

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 TOLL-LIKE-REZEPTOR-
SIGNALTRANSDUKTIONSWEG
BEI PATIENTEN MIT DILATATIVER
KARDIOMYOPATHIE**

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

vorgelegt von
ANDREA HENKEN
aus **Heide**

Kiel **2010**

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Nour Eddine El-Mokhtari

2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Fred Fändrich

Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.2011

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.03.2011

gez.:

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DILATATIVE KARDIOMYOPATHIE	1
1.1.1	Klinik, Diagnostik und Therapie der DCM.....	1
1.1.2	Familiäre DCM	3
1.2	INFEKTÖSE PATHOGENE, MYOKARDITIS UND PATHOGENESE DER DCM	5
1.2.1	Angeborenes Immunsystem und TLR-Pathway	6
1.3	PAMPs UND PRRs	6
1.3.1	Toll-like-Rezeptoren	7
1.3.2	TLR-Signaltransduktion	8
1.4	STUDIENDESIGN	10
1.4.1	Tagging-SNPs	10
1.4.2	Statistische Signifikanz.....	12
2	FRAGESTELLUNG	14
3	MATERIAL UND METHODEN	15
3.1	AUSWAHL DER MARKER-SNPs	15
3.2	CHARAKTERISIERUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS	16
3.2.1	Einschlusskriterien	18
3.3	DNA-ISOLIERUNG UND HERSTELLUNG VON 96- UND 384-WELL-PLATTEN	19
3.3.1	Durchführung der DNA - Extraktion.....	19
3.3.2	Konzentrationsbestimmung.....	20
3.3.3	Whole Genome Amplification und Plattenherstellung.....	21
3.4	GENOTYPISIERUNG	22
3.4.1	TaqMan-Genotypisierung.....	22
3.4.1.1	Durchführung der PCR mittels TaqMan Technologie	25
3.4.2	SNPlex Genotypisierung	26
3.4.3	Auswertung der Fluoreszenzmessungen von Taqman und SNPlex.....	28
3.5	STATISTIK	30
3.5.1	Qualitätskontrolle der Genotyp-Daten	30
3.5.2	Statistische Analyse	31
4	ERGEBNISSE	34
4.1	KLINISCHE ANALYSEPOPULATION	34
4.2	PRIMÄRE ASSOZIATIONSSTUDIE	35
4.2.1	Adjustierung für multiples Testen	36

4.3	REPLIKATIONSSTUDIE IN EINER UNABHÄNGIGEN POPULATION	37
5	DISKUSSION	39
5.1	EINFLUSSGRÖßEN IN DER ASSOZIATIONSSTUDIE	39
5.2	REPLIKATIONSSTUDIE	42
5.3	MÖGLICHER EINFLUSS VON GENEN DES TLR-PATHWAY AUF DIE DCM	42
5.4	AUSBLICK	43
6	ZUSAMMENFASSUNG	45
7	LITERATURVERZEICHNIS	47
8	ANHANG	54
9	DANKSAGUNG	79
10	LEBENS LAUF	80

Abkürzungsverzeichnis

<i>AHA</i>	<i>American Heart Association</i>
<i>ASO</i>	<i>allelspezifische Oligos</i>
<i>CC</i>	<i>engl.: case control</i>
<i>CCD</i>	<i>engl.: charge-couplet device</i>
<i>CD</i>	<i>cluster of differentiation, Differenzierungsfaktor</i>
<i>CEPH</i>	<i>Centre d'Etude du Polymorphisme Humain, Paris, Frankreich</i>
<i>CEU</i>	<i>HapMap-Kohorte aus Einwohnern Utahs mit Vorfahren aus Nord-West-Europa</i>
<i>CI</i>	<i>confidence interval, Konfidenzintervall</i>
<i>CR</i>	<i>Call rate, Genotypisierungserfolgsrate</i>
<i>DC</i>	<i>dendritic cell, dentritische Zelle</i>
<i>DCM</i>	<i>dilatative Kardiomyopathie</i>
<i>DD</i>	<i>death domaine, Todesdomäne</i>
<i>DNA</i>	<i>desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
<i>EF</i>	<i>Ejektionsfraktion</i>
<i>ESC</i>	<i>Europäische Gesellschaft für Kardiologie</i>
<i>FAM</i>	<i>6-Carboxy-Fluorescein</i>
<i>FRET</i>	<i>Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer</i>
<i>HLA</i>	<i>humanes Leukozytenantigen</i>
<i>htSNP</i>	<i>engl.: haplotype-tagging-single nucleotide polymorphism</i>
<i>HWE</i>	<i>Hardy-Weinberg-Equilibrium</i>
<i>ISFC</i>	<i>International Society and Federation of Cardiology</i>
<i>IRAK</i>	<i>engl. IL 1-receptor associated kinase</i>
<i>IL-6</i>	<i>Interleukin-6</i>
<i>IκB</i>	<i>engl. inhibitor of nuclear faktor κB (IκB)-kinase complex</i>
<i>IKK</i>	<i>IκB-kinase-complex</i>
<i>JAK</i>	<i>Janus Kinase</i>
<i>KHK</i>	<i>koronare Herzerkrankung</i>
<i>LD</i>	<i>Linkage disequilibrium, Kopplungsungleichgewicht</i>
<i>LPS</i>	<i>Lipopolysaccharide</i>
<i>LSO</i>	<i>lokusspezifisches Oligonukleotid</i>

LTA	<i>Lipoteichonsäure</i>
MDA	<i>engl.: Multiple displacement amplification</i>
MGB	<i>engl.: minor groove binder</i>
minAF	<i>minor allele frequency, minore Allelfrequenz</i>
NGFN	<i>Nationales Genomforschungsnetz</i>
NOS	<i>engl.: nitric oxide synthase</i>
MyD88	<i>engl.: myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
NFκB	<i>Nukleärer Faktor-κB</i>
nsSNP	<i>engl.: nonsynonymous single nucleotide polymorphism</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
ORC	<i>Odds Ratio (carriership of common allele)</i>
ORR	<i>Odds Ratio (carriership of rare allele)</i>
OLA	<i>Oligonukleotid-Ligations-Assay</i>
p(x)	<i>probability, statistische Wahrscheinlichkeit</i>
PAMP	<i>engl.: pathogen associated molecular patterns</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion</i>
PG	<i>Peptidoglykane</i>
Popgen	<i>engl.: Population based assessment of genetic effects</i>
PRR	<i>engl.: pattern recognition receptors</i>
RNA	<i>ribonucleic acid, Ribonukleinsäure</i>
Rpm	<i>rounds per minute, Umdrehungen pro Minute</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism, Einzelbasenpolymorphismus</i>
STAT	<i>engl.: signal transducer and activator of transcription</i>
TAB	<i>engl.: TAK1-binding protein</i>
TAK	<i>engl.: transforming growth factor beta activated kinase</i>
TAMRA	<i>6-Carboxy-Tetra-Methyl-Rhodamin</i>
TBK	<i>engl.: tank-binding kinase</i>
TIR	<i>Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne</i>
TIRAP	<i>engl.: TIR-associated protein</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF	<i>engl.: tumor necrosis factor</i>
TOLLIP	<i>engl.: Toll interacting protein</i>
TRAF	<i>engl.: tumor necrosis factor receptor associated factor</i>
TRAM	<i>engl.: toll-receptor associated molecule</i>

<i>TRIF</i>	<i>engl.: toll-receptor associated activator of interferon</i>
<i>tSNP</i>	<i>tagging single nucleotide polymorphism, Marker-SNP</i>
<i>WGA</i>	<i>Whole Genome Amplification</i>
<i>WHF</i>	<i>World Heart Federation</i>
<i>WHO</i>	<i>World Health Organization</i>

1 Einleitung

1.1 Dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist durch eine Vergrößerung der linken oder beider Herzkammern charakterisiert in Verbindung mit einer eingeschränkten systolischen Pumpfunktion [WHO/ ISFC 1995] des Herzens. Es werden idiopathische, familiär-genetische, viral oder immunogene, alkoholische oder toxische Formen unterschieden [Richardson et al. 1995]. Die kausale Ursache bleibt jedoch oft ungeklärt.

Die DCM ist die häufigste Form der primären Kardiomyopathien mit einer Prävalenz von 36 Fällen pro 100.000 Einwohner. Ihre Inzidenz beträgt 6 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner [Dec und Fuster 1994].

Generell muss aber von höheren Erkrankungszahlen ausgegangen werden, da der zunächst milde Verlauf über eine bereits morphologisch vorliegende DCM hinwegtäuschen kann und klinisch keine Herzinsuffizienzzeichen imponieren. Das Manifestationsalter dieser Erkrankung liegt zwischen dem 20. und 50. Lebensjahr, wobei Männer häufiger als Frauen betroffen sind, und es wird davon ausgegangen, dass in etwa 20-30% aller Fälle eine familiäre Häufung vorliegt [Michels et al. 1992]. Bei der familiär-genetischen Form variiert der Phänotyp aber erheblich, da sie den Erkrankungsverlauf, den Vererbungsmodus, die Begleiterkrankungen und den Nachweis kardialer Entzündung bzw. Infektion mit kardiotropen Viren sowie Genotyp-Phänotyp-Korrelation betrifft.

Die Prognose der DCM ist trotz therapeutischer Fortschritte außerordentlich schlecht mit einer jährlichen Letalität nach Diagnosestellung von ca. 10-20% aller Erkrankten. Etwa 50% der Fälle versterben an einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz bis zum Pumpversagen und jeweils weitere 25% an thrombembolischen Komplikationen und einem plötzlichen Herztod infolge maligner Herzrhythmusstörungen.

1.1.1 Klinik, Diagnostik und Therapie der DCM

Das klinische Erscheinungsbild der DCM resultiert aus der Dilatation und der herabgesetzten Kontraktilität des linken oder beider Ventrikel und ist Ausdruck des

Vorwärts- und Rückwärtsversagens des linken Ventrikels.

Das Rückwärtsversagen des linken Ventrikels steht anfänglich im Vordergrund und äußert sich durch die Symptome der pulmonalvenösen Stauung und eine daraus resultierende Luftnot bei körperlicher Belastung und bei Fortschreiten der Erkrankung auch bereits in Ruhe. Das Vorwärtsversagen imponiert durch Zeichen der Minderperfusion der Organe und der Körperperipherie. Dies führt zu einer verminderten körperlichen Leistungsfähigkeit mit rascher muskulärer Ermüdung und Abgeschlagenheit. Des Weiteren können Angina pectoris, Rhythmusstörungen und thrombembolische Komplikationen auftreten. Die Linksherzinsuffizienz kann mit weiterer Progression der Erkrankung in einer Globalinsuffizienz münden und wird dann mit zusätzlichen Zeichen der Rechtsherzbelastung symptomatisch.

Der Ausprägungsgrad dieser Symptome wird auf Empfehlung der New York Heart Association in vier Gruppen eingeteilt:

Beim Schweregrad I geht man von einer Herzerkrankung ohne Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit aus.

Die Schweregrade II und III sind durch geringe bzw. deutliche Einschränkungen der körperlichen Aktivität charakterisiert. Der Schweregrad IV ist durch Beschwerden in Ruhe mit erheblicher Steigerung der Symptomatik bei geringster körperlicher Belastung definiert [Swedberg et al. 2005].

Die Diagnostik der DCM wird im Allgemeinen als eine Ausschlussdiagnostik kausaler Ursachen geführt. Die Echokardiographie hat einen besonders hohen Stellenwert in der Diagnose und der Verlaufsbeschreibung der DCM. Bevorzugt können so im apikalen 4-Kammer-Blick in der endsystolischen Phase die linksventrikulär betonte Dilatation und im Ganzen die Form und Größe des Herzens beurteilt wie auch vermessen werden. Des Weiteren ermöglicht die Untersuchung die Feststellung einer verminderten Verkürzungs- bzw. Ejektionsfraktion.

Nuklearmedizinische Methoden wie die Radionuklidventrikulographie oder kernspintomographische Aufnahmen kommen nur zum Einsatz, wenn die Echokardiographie hinlänglich unzureichende Bilder liefert.

Neben diesen nicht invasiven Verfahren kommen in der Diagnostik auch die invasive Herzkatheteruntersuchung und die Myokardbiopsie zum Tragen. Die Links- und Rechtsherzkatheterisierung dient der Bestimmung der hämodynamischen Parameter

(z.B. Ejektionsfraktion, Füllungsdrücke, systemischer Widerstand) und besonders auch dem Ausschluss oder Nachweis einer koronaren Herzerkrankung (KHK).

Zusätzlich ermöglicht sie die Durchführung einer Endomyokardbiopsie. Das Biopsiematerial ist mit histologischen, immunhistochemischen und zusätzlich auch molekularbiologisch-virologischen (wie PCR oder In-situ-Hybridisierung) Methoden untersuchen zu lassen. Dies geschieht, um eine ätiologische Klärung der Kardiomyopathie herbeizuführen und von einer Myokarditis abzugrenzen.

Die Endomyokardbiopsie gehört allerdings nicht zur Routinediagnostik, da zum Einen die Sensivität und Spezifität der histologischen Veränderungen niedrig sind, zum Anderen existiert bislang noch keine etablierte Therapie für die akute Virusmyokarditis und zudem ist das Perforationsrisiko gerade bei dilatierten Herzkammern als nicht unbeträchtlich einzustufen [Hunt et al. 2005].

Die Therapie der dilatativen Kardiomyopathie orientiert sich an den Richtlinien zur Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz und basiert auf einer medikamentösen Therapie und auf Allgemeinmaßnahmen wie relativer körperlicher Schonung, Kochsalz- und Flüssigkeitsrestriktion. Ziel der Behandlung ist, die weitere Progression der Pumpfunktionsstörung zu verhindern und das Risiko des plötzlichen Herztodes durch maligne Herzrhythmusstörungen zu vermindern [Pitt et al. 1999, 2001].

Bei medikamentös nicht mehr zu beherrschender Herzinsuffizienz ist die Ultima Ratio eine Herztransplantation [McCarthy et al. 2000, Gronda et al. 2000].

1.1.2 Familiäre DCM

Generell werden in der Ätiologie und der Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie genetische, toxische, (auto)immune und virale Faktoren diskutiert. Eine Häufung von DCM-Fällen innerhalb einer Familie ist nicht selten. Mehrere systematische Untersuchungen von Patienten und deren Familien haben übereinstimmend ergeben, dass 20-30% aller DCM-Fälle genetisch bedingt sind [Schönberger und Seidman 2001]. Es wird aber wahrscheinlich die tatsächliche Häufigkeit der familiären DCM noch unterschätzt, da frühe Marker der Erkrankung fehlen und klinische sowie morphologische Kriterien zur Diagnosestellung einer

genetisch determinierten DCM nicht aussagekräftig sind [Mestroni et al. 1999]. Hinzu kommt, dass die Penetranz der DCM altersabhängig und sehr variabel ist. Die Krankheitsgene der DCM verlaufen sowohl nach dem autosomal-dominanten- [Ohlendieck 1996] als auch nach dem autosomal-rezessiven Erbgang [Kelly und Strauss 1993] sowie, dass auch der x-chromosomale [Berko und Swift, 1987] als Vererbungsmodus aufgezeigt worden ist.

Bei Patienten wurden vor allem autosomal-dominante Mutationen in verschiedenen Genen, wie z.B. Lamin A/C, Troponin T, Titin, Desmin, Phospholamban, Myosin schwere Kette oder Myosinbindungsprotein C nachgewiesen. Weiterhin sind auch Mutationen in chromosomalen Genen, die für die Proteine Dystrophin bzw. Taffazin kodieren, und in Genen, die dem autosomal-rezessiven Erbgang folgen, wie Desmoplaktin und Troponin I, beschrieben worden. Grundsätzlich handelt es sich hier also um Mutationen in sarkomerischen Proteinen, aber auch in Proteinen der Zellmembran, des Zytoskeletts und des Zellkerns. Die strukturelle Integrität der Herzmuskelzelle und die Kraftübertragung vom Sarkomer auf die extrazelluläre Matrix werden somit durch die Mutationen beeinflusst und führen zum Krankheitsbild der DCM [Towbin 1998].

Weiterhin erscheint auch eine familiäre Disposition für eine autoimmunvermittelte DCM möglich, da man im Serum von Patienten mit DCM und einigen Verwandten mit asymptomatischer Ventrikelvergrößerung erhöhte Interleukin-2-Spiegel nachweisen konnte [Marriott et al. 1996]. Des Weiteren sind Patienten mit einer familiären Kardiomyopathie, die nebenbefundlich eine entzündliche Herzmuskelerkrankung bzw. eine kardiale Infektion aufweisen, von großem Interesse. So könnte die hohe Prävalenz kardiotroper Erreger einen Risikofaktor für die Entstehung einer DCM darstellen oder einen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung haben [Kühl et al. 2005]. Da in eine Reihe von Genloci (HLA-Klasse-1- und HLA-Klasse-2-Antigene, bestimmte Zytokine und deren Rezeptoren) Variationen beschrieben wurden, die mit der Empfänglichkeit gegenüber infektiösen Erkrankungen assoziiert sind und somit das Auftreten einer DCM mit Nachweis kardiotroper Viren und/ oder Inflammation begünstigen könnten [McKenna et al. 1997; Portig et al. 2006].

1.2 Infektiöse Pathogene, Myokarditis und Pathogenese der DCM

Das Spektrum an mikrobiellen Erregern, welche an der Entstehung einer DCM maßgeblich beteiligt sein können, umfasst Viren (am häufigsten Parvovirus B19, Enteroviren, Epstein-Barr-Virus), eher selten Bakterien (z.B. *Borrelia burgdorferi*, Streptokokken, Staphylokokken) sowie noch seltener Pilze, Parasiten und Würmer. Parasiten sind in Europa zwar eher eine Rarität als Ursache einer DCM. In Südamerika ist dagegen der häufigste Grund für eine DCM und Herzinsuffizienz eine Infektion mit den Parasiten, durch *Trypanosoma cruzi* oder *Toxoplasma gondii* ausgelöste kardiale Toxoplasmose.

Virale Infektionen sind in Europa eine häufige Ursache entzündlicher Herzmuskelerkrankungen. So zeigten Untersuchungen am Modell der enteroviral induzierten Myokarditis der Maus, wie Infektionen mit kardiotropen Erregern über die Zerstörung zytoskeletaler Proteine wie Dystrophin und Sarkoglykan zur Aktivierung der angeborenen Immunität führen und somit das Ziel der Eliminierung des Virus verfolgen [Liu und Mason 2001]. Beispielsweise produziert replizierendes Coxsackievirus B3 nach dessen Aufnahme in die Myozyten die Protease 2A, welche durch Spaltung des Dystrophins den Dystrophin-Sarkoglykan-Komplex zerstört [Maekawa et al. 2007]. Dies führt letztlich zu einem ausgeprägten Remodeling im Myokard mit der Ausbildung einer DCM. In diesem Fall wird über die Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs Interferon freigesetzt, dessen antivirale Effekte wesentlich für die Viruseliminierung sind. Parallel wird das angeborene Immunsystem durch die virale RNA über den Toll-like-Rezeptor-Signaltransduktionsweg aktiviert [Linde et al. 2007]. Dies bewirkt die Freisetzung von Typ-I-Interferonen und Interleukin-6 (IL-6), die wiederum antiviral wirksam sind, aber verstärkt die Aktivierung der erworbenen Immunantwort mit Einwanderung insbesondere von T-Lymphozyten in das infizierte Myokard forcieren.

Ein chronischer Entzündungsprozess kann sich durch aktivierte autoreaktive bzw. kreuzreaktive T-Lymphozyten ereignen, so dass es selbst nach Eliminierung des Virus weiterhin über einen langen Zeitraum zur Gewebsschädigung und zur Entwicklung der DCM kommt [Mason 2003].

1.2.1 Angeborenes Immunsystem und TLR-Pathway

Das Immunsystem bei höheren Vertebraten wird unterschieden in ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem.

Die Hauptaufgaben der angeborenen Immunität sind die schnelle Erkennung und Reaktion auf das eingedrungene Pathogen sowie die Modulation der erworbenen Immunabwehr [Janeway und Medzhitov 2002].

Die Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen (DCs)) exprimieren eine Vielzahl von keimbahncodierten Rezeptoren (pattern recognition receptors = PRRs). Diese sind befähigt zur Erkennung unterschiedlichster konservierter pathogen-assoziiertes molekularer Muster (pathogen associated molecular pattern = PAMPs) [Medzhitov und Janeway, 2000].

Die Detektion von Krankheitserregern wird auch durch lösliche Faktoren, wie z.B. das Komplementsystem und Lektine sowie auch durch mikrobielle Peptide ermöglicht. Im weiteren Verlauf wird die Immunreaktion durch Sekretion von inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen, durch Antigenpräsentation humaner Leukozytenantigene (HLA) sowie die Expression kostimulierender Moleküle gesteuert. Des Weiteren kommt es zur klonalen Proliferation der dieses Antigen erkennenden naiven CD4-T-Lymphozyten, um die Aktivierung von B-Lymphozyten, CD8-T-Lymphozyten und weiterer Makrophagen zu gewährleisten [Janeway und Medzhitov 2002].

1.3 PAMPs und PRRs

Bei den PAMPs handelt es sich um Strukturmerkmale von Mikroorganismen und Viren. Beispiele dafür sind Peptidoglykane (PGs), Lipoteichonsäuren (LTAs), Mannane, Glykane, bakterielle DNA, doppelsträngige RNA sowie Lipopolysaccharide (LPS) [Aderem et al. 2000]. Sie sind für das Überleben der Mikroorganismen essentiell und erschweren dadurch die Entwicklung so genannter „escape-Mutanten“, welche sich wiederum der Detektion unseres Immunsystems entziehen könnten. Weiterhin sind die PAMPs innerhalb einer Klasse von Mikroorganismen gleich, so dass das System der angeborenen Immunität mit einer wesentlich geringeren Anzahl an Rezeptoren auskommt als das jedes Antigen spezifisch erkennende erworbene

Immunsystem [Medzhitov 2001]. Die PRRs des angeborenen Immunsystems lassen sich funktionell in drei Klassen einteilen, die sowohl auf der Zelloberfläche und intrazellulär als auch als sezernierbare Rezeptoren vorkommen [Medzhitov und Janeway, 2000]. Sezernierte Rezeptoren binden an mikrobielle Zellwände, diese sind infolgedessen zur weiteren Erkennung durch das Komplementsystem und der Phagozyten markiert und wirken somit als Opsonine. Endolytische Rezeptoren kommen auf der Oberfläche von Phagozyten vor und stimulieren die Aufnahme erkannter Mikroorganismen.

Bei der dritten Gruppe handelt es sich um signaltransferierende Rezeptoren. Sie sind membranständige Makromoleküle bzw. Komplexe, die nach der Erkennung von PAMPs eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen, die dann die veränderte Expression verschiedener Gene induziert. Dazu gehören Gene, die für PRRs und Bestandteile ihrer intrazellulären Signalwege selbst, für antimikrobiell wirksame Substanzen oder für proinflammatorische Zytokine codieren [Medzhitov und Janeway 2000].

Zur letztgenannten Gruppe zählen die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die in den Fokus der immunologischen Forschung der letzten Jahre gerückt sind.

1.3.1 Toll-like-Rezeptoren

Der Toll-Rezeptor wurde erstmals 1985 in der Taufliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Anderson et al. zeigten, dass dieses Gen bei *Drosophila* entscheidend für die dorsoventrale Polarisierung in der Ontogenese ist. Die zytoplasmatische Domäne des *Drosophila* Toll-Rezeptors (Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne (TIR)) weist Sequenzhomologien zum humanen Interleukin-1-Rezeptor auf und man stellte fest, dass der Signaltransduktionsweg des Toll-Rezeptors ebenso zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor- κ B (NF κ B) führt [Belvin et al. 1996]. Darauf basierend wurde angenommen, dass der Toll-Rezeptor vermittelte Signalweg an der Regulation der Immunantwort beteiligt ist.

Lemaitre et al. konnten 1996 diese Annahme bestätigen, indem sie zeigten, dass antifungale und antimikrobielle Proteine nach der Aktivierung von Mitgliedern der *Drosophila*-Toll-Rezeptor-Familie induziert werden.

