91, N (%)	Subkohorte für epigenetische Analysen, n = 60, n (%)	Fisher-Test [p-Wert]
Nein	56 (61,5)	36 (60,0)	
Verkehr Wohnstätte			0,96
Anwohnerverkehr	49 (53,8)	33 (55,0)	
Durchgangsverkehr	25 (27,5)	16 (26,7)	
Berufsverkehr	17 (18,7)	11 (18,3)	
Entfernung Wohn- und Arbeitsstätte			0,90
< 1 km	10 (11,0)	6 (10,0)	
1-3 km	11 (12,1)	7 (11,7)	
3-5 km	10 (11,0)	6 (10,0)	
≥ 5 km	59 (64,8)	40 (66,7)	
Keine Angabe	1 (1,1)	1 (1,7)	
Arbeitsweg per			0,40
ÖPNV	27 (29,7)	15 (25,0)	
Fuß/Fahrrad	23 (25,3)	17 (28,3)	
Auto	40 (44,0)	27 (45,0)	
Keine Angabe	1 (1,1)	1 (1,7)	
Arbeitsweg verkehrsreich			0,78
Ja	72 (79,1)	48 (80,0)	
Nein	18 (19,8)	11 (18,3)	
Keine Angabe	1 (1,1)	1 (1,7)	

Tabelle 21: Vergleich von Gesamt- mit Subkohorte hinsichtlich des Gesundheitszustandes mittels exaktem Fisher's Test

	Gesamtkohorte, N = 91, N (%)	Subkohorte für epigenetische Analysen, n = 60, n (%)	Fisher-Test [p-Wert]
Allergie			0,83
Ja	45 (49,5)	29 (48,3)	
Nein	46 (50,5)	31 (51,7)	
<i>Erkältung und Husten</i>			

	Gesamtkohorte, N = 91, N (%)	Subkohorte für epigenetische Analysen, n = 60, n (%)	Fisher-Test [p-Wert]
Erkältung bei Probenahme			0,09
Ja	11 (12,1)	10 (16,7)	
Nein	80 (87,9)	50 (83,3)	
Erkältungen mit Husten letzte 12 Monate (> 2 Wochen anhaltend)			0,53
Ja	13 (14,3)	10 (16,7)	
Nein	78 (85,7)	50 (83,3)	
Kurzatmigkeit, Atemnot in den letzten 12 Monate			0,15
nein	83 (91,2)	56 (93,3)	
1 mal	1 (1,1)	-	
1-3 mal	5 (5,5)	4 (6,7)	
4-12 mal	1 (1,1)	-	
> 12 mal	1 (1,1)	-	
Pfeifgeräusche beim Atmen jemals			0,09
Ja	25 (27,5)	20 (33,3)	
Nein	66 (72,5)	40 (66,7)	
Pfeifgeräusche beim Atmen letzte 12 Monate			0,53
Ja	13 (14,3)	10 (16,7)	
Nein	78 (85,7)	50 (83,3)	
<i>Augen und Nase</i>			
Nasenbeschwerden jemals			0,67
Ja	44 (48,4)	28 (46,7)	
Nein	47 (51,6)	32 (53,3)	
Nasenbeschwerden und juckende tränende Augen			0,48
Ja	14 (15,4)	8 (13,3)	
Nein	26 (28,6)	19 (31,7)	
Keine Angabe	51 (56,0)	33 (55,0)	

	Gesamtkohorte, N = 91, N (%)	Subkohorte für epigenetische Analysen, n = 60, n (%)	Fisher-Test [p-Wert]
Gerötete Augen ohne Nasen- beschwerden, letzte 12 Monate			0,79
Ja	19 (20,9)	12 (20,0)	
Nein	72 (79,1)	48 (80,0)	
<i>Haut</i>			
Hautbeschwerden jemals			0,21
Ja	13 (14,3)	11 (18,3)	
Nein	78 (85,7)	49 (81,7)	
Neurodermitis jemals			1,00
Ja	14 (15,4)	9 (15,0)	
Nein	77 (84,6)	51 (85,0)	

A.5 Methylom-Sequenzierung

Tabelle 22: Übersicht der Methylom-Sequenzierungs-Qualitätsparameter aller 60 Proben

Proben-ID Sim- merath	Mittelwert Genomweite Sequenzier- tiefe	% ge- mappte Reads	Proben- ID Stuttgart	Mittelwert Genomweite Sequenzier- tiefe	% ge- mappte Reads
SR1	61,96x	99,95	SG1	71,27x	99,98
SR2	69,55x	99,98	SG2	74,37x	99,97
SR3	59,94x	99,96	SG3	65,82x	99,98
SR4	69,51x	99,96	SG4	89,29x	99,96
SR6	62,18x	99,96	SG5	74,72x	99,96
SR7	80,34x	99,97	SG7	68,91x	99,97
SR8	62,63x	99,96	SG8	81,32x	99,96
SR9	75,46x	99,95	SG9	77,62x	99,96

