

Aus der Klinik für Innere Medizin I
Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Schreiber
im Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts- Universität zu Kiel

**ASSOZIATION VON GENETISCHER VARIANZ IM
VISFATINGEN ZU PARAMETERN DES METABOLISCHEN
SYNDROMS**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

LEVKE ENGLERT

aus Bremerhaven

Kiel 2014

Referent: PD. Dr. Diana Rubin

Koreferent: PD. Dr. Felix Treumer

Tag der mündlichen Prüfung: 07.09.2015

Zum Druck genehmigt, Kiel, den: 07.09.2015

1	Einleitung.....	1
1.1	Das metabolische Syndrom.....	1
1.1.1	Pathophysiologie des metabolischen Syndroms.....	1
1.2	Visfatin und die Bedeutung im Stoffwechsel.....	2
1.3	Genetische Varianz im Visfatingen.....	6
1.4	Kandidatengenansatz und Assoziationsstudien.....	9
1.5	Aufgabenstellung.....	9
2	Material und Methoden.....	10
2.1	Methoden.....	10
2.1.1	Probandenrekrutierung und Beschreibung der Kohorte.....	10
2.1.2	Ein- und Ausschlusskriterien für die Studie.....	10
2.1.3	oraler Glukose Toleranztest (oGTT).....	11
2.1.4	oraler metabolischer Toleranztest (oMTT).....	11
2.1.5	Auswahl der Visfatin SNP.....	11
2.2	Laborarbeiten.....	12
2.2.1	DNA- Gewinnung.....	12
2.2.2	Genotypisierung.....	13
2.3	Haplotypenanalyse.....	15
2.4	Statistische Analyse.....	16
2.5	Material.....	17
2.5.1	Verbrauchsmaterial.....	17
2.5.2	Geräte.....	18

3	Ergebnisse.....	19
3.1	Einzelanalyse der Single Nucleotid Polymorphismen im Visfatingen.....	19
3.2	Ergebnisse der Haplotypenanalyse.....	23
4	Diskussion.....	25
4.1	Hintergründe des Studienaufbaus.....	25
4.2	Beurteilung der Ergebnisse für die Visfatin Polymorphismen.....	28
4.3	Diskussion der Ergebnisse der Haplotypenanalyse.....	31
5	Zusammenfassung.....	33
6	Literaturverzeichnis.....	35
7	Anhang.....	39

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

AUC	area under the curve
BMI	Body Mass Index
CI	Konfidenzintervall
CRP	C- reaktives Protein
eNAMPT	extrazelluläre Nicotinamid Phosphoribosyltransferase
FFA	Free Fat Acid
GGT	Gamma-Glutamyl Transferase
GOT	Glutamat-Oxalat Transferase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GWAS	genome wide association studies
HDL	High Density Lipoprotein
HOMAbcell	Insulinsensitivität
HOMA-IR	Insulinresistenz
IDF	International Diabetes Federation
LD	Linkage Disequilibrium
LDL	low density lipoprotein
MetS	Metabolisches Syndrom
MCH	mean corpuscular haemoglobin
MCHC	mean corpuscular haemoglobin concentration
MCV	mean cell volume
MICK	Metabolic Intervention Cohort Kiel
NAD	Nicotinsäureamid- Dinukleotid
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NAMPT	Nicotinamid Phosphoribosyltransferase
oGTT	oraler Glukosetoleranztest
oMTT	oraler metabolischer Toleranztest
OR	odds ratio
PBEF	pre-B-cell enhancing factor
SNP	single nucleotid polymorphism
TAG	Triacylglycerid
T2DM	Diabetes Mellitus Typ II
VLDL	very low density lipoprotein

1 Einleitung

1.1 Das metabolische Syndrom

Das metabolische Syndrom (MetS) ist eine Erkrankung mit weltweit zunehmender Inzidenz (Grundy et al. 2008). In der deutschen Bevölkerung liegt die Prävalenz bei 25 Prozent laut Angabe des Robert Koch Institutes (Janhsen et al. 2008).

Pathogenetisch stehen äußere Faktoren, wie eine erhöhte Energieaufnahme im Zusammenhang mit verminderter sportlicher Aktivität sowie genetische Faktoren im Vordergrund (Gupta et al. 2010, Nair et al. 2010).

Für die Diagnose eines MetS liegen mehrere Klassifikationen unter anderem von Raeven et al. 1988 (Chabot et al.1993), sowie von der WHO 1998, der ATP III/NCEP 2001 (Adult Treatment Panel und National Cholesterol Education Program, Grundy et al. 2002) und der IDF 2005 (International Diabetes Federation) vor (Institut für präventive Medizin der Universität Erlangen- Nürnberg 2005). Nach den Kriterien der IDF sind mindestens drei von fünf der folgenden Befunde für das Vorhandensein dieses Symptomkomplexes erforderlich:

- eine bauchbetonte (zentrale) Adipositas; bei Männern Taillenumfang ≥ 102 cm
bei Frauen Taillenumfang ≥ 88 cm
- Nüchternblutzuckerwerte von ≥ 110 mg/dl oder diagnostizierter Diabetes mellitus
- erhöhte Triacylglyceridwerte (TAG) ≥ 150 mg/dl oder bereits behandelte Triacylglyceridämie
- erniedrigte High Density Lipoprotein Cholesterin Werte (HDL- Cholesterin);
bei Männern ≥ 40 mg/dl
bei Frauen ≥ 50 mg/dl oder bereits eingeleitete Therapie zur Erhöhung des HDL- Cholesterin
- Bluthochdruck ≥ 130 mmHg systolisch und ≥ 85 mmHg diastolisch oder bereits behandelte Hypertonie

1.1.1 Pathophysiologie des metabolischen Syndrom

Das MetS entsteht durch komplexe Stoffwechselveränderungen, metabolischer, kardiovaskulärer, renaler und neurohumoraler Art, die als wesentliche Grundlage eine

abdominelle Adipositas gemeinsam haben. Die pathogenetischen Schlüsselfaktoren für die resultierende Morbidität sind dabei eine chronische Entzündungsreaktion, Insulinresistenz sowie Lipotoxizität in Leber, Fettgewebe, Muskel, Pankreas und Gefäßen (Engeli et al. 2007). Die Insulinresistenz des Fettgewebes hat eine entscheidende Bedeutung in der Pathophysiologie der Erkrankung; speziell abdominelle Fettgewebsanteile haben höhere Umsatzraten an freien Fettsäuren. Im Rahmen der Insulinresistenz wird die Lipolyse aus Fettgewebsspeichern beschleunigt und erweiterte Speicher mobilisiert (Randle et al. 1998).

Unter normalen Bedingungen hemmt Insulin die Lipolyse im Fettgewebe, bei einer vorherrschenden Resistenz ist Insulin aber nicht in der Lage den Abbau zu unterdrücken; daraus resultiert eine erhöhte Freisetzung von freien Fettsäuren (FFA) ins Blut (Eckel et al. 2005). Die nun im Plasma zirkulierenden FFA haben im Stoffwechsel eine strenge Assoziation mit Insulinresistenz, Diabetes, Dyslipidämie und kardiovaskulären Erkrankungen. Die intrazelluläre Anreicherung von Stoffwechselprodukten der Fettsäuren stimuliert die Produktion von Entzündungsproteinen, welche dann die Insulinresistenz verstärken und vaskulär artherosklerotische Veränderungen induzieren (Mittendorfer et al. 2009).

Das weiße Fettgewebe agiert als ein endokrines Organ und produziert zahlreiche sekretorische Substanzen, die sogenannten Adipokine (Synonym Adipozytokine) (Haider et al. 2006). Zu ihnen zählt auch Visfatin, von dem man annimmt, dass es vielfältige Funktionen bei pathologischen und physiologischen Prozessen übernimmt, sowie bei der Regulation von Immunität und Entzündungsvorgängen eine Rolle spielt (Fukuhara et al. 2005, Saddi-Rosa et al. 2010).

1.2 Visfatin und die Bedeutung im Stoffwechsel

Visfatin ist ein 52 kDA schweres Molekül (Fukuhara et al. 2005) und wurde initial als Pre-B-Cell-Enhancing Factor (PBEF) bezeichnet, da es in Knochenmarkszellen synthetisiert und an Reifungsprozessen der B-Zellen in Anwesenheit von Interleukin 7 (IL-7) beteiligt ist (Samal et al. 1994). Weiterhin ist es unter dem Namen Nicotinamidphosphoribosyltransferase (NAMPT) bekannt, da es als Zytokin isoliert und aufgrund der enzymatischen Eigenschaften so betitelt wurde (Revollo et al. 2004). Der Name Visfatin entstand, weil die größte Freisetzung des Proteins aus viszeralen Fettzellen stattfindet (Fukuhara et al. 2005).

Nach Entschlüsselung der kristallinen Struktur wurde deutlich, dass es sich bei Visfatin um ein Homodimer mit zwei identischen Untereinheiten handelt und der Tertiärstruktur von

NAMPT ähnelt. Es konnte gezeigt werden, dass Visfatin in die Biosynthese von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) involviert ist (Revollo et al. 2007). NAD spielt in zahlreichen Stoffwechselreaktionen des menschlichen Organismus (Belenky et al. 2007), sowie in der Regulation von Transkriptionsfaktoren eine bedeutende Rolle (Denu et al. 2003). Eine extrazelluläre Form von Visfatin (eNAMPT) wird von Adipozyten produziert und weist eine stabile Biosyntheseaktivität von NAD auf, die höher als bei der intrazellulären Form ist. Es zeigt somit Eigenschaften sowohl eines extra- als auch eines intrazellulären Enzyms. Eine Hemmung des Visfatinstoffwechsels führt zu Defekten in der NAD Synthese und zu einer herabgesetzten glukosestimulierten Insulinfreigabe der β -Zellen des Pankreas. Sobald dieses System gestört wird, kann es zu Fehlfunktionen der insulinbildenden Zellen kommen, mit anschließend verändertem Glukosespiegel (Revollo et al. 2007).

Das aus 491 Aminosäuren aufgebaute Visfatin zeigte in Studien an Zellkulturen und Tierexperimenten eine hohe Affinität zum Insulinrezeptor und löste ähnliche Effekte wie das Peptidhormon Insulin selbst aus (Chen et al. 2006). Es bewirkte eine intrazelluläre Phosphorylierung mit anschließender Aktivierung der Signalmoleküle und Erniedrigung des Blutglukosespiegels (Luk et al. 2008). Die Moleküle konkurrierten jedoch nicht um eine Bindungsstelle, da sie sich unabhängig voneinander an unterschiedliche Bereiche des Rezeptors anlagerten und von verschiedenen Regionen erkannt wurden (Fukuhara et al. 2005) (Abbildung 1).

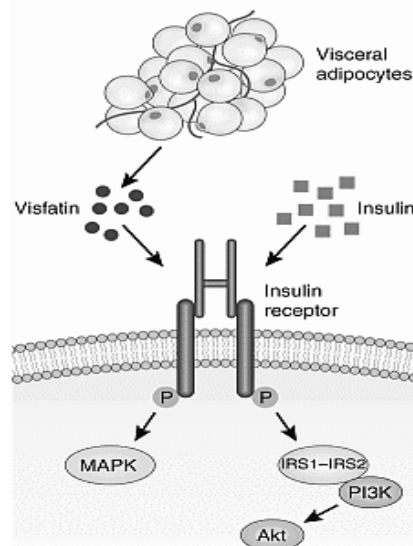


Abbildung 1 Visfatin bindet an einer separaten Stelle des Insulinrezeptors und aktiviert eine Signalkaskade (Murphy et al. 2006)

Die höchsten Konzentrationen an Visfatin werden im viszeralen Fettgewebe gemessen, wo das Protein eine verminderte Aufnahme von Insulin in die Fettzellen bewirkt. In der Leber wird eine reduzierte Freisetzung von Glukose aus Leberzellen erzielt. Zusätzlich begünstigt Visfatin die Speicherung von TAG in Adipozyten und stimuliert die Lipogenese (Kaminska et al. 2010). Seitdem bekannt ist, dass Visfatin eine Rolle in der Regulation des Glukosestoffwechsels spielt, wird angenommen, dass veränderte Konzentrationen des Proteins sich auf Glukose- und Insulinspiegel im Blut auswirken.

Durch exogen zugeführte Glukoseinfusionen erhöhten sich bei Studienprobanden sowohl die Insulin-, als auch die Visfatinkonzentrationen. Die Sekretion von Visfatin aus Adipozyten war abhängig von der Stärke, sowie Dauer der Glukoseeinwirkung (Haider et al. 2006).

Bei Studien an übergewichtigen Kindern konnte jedoch ein höherer Visfatinspiegel als bei Schlanken festgestellt werden; hier spielte zusätzlich das Alter eine bedeutende Rolle. Die höchsten Werte des Moleküls konnten in der Pubertät (11-16 Jahre) verzeichnet werden. In dieser Versuchsreihe wurde demonstriert, dass Visfatin vorwiegend bei entspannter und anstrengungsfreier Tätigkeit aus den Adipozyten freigesetzt wurde. Die Konzentrationen wurden nicht durch Hyperinsulinämie beeinflusst, allerdings erhöhten sich diese wesentlich durch Hyperglykämie (Haider et al. 2006).

Eine Insulinresistenz bei adipösen Probanden war ebenfalls mit erhöhten Visfatin Plasmaspiegeln assoziiert. Auch bei dem Krankheitsbild des Diabetes mellitus Typ II (T2DM), mit den charakteristischen Begleitsymptomen Insulinresistenz und Beta-Zell Dysfunktion, wurden veränderte Werte dieses Proteins im Serum festgestellt. Allerdings wurden widersprüchliche Befunde bezüglich des Zusammenhangs von Visfatinkonzentrationen mit T2DM beschrieben: einige Autoren gaben an, dass niedrige Werte des Proteins im Zusammenhang mit Diabetes stehen (Schindler et al. 2012, Gunduz et al. 2011, Akbarzadeh et al. 2012, Li et al. 2006). Andere wiederum sahen eine Erhöhung der Visfatinkonzentration im Blut bei an T2DM erkrankten Personen (Uslu et al. 2012, Chen et al. 2006, Haider et al. 2006, Dogru et al. 2007, Sandeep et al. 2007). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang mit Insulinkonzentrationen, die bei Diabetikern stark differieren können: in fortgeschrittenen Stadien bestehen eher niedrige, in früheren Stadien eher hohe Insulinkonzentrationen.

Humane Makrophagen (CD 14+ positive Zellen), die sich überwiegend im Fettgewebe übergewichtiger Personen befinden, produzieren eine signifikante Menge an Visfatin (Curat et al. 2006). Insgesamt konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Visfatin stark

erhöhte Plasmawerte bei Adipositas aufweist (Lopez-Bermejo et al. 2005, Haider et al. 2006, Chang et al. 2011, Sun et al. 2007). Zusammenhänge mit weiteren metabolischen Parametern wie Gesamtcholesterin (de Luis et al. 2013, Miazgowsky et al. 2013), LDL/HDL-Cholesterin (Miazgowsky et al. 2013, Esteghamati et al. 2012), sowie die genannte Assoziation mit einer Insulinresistenz (HOMA-IR), sowie Waist to hip ratio (WHR), Body Mass Index (BMI) oder Triglyceriden als wesentliche Faktoren des MetS konnten beobachtet werden (Miazgowsky et al. 2013, Esteghamati et al. 2012, Krzystek-Korpacka et al. 2011, Reda et al. 2011, Sun et al. 2007).