1997 entdeckten Medzhitov et al. als erste einen dem Toll-Rezeptor von *Drosophila melanogaster* homologen Rezeptor beim Menschen. Dieser wurde später als Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) bezeichnet. Bis heute sind 11 Toll-like-Rezeptoren und drei Homologe dieser Familie auf den Chromosomen 1, 3, 4 und 9 lokalisiert worden. Von den Rezeptoren werden unterschiedliche Liganden erkannt, die zur Aktivierung des jeweiligen Rezeptors führen und damit eine Signalkaskade auslösen. Der TLR stimuliert so u.a. Makrophagen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und antimikrobieller Moleküle sowie initiiert die Reifung von dendritischen Zellen [Janeway und Medzhitov 2002]. Man hat bei PAMPs erkennenden PRRs die Vorstellung, dass bestimmte molekulare Muster von Krankheitserregern durch einen bestimmten keimbahncodierten Rezeptor erkannt werden. Diese These der molekularen Spezifität konnte für die Toll-like-Rezeptoren bestätigt werden [Meier et al. 2003; Poltorak et al. 1998; Tabet et al. 2004; Underhill et al. 1999]. Eine Reihe von natürlichen Liganden sind inzwischen für beinahe alle TLRs ermittelt worden.

1.3.2 TLR-Signaltransduktion

Nach Aktivierung der Toll-like-Rezeptoren durch einen entsprechenden Liganden folgt die Signaltransduktion basierend auf einer Kaskade intrazellulärer und biochemischer Abläufe. Durch Proteininteraktionen, Phosphorylierungen und Konformationsänderungen wird eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bewirkt, die ihrerseits wiederum die Transkription der für die Immunantwort notwendigen Gene initiieren.

Die Toll-like-Rezeptoren aktivieren unterschiedliche Signalwege, deren Ausgangspunkt die TIR-Domäne des Rezeptors darstellt. Diese interagiert nun mit TIR-Domänen von verschiedenen Adaptormolekülen, so dass diese aktiviert werden. Bei dem als ersten beschriebenen Signalweg handelt es sich um die Aktivierung des Adapterprotein MYD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88), sie wird durch die Aggregation der TIR-Domäne an die TIR-Domäne des Adaptorproteins erreicht. Dieser Signalweg wird als MYD88-abhängiger Signalweg beschrieben [Takeda und Akira 2004] und kann von allen TLRs aktiviert werden, somit ist er essentiell für die Produktion inflammatorischer Zytokine. MyD88 ist aus einer TIR- und einer Todes-Domäne (death domain = DD) aufgebaut.

Ist es zur Aktivierung des MyD88 durch die TIR-Domäne des TLRs gekommen, so interagiert es über seine Todesdomäne mit dem ebenfalls eine Todesdomäne tragenden mit der IL1-Rezeptor assoziierten Kinase 4 (IRAK4), welche zur Stimulation und somit zur Autophosphorylierung von IRAK1 führt.

Als Folge der Autophosphorylierung kann sich nun das Adaptermolekül TRAF6 (tumor necrosis factor receptor associated factor 6) an IRAK1 anlagern. Die Einheit aus IRAK1 und TRAF6 dissoziiert nun vom zytoplasmatischen Teil des TLRs und interagiert mit dem an der Plasmamembran gelegenen Komplex aus TAK1 (transforming growth factor beta activated kinase 1) und TAB 1 und 2 (TAK1-binding protein). Dieser Komplex verlagert sich ins Zytoplasma, um dort über IKKs (I κ B-kinase-complex) den Abbau von I κ B einzuleiten. Da es sich bei I κ B (inhibitor of nuclear faktor κ B(I κ B)-kinase complex) um einen Inhibitor von NF κ B handelt, ist dieser Schritt gleichbedeutend mit der Aktivierung von NF κ B. Dieser wandert in den Zellkern und steuert dort als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen, die für an der Immunantwort beteiligte Stoffe kodieren (z.B. Gene für Interleukin-1 und Interleukin-6).

Kawai et al. konnten nachweisen, dass bei MyD88-Knockout-Mäusen trotz Stimulation mit Endotoxinen keine Aktivierung von NF- κ B durch TLR2, TLR7 oder TLR 9 stattfand. Allerdings konnte eine TLR4-induzierte NF- κ B-Aktivierung festgestellt werden. Dies lässt auf die Existenz eines MyD88-unabhängigen Signalwegs schließen. Demnach ist TLR4 dazu fähig, über eine weitere Signalkette von Adapterproteinen u.a. TRAM (Toll-receptor associated molecule), TRIF (Toll-receptor associated activator of Interferon- β) und TBK 1 (TANK-binding kinase 1) Transkriptionsfaktoren zu aktivieren. Dieser MyD88-unabhängige Signalweg kann des Weiteren von TLR3 induziert werden und führt zur Induktion von Interferon- β [Yamamoto et. al. 2003]. Ein weiteres TIR-Domänen enthaltendes Molekül wurde als TIR-Domänen-enthaltendes Adaptorprotein (TIRAP) identifiziert. Bei TIRAP-Knockout-Mäusen konnte auf die Stimulation des TLR2 oder TLR4 mit den jeweiligen Liganden keine Produktion von Zytokinen als positive Stimulationsantwort nachgewiesen werden, währenddessen TLR3, TLR7 und TLR9 jeweils normal auf die Stimulation reagierten.

Ferner konnte bei weiteren Versuchen mit MyD88/TIRAP-Knockout-Mäusen eine TLR4-induzierte Aktivierung von Interferon nachgewiesen werden. Somit ist

anzunehmen, dass TIRAP für den MyD88-abhängigen Signalweg von TLR2 und TLR4 erforderlich ist [Yamamoto und Akira 2004].

1.4 Studiendesign

Die vorliegende Studie wurde als Kandidatengen-Fall-Kontroll-Assoziationsstudie durchgeführt, um krankheitsspezifische Varianten zu identifizieren. Es wurden hierbei die Allel- und Genotypfrequenzen bestimmter genetischer Marker zwischen einer Fall- und Kontrollgruppe verglichen. Unter einer Assoziation wird das statistisch signifikant vermehrte oder reduzierte, abweichend von der Kontrollstichprobe, gemeinsame Auftreten eines bestimmten Allel-/ Genotyps mit dem untersuchten Phänotyp verstanden. Als genetische Marker werden heutzutage meist biallelische Einzelbasenpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) verwendet. Es handelt sich dabei um die häufigste Form von DNA-Variation im menschlichen Genom, wobei vom HapMap-Projekt ca. 10 Millionen SNPs identifiziert worden sind. Außerdem treten sie innerhalb einer Population definitionsgemäß mit einer Häufigkeit von mindestens 1% auf, andernfalls sind sie den Mutationen zugehörig. Die meisten SNPs scheinen keine physiologische Auswirkung zu haben, jedoch bilden einige von ihnen die genomische Grundlage der phänotypischen Variabilität. Diese sind überwiegend solche Polymorphismen, die zu Modifikationen in der Aminosäuresequenz führen (nonsynonymous SNPs, nsSNPs) oder welche durch ihre Lokalisierung im Promotor oder anderen regulatorischen DNA-Sequenzen einen Effekt auf die Expression eines Gens ausüben können oder Einfluss auf die Chromatinstruktur haben. So wird diesen SNPs ein prädisponierender Effekt auf die Ausprägung verschiedener Phänotypen (wie z.B. der DCM) zugeschrieben. Um die gesamte Haploinformation der untersuchten Gene zu erfassen, sind für die Studie tagging SNPs (tSNPs) ausgewählt worden.

1.4.1 Tagging-SNPs

Die Kenntnisse über die Haploblockstruktur des menschlichen Genoms erleichtern das Auffinden krankheits- bzw. phänotypassoziierter SNPs (siehe Abbildung 1). Die Haploblockstruktur wurde im Rahmen des Hapmap-Projektes [www.hapmap.org] mit

der Zielsetzung der kompletten Kartierung von Haploblöcken und -typen mit den dazugehörigen tagging SNPs analysiert.

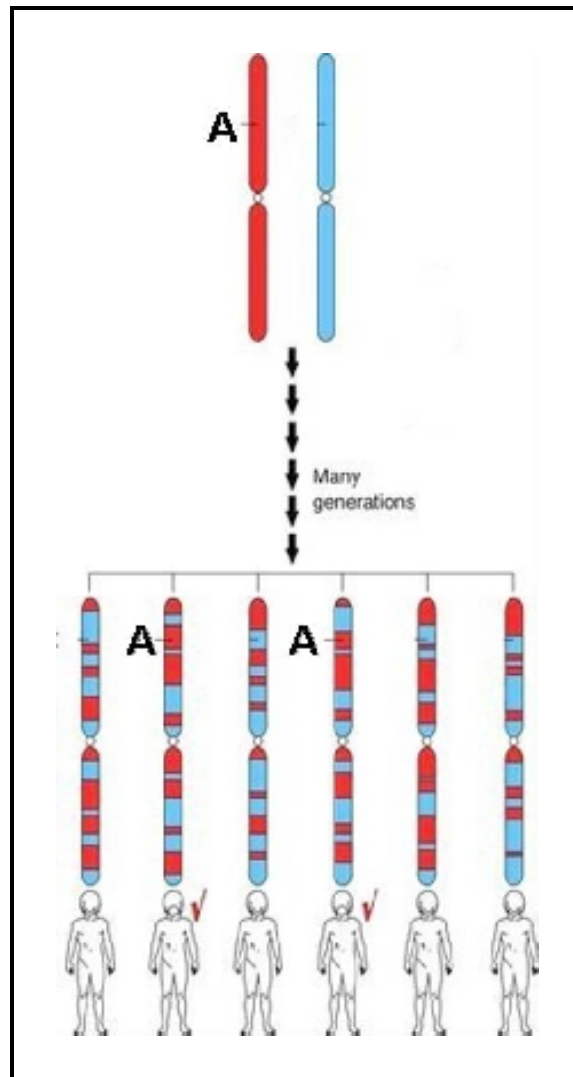


Abbildung 1: Das Diagramm zeigt zwei Vorfahren-Chromosomen. Sie sind durch Rekombination über viele Generationen vermischt worden, so dass verschiedene Nachkommen-Chromosomen hervorgebracht wurden. Wenn eine genetische markierte Variante A auf dem Vorfahren-Chromosom das Risiko für eine bestimmte Erkrankung steigert, werden die zwei Individuen in der gegenwärtigen Generation, welche diesen Teil des Vorfahren-Chromosoms erben, ein erhöhtes Risiko haben. Benachbart zu dieser markierten Variante A sind viele SNPs, welche genutzt werden können, um die Lokalisation der Variante A zu identifizieren.

Quelle HapMap-Projekt: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>

Als Haplotyp wird die Anordnung von SNP-Allelen in einem definierten chromosomalen Segment bezeichnet. Der Haplotypblock wird gekoppelt vererbt, währenddessen Rekombination zwischen den Blöcken stattfindet [Wang et al. 2002]. Die SNPs des Haplotyps stehen in einem statistisch wahrscheinlichen Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium, LD), wobei das LD die

überdurchschnittliche gemeinsame Auftretenshäufigkeit von Allelen auf einem Chromosom innerhalb einer Population bezeichnet. Des Weiteren charakterisiert ein standardisierter Koeffizient (D' von 0 bis 1) die Stärke des LD und somit die Wahrscheinlichkeit für eine gekoppelte Vererbung.

Infolgedessen kann aufgrund des Nachweises eines Marker-SNPs mit entsprechender Wahrscheinlichkeit auf die Identität des zweiten benachbarten SNP innerhalb eines Haplotypblocks geschlossen werden [Freudenberg et al. 2002].

SNPs, die eine hohe Kopplung zu den umliegenden Sequenzen aufweisen, markieren einen Haplotyp und werden auch als Haplotype-Tagging-SNPs (htSNPs) bezeichnet [Casas et al. 2006]. Somit genügt es, um die Identität eines Haplotypblocks genetisch vollständig zu erfassen, nur einen geringen Anteil der vorhandenen Polymorphismen zu identifizieren. Ein tSNP sollte eine definierte Allelfrequenz des selteneren Allels (minor allele frequency, minAF) von >5% haben, um in einer Stichprobe von 335 Fällen und 736 Kontrollen eine aussagekräftige Power (Abbildung 2) zu bekommen.

1.4.2 Statistische Signifikanz

Bei Fall-Kontroll-Assoziationsstudien ist die Abstimmung der Probandengruppen aufeinander von großer Bedeutung, um eine Populationsstratifizierung zu vermeiden. Wichtige Faktoren, auf die die Fall- und die Kontrollgruppe abgestimmt werden müssen, sind Alter, Geschlecht, Ethnizität und regionale Herkunft. Des Weiteren ist die klassische Fall-Kontroll-Studie durch ihre Retrospektivität sehr effektiv und erlaubt große Analysepopulationen im Sinne einer Populations-basierten Studie zu untersuchen [Casas et al. 2006]. Meine Mitarbeit befasste sich daher u.a. mit der Rekrutierung der klinischen Analysepopulation. Um stochastische Effekte auszugleichen, ist es erforderlich in großen Analysepopulationen eine mögliche Assoziation explorativ zu untersuchen und dann in einer bis mehreren unabhängigen umfassenden Stichproben die zunächst gefundene Assoziation zu replizieren.

Durch eine Wiederholung der Studie in unabhängigen und wenn möglich umfassenderen Stichproben, die sich an die Assoziationsstudie anschließt, können die bislang nur nominal statistisch assoziierten Ergebnisse validiert und wenn möglich in einer weiteren Stichprobe repliziert werden.

Die statistische Teststärke (statistische Power) beschreibt die Aussagekraft der Studie und zwar, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine in einer Population tatsächlich vorhandene Assoziation gefunden werden kann.

Die statistische Power ist von mehreren Faktoren abhängig. Zum Einen, wie häufig der betreffende SNP in der Bevölkerung vorkommt (Allelfrequenz), zum Anderen hängt sie vom Frequenzunterschied zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe ab und zuletzt von der Größe der Stichprobe.

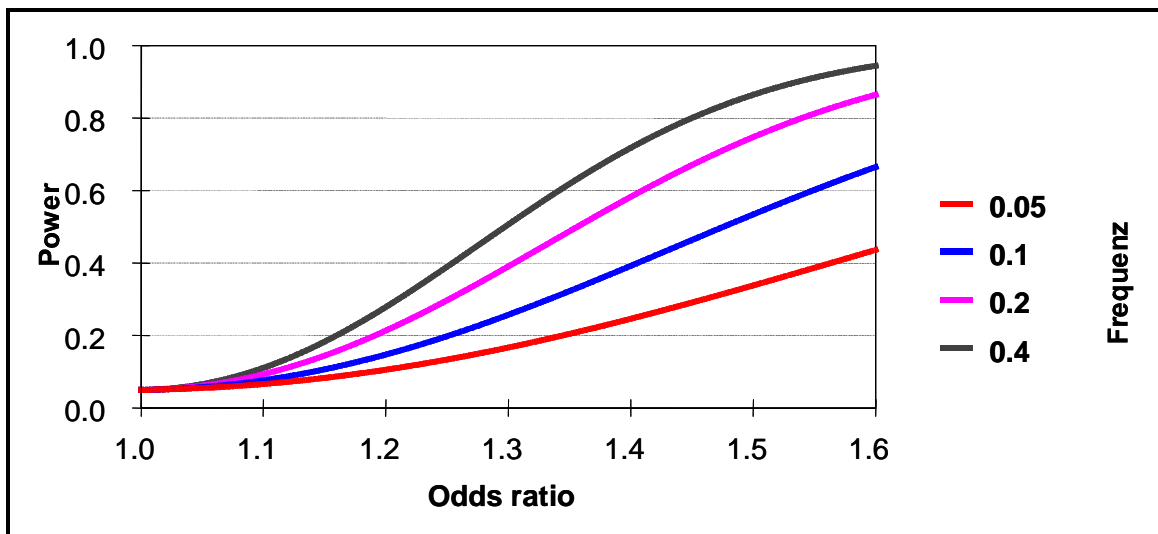


Abbildung 2: Statistische Teststärke für die explorative Studie

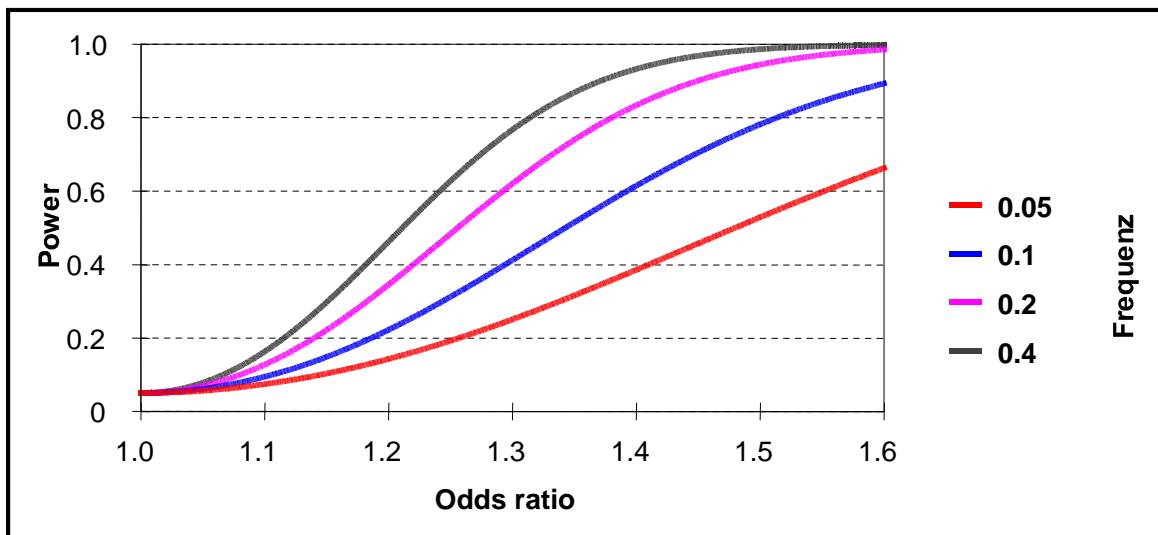


Abbildung 3: Statistische Teststärke für die Replikation

2 Fragestellung

Entzündliche Reaktionen im Myokard, welche durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems hervorgerufen werden, spielen eine große Rolle in der Ätiologie und in der Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie. Für die Toll-like-Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass ihre Aktivierung zu einer Immunantwort mit proinflammatorischen Mediatoren im Herzen (TNF- α , IL-1 β und NOS2) und zu einer messbaren kardialen Schädigung in Form einer linksventrikulären Dysfunktion führt [Knuefermann et al. 2002, Nemoto et al. 2002].

Die physiologischen Effekte infolge einer Aktivierung der Toll-like-Rezeptoren werden über einen transmembranen und intrazellulären Signaltransduktionsweg vermittelt. Nicht nur die Toll-like-Rezeptoren, sondern alle Bestandteile des Signaltransduktionswegs unterliegen einer genetischen Kontrolle. In der vorliegenden Arbeit werden die Untersuchungsergebnisse der groß angelegten populationsbasierten Fall-Kontroll-Assoziations-Studie vorgestellt. Die Untersuchung fand an 15 relevanten Genen des Toll-like-Rezeptor-Pathway auf genetische Varianten hin statt, bei denen Varianten mit dem Krankheitsbild der dilatativen Kardiomyopathie assoziiert sein könnten. Hierzu wurden die Genotypen von 132 Einzelbasen-Nukleotiden (single-nucleotide-polymorphisms, SNPs) identifiziert. Sie liegen innerhalb des Promotors oder in der transkribierten Sequenz von Genen, die für Liganden, Rezeptoren und Signaltransduktoren des TLR-Pathway kodieren.

3 Material und Methoden

3.1 Auswahl der Marker-SNPs

In der Populations-basierten Fall-Kontroll-Kandidatengen-Assoziations-Studie wurden 132 tagging single-nucleotide-polymorphismen (tSNPs) aus 15 Kandidatengenen des Toll-like-Rezeptor-Pathway untersucht (Tabelle 1). Mithilfe von Berechnungen aus Kopplungsungleichgewichts-Statistiken und Haplotyp-Mustern aus den HapMap CEU-Genotypen unter Verwendung der Haploview 3.2 Software wurde die Auswahl der zu untersuchenden tagging SNPs getroffen [Barrett et al. 2005].

Tabelle 1 zeigt die untersuchten 132 tSNPs der 15 Gene des Toll-like-Rezeptor-Pathway. Abbildung 4 stellt schematisch die untersuchten Gene im TLR-Signalpathway dar.

Tabelle 1: Die untersuchten 132 tSNPs der 15 Gene des Toll-like Rezeptor Pathway

Gen	Lokalisierung	Anzahl der untersuchten SNPs
<i>CD14</i>	5 (5q31.1)	2
<i>CD36</i>	7 (7q11.2)	15
<i>IRAK4</i>	12 (12q12)	14
<i>MyD88</i>	3 (3p22)	3
<i>TAB1</i>	22 (22q13.1)	1
<i>TAK1</i>	6 (6q16.1-q16.3)	10
<i>TBK1</i>	12 (12q14.1)	7
<i>TIRAP</i>	11 (11q24.2)	5
<i>TLR1</i>	4 (4p14)	4
<i>TLR2</i>	4 (4q32)	8
<i>TLR4</i>	9 (9q32-q33)	10
<i>TLR5</i>	1 (1q41-q42)	15
<i>TOLLIP</i>	11 (11p15.5)	12
<i>TRAF6</i>	11 (11p12)	9
<i>TRAM</i>	5 (5q23.1)	17

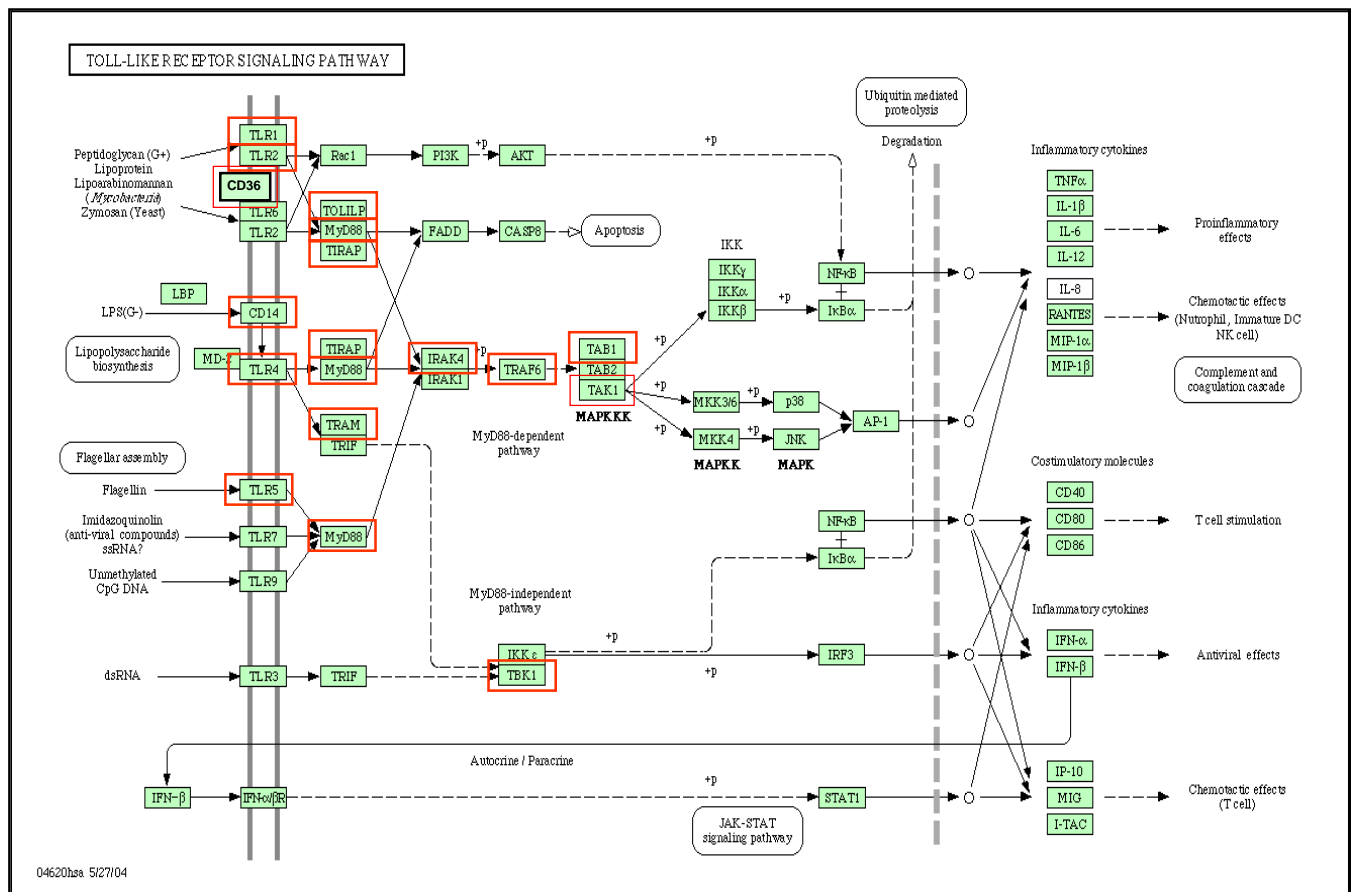


Abbildung 4: Toll-like-Rezeptor-Signaltransduktionsweg – Homo sapiens, modifiziert nach KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

3.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Die Patienten der Studie wurden im Zeitraum von 2002 bis 2006 durch das Popgen-Projekt rekrutiert. Die Abkürzung steht für „populationsgenetische Rekrutierung von Patienten und Kontrollen zur Analyse komplexer Genotyp-Phänotyp-Zusammenhänge“. Es ist ein Projekt des UK-SH und wird vom deutschen Nationalen Genomforschungsnetz (NGFN) sowie vom Bundesministerium für Bildung und Forschung unterstützt. Popgen soll die notwendigen Ressourcen zur Identifikation von Krankheitsgenen bereitstellen [Krawczak et al. 2006].