Proben-ID Sim- merath	Mittelwert Genomweite Sequenzier- tiefe	% ge- mappte Reads	Proben- ID Stuttgart	Mittelwert Genomweite Sequenzier- tiefe	% ge- mappte Reads
SR13	66,41x	99,96	SG12	96,60x	99,95
SR14	65,33x	99,97	SG13	82,28x	99,96
SR15	74,64x	99,98	SG15	84,75x	99,98
SR16	72,08x	99,98	SG16	56,82x	99,97
SR17	60,95x	99,97	SG17	66,72x	99,97
SR18	52,12x	99,96	SG19	60,56x	99,96
SR19	59,69x	99,97	SG20	58,87x	99,97
SR24	69,63x	99,94	SG21	74,57x	99,96
SR25	66,90x	99,98	SG22	74,67x	99,97
SR26	63,17x	99,97	SG24	58,80x	99,96
SR27	64,69x	99,98	SG26	61,22x	99,96
SR28	57,87x	99,98	SG27	84,95x	99,97
SR29	73,13x	99,97	SG28	67,88x	99,98
SR31	60,38x	99,98	SG29	63,03x	99,98
SR32	63,68x	99,97	SG30	80,86x	99,98
SR34	65,55x	99,97	SG31	71,50x	99,98
SR36	74,82x	99,97	SG32	62,60x	99,98
SR38	64,80x	99,96	SG33	75,54x	99,97
SR39	73,89x	99,97	SG35	65,70x	99,97
SR40	69,14x	99,96	SG38	70,35x	99,98
SR42	66,34x	99,98	SG43	80,13x	99,97
SR43	83,53x	99,97			

Proben-ID Sim- merath	Mittelwert Genomweite Sequenzier- tiefe	% ge- mappte Reads	Proben- ID Stuttgart	Mittelwert Genomweite Sequenzier- tiefe	% ge- mappte Reads
SR46	66,67x	99,98			

A.6 microRNA-Sequenzierung

Tabelle 23: Summe der miRNA-Reads aller 60 sequenzierten Proben

Der miRNA-Read-Summe nach absteigend geordnet

Rank	Proben-ID	Summe miRNA-Reads	Rank	Proben-ID	Summe miRNA-Reads
1	SG3	828.400	31	SR38	168.978
2	SG15	803.878	32	SG27	158.528
3	SR9	802.482	33	SG12	155.972
4	SR6	633.058	34	SR24	152.261
5	SG32	544.841	35	SG2	148.406
6	SG20	516.075	36	SR26	141.976
7	SR29	443.166	37	SR25	140.887
8	SR3	395.499	38	SR14	136.117
9	SR15	389.731	39	SR1	121.697
10	SR39	376.166	40	SG38	117.046
11	SR34	355.939	41	SG30	109.324
12	SR7	353.476	42	SR31	107.948
13	SR36	322.953	43	SG13	107.117
14	SR46	321.951	44	SG21	102.156
15	SG29	299.353	45	SG9	100.959
16	SG22	298.795	46	SG26	98.357
17	SG31	293.497	47	SG1	96.905
18	SR27	254.928	48	SG4	96.066

Rank	Proben-ID	Summe miRNA-Reads	Rank	Proben-ID	Summe miRNA-Reads
19	SR28	254.347	49	SG35	95.836
20	SR18	252.662	50	SG17	92.982
21	SG16	244.637	51	SG8	79.977
22	SR43	227.061	52	SG33	72.487
23	SR32	223.883	53	SR4	71.568
24	SR8	200.633	54	SG28	68.276
25	SR16	197.807	55	SR17	67.596
26	SG24	196.051	56	SR2	67.071
27	SR42	189.951	57	SG5	63.579
28	SG43	180.257	58	SR40	61.065
29	SR13	176.314	59	SG19	59.095
30	SG7	173.214	60	SR19	5.074

Tabelle 24: Zielgene von hsa-miR-486-5p

Schnittmenge der Zielgene aus *TargetScan* und *miRDB*, n=95

hsa-miR-485-5p Zielgene					
<i>BTA1F1</i>	<i>GRHL2</i>	<i>CELF2</i>	<i>CELSR3</i>	<i>CCDC85C</i>	<i>KCNQ3</i>
<i>FOXO1</i>	<i>TANC1</i>	<i>SLC12A5</i>	<i>TET3</i>	<i>SMOC1</i>	<i>GOLGA3</i>
<i>NCKAP5</i>	<i>SCNM1</i>	<i>ST5</i>	<i>TMEM115</i>	<i>ATXN7L3</i>	<i>DNAJC21</i>
<i>PTEN</i>	<i>TWF1</i>	<i>AFF3</i>	<i>KDM5B</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>TMEM178B</i>
<i>COPS7B</i>	<i>FNIP2</i>	<i>BCL11B</i>	<i>AAK1</i>	<i>GPX8</i>	<i>UNC5C</i>
<i>ARHGAP44</i>	<i>FAT3</i>	<i>GAB2</i>	<i>STK4</i>	<i>DOCK3</i>	<i>MYLK2</i>
<i>MARK1</i>	<i>ZNF827</i>	<i>C5orf64</i>	<i>PLXNA4</i>	<i>DAAM1</i>	<i>CSPG5</i>
<i>ABHD17B</i>	<i>MTA3</i>	<i>TSC22D2</i>	<i>PDE4A</i>	<i>RAB11FIP4</i>	<i>TOB1</i>
<i>ARID4B</i>	<i>SMAD2</i>	<i>TXLNG</i>	<i>YOD1</i>	<i>ELMSAN1</i>	<i>RHOQ</i>
<i>HAT1</i>	<i>EPB41L1</i>	<i>CDH7</i>	<i>PIM1</i>	<i>ACTR3</i>	<i>RASSF3</i>
<i>CTDSPL2</i>	<i>TBX2</i>	<i>SP5</i>	<i>SEMA3A</i>	<i>DKK2</i>	<i>CNKSR2</i>

