

Aus der
Klinik für Kardiologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Norbert Frey)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**POLYMORPHISMEN IM
INTERLEUKIN-6-SIGNALTRANSDUKTIONSWEG
BEI PATIENTEN MIT KORONARER HERZERKRANKUNG**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

NATALIE SCHELLER

aus Hamburg

Kiel 2010

1. Berichtstatter: PD Dr.med. Nour Eddine El Mokhtari

2. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Almut Nebel

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Koronare Herzerkrankung	1
1.1.1	Ätiologie der Atherosklerose	1
1.1.2	Die atherosklerotische Läsion	2
1.2	Interleukin-6 und Inflammation	3
1.2.1	Interleukin-6 und KHK	4
1.3	Genetische Prädisposition bei der KHK	5
1.3.1	Polymorphismen im Interleukin-6 Gen	7
1.4	Interleukin-6-Signaltransduktionsweg	8
1.4.1	Der Interleukin-6 Rezeptorkomplex	9
1.5	Genetische Studien	10
1.5.1	Studiendesign	10
1.5.2	Genetische Varianten als biallelische Einzelbasenpolymorphismen	11
1.5.3	Haplotypenanalyse und Kopplungsungleichgewicht	11
2	Fragestellung	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Untersuchungsgegenstand	15
3.2	Charakterisierung des Patientenkollektivs	17
3.2.1	Aufbau der Kartierungspopulation	17
3.2.2	Einschlusskriterien	18
3.2.3	Rekrutierung der Teilnehmer	18
3.4	DNA-Isolierung und Genotypisierung	20
3.4.1	Die DNA-Präparation	20
3.4.2	Die Herstellung von 384- PCR- Mikrotiterplatten	22
3.4.2.1	Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung	23
3.4.2.2	Einstellen der Konzentration	23
3.4.2.3	Whole Genome Amplification	23
3.4.2.4	Plattenherstellung	24
3.4.3	Die Genotypisierung mit der TaqMan Technologie	24

3.4.4.	Das SNPLex Genotypisierungs Verfahren	27
3.4.5	Auswertung der Fluoreszenzmessungen von TaqMan und SNPLex	29
3.5	Die statistische Analyse	32
3.5.1	Statistische Qualitätskontrolle der Testergebnisse	32
3.5.2	Statistische Auswertung der Testergebnisse	33
3.5.3	Verwendete Programme	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Die Stichproben	35
4.2	Einfluss von Risikofaktoren	36
4.2.1	Verteilung der Risikofaktoren innerhalb der Stichproben	36
4.3	Primäre Assoziationsstudie	38
4.3.1	Adjustierung des primären Ansatzes auf Risikofaktoren	40
4.4	Replikation in einer weiteren unabhängigen Analysepopulation	41
4.4.1	Adjustierung der Replikationsstudie auf Risikofaktoren	42
5	Diskussion	43
5.1	Limitationen dieser Studie	43
5.2	Genetische Relevanz der Signaltransduktionskaskade bei der KHK	44
5.2.1	Kandidatengene bei der KHK	45
5.2.2	Genomweite Assoziationsanalysen als neuer Ansatz	45
5.3	Ausblick	46
6	Zusammenfassung	48
7	Literaturverzeichnis	50
8	Anhang	I
9	Danksagung	XIII
10	Lebenslauf	XIV

Abkürzungsverzeichnis

ASO	engl. Allele specific oligos
BMI	engl. Body mass index
CardioNet	Kardiovaskuläres Krankheitsnetzwerk
CCD	engl. Charge coupled device
CD	engl. Cluster of differentiation
CEPH	Centre d'Etude du Polymorphisme Humain, Paris, Frankreich
CEU	HapMap Kohorte aus Einwohnern Utahs mit europäischen Vorfahren
CI	Konfidenzintervall
CLC	engl. Cardiotrophin-like cytokine
CNTF	engl. Ciliary neurotrophic factor
CR	engl. Call rate, Genotypisierungserfolgsrate
CRP	C-reaktives Protein
CT-1	Cardiotrophin-1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	engl. Etylene diamine tetra-acetate, Äthylendiamintetraessigsäure
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
gp130	Glykoprotein 130
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
IL-1 α , -1 β	Interleukin-1 α und 1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
IL-6ST	Interleukin-6-Signaltransduktor
IL-27RA	Interleukin-27-Rezeptor alpha
JAK	Janus Kinase
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
KHK	Koronare Herzerkrankung
LCR	engl. Ligation chain reaction
LD	engl. Linkage disequilibrium, Kopplungsungleichgewicht
LDL	engl. Low density lipoprotein

LIF	engl. Leukaemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharid
LSO	engl. Locus specific oligo
MAPK	engl. Mitogen activated protein kinase
MCP-1	engl. Monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	engl. Macrophage-colony stimulating factor
MDA	engl. Multiple displacement amplification
MGB	engl. Minor groove binder
MICK	Metabolische Interventionen Cohorte Kiel
minAF	engl. minor Allele frequency, Allelfrequenz des selteneren Alles
MMP	Matrix Metalloproteinase
NF-κB	engl. Nuclear factor-κB
NGFN	Nationales Genomforschungsnetz
OLA	engl. Oligonukleotide ligation reaction
OR	engl. Odds ratio, Chancenverhältnis
OSM	Oncostatin M
p (x)	engl. Probability, statistische Wahrscheinlichkeit
PCR	engl. Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3R1	Phosphoinositid-3-Kinase mit Untereinheit (regulatory subunit) 1
PIK3CG	Phosphoinositid-3-Kinase, catalytic, gamma
PopGen	engl. Population based assessment of genetic effects
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
PTPN11/22	Protein Tyrosin Phosphatase, non receptor type
Q	Quencher
R	Reporter Farbstoff
RNA	Ribonukleinsäure
SHP2	engl. Src-homology-2-domain-containing tyrosine phosphatase
SNP	engl. Single nucleotide polymorphism, Einzelbasenpolymorphismus
SOCS	engl. Suppressor of cytokine signaling
STAT	engl. Signal transducer and activator of transcription
TAMRA	6-Carboxy-Tetra-Methyl-Rhodamin
TNF α, β	Tumornekrosefaktor α und β

tSNP engl. tagging Single nucleotide polymorphism, Marker-SNP
VCAM-1 engl. Vascular cell adhesion molecule-1
WGA engl. Whole genome amplification

1 Einleitung

1.1 Die Koronare Herzerkrankung

Die koronare Herzerkrankung (KHK) stellt die Manifestation der Atherosklerose in den Herzkranzgefäßen dar. Sie zählt somit zum Formenkreis der kardiovaskulären Erkrankungen, denen ätiopathogenetisch eine stenosierende Veränderung der Arterienwand zugrunde liegt. Als Folge der KHK treten Myokardinfarkte auf. Die außerordentliche medizinische und ökonomische Bedeutung der kardiovaskulären Erkrankungen in den industrialisierten Ländern zeigt sich in den Todesursachenstatistiken, die von solchen Gefäßerkrankungen und deren Folgen angeführt werden. [Statistisches Bundesamt Deutschland 2008; Rosamond et al. 2007].

1.1.1 Ätiologie der Atherosklerose

Die Atherosklerose wurde seit Aufstellung der Lipidhypothese durch den deutschen Pathologen Rudolph Virchow 1856 als eine Fettspeicherkrankheit angesehen, wobei die Einlagerung von Blutfetten in die Gefäßwand im Mittelpunkt stand. Die Arterienwand selbst spielte in dieser Hypothese eine passive Rolle. Diese Grundannahme wurde zunehmend konkretisiert und in der Wissenschaft akzeptiert. Bei den schädigenden Blutfetten handelt es sich um Low density lipoprotein (LDL)-Cholesterin, das sich in oxidierte Form in die Intima der Gefäßwand einlagert. Mit zunehmender Erforschung der Gefäßwandveränderungen auf molekularer Ebene entwickelte sich eine andere Sichtweise. R. Ross postulierte 1973 erstmals in seiner Response-to-injury-Hypothese, dass die Veränderungen in der Gefäßwand komplexe Reaktionen auf schädigende Einflüsse seien [Ross und Glomset 1973; von der Thüsen et al. 2003]. Hiermit wurde die Gefäßwand in den Fokus gerückt. Zu den traditionellen Risikofaktoren als schädigende Einflüsse zählen Alter, Nikotinabusus, Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus [von der Thüsen et al. 2003] wie auch Adipositas.

Heute zählt man die Atherosklerose zu den chronisch inflammatorischen Erkrankungen. Es lassen sich zunehmend mehr Pathomechanismen aufklären, wie durch verschiedene primäre Noxen die immer gleichen proinflammatorischen Kaskaden initiiert und unterhalten werden. Ausgehend von der Lipidhypothese lagert sich oxidierte

Einleitung

tes LDL in der Gefäßwand ein und unterhält dort eine fortschreitende Entzündung. Es induziert zum Beispiel über Nuclear factor- κ B (NF- κ B) die Expression von chemotaktischen Molekülen wie dem Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Diese Substanz wiederum fördert die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen und deren Immigration in die Intima [Libby und Ridker 2006].

Die voranschreitende Aufklärung der immunologischen Wechselwirkungen in der Pathogenese der Atherosklerose eröffnet neue Perspektiven für die klinische Praxis. Zum einen können inflammatorische Mediatoren als Biomarker für die Diagnostik, den Verlauf und die Prognose dienen, zum anderen ist an neue antiinflammatorische Therapieansätze zu denken [Libby und Ridker 2006; Ikeda 2003, von der Thüsen et al. 2003].

1.1.2 Die atherosklerotische Läsion

Die Entstehung und Progression der Atherosklerose ist ein chronisch fortschreitender Prozess, der bereits in der Adoleszenz und zunehmend schon in der Kindheit beginnt. Zu symptomatischen Manifestationen kommt es zumeist im mittleren und höheren Lebensalter [von der Thüsen et al. 2003]. Jede einzelne Läsion durchläuft verschiedene Stadien, angefangen bei der Initiation bis hin zur Ruptur des atherosklerotischen Plaques. Innerhalb eines Individuums coexistieren zu einem Zeitpunkt verschiedene Stadien der atherosklerotischen Plaques. Dabei spielt in jedem Stadium die Inflammation eine entscheidende Rolle [Libby 2006].

In der Initiierungsphase werden vermehrt proinflammatorische Zytokine als Zeichen der endothelialen Dysfunktion sezerniert. Zu ihnen zählen NF- κ B, Interleukin-1 α und 1 β (IL-1 α , IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor α und β (TNF α , TNF β) und CD-40 Liganden [Libby 2006]. Diese locken chemotaktisch T-Lymphozyten und Monozyten an und fördern deren Adhäsion. Vermittler hierbei ist MCP-1 und VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) [Ikeda 2003; Libby 2006].

Innerhalb der Intima transformieren die Monozyten vor allem unter dem Einfluss des Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) zu Makrophagen. Unter Ausbildung spezieller Rezeptoren phagozytieren sie oxidiertes LDL. Als Schaumzellen charakterisieren sie das Stadium des „Fatty streak“ [von der Thüsen et al. 2003].

Aktivierte T-Lymphozyten bilden vermehrt Chemokine und Wachstumsfaktoren wie Platelet-derived growth factor und Transforming growth factor- β [Libby und Ridker

Einleitung

2006]. Sie induzieren die Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima und deren Proliferation [von der Thüsen et al. 2003]. Das von ihnen sezernierte Kollagen und Elastin formiert sich zur fibrösen Kappe, die schützend über dem lipiden Kern liegt. Diese Struktur bildet die Intermediärläsion, die je nach Überwiegen der fettigen Bestandteile als Atherom (fettiger Plaque) oder der fibrösen Anteile als fibröser Plaque bezeichnet wird.

Die unregelmäßige Oberfläche führt bei Erosion des Endothels zu Thrombozytenanlagerung und -aktivierung. Außerdem kann es zur Ruptur der fibrösen Kappe kommen. Diese wird erweicht durch zwei parallele Mechanismen. Zum einen vermittelt Interferon- γ eine reduzierte Kollagen Synthese der glatten Muskelzellen, zum anderen stimulieren CD-40 Liganden, IL-1 und IL-6 die Makrophagen zur Synthese von Kollagen-spaltenden Enzymen wie solche der Matrix Metalloproteinase (MMP) Familie. CD-40 Liganden erhöhen zusätzlich den Gewebefaktor als dominierendes Proagulans in dem Plaque [Libby und Ridker 2006]. Bei Ruptur des Plaques kommt es so zur Koagulation. Als Folge bildet sich ein Thrombus, der das Gefäßlumen verlegen oder weiter distal embolisch das Gefäß verschließen kann. Die Folge ist ein Myokardinfarkt.

1.2 Interleukin-6 und Inflammation

Interleukin-6 kommt eine sehr bedeutende Rolle bei der Atherosklerose zu. Als proinflammatorisches Zytokin hat es sich zu einem lokalen und zirkulierenden Marker für den Entzündungsgrad der koronaren Plaques entwickelt.

IL-6 ist ein 26 kDa Zytokin, das vorwiegend von Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, aber auch von Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Hepatozyten gebildet wird [Ikeda 2003]. Es lassen sich lokale von systemischen Wirkungen unterscheiden. In der atherosklerotischen Läsion stimuliert es die Expression von Gewebefaktor, Matrix-degradierenden-Enzymen und LDL-Rezeptoren sowie die Plättchenaggregation und Proliferation von glatten Muskelzellen. Es reguliert außerdem die Expression von Adhäsionsmolekülen und anderen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und TNF α [Ikeda 2003]. Systemisch ist es als Induktor der Akute-Phase-Protein-Synthese (vor allem C-reaktives Protein (CRP) und Fibrinogen) durch Hepatozyten verantwortlich. Somit initiiert es einen wesentlichen Teil der an-

geborenen Immunität. Zudem beeinflusst IL-6 die Induktion von Fieber, die Hämatopoese sowie die B- und T-Zell-Aktivierung. Östradiol und Glukokortikoide hemmen die IL-6 Synthese [Terry et al. 2000]. IL-1 β , TNF α , Lipopolysaccharide (LPS) und oxidiertes LDL steigern dementsgegen die Expression von IL-6 [Libby 2002, Heinrich et al. 2003].

1.2.1 Interleukin-6 und KHK

Es konnte in den letzten Jahren mehrfach nachgewiesen werden, dass erhöhte IL-6- und CRP-Plasmaspiegel die Schwere der Arterienwandentzündung und die Vulnerabilität zur Plaque Ruptur widerspiegeln.

Während bei der stabilen Angina pectoris keine erhöhten Serumwerte für IL-6 gemessen werden konnten, lassen sich signifikant erhöhte Werte bei der instabilen Angina sowie nach einem Myokardinfarkt dokumentieren [Biasucci et al. 1996; Sturk et al. 1992; Ikeda et al. 1992]. Dabei ist zirkulierendes IL-6 ein unabhängiger Marker für die Sterblichkeit unter instabiler Angina und kann Patienten identifizieren, die von einem frühen invasiven Management profitieren würden [Ikeda 2003]. Ridker et al. konnte in einer prospektiven Studie aufzeigen, dass ein erhöhter Basiswert an IL-6 mit einem späteren Infarkt korreliert [Ridker et al. 2000]. In einem Experiment mit Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen zeigte sich ebenfalls eine gesteigerte Progression der atherosklerotischen Plaques unter iatrogen erhöhten IL-6 Spiegel [Huber et al. 1999]. Auch in vitro bestätigte sich bei isolierten Monozyten von Patienten mit instabiler Angina und erhöhten CRP- und IL-6 Werten eine signifikant höhere IL-6 Produktion als bei Monozyten von Probanden mit unauffälligen Inflammationsparametern [Libby 2002]. Patienten mit instabiler Angina weisen analog zu den erhöhten IL-6 Spiegel einen komplizierten Krankheitsverlauf während des stationären Aufenthaltes auf [Biasucci et al. 1996].

Interleukin-6 scheint außerdem eine herausragende Stellung bei der Restenose nach perkutaner koronarer Intervention einzunehmen. Postinterventionell hohe IL-6 Spiegel korrelieren mit einer höheren Restenoserate [Suzuki et al. 2000]. Dies lässt sich durch die proinflammatorische Wirkung erklären, die ein vermehrtes Remodeling bewirkt.

1.3 Genetische Prädisposition bei der KHK

Trotz fortgeschrittener Aufklärung der Pathomechanismen der koronaren Atherosklerose kann keine eindeutige Ursache-Wirkung-Beziehung zwischen den klassischen Risikofaktoren und der Schwere der Manifestation der KHK hergestellt werden, die alle Krankheitsverläufe erklärt [von der Thüsen et al. 2003; Stephens und Humphries 2003]. Vielmehr lässt sich immer detaillierter zeigen, dass genetische Faktoren einen Anteil an der Entstehung und der Progression der KHK haben.

1979 hat A.M. Rissanen nachgewiesen, dass familiäre Prädisposition mit Abnahme des Manifestationsalters deutlich an Bedeutung gewinnt. J.M. Boer et al. bestätigte familiäre Morbiditätshäufungen und macht genetische interindividuelle Unterschiede für das Ausmaß der schädigenden Wirkung des Rauchens verantwortlich [Boer et al. 1999].

Insbesondere die Zwillingsstudien unterstreichen die Relevanz der Vererbung bei diesem Krankheitsbild. So zeigten Untersuchungen, dass der zweite Zwilling eines dizygoten Zwillingspaares bei Erkrankung des einen ein erhöhtes Risiko trägt, in frühem Alter an einer KHK zu erkranken. Noch eindeutiger waren Untersuchungen monozygoter Zwillinge. Bei Erkrankung des einen, zeigte sich eine noch größere Risikowahrscheinlichkeit für den zweiten, schon in frühen Lebensjahren eine koronare Herzerkrankung zu entwickeln [Marenberg et al. 1994]. Siehe dazu Abbildung 1.

Einleitung

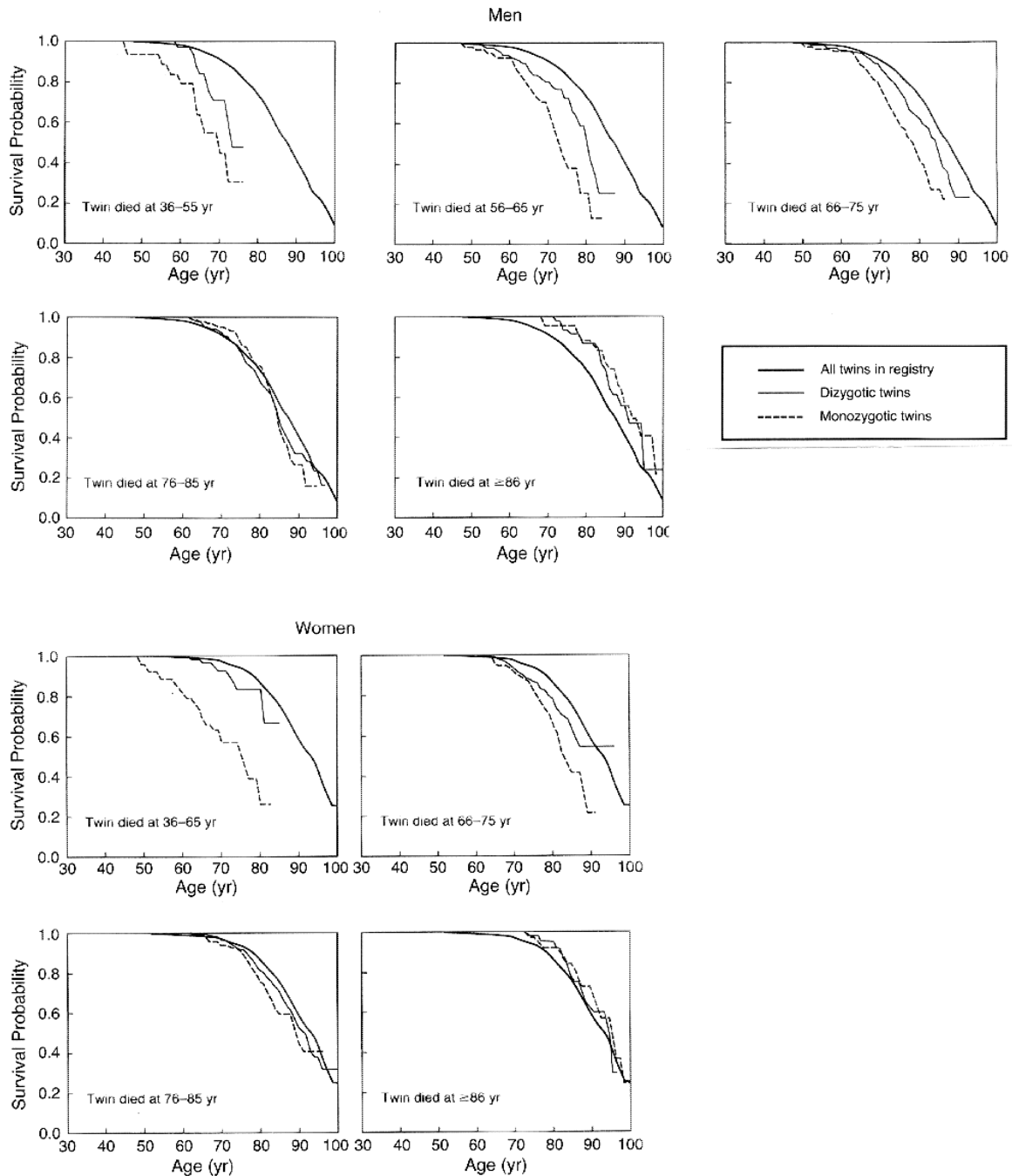


Abb. 1: Überlebenschance des zweiten Zwillings beim Tod des ersten, jeweils für alle, dizygote und monozygote Zwillinge für verschiedene Altersstufen nach Frauen und Männern getrennt. (nach Marenberg et al. 1994)

Die KHK ist somit ein multifaktorielles polygenes Krankheitsbild. Eine Vielzahl von Genen scheinen Kandidaten für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zu sein. Einige dieser Kandidatengene haben sich bereits als signifikante Risikofaktoren erwiesen, zum Beispiel Apolipoprotein E4 und Lipoproteinlipase im Fettstoffwechsel sowie weitere Faktoren des Gerinnungssystems und Homocystein [Casas et al. 2006].

Einleitung

In den letzten zwei Jahren kamen genomweite Assoziationsanalysen hinzu, die einen hypothesenfreien Ansatz haben und das gesamte Genom auf Assoziation hin überprüfen (siehe dazu auch 5.2.2). So erwiesen sich einige Varianten als signifikant in Assoziation zur KHK. Keines dieser relevanten Varianten lag jedoch in einem Gen der Entzündungskaskade. Im Vordergrund stand eine antisense RNA codierende Sequenz CDKN2BAS (Cyclin-dependent kinase inhibitor) auf Chromosom 9p21 nahe den Tumorsuppressorgenen CDKN2A und CDKN2B [McPherson et al 2007, Helgadóttir et al. 2007, The Wellcome Trust Case Control Consortium 2007, Samani et al. 2007, Larson et al. 2007, Schunkert et al. 2008]. In zwei Studien ergaben sich Hinweise auf weitere sechs Loci: 1p13.3, 1q41, 2q36.3, 6q25.1, 10q11.21 und 15q22.33 [Samani et al. 2007, Coronary Artery Disease Consortium 2009]. J. Erdmann et al. beschrieben einen zusätzlichen Locus auf Chromosom 3q22.3, der in dem M-ras-Protein-Gen liegt, das zur Superfamilie der G-bindenden Proteine gehört und ubiquitär exprimiert wird, insbesondere mit hohen Expressionsraten im kardiovaskulärem System [Erdmann et al. 2009]. Eine andere genomweite Studie indentifizierte mittels Haplotypen-Assoziation (siehe dazu 1.5.3) eine Sequenz auf Chromosom 6q26-q27, das die Gene SLC22A3 (für organische Anionen/Kationen Transporter) , LPAL2 (Lipoprotein a like) und LPA beinhaltet. Letzteres codiert für das Apolipoprotein a. Interessanterweise war diese Region in den vorherigen genomweiten Assoziationsstudien nicht in den Vordergrund getreten, weil sie eine ungenügende Abdeckung auf den gängigen Chips erfuhr [Trégouët et al. 2009].