Für die explorative Assoziationsstudie wurde die Fallgruppe der klinischen Analysepopulation aus dem Großraum Kiel und die unabhängige Fallgruppe der Replikationsstudie aus der Region Heidelberg rekrutiert. Währenddessen die jeweiligen Kontrollgruppen aus dem Popgen-Untersuchungsgebiet in Schleswig-Holstein stammen.

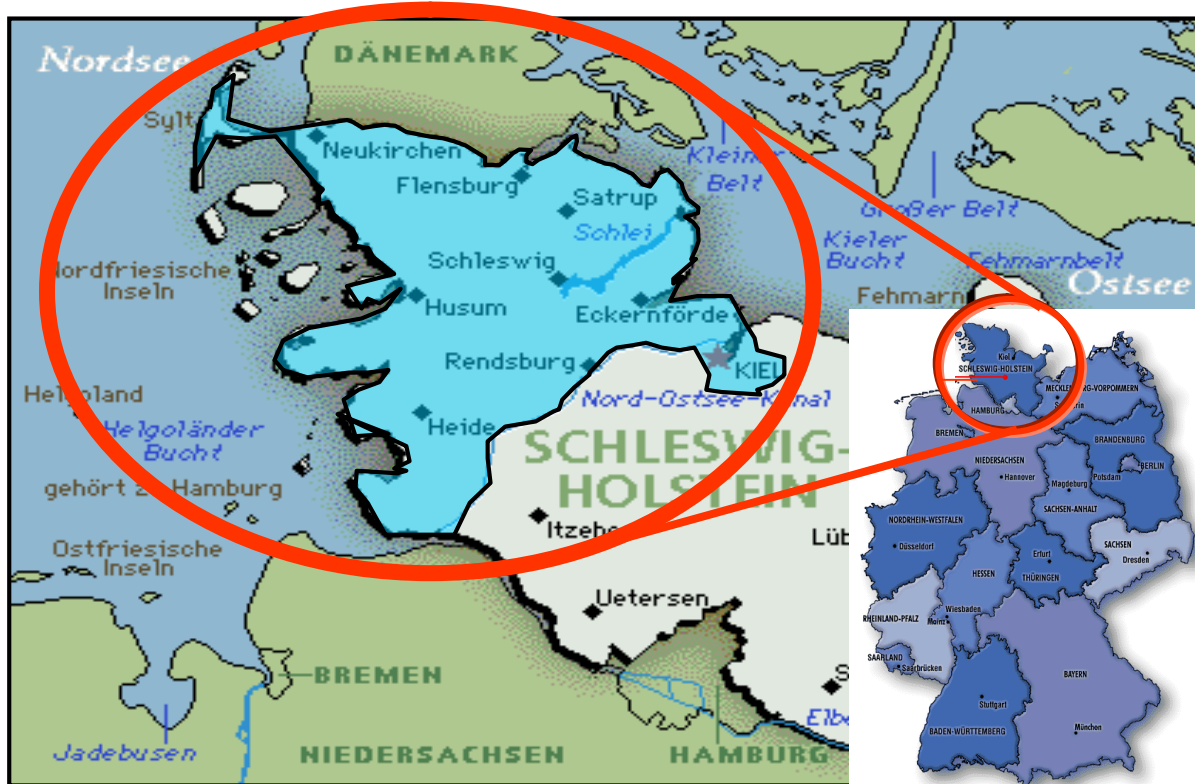


Abbildung 5: Popgen Untersuchungsgebiet (hell-blau hinterlegt) in Schleswig-Holstein

Dieses Gebiet grenzt im Norden an Dänemark, Nord- bzw. Ostsee bilden im Westen und Osten eine natürliche Grenze, währenddessen der Nord-Ostsee-Kanal als südliche Begrenzung des Zielgebiets gewählt wurde. Es leben in dieser Region circa 1,1 Millionen Menschen. Geringe Migrationsraten ergeben sich aus der relativen geographischen Isolation dieser Region und sind für Populations-repräsentative Analysepopulationen essentiell [Krawczak et al 2006]. Genetische Unterschiede innerhalb Deutschlands sind eher minimal [Steffens et al. 2006] und zwischen Nord- und Süd-Deutschland als sehr gering einzuschätzen [Lao et al. 2008], so dass sich die Allelfrequenzen der im Rahmen dieses Projektes untersuchten SNPs nicht wesentlich unterscheiden. Dies zeigten Lao et al. ferner dadurch auf, dass in Deutschland ein geringes Maß an genetischer Differenzierung zwischen den zwei Subpopulationen vorliegt (Abbildung 6). Insofern konnte aus genetischer Sicht unbedenklich für die Studie eine Fallgruppe aus der Region Heidelberg rekrutiert werden.

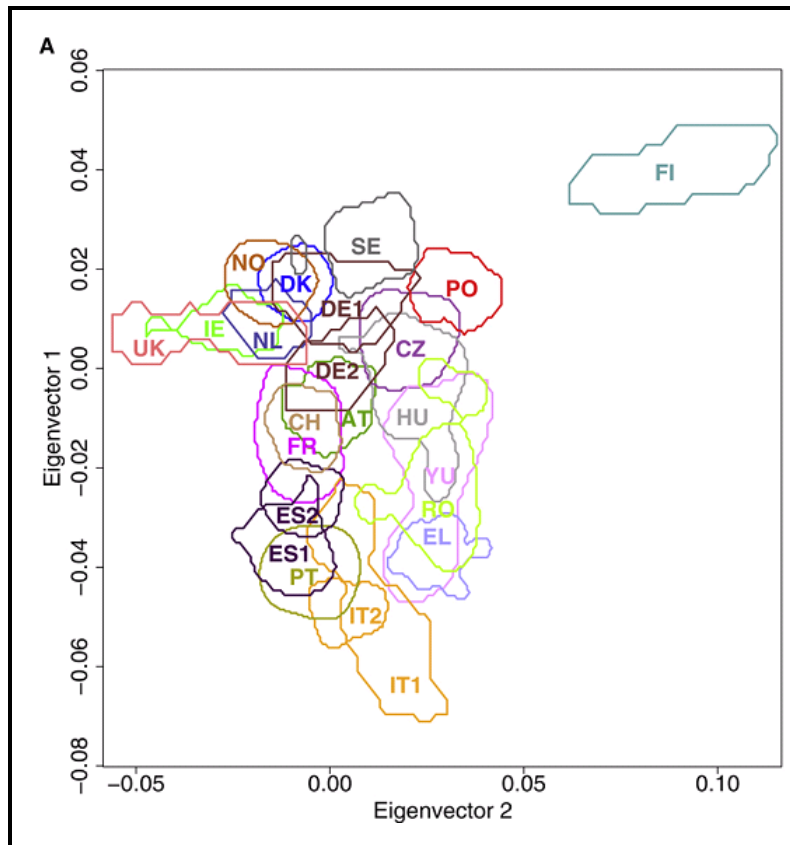


Abbildung 6: SNP basierte Principal-component Analyse (PCA) an 2457 Individuen aus 23 Subpopulationen europäischer Herkunft. Die beiden deutschen Subpopulationen (DE1-Schleswig-Holstein und DE2-Raum Augsburg) unterscheiden sich kaum (Kernel Density plot der ersten zwei Dimensionen der SNP basierten PCA, welche diese 309790 SNPs vom GeneChip Human Mapping 500K Array Set (Affymetrix) untersuchten, diese hielten der Qualitätskontrolle stand).

3.2.1 Einschlusskriterien

Die Kriterien für eine DCM waren eine lävokardiographische Ejektionsfraktion (EF) unter 50%, keine oder nicht signifikante KHK und keine primären kardialen Vitien. In die Studie wurden Patienten, bei denen durch eine Herzkatheteruntersuchung eine dilatative Kardiomyopathie diagnostiziert wurde, eingeschlossen.

Bei verbliebenen Unsicherheiten in den DCM-Diagnosen durch den Herzkatheter-Bericht und den Herzkatheter-Film wurden die Patientenakten und die Arztbriefe eingesehen und weitere Kriterien bewertet, die entweder einen Einschluss ermöglichten oder einen Ausschluss aus der Studie erforderten. Die zusätzlichen Kriterien des Einschlusses waren eine Verifizierung der signifikant eingeschränkten Pumpfunktion des Herzens, in erster Linie durch eine echokardiographische Untersuchung ermittelt. Der Ausschluss erfolgt durch den Nachweis einer

sekundären Form der DCM (am häufigsten eine ischämischen Ursache).

3.3 DNA-Isolierung und Herstellung von 96- und 384-well-Platten

3.3.1 Durchführung der DNA - Extraktion

Den Patienten wurde nach erfolgter Einverständniserklärung 30 ml peripher venöses Blut abgenommen, welches man bis zur DNA-Aufbereitung bei -80°C in Tris-EDTA-Puffer tiefgefroren aufbewahrte. Die Isolierung der DNA erfolgt unter Gebrauch des QIAGEN FlexiGene DNA Kits von QIAGEN gemäß Herstellerprotokoll, die dazubenenötigten Materialien sind in der folgenden Tabelle 2 gelistet.

Tabelle 2: Reagenzien und Geräte für die DNA-Extraktion

Reagenzien und Geräte	Anbieter
QIAGEN FlexiGene DNA Kit:	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Puffer FG1	
Puffer FG2	
QIAGEN® Protease	
100%iges Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
70%iges Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris- EDTA-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
50 ml SarstedtTubes	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

Zunächst werden nach dem Auftauen der Blutproben die Erythrozyten lysiert. Dies geschieht, indem 10 ml des Patientenblutes zusammen mit 25 ml Puffer FG1 in 50

ml Tubes pipettiert werden. Nach erfolgter Zentrifugation (fünf Minuten bei 2000 rpm) wird der Überstand abgegossen und man erhält ein leukozytenhaltiges Sediment.

Als Nächstes folgen die Lyse des Proteins und die Bindung von Kontaminationsstoffen, dazu werden 5 ml Puffer FG2 und 50 µl QIAGEN Protease zugegeben und zur Resuspension gründlich gevortext. Kommt es nicht zur Homogenität der Lösung, wird ein weiterer Milliliter FG2 hinzugegeben. Nach 25 minütiger Inkubation bei 65°C im Schüttelbad liegt die DNA in Lösung vor.

Anschließend findet die Präzipitation der genomischen DNA statt. Es wird dazu 5 ml 100%iges Isopropanol beigemischt und für drei Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss erfolgt das Waschen der DNA mit 70%igem Ethanol, darauf folgt die Zentrifugation für eine Minute bei 13000 rpm und das Abgießen des Überstandes, so dass die gereinigte DNA 20 Minuten bei Raumtemperatur trocknet, bis der Alkohol vollständig evaporiert ist. Letztlich wird sie unter Zugabe von 1ml Tris-EDTA-Puffer und dreistündiger Inkubation im Schüttelbad bei 65°C resuspendiert.

Die DNA wird langfristig bei -20°C aufbewahrt.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsmessung wird zunächst unter Verwendung des Tecan Genesis RSP 150 Pipettierroboters das Probenmaterial auf die deep-well-Verdünnungsplatten gebracht und der fluoreszierende Farbstoff PicoGreen® zugegeben. Der Farbstoff fluoresziert hierbei lediglich nach Anlagerung an doppelsträngige DNA. Die fluorometrische Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt mit dem Tecan Spectrafluor Plus Fluorometer.

Für die weitere Analyse der DNA werden definierte Mengen in einheitlicher Konzentration von 50ng/µl auf 96-well-Platten gebracht. Es wird beispielsweise auf eine 96-well-Platte die DNA von 92 Patientenproben gegeben. Die übrigen vier Kavitäten dienen als Kontrolle zur anschließenden Sequenzierung und den Analysen des TaqMan- und SNPlex-Assay (Applied Biosystems). Als Leerkontrollen werden drei Kavitäten verwendet. Die vierte Kavität wird mit DNA von CEPH-Zellen beschickt. CEPH-Zellen sind menschliche Zellen eines „Standardindividuums“ und stammen aus dem Centre d'Etude du Polymorphisme Humain in Paris.

Die angefertigten Platten werden für zwei Stunden bei 60°C getrocknet und nach Trocknung mit dem Platesealer ALPS-300 (für 1,5 Sekunden bei 145°C) verschlossen. Es ist nun möglich, die Platten bei Raumtemperatur bis zur Weiterverarbeitung zu lagern.

Tabelle 3: Reagenzien und Geräte zur Konzentrationsbestimmung, 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-Mikrotestplatten	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

3.3.3 Whole Genome Amplification und Plattenherstellung

Die Whole Genome Amplification (WGA) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA [Lovmar und Syvänen 2006] und basiert auf dem Prinzip der Polymerase-

Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR). Sie unterscheidet sich insofern zur herkömmlichen PCR, indem sie nicht in Temperaturzyklen, sondern isothermal abläuft. Insbesondere wird die Multiple displacement amplification (MDA) [Dean et al. 2002] angewendet, da man die DNA-Polymerase des Bakteriophagen phi29 von *Bacillus subtilis* verwendete. Als Ausgangsmaterial genügen bereits wenige Nanogramm an DNA, um eine Vervielfältigung um das 1000- bis 10000fache zu erreichen. Während der Reaktion steigt die DNA-Konzentration exponentiell an und endet selbstlimitierend in einer Plateauphase.

Zur Durchführung der WGA wurde das GenomPhi V2 DNA Amplification Kit von GE Healthcare verwendet. Es wurden 1 µg der ursprünglichen DNA oder 50 ng/µl der Aliquots als Ausgangsmaterial verwendet und zunächst zur Denaturierung mit dem Sample Puffer des Kits bei 95°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Amplifizierung durch die Zugabe des Enzym Mix und des Reaktionspuffers eingeleitet und für zwei Stunden bei 30°C inkubiert.

Nach Beendigung der WGA wurden die Materialproben erneut auf 96-deep-well-Verdünnungsplatten in der Plate Design Anordnung übertragen. Für eine SNPLex Genotypisierung des Materials wurden die Proben außerdem gemäß des SNPLex Protokolls fragmentiert.

Zur Hochdurchsatz-Typisierung wurden jeweils vier dieser deep-well-Platten per Tecan Pipettierroboter mit te-mo Zusatzmodul (96-Nadel-Einheit) in eine 384-deep-well-Platte überführt. Der Robbins Scientific®Hydra™ 384 Mikrodispenser brachte im Anschluss den Inhalt der deep-well-Platten auf die 384-Mikrotiter-PCR-Platten.

Diese können auch bei Raumtemperatur nach Trocknung und Versiegelung bis zur Genotypisierung gelagert werden.

3.4 Genotypisierung

3.4.1 TaqMan-Genotypisierung

Die TaqMan-Genotypisierung ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren gemäß dem bekannten PCR-Prinzip [Mullis et al. 1986].

Hinzukommt, dass sie auch die Detektion und die quantitative Analyse definierter DNA-Sequenzen (SNPs) ermöglicht [Livak et al. 1995]. Es werden hierzu Fluoreszenzmessungen während und auch am Ende des PCR-Zyklus durchgeführt.

Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte im Verlauf der Messungen zu. Diese Messungen geschehen mit Hilfe von TaqMan-Sonden, welche 1993 von Lee et al. bei Applied Biosystems entwickelt wurden [Lee et al. 1993].

TaqMan-Sonden, auch Hydrolyse-Sonden genannt, nutzen den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Bei diesem von Theodor Förster 1946 entdeckten physikalischen Prozess [Förster 1948] wird die Energie eines durch eine Lichtquelle angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Donor-Fluorophor, Reporter) strahlungsfrei auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor-Fluorophor, Quencher) übertragen, der sich in ausreichender Nähe befindet. Auf diese Weise nehmen das Fluoreszenzsignal des Donor-Fluorophors ab und das des Akzeptor-Fluorophors zu. Währenddessen sich bei zunehmendem Abstand zwischen Quencher und Reporter die Stärke des Fluoreszenzsignals zu Gunsten des letztgenannten verschiebt, da der FRET abnimmt.

Die TaqMan-Sonde ist ein Oligonukleotid, welches komplementär an die untersuchende Sequenz (SNP) bindet und an seinem 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (FAM: 6-Carboxy-Fluorescein oder VIC® von Applied Biosystem) und am 3'-Ende den Quencher (TAMRA: 6-Carboxy-Tetra-Methyl-Rhodamin) trägt. Es werden zwei unterschiedliche Reporter-Farbstoffe gewählt, wenn gleichzeitig zwei Allele zu untersuchen sind. Die Reporter-Farbstoffe unterscheiden sich durch das Fluoreszieren bei unterschiedlicher Wellenlänge, so dass Fam für das eine und VIC® für das andere Allel spezifisch ist.

Die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs wird bei intakten TaqMan-Sonden durch den Quencher wegen der strahlungsfreien Energieübertragung (FRET) unterdrückt. Während der PCR kommt es zur Hybridisierung der Oligonukleotide mit dem komplementären Strang, die Reporter-Fluoreszenz bleibt zunächst noch unterdrückt. Zusätzlich zur Synthese des Gegenstranges besitzt die Taq-Polymerase auch 5'-3'-Exonuklease-Aktivität. Das 5'-Ende der Sonde wird abgebaut, dadurch entfernen sich der Quencher und der Reporter-Farbstoff voneinander, so dass eine steigende Reporter-Fluoreszenz entsteht, die entsprechend der Produktmenge der amplifizierten Gensequenzen gemessen werden kann.

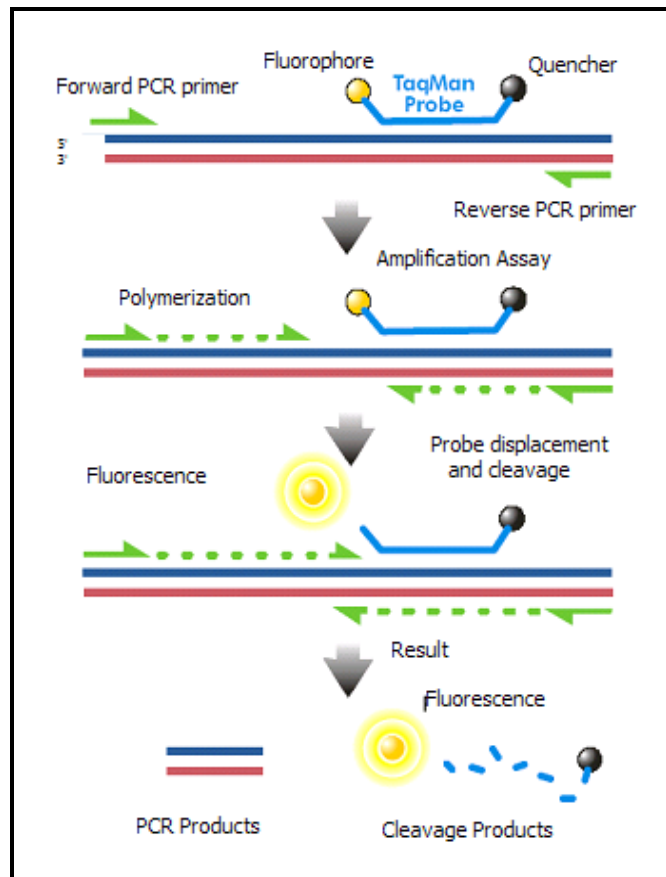


Abbildung 7: Prinzip des TaqMan-Assays

Insbesondere wurde die TaqMan-MGB (minor groove binder) -Sonde verwendet. Sie stellt eine Weiterentwicklung des bereits beschriebenen Sonden-Designs dar, an deren 3'-Ende man zusätzlich einen MGB synthetisierte (siehe Abbildung 8). Dies führt zur stabileren Bindung der Sonde in die kleine Furche der DNA (minor groove) an den komplementären DNA-Strang und macht es möglich, kürzere Sonden einzusetzen. Weiterhin ist das Fluoreszenzsignal zur Detektion gegenüber dem Grundleuchten angehoben und die Diskriminierung zwischen exakt hybridisierten und fehlerhaft hybridisierten Sonden (mismatch) erfolgt wesentlich genauer [Afonina et al. 1997, Kutuyavin et al. 1997].

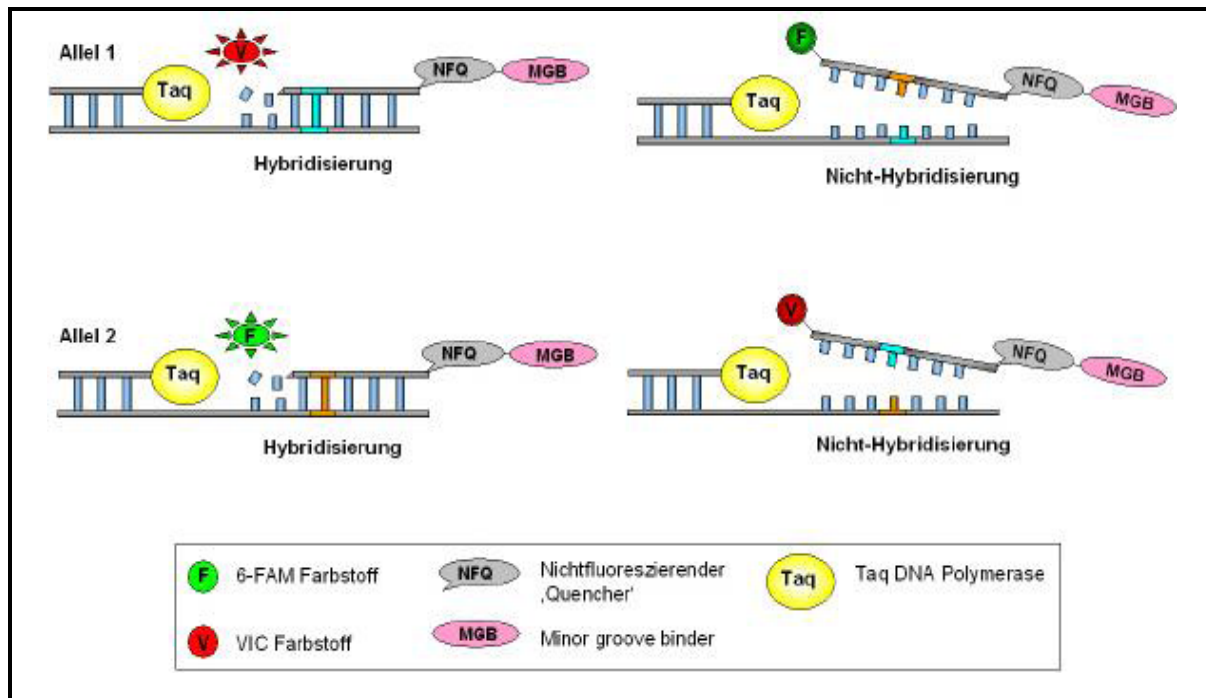


Abbildung 8: Prinzip des TaqMan-Assays

3.4.1.1 Durchführung der PCR mittels TaqMan Technologie

Das TaqMan Verfahren verwendet die PCR-Messplatten, dabei ist jede Kavität mit 2,5 ng DNA befüllt. Zu Beginn wird der DNA aus einem Master Mix die entsprechende Menge des Reaktionsgemisches, bestehend je aus 2,5 µl TaqMan Genotyping Master Mix, 0,0625 µl des entsprechenden Assay und 2,4375 µl deionisiertem Wasser unter Verwendung der Tecan Genesis Workstation 150 zugegeben. Die für die PCR erforderliche AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase sowie auch die Mischung an Nukleotiden für die Neustrangsynthese ist im TaqMan Genotyping Master Mix enthalten. Der auch zugefügte Assay besteht aus den zwei sequenzspezifischen Primern und Sonden für die beiden Allele, so dass dabei eine Sonde über den FAM- und die andere über den VIC®-Farbstoff verfügt. Anschließend werden die Platten mit einer durchsichtigen Folie, dem AB-0558 Adhesive PCR-Film, abgedeckt. Mit Hilfe des Gene Amp®PCR Systems 9700 und dem Biometra®T1 Thermocycler erfolgt dann die Amplifikation der DNA-Stränge. Es beginnt zunächst mit einer Inkubationsphase über zehn Minuten bei 95°C, welche die Aktivierung der AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase forciert. Die eigentliche Polymerase-Ketten-Reaktion verläuft daraufhin in 45 PCR-Zyklen, dabei wird jeweils zur Denaturierung der DNA-Stränge 15 Sekunden bei 95°C, zur erneuten

Anlagerung der Primer (Annealing), eine Minute bei 60°C und zur Strangverlängerung eine Minute bei 72°C inkubiert. Nach dem letzten Zyklus kühlt der Thermocycler auf 4°C ab und es findet außerdem eine kurze Zentrifugation des Reagenzes statt, um das Entweichen möglicher entstandener Luftblasen zu gewährleisten. Im Anschluss an die TaqMan-PCR erfolgt die Messung des Fluoreszenzsignals, wie zuvor beschrieben.