hsa-miR-485-5p Zielgene					
<i>ARHGAP5</i>	<i>CLDN10</i>	<i>NR2C2</i>	<i>FGF9</i>	<i>SLAIN2</i>	<i>DYNLL1</i>
<i>CDK4</i>	<i>GXYLT1</i>	<i>PLAGL2</i>	<i>SORCS1</i>	<i>CADM1</i>	<i>ZNF740</i>
<i>PRRC2C</i>	<i>NDUFB4</i>	<i>COL6A6</i>	<i>MAML3</i>	<i>UBE2N</i>	<i>FBN1</i>
<i>IGF1</i>	<i>ZC3HAV1</i>	<i>SRSF3</i>	<i>REV1</i>	<i>BCORL1</i>	<i>TENM2</i>
<i>ARMC8</i>	<i>ST6GALNAC6</i>	<i>GPR153</i>	<i>BTBD3</i>	<i>GABRB3</i>	

Tabelle 25: Übersicht der 147 differentiell methylierten Regionen (DMRs) aus dem Vergleich der DNA Methylierungsanalyse der Standorte Stuttgart und Simmerath.

Chr	Start	End	Länge DMR (bp)	Anzahl CGs	MW Methylierung (Stuttgart) [ß-Wert]	MW Methylierung (Simmerath) [ß-Wert]	MW Differenz Methylierung [ß-Wert]	Meth.- richtung	Genname	Distanz zu TSS (bp)	Genomische Position (gencode.v19)	Enhancer	Enhancer Zielgene	DMR Typ
1	68512792	68512898	107	10	0.640	0.584	0.056	hyper	DIRAS3	4416	exon	-	-	ng.dmr
1	39249631	39249692	62	7	0.508	0.429	0.079	hyper	RRAGC	75803	intergenic	-	-	ng.dmr
1	19600468	19600617	150	23	0.095	0.059	0.036	hyper	AKR7A3	15127	intergenic	YES	MRT04;AKR7L;TAS1R2;RP5-1126H10.2;AKR7A3;AKR7A2;PQLC2	ng.dmr
1	25296514	25296712	199	8	0.459	0.575	-0.116	hypo	RUNX3	-4903	intergenic	-	-	g.dmr
1	17026533	17026717	185	17	0.219	0.182	0.037	hyper	AL137798.1	-27035	intergenic	YES	MFAP2;MST1L;ESPNP	ng.dmr
1	234367033	234367372	340	33	0.775	0.666	0.109	hyper	COA6	141831	intron	-	-	ng.dmr
1	234367423	234367572	150	9	0.665	0.566	0.099	hyper	COA6	141631	intron	-	-	ng.dmr
1	46190258	46190338	81	8	0.916	0.891	0.025	hyper	IPP	25984	intron	-	-	g.dmr
1	207842500	207842575	76	4	0.479	0.419	0.060	hyper	CR1L	-24042	intron	-	-	ng.dmr
1	207842782	207843262	481	50	0.071	0.037	0.034	hyper	CR1L	-24324	intron	-	-	ng.dmr
1	53742495	53742792	298	49	0.875	0.824	0.051	hyper	MAGOH	-38214	intron	-	-	ng.dmr
1	154841946	154842410	465	16	0.491	0.417	0.073	hyper	KCNN3	346	promoter	YES	KCNN3	ng.dmr
1	2121047	2121126	80	11	0.172	0.114	0.059	hyper	AL590822.2	112	promoter	YES	MORN1	g.dmr
1	68517226	68517314	89	10	0.484	0.427	0.057	hyper	DIRAS3	0	promoter	YES	ARL5AP3;GNG12-AS1;DIRAS3	ng.dmr
2	105853447	105853618	172	15	0.556	0.467	0.090	hyper	GPR45	4583	intergenic	-	-	ng.dmr
2	105853795	105853922	128	4	0.718	0.618	0.099	hyper	GPR45	4279	intergenic	-	-	ng.dmr
2	39470798	39471154	357	40	0.629	0.533	0.097	hyper	CDKL4	-14070	intergenic	YES	CDKL4	ng.dmr
2	10560215	10560265	51	6	0.970	0.955	0.015	hyper	ODC1	28365	intron	-	-	ng.dmr
2	1801629	1802001	373	51	0.587	0.452	0.135	hyper	PXDN	-53006	intron	YES	MYT1L;AC093390.1;PXDN	g.dmr
3	122693933	122694154	222	5	0.234	0.121	0.113	hyper	SEMA5B	53298	intron	YES	SEMA5B;RP11-797D24.3;ADCY5	g.dmr
3	122694285	122694573	289	6	0.169	0.068	0.100	hyper	SEMA5B	52879	intron	YES	SEMA5B;RP11-797D24.3;ADCY5	g.dmr