Um seltene Varianten aufzuspüren sind Kandidatengenstudien weiterhin notwendig, da sie aufgrund der kleineren Anzahl an Einzeltests bei der Korrektur auf multiples Testen (beschrieben in 4.3) seltene und weniger signifikante Varianten detektieren können.

1.3.1 Polymorphismen im Interleukin-6 Gen

Unter den inflammatorischen Faktoren ist IL-6 eines der besterforschten Kandidaten. D. Fishman et al. entdeckte 1998 den IL-6 -174 G/C Promotor Polymorphismus. Er konnte nachweisen, dass die G-Variante mit höheren IL-6 Plasmaspiegeln und einer vermehrten IL-6 Antwort auf Stressfaktoren assoziiert ist [Fishman et al. 1998]. Damit hat sich IL-6 als potentes Kandidatengen erwiesen. Zahlreiche weitere Studien konnten die Korrelation jedoch nicht replizieren, sie fanden Assoziationen zwischen dem

Einleitung

C-Allel und der Schwere der Erkrankung oder konnten keine Zusammenhänge herstellen [Georges et al. 2001; Mysliwska et al. 2006; Lieb et al. 2004, Humphries et al. 2001]. Eine Metaanalyse bestätigt, dass es keine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Assoziation gibt [Sie et al. 2006]. Als phänotypische Parameter wurden IL-6-Plasmaspiegel, CRP-Spiegel sowie klinische Verlaufparameter der KHK herangezogen. In einer neueren Studie beschäftigt sich A. Mälarstig et al. mit acht weiteren Polymorphismen innerhalb des IL-6 Gens. Auch hier konnte keine Verbindung zu Plasmaspiegeln und klinischem Verlauf der Patienten hergestellt werden [Mälarstig et al. 2007].

Es besteht die Möglichkeit, dass nicht eine Genvariante alleine direkte Auswirkungen auf den Phänotyp hat, sondern erst verschiedene Interaktionen klinisch in Erscheinung treten. Zum einen kann ein Zusammenwirken einer Vielzahl verschiedener genetischer Varianten, sogenannte Gen-Gen-Interaktion von Bedeutung sein [Terry et al. 2000]. Zum anderen ist eine Gen-Umwelt-Interaktion anzunehmen [Stephens und Humphries 2003], bei der eine genetische Variante die Wirkkette eines Umweltfaktors moduliert.

Um den möglichen Anteil populationsrepräsentativer genetischer Varianten (mit einem Vorkommen von >5%) von Schlüsselgenen des IL-6-Signaltransduktionsweges (Pathways) an einem erhöhten KHK Risiko zu erfassen, sollen in dieser Arbeit mehrere Faktoren des IL-6-Signalweges beleuchtet werden, wie es in noch keiner Studie zuvor präsentiert wurde. Jeder an der Wirkungsentfaltung beteiligte Faktor hat prinzipiell das Potential, die Interleukinwirkung zu beeinflussen und stellt damit ein Kandidatengen und potentiell Therapie Ziel dar. Durch die Untersuchung des Pathways als Ganzes steigt die Wahrscheinlichkeit, Wechselwirkungen und deren Effekte aufzudecken.

1.4 Interleukin-6-Signaltransduktionsweg

Von wesentlicher Bedeutung im Interleukin-6 Metabolismus ist die Wirkungsentfaltung auf Rezeptorebene. Denn nur wenn hier eine adäquate Transduktion stattfindet, kann das Zytokin an der Zielzelle durch spezifische Gentranskription seine Wirkung entfalten.

Einleitung

Die IL-6 Zytokin Familie beinhaltet sechs weitere Zytokine: IL-11, LIF (Leukaemia inhibitory factor), OSM (Oncostatin M), CNTF (Ciliary neurotrophic factor), CT-1 (Cardiotrophin-1) und CLC (Cardiotrophin-like cytokine) [Heinrich et al. 2003]. Diese Zytokine vermitteln ihre biologische Aktivität durch einen komplexen Rezeptor mit mehreren Untereinheiten. Gemeinsam haben sie ein gp130 (Glykoprotein von 130 kDa) Transmembranprotein als Signal vermittelnde Einheit. Interleukin-23 und 27 verfügen über ähnlich aufgebaute Rezeptoren [von der Thüsen et al. 2003].

1.4.1 Der Interleukin-6 Rezeptorkomplex

Spezifisch für Interleukin-6 ist der IL-6 Rezeptor (IL-6R). Bei Bindung von IL-6 kommt es zu einer Homodimerisation der beiden gp130, was eine Transphosphorylierung bewirkt. Diese aktiviert Janus Kinasen (JAK), die nach Tyrosin Phosphorylierung eine Bindungsstelle für STAT (Signal transducer and activator of transkription) aufweisen. STAT bindet und wird ebenfalls phosphoryliert [von der Thüsen et al. 2003]. Nach Ablösung erlangen zwei STAT Moleküle durch Dimerisation die Fähigkeit, in den Zellkern transportiert zu werden. Dort binden sie an spezifische STAT-Bindungssequenzen im Bereich des Promotors des Zielgens auf der DNA und induzieren die Transkription. Gehemmt wird die JAK/STAT Kaskade durch sogenannte Suppressor of cytokine signaling (SOCS). Sie unterdrücken die Phosphorylierung von gp130, JAK und STAT [Heinrich et al. 2003].

Ein anderer Transduktionsmechanismus ist die MAPK (Mitogen activated protein kinase) Kaskade. Wichtig bei der Vermittlung ist hier die SHP2 (Src-homology-2-domain-containing tyrosine phosphatase) Bindungsstelle des gp130 [Heinrich et al. 2003].

Als dritte Kaskade ist die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) zu nennen. Sie ist assoziiert mit Wachstum (Insulin Wirkung) und Überleben (anti-apoptotische Effekte) der Zelle. Der molekulare Pathway liegt weitestgehend im Unklaren [Heinrich et al. 2003].

Bei der Termination der Signaltransduktion sind vorwiegend Phosphatasen involviert. Protein Tyrosin Phosphatasen (PTPs) können die aktive Seite eines Enzyms blockieren und somit seine Aktivität herabsetzen [Heinrich et al. 2003].

Der Transduktionsmechanismus ist in Abbildung 2 dargestellt.

Einleitung

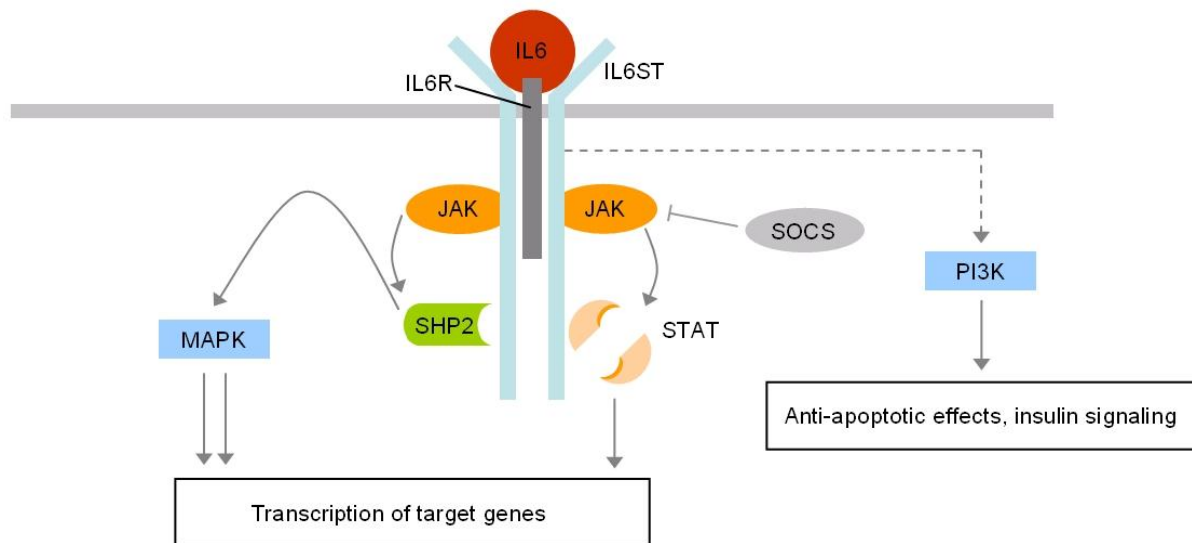


Abb. 2: Der Interleukin-6 Rezeptorkomplex. Die Bindung von IL-6 aktiviert multiple Kinasen, die Transkriptionsfaktoren induzieren, welche die Expression von Genen des Immunsystems triggern.

1.5 Genetische Studien

1.5.1 Studiendesign

Bei einer genetischen Untersuchung, die eine Korrelation zwischen einer genetischen Variante (Genotyp) und dem Auftreten von Merkmalen einer Erkrankung (Phänotyp) aufdecken soll, bietet sich die Fall-Kontroll-Assoziationsanalyse an.

Dazu werden einzelne Gene, welche in der Pathophysiologie der zu untersuchenden Erkrankung eine Rolle spielen, als sogenannte Kandidatengene ausgewählt. Diese werden in Bezug auf ihre Variabilität in einer erkrankten Patientenkohorte verglichen mit denen einer Kontrollgruppe. Solch klassische Fall-Kontroll-Studie ist durch ihre Retrospektivität sehr effektiv und erlaubt große Kohorten im Sinne einer populationsbasierten Studie [Casas et al. 2006], die notwendig ist, um zufällige stochastische Effekte auszugleichen.

Im Gegensatz dazu steht die genomweite Assoziationsanalyse, bei welcher das gesamte Genom auf Assoziation untersucht wird und die damit einen hypothesenfreien Ansatz zur Identifikation genetischer Risiken verfolgt (siehe hierzu auch 5.2.2).

1.5.2 Genetische Varianten als biallelische Einzelbasenpolymorphismen

Zur Identifizierung genetischer Varianten werden die einzelnen Basen einer Sequenz untersucht. Ein biallelischer Einzelbasenpolymorphismus (Single-nucleotide-polymorphism, SNP) ist eine Position mit einfachem Basenaustausch in einem DNA Doppelstrang. Definitionsgemäß unterscheiden sich Mutation und Polymorphismus darin, dass Polymorphismen mit einer Häufigkeit von mindestens 1% in einer Population auftreten. [Cichon et al. 2002]. Circa 90% aller Variationen im menschlichen Genom lassen sich auf Einzelbasenpolymorphismen zurückführen [Cichon et al. 2002]. Die SNPs sind eine wesentliche Grundlage der genetischen Unterschiede zwischen einzelnen Menschen. Aufgrund des häufigen Vorkommens der SNPs und ihrer relativ geringen Mutationsrate, sind sie einer statistischen Analyse sehr zugänglich. Die SNPs finden in der molekulargenetischen Analyse als genetische Marker ihre Funktion. Sie dienen in der zu untersuchenden Gensequenz als Orientierungspunkte, deren exakte Lokalisation bekannt ist. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind 18 Millionen SNPs beschrieben und 4,5 Millionen in HapMap geführt [www.hapmap.org], siehe dazu auch 1.5.3.

SNPs kommen in kodierenden Exons vor, in Promotorregionen, in nicht-kodierenden Introns und in intergenetischen Bereichen. Polymorphismen können in allen Genabschnitten entscheidende Wirkungen auf die Replikation und den Aufbau des zu kodierenden Proteins ausüben.

1.5.3 Haplotypenanalyse und Kopplungsungleichgewicht

Ein Haplotyp-Block beschreibt eine chromosomale Sequenz, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zusammenhängend vererbt wird. Zwischen den Blöcken findet Rekombination statt [Wang et al. 2002]. Da die meisten SNPs diallelisch sind, finden sich bei 70-90% der Bevölkerung zwei, selten drei unterschiedliche Haplotypen (unterschiedliche Blocktypen) an einem Locus [Freudenberg et al. 2002]. Innerhalb eines Haplotyp-Blocks sind eine Vielzahl von SNPs bekannt, er erstreckt sich über eine Länge von 10-100 kb.

Die Mendelschen-Gesetze beschreiben eine rein zufällige nicht gekoppelte Vererbung. Dabei befinden sich die benachbarten Allele in einem Kopplungsgleichgewicht.

Einleitung

Innerhalb eines Haploblocks werden die SNPs gekoppelt vererbt. Sie folgen also nicht den Mendelschen Gesetzen der zufälligen Verteilung sondern werden stets gemeinsam weitergegeben. Dies wird als Kopplungsungleichgewicht, englisch Linkage disequilibrium (LD), beschrieben [Wang et al. 2002] und als Korrelationskoeffizient r^2 zwischen 0 und 1 angegeben, wobei 0,8 als signifikantes LD angesehen wird, also ein starkes Kopplungsungleichgewicht beschreibt [Reich et al. 2001].

Durch die Identifizierung eines Marker-SNPs kann dadurch mit entsprechender Wahrscheinlichkeit auf die Identität des zweiten benachbarten SNP innerhalb eines Haplotyp Blocks geschlossen werden [Freudenberg et al. 2002]. SNPs, die eine hohe Kopplung zu den umliegenden Sequenzen aufweisen, markieren einen Haplotyp. Sie werden auch „tagging SNP“ (tSNP) genannt [Casas et al. 2006].

Die Anzahl und die Auswahl der zu untersuchenden tSNPs für eine aussagekräftige Haplotypenanalyse kann nach Berechnung des Kopplungsungleichgewichtes zwischen den SNPs eines Gens abgeschätzt werden. Dazu hat das Internationale HapMap Konsortium das HapMap Projekt 2001 ins Leben gerufen. Ziel ist eine komplette Kartierung von Haploblöcken und -typen mit den dazugehörigen „tagging SNPs“ [The International HapMap Consortium. 2003]. Dabei können 300.000 bis 600.000 tSNPs die Identität von 10 Millionen SNPs beschreiben [www.hapmap.org]. Als Grundlage für die Kartierung dient dem HapMap Konsortium eine Kohorte von 270 Personen aus Nigeria (YRI), Japan (JPT), China (CHB) und den USA (Einwohner Utahs mit europäischen Vorfahren, CEU Kohorte der CEPH). Ein tSNP muss definitionsgemäß eine minor Allele frequency (minAF, Allelfrequenz des selteneren Allels) von >5% in dieser Stichprobe haben. Als Beispiel der Haploblockstruktur eines Gens ist in Abbildung 3 das MAPK-1 Gen dargestellt.

Einleitung

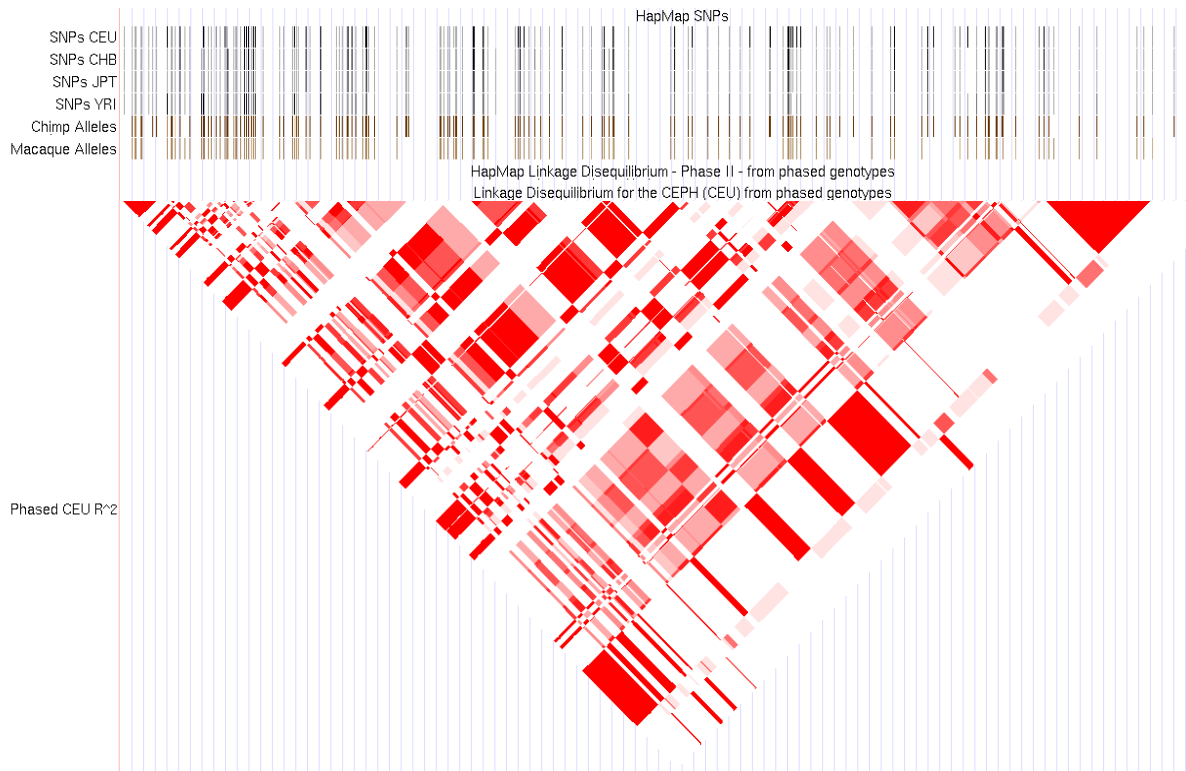


Abb. 3: MAPK1-Gen: alle identifizierten SNPs dieser Region (HapMap) und die Haploblockstruktur des MAPK1-Gens.

2 Fragestellung

Es konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass erhöhte Interleukin-6 und CRP Plasmaspiegel mit der Progression der koronaren Herzerkrankung einhergehen. Wie IL-6 seine Wirkung entfalten kann hängt wesentlich von dem Effektor-Pathway ab. Dieser unterliegt der genetischen Kontrolle durch Expression der entsprechenden Untereinheiten.

In der vorliegenden Arbeit wurde systematisch untersucht, ob sich genetische Varianten aus zwölf verschiedenen Genen, die für bekannte Liganden, Rezeptoren oder Signaltransduktoren innerhalb des IL-6-Pathways kodieren, mit dem Auftreten der KHK assoziieren lassen. Dies wurde in einer groß angelegten populationsbasierten Fall-Kontroll-Kandidatengen-Assoziations-Studie erforscht. Dazu wurden 73 Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNP), die die vollständige Haplotyp-Information dieser Gene umfassen, aus folgenden Kandidatengen untersucht: IL-6, IL-6ST, IL-6R, IL27RA, JAK1, STAT3, MAPK1, MAPK14, PIK3R1 und PIK3CG sowie PTPN11 und PTPN22.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsgegenstand

In einer populationsbasierten Fall-Kontroll-Kandidatengen-Assoziations-Studie wurden 73 tagging Single-nucleotide-polymorphismen (tSNPs), die in Tabelle 1 aufgelistet sind, aus 12 Kandidatengen des IL-6-Pathways untersucht (IL-6, IL-6ST, IL-6R, IL27RA, JAK1, STAT3, MAPK1, MAPK14, PIK3R1 und PIK3CG sowie PTPN11 und PTPN22). Die Auswahl der Gene orientierte sich an dem IL-6-Pathway, der Teil des JAK/STAT-Pathways ist [Heinrich et al. 2003, Kisseleva et al. 2002, Alexander und Hilton 2004, Kim und Baumann 1999, http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+hsa04630]. Die Auswahl der tSNPs geschah durch die Berechnung von Kopplungsungleichgewichts-Statistiken und Haplotyp-Mustern aus den HapMap CEU-Genotypen mithilfe der Haploview 3.2 Software [Barrett et al. 2005].

Tab. 1: Die untersuchten 73 tSNPs der zwölf Gene des IL-6 Pathways

Gen	Chromosom	Referenz Sequenz (rs) Identifizierungs Nummer	Position Basen- paar (bp)
IL27RA	19 (p13.12)	rs6511905	14003616
		rs11881500	14010814
		rs2306190	14023676
MAPK1	22 (q11.21- q11.22)	rs6928	20439558
		rs9340	20439907
		rs2298432	20447743
		rs9610470	20533693
		rs11913721	20534689
IL6	7 (p15.3)	rs2069824	22538472
		rs1800795	22539885
		rs2069832	22540673
		rs2069843	22543234
		rs2069860	22544278
MAPK14	6 (p21.31)	rs851034	36095623
		rs851024	36107542
		rs851023	36114198
		rs2145362	36137133
		rs851006	36173163
		rs12200998	36190660
		rs7757672	36193303
STAT3	17 (q21.2)	rs2272087	37713088
		rs1053005	37719436
		rs2293152	37735055
		rs3816769	37751799
		rs9912773	37764060
		rs744166	37767727

Methodik

IL6ST	5 (q11.2)	rs10471960	55272131
		rs1900173	55275763
		rs11574780	55279795
		rs7719246	55280534
		rs10940495	55298417
		rs6870870	55330085
JAK1	1 (p31.3)	rs310244	65017898
		rs2780819	65020894
		rs188698	65030605
		rs310228	65034253
		rs2256298	65042703
		rs310236	65045878
		rs3790541	65053588
		rs310202	65061565
		rs310199	65062143
PIK3R1	5 (q13.1)	rs40419	67551358
		rs706713	67558478
		rs7713645	67563082
		rs34300	67592001
		rs10940160	67598983
		rs2161120	67599952
		rs10515074	67601949
		rs1819987	67602809
		rs34306	67614501
		rs1550805	67619563
		rs1445760	67628772
		rs1043526	67630080
		rs9291926	67635412
		PIK3CG	7 (q22.3)
rs1526083	106104027		
rs849367	106110105		
rs4730205	106123200		
rs12667819	106140608		
rs849412	106143853		
PTPN11	12 (q24.13)	rs11066301	111334092
		rs2301756	111353496
		rs11066323	111386081
PTPN22	1 (p13.2)	rs2476601	114089610
IL6R	1 (q21.3)	rs952146	151182001
		rs4845618	151213088
		rs7549250	151217409
		rs7518199	151220492
		rs4845623	151228850
		rs4845374	151240020
		rs8192284	151240043
		rs2229238	151250969
		rs7526293	151257282

3.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs

3.2.1 Aufbau der Kartierungspopulation

Die Kartierungspopulation wurde zwischen 2002 und 2006 durch das PopGen-Projekt rekrutiert. Die Biobank PopGen (Population based assessment of genetic effects) ist Teil des deutschen Nationalen Genomforschungsnetzes (NGFN), dessen Aufgabe es ist, definierte Patienten- und Kontrollgruppen aus bestimmten geographischen Bereichen zu rekrutieren [Krawczak et al. 2006; www.popgen.de]. Die Patientenstichprobe für diese KHK Studie wurde im Rahmen des Kardiovaskulären Krankheitsnetzwerkes (CardioNet) des NGFN gebildet. Sie stammt aus geographisch engen Gebieten Schleswig-Holsteins, begrenzt durch die dänische Grenze, die Nord- und Ostsee sowie den Nord-Ostsee-Kanal, siehe hierzu Abbildung 4. Dieses Areal beheimatet rund 1,1 Millionen Menschen. Die geographische Isolation drückt sich in geringen Migrationsraten aus, die eine homogene genetische Struktur der Bevölkerung fördern [Krawczak et al. 2006].