Tabelle 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

3.4.2 SNPLex Genotypisierung

Durch das SNPLex Verfahren können in einer Reaktion parallel bis zu 48 SNPs genotypisiert werden, währenddessen die TaqMan-Methode lediglich einen SNP untersucht [de la Vega et. al. 2005]. Das Verfahren basiert auf einem Oligonukleotid-Ligations-Assay (OLA) und einer PCR zur Amplifizierung der Zielsequenz und zur Diskriminierung der Allele.

Zu Beginn findet die OLA-Reaktion statt [Tobler et al. 2005], welche die spezifische Bindung von Sonden an die SNP-Region darstellt.

Im zweiten Schritt werden die gebundenen Sonden vom DNA-Strang getrennt und darauf folgend durch die PCR amplifiziert.

Die PCR-Produkte werden weiterhin mit fluoreszierenden Markern (ZipChute) unterschiedlicher Länge hybridisiert, so dass nach Separierung der Marker die Auftrennung dieser durch die Kapillar-Elektrophorese nach Größe und daraufhin die Auswertung erfolgt.

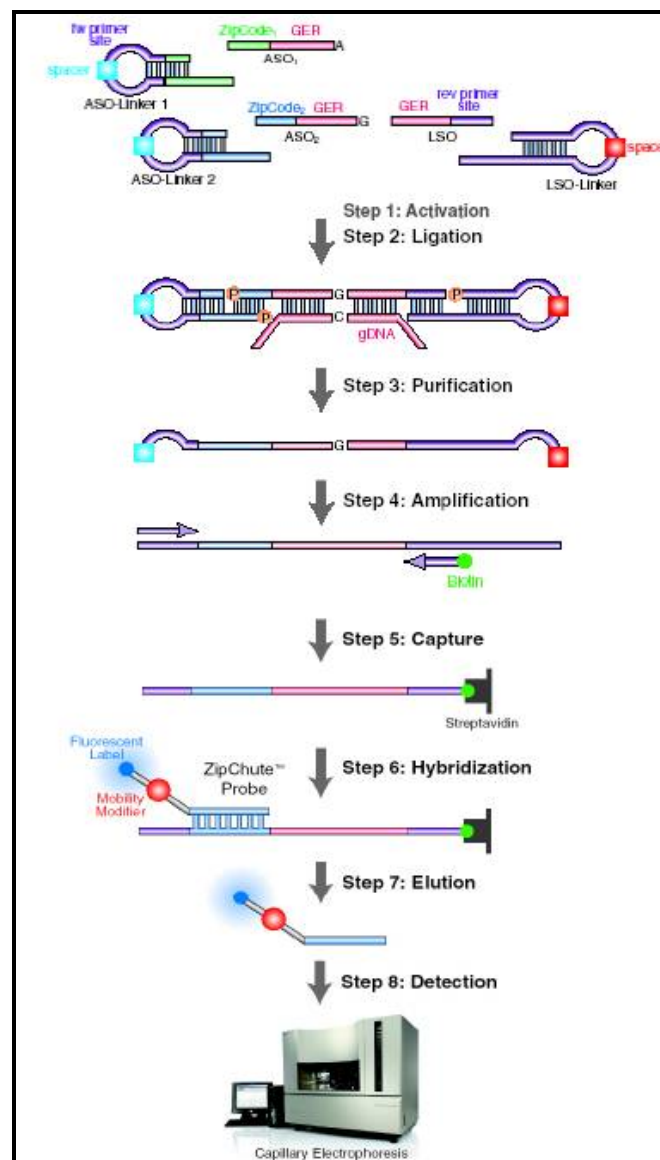


Abbildung 9: Prinzip des SNIPlex-Assays

In der OLA-Reaktion werden drei SNP-spezifische Oligonukleotide verwendet, und zwar zwei allelspezifische Oligos (ASOs) und ein lokusspezifisches Oligonukleotid

(LSO). Die ASOs binden sich je an ein Allel der SNP Sequenz und enthalten zusätzlich jeweils eine spezifische ZipCode-Sequenz zur Bindung der ZipChute-Proben. Bei dem LSO handelt es sich um eine nicht allelspezifische Frequenz, die neben dem SNP an die DNA-Zielsequenz bindet. Außerdem enthält jedes LSO eine universelle Reverse-Primer-Bindungssequenz. Zusätzlich kommen universelle Linker zum Einsatz. Sie binden sich an das ASO oder LSO und beinhalten eine Spacer Funktion, welche den späteren Abbau durch Exonukleasen verhindert. Die ASO-Linker halten die universelle Forward-Primer-Bindungssequenz vor.

Der zweite Schritt beinhaltet den Abbau aller nicht oder nur unvollständig gebundenen Oligonukleotide der genomischen DNA und dem äußeren Anteil der Linker bis zum Spacer durch die 5'- und 3'-Exonukleasen. Im Anschluss werden die verbleibenden Produkte aus SNP-Allel, ASO und LSO mittels PCR mit universellen Primern amplifiziert. Durch die Biotinmarkierung dieser PCR-Primer werden während der PCR die amplifizierten Produkte mit einem Biotinrest versehen und im vierten Schritt so auf mit Streptavidin beschichteten Mikrotiter-Platten gebunden, währenddessen unmarkierte Amplikons durch verschiedene Waschschriffe entfernt werden. Die verschiedenen ZipChute Marker repräsentieren nach Zugabe und Bindung den Genotyp. Für jeden SNP gibt es zwei ZipChute Marker, eine pro Allel und jedes Allelpaar ist mit denselben Fluoreszenzmarkern versehen. Die Diskriminierung der zwei Allele erfolgt nun nach Mobilitäts-Modifikatoren, welche eine Auftrennung der Proben während der Kapillar-Elektrophorese ermöglichen.

Die SNPlex Genotypisierung wurde nach dem SNPlex Protokoll, wie von Applied Biosystems vorgesehen, mit dementsprechenden Geräten durchgeführt. Weitere Informationen geben der SNPlex Genotyping System 48-plex User Guide aus dem Jahr 2007 von Applied Biosystems (<http://www3.appliedbiosystems.com>).

3.4.3 Auswertung der Fluoreszenzmessungen von Taqman und SNPlex

Zur Auswertung der Genotypisierung wird das ABI Prism® 7900 HT Sequence Detection System verwendet. Es leitet über ein Glasfaserkabel ein Laserlicht mit einer Wellenlänge von 488 nm auf die 384-well-Platten mit dem zu untersuchenden Probenmaterial. Die dabei entstehende Fluoreszenzemission wird anschließend von einem Spektrographen mit der CCD-Kamera (charge-couplet device camera)

gemessen und ausgewertet. Die Zuordnung der Genotypen erfolgt über ein Punktwolken- (Scatterplot-) Diagramm (vgl. Abbildung 10). Bei diallelischen Assays entstehen drei Punktwolken, welche die Genotypen der homozygoten und heterozygoten Allele repräsentieren. Des Weiteren stellt eine vierte Punktwolke in der Nähe des Ursprungs des Koordinatensystems das Signal der Leerwerte, Kontrollproben ohne DNA-Gehalt, dar. Zur weiteren Qualitätskontrolle wird die Allelzuordnung, welche von der Software v.2.0 automatisch durchgeführt und von der GeneMapper Analysis Software v.3.5.1 analysiert wurde, manuell kontrolliert. Die ermittelten Genotypen werden als Textfile exportiert und darauf folgend in eine SQL-Datenbank IBDbase importiert, welche dann die Basis der statistischen Analyse bildet.

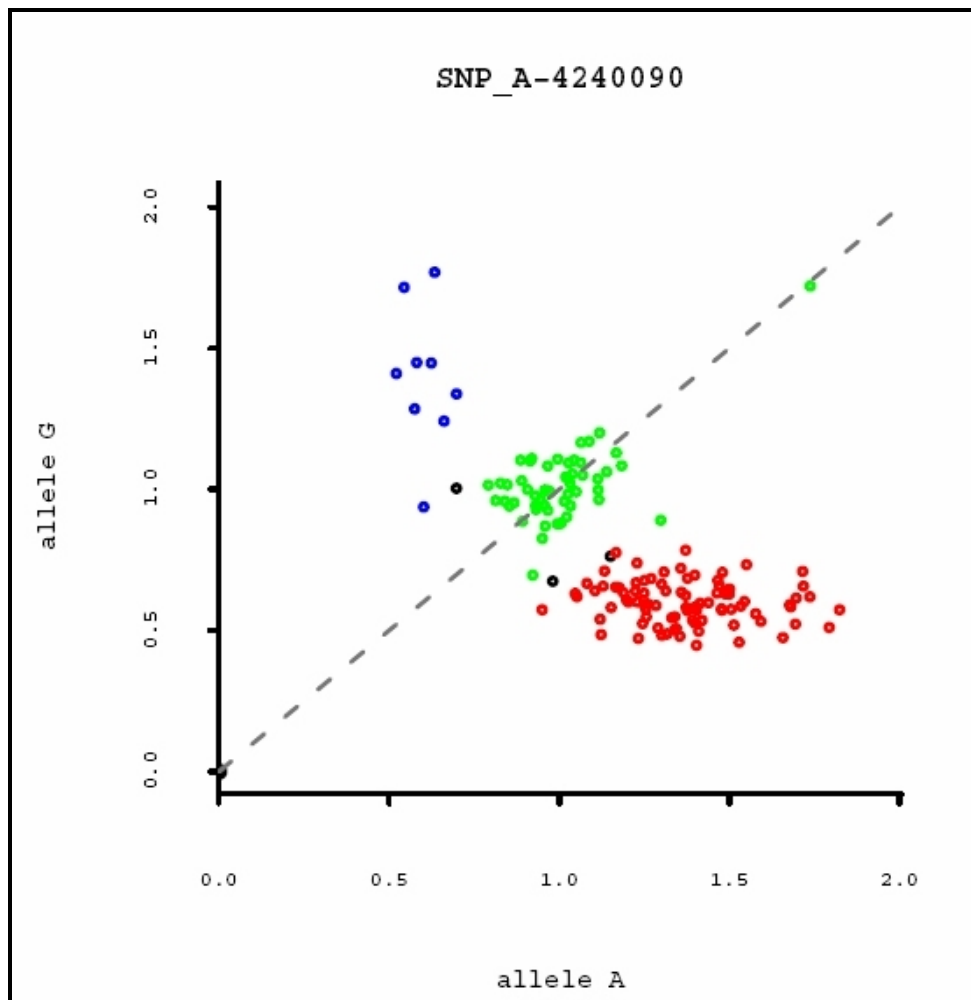


Abbildung 10: SNPLex-Fluoreszenzcluster

3.5 Statistik

3.5.1 Qualitätskontrolle der Genotyp-Daten

Die Verwaltung und Speicherung von Patientendaten, Plattenzuordnung der Proben, Genotypisierung und Markercharakteristika erfolgt in einem laboreigenen Datenbank Management System [Laboratory Information Management System; LIMS; HAMPE et al. 2001].

Zur Qualitätskontrolle wurde das Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) unter Anwendung des χ^2 -Testes berechnet. Dem HWE liegt ein theoretisches Modell zugrunde, dass Allelfrequenzen genutzt werden können, um die Genotypfrequenzen einer stabilen Population (unter Ausschluss von Migration, natürlicher Selektion oder nicht zufälligem Paarungsverhalten) vorherzusagen. Es hat für die meisten menschlichen Populationen seine Gültigkeit [Wigginton et al. 2005]. Eine Population befindet sich laut Modellvorstellung im Hardy-Weinberg-Equilibrium, wenn die Allel- und Genotypfrequenzen über viele Generationen stabil bleiben. Weichen die Genotypfrequenzen allerdings vom Erwartungswert des Gleichgewichts signifikant ab, kann davon ausgegangen werden, dass eine oder mehrere Annahmen dieses Modells gestört sind. In Fall-Kontroll-Assoziationsstudien kann eine solche Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht einen Genotypisierungsfehler [Xu et al. 2002], eine Populationsstratifizierung oder, bei betroffenen Fällen, eine sehr starke Selektion des Markers auf die Erkrankung indizieren [Wigginton et al. 2005]. Letzteres ist für das Studiendesign der Populations-repräsentativen Fall-Kontroll-Studie nicht zu erwarten, da häufige Marker mit geringen Effekten untersucht werden, die nicht einer starken Selektion unterliegen und in einer normal verteilten stabilen Population vorkommen. Aus diesem Grund werden Marker von der weiteren Analyse ausgeschlossen, welche in der Kontrollgruppe signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abweichen ($p < 0,05$), da diese Abweichungen auf Genotypisierungsfehler schließen lassen. Entsprechend auch solche, deren Genotypisierungserfolgsrate (Call rate, CR) unterhalb von 95% liegen. Diese Kriterien selektieren diese Marker von der Analyse aus, da das Risiko einer falsch beobachteten Assoziation besteht. Ebenso wird eine Allelfrequenz des selteneren Allels (Minor allele frequency, minAF) von $>5\%$ gefordert, da eine niedrigere Frequenz bei den Trägern für das Auffinden eines signifikanten Allels in der in dieser Arbeit

verwendeten Stichprobengröße nicht ausreicht. Weiterhin findet eine manuelle Kontrolle der Allelzuordnung, welche vorher durch die Software erfolgt war, für alle verwendeten SNPlex- und TaqMan-Sonden statt.

3.5.2 Statistische Analyse

Die Auswertung der Allel- und Genotypdaten wurde als Fall-Kontroll-Assoziationsanalyse (case control, CC) unter Berechnung eines χ^2 -Tests und einer Schätzung der Odds Ratio (OR) durchgeführt. Außerdem erfolgte eine Bonferroni-Korrektur zur Anpassung des Signifikanzniveaus für multiples Testen. Die assoziationsbasierte Analyse der Studie gründet sich auf dem Vergleich sowohl von allelischen als auch von genotypischen SNP-Frequenzen zwischen den betroffenen Personen (Fälle, DCM-Erkrankte) und nicht betroffenen Kontrollpersonen.

Zur Bestimmung, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den erhaltenen Genotyp- bzw. Allelfrequenzen besteht, wurde der Mehrfelder- χ^2 -Test nach Pearson [Ott 1985] durchgeführt. Dieser überprüft die Unabhängigkeit zweier Merkmale, indem der Unterschied zwischen dem Beobachtungswert und dem Erwartungswert bei Merkmalsunabhängigkeit bestimmt wird. In dieser Fall-Kontroll-Studie ist das eine Merkmal der Phänotypstatus (DCM-Erkrankter) und das andere Merkmal der Genotyp des bilallelischen Markers 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, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war (P_{CCA} = p-Wert des allelbasierten Fall-Kontroll- χ^2 -Tests; P_{CCG} = p-Wert des genotypbasierten Fall-Kontroll- χ^2 -Tests).

$$\chi^2 = \frac{((2n_{11} + n_{12}) * (m_{12} + 2m_{22}) - (n_{12} + 2n_{22}) * (2m_{11} + m_{12}))^2 * 2(n + m)}{(2n_{11} + n_{12} + 2m_{11} + m_{12}) * (n_{12} + 2n_{22} + m_{12} + 2m_{22}) * 2n * 2m}$$

n_{11} :Anzahl der Fälle homozygot für Allel 1
 n_{22} :Anzahl der Fälle homozygot für Allel 2
 n_{12} :Anzahl der Fälle heterozygot
 m : Anzahl der Kontrollen

Abbildung 11: Beispiel für die Berechnung des allelischen χ^2 -Wert

Diese Berechnung basiert auf einer 2x2-Felder-Kontingenztafel (Tabelle 5) mit einem Freiheitsgrad.

Tabelle 5: 2x2-Felder-Kontingenztafel für die Berechnung des allelischen χ^2 -Wertes (n = Anzahl der Fälle, m = Anzahl der Kontrollen)

	Allel		Σ
	1	2	
Fälle	$2n_{11} + n_{12}$	$n_{12} + 2n_{22}$	$2n$
Kontrollen	$2m_{11} + m_{12}$	$m_{12} + 2m_{22}$	$2m$

Die Analyse der Genotypdaten wurde unter Verwendung der 2x3-Felder-Kontingenztafel (Tabelle 6) durchgeführt, wobei die χ^2 -Verteilung der Teststatistik unter der Nullhypothese hier zwei Freiheitsgrade hat.

Tabelle 6: 2x3-Felder-Kontingenztafel für die Berechnung des genotypischen χ^2 -Wertes (n = Anzahl der Fälle, m = Anzahl der Kontrollen)

	Genotyp			Σ
	1/1	1/2	2/2	
Fälle	n_{11}	n_{12}	n_{22}	n
Kontrollen	m_{11}	m_{12}	m_{22}	m

Ebenfalls wird in einer Fall-Kontroll-Studie jeweils das Chancenverhältnis die Odds Ratio (OR) ermittelt. Die Odds Ratio drückt aus, um wieviel größer die Chance ist, betroffen zu sein (hier an DCM erkrankt), wenn man der Gruppe mit Suszeptibilitätsfaktor zugehörig ist (z.B. Träger des einen Allels), verglichen mit den Trägern des zweiten Allels (der Gruppe ohne Suszeptibilitätsfaktor).

$$OR = \frac{odds(E)}{odds(NE)}; odds(E) = \frac{P(E)}{1 - P(E)}; odds(NE) = \frac{P(NE)}{1 - P(NE)}$$

odds (E) = Chance der Exponierten, zur Fallgruppe zu gehören.
odds (NE) = Chance der Nicht-Exponierten, zur Fallgruppe zu gehören.
P (E) = Wahrscheinlichkeit der Exponierten, zur Fallgruppe zu gehören.
P (NE) = Wahrscheinlichkeit der Nicht-Exponierten, zur Fallgruppe zu gehören.

Abbildung 12: Odds Ratio-Berechnung

Die Odds Ratio kann Werte zwischen Null und Unendlich annehmen. Außerdem wird das 95%-Konfidenzintervall (confidence interval, CI) angegeben, welches die statistische Streuung angibt. Ein Wert von 1 bedeutet ein gleiches Chancenverhältnis und somit, dass es keinen Effekt dieses Faktors auf das Krankheitsrisiko gibt. Weicht die OR signifikant von 1 ab bzw. schließt in dem 95%-CI die OR von 1 nicht mit ein, so bedeutet ein Wert der Odds Ratio > 1 einen Anstieg der Wahrscheinlichkeit um den entsprechenden Faktor, dementsprechend < 1 für eine Abnahme der Wahrscheinlichkeit um den jeweiligen Faktor.

Die Bonferroni Korrektur ist die einfachste, aber auch die stringenteste Korrektur für die Kumulierung des α -Niveaus ($\alpha = 0,05$) im Fall des multiplen Testens einer Hypothese. Für multiple Tests allerdings genügt diese Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0.05$ nicht. Bei der Bonferroni-Korrektur multipliziert man den p-Wert des einfachen Signifikanzniveaus mit der Anzahl der Einzeltests, in dieser Studie ist es der Faktor 109. Daraus resultiert das korrigierte Signifikanzniveau für jeden Einzelvergleich. Liegen diese so veränderten p-Werte immer noch unter dem ursprünglichen Signifikanzniveau ($\alpha = 0,05$), nun aber für multiple Tests korrigiert, so können sie als signifikant betrachtet und die Nullhypothese verworfen werden.

$$P (P_{CCA} \text{ oder } P_{CCG}, \text{ signifikant}) \leq \frac{\alpha}{K}$$

P: p-Wert eines Tests
 α : 0,05
K: Anzahl der Tests

Abbildung 13: Berechnung zur Bonferroni-Korrektur

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Analysepopulation

Für die Fallgruppen der explorativen Assoziationsstudie und der Replikationsstudie konnten insgesamt 1037 Patienten mit der dilatativen Kardiomyopathie rekrutiert werden, wobei die Anzahl der Fälle der Replikationsstudie mehr als doppelt so groß ist wie die Fallgruppe der primären Assoziationsstudie. Die Fallgruppen sind im Anteil der männlichen (74,33% bzw. 75,50%) und weiblichen Teilnehmer (25,67% bzw. 23,22%), sowie beim mittleren Alter bei der Rekrutierung (52 Jahre bzw. 58 Jahre) vergleichbar. Die Kontrollgruppen der explorativen Studie und der Replikationsstudie wurden vom Popgen-Projekt aus dem entsprechenden Untersuchungsgebiet in Schleswig-Holstein rekrutiert. Die Teilnehmerzahl der Kontrollgruppe der Probanden ohne DCM beläuft sich für die Ausgangsstudie auf 736. Die Teilnehmer zeigten ein durchschnittliches Alter von 62 Jahren bei der Rekrutierung. Diese Kontrollgruppe besteht zu ungefähr gleichen Teilen aus Männern und Frauen (52,31% zu 47,69%). Währenddessen die Kontrollgruppe der Replikationsstudie 1104 Probanden ohne DCM umfasst, wies sie allerdings nur ein mittleres Alter bei Rekrutierung von 39 Jahren auf. Der Anteil der männlichen Teilnehmer belief sich hier wiederum auf 69,93% und der weiblichen Teilnehmer auf 29,71%. Die Details dieser Analysepopulationen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Beschreibung der klinischen Analysepopulationen

Klinische Analysepopulationen	Explorative Studie				Replikationsstudie			
	Fälle Kiel		Kontrollen Popgen		Fälle Heidelberg		Kontrollen Popgen	
Anzahl	335		736		702		1104	
männlich (%)	249	74,33%	385	52,31%	530	75,50%	772	69,93%
weiblich (%)	86	25,67%	351	47,69%	163	23,22%	328	29,71%
unbekannt (%)	0	0,00%	0	0,00%	9	1,28%	4	0,36%
Mittleres Alter bei Rekrutierung (2007)	58,30		62,82		52,17		39,44	

4.2 Primäre Assoziationsstudie

Die primäre Studie befasste sich mit der Untersuchung von 132 tagging SNPs aus 15 Genen des TLR-Signaltransduktionswegs, um Assoziationen zu identifizieren. Die klinische Analysepopulation umfasste die Fallgruppe mit 335 Probanden und die Kontrollgruppe mit 736 Probanden. Es bestanden als Qualitätskriterien eine Call rate von $\geq 95\%$ und ein P_{HWE} von $> 0,05$, welche alle SNPs erfüllen konnten. Bei 23 SNPs traten technische Fehler bei der Genotypisierung auf, so dass nur noch 109 SNPs ausgewertet werden konnten. Die erforderliche Allelfrequenz des selteneren Allels (minAF) von größer 5% konnten 37 SNPs nicht erreichen (Tabellen 16 und 17 im Anhang).