Chr	Start	End	Länge DMR (bp)	Anzahl CGs	MW Methylierung (Stuttgart) [ß-Wert]	MW Methylierung (Simmerath) [ß-Wert]	MW Differenz Methylierung [ß-Wert]	Meth.- richtung	Genname	Distanz zu TSS (bp)	Genomische Position (gencode.v19)	Enhancer	Enhancer Zielgene	DMR Typ
3	42727788	42727853	66	10	0.367	0.292	0.075	hyper	KLHL40	-777	promoter	YES	RN7SL567P;CCDC13;HHATL; KLHL40;CCK;LYZL4;KRBOX1; SEC22C;NKTR	ng.dmr
4	2819903	2819974	72	12	0.008	0.033	-0.025	hypo	SH3BP2	-25153	exon	YES	SH3BP2;NOP14-AS1;ADD1	g.dmr
4	3644017	3644137	121	15	0.955	0.933	0.022	hyper	LINC00955	-65421	intergenic	-	-	ng.dmr
4	81118443	81118554	112	15	0.089	0.049	0.039	hyper	PRDM8	-13410	intron	YES	ANTXR2;PRDM8	g.dmr
5	33937718	33937778	61	12	0.245	0.199	0.046	hyper	RXFP3	-1227	exon	-	-	ng.dmr
5	33938145	33938212	68	11	0.167	0.125	0.042	hyper	RXFP3	-1654	exon	-	-	ng.dmr
5	1725358	1725410	53	4	0.467	0.406	0.061	hyper	MRPL36	76070	intergenic	YES	CTD-2587M23.1	ng.dmr
5	1725785	1725873	89	4	0.507	0.413	0.094	hyper	MRPL36	75607	intergenic	YES	CTD-2587M23.1	ng.dmr
5	1726051	1726144	94	8	0.529	0.461	0.068	hyper	MRPL36	75336	intergenic	YES	CTD-2587M23.1	ng.dmr
5	3602481	3602571	91	15	0.109	0.146	-0.037	hypo	IRX1	-6313	intergenic	-	-	ng.dmr
5	38445839	38445913	75	4	0.868	0.822	0.046	hyper	LIFR	162543	intron	YES	CTD-2108O9.4;EGFLAM	ng.dmr
5	136874522	136874573	52	6	0.968	0.950	0.018	hyper	SPOCK1	59495	intron	-	-	ng.dmr
5	178156459	178156573	115	12	0.780	0.693	0.087	hyper	ZNF354A	1130	intron	YES	ZNF354A;CLK4	g.dmr
5	3600866	3601077	212	23	0.057	0.102	-0.045	hypo	IRX1	-4698	intron	YES	CTD-2012M11.3;IRX1	ng.dmr
5	60670418	60670480	63	6	0.983	0.967	0.015	hyper	ZSWIM6	-42318	intron	-	-	ng.dmr
6	149772442	149772553	112	18	0.036	0.021	0.015	hyper	ZC3H12D	33644	exon	YES	SUMO4;RP11-350J20.5;ZC3H12D	ng.dmr
6	170589696	170589746	51	5	0.594	0.500	0.094	hyper	DLL1	9815	intergenic	YES	WDR27;TCTE3;ERMARD;RP1-266L20.9;TBP;DLL1;FAM120B	ng.dmr
6	13743393	13743517	125	13	0.695	0.604	0.092	hyper	RANBP9	-31598	intergenic	-	-	g.dmr
6	158630730	158630803	74	9	0.849	0.936	-0.087	hypo	GTF2H5	-41346	intergenic	-	-	g.dmr
6	158630936	158631190	255	27	0.817	0.912	-0.095	hypo	GTF2H5	-41552	intergenic	-	-	g.dmr
6	50787539	50787649	111	20	0.038	0.023	0.015	hyper	TFAP2B	-1103	intron	-	-	g.dmr
6	127796286	127796355	70	9	0.943	0.908	0.034	hyper	KIAA0408	-15751	intron	-	-	ng.dmr
6	31650875	31650940	66	7	0.362	0.255	0.108	hyper	LY6G5C	877	promoter	YES	LY6G5C;BAG6	g.dmr
6	25882375	25882793	419	24	0.312	0.459	-0.147	hypo	SLC17A3	0	promoter	YES	HIST1H2APS2;SLC17A3	g.dmr
7	39848225	39848347	123	12	0.970	0.946	0.024	hyper	CDK13	141290	intergenic	-	-	ng.dmr