Abb. 4: PopGen Rekrutierungs-Gebiet (hell blau hinterlegt)

Die Kontrollgruppe für die explorative Studie wurde im selben Zeitraum aus dem Großraum Kiel rekrutiert. Sie setzt sich aus der gleichen ethnischen Gruppe, Alter und Geschlechterverhältnis zusammen wie die Patientengruppe. Dadurch kann eine potentielle Populationsstratifizierung und die Selektion falsch positiver Assoziationen vermieden werden [Khlat et al. 2004].

Als Kontrollgruppe der Replikationsstudie diente die unabhängige MICK-Stichprobe (Metabolische Interventions Cohorte Kiel des Max Rubner Bundesforschungsinstituts für Ernährung und Lebensmittel). Diese populationsrepräsentative Stichprobe stammt ebenfalls aus der Umgebung Kiels und wurde zwischen 2003 und 2006 aufgebaut.

3.2.2 Einschlusskriterien

Um in die Patientenstichprobe eingeschlossen zu werden, musste eine angiographisch gesicherte KHK vorliegen. Diese wurde definiert durch eine mindestens 70%ige Stenose einer der drei großen Koronargefäße. Mehr als 90% der Patienten wurden einer operativen oder interventionellen Myokardrevaskularisation unterzogen. Der Zeitraum der Herzkatheteruntersuchung beinhaltete die Jahre 1/1997 bis 10/2004. Zu diesem Zeitpunkt durfte der Patient/die Patientin nicht älter als 65 Jahre sein. Es erfolgte eine Aufteilung in eine Kohorte mit einem Alter jünger als 55 Jahre bei der Untersuchung und eine mit einem Alter von 55-65 Jahren.

Für die Kontrollstichprobe der explorativen Untersuchung wurden KHK Erkrankte heraus gefiltert, so dass eine KHK freie Stichprobe entstand.

Bei der MICK-Stichprobe bestanden die Einschlusskriterien aus dem Merkmal des männlichen Geschlechts, einem Alter von 45-65 Jahren und der Abwesenheit einer Diabetes Erkrankung.

3.2.3 Rekrutierung der Teilnehmer

Zunächst wurden die geeigneten Patienten durch Recherche in den Herzkatheterberichten aller angiographisch tätigen Einrichtungen des Einzugsgebietes identifiziert. Dazu zählen 5 Kliniken (Heide, Rendsburg, Kiel, Schleswig, Flensburg) sowie einige niedergelassene Praxen. Durch dieses flächendeckende Vorgehen wurde erreicht,

Methodik

dass möglichst alle erkrankten Einwohner des Einzugsgebietes erfasst werden konnten.

Die ermittelten Patienten wurden von der Einrichtung, in der die Untersuchung erfolgte, angeschrieben, informiert und um Teilnahme gebeten. Nach Eingang der schriftlichen Einverständniserklärung (Written informed consent) erhielten die Patienten von der PopGen-Zentrale einen Fragebogen zu anamnestischen Daten und ein Blutentnahme-Set. Das Blut (3 x 10ml EDTA-Röhrchen) wurde entweder vom Hausarzt oder in der PopGen Zentrale entnommen, dazu musste der Teilnehmer gesondert einwilligen.

Um die hohe Rücklaufquote von 80% zu erreichen, wurden die Teilnehmer zusätzlich postalisch oder telefonisch kontaktiert. Außerdem wurden den Krankenakten der Teilnehmer detailliertere Angaben in Hinblick auf den Krankheitsverlauf, Komorbiditäten, Medikation und Laborparameter entnommen. Hiermit ließ sich der Fragebogen der Patienten verifizieren und ergänzen.

Die Kontrollstichprobe wurde vom Einwohnermeldeamt entsprechend der Kriterien bereitgestellt und auf demselben Wege wie die Patienten rekrutiert.

Sowohl die Fragebögen als auch die Blutproben wurden durch eine fortlaufende Kodierung pseudonymisiert. So kann weiterhin eine Verbindung zwischen Geno- und Phänotyp hergestellt werden, jedoch nicht mehr zu dem Spender.

Alle Rekrutierungs- und Datenverarbeitungs-Prozesse wurden sowohl von der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel als auch von dem Datenschutzbeauftragten des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (siehe Schreiben im Anhang). Abbildung 5 zeigt schematisch den Rekrutierungs- und Datenverarbeitungsprozess.

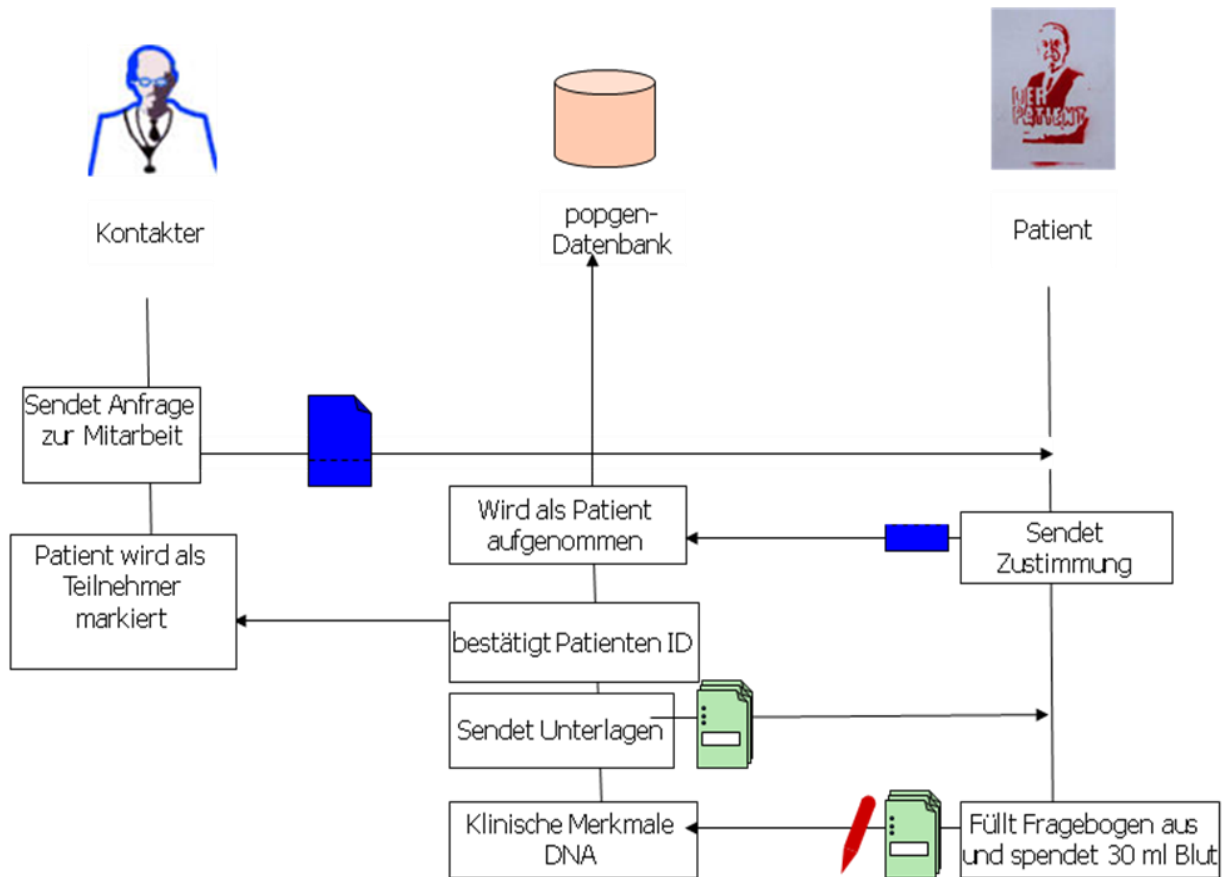


Abb. 5: Rekrutierung der Kohorten durch das PopGen Projekt

3.4 DNA-Isolierung und Genotypisierung

3.4.1 Die DNA-Präparation

Die Extraktion der DNA aus den EDTA-Blutproben der Patienten erfolgte unter Verwendung des QIAGEN FlexiGene DNA Kits der Firma QIAGEN nach Vorgaben des Hersteller Protokolls vom Februar 2003. Hierbei können aus 10 ml Vollblut bis zu 450 µg DNA extrahiert werden. Die verwendeten Materialien sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Methodik

Tab. 2: Reagenzien und Geräte für die DNA-Extraktion

Reagenzien und Geräte	Anbieter
QIAGEN FlexiGene DNA Kit: Puffer FG1 Puffer FG2 QIAGEN® Protease	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
100% Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
70% Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris- EDTA-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
50 ml Sarstedt Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
2 ml Eppendorf Tubes	Eppendorf, Köln, Deutschland
Eppendorf Pipetten (100/1000µl)	Eppendorf, Köln, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere® (100/1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Heraeus® Multifuge® 3 S-R	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Heraeus® Biofuge® fresco	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Schüttelwasserbad GFL® 1086	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Scientific Industries Vortex Genie™ 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

Die bei -80°C tiefgefrorenen Blutproben wurden hierfür bei 4°C aufgetaut. Zur Lyse der in den Proben enthaltenen Zellen wurde 10 ml Vollblut und 25 ml Puffer FG1 in 50 ml-Tubes pipettiert, geschwenkt und fünf Minuten bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Am Gefäßboden verblieben die als Pellet sedimentierten Zellkerne und übrige feste Zellbestandteile.

Zur Lyse der Proteine und Bindung von Kontaminationsstoffen wurden 5 ml Puffer FG2 und 50 µl QIAGEN Protease zugegeben und zur Resuspension gründlich gevortext. War die Lösung noch nicht homogen, wurde sie mit einem weiteren Milliliter FG2 aufbereitet. Nach 25-minütiger Inkubation im 65°C warmen Schüttelwasserbad lag die DNA in Lösung vor.

Im nächsten Schritt wurde die DNA mittels Zugabe von 5 ml 100% Isopropanol präzipitiert und durch dreiminütiges Zentrifugieren bei 2000 x g sedimentiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde dem DNA Sediment 1 ml 70% Ethanol zugegeben. Das Ethanol diente dem Auswaschen von Rückständen. Nach kurzem Vortexen wurde in der Biofuge eine Minute bei 13.000 upm zentrifugiert, der Überstand abge-

Methodik

gossen und gegebenenfalls der Rest abpipettiert. Das DNA Sediment trocknete 20 Minuten bei Raumtemperatur bis der Alkohol vollständig evaporiert war.

Zur Resuspension wurde der gereinigten DNA 1 ml Tris-EDTA-Puffer zugemischt. Nach kurzem Vortexen bei niedriger Geschwindigkeit wurde die DNA drei Stunden im 65°C warmen Schüttelwasserbad zur Lösung inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren.

3.4.2 Die Herstellung von 384- PCR- Mikrotiterplatten

Die Materialien, die für die folgenden Schritte verwendet wurden, sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Reagenzien und Geräte zur Herstellung von 96- und 384- Well-Platten und 384- PCR- Mikrotiterplatten

Reagenzien und Geräte	Anbieter
PicoGreen®	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Invitrogen DNA Standard	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tris-EDTA-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit: Sample Puffer Reaction Puffer Enzym Mix	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Tecan Genesis RSP 150 Pipettierroboter Tecan Genesis RSP 150 mit te-mo Einheit	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Tecan Spectrafluor Plus Fluorometer	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Robbins Scientific® Hydra™ 384 Mikrodispenser	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland
Platesealer ALPS-300	ABgene, Epsom, UK
2 ml Eppendorf Tubes	Eppendorf, Köln, Deutschland
96 well Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
384 deep well storage plate (250 µl)	ABgene, Epsom, UK
96 deep well storage plate (0,8 ml)	ABgene, Epsom, UK
384 well PCR Platte Polypropylen	Greiner bio-one, Frickenhausen; Deutschland

3.4.2.1 Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung

Wir überprüften die Qualität der extrahierten DNA mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (0,8% Gel, 1h, 220V). Die Konzentrationsmessung geschah durch fluorometrische Konzentrationsbestimmung der genomischen DNA durch PicoGreen [Ahn et al. 1996; Singer et al. 1997; Rengarajan et al. 2002; Guillo et al. 2006]. Dabei fluoresziert der Farbstoff ausschließlich nach Anlagerung an doppelsträngige DNA. Somit verfälscht eine natürliche Kontamination mit Einzelstrang-DNA, RNA und Oligonukleotiden nicht das Messergebnis. Für dieses Verfahren wurde eine 400x Tris EDTA / DNA-Verdünnung und die Farbstofflösung im Verhältnis 1:1 durch den Tecan Pipettierroboter in eine 96-Well (Kavitäten) -Mikrotestplatte pipettiert. Eine Mikrotestplatte wurde mit 32 Proben in doppelter Ausführung, vier Leerwerten und fünf jeweils doppelten DNA-Standard-Konzentrationen bestückt, die übrigen Wells blieben frei. Nach fünf minütiger Inkubation im Dunklen erfolgte die Analyse im Tecan Spectrafluor Plus Fluorometer mit Hilfe der hauseigenen Software.

3.4.2.2 Einstellen der Konzentration

Der Pipettierroboter passte die Konzentration eines Teils der Proben (Aliquots) auf eine einheitliche Konzentration von 50 ng/µl an. Nach Verifizierung durch eine erneute Konzentrationsmessung wurden die verdünnten Proben auf 96-Deep-Well-Platten (mit 96 Kavitäten) gebracht. Das Plattendesign schreibt 92 Proben, drei Wasser-Leerwerte und eine Referenz vor. Als Referenz fungierte DNA, die aus Zellkulturen humaner Zellen (CEPH Centre d'Étude du Polymorphisme Humain, Paris, Frankreich) isoliert wurden. Die Platten wurden anschließend mit dem ALPS 300 Platesealer versiegelt und tiefgefroren gelagert.

3.4.2.3 Whole Genome Amplification

Zur Amplifikation der genomischen DNA wurde eine WGA (whole genome amplification) durchgeführt [Lovmar und Syvänen 2006]. Im Gegensatz zur PCR werden dabei nicht einzelne Abschnitte eines Chromosoms vervielfältigt, sondern in kleinen Fragmenten das gesamte Chromosom und damit das vollständige Genom. Dabei wird die DNA nicht in Temperaturzyklen vervielfältigt, sondern isothermal. Dies wird durch

den Einsatz der DNA Polymerase des Bakteriophagen phi29 von *Bacillus subtilis* in der Multiple displacement amplification (MDA) Reaktion erreicht [Dean et al. 2002]. Hierbei steigt die DNA Konzentration exponentiell an und endet selbstlimitierend in einer Plateau Phase. Aus 10 ng genomischer DNA kann durch diese Methode 4-7 µg DNA generiert werden.

Die WGA wurde mit dem GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente 1 µg der Original DNA oder 50ng/µl Aliquots. Diese wurden mit dem Sample Puffer des Kits zur Denaturierung bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionspuffer und der Enzym Mix des Kits zugefügt und zur Amplifizierung zwei Stunden bei 30°C inkubiert.

3.4.2.4 Plattenherstellung

Nach der WGA Reaktion wurden die Proben auf 96-Deep-Well-Platten in der Plat- tendesign Anordnung verdünnt. Schloss sich eine SNPLex Typisierung an, mussten die Proben außerdem gemäß des SNPLex Protokolls fragmentiert werden (siehe dazu 3.4.4).

Zur Hochdurchsatz-Typisierung wurden vier 96-Deep-Well-Platten auf einer 384-Deep-Well-Platte zusammengefasst (mergen). Der Pipettiervorgang wurde durch den Tecan Pipettierroboter mit te-mo Zusatzmodul (96-Nadel-Einheit) ausgeführt. Anschließend verteilte der Robbins Scientific Hydra 384 Mikrodispenser jeweils 5 µl aus den Proben der Deep-Well-Platten auf 384-Mikrotiter-PCR-Platten. Diese wurden getrocknet, versiegelt und so bei Raumtemperatur bis zur Genotypisierung gelagert.

3.4.3 Die Genotypisierung mit der TaqMan Technologie

Die TaqMan Technologie ist ein bevorzugtes Verfahren zur Genotypisierung von Basensequenzvariationen wie SNPs in umfangreichen Probandenkohorten. Differenziert werden homozygote und heterozygote Allele.

TaqMan vereinigt die klassische Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit der Detektion der SNPs in einem Verfahren. Hierfür bedient sie sich spezifischer Detektions-Sonden (Probes), die an eine einzige SNP Sequenz binden. Für die Markierung sowie die Amplifikation muss die Basenabfolge der SNP Region bekannt sein.

Methodik

Die Sonden zur Detektion der SNPs sind Oligonukleotide, die komplementär an die zu untersuchende Sequenz binden können und mit zwei fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind [Lee et al. 1993]. Der eine ist der Reporter Farbstoff R (FAM: 6-Carboxy-Fluorescein oder VIC von Applied Biosystems) am 5'-Ende und der zweite der Quencher Q (TAMRA: 6-Carboxy-Tetra-Methyl-Rhodamin) am 3'-Ende [Livak et al. 1995]. Durch ihre räumliche Nähe unterdrückt der Quencher die Emission des Reporters als sogenannter Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET). Sollen gleichzeitig zwei Allele untersucht werden, bedient man sich der oben genannten unterschiedlichen Reporter Farbstoffe, die in unterschiedlicher Wellenlänge fluoreszieren, wobei FAM für das eine Allel und VIC für das andere spezifisch ist.

Während der PCR synthetisiert die Taq-Polymerase vom Primer aus in Richtung der Sonde den komplementären DNA-Strang. Erreicht die Polymerase die hybridisierte Sonde, spaltet sie diese durch ihre intrinsische 5'→3' Exonukleaseaktivität. Der Reporter-Anteil kann sich vom Strang und dem Quencher entfernen und hebt die Emissionsunterdrückung durch den Quencher auf. Dies ermöglicht die Fluoreszenz des Reporters. Die Polymerase entfernt im weiteren Verlauf auch den Quencher-Anteil und setzt die Neustrangsynthese fort. Damit die Taq-Polymerase nicht von der Sonde aus synthetisieren kann, ist diese am 3'-Ende mit einem Phosphatrest blockiert.

Da der Reporter freier intakter Sonden nicht fluoresziert und die nicht exakt hybridisierten Sonden nicht gespalten werden, stellt die Fluoreszenz ein direktes Maß für die Menge der replizierten Templates der Zielregion dar.

Eine Weiterentwicklung des oben beschriebenen Sonden-Designs stellt die TaqMan-MGB (Minor groove binder) Sonde dar. Bei dieser ist am 3'-Ende zusätzlich ein MGB gebunden, was zu einer stabileren Bindung der Sonde an den komplementären DNA Strang führt, siehe dazu auch Abbildung 6. Diese Modifikation hat mehrere Vorteile. Es können kürzere Sonden eingesetzt werden, das Fluoreszenz Signal zur Detektion ist gegenüber dem Grundleuchten angehoben und die Diskriminierung zwischen exakt hybridisierten Sonden und fehlerhaft hybridisierten (Mismatch) erfolgt wesentlich genauer, was von entscheidender Bedeutung für die SNP Detektion ist [Afonina et al. 1997, Kutuyavin et al. 1997].

Methodik

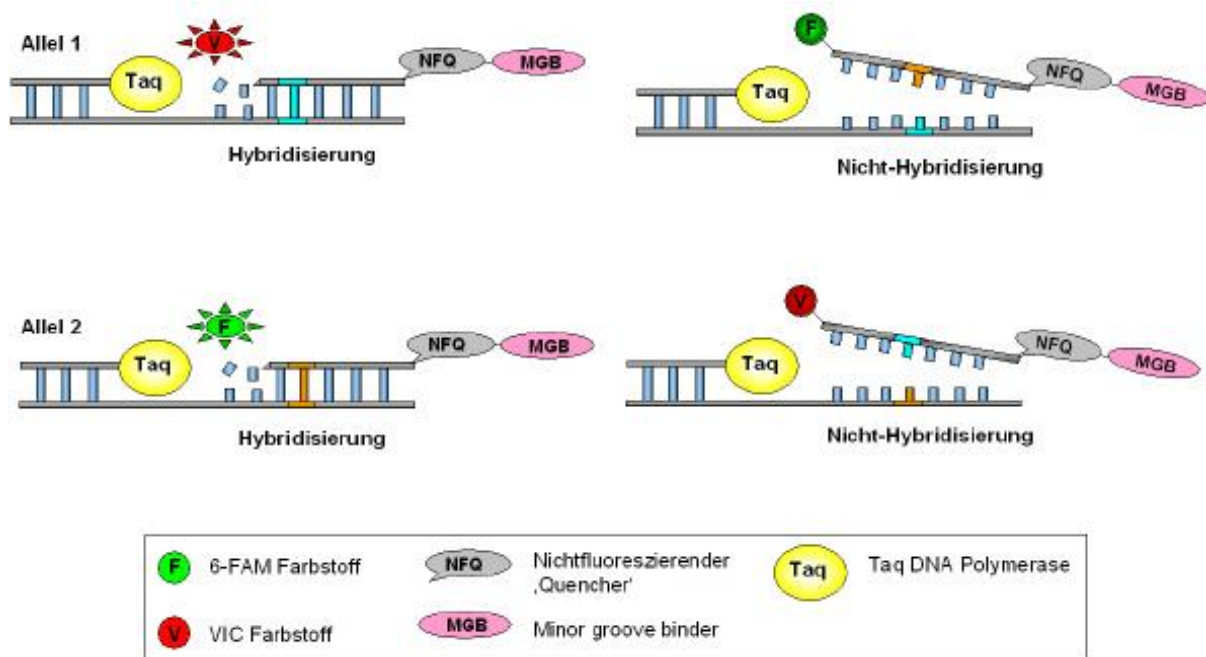


Abb. 6: Prinzip des TaqMan-Assays

Ausgangsmaterial für die TaqMan-Genotypisierung war die versiegelte 384-Well-PCR-Mikrotiterplatte, die bereits die getrocknete DNA der zu untersuchenden Studienteilnehmer enthielt. Die Materialien für die folgenden Schritte sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tab. 4: Materialien zur Durchführung der PCR mit der TaqMan Technologie

Reagenzien und Geräte	Anbieter
ABI TaqMan® Genotyping Master Mix: AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase dNTP optimierter PCR-Puffer MgCl ₂	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Tecan Genesis RSP 150 Pipettierroboter	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
AB-0558 Adhesive PCR-Film	ABgene, Epsom, UK
ABI Gene Amp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detector System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Heraeus® Labofuge 400	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Eppendorf Pipetten (100/1000/5000µl)	Eppendorf, Köln, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere® (100/500/1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen epTips (5000 µl) ohne Filter	Eppendorf, Köln, Deutschland

Methodik

Zu der getrockneten DNA wurde der TaqMan Genotyping Master Mix zugegeben, der die für die PCR notwendige AmpliTaq Gold DNA-Polymerase enthält. Diese benötigt zu Beginn der PCR eine zehnmünütige Aktivierungsphase bei 95°C, kann dann aber in einem Temperaturoptimum von nur 60°C arbeiten. Außerdem beinhaltet der Mix die Nukleotide für die Neustrangsynthese. Zusätzlich wurde der entsprechende Assay beigefügt. Dieser besteht aus den zwei Sequenz-spezifischen Primern und Sonden für die beiden Allele. Die eine Sonde verfügt dabei über den FAM und die andere über den VIC Farbstoff.

Pro Reaktion (2,5 ng DNA) setzte sich das Reaktionsgemisch von 5 µl wie folgt zusammen:

- 2,5 µl TaqMan Genotyping Master Mix
- 0,0625 µl des entsprechenden Assay
- 2,4375 µl deionisiertes Wasser.

Unter Verwendung des Tecan Genesis RSP 150 Pipettierroboters wurde die entsprechende Menge des Reaktionsgemisches in die 384 Wells der Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurden die Platten mit einer durchsichtigen Folie (AB-0558 Adhesive PCR-Film) abgedeckt und abzentrifugiert.

