

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
CD11-CLUSTER
BEI PATIENTEN MIT KORONARER HERZERKRANKUNG**

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

vorgelegt von

AGNES BAJ

aus Köslin

Kiel 2010

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. El-Mokhtari

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Fändrich

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2011

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 08.03.2011

gez.: Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi

für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	1
Die koronare Herzkrankheit (KHK).....	1
Die Atherosklerose und ihre Pathogenese.....	1
Ätiologie der Atherosklerose.....	3
Inflammation und KHK.....	4
β2-Integrine.....	4
KHK und die genetische Forschung.....	6
Fragestellung.....	9
Patienten und Methoden.....	10
Zum Studiendesign: Fall-Kontroll-Assoziationsstudie.....	10
Das popgen-Projekt.....	11
Die Studienpopulation.....	12
Die Fall- und die Replikationsstichprobe.....	13
Die Kontrollstichprobe.....	13
Single nucleotide polymorphisms (SNPs).....	14
Haplotypen.....	15
DNA-Extraktion und Genotypisierung.....	17
Statistische Methoden und Analyse.....	19
Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	19
Der χ^2 -Test.....	20
Odds Ratio (OR).....	20
Das Konfidenzintervall (CI)	22
Die logistische Regression.....	22
Die statistische Power.....	22
Ergebnisse.....	23
Resultate der Primärstudie.....	23
Ergebnisse der Replikationsstudie.....	24

Diskussion.....	27
Die KHK und die genetische Komponente.....	27
Vorangegangene Studien über das β 2-Integrin.....	27
Steigerung der Teststärke und Limitation der Studie.....	28
Ausblick.....	31
Zusammenfassung.....	33
Anhang.....	34
Literaturverzeichnis.....	37
Danksagung.....	43
Lebenslauf	44

Abkürzungsverzeichnis

95-CI	95%-Konfidenzintervall
BMI	Bodymaßindex
CI	Konfidenzintervall
CR	Call Rate
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonuclein Acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F22ca	Frequenz des homozygoten Genotyps für das seltene Allel in den Fällen
F22co	Frequenz des homozygoten Genotyps für das seltene Allel in den Kontrollen
GWA	Genome-Wide Association
htSNPs	Haplotype-Tagging-SNPs
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
ICAM	Intercellular Adhesion Molecules
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LFA-1	Lymphocyte Function-Associated Antigen 1
Mac-1	Macrophage-1 Antigen
minAFca	Frequenz des seltenen Allels in den Fällen
minAFco	Frequenz des seltenen Allels in den Kontrollen
n11ca	Zahl der homozygoten Genotypen für das häufige Allel in den Fällen
n11co	Zahl der homozygoten Genotypen für das häufige Allel in den Kontrollen
n12ca	Zahl der heterozygoten Genotypen in den Fällen
n12co	Zahl der heterozygoten Genotypen in den Kontrollen
n22ca	Zahl der homozygoten Genotypen für das seltene Allel in den Fällen

n _{22co}	Zahl der homozygoten Genotypen für das seltene Allel in den Kontrollen
N _{ca}	Zahl der Fälle
N _{co}	Zahl der Kontrollen
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase Chain Reaktion
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WTCCC	Wellcome Trust Case Control Consortium

Einleitung

Die koronare Herzkrankheit (KHK)

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist die Manifestation der Atherosklerose in den Herzkranzgefäßen, die durch atherosklerotische Veränderungen der Blutgefäßwände mit Verengung oder Verschlüssen eines oder mehrerer Herzkranzgefäße gekennzeichnet ist.¹ Die Folge ist eine Mangeldurchblutung des Myokards.

In Ländern mit hohem Lebensstandard führen die KHK und ihre Folgekrankheiten die Liste der häufigsten Erkrankungen an und insofern ist sie eine vorrangige Ursache für Morbidität und Mortalität im Erwachsenenalter.² Die aus den pathophysiologischen Vorgängen resultierende Minderperfusion der Koronararterien führt schließlich zur Koronarinsuffizienz, welche sich klinisch manifestiert, wenn das Verhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot zu Ungunsten des Angebots verschoben ist. Je nach Ausprägungsgrad der Atherosklerose kommt es zur Einengung des Gefäßlumens bis hin zu einem vollständigen Verschluss eines Herzkranzgefäßes mit der Folge eines Myokardinfarkts, der die Maximalausprägung der KHK darstellt. Der Myokardinfarkt wird dadurch charakterisiert, dass eine oder mehrere Koronararterien vollständig verlegt sind, sodass der zu versorgende Teil des Myokards nicht mehr durchblutet wird und konsekutiv nekrotisiert.

Trotz der ständigen Weiterentwicklung der Therapie der koronaren Herzkrankheit sind ihre Folgekrankheiten wie Herzinfarkt, Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen die führenden Todesursachen in den wohlhabenden Ländern. Gründe für diese Entwicklung sind die steigende Prävalenz der Atherosklerose in der Bevölkerung, die steigende Überlebensrate von Patienten mit koronarer Herzerkrankung und die mangelhafte Behandlung von Patienten mit Risikofaktoren für die Atherosklerose.³

Die Atherosklerose und ihre Pathogenese.

Bis zu 50 % der Todesfälle in der westlichen Welt sind auf die Atherosklerose und ihre Folgen zurückzuführen⁴, sie ist daher von außerordentlicher ökonomischer, medizinischer und wissenschaftlicher Relevanz. Die Atherosklerose ist

gekennzeichnet durch eine krankhafte Verdickung der Gefäßwand, die zur Einengung und Sklerosierung des arteriellen Strombettes führt. Diese betrifft vor allem die elastischen und die größeren und mittelgroßen Arterien. Der pathologische Prozess spielt sich in der Tunica intima ab. Im deutschen Sprachgebrauch werden die Begriffe „Atherosklerose“ und „Arteriosklerose“ synonym verwendet, obwohl es sich bei der Atherosklerose um die Ablagerung von Lipiden in der Tunica intima handelt, jedoch bei der Arteriosklerose auch die Tunica media betroffen ist.⁵

In Bezug auf die Aufklärung der Mechanismen, die zur Initiierung der Arteriosklerose führen, hat sich in den letzten Jahrzehnten breit gefächerte Atheroskleroseforschung eine zentrale Hypothese herauskristallisiert, die für die Pathogenese der Atherosklerose einen inflammatorischen Prozess in den Vordergrund stellt, die "Response-to-injury"-Hypothese des Pathologen Russell Ross.⁶ In dieser allgemein anerkannten Hypothese wird das Auftreten von Endothelläsionen, unabhängig von ihrer Genese, als Ausgangspunkt für die Entstehung der Atherosklerose gesehen.⁶ Hervorgerufen wird diese Verletzung des Blutgefäßes durch eine Reihe von Oxidantien, Low Density Lipoproteinen (LDL), Viren, Toxinen, Homocystein und anderen das Immunsystem aktivierenden Molekülen. Auch auf mechanischem Weg kann das Endothel verletzt werden.⁶ Die Arterienwand reagiert auf die Irritationen, indem sie ihre Adhäsions- und Permeabilitätseigenschaften verändert und lokal vermehrt Zytokine, vasoaktive Substanzen und Wachstumsfaktoren freisetzt.⁷ Thrombozyten und Leukozyten erhöhen ebenfalls ihre Affinität zum geschädigten Endothel, sodass eine Penetration von Leukozyten in die Gefäßwand ermöglicht wird und es zu einer Ansammlung leukozytärer Infiltrate in der Tunica intima kommt. Die Ausschüttung der Mediatoren führt zu einer Migration von glatten Muskelzellen aus der Tunica media in die Tunica intima und zu ihrer Proliferation. Des Weiteren werden oxidierte Low Density Lipoproteine (LDL) in die Gefäßwand eingelagert und von Makrophagen aufgenommen, welche dadurch zu Schaumzellen werden. Sowohl die Migration der glatten Muskelzellen als auch die Bildung von Schaumzellen führen über einen längeren Zeitraum zur Bildung herdförmiger fester Strukturen in den Gefäßwänden. Diese Strukturen, die als Plaques bezeichnet werden, prägen das makroskopische Bild der Atherosklerose.

Ätiologie der Atherosklerose

Die Gründe für die Entstehung der atherosklerotischen Plaques sind vielseitiger Natur. Sowohl der Lebensstil als auch die genetische Prädisposition als nicht kontrollierbarer Faktor spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung der Atherosklerose und sind somit von entscheidender Bedeutung für ihre Entwicklung und ihr Voranschreiten.

Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose zählen Zigarettenrauchen⁸, eine fettreiche Ernährung mit daraus resultierenden hohen Triglyceridspiegeln⁹, Stress, ein Mangel an körperlicher Bewegung¹⁰, Diabetes mellitus Typ II¹¹, ein arterieller Hypertonus und niedrige Antioxidantienpiegel.¹² Nicht beeinflussbare Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose sind dagegen Fettstoffwechselstörungen, entzündliche Prozesse, fortschreitendes Alter, genetische Veranlagung und das männliche Geschlecht.¹³ Epidemiologische Studien konnten wiederholt zeigen, dass Männer häufiger und früher von atherosklerotischen Gefäßveränderungen und den aus ihnen resultierenden Erkrankungen betroffen sind als Frauen. Jedoch steigt die Inzidenz der Atherosklerose beim weiblichen Geschlecht nach der Menopause an, was auf einen protektiven Effekt der Östrogene schließen lässt.¹⁴

Auch die genetische Prädisposition hat einen entscheidenden Einfluss auf das Risiko für die Bildung der Atherosklerose.^{15,16} Erbliche Fettstoffwechselstörungen mit erhöhten LDL/VLDL- und Lipoprotein A-Spiegeln und erniedrigten HDL-Spiegeln¹⁵ erhöhen das Risiko, an einer Atherosklerose und den mit ihr verbundenen Komplikationen zu erkranken.¹⁷ Ferner hat die genetisch determinierte Immunantwort und die darauf folgende Entzündung im Organismus einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung und das Voranschreiten einer koronaren Herzkrankheit. Studien haben ergeben, dass Entzündungserkrankungen wie der Systemische Lupus erythematodes mit einem erhöhtem Risiko verbunden sind, eine Atherosklerose zu entwickeln.¹⁸ Des Weiteren konnten epidemiologische Studien zeigen, dass erniedrigte Leukozytenzahlen das kardiovaskuläre Risiko deutlich senken können.¹⁹

Inflammation und KHK

Die koronare Herzkrankheit wird von einer erheblichen entzündlichen Komponente begleitet: Alle Stadien der Atherosklerose werden von leukozytären Infiltraten geprägt.²⁰ Bei der Regulation der Inflammation spielen das Interleukin 6, der Tumornekrosefaktor α und das C-reaktive Protein (CRP) eine wichtige Rolle. Hiermit verbunden konnten sowohl für den Tumornekrosefaktor α als auch für das Interleukin 6 ein Zusammenhang zwischen Inflammation und der Bildung von Atherosklerose gezeigt werden.^{21,22} Ebenso ist das CRP als ein bei der Entzündung beteiligtes Protein bei der Atherosklerose erhöht.²³ Wilson et al. fanden heraus, dass die Menge des im Blut zirkulierenden CRPs hilfreich sein kann, um das Risiko für eine beginnende KHK abzuschätzen.²⁴ In den Phasen der Bildung der Plaques in den Arterienwänden sind Leukozyten, Adhäsionsmoleküle, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren beteiligt. Die bei der Transmigration der Entzündungszellen erforderlichen Adhäsionsmoleküle spielen eine unerlässliche Rolle für das Zustandekommen der leukozytären Infiltrate in der Gefäßwand. Durch Polymorphismen der Gene, die für an dem Prozess beteiligte Proteine kodieren, können morphologische Unterschiede dieser Moleküle entstehen. Ein Resultat dieser genetischen Variationen kann ein erhöhtes oder erniedrigtes Risiko für die Entstehung und das Fortschreiten der Atherosklerose sein, wie beispielsweise Untersuchungen von Georges et al. über das Interleukin-6 herausstellten. Hierbei konnte gezeigt werden, dass genetische Variationen im Interleukin-6-Lokus mit einer erhöhten Anfälligkeit für das Auftreten eines Myokardinfarktes assoziiert sind.²⁵

β 2-Integrine

β 2-Integrine sind Glykoproteine der leukozytären Zellmembran, von denen vier verschiedene Isotypen bekannt sind: CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (Mac-1), CD11c/CD18 (gp150/95) und CD11d/CD18.²⁶ Die Adhäsion von zirkulierenden Leukozyten an das Endothel ist ein früher Schritt bei der Atherogenese und spielt eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Atherosklerose. Für diese Interaktion bedienen sich die Leukozyten der β 2-Integrine. Diese binden über interzelluläre Adhäsionsmoleküle, die als ICAMs (Intercellular Adhesion Molecules) bezeichnet

werden, an Endothelzellen, woraufhin eine Transmigration der Leukozyten durch das Endothel stattfindet.^{27,28} Jedes der β 2-Integrine besteht aus einer α - und einer β -Kette, welche nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Die β 2-Untereinheit der β 2-Integrine zählt zum CD18-Cluster und ist in allen vier Isotypen identisch, die vier voneinander abweichenden α -Untereinheiten der verschiedenen Isotypen zählen zum CD11-Cluster, welcher sich auf dem Chromosom 16 befindet.^{27,29,30} Eine Aktivierung von β 2-Integrinen, unabhängig von den Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, ist mit einem erhöhten Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen in Verbindung gebracht worden.³¹ Auch konnten Tierversuche zeigen, dass die β 2-Integrin-vermittelte Interaktion zwischen den Leukozyten und der Gefäßwand in frühen initialen Stadien der Atherosklerose vor atherosklerotischen Läsionen schützt. Bei chronischer Atherosklerose und langwierigen Dyslipidemien überwiegt jedoch die pro-atherogene Wirkung.³²

Die Adhäsionsmoleküle des CD11-Clusters sind der Schlüssel für den Übertritt der Leukozyten vom Lumen in die verletzte Tunica intima und spielen eine entscheidende Rolle für die Initiierung atherosklerotischer Prozesse. Polymorphismen im CD11-Cluster könnten einen entscheidenden Einfluss auf die Beschaffenheit der β 2-Integrine haben und den Verlauf der koronaren Herzkrankheit wesentlich beeinflussen, indem eine Modulierung der Rekrutierung von weißen Blutzellen zu den Endothelläsionen stattfindet.