Chr	Start	End	Länge DMR (bp)	Anzahl CGs	MW Methylierung (Stuttgart) [ß-Wert]	MW Methylierung (Simmerath) [ß-Wert]	MW Differenz Methylierung [ß-Wert]	Meth.- richtung	Genname	Distanz zu TSS (bp)	Genomische Position (gencode.v19)	Enhancer	Enhancer Zielgene	DMR Typ
7	4244256	4244340	85	8	0.743	0.852	-0.108	hypo	FOXK1	439049	intron	-	-	g.dmr
7	132669032	132669091	60	7	0.970	0.954	0.016	hyper	CHCHD3	97757	intron	-	-	ng.dmr
7	120599899	120599949	51	6	0.976	0.954	0.022	hyper	ING3	-9096	intron	-	-	ng.dmr
7	89963748	89963931	184	19	0.940	0.914	0.026	hyper	GTPBP10	607	promoter	-	-	ng.dmr
7	27169824	27169912	89	16	0.396	0.310	0.086	hyper	HOXA4	506	promoter	YES	HOXA10;HOXA9;HOXA7;HOXA6;HOXA5;HOXA4;HOXA3;HOXA2;HOXA1;CBX3;HOTAIRM1;RP1-170O19.22;RP1-170O19.23;RP1-170O19.21;RP1-170O19.20;HOXA-AS3;TPM3P4;SKAP2;HMGB3P20;HNRNPA2B1;KIAA0087;PSMC1P2;HOTTIP;HOXA13;RP1-170O19.14;HOXA11;HOXA11-AS;MIR196B;HOXA-AS2	ng.dmr
7	27170163	27170265	103	13	0.302	0.213	0.088	hyper	HOXA4	153	promoter	YES	HOXA10;HOXA9;HOXA7;HOXA6;HOXA5;HOXA4;HOXA3;HOXA2;HOXA1;CBX3;HOTAIRM1;RP1-170O19.22;RP1-170O19.23;RP1-170O19.21;RP1-170O19.20;HOXA-AS3;TPM3P4;SKAP2;HMGB3P20;HNRNPA2B1;KIAA0087;PSMC1P2;HOTTIP;HOXA13;RP1-170O19.14;HOXA11;HOXA11-AS;MIR196B;HOXA-AS2	ng.dmr
8	110433872	110433968	97	9	0.904	0.854	0.049	hyper	PKHD1L1	-59166	intron	-	-	g.dmr
8	81144129	81144259	131	17	0.911	0.877	0.034	hyper	TPD52	-663	promoter	-	-	ng.dmr
9	67340428	67340485	58	13	0.659	0.595	0.065	hyper	FAM27E3	446139	intergenic	-	-	ng.dmr
9	115830590	115830733	144	11	0.470	0.404	0.066	hyper	ZFP37	-11552	intergenic	-	-	ng.dmr
9	125168285	125169118	834	63	0.763	0.605	0.158	hyper	AL162424.1	-19358	intergenic	-	-	g.dmr
9	99839207	99839266	60	8	0.077	0.049	0.028	hyper	CTSV	-37283	intergenic	-	-	ng.dmr
9	40920012	40920087	76	6	0.360	0.181	0.179	hyper	ZNF658	-83598	intergenic	-	-	ng.dmr
9	139889264	139889454	191	28	0.433	0.366	0.067	hyper	CLIC3	1801	intron	YES	SNHG7;CLIC3;A-PC2;C9orf139;ABCA2;MAN1B1;SEC16A;RABL6;EGFL7;SPC4;LCNL1;EHMT1;DPH7;INP5E;LCN12;EXD3;NDOR1	ng.dmr