Zur Auswertung der Allel- und Genotypdaten der SNPs erfolgte zunächst die Berechnung der Wahrscheinlichkeit unter der Nullhypothese, dass die Allel- oder Genotypfrequenzen in der Fallgruppe denen der Kontrollgruppe entsprechen.

In der allelischen Analyse (vgl. Tabelle 8) zeigte sich für SNP rs11536897 des *TLR4* Gens ein signifikanter p-Wert ($P_{CCA}=9,83E-04$, $ORC=-1$). Die ORC konnte nicht bestimmt werden, da die Fall- und Kontroll-Analysepopulation keine homozygoten Träger des seltenen Allels beinhalteten.

Tabelle 8: Primäre Studie: SNP mit der Anzahl (N) bei Kontrollen und Fällen, dem p-Wert des allelbasierten Fall-Kontroll- χ^2 -Tests (P_{CCA}) und der Odds Ratio (carriership of common allele, ORC) mit 95%-Konfidenzintervall (CI)

Gen	SNP	N Kontrollen	N Fälle	P_{CCA}	ORC	95%-CI
<i>TLR4</i>	rs11536897	730	331	9,83E-04	-	-

Die sich anschließende genotypische Analyse (vgl. Tabelle 9) zeigte für 3 SNPs signifikante Werte. SNP rs11536897 zeigte hier erneut das stärkste Assoziationssignal ($P_{CCG}=8,02E-04$, $ORR=2,27$ [95%-CI 1.39-3.71]). Nächste signifikante SNP war rs7769929 (*TAK1*) mit $P_{CCG}=9,23E-03$ und einer ORR von 0,67 (95%-CI 0.46-0,98), gefolgt von SNP rs1816702 (*TLR2*) mit $P_{CCG}=3,13E-02$ und der ORR von 0,65 (95%-CI 0.47-0.91).

Tabelle 9: Primäre Studie: SNPs mit der Anzahl (N) bei Kontrollen und Fällen, dem p-Wert des genotypbasierten Fall-Kontroll- χ^2 -Tests (P_{CCG}) und der Odds Ratio (carriership of rare allele, ORR) mit 95%-Konfidenzintervall (CI)

Gen	SNP	N Kontrollen	N Fälle	P_{CCG}	ORR	95%-CI
TAK1	rs7769929	722	325	9,23E-03	0,67	0.46-0.98
TLR2	rs1816702	729	331	3,13E-02	0,65	0.47-0.91
TLR4	rs11536897	730	331	8,02E-04	2,27	1.39-3.71

Die übrigen untersuchten SNPs wiesen weder in der allelischen Analyse noch in der genotypischen Analyse auf eine signifikante Assoziation zu einer entsprechenden Manifestation des Krankheitsbildes der dilatativen Kardiomyopathie hin (Tabellen 19 und 20 im Anhang).

Insgesamt war der SNP mit den stärksten Assoziationssignalen rs11536897 auf dem *TLR4* Gen. In den Fall- und Kontrollanalysepopulationen konnten hierfür keine homozygoten Träger des selteneren Allels (hier G-Allel) detektiert werden, währenddessen die Frequenz der heterozygoten Träger (A/G, das häufigere Allel ist das A-Allel) bei den Fällen 10,3% und bei den Kontrollen lediglich 4,8% betrug (Tabelle 10). Die Frequenz für die Anzahl der heterozygoten Träger der Fallpopulation ist somit um den Faktor 2,1 größer als die Frequenz der Kontrollpopulation.

Tabelle 10: Primäre Studie: SNPs mit der Anzahl (N) und der Anzahl (n) der Genotypen 11, 12 und 22 sowie den Frequenzen (F in %) bei Kontrollen (co) und Fällen (ca); 1 ist das häufigere und 2 das seltene Allel.

Gen	SNP	Nco	Nca	n11co	n11ca	N12co	n12ca	n22co	n22ca	F22co	F22ca	F12co	F12ca
TAK1	rs7769929	722	325	594	284	123	35	5	6	0,7	1,8	17,0	10,8
TLR2	rs1816702	729	331	550	273	161	54	18	4	2,5	1,2	22,1	16,3
TLR4	rs11536897	730	331	695	297	35	34	0	0	0,0	0,0	4,8	10,3

4.2.1 Adjustierung für multiples Testen

Keines der zuvor signifikanten SNPs erreichte nach Korrektur für 109 Einzeltests nach Bonferroni ein Signifikanzniveau von $<0,05$ (Tabelle 11).

Der am stärksten assoziierte SNP rs11536897 (*TLR4*) wurde in einer zweiten unabhängigen Fall-Kontroll-Population auf eine Bestätigung des Assoziationssignals hin untersucht. Dies wurde trotz nicht bestandener Bonferroni-Korrektur

durchgeführt, da die Annahme bestand, dass die klinische Analysepopulation der explorativen Studie möglicherweise zu klein gewesen sei und ein deutlicher Unterschied in den Allelfrequenzen zwischen Fällen und Kontrollen und damit eine stärkere Signifikanz für diesen SNP sich möglicherweise in einer größeren unabhängigen Population der Replikationsstudie doch herausstellen könnte.

Tabelle 11: Primäre Studie: SNPs mit dem p-Wert des allelbasierten Fall-Kontroll- χ^2 -Tests (P_{CCA}), dem p-Wert des genotypbasierten Fall-Kontroll- χ^2 -Tests (P_{CCG}) sowie deren adjustierte p-Werte (Adjust.- P_{CCA} und Adjust.- P_{CCG})

Gen	SNP	P_{CCA}	Adjust.- P_{CCA}	P_{CCG}	Adjust.- P_{CCG}
TAK1	rs7769929	1,35E-01	14,70	9,23E-3	1,01
TLR2	rs1816702	6,90E-03	0,75	3,13E-2	3,41
TLR4	rs11536897	9,83E-04	0,11	8,02E-04	0,09

Die vollständige Tabelle für die statistische Auswertung aller SNPs befinden sich im Anhang (Tabelle 21).

4.3 Replikationsstudie in einer unabhängigen Population

Die Fallgruppe der unabhängigen klinischen Analysepopulation der Replikationsstudie umfasst 702 und die dazugehörige Kontrollgruppe des Popgen-Untersuchungsgebietes 1104 Probanden. Die Qualitätskriterien Call rate von $\geq 95\%$ und ein P_{HWE} von $> 0,05$ konnten eingehalten werden.

In der Replikationsstudie konnte das Fehlen einer Korrelation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp bestätigt werden. Die p-Werte konnten das Signifikanzniveau von 0,05 nicht unterschreiten (Tabelle 12 und 13). Es fanden sich eine Häufigkeit der homozygoten Träger des selteneren Allels von 0,5% bei den Fällen und 0,1% bei den Kontrollen und der heterozygoten Träger von 9,4% bei den Fällen und 8,1% bei den Kontrollen (Tabelle 14).

Tabelle 12: Replikationsstudie: SNP mit der Anzahl (N) der Kontrollen und Fälle, dem p-Wert des genotypbasierten Fall-Kontroll- χ^2 -Tests (P_{CCA}) und der Odds Ratio (carriership of common Allele, ORC) mit 95%-Konfidenzintervall (CI)

Gen	SNP	N Kontrollen	N Fälle	P_{CCA}	ORC	95%-CI
TLR4	rs11536897	1097	586	0,16	0,18	0.02-1.71

Tabelle 13: Replikationsstudie: SNP mit der Anzahl (N) der Kontrollen und Fälle, dem p-Wert des genotypbasierten Fall-Kontroll- χ^2 -Tests (P_{CCG}) und der Odds Ratio (carriership of rare allele, ORR) mit 95%-Konfidenzintervall (CI)

Gen	SNP	N Kontrollen	N Fälle	P_{CCG}	ORR	95%-CI
TLR4	rs11536897	1097	586	0,16	1,23	0.87-1.74

Tabelle 14: Replikationsstudie: SNP mit der Anzahl (N) und der Anzahl (n) der Genotypen 11, 12 und 22 sowie den Frequenzen (F in %) bei Kontrollen (co) und Fällen (ca); 1 ist das häufigere und 2 das seltenere Allel.

Gen	SNP	Nco	Nca	n11co	n11ca	n12co	n12ca	n22co	n22ca	F22co	F22ca	F12co	F12ca
TLR4	Rs11536897	1097	586	1007	528	89	55	1	3	0,1	0,5	8,1	9,4

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte für keines der 132 untersuchten SNPs des TLR-Signaltransduktionswegs eine Assoziation mit DCM repliziert werden. Assoziationen der SNPs rs7769929 (*TAK1*), rs1816702 (*TLR2*) und rs11536897 (*TLR4*) waren nominal signifikant, konnten aber nach Korrektur für multiples Testen nicht das Signifikanzniveau von $<0,05$ erreichen. Dennoch wurde der SNP rs11536897 des *TLR4* Gens in die Replikation geführt. Dieser SNP hatte den kleinsten p-Wert und die klinische Analysepopulation der explorativen Studie besaß aufgrund der geringen Allelfrequenz dieses SNPs eine nicht ausreichende Teststärke, um eine Signifikanz für den SNP bei einem angenommenen Odds Ratio von 1,5 aufzuzeigen. In der Replikation konnte sich eine Assoziation des rs11536897 (*TLR4*) bei ausreichender Teststärke jedoch nicht bestätigen.

5.1 Einflussgrößen in der Assoziationsstudie

Für die Aussagekraft jeder statistischen Untersuchung ist die Größe der Stichprobe entscheidend. Ist im Falle einer Assoziationsstudie die Studienpopulation zu klein gewählt worden, so kann die Teststärke einer statistischen Auswertung, die neben der Größe der klinischen Analysepopulation auch vom genetischen Effekt und der Allelfrequenz abhängt [McCarthy et al. 2000; Ardlie et al. 2002], beeinflusst sein, so dass Typ I-(falsch positive Assoziation) und Typ II-Fehler (übersehene Assoziation) wahrscheinlich werden.

In der primären Studie konnten zunächst mit einer Fallpopulation bestehend aus etwa 335 Probanden und einer Kontrollpopulation aus etwa 736 Probanden nur für die SNPs rs7769929 (*TAK1*), rs1816702 (*TLR2*) und rs11536897 (*TLR4*) nominal signifikante Assoziationen zum Phänotyp der DCM angegeben werden, welche später durch die Bonferroni-Korrektur für multiples Testen nicht signifikant blieben. Es wäre bei einer größeren Population und dementsprechend gesteigerter Teststärke denkbar, dass für weitere der untersuchten SNPs signifikante Werte aufgezeigt worden wären, da eine größere Population mögliche Schwankungen bei anderen Einflussfaktoren auf die Signifikanz eines SNPs (z.B. zufällige Schwankungen der Frequenzen zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe und der

Häufigkeit des betreffenden SNPs in der Bevölkerung) kompensieren könnte. Die Wahrscheinlichkeit, eine echte Assoziation zu übersehen, ist umso größer, je kleiner die Anzahl der Probanden und je niedriger die Frequenz des selteneren Allels ist. Dementsprechend läge beispielsweise die statistische Power bei einer Frequenz des selteneren Allels von 10% und einem Odds Ratio von 1,5 in der explorativen Studie bei knapp 55%, währenddessen eine fast doppelt so große Population, wie sie die Replikationsstudie darstellt, eine Teststärke von circa 80% erreichen könnte (Abbildung 2 und 3), und damit statistisch aussagekräftig wäre.

Ein Aspekt, der die Möglichkeit zufälliger Schwankungen der Allelfrequenzen innerhalb einer Ethnizität verdeutlicht, ist der Folgende. In einer Referenzpopulation wurden die SNPs des Toll-like-Rezeptor-Pathways vom Hapmap-Projekt untersucht. Die CEU-HapMap Population besteht aus 90 Einwohnern Utahs mit Vorfahren aus Nord- und West-Europa und zeigte für SNPs Allelfrequenzen der selteneren Allele (minAF) von mehr als 5%. Diese Studie beruft sich auf die Ergebnisse des HapMap Konsortiums und untersuchte somit lediglich tagging SNPs mit der minAF von größer 5%. In der primären Studie zeigte sich jedoch für 37 SNPs (vgl. Tabellen 16 und 17 im Anhang), dass sie dieses Qualitätskriterium der kleineren Allelfrequenz von größer als 5% nicht mehr erfüllen können, obwohl es sich in der Referenzpopulation des Hapmap-Projekts so darlegte.

Ein weiterer Faktor, welcher Einfluss auf das Ergebnis der Studie nimmt, ist die Verwendung von Sonden, die aufgrund technischer Probleme keine Genotypen-Informationen ergaben. 23 der 132 ausgewählten tagging SNPs (17,4%) konnten mit dem SNPlex System nicht untersucht werden. Es ist somit möglich, dass bei einigen Haplotypblöcken Informationen über eine mögliche Assoziation nicht erfasst werden konnten.

Entscheidend für die Validität einer Assoziationsstudie ist die Vermeidung von Populationsstratifikation, sie ist die am häufigsten zitierte Störgröße in Assoziationsstudien [Cardon und Palmer 2003, Khlat et al. 2004]. Sie ist oft für den statistischen Fehler erster Ordnung (in Form eines falschpositiven Assoziationssignals) als auch für den Fehler zweiter Ordnung (Übersehen echter Suszeptibilitätsfaktoren) verantwortlich. Die Populationsstratifikation entsteht durch unberücksichtigte Subpopulationen, die unterschiedlichen genetischen Einflüssen

und/oder Umwelteinflüssen unterliegen, z.B. durch ethnische und soziale Faktoren. Des Weiteren kann dies auch in unterschiedlichen Altersstrukturen oder Geschlechtsverteilungen in den klinischen Analysepopulationen seine Begründung finden. Geht mit diesen Faktoren ein unterschiedliches Allelvorkommen in der Fall- und Kontrollpopulation einher, schafft dies die Grundvoraussetzungen für ein falsches bzw. verzerrtes Studienergebnis [Wacholder et al. 2000]. Es ist das Ziel bei der Zusammenstellung von Fall- und Kontrollpopulationen solchen Faktoren entgegenzuwirken, indem die Analysepopulationen einem möglichst einheitlichen genetischen, geographischen und kulturellen Hintergrund entstammen. Die Adjustierung für Alter und Geschlecht wurde nicht durchgeführt, da kein signifikanter Einfluss auf die Ergebnisse erwartet wurde.

Die in der Studie verwendeten Populationen stellten sich in vorangegangenen Studien bislang als genetisch homogen und repräsentativ bezüglich der Allelverteilungen innerhalb der Studienpopulation dar [Krawczak et al. 2006]. Im Übrigen werden regionale genetische Unterschiede in der Populationsstruktur innerhalb von Deutschland als gering eingestuft [Steffens et al. 2006, Lao et al. 2008], so dass das Risiko von Typ I und Typ II Fehlern bei einer Replikation mit Fällen aus Süddeutschland von Befunden, die mit Fällen aus Norddeutschland gewonnen wurden, als nicht sehr wahrscheinlich anzusehen ist.

Eine weitere Determinante für die statistische Aussagekraft einer Assoziationsstudie ist die exakte Phänotypen-Klassifikation der Fall-Kontroll-Populationen. Dieser Forderung kommt die Anwendung standardisierter Diagnosekriterien entgegen. Im Falle der DCM handelt es sich um eine retrospektive Diagnosestellung, dies bedeutet, die Definition ist eindeutig und die Phänotypen-Zuordnung folglich sehr zuverlässig.

Bei der statistischen Auswertung dieser Studie war man mit dem Problem des multiplen Testens konfrontiert. Die Wahrscheinlichkeit, mindestens eine dieser Hypothesen fälschlich anzunehmen, also eine falsch positive Aussage zu treffen, steigt mit der Anzahl der zu untersuchenden Hypothesen. Bei einem Signifikanzniveau von 5% sind bei 100 Einzeltests bereits fünf zufällige Assoziationen zu erwarten. Je höher also die Anzahl der durchgeführten Tests, desto mehr rein zufällige Assoziationen können beobachtet werden, die zur falschen

Zurückweisung der Nullhypothese führen können. Die Unkenntnis darüber, welche Ergebnisse zufällig falsch positiv und welche tatsächlich als signifikant erscheinen, führt zur Berücksichtigung der multiplen Testproblematik. Aufgrund dessen wurde die Bonferroni-Korrektur für multiples Testen durchgeführt.

Es stellte sich für die explorative Studie heraus, dass die nominal signifikanten Assoziationen der drei SNPs nach der Korrektur für multiples Testen nicht länger signifikant blieben. Dies weist auf Assoziationen mit Typ I-Fehlern hin.

5.2 Replikationsstudie

Das Ergebnis der Bonferroni-Korrektur vermittelte, dass kein SNP nach multiplen Testen dem Schwellenwert für Signifikanz standhalten konnte. Dennoch wurde lediglich das Assoziationssignal von SNP rs11536897 (*TLR4*) erneut in einer unabhängigen Population repliziert. Ein Argument dafür bestand darin, dass sich eine deutliche Anreicherung des SNPs bei den heterozygoten Trägern der Fallpopulation im Vergleich zur Kontrollpopulation (im Verhältnis von 10 zu 5, vgl. Tabelle 10) zeigte. Aufgrund der geringen Allelfrequenz wurden allerdings keine homozygoten Träger des seltenen Allels identifiziert. Bei einer Fall-Analysepopulation, die lediglich 335 Fälle umfasst, ist das fehlende Auftreten von homozygoten Trägern eines Allels mit einer Frequenz von ca. 10% bei heterozygoten Fällen (Tabelle 10) wahrscheinlich. Jedoch hätten in einer Replikation mit einer doppelt so großen Fallpopulation signifikante Frequenzunterschiede identifiziert werden können.

Trotz der vergrößerten Population konnte eine Assoziation von SNP rs11536897 mit dem Krankheitsbild der DCM jedoch nicht repliziert werden.

5.3 Möglicher Einfluss von Genen des TLR-Pathway auf die DCM

Es zeigte sich in Studien, dass Toll-like-Rezeptor vermittelte Immunantworten zu einem schnellen Einsatz von proinflammatorischen Mediatoren im Herzen (TNF- α , IL-1 β und NOS2) führten und sich linksventrikuläre Dysfunktionen ereigneten [Knuefermann et al. 2002, Nemoto et al. 2002]. Des Weiteren konnte an Maus-Modellen gezeigt werden, dass Infektionen mit kardiotropen Erregern, die über die

Zerstörung zytoskeletaler Proteine wie Dystrophin und Sarkoglykan zur Aktivierung der angeborenen Immunität führen und somit dem Ziel der Eliminierung des Erregers folgen [Liu und Mason 2001], maßgeblich an der Entstehung der DCM beteiligt sind. In dieser Arbeit konnte kein populationsbasierender Beleg für genetische Varianten in den Genen des Toll-like-Rezeptor-Pathways, die auf eine Assoziation zum Krankheitsbild der dilatativen Kardiomyopathie schließen lassen, gegeben werden. Es muss aber auch Erwähnung finden, dass an einigen SNPs und somit ganzen Haplotypblöcken aufgrund von Genotypisierungsfehlern keine statistische Auswertung erfolgen konnte. Außerdem wurden nicht alle Gene im Pathway untersucht, so dass hier die Möglichkeit der Existenz bislang unentdeckter signifikanter Gene in Bezug auf die DCM besteht.

5.4 Ausblick

Die dilatative Kardiomyopathie wird heute als eine komplexe Erkrankung verstanden, der unterschiedliche pathogene Mechanismen zugrunde liegen. So scheint sich die DCM ebenso als Folge einer akuten oder chronischen Myokarditis [Dec und Fuster 1994, Chow et al. 1992, Woodruff 1980] zu ereignen. Es liegt deswegen nahe, auch diesen Aspekt bei der Detektierung relevanter krankheitsverursachender Gene bei der DCM zu berücksichtigen. Generell lässt sich sagen, dass der potentielle Beitrag, den die Assoziationsstudien am medizinisch-wissenschaftlichen Fortschritt leisten können, groß ist. So führten Assoziationsstudien bislang zu der Entdeckung von mehr als 300 verschiedenen Genomabschnitten, die bei über 70 Krankheiten eine Rolle spielen [Donnelly 2008]. Die Identifizierung krankheitsverursachender Gene wird die Weiterentwicklung des Verständnisses über das Krankheitsbild der DCM ermöglichen, infolgedessen könnte dies zur Aufklärung von Risiko, Entstehung und Verlauf beitragen und dadurch möglicherweise ätiologisch orientierte Therapieformen einer Pathologie aufzeigen. Demzufolge könnte man dem Anspruch der Patienten mit genetischem Hintergrund, eine individuelle Erkrankung früh zu erkennen, spezifisch zu therapieren und damit den klinischen Verlauf günstig zu beeinflussen, am ehesten gerecht werden [Deo und MacRae 2007].

Im Rahmen dieser Dissertation konnte ein Nachweis erbracht werden, dass innerhalb der ausgewählten Analysepopulation Nord-West Europäischer Herkunft

keine Assoziation zwischen den untersuchten Haplotypen der ausgewählten Gene des Toll-like-Rezeptor-Signaltransduktionswegs und der dilatativen Kardiomyopathie besteht. Diese Studie bietet somit einen Ansatzpunkt im Bereich der genetischen Grundlagenforschung der dilatativen Kardiomyopathie, bestimmte Gene ausschließen zu können und dem zu Folge andere Gene des TLR-Pathway auf Assoziationen im Hinblick auf die dilatative Kardiomyopathie zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Die dilatative Kardiomyopathie ist durch einen progredienten Verlauf mit zunehmender Dilatation und Kontraktilitätsstörung des linken oder beider Ventrikel verursacht [Richardson et al. 1996]. Für DCM-Patienten, welche an den Symptomen der Herzinsuffizienz in unterschiedlicher Ausprägung leiden, gibt es zur Zeit neben den medikamentös-konservativen Behandlungsmöglichkeiten bei Progredienz der Erkrankung keine befriedigenden Behandlungsalternativen.

Bei vielen DCM-Patienten lassen sich zirkulierende und biopsiegebundene organspezifische Autoantikörper, entzündliche Infiltrate und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine nachweisen. 20-30% der Fälle mit dilatativer Kardiomyopathie treten familiär gehäuft auf. Dies führt zur Annahme, dass genetische Faktoren daher entweder als Suszeptilitätsfaktoren für gewisse Umwelteinflüsse wie zum Beispiel bakterielle oder virale Infektionen dienen oder als direkte Determinante für den funktionellen und strukturellen Phänotyp der Kardiomyopathie verantwortlich sind. Beispielsweise konnte die erhöhte Expression des TLR4-Rezeptors bei viraler Infektion und Replikation bei Patienten mit DCM nachgewiesen werden [Satoh et. al 2004].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Toll-like-Rezeptor-Signaltransduktionsweg im Hinblick auf die dilatative Kardiomyopathie betrachtet. Hierzu wurden 132 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) aus 15 Kandidatengen des Toll-like-Rezeptor-Signaltransduktionswegs in einer großen populationsbasierten Fall-Kontroll-Assoziationstudie durch eine Haplotypenanalyse untersucht. In der primären Studie wurden die 335 Probanden umfassende klinische Fall- mit der aus 736 Probanden bestehenden Kontroll-Analysepopulation verglichen. Es zeigten sich zunächst für drei SNPs nominal signifikante Werte (rs7769929 *TAK1*, rs1816702 *TLR2* und rs11536897 *TLR4*), die aber der Korrektur für multiples Testen nicht standhielten. Die Replikationsstudie erfolgte in einer unabhängigen Population mit 702 Fällen aus Heidelberg und 1104 Kontrollen. Es wurde der SNP (rs11536897 *TLR4*) mit dem signifikantesten Wert, obwohl dieser nach Bonferroni-Korrektur das Signifikanzniveau nicht erreichte, repliziert. Hierbei konnte erneut trotz der doppelt so großen Studienpopulation keine Assoziation zwischen dieser Variante und dem Phänotyp der dilatativen Kardiomyopathie aufgedeckt werden.

Die Intensivierung der Erkenntnisse in Bezug auf Risiko, Entstehung und Verlauf der dilatativen Kardiomyopathie wird durch Identifikation und den Ausschluss krankheitsverursachender Gene ermöglicht und gewährt die Perspektive, ätiologisch orientierte Therapien dieser Pathologie anzubieten. Folglich bietet diese Studie die Basis und den Ansatzpunkt für weitergehende Forschung.