Die Amplifikation der DNA-Stränge verlief mittels des Gene Amp PCR Systems 9700. Dabei wurde zunächst durch eine zehnmünütige Inkubation bei 95°C die AmpliTaq Gold DNA-Polymerase aktiviert. Im nächsten Schritt erfolgte die eigentliche Polymerase Ketten Reaktion im zwei-Schritt-Verfahren. In 45 PCR-Zyklen wurde jeweils zur Denaturierung der DNA-Stränge 15 Sekunden bei 95°C und zur Primer- und Sonden-Hybridisierung sowie der Neustrangsynthese eine Minute bei 60°C inkubiert. Nach Beendigung des letzten Zyklus kühlte der Thermocycler auf 4°C ab. Zum Entweichen möglicher Luftblasen wurde das Reagenz kurz zentrifugiert.

Am Ende der TaqMan-PCR fand eine Endpunkt Messung des Fluoreszenz Signals statt.

3.4.4. Das SNPLex Genotypisierungs Vefahren

Mit dem SNPLex Verfahren kann ein größerer Durchsatz an Typisierungen erreicht werden indem im Gegensatz zur TaqMan Technologie nicht nur ein SNP sondern 48 gleichzeitig diskriminiert werden [de la Vega et al. 2005].

Die Umsetzung dieses Genotypisierungsverfahrens wurde exakt nach dem SNPLex Protokoll von Applied Biosystems mit den dafür vorgesehenen Geräten durchgeführt.

Methodik

Für weitere Informationen siehe SNPLEX Genotyping System 48-plex User Guide vom April 2006 von Applied Biosystems

(<http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04360856.pdf>).

Es wird zwischen Pre-PCR Schritten und Post-PCR Schritten unterschieden. Die Pre-PCR Schritte wurden zur Vermeidung von Kontaminationen räumlich getrennt von den Post-PCR Schritten durchgeführt.

Die entscheidende Reaktion beim SNPLEX Verfahren ist die zu Beginn stattfindende OLA Reaktion (Oligonukleotide ligation reaction) [Tobler et al. 2005]. Diese bezeichnet die spezifische Bindung von Sonden an die SNP Region. Im zweiten Schritt werden die gebundenen Sonden vom DNA-Strang getrennt und mittels PCR amplifiziert. An die vervielfältigten Sonden binden im dritten Schritt fluoreszierende Marker (Zip-Chute) mit unterschiedlicher Länge. Nach Separierung der Marker können diese durch die Kapillar-Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt und ausgewertet werden.

Die folgenden einzelnen Schritte sind in Abbildung 7 nachzuvollziehen.

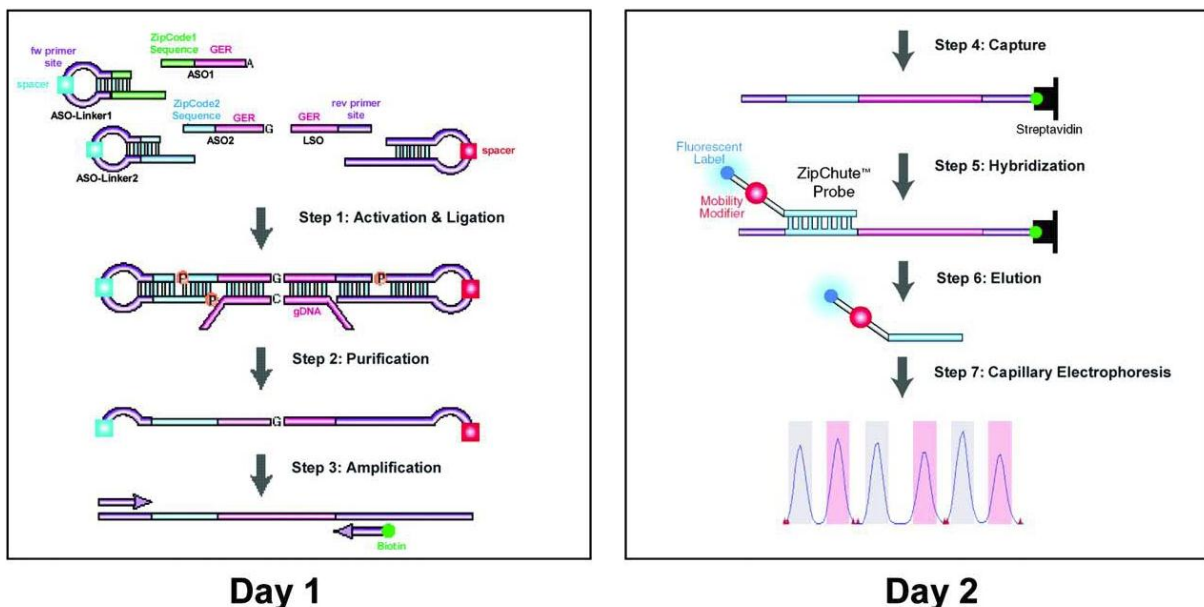


Abb. 7: Prinzip des SNPLEX Genotypisierungsverfahrens

Die OLA-Reaktion basiert auf dem Prinzip der LCR (Ligase chain reaction), benutzt allerdings die normale PCR zur Amplifikation des Bindungsproduktes.

Pro SNP wird ein Assay (spezifische Sonden) mit zwei ASO (Allele specific oligos) und einem LSO (Locus specific oligo) benötigt. Das ASO ist ein Oligonukleotid, das an die SNP Sequenz eines Allels bindet. Somit decken zwei ASO beide Allele ab. Es enthält außerdem eine ZipCode Sequenz, an der später spezifisch eines der Marker (ZipChute) binden kann. Das LSO bindet neben dem ASO und ist nicht Allel spezifisch, es verfügt zusätzlich über eine universelle Reverse-Primer Bindungssequenz.

Außer dem Assay-Multiplex-Pool (für 48 SNPs) sind universelle Linker erforderlich. Diese lagern sich nicht an die DNA sondern an das ASO oder LSO an und beinhalten ein Spacer Element, das einen späteren enzymatischen Abbau stoppt. ASO-Linker halten die universelle Forward-Primer Bindungssequenz vor.

Im zweiten Schritt verdauen 5'- und 3'-Exonukleasen alle nicht oder unvollständig gebundenen Oligonukleotide, die DNA Vorlage und die äußeren Regionen der gebundenen Linker bis zum Spacer. Anschließend wird das übrig gebliebene Bindungsprodukt mittels PCR amplifiziert, wobei einer der zugegebenen Primer mit einem Biotin Molekül markiert ist.

Beim dritten Schritt werden die mit Biotin markierten Amplicons nach Denaturierung als Einzelstrang an eine Streptavidin beschichtete Platte gebunden, andere gelöst und ausgewaschen. Nach Zugabe und Bindung der 96 (plus 6 Kontrollen) verschiedenen ZipChute Marker repräsentieren sie den Genotyp.

So können im vierten Schritt nach Lösung der Marker von den Bindungsprodukten die ZipChutes in der Kapillar Elektrophorese über Mobilitäts-Modifikatoren differenziert werden.

3.4.5 Auswertung der Fluoreszenzmessungen von TaqMan und SNPlex

Die Evaluation der Fluoreszenz erfolgte für die 384-PCR-Platten unter Verwendung des ABI PRISM 7900 HT Sequence Detector Systems. Ein Laserlicht mit der Wellenlänge von 488 nm wurde auf jede einzelne Kavität der Mikrotiterplatte mit dem Untersuchungsmaterial gebracht. Die entsprechende Fluoreszenzemission wurde zu einem Spektrographen mit CCD-Kamera (Charge-coupled device camera) zurückgeleitet und konnte ausgewertet werden.

Die Qualitätskontrolle erfolgte unter Anwendung eines Punktwolken- (Scatter-) Diagramms, wie in Abbildung 8 dargestellt. Die Auswertung eines diallelischen Assays liefert drei Punktwolken (homozygot Allel 1, heterozygot, homozygot Allel 2). Eine

Methodik

vierte Punktwolke tritt durch das Signal der Kontrollproben ohne DNA Gehalt nahe des Schnittpunktes von Abszisse und Ordinate auf. Die daraus resultierenden Daten wurden mit der Data Collection Software v2.0 verarbeitet und mit der GeneMapper Analysis Software v3.5.1 analysiert (geschützte Software von Applied Biosystems www.applied-biosystems.com). Zur Qualitätskontrolle der Daten wurde die von der Software automatisch durchgeführte Allelzuordnung manuell kontrolliert. Die so erhaltenen Genotypen wurden als Textfile exportiert und darauf folgend in die SQL-Datenbank IBDbase, welche die Basis der statistischen Analyse bildet, importiert.

Methodik

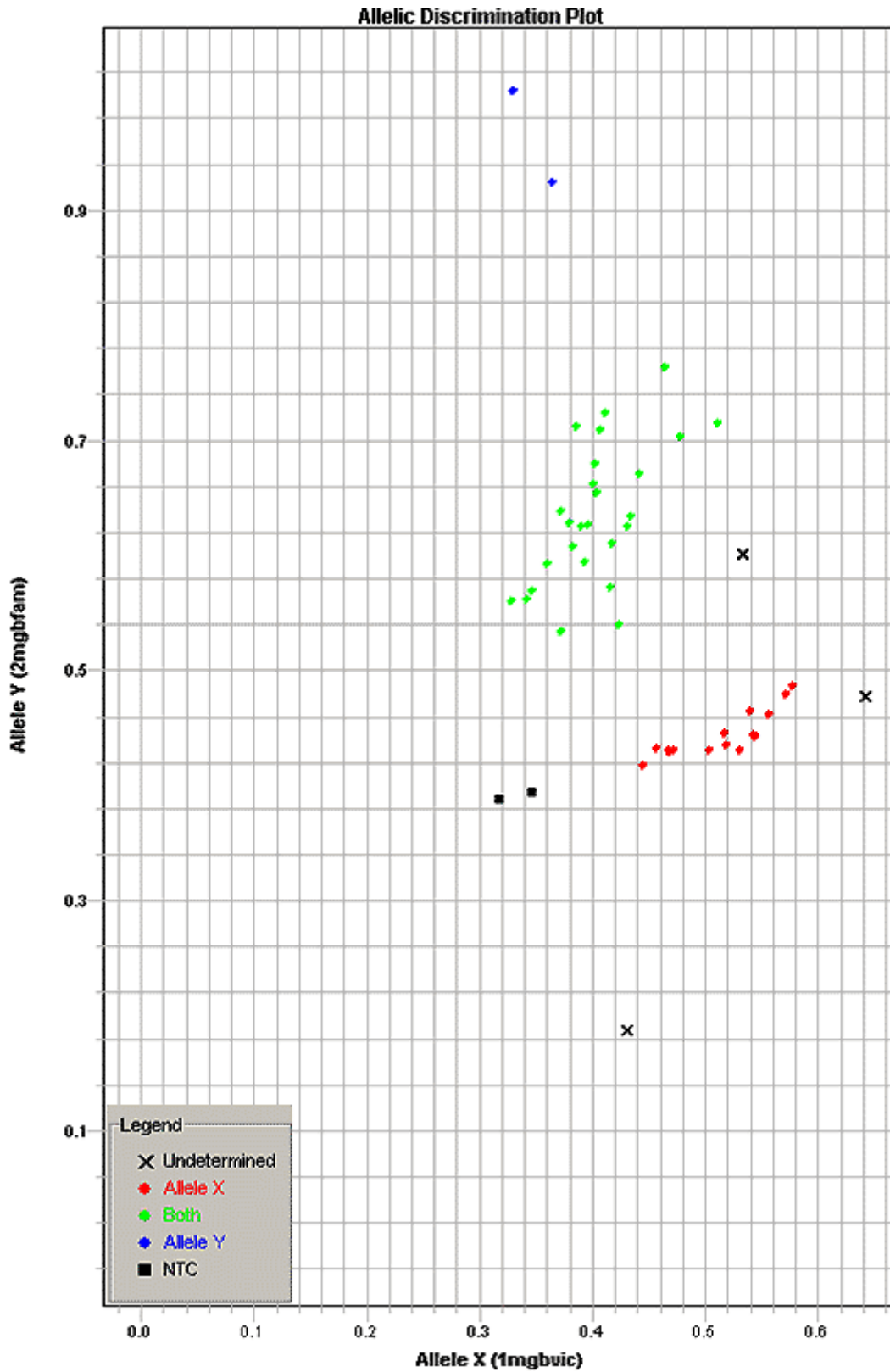


Abb. 8: Darstellung der Fluoreszenzmessung eines TaqMan Assays als Punktwolkendiagramm (Scatter plot). NTC= Negativkontrolle

3.5 Die statistische Analyse

3.5.1 Statistische Qualitätskontrolle der Testergebnisse

Die Verwaltung von Patientendaten, Probenzuordnung auf den Platten, Genotypisierung und Markercharakteristika erfolgte in einem laboreigenen Datenbanksystem [Hampe et al. 2001]. Unter Anwendung dieses Systems wurden die Daten in das für die Statistik notwendige Format überführt.

Zum Ausschluss grober systematischer Fehler, wie einer Populationsstratifizierung oder unzureichender Genotypisierung, wurde das Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) unter Anwendung des χ^2 -Tests als Qualitätskriterium berechnet.

Hinter dem HWE steht ein theoretisches Modell, das die Genotypfrequenzen einer stabilen Population (unter Ausschluss von Migration, natürlicher Selektion oder nicht zufälligem Paarungsverhalten) aus den entsprechenden Allelfrequenzen vorhersagt. Eine Population befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, wenn die Allel- und Genotypfrequenzen über viele Generationen stabil bleiben und dem Erwartungswert entsprechen, weichen die Genotypfrequenzen von diesem Erwartungswert des Gleichgewichts signifikant ab, kann davon ausgegangen werden, dass eine oder mehrere Annahmen dieses Modells gestört sind. Das Hardy-Weinberg-Modell hat auch für die meisten menschlichen Populationen seine Gültigkeit [Winnington et al. 2005]. In Fall-Kontroll-Assoziationsstudien deutet eine Abweichung vom HWE meist eine Populationsstratifizierung, eine unzureichende Genotypisierung [Xu et al. 2002] oder eine unterschiedliche Sondenbindung bei hetero- und homozygoten Trägern an [Winnington et al. 2005]. Marker, welche in der Kontrollgruppe signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abwichen ($P_{\text{HWE}} < 0,01$), wurden deshalb von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Darüber hinaus sind auch solche Marker von der weiteren Analyse ausgeschlossen worden, deren Genotypisierungserfolgsrate (Call rate CR) unter 95% lag. Zusätzliche Bedingung war außerdem eine Allelfrequenz des selteneren Allels (Minor allele frequency, minAF) von $>5\%$. Außerdem fand eine manuelle Überprüfung der über die Software erfolgten Allelzuordnung für alle verwendeten SNPlex - und TaqMan-Assays statt.

3.5.2 Statistische Auswertung der Testergebnisse

Die Auswertung der Assoziations-Fall-Kontroll-Studie basiert auf dem Vergleich der Genotypverteilungen der untersuchten SNPs zwischen den betroffenen Personen (Fälle mit KHK) und nicht betroffenen Individuen (Kontrollen). Um festzustellen, ob sich die Allel- bzw. Genotypfrequenzen der beiden Testpopulationen signifikant voneinander unterscheiden, wurde der Mehrfelder χ^2 -Test nach Pearson angewendet [Ott J 1985]. Dieser überprüft die Unabhängigkeit zweier Merkmale, indem der Unterschied zwischen dem Erwartungswert und dem Beobachtungswert bestimmt wird. In der vorliegenden Studie sind diese beiden Merkmale zum einen der Phänotypstatus (KHK) und zum anderen der biallelische Marker (Allel 1 und 2 oder Genotyp 11, 22 und 12) unter der Nullhypothese, dass die Allel- oder Genotypfrequenzen in der Fallgruppe denen der Kontrollgruppe entsprechen. Aufgrund einer χ^2 -Verteilung mit einem Freiheitsgrad wurde der p-Wert bestimmt. Ein Testausgang wurde als signifikant betrachtet und die Nullhypothese zurückgewiesen, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war. Der p-Wert wurde dazu nach dem dominanten, additiven und rezessiven Modell nach Wald bestimmt.

Des Weiteren erfolgte die statistische Auswertung mit Hilfe des Chancenverhältnisses (Odds Ratio, OR). p_e bezeichnet die Wahrscheinlichkeit der Exponierten, zur Fallgruppe zu gehören, und p_{ne} die entsprechende Wahrscheinlichkeit der Nicht-Exponierten. Unter dieser Annahme berechnet sich die Chance der Exponierten, zur Fallgruppe zu gehören, zu $odds_e = p_e/(1-p_e)$ und die Chance der Nicht-Exponierten zu $odds_{ne} = p_{ne}/(1-p_{ne})$. Die OR ist dann $OR = odds_e/odds_{ne}$. Die Odds Ratio drückt somit aus, um wieviel größer die Chance ist, betroffen zu sein (hier: an KHK zu erkranken), wenn man der Gruppe mit Suszeptibilitätsfaktor (Exponierte) zugehörig ist (z.B. Träger von Allel 1), verglichen mit den Trägern von Allel 2 (der Gruppe ohne Suszeptibilitätsfaktor, nicht Exponierte). Die Odds Ratio kann einen Wert zwischen Null und Unendlich annehmen. Ein Wert von 1 bedeutet ein gleiches Chancenverhältnis. Ein Wert >1 zeigt eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit betroffen zu sein um den entsprechenden Faktor an, ein Wert <1 eine Verminderung um den jeweiligen Faktor. Zusätzlich angegeben wird das 95% Konfidenzintervall (CI), das das jeweilige Intervall, in dem die OR mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% tatsächlich liegt angibt. Schließt das 95% CI die 1 mit ein, kann die wahre OR

somit auch 1 betragen und ein gleiches Chancenverhältnis anzeigen und damit einen tatsächlichen Effekt unwahrscheinlich machen.

Die logistische Regression gehört in der Statistik zur Kategorie der verallgemeinerten linearen Modelle. Wenn die zu untersuchende Zielgröße einen dichotomen Charakter aufweist (d.h. betroffen/nicht betroffen), kann sie für die Analyse genetischer Daten verwendet werden, um den Einfluss von Kovariaten in die Analyse einbeziehen zu können. In dieser Studie wurde mit Hilfe der logistischen Regression der Einfluss der Kovariaten Geschlecht, Bluthochdruck, Body Mass Index (BMI), Rauchen und Diabetes mellitus berücksichtigt.

3.5.3 Verwendete Programme

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Statistik-Programm „R“ durchgeführt. Dieses ist ein frei zugängliches Rechenprogramm, welches durch das Projekt „The project for statistical computing“ entwickelt wurde und unter www.r-project.org einsehbar ist. Die statistische Auswertung fand mit Hilfe des Instituts für Medizinische Informatik und Statistik der Universität zu Kiel statt.

4 Ergebnisse

Im Rahmen der explorativen Kandidatengen-Studie sollten Genvarianten identifiziert werden, die für die Entwicklung einer KHK prädisponieren. Dafür wurden zunächst in der primären Studie 73 tagging SNPs aus zwölf Genen des Interleukin-6 Pathways auf Assoziation untersucht. Anschließend wurden diese Ergebnisse auf andere Einflussgrößen adjustiert. Der signifikanteste SNP wurde in einer unabhängigen Stichprobe repliziert und ebenfalls adjustiert.

4.1 Die Stichproben

Es ließen sich insgesamt 2199 an KHK erkrankte Patienten in die Fallstichprobe einschließen. Diese teilen sich zur Hälfte in die Gruppe der Jüngeren (<55 Jahre) für die primäre Studie und die der Älteren (55-65 Jahre) für die Replikationsstudie auf. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei den Jüngeren bei 48 Jahren, bei den Älteren bei 57 Jahren. Die Rekrutierung fand sechs Jahre nach Diagnosestellung statt. Der Anteil der männlichen Teilnehmer beläuft sich auf 79%, wobei er mit 83% bei den Jüngeren etwas höher liegt als bei den Älteren mit 75%.

Die Teilnehmerzahl der KHK-freien Kontrollgruppe für die Ausgangsstudie beläuft sich auf 636. Die Teilnehmer sind mit einem durchschnittlichen Alter von 62 Jahren bei der Rekrutierung 8 Jahre älter als die der entsprechenden Fallgruppe. Diese Kontrollgruppe wird zu gleichen Teilen von Männern wie von Frauen gebildet.

Die MICK Kontrollstichprobe verfügt über 1079 Teilnehmer mit einem durchschnittlichen Alter von 57 Jahren, dieses liegt mit 6 Jahren unter dem der entsprechenden Fallgruppe. Die MICK Stichprobe besteht ausschließlich aus Diabetes-freien Männern.

Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tab. 5: Beschreibung der Stichproben

Stichproben- Charakterisierung	Ausgangsstudie		Replikationsstudie	
	Fall KHK <55 J.	Kontrolle KHK frei	Fall KHK 55-65 J.	Kontrolle MICK
Individuen	1096	636	1103	1079
männlich (%)	917 (83,7)	319 (50,2)	828 (75,1)	1079 (100)
weiblich (%)	179 (16,3)	317 (49,8)	275 (24,9)	0 (0)
Mittleres Alter bei Rekrutierung (SD)	54,2 (5,97)	62,2 (7,27)	63,3 (6,02)	57,0 (6,31)
Mittleres Alter bei Diagnose (SD)	48,2 (5,67)	-	57,0 (6,4)	-

J.=Jahre, SD=Standardabweichung

4.2 Einfluss von Risikofaktoren

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf den genetischen Untersuchungen, bei der eine abweichende Verteilung von Genvarianten zwischen den Erkrankten und den Kontrollen innerhalb des Interleukin-6-Pathways detektiert werden sollte. Um eine Assoziation zwischen Genvariante und Phänotyp herstellen zu können, muss unter anderem eine Stratifizierung aufgrund eines Confounding Bias ausgeschlossen werden. Dieser entsteht, wenn der genetische Unterschied in Wahrheit nicht mit dem Phänotyp der KHK assoziiert ist, sondern mit einem Risikofaktor, der wiederum mit der KHK einhergeht. Um diesen Fehler auszuschließen, wurde die logistische Regression angewendet, mit deren Hilfe die Einflüsse der Risikofaktoren adjustiert werden. Dabei wurden die fünf Faktoren Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Body Mass Index (BMI), Rauchen und das Geschlecht mit einbezogen. Wurde die MICK-Stichprobe für die Assoziationsanalyse verwendet, wurde nicht für Diabetes und das Geschlecht adjustiert, da die Abwesenheit von Diabetes und des weiblichen Geschlechts ein Einschlusskriterium dieser Kontroll-Stichprobe war.

4.2.1 Verteilung der Risikofaktoren innerhalb der Stichproben

Insgesamt zeigte sich, dass die klassischen Risikofaktoren der KHK auch in diesen Stichproben deutlich häufiger bei den KHK-Patienten anzutreffen sind als unter den Kontrollen. Bei der Datenerhebung der Risikofaktoren konnte eine Erfassungsquote

Ergebnisse

von mindestens 97,7% pro Stichprobe und Kategorie erzielt werden. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6: Risikofaktoren innerhalb der Stichproben

Risikofaktoren	Ausgangsstudie		Replikationsstudie	
	Fall KHK <55 J.	Kontrolle KHK frei	Fall KHK 55-65 J.	Kontrolle MICK
Individuen	1096	636	1103	1079
männlich (%)	917 (83,7)	319 (50,2)	828 (75,1)	1079 (100)
weiblich (%)	179 (16,3)	317 (49,8)	275 (24,9)	0 (0)
Raucher (%)	869 (81,1)	324 (51,0)	754 (68,7)	190 (17,7)
Diabetes mellitus (%)	196(18,1)	31 (4,9)	218 (19,8)	0 (0)
Bluthochdruck * (%)	786 (73,2)	276 (43,5)	830 (75,7)	607 (56,3)
BMI ≥ 30 (%)	323 (30,1)	95 (15,0)	275 (25,3)	200 (18,6)

*Bluthochdruck ≥140mmHg systolisch oder ≥90mmHg diastolisch, J.=Jahre, BMI= Body Mass Index

Von den Fällen mit einem Alter bei der Herzkatheteruntersuchung von unter 55 Jahren haben 81,1% jemals geraucht. Dies wurde definiert durch einen Tabakkonsum von mindestens fünf Zigaretten täglich über einen Zeitraum von mindestens zwei Jahren. Bei der älteren KHK Stichprobe beträgt der Anteil der Raucher 68,7%. Im Vergleich zu den Kontrollen mit 51% und 17,7% liegt der Anteil der Raucher bei den Erkrankten deutlich höher. Ein nachgewiesener Diabetes mellitus besteht bei 18,1 und 19,8% der KHK Patienten im Gegensatz zu einem Vorkommen von 4,9% bei der Kontrolle. Bei der MICK Kontroll-Stichprobe gehörte die Abwesenheit einer Diabetes Erkrankung zum Einschlusskriterium. Ein erhöhter Blutdruck, definiert durch einen systolischen Wert ≥140mmHg oder einen diastolischen ≥90mmHg, trat ebenfalls gehäuft innerhalb der KHK Stichproben auf, bei den jüngeren mit 73,2%, bei den älteren mit 75,7%. Die Kontroll Stichproben zeigten mit 43,5% und 56,3% im Durchschnitt niedrigere Werte. Deutlich wird auch ein häufigeres Vorkommen der Adipositas mit einem BMI von ≥30 unter den Erkrankten, bei denen 25% bis nahezu 30% unter Fettleibigkeit leiden. Unter den Kontrollen liegt sie mit einem Anteil von 15% und 18,6% eindeutig niedriger.

4.3 Primäre Assoziationsstudie

In der primären Studie wurden 73 tagging SNPs aus zwölf Genen des Interleukin-6-Pathways auf Assoziation untersucht. Als Stichproben dienten die jüngere KHK Stichprobe mit einem Alter bei der Herzkatheteruntersuchung von unter 55 Jahren (1096 Fälle) und eine populationsrepräsentative Kontrollstichprobe (636 Kontrollen). Eine erfolgreiche Genotypisierung konnte bei 1086 Fällen und 631 Kontrollen durchgeführt werden. Diese Anzahl wurde jeweils als Grundlage zur weiteren Auswertung verwendet.

Alle 73 SNPs erreichten eine Call rate von $\geq 95\%$ und ein $P_{HWE} > 0,01$. Es konnten allerdings nur 70 SNPs allen Qualitätskriterien Stand halten (Minor allele frequency $\text{minAF} > 5\%$; $P_{HWE} > 0,01$; Call rate $\geq 95\%$). Drei SNPs (IL6_rs2069843, IL6_rs2069860, IL6ST_rs11574780) erreichten nicht die erforderliche Allelfrequenz des selteneren Allels. Eine Tabelle dieser Daten befindet sich im Anhang (Tabelle 14).

Die Berechnung der Wahrscheinlichkeit, mit der das seltenere Allel den Phänotyp beeinflusst, wurde sowohl mit dem dominanten, dem additiven als auch dem rezessiven genetischen Modell durchgeführt mit einer p-Berechnung nach Wald. Das dominante Modell beschreibt, ob das Vorkommen der Genotypen 22 wie auch 12 gegenüber 11 dominant ist und den Phänotyp zum Ausdruck bringt. Beim additiven Modell ist der Effekt eines jeweiligen Allels additiv auf den Phänotyp. Das heißt zwei Risikoallele zeigen einen deutlicheren Effekt als ein Allel, das sich aber auch im Phänotyp bemerkbar macht. Im rezessiven Modell hingegen zeigt sich ein Effekt nur bei homozygoten Trägern des Risikoallels, wobei der Genotyp 12 keinen Phänotyp zeigt.

Bei vier SNPs ließ sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung des häufigeren und selteneren Allels bei der Fallgruppe gegenüber der Kontrollgruppe mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ berechnen, das eine Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp vermuten lassen könnte, siehe hierzu Tabelle 7.

Beim SNP rs6928 des MAPK1 Gens ist das seltenere Allel 2 (hier G-Allel) sowohl bei den homozygoten als auch den heterozygoten Trägern mit dem Phänotyp der KHK assoziiert mit einer Erhöhung des Risikos um den Faktor 1,41 (95% CI 1,13-1,77) gegenüber dem häufigeren Allel 1 (hier: C-Allel). Dies geht einher mit höheren Fre-

Ergebnisse

quenzen der Anzahl der 22 und 12 Träger unter den Fällen (0,27 und 0,504) gegenüber den Kontrollen (0,254 und 0,457), siehe hierzu Tabelle 8.

Die anderen SNPs des MAPK 1 Gens hingegen haben ein $OR < 1$ (95% CI 0,70-1,05). Entsprechend ist die Rate der Träger des 22 Allels unter den Kontrollen höher als unter den Fällen (bei rs9340 0,192 gegenüber 0,153 bei den Fällen). Der Effekt des seltenen Allels ist zudem rezessiv gegenüber dem des häufigen Allels.

Tab. 7: Primäre Studie: Vier signifikante SNPs mit den Berechnungen nach dem dominanten, additiven und rezessiven Modell mit jeweils p nach Wald, Odds Ratio und 95%-CI (=95% Konfidenzintervall)

Gen mit SNP	dominant		additiv		rezessiv	
	p	OR (95-CI)	p	OR (95-CI)	p	OR (95-CI)
MAPK1_rs6928	0,0026	1.41 (1.13-1.77)	0,0190	1.18 (1.03-1.35)	0,3940	1.10 (0.88-1.38)
MAPK1_rs9340	0,1440	0.86 (0.70-1.05)	0,0336	0.86 (0.75-0.99)	0,0353	0.76 (0.59-0.98)
MAPK1_rs11913721	0,1390	0.86 (0.70-1.05)	0,0321	0.86 (0.75-0.99)	0,0344	0.76 (0.58-0.98)
PIK3R1_rs7713645	0,2210	0.87 (0.69-1.09)	0,5990	1.04 (0.90-1.19)	0,0320	1.30 (1.02-1.65)

Tab. 8: Primäre Studie: Vier signifikante SNPs mit der Anzahl (N) sowie den Frequenzen (F) der Genotypen 11, 12 und 22 bei Kontrollen (co) und Fällen (ca), 1 ist dabei das häufigere, 2 das seltenere Allel

Gen mit SNP	Nco	Nca	n11co	n11ca	n12co	n12ca	n22co	n22ca	F22co	F12co	F22ca	F12ca
MAPK1_rs6928	630	1082	182	245	288	545	160	292	0,254	0,457	0,27	0,504
MAPK1_rs9340	630	1071	214	395	295	512	121	164	0,192	0,468	0,153	0,478
MAPK1_rs11913721	631	1075	214	396	296	514	121	165	0,192	0,469	0,153	0,478
PIK3R1_rs7713645	631	1072	155	293	347	510	129	269	0,204	0,55	0,251	0,476

Geht man von einer Normalverteilung der Allelfrequenzen innerhalb der 73 Tests aus, kann man bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ eine Anzahl von 3 bis 4 Tests erwarten, die statistisch abweichen und damit keine echte Assoziation anzeigen. Die Korrektur auf multiples Testen nach Bonferroni fordert bei 73 Einzeltests ein Signifikanzniveau von 0,0007, um die Irrtumswahrscheinlichkeit anzupassen. Nur ein SNP (MAPK1_rs6928) reicht bis auf eine Zehnerpotenz mit einem p von 0,0026 an dieses Kriterium heran. Aufgrund der zahlreichen Einzeltests ist es formal nach Bonferroni als nicht signifikant assoziiert zu sehen. Es liegt im MAP-Kinase-1 Gen, das interessanterweise außerdem flankierend zwei weitere zunächst signifikante

Ergebnisse

SNPs beinhaltet (rs9340 und rs11913721). Dieser am stärksten assoziierte SNP (MAPK1_rs6928) wurde in einer zweiten unabhängigen Fall-Kontroll-Population auf eine Bestätigung des Assoziationssignals hin untersucht.

rs7713645 zeigte sich zunächst auch signifikant und liegt vereinzelt im PIK3R1 Gen. Eine komplette Liste der Statistik aller SNPs befindet sich im Anhang (Tabelle 15 und 16).

4.3.1 Adjustierung des primären Ansatzes auf Risikofaktoren

Um einen Confounding Bias auszuschließen, müssen die Ergebnisse der primären Studie auf Risikofaktoren der KHK mit Hilfe der logistischen Regression adjustiert werden. Dabei wurden fünf Faktoren miteinbezogen: Diabetes mellitus, Bluthochdruck, BMI, Rauchen und das Geschlecht. Auch nach Adjustierung blieben die Ergebnisse für die drei SNPs im MAP-Kinase-1-Gen konstant signifikant, wobei der signifikanteste (rs6928) eine Zehnerpotenz an Signifikanz verlor, wie in Tabelle 9 nachzulesen ist. Der genetische Effekt blieb konstant. Der SNP im PIK3R1-Gen hingegen wies nach Adjustierung keine Signifikanz mehr auf. Zusätzlich zeigten sich zwei weitere SNP Assoziationen, eines im MAP-Kinase-14-Gen (rs7757672) und eines im Janus-Kinase-1-Gen (rs310236), die Frequenzen sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Statistik für die Adjustierung aller SNPs ist im Anhang zu finden (Tabelle 17).

Tab. 9: Primäre Studie: Signifikante SNPs mit den Berechnungen nach dem dominanten, additiven und rezessiven Modell mit jeweils p nach Wald, Odds Ratio und 95%-CI (=95% Konfidenzintervall) nach Adjustierung auf die Risikofaktoren Diabetes mellitus, Bluthochdruck, BMI, Rauchen und das Geschlecht

Gen mit SNP	dominant		additiv		rezessiv	
	p	OR (95-CI)	p	OR (95-CI)	p	OR (95-CI)
MAPK1_rs6928	0,0217	1.36 (1.05-1.77)	0,0369	1.19 (1.01-1.40)	0,2546	1.17 (0.90-1.52)
MAPK1_rs9340	0,1052	0.82 (0.64-1.04)	0,0158	0.82 (0.69-0.96)	0,0147	0.69 (0.51-0.93)
MAPK1_rs11913721	0,1006	0.82 (0.64-1.04)	0,0150	0.82 (0.69-0.96)	0,0142	0.68 (0.51-0.93)
MAPK14_rs7757672	0,2514	0.79 (0.52-1.18)	0,1490	1.14 (0.95-1.36)	0,0118	1.35 (1.07-1.70)
JAK1_rs310236	0,1620	1.29 (0.90-1.84)	0,0468	1.19 (1.00-1.42)	0,0751	1.24 (0.98-1.56)
PIK3R1_rs7713645	0,0628	0.78 (0.60-1.01)	0,7331	0.97 (0.83-1.15)	0,1677	1.21 (0.92-1.60)

Ergebnisse

Tab. 10: Primäre Studie: Weitere zwei signifikante SNPs nach der Adjustierung mit der Anzahl (N) sowie den Frequenzen (F) der Genotypen 11, 12 und 22 bei Kontrollen (co) und Fällen (ca), 1 ist dabei das häufigere, 2 das seltenere Allel

Gen mit SNP	Nco	Nca	n11co	n11ca	n12co	n12ca	n22co	n22ca	F22co	F12co	F22ca	F12ca
MAPK14_rs7757672	631	1075	285	535	294	441	52	99	0,082	0,466	0,092	0,41
JAK1_rs310236	630	1068	256	473	294	477	80	118	0,127	0,467	0,11	0,447

4.4 Replikation in einer weiteren unabhängigen Analysepopulation

Um das Ergebnis der primären Studie zu bestätigen wurde der signifikanteste SNP (MAPK1_rs6928) in einer weiteren unabhängigen Stichprobe repliziert. Dazu diente als Fallstichprobe die ältere KHK Stichprobe mit einem Alter bei der Herzkatheteruntersuchung von 55-65 Jahren (1103 Fälle) und die MICK-Stichprobe als Kontrollgruppe (1079 Kontrollen). Eine erfolgreiche Genotypisierung konnte bei allen Fällen und bei 1001 Kontrollen durchgeführt werden. Alle drei Qualitätskriterien konnten eingehalten werden ($CR \geq 95\%$, $P_{HWE} > 0,01$, $minAF > 5\%$), wie im Anhang einzusehen ist (Tabelle 18).

In dieser Replikationsstudie zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp. Die zuvor signifikante Assoziation ließ sich nicht replizieren (siehe Tabelle 11). Zusätzlich spricht eine annähernd gleiche Verteilung der Genotypfrequenzen zwischen den Kontrollen und den Fällen für keinen genetischen Einfluss dieses SNPs auf das Erkrankungsrisiko (siehe Tabelle 12).

Tab. 11: Replikationsstudie: Assoziationsstatistik für SNP rs6928 mit den Berechnungen nach dem dominanten, additiven und rezessiven Modell mit jeweils p nach Wald, Odds Ratio und 95%-CI (=95% Konfidenzintervall)

Gen mit SNP	dominant		additiv		rezessiv	
	p	OR (95-CI)	p	OR (95-CI)	p	OR (95-CI)
MAPK1_rs6928	0,458	0.93 (0.77-1.13)	0,434	0.95 (0.85-1.07)	0,591	0.95 (0.78-1.15)

Tab. 12: Replikationsstudie: Genotypen und Allelfrequenzen für SNP rs6928 mit der Anzahl (N) sowie den Frequenzen (F) der Genotypen 11, 12 und 22 bei Kontrollen (co) und Fällen (ca), 1 ist dabei das häufigere, 2 das seltenere Allel

Gen mit SNP	Nco	Nca	n11co	n11ca	n12co	n12ca	n22co	n22ca	F22co	F12co	F22ca	F12ca
MAPK1_rs6928	1001	1103	256	298	495	540	250	265	0,25	0,495	0,24	0,49

Ergebnisse

4.4.1 Adjustierung der Replikationsstudie auf Risikofaktoren

Die Replikationsstudie wurde mit Hilfe der logistischen Regression auf die Risikofaktoren Bluthochdruck, BMI und Rauchen adjustiert. Da als Einschlusskriterium für die MICK-Kontroll-Stichprobe die Abwesenheit einer Diabetes mellitus Erkrankung sowie des weiblichen Geschlechts bestand, verbietet sich die Adjustierung auf diese Risikofaktoren. Auch nach Adjustierung veränderten sich die statistischen Werte kaum gegenüber dem nicht adjustierten Ansatz. Der SNP rs6928 des MAPK1 Gens zeigte keine signifikante Assoziation mit der Erkrankung (siehe Tabelle 13).

Tab. 13: Replikationsstudie: Assoziationsstatistik für SNP rs6928 mit den Berechnungen nach dem dominanten, additiven und rezessiven Modell mit jeweils p nach Wald, Odds Ratio und 95%-CI (=95% Konfidenzintervall) nach Adjustierung auf Bluthochdruck, BMI und Rauchen

Gen mit SNP	dominant		additiv		rezessiv	
	p	OR (95-CI)	p	OR (95-CI)	p	OR (95-CI)
MAPK1_rs6928	0,657	0.95 (0.76-1.19)	0,590	0.96 (0.84-1.11)	0,662	0.95 (0.76-1.19)

5 Diskussion

Unter den 73 untersuchten SNPs des IL-6-Pathways konnte in der vorliegenden Arbeit keines mit der KHK assoziiert werden. Die Replikationsstudie konnte eine vorläufige Assoziation des SNP rs6928 im MAPK1 Gen nicht bestätigen.

5.1 Limitationen dieser Studie

Assoziationsstudien bergen zwei Fehler: den statistischen Fehler erster Ordnung (falsch positive Assoziation) und den Fehler zweiter Ordnung (übersehene Assoziation). Typ I Fehler werden durch Korrekturen auf multiples Testen, Adjustierung anderer Einflussgrößen (z.B. umwelt- oder verhaltensbedingte Risikofaktoren) und Replikation der Assoziationsbefunde in unabhängigen Stichproben versucht zu vermeiden. Typ II Fehler wirkt man mit einer Vergrößerung der Stichprobe zur Steigerung der Teststärke entgegen. Die am häufigsten zitierte Störgröße in populationsbasierten Assoziationsstudien ist allerdings die unentdeckte Populationsstratifizierung [Cardon und Palmer 2003, Khat et al. 2004]. Sie entsteht durch unbekannte Strukturen innerhalb einer Population, die eine Assoziation einer genetischen Variante mit einem Phänotyp verdecken können. Diese können bedingt sein durch verschiedene ethnische Herkünfte von Unterpopulationen, die einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund aufweisen, aber auch soziale Faktoren, als auch durch eine andere Altersstruktur oder Geschlechterverteilung. Um diesem Effekt entgegenzuwirken müssen die Fall- und Kontroll-Stichproben einen möglichst einheitlichen genetischen, geographischen und kulturellen Hintergrund haben.

Die verwendeten Stichproben bewiesen sich bislang als genetisch homogen und repräsentativ [Steffens et al. 2006, Krawczak et al. 2006, Schunkert et al. 2008, Trégouët et al. 2009, Coronary Artery Disease Consortium 2009].

Allerdings stellt beispielsweise das Ausschlusskriterium „Diabetes mellitus“ und „weibliches Geschlecht“ bei der MICK Stichprobe in Bezug auf deren Verwendung als Kontroll-Stichprobe für diese Studie eine Quelle einer möglichen Stratifizierung dar. Diese Kontrollstichprobe spiegelt aufgrund dieser beiden Ausschlusskriterien nicht den Bevölkerungsquerschnitt und ist nicht optimal gepaart zur KHK-Stichprobe

Diskussion

sondern auf Fehlen von Diabetes und weibliches Geschlecht selektiert. Daher lässt sich diese Kontrollpopulation nicht auf diese beiden KHK relevanten Risikofaktoren adjustieren. Hier könnte sich eine Populationsstratifizierung verbergen und damit das Ergebnis verzerren.

Zusätzlich ist der genetische Einfluss zwischen den beiden KHK Stichproben möglicherweise nicht identisch, da sie sich durch das Manifestationsalter der KHK unterscheiden. Bei früher Manifestation einer Erkrankung spielt der genetische Hintergrund als Risikofaktor wahrscheinlich eine größere Rolle als bei älteren Patienten, wo die üblichen Risikofaktoren bereits über einen längeren Zeitraum ihren negativen Einfluss ausgeübt haben. Der Rückgang der Allelfrequenzen des Risikoallels bei der älteren KHK Stichprobe gegenüber der jüngeren stützt diese Annahme. Auch hier wäre eine andere unabhängige Fall-Stichprobe mit gleichem Alter beim ersten Auftreten der Krankheit zur Überprüfung der Hypothese sinnvoll.

5.2 Genetische Relevanz der Signaltransduktionskaskade bei der KHK

Vorangegangene Studien über einzelne Einheiten der Signaltransduktionskaskade zeigten Zusammenhänge mit der KHK, die auf eine pathophysiologische Relevanz schließen lassen können. Zum einen aktiviert Angiotensin II, das eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der KHK spielt, den JAK/STAT Pathway [Daugherty et al. 2004] zum anderen wurde SOCS-3 in atherosklerotischen Läsionen als negativer Regulator nachgewiesen [Tang et al. 2005].

Die Entdeckung des IL-6 -174 G/C Promotor Polymorphismus, der mit erhöhten IL-6 Plasmaspiegeln und einer vermehrten IL-6 Antwort auf Stressfaktoren assoziiert ist [Fishman D et al. 1998], rückte IL-6 in den Fokus der Kandidatengene. Bittar et al. zeigte in einer Studie die klinische Relevanz dieser Erkenntnisse für die koronare Herzerkrankung: es wurde die Prognose nach einer operativen Revaskularisation bei KHK mit dem oben genannten Polymorphismus der Promotorregion des IL-6 Gens (-174G/C) korreliert. Die Ergebnisse legten dar, dass das C-Allel mit erhöhten IL-6 Werten und einem schlechteren Outcome nach einer operativen Revaskularisation assoziiert ist [Bittar et al. 2005].

Diskussion

Die vorliegende Studie verfolgte einen multigenetischen Ansatz, um systematisch eine Assoziation zwischen einer Vielzahl von Polymorphismen im IL-6 Signaltransduktionsweg und der KHK zu untersuchen. Erstmals wurde für die Atherosklerose die Signaltransduktionskaskade von IL-6 in einer genetischen Assoziationsanalyse untersucht.

5.2.1 Kandidatengene bei der KHK

Viele Studien der jüngeren Zeit haben sich mit Kandidatengen zur Erforschung der genetischen Ursachen der KHK beschäftigt. Sie stehen vor allem in Zusammenhang mit veränderten Serumwerten von Lipiden, Einflussgrößen des Gerinnungssystems und der Entzündungskaskade wie CRP und IL-6. Einige dieser Kandidatengene haben sich bereits als signifikante Risikofaktoren erwiesen. Allerdings ist hervorzuheben, dass bei all diesen genetischen Risikofaktoren aus Kandidatengenstudien eine konsistente Replikation bisher ausgeblieben ist [Casas et al. 2006, Morgan et al. 2007].

Es konnte aber nachgewiesen werden, dass herkömmliche Risikofaktoren zusammen mit genetischen Prädispositionen im IL-6 Gen das Risiko, an einer KHK zu erkranken erhöhen [Humphries et al. 2007].

Bei relativ wenig untersuchten Varianten (Kandidatengen) und einer großen Kohorte gewährleistet eine daraus resultierende ausreichende Teststärke (statistische Power) die Identifizierung auch von selteneren Varianten mit geringerem Effekt. Als Nachteil hat sich die andererseits daraus resultierende schlechte Reproduzierbarkeit erwiesen. Trotz der genomweiten Assoziationsanalysen sind daher Kandidatengen-Assoziationsstudien weiterhin notwendig, um seltene Varianten aufzuspüren.

5.2.2 Genomweite Assoziationsanalysen als neuer Ansatz

In den letzten zwei Jahren rückte ein anderes Verfahren bei der Assoziation von Genen und Phänotypen in den Vordergrund. Es wurden weniger gezielt Regionen der Kandidatengene analysiert sondern das gesamte Genom mittels ausgewählter SNPs auf Assoziationen geprüft. Dies wurde erst möglich durch die Etablierung von Genchips, die 100.000 bis 1.000.000 SNPs gleichzeitig darstellen können. Diese SNPs werden nach dem Kriterium der Lage innerhalb des Genoms ausgewählt, um mög-

Diskussion

lichst eine breite Abdeckung zu erzielen. Sie können aber nur als Anhaltspunkte für die variable Region gelten. Bei aussagekräftigen Varianten, die eine Assoziation vermuten lassen, muss die Gen Region näher betrachtet werden und eine Genotypisierung folgen. Hierin liegt eine Limitation des Verfahrens.

In den jüngst veröffentlichten genomweiten Assoziationsstudien erwiesen sich einige SNPs als signifikant in Assoziation zur KHK. Keines dieser relevanten Varianten lag jedoch in einem Gen der Entzündungskaskade (siehe auch 1.3).

Dieser Ansatz eröffnet die Möglichkeit, neue Loci zu entdecken unabhängig von ihrem codierenden Inhalt. Somit können Gene in Assoziation gebracht werden, die zuvor keine Berücksichtigung fanden und somit neue Hinweise auf mögliche Pathomechanismen geben. Auf der anderen Seite ist die Abdeckung der potentiellen Risikogene unvollständig. Die enorm hohe Anzahl untersuchter Varianten setzt zusätzlich aufgrund der Notwendigkeit auf Korrektur tausender Einzeltests eine größere Signifikanz der einzelnen Variante zur Identifikation voraus wodurch seltener, aber relevante Varianten nicht detektiert werden. Dem kann nur entgegen gewirkt werden durch eine ebenso massive Vergrößerung der Stichproben mit entsprechender Steigerung der Teststärke. Dies stellt derzeit das größte Problem dar und erschwert dadurch ebenso die konsistente Replikation der bisherigen Ergebnisse.

Die vorliegende Studie als Kandidatengen Assoziationsstudie verfolgte grundsätzlich den klassischen Ansatz. Ausgangspunkt der Analyse war eine Auswahl von tagging SNPs des IL-6 Pathways. Sie schloss somit auch SNPs ein, die keine Berücksichtigung auf den Genchips fanden. Zusammenfassend konnte dabei jedoch keine signifikante Assoziation mit der KHK nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der genomweiten Assoziationsstudien, die ebenfalls keine relevanten Polymorphismen im Bereich von Immungenen nachweisen konnten.

5.3 Ausblick

Die koronare Herzerkrankung muss als ein sehr komplexes Krankheitsbild verstanden werden, bei der insbesondere die Kombination zwischen einer spezifischen genetischen Prädisposition, Umweltfaktoren und deren Interaktionen ein erhebliches

Diskussion

und individuelles Risiko darstellt, an ihr zu erkranken [Stephens und Humphries 2003].

Die zunehmende Erforschung von genetischen Risikofaktoren eröffnet neue Blickwinkel auf die Pathophysiologie der Erkrankung. So werden einzelne Risikogene in einen neuen Kontext gesetzt und tragen zum besseren Verständnis der Genese der Erkrankung bei. Die vollständige ätiologische Klärung der koronaren Herzerkrankung ist aus verschiedenen Gesichtspunkten von grundlegender Bedeutung. Sie bietet Ansatzpunkte zur Primär-, Sekundär- und Tertiärprävention der KHK, eröffnet aber auch neue therapeutische und pharmakologische Perspektiven.

Diese Studie bietet die Basis für weitere Untersuchungen auf dem Themengebiet der genetischen Grundlagen der koronaren Herzerkrankung. Wir konnten unter Durchführung der Haplotypenanalyse innerhalb verschiedener Gene des IL-6-Pathways nachweisen, dass keiner der hier untersuchten SNPs für eine Zunahme des Risikos an einer KHK zu erkranken, verantwortlich ist. Um eine noch immer unvollständige SNP-Abdeckung der genomweiten Assoziationsanalysen zu schließen, wird es weiterhin erforderlich sein, Kandidatengen Studien durchzuführen, wie in dieser Arbeit vorgelegt. Desweiteren rücken auch Untersuchungen von Gen-Gen-Interaktion wie auch Gen-Umwelt-Interaktionen in den Fokus der humanmedizinischen genetischen Forschung.

6 Zusammenfassung

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist gemessen an der Morbidität und der Mortalität eine der wichtigsten Erkrankungen der industrialisierten Gesellschaft der heutigen Zeit. Die Genese ist multifaktoriell, neben bekannten Risikofaktoren besteht auch eine wesentliche erbliche, polygene Komponente, die zur Entstehung der Erkrankung beiträgt. Bisher wurden zahlreiche genetische Faktoren in Kandidatengenstudien ausfindig gemacht, die jeweils aber nur einen sehr kleinen Risikozuwachs bedingen. Die Inflammation und die Entzündungsmediatoren sind von entscheidender Relevanz in der Pathogenese der KHK. Studien zeigten, dass der Entzündungsmediator Interleukin-6 (IL-6) eine zentrale Rolle in verschiedenen Krankheitsstadien spielt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der IL-6 Signaltransduktionsweg als Ganzes betrachtet. In einer groß angelegten populationsbasierten Fall-Kontroll-Assoziationsstudie wurden 73 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) aus zwölf Kandidatengen des IL-6 Signaltransduktionsweges untersucht. Dies geschah zunächst in einer explorativen Studie mit einer 1.096 Fälle umfassenden jüngeren KHK Stichprobe (Krankheitsbeginn vor dem 55. Lebensjahr) im Vergleich zu einer 636 Individuen umfassenden gesunden und ethnisch gepaarten Kontrollstichprobe. Im zweiten Schritt wurde die Assoziation eines potentiell assoziierten SNP in einer Replikationsstudie getestet. Diese beinhaltete eine ältere KHK Stichprobe von 1.103 Personen (Krankheitsbeginn mit 55-65 Jahren) und eine weitere unabhängige 1.079 Personen umfassende Kontrollstichprobe („Metabolische Interventions Kohorte Kiel“). Die Genotypisierung erfolgte mittels der SNPlex und TaqMan Technologie. Beide Ansätze wurden soweit möglich auf die KHK relevanten Risikofaktoren Rauchen, Gewicht, Bluthochdruck, Diabetes und Geschlecht mittels logistischer Regression adjustiert.

In der primären Studie wurden Assoziationen von drei SNPs innerhalb des Gens MAPK1 (Mitogen activated protein kinase 1) identifiziert, mit SNP rs6928 als am stärksten assoziiert ($p=0,0026$ OR=1,41 95% CI 1,13-1,77). Diese Assoziationen waren vor und nach Adjustierung um die Risikofaktoren signifikant. Die Assoziation des am stärksten assoziierten SNP rs6928 wurde in unabhängigen Stichproben repliziert. In der Replikation konnte die Assoziation der explorativen Studie nicht bestätigt werden.

Zusammenfassung

Die in jüngster Zeit durchgeführten genomweiten Assoziationsanalysen haben Assoziationen von genetischen Varianten mit der KHK identifizieren können. Unser Befund passt in den Gesamtkontext des derzeitigen Wissensstandes. Ein Positivbefund in einem Gen der untersuchten Entzündungskaskade konnte bisher auch in anderen Studien nicht bestätigt werden. Die vollständige ätiologische Klärung der koronaren Herzerkrankung ist nach wie vor von grundlegender Bedeutung, um effektive Ansatzpunkte zur Prävention der KHK wie neue therapeutische und pharmakologische Perspektiven zu eröffnen.

Das Manuskript für die Veröffentlichung mit dem Titel „No genetic risk factors in key genes within the Interleukin 6 pathway in large european population of coronary heart disease.“ befindet sich in Vorbereitung.

7 Literaturverzeichnis

Afonina I, Zivarts M, Kutyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer RB. **Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder.** Nucleic Acids Res 1997; 25(13): 2657-60.

Ahn SJ, Costa J, Emanuel JR. **PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR.** Nucleic Acids Res 1996; 24(13): 2623-2625.

Alexander WS, Hilton DJ. **The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response.** Annu Rev Immunol 2004; 22: 503-29.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. **Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps.** Bioinformatics 2005; 21 (2): 263-265.

Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuzzi AG, Ciliberto G, Maseri A. **Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina.** Circulation 1996; 94: 874-877.

Bittar MN, Carev JA, Varnard J, Fildes JE, Pravica V, Yonan N, Hutchinson IV. **Interleukin 6 G-174C polymorphism influences outcome following coronary revascularization surgery.** Heart Surg Forum 2005; 8(3): E140-145.

Boer JM, Feskens EJ, Verschuren WM, Seidell JC, Kromhout D. **The joint impact of family history of myocardial infarction and other risk factors on 12-year coronary heart disease mortality.** Epidemiology 1999; 10(6): 767-770.

Cardon LR und Palmer LJ. **Population stratification and spurious allelic association.** Lancet 2003; 361(9357): 598-604.

Casas JP, Cooper J, Miller GJ, Hingorani AD, Humphries SE. **Investigating the genetic determinants of cardiovascular disease using candidate genes and meta-analysis of association studies.** Ann Hum Genet 2006; 70(Pt 2): 145-169.

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

Coronary Artery Disease Consortium. **Large scale association analysis of novel genetic loci for coronary artery disease.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009; 29: 774-780.

Daugherty A, Cassis L. **Angiotensin II-mediated development of vascular diseases.** Trends Cardiovasc Med 2004; 14(3): 117-20.

Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, Sun Z, Zong Q, Du Y, Du J, Driscoll M, Song W, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS. **Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification.** Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99(8): 5261-5266.

Literaturverzeichnis

Erdmann J, Grosshennig A, Braund PS, König IR, Hengstenberg C, Hall AS, Linsel-Nitschke P, Kathiresan S, Wright B, Trégouët DA, Cambien F, Bruse P, Aherrahrou Z, Wagner AK, Stark K, Schwartz SM, Salomaa V, Elosua R, Melander O, Voight BF, O'Donnell CJ, Peltonen L, Siscovick DS, Altshuler D, Merlini PA, Peyvandi F, Bernardinelli L, Ardissino D, Schillert A, Blankenberg S, Zeller T, Wild P, Schwarz DF, Tiret L, Perret C, Schreiber S, El Mokhtari NE, Schäfer A, März W, Renner W, Bugert P, Klüter H, Schrezenmeir J, Rubin D, Ball SG, Balmforth AJ, Wichmann HE, Meitinger T, Fischer M, Meisinger C, Baumert J, Peters A, Ouwehand WH; Italian Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Working Group; Myocardial Infarction Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium; Cardiogenics Consortium, Deloukas P, Thompson JR, Ziegler A, Samani NJ, Schunkert H. **New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3.** Nat Genet 2009; 41(3): 280-2.

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. **The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on the IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis.** J Clin Invest 1998; 102: 1369-1376.

Freudenberg J, Cichon S, Nöthen MM, Propping P. **Blockstruktur des menschlichen Genoms.** Deutsches Ärzteblatt 2002; 47: 3190-33195.

Georges JL, Loukaci V, Poirier O, Evans A, Luc G, Arveiler D, Ruidavets JB, Cambien F, Tiret L. **Interleukin-6 gene polymorphisms and susceptibility to myocardial infarction: the ECTIM study.** J Mol Med 2001; 79: 300-305.

Guillo C, Ferrance JP, Landers JP. **Use of a capillary electrophoresis instrument with laser-induced fluorescence detection for DNA quantitation. Comparison of YO-PRO-1 and PicoGreen assays.** J Chromatogr A 2006; 1113(1-2): 239-243.

Hampe J, Wollstein A, Lu T. **An integrated system for high throughput Taqman based SNP genotyping.** Bioinformatics 2001; 17: 654-5.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. **Review Article. Principles of interleukin (IL) -6-type cytokine signalling and its regulation.** Biochem J 2003; 374: 1-20.

Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdóttir S, Blondal T, Jonasdóttir A, Jonasdóttir A, Sigurdsson A, Baker A, Palsson A, Masson G, Gudbjartsson DF, Magnusson KP, Andersen K, Levey AI, Backman VM, Matthiasdóttir S, Jonsdóttir T, Palsson S, Einarsdóttir H, Gunnarsdóttir S, Gylfason A, Vaccarino V, Hooper WC, Reilly MP, Granger CB, Austin H, Rader DJ, Shah SH, Quyyumi AA, Gulcher JR, Thorgeirsson G, Thorsteinsdóttir U, Kong A, Stefansson K. **A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction.** Science 2007; 316(5830): 1491-3.

Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. **Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19(10): 2364-2367.

Literaturverzeichnis

Humphries SE, Cooper JA, Talmud PJ, Miller GJ. **Candidate gene genotypes, along with conventional risk factor assessment, improve estimation of coronary heart disease risk in healthy UK men.** Clin Chem 2007; 53(1): 8-16.

Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ. **The interleukin-6-174G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men.** Eur Heart J 2001; 22: 2243-2252.

Ikeda U. **Inflammation and coronary artery disease.** Current Vascular Pharmacology 2003; 1: 65-70.

Ikeda U, Ohkawa F, Seino Y, Yamamoto K, Hidaka Y, Kasahara T; Kawai T, Shimada K. **Serum interleukin 6 levels become elevated in acute myocardial infarction.** J Mol Cell Cardiol 1992; 24: 579-584.

Khlat M, Cazes MH, Génin E, Guiguet M. **Robustness of case-control studies of genetic factors to population stratification: magnitude of bias and type I error.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004; 13(10): 1660-1664.

Kim H, Baumann H. **Dual signaling role of the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in regulating expression of acute-phase plasma proteins by interleukin-6 cytokine receptors in hepatic cells.** Mol Cell Biol 1999; 19:5326-38.

Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. **Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges.** Gene 2002; 285: 1-24.

Krawczak M, Nikolaus S, von Eberstein H, Croucher PJ, El Mokhtari NE, Schreiber S. **PopGen: population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotype-phenotype relationships.** Community Genet 2006; 9(1): 55-61.

Kutyavin IV, Lukhtanov EA, Gamper HB, Meyer RB. **Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization.** Nucleic Acids Res. 1997; 25(18): 3718-23.

Larson MG, Atwood LD, Benjamin EJ, Cupples LA, D'Agostino RB Sr, Fox CS, Govindaraju DR, Guo CY, Heard-Costa NL, Hwang SJ, Murabito JM, Newton-Cheh C, O'Donnell CJ, Seshadri S, Vasan RS, Wang TJ, Wolf PA, Levy D. **Framingham Heart Study 100K project: genome-wide associations for cardiovascular disease outcomes.** BMC Med Genet 2007; 8 Suppl 1: S5.

Lee LG, Connell CR, Bloch W. **Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.** Nucleic Acids Res 1993; 21: 3761-6.

Lee KW, Hill JS, Walley KR, Frohlich JJ. **Relative value of multiple plasma biomarkers as risk factors for coronary artery disease and death in an angiographic cohort.** CMAJ 2006; 174: 461-466.

Libby P. **Inflammation in atherosclerosis.** Nature 2002; 420(6917): 868-874.

Literaturverzeichnis

Libby P. **Inflammation and cardiovascular disease mechanisms.** Am J Clin Nutr 2006; 83(suppl): 456S-60S.

Libby P, Ridker PM. **Inflammation and atherothrombosis. From population biology and bench research to clinical practice.** J Am Coll Cardiol 2006; 48: A33-46.

Lieb W, Pavlik R, Erdmann J, Mayer B, Holmer SR, Fischer M, Baessler A, Hengstenberg C, Loewel H, Doering A, Riegger GA, Schunkert H. **No association of interleukin-6 gene polymorphism (-174 G/C) with myocardial infarction or traditional cardiovascular risk factors.** Int J Cardiol 2004; 97: 205-212.

Livak KJ, Marmaro J, Todd JA. **Towards fully automated genome-wide polymorphism screening.** Nat Genet 1995; 9: 341-2.

Lovmar L, Syvänen AC. **Multiple displacement amplification to create a long-lasting source of DNA for genetic studies.** Hum Mutat 2006; 27(7): 603-614.

Mälärstig A, Wallentin L, Siegbahn A. **Genetic variation in the interleukin-6 gene in relation to risk and outcome in acute coronary syndrome.** Thromb Res 2007; 119(4): 467-473.

Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. **Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins.** N Engl J Med 1994; 330 (15): 1041-1046.

McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, Hinds DA, Pennacchio LA, Tybjaerg-Hansen A, Folsom AR, Boerwinkle E, Hobbs HH, Cohen JC. **A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease.** Science 2007; 316(5830): 1488-91.

Morgan TM, Krumholz HM, Lifton RP et al. **Nonvalidation of Reported Genetic Risk Factors for Acute Coronary Syndrome in a Large-Scale Replication Study.** JAMA 2007; 297(14): 1551-1561.

Mysliwska J, Wieckiewicz J, Hak L, Siebert J, Rogowski J, Szyndler K, Mysliwski A. **Interleukin 6 polymorphism corresponds to the number of severely stenosed coronary arteries.** Eur Cytokine Netw 2006; 17(3): 181-188.

Ott J. **A chi-square test to distinguish allelic association from other causes of phenotypic association between two loci.** Genet Epidemiol 1985; 2: 79-84.

Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, Lavery T, Kouyoumjian R, Farhadian SF, Ward R, Lander ES. **Linkage disequilibrium in the human genome.** Nature 2001; 411: 199-204.

Rengarajan K, Cristol SM, Mehta M, Nickerson JM. **Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores.** Mol Vis 2002; 8: 416-421.

Literaturverzeichnis

Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. **Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men.** *Circulation* 2000; 101: 1767-1772.

Rissanen AM. **Familial occurrence of coronary heart disease: effect of age at diagnosis.** *Am J Cardiol* 1979; 44(1): 60-66.

Rosamond W, Flagal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenland K, Hasse N, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell CJ, Roger V, Rumsfeld J, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Hong Y. **Heart disease and stroke statistics – 2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee.** *Circulation* 2007; 115: e69-e171.

Ross R, Glomset JA. **Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis.** *Science* 1973; 180(93): 1332-9.

Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, Dixon RJ, Meitinger T, Braund P, Wichmann HE, Barrett JH, König IR, Stevens SE, Szymczak S, Tregouet DA, Iles MM, Pahlke F, Pollard H, Lieb W, Cambien F, Fischer M, Ouwehand W, Blankenberg S, Balmforth AJ, Baessler A, Ball SG, Strom TM. **Genomewide association analysis of coronary artery disease.** *N Engl J Med* 2007; 357(5): 443-53.

Schunkert H, Götz A, Braund P, McGinnis R, Tregouet DA, Mangino M, Linsel-Nitschke P, Cambien F, Hengstenberg C, Stark K, Blankenberg S, Tiret L, Ducimetiere P, Keniry A, Ghorri MJ, Schreiber S, El Mokhtari NE, Hall AS, Dixon RJ, Goodall AH, Liptau H, Pollard H, Schwarz DF, Hothorn LA, Wichmann HE, König IR, Fischer M, Meisinger C, Ouwehand W, Deloukas P, Thompson JR, Erdmann J, Ziegler A, Samani NJ; Cardiogenics Consortium. **Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease.** *Circulation*. 2008; 117(13): 1675-84.

Sie MPS, Sayed-Tabatabaei FA, Oei HHS, Uitterlinden AG, Pols HAP, Hofman A, van Duijn CM, Witteman JCM. **Interleukin 6-174 G/C promoter polymorphism and risk of coronary heart disease: Results from the Rotterdam Study and a meta-analysis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 212-217.

Singer VL, Jones LJ, Yue ST, Haugland RP. **Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation.** *Anal Biochem* 1997; 249(2): 228-238.

Stephens JW, Humphries SE. **The molecular genetics of cardiovascular disease: clinical implications.** *J Intern Med* 2003; 253(2): 120-127.

Sturk A, Hack CE, Aarden LA, Brouwer M, Koster RR, Sanders GT. **Interleukin-6 release and the acute-phase reaction in patients with acute myocardial infarction: a pilot study.** *J Lab Clin Med* 1992; 119: 574-579.

Literaturverzeichnis

Suzuki T, Ishiwata S, Hasegawa K, Yamamoto K, Yamazaki T. **Raised interleukin 6 concentrations as a predictor of postangioplasty restenosis.** Heart 2000; 83: 5780.

Tang J, Kozaki K, Farr AG, Martin PJ, Lindahl P, Betsholtz C, Raines EW. **The absence of platelet-derived growth factor-B in circulating cells promotes immune and inflammatory responses in atherosclerosis-prone ApoE^{-/-} mice.** Am J Pathol 2005; 167: 901-912.

Terry CF, Loukaci V, Green FR. **Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation.** J Biol Chem 2000; 275: 18138-18144.

The International HapMap Consortium. **The international HapMap project.** Nature 2003; 426: 789-794.

The Wellcome Trust Case Control Consortium. **Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls.** Nature 2007; 447: 661-678.

von der Thüsen J, Kuiper J, van Berkel TJC, Biessen EAL. **Interleukins in atherosclerosis: Molecular pathways and therapeutic potential.** Pharmacol Rev 2003; 55: 133-166.

Tobler AR, Short S, Andersen MR, Paner TM, Briggs JC, Lambert SM, Wu PP, Wang Y, Spoonde AY, Koehler RT, Peyret N, Chen C, Broomer AJ, Ridzon DA, Zhou H, Hoo BS, Hayashibara KC, Leong LN, Ma CN, Rosenblum BB, Day JP, Ziegler JS, De La Vega FM, Rhodes MD, Hennessy KM, Wenz HM. **The SNPlex genotyping system: a flexible and scalable platform for SNP genotyping.** J Biomol Tech 2005; 16(4): 398-406.

Tréguët DA, König IR, Erdmann J, Munteanu A, Braund PS, Hall AS, Grosshennig A, Linsel-Nitschke P, Perret C, DeSuremain M, Meitinger T, Wright BJ, Preuss M, Balmforth AJ, Ball SG, Meisinger C, Germain C, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Morrison C, van der Harst P, Schreiber S, Neureuther K, Schäfer A, Bugert P, El Mokhtari NE, Schrezenmeir J, Stark K, Rubin D, Wichmann HE, Hengstenberg C, Ouwehand W; Wellcome Trust Case Control Consortium; Cardiogenics Consortium, Ziegler A, Tiret L, Thompson JR, Cambien F, Schunkert H, Samani NJ. **Genome-wide haplotype association study identifies the SLC22A3-LPAL2-LPA gene cluster as a risk locus for coronary artery disease.** Nat Genet 2009; 41(3): 283-5.

de la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH. **Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System.** Mutat Res 2005; 573(1-2): 111-135.

Wang N, Akey JM, Zhang K, Chakraborty R, Jin L. **Distribution of recombination crossovers and the origin of haplotype blocks: the interplay of population history, recombination, and mutation.** Am J Hum Genet 2002; 71: 1227-1234.

Literaturverzeichnis

Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. **A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium.** Am J Hum Genet 2005; 76: 887-93.

Xu J, Turner A, Little J, Bleecker ER, Meyers DA. **Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error?** Hum Genet 2002; 111: 573-4.

Anhang

8 Anhang

Tab. 14: Primäre Studie: 73 SNPs mit den Qualitätskriterien Call rate (CR), Chi-Quadrat-Test, Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE), Frequenz des selteneren Allels (minAF) bei Kontrollen (co) und Fällen (ca) sowie Anzahl (N) der Kontrollen (co) und Fälle (ca)

Gen mit SNP	Nco	Nca	CR	Chi Quadrat	HWE	minAF co	minAF ca
IL27RA_rs6511905	631	1070	0,99	0,064	0,07624	0,25	0,26
IL27RA_rs11881500	631	1071	0,99	0,161	0,26127	0,29	0,29
IL27RA_rs2306190	631	1082	1	0,096	0,10725	0,42	0,43
MAPK1_rs6928	630	1082	1	4,891	0,03372	0,48	0,52
MAPK1_rs9340	630	1071	0,99	3,814	0,28599	0,43	0,39
MAPK1_rs2298432	631	1073	0,99	1,186	0,05029	0,39	0,41
MAPK1_rs9610470	631	1084	1	3,096	0,66274	0,25	0,23
MAPK1_rs11913721	631	1075	0,99	3,759	0,30516	0,43	0,39
IL6_rs2069824	630	1084	1	0,004	0,07371	0,08	0,08
IL6_rs1800795	631	1073	0,99	0,127	0,75765	0,43	0,43
IL6_rs2069832	631	1073	0,99	0,318	0,67185	0,42	0,43
IL6_rs2069843	631	1084	1	0,862	0,68584	0,02	0,02
IL6_rs2069860	631	1083	1	2,041	0,93634	0	0,01
MAPK14_rs851034	631	1073	0,99	0,032	0,41542	0,29	0,29
MAPK14_rs851024	631	1081	1	0,037	0,01370	0,48	0,49
MAPK14_rs851023	631	1084	1	0,067	0,60019	0,14	0,14
MAPK14_rs2145362	631	1075	0,99	0	0,45840	0,11	0,11
MAPK14_rs851006	631	1075	0,99	0,029	0,75369	0,27	0,26
MAPK14_rs12200998	631	1073	0,99	0,112	0,01393	0,48	0,49
MAPK14_rs7757672	631	1075	0,99	1,24	0,04728	0,32	0,3
STAT3_rs2272087	628	1067	0,99	0,207	0,94257	0,16	0,17
STAT3_rs1053005	631	1074	0,99	0,493	0,53902	0,19	0,2
STAT3_rs2293152	631	1073	0,99	0,289	0,47555	0,41	0,4
STAT3_rs3816769	631	1081	1	0,528	0,86164	0,35	0,36
STAT3_rs9912773	631	1084	1	0,003	0,97479	0,26	0,26
STAT3_rs744166	630	1082	1	1,125	0,65562	0,41	0,43
IL6ST_rs10471960	631	1081	1	0,091	0,84802	0,12	0,12
IL6ST_rs1900173	631	1082	1	0,002	0,36753	0,08	0,07
IL6ST_rs11574780	631	1084	1	2,764	0,68436	0,05	0,04
IL6ST_rs7719246	631	1084	1	0,026	0,97708	0,13	0,13
IL6ST_rs10940495	631	1081	1	0,013	0,56887	0,27	0,28
IL6ST_rs6870870	630	1076	0,99	0,013	0,37390	0,41	0,41
JAK1_rs310244	631	1071	0,99	0,62	0,34303	0,25	0,24
JAK1_rs2780819	631	1076	1	1,643	0,75206	0,29	0,27
JAK1_rs188698	631	1083	1	1,769	0,69030	0,36	0,34
JAK1_rs310228	631	1074	0,99	0,761	0,36561	0,14	0,13
JAK1_rs2256298	631	1082	1	0,961	0,07016	0,28	0,27
JAK1_rs310236	630	1068	0,99	2,47	0,75673	0,36	0,33
JAK1_rs3790541	631	1077	1	1,771	0,82366	0,11	0,1
JAK1_rs310202	631	1080	1	1,175	0,40150	0,22	0,2
JAK1_rs310199	630	1073	0,99	1,13	0,80224	0,29	0,27
PIK3R1_rs40419	631	1079	1	0,072	0,22815	0,42	0,43
PIK3R1_rs706713	630	1083	1	0,031	0,64959	0,25	0,25

Anhang

PIK3R1_rs7713645	631	1072	0,99	0,282	0,01061	0,48	0,49
PIK3R1_rs34300	631	1075	0,99	0,679	0,44089	0,14	0,15
PIK3R1_rs10940160	631	1083	1	0,207	0,47535	0,46	0,46
PIK3R1_rs2161120	631	1078	1	0,093	0,44944	0,44	0,45
PIK3R1_rs10515074	631	1084	1	0,166	0,37010	0,21	0,21
PIK3R1_rs1819987	631	1079	1	0	0,82255	0,4	0,4
PIK3R1_rs34306	631	1082	1	0,605	0,45989	0,15	0,16
PIK3R1_rs1550805	631	1083	1	0,5	0,13588	0,09	0,1
PIK3R1_rs1445760	631	1081	1	0,876	0,76712	0,47	0,49
PIK3R1_rs1043526	631	1084	1	0,26	0,92041	0,14	0,14
PIK3R1_rs9291926	629	1072	0,99	0,187	0,59773	0,49	0,5
PIK3CG_rs4727666	631	1082	1	0,658	0,45670	0,18	0,19
PIK3CG_rs1526083	631	1072	0,99	1,409	0,77131	0,4	0,38
PIK3CG_rs849367	631	1084	1	0,005	0,48955	0,1	0,1
PIK3CG_rs4730205	631	1082	1	0,163	0,64249	0,31	0,32
PIK3CG_rs12667819	631	1081	1	1,367	0,73686	0,46	0,44
PIK3CG_rs849412	630	1083	1	0,013	0,37651	0,14	0,14
PTPN11_rs11066301	630	1080	1	0,085	0,27019	0,46	0,45
PTPN11_rs2301756	631	1082	1	3,34	0,25163	0,11	0,09
PTPN11_rs11066323	631	1076	1	0,496	0,98205	0,08	0,07
PTPN22_rs2476601	631	1083	1	1,255	0,37327	0,12	0,11
IL6R_rs952146	631	1075	0,99	3,38	0,57912	0,4	0,37
IL6R_rs4845618	631	1075	0,99	0,399	0,39740	0,44	0,45
IL6R_rs7549250	630	1083	1	0,285	0,58753	0,44	0,45
IL6R_rs7518199	631	1074	0,99	0,044	0,19928	0,39	0,39
IL6R_rs4845623	631	1076	1	0,038	0,08996	0,4	0,4
IL6R_rs4845374	631	1074	0,99	0,402	0,22482	0,17	0,16
IL6R_rs8192284	631	1082	1	0,311	0,23783	0,39	0,38
IL6R_rs2229238	631	1073	0,99	1,015	0,72261	0,19	0,2
IL6R_rs7526293	631	1075	0,99	1,687	0,44764	0,2	0,22

Anhang

Tab. 15: Primäre Studie: 73 SNPs mit den Berechnungen nach dem dominanten, additiven und rezessiven Modell mit jeweils p nach Wald, Odds Ratio und 95%-CI (=95% Konfidenzintervall)

Gen mit SNP	dominant		additiv		rezessiv	
	p	OR (95-CI)	p	OR (95-CI)	p	OR (95-CI)
IL27RA_rs6511905	0,3390	1.1016 (0.9037-1.3436)	0,6850	1.0332 (0.8828-1.2107)	0,3860	0.8456 (0.5804-1.2410)
IL27RA_rs11881500	0,6583	1.0811 (0.7619-1.5233)	0,6650	0.9669 (0.8297-1.1257)	0,4180	0.9219 (0.7571-1.1225)
IL27RA_rs2306190	0,5760	1.0743 (0.8342-1.3793)	0,6980	0.9728 (0.8460-1.1181)	0,2970	0.8954 (0.7278-1.1027)
MAPK1_rs6928	0,0026	1.4125 (1.1279-1.7674)	0,0190	1.1792 (1.0276-1.3539)	0,3940	1.1025 (0.8820-1.3814)
MAPK1_rs9340	0,1440	0.8573 (0.6968-1.0532)	0,0336	0.8588 (0.7462-0.9883)	0,0353	0.7573 (0.5850-0.9822)
MAPK1_rs2298432	0,9200	0.9638 (0.4569-1.9428)	0,4412	1.0808 (0.8859-1.3163)	0,3740	1.1052 (0.8857-1.3769)
MAPK1_rs9610470	0,4890	1.1615 (0.7550-1.7685)	0,0640	1.1663 (0.9907-1.3723)	0,0530	1.2173 (0.9973-1.4855)
MAPK1_rs11913721	0,1390	0.8556 (0.6956-1.0511)	0,0321	0.8577 (0.7452-0.9869)	0,0344	0.7563 (0.5843-0.9808)
IL6_rs2069824	0,0898	0.1685 (0.0092-0.8825)	0,9608	1.0063 (0.7803-1.2922)	0,6367	1.0663 (0.8153-1.3893)
IL6_rs1800795	0,6530	0.9439 (0.7321-1.2124)	0,6800	0.9711 (0.8445-1.1163)	0,8070	0.9742 (0.7906-1.2020)
IL6_rs2069832	0,6230	0.9386 (0.7275-1.2064)	0,5400	0.9572 (0.8323-1.1005)	0,6090	0.9469 (0.7686-1.1678)
IL6_rs2069843	0,1560	2.2287 (0.8048-7.8452)	0,1560	2.2287 (0.8048-7.8452)	NA	NA (NA)
IL6_rs2069860	NA	NA (NA)	NA	NA (NA)	NA	NA (NA)
MAPK14_rs851034	0,3766	1.1827 (0.8118-1.7114)	0,7191	1.0293 (0.8791-1.2044)	0,9900	0.9988 (0.8203-1.2162)
MAPK14_rs851024	0,2500	0.8755 (0.6971-1.0966)	0,8320	1.0154 (0.8819-1.1693)	0,1200	1.2080 (0.9536-1.5357)
MAPK14_rs851023	0,6190	1.1912 (0.5855-2.3587)	0,8544	0.9815 (0.8025-1.1973)	0,7160	0.9593 (0.7659-1.1989)
MAPK14_rs2145362	0,7350	1.0431 (0.8179-1.3345)	0,9930	1.0009 (0.7992-1.2578)	0,1900	0.5271 (0.1970-1.3854)
MAPK14_rs851006	0,9414	0.9859 (0.6711-1.4332)	0,9380	1.0063 (0.8601-1.1761)	0,8900	1.0139 (0.8320-1.2353)
MAPK14_rs12200998	0,2550	0.8769 (0.6983-1.0982)	0,7120	1.0268 (0.8925-1.1814)	0,0731	1.2415 (0.9815-1.5758)
MAPK14_rs7757672	0,4718	0.8789 (0.6146-1.2436)	0,2644	1.0905 (0.9363-1.2695)	0,0645	1.2045 (0.9890-1.4676)
STAT3_rs2272087	0,9300	1.0286 (0.5365-1.9132)	0,7838	0.9737 (0.8043-1.1765)	0,7340	0.9634 (0.7765-1.1934)
STAT3_rs1053005	0,3840	1.0961 (0.8922-1.3482)	0,5970	1.0487 (0.8796-1.2526)	0,5210	0.8458 (0.5094-1.4242)
STAT3_rs2293152	0,4593	1.1048 (0.8468-1.4367)	0,5530	1.0436 (0.9061-1.2017)	0,7720	1.0308 (0.8401-1.2662)
STAT3_rs3816769	0,7080	0.9445 (0.6984-1.2693)	0,4630	0.9468 (0.8180-1.0951)	0,4500	0.9260 (0.7587-1.1306)
STAT3_rs9912773	0,7440	1.0335 (0.8483-1.2596)	0,9840	0.9984 (0.8501-1.1737)	0,4650	0.8600 (0.5758-1.2964)
STAT3_rs744166	0,3680	0.8873 (0.6822-1.1489)	0,2810	0.9248 (0.8021-1.0657)	0,3880	0.9120 (0.7403-1.1246)
IL6ST_rs10471960	0,7230	0.9585 (0.7591-1.2133)	0,7400	0.9645 (0.7800-1.1958)	0,9720	0.9851 (0.4358-2.3579)

Anhang

IL6ST_rs1900173	0,8920	1.1319 (0.1488-6.8492)	0,9901	1.0017 (0.7633-1.3081)	0,9940	0.9989 (0.7549-1.3155)
IL6ST_rs11574780	0,1600	0.7786 (0.5500-1.1078)	0,1100	0.7574 (0.5391-1.0684)	0,9700	NA (NA)
IL6ST_rs7719246	0,8250	0.9745 (0.7758-1.2269)	0,8530	0.9807 (0.7993-1.2065)	0,9630	1.0180 (0.4889-2.2256)
IL6ST_rs10940495	0,4840	1.0730 (0.8810-1.3073)	0,8200	1.0185 (0.8706-1.1926)	0,4260	0.8592 (0.5927-1.2547)
IL6ST_rs6870870	0,3963	1.1212 (0.8591-1.4586)	0,9440	0.9949 (0.8626-1.1472)	0,4480	0.9233 (0.7517-1.1351)
JAK1_rs310244	0,7220	0.9645 (0.7903-1.1776)	0,5140	0.9478 (0.8072-1.1140)	0,3530	0.8255 (0.5523-1.2435)
JAK1_rs2780819	0,3616	1.1820 (0.8220-1.6886)	0,2413	1.0964 (0.9396-1.2786)	0,3170	1.1057 (0.9080-1.3464)
JAK1_rs188698	0,2400	0.8873 (0.7265-1.0829)	0,1980	0.9081 (0.7841-1.0520)	0,3850	0.8743 (0.6469-1.1872)
JAK1_rs310228	0,2060	1.5827 (0.7695-3.2381)	0,3788	1.0955 (0.8931-1.3412)	0,5580	1.0703 (0.8516-1.3426)
JAK1_rs2256298	0,1960	0.8782 (0.7211-1.0694)	0,3480	0.9269 (0.7911-1.0867)	0,7920	1.0547 (0.7137-1.5787)
JAK1_rs310236	0,3413	1.1586 (0.8534-1.5660)	0,1595	1.1112 (0.9593-1.2868)	0,1980	1.1400 (0.9339-1.3926)
JAK1_rs3790541	0,1160	0.8191 (0.6394-1.0517)	0,1670	0.8522 (0.6799-1.0706)	0,8360	1.1026 (0.4492-2.9481)
JAK1_rs310202	0,5715	0.8717 (0.5347-1.3903)	0,2791	1.0976 (0.9267-1.2987)	0,1220	1.1731 (0.9577-1.4363)
JAK1_rs310199	0,6042	1.1021 (0.7595-1.5866)	0,3370	1.0790 (0.9235-1.2599)	0,3470	1.0991 (0.9024-1.3386)
PIK3R1_rs40419	0,4810	0.9273 (0.7510-1.1432)	0,6880	1.0291 (0.8950-1.1836)	0,1150	1.2295 (0.9527-1.5944)
PIK3R1_rs706713	0,7480	1.0332 (0.8470-1.2609)	0,8630	1.0143 (0.8638-1.1926)	0,8240	0.9549 (0.6387-1.4443)
PIK3R1_rs7713645	0,2210	0.8684 (0.6920-1.0870)	0,5990	1.0382 (0.9029-1.1939)	0,0320	1.2961 (1.0242-1.6461)
PIK3R1_rs34300	0,1980	1.1587 (0.9268-1.4524)	0,3430	1.1027 (0.9023-1.3517)	0,4540	0.7635 (0.3783-1.5726)
PIK3R1_rs10940160	0,3350	0.8876 (0.6953-1.1293)	0,6720	0.9703 (0.8440-1.1154)	0,8320	1.0237 (0.8248-1.2727)
PIK3R1_rs2161120	0,6320	0.9491 (0.7657-1.1745)	0,8120	1.0170 (0.8847-1.1694)	0,3330	1.1300 (0.8837-1.4505)
PIK3R1_rs10515074	0,7610	0.9689 (0.7906-1.1885)	0,6730	0.9643 (0.8151-1.1425)	0,6430	0.8975 (0.5712-1.4290)
PIK3R1_rs1819987	0,7970	0.9654 (0.7364-1.2602)	0,9790	0.9981 (0.8667-1.1490)	0,8750	1.0165 (0.8293-1.2472)
PIK3R1_rs34306	0,8330	1.0685 (0.5672-1.9584)	0,3740	0.9169 (0.7561-1.1090)	0,2780	0.8864 (0.7121-1.1010)
PIK3R1_rs1550805	0,4190	1.1139 (0.8591-1.4508)	0,4560	1.0937 (0.8660-1.3884)	0,9450	1.0315 (0.4393-2.5953)
PIK3R1_rs1445760	0,3440	1.1130 (0.8910-1.3880)	0,3000	1.0772 (0.9360-1.2401)	0,4620	1.0928 (0.8637-1.3867)
PIK3R1_rs1043526	0,5860	0.9396 (0.7511-1.1775)	0,5450	0.9398 (0.7693-1.1506)	0,6750	0.8586 (0.4246- 1.7907)
PIK3R1_rs9291926	0,5450	1.0730 (0.8532-1.3468)	0,6240	1.0361 (0.8990-1.1944)	0,8510	1.0225 (0.8115-1.2914)
PIK3CG_rs4727666	0,4308	1.1140 (0.8500-1.4552)	0,2240	1.0914 (0.9478-1.2567)	0,2470	1.1279 (0.9204-1.3838)
PIK3CG_rs1526083	0,7600	0.9620 (0.7513-1.2357)	0,9980	1.0002 (0.7976-1.2590)	0,2670	1.7784 (0.6854-5.4903)

Anhang

PIK3CG_rs849367	0,4360	1.1016 (0.8625-1.4034)	0,2310	1.0882 (0.9475-1.2500)	0,2480	1.1341 (0.9170-1.4051)
PIK3CG_rs4730205	0,7920	1.0284 (0.8353-1.2678)	0,4370	1.0729 (0.8991-1.2831)	0,1100	1.5682 (0.9189-2.7934)
PIK3CG_rs12667819	0,9860	1.0017 (0.8214-1.2220)	0,7760	1.0231 (0.8750-1.1976)	0,5180	1.1333 (0.7800-1.6678)
PIK3CG_rs849412	0,9830	0.9979 (0.8190-1.2157)	0,6680	1.0330 (0.8906-1.1991)	0,3360	1.1749 (0.8498-1.6398)
PTPN11_rs11066301	0,9770	0.9968 (0.8042-1.2336)	0,7500	0.9778 (0.8520-1.1224)	0,6020	0.9383 (0.7396-1.1933)
PTPN11_rs2301756	0,1030	2.0915 (0.8610-5.2152)	0,0884	1.2158 (0.9699-1.5213)	0,1584	1.1945 (0.9319-1.5276)
PTPN11_rs11066323	0,9440	0.9569 (0.2498-3.1816)	0,3560	1.1295 (0.8704-1.4607)	0,3159	1.1518 (0.8720-1.5161)
PTPN22_rs2476601	0,5616	1.1129 (0.7719-1.5924)	0,5344	1.0501 (0.8996-1.2249)	0,6310	1.0497 (0.8611-1.2795)
IL6R_rs952146	0,0736	0.8306 (0.6773-1.0173)	0,0602	0.8736 (0.7587-1.0058)	0,2230	0.8458 (0.6467-1.1094)
IL6R_rs4845618	0,2790	0.8723 (0.6797-1.1153)	0,4570	0.9481 (0.8238-1.0908)	0,8490	0.9794 (0.7906-1.2150)
IL6R_rs7549250	0,3240	0.8824 (0.6866-1.1296)	0,5090	0.9539 (0.8292-1.0971)	0,8780	0.9835 (0.7952-1.2180)
IL6R_rs7518199	0,3710	0.9110 (0.7424-1.1167)	0,7760	0.9794 (0.8489-1.1303)	0,5060	1.0992 (0.8339-1.4565)
IL6R_rs4845623	0,2710	0.8908 (0.7244-1.0939)	0,8400	0.9854 (0.8546-1.1367)	0,2860	1.1610 (0.8849-1.5317)
IL6R_rs4845374	0,8550	1.0654 (0.5290-2.0762)	0,4464	1.0769 (0.8892-1.3023)	0,4300	1.0892 (0.8803-1.3460)
IL6R_rs8192284	0,2030	0.8759 (0.7139-1.0735)	0,5050	0.9525 (0.8256-1.0991)	0,6540	1.0658 (0.8082-1.4131)
IL6R_rs2229238	0,3160	1.1113 (0.9049-1.3667)	0,3160	1.0936 (0.9189-1.3041)	0,6600	1.1199 (0.6820-1.8836)
IL6R_rs7526293	0,1370	1.1676 (0.9524-1.4332)	0,1700	1.1272 (0.9507-1.3392)	0,7180	1.0907 (0.6858-1.7692)

Anhang

Tab. 16: Primäre Studie: 73 SNPs mit der Anzahl (N) sowie den Frequenzen (F) der Genotypen 11, 12 und 22 bei Kontrollen (co) und Fällen (ca), 1 ist dabei das häufigere, 2 das seltenere Allel

Gen mit SNP	Nco	Nca	n11co	n11ca	n12co	n12ca	n22co	n22ca	F22co	F12co	F22ca	F12ca
IL27RA_rs6511905	631	1070	360	589	222	411	49	70	0,078	0,352	0,065	0,384
IL27RA_rs11881500	631	1071	326	533	247	446	58	92	0,092	0,391	0,086	0,416
IL27RA_rs2306190	631	1082	221	355	288	530	122	197	0,193	0,456	0,182	0,49
MAPK1_rs6928	630	1082	182	245	288	545	160	292	0,254	0,457	0,27	0,504
MAPK1_rs9340	630	1071	214	395	295	512	121	164	0,192	0,468	0,153	0,478
MAPK1_rs2298432	631	1073	246	366	277	535	108	172	0,171	0,439	0,16	0,499
MAPK1_rs9610470	631	1084	351	651	242	377	38	56	0,06	0,384	0,052	0,348
MAPK1_rs11913721	631	1075	214	396	296	514	121	165	0,192	0,469	0,153	0,478
IL6_rs2069824	630	1084	525	913	104	161	1	10	0,002	0,165	0,009	0,149
IL6_rs1800795	631	1073	209	350	305	516	117	207	0,185	0,483	0,193	0,481
IL6_rs2069832	631	1073	212	348	303	519	116	206	0,184	0,48	0,192	0,484
IL6_rs2069843	631	1084	611	1040	20	44	0	0	0	0,032	0	0,041
IL6_rs2069860	631	1083	627	1068	4	15	0	0	0	0,006	0	0,014
MAPK14_rs851034	631	1073	311	526	270	471	50	76	0,079	0,428	0,071	0,439
MAPK14_rs851024	631	1081	154	291	346	531	131	259	0,208	0,548	0,24	0,491
MAPK14_rs851023	631	1084	468	793	149	271	14	20	0,022	0,236	0,018	0,25
MAPK14_rs2145362	631	1075	505	852	117	216	9	7	0,014	0,185	0,007	0,201
MAPK14_rs851006	631	1075	342	589	243	407	46	79	0,073	0,385	0,073	0,379
MAPK14_rs12200998	631	1073	153	289	346	518	132	266	0,209	0,548	0,248	0,483
MAPK14_rs7757672	631	1075	285	535	294	441	52	99	0,082	0,466	0,092	0,41
STAT3_rs2272087	628	1067	442	737	170	304	16	26	0,025	0,271	0,024	0,285
STAT3_rs1053005	631	1074	417	683	189	354	25	37	0,04	0,3	0,034	0,33
STAT3_rs2293152	631	1073	226	389	296	514	109	170	0,173	0,469	0,158	0,479
STAT3_rs3816769	631	1081	270	443	284	499	77	139	0,122	0,45	0,129	0,462
STAT3_rs9912773	631	1084	348	587	241	434	42	63	0,067	0,382	0,058	0,4
STAT3_rs744166	630	1082	214	346	311	537	105	199	0,167	0,494	0,184	0,496
IL6ST_rs10471960	631	1081	485	839	137	226	9	16	0,014	0,217	0,015	0,209
IL6ST_rs1900173	631	1082	538	923	91	156	2	3	0,003	0,144	0,003	0,144
IL6ST_rs11574780	631	1084	571	1003	58	81	2	0	0,003	0,092	0	0,075
IL6ST_rs7719246	631	1084	476	823	144	241	11	20	0,017	0,228	0,018	0,222
IL6ST_rs10940495	631	1081	336	559	245	449	50	73	0,079	0,388	0,068	0,415
IL6ST_rs6870870	630	1076	228	368	293	539	109	169	0,173	0,465	0,157	0,501
JAK1_rs310244	631	1071	362	627	226	384	43	60	0,068	0,358	0,056	0,359
JAK1_rs2780819	631	1076	319	574	257	422	55	80	0,087	0,407	0,074	0,392
JAK1_rs188698	631	1083	257	474	295	489	79	120	0,125	0,468	0,111	0,452
JAK1_rs310228	631	1074	470	813	146	245	15	16	0,024	0,231	0,015	0,228
JAK1_rs2256298	631	1082	316	578	274	431	41	73	0,065	0,434	0,067	0,398
JAK1_rs310236	630	1068	256	473	294	477	80	118	0,127	0,467	0,11	0,447
JAK1_rs3790541	631	1077	500	886	124	177	7	14	0,011	0,197	0,013	0,164
JAK1_rs310202	631	1080	380	692	224	334	27	54	0,043	0,355	0,05	0,309
JAK1_rs310199	630	1073	318	571	261	422	51	80	0,081	0,414	0,075	0,393
PIK3R1_rs40419	631	1079	202	367	323	499	106	213	0,168	0,512	0,197	0,462
PIK3R1_rs706713	630	1083	361	612	229	405	40	66	0,063	0,363	0,061	0,374
PIK3R1_rs7713645	631	1072	155	293	347	510	129	269	0,204	0,55	0,251	0,476
PIK3R1_rs34300	631	1075	473	778	144	279	14	18	0,022	0,228	0,017	0,26
PIK3R1_rs10940160	631	1083	182	316	322	528	127	239	0,201	0,51	0,221	0,488
PIK3R1_rs2161120	631	1078	190	334	321	518	120	226	0,19	0,509	0,21	0,481
PIK3R1_rs10515074	631	1084	396	688	203	346	32	50	0,051	0,322	0,046	0,319

Anhang

PIK3R1_rs1819987	631	1079	232	401	299	502	100	176	0,158	0,474	0,163	0,465
PIK3R1_rs34306	631	1082	456	758	158	297	17	27	0,027	0,25	0,025	0,274
PIK3R1_rs1550805	631	1083	527	889	96	180	8	14	0,013	0,152	0,013	0,166
PIK3R1_rs1445760	631	1081	176	280	318	552	137	249	0,217	0,504	0,23	0,511
PIK3R1_rs1043526	631	1084	465	809	153	256	13	19	0,021	0,242	0,018	0,236
PIK3R1_rs9291926	629	1072	160	258	321	560	148	254	0,235	0,51	0,237	0,522
PIK3CG_rs4727666	631	1082	420	713	193	321	18	48	0,029	0,306	0,044	0,297
PIK3CG_rs1526083	631	1072	227	417	300	491	104	164	0,165	0,475	0,153	0,458
PIK3CG_rs849367	631	1084	507	879	119	190	5	15	0,008	0,189	0,014	0,175
PIK3CG_rs4730205	631	1082	296	510	276	454	59	118	0,094	0,437	0,109	0,42
PIK3CG_rs12667819	631	1081	188	351	309	516	134	214	0,212	0,49	0,198	0,477
PIK3CG_rs849412	630	1083	468	811	153	247	9	25	0,014	0,243	0,023	0,228
PTPN11_rs11066301	630	1080	192	331	299	520	139	229	0,221	0,475	0,212	0,481
PTPN11_rs2301756	631	1082	499	888	121	185	11	9	0,017	0,192	0,008	0,171
PTPN11_rs11066323	631	1076	534	925	93	144	4	7	0,006	0,147	0,007	0,134
PTPN22_rs2476601	631	1083	484	865	140	199	7	19	0,011	0,222	0,018	0,184
IL6R_rs952146	631	1075	228	431	297	489	106	155	0,168	0,471	0,144	0,455
IL6R_rs4845618	631	1075	190	321	322	530	119	224	0,189	0,51	0,208	0,493
IL6R_rs7549250	630	1083	195	334	317	527	118	222	0,187	0,503	0,205	0,487
IL6R_rs7518199	631	1074	226	405	316	505	89	164	0,141	0,501	0,153	0,47
IL6R_rs4845623	631	1076	215	393	324	507	92	176	0,146	0,513	0,164	0,471
IL6R_rs4845374	631	1074	430	749	187	302	14	23	0,022	0,296	0,021	0,281
IL6R_rs8192284	631	1082	226	417	315	502	90	163	0,143	0,499	0,151	0,464
IL6R_rs2229238	631	1073	416	681	191	347	24	45	0,038	0,303	0,042	0,323
IL6R_rs7526293	631	1075	408	658	195	366	28	51	0,044	0,309	0,047	0,34

Anhang

Tab. 17: Primäre Studie: 73 SNPs mit den Berechnungen nach dem dominanten, additiven und rezessiven Modell mit jeweils p nach Wald, Odds Ratio und 95%-CI (=95% Konfidenzintervall) nach Adjustierung auf die Risikofaktoren Diabetes mellitus, Bluthochdruck, BMI, Rauchen und Geschlecht

Gen mit SNP	dominant		additiv		rezessiv	
	p	OR (95-CI)	p	OR (95-CI)	p	OR (95-CI)
IL27RA_rs6511905	0,3285	1.1222 (0.8908-1.4146)	0,6513	1.0431 (0.8691-1.2533)	0,4373	0.8409 (0.5445-1.3072)
IL27RA_rs11881500	0,7647	1.0629 (0.7103-1.5801)	0,6755	0.9629 (0.8061-1.1491)	0,4738	0.9193 (0.7301-1.1572)
IL27RA_rs2306190	0,8961	1.0198 (0.7590-1.3661)	0,3710	0.9281 (0.7878-1.0928)	0,1467	0.8345 (0.6537-1.0658)
MAPK1_rs6928	0,0217	1.3617 (1.0457-1.7718)	0,0369	1.1870 (1.0107-1.3950)	0,2546	1.1652 (0.8967-1.5182)
MAPK1_rs9340	0,1052	0.8188 (0.6422-1.0420)	0,0158	0.8166 (0.6924-0.9625)	0,0147	0.6856 (0.5064-0.9291)
MAPK1_rs2298432	0,6660	1.2009 (0.5080-2.7096)	0,1650	1.1776 (0.9340-1.4826)	0,1588	1.2030 (0.9297-1.5553)
MAPK1_rs9610470	0,5050	1.1805 (0.7212-1.9156)	0,0987	1.1736 (0.9703-1.4191)	0,0880	1.2253 (0.9702-1.5478)
MAPK1_rs11913721	0,1006	0.8167 (0.6406-1.0392)	0,0150	0.8152 (0.6912-0.9608)	0,0142	0.6846 (0.5059-0.9276)
IL6_rs2069824	0,0768	0.1449 (0.0075-0.8517)	0,4260	0.8871 (0.6584-1.1885)	0,6913	0.9385 (0.6846-1.2814)
IL6_rs1800795	0,7674	0.9568 (0.7128-1.2801)	0,8138	0.9807 (0.8336-1.1534)	0,9144	0.9866 (0.7725-1.2615)
IL6_rs2069832	0,7477	0.9530 (0.7094-1.2759)	0,7288	0.9717 (0.8260-1.1427)	0,7992	0.9688 (0.7589-1.2379)
IL6_rs2069843	0,8014	1.1697 (0.3745-4.5380)	0,8014	1.1697 (0.3745-4.5380)	NA	NA (NA)
IL6_rs2069860	NA	NA (NA)	NA	NA (NA)	NA	NA (NA)
MAPK14_rs851034	0,2630	1.2865 (0.8241-1.9950)	0,5988	1.0509 (0.8732-1.2641)	0,9369	1.0093 (0.8019-1.2705)
MAPK14_rs851024	0,4277	0.8988 (0.6895-1.1687)	0,5591	1.0504 (0.8907-1.2390)	0,0723	1.2908 (0.9789-1.7088)
MAPK14_rs851023	0,6550	1.2020 (0.5246-2.6557)	0,7892	0.9686 (0.7651-1.2227)	0,6580	0.9426 (0.7242-1.2240)
MAPK14_rs2145362	0,8445	0.9715 (0.7289-1.2985)	0,8080	0.9678 (0.7432-1.2625)	0,7980	0.8681 (0.2880-2.5799)
MAPK14_rs851006	0,6057	0.8902 (0.5691-1.3781)	0,5825	0.9500 (0.7906-1.1401)	0,6718	0.9512 (0.7546-1.1985)
MAPK14_rs12200998	0,3623	0.8846 (0.6785-1.1504)	0,5405	1.0525 (0.8934-1.2404)	0,0502	1.3184 (1.0015-1.7424)
MAPK14_rs7757672	0,2514	0.7861 (0.5181-1.1807)	0,1490	1.1397 (0.9540-1.3615)	0,0118	1.3465 (1.0686-1.6988)
STAT3_rs2272087	0,5460	1.2523 (0.5920-2.5689)	0,5790	1.0650 (0.8520-1.3290)	0,6720	1.0559 (0.8205-1.3573)
STAT3_rs1053005	0,9250	1.0116 (0.7949-1.2884)	0,9291	0.9907 (0.8076-1.2167)	0,6260	0.8639 (0.4823-1.5679)
STAT3_rs2293152	0,4880	1.1156 (0.8175-1.5180)	0,4160	1.0706 (0.9084-1.2617)	0,5160	1.0824 (0.8528-1.3755)
STAT3_rs3816769	0,5950	0.9097 (0.6394-1.2860)	0,2501	0.9046 (0.7619-1.0727)	0,2226	0.8648 (0.6847-1.0922)
STAT3_rs9912773	0,8326	1.0252 (0.8138-1.2919)	0,8723	0.9847 (0.8158-1.1896)	0,3955	0.8141 (0.5083-1.3154)
STAT3_rs744166	0,3818	0.8736 (0.6437-1.1802)	0,1093	0.8726 (0.7380-1.0306)	0,0977	0.8128 (0.6360-1.0390)

Anhang

IL6ST_rs10471960	0,9976	1.0004 (0.7601-1.3201)	0,9586	0.9934 (0.7745-1.2778)	0,8356	0.9049 (0.3567-2.3960)
IL6ST_rs1900173	0,7060	1.4747 (0.1621-10.7488)	0,8050	0.9612 (0.7001-1.3133)	0,7539	0.9494 (0.6846-1.3109)
IL6ST_rs11574780	0,3881	0.8367 (0.5591-1.2579)	0,2995	0.8111 (0.5467-1.2074)	0,9673	NA (NA)
IL6ST_rs7719246	0,8314	1.0297 (0.7874-1.3497)	0,9437	1.0087 (0.7940-1.2855)	0,6694	0.8322 (0.3628-1.9849)
IL6ST_rs10940495	0,7849	1.0327 (0.8198-1.3009)	0,9671	1.0039 (0.8360-1.2065)	0,6726	0.9098 (0.5888-1.4172)
IL6ST_rs6870870	0,3020	1.1751 (0.8636-1.5948)	0,9863	0.9986 (0.8465-1.1776)	0,4079	0.9037 (0.7112-1.1490)
JAK1_rs310244	0,4940	0.9218 (0.7300-1.1642)	0,3225	0.9094 (0.7535-1.0981)	0,2671	0.7652 (0.4784-1.2334)
JAK1_rs2780819	0,3000	1.2479 (0.8183-1.8927)	0,1660	1.1356 (0.9485-1.3593)	0,2280	1.1523 (0.9153-1.4514)
JAK1_rs188698	0,1031	0.8236 (0.6517-1.0395)	0,0777	0.8564 (0.7208-1.0173)	0,2460	0.8100 (0.5683-1.1591)
JAK1_rs310228	0,1150	1.9059 (0.8469-4.2600)	0,1590	1.1846 (0.9351-1.4985)	0,2830	1.1565 (0.8860-1.5075)
JAK1_rs2256298	0,0562	0.7990 (0.6344-1.0057)	0,0888	0.8507 (0.7060-1.0251)	0,7116	0.9162 (0.5787-1.4670)
JAK1_rs310236	0,1620	1.2899 (0.9008-1.8406)	0,0468	1.1913 (1.0025-1.4160)	0,0751	1.2366 (0.9792-1.5636)
JAK1_rs3790541	0,5482	0.9146 (0.6841-1.2257)	0,7891	0.9644 (0.7405-1.2593)	0,2832	1.8015 (0.6318-5.5355)
JAK1_rs310202	0,4215	0.7952 (0.4490-1.3774)	0,7920	1.0270 (0.8421-1.2506)	0,5061	1.0835 (0.8549-1.3722)
JAK1_rs310199	0,7330	1.0773 (0.6989-1.6480)	0,5290	1.0599 (0.8839-1.2702)	0,5377	1.0752 (0.8537-1.3541)
PIK3R1_rs40419	0,4481	0.9098 (0.7120-1.1608)	0,9937	0.9993 (0.8495-1.1759)	0,3650	1.1477 (0.8535-1.5499)
PIK3R1_rs706713	0,7953	1.0312 (0.8176-1.3015)	0,7956	1.0252 (0.8495-1.2389)	0,9014	1.0309 (0.6406-1.6794)
PIK3R1_rs7713645	0,0628	0.7780 (0.5962-1.0121)	0,7331	0.9719 (0.8250-1.1448)	0,1677	1.2146 (0.9228-1.6039)
PIK3R1_rs34300	0,2741	1.1566 (0.8921-1.5033)	0,5310	1.0775 (0.8544-1.3628)	0,2130	0.6049 (0.2758-1.3554)
PIK3R1_rs10940160	0,1474	0.8114 (0.6103-1.0747)	0,4134	0.9343 (0.7937-1.0993)	0,9674	1.0053 (0.7807-1.2964)
PIK3R1_rs2161120	0,8554	0.9770 (0.7604-1.2537)	0,5218	1.0546 (0.8965-1.2411)	0,1844	1.2149 (0.9130-1.6231)
PIK3R1_rs10515074	0,9491	0.9922 (0.7817-1.2609)	0,8298	0.9785 (0.8028-1.1942)	0,6562	0.8842 (0.5166-1.5312)
PIK3R1_rs1819987	0,5753	0.9145 (0.6672-1.2481)	0,6900	0.9671 (0.8201-1.1397)	0,8809	0.9819 (0.7739-1.2467)
PIK3R1_rs34306	0,6690	1.1596 (0.5787-2.2683)	0,5702	0.9384 (0.7522-1.1676)	0,4173	0.9005 (0.6983-1.1590)
PIK3R1_rs1550805	0,6370	1.0769 (0.7931-1.4685)	0,7283	1.0499 (0.7992-1.3862)	0,7859	0.8720 (0.3307-2.4381)
PIK3R1_rs1445760	0,7905	1.0354 (0.8001-1.3377)	0,8492	1.0159 (0.8633-1.1956)	0,9703	1.0052 (0.7646-1.3248)
PIK3R1_rs1043526	0,5810	0.9289 (0.7152-1.2083)	0,5141	0.9254 (0.7335-1.1695)	0,5745	0.7942 (0.3575-1.8061)
PIK3R1_rs9291926	0,9779	0.9963 (0.7632-1.2977)	0,7902	0.9778 (0.8289-1.1533)	0,6820	0.9450 (0.7213-1.2404)
PIK3CG_rs4727666	0,1370	1.2705 (0.9254-1.7399)	0,0890	1.1549 (0.9783-1.3638)	0,1841	1.1758 (0.9265-1.4944)

Anhang

PIK3CG_rs1526083	0,2915	0.8554 (0.6406-1.1449)	0,4247	0.8978 (0.6900-1.1719)	0,5169	1.4453 (0.5006-4.8377)
PIK3CG_rs849367	0,1390	1.2403 (0.9318-1.6481)	0,0913	1.1506 (0.9778-1.3546)	0,1946	1.1797 (0.9198-1.5163)
PIK3CG_rs4730205	0,7601	1.0387 (0.8145-1.3262)	0,4474	1.0835 (0.8819-1.3343)	0,1491	1.5868 (0.8612-3.0356)
PIK3CG_rs12667819	0,9141	1.0129 (0.8027-1.2786)	0,5997	1.0508 (0.8736-1.2653)	0,2912	1.2758 (0.8157-2.0191)
PIK3CG_rs849412	0,8307	1.0255 (0.8141-1.2918)	0,5781	1.0509 (0.8826-1.2525)	0,3891	1.1850 (0.8083-1.7523)
PTPN11_rs11066301	0,8204	1.0290 (0.8034-1.3163)	0,5302	0.9499 (0.8090-1.1153)	0,1710	0.8219 (0.6209-1.0897)
PTPN11_rs2301756	0,1850	1.9620 (0.7266-5.4724)	0,0584	1.2847 (0.9905-1.6651)	0,0882	1.2831 (0.9624-1.7078)
PTPN11_rs11066323	0,9150	0.9270 (0.2139-3.6503)	0,5070	1.1073 (0.8180-1.4943)	0,4610	1.1289 (0.8162-1.5565)
PTPN22_rs2476601	0,8470	1.0442 (0.6689-1.6163)	0,6370	1.0451 (0.8700-1.2547)	0,6200	1.0603 (0.8412-1.3364)
IL6R_rs952146	0,3712	0.8973 (0.7073-1.1375)	0,3090	0.9179 (0.7780-1.0830)	0,4498	0.8849 (0.6451-1.2174)
IL6R_rs4845618	NA	NA (NA)	NA	NA (NA)	NA	NA (NA)
IL6R_rs7549250	0,5538	0.9155 (0.6821-1.2242)	0,6180	0.9590 (0.8134-1.1303)	0,8040	0.9690 (0.7561-1.2434)
IL6R_rs7518199	0,5206	0.9247 (0.7279-1.1736)	0,9485	1.0055 (0.8509-1.1886)	0,3243	1.1765 (0.8535-1.6298)
IL6R_rs4845623	0,3053	0.8814 (0.6919-1.1213)	0,9760	0.9974 (0.8443-1.1786)	0,1998	1.2318 (0.8977-1.6989)
IL6R_rs4845374	0,6420	1.2076 (0.5335-2.6426)	0,3420	1.1145 (0.8905-1.3930)	0,3627	1.1222 (0.8750-1.4381)
IL6R_rs8192284	0,3450	0.8914 (0.7016-1.1311)	0,8600	0.9851 (0.8338-1.1642)	0,3503	1.1668 (0.8460-1.6174)
IL6R_rs2229238	0,5243	1.0811 (0.8508-1.3754)	0,4875	1.0745 (0.8779-1.3176)	0,6537	1.1427 (0.6441-2.0741)
IL6R_rs7526293	0,4293	1.1008 (0.8678-1.3978)	0,4523	1.0792 (0.8853-1.3178)	0,7970	1.0744 (0.6271-1.8768)

Tab. 18: Replikationsstudie: Der signifikanteste SNP mit den Qualitätskriterien Call rate (CR), Chi-Quadrat-Test, Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE), Frequenz des selteneren Allels (minAF) bei Kontrollen (co) und Fällen (ca) sowie Anzahl (N) der Kontrollen (co) und Fälle (ca)

Gen mit SNP	Nco	Nca	CR	Chi Quadrat	HWE	minAF co	minAF ca
MAPK1_rs6928	1001	1103	1	0,601	0,72892	0,50	0,49

**MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**

ETHIK-KOMMISSION



A.D. 1665

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Herrn
Prof. Dr. med. S. Schreiber
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Klinik für Allgemeine Innere Medizin
Schittenhelmstraße 12

24105 Kiel

Schwanenweg 20
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-18 31

Datum:

25.11.2003

AZ: A 156/03

Studienplan:

PopGen - populationsrepräsentative Stichprobe für die populationsgenetische Exploration im NGFN – Phase 1

Projektbeschreibung, Fragebogen, Einwilligungserklärung - Version vom 29.9.2003

Probandenaufklärung (Merkblatt zur Einwilligungserklärung)-überarbeitete Version vom 13.11.2003

Stellungnahmen des Unabhängigen Landeszentrums für Datenschutz Schleswig-Holstein vom 5.6.2003 und 22.9.2003

Antragsteller:

Prof. Dr. Schreiber, Klinik für Allgemeine Innere Medizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Datum des

Erstantrages: 29.9.2003

Datum des

überarb. Antrages: 13.11.2003

V o t u m

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel hat die zu dem oben bezeichneten Versuchsplan eingereichten Unterlagen auf mögliche berufsethische und berufsrechtliche Bedenken hin überprüft.

Die Kommission stimmt darin überein, daß gegen die Durchführung der Studie nunmehr keine Bedenken bestehen.

Es wird darauf hingewiesen, daß künftig eventuell für zweckmäßig und notwendig erachtete Änderungen und Erweiterungen des Versuchsplanes der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.

Nach Abschluß der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem

Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.

J. Schaub

Prof. Dr. med. Jürgen Schaub
Vorsitzender der Ethik-Kommission
der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel

Nachfolgend sind die Mitglieder der Ethik-Kommission aufgeführt, die diese Studie im Umlaufverfahren beurteilt haben:

Prof. Dr. med. J. Schaub (Pädiatrie)
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Prof. Dr. med. H.M. Mehdorn (Neurochirurgie)
Stellv. Vorsitzender der Ethik-Kommission

Prof. Dr. med. Dr. jur. H.-J. Kaatsch (Rechtsmedizin)

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. B. Kimmig (Strahlentherapie)

Prof. Dr. med. H. Mönig (Innere Medizin)

Herr Pastor K. Becker (Pastor i.R.)

Priv.-Doz. Dr. med. D. Proppe (Innere Medizin und Klinische Pharmakologie)

Prof. Dr. med. R. Simon (Innere Medizin)

Frau Priv.-Doz. Dr. med. I. Vogel (Chirurgie)

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt allen, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger Simon und Prof. Dr. med. Norbert Frey sowie Herrn Prof. Dr. med. Stefan Schreiber möchte ich mich bedanken für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Klinik für Kardiologie und dem Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB) am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel unter ausgezeichneten Bedingungen habe durchführen können.

Mein ausgesprochener Dank gilt PD Dr. med. Nour Eddine El Mokhtari für die Betreuung dieser Arbeit, die interessante und anspruchsvolle Themenstellung sowie die ständige Begleitung und die inhaltliche Auseinandersetzung mit dem Stoffgebiet. Auch Herrn Dr. rer. nat. Dipl. biol. Arne Schäfer danke ich sehr für seine Unterstützung, insbesondere bei der methodischen Erarbeitung und der statistischen Auswertung sowie für die konstruktive Kritik. Ebenso danke ich Dr. rer. nat. Michael Nothnagel des Instituts für Medizinische Informatik und Statistik für die Unterstützung bei der statistischen Analyse.

Für den praktischen Beistand möchte ich mich bei den Mitarbeitern des IKMB sowie der PopGen-Zentrale bedanken, da ohne deren freundliche Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein besonderer Dank gilt hierbei Catharina Fürstenau, Ilona Urbach, Susan Ehlers, Jan Sebastian Tammen, Katja Cloppenburg-Schmidt, Tanja Henke, Catharina von der Lancken, Meike Davids, Ina Elena Baumgartner, Tanja Wesse, Lena Bossen, Birthe Fedders, Anita Dietsch, Melanie Friskovec, Huberta von Eberstein, Christine Höll, Birgit Timm, Sonja Börm, Kerstin Milbradt und Janina Heinze.

Vor allem aber möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während meines gesamten Studiums und dieser wissenschaftlichen Arbeit unterstützt haben und mir stets in allen Lebenslagen mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben sowie meinem Lebenspartner Tim Kader, der mich immer wieder motiviert und mental unterstützt hat, mich in allen Phasen begleitet und mich mit unzähligen Tees und Naschereien bei Laune gehalten hat.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Natalie Scheller

Geboren am 03.01.1979 in Hamburg

Staatsangehörigkeit deutsch

Universität

Oktober 2002 - Dezember 2008 Humanmedizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

- Dezember 2008 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung nach neuer AO mit der Note 1,5
- August 2004 Ärztliche Vorprüfung nach alter AO mit der Note 2,3

Praktisches Jahr

- April 2008 - Juli 2008 Chirurgie, Kantonsspital Liestal Schweiz
- Dez. 2007 - April 2008 Innere Medizin, UK-SH Campus Kiel
- August 2007 - Dez. 2007 Gynäkologie, Kreiskrankenhaus Rendsburg

Promotion

Seit Februar 2005 Mitarbeit in der Klinik für Kardiologie unter PD Dr. med. El Mokhtari im Rahmen des populationsgenetischen Projektes (PopGen) des UK-SH Campus Kiel zur Erforschung genetischer Faktoren bei der Entstehung der koronaren Herzkrankheit.

Schulbildung, Berufsausbildung und-tätigkeit

- Juni 2001 - Nov. 2002 Kameraassistentin beim NDR, Kiel
- Juli 1998 - Juni 2001 Berufsausbildung zur Mediengestalterin in Bild und Ton beim NDR in Hamburg, Abschlussnote 2
- August 1989 - Juni 1998 Gymnasium Bondenwald, Hamburg
Abitur mit der Note 1,9
- Februar 1996 - April 1996 Concordia College, Adelaide Australien