Chr	Start	End	Länge DMR (bp)	Anzahl CGs	MW Methylierung (Stuttgart) [ß-Wert]	MW Methylierung (Simmerath) [ß-Wert]	MW Differenz Methylierung [ß-Wert]	Meth.-richtung	Genname	Distanz zu TSS (bp)	Genomische Position (gencode.v19)	Enhancer	Enhancer Zielgene	DMR Typ
9	96108513	96108600	88	11	0.089	0.065	0.024	hyper	C9orf129	96	promoter	YES	C9orf129;RP11-165J3.6;RP11-370F5.4	ng.dmr
10	44113832	44113892	61	6	0.980	0.962	0.017	hyper	ZNF485	-11977	intergenic	-	-	ng.dmr
10	1205594	1205807	214	26	0.916	0.890	0.026	hyper	WDR37	-110116	intergenic	-	-	ng.dmr
10	12574422	12574487	66	6	0.979	0.960	0.019	hyper	CAMK1D	-182941	intron	-	-	ng.dmr
11	47968777	47968841	65	4	0.028	0.010	0.018	hyper	PTPRJ	33273	intergenic	YES	MADD;NUP160;PACSIN3;FNB P4;DDB2;ACP2;Y_R-;PTPRJ;C1QTNF4;RP11-390K5.6;CELF1	ng.dmr
11	132951486	132951744	259	8	0.670	0.573	0.097	hyper	OPCML	450670	intron	-	-	ng.dmr
11	132951898	132951993	96	9	0.584	0.501	0.083	hyper	OPCML	450421	intron	-	-	ng.dmr
11	132952052	132952250	199	16	0.664	0.580	0.084	hyper	OPCML	450164	intron	-	-	ng.dmr
11	119557365	119557481	117	9	0.082	0.037	0.045	hyper	PVRL1	42313	intron	YES	TRIM29	ng.dmr
11	61544755	61544844	90	11	0.121	0.080	0.041	hyper	FEN1	15266	intron	YES	MYRF;MIR611;TMEM258;FAD S2	ng.dmr
11	73668640	73668760	121	5	0.498	0.387	0.111	hyper	DNAJB13	-7276	intron	-	-	ng.dmr
11	57456866	57456951	86	8	0.977	0.955	0.022	hyper	ZDHHC5	-21647	intron	-	-	ng.dmr
12	132146015	132146073	59	7	0.121	0.076	0.045	hyper	SFSWAP	49554	intergenic	-	-	ng.dmr
12	7792741	7792843	103	13	0.498	0.404	0.095	hyper	APOBEC1	25656	intergenic	YES	LAG3;ZNF384;SLC2A14;PEX5; SCAR-12;-NOG;DPPA3;GDF3	ng.dmr
12	9891940	9892194	255	10	0.875	0.833	0.042	hyper	CLECL1	-6046	intergenic	YES	CLECL1;RP11-726G1.1;RP11-75L1.2;KLRF1;KLRB1;CLEC2B ;CLEC2D;CLEC7A;CD69	ng.dmr
12	9892318	9892412	95	10	0.853	0.810	0.043	hyper	CLECL1	-6424	intergenic	YES	CLECL1;RP11-726G1.1;RP11-75L1.2;KLRF1;KLRB1;CLEC2B ;CLEC2D;CLEC7A;CD69	ng.dmr
12	9892674	9892792	119	8	0.856	0.800	0.056	hyper	CLECL1	-6780	intergenic	YES	CLECL1;RP11-726G1.1;RP11-75L1.2;KLRF1;KLRB1;CLEC2B ;CLEC2D;CLEC7A;CD69	ng.dmr
12	129520399	129520500	102	11	0.971	0.953	0.018	hyper	GLT1D1	-182427	intergenic	-	-	ng.dmr
12	127650782	127650846	65	13	0.046	0.023	0.023	hyper	NA		intergenic	-	-	ng.dmr
12	130823695	130823758	64	11	0.062	0.041	0.021	hyper	PIWIL1	-1263	intron	-	-	ng.dmr
12	130823811	130823905	95	9	0.153	0.109	0.044	hyper	PIWIL1	-1379	intron	-	-	ng.dmr

Chr	Start	End	Länge DMR (bp)	Anzahl CGs	MW Methylierung (Stuttgart) [ß-Wert]	MW Methylierung (Simmerath) [ß-Wert]	MW Differenz Methylierung [ß-Wert]	Meth.- richtung	Genname	Distanz zu TSS (bp)	Genomische Position (gencode.v19)	Enhancer	Enhancer Zielgene	DMR Typ
13	21295871	21295933	63	10	0.026	0.012	0.013	hyper	IL17D	-19605	exon	YES	IFT88;CRYL1;IL17D	ng.dmr
13	19957003	19957117	115	8	0.811	0.752	0.059	hyper	TPTE2	153786	intergenic	-	-	ng.dmr
13	19957231	19957454	224	11	0.832	0.770	0.062	hyper	TPTE2	153449	intergenic	-	-	ng.dmr
13	100218509	100218792	284	11	0.758	0.644	0.114	hyper	CLYBL	40128	intergenic	-	-	ng.dmr
13	20694988	20695154	167	15	0.620	0.491	0.129	hyper	GJA3	40034	intergenic	YES	CRYL1;ZMYM2;PSPC1;GJA3;MPHOSPH8;ZMYM5;XPO4;RN U2-7P	g.dmr
13	112996875	112996988	114	7	0.723	0.671	0.052	hyper	SPACA7	33646	intergenic	-	-	ng.dmr
13	114302059	114302183	125	5	0.054	0.015	0.038	hyper	ATP4B	10318	intergenic	YES	PCID2;DCUN1D2;GAS6;GAS6-AS1;GRK1;DCUN1D2-AS	ng.dmr
13	45281465	45281555	91	7	0.973	0.949	0.024	hyper	TSC22D1	-130183	intergenic	-	-	ng.dmr
13	101628082	101628195	114	12	0.548	0.669	-0.121	hypo	TMTC4	-300736	intergenic	-	-	g.dmr
13	24882625	24882795	171	18	0.898	0.858	0.041	hyper	C1QTNF9	-1321	intron	YES	RP11-307N16.6;C1QTNF9;C1QTNF9-AS1	ng.dmr
13	97646614	97646675	62	7	0.020	0.004	0.016	hyper	OXGR1	309	promoter	YES	TULP3P1;LINC00359;RAP2A;OXGR1	ng.dmr
13	24882267	24882529	263	26	0.809	0.737	0.072	hyper	C1QTNF9	-963	promoter	-	-	g.dmr
14	34269636	34269687	52	11	0.235	0.184	0.051	hyper	SPTSSA	661875	exon	-	-	ng.dmr
14	70700814	70701048	235	33	0.883	0.840	0.043	hyper	SLC8A3	-45028	intergenic	YES	ADAM21P1	ng.dmr
14	89445018	89445144	127	12	0.330	0.227	0.103	hyper	TTC8	-154521	intergenic	-	-	g.dmr
15	79092538	79092723	186	24	0.867	0.814	0.053	hyper	MORF4L1	10107	exon	-	-	g.dmr
15	74266057	74266209	153	23	0.900	0.854	0.046	hyper	STOML1	20754	intergenic	YES	PML;STOML1;LOXL1-AS1	ng.dmr
15	79124351	79124466	116	11	0.916	0.877	0.039	hyper	ADAMTS7	-20579	intron	YES	MORF4L1;ADAMTS7	g.dmr
15	69222773	69222987	215	20	0.657	0.566	0.091	hyper	NOX5	0	promoter	YES	SPESP1;RP11-809H16.2;NOX5	ng.dmr
15	69223117	69223179	63	4	0.791	0.719	0.072	hyper	NOX5	-253	promoter	YES	SPESP1;RP11-809H16.2;NOX5	ng.dmr
15	69223290	69223367	78	6	0.874	0.818	0.056	hyper	NOX5	-426	promoter	YES	SPESP1;RP11-809H16.2;NOX5	ng.dmr
16	81944244	81944313	70	9	0.976	0.956	0.020	hyper	SDR42E1	100780	exon	-	-	ng.dmr
16	55794522	55794777	256	17	0.465	0.590	-0.125	hypo	CES1	72472	intergenic	-	-	g.dmr