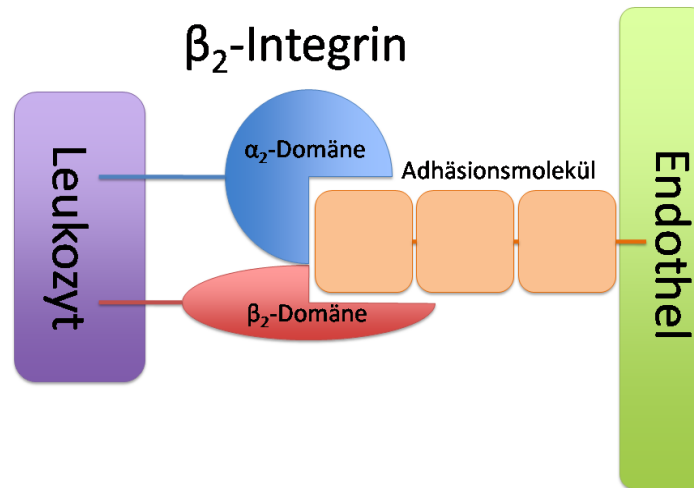


Abbildung 1: Interaktion des β_2 -Integrins mit den Leukozyten und dem Endothel

KHK und die genetische Forschung

Die koronare Herzkrankheit ist ein multifaktorielles Geschehen. Sowohl die Umwelt als auch nicht beeinflussbare Risikofaktoren sind an ihrem Entstehen beteiligt. 2007 veröffentlichten Morgan et al. ihre Metaanalyse über Studien, die Genvarianten beschrieben, die eine KHK begünstigen. Sie untersuchten in 85 Fall-Kontroll-Assoziationsstudien 85 Genvarianten, für die zuvor ein Zusammenhang mit der KHK beschrieben worden war und fanden heraus, dass keine der besagten Genvarianten eine signifikante Assoziation aufweisen konnte. Diese Erkenntnis zeigte, dass das Studienmodell der Fall-Kontroll-Assoziationsstudie nicht valide sein kann, wenn die Studienpopulation keine ausreichende Größe besitzt oder keine Replikation durchgeführt wird.³³

Einen anderen Ansatz für die Analyse krankheitsrelevanter Gene mittels Fall-Kontroll-Assoziationsstudien ist die Betrachtung des gesamten Genoms. Das Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCCC) untersuchte 2007 in einer großen Studie das gesamte Genom von 14.000 Patienten, darunter auch 2.000 KHK-Patienten. Es konnten Genvarianten gefunden werden, die einen Zusammenhang mit

der KHK aufweisen, doch auch hier gab es keine Replikationspopulation, sondern lediglich eine zweite Kontrollpopulation.³⁴ Das aus 77 Wissenschaftlern bestehende Coronary Artery Disease Consortium griff die Ergebnisse des WTCCC auf und führte die für die KHK bisher größte Fall-Kontroll-Assoziationsstudie durch, in diesem Studienansatz jedoch mit einer anschließenden Replikation. In 11.550 Fällen und 11.205 Kontrollen aus 9 europäischen Studien wurden 7 Genvariationen (Genloki 1p13.3, 1q41, 2q36.3, 6q25.1, 9p21, 10q11.21 und 15q22.33) erneut untersucht und auf eine Assoziation mit KHK überprüft. Nach einer anschließenden Replikation konnte vier Genvarianten (Genloki 9p21, 1p13.3, 2q36.3 und 10q11.21) eine signifikante Assoziation mit dem Auftreten einer KHK bei Europäern zugeschrieben werden.³⁵ In der intensiven Atheroskleroseforschung der vergangenen Jahre wurde die genetische Prädisposition als ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung einer KHK immer wieder deutlich.^{17,35} Auf grund der pathophysiologischen Vorgänge im Prozess der Atherogenese, in denen die β 2-Integrine eine erhebliche Rolle spielen, erscheint der CD11-Cluster, der sich auf dem Chromosoms 16 befindet und Gene beinhaltet, die für die α -Domäne des β 2-Integrins kodieren, von Relevanz. Da die Gene des CD 11-Clusters bereits bekannte Kandidatengene sind, die innerhalb pathophysiologischer Prozesse verankert sind, sind sie ideal für eine systematische genetische Untersuchung mittels einer Kandidatengenstudie.

Ein in der genetischen Forschung neuerer Ansatz zur Identifikation genetischer Varianten ist die Durchführung einer Genomweiten Assoziationsstudie (GWA), bei der nicht ein Kandidatengen, sondern das gesamte Genom auf Varianten untersucht wird, die mit einer Krankheit im Zusammenhang stehen können. Durch GWA Studien identifizierte krankheitsassoziierte Varianten unterliegen jedoch einer systematischen Verzerrung zur Selektion kleiner Wahrscheinlichkeitswerte (p-Werte). Diese Verzerrung resultiert aus der notwendigen Korrektur gegen die Vielzahl von bis zu einer Million Einzel-SNP Assoziationstests, um statistische Fehler erster Ordnung (Falschpositive) ausschließen zu können. Da Varianten mit hohen Allelfrequenzen oder großen genetischen Effekten eine höhere statistische Teststärke verleihen, werden in GWAS meistens lediglich häufige Varianten als krankheitsassoziiert entdeckt. Bei extrem hohen oder niedrigen Allelfrequenzen reduziert sich die

statistische Teststärke und es können nur noch Varianten mit einem sehr hohen genetischen Risiko detektiert werden. Eine Alternative für die Identifizierung genetisch relevanter, jedoch seltener Varianten bietet hier wieder die Kandidatengen-Assoziationsstudie, da der Schwellenwert des von vornherein definierten Signifikanzniveaus aufgrund der niedrigeren Anzahl von Einzel-SNP-Assoziationstests in diesem Studiendesign höher ist. Sie erlaubt vor allem, nicht nur häufige, sondern auch seltene Varianten zu detektieren, die jedoch individuell einen großen genetischen Effekt haben können. Kandidatengenstudien sind damit in der Lage, bereits erlangtes Wissen der Pathophysiologie um mögliche genetische Komponenten zu erweitern und Einblicke in bislang unbekannte kausale Zusammenhänge zu geben.

Fragestellung

Die koronare Herzkrankheit ist eine multifaktorielle Erkrankung, die eine entscheidende Beeinflussung durch die Genetik erfährt. An der Atherogenese sind unter anderem die β 2-Integrine beteiligt. Diese Adhäsionsmoleküle der Leukozyten sind unerlässlich für ihren Übertritt vom Lumen in die Gefäßwand und einer der ersten Schritte in der Atherogenese. Die Gene, die für die beiden Domänen der β 2-Integrine kodieren, befinden sich im CD11- und CD18-Cluster.

Für das Auftreten des Systemischen Lupus erythematoses, der wie die KHK eine chronisch entzündliche Erkrankung ist, wurde bereits ein Zusammenhang mit Varianten im CD11-Cluster belegt.³⁶ Variationen in den Genen, die für die β 2-Integrine kodieren, könnten eine relevante Auswirkung auf die Form und Funktion des Proteins haben. Kommt es zu einem Basenaustausch, der bewirkt, dass nicht die ursprüngliche Aminosäure transkribiert wird, kann es zu einem funktionellen Verlust des β 2-Integrins kommen. Die Folge wäre eine verstärkte oder geringere Adhäsion der Leukozyten an das Endothel des Blutgefäßes und könnte somit eine Auswirkung auf die Entstehung der koronarerteriellen Atherosklerose haben.

Daraus ergibt sich die Fragestellung dieser Arbeit:

1. Gibt es einen Zusammenhang genetischer Polymorphismen des CD11-Clusters mit dem Vorhandensein der KHK?

Sollte sich aus oben genannter Fragestellung ein Zusammenhang ergeben, stellen sich weiter Fragen:

2. Wirkt sich der Genpolymorphismus positiv oder negativ auf die Progression der koronaren Herzerkrankung aus?
3. Zeigt sich eine Beziehung zwischen der Schwere der Erkrankung und dem Vorliegen von CD11-Genpolymorphismen?

Der Studienauftrag wurde der Ethikkommission vorgelegt und von ihr genehmigt.

Patienten und Methoden

Zum Studiendesign: Fall-Kontroll-Assoziationsstudie

Die Frage, ob Variationen in Genen, die für das β 2-Integrin kodieren, in einem Zusammenhang mit dem Vorhandensein einer KHK stehen, soll in einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie untersucht werden.

Die Fall-Kontroll-Assoziationsstudie ist eine klinische Studie und kann zur Identifizierung krankheitsrelevanter Gene eingesetzt werden. Dabei ist es das Ziel, eine Korrelation bestimmter Allele einer Patientenstichprobe mit der zu untersuchenden Erkrankung festzustellen oder auszuschließen. Es soll somit untersucht werden, ob ein bestimmter Genotyp (im vorliegendem Falle Polymorphismen im CD11-Cluster) im Zusammenhang mit einem bestimmten Phänotyp (in unserem Falle KHK) steht. Ist dies der Fall, so spricht man von einer Assoziation. Bei der Fall-Kontroll-Assoziationsstudie handelt es sich um eine retrospektive Untersuchung einer Stichprobe, die aus erkrankten Personen (Fall) und einer Stichprobe, die aus gesunden Personen (Kontrolle) besteht. Die Auswahl der Fall-Gruppe erfolgt nach Vorliegen der Erkrankung wie in diesem Fall dem Vorliegen einer KHK. Die Kontrollgruppe besteht aus Personen, von denen angenommen wird, dass sie gesund sind und dient als Vergleichsgruppe zu der Fallgruppe. Je mehr Übereinstimmungen in den beiden Gruppen in Bezug auf ihre Herkunft, Alter, Geschlecht, Umwelt- und Risikofaktoren anzutreffen sind, desto besser kann man sie in Bezug auf die Erkrankung und die vorliegenden Genotypen miteinander vergleichen. Dafür findet ein sogenanntes Matching statt, bei dem die beiden Gruppen aufeinander abgestimmt werden. Wird bei der Studie entdeckt, dass eine Assoziation besteht, sollte sichergestellt werden, dass diese nicht ein Produkt des Zufalls ist. Hierfür müssen eine oder mehrere Replikationen durchgeführt werden. Das heißt, dass eine oder mehrere zusätzliche Fallgruppen, die dasselbe Merkmal wie die erste Fallgruppe (in unserem Falle KHK) tragen, mit einer weiteren Kontrollgruppe verglichen werden. Es findet also eine weitere unabhängige Untersuchung statt.

Das popgen-Projekt

Popgen ist ein Projekt, das 2003 vom Universitätsklinikum Schleswig- Holstein mit finanzieller Unterstützung des Nationalen Genomforschungsnetzes (NGFN) ins Leben gerufen wurde. Es wurde gegründet, um ein besseres Verständnis der Ursachen der großen Volkskrankheiten zu schaffen. Es dient der Sammlung und Aufbewahrung populationsspezifischer genotypischer Merkmale, diese werden mit dem Ziel, krankheitsrelevante Gene zu identifizieren und zu analysieren pseudonymisiert der Forschung zur Verfügung gestellt. Die popgen-Population gehört dem schleswig-holsteinischen Raum nördlich des Nord-Ostsee-Kanals an, in dem ca. 1,1 Millionen Menschen leben. Im Westen bildet die Nord- und im Osten die Ostsee eine natürliche Grenze. Die südliche Begrenzung entsteht durch den Nord-Ostsee-Kanal und im Norden wird sie durch Dänemark gebildet. Durch die vollständige Erfassung der Patienten in diesem umschriebenen geographischen Gebiet und geringe Migrationsraten können präzise Einschätzungen über die genetische Struktur der Bevölkerung gemacht werden.



Abbildung 2: Das popgen-Studienggebiet ist blau markiert.

Die Studienpopulation

Zum Zwecke der KHK-Forschung wurde für das popgen-Projekt eine Gruppe von KHK-Patienten durch Kardiologen aufgrund klinischer Daten und anhand von Herzkatheterbefunden rekrutiert. Insgesamt konnten 3351 Patienten als Probanden, die aus dem nord-schleswig-holsteinischen Raum stammen, für die popgen-KHK-Kohorte gewonnen werden. Da die geographischen Grenzen des popgen-Gebietes klar sind und Daten aus allen Katheterlaboren dieses Gebietes (Flensburg, Kiel, Schleswig, Heide, Rendsburg) miteinbezogen wurden, können die Daten der Probanden der Studie als repräsentativ für die schleswig-holsteinische Population angesehen werden. Alle an der Studie beteiligten Probanden erklärten sich vor ihrer Teilnahme schriftlich einverstanden und die Untersuchung wurde von der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und von dem Datenschutzbeauftragten des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein geprüft und genehmigt.