7 Literaturverzeichnis

Aderem, A., Ulevitch, R. J. (2000): ***Toll-like receptors in the induction of the innate immune response.*** Nature, 406: 782-787

Afonina, I., Zivarts, M., Kutuyavin, I., Lukhtanov, E., Gamper, H., Meyer, R.B. (1997): ***Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder.*** Nucleic Acids Res, 25(13): 2657-2660

Anderson, K. V., Bokla, L., Nusslein-Volhard, C. (1985): ***Establishment of dorsalventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product.*** Cell, 42: 791-798

Ardlie, K.G., Lunetta, K.L., Seielstad, (2002): ***M. Testing for population subdivision and association in four case-control studies.*** Am J Hum Genet, 71: 304-311

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

Belvin, M. P., Anderson, K. V. (1996): ***A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway.*** Annu Rev Cell Dev Biol, 12: 393-416

Berko, B.A., Swift, M. (1987): ***X-linked dilated cardiomyopathy.*** N Engl J Med, 316: 1186–1191

Cardon, L.R., Palmer L.J. (2003): ***Population stratification and spurious allelic association.*** Lancet; 361(9357): 598-604

Casas J.P., Cooper, J., Miller, G.J., Hingorani, A.D., Humphries, S.E. (2006): ***Investigating the genetic determinants of cardiovascular disease using candidate genes and meta-analysis of association studies.*** Ann Hum Genet 2006, 70(2): 145-169

Chow, L.H., Beisel, K.W., McManus, B.M. (1992): ***Enteroviral infection of mice with severe combined immunodeficiency. Evidence for direct viral pathogenesis of myocardial injury.*** Lab Invest, 66: 24-31

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

Dec, G.W., Fuster, V. (1994): ***Idiopathic dilated cardiomyopathy.*** N Engl J Med. 331(23): 1564-1575

Deo, R., MacRae, C.A. (2007): ***The genetics of cardiomyopathies: what clinicians should know.*** Curr Heart Fail Rep, 4: 229-235

Donnelly, P. (2008): ***Progress and challenges in genome-wide association studies in humans.*** Nature, 456(7223): 728-731

Förster, T. (1948): **Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.** Ann. Physik., 437, 55

Freudenberg, J., Cichon, S., Nöthen, M.M., Propping, P. (2002): **Blockstruktur des menschlichen Genoms.** Deutsches Ärzteblatt, 47: 3190-3195

Gronda, E., Mangiavacchi, M., Frigerio, M., Oliva, F., Andreuzzi, B., Paolucci, M., Masciocco, G., Comerio, G., Piccalò, G., Moreo, A., Gabrielli, D., Barbieri, P. (2000): **Determination of candidacy for mechanical circulatory support: importance of clinical indices.** Heart Lung Transplant;19(8): 83-88

Hampe, J., Wollstein, A., Lu, T. (2001): **An integrated system for high throughput Taqman based SNP genotyping.** Bioinformatics, 17: 654-655

Hapmap organisation: <http://www.hapmap.org/>

Hunt, S.A., Abraham, W.T., Chin, M.H., Feldman, A.M., Francis, G.S., Ganiats, T.G., Jessup, M., Konstam, M.A., Mancini, D.M., Michl, K., Oates, J.A., Rahko, P.S., Silver, M.A., Stevenson, L.W., Yancy, C.W., Antman, E.M., Smith, S.C. Jr., Adams, C.D., Anderson, J.L., Faxon, D.P., Fuster, V., Halperin, J.L., Hiratzka, L.F., Jacobs, A.K., Nishimura, R., Ornato, J.P., Page, R.L., Riegel, B.; American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; American College of Chest Physicians; International Society for Heart and Lung Transplantation; Heart Rhythm Society (2005):. **ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society.** Circulation, 112(12): 154-235

Janeway, C. A., Jr., Medzhitov, R. (2002): **Innate Immune Recognition.** Annu.Rev.Immunol., 20: 197-216

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999): **Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin.** Immunity., 11(1): 115-122

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

Kelly, D.P., Strauss, A.W. (1993): **Inherited cardiomyopathies.** N Engl J Med, 330: 913-919

- Knuefermann, P., Nemoto, S., Misra, A., Nozaki, N., Defreitas, G., Goyert, S.M., Carabello, B.A., Mann, D.L., Vallejo, J.G. (2002): ***CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction.*** *Circulation*, 106(20): 2608-2615
- Krawczak, M., Nikolaus, S., von Eberstein, H., Croucher, P.J., El Mokhtari, N.E., Schreiber, S. (2006): ***Popgen: population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotype-phenotype relationships.*** *Community Genet*, 9(1): 55-61
- Kutyavin, I.V., Lukhtanov, E.A., Gamper, H.B., Meyer, R.B. (1997): ***Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization.*** *Nucleic Acids Res.*, 25(18): 3718-3723
- Kühl, U., Pauschinger, M., Noutsias, M., Seeberg, B., Bock, T., Lassner, D., Poller, W., Kandolf, R., Schultheiss, H.P. (2005): ***High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with “idiopathic” left ventricular dysfunction.*** *Circulation*, 111: 887–893
- Lao, O., Lu, T.T., Nothnagel, M., Junge, O., Freitag-Wolf, S., Caliebe, A., Balascakova, M., Bertranpetit, J., Bindoff, L.A., Comas, D., Holmlund, G., Kouvatsi, A., Macek, M., Mollet, I., Parson, W., Palo, J., Ploski, R., Sajantila, A., Tagliabracci, A., Gether, U., Werge, T., Rivadeneira, F., Hofman, A., Uitterlinden, A.G., Gieger, C., Wichmann, H.E., Rütger, A., Schreiber, S., Becker, C., Nürnberg, P., Nelson, M.R., Krawczak, M., Kayser, M. (2008): ***Correlation between genetic and geographic structure in Europe.*** *Curr Biol.*;18(16): 1241-1248
- Lee, L.G., Connell, C.R., Bloch, W. (1993): ***Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.*** *Nucleic Acids Res*, 21: 3761-3766
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. (1996): ***The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette Spatzle/Toll/Cactus Controls the Potent Antifungal Response in Drosophila Adults.*** *Cell*, 86(6): 973-983
- Linde, A., Mosier, D., Blecha, F. , Melgarejo, T. (2007): ***Innate immunity and inflammation– new frontiers in comparative cardiovascular pathology.*** *Cardiovasc Res*, 73: 26-36
- Lovmar, L., Syvänen, A.C. (2006): ***Multiple displacement amplification to create a long-lasting source of DNA for genetic studies.*** *Hum Mutat*, 27(7): 603-614
- Liu, P.P., Mason, J.W. (2001): ***Advances in the understanding of myocarditis.*** *Circulation*, 104: 1076-1082
- Livak, K.J., Marmaro, J., Todd, J.A. (1995): ***Towards fully automated genome-wide polymorphism screening.*** *Nat Genet*, 9: 341-342

- Maekawa, Y., Ouzounian, L., Opavsky, M.A. (2007): **Connecting the missing link between dilated cardiomyopathy and viral myocarditis: virus, cytoskeleton, and innate immunity.** *Circulation*, 115: 5-8.
- Marriott, J.B., Goldman, J.H., Keeling, P.J., Baig, M.K., Dalgleish, A.G., McKenna, W.J. (1996): **Abnormal cytokine profiles in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and their asymptomatic relatives.** *Heart*, 75: 287-290
- Mason, J.W. (2003): **Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link.** *Cardiovasc Res*, 60: 5-10
- McKenna, C.J., Codd, M.B., McCann, H.A., Sugrue, D.D. (1997): **Idiopathic dilated cardiomyopathy: familial prevalence and HLA distribution.** *Heart*, 77: 549-552
- Medzhitov, R. (2001): **Toll-Like Receptors and Innate Immunity.** *Nature*, 1: 135-145
- Medzhitov, R., Janeway, C. A., Jr. (2000): **How Does the Immune System Distinguish Self From Nonself?** *Semin.Immunol.*, 12(3): 185-188
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C. A., Jr. (1997): **A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.** *Nature*, 388: 394-397
- Meier, A., Kirschning, C. J., Nikolaus, T., Wagner, H., Heesemann, J., Ebel, F. (2003): **Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for Aspergillus-induced activation of murine macrophages.** *Cell Microbiol*, 5: 561-570
- Mestroni, L., Rocco, C., Gregori, D., Sinagra, G., Di Lenarda, A., Miocic, S., Vatta, M., Pinamonti, B., Muntoni, F., Caforio, A.L., McKenna, W.J., Falaschi, A., Giacca, M., Camerini, T. (1999): **Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity.** *Heart Muscle Disease Study Group. J Am Coll Cardiol*, 34: 181-190
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986): **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 51(1): 263-273
- McCarthy, J.J., Hilfiker, R. (2000): **The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics.** *Nat Biotechnol*, 18: 505-508
- McCarthy, P.M., Starling, R.C., Young, J.B., Smedira, N.G., Goormastic, M. (2000): **Left ventricular reduction surgery with mitral valve repair.** *J Heart Lung Transplant.*, 19(8): 64-67
- Nemoto, S., Vallejo, J.G., Knuefermann, P., Misra, A., Defreitas, G., Carabello, B.A., Mann, D.L. (2002): **Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the adult heart.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 282(6): 2316-2323

Ohlendieck, K. (1996): ***Towards an understanding of the dystrophin-glycoprotein complex: linkage between the extracellular matrix and the membrane cytoskeleton in fibers.*** Eur J Cell Biol, 69: 1-10

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

Pitt, B., Williams, G., Remme, W., Martinez, F., Lopez-Sendon, J., Zannad, F., Neaton, J., Roniker, B., Hurley, S., Burns, D., Bittman, R., Kleiman, J. (2001): ***The EPHEBUS trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study.*** Cardiovasc Drugs Ther.,15(1): 79-87

Pitt, B., Zannad, F., Remme, W.J., Cody, R., Castaigne, A., Perez, A., Palensky, J., Wittes, J. (1999): ***The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators.*** N Engl J Med, 341: 709-717

Portig, I., Wilke, A., Freyland, M., Wolf, M.J., Richter, A., Ruppert, V., Pankuweit, S., Maisch, B. (2006): ***Familial inflammatory dilated cardiomyopathy.*** Eur J Heart Fail, 8: 816-825

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. J., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. (1998): ***Defective LPS signalling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene.*** Science, 282: 2085-2088

Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mautner, B., O'Connell, J., Olsen, E., Thiene, G., Goodwin, J., Gyarsfas, I., Martin, I., Nordet, P. (1996): ***Report of the 1995 World Health Organization / International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies.*** Circulation, 93: 841-842

Report WHO/ISFC TFDCC (1996): ***Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies.*** Circulation, 93: 841-842

Satoh, M., Nakamura, M., Akatsu, T., Shimoda, Y., Segawa, I., Hiramori, K. (2004): ***Toll-like receptor 4 is expressed with enteroviral replication in myocardium from patients with dilated cardiomyopathy.*** Lab Invest, 84: 173-181

Schönberger, J., Seidman, C.E. (2001): ***Many roads lead to a broken heart: the genetics of dilated cardiomyopathy.*** Am J Hum Genet, 69: 249-260

Steffens, M., Lamina, C., Illig, T., Bettecken, T., Vogler, R., Entz, P., Suk, E.K., Toliat, M.R., Klopp, N., Caliebe, A., König, I.R., Köhler, K., Ludemann, J., Diaz Lacava, A., Fimmers, R., Lichtner, P., Ziegler, A., Wolf, A., Krawczak, M., Nürnberg, P., Hampe, J., Schreiber, S., Meitinger, T., Wichmann, H.E., Roeder, K., Wienker, T.F., Baur, M.P. (2006): ***SNP-based analysis of genetic substructure in the German population.*** Hum Hered, 62: 20-29

Swedberg, K., Cleland, J., Dargie, H., Drexler, H., Follath, F., Komajda, M., Tavazzi, L., Smiseth, O.A., Gavazzi, A., Haverich, A., Hoes, A., Jaarsma, T., Korewicki, J., Lévy, S., Linde, C., Lopez-Sendon, J.L., Nieminen, M.S., Piérard, L., Remme, W.J. (2005): **Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology.** Eur Heart J., 26(11): 1115-1140

Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., Beutler, B. (2004): **Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection.** Proc Natl Acad Sci USA, 101: 3516-3521

Takeda, K., Akira, S. (2004): **Microbial Recognition by Toll-Like Receptors.** J.Dermatol.Sci., 34(2): 73-82

Tobler, A.R., Short, S., Andersen, M.R., Paner, T.M., Briggs, J.C., Lambert, S.M., Wu, P.P., Wang, Y., Spoonde, A.Y., Koehler, R.T., Peyret, N., Chen, C., Broomer, A.J., Ridzon, D.A., Zhou, H., Hoo, B.S., Hayashibara, K.C., Leong, L.N., Ma, C.N., Rosenblum, B.B., Day, J.P., Ziegler, J.S., De La Vega, F.M., Rhodes, M.D., Hennessy, K.M., Wenz, H.M. (2005): **The SNPlex genotyping system: a flexible and scalable platform for SNP genotyping.** J Biomol Tech, 16(4): 398-406

Towbin, J.A. (1998): **The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies.** Curr Opin Cell Biol, 10(1): 131-139

Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M., Aderem, A. (1999): **The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens.** Nature, 401: 811-815

de la Vega, F.M., Lazaruk, K.D., Rhodes, M.D., Wenz, M.H. (2005): **Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System.** Mutat Res, 573(1-2): 111-135

Wacholder, S., Rothman, N., Caporaso, N. (2000): **Population stratification in epidemiologic studies of common genetic variants and cancer: quantification of bias.** J Natl Cancer Inst, 92: 1151-1158

Wigginton, J.E., Cutler, D.J., Abecasis, G.R. (2005): **A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium.** Am J Hum Genet, 76: 887-893

Woodruff, J.F. (1980): **Viral myocarditis. A review.** Am J Pathol., 101(2): 425-484

Xu, J., Turner, A., Little, J., Bleecker, E.R., Meyers, D.A. (2002): **Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error?** Hum Genet, 111: 573-574

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. and Akira, S. (2003): ***Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway***. Science 301(5633): 640-643

Yamamoto, M., Akira, S. (2004): ***TIR Domain--Containing Adaptors Regulate TLR-Mediated Signaling Pathways***. Nippon Rinsho, 62(12): 2197-2203

8 Anhang

Tabelle 15: Die untersuchten 132 tSNPs der 15 Gene des Toll-like Rezeptor Pathways

Gen	Lokalisierung	Referenz Sequenz (rs) Identifizierungs Nummer	Position Basenpaar (bp)
CD14	5 (5q31.1)	rs2569190	139993100
		rs4914	139991652
CD36	7 (7q11.2)	rs1054516	79929593
		rs13230419	79953936
		rs1527483	79946151
		rs3211817	79922758
		rs3211825	79923811
		rs3211827	79924111
		rs3211876	79932892
		rs3211881	79933505
		rs3211883	79933694
		rs3211908	79938567
		rs3211913	79939255
		rs3212001	79927426
		rs3212012	79940352
		rs3212013	79940705
		rs5956	79937100
IRAK4	12 (12q12)	rs12311633	42445212
		rs1461567	42450956
		rs4238087	42450572
		rs4251434	42442959
		rs4251444	42444932
		rs4251485	42455781
		rs4251498	42457629
		rs4251512	42459655
		rs4251513	42460471
		rs4251520	42461605
		rs4251527	42463130
		rs4251550	42467305
		rs4251572	42448596
		rs4251576	42456631
MyD88	3 (3p22)	rs4988453	38154258
		rs6853	38159374
		rs7744	38159025
TAB1	22 (22q13.1)	rs9611173	38147722
TAK1	6 (6q16.1-q16.3)	rs10485120	91317895
		rs12195854	91261362
		rs13208824	91301450

Gen	Lokalisierung	Referenz Sequenz (rs) Identifizierungs Nummer	Position Basenpaar (bp)
TAK1	6 (6q16.1-q16.3)	rs157428	91335203
		rs157692	91306962
		rs16883102	91308979
		rs3799912	91305464
		rs7769929	91336441
		rs812606	91291080
		rs9345031	91337022
TBK1	12 (12q14.1)	rs10878176	63156800
		rs11175411	63165432
		rs11175414	63171175
		rs11175416	63176776
		rs12367468	63155385
		rs7303577	63160369
		rs7972334	63161119
TIRAP	11 (11q24.2)	rs2298452	125647974
		rs3802813	125667678
		rs591163	125653642
		rs8177376	125668822
		rs8177401	125672644
TLR1	4 (4p14)	rs11725309	38606414
		rs4833092	38612282
		rs4833103	38638068
		rs5743611	38622780
TLR2	4 (4q32)	rs1337	154989192
		rs1339	154989168
		rs1816702	154967128
		rs2405432	154989148
		rs3804100	154983014
		rs5743704	154983556
		rs5743708	154845767
		rs7656411	154985260
TLR4	9 (9q32-q33)	rs10759932	117544698
		rs10983755	117544224
		rs11536889	117557685
		rs11536897	117559564
		rs12344353	117548203
		rs1927906	117559669
		rs2149356	117553753
		rs2770146	117552892
		rs4986790	117554856
		rs7873784	117558490
TLR5	1 (1q41-q42)	rs10797373	2893916

Gen	Lokalisierung	Referenz Sequenz (rs) Identifizierungs Nummer	Position Basenpaar (bp)
TLR5	1 (1q41-q42)	rs10909854	2897930
		rs11583804	2901523
		rs11586705	2922760
		rs12046158	2914870
		rs12728758	2902896
		rs12752801	2909623
		rs1456468	2896642
		rs2485945	2907089
		rs2788089	2898377
		rs2842925	2909513
		rs4648444	2912305
		rs5744168	1375288
		rs6659552	2902617
		rs878201	2902797
TOLLIP	11 (11p15.5)	rs11042484	1274888
		rs12285466	1249777
		rs3750920	1266532
		rs3829223	1256982
		rs5743869	1284328
		rs6578810	1247155
		rs7946008	1244019
		rs955396	1245452
		rs3750919	1249407
		rs3793964	1258558
		rs5743899	1280140
		rs5743942	1270604
TRAF6	11 (11p12)	rs331457	36480188
		rs5030411	36490329
		rs5030416	36489064
		rs5030442	36481043
		rs5030477	36467866
		rs5030492	36488125
		rs5030493	36487673
		rs5030502	36474785
		rs5030504	36471868
TRAM	5 (5q23.1)	rs10038493	114918611
		rs11957931	114983096
		rs13154471	114921862
		rs13160830	114940262
		rs13173913	114981718
		rs13178564	114922007
		rs1366079	114999174

Gen	Lokalisierung	Referenz Sequenz (rs) Identifizierungs Nummer	Position Basenpaar (bp)
TRAM	5 (5q23.1)	rs17473484	114943359
		rs2288384	114943927
		rs256946	114959509
		rs256957	114905819
		rs256971	114924494
		rs256973	114923036
		rs256980	114930706
		rs256997	114946741
		rs419939	114954320
		rs428191	114975013

Tabelle 16: Primäre Studie: 132 SNPs mit der Anzahl (n) der Genotypen 11, 12 und 22 der Kontrollen (co), 1 ist das häufigere und 2 das seltenere Allel sowie der Frequenz des selteneren Allels (minAF)

Gen	SNP	Genotyp Kontrollen			minAfco
		n11co	n12co	n22co	
CD14	rs2569190	210	376	146	45,6
	rs4914	562	158	8	12
CD36	rs1054516	201	371	151	46,5
	rs13230419	236	343	145	43,7
	rs1527483	626	94	4	7
	rs3211817	631	96	4	7,1
	rs3211825	695	36	0	2,5
	rs3211827	279	352	100	37,8
	rs3211876	687	43	1	3,1
	rs3211881	638	84	3	6,2
	rs3211883	606	112	7	8,7
	rs3211908	663	66	1	4,7
	rs3211913	705	23	1	1,7
	rs3212001	0	0	0	0
	rs3212012	713	10	0	0,7
	rs3212013	0	0	0	0
	rs5956	683	47	1	3,4
IRAK4	rs12311633	706	26	1	1,9
	rs1461567	371	307	54	28,3
	rs4238087	582	139	12	11,1
	rs4251434	733	0	0	0
	rs4251444	648	80	3	5,9
	rs4251485	733	0	0	0
	rs4251498	733	0	0	0
	rs4251512	689	44	0	3
	rs4251513	194	379	160	47,7
	rs4251520	554	166	13	13,1
	rs4251527	621	108	4	7,9
	rs4251550	733	0	0	0
	rs4251572	733	0	0	0
	rs4251576	714	19	0	1,3
MyD88	rs4988453	0	0	0	0
	rs6853	562	152	10	11,9
	rs7744	505	207	18	16,6
TAB1	rs9611173	666	67	0	4,6
TAK1	rs10485120	709	22	1	1,6
	rs12195854	654	76	3	5,6
	rs13208824	542	173	17	14,1
	rs157428	683	48	1	3,4
	rs157692	319	320	92	34,5

Gen	SNP	Genotyp Kontrollen			minAfco
		n11co	n12co	n22co	
TAK1	rs16883102	646	85	2	6,1
	rs3799912	581	142	9	10,9
	rs7769929	594	123	5	9,2
	rs812606	378	292	63	28,5
	rs9345031	680	51	1	3,6
TBK1	rs10878176	410	282	41	24,8
	rs11175411	586	136	11	10,8
	rs11175414	698	32	1	2,3
	rs11175416	683	47	1	3,4
	rs12367468	245	352	136	42,6
	rs7303577	576	152	5	11,1
	rs7972334	637	94	2	6,7
TIRAP	rs2298452	674	55	1	3,9
	rs3802813	677	54	1	3,8
	rs591163	456	238	39	21,6
	rs8177376	415	276	42	24,6
	rs8177401	685	45	2	3,3
TLR1	rs11725309	507	195	20	16,3
	rs4833092	664	62	0	4,3
	rs4833103	219	357	151	45,3
	rs5743611	558	156	10	12,2
TLR2	rs1337	410	272	42	24,6
	rs1339	430	256	38	22,9
	rs1816702	550	161	18	13,5
	rs2405432	717	7	0	0,5
	rs3804100	635	92	3	6,7
	rs5743704	657	60	3	4,6
	rs5743708	681	51	1	3,6
	rs7656411	445	257	27	21,3
TLR4	rs10759932	528	176	19	14,8
	rs10983755	684	46	0	3,2
	rs11536889	541	168	16	13,8
	rs11536897	695	35	0	2,4
	rs12344353	639	80	4	6,1
	rs1927906	599	125	5	9,3
	rs2149356	349	309	72	31
	rs2770146	361	300	67	29,8
	rs4986790	650	79	4	5,9
	rs7873784	541	166	16	13,7
TLR5	rs10797373	351	305	73	30,9
	rs10909854	0	0	0	0
	rs11583804	263	343	126	40,6

Gen	SNP	Genotyp Kontrollen			minAfco
		n11co	n12co	n22co	
TLR5	rs11586705	641	81	3	6
	rs12046158	0	0	0	0
	rs12728758	0	0	0	0
	rs12752801	0	0	0	0
	rs1456468	404	268	52	25,7
	rs2485945	493	206	23	17,5
	rs2788089	636	84	3	6,2
	rs2842925	692	29	0	2
	rs4648444	0	0	0	0
	rs5744168	631	99	3	7,2
	rs6659552	419	251	53	24,7
	rs878201	358	304	61	29,5
TOLLIP	rs11042484	0	0	0	0
	rs12285466	0	0	0	0
	rs3750920	0	0	0	0
	rs3829223	202	337	182	48,6
	rs5743869	683	41	0	2,8
	rs6578810	620	97	5	7,4
	rs7946008	354	295	66	29,9
	rs955396	631	93	5	7,1
	rs3750919	409	270	43	24,7
	rs3793964	286	320	117	38,3
	rs5743899	480	212	30	18,8
	rs5743942	0	0	0	0
TRAF6	rs331457	531	175	16	14,3
	rs5030411	254	352	124	41,1
	rs5030416	565	151	16	12,5
	rs5030442	664	66	0	4,5
	rs5030477	722	9	0	0,6
	rs5030492	0	0	0	0
	rs5030493	0	0	0	0
	rs5030502	712	17	0	1,2
rs5030504	705	19	0	1,3	
TRAM	rs10038493	259	346	125	40,8
	rs11957931	529	187	14	14,7
	rs13154471	678	45	1	3,2
	rs13160830	676	46	1	3,3
	rs13173913	714	15	0	1
	rs13178564	621	97	2	7
	rs1366079	723	0	0	0
	rs17473484	655	68	1	4,8
	rs2288384	604	117	3	8,5