Chr	Start	End	Länge DMR (bp)	Anzahl CGs	MW Methylierung (Stuttgart) [ß-Wert]	MW Methylierung (Simmerath) [ß-Wert]	MW Differenz Methylierung [ß-Wert]	Meth.-richtung	Genname	Distanz zu TSS (bp)	Genomische Position (gencode.v19)	Enhancer	Enhancer Zielgene	DMR Typ
16	1000422	1000472	51	4	0.960	0.908	0.052	hyper	AC009041.2	30781	intron	-	-	ng.dmr
16	4730115	4730209	95	7	0.119	0.060	0.058	hyper	NUDT16L1	13487	intron	YES	NUDT16L1;ZNF500;MGRN1	ng.dmr
17	72915902	72915977	76	7	0.755	0.693	0.062	hyper	USH1G	3374	exon	-	-	ng.dmr
17	72916217	72916330	114	10	0.789	0.715	0.074	hyper	USH1G	3021	exon	-	-	ng.dmr
17	40650566	40650703	138	10	0.971	0.957	0.014	hyper	NAGLU	37488	intron	-	-	ng.dmr
18	77236180	77236254	75	12	0.911	0.856	0.055	hyper	AC018445.1	39803	intron	YES	RBFADN;NFATC1	ng.dmr
19	40421153	40421279	127	13	0.684	0.619	0.065	hyper	FCGBP	19254	exon	-	-	ng.dmr
19	49002703	49002779	77	9	0.746	0.647	0.098	hyper	LMTK3	13667	exon	-	-	ng.dmr
19	2807564	2807649	86	6	0.974	0.951	0.023	hyper	ZNF554	12224	exon	-	-	ng.dmr
19	48983760	48983839	80	9	0.032	0.010	0.022	hyper	CYTH2	-11471	exon	YES	CYTH2;CTC-273B12.10;GRIN2D;GRWD1	ng.dmr
19	36757325	36757471	147	16	0.890	0.823	0.068	hyper	ZNF565	-20167	intergenic	-	-	g.dmr
19	12305797	12305930	134	15	0.030	0.014	0.016	hyper	ZNF136	-31918	intergenic	YES	ZNF20;ZNF625-ZNF20;ZNF433;D-SE2	ng.dmr
19	36800274	36800454	181	23	0.785	0.681	0.104	hyper	ZNF565	-63116	intergenic	-	-	g.dmr
19	36800578	36800722	145	12	0.724	0.611	0.113	hyper	ZNF565	-63420	intergenic	-	-	ng.dmr
19	57454314	57454466	153	9	0.607	0.536	0.072	hyper	ZIM2	-102218	intergenic	YES	CTC-444N24.13;CTC-258N23.3	g.dmr
19	54945666	54946339	674	27	0.585	0.464	0.121	hyper	LENG8	13727	intron	YES	TTYH1;AC008746.12;CTD-2587H19.2;AC008746.3	g.dmr
19	21666328	21666475	148	12	0.886	0.840	0.047	hyper	ZNF429	13010	intron	YES	LINC00664;RP11-678G14.3;CTD-2561J22.3;ZNF708	ng.dmr
19	6273839	6273894	56	5	0.042	0.012	0.030	hyper	MLLT1	6065	intron	YES	VMAC;SNRPEP4;RFX2;SAFB;ACSBG2;DUS3L;NDUFA11;ZNF557;AC104532.4;MLLT1;ALKBH7;PSPN;GTF2F1;KHSRP;SLC25A23;DENND1C;GPR108;SH2D3A;VAV1;MBD3L5;MBD3L3;RANBP3	ng.dmr
19	53361406	53361667	262	20	0.562	0.393	0.169	hyper	ZNF468	-505	promoter	YES	ZNF320;ZNF468;ZNF28	g.dmr
20	49626502	49626635	134	16	0.760	0.715	0.045	hyper	KCNG1	13031	exon	-	-	ng.dmr