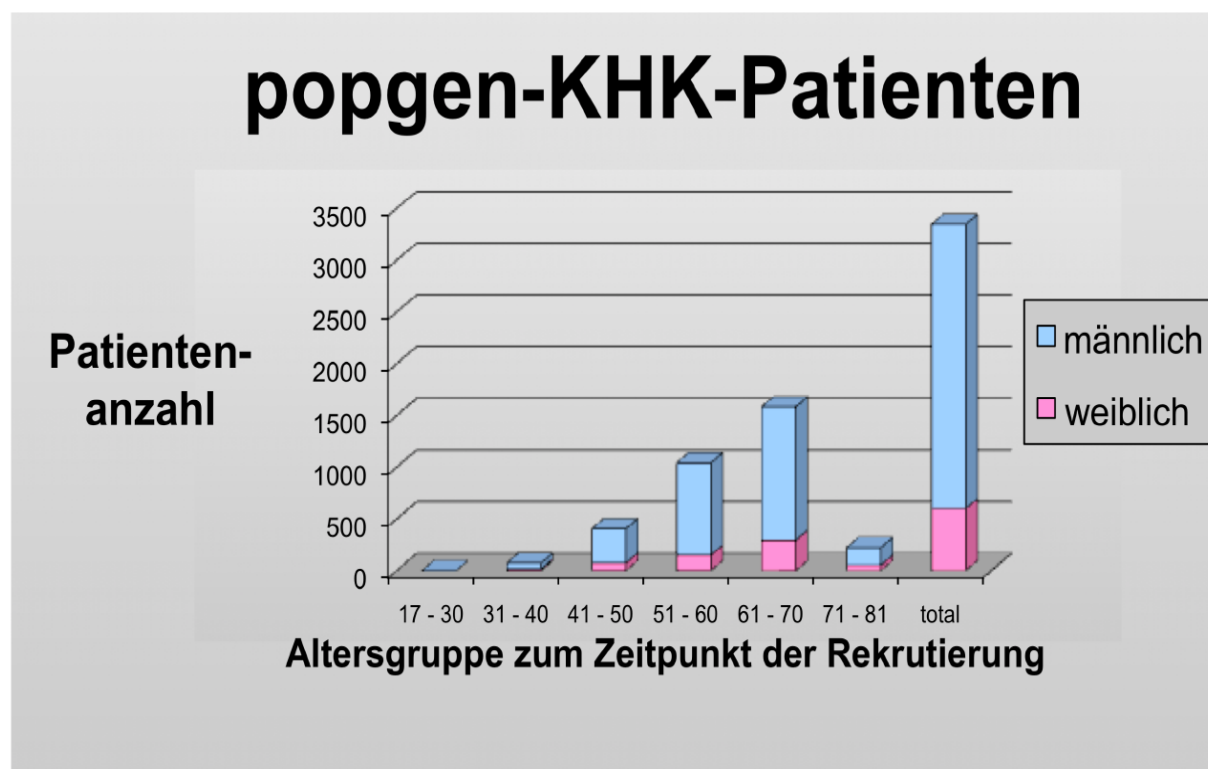


Abbildung 3: KHK-Population des popgen-Projektes

Die Fall- und die Replikationsstichprobe

Die Stichprobe der Patienten der Fall-Gruppe umfasst 1.097 KHK-Patienten. Die Voraussetzung, um als Patient in die Studie miteinbezogen zu werden, war eine signifikante Stenose von mindestens 70 Prozent in einer Koronararterie, die diagnostisch durch eine Linksherzkatheteruntersuchung gesichert worden war. Die Erkrankung wurde bei den Patienten der Fallgruppe der Primärstudie in einem sehr frühen Manifestationsalter von unter 55 Jahren (Durchschnittsalter 48 Jahre) diagnostiziert, wobei 596 von ihnen bereits einen Herzinfarkt erlitten hatten. Die meisten der Patienten (90,3%) weisen eine positive Familienanamnese für eine schwere KHK auf und wurden mit Hilfe einer Koronarangiographie revaskularisiert oder wurden operativ mit Bypässen versorgt. 83,8% der Patienten sind männlich, 16,2 % weiblich. Die Replikation erfolgte anhand von Blutproben von 1.104 Patienten, deren koronare Herzkrankheit im Alter von $57 \pm 6,4$ Jahren diagnostiziert wurde. 75,1 % von ihnen sind männlich und 24,9 % weiblich. Auch sie wurden revaskularisiert. Sowohl die Patienten der Primär-, als auch der Replikationsstudie gaben Informationen zu Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie, Bodymaßindex und dem Rauchen.

Die Kontrollstichprobe

Alle Blutproben aus der Kontrollgruppe wurden von Patienten aus dem Kontrollpool des popgen Projektes eingeholt. Die Kontrollproben wurden randomisiert ausgesucht und stammen von deutschstämmigen Patienten mit einem Alter zwischen 48 und 77 Jahren, das Durchschnittsalter betrug 62 Jahre, das Verhältnis von Frauen zu Männern nahezu 1:1. Die Personen wurden körperlich untersucht und auch sie beantworteten einen Fragebogen, in dem sie Angaben zu ihren Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Bodymaßindex und Rauchen machten. So konnte ein genereller Gesundheitsstatus erhoben werden und die Risikofaktoren in der Auswertung berücksichtigt werden. In Tabelle 1 sind die Kohorten der Fall- und der Kontrollgruppe beider Studien dargestellt.

Tabelle 1: Beschreibung der Kohorten

	Primäre Studie		Replikationsstudie	
Risikofaktoren	Fall KHK <55 J.	Kontrolle KHK frei	Fall KHK 57±6,4 J.	Kontrolle KHK frei
Individuen	1097	736	1104	1092
Männlich (%)	919 (83,8)	385 (52,3)	829 (75,1)	277 (25,4)
Weiblich (%)	178 (16,2)	351 (47,7)	275 (24,9)	815 (74,6)
Raucher (%)	885 (80,7)	382 (51,9)	761 (68,9)	29 (2,7)
Diabetes mellitus (%)	212(19,3)	48 (6,5)	218 (19,8)	239 (21,9)
Bluthochdruck (%)	810 (73,8)	334 (45,4)	838 (75,9)	480 (44,0)
BMI ≥ 30 (%)	322 (29,4)	111 (15,0)	276 (25,0)	45 (4,1)

Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

In der vorliegenden Arbeit soll herausgefunden werden, ob Variationen in Genen, die für das β 2-Integrin kodieren, in einem Zusammenhang mit dem Vorhandensein einer

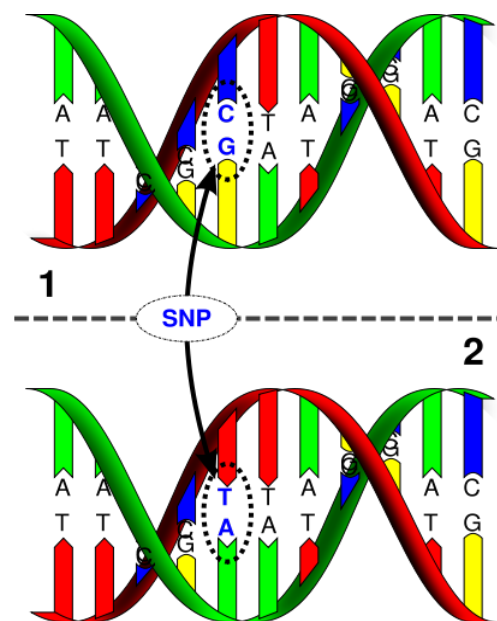


Abbildung 4: Darstellung eines SNPs in der DNA (nach David Hall)

KHK stehen. Das zu untersuchende Gen bzw. die zu untersuchende Gengruppe wird dabei als Kandidatengen bezeichnet. In dem vorliegenden Falle ist dies der CD11-Cluster, der drei Gene für die α -Kette des β 2-Integrins enthält, das CD11A-, CD11B- und CD11C-Gen. Um die Varianten zu detektieren, bedient man sich der SNPs. Diese sind Abweichungen von Basenpaaren in einem DNA-Strang und stellen die häufigste Form von DNA-Variationen im menschlichen Genom dar, von denen zur Zeit etwa 10 Millionen verschiedene identifiziert worden sind. Die Abweichungen

können häufig oder selten vorkommen. Ist ein SNP in einem oder mehr Prozent der Population vorhanden, so spricht man von einer Variante. Sobald weniger als ein Prozent diese Abweichung aufweisen, bezeichnet man sie als eine Mutation. Ein SNP ist der Austausch eines einzelnen Basenpaares. Kommt es beispielsweise zu einer Methylierung von Cytosin, so entsteht 5-Methyl-Cytosin. Wird dieses spontan desaminiert, entsteht Thymin. Eine derartige Mutation kann entweder stumm (d.h. ohne phänotypische Veränderung) verlaufen oder bewirken, dass eine andere Aminosäure oder gar ein Start- oder Stoppcodon transkribiert wird. Die Konsequenz ist eine Modifizierung der Aminosäuresequenz. Während viele SNPs ohne Effekt bleiben und keine Auswirkungen auf den Phänotyp zeigen, haben andere einen Einfluss auf das Entstehen vieler Krankheiten, da sie verschiedene Reaktionen im Organismus bewirken können. Proteine können in ihrer Struktur nachhaltig verändert werden und einen Funktionsverlust des Proteins hervorrufen. Doch auch bereits innerhalb des Zellkerns können SNPs Auswirkung zeigen: Die DNA-Konformität könnte gestört werden, zum einen indirekt durch den Funktionsverlust von Proteinen, die die DNA im dreidimensionalen Kernraum in ihrer Position halten oder direkt, weil DNA-Bereiche, die von Relevanz für die DNA-Struktur sind, zerstört werden. Des Weiteren kann ein SNP bewirken, dass ein Transkriptionskomplex gar nicht oder lediglich schlecht ausgebildet wird. Ferner kann die Inaktivierung eines Promotors, der ein Gen ein- oder ausschaltet, hervorgerufen werden.

Haplotypen

Viele Genotypisierungsverfahren bestimmen einen einzelnen SNP an einer vorgegebenen Position auf beiden Chromosomen. Als Resultat erhält man ein Basenpaar (z.B. AA, GG oder GA). Einen weiteren Ansatz stellt die Haplotypenanalyse dar. Eine spezielle Kombination von SNP-Allelen in einem chromosomalen Segment, die wenig Hinweis auf meiotische Rekombination gibt, wird Haplotyp-Block oder Haploblock genannt. Dieser Bereich des Chromosoms wird somit mit hoher Wahrscheinlichkeit gekoppelt vererbt und ein Austausch von Allelen erfolgt lediglich zwischen den Haploblocks. Somit werden alle SNPs eines Haploblocks zusammenhängend vererbt, was als Kopplungsungleichgewicht

bezeichnet wird. Die verschiedenen Haplotypen lassen sich jeweils durch spezifische SNPs, die sogenannten Haplotype-Tagging-SNPs (htSNPs), sicher voneinander unterscheiden. Mit ihrer Hilfe braucht nur ein geringer Anteil der vorhandenen Polymorphismen typisiert zu werden, um einen Haplotypblock zu charakterisieren. Diese Kenntnisse über die Haplotypblockstruktur des menschlichen Genoms verringern den Aufwand zum Auffinden von krankheitsassoziierten SNPs maßgeblich und werden vom Hapmap-Projekt bereitgestellt.³⁷ Abbildung 5 zeigt exemplarisch, wie Haplotype-Tagging-SNPs einen Haplotypen markieren. In der Abbildung 6 ist ein Beispiel für einen Haploblock zu sehen. Dargestellt ist das CHRD-Gen, welches sich auf dem Chromosom 3 befindet und für das Protein Chordin codiert.

In der vorliegenden Studie wurde der Haplotypen-Ansatz für die Detektion der SNPs gewählt, wobei ein Haplotype-Tagging-SNP eine Frequenz von >5% für das seltene Allel aufweisen musste. Um das Genom der Probanden zu genotypisieren, wurde ihnen Blut entnommen, die DNA daraus extrahiert und dann untersucht.

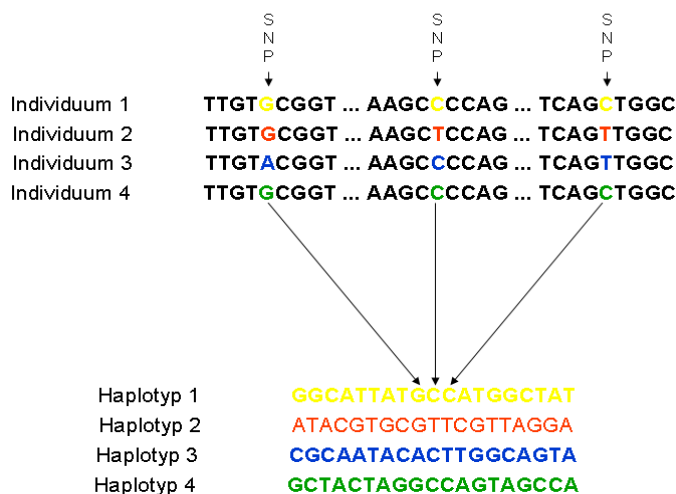


Abbildung 5: spezifische SNPs, die Haplotypen markieren

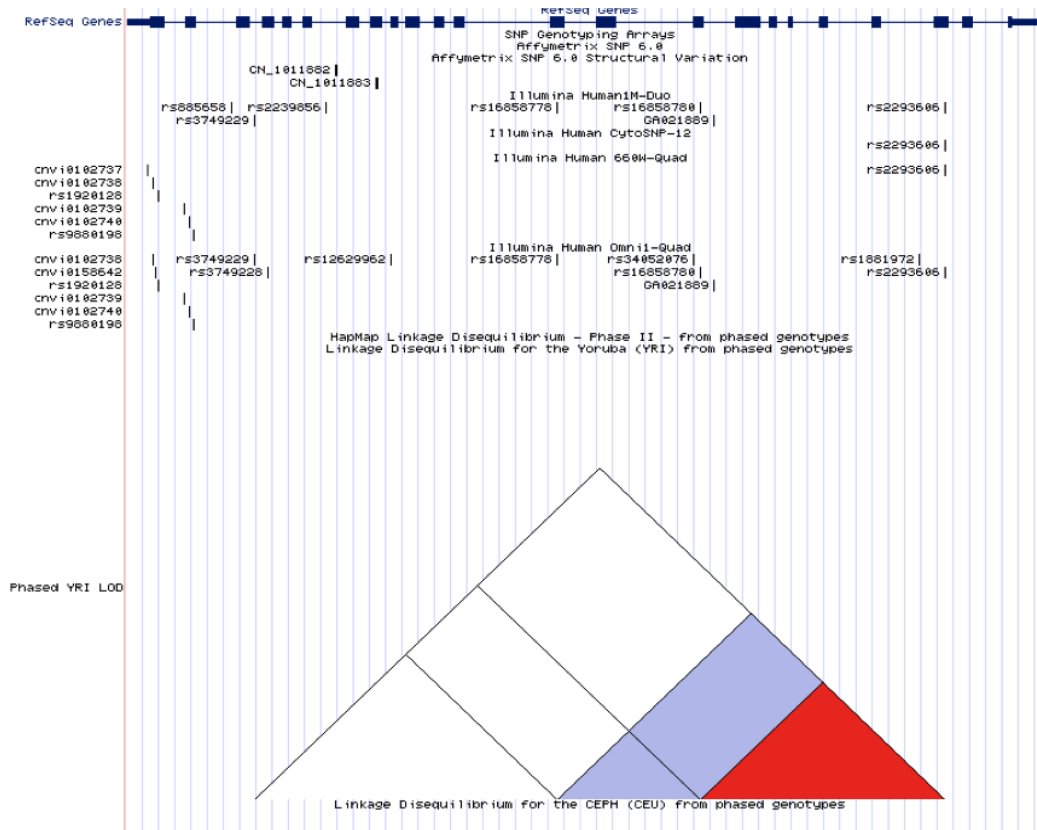


Abbildung 6: Beispiel für einen Haplotyp-Block für das CHRD-Gen auf Chromosom 3: In der oberen Reihe sieht man das Gen, darunter die dazugehörigen SNPs. Die farbigen Bereiche stellen unterschiedlich starke Kopplungsungleichgewichte dar.

DNA-Extraktion und Genotypisierung

Um im Genom der Probanden nach SNPs zu suchen, musste zunächst die DNA aus den Blutproben der Probanden isoliert werden. Dafür wurden den Patienten und Kontrollpersonen je 3 x 10 ml Vollblut entnommen und in EDTA-Puffer enthaltenden Röhrchen gelagert. Nach maximal ein bis vier Tagen Lagerung bei Raumtemperatur erfolgte die Lagerung anschließend bis zur DNA-Präparation bei -80°C . Die anschließende Extraktion der DNA aus den EDTA-Blutproben erfolgte entsprechend

der Gebrauchsanweisung unter Anwendung des *Invisorb® Blood Universal Kit* von *Invitex*. Die DNA wurde daraufhin durch Gelelektrophorese auf ihre Qualität überprüft und anschließend mit Hilfe von *Picogreen Fluoreszenztinte (Molecular Probes - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)* auf eine DNA-Konzentration von 20-30 ng/µl DNA Gehalt eingestellt. Eine Teilprobe der isolierten DNA wurde für eventuelle Wiederholungen im Falle technischer Fehler aufbewahrt, ein anderer Teil mit Hilfe der Whole Genome Amplification (WGA) vermehrt. Die durch diesen Prozess amplifizierte DNA diente dann in getrocknetem Zustand als Ausgangsbasis für die Genotypisierungen, welche mit Hilfe der SNPlex- und- TaqMan- Methode durchgeführt wurden. Für die Genotypisierungen in der Primärstudie wurde die SNPlex-Technik gewählt. Hierbei binden zunächst 48 spezifische Sonden an die von ihnen zu detektierenden bis zu 48 verschiedenen SNP-Regionen. Darauf folgt ihre Trennung vom DNA-Strang mit einer anschließenden PCR (Polymerase Chain Reaction) zur Vervielfältigung. Die amplifizierten SNP-Regionen mit den daran gebundenen Sonden werden nun mit fluoreszierendem Farbstoffmarkern unterschiedlicher Länge markiert und dann mittels Kapillar-Elektrophorese aufgetrennt. Anschließend können die markierten SNPs analysiert werden. Die Genotypisierungen der Replikation erfolgten unter Zuhilfenahme der TaqMan-Technik. Bei dieser Methode finden die SNP-Detektion und die PCR parallel statt. Im Gegensatz zur SNPlex-Technik kann hier jedoch nur ein SNP zur Zeit identifiziert werden. Die Detektion des SNPs erfolgt mittels Oligonukleotid-Detektionssonden, die komplementär an eine spezifische Basensequenz binden und mit zwei fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind. Es werden zwei Farbstoffe verwendet, damit homozygote und heterozygote Allele differenziert werden können: Die Stärke der Fluoreszenz nimmt mit der Zunahme der amplifizierten DNA-Stränge zu. Im Falle der Heterozygotie ergeben sich zwei verschiedenfarbige Fluoreszenzsignale einfacher Intensität, liegt eine Homozygotie vor, entsteht ein einzelnes Fluoreszenzsignal doppelter Intensität für den untersuchten SNP.

Statistische Methoden und Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Statistik-Programm Haploview 3.2 und Genomizer Engine und mit Hilfe des Instituts für Medizinische Informatik und Statistik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) nach dem Mathematiker G. H. Hardy und dem Arzt Wilhelm Weinberg ist ein Begriff aus der Populationsgenetik. Es ist ein mathematisches Modell, mit dessen Hilfe die Genotypfrequenzen aus den Allelfrequenzen einer idealen Population berechnet werden können. „Ideal“ heißt in diesem Zusammenhang, dass der Genpool der Population konstant bleibt. Das wird erreicht, indem die Individuen innerhalb der eigenen Population verbleiben, keine Individuen externer Populationen hinzukommen und keine Selektion stattfindet. Wenn die Allel- und Genotypfrequenzen auch nach vielen Reproduktionen innerhalb der Population konstant bleiben und dem Erwartungswert entsprechen, befindet sich die Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Besteht eine Assoziation des Markers mit der Erkrankung, so kann es in der Fallgruppe zu einer Abweichung vom HWG kommen. Auch Fehler wie eine unterschiedliche Sondenbindung bei hetero- und homozygoten Trägern, eine unzureichende Genotypisierung und eine Populationsstratifizierung können dazu führen, dass bei der Berechnung die Genotypfrequenzen nicht mehr einer idealen Population entsprechen. Um derartige Fehler auszuschließen, wurde das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) für die Kontrollgruppe unter Anwendung des χ^2 -Tests berechnet. Wichen in der Kontrollgruppe Marker signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab ($P_{HWE} < 0,05$), wurden sie in der weiteren Analyse nicht mehr beachtet. Die Genotypen wurden durch automatisiertes Calling generiert. Die über die Software erfolgte Allelzuordnung für alle verwendeten SNPlex- und TaqMan-Assays wurde zum Ausschluss von Fehlern einem manuellem Review unterzogen, wobei Call Rates (CR) von über 95% gefordert wurden, was heißt, dass mindestens 95%

erfolgreich genotypisiert worden sein mussten. Alle Marker, deren CR darunter lag, wurden in der Analyse nicht berücksichtigt.

Der χ^2 -Test

In der vorliegenden Fall-Kontroll-Assoziationsstudie beruhte die Auswertung auf dem Vergleich von SNP-Frequenzen betroffener Personen (Fälle) mit SNP-Frequenzen nicht betroffener Personen (Kontrollen). Das Ziel lag darin, herausfinden, ob die Fallgruppe, deren Individuen an KHK erkrankt sind, in ihrem Genom eine häufigere Frequenz bestimmter SNPs aufweisen als die nicht an KHK erkrankten Individuen der Kontrollgruppe. In der vorliegenden Studie wurde die Nullhypothese aufgestellt, die besagt, dass die SNP-Frequenzen der Fallgruppe denen der Kontrollgruppe entsprechen. Unter dieser Annahme wäre die in der Fallgruppe auftretende KHK ein Produkt des Zufalls und nicht des Auftretens gewisser SNPs. Um diese Nullhypothese verwerfen zu können, musste ein p-Wert kleiner 0,05 berechnet werden. War dies der Fall, so konnte die Alternativhypothese angenommen werden, nämlich, dass ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der SNPs, für die die Berechnung stattfand, und der Erkrankung an einer KHK besteht. Der p-Wert gibt somit das Signifikanzniveau einer Nullhypothese an, aus der ein Rückschluss auf das Signifikanzniveau der Alternativhypothese gezogen werden kann. Um den p-Wert zu erhalten, wurde der χ^2 -Test angewandt. Mit ihm lässt sich prüfen, ob die beobachtete Verteilung der vorgegebenen Verteilung entspricht. Somit kann die Abhängigkeit zweier Merkmale voneinander überprüft werden, indem der Unterschied zwischen dem bei der Studie ermittelten Wert und dem Erwartungswert bestimmt wird. In dieser Fall-Kontroll-Assoziationsstudie sind diese beiden Merkmale der Phänotyp (an KHK erkrankt und gesund) und der Genotyp (SNP mono-oder biallelisch vorhanden und nicht vorhanden).

Odds Ratio (OR)

Darüber hinaus wurde die Odds Ratio in die statistische Auswertung miteinbezogen. Sie ist eine vom p-Wert unabhängige statistische Maßzahl, die etwas über die Stärke eines Zusammenhangs von zwei Merkmalen aussagt. Die Odds Ratio wird häufig in

medizinischen epidemiologischen Studien verwendet, um herauszufinden, wie stark ein vermuteter Risikofaktor (in unserem Falle das Vorhandensein gewisser SNPs) mit einer bestimmten Erkrankung (in unserem Falle KHK) zusammenhängt. In der Regel vergleicht man dabei Personen mit einem potentiellen Risikofaktor für eine Erkrankung mit Personen ohne diesen Risikofaktor bezüglich des Auftretens der Erkrankung. Die gewonnenen Daten werden, wie in Abbildung 2 zu sehen ist, in einer Vierfeldertafel dargestellt, mit deren Hilfe die Odds Ratio errechnet werden kann.

Tabelle 2: Berechnung der Odds Ratio mit Formel

	mit SNP	ohne SNP
KHK (Fälle)	a	b
gesund (Kontrollen)	c	d

$$Odds\ Ratio = \frac{\frac{a}{c}}{\frac{b}{d}} = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$$

Ein Wert von 1 bedeutet ein gleiches Chancenverhältnis. Ergibt die OR eine signifikante Abweichung von 1, kann von einer Assoziation des getesteten Merkmals (bei uns Vorhandensein des SNPs) mit dem untersuchten Phänotyp ausgegangen werden. Dabei zeigt ein Wert zwischen 0 und 1 eine negative, ein Wert über 1 eine positive Assoziation an. Liegt der Wert zum Beispiel bei 4, so heißt dies, dass die Wahrscheinlichkeit zu erkranken vierfach erhöht ist, beziehungsweise, dass der SNP bei einem Patienten der Fallgruppe viermal häufiger vorkommt als bei einer Person der Kontrollgruppe. Die Odds Ratio wurde in dieser Arbeit für jeden der genotypisierten SNPs berechnet, um herauszufinden, ob Assoziationen zwischen den jeweiligen SNPs und dem Auftreten der KHK bestehen.

Das Konfidenzintervall (CI)

Neben der OR wurde ein 95%-Konfidenzintervall (CI) gewählt. Es zeigt die statistische Streuung der OR an. Beispielsweise liegt die tatsächliche OR bei einem 95%-CI von 1,8-2,3 zu 95%iger Wahrscheinlichkeit innerhalb dieses Wertebereiches. Es kann von einer Assoziation ausgegangen werden. Unwahrscheinlich ist eine Assoziation somit, wenn das 95%-CI beispielsweise zwischen 0,9 und 1,1 liegt, da dann angenommen werden kann, dass die Odds Ratio mit 95%iger Wahrscheinlichkeit bei 1 oder nahezu 1 liegt. Eine Odds Ratio von 1 heißt, dass keine Assoziation besteht.

Die logistische Regression

Die logistische Regression ist ein Verfahren, mit dem demonstriert werden kann, dass eine Assoziation unabhängig von Nebenbefunden ist. Als Ergebnis erhält man einen p-Wert, der, wenn er signifikant ist, aussagt, dass das Ergebnis unabhängig von anderen Faktoren ist. Das einfache Regressionsmodell geht davon aus, dass ein linearer Zusammenhang zwischen abhängiger Variablen (hier KHK) und unabhängiger Variablen (hier SNPs) besteht. Dafür sollte das zu untersuchende Merkmal, der Phänotyp einen dichotomen Charakter aufweisen. Dies ist in der vorliegenden Arbeit der Fall: an KHK erkrankt und nicht an KHK erkrankt. Mit Hilfe der logistischen Regression wurden die Studienergebnisse auf die Risikofaktoren Rauchen, BMI, das Geschlecht, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus adjustiert.

Die statistische Power

Darüber hinaus kann die statistische Power berechnet werden. Diese sagt aus, wie wahrscheinlich es ist, eine Assoziation zu finden. Je größer die Odds Ratio ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, einen Zusammenhang zu detektieren. Möchte man seltene Allele detektieren, ist eine große Patientenzahl notwendig, um einen hohen Effekt zu finden.

Ergebnisse

In der vorliegenden Studie sollten Genvarianten des CD11 Clusters identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Entwicklung einer KHK haben. Zu diesem Zwecke wurde als Studiendesign eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie mit einer Replikation gewählt. In der primären Studie wurden zunächst 44 Tagging-SNPs aus drei Genen, welche für die α -Kette des β 2-Integrins kodieren, auf eine Assoziation untersucht. Nach einer Adjustierung der Ergebnisse auf andere Einflussgrößen wurden zwei SNPs in einer unabhängigen Kohorte repliziert.

Resultate der Primärstudie

Für die Untersuchungen der primären Studie dienten die Daten der Patienten der Fallgruppe, bei denen die KHK in einem Alter von unter 55 Jahren diagnostiziert worden war. Diese Gruppe umfasste 1.104 KHK-Patienten. Es wurden 44 Tagging-SNPs aus den drei Genen CD11A, CD11B und CD11C auf eine Assoziation mit der KHK untersucht. Alle SNPs wurden zu mindestens 98 % erfolgreich genotypisiert ($CR \geq 95\%$), es wich jedoch in der Kontrollgruppe ein SNP vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab, die 43 übrigen befanden sich in dem signifikanten Bereich ($P_{HWE} > 0,05$). Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 5 und 6 im Anhang dargestellt. Da die klassischen Risikofaktoren der KHK bei den Patienten der Fallgruppe häufiger vorkamen als bei den Probanden der Kontrollgruppe, musste diese Abweichung in die Auswertung miteinbezogen werden. Die 43 SNPs, die nicht vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abwichen, wurden deswegen mit Hilfe der logistischen Regression auf die Risikofaktoren Geschlecht, Alter, Rauchen, Diabetes mellitus und eine arterielle Hypertonie adjustiert. Nach der Adjustierung wurden die SNPs nach dem dominanten, additiven und rezessiven Modell mit jeweils p nach Wald, Odds Ratio und 95%-CI (=95% Konfidenzintervall) berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zu sehen. Wie die Tabelle zeigt, waren nach der Adjustierung zwei SNPs signifikant assoziiert, die SNPs rs1064524 und rs6565189. (Für die Ergebnisse aller SNPs nach der Adjustierung siehe Tabelle 7 im Anhang).

Tabelle 3: Primäre Studie mit signifikanten SNPs mit den Berechnungen nach dem dominanten, additiven und rezessiven Modell mit jeweils p nach Wald, Odds Ratio und 95%-CI nach Adjustierung auf die Risikofaktoren Diabetes mellitus, Bluthochdruck, BMI, Rauchen und das männliche Geschlecht

Modell SNP	dominant		additiv		rezessiv	
	p	OR_(95-CI)	p	OR_(95-CI)	p	OR_(95-CI)
rs1064524	0,04	2.02 (1.04-3.88)	0,04	1.90 (1.01-3.53)	0,98	NA (NA)
rs6565189	0,55	1.13 (0.75-1.71)	0,09	1.31 (0.96-1.79)	0,01	2.55 (1.29-5.10)

Ergebnisse der Replikationsstudie

Wendete man für diese beiden SNPs die Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni an, so waren sie jedoch nicht mehr signifikant assoziiert. Trotz der Ergebnisse der primären Studie wurden die SNPs rs1064524 und rs6565189 in einer weiteren Studie mit einer weiteren KHK-Kohorte und einer anderen Kontroll-Gruppe repliziert. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der sekundären Studie. Es ist zu sehen, dass für beide SNPs ein p-Wert größer 0,05 (p-Wert für rs1064524: 0,176, p-Wert für rs6565189: 0,44) berechnet wurde. Somit konnten beide SNPs weiterhin nicht als signifikant assoziiert gewertet werden.

Tabelle 4: Replikation der zwei signifikantesten SNPs mit der Anzahl, der Call Rate und der Frequenz des seltenen Allels für die Fälle und Kontrollen, dem Chi Quadrat-Test und dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

SNP	Nca	Nco	Crco	Crca	Chi Quadrat	HWE	minAFca	minAFco
rs6565189	1101	1052	0,99	1	0,48	0,7	0,31	0,3
rs1064524	1096	1061	1	1	0,18	0,96	0,05	0,05

Abbildung 7 und 8 stellen die Haplotypblöcke dar, in denen sich die beiden SNPs befinden. In Abbildung 7 ist zu sehen, dass rs1064524 in einem Exon liegt und zu einem Austausch von Arginin zu Tryptophan führt. Abbildung 8 zeigt rs6565189. Es ist dargestellt, dass dieser SNP keinen Hinweis auf den Austausch einer Aminosäure gibt, und zwischen dem 13. und 14. Exon liegt.

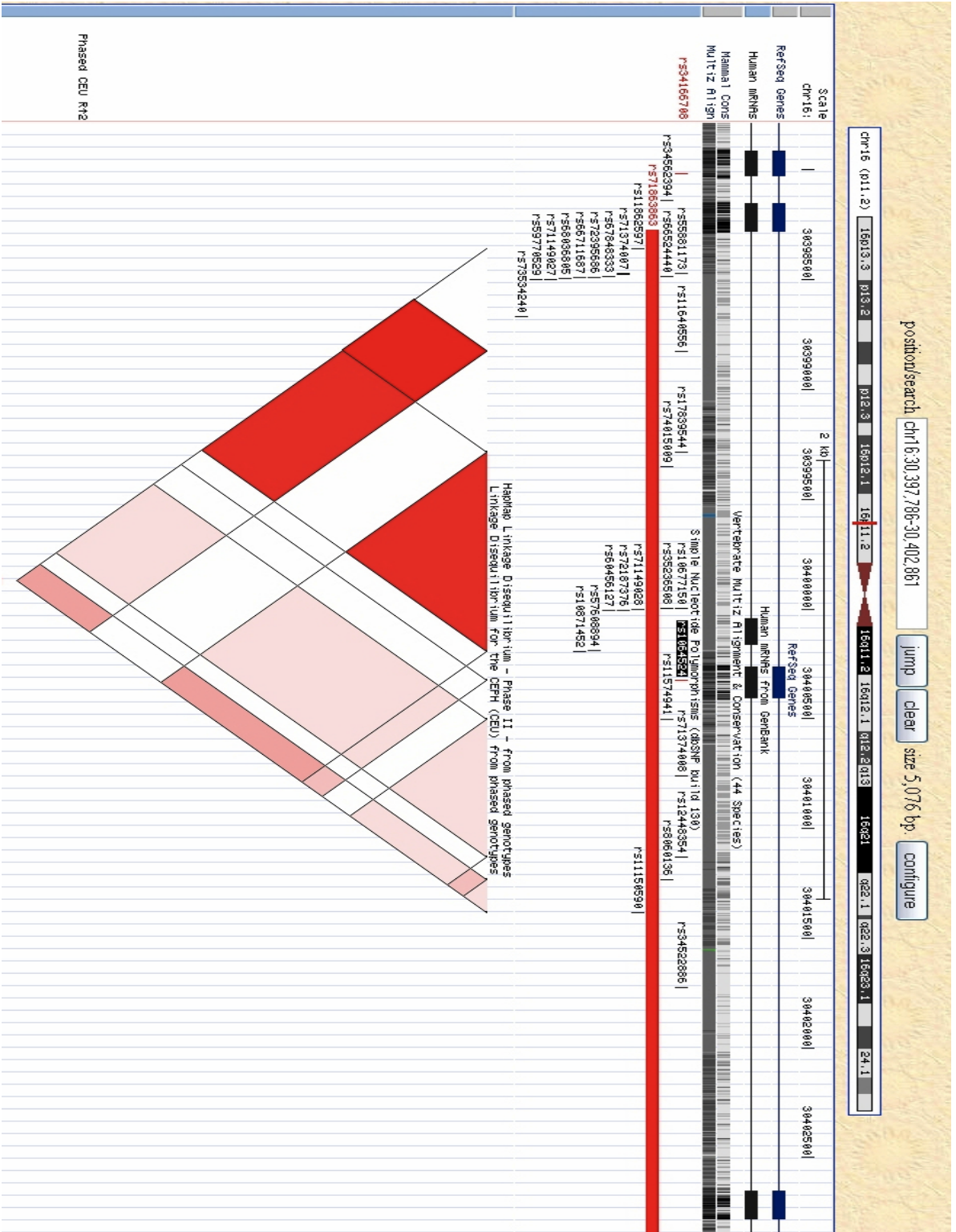


Abbildung 7: Haploblock SNP rs1064524

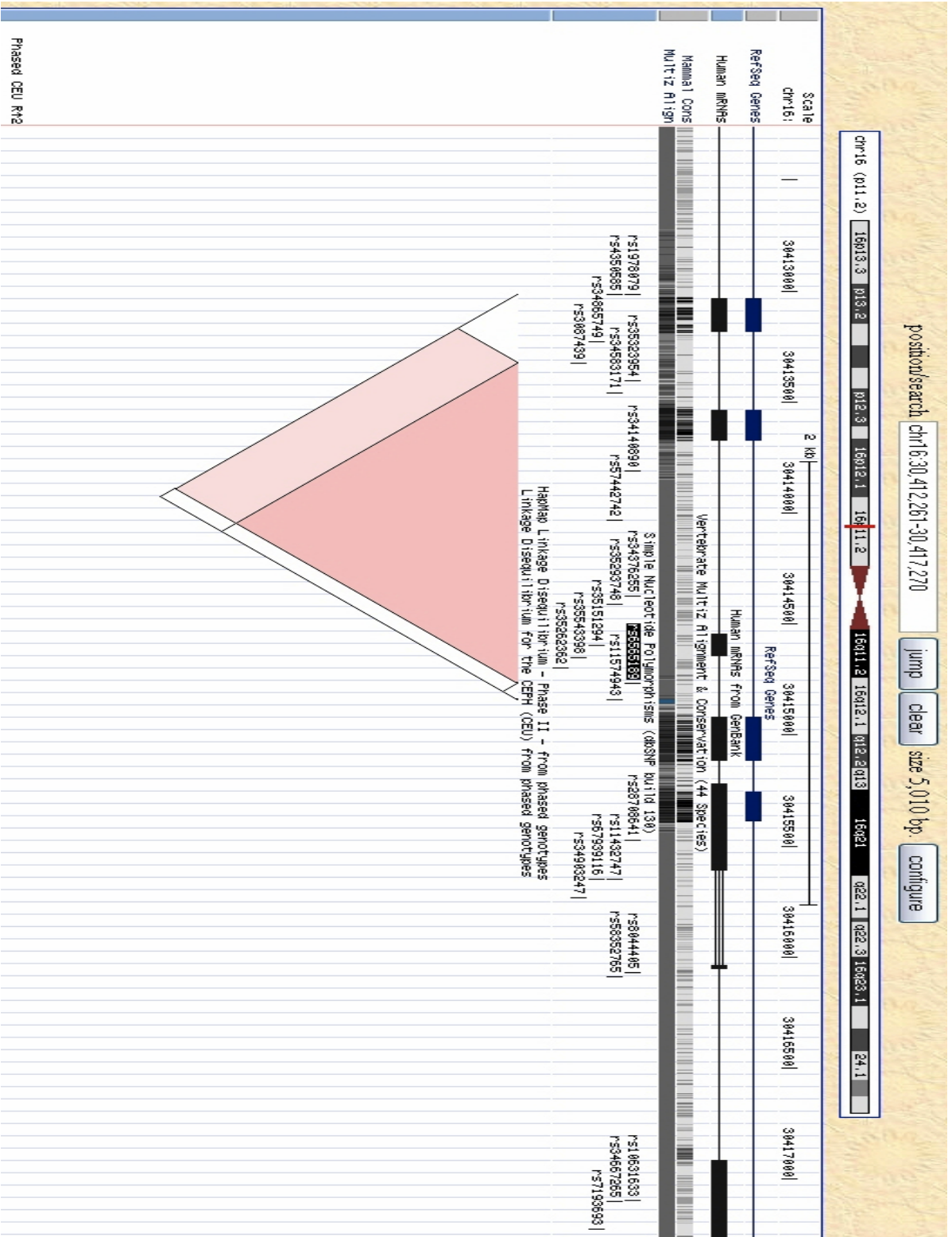


Abbildung 8: Haploblock SNP rs6565189

Diskussion

Die KHK und die genetische Komponente

Bei der Pathogenese der KHK spielen die klassischen Risikofaktoren wie unter anderem der arterielle Hypertonus, Nikotinabusus, Hypercholesterinämie und ein Mangel an Bewegung eine wesentliche Rolle. Die Abwesenheit dieser Risikofaktoren führt jedoch nicht zwangsläufig zu einer Verminderung der Morbidität, so dass davon ausgegangen werden muss, dass weitere pathogenetische Faktoren für die Initiierung und das Fortbestehen der Atherosklerose vorliegen. In epidemiologischen Studien und Zwillingsstudien konnte gezeigt werden, dass die KHK zusätzlich von einer wesentlichen genetischen Komponente bestimmt wird. Personen mit einer genetischen Prädisposition für Atherosklerose haben besonders im jungen Alter ein erhöhtes Risiko, an einer KHK zu erkranken.^{38,39}

Vorangegangene Studien über das β 2-Integrin

In den letzten Jahrzehnten wurden in zahlreichen Studien Kandidatengene auf eine Assoziation mit der KHK untersucht. 2007 veröffentlichten Morgan et al. eine Metaanalyse, in welcher 85 Kandidatengene, für die zuvor ein Zusammenhang mit der KHK gezeigt werden konnte, erneut untersucht wurden. Als Resultat dieser großen Replikationsstudie zeigte sich, dass keines dieser zuvor untersuchten 85 Kandidatengene in einen nennenswerten Zusammenhang mit der KHK gebracht werden konnte. Diese Ergebnisse zeigten die Notwendigkeit einer Replikation bei Fall-Kontroll-Assoziationsstudien, um tatsächlich valide Ergebnisse zu erhalten. Im Rahmen der Metaanalyse von Morgan et al. konnte auch für das β 2-Integrin mit einem p-Wert von 0,4 eine Assoziation mit der KHK nicht nachgewiesen werden.³³ Neuere Untersuchungen zum β 2-Integrin zeigen, dass Mutationen in Genen des CD18-Clusters, die für die β -Kette des Proteins kodieren, einen Defekt in der Leukozyten-Adhäsion herbeiführen können. Auch konnte in dieser Arbeit von Etzioni die Relevanz des β 2-Integrins für die Atherogenese belegt werden.⁴⁰ In der vorliegenden Arbeit wurden die drei relevanten für die α -Domäne des β 2-Integrins kodierenden Gene des CD11-Clusters auf eine Assoziation mit der KHK

untersucht. Da die β 2-Integrine unerlässlich für die Transmigration der Leukozyten in die Gefäßwand sind, spielen sie eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose. Mit der Haplotyp-Analyse wurden in dieser Fall-Kontroll-Assoziationsstudie 44 SNPs auf einen Zusammenhang mit der KHK untersucht. Der Haplotyp-Ansatz wurde dabei erstmalig für das β 2-Integrin verwendet. Im Gegensatz zu vorhergegangenen Studien wurde statt einzelner SNPs in der vorliegenden Arbeit das gesamte Gen untersucht.

Steigerung der Teststärke und Limitation der Studie

Fall-Kontroll-Assoziationsstudien sind in ihrer Aussagekraft limitiert, da zwei statistische Fehler auftreten können: Fehler erster Ordnung (falsch positive Assoziation) und Fehler zweiter Ordnung (übersehene Assoziation). Um diesen Fehlern entgegenzuwirken, sollte bei der Durchführung auf eine ausreichende Populationsgröße sowohl der Fall- als auch der Kontrollkohorte geachtet werden. Je höher die Zahl der Probanden ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Assoziation Produkt des Zufalls und hiermit falsch positiv ist. Für die Primär- und die Replikationsstudie wurde die statistische Power berechnet. Die Abbildungen 9 und 10 stellen diese für die verschiedenen Allelfrequenzen dar. Je größer die Odds Ratio für den SNP ist, desto größer ist die statistische Power. Für häufige Allelfrequenzen wurde eine höhere statistische Power berechnet als für seltene, beispielsweise liegt bei einer Odds Ratio von 1,3 für das häufige Allel mit einer Frequenz von 40 % eine 80 %ige Wahrscheinlichkeit vor, dass eine Assoziation entdeckt wird, für das seltene Allel mit einer Frequenz von 5 % liegt die Wahrscheinlichkeit jedoch nur bei 5 %. Um Assoziationen mit der KHK für seltene Allele entdecken zu können, müsste eine größere Population gewählt werden.

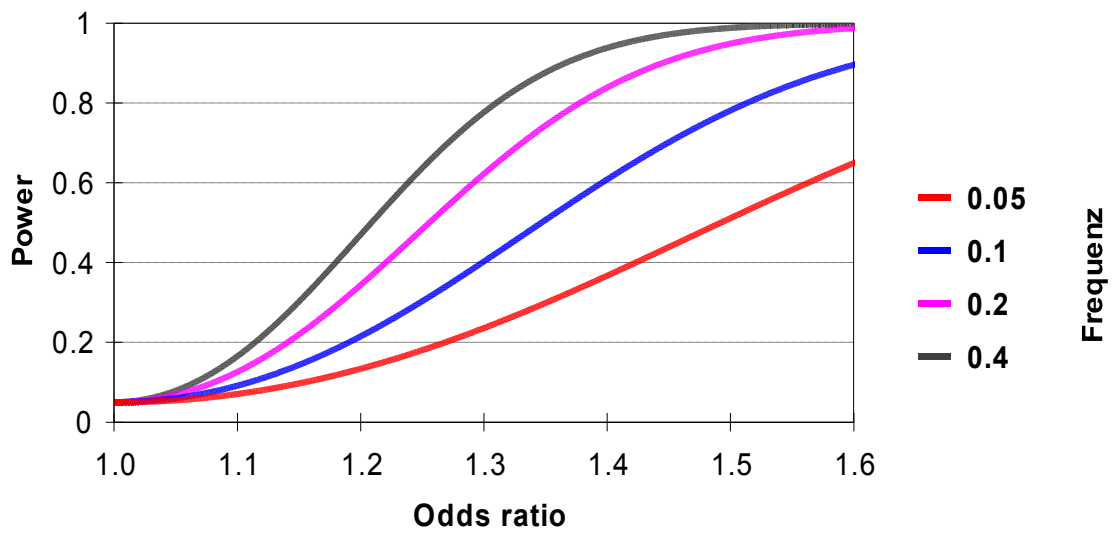


Abbildung 9: Power für die Explorative Studie (1097 Fälle und 736 Kontrollen)

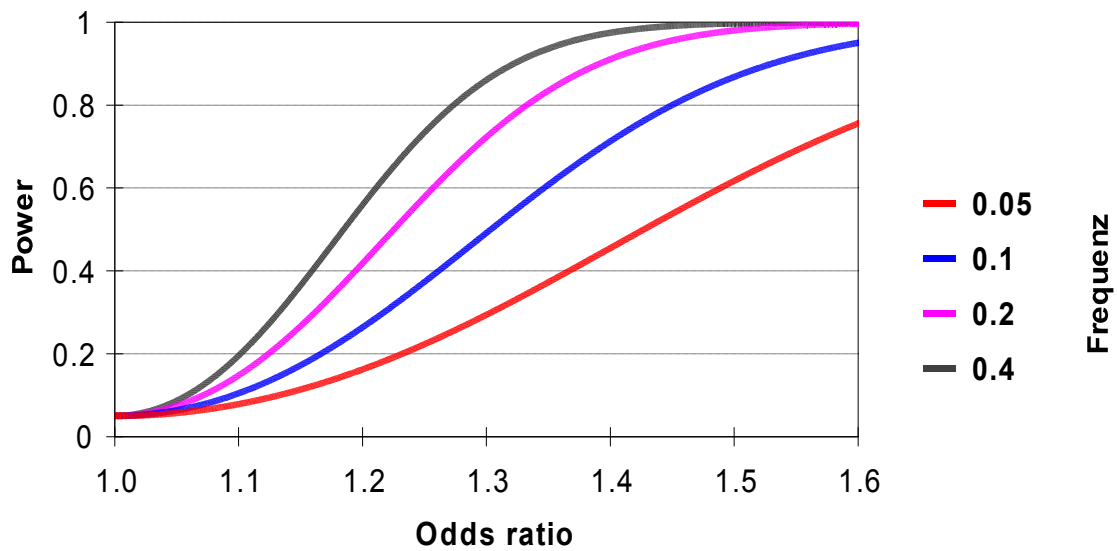


Abbildung 10: Power für die Replikation (1104 Fälle und 1092 Kontrollen)

Häufig sind nicht die zu untersuchenden Größen, sondern Nebenbefunde der Grund für eine Assoziation. Deswegen sollten erhaltene Ergebnisse stets auf Nebenbefunde adjustiert werden. In der vorliegenden Studie ist die Prozentzahl der Individuen mit einem Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie, einem BMI größer als 30, einer positiven Raucheranamnese und dem männlichen Geschlecht in der Fallkohorte stets höher als in der Kontrollkohorte. Um zu gewährleisten, dass positive Ergebnisse nicht auf die Risikofaktoren zurückzuführen sind, fand mit Hilfe einer logistischen Regression eine Adjustierung auf diese Faktoren statt. Aus der primären Studie, in der 44 SNPs untersucht wurden, resultierte nach der Adjustierung zunächst für die SNPs rs1064524 (p-Wert: 0,04) und rs6565189 (p-Wert: 0,01) eine signifikante Assoziation mit der KHK. Nach einer Korrektur dieser Werte für multiples Testen nach Bonferroni müssten diese SNPs jedoch einen p-Wert von 0,001 oder kleiner aufzeigen, um signifikant zu sein.

Rs1064524 liegt in einem Exon und führt zu einem Austausch der Aminosäure Arginin zu Tryptophan. Rs6565189 wird nicht in ein Protein umgeschrieben, steht jedoch im lockeren Kopplungsgleichgewicht mit einer mRNA und befindet sich zwischen dem 13. und 14. Exon. In diesen Exonen liegen keine bekannten SNPs, es könnten dennoch SNPs sein, die im Zusammenhang mit der KHK stehen. Wählt man in einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie eine zu kleine Studienpopulationen, können mögliche Assoziationen übersehen werden. Nach der Korrektur nach Bonferroni waren beide SNPs nicht signifikant. In einer größeren oder unabhängigen Stichprobe könnten sie dessen ungeachtet signifikant sein. Um Fehler zweiter Ordnung zu vermeiden, fand trotz der Ergebnisse der Primärstudie eine Replikation statt. Auch das Ergebnis der Replikation konnte nicht auf eine signifikante Assoziation der Polymorphismen mit der KHK hinweisen und stimmt mit den Resultaten der Replikation und der Metaanalyse von Morgan et al. überein. Des Weiteren ist es wahrscheinlich, dass die Kohorten der Primär- und Sekundärstudie sich in ihrem genetischen Einfluss zu stark voneinander unterscheiden. Bei einem hohen Manifestationsalter spielt der genetische Einfluss eine geringere Rolle als bei jungen Patienten. Die KHK der Patienten der sekundären Studie wurde im Durchschnitt später diagnostiziert als bei den Patienten der primären Studie und

kann so das Ergebnis beeinflusst haben. Eine weitere wichtige Störgröße bei Fall-Kontroll-Assoziationsstudien ist die unentdeckte Populationsstratifizierung. Sie tritt auf, wenn es innerhalb der zu untersuchenden Population zur Bildung einzelner Unterpopulationen kommt. Diese Unterpopulationen können verschiedener ethnischer Herkunft sein, verschiedenen Altersgruppen angehören oder unterschiedliche soziale Strukturen aufweisen. Um die Rahmenbedingungen bestmöglich zu gestalten, sollten darauf geachtet werden, dass die Studienpopulationen so weit wie möglich denselben ethnischen, geographischen und kulturellen Hintergrund aufweisen. Hierfür bietet die vom popgen-Projekt zur Verfügung gestellte Studienpopulation eine gute Ausgangsposition, dennoch kann auch hier eine unentdeckte Populationsstratifizierung vorliegen.

Ausblick

Die koronare Herzkrankheit ist die führende Todesursache in Ländern mit einem hohen Entwicklungsstandard. Im Jahre 2001 konnten 7,3 Millionen Todesfälle auf die kardiovaskuläre Erkrankung zurückgeführt werden. Gemäß der Statistik der Weltgesundheitsorganisation für das Jahr 2007 konnte in 33,7 Prozent der Todesfälle die KHK als Ursache für die Mortalität identifiziert werden.^{41,42} Auch in Ländern mit einem niedrigen Einkommen steigt die Inzidenz der auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführenden Todesfälle.⁴³ Dieser Sachverhalt verdeutlicht, dass es von großem Interesse ist, die Gründe für das Entstehen der koronaren Herzkrankheit zu erforschen. In Hinblick auf die Ursachen konnten sowohl beeinflussbare als auch nicht beeinflussbare Risikofaktoren identifiziert werden, wobei der genetische Aspekt besonders bei KHK-Patienten mit einem frühen Erkrankungsalter eine wichtige Rolle spielt.³⁸

In den vergangenen Jahrzehnten befassten sich viele Studien mit dem genetischen Aspekt der KHK und in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten wurden Genvarianten detektiert, die mit dem Auftreten der KHK korrelieren. Nicht alle dieser Studien konnten einer Metaanalyse Stand halten. In der vorliegenden Studie konnte die Annahme, dass Varianten im CD11-Cluster eine Assoziation mit der KHK zeigen, nicht bestätigt werden. Allerdings gibt es gleichwohl Genvarianten, für die ein

Zusammenhang mit der KHK immer wieder bestätigt werden konnte. Erwähnenswert ist in diesem Rahmen das Apolipoprotein E, für welches mehrfach nachgewiesen wurde, dass bestimmte Genvarianten mit einem erhöhten LDL-Spiegel und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen einhergehen.⁴⁴

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kandidatengenstudie als Studiendesign gewählt, da sie sowohl häufige, als auch seltene Genvarianten aufzudecken vermag, die jedoch individuell einen relevanten genetischen Effekt haben können. Die Erforschung des Genoms ist ein wichtiger Schritt für das Verständnis der Pathogenese der KHK, die eine Erkrankung mit einer beachtenswerten genetischen Komponente ist. Die Kenntnis über Variationen in Genen, die mit der Atherosklerose vergesellschaftet sind, könnte künftig von grundlegender Bedeutung für die Therapieansätze sein. Eine Assoziation mit der KHK wurde für Varianten des CD11-Clusters ausgeschlossen. Dennoch könnten Varianten anderer Genabschnitte durchaus mit der KHK in Verbindung gebracht werden und die Kandidatengenstudie kann als ein nützliches Werkzeug für die Erforschung dieser Varianten betrachtet werden.

Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit ist eine der häufigsten Erkrankungen in Ländern mit hohem Lebensstandard und die vorrangige Ursache für Morbidität und Mortalität in der erwachsenen Bevölkerung. Ihre Entwicklung wird durch eine Reihe von Risikofaktoren begünstigt, worunter die genetische Komponente als ein nicht beeinflussbarer Faktor eine enorme Bedeutung hat. Besonders im jungen Alter trägt die genetische Prädisposition einen entscheidenden Anteil zu der Entstehung der Erkrankung bei, wie vielfach, unter anderem in Zwillingsstudien, für die KHK nachgewiesen werden konnte. Entscheidend für das Verständnis des Pathomechanismus der KHK ist, dass es sich bei der Atherosklerose um eine chronisch entzündliche Erkrankung handelt, wobei die Leukozyten für die Interaktion mit dem Endothel verschiedene Adhäsionsmoleküle nutzen. Eine hervorragende Rolle nehmen in diesem Geschehen die β 2-Integrine ein, welche zum großen Teil durch Gene des CD11-Clusters kodiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage gestellt, ob ein Zusammenhang zwischen genetische Polymorphismen des CD11-Clusters und der KHK existiert. Hierfür wurde eine Kandidatengen-Fall-Kontroll-Assoziationsstudie durchgeführt, die insgesamt 2201 KHK-Patienten berücksichtigte. In den Genotypisierungen wurden insgesamt 44 SNPs aus drei Genen des CD11-Clusters untersucht. Die Analysen sowohl der Primär-, als auch der Replikationsstudie konnten keine Assoziationen von Genvarianten des CD11-Clusters mit der KHK nachweisen.

Die umfassende Betrachtung des genetischen Aspektes der koronaren Herzkrankheit hat sich im vergangenen Jahrzehnt zu einem festen Bestandteil der Erforschung der Genese der KHK entwickelt. Obwohl in der vorliegenden Arbeit für Varianten im CD11-Cluster kein Zusammenhang mit der KHK bestätigt werden konnte, könnte jedoch für andere Gene durchaus eine Assoziation entdeckt werden. Daher bleibt die genaue Betrachtung der hereditären Situation nicht nur relevant, um die Therapie der KHK zu optimieren, sondern könnte künftig auch als Ausgangspunkt für die Prävention der Erkrankung genutzt werden.

Anhang

Tabelle 5: Primäre Studie: 44 SNPs mit den Qualitätskriterien Call rate (CR), Chi-Quadrat-Test, Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE), Frequenz des selteneren Allels (minAF) bei Kontrollen (co) und Fällen (ca) sowie Anzahl (N) der Kontrollen (co) und Fälle (ca)

SNP	Nca	Nco	CR	Chi Quadrat	HWE	minAFca	minAFco
rs12598978	1079	634	1	1,6	0,56	0,49	0,46
rs11862597	1082	634	1	0,13	0,52	0,14	0,15
rs11640556	1082	634	1	-1	-1	0	0
rs1064524	1081	633	1	0,89	0,51	0,05	0,05
rs11574941	1082	634	1	1,79	0,61	0,14	0,12
rs8060136	1081	634	1	0,09	0,08	0,09	0,08
rs11150590	1080	634	1	0,1	0,1	0,37	0,37
rs2285459	1079	632	1	0,5	0,66	0,45	0,44
rs3087437	1082	633	1	1,19	0,3	0,02	0,02
rs3087438	1079	634	1	3,48	0,89	0,39	0,42
rs3087439	1082	634	1	0,1	0,94	0,07	0,07
rs6565189	1077	633	1	1,69	0,32	0,31	0,29
rs1557672	1074	633	0,99	2,38	0,85	0,36	0,38
rs4243232	1080	633	1	0,05	0,96	0,47	0,47
rs2230434	1082	634	1	0,33	0,57	0,11	0,12
rs17790434	1081	634	1	0,03	0,71	0,22	0,22
rs3087443	1073	633	0,99	0,12	0,71	0,22	0,22
rs7196298	1073	632	0,99	0,12	0,68	0,05	0,05
rs4243233	1079	634	1	0	0,71	0,46	0,46
rs8057320	1079	634	1	0,53	0,66	0,28	0,29
rs8048583	1080	634	1	0,88	0,91	0,3	0,32
rs9936831	1082	634	1	2,75	0,41	0,13	0,11
rs11861251	1081	634	1	0,04	0,44	0,16	0,16
rs7190807	1081	634	1	2,09	0,64	0,13	0,11
rs11645653	1073	631	0,99	0,93	0,97	0,23	0,25
rs7499077	1080	634	1	1,72	0,86	0,29	0,27
rs11860650	1080	634	1	2,01	0,64	0,13	0,11
rs11150610	1076	634	1	0,13	0,35	0,42	0,42
rs1143683	1080	634	1	4,57	0,54	0,18	0,15
rs7201448	1080	634	1	4,71	0,54	0,18	0,15
rs4077810	1082	633	1	0,71	0,87	0,29	0,31
rs7193268	1074	634	1	5,48	0,54	0,18	0,15
rs4597342	1082	634	1	0,81	0,86	0,29	0,31
rs11574630	1082	634	1	0,17	0,87	0,33	0,34
rs10782004	1075	634	1	0,17	0,89	0,33	0,34
rs11574632	1074	634	1	0,19	0,57	0,19	0,2
rs11150614	1056	633	0,98	0,74	0,69	0,28	0,29
rs11574633	1063	632	0,99	0,02	0,29	0,15	0,15
rs11574635	1081	634	1	0,08	0,54	0,19	0,2
rs11150615	1067	631	0,99	2,91	0,69	0,19	0,16
rs2230429	1072	632	0,99	0	0,54	0,34	0,34
rs8046381	1082	634	1	3,27	0,41	0,06	0,07
rs8052139	1080	634	1	0	0,41	0,31	0,31
rs11150620	1074	634	1	0,44	0,9	0,27	0,26

Tabelle 6: Primäre Studie: 44 SNPs mit der Anzahl (N) sowie den Frequenzen (F) der Genotypen 11, 12 und 22 bei Kontrollen (co) und Fällen (ca), 1 ist dabei das häufigere, 2 das seltenere Allel

SNP	Nca	Nco	n11ca	n11co	n12ca	n12co	n22ca	n22co	F22ca	F22co	F12ca	F12co
rs12598978	1079	634	279	186	551	308	249	140	0,23	0,22	0,51	0,49
rs11862597	1082	634	787	462	279	156	16	16	0,02	0,03	0,26	0,25
rs11640556	1082	634	1082	634	0	0	0	0	0	0	0	0
rs1064524	1081	633	969	578	111	53	1	2	0	0	0,1	0,08
rs11574941	1082	634	806	489	251	134	25	11	0,02	0,02	0,23	0,21
rs8060136	1081	634	903	529	169	104	9	1	0,01	0	0,16	0,16
rs11150590	1080	634	427	264	502	275	151	95	0,14	0,15	0,47	0,43
rs2285459	1079	632	316	201	550	306	213	125	0,2	0,2	0,51	0,48
rs3087437	1082	633	1041	603	41	29	0	1	0	0	0,04	0,05
rs3087438	1079	634	396	215	532	307	151	112	0,14	0,18	0,49	0,48
rs3087439	1082	634	931	548	144	83	7	3	0,01	0,01	0,13	0,13
rs6565189	1077	633	514	314	456	271	107	48	0,1	0,08	0,42	0,43
rs1557672	1074	633	446	241	493	301	135	91	0,13	0,14	0,46	0,48
rs4243232	1080	633	301	177	533	316	246	140	0,23	0,22	0,49	0,5
rs2230434	1082	634	853	497	221	127	8	10	0,01	0,02	0,2	0,2
rs17790434	1081	634	659	385	369	216	53	33	0,05	0,05	0,34	0,34
rs3087443	1073	633	658	384	363	216	52	33	0,05	0,05	0,34	0,34
rs7196298	1073	632	976	572	96	59	1	1	0	0	0,09	0,09
rs4243233	1079	634	316	189	538	310	225	135	0,21	0,21	0,5	0,49
rs8057320	1079	634	571	321	413	257	95	56	0,09	0,09	0,38	0,41
rs8048583	1080	634	534	295	437	274	109	65	0,1	0,1	0,41	0,43
rs9936831	1082	634	822	497	234	131	26	6	0,02	0,01	0,22	0,21
rs11861251	1081	634	771	454	277	162	33	18	0,03	0,03	0,26	0,26
rs7190807	1081	634	823	497	234	130	24	7	0,02	0,01	0,22	0,21
rs11645653	1073	631	634	357	377	235	62	39	0,06	0,06	0,35	0,37
rs7499077	1080	634	559	338	416	251	105	45	0,1	0,07	0,39	0,4
rs11860650	1080	634	823	497	233	130	24	7	0,02	0,01	0,22	0,21
rs11150610	1076	634	360	217	536	298	180	119	0,17	0,19	0,5	0,47
rs1143683	1080	634	736	458	307	164	37	12	0,03	0,02	0,28	0,26
rs7201448	1080	634	735	458	308	164	37	12	0,03	0,02	0,29	0,26
rs4077810	1082	633	550	306	432	267	100	60	0,09	0,1	0,4	0,42
rs7193268	1074	634	726	458	311	164	37	12	0,03	0,02	0,29	0,26
rs4597342	1082	634	552	307	431	267	99	60	0,09	0,1	0,4	0,42
rs11574630	1082	634	476	274	488	287	118	73	0,11	0,12	0,45	0,45
rs10782004	1075	634	475	277	484	283	116	74	0,11	0,12	0,45	0,45
rs11574632	1074	634	713	408	315	204	46	22	0,04	0,04	0,29	0,32
rs11150614	1056	633	552	317	415	259	89	57	0,08	0,09	0,39	0,41
rs11574633	1063	632	772	458	263	156	28	18	0,03	0,03	0,25	0,25
rs11574635	1081	634	713	407	320	205	48	22	0,04	0,04	0,3	0,32
rs11150615	1067	631	709	444	320	169	38	18	0,04	0,03	0,3	0,27
rs2230429	1072	632	469	273	481	290	122	69	0,11	0,11	0,45	0,46
rs8046381	1082	634	961	544	114	85	7	5	0,01	0,01	0,11	0,13
rs8052139	1080	634	509	305	469	263	102	66	0,09	0,1	0,43	0,42
rs11150620	1074	634	571	349	428	242	75	43	0,07	0,07	0,4	0,38

Tabelle 7: Primäre Studie mit signifikanten SNPs mit den Berechnungen nach dem dominanten, additiven und rezessiven Modell mit jeweils p nach Wald, Odds Ratio und 95%-CI (=95% Konfidenzintervall) nach Adjustierung auf die Risikofaktoren Diabetes mellitus, Bluthochdruck, BMI, Rauchen und das Geschlecht.

	Modell SNP	dominant		additiv		rezessiv	
		p	OR (95-CI)	p	OR (95-CI)	p	OR (95-CI)
1	rs12598978	0,86	1.0410 (0.6576-1.6565)	0,81	1.0360 (0.7766-1.3818)	0,82	1.0562 (0.6521-1.7010)
2	rs11862597	0,94	1.0636 (0.2491-6.2598)	0,12	1.4096 (0.9186-2.1980)	0,09	1.5043 (0.9404-2.4322)
3	rs11640556	NA	NA (NA)	NA	NA (NA)	NA	NA (NA)
4	rs1064524	0,04	2.0151 (1.0413-3.8795)	0,04	1.9004 (1.0052-3.5341)	0,98	NA (NA)
5	rs11574941	0,41	1.9195 (0.4108-9.7223)	0,21	1.3304 (0.8557-2.0899)	0,25	1.3435 (0.8174-2.2360)
6	rs8060136	0,13	0.0823 (0.0023-1.3226)	0,24	0.7422 (0.4511-1.2175)	0,37	0.7859 (0.4641-1.3361)
7	rs11150590	0,27	0.7898 (0.5181-1.2003)	0,41	0.8833 (0.6567-1.1839)	0,92	0.9696 (0.5460-1.7040)
8	rs2285459	0,98	1.0057 (0.6128-1.6620)	0,96	0.9928 (0.7438-1.3263)	0,92	0.9782 (0.6228-1.5307)
9	rs3087437	0,98	311835.1619 (0.0000-NA)	0,05	2.9443 (1.0539-9.4864)	0,05	2.9710 (1.0339-9.6269)
10	rs3087438	0,67	1.1348 (0.6379-2.0526)	0,62	0.9254 (0.6807-1.2570)	0,31	0.7980 (0.5141-1.2299)
11	rs3087439	0,47	0.8059 (0.4439-1.4438)	0,52	0.8336 (0.4766-1.4448)	0,86	1.2804 (0.0869-18.2896)
12	rs6565189	0,55	1.1320 (0.7514-1.7063)	0,09	1.3076 (0.9565-1.7916)	0,01	2.5504 (1.2866-5.0963)
13	rs1557672	0,74	1.1054 (0.6109-2.0358)	0,76	0.9547 (0.7055-1.2920)	0,52	0.8699 (0.5690-1.3235)
14	rs4243232	0,45	0.8325 (0.5192-1.3399)	0,92	0.9853 (0.7419-1.3092)	0,57	1.1395 (0.7217-1.7944)
15	rs2230434	0,18	0.6972 (0.4087-1.1730)	0,22	0.7420 (0.4539-1.1852)	0,94	0.9331 (0.1287-4.5133)
16	rs17790434	0,15	1.3540 (0.8950-2.0530)	0,29	1.2028 (0.8526-1.6950)	0,7	0.8316 (0.3095-2.1063)
17	rs3087443	0,69	1.2171 (0.4793-3.2784)	0,33	0.8416 (0.5967-1.1884)	0,17	0.7499 (0.4941-1.1358)
18	rs7196298	0,76	0.4008 (0.0035-45.2809)	0,8	0.9204 (0.4839-1.7578)	0,83	0.9287 (0.4825-1.8046)
19	rs4243233	0,23	1.3308 (0.8383-2.1321)	0,56	1.0922 (0.8136-1.4675)	0,75	0.9227 (0.5550-1.5199)
20	rs8057320	0,36	0.7255 (0.3682-1.4457)	0,53	0.9057 (0.6630-1.2377)	0,79	0.9450 (0.6272-1.4227)
21	rs8048583	0,67	0.9139 (0.6053-1.3790)	0,99	1.0017 (0.7357-1.3622)	0,48	1.2605 (0.6569-2.3940)
22	rs9936831	0,56	1.1552 (0.7046-1.8840)	0,54	1.1518 (0.7339-1.8021)	0,72	1.3741 (0.2390-7.8108)
23	rs11861251	0,19	0.4424 (0.1319-1.5612)	0,93	0.9820 (0.6565-1.4768)	0,71	1.0916 (0.6857-1.7489)
24	rs7190807	0,78	0.7813 (0.1447-4.5131)	0,55	0.8724 (0.5585-1.3687)	0,56	0.8657 (0.5308-1.4192)
25	rs11645653	0,39	1.4052 (0.6546-3.0667)	0,4	1.1479 (0.8325-1.5871)	0,54	1.1365 (0.7529-1.7198)
26	rs7499077	0,09	0.5434 (0.2689-1.1137)	0,6	0.9193 (0.6697-1.2642)	0,78	1.0607 (0.6993-1.6104)
27	rs11860650	0,56	1.1552 (0.7046-1.8840)	0,55	1.1462 (0.7306-1.7904)	0,78	1.2799 (0.2216-6.9091)
28	rs11150610	0,06	1.7208 (0.9946-3.0264)	0,73	1.0532 (0.7849-1.4148)	0,3	0.7938 (0.5112-1.2247)
29	rs1143683	0,65	1.1115 (0.7072-1.7418)	0,54	1.1348 (0.7583-1.6935)	0,47	1.6485 (0.4069-6.3501)
30	rs7201448	0,64	1.1118 (0.7074-1.7422)	0,54	1.1351 (0.7584-1.6938)	0,47	1.6485 (0.4069-6.3505)
31	rs4077810	0,82	0.9532 (0.6324-1.4362)	0,84	0.9689 (0.7090-1.3218)	0,96	0.9813 (0.4940-1.9205)
32	rs7193268	0,57	1.1384 (0.7244-1.7841)	0,47	1.1577 (0.7736-1.7278)	0,46	1.6667 (0.4118-6.4177)
33	rs4597342	0,78	0.9445 (0.6268-1.4227)	0,82	0.9647 (0.7059-1.3160)	0,97	0.9857 (0.4962-1.9289)
34	rs11574630	0,3	1.2449 (0.8234-1.8902)	0,88	1.0237 (0.7499-1.3976)	0,18	0.6334 (0.3211-1.2297)
35	rs10782004	0,13	1.6709 (0.8596-3.3097)	0,91	0.9822 (0.7197-1.3408)	0,27	0.7934 (0.5225-1.1998)
36	rs11574632	0,45	0.8444 (0.5430-1.3059)	0,66	0.9190 (0.6270-1.3391)	0,5	1.4744 (0.4601-4.4626)
37	rs11150614	0,9	0.9543 (0.4689-1.9875)	0,77	1.0495 (0.7631-1.4469)	0,65	1.0998 (0.7292-1.6602)
38	rs11574633	0,2	0.4414 (0.1304-1.5806)	0,74	0.9325 (0.6185-1.4133)	0,93	1.0219 (0.6344-1.6564)
39	rs11574635	0,47	0.6605 (0.2208-2.0678)	0,75	1.0640 (0.7313-1.5552)	0,51	1.1570 (0.7480-1.7991)
40	rs11150615	0,41	0.5997 (0.1795-2.0690)	0,34	0.8315 (0.5671-1.2206)	0,43	0.8392 (0.5422-1.3005)
41	rs2230429	0,39	1.1993 (0.7906-1.8255)	0,74	1.0546 (0.7739-1.4370)	0,54	0.8166 (0.4247-1.5511)
42	rs8046381	0,26	0.6936 (0.3634-1.2937)	0,4	0.7742 (0.4223-1.3889)	0,26	4.0573 (0.2670-42.9194)
43	rs8052139	0,64	1.1641 (0.6173-2.2269)	0,4	1.1384 (0.8406-1.5477)	0,41	1.1904 (0.7894-1.8006)
44	rs11150620	0,75	1.1251 (0.5460-2.3632)	0,34	1.1662 (0.8493-1.6087)	0,3	1.2453 (0.8265-1.8850)

Literaturverzeichnis

1. Böcker et al. *Pathologie*. 3. ed. München, Jena: Elsevier; 2004:462.
2. Löwel H. Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt [Gesundheitsberichterstattung - Themenhefte]. 2006;33(Robert-Koch-Institut).
3. Sanz J, Fayad ZA. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature*. 2008;451(7181):953-957.
4. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-241.
5. Renz-Polster H. *Basislehrbuch Innere Medizin*. 3. ed. München, Jena: Elsevier; 2006:208.
6. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362(6423):801-809.
7. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-874.
8. Tamura U, Tanaka T, Okamura T, et al. Changes in Weight, Cardiovascular Risk Factors and Estimated Risk of Coronary Heart Disease Following Smoking Cessation in Japanese Male Workers: HIPOP-OHP Study. *J Atheroscler Thromb*. 2010. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20081325> [Accessed January 24, 2010].
9. Luley C. [Lipometabolic disorder--cholesterol and triglycerides]. *Clin Res Cardiol*. 2006;95 Suppl 6:VI17-22.

10. Kozakova M, Palombo C, Mhamdi L, et al. Habitual physical activity and vascular aging in a young to middle-age population at low cardiovascular risk. *Stroke*. 2007;38(9):2549-2555.
11. Pellitero S, Reverter JL, Tàssies D, et al. Polymorphisms in platelet glycoproteins Ia and IIIa are associated with arterial thrombosis and carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. *Thromb Haemost*. 2010;103. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20076847> [Accessed January 24, 2010].
12. Levisianou D, Melidonis A, Adamopoulou E, et al. Impact of the metabolic syndrome and its components combinations on arterial stiffness in Type 2 diabetic men. *Int Angiol*. 2009;28(6):490-495.
13. Kaya A, Uzunhasan I, Baskurt M, et al. Oxidative Status and Lipid Profile in Metabolic Syndrome: Gender Differences. *Metab Syndr Relat Disord*. 2009. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19958158> [Accessed January 25, 2010].
14. Lekontseva ON, Chakrabarti S, Davidge ST. Endothelin in the female vasculature: a role in aging? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20053960> [Accessed January 25, 2010].
15. Cziraky MJ, Watson KE, Talbert RL. Targeting low HDL-cholesterol to decrease residual cardiovascular risk in the managed care setting. *J Manag Care Pharm*. 2008;14(8 Suppl):S3-28; quiz S30-31.
16. Cynshi O, Tamura K, Niki E. Design, synthesis, and action of antiatherogenic antioxidants. *Methods Mol. Biol*. 2010;610:91-107.

17. Jayasinghe SR, Mishra A, Van Daal A, Kwan E. Genetics and cardiovascular disease: Design and development of a DNA biobank. *Exp Clin Cardiol.* 2009;14(3):33-37.
18. Thacker S, Duquaine D, Park J, Kaplan MJ. Lupus-prone New Zealand Black/New Zealand White F1 mice display endothelial dysfunction and abnormal phenotype and function of endothelial progenitor cells. *Lupus.* 2010. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068018> [Accessed January 25, 2010].
19. Riccioni G, Mancini B, Di Ilio E, Bucciarelli T, D'Orazio N. Protective effect of lycopene in cardiovascular disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2008;12(3):183-190.
20. Ross R. Atherosclerosis -- An Inflammatory Disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-126.
21. Yan AT, Yan RT, Cushman M, et al. Relationship of interleukin-6 with regional and global left-ventricular function in asymptomatic individuals without clinical cardiovascular disease: insights from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2010. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20064818> [Accessed January 25, 2010].
22. Angel K, Provan SA, Gulseth HL, et al. Tumor necrosis factor-alpha antagonists improve aortic stiffness in patients with inflammatory arthropathies: a controlled study. *Hypertension.* 2010;55(2):333-338.
23. Batuca J, Delgado Alves J. C-reactive protein in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 2009;42(4):282-285.

24. Wilson PWF, Pencina M, Jacques P, et al. C-reactive protein and reclassification of cardiovascular risk in the Framingham Heart Study. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2008;1(2):92-97.
25. Georges JL, Loukaci V, Poirier O, et al. Interleukin-6 gene polymorphisms and susceptibility to myocardial infarction: the ECTIM study. Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde. *J. Mol. Med*. 2001;79(5-6):300-305.
26. Walzog B, Jeblonski F, Zakrzewicz A, Gaehtgens P. Beta2 integrins (CD11/CD18) promote apoptosis of human neutrophils. *FASEB J*. 1997;11(13):1177-1186.
27. Corbi AL, Garcia-Aguilar J, Springer TA. Genomic structure of an integrin alpha subunit, the leukocyte p150,95 molecule. *J. Biol. Chem*. 1990;265(5):2782-2788.
28. Lee HM, Kim HJ, Won K, et al. Contribution of soluble intercellular adhesion molecule-1 to the migration of vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol*. 2008;579(1-3):260-268.
29. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990;346(6283):425-434.
30. Sanchez-Madrid F, Nagy JA, Robbins E, Simon P, Springer TA. A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule. *J. Exp. Med*. 1983;158(6):1785-1803.
31. Konstandin MH, Aksoy H, Wabnitz GH, et al. Beta2-integrin activation on T cell subsets is an independent prognostic factor in unstable angina pectoris. *Basic Res. Cardiol*. 2009;104(3):341-351.

32. Merched A, Tollefson K, Chan L. β 2 integrins modulate the initiation and progression of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Cardiovasc. Res.* 2009. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19843511> [Accessed January 29, 2010].
33. Morgan TM, Krumholz HM, Lifton RP, Spertus JA. Nonvalidation of reported genetic risk factors for acute coronary syndrome in a large-scale replication study. *JAMA.* 2007;297(14):1551-1561.
34. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007;447(7145):661-678.
35. Samani NJ, Deloukas P, Erdmann J, et al. Large scale association analysis of novel genetic loci for coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009;29(5):774-780.
36. Nath SK, Han S, Kim-Howard X, et al. A nonsynonymous functional variant in integrin-alpha(M) (encoded by ITGAM) is associated with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 2008;40(2):152-154.
37. About the HapMap. Available at: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/thehapmap.html.en> [Accessed February 7, 2010].
38. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N. Engl. J. Med.* 1994;330(15):1041-1046.
39. Scheuner MT. Clinical application of genetic risk assessment strategies for coronary artery disease: genotypes, phenotypes, and family history. *Prim. Care.* 2004;31(3):711-737, xi-xii.

40. Etzioni A. Genetic etiologies of leukocyte adhesion defects. *Current Opinion in Immunology*. 2009;21(5):481-486.
41. WHO. The World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life, World Health Organization. 2002.
42. <http://www.who.int/whostat2007/en/index.html> .
43. Gaziano TA, Bitton A, Anand S, Abrahams-Gessel S, Murphy A. Growing Epidemic of Coronary Heart Disease in Low- and Middle-Income Countries. *Current Problems in Cardiology*. 2010;35(2):72-115.
44. Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, et al. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA*. 2007;298(11):1300-1311.

Danksagung

Für die Bereitstellung dieses interessanten Themas möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Privatdozenten Dr. med. N.-E. El Mokhtari herzlich bedanken sowie für seine Kritik, die konstruktiven Gespräche und seinen Optimismus.

Für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Klinik für Kardiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel durchführen zu können, danke ich Herrn Prof. Dr. med. N. Frey und seinem Vorgänger Herrn Prof. Dr. med. R. Simon.

Herrn Prof. Dr. med. S. Schreiber, Herrn Prof. Dr. rer. nat. M. Krawczak und ihren Mitarbeitern des popgen-Projektes danke ich für die Bereitstellung der Kohorten. Herrn Prof. Dr. med. S. Schreiber und seinen Mitarbeitern des IKMB bin ich zu Dank verpflichtet, wobei ich vor allem Herrn Dr. rer. nat. Arne Schäfer für seinen Rat, die kritischen Diskussionen und seine kontinuierliche konstruktive Kritik danken möchte.

Nicht zuletzt möchte ich mich für den starken Rückhalt bei meiner Mutter, meinem Bruder und Marc Müller bedanken, welche stets die passenden Worte finden und mich in allen Phasen dieser Arbeit unterstützt und ermutigt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Baj, Agnes
Geburtsdatum	22.06.1985
Geburtsort	Köslin
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1991-1995	Grundschule Ramsharde, Flensburg
1995-2004	Altes Gymnasium, Flensburg
Juni 2004	Abitur

Universität

seit Oktober 2004	Studium der Humanmedizin an der CAU Kiel
August 2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 2009 – Dezember 2009	1. PJ-Tertial Innere Medizin, Diako Flensburg
Dezember 2009 - April 2010	2. PJ-Tertial Chirurgie, Städtisches Krankenhaus Kiel
April 2010 – Juli 2010	3. PJ-Tertial Pädiatrie, UK-SH, Campus Kiel
Oktober 2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit Oktober 2004	Fachschaftsarbeit, Hochschulpolitik
2008	Vizepräsidentin der Bundesvertretung der Medizinstudierenden in Deutschland