Gen	SNP	Genotyp Kontrollen			minAfco
		n11co	n12co	n22co	
<i>TRAM</i>	rs256946	556	157	9	12,1
	rs256957	644	79	4	6
	rs256971	240	355	129	42,3
	rs256973	0	0	0	0
	rs256980	202	360	163	47,3
	rs256997	200	356	171	48
	rs419939	389	288	50	26,7
	rs428191	203	360	160	47

Tabelle 17: Primäre Studie: 132 SNPs mit der Anzahl (n) der Genotypen 11, 12 und 22 der Fälle (ca), 1 ist das häufigere und 2 das seltenere Allel sowie der Frequenz des selteneren Allels (minAF)

Gen	SNP	Genotyp Fälle			minAfca
		n11ca	n12ca	n22ca	
CD14	rs2569190	103	164	61	43,6
	rs4914	250	71	6	12,7
CD36	rs1054516	99	164	65	44,8
	rs13230419	90	171	64	46
	rs1527483	289	42	0	6,3
	rs3211817	292	37	1	5,9
	rs3211825	315	16	0	2,4
	rs3211827	134	149	47	36,8
	rs3211876	315	15	1	2,6
	rs3211881	0	0	0	0
	rs3211883	276	50	1	8
	rs3211908	0	0	0	0
	rs3211913	316	14	0	2,1
	rs3212001	0	14	314	97,9
	rs3212012	326	3	0	0,5
	rs3212013	0	0	0	0
rs5956	312	19	0	2,9	
IRAK4	rs12311633	325	6	0	0,9
	rs1461567	172	140	18	26,7
	rs4238087	246	77	8	14
	rs4251434	331	0	0	0
	rs4251444	279	47	3	8,1
	rs4251485	331	0	0	0
	rs4251498	331	0	0	0
	rs4251512	316	15	0	2,3
	rs4251513	77	170	83	50,9
	rs4251520	263	64	3	10,6
	rs4251527	276	50	5	9,1
	rs4251550	331	0	0	0
	rs4251572	331	0	0	0
	rs4251576	323	8	0	1,2
MyD88	rs4988453	0	0	0	0
	rs6853	272	54	4	9,4
	rs7744	225	91	9	16,8
TAB1	rs9611173	306	22	2	3,9
TAK1	rs10485120	319	12	0	1,8
	rs12195854	297	34	0	5,1
	rs13208824	241	81	8	14,7
	rs157428	308	22	0	3,3
	rs157692	157	136	38	32

Gen	SNP	Genotyp Fälle			minAfca
		n11ca	n12ca	n22ca	
TAK1	rs16883102	288	42	1	6,6
	rs3799912	258	69	3	11,4
	rs7769929	284	35	6	7,2
	rs812606	166	138	27	29
	rs9345031	310	19	2	3,5
TBK1	rs10878176	193	113	25	24,6
	rs11175411	269	54	8	10,6
	rs11175414	0	0	0	0
	rs11175416	316	15	0	2,3
	rs12367468	111	149	71	44
	rs7303577	255	68	8	12,7
	rs7972334	287	43	0	6,5
TIRAP	rs2298452	299	31	1	5
	rs3802813	299	31	1	5
	rs591163	207	104	17	21
	rs8177376	173	140	17	26,4
	rs8177401	307	24	0	3,6
TLR1	rs11725309	236	86	5	14,7
	rs4833092	301	30	0	4,5
	rs4833103	94	180	56	44,2
	rs5743611	251	73	6	12,9
TLR2	rs1337	190	119	19	23,9
	rs1339	197	117	15	22,3
	rs1816702	273	54	4	9,4
	rs2405432	330	1	0	0,2
	rs3804100	287	41	1	6,5
	rs5743704	303	25	3	4,7
	rs5743708	310	21	0	3,2
	rs7656411	0	0	0	0
TLR4	rs10759932	260	65	5	11,4
	rs10983755	313	18	0	2,7
	rs11536889	252	74	3	12,2
	rs11536897	297	34	0	5,1
	rs12344353	297	34	1	5,4
	rs1927906	278	52	1	8,2
	rs2149356	159	137	31	30,4
	rs2770146	166	128	37	30,5
	rs4986790	295	34	1	5,5
	rs7873784	231	88	10	16,4
TLR5	rs10797373	163	134	30	29,7
	rs10909854	0	0	330	100
	rs11583804	97	171	59	44,2

Gen	SNP	Genotyp Fälle			minAfca
		n11ca	n12ca	n22ca	
TLR5	rs11586705	0	0	0	0
	rs12046158	0	0	0	0
	rs12728758	0	0	0	0
	rs12752801	214	98	10	18,3
	rs1456468	158	141	31	30,8
	rs2485945	213	100	12	19,1
	rs2788089	294	35	1	5,6
	rs2842925	0	0	0	0
	rs4648444	0	0	0	0
	rs5744168	286	44	1	6,9
	rs6659552	186	125	16	24
	rs878201	173	109	34	28
TOLLIP	rs11042484	0	0	0	0
	rs12285466	0	0	0	0
	rs3750920	0	0	0	0
	rs3829223	67	160	70	50,5
	rs5743869	315	10	0	1,5
	rs6578810	288	37	2	6,3
	rs7946008	158	133	36	31,3
	rs955396	281	47	2	7,7
	rs3750919	195	113	16	22,4
	rs3793964	116	174	32	37
	rs5743899	0	0	0	0
	rs5743942	0	0	0	0
TRAF6	rs331457	244	79	7	14,1
	rs5030411	119	166	45	38,8
	rs5030416	247	75	5	13
	rs5030442	297	31	2	5,3
	rs5030477	325	6	0	0,9
	rs5030492	0	0	0	0
	rs5030493	0	0	0	0
	rs5030502	0	0	0	0
rs5030504	323	8	0	1,2	
TRAM	rs10038493	103	156	67	44,5
	rs11957931	239	83	6	14,5
	rs13154471	309	22	0	3,3
	rs13160830	306	24	0	3,6
	rs13173913	321	5	0	0,8
	rs13178564	281	46	0	7
	rs1366079	331	0	0	0
	rs17473484	311	19	1	3,2
	rs2288384	271	55	5	9,8

Gen	SNP	Genotyp Fälle			minAfca
		n11ca	n12ca	n22ca	
<i>TRAM</i>	rs256946	258	63	11	12,8
	rs256957	302	26	2	4,5
	rs256971	125	151	53	39,1
	rs256973	258	65	9	12,5
	rs256980	113	154	62	42,2
	rs256997	104	152	73	45,3
	rs419939	180	118	28	26,7
	rs428191	83	153	93	51,5

Tabelle 18: Primäre Studie: 132 SNPs mit der Anzahl (N) und der Anzahl (n) der Genotypen 11, 12 und 22 sowie den Frequenzen (F in %) bei Kontrollen (co) und Fällen (ca); 1 ist das häufigere und 2 das seltenere Allel.

Gen	SNP	Nco	Nca	n11co	n11ca	n12co	n12ca	n22co	n22ca	F22co	F22ca	F12co	F12ca
CD14	rs2569190	732	328	210	103	376	164	146	61	19,9	18,6	51,4	50,0
	rs4914	728	327	562	250	158	71	8	6	1,1	1,8	21,7	21,7
CD36	rs1054516	723	328	201	99	371	164	151	65	20,9	19,8	51,3	50,0
	rs13230419	724	325	236	90	343	171	145	64	20,0	19,7	47,4	52,6
	rs1527483	724	331	626	289	94	42	4	0	0,6	0,0	13,0	12,7
	rs3211817	731	330	631	292	96	37	4	1	0,5	0,3	13,1	11,2
	rs3211825	731	331	695	315	36	16	0	0	0,0	0,0	4,9	4,8
	rs3211827	731	330	279	134	352	149	100	47	13,7	14,2	48,2	45,2
	rs3211876	731	331	687	315	43	15	1	1	0,1	0,3	5,9	4,5
	rs3211881	725	0	638	0	84	0	3	0	0,4	0,0	11,6	0,0
	rs3211883	725	327	606	276	112	50	7	1	1,0	0,3	15,4	15,3
	rs3211908	730	0	663	0	66	0	1	0	0,1	0,0	9,0	0,0
	rs3211913	729	330	705	316	23	14	1	0	0,1	0,0	3,2	4,2
	rs3212001	0	328	0	0	0	14	0	314	0,0	95,7	0,0	4,3
	rs3212012	723	329	713	326	10	3	0	0	0,0	0,0	1,4	0,9
rs3212013	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	
rs5956	731	331	683	312	47	19	1	0	0,1	0,0	6,4	5,7	
IRAK4	rs12311633	733	331	706	325	26	6	1	0	0,1	0,0	3,5	1,8
	rs1461567	732	330	371	172	307	140	54	18	7,4	5,5	41,9	42,4
	rs4238087	733	331	582	246	139	77	12	8	1,6	2,4	19,0	23,3
	rs4251434	733	331	733	331	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
	rs4251444	731	329	648	279	80	47	3	3	0,4	0,9	10,9	14,3
	rs4251485	733	331	733	331	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
	rs4251498	733	331	733	331	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
	rs4251512	733	331	689	316	44	15	0	0	0,0	0,0	6,0	4,5
	rs4251513	733	330	194	77	379	170	160	83	21,8	25,2	51,7	51,5
	rs4251520	733	330	554	263	166	64	13	3	1,8	0,9	22,6	19,4
	rs4251527	733	331	621	276	108	50	4	5	0,5	1,5	14,7	15,1
	rs4251550	733	331	733	331	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
rs4251572	733	331	733	331	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	
rs4251576	733	331	714	323	19	8	0	0	0,0	0,0	2,6	2,4	
MyD88	rs4988453	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
	rs6853	724	330	562	272	152	54	10	4	1,4	1,2	21,0	16,4
	rs7744	730	325	505	225	207	91	18	9	2,5	2,8	28,4	28,0
TAB1	rs9611173	733	330	666	306	67	22	0	2	0,0	0,6	9,1	6,7
TAK1	rs10485120	732	331	709	319	22	12	1	0	0,1	0,0	3,0	3,6
	rs12195854	733	331	654	297	76	34	3	0	0,4	0,0	10,4	10,3
	rs13208824	732	330	542	241	173	81	17	8	2,3	2,4	23,6	24,5
	rs157428	732	330	683	308	48	22	1	0	0,1	0,0	6,6	6,7
	rs157692	731	331	319	157	320	136	92	38	12,6	11,5	43,8	41,1
	rs16883102	733	331	646	288	85	42	2	1	0,3	0,3	11,6	12,7
	rs3799912	732	330	581	258	142	69	9	3	1,2	0,9	19,4	20,9
	rs7769929	722	325	594	284	123	35	5	6	0,7	1,8	17,0	10,8
rs812606	733	331	378	166	292	138	63	27	8,6	8,2	39,8	41,7	
rs9345031	732	331	680	310	51	19	1	2	0,1	0,6	7,0	5,7	
TBK1	rs10878176	733	331	410	193	282	113	41	25	5,6	7,6	38,5	34,1
	rs11175411	733	331	586	269	136	54	11	8	1,5	2,4	18,6	16,3

Gen	SNP	Nco	Nca	n11co	n11ca	n12co	n12ca	n22co	n22ca	F22co	F22ca	F12co	F12ca
TBK1	rs11175414	731	0	698	0	32	0	1	0	0,1	0,0	4,4	0,0
	rs11175416	731	331	683	316	47	15	1	0	0,1	0,0	6,4	4,5
	rs12367468	733	331	245	111	352	149	136	71	18,6	21,5	48,0	45,0
	rs7303577	733	331	576	255	152	68	5	8	0,7	2,4	20,7	20,5
	rs7972334	733	330	637	287	94	43	2	0	0,3	0,0	12,8	13,0
TIRAP	rs2298452	730	331	674	299	55	31	1	1	0,1	0,3	7,5	9,4
	rs3802813	732	331	677	299	54	31	1	1	0,1	0,3	7,4	9,4
	rs591163	733	328	456	207	238	104	39	17	5,3	5,2	32,5	31,7
	rs8177376	733	330	415	173	276	140	42	17	5,7	5,2	37,7	42,4
	rs8177401	732	331	685	307	45	24	2	0	0,3	0,0	6,1	7,3
TLR1	rs11725309	722	327	507	236	195	86	20	5	2,8	1,5	27,0	26,3
	rs4833092	726	331	664	301	62	30	0	0	0,0	0,0	8,5	9,1
	rs4833103	727	330	219	94	357	180	151	56	20,8	17,0	49,1	54,5
	rs5743611	724	330	558	251	156	73	10	6	1,4	1,8	21,5	22,1
TLR2	rs1337	724	328	410	190	272	119	42	19	5,8	5,8	37,6	36,3
	rs1339	724	329	430	197	256	117	38	15	5,2	4,6	35,4	35,6
	rs1816702	729	331	550	273	161	54	18	4	2,5	1,2	22,1	16,3
	rs2405432	724	331	717	330	7	1	0	0	0,0	0,0	1,0	0,3
	rs3804100	730	329	635	287	92	41	3	1	0,4	0,3	12,6	12,5
	rs5743704	720	331	657	303	60	25	3	3	0,4	0,9	8,3	7,6
	rs5743708	733	331	681	310	51	21	1	0	0,1	0,0	7,0	6,3
rs7656411	729	0	445	0	257	0	27	0	3,7	0,0	35,3	0,0	
TLR4	rs10759932	723	330	528	260	176	65	19	5	2,6	1,5	24,3	19,7
	rs10983755	730	331	684	313	46	18	0	0	0,0	0,0	6,3	5,4
	rs11536889	725	329	541	252	168	74	16	3	2,2	0,9	23,2	22,5
	rs11536897	730	331	695	297	35	34	0	0	0,0	0,0	4,8	10,3
	rs12344353	723	332	639	297	80	34	4	1	0,6	0,3	11,1	10,2
	rs1927906	729	331	599	278	125	52	5	1	0,7	0,3	17,1	15,7
	rs2149356	730	327	349	159	309	137	72	31	9,9	9,5	42,3	41,9
	rs2770146	728	331	361	166	300	128	67	37	9,2	11,2	41,2	38,7
	rs4986790	733	330	650	295	79	34	4	1	0,5	0,3	10,8	10,3
rs7873784	723	329	541	231	166	88	16	10	2,2	3,0	23,0	26,7	
TLR5	rs10797373	729	327	351	163	305	134	73	30	10,0	9,2	41,8	41,0
	rs10909854	0	330	0	0	0	0	0	330	0,0	100,0	0,0	0,0
	rs11583804	732	327	263	97	343	171	126	59	17,2	18,0	46,9	52,3
	rs11586705	725	0	641	0	81	0	3	0	0,4	0,0	11,2	0,0
	rs12046158	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
	rs12728758	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
	rs12752801	0	322	0	214	0	98	0	10	0,0	3,1	0,0	30,4
	rs1456468	724	330	404	158	268	141	52	31	7,2	9,4	37,0	42,7
	rs2485945	722	325	493	213	206	100	23	12	3,2	3,7	28,5	30,8
	rs2788089	723	330	636	294	84	35	3	1	0,4	0,3	11,6	10,6
	rs2842925	721	0	692	0	29	0	0	0	0,0	0,0	4,0	0,0
	rs4648444	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
	rs5744168	733	331	631	286	99	44	3	1	0,4	0,3	13,5	13,3
rs6659552	723	327	419	186	251	125	53	16	7,3	4,9	34,7	38,2	
rs878201	723	316	358	173	304	109	61	34	8,4	10,8	42,0	34,5	
TOLLIP	rs11042484	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
	rs12285466	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
	rs3750920	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0

Gen	SNP	Nco	Nca	n11co	n11ca	n12co	n12ca	n22co	n22ca	F22co	F22ca	F12co	F12ca
TOLLIP	rs3829223	721	297	202	67	337	160	182	70	25,2	23,6	46,7	53,9
	rs5743869	724	325	683	315	41	10	0	0	0,0	0,0	5,7	3,1
	rs6578810	722	327	620	288	97	37	5	2	0,7	0,6	13,4	11,3
	rs7946008	715	327	354	158	295	133	66	36	9,2	11,0	41,3	40,7
	rs955396	729	330	631	281	93	47	5	2	0,7	0,6	12,8	14,2
	rs3750919	722	324	409	195	270	113	43	16	6,0	4,9	37,4	34,9
	rs3793964	723	322	286	116	320	174	117	32	16,2	9,9	44,3	54,0
	rs5743899	722	0	480	0	212	0	30	0	4,2	0,0	29,4	0,0
	rs5743942	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
TRAF6	rs331457	722	330	531	244	175	79	16	7	2,2	2,1	24,2	23,9
	rs5030411	730	330	254	119	352	166	124	45	17,0	13,6	48,2	50,3
	rs5030416	732	327	565	247	151	75	16	5	2,2	1,5	20,6	22,9
	rs5030442	730	330	664	297	66	31	0	2	0,0	0,6	9,0	9,4
	rs5030477	731	331	722	325	9	6	0	0	0,0	0,0	1,2	1,8
	rs5030492	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
	rs5030493	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
	rs5030502	729	0	712	0	17	0	0	0	0,0	0,0	2,3	0,0
	rs5030504	724	331	705	323	19	8	0	0	0,0	0,0	2,6	2,4
TRAM	rs10038493	730	326	259	103	346	156	125	67	17,1	20,6	47,4	47,9
	rs11957931	730	328	529	239	187	83	14	6	1,9	1,8	25,6	25,3
	rs13154471	724	331	678	309	45	22	1	0	0,1	0,0	6,2	6,6
	rs13160830	723	330	676	306	46	24	1	0	0,1	0,0	6,4	7,3
	rs13173913	729	326	714	321	15	5	0	0	0,0	0,0	2,1	1,5
	rs13178564	720	327	621	281	97	46	2	0	0,3	0,0	13,5	14,1
	rs1366079	723	331	723	331	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
	rs17473484	724	331	655	311	68	19	1	1	0,1	0,3	9,4	5,7
	rs2288384	724	331	604	271	117	55	3	5	0,4	1,5	16,2	16,6
	rs256946	722	332	556	258	157	63	9	11	1,2	3,3	21,7	19,0
	rs256957	727	330	644	302	79	26	4	2	0,6	0,6	10,9	7,9
	rs256971	724	329	240	125	355	151	129	53	17,8	16,1	49,0	45,9
	rs256973	0	332	0	258	0	65	0	9	0,0	2,7	0,0	19,6
	rs256980	725	329	202	113	360	154	163	62	22,5	18,8	49,7	46,8
	rs256997	727	329	200	104	356	152	171	73	23,5	22,2	49,0	46,2
rs419939	727	326	389	180	288	118	50	28	6,9	8,6	39,6	36,2	
rs428191	723	329	203	83	360	153	160	93	22,1	28,3	49,8	46,5	

Tabelle 19: Primäre Studie: 132 SNPs mit der Anzahl (N) bei Kontrollen und Fällen, dem p-Wert des allelbasierten Fall-Kontroll- χ^2 -Tests (P_{CCA}) und der Odds Ratio (carriership of common allele, ORC) mit 95% Konfidenzintervall (CI)

Gen	SNP	N Kontrollen	N Fälle	P_{CCA}	ORC	95%-CI
CD14	rs2569190	732	328	0,3849282	1,09	0.78-1.52
	rs4914	728	327	0,63048924	0,59	0.20-1.73
CD36	rs1054516	723	328	0,46216297	1,07	0.77-1.48
	rs13230419	724	325	0,33014067	1,02	0.74-1.42
	rs1527483	724	331	0,55419161	-1	0.00-0.00
	rs3211817	731	330	0,30745948	1,81	0.20-16.26
	rs3211825	731	331	0,9499291	-1	0.00-0.00
	rs3211827	731	330	0,6793289	0,95	0.66-1.39
	rs3211876	731	331	0,51781967	0,45	0.03-7.25
	rs3211881	725	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs3211883	725	327	0,5731262	3,18	0.39-25.94
	rs3211908	730	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs3211913	729	330	0,51922372	-1	0.00-0.00
	rs3212001	0	328	-1	-1	0.00-0.00
	rs3212012	723	329	0,52252439	-1	0.00-0.00
	rs3212013	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs5956	731	331	0,55932739	-1	0.00-0.00
IRAK4	rs12311633	733	331	0,08740969	-1	0.00-0.00
	rs1461567	732	330	0,42386129	1,38	0.80-2.39
	rs4238087	733	331	0,05445862	0,67	0.27-1.66
	rs4251434	733	331	-1	-1	0.00-0.00
	rs4251444	731	329	0,06155204	0,45	0.09-2.23
	rs4251485	733	331	-1	-1	0.00-0.00
	rs4251498	733	331	-1	-1	0.00-0.00
	rs4251512	733	331	0,3387361	-1	0.00-0.00
	rs4251513	733	330	0,16839954	0,83	0.61-1.13
	rs4251520	733	330	0,10600898	1,97	0.56-6.95
	rs4251527	733	331	0,37227828	0,36	0.10-1.34
	rs4251550	733	331	-1	-1	0.00-0.00
	rs4251572	733	331	-1	-1	0.00-0.00
	rs4251576	733	331	0,86728004	-1	0.00-0.00
MyD88	rs4988453	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs6853	724	330	0,09220249	1,14	0.36-3.67
	rs7744	730	325	0,94313485	0,89	0.39-2.00
TAB1	rs9611173	733	330	0,51051754	-1	0.00-0.00
TAK1	rs10485120	732	331	0,77422104	-1	0.00-0.00
	rs12195854	733	331	0,66693529	-1	0.00-0.00
	rs13208824	732	330	0,73414472	0,96	0.41-2.24
	rs157428	732	330	0,92303913	-1	0.00-0.00
	rs157692	731	331	0,26981102	1,11	0.74-1.66
	rs16883102	733	331	0,61159296	0,9	0.08-9.99

Gen	SNP	N Kontrollen	N Fälle	P _{CCA}	ORC	95%-CI
TAK1	rs3799912	732	330	0,76757212	1,36	0.36-5.04
	rs7769929	722	325	0,13490401	0,37	0.11-1.22
	rs812606	733	331	0,81697612	1,06	0.66-1.70
	rs9345031	732	331	0,86675405	0,23	0.02-2.49
TBK1	rs10878176	733	331	0,91838584	0,73	0.43-1.21
	rs11175411	733	331	0,88819945	0,62	0.25-1.54
	rs11175414	731	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs11175416	731	331	0,17537758	-1	0.00-0.00
	rs12367468	733	331	0,54794427	0,83	0.60-1.15
	rs7303577	733	331	0,2750086	0,28	0.09-0.85
	rs7972334	733	330	0,8843259	-1	0.00-0.00
TIRAP	rs2298452	730	331	0,25321368	0,45	0.03-7.26
	rs3802813	732	331	0,21674517	0,45	0.03-7.24
	rs591163	733	328	0,78773799	1,03	0.57-1.85
	rs8177376	733	330	0,37406958	1,12	0.63-2.00
	rs8177401	732	331	0,74411151	-1	0.00-0.00
TLR1	rs11725309	722	327	0,35313269	1,83	0.68-4.93
	rs4833092	726	331	0,78441612	-1	0.00-0.00
	rs4833103	727	330	0,64344099	1,28	0.91-1.80
	rs5743611	724	330	0,63971862	0,76	0.27-2.10
TLR2	rs1337	724	328	0,74670535	1	0.57-1.75
	rs1339	724	329	0,76552389	1,16	0.63-2.14
	rs1816702	729	331	0,00690437	2,07	0.69-6.16
	rs2405432	724	331	0,24981068	-1	0.00-0.00
	rs3804100	730	329	0,87954893	1,35	0.14-13.06
	rs5743704	720	331	0,9195966	0,46	0.09-2.28
	rs5743708	733	331	0,60552859	-1	0.00-0.00
	rs7656411	729	0	-1	-1	0.00-0.00
TLR4	rs10759932	723	330	0,03353477	1,75	0.65-4.74
	rs10983755	730	331	0,59013503	-1	0.00-0.00
	rs11536889	725	329	0,3072549	2,45	0.71-8.47
	rs11536897	730	331	9,83E-04	-1	0.00-0.00
	rs12344353	723	332	0,54696706	1,84	0.21-16.54
	rs1927906	729	331	0,40921609	2,28	0.27-19.58
	rs2149356	730	327	0,78272934	1,04	0.67-1.63
	rs2770146	728	331	0,74251674	0,81	0.53-1.23
	rs4986790	733	330	0,66097099	1,81	0.20-16.21
	rs7873784	723	329	0,1008291	0,72	0.32-1.61
TLR5	rs10797373	729	327	0,55819828	1,1	0.70-1.72
	rs10909854	0	330	-1	-1	0.00-0.00
	rs11583804	732	327	0,12618464	0,94	0.67-1.33
	rs11586705	725	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs12046158	0	0	-1	-1	0.00-0.00