Chr	Start	End	Länge DMR (bp)	Anzahl CGs	MW Methylierung (Stuttgart) [β-Wert]	MW Methylierung (Simmerath) [β-Wert]	MW Differenz Methylierung [β-Wert]	Meth.-richtung	Genname	Distanz zu TSS (bp)	Genomische Position (gencode.v19)	Enhancer	Enhancer Zielgene	DMR Typ
20	42143296	42143363	68	8	0.444	0.496	-0.052	hypo	L3MBTL1	-6976	exon	YES	RP1-138B7.5;L3MBTL1;IFT52;SGK2;RP1-138B7.4	ng.dmr
20	623186	623257	72	13	0.033	0.009	0.023	hyper	SRXN1	10757	intergenic	YES	CSNK2A1;TCF15;SRXN1	ng.dmr
20	58713589	58713661	73	4	0.724	0.646	0.078	hyper	C20orf197	-82609	intergenic	-	-	ng.dmr
20	58713718	58713783	66	9	0.813	0.731	0.082	hyper	C20orf197	-82738	intergenic	-	-	ng.dmr
20	58713921	58714042	122	7	0.814	0.742	0.072	hyper	C20orf197	-82941	intergenic	-	-	ng.dmr
20	57416968	57417047	80	8	0.531	0.486	0.045	hyper	GNAS	-2195	intron	YES	G-S-AS1;G-S	ng.dmr
20	822973	823167	195	10	0.058	0.036	0.022	hyper	FAM110A	-8615	intron	YES	RSPO4;ANGPT4;FAM110A	ng.dmr
20	44829508	44829632	125	18	0.229	0.175	0.054	hyper	CD40	-82597	intron	-	-	ng.dmr
20	44829778	44829893	116	12	0.399	0.337	0.063	hyper	CD40	-82867	intron	YES	NCOA5;RP5-998H6.2;CDH22	ng.dmr
20	29611578	29611669	92	12	0.104	0.059	0.045	hyper	FRG1B	189	promoter	YES	MLLT10P1	ng.dmr
21	42742211	42742362	152	8	0.791	0.693	0.098	hyper	MX2	-8341	exon	YES	MX1;AP001610.5;MX2;FAM3B	g.dmr
21	48081256	48081464	209	24	0.410	0.336	0.074	hyper	PRMT2	-26177	exon	YES	RPL23AP4;PRMT2;S100B;DSTNP1	ng.dmr
21	48081609	48081683	75	12	0.660	0.589	0.071	hyper	PRMT2	-26530	exon	YES	RPL23AP4;PRMT2;S100B;DSTNP1	ng.dmr
21	47296763	47296827	65	8	0.832	0.762	0.069	hyper	PRED62	55650	intron	YES	COL6A1;PCBP3	g.dmr
22	32599356	32599612	257	22	0.364	0.259	0.105	hyper	RFPL2	1106	exon	YES	IGLCOR22-1;RFPL2	ng.dmr
22	25160010	25160377	368	24	0.799	0.743	0.056	hyper	PIWIL3	10310	intron	-	-	ng.dmr
22	32599086	32599212	127	9	0.196	0.128	0.068	hyper	RFPL2	1506	intron	YES	IGLCOR22-1;RFPL2	ng.dmr
22	46996508	46996598	91	7	0.688	0.803	-0.116	hypo	GRAMD4	-24599	intron	YES	GRAMD4;CERK;TBC1D22A	g.dmr
22	32599759	32600046	288	20	0.545	0.435	0.111	hyper	RFPL2	672	promoter	-	-	ng.dmr
22	32600099	32600253	155	9	0.571	0.439	0.132	hyper	RFPL2	465	promoter	-	-	ng.dmr
22	32600318	32600666	349	24	0.531	0.410	0.120	hyper	RFPL2	52	promoter	-	-	ng.dmr
22	32600945	32601100	156	8	0.723	0.611	0.112	hyper	RFPL2	-228	promoter	-	-	ng.dmr
22	32601237	32601381	145	11	0.709	0.597	0.113	hyper	RFPL2	-520	promoter	-	-	ng.dmr

Chr = Chromosom; bp = Basenpaar; DMR = differentiell methylierte Region; MW = Mittelwert, β-Wert = prozentualer Anteil an methylierten CpGs in entsprechender Region (0 = unmethyliert, 1 = 100 % methyliert); TSS = Transkriptionsstartseite, ng.dmr = DMR nicht vom Genotyp beeinflusst, g.dmr = DMR vom Genotyp beeinflusst