Ein weiterer Parameter des MetS ist ein erhöhter Blutdruck von höher oder gleich 130 mmHg systolisch und höher als 85 mmHg diastolisch. Hier zeigten verschiedene Autoren (Haider et al. 2006, Dogru et al. 2007, Hosseinzadeh Atar et al. 2012), dass es keine Beziehung zwischen Visfatingonzentrationen und Blutdruckwerten gibt. Gunes et al. hingegen vermuten einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Komponenten: In dieser Studie zeigte sich, dass die Visfatingpiegel bei übergewichtigen Personen mit Bluthochdruck wesentlich höher ausfielen (Gunes et al. 2012). Ebenso bei der nicht-alkoholischen Lebererkrankung (Non alcoholic fatty liver disease, NAFLD) wurde eine gesteigerte Produktion von Visfatin festgestellt. Es konnte in dieser Studie allerdings kein Zusammenhang zu BMI, Nüchternblutglukose-, Nüchterninsulin oder Nüchterntriglyceriden aufgezeigt werden (Dahl et al. 2010). Es wird somit deutlich, dass die Rolle von Visfatin im menschlichen Stoffwechsel immer noch unzureichend geklärt ist und zudem kontrovers diskutiert wird. Die Frage, die sich aus den beschriebenen Wirkmechanismen des Hormons und den Studien ergibt ist, ob es sich bei Visfatin überhaupt um ein Adipozytokin handelt: Die Aminosäuresequenz des Visfatin enthält eigentlich keine Signalsequenz und ist vorwiegend im Zellkern und Zytoplasma der Adipozyten vorzufinden (Okuno et al. 2011). Zusätzlich erzielt Visfatin seine Effekte im extrazellulären Plasma wie ein Fettgewebshormon, welches jedoch nicht über Sezernierung, sondern durch Zellyse dorthin gelangt (Rongvaux et al. 2002). Sicher ist allerdings, dass Visfatin und Insulin in ihren Wirkungsmechanismen und Effekten Ähnlichkeiten aufweisen (Fukuhara et al. 2005).

1.3 Genetische Varianz im Visfatingen

Viele Studienergebnisse der letzten Jahre veranschaulichen, dass Visfatin ein bedeutsamer Marker im Zusammenhang mit dem MetS ist (Kralisch et al. 2005). Daraufhin stellte sich

auch die Frage, ob genetische Veränderungen im Visfatingen mit Stoffwechselfparametern assoziiert sein können.

Das Visfatingen ist auf dem langen Arm des Chromosom 7q22.2 lokalisiert, erstreckt sich über 34.7 kb und besteht aus 11 Exons und 10 Introns (Tokunaga et al. 2008). Zusätzlich sind drei unterschiedliche mRNA Isoformen verzeichnet, mit 2.0, 2.4 und 4.0 kb Länge, jedoch beinhaltet nur die 2.4 kb Isoform die dominante Region für die Transkription (Luk et al. 2008). Ein alternatives Splicing von Exons oder unterschiedliche Polyadenylierung des 3' Ende bei posttranskriptionalen Modifikationen könnten die Variantenvielfalt der mRNA erklären (Samal et al. 1994).

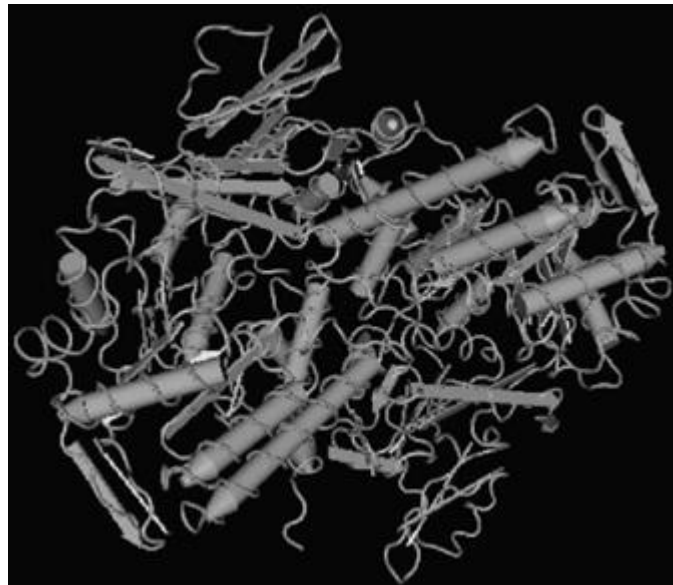


Abbildung 2 Kristalline Struktur von Visfatin (Wang et al. 2000)

Die DNA Sequenz weist etwa alle 1000 Basenpaare kleinste Unterschiede auf, die durch sogenannte Single Nucleotide Polymorphismen (SNP, Punktmutationen) zustande kommen und somit die erhebliche genetische Variabilität des menschlichen Genoms ausmacht. Es gibt Millionen dieser SNP, aber nur ein Teil ist für die Entstehung von Krankheiten entscheidend (Freudenberg et al. 2002). Seit es das HapMapProjekt gibt und diese Millionen SNP identifiziert wurden und somit unter anderem für Assoziationsstudien zur Verfügung stehen, können Erkrankungen mit genetischem Hintergrund besser untersucht werden (Kwok et al. 2003). Das Hapmap Projekt ist ein Zusammenschluss von Forschern unterschiedlicher Länder, das der Identifikation von Genen dient, die Einfluss auf die menschliche Gesundheit,

Krankheiten und Reaktion auf Medikamente ausüben. Das Ziel dieses Projektes ist eine Darstellung des menschlichen Genoms mit Entschlüsselung der chromosomalen Regionen (www.hapmap.org)

Die Beeinflussung von Stoffwechselfparametern durch genetische Variationen im Visfatingen konnte bereits in mehreren unabhängigen Studien gezeigt werden. Blakemore et al. untersuchten mehrere Visfatin SNP bei Übergewichtigen, Patienten mit T2DM und einer Kontrollgruppe. Ein SNP rs10487818, lokalisiert auf Intron 4, zeigte eine Assoziation mit schwerer Adipositas bei den Trägern des seltenen Allels (A/A vs. A/T+T/T $p=0,0006$) (Blakemore et al. 2009). Der SNP mit der Codierung -1535T/C, der sich in der Promoterregion befindet, wurde von Tokunaga et al. untersucht und es konnte festgestellt werden, dass die seltene Variante (T/T) mit niedrigeren Triglyceridwerten, sowie höheren Cholesterinwerten in einer japanischen nichtdiabetischen Kohorte assoziiert war ($p=0,05$). Da es sich hier um widersprüchliche Befunde handelt, ist es fraglich, ob dieser SNP eine tatsächliche funktionelle Veränderung des Gens indiziert. Weitere untersuchte SNP in Exon 2 und 7 zeigten keine Auffälligkeiten in dieser Untersuchung (Tokunaga et al. 2008).

Zhang et al. zeigten, dass bei T2DM Patienten im Vergleich zu einer nichtdiabetischen Kontrollgruppe der SNP -948C>A bei Diabetikern häufiger vorkommt ($p=0,02$). Zusätzlich fielen erhöhte Plasmawerte von Fibrinogen ($p=0,002$) und C-reaktivem Protein ($p=0,004$) auf. Es konnte allerdings keine Assoziation zu BMI, Waist to Hip, Ratio (WHR) und Insulinwerten festgestellt werden. Als Fazit dieser Studie geben die Autoren an, dass das Visfatingen eine Rolle im metabolischen Kreislauf und im Entzündungsgeschehen haben könnte (Zhang et al. 2006).

In einer weiteren Studie wurden die Beziehungen von Varianten im Visfatingen zum Lipid- und Glukosemetabolismus und die Effekte auf einen Gewichtsverlust im Rahmen eines Gewichtsreduktionsprogramms untersucht. Hierzu wurden 88 übergewichtige Kinder und Erwachsene ausgewählt. Bei den homozygot häufigen Trägern (G/G) des Polymorphismus rs4730153, lokalisiert in der Intronregion, konnte eine höhere Insulinsensitivität nachgewiesen werden, bei gleichzeitiger Reduzierung der Triglyceridwerte (Lai et al. 2012). Bereits 2008 wurde in einer Studie von Johansson et al. deutlich, dass die untersuchten SNP, darunter auch rs4730153 und G-948T, bei Personen mit Adipositas mit erhöhten HDL- Cholesterin Spiegeln einher gehen ($p=0,02$) (Johansson et al. 2008). Eine 2007 veröffentlichte Studie von Körner et al. bei übergewichtigen Schulkindern zeigte, dass bei den SNP rs9770242, rs4730153 und -948G>T keine Assoziation mit BMI, WHR, veränderten Glukose- oder Lipidstoffwechsel

beobachtet werden konnte. Allerdings fiel hier ein Zusammenhang mit einem erhöhten diastolischen Blutdruck mit den Polymorphismen auf ($p=0,05$) (Körner et al. 2007). Auch weitere Autoren haben sich mit dem Polymorphismus rs9770242 beschäftigt. Bailey et al. untersuchten in einer kanadischen Population (Quebec Family Study) insgesamt 11 SNP in der Intronregion, Promoterregion und in 3' Region und Exon 7. Darunter zeigten Personen mit den SNP rs9770242 und rs1319501 niedrigere Nüchtern glukose- ($p=0,02$) und Nüchterninsulinwerte ($p=0,003$). Eine weitere Mutation rs7789066 wurde in Verbindung mit höheren Konzentrationen der Apolipoprotein B Komponente des LDL- Cholesterins gebracht ($p=0,01$) (Bailey et al. 2006). Zwei der SNP wurden später auch von Carrero et al. untersucht. Die Autoren dieser Studie zeigten bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, die sich in Dialysebehandlung befanden, dass die SNP rs1319501 und rs9770242 mit erhöhten Visfatinplasmaspiegeln, sowie tendenziell einer Erhöhung der Appetitlosigkeit einhergehen ($p=0,05$) (Carrero et al. 2009).

Insgesamt gibt es demnach Hinweise darauf, dass Punktmutationen im Visfatingen Stoffwechselfparameter sowohl positiv, als auch negativ beeinflussen, daher ist davon auszugehen, dass einige SNP mit einem Funktionsverlust und andere mit einer Verstärkung der Genexpression und Proteinexpression einhergehen („gain and loss of function“).

1.4 Kandidatengenansatz und Assoziationsstudien

Analysen die dazu dienen, die Pathophysiologie einer Erkrankung in einem Gen zu identifizieren werden Kandidatengenuntersuchungen genannt (Kwok et al. 2003). Speziell die Assoziationsstudien sind die am häufigsten durchgeführten Studien in Bezug auf häufige, polygenetische Erkrankungen. Die meisten genetischen Assoziationsanalysen basieren auf einer einzelnen SNP Analyse im Kandidatengenansatz, bei dem bestimmte Gene aufgrund ihrer möglichen Funktion in einem pathophysiologischen Prozess ausgewählt werden (Balding et al. 2006). Diese Analysen untersuchen nur den Zusammenhang eines einzelnen SNP mit dem Phänotyp und werden bei sogenannten genome-wide association studies (GWAS) kombiniert untersucht, ohne dass hier eine funktionelle Überlegung zur Auswahl der SNP führt. Bei Erforschung von komplexen Erkrankungen stellt es sich allerdings als schwierig dar, nur mit dieser einzelnen SNP-Analyse zu arbeiten, da diese in der Regel polygenetische Erkrankungen darstellen.

1.5 Aufgabenstellung

Unter dem Aspekt, dass für Visfatin ein Einfluss auf die Regulation des Glucose- und Lipidstoffwechsels angenommen wird, soll untersucht werden, ob genetische Variationen im Visfatingen mit Parametern des MetS assoziiert sind.

In der vorliegenden Arbeit sollen putative Assoziationen zwischen Visfatin SNP bzw. Haplotypen und Parametern des MetS in einer prospektiven Kohorte von Männern mittleren Alters (Metabolic Intervention Cohort Kiel, MICK) untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Probandenrekrutierung und Beschreibung der Kohorte

Varianten im Visfatingen wurden bei Probanden aus der Metabolic Intervention Cohort Kiel genotypisiert. Diese Kohorte umfasst 755 Männer zwischen 45 und 65 Jahren aus Kiel und der näheren Umgebung. Die Rekrutierung erfolgte über das Einwohnermelderegister. Die geringe Altersspanne wurde gewählt, um den Einfluß der altersbedingten Änderung der Blutfettwerte auf die Prävalenz des MetS weitestgehend zu vermeiden. Die Studienteilnehmer wurden vor Teilnahme schriftlich und mündlich über die Untersuchung aufgeklärt. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Kiel auf ethische Unbedenklichkeit geprüft. Im Zuge der Studie wurden die Teilnehmer angehalten, standardisierte Fragen in Bezug auf ihre persönliche und familiäre Anamnese zu beantworten. Diese Fragen bezogen sich z.B. auf sportliche Aktivitäten, Konsum von Nikotin und Alkohol, Essverhalten und sozialen Stand. Es wurden Größe, Gewicht (ohne Schuhe und Jacke), Taillenumfang, Hüftumfang, Puls und Blutdruck erfasst. Zusätzlich wurden Stoffwechselfparameter (Cholinesterase, GGT, GOT, GPT, HDL, LDL, Gesamtcholesterin, CRP, Hämatokrit, Hämoglobin, Erythrozytenzahl, MCV, MCH, MCHC, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl und Kreatinin), sowie nüchtern Insulin-, Triglyzerid- und Glucosewerte erfasst. Blutproben für die DNA-Extraktion wurden in EDTA-Monovetten bei -20°C gelagert. Die oben genannten Untersuchungen wurden ergänzend zu den beiden, weiter unten beschriebenen, postprandialen Tests bei 755 beteiligten Teilnehmern durchgeführt.

2.1.2 Ein- und Ausschlußkriterien für die Studie

Einschlusskriterium für die Studie waren männliches Geschlecht und ein Alter zwischen 45 und 65 Jahren. Die Probanden wurden über das Melderegister der Stadt Kiel kontaktiert und in einer Informationsveranstaltung über das Projekt informiert. Zu einem Ausschluß von der Studie führten eine unbehandelte Hypo- oder Hyperthyreose, höhergradige Niereninsuffizienz, Cholestase, eine vorliegende Hepatitis oder andere chronische Lebererkrankungen. Weiterhin zum Ausschluß führte ein bekannter Diabetes mellitus Typ I oder II und das Vorliegen einer Erkrankung, die Nährstoffresorption, Verdauungsfunktion, Verstoffwechslung oder Ausscheidung beeinflusst.

Eine Operation des Intestinaltraktes oder eine Kortikosteroidbehandlung, welche weniger als drei Monate zurücklagen, führten ebenso zu einem Ausschluß, wie die Einnahme von Medikamenten, die den Lipidstoffwechsel beeinflussen, eine bestehende Alkoholabhängigkeit oder exzessiver chronischer Alkoholkonsum, eine Anämie mit einer Hämoglobinkonzentration von weniger als 12 g/dl oder ein Krebsleiden.

2.1.3 oraler Glukose Toleranztest (oGTT)

Die Probanden wurden im Zuge der Studie zunächst einem oralen Glucose-Toleranz-Test (oGTT) unterzogen. Dieser ermöglicht sowohl die Schätzung der Insulinsensitivität –und resistenz nach HOMA, als auch die Diagnose eines Diabetes mellitus und einer gestörten Glucosetoleranz.

Hierzu wurde dem Probanden 75 g Glucose, die in 250 ml Wasser aufgelöst war, innerhalb von fünf Minuten verabreicht. Nach einer halben, einer, zwei, drei und vier Stunden wurde die Insulin- und Glucosekonzentration nach Blutentnahme im Plasma bestimmt.

2.1.4 oraler Metabolischer Toleranztest (oMTT)

Dieser standardisierte orale metabolische Toleranztest (oMTT) dient der Erstellung eines Profils für den Verlauf der Blutkonzentration von Triglyzeriden, Glucose und Insulin nach Verzehr einer Testmahlzeit. Die Testmahlzeit besteht aus einer standardisierten, gemischten Flüssignahrung, die Makronährstoffe entsprechend einer „western diet“ enthält (Fett 51,6 kcal% [vorwiegend gesättigt], Kohlenhydrate 29,6 kcal% und Protein 11,9 kcal%). Blutproben wurden nach einer halben, einer, zwei, drei, vier und fünf Stunden zur

Bestimmung von Insulin, Glucose und TG entnommen. Zur Bestimmung der Triglyzeridwerte wurden Blutproben stündlich bis zur neunten Stunde entnommen.

2.1.4 Auswahl der Visfatin SNP

Die Auswahl der zu untersuchenden SNP im Visfatingen erfolgte auf Basis einer Analyse des Gens mit dem Programm Haploview. Es wurden SNP ausgesucht, die über ein Linkage disequilibrium (LD) mit anderen SNP verbunden waren. Nach Methode der sogenannten „tagging SNP“ wurde eine geringstmögliche Anzahl von SNP durch das Programm vorgegeben, die durch das LD Information über alle SNP der verschiedenen Haplotypen des Gens liefern. Der LD-Block der ausgewählten SNP ist in Abbildung 3 ersichtlich. Es wurden schließlich fünf SNP ausgewählt und genotypisiert. Die Lokalisation und Allelfrequenz der SNP sind in Tabelle 1 ersichtlich. In die statistische Analyse eingehenden SNP waren rs2891846, rs10953502, rs3801272, rs6947766 und rs1319313.

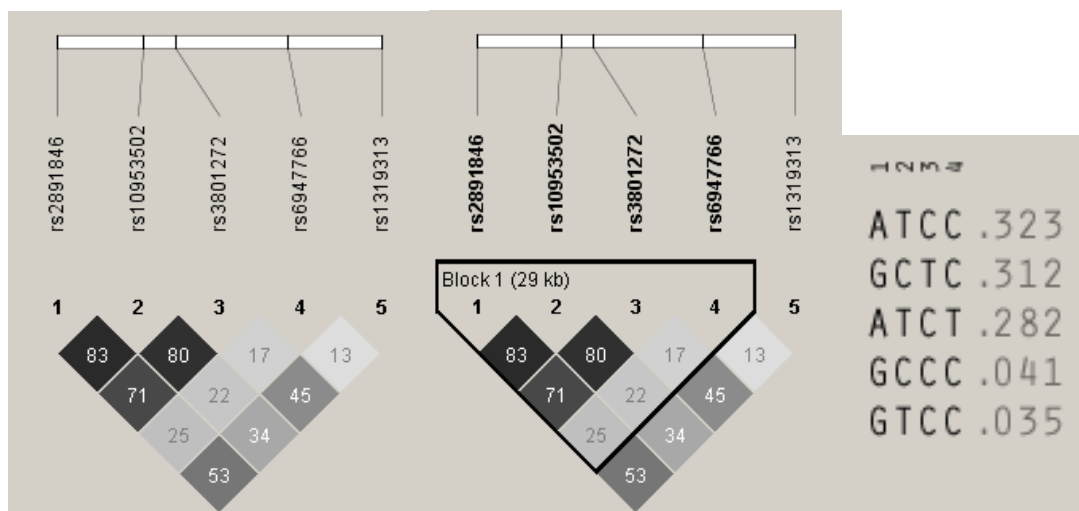


Abbildung 3 LD Block des Visfatingens mit Haploview erstellt, Europäische Population (CEU only (n=85)), r2 Werte, LD-Block Definition nach Gabriel et al.

2.2 Laborarbeiten

2.2.1 DNA-Gewinnung

Die für die Sequenzierungen benötigte genomische DNA wurde aus 10ml EDTA-Vollblut extrahiert.

Die Gewinnung der DNA wurde in sechs Schritten durchgeführt.

1. **Lyse der Blutproben:** Als erstes wurde eine 10 ml Blutprobe und 500 µl proteinaseK in ein 50 ml Röhrchen pipetiert. Es wurden dann 10 ml des Puffers BQ 1 hinzugefügt und für zehn Sekunden gevortext. Nach Mischung wurde die Probe bei 56°C für 15 Minuten inkubiert.
2. **Einstellung der DNA-Bindung:** Nach Inkubation wurde 10 ml Ethanol (96-100 %) hinzugefügt und erneut für zehn Sekunden gevortext. Dabei wurde das Lysat auf Zimmertemperatur abgekühlt.
3. **Bindung der DNA:** Für jede Aufbereitung wurde eine NucleoSpin® Blood XL Säule in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Hinzu kamen 15 ml des Lysates. Anschließend wurde für drei Minuten bei 4000 g zentrifugiert. Der Vorgang wurde mit den restlichen 15 ml des Lysates wiederholt.
4. **Waschen der Silica Membran:** Das Waschen der Membran wurde in zwei Schritten durchgeführt. Es wurden 7,5 ml des Puffers BQ 2 der NucleoSpin® BloodXL Säule hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde für zwei Minuten bei 4000 g zentrifugiert. Beim zweiten Waschgang wurden erneut 7,5 ml des BQ 2 Puffers hinzugefügt und für zehn Minuten bei 4000 g erneut zentrifugiert.
5. **Trocknung der Silica Membran:** Die Trocknung der NucleoSpin® Blood XL Säule wurde durch die Zentrifugation des zweiten Waschvorgangs durchgeführt.
6. **Herauslösung der hochreinen DNA:** Zur Lösung der DNA wurde die Säule in ein neues 50 ml Sammelröhrchen gegeben und 1000 µl vorgewärmter Lösungspuffer BE (70°C) direkt auf die Mitte der Silica Membran gegeben. Der Ansatz wurde zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach für zwei Minuten bei 4000 g zentrifugiert.

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Integrität wurde mittels Gel-Elektrophorese überprüft.

Die benötigte DNA für die Genotypisierung der Polymorphismen wurde aus 100 µl sedimentiertem Blut gewonnen.

2.2.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung folgender bekannter Polymorphismen rs2891846, rs10953592, rs3802172, rs6947766 und rs1319313 wurden mit dem TaqMan System (ABI, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die SNP befanden sich in der Intron 3'UTR Region auf Chromosom 7 (Abbildung 4).

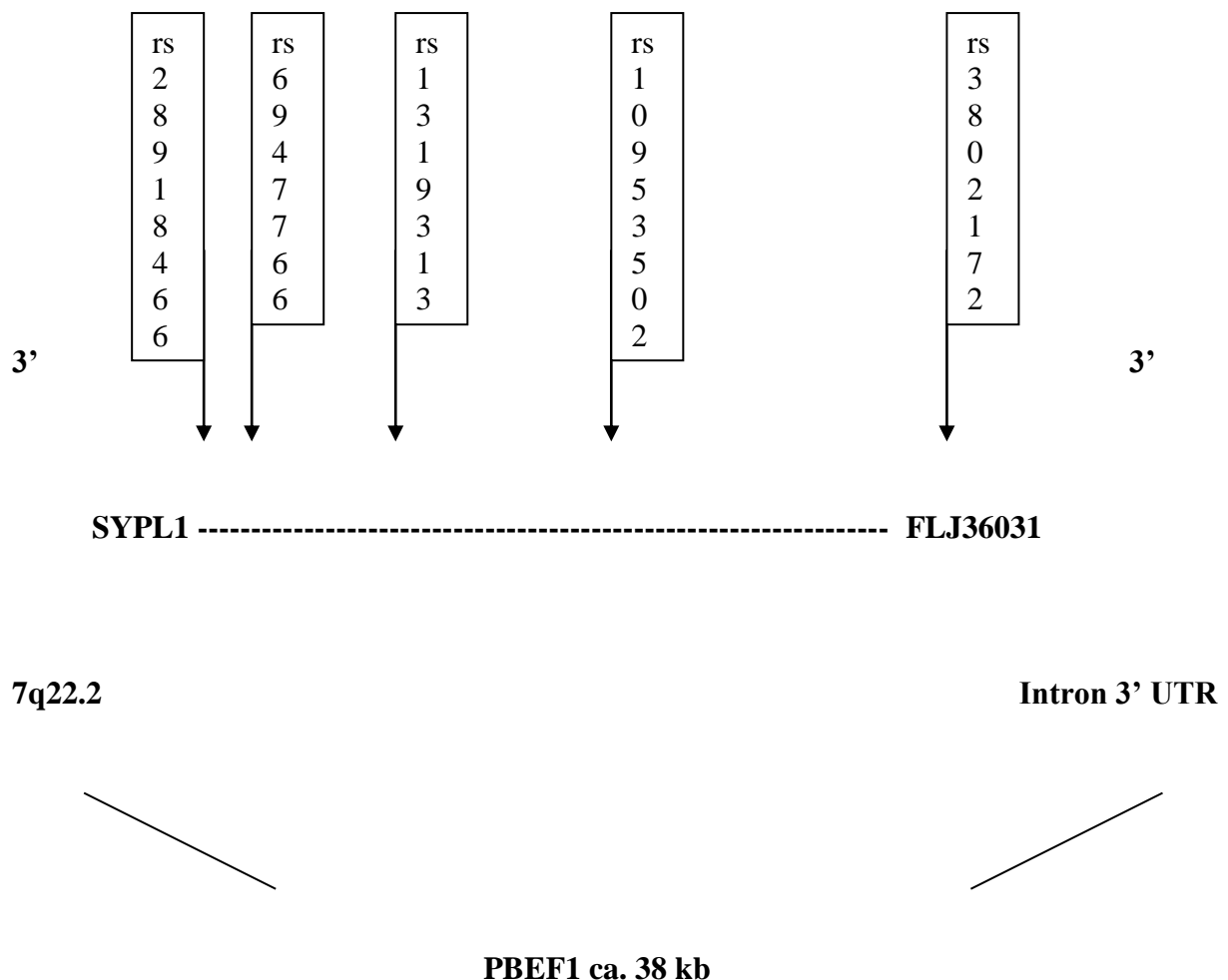


Abbildung 4 Struktur der menschlichen Visfatin Genregion und Lage der 5 SNP

Die Fluoreszenzmessungen der Sequenzen wurden mit dem ABI Prism 7900 HT durchgeführt.

Die TaqMan SNP Genotypisierung ist eine PCR-basierte Methode zur Alleldiskriminierung von SNP. Zur Genotypisierung wurde aus den eingefrorenen Blutproben (10ml EDTA-Vollblut) mittels NucleoSpin® Blood XL-Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG D-52355 Düren) die DNA nach Herstellerangaben extrahiert. Prinzipiell funktioniert die Genotypisierung mit der TaqMan-Methode im Sinne einer Real-Time-PCR. Dabei wird der Teil, in dem der SNP liegt, bzw. vermutet wird, mit Hilfe eines Primerpaares amplifiziert. Zusätzlich werden zwei Oligonukleotidsonden eingesetzt, die spezifisch an der Stelle des Polymorphismus ansetzen, jeweils spezifisch für die unterschiedlichen Allele. An den 5'-Enden der Sonden befinden sich fluoreszierende Reporterfarbstoffe (6-FAM und VIC), zusätzlich sind die beiden Sonden an ihrem 3'-Ende mit einem Quencher markiert. Der Quencher unterdrückt den angeregten Reporterfarbstoff.

Während der Amplifikation der DNA Fragmente hybridisiert die TaqMan-Sonde vollständig an den DNA-Strang. Ist die Sonde vollständig an den DNA-Strang hybridisiert, wird diese durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut, wodurch der Quencher vom Reporterfarbstoff entfernt und die Fluoreszenz nicht mehr unterdrückt wird. Hybridisiert die Sonde nicht vollständig an den DNA-Strang, so wird die Sonde durch die Taq-Polymerase nur verdrängt, ohne dass eine Fluoreszenz entsteht. Nach Beendigung der PCR-Reaktion wird die vorhandene Fluoreszenz mit Hilfe eines Detektors gemessen.

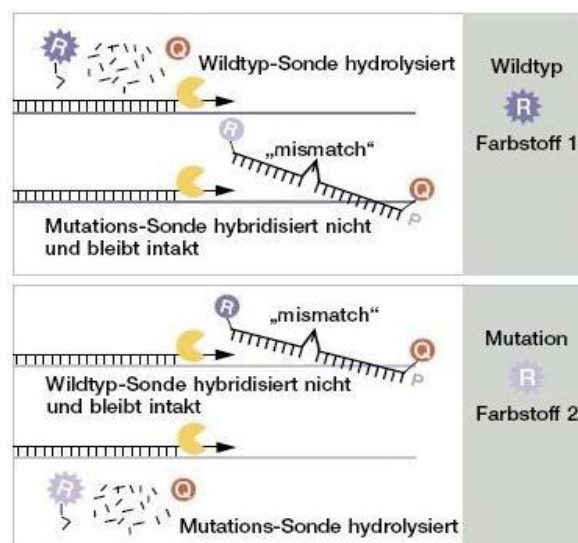


Abbildung 5 TaqMan Assay, schematische Darstellung des Funktionsprinzips, (www.dzmf.de)

2.3 Haplotypenanalyse

Haplotypen sind SNP Kombinationen, bei denen es sich um abgegrenzte Gruppen von miteinander assoziierten SNP handelt. Um verschiedene Haplotypen vergleichen zu können, verwendet man einen speziellen Test, die sogenannte LD Analyse. Bei dieser Analyse wird ermittelt, ob die zu untersuchenden SNP in Testpopulationen LD-Blöcke bilden. Wenn SNP sich in dem gleichen LD-Block befinden, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Assoziation vor.

LD bedeutet „Kopplungsungleichgewicht“ und beschreibt eine statistische Assoziation von SNP, die sich an verschiedenen Chromosomenorten befinden (Weiss et al. 2002).

Durch die Haplotypenanalyse kann man somit eine genetische Kartierung von Haplotypen und auch Genen erstellen, die in der Genese verschiedener Krankheiten eine Rolle spielen können (siehe auch Internationales HapMap Projekt: www.hapmap.org).

Die Analyse in dieser Studie erfolgte mit der UNPHASED 3.1.6. Software für genetische Assoziationsstudien, sowie mit dem Programm R-Paket haplo.stat, dass auf den Artikel von Schaid et al. 2002 basiert. UNPHASED ist ein Programm, mit dem von einem bestimmten Haplotypenblock die Frequenzen der Haplotypen mittels sogenannter expectation-maximization Algorithmen geschätzt werden. Es ermöglicht die kombinierte Analyse von Familienmitgliedern oder unabhängigen Individuen und kann die statistische Aussage erhöhen. UNPHASED analysiert getrennt voneinander die Allelfrequenz der getesteten Personen und Kontrollpersonen und berechnet die Odds Ratio (OR), das 95% Konfidenzintervall (CI) und die P-Value (Stephens et al. 2001)

Unsere erhobenen Datenmengen wurden mit dem Shapiro- Wilk Tests auf Normalverteilung überprüft, sowie dichotomisiert und anschließend von den Softwareprogrammen mit den einzelnen Haplotypen vereint. Es konnten 7 Haplotypen sequenziert werden, die dann zusammen mit den metabolischen Parametern getestet wurden (siehe 3.2.). Da die stetigen Merkmale Abweichungen von der Normalverteilung zeigten, wurden einige Daten für die Haplotypenanalyse am Median in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Haplotypenfrequenzen in diesen beiden Gruppen wurden dann zuerst mit UNPHASED 3.1.6. geschätzt und daraufhin mit Hilfe von Likelihood- Ratio- Tests verglichen.

2.4 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistics Package for the Social Sciences (SPSS) 18 berechnet. Die Allel- und Genotypfrequenzen wurden durch Genzählung ermittelt. Die Studienpopulation wurde auf die Verteilung von Genotypen in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht χ^2 getestet. Um den Einfluss von Polymorphismen des Visfatin Gens auf das metabolisches Syndrom, Hypertonie und Diabetes als Ordinalparameter abzuschätzen, wurden die Odds Ratios mit 95% Konfidenzintervall berechnet. Der Zusammenhang zwischen den SNP und stetigen Parametern wie Insulin-, Glucose- und Triglyzeridkonzentrationen wurde bei normalverteilten Parametern mit dem Student t-Test bewertet, nicht normalverteilte Parameter wurden vor der Berechnung logarithmiert um eine Normalverteilung zu erreichen. Die Verteilung der stetigen Variablen wurden als Mittelwert \pm Standardfehler ausgedrückt. Die Variablen, die nicht in einer Normalverteilung vorlagen, wurden vor der Analyse logarithmisch transformiert, die entsprechenden Ergebnisse wurden als geometrischer Mittelwert mit Standardfehlerintervall dargestellt. Ein nomineller p-Wert von <0.05 wurde als statistisch signifikant angenommen. Zur Anpassung des Signifikanzniveaus haben wir bei den signifikanten Ergebnissen der Haplotypenanalyse eine Bonferroni-Holm Korrektur (Alphaniveau 5%) für multiples Testen durchgeführt.

Das Homeostasis Model Assessment-IR (HOMA-IR) ist ein Maß für die Insulinresistenz. Es wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{HOMA-IR} = \text{Nüchterninsulin } (\mu\text{U/ml}) \times \text{Nüchternglucose } (\text{mg/dl}) / 405$$

Das Homeostasis Model Assessment- β cell (HOMA- β cell) ist ein Maß für die Insulinsensitivität. Es wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{HOMA-}\beta\text{cell} = 360 \times \text{Insulin } (\mu\text{U/ml}) / \text{Glucose } (\text{mg/dl}) - 63$$

Die „Area under the curve“ (AUC) ist ein Parameter zur Beurteilung von Reihenmessungen, deren Verlauf als Summe der Einzelbruttoflächen zusammengefasst wird.

Die AUC wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{AUC} = [x_i + x_{i+1}] / 2 \times [t_{i+1} - t_i]$$

AUC = Bruttofläche des untersuchten Parameters jedes Probanden

x_i = Einzelwert

x_{i+1} = auf x_i folgender Einzelwert

t_i = Entnahmezeitpunkt

t_{i+1} = auf t_i folgender Entnahmezeitpunkt

2.5 Material

2.5.1 Verbrauchsmaterial

- Sarstedt-Monovette® 9ml Kalium-EDTA Art.: 02.1066.001 (04.1901) (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland)
- Sarstedt-Monovette® 2,6ml Fluorid-EDTA Art.: 04.1903 (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland)
- Sarstedt-Monovette® 4,7ml Z-Gel Art.: 03.1524 (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland)
- Taq-Polymerase 5 u/µl Rapidozym, Promega
- Vasofix® Braunüle 178G/1¾“ Art.: 4268130B (Braun Melsungen AG, Deutschland)
- NucleoSpin® Blood XL-Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland)
- E.Z.N.A.® Blood DNA MiniKits (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland)
- Taq DNA Polymerase-Kit (recombinant) (Invitrogen Carlsbad, CA, USA)
- Molecular Biology Grade Agarose der Packungsgröße 500g Ref.#: EP-0010-05 (Eurogentec, Serating, Belgien)
- 10x PCR-Puffer Rapidozym, Promega

2.5.2 Geräte

- Zentrifuge: Megafuge 1.OR Bj. 1991 Fabrik-No.: 176125 (Heraeus Sepatech, Deutschland)
- Kolbenhubpipetten 200-1000µl (Eppendorf, Gilson)
- Thermocycler Typ T1 Thermoblock für die DNA-Amplifizierung (Whatman Biometra GmbH i. L., Göttingen, Deutschland)
- ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- ABI 3700 capillary DNA Sequenzierer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- TaqMan System (ABI, Foster City, CA, USA)
- R-Paket haplo.stat
- UNPHASED 3.1.6. Software

3 Ergebnisse

3.1 Einzelanalyse der Single Nucleotide Polymorphismen im Visfatingen

Die Genotypisierung und folgenden Datenauswertung konnte in der MICK bei 712 Von 755 Männern erfolgreich durchgeführt werden. Es wurden nach Genotypisierung für die Polymorphismen folgende Frequenzen des seltenen Allels (MAF) ermittelt: rs28918466: 0,42; rs10953502: 0,41; rs3802172: 0,37; rs6947766: 0,24 und rs1319313: 0,27 (Tabelle 1).

Vor der Haplotypenanalyse und Auswertung wurden die zu testenden metabolischen Parameter ausgewählt. Hierzu gehören: LDL- Cholesterin, HDL- Cholesterin, Triglyceride nüchtern (TG) und TG- Anstieg nach oMTT, systolischer- und diastolischer Blutdruck (Hypertonie ja/nein), Gesamtcholesterin, Taillenumfang, Insulinsensitivität (HOMA_{Abcell}), Insulinresistenz (HOMA-IR), freie Fettsäuren nüchtern (FFA 0h), freie Fettsäuren postprandial (FFA AUC), Vorliegen eines Metabolischen Syndroms (MetS IDF/ ATP ja/nein, Diabetes mellitus ja/nein), sowie nüchtern Glukose nach oGTT (Tabelle 2,3,4).

In Tabelle 3 wird der statistische Zusammenhang der von uns untersuchten SNP zu metabolischen Parametern deutlich. Für die weitere Analyse der erhobenen und statistisch ausgewerteten Daten werden die Ergebnisse der homozygoten Träger des seltenen Allels und die heterozygoten Träger zusammengefasst und gegen die Allelträger des homozygot häufigen Typs getestet (dominantes Modell). Dieses Verfahren nutzten wir, um die Gruppen zu vergrößern und somit vorhandene statistische Effekte zu verstärken und auftretende Zufallsbefunde durch stark abweichende Einzelwerte, die bei einer kleinen Gruppengröße auftreten könnten, abzuschwächen.

rs1319313

Die homozygot seltenen und heterozygoten Allelträger (A/A+A/G) des Polymorphismus rs1319313 wiesen niedrigere GOT- Werte im Vergleich zu homozygot häufigen (G/G) Trägern auf (8,61 U/l vs. 9,03 u/l) auf, die homozygot seltenen und heterozygoten Allelträger (A/A+A/G) Werte von 8,61 U/l ($p=0,02$). Diese Unterschiede sind in Diagramm 1 dargestellt.

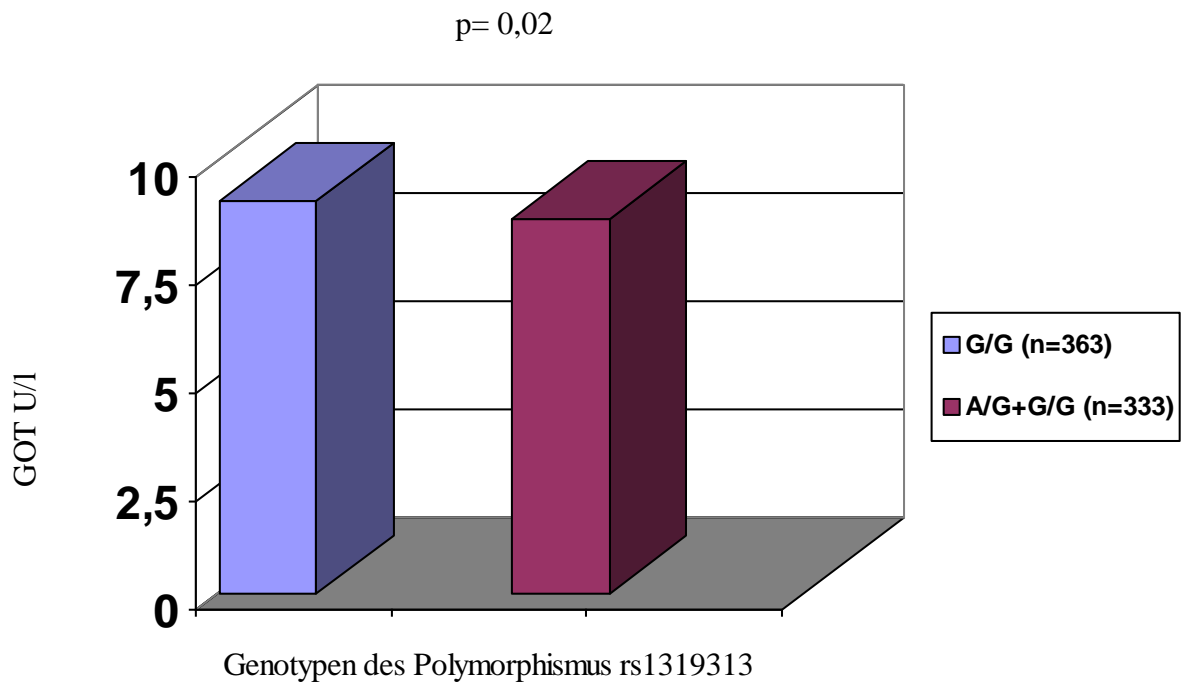


Diagramm 1 GOT- Konzentrationen der Träger des SNP rs1319313 im Vergleich zum Wildtyp

Außerdem erniedrigt gegenüber den Homozygoten des Wildtypallels, zeigten sich die Konzentrationen von Serum- Gesamtcholesterin der Träger der homozygot seltenen und heterozygoten Variante mit 222,59 mmol/l vs. 226,50 mmol/l ($p=0,02$), was in Diagramm 2 grafisch dargestellt wird.

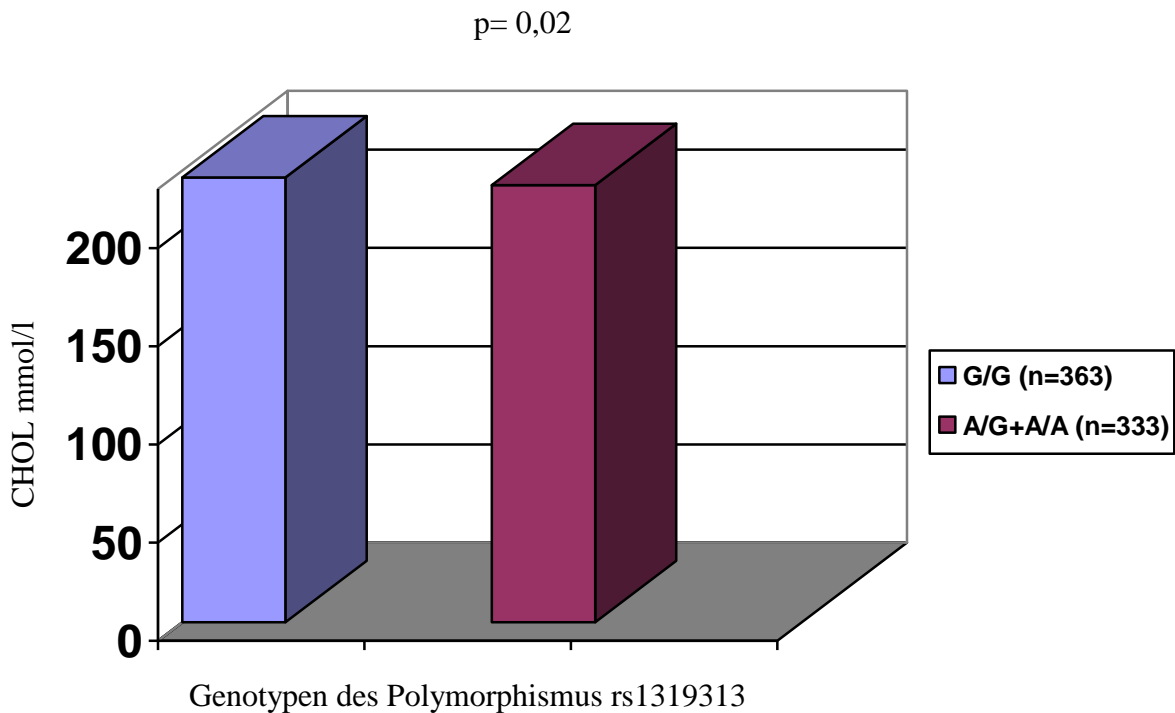


Diagramm 2 Gesamtcholesterin der Träger des SNP rs1319313 im Vergleich zum Wildtyp

Ebenso wiesen Träger dieses Polymorphismus tendenziell niedrigere LDL Konzentrationen (140,57 mg/dl) gegenüber den homozygoten Wildtypträgern auf (143,56 mg/dl) ($p=0,05$).

Die zusätzliche statistische Datenauswertung mit dem Qui- Quadrat Test ergab für die Träger des seltenen Allels eine tendenziell geringere Häufigkeit des Vorliegens eines MetS (OR 0,56; $p= 0,06$) (Tabelle 2).

rs10953502

Beim Polymorphismus rs10953502 wurde eine signifikante Erhöhung ($p=0,04$) des systolischen Blutdrucks bei den Trägern des homozygot häufigen (T/T) Allels gegenüber den des homozygot seltenen und heterozygoten (C/C+C/T) Allels festgestellt. Der Blutdruck zeigte Werte von 129,53 mmHg bei den homozygot häufigen Trägern vs. 128,46 mmHg beim Vorliegen der Mutation. Die zusätzliche statistische Auswertung mit dem Qui-Quadrat Test (Tabelle 2) zeigte bei diesem Polymorphismus keine Auffälligkeiten hinsichtlich des Risikos für MetS, Hypertonie oder Diabetes.

rs6947766

Träger des Polymorphismus rs6947766 wiesen einen geringeren diastolischen Blutdruck im Vergleich zu homozygoten Wildtypträgern auf. Träger des seltenen Allels (T/T+C/T) wiesen, verglichen mit den homozygoten Wildtypträgern (C/C), mit 81,23 mmHg vs. 79,38 mmHg höhere Werte auf ($p=0,02$). Auch dieses Ergebnis wird mit Hilfe eines Diagramms (Diagramm 3) dargestellt.

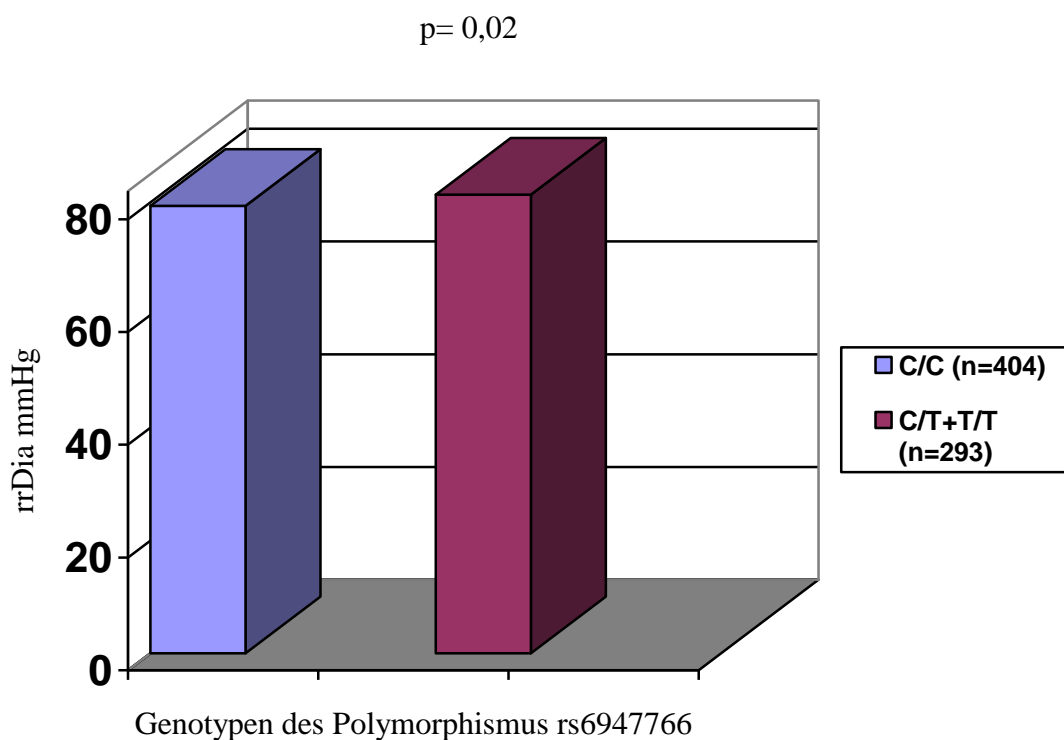


Diagramm 3 Diastolischer Blutdruck der Träger des SNP rs6947766 im Vergleich zum Wildtyp

Die Polymorphismen rs10953502 und rs3802172 zeigten eine Signifikanz zum Parameter Alter. Dieser Befund kann funktionell nicht erklärt werden und wird daher eher als Zufallsbefund gewertet. Bei den weiteren untersuchten Polymorphismen rs3802172 und rs2891846 konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Genotypen und den metabolischen Parametern oder Erkrankungen festgestellt werden (Tabelle 2,3).

3.2 Ergebnisse der Haplotypenanalyse

Signifikante Assoziationen in der Auswertung zeigten sich bei Haplotyp 3 mit der Codierung 11222 zu mehreren metabolischen Parametern. Hier konnte ein signifikanter Zusammenhang zu sieben metabolischen Parametern festgestellt werden. Diese Zusammenhänge werden jeweils in Tabelle 1.1 dargestellt.

<i>Metabolischer Parameter</i>	<i>Fall n=232 (Frequenz)</i>	<i>Kontroll n=164 (Frequenz)</i>	<i>p-Wert</i>
WHR	0.034	0.016	0.037
HDL	0.016	0.033	0.037
Taille	0.034	0.014	0.011
BMI	0.034	0.016	0.040
HOMAbcell	0.016	0.034	0.039
HOMair	0.034	0.016	0.041
OGTT Glukose	0.016	0.034	0.036

Tabelle 1 Haplotypfrequenzen des Haplotyps 11222 und Assoziationen mit metabolischen Parametern, Berechnung ohne Bonferroni- Korrektur nach Holm

Mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur nach Holm haben wir eine Anpassung des Signifikanzniveaus für multiples Testen durchgeführt. Es erfolgte eine Sortierung der p-Werte nach Größe und anschließendem Vergleich wachsender Schranken. Die kleinste Schranke ist das Niveau geteilt durch die Anzahl der Hypothesen. Für den folgenden p- Wert ist die Schranke dann das Niveau, geteilt durch die Anzahl der Hypothesen minus 1 und so fortgesetzt (minus 2, minus 3) Nach einmaligem Testen konnten die Nullhypothesen (Alpha Niveau 5%) unserer p-Werte abgelehnt werden, da die zugehörigen Schranken kleiner waren. Weitere Signifikanzen konnten beim Haplotyp 1 mit der Codierung 11121 festgestellt werden. Hier gab es eine Assoziation zur Erkrankungshäufigkeit an MetS (p=0,03) (Tabelle 7). Außerdem zeigte der Haplotyp 5 (21222) eine signifikante Risikoerhöhung mit einem p-Wert von 0,03 für Glukosestoffwechselstörungen .

Bei Haplotyp 7, codiert mit 22222, ließen sich ebenfalls Auffälligkeiten feststellen hinsichtlich der metabolischen Datenauswertung. Hier zeigte sich bei Vorhandensein des Haplotypen eine tendenzielle Assoziation zu Veränderungen des Taillenumfanges ($p=0,06$).

Der mit 22212 codierte Haplotyp 6 zeigte Assoziationen zu veränderten Triglyceridwerten ($p=0,02$) und diastolischem Blutdruck ($p=0,03$).

Die anderen Haplotypen konnten in unseren Auswertungen keine nennenswerten Ergebnisse zu den getesteten metabolischen Parametern aufweisen.

4 Diskussion

4.1 Hintergründe des Studienaufbaus

Die DNA Sequenz weist etwa alle 1000 Basenpaare einzelne Nukleotidaustausche auf, die Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) genannt werden. Diese SNP führen zu einer erheblichen genetischen Variabilität des menschlichen Genoms. Es gibt Millionen dieser SNP, aber nur ein Teil ist für die Entstehung von Krankheiten entscheidend (Chichon et al. 2002, Freudenberg et al. 2002). Im Rahmen des Humangenomprojektes wurde das menschliche Genom bis zum Jahre 2013 entschlüsselt und in der Folge Millionen von SNP identifiziert. Diese Punktmutationen stehen unter anderem für Assoziationsstudien zur Verfügung, und somit können Erkrankungen mit genetischem Hintergrund gezielter untersucht werden (Kwok et al. 2003).

Das Gen bildet zusammen mit seinem kodierenden Protein eine Einheit und ist somit für unterschiedliche Funktionen der Proteine verantwortlich. Die Genanalyse beinhaltet die gesamte Gensequenz mit den dazugehörigen regulierenden Exons und Introns (Hoehe et al. 2003). Inwieweit jedoch verschiedene Genabschnitte oder SNP die Genfunktion und Translation in Proteine beeinflussen können, ist Gegenstand intensiver Untersuchungen. Es gibt unterschiedliche Studiendesigns, um im Rahmen der genetischen Analyse den Zusammenhang mit Krankheiten zu untersuchen, die für jede Art von Fragestellung ihre Vor- oder Nachteile haben können.

Um die Signale einzelner SNP nochmals präziser bestätigt zu bekommen und eine komplette Analyse des Gens vorzunehmen, wählten wir eine Alternative zur Single-SNP Assoziationsstudie, die sogenannte Haplotypenanalyse (Schaid et al. 2004). Bei den von uns untersuchten Polymorphismen könnte es somit der Fall sein, dass nicht dieser, sondern ein im LD stehender SNP in diesem Haplotypblock für funktionelle Veränderung verantwortlich ist. Die Haplotypenanalyse liefert weitaus mehr Informationen zwischen einem Genlocus und einer möglichen Assoziation mit einer Erkrankung als die Einzel-SNP-Analyse. In der Analyse werden Untersuchungen gemacht, ob es Kombinationen von Polymorphismen auf den beiden Chromosomenabschnitten der getesteten Personen gibt, die gehäuft auftreten (Thompson et al. 2003). Werden in einem Gen mehrere Haplotypenblöcke generiert, kann damit die genetische Varianz des gesamten Gens untersucht werden. Haplotypen können aus genotypischen Datenbanken generiert werden oder experimentell aus den Daten von genetisch verwandten Familien. Zur Rekonstruktion werden Computerprogramme verwendet. Hier wird

durch aufwendige und umfangreiche Abschätzungen bestimmt, welche Haplotypen in einem untersuchten Testpool auftreten und diese einem Individuum zugeordnet. Statistische Auswertungen können Assoziationen der getesteten Haplotypen mit Erkrankungen (Phänotypen) bewerten und zusätzlich das Krankheitsrisiko ermitteln (Kwok et al. 2003).

Daly et al. (Daly et al. 2001) hat die Widersprüchlichkeit der Ergebnisse durch Assoziationsstudien dargestellt: Die Assoziationsstudien, die sich mit der Identifizierung von Krankheitsgenen beschäftigen, testen in der Regel nur einen individuellen SNP im Gen oder der Umgebung (Promoter, 3' und 5' Ende). Allerdings könnten somit durch mangelnde Informationen andere SNP aus der Region unentdeckt bleiben. Ein weiterer Einflussfaktor kann durch eine fehlerhafte Auswahl der Kontrollgruppen entstehen, in denen Variationen der Allelfrequenzen durch Unterschiede in der ethnischen Herkunft zustande kommen können (Daly et al. 2001).

Durch negative Ergebnisse würden Assoziationen ausgeschlossen werden, aber auch positive Ergebnisse sind kein direkter Hinweis für die tatsächliche Funktionalität eines codierenden SNP, sondern eher der Hinweis auf Marker im Kopplungsungleichgewicht mit einem kausalen SNP, der mehrere Gene entfernt liegen könnte. Wir haben in unserer Studie mit nicht kodierenden SNP gearbeitet, die sich alle in Intronregionen befinden. Introns sind Bereiche auf der DNA, die nicht codierend sind, und es somit nicht zu einem Aminosäureaustausch im Protein kommen kann. Man kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass ein Großteil der SNP in diesen nichtkodierenden Bereichen phänotypisch ohne Folgen bleiben und evolutionär gesehen sich neutral verhalten. Allerdings können Auswirkungen auf die Genregulation erfolgen, indem die Transkription eines Gens durch veränderte Bindungsstellen beeinflusst wird (Humeny et al 2001).

Um den Einfluss von Varianz in einem Gen auf Krankheiten zu untersuchen, muss man nicht unbedingt jeden einzelnen SNP auf seine Wertigkeit überprüfen, sondern nutzt die sogenannte Blockstruktur von SNP dafür (Freudenberg et al. 2002). Das sind Chromosomenregionen im menschlichen Genom mit geringer Haplotypenvielfalt, die durch Hotspots voneinander getrennt werden (Daly et al. 2001). Allerdings gibt es Regionen, die ein großes Kopplungsungleichgewicht aufweisen, in denen einzelne Allele von SNP nicht unabhängig voneinander existieren, wenn sie auf einem Chromosom benachbart sind. Weil es somit eine Abhängigkeit der Allele verschiedener Polymorphismen innerhalb der Blöcke gibt, ist die Variabilität der Allelkombinationen herabgesetzt (Freudenberg et al. 2002). Diese Kombinationen werden als Haplotypen bezeichnet und somit die Blockstruktur auch als Haplotypen-Blockstruktur betitelt (Johnson et al. 2001). SNP, die sich innerhalb dieses

Blockes befinden, stehen zueinander im LD und werden zumeist gemeinsam vererbt (Thompson et al. 2003). Die Kopplungsungleichgewichte erstrecken sich über ein vielfaches an Distanzen (Reich et al. 2001), somit könnte es sein, dass diese auch durch die Organisation der Blockstruktur entstehen (Daly et al. 2001). Sobald die Blockstruktur bekannt ist, kann der Aufwand bei der Suche nach krankheitsassoziierten Haplotypen maßgeblich verringert werden (Johnson et al. 2001).

Unsere Untersuchungen erfolgten an haplotype tagged SNP (htSNP). Diese werden über das 2002 gegründete International HapMap Project zur Analyse bereitgestellt. Damit ist es möglich genetische Variationen des menschlichen Erbgutes in Haplotypen zusammenzufassen. Das Projekt beinhaltet neben den Haplotypen zusätzlich auch die SNP der chromosomalen Regionen, die zur Identifizierung und Unterscheidung von den bereits vorhandenen Haplotypen dienen, die sogenannten htSNP. Diese Auswahl weist eine bessere Differenzierung von Variationen der Haplotypen innerhalb einer Population auf und definieren die häufigsten Haplotypen eines zugehörigen Blocks (Sebastiani et al. 2003). Wu et al. machen deutlich, dass es mit htSNP deutlich einfacher ist, Krankheiten genetisch herzuleiten, als die gesamte Menge an SNP zu bestimmen. Studien mit htSNP sind im Gegensatz zu Assoziationsstudien mit Einzel SNP mit einer erheblichen Kostenreduktion und weniger falsch negativen Ergebnissen verbunden (Wu et al. 2012, Thompson et al. 2003).

Um diese Assoziationen um den Faktor der multiplen Vergleiche zu korregieren, haben wir die Ergebnisse zusätzlich mit der Bonferroni Formel nach Holm auf die korregierte Signifikanz überprüft. Das Bonferroni- Verfahren ist eine klassische Methode für multiple Testsituationen. Um den Gesamtfehler nicht Alpha (Bsp. 5%) überschreiten zu lassen, teilt man das multiple Gesamtniveau durch die Anzahl aller durchgeführter Tests und vergleicht anschließend jeden p-Wert mit der kleineren Schranke. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass es sehr einfach und global anzuwenden ist. Jedoch hat es den Nachteil, dass durch grobe Abschätzung der versuchsbezogenen Irrtumswahrscheinlichkeit die Power der Tests stark reduziert wird, gerade dann, wenn die Zahl der zuvor durchgeführten Tests hoch ist und diese miteinander korrelieren (Sonnemann 1982). Ebenso ist die Methode als sehr konservativ und strikt anzusehen, da viele Ergebnisse übersehen werden können (Fisher 1935). Um die Power des Verfahrens zu steigern, kann man zusätzlich die Bonferroni- Holm- Prozedur verwenden, bei der alle p-Werte der Größe nach sortiert und darauf mit wachsenden Schranken verglichen werden (Holm 1975).

4.2 Beurteilung der Ergebnisse für die Visfatin Polymorphismen

In der vorliegenden Studie konnten verschiedene Assoziationen genetischer Varianten und Haplotypen im Visfatingen zu metabolischen Parametern hergestellt werden. Dazu wurden folgende Polymorphismen näher analysiert: rs2891846, rs10953592, rs3802172, rs6947766 und rs1319313.

Der von uns untersuchte SNP rs10953502 liegt in der Intronregion 3'UTR des Visfatingens. Der Wildtyp weist an der Stelle des beschriebenen Defektes Cytosin auf, der SNP ist durch die Base Thymin gekennzeichnet. Die Mutation weist eine Allelfrequenz von 41 % in der europäischen Bevölkerung auf. Es haben sich für diesen SNP signifikante Assoziationen zu Parametern des metabolischen Syndroms ergeben, die sich in einer signifikanten Erhöhung des systolischen Blutdrucks bei den Trägern des homozygot häufigen Allels (T/T) gegenüber des homozygot seltenen (C/C) und heterozygoten C/T Allels darstellte. In den Kohortenstudien MONICA, KORA und HIFAM wurden ebenfalls Polymorphismen im Visfatingen untersucht, darunter auch rs10953502. Hier konnten nach einer geschlechtsspezifischen Analyse, bei männlichen Patienten, die Träger des homozygot häufigen Allels sind, im Durchschnitt die höchsten HDL-Cholesterin Werte beobachtet werden. Außerdem zeigten sich, sowohl bei Männern, als auch bei Frauen, erhöhte Triglyceridwerte der homozygot häufigen Allelträger und ein erhöhter BMI bei Trägern des homozygot seltenen Allels (Dissertation Schmalenberger, 2009). Das homozygot häufige Allel geht hier eher mit einer ungünstigen Entwicklung auf die Blutfettwerte einher. Weitere Untersuchungen des SNP rs10953502 unternahmten Jian et al., die bei Patienten mit T2DM, gestörter Glukosetoleranz und einer Kontrollgruppe diesen Polymorphismus und zwei weitere im Visfatingen analysierten (rs205839, -153C/T). Alle SNP waren mit einer Erhöhung von Triglyceridwerten und Gesamtcholesterin assoziiert. Zusätzlich zeigten sich bei Personen mit Adipositas niedrigere Visfatinwerte im Plasma als bei Normalgewichtigen (Jian et al. 2006). Unsere Auswertungen des Polymorphismus rs10953502 konnten für beide Studien keine Übereinstimmung mit Veränderungen des systolischen Blutdrucks ermitteln, was möglicherweise in der unterschiedlichen Ethnizität und höheren Fallzahl (n=1678) begründet ist. Da jedoch die einzelnen Parameter des MetS in hohem Maße korrelieren, kann davon ausgegangen werden, dass die Befunde der beiden Studien in die gleiche Richtung weisen.

In unseren Ergebnissen konnte bei den Trägern des homozygot seltenen und heterozygoten Allels (T/T+C/T) des Polymorphismus rs6947766 ebenfalls eine Korrelation zum Blutdruck festgestellt werden, der sich mit einer Erhöhung des diastolischen Blutdrucks gegenüber des

Wildtyps definierte. Rs6947766, der sich in der Intronregion des Gens befindet, führt zu einem Austausch von Cytosin zu Thymin. In der europäischen Bevölkerung zeigt sich die Mutation durch eine Allelfrequenz von 0,24. Personen, die Träger des häufigen Allels sind, haben möglicherweise ein erhöhtes Risiko für arteriellen Hypertonus, eine polygenetische Erkrankung mit zahlreichen weiteren Risikofaktoren, die zu den wesentlichen Volkskrankheiten zählt und in der erwachsenen Bevölkerung in Industrienationen sehr häufig auftritt. Um den Aspekt der Prädisposition für konsekutive Herz-Kreislauf Erkrankungen aufzugreifen, könnten weitere Studien mit Analyse des Polymorphismus in KHK- oder Schlaganfallkohorten hilfreich sein.

Ein weiterer von uns untersuchter SNP rs1319313 liegt ebenfalls in der Intronregion des Visfatingens. Die Allelfrequenz der Mutation weist in der europäischen Bevölkerung eine Häufigkeit von 27 % auf, der Defekt ist durch die Base Guanin gekennzeichnet und der SNP ist durch die Base Adenin charakterisiert. Es wurden bei homozygoten Trägern des Wildtyps (G/G) höhere Konzentrationen von LDL- und Gesamtcholesterin im Vergleich zu den Trägern des seltenen und heterozygoten Allels (A/A+A/G) gefunden (LDL-Cholesterin $p=0,05$; Gesamtcholesterin $p=0,02$). Der LDL-Cholesterin Wert liegt in unserem Falle bei dem Wildtypallel im Bereich von 143 mg/dl vs. 140 mg/dl bei den homozygot seltenen und heterozygoten Trägern. LDL kann durch Metallkationen leicht oxidiert werden, wodurch sich sogenanntes oxidiertes LDL bildet. Dieses ist dann in der Lage Monozyten zu aktivieren, die ihrerseits daraufhin Gefäßwände penetrieren können. Dieser Prozess ist das Initialstadium der Atherosklerose (Cipolletta et al. 2005). Daher gehen hohe Konzentrationen von oxidierten LDL mit einem erhöhtem Risiko für myokardiale Infarkte und dem MetS einher (Holvoet et al. 2011). Wenn also wie im Fall des Polymorphismus rs1319313 der LDL Stoffwechsel zu beeinflusst zu sein scheint, dann könnten Personen, die eine Mutation in diesem SNP aufweisen, vor kardiovaskulären Erkrankungen geschützt sein.

Außerdem zeigte sich für diesen Polymorphismus ein Zusammenhang mit dem Leberenzym Glutamat-Oxalat Transferase (GOT). Passend zu den Ergebnissen der Cholesterinkonzentrationen konnten wir bei den Trägern des Wildtyps gegenüber den Trägern der Mutation ebenfalls höhere Plasmawerte feststellen ($p=0,02$). Das Enzym GOT kann in unterschiedlichen Isoformen vorliegen, welche im Zytoplasma (c-GOT) und den Mitochondrien (m-GOT) vorkommen (Wada et al. 1964). Die Transferase ist in der Lage eine Umwandlung von Alpha- Ketoglutarat in die Aminosäure Glutamin zu katalysieren. Diese Reaktion ist für den menschlichen Körper essentiell, da sonst die Umwandlung von Kohlenhydraten im Stoffwechsel nicht möglich wäre (Panteghini et al. 1990). Speziell die

Zytoplasmaform spielt eine bedeutende Rolle in der Glukogenese, da es durch Glukagon stimuliert werden kann (Hirano et al. 1986). In der Studie von Zhang et al. (Zhang et al. 2010) wurden die drei Leberenzyme GOT, GGT (Gamma Glutamyltransferase) und ALT (Alanin Aminotranferase) näher betrachtet: Alle Personen litten an T2DM mit Hyperglykämie und an mindestens einer der Komponenten des Mets, in diesem Falle an Hypertonie, Adipositas, Hypertriglyceridämie. Alle Enzyme zeigten einen Anstieg bei Vorhandensein dieser metabolischen Komponenten. Die positive Korrelation zwischen dem Anstieg der Konzentration von GOT, GGT und ALT und der Assoziation zum MetS oder T2DM, sowie der Zusammenhang mit IR und Hyperinsulämie, erhärtet sich somit (Nannipieri et al. 2005, Nakanishi et al. 2004). Personen mit Steatosis hepatis und einer begleitenden Steatohepatitis weisen erhöhte Konzentrationen von GOT auf (Herlong et al. 1994). Eine erhöhte Serumkonzentration dieser Transferasen können auch Indikatoren für andere, nicht-metabolische Lebererkrankungen sein. Darunter gehört GOT zu den bedeutendsten klinischen Laborparametern für eine intrazelluläre Schädigung der Hepatozyten und damit die wesentliche prognostische Relevanz für die Entwicklung einer chronischen Leberschädigung (Weyer et al. 2001). Unsere Probanden, die Träger des seltenen Allels sind, könnten zusammengefasst demnach vor metabolischen Stoffwechselstörungen, inklusive einer Steatohepatitis geschützt sein. In der Studie von Schmalenberger (Dissertation 2009) zeigte der SNP rs1319313 Assoziationen mit dem Lipid- und Glukosestoffwechsel. Hier zeigten sich erhöhte BMI-Werte bei den homozygot seltenen Allelträgern und erhöhte Triglyceridkonzentrationen bei den heterozygoten Trägern. Diesen Einfluss auf anthropometrische Parameter konnten wir nicht feststellen. Allerdings konnten Parallelen zum Cholesterinstoffwechsel gefunden werden. Hier zeigte zwar nur vorwiegend der weibliche Bevölkerungsanteil, der Träger des homozygot seltenen Allels war, signifikant höhere HDL-Cholesterinwerte. In unserer Kohortenstudie wurden nur männliche Patienten getestet. Man könnte daraus schließen, dass pathogene Polymorphismen geschlechtsabhängig relevant sein können. Passend zu diesen Assoziationen mit einzelnen Stoffwechselfparametern, haben wir zudem in unseren Ergebnissen festgestellt, dass die Träger des seltenen Allels des SNP rs1319313 weniger häufig an einem kompletten MetS leiden als die homozygoten Wildtypträger. Ein Befund der tendenziell festzustellen ist, jedoch nicht statistisch signifikant war ($p=0,06$). Somit bestehen sowohl aus unseren eigenen Daten, als auch aus zwei weiteren Veröffentlichungen zu anderen Kohorten Hinweise, dass homozygote Träger des häufigen Allels ein erhöhtes Risiko für das metabolische Syndrom, erhöhte LDL-Cholesterinkonzentrationen und möglicherweise auch eine damit verbundene Steatohepatitis

aufweisen. Bezüglich der Lebererkrankung können wir diesbezüglich jedoch keine abschließende Aussage treffen, da wir zum einen keine Leberbiopsie oder Leberultraschall durchgeführt haben und zum anderen in der statistischen Analyse nicht um den Faktor Alkoholkonsum korrigiert wurde. Interessant wäre es in diesem Zusammenhang prospektiv zu untersuchen, ob tatsächlich ein erhöhtes Risiko für medizinisch relevante Endpunkte besteht (Herzinfarkte, Schlagfälle, Leberzirrhose).

Der Polymorphismus rs3802172 befindet sich in der Intron 3' UTR Region auf dem Visfatingen. Der Wildtyp weist an der Defektstelle Adenin auf, der SNP lässt sich durch die Base Guanin charakterisieren. Die Mutation weist in der europäischen Bevölkerung eine Allelfrequenz von 0,37 auf. Wir konnten in unseren Ergebnissen keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des SNP und metabolischen Parametern feststellen.

4.3 Diskussion der Ergebnisse der Haplotypenanalyse

In der von uns durchgeführten Haplotypenanalyse zeigte die Analyse der sieben identifizierten Haplotypen, dass Haplotyp 3 die engste Assoziation mit mehreren metabolischen Parametern aufwies. Eine signifikante Assoziationen konnte mit den Parametern HDL- Cholesterin, Taillenumfang, BMI, Insulinresistenz (HOMA-IR), Beta-Zellfunktion (HOMA β) und Glukose (nach OGTT) festgestellt werden. Es konnte damit gezeigt werden, dass Haplotypen, als eine Kombination von Einzel-SNP zu einer stärkeren Assoziation mit mehreren Parametern des MetS führen kann, als eine Einzel-SNP Analyse.

Weitere Assoziationen bestanden zwischen Haplotyp 1 und dem Auftreten eines MetS als binärer Parameter (MetS ja/nein) und zwischen Haplotyp 5 und dem Risiko für das Auftreten eines gestörten Glukosestoffwechsels (ja/nein). Träger des Haplotyp 6 zeigten einen signifikant höheren diastolischen Blutdruck und höhere Triglyceridwerte im Vergleich zu den anderen Parametern.

Diese Haplotypen könnten demnach das Risiko für ein MetS und T2DM erhöhen oder Personen mit dem gegenteiligen Haplotyp davor schützen. Dieses Ergebnis ist konform mit zahlreichen in der Vergangenheit durchgeführten Untersuchungen polygenetischer Erkrankungen, bei denen einzelne SNP häufig nur einen geringen Effekt auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit haben, aber eine Haplotypkombination von SNP einen signifikanten Effekt ausüben kann.

Die funktionelle Vermittlung dieses Effektes bleibt bei den von uns untersuchten Intron-SNP jedoch unklar. Um die funktionellen Veränderungen durch die Polymorphismen zu erklären, wären zwei Möglichkeiten denkbar: Zum einen wäre es möglich, dass diese für verschiedene Splice-Varianten des Gene kodieren und darüber zu verschiedenen Isoformen führen, oder die untersuchten SNP stehen im LD mit anderen, funktionell wirksamen SNP, beispielweise in codierenden Genabschnitten oder Promoterregionen. Durch die Analyse dieser Haplotypen des Visfatingens konnte mit unserer Untersuchung erstmalig die Varianz des gesamten Gens und ihr Zusammenhang zu Stoffwechselfparametern, MetS und T2DM untersucht werden. Damit stellt diese Studie eine wesentlich Erweiterung der bisher publizierten Daten dar.

Außer bei SNP rs6947799, wo das Mutantenallel eine Signifikanz zu höherem diastolischen Blutdruck aufwies, wiesen Träger des seltenen Allels eher günstigere metabolische Werte auf. Bei SNP rs1319313 wiesen die Träger des seltenen Allels sogar eine geringere Häufigkeit eines MetS auf.

Um diese Ergebnisse näher zu bestätigen, könnte man eine Replikation der untersuchten SNPs in einer weiteren repräsentativen Kohorte der Allgemeinbevölkerung oder auch Fall-Kontroll Studien bei Patienten mit metabolischen Folgeerkrankungen (T2DM, KHK) durchführen. Auch wäre es im Verlauf denkbar, hier weiterführende Untersuchungen zu Gen-Nahrungs-Interaktion durchzuführen, um zu untersuchen, ob beispielweise bestimmte Nahrungsmittel oder Diätformen von den Variantenträgern unterschiedlich verstoffwechselt werden oder andere Effekte ausüben.

Es wäre zudem sinnvoll, funktionelle Untersuchungen des Gens durchzuführen, um in vitro zu bestätigen, dass eine genetische Varianz im Visfatingen Auswirkungen auf die Genfunktion hat.

Ziel wäre es, personalisierte Empfehlungen für die Allgemeinbevölkerung mit metabolischem Risiko abzugeben, die eine individualisierte Aufklärung über Ernährung, Umstellung des Lebensstils und sportliche Aktivität beinhalten, um das Risiko des Eintretens eines T2DM oder kardiovaskuläre Folgeerkrankungen zu verhindern.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen im Visfatingen und Parametern des metabolischen Syndroms bestehen. 750 metabolisch gut charakterisierte Probanden der Metabolic Intervention Cohort Kiel wurden für fünf Visfatin SNP genotypisiert. In dieser Untersuchung wurde eine Haplotypenanalyse gewählt. Dabei wurden Intron SNP ausgewählt, die als sogenannte tagging SNP über ein Linkage Disequilibrium mit benachbarten SNP das gesamte Gen abdecken.

Es ergab sich ein signifikanter Zusammenhang für Träger des seltenen Allels im SNP rs10953502 mit einem niedrigeren systolischem Blutdruck. SNP rs1319313 Träger wiesen geringere Konzentrationen des Leberenzym GOT- , des Gesamtcholesterin- und des LDL-Cholesterins auf. Träger des seltenen Allels in diesem SNP zeigten ein um 50% reduziertes Risiko an dem metabolischem Syndrom zu erkranken, verglichen mit Probanden mit dem Wildtypallel.

Nach zusätzlicher Haplotypenanalyse konnten sieben Haplotypen identifiziert und Assoziationen zum metabolischen Syndrom untersucht werden. Haplotyp 3 zeigte zu verschiedenen metabolischen Parametern einen signifikanten Zusammenhang und war damit der Haplotyp mit der höchsten potentiell funktionellen Relevanz: HDL- Cholesterin, Taillenumfang, BMI, Insulinresistenz und Glukosekonzentrationen waren bei diesem Haplotyp im Vergleich zu anderen Haplotypen signifikant erhöht.

Bei Trägern des Haplotyp 1 liegt häufiger ein metabolisches Syndrom und bei Haplotyp 5 eine Glukosestoffwechselstörung vor.

Zusammenfassend können wir mithilfe der vorangegangenen Erkenntnisse aus der Literatur und aus unseren Ergebnissen den Schluss ziehen, dass Varianten im Visfatingen mit mehreren metabolischen Risikofaktoren assoziiert sind, die dazu führen an dem metabolischen Syndrom zu erkranken. Dabei waren in unseren statistischen Auswertungen der einzelnen Polymorphismen, bis auf eine Ausnahme, jeweils der Wildtyp mit Risikoparametern des metabolischen Syndroms vergesellschaftet. Demnach hatten offenbar die Mutationen einen Selektionsvorteil. Die Mutationen im Visfatingen führen in Zeiten zunehmender Überernährung zu einer Risikominderung und könnte demnach evolutionäre Anpassung an die geänderten Lebensbedingungen darstellen.

Damit konnte gezeigt werden, dass Variationen im Visfatingen Parameter des metabolischen Syndroms und damit auch das Risiko eines Auftretens des kompletten Krankheitsbildes und von Glukosestoffwechselstörungen beeinflussen könnten.

Weitere Untersuchungen in Replikationskohorten sind notwendig um diese Ergebnisse zu bestätigen. Zudem wären funktionelle Untersuchungen der relevanten SNP für das weitere Verständnis der Pathophysiologie notwendig. Da es sich bei den untersuchten SNP jedoch um Intron SNP handelt, könnte zunächst geprüft werden, ob die Genexpression in Trägern der Varianten unterschiedlich ist. Auch Intron SNP können zum einen, beispielweise über die Beeinflussung von Splice- Varianten funktionell wirksam sein, zum anderen könnten die untersuchten SNP mit anderen funktionellen SNP im Linkage Disequilibrium stehen.

6 Literaturverzeichnis

1. Akbarzadeh, S., et al., *Serum visfatin and vaspin levels in normoglycemic first-degree relatives of Iranian patients with type 2 diabetes mellitus*. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012. **95**(1): p. 132-8.
2. Bailey, S.D., et al., *Common polymorphisms in the promoter of the visfatin gene (PBEF1) influence plasma insulin levels in a French-Canadian population*. *Diabetes.* 2006. **55**(10): p. 2896-902.
3. Balding, D.J., *A tutorial on statistical methods for population association studies*. *Nat Rev Genet.* 2006. **7**(10): p. 781-91.
4. Belenky, P., et al., *NAD⁺ metabolism in health and disease*. *Trends Biochem Sci.* 2007. **32**(1):p. 12-9.
5. Blakemore, A.I., et al., *A rare variant in the **visfatin** gene (NAMPT/PBEF1) is associated with protection from obesity*. *Obesity (Silver Spring).* 2009. **17**(8): p. 1549-53.
6. Carrero, J.J., et al., *Visfatin is increased in chronic kidney disease patients with poor appetite and correlates negatively with fasting serum amino acids and triglyceride levels*. *Nephrol Dial Transplant.* 2010. **25**(3): p. 901-6.
7. Chabot, V., *Syndrome "X"*. *Schweiz Rundsch Med Prax.* 1993. **82**(32): p. 858-63.
8. Chang, YH., et al., *Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review*. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011. **27**(6): p. 515-27.
9. Chen, M.P., et al., *Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus*. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 **91**(1): p. 295-9.
10. Cipolletta, C., et al., *Activation of peripheral blood CD14⁺ monocytes occurs in diabetes*. *Diabetes.* 2005. **54**(9): p. 2779-86.
11. Curat, A., et al., *Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin*. *Diabetologia.* 2006. **49**(4): p. 744-7.
12. Dahl, T.B., et al., *Intracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase protects against hepatocyte apoptosis and is down-regulated in nonalcoholic fatty liver disease*. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010. **95**(6): p. 3039-47.
13. Daly, A.K., et al., *Candidate gene case-control **association studies**: advantages and potential pitfalls*. *Br J Clin Pharmacol.* 2001. **52**(5): p. 489-99.
14. de Luis, D.A., et al., *Relation of **visfatin** to cardiovascular risk factors and adipocytokines in patients with impaired fasting glucose*. *Nutrition.* 2013. **29**(11-12): p. 1300-3.
15. Denu, J.M., et al., *Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD(+)-dependent deacetylases*. *Trends Biochem Sci.* 2003. **28**(1): p. 41-8.
16. Dogru, T., et al., *Plasma **visfatin** levels in patients with newly diagnosed and untreated type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance*. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007. **76**(1): p. 24-9.
17. Eckel, R.H., et al., *The metabolic syndrome*. *Lancet.* 2005. **365**(9468): p. 1415-28.
18. Engeli, S., et al., *Dissociation between adipose nitric oxide synthase expression and tissue metabolis*. *J Clin Endocrinol Metab,* 2007. **92**(7): p. 2706-11.

19. Esteghamati, A., et al., *The value of visfatin in the prediction of metabolic syndrome: a multi-factorial analysis*. J Cardiovasc Transl Res. 2012. **5**(4): p. 541-6.
20. Fukuhara, A., et al., *Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin*. Science. 2005. **21**; 307(5708): p. 426-30.
21. Grundy, S.M., et al., *Metabolic syndrome pandemic*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(4): p. 629-36.
22. Gunduz, F.O., et al., *Serum visfatin and fetuin-a levels and glycemic control in patients with obese type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Metab J. 2011. **35**(5): p. 523-8.
23. Gunes, F., et al., *Visfatin may be a novel marker for identifying stages of essential hypertension in advanced age patients*. Intern Med. 2012. **51**(6): p. 553-7.
24. Gupta, A., et al., *Metabolic syndrome: what are the risks for humans?* Biosci Trends, 2010. **4**(5): p. 204-12.
25. Haider, D.G., et al., *The release of the adipocytokine visfatin is regulated by glucose and insulin*. Diabetologia. 2006. **49**(8): p. 1909-14.
26. Herlong, H.F., et al., *Approach to the patient with abnormal liver enzymes*. Hosp Pract (Off Ed). 1994. **29**(11): p. 32-8.
27. Hirano, K., et al., *Determination of mitochondrial aspartate aminotransferase in serum*. Clin Chim Acta. **1986**. **155**(3): p. 251-62.
28. Hoehe, M.R., *Haplotypes and the systematic analysis of genetic variation in genes and genomes*. Pharmacogenomics. 2003. **4**(5): p. 547-70.
29. Holvoet, P., et al., *Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001. **21**(5): p. 844-8.
30. Hosseinzadeh, Atar., et al., *The effects of omega-3 on blood pressure and the relationship between serum visfatin level and blood pressure in patients with type II diabetes*. ARYA Atheroscler. 2012. **8**(1): p. 27-31.
31. Humeny, A., et al., *MALDI-TOF-MS analysis of protein and DNA*. Neuroscientist. 2001. **7**(1): p. 6-12.
32. Jian, W.X., et al., *The visfatin gene is associated with glucose and lipid metabolism in a Chinese population*. Diabet Med. 2006. **23**(9): p. 967-73.
33. Johansson, L.M., et al., *The visfatin (PBEF1) G-948T gene polymorphism is associated with increased high-density lipoprotein cholesterol in obese subjects*. Metabolism. 2008. **57**(11): p. 1558-62.
34. Johnson, G.C., et al., *Haplotype tagging for the identification of common disease genes*. Nat Genet. 2001. **29**(2): p. 233-7.
35. Kaminska, A., et al., *An evaluation of visfatin levels in obese subjects*. Endokrynol Pol. 2010. **61**(2): p. 169-73.
36. Körner, A., et al., *Effects of genetic variation in the visfatin gene (PBEF1) on obesity, glucose metabolism, and blood pressure in children*. Metabolism. 2007. **56**(6): p. 772-7.
37. Kralisch, S., et al., *Hormonal regulation of the novel adipocytokine visfatin in 3T3-L1 adipocytes*. J Endocrinol. 2005. **185**(3): p. R1-8.
38. Krzystek-Korpacka, M., et al., *Visfatin in juvenile obesity - the effect of obesity intervention and sex*. Eur J Clin Invest. 2011. **41**(12): p. 1284-91.
39. Kwok, P.Y., et al., *SNP genotyping and molecular haplotyping of DNA pools*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2003. **68**: p. 65-7.

40. Lai, A., et al., *Effects of visfatin gene polymorphism RS4730153 on exercise-induced weight loss of obese children and adolescents of Han Chinese*. Int J Biol Sci. 2013. **9**(1): p. 16-21.
41. Li, L., et al., *Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects*. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2006. **114**(10): p. 544-8.
42. Lopez-Bermejo, A., et al., *Serum visfatin increases with progressive beta-cell deterioration*. Diabetes. 2006. **55**(10): p. 2871-5.
43. Luk, T., et al., *Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity*. J Leukoc Biol. 2008. **83** (4): p. 804-16.
44. Miazgowski, T., et al., *Adiponectin, visfatin and regional fat depots in normal weight obese premenopausal women*. Eur J Clin Invest. 2013. **43**(8): p. 783-90.
45. Mittendorfer, B., et al., *Relationship between body fat mass and free fatty acid kinetics in men and women*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(10): p. 1872-7.
46. Murphy, K.G. et al., *Are all fats created equal?* Nat Med. 2006. **12**(1): p. 32-3.
47. Nair, CV., et al., *Metabolic syndrome: an occupational perspective*. Indian J Community Med, 2010. **35**(1): p. 122-4.
48. Nannipieri, M., et al., *Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study*. Diabetes Care. 2005 **28**(7): p. 1757-62.
49. Okuno, T., et al., *Quantitative comparison of adipocytokine gene expression during adipocyte maturation in non-obese and obese rats*. Biol Pharm Bull. 2011 **34**(6):p. 865-70.
50. Pantegini, M., et al., *Aspartate aminotransferase isoenzymes*. Clin Biochem. 1990. **23**(4): p. 311-9.
51. Randle, P.J., et al., *Regulatory interactions between lipid and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years*. Diabetes Metab Rev. 1998. **14**(4): p. 263-83.
52. Reda, R., et al., *Serum visfatin levels in a group of Egyptian obese individuals*. Egypt J Immunol. 2011. **18**(1): p. 25-32.
53. Reich, D.E., et al., *Linkage disequilibrium in the human genome*. Nature. 2001. **411**(6834): p. 199-204.
54. Revollo, J.R., et al., *Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme*. Cell Metab, 2007. **6**(5): p. 363-75.
55. Revollo, J.R., et al., *The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells*. J Biol Chem. 2004. **279**(49): p. 50754-63.
56. Rongvaux, A., et al., *Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is anicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis*. Eur J Immunol. 2002. **32**(11): p. 3225-34.
57. Saddi-Rosa, P., et al., *Visfatin, glucose metabolism and vascular disease: a review of evidence*. Diabetol Metab Syndr. 2010. **26**(10): p. 1224-30.
58. Samal, B., et al., *Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony- enhancing factor*. Mol Cell Biol. 1994. **14**(2): p. 1431-7.
59. Sandeep. S., et al., *Serum visfatin in relation to visceral fat, obesity, and type 2 diabetes mellitus in Asian Indians*. Metabolism. 2007. **56**(4): p. 565-70.

60. Schaid, D.J., et al., *Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous*. Am J Hum Genet. 2002. **70**(2): p. 425-34.
61. Schaid, D.J., *Evaluating associations of haplotypes with traits*. Genet Epidemiol. 2004. **27**(4): p. 348-64.
62. Schindler, K., et al., *The Impact of Type 2 Diabetes on Circulating Adipokines in Patients with Metabolic Syndrome*. Obes Facts. 2012. **5**(2): p. 270-276.
63. Sebastiani, P., et al., *Minimal haplotype tagging*. Proc Natl Acad Sci USA. 2003. **100**(17): p. 9900-5.
64. Sonnemann, E., *General solutions to multiple testing problems. Translation of "Sonnemann, E. (1982). Allgemeine Lösungen multipler Test probleme. EDV in Medizin und Biologie 13(4), 120-128"*. Biom J. 2008. **50**(5): p. 641-56.
65. Sun, G., et al., *Serum visfatin concentrations are positively correlated with serum triacylglycerols and down-regulated by overfeeding in healthy young men*. Am J Clin Nutr. 2007. **85**(2): p. 399-404.
66. Thompson, D., et al., *Haplotype tagging single nucleotide polymorphisms and association studies*. Hum Hered. 2003. **56**(1-3): p. 48-55.
67. Tokunaga, A., et al., *The -1535 promoter variant of the visfatin gene is associated with serum triglyceride and HDL-cholesterol levels in Japanese subjects*. Endocr J. 2008. **55**(1): p. 205-12.
68. Uslu, S., et al., *Relationship between adipocytokines and cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus*. Exp Ther Med. 2012 **4**(1): p. 113-120.
69. Wada, H., et al., *Recent studies in GOT*. Sogo Rinsho. 1964. **13**: p. 758-65.
70. Weiss, K.M., et al., *Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits*. Trends Genet. 2002. **18**(1): p. 19-24.
71. Weyer, C., et al. *Insulin resistance and insulin secretory dysfunction are independent predictors of worsening of glucose tolerance during each stage of type 2 diabetes development*. Diabetes Care. 2001. **24**(1): p. 89-94.
72. Wu, C., et al., *Genetic association studies: an information content perspective*. Curr Genomics. 2012. **13**(7): p. 566-73.
73. Zhang, Y., et al., *Positive correlations of liver enzymes with metabolic syndrome including insulin resistance in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus*. Endocrine. 2010. **38**(2): p. 181-7.
74. Zhang, Y.Y., et al., *A visfatin promoter polymorphism is associated with low-grade inflammation and type 2 diabetes*. Obesity (Silver Spring). 2006. **14**(12): p. 2119-26.
75. Schmalenberger, D., *Dissertation Die Rolle genetischer Varianten des Adipozytokins Visfatin und des Signaltransduktors Phosphatidylinositol-3-kinase bei kardiometabolischen Erkrankungen, Regensburg 2009*
76. Janhsen K., et al., *Gesundheitsberichterstattung des Bundes (Robert Koch Institut)2008*

Internetreferenzen

77. www.hapmap.org
78. www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP
79. www.dzmf.de

7 Anhang

Tabelle 1 Ausgewählte Polymorphismen von Visfatin (PBEF1) lokalisiert auf Chromosom 7, Verteilung der Genotypen in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg Gleichgewicht (p-Wert, HWE)

DbSNP ID	Position des SNP	Sequenz (5' → 3')	MAF	Häufiges/ Seltenes Allel	P dominant	P additive	P recessive	Gen-Position	P HWE
rs28918466	3'UTR	cttgtgaaaatC/Taaaagttcagt	0,42	T/C	0,28 T/T	0,46 C/T	0,25 C/C	43914399	0,90
rs10953502	intr/3'UTR	atctaattttC/Tgtcattgtgt	0,41	T/C	0,33 T/T	0,46 C/T	0,20 C/C	43925274	0,54
rs3801272	intr/3'UTR	ccatagcttcaA/Gcaatttgctt	0,37	G/A	0,46 G/G	0,46 A/G	0,08 A/A	42473464	0,76
rs6947766	Intron	ttagaaattcaC/Tttcttcattct	0,24	C/T	0,56 C/C	0,36 T/C	0,08 T/T	43943509	0,84
rs1319313	Intron	gtctctggggA/Gcaagctgcaac	0,27	G/A	0,55 G/G	0,35 A/G	0,10 A/A	43955366	0,73

MAF- Minor Allele frequency, Häufigkeit des seltenen Allels, HWE – Hardy- Weinberg- Equilibrium

Tabelle 2 Ergebnisse Chi-Quadrat-Test: für das Vorliegen von MetS IDF ja/nein, MetS ATP ja/nein, Diabetes ja/nein, Hypertonie Ja/Nein für rs28918466, rs10953502, rs3801272, rs6947766 und rs1319313

Genotyp	<u>METABOLISCHES SYNDROM (IDF)</u>		OR (95% CI)	p	<u>METABOLISCHES SYNDROM (ATPIII)</u>		OR (95%CI)	p
	ja n (%)	nein n (%)			ja n (%)	nein n (%)		
rs28918466 T/T n=232	144 (21)	88 (13)	1,00	0,87	180 (26)	52 (7)	1,00	0,63
rs2891846 C/T+C/C n=462	296 (8)	193 (28)	0,96 (0,64-1,46)		107 (15)	355 (51)	1,13 (0,69-1,85)	
rs3801272 G/G n=271	168 (24)	103 (15)	1,00	0,88	211 (30)	60 (9)	1,00	0,91
rs3801272 A/G+A/A n=424	244 (35)	180 (26)	0,96 (0,61-1,53)		323 (46)	101 (15)	0,97 (0,57-1,66)	
rs1319313 G/G n=363	229 (33)	134 (19)	1,00	0,06	287 (41)	76 (11)	1,00	0,82
rs1319313 A/G+A/A n=333	184 (26)	149 (21)	0,56 (0,30-1,04)		247 (35)	86 (12)	1,08 (0,53-2,26)	
rs10953502 T/T n=246	151 (22)	95 (14)	1,00	0,98	188 (27)	58 (8)	1,00	0,78
rs10953502 C/T+C/C n=455	266 (38)	332 (47)	1,00 (0,66-1,53)		351 (50)	104 (15)	1,07 (0,65-1,77)	
rs6947766 C/C n=404	234 (34)	170 (24)	1,00	0,56	310 (44)	94 (14)	1,00	0,40
rs6947766 C/T+T/T n=293	181 (26)	112 (16)	1,22 (0,61-2,46)		228 (33)	65 (9)	1,45 (0,61-3,44)	

Genotyp	<u>GLUKOSESTOFFWECHSEL STÖRUNG</u>				<u>ARTERIELLE HYPERTONIE</u>			
	ja n (%)	nein n (%)	OR (95% CI)	p	ja n (%)	nein n (%)	OR (95% CI)	p
rs28918466 T/T n=232	19 (3)	213 (31)	1,00	0,63	60 (9)	65 (9)	1,00	0,97
rs2891846 C/T+C/C n=462	424 (61)	38 (5)	1,21 (0,56-2,64)		278 (40)	300 (43)	1,00 (0,67-1,51)	
rs3801272 G/G n=271	247 (35)	24 (3)	1,00	0,63	45 (6)	50 (7)	1,00	0,77
rs3801272 A/G+AA n=424	389 (56)	35 (5)	0,82 (0,37-1,82)		295 (42)	315 (45)	0,93 (0,51-1,47)	
rs1319313 G/G n=363	335 (48)	28 (4)	1,00	0,24	20 (3)	25 (4)	1,00	0,58
rs1319313 A/G+A/A n=333	302 (43)	31 (4)	0,24 (0,54-2,45)		321 (46)	340 (49)	1,19 (0,64-2,22)	
rs10953502 T/T n=246	223 (32)	23 (3)	1,00	0,92	65 (9)	58 (8)	1,00	0,44
rs10953502 C/T+C/C n=455	419 (60)	36 (5)	0,96 (0,45-2,05)		279 (40)	310 (44)	0,84 (0,55-1,30)	
rs6947766 C/C n=404	369 (53)	35 (5)	1,00	0,63	21 (3)	20 (3)	1,00	0,55
rs6947766 C/T+T/T n=293	270 (3)	23 (3)	0,75 (0,23-2,34)		311 (45)	345 (50)	1,22 (0,64-2,35)	

Tabelle 3 Anthropometrische und Metabolische Parameter der rs28918466, rs10953502, rs3801272, rs6947766 und rs1319313 Genotypen.

^a arithmetisches Mittel (SEM); ^b geometrisches Mittel (+/- SEM); ^c t-Test zum Vergleich der Mittelwerte, zweiteilige Signifikanz; ^d t-Test zum Vergleich der Mittelwerte, berechnet mit logarithmisch umgerechneten Daten, zweiteilige Signifikanz; ^e HOMA homeostasis model assesment: mU/l Insulin x mmol/l Glucose x 22.5⁻¹; ^f Mittelwert zweier unabhängiger Messungen

Variablen	<i>rs6947766</i>			<i>rs1319313</i>		
	C/C	C/T + T/T	p	G/G	A/G + A/A	p
Probanden [n]	404	293		363	333	
Alter [Jahre] ^a	59,07 (0,30)	58,40 (0,33)	0,33	58,89 (0,33)	59,02 (0,54)	0,79
BMI [kg/m ²] ^a	27,30 (0,19)	27,11 (0,22)	0,14	27,38 (0,22)	27,43 (0,42)	0,58
Taille [cm] ^a	99,95 (0,55)	100,13 (0,64)	0,84	100,12 (0,63)	100,67 (0,70)	0,71
GOT [u/l] ^a	8,69 (0,18)	9,02 (0,28)	0,88	9,03 (0,27)	8,61 (0,48)	0,02
CHOL [mmol/l] ^a	227,61 (2,00)	226,74 (2,70)	0,85	226,50 (2,16)	222,59 (2,50)	0,02
HDL [mmol/l] ^a	53,87 (0,76)	53,26 (0,78)	0,36	53,64 (0,90)	53,60 (0,82)	0,93
LDL [mmol/l] ^a	145,09 (1,64)	143,91 (1,64)	0,06	143,56 (1,66)	140,57 (2,02)	0,05
rrsys [mmHg] ^a	128,22 (0,93)	128,95 (1,84)	0,22	12,56 (1,03)	127,34 (1,15)	0,32
rrdia [mmHg] ^a	79,38 (0,57)	81,23 (0,75)	0,02	80,51 (0,65)	79,15 (0,68)	0,43
Nüchtern Triglyceride [mmol/l] ^b	142,10 (4,63)	137,24 (6,08)	0,50	139,38 (5,22)	142,18 (4,98)	0,36

Triglyceride (AUC)	1749,87 (49,81)	1719,21 (58,84)	0,43	1708,21 (53,13)	1701,06 (54,88)	0,32
Pp Glucose oMTT (AUC)	524,99 (5,48)	512,61 (5,27)	0,67	519,77 (5,69)	528,75 (5,33)	0,20
Pp Insulin oMTT (AUC)	201,33 (8,43)	203,87 (11,21)	0,57	199,04 (7,86)	217,98 (11,52)	0,49
Nüchtern Insulin [μ IE/ml]	14,35 (0,53)	14,22 (0,68)	0,15	14,23 (0,54)	15,05 (0,63)	0,75
Nüchtern Glucose ^f [mmol/l] ^b	105,41 (0,90)	104,55 (1,41)	0,73	104,66 (0,90)	105,61 (0,91)	0,61
Pp Glucose oGTT (AUC)	464,86 (6,36)	471,23 (7,02)	0,75	473,08 (21,13)	465,96 (6,71)	0,73
Pp Insulin oGTT (AUC)	171,32 (6,93)	168,65 (8,59)	0,88	172,92 (14,76)	175,08 (8,13)	0,22
HOMA ^{e,f} [$\text{mU} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{l}^{-2}$] ^b	3,89 (0,18)	3,40 (0,20)	0,60	3,72 (0,16)	4,12 (0,23)	0,58
WHR ^a	0,98 (0,005)	1,00 (0,004)	0,70	0,99 (0,004)	0,99 (0,005)	0,74

Variablen	<i>rs28918466</i>			<i>rs10953502</i>			<i>rs3801272</i>		
	T/T	C/T + C/C	p	T/T	C/T + C/C	p	G/G	A/G + A/A	p
Probanden [n]	232	462		246	455		271	424	
Alter [Jahre] ^a	58,81 (0,44)	58,77 (0,38)	0,10	58,79 (0,42)	58,59 (0,35)	0,02	58,64 (0,40)	59,72 (0,42)	0,04
BMI [kg/m ²] ^a	27,45 (0,28)	27,24 (0,40)	0,40	27,44 (0,26)	27,31 (0,30)	0,38	27,41 (0,25)	27,46 (0,31)	0,92
Taillenumfang [cm] ^a	100,76 (0,79)	99,71 (0,83)	0,52	100,70 (0,74)	99,82 (0,88)	0,40	100,64 (0,72)	100,19 (0,94)	0,91
GOT	9,33 (0,40)	8,80 (0,30)	0,27	9,30 (0,38)	8,85 (0,25)	0,27	9,20 (0,35)	8,76 (0,32)	0,15
Chol [mmol/l] ^a	224,33 (2,55)	227,06 (3,00)	0,36	224,45 (2,53)	227,28 (2,93)	0,23	224,37 (2,40)	226,82 (2,89)	0,24
HDL [mmol/l] ^a	52,47 (1,03)	54,06 (1,04)	0,18	52,23 (0,98)	53,94 (1,07)	0,19	52,40 (0,92)	53,72 (1,12)	0,20
LDL [mmol/l] ^a	142,10 (2,06)	144,55 (2,46)	0,20	141,99 (2,01)	144,61 (2,45)	0,68	141,83 (1,90)	144,59 (2,58)	0,21
rrsys [mmHg] ^a	129,74 (1,30)	128,22 (1,24)	0,13	129,53 (1,24)	129,46 (1,34)	0,04	129,56 (1,03)	127,24 (3,41)	0,32
rrdia [mmHg] ^a	80,80 (0,78)	79,77 (0,79)	0,19	80,65 (0,75)	79,72 (0,84)	0,15	80,33 (0,61)	80,15 (0,68)	0,43
Nüchtern Triglyceride [mmol/l] ^b	139,32 (4,98)	139,18 (6,20)	0,96	141,15 (5,75)	138,61 (5,96)	0,96	139,38 (5,22)	142,18 (4,98)	0,36
Pp Triglyceride (AUC)	1710,45 (55,36)	1707,49 (60,74)	0,88	1734,35 (60,72)	1705,11 (63,05)	0,95	1708,21 (53,13)	1701,06 (59,88)	0,23
Pp Glucose oMTT (AUC)	517,58 (5,58)	522,08 (6,78)	0,67	519,35 (5,49)	521,86 (7,07)	0,91	519,77 (5,69)	528,75 (5,33)	0,20
Pp Insulin oMTT (AUC)	204,41 (10,56)	203,20 (11,27)	0,78	207,98 (10,75)	203,39 (11,53)	0,80	199,04 (7,86)	217,12 (11,52)	0,49
Nüchtern Insulin [μIE/ml]	15,00 (0,75)	14,45 (0,44)	0,49	15,09 (0,72)	14,53 (0,83)	0,27	14,77 (0,66)	15,02 (0,49)	0,51
Nüchtern Glucose ^f [mmol/l] ^b	104,15 (0,85)	105,14 (0,78)	0,53	104,87 (0,85)	105,20 (1,46)	0,78	104,45 (0,80)	105,69 (0,16)	0,73
Pp Glucose oGTT (AUC)	466,33 (6,93)	463,32 (8,55)	0,23	463,99 (11,13)	462,71 (7,05)	0,13	465,84 (6,40)	467,77 (7,41)	0,59
Pp Insulin oGTT (AUC)	177,60 (8,61)	169,23 (8,80)	0,12	164,85 (10,08)	176,11 (8,22)	0,91	175,82 (7,78)	172,59 (8,23)	0,87
HOMA ^{e,f} [mU*mmol*1 ⁻²] ^b	3,91 (0,22)	3,40 (0,21)	0,75	3,95 (0,21)	3,98 (0,29)	0,47	3,85 (0,19)	4,16 (1,03)	0,90
WHR ^a	0,99 (0,003)	0,98 (0,004)	0,44	0,99 (0,004)	0,98 (0,005)	0,60	0,99 (0,005)	0,99 (0,004)	0,94

Tabelle 4 P-Werte für metabolische Parameter der Haplotypen des Visfatingens nach Haplotypenanalyse

Haplotyp	<u>LDL- Cholesterin</u>			<u>TG</u>			<u>Hypertonus ja/nein</u>			<u>HDL- Cholesterin</u>		
	Fälle (Frequenz)	Kontroll (Frequenz)	P	Fälle (Frequenz)	Kontroll (Frequenz)	P	Fälle (Frequenz)	Kontroll (Frequenz)	P	Fälle (Frequenz)	Kontroll (Frequenz)	P
1 (11121)	0,244	0,249	0,837	0,225	0,267	0,065	0,255	0,231	0,339	0,247	0,246	0,949
2 (11122)	0,110	0,136	0,142	0,122	0,126	0,886	0,129	0,114	0,400	0,121	0,126	0,739
3 (11222)	0,028	0,022	0,487	0,030	0,021	0,297	0,025	0,023	0,972	0,016	0,034	0,037
4 (12221)	0,029	0,019	0,270	0,020	0,029	0,315	0,024	0,027	0,697	0,024	0,026	0,726
5 (21222)	0,019	0,016	0,680	0,017	0,018	0,999	0,020	0,013	0,300	0,024	0,011	0,099
6 (22212)	0,256	0,217	0,096	0,263	0,210	0,021	0,218	0,271	0,029	0,226	0,247	0,372
7 (22222)	0,313	0,332	0,450	0,320	0,327	0,771	0,326	0,317	0,747	0,338	0,307	0,223

Haplotyp	<u>Taille</u>			<u>Hypertonus ja/nein</u>			<u>MetS (IDF)</u>			<u>BMI</u>		
	Fälle (Frequenz)	Kontroll (Frequenz)	P	Fälle (Frequenz)	Kontroll (Frequenz)	P	Fälle (Frequenz)	Kontroll (Frequenz)	P	Fälle (Frequenz)	Kontroll (Frequenz)	P
1 (11121)	0,240	0,237	0,448	0,251	0,237	0,576	0,225	0,276	0,029	0,239	0,254	0,508
2 (11122)	0,127	0,123	0,887	0,129	0,113	0,368	0,125	0,121	0,779	0,128	0,119	0,604
3(11222)	0,027	0,014	0,011	0,022	0,031	0,311	0,024	0,026	0,806	0,034	0,016	0,040
4 (12221)	0,009	0,023	0,617	0,026	0,023	0,670	0,025	0,024	0,909	0,024	0,025	0,761
5 (21222)	0,011	0,021	0,312	0,017	0,018	0,865	0,021	0,012	0,197	0,015	0,021	0,406
6 (22212)	0,213	0,232	0,716	0,232	0,246	0,556	0,251	0,216	0,139	0,246	0,227	0,401
7 (22222)	0,357	0,347	0,065	0,319	0,330	0,674	0,225	0,276	0,029	0,313	0,332	0,459

Haplotyp	<u>HOMAbcell</u>			<u>FFA (0h)</u>			<u>FFA (postprandial)</u>			<u>HOMAIR</u>		
	Fälle (Frequenz)	Kontroll (Frequenz)	P	Fälle (Frequenz)	Kontroll (Frequenz)	P	Fälle (Frequenz)	Kontroll (Frequenz)	P	Fälle (Frequenz)	Kontroll (Frequenz)	P
1 (11121)	0,253	0,238	0,502	0,246	0,244	0,930	0,231	0,258	0,241	0,246	0,245	0,982
2 (11122)	0,112	0,137	0,155	0,131	0,114	0,339	0,134	0,112	0,210	0,128	0,121	0,683
3 (11222)	0,016	0,034	0,039	0,023	0,026	0,712	0,024	0,025	0,863	0,034	0,016	0,041
4 (12221)	0,025	0,023	0,855	0,025	0,025	0,894	0,024	0,027	0,724	0,021	0,028	0,387
5 (21222)	0,021	0,015	0,411	0,019	0,017	0,802	0,015	0,021	0,405	0,016	0,019	0,674
6 (22212)	0,234	0,237	0,923	0,244	0,231	0,583	0,250	0,225	0,274	0,226	0,245	0,385
7 (22222)	0,253	0,238	0,502	0,246	0,244	0,223	0,316	0,330	0,605	0,326	0,321	0,849

Haplotyp	<u>MetS (ATP III) ja/nein</u>			<u>MetS (IDF) ja/nein</u>			<u>Diabetes</u>			<u>OGTT Glukose</u>		
	Fälle (Frequenz)	Kontroll (Frequenz)	P	Fälle (Frequenz)	Kontroll (Frequenz)	P	Fälle (Frequenz)	Kontroll (Frequenz)	P	Fälle (Frequenz)	Kontroll (Frequenz)	P
1 (11121)	0,272	0,239	0,222	0,275	0,234	0,039	0,240	0,247	0,889	0,254	0,239	0,518
2 (11122)	0,116	0,126	0,618	0,115	0,129	0,428	0,127	0,123	0,954	0,119	0,128	0,605
3 (11222)	0,013	0,029	0,117	0,003	0,025	0,915	0,027	0,025	0,888	0,016	0,034	0,037
4 (12221)	0,026	0,025	0,936	0,026	0,024	0,923	0,009	0,018	0,464	0,026	0,024	0,764
5 (21222)	0,010	0,020	0,219	0,013	0,021	0,262	0,011	0,001	0,030	0,021	0,015	0,411
6 (22212)	0,220	0,241	0,459	0,215	0,251	0,139	0,213	0,238	0,724	0,227	0,246	0,405
7 (22222)	0,337	0,319	0,554	0,327	0,320	0,806	0,357	0,321	0,548	0,332	0,313	0,450

Danksagung

Mein herzliches Dankeschön soll an alle Menschen gehen, die Anteil an der Entstehung dieser Doktorarbeit haben und von denen ich immer Unterstützung bekommen habe.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Stefan Schreiber für die Möglichkeit an der Medizinischen Klinik I meine Dissertation zu erstellen.

Ganz besonderen Dank richte ich an Frau PD Dr. Diana Rubin, die die Doktormutterschaft für diese Arbeit übernommen hat. Sie hat unheimlich viel Geduld bewiesen und immer Tipps und Anregungen dazub beigetragen.

Auch ein Dankeschön gilt Frau Dr. Annegret Auinger, die zu Beginn der Arbeit als Betreuerin für mich da war.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dipl. Stat. Dr. rer. nat. Sandra Freitag-Wolf (Institut für medizinische Statistik und Informatik UKSH Kiel), die meine Ansprechpartnerin in Sachen statistische Auswertung war. Ich weiß es wirklich sehr zu schätzen, dass sie sich viel Zeit für mein fachliches Anliegen genommen hat.

Ebenso ein besonderes Dankeschön möchte ich an Herrn Dr. Nothnagel, Universität Köln, Center for Genomics, richten. Er hat mich bei den Berechnungen für die Haplotypenanalyse unterstützt.

Zum Schluss möchte ich noch ein Dankeschön an die technischen Assistentinnen des Instituts für klinische Molekularbiologie richten, diese haben sehr sorgfältig und freundlich die Genotypisierung durchgeführt.

Tabellarischer Lebenslauf:

Name: Levke Englert
Geburtstag: 29. April 1987
Geburtsort: Bremerhaven

1. Schulausbildung

1993 – 1997 Grundschule am Hinschweg Langen
1997 – 1999 Orientierungsstufe Langen
1999 – 2003 Wilhelm Raabe Gymnasium Bremerhaven
2003 – 2006 Lloyd Gymnasium Bremerhaven
2006 Abitur

2. Akademischer Werdegang

Studium

Fachrichtung: Zahnmedizin
Dauer: Oktober 2006 – Juni 2012
Ort: Christian-Albrecht-Universität zu Kiel
2008 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
2009 1.Staatsexamen
2012 2.Staatsexamen
2012 Approbation

Dissertation: „Assoziation von genetischer Varianz im Visfatingen zu Parametern des metabolisches Syndroms“

Beruf

Wissenschaftliche Mitarbeiterin und angestellte Zahnärztin am Universitätsklinikum Erlangen-Nürnberg Zahnklinik-1, Zahnerhaltung und Parodontologie