Gen	SNP	N Kontrollen	N Fälle	P _{CCA}	ORC	95%-CI
TLR5	rs12728758	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs12752801	0	322	-1	-1	0.00-0.00
	rs1456468	724	330	0,01542111	0,75	0.47-1.19
	rs2485945	722	325	0,36994947	0,86	0.42-1.75
	rs2788089	723	330	0,58050056	1,37	0.14-13.23
	rs2842925	721	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs4648444	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs5744168	733	331	0,85892023	1,36	0.14-13.09
	rs6659552	723	327	0,73615369	1,54	0.87-2.73
	rs878201	723	316	0,50160229	0,76	0.49-1.19
TOLLIP	rs11042484	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs12285466	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs3750920	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs3829223	721	297	0,43760134	1,09	0.80-1.50
	rs5743869	724	325	0,07536239	-1	0.00-0.00
	rs6578810	722	327	0,34451749	1,13	0.22-5.87
	rs7946008	715	327	0,49361826	0,82	0.54-1.26
	rs955396	729	330	0,58638392	1,13	0.22-5.87
	rs3750919	722	324	0,26002514	1,22	0.68-2.20
	rs3793964	723	322	0,55516452	1,75	1.16-2.65
	rs5743899	722	0	-1	-1	0.00-0.00
rs5743942	0	0	-1	-1	0.00-0.00	
TRAF6	rs331457	722	330	0,88180106	1,05	0.43-2.57
	rs5030411	730	330	0,31808934	1,3	0.90-1.87
	rs5030416	732	327	0,75062508	1,44	0.52-3.96
	rs5030442	730	330	0,43352095	-1	0.00-0.00
	rs5030477	731	331	0,45859356	-1	0.00-0.00
	rs5030492	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs5030493	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs5030502	729	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs5030504	724	331	0,84410361	-1	0.00-0.00
TRAM	rs10038493	730	326	0,11573156	0,8	0.57-1.11
	rs11957931	730	328	0,88313515	1,05	0.40-2.76
	rs13154471	724	331	0,92608998	-1	0.00-0.00
	rs13160830	723	330	0,71048528	-1	0.00-0.00
	rs13173913	729	326	0,56611269	-1	0.00-0.00
	rs13178564	720	327	0,98691993	-1	0.00-0.00
	rs1366079	723	331	-1	-1	0.00-0.00
	rs17473484	724	331	0,08119783	0,46	0.03-7.32
	rs2288384	724	331	0,32180015	0,27	0.06-1.14
	rs256946	722	332	0,6582052	0,37	0.15-0.90
	rs256957	727	330	0,18046698	0,91	0.17-4.98
	rs256971	724	329	0,15708771	1,13	0.80-1.60

Gen	SNP	N Kontrollen	N Fälle	P _{CCA}	ORC	95%-CI
TRAM	rs256973	0	332	-1	-1	0.00-0.00
	rs256980	725	329	0,03066862	1,25	0.90-1.73
	rs256997	727	329	0,24747564	1,08	0.79-1.47
	rs419939	727	326	0,99919258	0,79	0.49-1.27
	rs428191	723	329	0,05587295	0,72	0.54-0.97

Tabelle 20: Primäre Studie: SNPs mit der Anzahl (N) bei Kontrollen und Fällen, dem p-Wert des genotypbasierten Fall-Kontroll- χ^2 -Tests (P_{CCG}) und der Odds Ratio (carriership of rare Allele, ORR) mit 95% Konfidenzintervall (CI)

Gen	SNP	N Kontrollen	N Fälle	P_{CCG}	ORR	95%-CI
CD14	rs2569190	732	328	0,65094587	0,88	0.66-1.17
	rs4914	728	327	0,62584893	1,04	0.77-1.42
CD36	rs1054516	723	328	0,72240595	0,89	0.67-1.19
	rs13230419	724	325	0,22251061	1,26	0.95-1.68
	rs1527483	724	331	0,39399856	0,93	0.63-1.37
	rs3211817	731	330	0,58300362	0,82	0.55-1.22
	rs3211825	731	331	0,94928957	0,98	0.54-1.79
	rs3211827	731	330	0,65925989	0,9	0.69-1.18
	rs3211876	731	331	0,56962062	0,79	0.44-1.43
	rs3211881	725	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs3211883	725	327	0,51909653	0,94	0.66-1.35
	rs3211908	730	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs3211913	729	330	0,5371961	1,3	0.66-2.55
	rs3212001	0	328	-1	-1	0.00-0.00
	rs3212012	723	329	0,5212264	0,66	0.18-2.40
	rs3212013	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs5956	731	331	0,72483432	0,87	0.50-1.50
IRAK4	rs12311633	733	331	0,24479864	0,48	0.20-1.18
	rs1461567	732	330	0,51050683	0,94	0.73-1.22
	rs4238087	733	331	0,16777037	1,33	0.98-1.81
	rs4251434	733	331	-1	-1	0.00-0.00
	rs4251444	731	329	0,17325827	1,4	0.96-2.04
	rs4251485	733	331	-1	-1	0.00-0.00
	rs4251498	733	331	-1	-1	0.00-0.00
	rs4251512	733	331	0,33174522	0,74	0.41-1.36
	rs4251513	733	330	0,3720746	1,18	0.87-1.60
	rs4251520	733	330	0,25356108	0,79	0.57-1.08
	rs4251527	733	331	0,27536902	1,1	0.78-1.57
	rs4251550	733	331	-1	-1	0.00-0.00
	rs4251572	733	331	-1	-1	0.00-0.00
	rs4251576	733	331	0,866427	0,93	0.40-2.15
MyD88	rs4988453	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs6853	724	330	0,2023027	0,74	0.53-1.03
	rs7744	730	325	0,9554638	1	0.75-1.32
TAB1	rs9611173	733	330	0,0452171	0,78	0.48-1.27
TAK1	rs10485120	732	331	0,69365995	1,16	0.57-2.36
	rs12195854	733	331	0,50578599	0,95	0.62-1.45
	rs13208824	732	330	0,94142008	1,05	0.79-1.41
	rs157428	732	330	0,79653849	1	0.59-1.68
	rs157692	731	331	0,51117202	0,86	0.66-1.11
	rs16883102	733	331	0,87472122	1,11	0.75-1.64
	rs3799912	732	330	0,77548943	1,07	0.78-1.47

Gen	SNP	N Kontrollen	N Fälle	P _{CCG}	ORR	95%-CI
TAK1	rs7769929	722	325	0,00923193	0,67	0.46-0.98
	rs812606	733	331	0,84553136	1,06	0.82-1.37
	rs9345031	732	331	0,31643291	0,89	0.52-1.50
TBK1	rs10878176	733	331	0,24766905	0,91	0.70-1.18
	rs11175411	733	331	0,41431645	0,92	0.66-1.28
	rs11175414	731	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs11175416	731	331	0,3755579	0,68	0.37-1.22
	rs12367468	733	331	0,49119527	1	0.76-1.31
	rs7303577	733	331	0,05812748	1,09	0.80-1.49
	rs7972334	733	330	0,63507032	0,99	0.68-1.46
TIRAP	rs2298452	730	331	0,5039173	1,29	0.82-2.03
	rs3802813	732	331	0,45517436	1,32	0.83-2.08
	rs591163	733	328	0,96160359	0,96	0.73-1.26
	rs8177376	733	330	0,33560929	1,18	0.91-1.54
	rs8177401	732	331	0,50951985	1,14	0.68-1.90
TLR1	rs11725309	722	327	0,44542311	0,91	0.68-1.21
	rs4833092	726	331	0,7794675	1,07	0.68-1.69
	rs4833103	727	330	0,20170628	1,08	0.81-1.44
	rs5743611	724	330	0,83957268	1,06	0.78-1.44
TLR2	rs1337	724	328	0,91968343	0,95	0.73-1.23
	rs1339	724	329	0,89351547	0,98	0.75-1.28
	rs1816702	729	331	0,03126636	0,65	0.47-0.91
	rs2405432	724	331	0,24889697	0,31	0.04-2.53
	rs3804100	730	329	0,963711	0,98	0.66-1.44
	rs5743704	720	331	0,56969564	0,96	0.61-1.54
	rs5743708	733	331	0,74375831	0,89	0.53-1.50
TLR4	rs7656411	729	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs10759932	723	330	0,11235682	0,73	0.53-0.99
	rs10983755	730	331	0,58423016	0,86	0.49-1.50
	rs11536889	725	329	0,32168309	0,9	0.66-1.22
	rs11536897	730	331	8,02E-04	2,27	1.39-3.71
	rs12344353	723	332	0,78755281	0,9	0.59-1.36
	rs1927906	729	331	0,61727122	0,88	0.62-1.25
	rs2149356	730	327	0,96306896	0,97	0.75-1.26
	rs2770146	728	331	0,52705057	0,98	0.75-1.27
	rs4986790	733	330	0,84101913	0,93	0.61-1.41
rs7873784	723	329	0,26919262	1,26	0.94-1.69	
TLR5	rs10797373	729	327	0,84490688	0,93	0.72-1.21
	rs10909854	0	330	-1	-1	0.00-0.00
	rs11583804	732	327	0,13035089	1,33	1.00-1.76
	rs11586705	725	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs12046158	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs12728758	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs12752801	0	322	-1	-1	0.00-0.00
	rs1456468	724	330	0,05025616	1,37	1.06-1.78

Gen	SNP	N Kontrollen	N Fälle	P _{CCG}	ORR	95%-CI
TLR5	rs2485945	722	325	0,66822112	1,13	0.86-1.49
	rs2788089	723	330	0,85533151	0,9	0.59-1.35
	rs2842925	721	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs4648444	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs5744168	733	331	0,96075442	0,97	0.67-1.42
	rs6659552	723	327	0,23985443	1,04	0.80-1.36
	rs878201	723	316	0,05988759	0,81	0.62-1.06
TOLLIP	rs11042484	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs12285466	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs3750920	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs3829223	721	297	0,09069855	1,34	0.97-1.83
	rs5743869	724	325	0,0717289	0,53	0.26-1.07
	rs6578810	722	327	0,62505835	0,82	0.55-1.22
	rs7946008	715	327	0,66742711	1,05	0.81-1.36
	rs955396	729	330	0,79730226	1,12	0.78-1.63
	rs3750919	722	324	0,52658878	0,86	0.66-1.13
	rs3793964	723	322	0,0034813	1,16	0.89-1.53
	rs5743899	722	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs5743942	0	0	-1	-1	0.00-0.00
TRAF6	rs331457	722	330	0,98883178	0,98	0.73-1.32
	rs5030411	730	330	0,38575213	0,95	0.72-1.24
	rs5030416	732	327	0,56671216	1,1	0.81-1.49
	rs5030442	730	330	0,10655376	1,12	0.72-1.74
	rs5030477	731	331	0,45698864	1,48	0.52-4.20
	rs5030492	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs5030493	0	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs5030502	729	0	-1	-1	0.00-0.00
	rs5030504	724	331	0,84309652	0,92	0.40-2.12
TRAM	rs10038493	730	326	0,2924376	1,19	0.90-1.57
	rs11957931	730	328	0,9885736	0,98	0.73-1.31
	rs13154471	724	331	0,76884736	1,05	0.62-1.77
	rs13160830	723	330	0,68612834	1,13	0.68-1.88
	rs13173913	729	326	0,56424271	0,74	0.27-2.06
	rs13178564	720	327	0,61592512	1,03	0.70-1.50
	rs1366079	723	331	-1	-1	0.00-0.00
	rs17473484	724	331	0,11660122	0,61	0.36-1.02
	rs2288384	724	331	0,15765789	1,11	0.79-1.57
	rs256946	722	332	0,05055602	0,96	0.70-1.31
	rs256957	727	330	0,32139944	0,72	0.46-1.13
	rs256971	724	329	0,30471567	0,81	0.62-1.06
	rs256973	0	332	-1	-1	0.00-0.00
	rs256980	725	329	0,08362208	0,74	0.56-0.98
	rs256997	727	329	0,3949843	0,82	0.62-1.09
	rs419939	727	326	0,42880639	0,93	0.72-1.21
rs428191	723	329	0,09450922	1,16	0.86-1.56	

Tabelle 21: Primäre Studie: SNPs mit dem p-Wert des allelbasierten Fall-Kontroll- χ^2 -Tests (P_{CCA}), dem p-Wert des genotypbasierten Fall-Kontroll- χ^2 -Tests (P_{CCG}) sowie deren adjustierte p-Werte (Adjust.- P_{CCA} und Adjust.- P_{CCG})

Gen	SNP	P_{CCA}	Adjust.- P_{CCA}	P_{CCG}	Adjust.- P_{CCG}	
CD14	rs2569190	0,384928204	41,95717422	0,650945875	70,95310034	
	rs4914	0,630489245	68,7233277	0,625848931	68,2175335	
CD36	rs1054516	0,462162966	50,3757633	0,722405947	78,74224821	
	rs13230419	0,330140666	35,98533258	0,222510608	24,25365623	
	rs1527483	0,554191609	60,40688542	0,393998562	42,94584329	
	rs3211817	0,30745948	33,5130833	0,583003621	63,54739469	
	rs3211825	0,949929098	103,5422717	0,949289574	103,4725635	
	rs3211827	0,679328895	74,0468496	0,659259887	71,85932765	
	rs3211876	0,517819674	56,44234451	0,569620625	62,08864811	
	rs3211881	-1	-109	-1	-109	
	rs3211883	0,573126198	62,4707556	0,519096531	56,58152185	
	rs3211908	-1	-109	-1	-109	
	rs3211913	0,51922372	56,5953855	0,537196101	58,55437501	
	rs3212001	-1	-109	-1	-109	
	rs3212012	0,522524391	56,95515863	0,521226399	56,81367746	
	rs3212013	-1	-109	-1	-109	
	rs5956	0,55932739	60,96668551	0,724834321	79,00694097	
	IRAK4	rs12311633	0,087409691	9,527656265	0,244798643	26,68305213
rs1461567		0,423861285	46,20088011	0,510506833	55,64524483	
rs4238087		0,05445862	5,935989623	0,167770373	18,28697069	
rs4251434		-1	-109	-1	-109	
rs4251444		0,061552036	6,709171978	0,173258267	18,88515106	
rs4251485		-1	-109	-1	-109	
rs4251498		-1	-109	-1	-109	
rs4251512		0,338736104	36,92223528	0,331745219	36,16022888	
rs4251513		0,168399541	18,35554999	0,3720746	40,55613145	
rs4251520		0,106008977	11,55497846	0,253561081	27,63815778	
rs4251527		0,37227828	40,57833255	0,275369022	30,0152234	
rs4251550		-1	-109	-1	-109	
rs4251572		-1	-109	-1	-109	
rs4251576		0,867280043	94,53352471	0,866427005	94,44054353	
MyD88		rs4988453	-1	-109	-1	-109
		rs6853	0,092202485	10,05007089	0,202302698	22,05099406
	rs7744	0,943134846	102,8016982	0,955463801	104,1455543	
TAB1	rs9611173	0,510517545	55,6464124	0,045217102	4,928664139	
TAK1	rs10485120	0,774221041	84,39009347	0,693659947	75,60893426	
	rs12195854	0,666935286	72,69594623	0,505785988	55,13067272	
	rs13208824	0,734144721	80,02177458	0,941420077	102,6147884	
	rs157428	0,923039132	100,6112653	0,796538492	86,82269564	
	rs157692	0,269811021	29,40940133	0,511172024	55,71775057	
	rs16883102	0,611592957	66,66363229	0,874721219	95,3446129	
	rs3799912	0,767572117	83,66536072	0,775489427	84,52834749	
	rs7769929	0,13490401	14,70453707	0,009231932	1,006280578	
	rs812606	0,816976117	89,05039673	0,845531364	92,16291867	
	rs9345031	0,86675405	94,47619148	0,31643291	34,49118722	

Gen	SNP	P _{CCA}	Adjust.-P _{CCA}	P _{CCG}	Adjust.-P _{CCG}
TBK1	rs10878176	0,918385838	100,1040563	0,247669055	26,99592699
	rs11175411	0,888199445	96,81373951	0,414316452	45,16049325
	rs11175414	-1	-109	-1	-109
	rs11175416	0,175377581	19,1161563	0,375557896	40,93581065
	rs12367468	0,547944265	59,72592493	0,491195273	53,54028481
	rs7303577	0,275008602	29,97593763	0,058127482	6,335895496
	rs7972334	0,884325895	96,39152258	0,635070317	69,22266451
TIRAP	rs2298452	0,253213676	27,60029067	0,503917298	54,92698552
	rs3802813	0,216745165	23,62522301	0,455174355	49,61400473
	rs591163	0,787737989	85,8634408	0,961603592	104,8147915
	rs8177376	0,374069577	40,77358391	0,335609289	36,58141248
	rs8177401	0,74411151	81,10815464	0,509519853	55,53766399
TLR1	rs11725309	0,353132688	38,49146304	0,445423114	48,55111944
	rs4833092	0,784416125	85,50135758	0,7794675	84,96195752
	rs4833103	0,643440989	70,13506784	0,201706283	21,98598482
	rs5743611	0,639718624	69,72932997	0,839572682	91,51342238
TLR2	rs1337	0,746705346	81,39088267	0,91968343	100,2454939
	rs1339	0,765523894	83,44210448	0,893515475	97,39318674
	rs1816702	0,006904374	0,752576782	0,031266362	3,408033492
	rs2405432	0,249810678	27,22936388	0,248896973	27,12977003
	rs3804100	0,879548929	95,87083322	0,963710999	105,0444989
	rs5743704	0,919596596	100,236029	0,569695643	62,09682506
	rs5743708	0,605528588	66,00261609	0,743758314	81,06965623
	rs7656411	-1	-109	-1	-109
TLR4	rs10759932	0,033534768	3,65528969	0,112356818	12,2468932
	rs10983755	0,590135031	64,32471833	0,584230158	63,68108727
	rs11536889	0,307254903	33,49078443	0,321683094	35,06345723
	rs11536897	9,83E-04	0,107144256	8,02E-04	0,08739755
	rs12344353	0,546967057	59,61940917	0,787552813	85,84325662
	rs1927906	0,409216095	44,60455435	0,617271221	67,28256309
	rs2149356	0,782729341	85,31749819	0,963068959	104,9745165
	rs2770146	0,742516737	80,93432431	0,527050565	57,4485116
	rs4986790	0,660970989	72,04583781	0,841019131	91,67108532
	rs7873784	0,100829104	10,99037238	0,269192618	29,34199532
TLR5	rs10797373	0,558198285	60,84361305	0,844906879	92,09484981
	rs10909854	-1	-109	-1	-109
	rs11583804	0,12618464	13,75412575	0,130350886	14,20824653
	rs11586705	-1	-109	-1	-109
	rs12046158	-1	-109	-1	-109
	rs12728758	-1	-109	-1	-109
	rs12752801	-1	-109	-1	-109
	rs1456468	0,015421109	1,68090092	0,050256156	5,477920965
	rs2485945	0,369949472	40,32449241	0,66822112	72,83610206
	rs2788089	0,580500565	63,27456158	0,855331505	93,23113408
	rs2842925	-1	-109	-1	-109
	rs4648444	-1	-109	-1	-109
	rs5744168	0,858920227	93,62230474	0,960754418	104,7222315
	rs6659552	0,736153694	80,2407526	0,239854429	26,14413272

Gen	SNP	P _{CCA}	Adjust.-P _{CCA}	P _{CCG}	Adjust.-P _{CCG}
TLR5	rs878201	0,501602287	54,67464924	0,05988759	6,527747258
TOLLIP	rs11042484	-1	-109	-1	-109
	rs12285466	-1	-109	-1	-109
	rs3750920	-1	-109	-1	-109
	rs3829223	0,437601345	47,69854658	0,090698554	9,886142417
	rs5743869	0,075362392	8,214500781	0,071728899	7,818449975
	rs6578810	0,344517491	37,55240649	0,625058347	68,13135978
	rs7946008	0,49361826	53,80439031	0,667427107	72,7495547
	rs955396	0,586383923	63,91584766	0,797302261	86,90594645
	rs3750919	0,260025138	28,34274008	0,526588779	57,39817695
	rs3793964	0,555164521	60,51293275	0,0034813	0,379461713
	rs5743899	-1	-109	-1	-109
	rs5743942	-1	-109	-1	-109
	TRAF6	rs331457	0,881801056	96,11631506	0,988831781
rs5030411		0,318089339	34,67173797	0,385752129	42,0469821
rs5030416		0,750625077	81,81813339	0,566712163	61,77162581
rs5030442		0,433520946	47,25378308	0,106553757	11,61435952
rs5030477		0,458593561	49,98669815	0,456988645	49,81176228
rs5030492		-1	-109	-1	-109
rs5030493		-1	-109	-1	-109
rs5030502		-1	-109	-1	-109
rs5030504		0,844103613	92,00729381	0,843096525	91,89752119
TRAM		rs10038493	0,115731563	12,61474036	0,292437596
	rs11957931	0,88313515	96,26173131	0,988573602	107,7545226
	rs13154471	0,926089975	100,9438073	0,768847359	83,80436212
	rs13160830	0,710485285	77,44289602	0,686128339	74,7879889
	rs13173913	0,566112689	61,70628315	0,564242706	61,5024549
	rs13178564	0,986919928	107,5742722	0,615925123	67,13583838
	rs1366079	-1	-109	-1	-109
	rs17473484	0,081197831	8,850563632	0,116601225	12,70953351
	rs2288384	0,32180015	35,07621636	0,157657889	17,18470987
	rs256946	0,658205204	71,7443672	0,050556022	5,510606381
	rs256957	0,180466984	19,67090129	0,321399435	35,03253847
	rs256971	0,157087709	17,12256028	0,30471567	33,21400801
	rs256973	-1	-109	-1	-109
	rs256980	0,03066862	3,34287963	0,083622078	9,114806479
	rs256997	0,247475645	26,97484529	0,394984302	43,05328889
	rs419939	0,999192577	108,9119908	0,428806393	46,73989683
	rs428191	0,055872951	6,0901517	0,09450922	10,30150503

9 Danksagung

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

Bei Herrn Prof. Dr. med. Norbert Frey und 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 erstellen zu können.

Auch bedanke ich mich ausdrücklich bei PD Dr. med. Nour Eddine El Mokhtari für die Betreuung dieser Arbeit, die interessante und anspruchsvolle Themenstellung sowie die Begleitung und die inhaltliche Auseinandersetzung mit dem Stoffgebiet.

Des Weiteren gilt mein ausgesprochen Dank Herrn Dr. rer. nat. Dipl. biol. Arne Schäfer für seine Unterstützung, insbesondere bei der methodischen Erarbeitung und der statistischen Auswertung sowie für die konstruktive Kritik.

Insbesondere bedanke ich mich bei meiner Familie sowie Herrn Nils Ludwig, der mich besonders in der Endphase motiviert und mental unterstützt hat. Vor allem aber gilt mein Dank meinen Eltern, die mich während meines gesamten Studiums unterstützt und mir stets in allen Lebenslagen mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andrea Henken
Geburtsdatum: 25.9.1984
Geburtsort: Heide/ Holstein
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1991 - 1995 Herzog-Ulrich Grundschule, Schwabstedt
1995 - 2004 Hermann-Tast-Schule, Gymnasium Husum
Juni 2004 Abitur

Hochschulstudium

2004 - 2010 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
August 2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Vrs. Oktober 2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

Aug. 2009 - Dez. 2009 Chirurgie, Kantonsspital Zug Schweiz
Dez. 2009 - April 2010 Gynäkologie, Westküstenklinikum Heide
April 2010 - Aug. 2010 Innere Medizin, UK-SH Campus Kiel

Promotion

Seit Mai 2007 Beschäftigung mit der Thematik dieser Dissertation in der Klinik für Kardiologie unter PD Dr. El Mokhtari im Rahmen des populationsgenetischen Projektes (Popgen) des UK-SH Campus Kiel zur Erforschung genetischer Faktoren bei der Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie