

Aus dem Institut für klinische Molekularbiologie
(Direktoren: Prof. Dr. Stefan Schreiber, Prof. Dr. Philip Rosenstiel,
Prof. Dr. Andre Franke)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Fall-Kontroll-Assoziationsstudie etablierter genetischer Risikofaktoren einer
tiefen Beinvenenthrombose mit dem Phänotyp Varikosis und Subphänotyp
Phlebitis sowie epidemiologische Bedeutung des Subphänotyps Phlebitis in
einer deutschen Stichprobe**

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

Vorgelegt von
Marko Gawlick
aus Neu Kaliß
Kiel 2021

1. Berichterstatter*in: Prof. Dr. Susanna Nikolaus

2. Berichterstatter*in: Priv.-Doz. Dr. Sascha Gerdes

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 30.08.2021

gez.: Prof. Dr. Almut Nebel

(Vorsitzende der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren des Venenleidens	1
1.2 Bedeutung des chronischen Venenleidens	2
1.3 Anatomie und Physiologie des Venensystems	2
1.4 Einteilung und Klassifikation der Varikosis	6
1.4.1 Einteilung der Varikosis	6
1.4.2 CEAP Klassifikation	6
1.5 Histologie	10
1.5.1 Histologie der gesunden Venenwand	10
1.5.2 Histologie der varikösen Venenwand	12
1.6 Molekulare Veränderungen der Venenwand	13
1.6.1 Vasodilatation	13
1.6.2 Inflammatorische Prozesse	15
1.6.3 Remodeling der Venenwand	16
1.7 Pathophysiologie der Varikosis	18
1.7.1 Pathophysiologie der primären Varikosis	18
1.7.2 Pathophysiologie der sekundären Varikosis	19
1.8 Subphänotyp Phlebitis	21
1.9 Hereditäre Thrombophilie	22
1.10 Etablierte genetische Thrombosefaktoren	22
1.10.1 APC-Resistenz (rs6025)	23
1.10.2 Prothrombinmutation (rs1799963)	24
1.10.3 Antithrombinmangel (rs2227589)	25
1.10.4 Glykoprotein 6 Polymorphismus (rs1613662)	25

1.10.5 KLKB1 Polymorphismus (rs3087505)	25
1.10.6 CYP4V2 Polymorphismus (rs13146272)	26
1.10.7 Faktor 11 Polymorphismus (rs3756008)	26
1.11 Genetische Aufklärung komplexer Erkrankungen	27
1.11.1 Heritabilität der Varikosis	27
1.11.2 Assoziationsanalysen	27
1.11.3 Fall-Kontroll-Studien	28
1.12 Bekannte genetische Assoziationen mit dem Phänotyp Varikosis	28
1.13 Zielsetzung der Studie	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Rekrutierung der Kohorte	31
2.2 Datenerfassung	31
2.3 Phänotypisierung	33
2.4 Probengewinnung	34
2.5 DNA Isolation aus EDTA Vollblut	34
2.6 Qualitätssicherung durch Agarose-Gelelektrophorese	36
2.7 Whole Genom Amplification (WGA)	37
2.8 Genotypisierung mittels TaqMan®-PCR	39
2.9 Praktische Durchführung der TaqMan®-PCR	41
2.10 Statistische Auswertung	43
2.10.1 Testung der Genotypen auf Abweichung vom Hardy-Weinberg Equilibrium	43
2.10.2 Analyse der Einzelpunktassoziation und Power-Schätzung	43
2.10.3 Logistische Regressionsanalyse	44
2.10.4 Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni	44
3 Ergebnisse	45
3.1 Charakterisierung der Patientenkohorte	45
3.2 Schweregrade des Patientenkollektives	46

3.3 Epidemiologie thromboembolischer Ereignisse	47
3.4 Der Subphänotyp Phlebitis	48
3.5 Phlebitis in Abhängigkeit zum CEAP Stadium	49
3.6 Geschlechtsspezifität des Subphänotyps Phlebitis	50
3.7 Phlebitis, ein Subphänotyp des mittleren und höheren Alters	51
3.8 Ergebnisse der Assoziationsanalyse des Phänotyps Varikosis	52
3.9 Ergebnisse der Assoziationsanalyse des Phänotyps Varikosis nach logistischer Regressionsanalyse für Alter und Geschlecht	55
3.10 Ergebnisse der Assoziationsanalyse des Subphänotyps Phlebitis nach logistischer Regressionsanalyse für Alter und Geschlecht	56
3.11 Ergebnisse der Assoziationsanalyse des Phänotyps Varikosis in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung	58
4 Diskussion	59
4.1 Auswahl des Studiendesigns	59
4.2 Diskussion der Gesamtkohorte	62
4.3 Assoziation der Kandidatengene mit dem Phänotyp Varikosis	65
4.4 Phlebitis, ein klinisch bedeutender Subphänotyp	67
4.5 Assoziation der Kandidatengene mit dem Subphänotyp Phlebitis	69
4.6 Bewertung der Ergebnisse	70
4.7 Ausblick	73
5 Zusammenfassung	74
6 Literaturverzeichnis	76
7 Anhang	96

Abkürzungsverzeichnis, Einheiten und Symbole

8-Epi - PGF	2α 8-epi-Prostaglandin (PG) F _{2α}
CEAP	Klassifikationsschema für Venenerkrankungen nach 4 Kriterien: C= klinisch, E= ätiologisch, A= anatomisch, P= pathophysiologisch
C1 - C6	Stadien nach CEAP Einteilung
CVI	Chronisch venöse Insuffizienz
Cyp3A4	Cytochrom P450 3A4
DNA	deoxyribonucleic acid (deutsch: DNS=Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EL Puffer	Erythrozyten Lyse Puffer
EtBr	Ethidiumbromid
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
h^2	Heritabilität (narrow sense) [%]
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium (deutsch: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht)
ICAM - 1	Intercellular adhesion molecule
IKMB	Institut für Klinische Molekularbiologie
KI	95%-Konfidenzintervall
MAP - Kinasen	Mitogen-Activated Protein Kinasen
MEK	Mosel-Eifel-Klinik
MMP	Matrixmetalloproteinasen

ml	Milliliter
Mrd.	Milliarden
µl	Mikroliter
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NO-Synthetase	Stickstoffmonoxid-Synthetase
OR	Odds Ratio (das Quotenverhältnis)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
popgen Biobank	Populationsgenetisches Forschungsprojekt des Nationalen Genom-Forschungsnetzes und des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein; http://www.epi.uni-kiel.de/de/biobank-popgen
RS-Nummer	SNP Identifikationsnummer
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SNP	Singe Nucleotid Polymorphism (Einzelnukleotidpolymorphismus)
STR	Short tandem repeats (deutsch: kurze hintereinander auftretende Wiederholungen)
TE Puffer	Tris-EDTA-Puffer (Tris-Ethylenediaminteraessigsäure Puffer)
TVT	Tiefe Venenthrombose
TGF - β1	Transforming Growth Factor β1
U/min	Umdrehungen pro Minute
WGA	Whole Genom Amplifikation (Amplifikation des gesamten Genoms)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Übersicht der großen Beinvenen.	5
Abbildung 2	Darstellung verschiedener C - Stadien nach CEAP.	9
Abbildung 3	Histologie einer normalen Stammvene.	11
Abbildung 4	Histologie einer varikös veränderten Stammvene.	12
Abbildung 5	Pathogenese der primären und sekundären Varikosis.	20
Abbildung 6	Maske des Inhouse -Tools der Biodatenbank popgen.	33
Abbildung 7	Schematische Darstellung der WGA.	38
Abbildung 8	Schematischer Ablauf der TAQMAN® Genotypisierung.	40
Abbildung 9	Verteilung des Subphänotyps Phlebitis in der Gesamtkohorte.	48
Abbildung 10	Verteilung des Subphänotyps Phlebitis nach C-Stadien.	49
Abbildung 11	Geschlechtsspezifität der Phlebitis.	50
Abbildung 12	Abhängigkeit des Subphänotyps Phlebitis vom Patientenalter.	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Darstellung der CEAP Klassifikation.	8
Tabelle 2	Übersicht der getesteten Thrombosefaktoren.	23
Tabelle 3	Übersicht der Sequenzen der Thrombosefaktoren für das TaqMan® Assay.	42
Tabelle 4	Übersicht der untersuchten Stichprobe.	46
Tabelle 5	Übersicht thromboembolischer Ereignisse der Fallkohorte.	47
Tabelle 6	Übersicht der verwendeten SNPs.	52
Tabelle 7	Übersicht der unadjustierten Ergebnisse der Assoziationsanalyse des Phänotyps Varikosis.	53
Tabelle 8	Übersicht der adjustierten Ergebnisse der Assoziationsanalyse des Phänotyps Varikosis.	55
Tabelle 9	Übersicht der adjustierten Ergebnisse der Assoziationsanalyse des Subphänotyps Phlebitis.	56
Tabelle 10	Übersicht der adjustierten Ergebnisse der Assoziationsanalyse des Phänotyps Varikosis mit dem Erkrankungsstadium in der Patientenkohorte.	58
Tabelle 11	Patientenkollektive im Vergleich.	64
Tabelle 12	Kalkulierte Stichprobengröße für den Subphänotyp Phlebitis.	71

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren des Venenleidens

Venenerkrankungen zeigen eine hohe Prävalenz in den Industriestaaten (Evans et al., 1999; Fischer et al., 1981, Rabe et al., 2003 und 2016; Michaelis et al., 2006) und können demnach als Volkskrankheit betrachtet werden. In Großbritannien wird eine Prävalenz von 20-40% der Erwachsenen Bevölkerung angenommen (Michaelis et al., 2006). Entsprechend der bevölkerungsrepräsentativen Bonner Venenstudie zeigen nur 9,6% (Rabe et al., 2003) der Erwachsenen keine Zeichen (C0 nach CEAP Klassifikation) einer sichtbaren varikösen Veränderung und die Prävalenz wird mit 5-18% unter Frauen sowie 7-15% unter Männern angegeben (Evans et al., 1999; Rabe et al., 2003; Carpentier et al., 2004). Immerhin zeigen mehr als 30% relevante Veränderungen des Venensystems (C2-C6 nach CEAP Klassifikation), welche einer medizinischen Behandlung bedürfen (Rabe et al., 2003), auch aktuelle epidemiologische Daten beschreiben eine Inzidenz von ca. 2% pro Jahr (Rabe et al., 2016) und unterstreichen die Bedeutung der Varikosis als Volkskrankheit. Eine epidemiologische Studie in Belgien und Luxemburg zeigte bei 61,3% der über 6000 durch Hausärzte eingeschlossenen Patienten variköse Veränderungen (Vuylsteke et al., 2015).

Die Ursachen der Varikosis sind vielschichtig, so werden diverse Risikofaktoren diskutiert. Bedeutende Risikofaktoren sind Übergewicht (Rabe et al., 2003; Sadick et al., 1992), höheres Lebensalter (Chiesa et al., 2005; Carpentier et al., 2004; Jawien et al., 2003; Rabe et al., 2003), weibliches Geschlecht (Chiesa et al., 2005; Carpentier et al., 2004; Jawien et al., 2003; Rabe et al., 2003), Schwangerschaft (Chiesa et al., 2005; Carpentier et al., 2004; Rabe et al., 2003) sowie langes Stehen und Sitzen (Sadick et al., 1992). Auch eine lange Krankheitsdauer sowie der Krankheitsbeginn konnten als Risikofaktoren einer Varikosis identifiziert werden (Fiebig et al., 2010). Darüber hinaus wurde erst kürzlich die Körpergröße im Rahmen einer multizentrischen Kohortenstudie als unabhängiger Risikofaktor beschrieben (Fukaya et al., 2018). Allerdings wurde bereits frühzeitig eine genetische Komponente angenommen und in den Zwillingsstudien von Niermann postuliert (Niermann et al., 1964) und in neueren Studien bestätigt (Ellinghaus et al., 2017; Bharath et al., 2014; Krysa et al., 2012;

Fiebig et al., 2010). Auch die Tatsache, dass sportlich aktive und normalgewichtige Menschen ohne Risikofaktoren wie Übergewicht, höherem Lebensalter oder mit weder stehenden noch überwiegend sitzenden Tätigkeiten an Varikosis erkranken, untermauert die Hypothese eines genetischen Einflusses auf die Krankheitsentstehung. Auch einige epidemiologische Studien (Lee et al., 2003; Fischer et al., 1981) zeigen eine positive Familienanamnese und bekräftigen die Annahme einer genetischen Disposition.

1.2 Bedeutung des chronischen Venenleidens

Neben der Bedeutung der Varikosis aus epidemiologischer Sicht spielt auch die medizinische und sozialmedizinische Betrachtung dieser Volkskrankheit eine wichtige Rolle. Besonders die Verminderung der Lebensqualität (Rabe et al., 2003; Vanhoutte et al., 1997) beispielsweise aufgrund der typischen Stauungsbeschwerden (Rabe et al., 2003) führt zu Einbußen im privaten und beruflichen Bereich (Vuylsteke et al., 2015; Augustin et al., 1999). Auch schwerwiegende medizinische Komplikationen, welche im Verlauf der Erkrankung auftreten können, müssen bedacht werden. Stellvertretend seien hier die Thrombose und *Ulcera cruris* genannt. Auch die Belastungen für das Gesundheitssystem sind angesichts der steigenden Prävalenz enorm und beliefen sich laut dem statistischen Bundesamtes für das Jahr 2006 auf 2,2 Mrd. Euro (Rabe et al., 2009). Da aufgrund der Veränderungen der Bevölkerungsstruktur der Anteil der Menschen mit einem höheren Lebensalter zunehmen wird, müssen zukünftig trotz Kostenersparnissen durch ambulante Behandlungen, ähnliche oder zunehmende Belastungen für das Gesundheitssystem zukünftig erwartet werden. Aufgrund der enormen Bedeutung für den Menschen aus medizinischer, sozialer und ökonomischer Sicht ist eine gezielte Ursachenforschung der varikösen Venenerkrankung notwendig.

1.3 Anatomie und Physiologie des Venensystems

Die Venen der unteren Extremität lassen sich drei verschiedenen Systemen zuordnen, dem oberflächlichen (extra-/epifaszialen) und einem tiefen (subfaszialen) Venensystem. Das subfasiale und epifasziale System kommunizieren über das dritte

System, dem transfaszialen Venensystem miteinander (*Venae Perforantes*) (Sobotta., 2006; Kappert et al., 1979).

Das subfasziale System besteht vor allem aus den tiefen Leitvenen (*Vena tibialis anterior* und *posterior* sowie *Vena poplitea* und *femoralis*), welche meist mit den gleichnamigen Arterien verlaufen. Die Venen des Unterschenkels vereinigen sich auf Höhe der Kniekehle zur *Vena poplitea* (subfasziale Kniekehlenvene). Die tiefen Leitvenen der unteren Extremität besitzen Venenklappen, welche einen herzwärts gerichteten Blutstrom zulassen. Die Venen des Beckens (*Venae iliaca*e) sowie die untere Hohlvene (*Vena cava inferior*) sind frei von Venenklappen. Die epifaszialen Venen bestehen aus den großen Stammvenen (*Vena saphena parva* und *magna* (große und kleine Rosenvene)) und einem venösen subkutanen Venennetz (*Rete venosum subcutaneum*). Die Stammvenen münden in das tiefe Venensystem über direkte Verbindungen (Crossen). Die große Stammvene (*Vena saphena magna*) verläuft dabei vom Innenknöchel des medialen Fußrandes über den *Hiatus saphenus* am Oberschenkel zur Leiste, um in die *Vena femoralis*, dem tiefen Venensystem, zu münden. Die *Vena saphena parva* (kleine Stammvene) entsteht aus den Venen des Fußrückens (*Vena marginalis externa*) und verläuft vom hinteren Außenknöchel des Fußes dorsal am Oberschenkel entlang um dann inkonstant durch die Faszie ins tiefe Venensystem (*Vena poplitea*) zu münden. Das oberflächliche und das tiefe Venensystem sind durch die *Venae perforantes* (transfasziales Venensystem) miteinander verbunden, wobei mehr als 90 unterschiedliche Perforansvenen beschrieben sind (Neer et al., 2003; Rijcke et al., 2003). Klinisch bedeutsam sind dabei die Boyd'schen, Cockett'schen Perforansvenen sowie die Gastroknemikusperforansvene am Unterschenkel und die Dott'sche Perforansvene am Oberschenkel (van Linborgh et al., 1981). Alle Perforansvenen besitzen Venenklappen, welche einen einseitig gerichteten Blutstrom vom oberflächlichen zum tiefen Venensystem erzeugen. Das tiefe Venensystem gewährleistet einen herzwärts gerichteten Blutstrom durch die vorhandenen Venenklappen, wobei der Antrieb der Blutströmung durch die Muskelpumpe erzeugt wird. Dabei spielt die Fußmuskelpumpe der Plantarvenen und die Muskelpumpe der Wadenmuskulatur sowie die Gelenkpumpe des Sprunggelenks eine entscheidende Rolle (Staubesand et al., 1984). Die Intakten Venenklappen gewährleisten somit einen Transport entgegen der Schwerkraft und sind daher für den Blutstrom von entscheidender Bedeutung. Sie können bei unzureichender Funktion zur Ausbildung variköser Veränderungen der

Venen führen. Befindet sich das venöse Blut in den Venen des kleinen Beckens, so befördert die Druckerhöhung im Abdomen durch das Tiefertreten des Zwerchfells bei Inspiration das Blut in die untere Hohlvene des Thoraxes, da es dort gleichzeitig zu einer Druckminderung kommt. In den Perforansvenen wird der Transport ins tiefe Venensystem ebenfalls durch die Muskelpumpe und den Venenklappen garantiert. In der Systole, also Anspannungsphase der Unterschenkelmuskulatur, wird das tiefe Venensystem komprimiert und das Blut bei gleichzeitigem Verschluss der Venenklappen befördert. In der Diastole, also Entspannungsphase der Muskulatur, wird das Blut, durch den Druckunterschied zwischen tiefen und oberflächlichen Venensystem, in die tiefen Leitvenen befördert. Durch den geringen Druck im subfaszialen Venensystem und dem hohen Druck in den Perforansvenen kann das Blut ins tiefere Leitsystem abfließen. Das oberflächliche, retikuläre Venengeflecht und deren klappenlosen *Venae communicantes* speisen vor allem die Stammvenen und die Perforansvenen. Während die Perforansvenen in der Diastole der Muskelpumpe das Blut in tiefe Venen befördern, wird in den Stammvenen das Blut durch den äußeren Druck und den vorhandenen Venenklappen herzwärts transportiert.

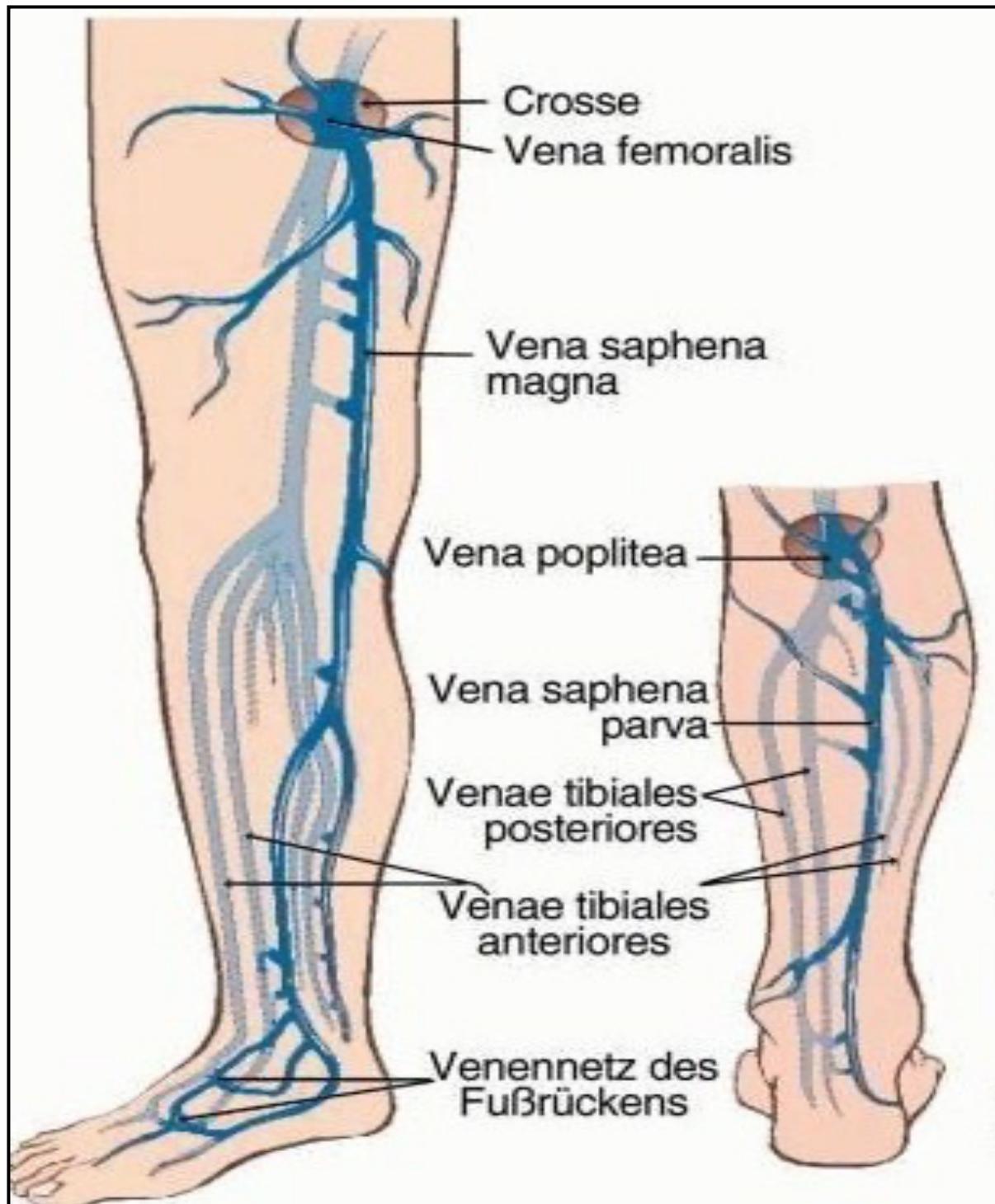


Abbildung 1 Übersicht der großen Beinvenen. Die Abbildung zeigt schematisch die großen Venen der unteren Extremität. Insbesondere die Stammvenen *Vena saphena magna* und *parva* (kleine und große Rosenvene) sind häufig von einer Varikosis betroffen. Die *Vena saphena magna* verläuft an der medialen Seite des Unter- und Oberschenkels und entspringt am medialen Fußrand, um im Venenstern (*Crosse*) ins tiefe Venensystem zu münden. Die kleine Rosenvene verläuft vom Fußrücken dorsal und mündet in die *Vena poplitea*. (aus Gefäßdiagnostik mit Ultraschall. Lehrbuch und Atlas. Thieme Verlag, 1999).

1.4 Einteilung und Klassifikation der Varikosis

1.4.1 Einteilung der Varikosis

Die Einteilung erfolgt in primäre idiopathische Varikosis (ca. 95%), verursacht durch genetische Disposition sowie weiteren Risikofaktoren, insbesondere Alter und Geschlecht (Fiebig et al., 2010; Rabe et al., 2003) oder in die sekundäre Varikosis (ca. 5%) als Folge einer anderen Grunderkrankung des Venensystems, insbesondere der tiefen Beinvenenthrombose (Herold Innere Medizin 2017). Die primäre Varikosis wird unterschieden in die Stammvenenvarikosis, Seitenastvarikosis, Varikosis durch insuffiziente *Venae perforans*, retikuläre Varikosis, die Besenreiserverarzten sowie als Besonderheit in die pudendale Varikosis eine medial der Adduktorenkanäle gelegene Varikosis (Rabe et al., 1999). Als chronisch venöse Insuffizienz bezeichnet man eine Varikosis im fortgeschrittenen Krankheitsstadium mit deutlichen klinischen Veränderungen. Für die vorliegende Studie ist insbesondere die Stammvenenvarikosis von großem Interesse. Als Stammvenenvarikosis bezeichnet man eine variköse Veränderung der *Vena saphena magna* und/oder *parva* (große und kleine Rosenvene).

1.4.2 CEAP Klassifikation

Neben den veralteten Klassifikationssystemen nach Hach (Hach et al., 1977) und Widmer (Widmer et al., 1981) spielt in der klinischen Forschung als auch im diagnostischen Bereich die CEAP Klassifikation die entscheidende Rolle. Bei der CEAP Klassifikation handelt es sich um eine genauere Klassifikation der Varizen und der chronisch venösen Insuffizienz und wird bei den Patienten unserer Kohorte zur exakten klinischen Klassifikation der Varizen verwendet (Eklof et al., 2004; Kistner et al., 1995). Diese Klassifikation ist das derzeit aktuellste Einteilungsschema für chronische Venenerkrankungen, welches 1994 durch ein internationales Ad-hoc-Komitee des *American Venous Forum* (AVF) erarbeitet wurde und in die *Reporting Standards in Venous Diseases* übernommen (Kistner et al., 1996; Porter et al., 1995) sowie überarbeitet worden ist (Eklof et al., 2004). Dabei steht das Synonym CEAP für die Bereiche Klinik (C (engl. *Clinic*)), Ätiologie (E (engl. *Etiology*)), anatomische Ausprägung (A (engl. *Anatomy*)) und Pathophysiologie (P (*Pathophysiology*)). Klinisch unterscheidet man die Klasse 0 bis Klasse 6, wobei die Klasse 0 keine sichtbaren

Zeichen einer venösen Erkrankung darstellt. Die Klasse 1 (C1) entspricht den Teleangiektasien oder retikulären Venen. Ab Klasse 2 (C2) stellt sich das Krankheitsbild der Varikosis dar. Sind zudem noch Ödeme vorhanden, ordnet man dieses der Klasse 3 (C3) zu. Von der CEAP Klasse 4 (C4) spricht man beim Vorhandensein von Hautveränderungen (z.B. Hyperpigmentation). Eine chronisch venöse Insuffizienz (CVI) nach Ulzeration beschreibt die Klasse 5 (C5) und das aktive Ulkus wird als Klasse 6 (C6) kategorisiert. Ätiologisch unterscheidet man die kongenitale (Ec) von der primären (Ep) und der sekundären (Es) Varikosis mit bekannter Ursache (z.B. postthrombotisch). Anatomisch wird in ein oberflächliches (engl. superficial) System (As) und in tiefe (engl. deep) Venen (Ad) sowie in Vv. *Perforantes* (Ap) unterschieden. Pathophysiologisch werden zudem der Reflux (Pr) und die Obstruktion (Po) unterschieden. Die oberflächlichen und tiefen Venen werden durchnummerniert (Eklof et al., 2004). Die häufigste Form der Varikosis ist die primäre Stammvarikosis der *Vena saphena magna* nach CEAP Einteilung (C2, Ep, As, 2,3, Pr).

Tabelle 1 Darstellung der CEAP Klassifikation. Die Übersicht zeigt das aktuell gültige Klassifikationsschema nach CEAP Klassifikation (Eklof et al., 2004) mit der klinischen, ätiologischen, anatomischen und pathophysiologischen Einteilung der Varikosis.

Klinische Klassifizierung	
C ₀	Keine sichtbaren oder tastbaren Zeichen venöser Erkrankung
C ₁	Teleangiektasien oder retikuläre Venen
C ₂	Varizen
C ₃	Ödeme ohne Hautveränderungen
C _{4a}	Hautveränderungen (Pigment oder Ekzem)
C _{4b}	Hautveränderungen (Lipodermatosklerose oder <i>Atrophie blanche</i>)
C ₅	Abgeheiltes venöses Ulkus
C ₆	Aktives venöses Ulkus
S	Symptomatisch
A	Asymptomatisch
Ätiologische Klassifizierung	
E _c	Kongenital
E _p	Primär
E _s	Sekundär (Postthrombotisch)
E _n	Keine venöse Ursache feststellbar
Anatomische Klassifizierung	
A _s	Superfizielle, oberflächliche Venen
A _{s1}	Teleangiektasien oder retikuläre Venen
A _{s2}	V. saphena magna oberhalb des Knies
A _{s3}	V. saphena magna unterhalb des Knies
A _{s4}	V. saphena parva
A _{s5}	Nichtsaphenavarizen
A _d	Tiefe Venen (<i>Deep veins</i>)
A _{d6}	V. cava inferior
A _{d7}	V. iliaca communis
A _{d8}	V. iliaca interna
A _{d9}	V. iliaca externa
A _{d10}	Beckenvenen
A _{d11}	V. femoralis communis
A _{d12}	V. femoralis profunda
A _{d13}	V. femoralis superficialis
A _{d14}	V. poplitea
A _{d15}	Unterschenkelvenen
A _{d16}	Muskelvenen
A _p	Venae perforantes
A _{p17}	Oberschenkel
A _{p18}	Unterschenkel
Pathophysiologische Klassifizierung	
P _r	Reflux
P _o	Obstruktion
P _{r, o}	Reflux und Obstruktion
P _n	Keine venöse Pathophysiologie feststellbar

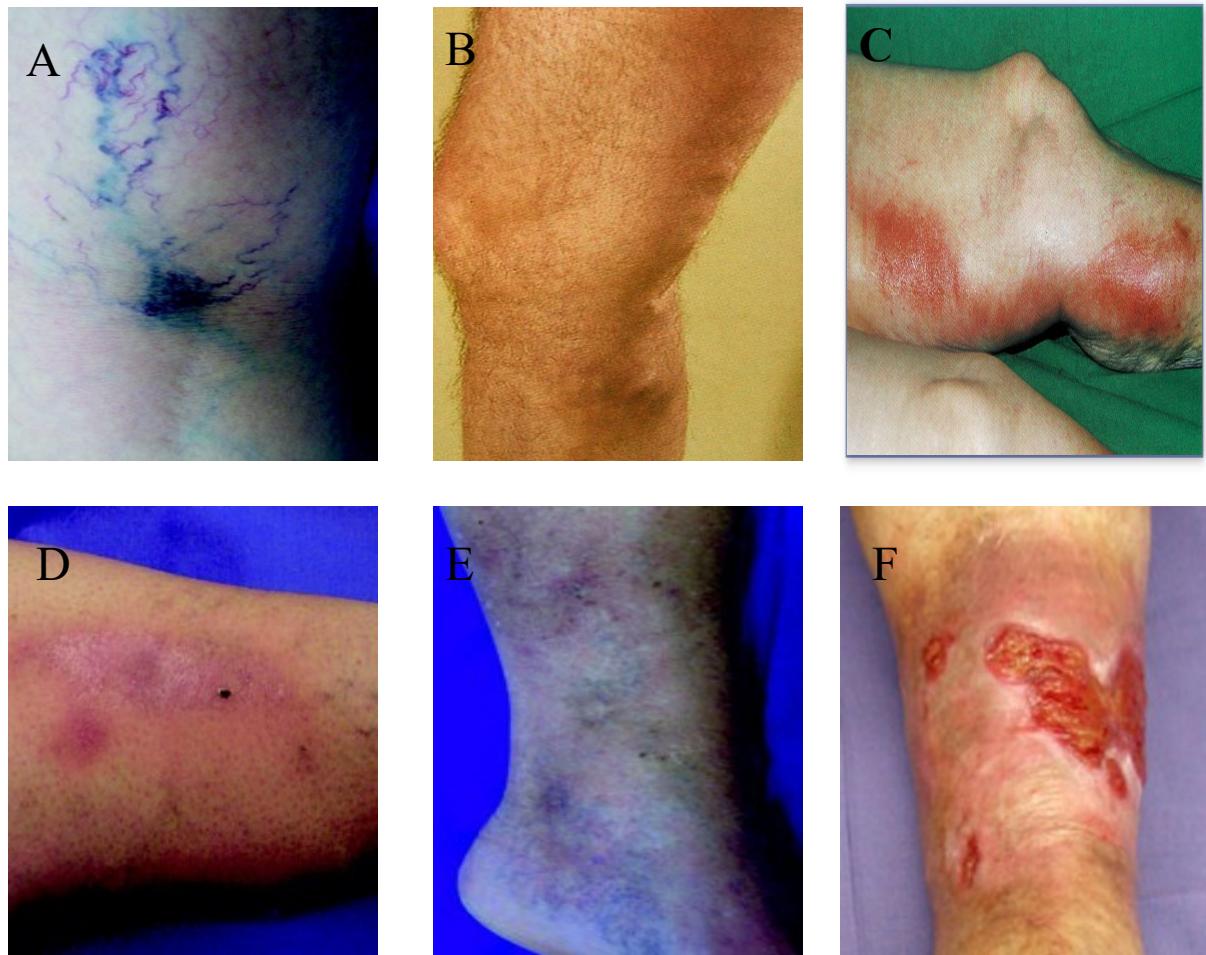


Abbildung 2 Darstellung verschiedener C-Stadien nach CEAP. Die Abbildung zeigt exemplarisch einige Stadien nach CEAP Klassifikation. In Abbildung A zeigen sich Besenreiser entsprechend dem Stadium C1. Abbildung B zeigt eine Stammvenenvarikosis der *Vena saphena magna* Stadium C2 nach CEAP Klassifikation. Abbildung C und D zeigen das Stadium C4a mit Hautveränderung (Ekzem) sowie beginnendem Ulkus in Abbildung D. In Abbildung E ist das Stadium C4b nach CEAP mit einer *Atrophie blanche* dargestellt. Die Abbildung E zeigt eine chronisch venöse Insuffizienz mit aktivem Ulkus somit Stadium C6 nach CEAP Klassifikation.(Bilder mit freundlicher Unterstützung von Dr. med. P. Krusche, Mosel-Eifel-Klinik und dem Kompetenznetz Chronische Venenkrankheiten, Dr. rer. nat. Andreas Fiebig).

1.5 Histologie

1.5.1 Histologie der gesunden Venenwand

Aufgrund des geringeren Druckes im Venensystem ist die Venenwand elastischer und lockerer aufgebaut als die Arterienwand. Die Venenwand wird analog zur Arterienwand in drei Schichten unterteilt. Durch den unregelmäßigen Aufbau der Venenwand lassen sich die Schichten jedoch weniger deutlich voneinander trennen. Die *Tunica intima* ist die innerste Schicht und dem Blutstrom ausgesetzt. Sie besteht aus Endothelzellen, die einschichtig in die extrazelluläre Matrix eingelagert sind. Das Endothel ist antithrombogen um eine Anheftung von Thrombozyten zu verhindern (Mann et al., 2001; Thum et al., 2000; Barthels et al., 1996). Die sich anschließende *Tunica media* besteht aus ringförmig angeordneten Muskelfaserbündeln, die netzartig untereinander verknüpft sind. Dazwischen liegen kollagene und elastische Netze, welche beide annähernd achsenparallel verlaufen (Sanchez-Hanke et al., 2000). Die *Tunica adventitia* enthält als äußerste Schicht ebenfalls kollagene- und elastische Gitter, die in Längsrichtung verlaufen und von netzartig anastomosierten Muskelfasern durchzogen werden. Die *Intima* und die inneren Anteile der *Media* sind gefäßlos und werden durch Diffusion mit Nährstoffen versorgt. Die *Adventitia* besitzt *Vasa vasorum*, die auch in der *Media* vorkommen können. Die Innervation der Venen erfolgt über Nervenbündel, die in der *Adventitia* verlaufen. Die Venenklappen (*Valvulae venosae*) sind halbmondförmige Ausstülpungen der *Intima*. Die Klappensegel bestehen aus einer Endothelfalte und sind durch Einlagerung kollagener Fasergeflechte verstieft. Diese Endothelfalten bilden Venenklappensegel, die sich in der Regel paarweise gegenüberstehen (*bicuspidale* Klappen). Der Blutstrom ist von distal nach proximal gerichtet, ein Reflux wird durch den Klappenschluss der Venenklappen verhindert (Storch et al., 1994). Als typisches kollagenes Bindegewebe besteht die Venenwand zu 60 bis 70 % aus Bausteinen der extrazellulären Matrix mit den Strukturproteinen (Kollagen 50 %, Elastin 15% und Fibrillin), den Adhäsionsproteinen (Fibronektin, Laminin, Tenaskin und Undulin) und der Grundsubstanz (Proteoglykane 1–2 %, Apatit) (Krusche., 2006).

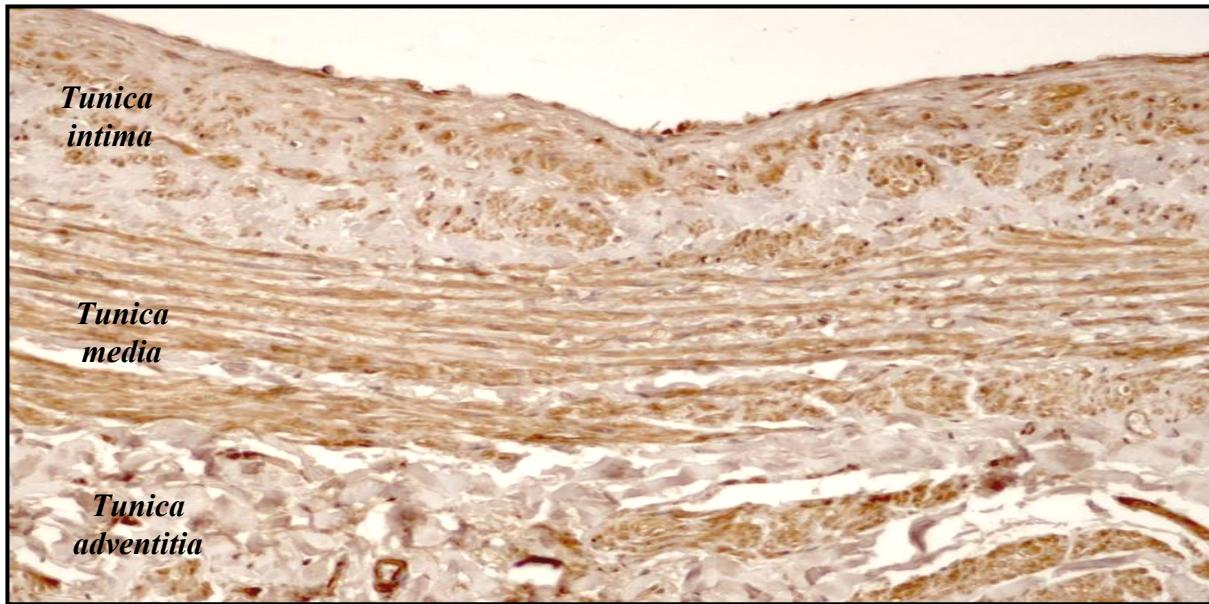


Abbildung 3 Histologie einer normalen Stammvene. Die Abbildung zeigt exemplarisch das Schnittbild einer Stammvene eines Studienteilnehmers mit der klassischen Dreischichtung einer gesunden Venenwand mit der innersten *Tunica intima*, der mittleren *Tunica media* und der äußereren *Tunica adventitia*. (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. Rosenstiel, Kiel).

1.5.2 Histologie der varikösen Venenwand

Histomorphologisch ist die variköse Vene in allen Strukturelementen (*Intima*, *Media* und *Adventitia*) von pathologischen Veränderungen betroffen. So wurde bereits 1971 (Mahrle et al., 1971) elektronenmikroskopisch eine Abnahme der Retraktionsfähigkeit in varikösen Venenabschnitten sowie Veränderungen des Endothels mit unregelmäßig angeordneten Endothelzellen sowie thrombotischen Wandprozessen beschrieben. Des Weiteren wurden Veränderungen der glatten Muskulatur (Staubesand et al., 1978) und der extrazellulären Matrix (Buddecke et al., 1995) beobachtet. Somit zeigt sich vor allem eine Vermehrung des Kollagengehaltes bei gleichzeitiger Abnahme des Elastin gehaltes und konsekutivem Elastizitätsverlust und reduzierter Zugfestigkeit (Buddecke et al., 1995). Insbesondere die Zunahme der Matrixproteine der extrazellulären Matrix resultiert in einer inhomogenen Verdickung der Venenwand (Kirsch et al., 1999). Allerdings sind auch Veränderungen der *Tunica muscularis* mit Umgestaltung der glatten Muskelzellen (Elsharawy et al., 2007) sowie Volumenzunahme (Knaapen et al., 2005) beschrieben und verursachen eine ausgesprochene Inhomogenität im Bereich der *Tunica media*.

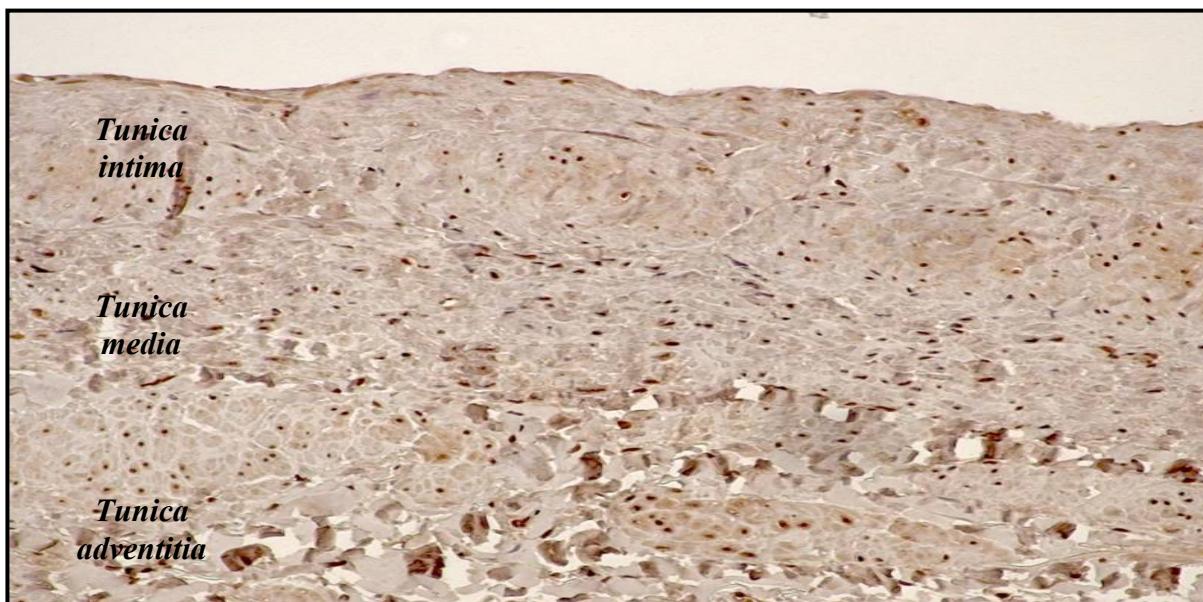


Abbildung 4 Histologie einer varikös veränderten Stammvene. Die Abbildung zeigt exemplarisch eine varikös veränderte Stammvene eines Studienteilnehmers. Aufgrund der morphologischen Umbauprozesse im Rahmen der Varikosis lassen sich die einzelnen Wandschichten nur noch unzureichend voneinander abgrenzen. (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. Rosenstiel, Kiel).

1.6 Molekulare Veränderungen der Venenwand

Der Einfluss molekularer Veränderungen auf die Genese der Varikosis ist bereits längerfristig Gegenstand der Forschung und bisher konnten drei Einflussbereiche und deren mögliche Beteiligung an der Varikosis etabliert werden. Diese Bereiche umfassen die molekularen Ereignisse, welche eine Vasodilatation, inflammatorische Prozesse oder das *Remodeling* der Venenwand herbeiführen oder teilweise einander bedingen.

1.6.1 Vasodilatation

Die Vasodilatation spielt bei der Pathogenese der Varikosis eine bedeutende Rolle, da hierdurch eine Stase (Stillstand) der Blutsäule entsteht und ein Rücktransport des Blutes in die untere Hohlvene (*Vena cava inferior*) erschwert wird. Die damit einhergehende Volumenbelastung der Vene führt somit zu einer Aussackung und Funktionseinschränkung mit langfristigen morphologischen Veränderungen des Gefäßes. Die Vasodilatation kann durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden.

Endothelinrezeptoren

Eine Verringerung der Endothelinrezeptordichte (Agu et al., 2002) hat eine Erweiterung der Venen zur Folge. Endothelin ist ein vasoaktives Peptidhormon und wirkt am Endothelin A und B Rezeptor. Während die Endothelinrezeptoren Typ A vorzugsweise in der glatten Muskulatur vorkommen, ist der Rezeptortyp B auf dem Endothel nachweisbar. Eine Aktivierung des Endothelinrezeptors Typ B hat eine Vasokonstriktion über G-Protein vermittelte Signalkaskaden zur Folge. Eine Verringerung der Rezeptordichte resultiert in einer verminderten Fähigkeit zur Vasokonstriktion.

Wachstumsfaktoren

Eine weitere Ursache der Vasodilatation ist eine erhöhte Konzentration von NO Synthetase und Überexpression von TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor β 1*) (Kowalewski et al., 2010; Jacob et al., 2005), welche als Mediatoren der Venodilatation

fungieren. TGF- β 1 spielt eine Rolle beim Remodeling der Gefäßwand im Zusammenhang mit vaskulären Erkrankungen (Jacob et al., 2005). So bewirken ein erhöhter TGF- β 1 Spiegel und eine verstärkte Synthese von NO-Synthetase eine Einwanderung von Monozyten und Makrophagen sowie eine Verminderung der glatten Muskulatur der Venenwand, welches als gemeinsame Endstrecke eine Vasodilatation erzeugt. Darüber hinaus wird der Faktor 8-Epi-PGF 2 α diskutiert, ein Prostaglandin, welches vasokonstriktiv und proliferierend wirkt und deshalb bei verminderter Plasmaspiegel als Vasodilatator fungiert. So zeigte eine Studie an varikös veränderten Venen einen deutlich verminderter Gehalt an 8-Epi-PGF 2 α (Meghdadi et al., 2003). Außerdem haben auch diverse Metaboliten Einfluss auf den Gefäßtonus, welche durch das Cytochrom P450 gebildet werden und in varikösen Venen in allen Zelltypen erhöht nachzuweisen sind (Bertrand et al., 2003). Durch verstärkte Bildung vasoaktiver Substanzen wie z.B. den Metaboliten der Arachnoidonsäure wird der Venentonus reduziert. Des Weiteren können Polymorphismen des Cyp3A4 zu einer verstärkten Expression beitragen und somit die Morphologie und Funktion der Vene maßgeblich beeinflussen (Bertrand et al., 2003).

Matrixmetalloproteininasen

Matrixmetalloproteininasen (MMP) nehmen Einfluss auf Zellwachstum, Regulation und Differenzierung, indem sie die Zellen einerseits über TGF- α und Integreine stimulieren, andererseits durch Aktivierung von TGF- β oder TNF- α hemmen können. Durch MMPs (insbesondere MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 und MMP-9 und die Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-3) erfolgt eine Aktivierung des Endothels mit folgender Intimahyperplasie sowie Zunahme der glatten Muskulatur auf Kosten der elastischen Eigenschaften. Zudem beeinflussen die MMPs den programmierten Zelltod (Apoptose) und können somit eine Atrophie hervorrufen. Folglich kommt es zu einem Zusammenbruch der extrazellulären Matrix in der Adventitia und Media (Pascarella et al., 2005). Insbesondere MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 und MMP-9 sowie die Inhibitoren der MMPs (TIMP-1 und TIMP-3) werden dabei verstärkt aktiviert (Lim et al., 2009; Pascarella et al., 2005) und führen zu einem morphologischen Umbau der Venenwand (Remodeling). Anderseits nehmen Matrixmetalloproteininasen durch Venodilatation auch direkten Einfluss auf den Blutfluss (Raffetto et al., 2007). Aufgrund dieser

Signalkaskade wurde auch eine Umwandlung der Venenwand, vor allem eine Verschiebung hin zum Kollagen 1 und eine Abnahme der elastischen Elemente innerhalb der Venenwand beobachtet (Lim et al., 2009; Pascarella et al., 2005). Interessanterweise sind 23 MMPs im menschlichen Körper bekannt, wobei mindestens 14 in der extrazellulären Matrix nachzuweisen sind (Lim et al., 2010; Raffetto et al., 2008). Diese vielseitigen Effekte und Einflüsse der MMPs begünstigen auf komplexe Weise eine Dilatation, dennoch ist die Datenlage sehr widersprüchlich und bis dato nicht etabliert.

1.6.2 Inflammatorische Prozesse

Der Einfluss von Entzündungsvorgängen bei der Entstehung des Krampfaderleidens wird diskutiert (Pascarella et al., 2005). Veränderungen an Venenklappen und Gefäßwand gehen Entzündungsvorgänge und Umbauprozesse der Wandstruktur voraus (Pascarella et al., 2005). Durch Scherkräfte an Endothelzellen sowie häodynamische Kräfte oder Blutdruckänderungen in der Venenwand kommt es zur Aktivierung der Endothelzellen und Leukozyten durch Integrine (Transmembranproteine) welche ihrerseits eine Aktivierung von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1) hervorrufen.

Zytokine

Zytokine haben nachweislich einen Einfluss auf die Genese vaskulärer Erkrankungen (z.B. der Arteriosklerose, dem Bauchaortenaneurysma oder dem arteriellen Hypertonus) und zeigen sich auch beim Krampfaderleiden verstärkt in der Venenwand (Sprague et al., 2009). Durch den Einfluss auf zelluläre Vorgänge, sind Zytokine ein wichtiger Mediator in der Entstehung von Varizen. Zytokine interagieren mit der glatten Muskulatur der Gefäße und aktivieren Calcium, Proteinkinasen, MAP- Kinasen oder Signalwege, welche Zellwachstum und Zellmigration steuern und eine Reaktion der glatten Muskulatur zur Folge haben. Des Weiteren interagieren Zytokine mit Integrinen und Matrixmetalloproteininasen (MMP) und haben damit einen modifizierenden Einfluss auf die extrazelluläre Matrix (Sprague et al., 2009).

1.6.3 Remodeling der Venenwand

Ein weiterer wichtiger Faktor in der Entstehung und Progression der Varikosis ist das *Remodeling* der extrazellulären Matrix bzw. die morphologische Veränderung der Venenwand. Eine Veränderung der Venenwand ist durch diverse Vorgänge und Einflussfaktoren möglich, so können sowohl die bereits genannten Entzündungsvorgänge (MMP) oder Vasodilatation (NO Synthetase / TGF- β) oder primär strukturelle Veränderungen zu Umbaumechanismen in der Venenwand führen.

Darüber hinaus ist auch die glatte Muskulatur in der Venenwand von Veränderungen betroffen (Sansilvestri et al., 2005). Anhand von kultivierten Zellen der glatten Muskulatur aus Biopsien variköser Venen konnte gezeigt werden, dass es in der glatten Muskulatur zu einem Abbau von Kollagen Typ 3 und Fibronectin, einem extrazellulärem Glykoprotein durch Metalloproteininasen kommt (Sansilvestri et al., 2005). Der extrazelluläre Abbau von Kollagen Typ 3 und Fibronectin in der glatten Muskulatur hat somit einen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Venenwand und damit eine Mitbeteiligung an der Entstehung der Varikosis (Sansilvestri et al., 2005). Obwohl eine Abnahme von Kollagen und Fibronectin in der glatten Muskulatur zu beobachten ist, zeigen andere Ergebnisse, dass variköse Venen mit einem signifikanten Anstieg der Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix assoziiert sind. Dabei sind vor allem Kollagen Typ 4, Laminin und Tenascin zu nennen. Das Kollagen Typ 4 stellt als netzbildendes Kollagen, genauso wie Laminin, ein Glykoprotein dar und ist Substanz der extrazellulären Matrix und der Basallamina. Tenascin ist ebenfalls ein Glykoprotein und reichhaltig in der extrazellulären Matrix vorhanden, in der es zur Stabilisierung über Vernetzung mit Fibronectin beiträgt. Die genannten morphologischen Veränderungen tragen somit zur Genese der primären Varikosis bei (Kirsch et al., 2000). Das veränderte Expressionsmuster sowie die Akkumulation von Matrixproteinen (Kollagen Typ 4) vor allem in der Intima, aber auch der Media, hat eine Zunahme der Rigidität der Venenwand (Kirsch et al., 1999) und damit Funktionseinbußen zur Folge.

Ferner zeigte sich, dass der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Spiegel bei Patienten mit primärer Varikosis deutlich erniedrigt ist (Erguzel et al., 2012). Als Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI) bezeichnet man Proteine im Blut, die an der Blutgerinnung

beteiligt sind. Sie wirken als Hemmstoff (Inhibitor) der körpereigenen Auflösung eines Blutgerinnsels (Fibrinolyse). Man unterscheidet derzeit vier Typen von Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren, wobei dem Typ 1 (PAI-1) die Hauptbedeutung zukommt. Der Plasminogenaktivatorinhibitor stellt den wichtigsten Hemmstoff des Plasminogenaktivators (engl. *tissue plasminogen activator*, t-PA) dar, welches das inaktive Plasminogen zu Plasmin umwandelt. Die wichtigste Aufgabe des Plasmin ist der Abbau von Fibrinpolymeren, welche im Rahmen der plasmatischen Blutstillung entstehen. PAI-1 zählt zu den Serinen und wird durch das Serpin-1 Gen insbesondere in Endothelzellen, Megakaryozyten und Adipozyten des Viszeralfettes synthetisiert. Circa 80% der PAI-1 Aktivität liegt in den Thrombozyten und beugt im Rahmen der primären Wundheilung einem frühzeitigen Abbau der Fibrinpolymere vor. Bei Vorliegen eines erhöhten Spiegels an PAI-1 steigt das Risiko thromboembolischer Ereignisse. Plasmin hat zudem durch Aktivierung von Matrixmetalloproteininasen und Veränderung der extrazellulären Matrix Einfluss auf die Entstehung/Progression einer Varikosis (Erguzel et al., 2012).

1.7 Pathophysiologie der Varikosis

1.7.1 Pathophysiologie der primären Varikosis

Als Ursache wird eine genetisch bedingte Schwäche der Venenwand diskutiert (Kirsch et al., 2000). Prädisponierende Faktoren sind ein Mangel an Muskelarbeit, erhöhtes Alter, erhöhtes Übergewicht sowie hormonelle Veränderungen z.B. während der Schwangerschaft. Die Bindegewebsschwäche betrifft vor allem die oberflächlichen Venen, welche keine schützende Muskelschicht besitzen und bei einer Erhöhung des intravasalen Druckes stark dilatieren und einen pathologischen Reflux zu Folge haben. Die Veränderungen betreffen vor allem die *Tunica media* und das kollagene Bindegewebsgerüst. Die Dilatation führt bereits frühzeitig zu einer Insuffizienz der Venenklappen und zu Umbauprozessen in der Venenwand und betrifft verstärkt das oberflächliche Venensystem sowie die Perforansvenen. Da der hydrostatische Druck im proximalen Anteil des Venenstamms der *Vena saphena magna* am größten ist, ist diese häufiger (Rabe et al., 2003; Schulte et al., 1998) und zuerst betroffen. Bei einer Insuffizienz der Mündungsklappe (*Crosse*) schreitet die Insuffizienz regelmäßig nach kaudal fort.

1.7.2 Pathophysiologie der sekundären Varikosis

Die sekundäre Varikosis macht nur ca. 5% (Fiebig et al., 2010) bis 28 % (Labropoulos et al., 1997; Kistner et al., 1996) der Fälle aus und hat meistens ein akutes Abstromhindernis der tiefen Venen (insbesondere tiefe Beinvenenthrombose) als Ursache. Dabei können sowohl die Venen des Beckens als auch die tiefen Leitvenen des Unterschenkels betroffen sein. Folglich kommt es zu einem Rückstau und einer Zunahme des intravasalen Druckes. Da die oberflächlichen Venen, aufgrund deren Lage im subkutanen Fettgewebe, wenig Widerstand entgegenzusetzen haben, zeigen sich hier die stärksten Auswirkungen. Sind im Verlauf dann auch die tiefen Venen betroffen, so kommt es zu Dilatation und später Insuffizienz, welche wiederum durch Flussumkehr des Blutes eine Druckerhöhung verursacht. Als Kompensation dilatieren die betroffenen Venenabschnitte und es kommt zu Umbauvorgängen in der Venenwand. Die *Tunica muscularis* wird durch kollagene Fasern ersetzt und verliert die Kontraktilität und Elastizität, sodass die Insuffizienz fortschreitet und im weiteren Progress auch die Venenklappen mit einbezieht. Besteht das Abflusshindernis längere Zeit, so werden die Venen dauerhaft geschädigt und ein variköser Umbau der Venenabschnitte setzt ein. Die meisten Venen rekanalisiieren in den ersten 6 bis 12 Wochen nach dem akuten Ereignis, dennoch zeigen sich relevante Veränderungen der Venenwand welche Obstruktion und Reflux zur Folge haben. Dies mündet in einer Progression der sekundären Varikosis (Labropoulos 1997). Die tiefe Venenthrombose als stärkster Risikofaktor der sekundären Varikosis hat eine Inzidenz von einem Fall auf 1000 Personen (Naess et al., 2007) sowie ein Risiko von 30% rezidivierender Thrombosen in einem Zeitraum von 8 Jahren (Prandoni et al., 1996). Die Bedeutung einer stattgehabten tiefen Beinvenenthrombose wird auch in aktuellen Studien als wichtigster Risikofaktor beschrieben (Fukaya et al., 2018).

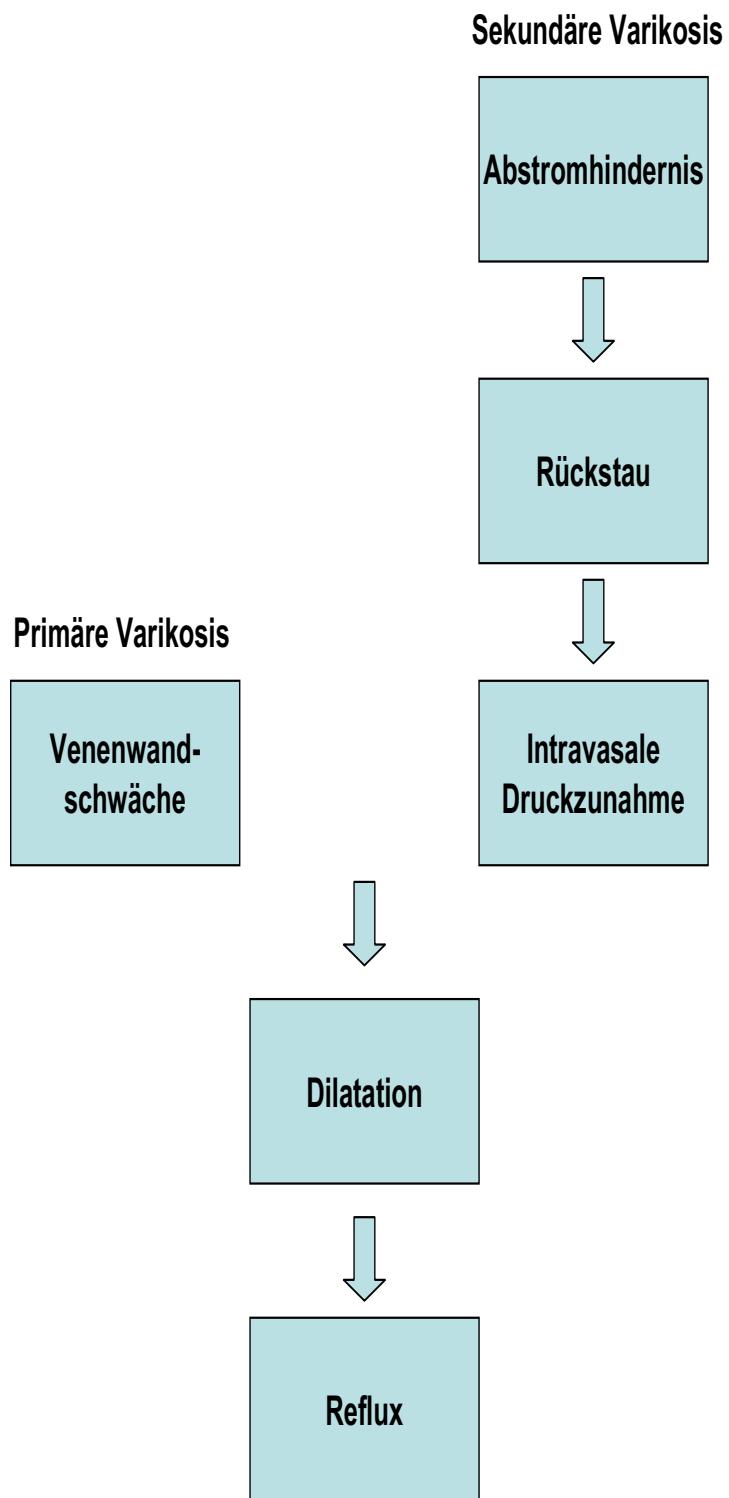


Abbildung 5 Pathogenese der primären und sekundären Varikosis. Die Abbildung zeigt schematisch die unterschiedliche Pathogenese einer Varikosis. Während der primären Varikosis eine Venenwandschwäche (z.B. durch genetische Prädisposition) vorausgeht, entsteht die sekundäre Varikosis im Rahmen eines Abstromhindernis (z.B. im Rahmen einer TVT).

1.8 Subphänotyp Phlebitis

Ein weiterer wichtiger und in der Vergangenheit eher vernachlässigter Risikofaktor für die sekundäre Varikosis stellt die Thrombophlebitis dar. Es handelt sich dabei vor allem um thrombotische Veränderungen an oberflächlichen Venen und kann an der gesunden Vene durch primäre Faktoren wie Venenwandentzündung/-verletzung oder durch sekundäre Faktoren (*Virchow Trias*) wie Stase, erhöhte Blutviskosität oder Endothelveränderungen (Marshall et al., 2008) ausgelöst werden. Viel häufiger und von der Thrombophlebitis der zuvor gesunden Vene abzugrenzen, ist die Varikophlebitis (Venenwandentzündung an varikösen Venen), welche zu 90% Ursache einer oberflächlichen Phlebitis ist und eine Prävalenz von ca. 1% der Gesamtbevölkerung zeigt (Wienert et al., 1999). Die Varikophlebitis ist gekennzeichnet durch eine Entzündung an einer varikös- veränderten oberflächlichen Vene mit Periphlebitis und Thrombusbildung (Marshall et al., 2008). Die Gesamtprävalenz liegt laut Bonner-Venenstudie bei 5,3% (Rabe et al., 2003) und bei Patienten mit Varikosis liegt die Inzidenz zwischen 10 bis 50 %, bei allerdings schlechter Datenlage (Marshall et al., 2007). Insbesondere die Tatsache, dass ein Entzündungsprozess am Beginn der Genese variköser Veränderungen steht, mit der Folge eines thrombotischen Ereignisses mit konsekutiver sekundärer Veränderung der Venenwand, untermauert die Bedeutung der Thrombophlebitis in der Genese oder Progression einer Varikosis.

1.9 Hereditäre Thrombophilie

Die Thrombophilie beschreibt die genetisch bedingte oder erworbene Neigung zur Bildung von Blutgerinnseln. Eine erhöhte Prävalenz zur Thromboseneigung bei Patienten mit chronisch venösen Ulzerationen (C6 Klassifikation nach CEAP) und Varikosis ist beschrieben und bis zu 30-fach höher als in der Normalbevölkerung (Darvall et al., 2009; MacKenzie et al., 2002). Die Venenthrombose ist eine Erkrankung des älteren Menschen und das Risiko zu erkranken, steigt ab dem 75. Lebensjahr auf ca. 1:100 (Delluc et al., 2012) und liegt insgesamt bei 1:1000 (Zöller et al., 1999). Familien und Zwillingsstudien haben gezeigt, dass genetische Faktoren verantwortlich sind (Larsen et al., 2003; Souto et al., 2000). Als Ursache der genetisch bedingten Thrombophilie sind insbesondere die APC-Resistenz (Cohen et al., 2014), Prothrombinmutation (Cohen et al., 2014), Mangel an Protein C und S sowie der hereditäre Antithrombinmangel (Fischer et al., 2013; Vossen et al., 2005) und Mutationen im Thrombomodulin-Gen zu nennen (Torbicki et al., 2000; Bertina et al., 1994; Meer et al., 1997). Ferner ist die Homocystämie als Risikofaktor venöser Thrombosen anerkannt und etabliert (Abudureheman et al., 2012; Gohil et al., 2009; Naess et al., 2008).

Zusammenfassend ist die Thrombose eine multifaktorielle und polygenetische Erkrankung, wobei das Risiko einzelner Mutationen isoliert betrachtet gering erscheint, aber bei gleichzeitigem Auftreten verschiedener Mutationen das Risiko zu erkranken dramatisch ansteigt. Insbesondere sind es Umweltfaktoren (Franco et al., 2001), welche isoliert oder in Kombination mit dem genetischen Risiko die Prävalenz einer Venenthrombose entscheidend beeinflussen kann.

1.10 Etablierte genetische Thrombosefaktoren

Die sieben getesteten Polymorphismen (siehe Tabelle 3-2) sind bereits in drei großen Studien (LETS, MEGA-1 und MEGA-2) beschrieben und basieren auf zwei großen bevölkerungsrepräsentativen Studien. Die *Leiden Thrombophilia Study* (LETS, Koster et al., 1993) und der *Multiple Environmental and Genetic Assessment of Risk Factors for Venous Thrombosis Study* (MEGA Studie, Blom et al., 2005). Die in unserer Studie getesteten Thrombosemarker sind alle mit der Entstehung einer tiefen Venenthrombose assoziiert und etabliert (Bezemer et al., 2008).

Tabelle 2 Übersicht der getesteten Thrombosefaktoren. Angegeben sind die sieben getesteten Thrombosefaktoren mit der entsprechenden Zuordnung zum Chromosom und dem dazugehörigen Gen. Ferner sind die Positionen der SNPs angegeben, welche der Biodatenbank NCBI-36.3 (*National Center for Biotechnology Information, März 2008*) entnommen sind.

SNP Name	Position (NCBI_36.3,März 2008)	Chromosom	Gen
rs6025	167785673	1	F5
rs1799963	46717631	11	F2
rs2227589	172152839	1	SERPINC1
rs1613662	60228407	19	GP6
rs3087505	187416480	4	KLKB1
rs13146272	187357205	4	CYP4V2
rs3756008	187422379	4	F11

1.10.1 APC-Resistenz (rs6025)

Die APC (aktiviertes Protein C) Resistenz beschreibt die Resistenz des aktivierten Faktor V gegen den Abbau durch Protein C. Das Protein C fungiert als wichtiger Bestandteil im Gleichgewicht zwischen Antikoagulation und Koagulation. Protein C ist membranständig an Endothelzellen gebunden und wird durch Thrombin aktiviert (Kane et.al., 1986), welches seinerseits als aktiviertes Protein C den Membran-gebundenen Faktor 5 inhibiert und somit eine überschießende Blutgerinnung verhindert. Die APC Resistenz gilt als eine der wichtigsten genetischen Ursachen der tiefen Beinvenenthrombose und Lungenarterienembolie (Cohen et al., 2014). Die häufigste Ursache einer APC- Resistenz stellt mit ca. 90% die Faktor 5 Leiden Mutation dar (Ridker et al., 1995; Bertina et al., 1994). Es handelt sich dabei um eine Punktmutation auf Chromosom 1 welche durch den SNP rs6025 repräsentiert wird und an Position 506 einen Austausch von Arginin (R) gegen Glutamin (Q) bewirkt. Diese Mutation wird als R506Q bezeichnet und zeigt eine Prävalenz von 5 bis 15% unter Europäern (Zöller et al., 1999) und variiert je nach Herkunft. Bei erkrankten Europäern konnte sogar eine Prävalenz von 20 bis 60% nachgewiesen werden (Zöller et al., 1999). Weitere Studien zeigten, dass 2 bis 4% der holländischen Bevölkerung und 7% der schwedischen Bevölkerung Träger der R506Q Mutation sind (Majerus et al., 1994). Auch in einer süddeutschen Populationsstudie waren 14 von 180 Probanden (7,8%) heterozygot für die Faktor 5 Leiden Mutation (Braun et al., 1996).

1.10.2 Prothrombinmutation (rs1799963)

Die Prothrombinmutation (G20210A), eine Punktmutation repräsentiert durch den Prothrombin rs1799963-Polymorphismus, stellt ebenfalls einen bedeutenden Risikofaktor für eine Venenthrombose dar (Cohen et al., 2014). Diese Mutation findet man bei ca. 1 bis 3% der gesunden Bevölkerung und bei ca. 6 bis 18% der Thrombosepatienten (Zöller et al., 1999; Cumming et al., 1999; Kapur et al., 1997). Die Mutation ist eine Punktmutation mit Austausch von Guanin gegen Adenin an Position 20210 im Intronbereich des Prothrombin-Gens und tritt vorwiegend heterozygot auf. Durch die Basenmutation im Intron ist nicht das Prothrombinprotein, sondern die Regulation der Expression gestört, sodass mehr Prothrombin (Faktor 2) produziert wird und die Homöostase in Richtung Gerinnungsneigung verlagert ist (Segal et al., 2009). Die bekannte Assoziation des Prothrombinpolymorphismus rs1799963 mit einer tiefen Beinvenenthrombose (Bezemter et al., 2008), ist auch im Rahmen einer großen Verlaufsstudie (*MEGA follow-up-study*) mit einer erhöhten Rezidivrate assoziiert (Hylckama Vlieg et al., 2014).

1.10.3 Antithrombinmangel (rs2227589)

Antithrombin zählt zu den wichtigen Inhibitoren (Hemmstoffen) der Blutgerinnung, insbesondere die Hemmung und Inaktivierung von Thrombin und Faktor 10a (Xa). Hereditärer Antithrombinmangel stellt somit ein erhöhtes Risiko für ein thromboembolisches Ereigniss dar (Austin et al., 2011; Bezemer et al., 2008). Der Polymorphismus (rs2227589) des Antithrombingens (SERPINC1) bewirkt eine verstärkte Thromboseneigung und konnte als Risikofaktor in einer spanischen Studie identifiziert werden (Antòn et al., 2009). Die Prävalenz wird mit 0,02% bis 0,2% in der gesunden Bevölkerung und mit ca. 2% bis 7% bei Patienten mit stattgehabter Venenthrombose angegeben (Fischer et al., 2013; Vossen et al., 2005). Auch kürzlich durchgeführte Studien bei Erwachsenen und Kindern konnte die Assoziation der SERPINC1 Mutation mit einem gehäuften Auftreten von Thrombosen nachweisen (Kumar et al., 2014; Luxembourg et al., 2013).

1.10.4 Glykoprotein 6 Polymorphismus (rs1613662)

Das Glykoprotein 6 ist als Membranprotein ein wichtiger Faktor in der kollagen-induzierten Aktivierung von Blutplättchen. Der SNP rs1613662 ist in mehreren Studien nachweislich mit einem erhöhten Risiko für eine Venenthrombose assoziiert (Tregouët et al., 2009; Bezemer et al., 2008).

1.10.5 KLKB1 Polymorphismus (rs3087505)

Das KLKB1 Gen kodiert das Glykoprotein Prekallikrein welches eine wichtige Funktion in der Aktivierung der Blutgerinnung, Fibrinolyse sowie bei Entzündungsvorgängen einnimmt. Es wird in der Leber synthetisiert und in die Blutbahn als Polypeptidkette sezerniert. Nachfolgend wird das Prekallikrein durch den Faktor XII in Kallikrein umgewandelt, welches seinerseits die Bildung von Faktor 12 aktiviert und somit die intrinsische Blutgerinnung fördert. In der Studie von Bezemer 2008 wurde dieser SNP als Risikofaktor einer tiefen Beinvenenthrombose identifiziert. Auch in weiteren großen Studien wurde rs3087505 mit einer tiefen Beinvenenthrombose assoziiert (Heit et al., 2011; Blom et al., 2008; Bezemer et al., 2008).

1.10.6 CYP4V2 Polymorphismus (rs13146272)

Das CYP4V2 Gen kodiert für eine Reihe der Cytochrome und ist bei der Oxidation verschiedener Substrate (z.B. im Fettsäuremetabolismus) beteiligt (Nakano et al., 2009). In verschiedenen Studien (Tregouët et al., 2009; Bezemer et al., 2008; Blom et al., 2005) wurde der CYP4V2 Polymorphismus rs13146272 als genetischer Risikofaktor einer tiefen Beinvenenthrombose beschrieben.

1.10.7 Faktor 11 Polymorphismus (rs3756008)

Der Gerinnungsfaktor Faktor 11, ein wichtiger Modulator der Blutgerinnungskaskade, stellt nach der Punktmutation (rs3756008) ein Risikofaktor für die Entstehung einer Venenthrombose dar (Austin et al., 2011). Faktor 11 auch als *Rosenthal Faktor* bekannt, ist eine Serinprotease und spielt eine wichtige Rolle im intrinsischen Pfad der plasmatischen Blutgerinnung. Eine Assoziation von rs3756008 mit der tiefen Beinvenenthrombose ist etabliert (Austin et al., 2011; Bezemer et al., 2008). Ferner wurde rs3756008 als Risikofaktor rezidivierender Thrombosen unter schwedischen Frauen in der *Thromboembolism Hormone Study* identifiziert (Bruzelius et al., 2016).

1.11 Genetische Aufklärung komplexer Erkrankungen

Die Varikosis zählt zu den multifaktoriellen und polygenen Erkrankungen in der mehrere interagierende Gene, welche zudem Umwelteinflüssen unterliegen, zum Phänotyp beitragen (Ziegler et al., 2002). Während monogene Erkrankungen äußerst selten sind, weisen die meisten Erkrankungen einen komplexen Erbgang auf (Nothnagel et al., 2005; Chakravarti et al., 1999).

1.11.1 Heritabilität der Varikosis

Heritabilität beschreibt den Anteil der phänotypischen Variabilität (Ausprägung der Varikosis), der auf einem genetischen Unterschied beruht. Die Heritabilität (Symbol: h^2) ist demnach ein Maß für die Erblichkeit von Eigenschaften, bei deren phänotypischer Ausbildung sowohl die Gene als auch Umwelteinflüsse eine Rolle spielen. Dabei gibt die Heritabilität an, in welchem Maße der Genotyp eines Erkrankten, Einfluss auf den Phänotyp hat. Die Heritabilität in unserer Studie, ist anhand der erhobenen Stammbäume und mittels einer Varianz-Komponenten-Analyse durch die spezielle Software Solar® (Almasy et al., 1998) am Institut für Medizinische Informatik und Statistik der Christian-Albrechts-Universität Kiel bestimmt worden (Fiebig et al., 2010). Heritabilitätsuntersuchungen an 2701 Stammbäumen der Patienten der Mosel-Eifel Klinik zeigten eine Heritabilität (h^2) von $17,3 \pm 2,5\%$ und konnte somit erstmalig den Einfluss erblicher Faktoren auf die multifaktorielle Entstehung der Varikosis aufzeigen (Fiebig et al., 2010) und ebnete den Grundstein der aktuellen weiterführenden Analysen.

1.11.2 Assoziationsanalysen

Als Assoziation bezeichnet man entweder das überdurchschnittlich häufige Auftreten eines Allels in einer Gruppe betroffener Personen im Vergleich zu nicht betroffenen Personen (Fall-Kontroll-Studie) sowie die überdurchschnittlich häufige Weitergabe eines Allels von den Eltern an die betroffenen Kinder (familienbasierter Ansatz). Assoziationsstudien können entweder unter der Annahme einer Hypothese in einem für eine bestimmte Erkrankung potentiell relevanten Gen erfolgen (Kandidatengenansatz) oder aber hypothesenfrei im Rahmen von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) durchgeführt werden.

1.11.3 Fall-Kontroll-Studien

Der klassische Ansatz zur Untersuchung einer Assoziation ist die sogenannte Fall-Kontroll-Studie. Dabei wird die Häufigkeit einer genetischen Variante in Gruppen betroffener sowie nicht betroffener Individuen verglichen. Ergeben sich bedeutsame Unterschiede in der Häufigkeit der Variante zwischen Fällen und Kontrollen, spricht man von einer Assoziation zwischen der Variante und dem Phänotyp (Balding et al., 2006; Gambaro et al., 2000).

1.12 Bekannte genetische Assoziationen mit dem Phänotyp Varikosis

Den Einfluss additiver genetischer Faktoren auf die Prädisposition einer Varikosis, sowie die geschätzte Heritabilität von 17,3% wurden bereits aus der Stammbaumanalyse der Kohorte verifiziert (Fiebig et al., 2010), bis heute konnten allerdings keine eindeutigen Suszeptibilitätsgene identifiziert werden. Zur Aufdeckung genetischer Prädispositionen sind in den letzten Jahren bereits mehrere Studien erfolgt, welche lediglich eine Assoziation verschiedener Genvarianten mit dem Phänotyp Varikosis nachweisen und insbesondere einen Einfluss auf das Remodeling der Venenwand haben (Bharath et al., 2014). Hervorzuheben ist der Polymorphismus (rs3917) im COL1A2 Gen (Kollagen Typ 1), welches mit einem 1,6fach erhöhtem Risiko für eine chronisch venöse Insuffizienz einhergeht (Jin et al., 2013). Des Weiteren sind Einzelpunktmutationen im VEGF Gen beschrieben (Grzela et al., 2010), welche folglich mit einem Integritätsverlust der Venenwand einhergehen (Kowalewski et al., 2011; Hollingsworth et al., 2004). Ferner sind mehrere Mutationen im FOXC2 Gen beschrieben, welches für einen Transkriptionsfaktor codiert und in der Gefäßentwicklung eine wichtige Rolle spielt (Al-Batayneh et al., 2008; Mellor et al., 2007; Ng et al., 2005).

Die pathophysiologische Bedeutung der Matrixmetalloproteininasen (MMPs) und Inhibitoren (TIMPs) ist etabliert und diverse Studien zeigen bei entsprechender Veränderung im Expressionsmuster durch Einzelpunktmutationen eine Assoziation mit

einer chronischen Venenerkrankung (Bharath et al., 2014). Die vorliegenden Studienergebnisse müssen allerdings kritisch bewertet werden, da es sich überwiegend um Tierstudien handelt, nur eine geringe Patientenzahl untersucht worden ist oder die Ergebnisse nur aus Proben nach Saphenektomie gewonnen wurden (Bharath et al., 2014).

Des Weiteren erfolgte 2017 am selbigen Institut die Genomweite Assoziationsstudie an 323 Patienten mit einer Varikosis Stadium C2 bis C4 nach CEAP Klassifikation verglichen mit 4619 Kontrollen aus der popgen Biodatenbank (Ellinghaus et al., 2017). Insgesamt wurden mehr als 1,9 Millionen SNP-Marker bezüglich Ihrer Assoziation untersucht und im weiteren Schritt 70 SNPs nach Ihrer Signifikanz zur weiteren Genotypisierung an 1258 Varikosis Erkrankten und 1925 Kontrollen untersucht. Weiterführend wurden drei SNPs, welche das Signifikanzniveau nach Bonferroni erreichten gesondert an 688 Erkrankten und 1221 Kontrollen untersucht. Die SNPs rs17278665 (EFEMP1), rs727139 (KCNH8) und rs2030136 (SKAP2) erreichten dabei das geforderte Signifikanzniveau. Das Genprodukt von EFEMP1 ist ein extrazelluläres Matrixprotein mit Interaktionen zu den Matrixmetalloproteininasen (MMPs) und deren Inhibitoren (TIMPs), welche in der Genese der chronisch venösen Insuffizienz bekanntermaßen eine wichtige Rolle einnehmen (Lim et al., 2009; Kowalewski et al., 2004). KCNH8, ein Mitglied der humanen Kaliumkanalgene, ist vermutlich an der Pathogenese der Varikosis beteiligt (Raffetto et al., 2007). Interessanterweise ist dieser Marker bereits 2010, im Rahmen einer Genomweiten Assoziationsstudie zu Varikosis (Kopetsch 2010), an dieser vorliegenden Kohorte bereits erwähnt worden. Das Genprodukt von SKAP2 ist ein Protein mit Beteiligung an der Aktivierung des Immunsystems, insbesondere der B-Zellen und der dendritischen Zellen und ist assoziiert mit dem Diabetes mellitus Typ1 sowie Morbus Crohn (Ellinghaus et al., 2017). Da die Inflammation in der Genese der Varikosis eine entscheidende Rolle spielt (Raffetto et al., 2014), ist der Polymorphismus ein interessanter Marker für weitere Untersuchungen (Ellinghaus et al., 2017).

Eine weitere britische multizentrische Genomweite Assoziationsstudie an 9577 Fällen und 327959 Kontrollen (Fukaya et al., 2018) konnte eine mögliche Assoziation von 855 SNPs zum Phänotyp Varikosis aufzeigen, interesseranterweise waren die SNPs der Kieler GWAS in der britischen Kohorte nicht repräsentiert.

Auch die kürzlich durchgeführte GWAS an 273 russischen Probanden nimmt eine Assoziation des SNPs rs4151657 im Gen eines Komplementfaktors an und konnte weitere assoziierte SNPs im Rahmen einer großen genetischen Studie identifizieren (Shadrina et al., 2018).

1.13 Zielsetzung der Studie

Die vorliegende Fall-Kontroll-Studie untersucht die Assoziation bereits etablierter genetischer Risikofaktoren einer tiefen Beinvenenthrombose mit der Volkskrankheit Varikosis. Die sieben etablierten Einzelpunktmutationen, assoziiert mit einer tiefen Beinvenenthrombose (Bezemer et al., 2008) rs6025, rs1799963, rs2227589, rs1613662, rs3087505, rs13146272 sowie rs3756008 sind bezüglich ihrer Assoziation mit dem Phänotyp Varikosis und dem Subphänotyp Phlebitis an einer großen und repräsentativen deutschen Stichprobe untersucht sowie mit einer gesunden Kontrollgruppe aus dem popgen Institut in Kiel (Nöthlings et al., 2012; Krawczak et al., 2006) verglichen worden. Darüber hinaus erfolgte eine umfangreiche epidemiologische Untersuchung des bislang unterschätzten Subphänotyps Phlebitis.

2 Material und Methoden

2.1 Rekrutierung der Kohorte

Im Zeitraum von Oktober 2005 bis Juli 2008 wurden 2701 Patienten (1904 Frauen, 797 Männer) der Mosel-Eifel-Klinik (Venenzentrum Bad Bertrich, Fachklinik für Venenleiden) in die Studie eingeschlossen. Für unsere Fall-Kontroll-Studie sind 2388 Probanden randomisiert durch das popgen Institut in Kiel ausgewählt (insbesondere durch Frau Birgitt Timm und Herrn Lukas Tittmann) und für die Analyse der genotypischen und allelischen Einzelpunktassoziation mit der Kontrollgruppe verglichen worden. Bei der Auswahl der Patienten wurden stark geschwächte Probanden sowie Probanden mit akuter tiefer Venenthrombose von der Studie ausgeschlossen. Alle Patienten zeigen eine ausgeprägte Varikosis der großen Stammvene (*Vena saphena magna*) und der stationäre Aufenthalt dauerte mindestens 4 Tage. Die Fachärzte (Frau Dr. med. Krusche und Herr Greiner) der Mosel-Eifel Klinik wurden bezüglich der Einschlusskriterien intensiv geschult. Die Kontrollgruppe mit 1472 gesunden Probanden wurde durch das popgen Institut rekrutiert (Nöthlings et al., 2012; Krawczak et al., 2006). Die Probanden mussten sich einer körperlichen Untersuchung sowie Angaben zum Venenstatus durch ärztliches Personal im popgen Institut unterziehen. Zudem wurden in beiden Kohorten die Rauchgewohnheiten und die ethnische Herkunft abgefragt, sodass nur Patienten eingeschlossen sind, deren Eltern in Deutschland geboren wurden.

2.2 Datenerfassung

Die Phänotypisierung der Patienten wurde an der Mosel-Eifel-Klinik, Fachklinik für Venenleiden, durch die dortigen Phlebologen (insbesondere Frau Dr. med. Krusche und Herrn Greiner) durchgeführt. Zur standardisierten Erfassung wurde in Kooperation mit dem IKMB (Institut für Klinische Molekularbiologie) und der Biodatenbank popgen (Kiel, Deutschland; Dr. rer. nat. Andreas Fiebig; Prof. Dr. med. Susanna Nikolaus; Prof. Dr. med. Stefan Schreiber) ein Fragebogen konzipiert. Neben allgemeinen Daten zur Person wurde eine detaillierte Stadieneinteilung nach der CEAP Klassifikation vorgenommen. Ergänzend wurden individuelle Stammbaumdaten (Familienmitglieder ersten Grades), Risikofaktoren (Gewicht, Schwangerschaft etc.) und Vorerkrankungen

(Thrombose, Phlebitis, Diabetes etc.) erhoben. Der Fragebogen wurde dem Patienten mit einer Patientenaufklärung (Information zur Blutentnahme und Speicherung personenbezogener Daten) sowie Einwilligungserklärung in doppelter Ausfertigung ausgehändigt. Neben der Erhebung des Fragebogens erfolgte zudem die Blutentnahme (drei EDTA- Monovetten à 9 ml) zur späteren DNA Extraktion im Rahmen der routinemäßigen postoperativen Laborwertkontrolle. Die EDTA-Monovetten und Patientenfragebögen waren durch einen Barcode gekennzeichnet. Die Blutproben wurden anschließend getrennt von den persönlichen Daten gespeichert und durch eine fortlaufende Strichkodierung pseudonymisiert. Das Landeszentrum für Datenschutz (AZ LD4-16.1/03.001) und die Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (AZ A 156/03) prüfte und begutachtete das Konzept zur Sammlung und Speicherung der Daten positiv. Die Fragebögen und Blutproben wurden regelmäßig getrennt voneinander der popgen Biodatenbank sowie dem Institut für klinische Molekularbiologie (unter Einhaltung der Kühlkette bei -20°C) zugetragen. Die Fragebögen wurden mit Hilfe eines Inhouse-Tools der popgen Biodatenbank durch uns medizinische Doktoranden unter Aufsicht erfasst. Auf diese Weise wurde der Fragebogen für die weiteren Untersuchungen digitalisiert.

Abbildung 6 Maske des Inhouse-Tools der Biodatenbank popgen. Die Digitalisierung des Probandenfragebogens erfolgte durch ein Inhouse-Tool der Biodatenbank popgen. Neben direkten Eingaben (z.B. Geburtsjahr, Größe und Gewicht) erfolgte die Eingabe durch die Abkürzungen 0 für „unbekannt“, 1 für „Ja“ sowie 2 für „Nein“. Falls ein Proband eine Frage nicht sicher beantworten konnte und die Antwort „weiß nicht“ angekreuzt hatte erfolgte die Eingabe 3.

2.3 Phänotypisierung

Die Phänotypisierung erfolgte anhand der CEAP Klassifikation durch spezialisierte Fachärzte der Mosel-Eifel Klinik Bad Bertrich. Die klinische Einteilung (C-Klassifizierung) erfolgte anhand klinischer Zeichen im Rahmen der körperlichen Untersuchung (sicht- und tastbaren Varizen, Symptome der CVI). Die Ätiologie (E-Klassifizierung) wurde anhand anamnestischer Daten sowie durch präoperative phlebologische Diagnostik erfasst. Die anatomische Klassifikation (A-Klassifikation) wurde anhand der Art und Lokalisation der Varikosis ermittelt. Die pathologische Klassifizierung (P-Klassifikation) erfolgte durch Farbduplexsonographie mit der 7,5 MHz Sonde (Gerät: Hewlett-Packard, Image Point HX, 3000 Minuteman Road, Adover, Massachusetts 01810, USA). Ferner wurde durch spezialisierte Ärzte der Mosel-Eifel Klinik ein uni/bidirektionales Dopplergerät zur präoperativen Markierung der Varizen

benutzt. Zur Funktionsdiagnostik erfolgte bei jedem Patienten eine Lichtreflexionsrheographie, um das Ausmaß der hämodynamischen Störung zu erfassen.

2.4 Probengewinnung

Die Genotypisierung der DNA erfolgte am Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB) am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Die Blutproben der Mosel-Eifel-Klinik Bad Bertrich wurden innerhalb von 15 Minuten nach Blutabnahme bei -20°C gelagert um die Qualität der DNA in den Leukozyten zu erhalten. Der Transport erfolgte, unter Einhaltung der Kühlkette bei -70° durch Trockeneis, von der Mosel-Eifel-Klinik in das Institut für klinische Molekularbiologie, dort erfolgte bis zur DNA Extraktion die Lagerung bei -70°C. Zur DNA Isolation im Labor des IKMB wurden die Blutproben aufgetaut und umgehend zur DNA Isolation verwendet. Die isolierte DNA wurde zudem einer Qualitätssicherung unterzogen, indem eine Konzentrationsbestimmung mit PicoGreen® (Ahn et al. 1996) erfolgte. Bei ausreichend hoher Konzentration der DNA wurde diese vorerst in Form einer „Whole Genom Amplifikation“ (WGA) amplifiziert um dann den Genotypisierungsplatten zugefügt zu werden. Die Platten dienten der anschließenden Genotypisierung mittels der TaqMan® Technologie (Applied Biosystems [ABI], Foster City, CA, USA) (Hampe et al., 2001).

2.5 DNA Isolation aus EDTA Vollblut

Die Extraktion genomicscher DNA wurde mit dem Präparationskit „Invisorb® Blood Giga Kit“ (Invitek, Berlin, Deutschland) unter optimierten Protokollbedingungen durchgeführt. Im ersten Reaktionsschritt wurden 10 ml EDTA-Vollblut mit 30 ml EL-Puffer (*erythrocyte lysis buffer*) versetzt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe 3 min bei 3000 U/min zentrifugiert (Zentrifugen der Firma Kendro, Hanau, Deutschland) und der Überstand bestehend aus Erythrozytenfragmenten verworfen. Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis das Zellpellett farblos und frei von Erythrozytenfragmenten war, welches die PCR-Reaktion (*polymerase chain reaction*) gehemmt hätte (Heath et al., 1999). Das gewonnene Zellpellet bestand im Anschluss ausschließlich aus DNA-haltigen

Leukozyten. Das gereinigte DNA-haltige Zellpellet wurde nun mit 5 ml HL-Puffer (*HL-Binding Buffer*) und 50 μ l Proteinase K resuspendiert und im Wasserbad bei 60°C und durchgehendem Schütteln inkubiert um die DNA vom Zellkern zu trennen. Die Präzipitation der DNA erfolgte nach dem Prinzip der Alkoholfällung (Shapiro et al., 1981; Wilcockson et al., 1975, Bearden et al., 1974), indem 10 ml Ethanol (70%) dem Überstand zugefügt wurden. Die präzipitierte DNA wurde danach mit der Pipettenspitze in ein 2 ml Eppendorf Röhrchen überführt welches 1 ml Ethanol (70%) enthielt. Das DNA Pellet wurde auf diese Art und Weise gewaschen und im Anschluss an einen Vortex Zwischenschritt bei 13000 U/min für 2 min abzentrifugiert (Mini Vortexer VM-3000, VWR, Darmstadt, Deutschland). Der Ethanol-Überstand wurde abpipettiert und das DNA Pellet bei Raumtemperatur 10 min getrocknet um das restliche flüchtige Ethanol zu entfernen. Das DNA Pellet wurde schlussendlich in ein 1200 μ l Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer) resuspensiert (im Wasserbad bei 60°C) und anschließend bei -20° gelagert.

2.6 Qualitätssicherung durch Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode um Nukleinsäure-Stränge nach ihrer Größe zu trennen und die Größe durch Vergleich mit Strängen bekannter Größe zu bestimmen. Auf diese Weise können Rückschlüsse über die Qualität der DNA gezogen werden und somit als Qualitätskontrolle der isolierten DNA herangezogen werden. Die Nukleinsäure Moleküle werden aufgrund ihrer negativen Ladungen der Zucker-Phosphate im elektrischen Feld ihrer Größe nach in der Agarose-Gelmatrix aufgetrennt. Kleinere Moleküle bewegen sich schneller durch die Agarose-Gelmatrix als große Moleküle, da sie aufgrund ihrer geringen Größe einfacher die Poren des Gels durchlaufen. Obendrein hat die Konformation der DNA einen Einfluss auf die Fließgeschwindigkeit. Das Agarosegel ist einfach zu handhaben und hat keinen chemischen Einfluss auf die DNA während der Elektrophorese und eignet sich daher besonders, um die Qualität der DNA zu beurteilen. Um im Anschluss die DNA Banden zu visualisieren, hat sich die Darstellung mit Ethidiumbromid bewährt. Das Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA (zwischen den Basen der DNA im Abstand von 10 Basenpaaren) und erhöht damit die Eigenschaft unter UV-Licht zu fluoreszieren. Daher kann die DNA, welche durch ein Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt wird, ab einer Menge von 20ng DNA pro DNA Bande sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise leuchten im Agarosegel die Stellen hell auf, an denen sich Nukleinsäuren befinden, während Stellen ohne Nukleinsäuren dunkel erscheinen. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorliegenden DNA Konzentration sowie zur Länge der Nukleinsäuren. Für die Verwendung genomicscher DNA bestand das Gel zu 0,8% aus Agarose und 1,5µl EtBr (Ethidiumbromid) pro 100ml Gel zur Visualisierung der DNA Banden. Als Puffer (engl. *Running buffer*) wurde TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer verwendet. Das Agarosegel wurde in der Mikrowelle erhitzt und nach Abkühlung auf 60°C EtBr unter Einhaltung der Vorsichtsmaßnahmen dazugegeben. Nach ca. 30 Minuten war das Gel vollständig polymerisiert. Die Elektrophorese wurde bei 220V für 60 Minuten durchgeführt bis die DNA Banden vollständig voneinander getrennt waren, um dann die geschätzte Größe unter UV-Illumination zu visualisieren. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der DNA mittels des fluoreszierenden Farbstoffs PicoGreen® (Ahn et al., 1996) und dem „Tecan Spectralfluor Plus Fluorometer“.

2.7 Whole Genom Amplification (WGA)

Für genetische Studien bildet DNA in ausreichender Qualität und Quantität die Grundlage. Durch Entwicklung von Hochdurchsatzverfahren zur Analyse des Erbguts ist die vorhandene Menge DNA mittlerweile zum limitierenden Faktor geworden (Lasken et al., 2003). Ein wichtiges Ziel ist es daher, genug genomische DNA, sowohl für diese Analyseverfahren als auch für zukünftige Studien bereitzustellen. Eine dieser Methoden, die das gesamte Genom eines Individuums vervielfältigen, wird *Whole Genome Amplification* (WGA) genannt. Da die DNA Menge aus der Isolation aus weißen Blutkörperchen nur sehr gering und eine Vielzahl von Untersuchungen notwendig sind, wurde eine Whole Genome Amplification (Lovmar et al., 2006) durchgeführt. Erst danach konnte die Genotypisierung nach der TaqMan® Methode angewendet werden. Die WGA wurde mit dem GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit durchgeführt, welches aus einer Ausgangsmenge von 10ng genomischer DNA, 4 bis 7 μ g DNA in 1,5 bis 2 Stunden erzeugt. Nach der WGA-Reaktion wurden die Proben auf 96-Kammer-Platten in der Platten-Design Anordnung verdünnt. Zur Hochdurchsatz-Typisierung wurden vier 96-Kammer-Platten auf einer 384-Kammer-Platte zusammengefasst. Der Pipettievorgang wurde durch den Tecan Pippettierroboter (Tecan, Männedorf, Schweiz) ausgeführt. Anschließend verteilte der Robbins Scientific®HydraTM 384-Mikrodispenser den Inhalt der Kammer-Platten auf 384-Mikrotiter-PCR-Platten. Diese wurden getrocknet, versiegelt und bei Zimmertemperatur bis zur Genotypisierung gelagert.

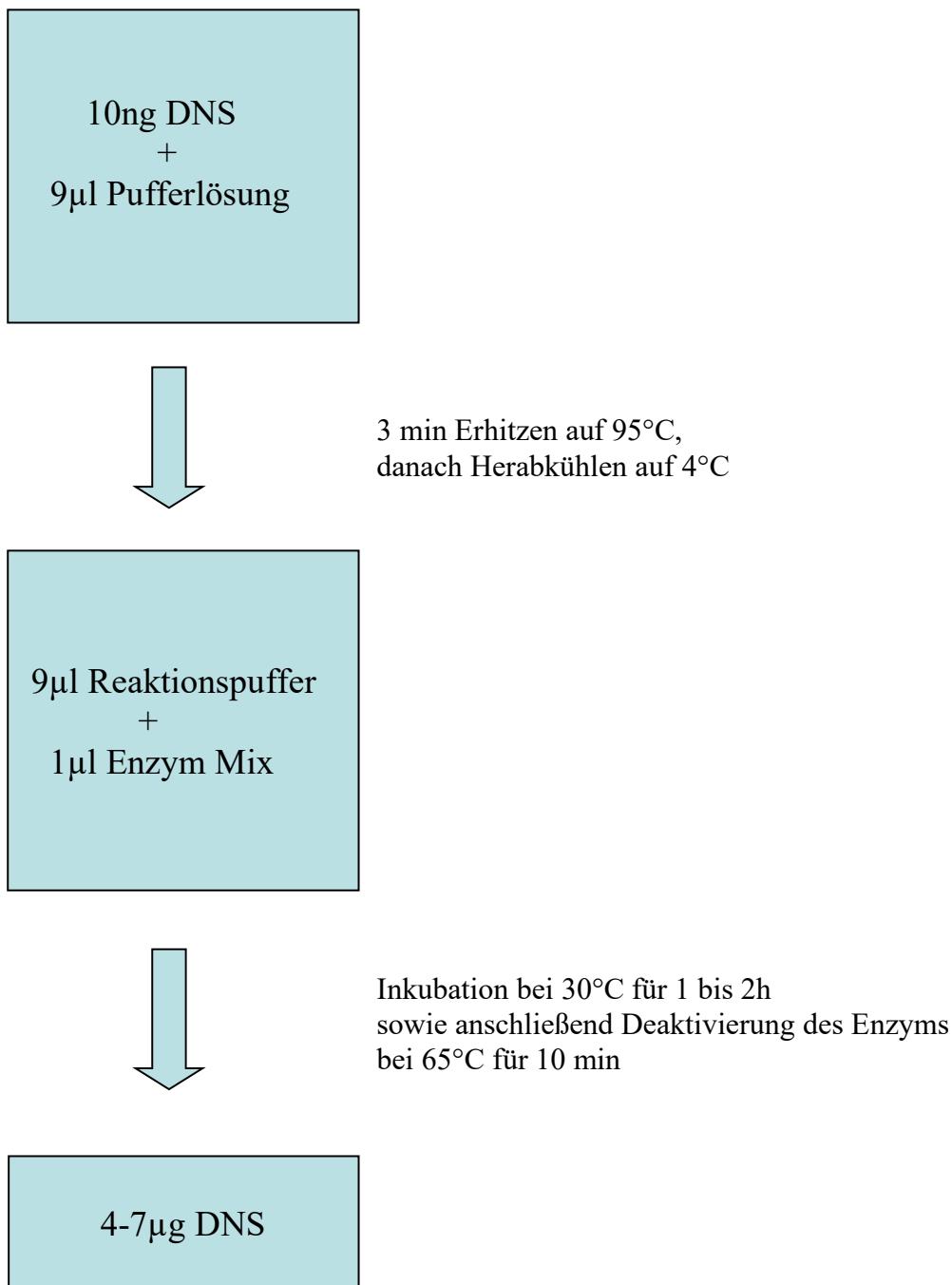


Abbildung 7 Schematische Darstellung der WGA. Schaubild nach dem Protokoll des GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit, GE Healthcare.

2.8 Genotypisierung mittels TaqMan®-PCR

TaqMan® ist eine robuste und kosteneffiziente PCR-basierte Genotypisierungsmethode (Morin et al., 1999, Holland et al., 1991). Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR Zyklus erfasst werden (quantitative Echtzeit PCR). Der TaqMan® SNP Genotyping Assay beinhaltet eine Polymerase und zwei Primer, welche die zu untersuchenden SNPs flankieren sowie zwei allelspezifische TaqMan®-Sonden. Die für die Genotypisierung der sieben SNPs benötigten Assays wurden von der Firma Applied Biosystems [ABI] (Foster City, CA, USA) als Assay-on-Demand (AoD) bezogen. Die Assays beinhalten einen Vorwärtsprimer (*Forward primer*) und Rückwärtsprimer (*Reverse primer*) sowie zwei allelspezifische Fluoreszenzsonden. Zudem ist im Assay eine Polymerase (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase) enthalten, welche eine 5`Nukleaseaktivität besitzt. Die Fluoreszenzsonden sind doppelt markiert und besitzen sowohl einen Reporterfarbstoff (Fam, 6-Carboxy-Fluorescein) als auch einen Quenscherfarbstoff. Der Reporterfarbstoff (FAM™ und VIC®) ist am 5`Ende der Fluoreszenzsonde und der Quenscherfarbstoff am 3`Ende welcher die Fluoreszenzfähigkeit des Reporterfarbstoffs im gebundenen Zustand an der Sonde unterdrückt. Die SNP-Sonden erlangen ihre Allelspezifität durch den Unterschied der Nukleotidsequenz an der Stelle der Einzelpunktmutation und der individuellen Fluoreszenz bei unterschiedlicher Wellenlänge des Reporterfarbstoffes (FAM™ und VIC®) und ermöglichen somit eine Unterscheidung der Markerallele. Die Sonde bindet an die entsprechende Zielsequenz der DNA, welche amplifiziert werden soll. Im Verlauf wird die Sonde durch 5`Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase wieder abgespalten und gewinnt so die Fähigkeit zur Fluoreszenz. Durch die Zunahme der DNA Fragmente nimmt die Fluoreszenz entsprechend zu und je nachdem, ob das Markerallel homozygot oder heterozygot vorliegt, nimmt ein Fluoreszenzsignal oder zwei Fluoreszenzsignale entsprechend der quantitativen Zunahme der DNA Fragmente ebenfalls zu. In einer so genannten Endpunktmessung, wird nach Abschluss der PCR mittels Laser-Scan-Technologie, die erzeugte Fluoreszenz gemessen. Die spektrographisch gemessene und elektronisch gespeicherte Fluoreszenz wird durch den Reporter Farbstoff erzeugt, welcher durch das Laserlicht im nicht-gebundenen Zustand aktiviert wird. Durch den bereits erwähnten Unterschied der Wellenlängen ist eine eindeutige Zuordnung zum Genotyp gewährleistet.

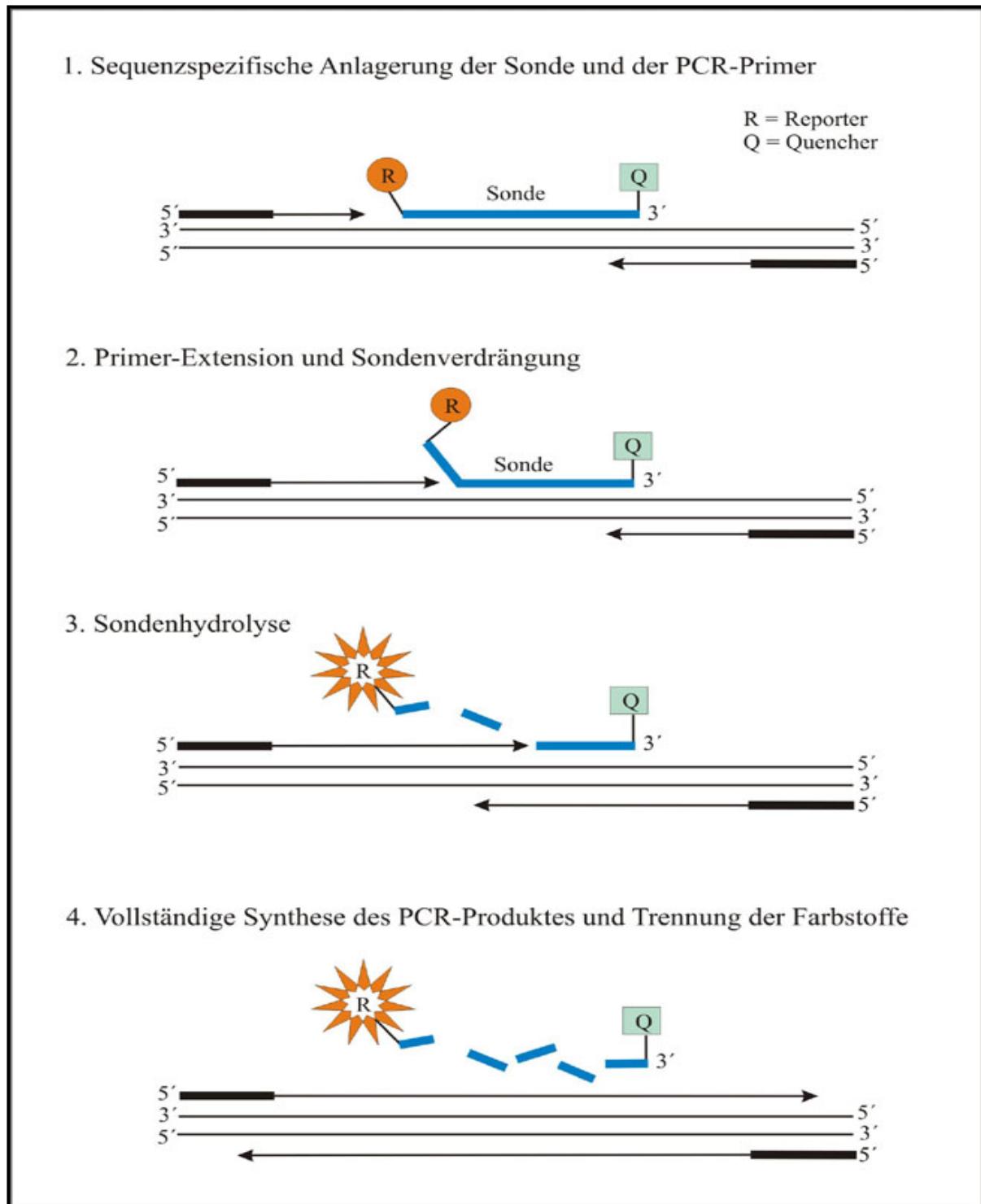


Abbildung 8 Schematischer Ablauf der TAQMAN® Genotypisierung. Darstellung des schematischen Ablaufs der TaqMan®-PCR. Durch die $5' \rightarrow 3'$ Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase kommt es zur Sondenverdrängung und Sondenhydrolyse mit vollständiger Synthese des PCR Produktes und Trennung der Farbstoffe sowie Darstellung des Fluoreszenzsignals.

2.9 Praktische Durchführung der TaqMan®-PCR

Als Ausgangmaterial diente die 384-Kammer-PCR-Mikrotiterplatte mit der aus der DNA-Isolation gewonnenen DNA der Probanden. Ein TaqMan® *Genotyping Master Mix* bestehend aus einer DNA Polymerase (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase) sowie Nukleotide zur Neustrangsynthese und dem entsprechendem Assay bestehend aus zwei spezifischen Primern (F und R) und den Sonden (VIC® und FAM®) für die beiden Allele. Die Sequenzen entstammen der öffentlichen Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI). Für die Reaktion wurden 2,5ng DNA als Template verwendet und der Reaktionsansatz bestand aus 2,5µl „TaqMan® *Genotyping Master Mix*“ sowie 0,0625µl Assay und 2,4375µl deionisiertem Wasser. Das Reaktionsgemisch wurde durch den „Tecan Genesis RSP 150 Pipettierroboter“ in 384 Kammern der Mikrotiterplatte mit dem DNA Template überführt. Abschließend wurden die Platten mittels einer durchsichtigen Folie (AB-0558 Adhesive PCR-Film) abgedeckt und abzentrifugiert. Die Amplifikation der DNA Stränge erfolgte durch das „Gene Amp PCR Systems 9700“ (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) beginnend mit einer zehnminütigen Inkubation bei 95°C zur Aktivierung der DNA Polymerase mit anschließender Polymerase-Ketten-Reaktion. Die Denaturierung der DNA Stränge erfolgte in den jeweils 45 PCR-Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden. Ferner wurde zur Primer- und Sonden Hybridisierung sowie zur Neustrangsynthese eine Minute bei 60°C inkubiert. Nach Abschluss des 45. Zyklus erfolgte eine Abkühlung des Thermocycler auf 4°C sowie eine kurze Zentrifugation zum Entfernen störender Luftblasen. Letztendlich erfolgte eine Endpunkt-Messung des Fluoreszenzsignals mit einer elektronischen Kamera (ABI Prism® 7900 Sequenz Detector System) der Firma Applied Biosystems (ABI, Foster City, CA, USA). Die Ergebnisse der Endpunktmessung wurden mit einer speziellen Software (Sequenz System Detection Software 2.0) gespeichert und durch ein Punktwolkendiagramm dargestellt. Bei drei deutlich getrennten Punktwolken handelte es sich um ein aussagekräftiges Assay, wobei zwei Punktwolken die homozygoten Allele und eine Punktwolke die heterozygoten Allele darstellten. Eine Negativkontrolle zeigte sich im Bereich des x- und y-Achsenabschnittspunktes.

Tabelle 3 Übersicht der Sequenzen der Thrombosefaktoren für das TaqMan® Assay. Dargestellt sind die Sequenzen des TaqMan® Assays aus der Biodatenbank NCBI-36.3 (*National Center for Biotechnology Information*, März 2008).

SNP	Sequenzen
rs6025	TCAAGGACAAAATACCTGTATTCC[C/T]GCCTGTCCAGGGATCTGCTTTACA
rs1799963	GTTCCAATAAAAGTGACTCTCAGC[A/G]AGCCTCAATGCTCCCAGTGCTATTG
rs2227589	GATGAGGTTCCATGGAGTAAACAAT[A/T]CAAGGATATAAGGACCTCATATAAT
rs1613662	ACCCTGCAGAACCTACCTGCTACCG[A/G]GGAAGGTGGTCTGTTGGTAACCGG
rs3087505	GTGGGAGGGAGAGCACTTGAAATGA[C/T]GTCTTCAAACAGGTCTTGACTGT
rs13146272	TCTTCTTGCATCCTAAGGACGAAA[A/G]ACACAGTGCACTCAGAGCTGCTGAG
rs3756008	AGGATGGAACACAAAAAGAGCCTT[A/C]AGATCCTACATACTTTACCAACAG

2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der genotypischen und allelischen Einzelpunktassoziationen durch logistische Regressionsanalysen erfolgten durch Herrn Prof. Dr. rer. medic. M. Nothnagel (aktuell Universität zu Köln) am IMIS Kiel (Institut für Medizinische Informatik und Statistik am UKSH Campus Kiel, Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Michael Krawczak).

2.10.1 Testung der Genotypen auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium

Das Hardy-Weinberg-Gesetz besagt, dass die relative Häufigkeit der Genotypenverteilung über Generationen hinweg konstant bleibt, daher sollte eine gesunde Population nicht vom Hardy-Weinberg-Gesetz abweichen. Es werden anhand der Allelfrequenzen die zu erwartenden Häufigkeiten der Genotypen berechnet, welche nach Möglichkeit mit den experimentell ermittelten Häufigkeiten übereinstimmen sollten, da man sonst einen Genotypisierungsfehler in Betracht ziehen muss. In unserer Studie wurden alle Marker in den Kontrollen einem solchen Test unterzogen (Wigginton et al., 2005) und wichen nicht vom Hardy-Weinberg-Gesetz ab.

2.10.2 Analyse der Einzelpunktassoziation und Power-Schätzung

Zur Evaluation einer möglichen Assoziation zwischen einem von uns untersuchten SNP und der Varikosis schätzten wir die Power unter Zuhilfenahme eines *Genetic Power Calculator* (Purcell et al., 2003). Die Analyse und Visualisierung der Einzelpunktassoziation für den Phänotyp Varikosis erfolgte für jeden Marker unter Verwendung von Haplovie 4.0 (Barrett et al., 2005) und Genomizer Engine (Franke et al., 2006). Mittels allel- und genotypbasierter Tests basierend auf Chi-quadrat-Tests, erfolgten die Berechnung des Genotyps, der Allelfrequenz und der empirischen Signifikanzen (p-Werte, Odds Ratios und Konfidenzintervalle der Odds Ratios). Die Subanalyse des Subphänotyps Phlebitis sowie die logistische Regressionsanalyse erfolgten mittels R-Package (Version 2.9.2) und Plink 2.049 (Purcell et al., 2007).

2.10.3 Logistische Regressionsanalyse

Die logistische Regression ist ein multiples Verfahren, das ermöglicht die Wahrscheinlichkeit eines bestimmten Endergebnisses abhängig von mehreren qualitativen oder quantitativen Merkmalen zu modellieren. Um Differenzen in den Genotypfrequenzen aufzudecken, erfolgte eine multiple logistische Regression mit den zusätzlichen Einflussgrößen Alter und Geschlecht mittels Wald-Test. Es wurden zusätzlich alle SNPs bezüglich Ihrer Assoziationen in den drei Modellen multiplikativ, rezessiv und dominant unter Verwendung eines Likelihood-Ratio-Test evaluiert.

2.10.4 Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni

Werden mehrere Tests durchgeführt, so steigt die Irrtumswahrscheinlichkeit α , also die Wahrscheinlichkeit ein signifikantes Ergebnis zu erhalten obwohl es keinen wahren Unterschied gibt, mit der Anzahl der Tests an. Daher wird bei multiplem Testen häufig eine Korrektur benutzt, die einen Grenzwert ermittelt, ab dem die errechneten p-Werte als signifikant anzusehen sind (Rice et al., 2008). Die Bonferroni-Korrektur, setzt das Signifikanzniveau üblicherweise durch Division des Alpha-Niveaus durch die Zahl der durchgeföhrten Tests herab. Bei den getesteten sieben SNPs erfolgte eine Bonferroni-Korrektur, welches das Signifikanzniveau für eine Korrelation auf 0,007 herabsetzt ($0,05 / 7 = 0,007$). Jeder Test, der einen p-Wert kleiner als 0,007 aufzeigt gilt als statistisch signifikant, Korrelationen mit einem Wahrscheinlichkeitswert größer als 0,007 gelten als nicht signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Patientenkohorte

Insgesamt wurden 2701 Patienten (Gesamtkohorte), 90% der im Zeitraum von Oktober 2005 bis Juli 2008 (Fiebig et al., 2010) behandelten Patienten der Mosel-Eifel-Klinik in Bad Bertrich rekrutiert. Durch das popgen Institut wurden 2388 Probanden der Gesamtkohorte für eine Genotypisierung randomisiert ausgewählt und zeigen bezüglich des Phänotyps keinen Unterschied zu den 2701 Patienten. Zudem erfolgte eine sorgfältige Zuordnung der 1472 Kontrollen zu den Probanden bezüglich Alter, Geschlecht und ethnischer Zugehörigkeit und ist eine Voraussetzung um Stratifizierungseffekte zu minimieren. In der Fallgruppe sind ausschließlich Patienten mit ausgeprägter Varikose ab Stadium C2 nach CEAP Klassifikation, insgesamt 2388 Patienten (1672 Frauen (70%), 716 Männer (30%)). Im Durchschnitt sind die Patienten 56 Jahre alt (Standardabweichung 10,6 Jahre, Altersspanne 18 bis 81 Jahre) und der Krankheitseintritt liegt bei 32,6 Jahren (SD 12,1; Altersspanne 5 bis 72 Jahre). Dabei zeigt sich bezüglich des Alters keine wesentliche Differenz zwischen den Geschlechtern. Die Krankheitsdauer ist im Schnitt mit 23,2 Jahren angegeben (SD 12,8; Zeitspanne 0 bis 63 Jahre).

3.2 Schweregrade des Patientenkollektives

Die Fallgruppe zeigt mit 84,3% (2013 Probanden) Zeichen einer CVI (Chronisch-Venösen-Insuffizienz), welche nach CEAP Klassifikation die Stadien C3 bis C6 beinhaltet. Der überwiegende Anteil der Fallgruppe (64%) hat eine Krankheitsausprägung C3 (1530 Probanden) sowie Stadium C4 (15,9%; 379 Probanden). Die stärkste Ausprägung also C5 und C6 nach CEAP Klassifikation sind am geringsten vertreten (4,4%; 104 Probanden). Eine Varikose im Stadium C2 der CEAP Klassifikation haben lediglich 15,7% (375 Probanden).

Tabelle 4 Übersicht der untersuchten Stichprobe. Die Tabelle zeigt eine Übersicht der verwendeten Patientenkohorte sowie der Kontrollkohorte. Ferner ist die geschlechtliche Verteilung sowie der Altersdurchschnitt, der Krankheitsbeginn und Krankheitsdauer dargestellt. Zudem ist die Verteilung nach Krankheitsstadium angegeben sowie in Klammern dessen Anteil an der Gesamtkohorte.

Eigenschaften	Fälle (N=2388)	Kontrollen (N=1472)
Geschlecht		
Männer	716 (30%)	736 (50%)
Frauen	1672 (70%)	736 (50%)
Alter bei Blutentnahme in Jahren	56 ± 10,6 (21 - 81)	51,1 ± 16,1 (18 - 78)
Alter bei Krankheitsbeginn in Jahren	32,6 ± 12,1 (5 - 72)	
Krankheitsdauer in Jahren	23,2 ± 12,8 (0 - 63)	
Verteilung der Fälle nach CEAP		
Stadium in Prozent (%)		
C2	375 (15,7%)	
C3	1530 (64,0%)	
C4	379 (15,9%)	
C5 & C6	104 (4,4%)	
C3 - C6	2013 (84,3%)	

3.3 Epidemiologie thromboembolischer Ereignisse

In der Studienkohorte berichten nur 1,8 % der Patienten, bereits an einer tiefen Beinvenenthrombose erkrankt gewesen zu sein, hingegen waren 97,7 % Patienten noch nie von einer Thrombose betroffen. Nur 12 Probanden äußerten sich nicht zu dieser Frage. Die Lungenarterienembolie als schweres und potentiell tödliches thromboembolisches Ereignis ist erstmalig an einer großen Krampfaderkohorte evaluiert worden. Bei nur 1,7% der Patienten ist eine stattgehabte Lungenarterienembolie bekannt. Die Mehrheit der Patienten mit 97,8% (2337) hatten anamnestisch keine Lungenarterienembolie. Bei 11 Patienten (0,5%) ist eine frühere Lungenarterienembolie unbekannt.

Tabelle 5 Übersicht thromboembolischer Ereignisse der Fallkohorte. Dargestellt ist die Prävalenz der tiefen Beinvenenthrombose und der Lungenarterienembolie in der Patientenkohorte.

Stattgehabte Beinvenenthrombose	Fälle (N=2388)
erkrankt	44 (1,8%)
nicht erkrankt	2332 (97,7%)
keine Angaben	12 (0,5%)
Stattgehabte Lungenembolie	
erkrankt	40 (1,7%)
nicht erkrankt	2337 (97,8%)
keine Angaben	11 (0,5%)

3.4 Der Subphänotyp Phlebitis

Zudem ist in dieser Fall-Kontrollstudie erstmalig der Subphänotyp Phlebitis evaluiert worden und ca. ein Drittel (35%) der Studienkohorte (836 Patienten) leiden unter den Symptomen einer schmerzhaften Entzündung (Phlebitis) der Stammvenen. Bei 63,7% der Patienten (1520 Probanden) kann keine Phlebitis evaluiert werden und bei 1,3% (32 Patienten) ist das Auftreten einer symptomatischen Phlebitis unbekannt.

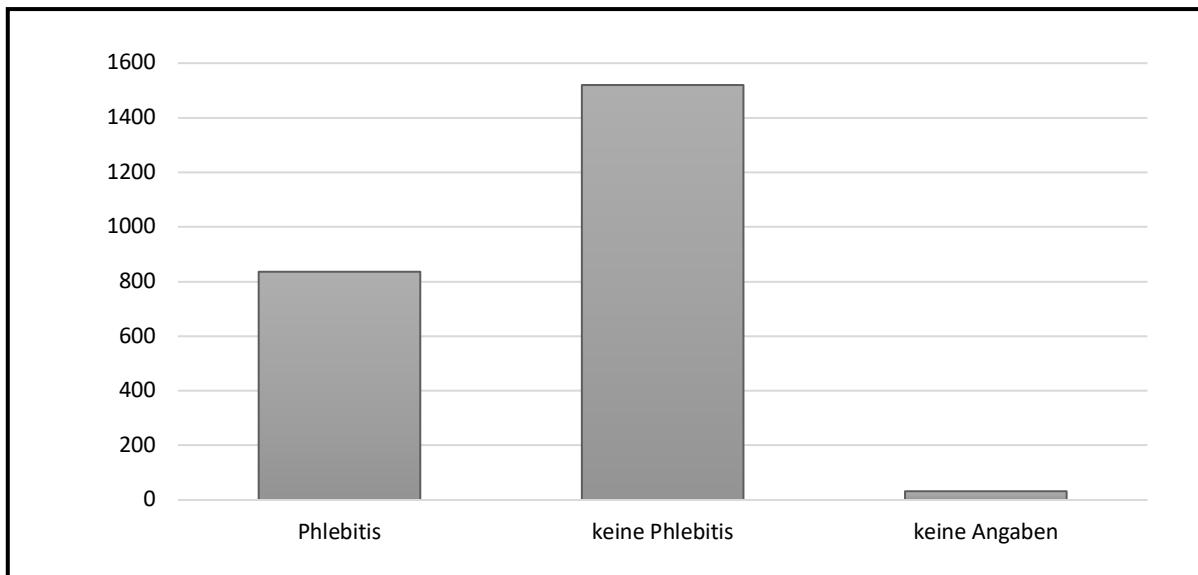


Abbildung 9 Verteilung des Subphänotyps Phlebitis in der Gesamtkohorte.
Dargestellt ist das Auftreten des Subphänotyp Phlebitis auf der X-Achse und die Anzahl der Probanden der Gesamtkohorte auf der Y-Achse.

3.5 Phlebitis in Abhängigkeit zum CEAP Stadium

Betrachtet man die Verteilung der Phlebitis in den einzelnen CEAP Stadien im Vergleich zur Gesamtkohorte, so zeigt sich eine Fokussierung auf fortgeschrittene Krankheitsstadien. Es präsentieren ca. 53% der Patienten im Krankheitsstadium C5 und C6 eine Phlebitis. Im Stadium C4 sind ca. 40% der Probanden von einer Phlebitissymptomatik betroffen und von den 1530 Patienten der C3 Klassifikation berichten 516 Patienten (ca. 34%) von einer entzündlichen Veränderung der Venen. Bei den Patienten mit einer C2 Varikosis ist der Subphänotyp am geringsten ausgeprägt (30% Phlebitis).

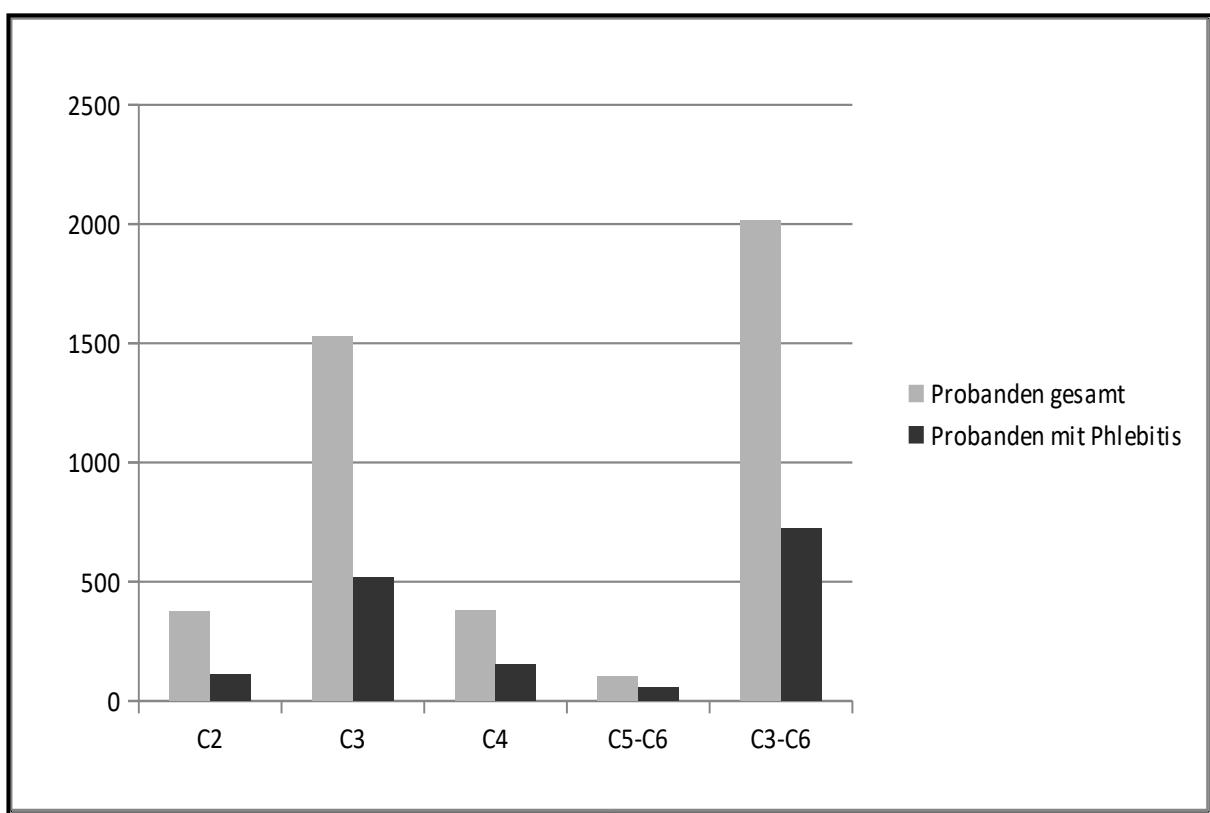


Abbildung 10 Verteilung des Subphänotyps Phlebitis nach C-Stadien. Auf der X-Achse sind die C-Stadien nach CEAP Klassifikation und auf der Y-Achse die Anzahl der Probanden mit Phlebitis (schwarz) in Relation zur Gesamtkohorte (grau) dargestellt.

3.6 Geschlechtsspezifität des Subphänotyps Phlebitis

Analog zu unseren bisherigen Resultaten zeigt sich auch bei der Phlebitis eine Geschlechtsspezifität des klinischen Symptoms, denn annähernd 78% der Patienten mit Phlebitis sind weiblich. Auch in Relation zur Gesamtkohorte ist bei den Frauen ein häufigeres Auftreten von Phlebitis zu beobachten. So sind bei ca. 39 % der Frauen der Gesamtkohorte eine Entzündung der Stammvenen zu beobachten, bei den Männern hingegen nur bei 26%.

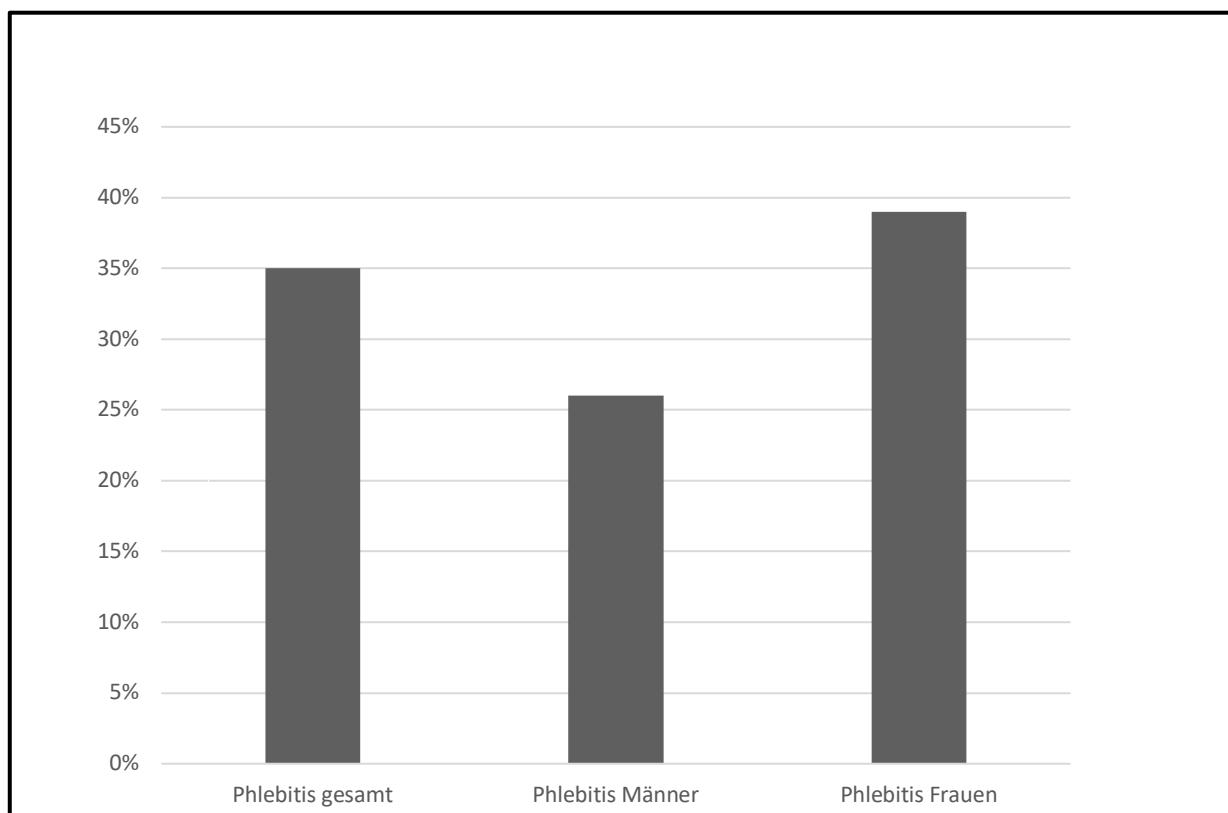


Abbildung 11 Geschlechtsspezifität der Phlebitis. Angegeben ist der Anteil der Patienten mit Phlebitis in Prozent (Y-Achse) entsprechend dem Geschlecht, im Vergleich zum Phlebitisdurchschnitt der Gesamtkohorte.

3.7 Phlebitis, ein Subphänotyp des mittleren und höheren Alters

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Altersverteilung. So sind die meisten Patienten mit Phlebitis zum Zeitpunkt der Datenerhebung unter den 50 bis 59-Jährigen (299 Probanden) und damit ca. 12,5% der Studienkohorte sowie unter den 70 bis 79-Jährigen Probanden (39% Phlebitis). Die Patienten im Alter von 60 bis 69 Jahren sind mit 262 mit ca. 11% (an der Studienkohorte) ebenfalls häufig vertreten. Mit 160 Probanden und somit 6,7% der gesamten Studienprobanden sind die 40 bis 49-Jährigen sehr oft an Phlebitis erkrankt. Die restlichen Altersgruppen machen insgesamt einen geringeren Anteil an den Phlebitiserkrankten in der Gesamtkohorte aus (20 bis 29 Jahre 5 Probanden; 30 bis 39 Jahre 36 Probanden). Wie bereits angeführt, liegt der Phlebitisdurchschnitt bei 35% (Fiebig et al., 2010). Nach der Zuteilung zu bestimmten Altersgruppen zeigen sich lediglich die Probanden in der Altersgruppe 70 bis 79 Jahre mit 39% sowie die 50 bis 59-Jährigen über dem Phlebitisdurchschnitt mit ca. 38% Phlebitiserkrankter dieser Altersgruppen. Nur geringfügig unterhalb des Phlebitisdurchschnitts zeigten sich die Altersgruppen 40 bis 49 Jahre sowie 60 bis 69 Jahre. Deutlich unter 35% Phlebitisdurchschnitt zeigten sich die jüngeren Patienten (20 bis 39 Jahre) sowie die Patienten im fortgeschrittenen Alter ab 80 Jahre.

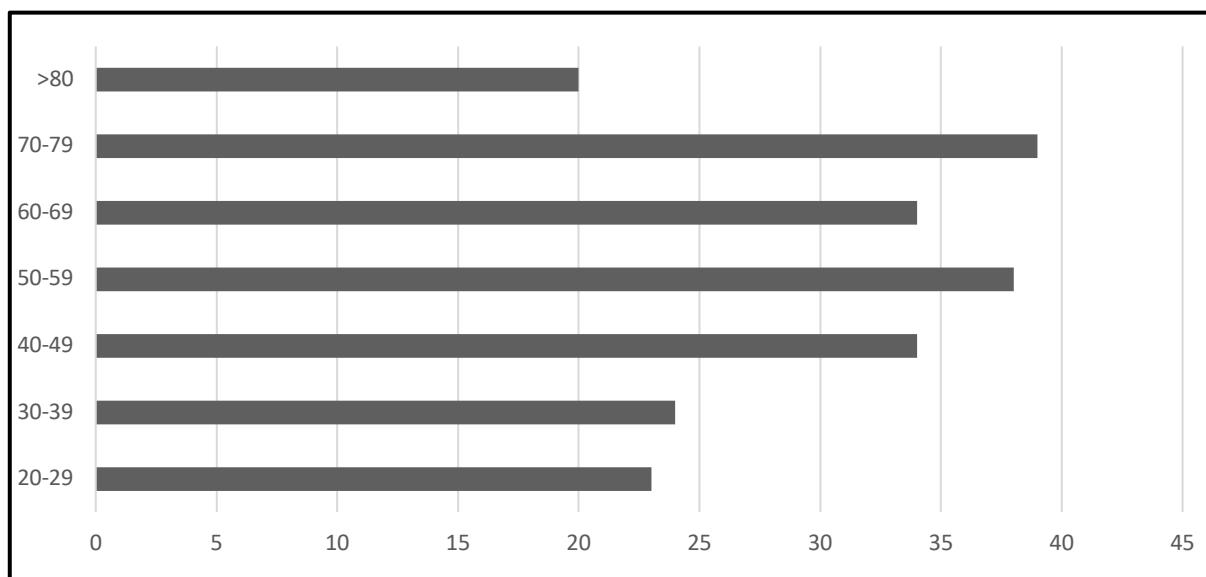


Abbildung 12 Abhängigkeit des Subphänotyps Phlebitis vom Patientenalter. Auf der X-Achse ist der Anteil der Patienten mit Phlebitis in Prozent, auf der Y-Achse die Altersgruppen (in Jahren) angegeben.

3.8 Ergebnisse der Assoziationsanalyse des Phänotyps Varikosis

Der Anteil der auswertbaren Genotypisierungsdaten (*Callrate*) betrug bei allen 7 Polymorphismen mindestens 95%, zudem wurden alle Marker bezüglich Ihrer Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der Kontrollen unter Anwendung eines exakten Tests (Wigginton et al., 2005) evaluiert und es zeigte sich für alle sieben Marker keine signifikante Auslenkung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Tabelle 6 Übersicht der verwendeten SNPs. Die Tabelle zeigt die SNPs mit Ihren rs Nummern, dem Chromosom sowie der Position. Ergänzend ist für jeden SNP die Call Rate und der p-Wert für die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht in den Kontrollen angegeben.

SNP Name	Chromosom	Position (kb)	Callrate	pHWE
rs6025	1	167785673	1,000	0.9893
rs1799963	11	46717631	0,990	0.6913
rs2227589	1	172152839	0,990	0,7999
rs1613662	19	60228407	1,000	0,9012
rs3087505	4	187416480	0,990	0,6289
rs13146272	4	187357205	0,990	0,5653
rs3756008	4	187422379	1,000	0,0573

Tabelle 7 Übersicht der unadjustierten Ergebnisse der Assoziationsanalyse des Phänotyps Varikosis. Die Tabelle zeigt die unadjustierten Ergebnisse der Genotypisierung der sieben getesteten Marker, die Analyse und Visualisierung erfolgte mittels Haploview 4.0 (Barett et al., 2005) und Genomizer Engine (Franke et al., 2006). Dargestellt sind die rs-Nummern der verifizierten SNPs sowie die Anzahl der homozygoten Träger des seltenen Allels und häufigen Allels in der Kontrollgruppe sowie Fallgruppe sowie die Anzahl der Heterozygoten in Kontroll- und Fallgruppe. Ferner ist die Frequenz des Minor Allels (MAF) der Fallkohorte und der Kontrollgruppe angegeben sowie die Ergebnisse der Allel- und der Genotyp-basierten Tests zwischen Fällen und Kontrollen mit dem entsprechendem p-Wert, Odds Ratio und das 95%-Konfidenzintervall. Ist eine Berechnung nicht möglich da die Genotypenhäufigkeit z.B. „0“ beträgt sind fehlende Werte mit „NA“ angegeben.

SNP Name	Allelverteilung			MAFc0	MAFcA	pCCA	pCCG	pCCR	ORR	ORR conf	pCCC	ORC	ORC conf	
	TT	CT	CC											
rs6025	Kontrollen	1	75	1387	0,03	0,04	0,003	0,014	0,004	1,50	1,14-1,98	0,405	0,41	0,05-3,64
	Fälle	4	177	2200										
		AA	GA	GG										
rs1799963	Kontrollen	0	30	1427	0,01	0,01	0,196	0,379	0,22	1,32	0,85-2,04	0,434	NA	NA
	Fälle	1	63	2315										
		TT	CT	CC										
rs2227589	Kontrollen	16	265	1178	0,10	0,10	0,733	0,93	0,711	0,97	0,82-1,14	0,999	1,00	0,53-1,87
	Fälle	26	419	1925										
		AA	GA	GG										
rs1613662	Kontrollen	32	365	1068	0,15	0,16	0,207	0,434	0,268	1,09	0,94-1,26	0,36	0,82	0,53-1,26
	Fälle	63	618	1687										
		GG	AG	AA										
rs3087505	Kontrollen	21	292	1145	0,11	0,10	0,021	0,011	0,06	0,86	0,73-1,01	0,007	2,46	1,25-4,85
	Fälle	14	436	1920										
		AA	CA	CC										
rs13146272	Kontrollen	159	660	640	0,34	0,34	0,676	0,404	0,835	0,99	0,86-1,12	0,234	0,88	0,72-1,08
	Fälle	288	1023	1046										
		TT	AT	AA										
rs3756008	Kontrollen	223	740	499	0,41	0,43	0,016	0,014	0,23	1,09	0,95-1,25	0,003	0,77	0,65-0,92
	Fälle	450	1159	766										

Abkürzungen:

- MAF Frequenz des weniger häufigen Allels (MAF = minor allele frequency) in Fällen (cases(ca)) und Kontrollen (control (co))
- pCCA p-Wert Allel-basierter Test der Fall-Kontroll-Analyse
- pCCG p-Wert Genotyp-basierter Test der Fall-Kontroll-Analyse
- pCCR p-Wert der Fall-Kontroll-Analyse für das weniger häufige Allel
- ORR Odds Ratio des weniger häufigen Allels
- ORR conf 95% Konfidenzintervall (KI) für die Odds Ratio des weniger häufigen Allels
- pCCC p-Wert der Fall-Kontroll-Analyse für das häufige Allel
- ORC Odds Ratio des häufigen Allels
- ORC conf 95% Konfidenzintervall für die Odds Ratio des häufigen Allels

Die Analyse der allelischen Einzelpunktassoziation für den SNP rs6025 (pCCA) zeigt einen nominal statistisch signifikanten Unterschied ($p= 0,003$) zwischen Fall- und Kontrollgruppe, auch die Fall-Kontroll Assoziationsanalyse der Genotypenfrequenz zeigt formal einen nominal statistisch signifikanten Unterschied (p -Wert von 0,004) für das weniger häufige Allel (pCCR) bei einer Odds Ratio (OR) von 1,5 und einem Konfidenzintervall von 1,14 bis 1,98. Unter Anwendung der Bonferroni Korrektur für multiples Testen zeigt sich weiterhin ein nominal statistisch signifikantes Ergebnis.

Die allel- und genotyp-basierten Assoziationsanalysen für rs3087505 zeigen nominal einen signifikanten p -Wert ($pCCA = 0,021$ und $pCCG = 0,011$) dieser ist allerdings unter Anwendung der Bonferroni Korrektur nicht signifikant. Auch die Assoziationsanalyse für das häufige Allel zeigt nominal ein statistisch signifikantes Ergebnis kann aber das Signifikanzniveau nach Bonferronikorrektur nicht erreichen ($pCCC = 0,007$; OR 2,46; KI 1,25 - 4,85).

Ferner zeigt die Analyse von rs3756008 zur allelischen und genotypischen Einzelpunktassoziation auch ein nominales Signifikanzniveau $p=<0,05$ ($pCCA = 0,016$; $pCCG = 0,014$) erreicht allerdings nicht das adjustierte Signifikanzniveau nach Bonferroni. Bemerkenswerterweise ergibt die Analyse des häufigen Allels (pCCC) einen signifikanten Unterschied zwischen der Fall- und Kontrollgruppe ($pCCC = 0,003$), das Odds Ratio zeigte sich allerdings nur bei 0,77 (KI 0,65 - 0,92).

Die Analysen der SNPs rs1799963, rs227589 sowie rs1613662 und rs13146272 zeigen sowohl für die allelische als auch für die genotypische Einzelpunktassoziation keinen signifikanten Unterschied zwischen der Patientengruppe und Kontrollgruppe in allen durchgeführten Tests.

3.9 Ergebnisse der Assoziationsanalyse des Phänotyps Varikosis nach logistischer Regressionsanalyse für Alter und Geschlecht

Aufgrund des bekannten Einflusses von Alter und Geschlecht auf das Krankheitsbild Varikosis (Fiebig et al., 2010) erfolgt die Fall-Kontroll-Analyse unter Anpassung der Einflussfaktoren mittels multipler logistischer Regression.

Tabelle 8 Übersicht der adjustierten Ergebnisse der Assoziationsanalyse des Phänotyps Varikosis. Angegeben sind die sieben Marker mit Ihren rs Nummern sowie dem adjustiertem p-Wert nach logistischer Regressionsanalyse (pLRT) für Alter und Geschlecht, bei dem Model (MUL = multiplikatives Modell; REC= rezessives Model) mit dem niedrigsten p-Wert sowie die Odds Ratio und das Konfidenzintervall.

SNP Name	Model	pLRT	OR (95%KI)
rs6025	MUL	0,00679	1,459 (1,108 - 1,937)
rs1799963	MUL	0,102	1446 (0,930 - 2,295)
rs2227589	MUL	0,6	0,958 (0,819 - 1,124)
rs1613662	MUL	0,411	1,057 (0,926 - 1,209)
rs3087505	MUL	0,0122	0,818 (0,700 - 0,957)
rs13146272	REC	0,187	1,153 (0,933 - 1,429)
rs3756008	REC	0,00127	1,346 (1,123 - 1,617)

Nach Anpassung für Alter und Geschlecht zeigen lediglich die SNPs rs6025 (multiplikatives Modell) und rs3756008 (rezessives Model) einen signifikanten Unterschied zwischen der Fallkohorte und Kontrollgruppe und zeigen sich auch für das adjustierte Signifikanzniveau von $p < 0,007$ signifikant. Der P-Wert für den Marker rs3087505 ist nur nominal signifikant. Die übrigen SNPs rs1799963, rs2227589, rs1613662 sowie rs13146272 zeigen keinen statistisch relevanten Unterschied zwischen den Kohorten.

3.10 Ergebnisse der Assoziationsanalyse des Subphänotyps Phlebitis nach logistischer Regressionsanalyse für Alter und Geschlecht

Die klinische Bedeutung des Subphänotyps Phlebitis sowie die Fokussierung auf das weibliche Geschlecht und das mittlere bis höhere Lebensalter sind bereits umfangreich beschrieben. Aufgrund der enormen klinischen Bedeutung des Subphänotyps Phlebitis erfolgt erstmalig die Fall-Kontroll-Analyse bezüglich einer Assoziation der bekannten Risikofaktoren einer tiefen Beinvenenthrombose (Bezemter et al., 2008) mit dem Subphänotyp Phlebitis. Angesichts der Tatsache, dass sowohl das Geschlecht als auch das Lebensalter einen Einfluss auf den Phänotyp Varikosis nehmen (Fiebig et al., 2010), erfolgt die Assoziationsanalyse des Subphänotyps Phlebitis unter Anpassung von Alter und Geschlecht mittels logistischer Regression.

Tabelle 9 Übersicht der adjustierten Ergebnisse der Assoziationsanalyse des Subphänotyps Phlebitis. Angegeben sind die sieben Marker mit Ihren rs Nummern sowie dem adjustiertem p-Wert nach logistischer Regressionsanalyse (für Alter und Geschlecht) bei dem Modell (MUL= multiplikatives Modell; DOM= dominantes Modell) mit dem niedrigsten p-Wert sowie die Odds Ratio und das Konfidenzintervall.

SNP Name	Model	pLRT	OR (95%KI)
rs6025	MUL	0,0062	1,528 (1,129 - 2,064)
rs1799963	DOM	0,000869	2,389 (1,434 - 4,007)
rs2227589	DOM	0,0429	0,795 (0,634 - 0,993)
rs1613662	MUL	0,475	1,062 (0,900 - 1,250)
rs3087505	DOM	0,276	0,885 (0,708 - 1,102)
rs13146272	DOM	0,151	0,881 (0,741 - 1,047)
rs3756008	DOM	0,000389	1,399 (1,162 - 1,689)

Die Analyse des SNPs rs6025 zeigt unter der Annahme eines multiplikativen Modells für die Einzelpunktassoziation einen p-Wert von 0,0062 und erreicht das Signifikanzniveau nach Bonferroni bei einem Odds Ratio von 1,528 (KI 1,129 - 2,064). Außerdem erreichen auch rs1799963 und rs3756008 unter dem dominanten Modell das Signifikanzniveau nach Bonferroni. Hervorzuheben ist hierbei das Odds Ratio von

2,389 (KI 1,434 - 4,007) für den SNP rs1799963 sowie eine OR von 1,399 (KI 1,162 - 1,689) für den SNP rs3756008. Die verbliebenen SNPs rs2227589, rs1613662 sowie rs3087505 und rs13146272 zeigen keine signifikanten Ergebnisse.

3.11 Ergebnisse der Assoziationsanalyse des Phänotyps Varikosis in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung

Zusätzlich zu Alter und Geschlecht zeigt die Varikosis auch eine Fokussierung auf fortgeschrittene Krankheitsstadien, sodass in dieser Studie erstmalig im Rahmen einer Subanalyse die Assoziation des Krankheitsstadiums mit den ausgewählten sieben Markern untersucht wurde. Diesbezüglich werden die Patienten mit einer chronisch venösen Insuffizienz (Stadium C3 bis C6 nach CEAP-Klassifikation) mit Patienten mit leichter phänotypischer Ausprägung (Stadium C2 nach CEAP Klassifikation) nach logistischer Regressionsanalyse für Alter und Geschlecht, verglichen. Die Subanalyse erreicht allenfalls beim SNP rs3756008 das Signifikanzniveau nach Bonferroni von $p < 0,007$ ($p_{LRT} = 0,00514$) mit einer aussagekräftigen Odds Ratio von 1,428 (KI 1,1 - 1,8), die restlichen Marker zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied der genotypischen Einzelpunktassoziation zwischen Patienten mit schwerem (Stadium C3-C6 nach CEAP-Klassifikation) und leichtem (Stadium C2 nach CEAP Klassifikation) Krankheitsbild.

Tabelle 10 Übersicht der adjustierten Ergebnisse der Assoziationsanalyse des Phänotyps Varikosis mit dem Erkrankungsstadium in der Patientenkohorte. Angegeben sind die sieben Marker mit Ihren rs Nummern sowie dem adjustierten p-Wert nach logistischer Regressionsanalyse (für Alter und Geschlecht) bei dem Modell (DOM= dominantes Modell; MUL= multiplikatives Modell; REC= rezessives Modell), mit dem niedrigsten p-Wert sowie die Odds Ratio und das Konfidenzintervall.

SNP Name	Model	pLRT	OR (95%KI)
rs6025	DOM	0,325	0,799 (0,494 - 1,238)
rs1799963	MUL	0,12	0,541 (0,208 - 1,157)
rs2227589	DOM	0,622	1,074 (0,805 - 1,418)
rs1613662	REC	0,343	1,382 (0,691 - 2,558)
rs3087505	REC	0,0256	0,000 (NA - 29717,747)
rs13146272	DOM	0,148	0,846 (0,675 - 1,061)
rs3756008	DOM	0,00514	1,428 (1,111 - 1,848)

4 Diskussion

Die Volkskrankheit Varikosis ist eine polygenetische und multifaktorielle Erkrankung und insbesondere die Annahme genetischer Einflüsse sind etabliert (Krysa et al., 2012; Fiebig et al., 2010; Lee et al., 2003). In den letzten Jahren sind diverse Studien veröffentlicht worden, in denen im Rahmen von genomweiten Assoziationsstudien mögliche Suszeptibilitätsgene beschrieben wurden (Shadrina et al., 2018 und Fukaya et al., 2018; Ellinghaus et al., 2016), die Ergebnisse sind bis dato allerdings sehr uneinheitlich und tragen bisher wenig zum Verständnis krankheitsverursachender Gene bei. Insbesondere die genetischen Einflüsse einer tiefen Beinvenenthrombose sind etabliert (Bezemer et al., 2008) und die Assoziation einer tiefen Beinvenenthrombose mit dem Phänotyp Varikosis wurde in weiteren Studien bestätigt (Fukaya et al., 2018; Chang et al., 2018). Aufgrund der pathophysiologischen Zusammenhänge beider Erkrankungen ist auch eine Assoziation der Varikosis (und chronisch venösen Insuffizienz) mit diesen etablierten Genvarianten nicht auszuschließen. Aufgrund dieser Annahme erfolgte eine Fall-Kontroll-Assoziationsanalyse der sieben etablierten Thrombosefaktoren (rs6025, rs1799963, rs2227589, rs1613662, rs3087505, rs13146272 sowie rs3756008) mit dem Phänotyp Varikosis und Subphänotyp Phlebitis an einer aussagekräftigen deutschen Stichprobe.

4.1 Auswahl des Studiendesigns

Die Aufdeckung genetischer Krankheitsursachen erfolgt idealerweise in mehreren Schritten, wobei zunächst untersucht werden sollte, ob eine Erkrankung vererbbar ist. Dieses konnte für die polygenetische Erkrankung der Varikosis an dieser Stichprobe bereits nachgewiesen werden (Fiebig et al., 2010). Ein Fall-Kontroll-Studiendesign eignet sich anschließend hervorragend um im Erfolgsfall einen signifikanten Unterschied zwischen den Gesunden und Erkrankten und damit eine Korrelation zwischen dem Risikofaktor und der Erkrankung herzustellen. Dazu wurden Allel- und Genotypfrequenzen der sieben bekannten Einzelnukleotidpolymorphismen betroffener Patienten, den Frequenzen gesunder Kontrollpersonen gegenübergestellt und die Signifikanz der Abweichung berechnet. Die retrospektive Assoziationsanalyse erfolgte an einer repräsentativen Stichprobe an Varikosis erkrankten Patienten der Mosel-Eifel-

Klinik Bad Bertrich (Fiebig et al., 2010) sowie einer gesunden Stichprobe der Biodatenbank popgen (Nöthlings et al., 2012; Krawczak et al., 2006).

Da die Ergebnisse im Vergleich zwischen Fällen und Kontrollen bestimmten Störgrößen (Confounder) unterliegen und einen systematischen Fehler (Bias) zur Folge haben kann, sollten mögliche Störgrößen minimiert werden. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den Fällen und Kontrollen zu gewährleisten, sollten sich die beiden Kohorten, wenn möglich, nur in dem zu untersuchenden Merkmal (Phänotyp Varikosis/Subphänotyp Phlebitis) unterscheiden. Um dies zu gewährleisten, ist die Kontrollgruppe ähnlich bezüglich der Altersverteilung ausgewählt worden. Vergleicht man das mittlere Alter bei Blutentnahme von 56 Jahren der Fallgruppe und 51,1 Jahren der Kontrollgruppe, so zeigt sich eine annährend gleiche Altersverteilung. Damit kein systematischer Fehler bezüglich der ethnischen Herkunft auftritt und damit eventuell eine höhere Prävalenz bezogen auf die Gesamtbevölkerung besteht (Populationsstratifikation), wurde bei der Auswahl der Patienten und Probanden auf eine deutsche Herkunft über zwei Generationen geachtet. Die popgen Biodatenbank stellt zudem eine für Deutschland repräsentative Kohorte zur Verfügung (Nöthlings et al., 2012; Krawczak et al., 2006), welche sich zur Aufklärung komplexer Erkrankungen eignet, und nicht von anderen Regionen in Deutschland abweicht (Krawczak et al., 2006), und stellt somit eine ideale Kontrollgruppe dar. Durch die sorgfältige Auswahl der Fallgruppe und der Kontrollgruppe haben Populationsstratifikationen keine großen Auswirkungen (Wacholder et al., 2002).

Dass die Kohorte für die Durchführung einer Fall-Kontroll-Studie geeignet ist zeigt sich auch darin, dass keiner der untersuchten SNP-Marker in der Kontroll-Gruppe signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abweicht. Um zudem eine möglichst hohe Power zu erreichen, konnte mit 2388 Patienten eine der größten nationalen Varikosiskohorte aufgebaut werden (Fiebig et al., 2010).

Kritisch zu bemerken bleibt allerdings, dass aufgrund der hohen Prävalenz der Varikosis nicht sicher ausgeschlossen werden kann, dass auch unter den Kontrollen klinisch unauffällige Merkmalsträger sein könnten, welches dann einen Einfluss auf das Ergebnis haben könnte. Die Alternative eines bevölkerungsrepräsentativen

Studienansatzes erfolgte im Rahmen einer *follow-up* Untersuchung der Bonner Venenstudie (Conrad 2015; Rabe et al., 2003;) an 974 Patienten mit überwiegend leichtem Phänotyp (Stadium C0, C1 und C2 nach CEAP-Klassifikation) und konnte keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der sieben SNPs (Bezemer et al., 2008) aufweisen, sodass ein Fall-Kontrollansatz mit einem starken Phänotyp der Probanden, die bestmögliche Voraussetzung für unsere Studie darstellt.

4.2 Diskussion der Gesamtkohorte

Die Volkskrankheit Varikosis (Rabe et al., 2003) ist bis dato in verschiedenen Studien, insbesondere epidemiologisch, untersucht worden (Fukaya et al., 2018; Vuylsteke et al., 2015; Carpentier et al., 2004; Rabe et al., 2003). Im Zeitraum von 2005 bis 2008 wurden 2701 Patienten mit einer behandlungsbedürftigen Varikosis in dieser Studie eingeschlossen, von denen 2388 Patienten randomisiert durch das popgen Institut (Nöthlings et al., 2012; Krawczak et al., 2006) ausgewählt wurden.

Betrachtet man andere deutsche epidemiologische Untersuchungen wie die Tübinger Studie (Fischer et al., 1981) oder die Bonner Venenstudie (Rabe et al., 2003), so zeichnet sich unsere Studie, aufgrund der strengen Einschlusskriterien (ab Stadium C2 nach CEAP), vor allem durch einen deutlich stärkeren Phänotyp aus. Die Klassifikation der Probanden erfolgte dabei nach internationalem Standard (CEAP Klassifikation, Eklof et al., 2004). Im Vergleich zur Bonner Venenstudie, zeigt unsere Kohorte bezüglich der Verteilung nach dem CEAP Stadium eine ausgeprägte Fokussierung auf die Stadien C3 - C6 und damit zu 84,3% Zeichen der chronisch venösen Insuffizienz. Die Bonner Venenstudie zeigte insbesondere eine ausgeprägte Verteilung in den Stadien C0 (9,6%), C1 (59,1%) und C2 (14,3%) und nur ca. 17% der Probanden hatten das klinische Bild einer chronisch venösen Insuffizienz (Rabe et al., 2003). Auch die epidemiologische Studie in Belgien und Luxemburg (Vuylsteke et al., 2015) mit 5740 eingeschlossenen Patienten hat einen großen Anteil asymptomatischer und symptomatischer Patienten mit einer C0 Klassifikation nach CEAP (38,7%) eingeschlossen. Mit 16,7% versus 15,7% in unserer Stichprobe ist das Stadium C2 nach CEAP beinahe gleich verteilt. Während in unserer Studie überwiegend das Stadium C3 nach CEAP Klassifikation eingeschlossen worden ist (64% der Fallkohorte), haben nur 13,7% der Patienten der luxemburgischen/belgischen Studie eine Varikosis der C3 Klassifikation nach CEAP. Auch eine fortgeschrittene Varikosis ab Stadium C4 bis C6 nach CEAP ist in unserer Kohorte prozentual deutlich häufiger vertreten (4,4% vs 3,0 %). Betrachtet man nur das Stadium C3 bis C6 nach CEAP Klassifikation (definiert als chronisch venöse Insuffizienz), so hebt sich das vorliegende Patientenkollektiv mit einer ausgeprägten Fokussierung auf eine fortgeschrittene Varikosis deutlich, von den bereits vorliegenden Studien ab.

Ein weiterer hervorzuhebender Aspekt ist die Vorrangstellung des weiblichen Geschlechts dieser Kohorte, es sind 70% der Probanden Frauen, dieses Ergebnis deckt sich mit den anderen großen epidemiologischen Studien. Insbesondere die epidemiologische Studie aus Belgien/Luxemburg zeigt mit einem Frauenanteil von 67,5% ähnliche Ergebnisse (Vuylsteke et al., 2015), die Bonner Venenstudie aus dem Jahr 2003 (Rabe et al., 2003) sowie die kürzlich publizierte Studie aus dem Vereinigten Königreich (Fukaya et al., 2018) zeigen nur eine leichte Dominanz des weiblichen Geschlechts (56% bei Rabe et al., 2003 und 54% bei Fukaya et.al., 2018). Der Risikofaktor weibliches Geschlecht ist bekannt und etabliert (Fiebig et al., 2010) und auch die möglichen Ursachen der weiblichen Dominanz in der Kohorte wie stattgehabte Schwangerschaften, Einfluss weiblicher Geschlechtshormone sowie einer höheren Bereitschaft zur medizinischen Versorgung sind bekannt (Chiesa et al., 2005; Capentier et al., 2004; Rabe et al., 2003; Jawien et al., 2003).

Vergleicht man auch das Durchschnittsalter der Probanden unserer Kohorte (56 Jahre \pm 10,6 Jahre; SD 21 - 81 Jahre), so ist dieses vergleichbar mit der großen multizentrischen Studie (58 Jahre SD 50 - 63 Jahre), die belgisch/luxemburgische Studie mit einem Durchschnittsalter von 53,4 Jahren und die Patienten der Bonner Venenstudie (48 Jahre \pm 16 Jahre) zeigen hingegen ein jüngeres Durchschnittsalter der Populationsgruppe. Als Ursache des höheren Patientenalters sind die unterschiedlichen Einschlusskriterien zu berücksichtigen, insbesondere der Einschluss asymptomatischer Patienten und Patienten mit Teleangiektasien (C0 und C1nach CEAP Klassifikation) in die Bonner Venenstudie, welche zusammen 68,7% der Gesamtkohorte ausmachen und somit deutlich jüngere Patienten mit kosmetischen Veränderungen einschließt.

Auch wenn diese Fallkohorte insgesamt weniger Patienten eingeschlossen hat, ist sie dennoch aktuell die zweitgrößte in Deutschland. Zusammenfassend ist die aufgebaute Kohorte vergleichbar mit bereits bestehenden epidemiologischen Daten der vergleichbaren Bonner Venenstudie und belgischen/luxemburgischen Studie, hervorzuheben ist allerdings der deutlich stärkere Phänotyp dieser Studie, welches die Voraussetzung für die anschließende genetische Untersuchung darstellt.

Tabelle 11 Patientenkollektive im Vergleich. Die Übersicht stellt die Krankheitsstadien nach CEAP Klassifikation des Probandenkollektives der Assoziationsstudie des IKMB Kiel (Fiebig et al., 2010), im Vergleich zur epidemiologischen Studie aus Luxemburg/Belgien (Vuylsteke et al., 2015) und der Bonner Venenstudie (Rabe et al., 2003) dar. Neben den absoluten Zahlen ist der Anteil an der Gesamtkohorte in Klammern, in Prozent, angegeben.

CEAP	Kiel	Luxemburg/Belgien	Bonn
C0	0 (0%)	2221 (38,7%)	294 (9,6%)
C1	0 (0%)	1072 (18,7%)	1814 (59,1%)
C2	375 (15,7%)	960 (16,7%)	439 (14,3%)
C3	1530 (64,0%)	784 (13,7%)	412 (13,4%)
C4	379 (15,9%)	530 (9,2%)	88 (2,9%)
C5 & C6	104 (4,4%)	173 (3,0%)	22 (0,7%)
C3 – C6	2013 (84,3%)	1478 (25,7%)	522 (17%)
Gesamt	2388	5740	3069

4.3 Assoziation der Kandidatengene mit dem Phänotyp Varikosis

Grundlage der genetischen Untersuchung sind sieben als Risikofaktoren der tiefen Beinvenenthrombose etablierte Einzelpunktmutationen (Bezemter et al., 2008). Aus der bereits bekannten und angeführten Studie sind die Faktor 5-Leiden Mutation (rs6025) sowie die Prothrombinmutation (rs1799963) als potentielle Risikofaktoren für eine tiefe Beinvenenthrombose etabliert (Bezemter et al., 2008) und dienen der Positivkontrolle unserer Genotypisierung.

Obwohl sich für den SNP rs6025 ein signifikantes Ergebnis in der allelischen und genotypischen Fall-Kontroll-Einzelpunktassoziationsanalyse zeigt ($p_{CCA} = 0,003$; $p_{CCR} = 0,004$), relativiert sich der Effekt aufgrund der niedrigen Allelfrequenz von 3% in den Kontrollen und 4% in der Fallgruppe. Ähnlich niedrige Allelfrequenzen für rs6025 von 2 bis 7% wurden bereits in einer holländischen und schwedischen Population beschrieben (Majerus et al., 1994) und decken sich demnach mit den Ergebnissen dieser Studie. Die Effektstärke ist aufgrund der niedrigen Allelfrequenz und der Odds Ratio von 1,5 (KI 1,14 - 1,98) für die genotypische Assoziationsanalyse allerdings als gering einzuschätzen. Zudem ist anzumerken, dass die Ergebnisse unadjustiert sind und daher das Risiko für falsch positive Ergebnisse erhöht ist weswegen in den weiteren Analysen eine Adjustierung erfolgte. Nach logistischer Regressionsanalyse der bekannten Einflussgrößen Alter und Geschlecht zeigt die Assoziationsanalyse für den SNP rs6025 nominal ein schwach signifikantes Ergebnis nach Bonferroni ($p_{LRA} = 0,00679$). Demnach ist eine geringe Assoziation zu vermuten, dennoch ist der Einfluss der Faktor-5 Leiden Mutation auf die Prädisposition einer primären Varikosis bei niedriger Effektstärke (Odds Ratio 1,459; KI 1,108 - 1,937) als gering einzuschätzen.

Für den Polymorphismus des Faktor 11 (rs3756008) zeigt sich keine Signifikanz nach Analyse der Einzelpunktassoziation, lediglich die Fall- Kontrollanalyse für das häufige Allel zeigt sich schwach signifikant nach Bonferroni ($p_{CCC} = 0,003$), jedoch muss das Ergebnis aufgrund der OR von 0,77 (KI 0,65 - 0,92) relativiert werden. Nach logistischer Regressionsanalyse zeigt sich unter dem rezessiven Modell ein, im Vergleich zum SNP rs6025 nominal signifikanteres Ergebnis ($p_{LRA} = 0,00127$; OR 1,35; KI 1,12 - 1,62). Dennoch ist zu betonen, dass nach logistischer

Regressionsanalyse dieser wichtigen Einflussgrößen (Alter und Geschlecht) sowie unter Verwendung verschiedener genetischer Modelle die Ergebnisse deutlich unter dem Signifikanzniveau nach Bonferroni liegen müssten und auch die Odds Ratios aussagekräftiger sein müssten.

Die Fall-Kontroll-Analysen der SNPs rs2227589 (*SERPINC1*), rs1613662 (GP6) und rs13146272 (*CYP4V2*) der großen genetischen Studien (LETS, MEGA-1 und MEGA-2) zeigen erstaunlicherweise überhaupt keine statistische Signifikanz. Die Assoziationsanalyse der SNPs rs1799963 und rs3087505 blieben ebenfalls ohne statistische Signifikanz.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der Fall-Kontroll-Assoziationsanalyse vermuten, dass die primäre Varikosis allenfalls eine leichte Assoziation mit der Faktor 5 Leiden Mutation und dem Faktor 11 Polymorphismus haben könnte. Aufgrund der allerdings nur nominal signifikanten Ergebnisse bei einer Vielzahl betrachteter SNPs und Verwendung mehrerer genetischer Modelle, weisen die Ergebnisse trotz Korrektur für multiples Testen darauf hin, dass der Phänotyp Varikosis vermutlich unabhängig von den sieben etablierten Einzelpunktmutationen einer hereditären Thrombophilie (Bezemer et al., 2008) ist.

Die genomweite Assoziationsstudie (Ellinhaus et al., 2017), welche auf dieser Gesamtkohorte basiert, konnte zwar weitere Genmutationen (*EFEMP1*, *SKAP2* und *KCNH8*) identifizieren, zusammen allerdings nur ca. 2 % der Heritabilität einer primären Varikosis (Ellinhaus et al., 2017) erklären. Auch die Ergebnisse der britischen genomweiten Assoziationsstudie (Fukaya et al., 2018), mit dem Nachweis von weiteren 855 SNPs mit Assoziation zum Phänotyp der Varikosis unterstreichen den polygenetischen Einfluss der Erkrankung.

4.4 Phlebitis, ein klinisch bedeutender Subphänotyp

Erstmalig ist der Subphänotyp Phlebitis detailliert epidemiologisch untersucht worden. So zeigen ca. ein Drittel der Studienkohorte (35%, 836 Probanden) das Beschwerdebild der Phlebitis (Fiebig et al., 2010) und es zeigen sich insbesondere eine Fokussierung auf ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium, ein höheres Lebensalter sowie auf das weibliche Geschlecht. Analog der epidemiologischen Ergebnisse des Phänotyps Varikosis zeigen insbesondere Frauen ein gehäuftes Auftreten der Phlebitis im Vergleich zu den männlichen Probanden. So zeigen 39% der Frauen, aber nur 26% der Männer, eine Entzündungssymptomatik. Demzufolge zeigt sich eindeutig eine Geschlechtsspezifität des Subphänotyps Phlebitis. Ursächlich ist einerseits ein früherer Erkrankungsbeginn bei Frauen als bei Männern (30. Lebensjahr versus 37. Lebensjahr; Fiebig et al., 2010) verbunden mit einer längeren Krankheitsdauer und demzufolge einem deutlich erhöhtem Risiko für die Ausbildung einer fortgeschrittenen Varikosis (Fiebig et al., 2010; Kopetsch 2010). Der frühe Krankheitsbeginn bei Frauen ist vor allem durch hormonelle Einflüsse (insbesondere Östrogene und Gestagene) auf die glatte Gefäßmuskulatur und Dehnbarkeit der Kollagenfasern zurückzuführen (Fowkes et al., 2001; Göretzlehner et al., 1999). Die hormonellen Einflüsse bestehen vor allem bei Hormonsubstitution (Kontrazeptiva) oder während der Schwangerschaft. In der Gesamtkohorte (2701 Probanden) waren ca. 87% der Frauen mindestens einmal schwanger, ca. 66% sind mehrmals schwanger gewesen (Fiebig et al., 2010). Diese frühen Einflüsse auf die Hämodynamik des Blutflusses in der Vene begünstigen einen frühen Beginn der Varikosis und somit, bei progredientem Krankheitsverlauf, ein verstärktes Auftreten der Entzündungssymptomatik im höheren Erkrankungsstadium.

Überdies wurden erstmalig epidemiologische Daten in Bezug des Probandenalters zum Auftreten einer Phlebitis erhoben. Die erhobenen Daten zeigen, dass geschlechtsunabhängig vor allem die älteren Patienten betroffen sind, ein eindeutig linearer Anstieg wie beim Phänotyp Varikosis (Fiebig et al., 2010) besteht allerdings nicht.

Betrachtet man darüber hinaus die Bedeutung des Subphänotyps Phlebitis in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium (CEAP Stadium), so zeigt sich insbesondere

eine Fokussierung auf die fortgeschrittenen Krankheitsstadien. Speziell die fortgeschrittenen Stadien C5 und C6 nach CEAP Klassifikation weisen zu 53% den Subphänotyp Phlebitis auf. Im Stadium C4 zeigen immerhin 40% und im Stadium C3 noch 34% der Patienten eine Phlebitis, sodass der Subphänotyp als Zeichen einer progressiven Erkrankung zu sehen ist.

Es wird angenommen, dass die Phlebitis die Hauptursache der Schmerzsymptomatik darstellt, als eine der führenden Beschwerden mit hohem Leidensdruck gilt (Bradbury et al., 1999) und eine Auswirkung auf die Lebensqualität der Betroffenen hat (Andreozzi et al., 2005; Launois et al., 1996). Obwohl die Schmerzsymptomatik so bedeutend für die Betroffenen ist, ist der kausale Zusammenhang zwischen der Varikosis und den auftretenden Schmerzen weiterhin nur unzureichend erklärt, dennoch werden überwiegend inflammatorische Prozesse angenommen. Neurophysiologische Schmerzursachen (Arndt et al., 1991) und biochemische Prozesse, welche durch inflammatorische Prozesse zum Umbauprozess der Venenwand beitragen (Michiels et al., 2002; Badier-Commandier et al., 2000; Castro-Ferreira et al., 2017), wurden beschrieben, können die Vielschichtigkeit der Schmerzentstehung einer varikösen Vene jedoch nicht ausreichend erklären. Insbesondere die Unabhängigkeit der Schmerzsymptomatik vom Schweregrad der Erkrankung (Danziger et al., 2007) und die mehrfach beschriebene Inflammation der Venenwand, definiert als Phlebitis, untermauern die enorme Bedeutung.

4.5 Assoziation der Kandidatengene mit dem Subphänotyp

Phlebitis

Aufgrund der klinischen Bedeutung der Inflammation erfolgte erstmalig eine Assoziationsanalyse der sieben beschriebenen Einzelpunktmutationen (Bezemer et al., 2008) mit dem Subphänotyp Phlebitis. Aufgrund des progressiven Charakters des Subphänotyps Phlebitis mit starker Fokussierung auf ein höheres Lebensalter und dem weiblichen Geschlecht, erfolgte auch hier die logistische Regressionsanalyse.

Von den sieben SNPs zeigen die genotypischen Assoziationsanalysen der Polymorphismen von Faktor 2 und Faktor 11 (rs1799963 und rs3756008) ein signifikantes Ergebnis nach Bonferroni ($p_{LRA} = 0,000869$ und $p_{LRA} = 0,000389$). Die Prothrombinmutation (rs1799963) ist als Risikofaktor einer tiefen Beinvenenthrombose etabliert (Hylckama et al., 2014; Cohen et al., 2014, Bezemer et al., 2008) und neben der bekannten Rolle in der Hämostase und Thrombose sind weitere biologische Funktionen des Prothrombins und Thrombins beschrieben, hervorzuheben ist die Mitwirkung bei Entzündungsvorgängen oder der Immunaktivierung (Levi et al., 2003; Strukova et al., 2001; Narayanan et al., 1999). Auch wenn die genauen Zusammenhänge einer Prothrombinmutation auf die Entwicklung einer Phlebitis ungeklärt sind, lässt sich aufgrund der vielseitigen Funktionen des Prothrombins und der nachgewiesenen Assoziation einer Prothrombinmutation mit dem Subphänotyp Phlebitis ein Zusammenhang vermuten dem weitere Studien folgen sollten. Die Bedeutung der Einzelpunktmutation rs3756008 im Rahmen der hereditären Thrombophilie ist umstritten (Austin et al., 2011; Bezemer et al., 2008), für eine Mitbeteiligung bei Entzündungsvorgängen besteht allerdings aktuell eine schlechte Datenlage. Im Rahmen einer Tierstudie (Tucker et al., 2012) an Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass der Faktor 11 an der Aktivierung einer Inflammation im Rahmen einer Sepsis beteiligt ist und auch die Mitwirkung im Rahmen der Phlebitis somit denkbar wäre. Insbesondere die Häufigkeit der Einzelpunktmutation rs3756008 in unserer Fallkohorte (minimale Allelfrequenz 43%) untermauert eine mögliche Assoziation.

4.6 Bewertung der Ergebnisse

Erstmalig erfolgte die Evaluierung einer Assoziation etablierter genetischer Risikofaktoren einer tiefen Beinvenenthrombose (Bezemerd et al., 2008) mit dem Phänotyp Varikosis und dem Subphänotyp Phlebitis an einer aussagekräftigen deutschen Stichprobe (Fiebig et al., 2010) und einer repräsentativen Kontrollgruppe (Nöthlings et al., 2012; Krawczak et al., 2006). Dieses Studiendesign benötigt eine große Stichprobe um kleine Effektgrößen nachzuweisen. Powerkalkulationen zeigen, dass mindestens 1000 Patienten notwendig sind, um genetische Effekte zu entdecken, die kleiner als 1% der Varianz sind (Bretthauer 2013). Insbesondere Assoziationen mit komplexen polygenen Erkrankungen wie der Varikosis sind allgemein schwierig zu replizieren (Sullivan et al., 2007) und benötigen ausreichend große Stichproben. Die vorliegenden Assoziationsanalysen erfolgten an 2388 Patienten für den Phänotyp Varikosis, sodass die Ergebnisse als reliabel angesehen werden können. Die Assoziationsanalyse zum Subphänotyp Phlebitis erfolgte allerdings nur an 836 Patienten der Studienkohorte, diese Stichprobengröße ist möglicherweise zu gering um ein verlässliches Ergebnis zu erzielen. Powerkalkulationen für den Subphänotyp Phlebitis zeigen nur für den SNP rs6025 eine Teststärke $> 80\%$, für eine Power von 90% sind hingegen deutlich größere Stichproben notwendig. Aufgrund der zu geringen Teststärke und der kleinen Effektgröße kann der genetische Unterschied zwischen den Fällen und Kontrollen möglicherweise nicht detektiert werden und es liegt ein sogenannter Typ-2-Fehler vor. Auch die formal statistisch signifikanten Ergebnisse für rs1799963 und rs3756008 sind aufgrund der geringen Teststärke kritisch zu bewerten, da aufgrund der niedrigen Teststärke die Wahrscheinlichkeit sinkt, dass tatsächlich ein Unterschied existiert (Button et al., 2013).

Tabelle 12 Kalkulierte Stichprobengröße für den Subphänotyp Phlebitis. Dargestellt sind die Ergebnisse der Powerkalkulation der Assoziationsanalyse für den Subphänotyp Phlebitis und den untersuchten SNPs. Die Powerkalkulation erfolgte für ein Signifikanzniveau $p < 0,05$, angegeben ist die Power für jeden SNP sowie die notwendige Stichprobengröße der Fallkohorte und Kontrollgruppe für eine Power von 90%.

SNP Marker	OR	Power ($\alpha = 0,05$)	N-Fälle / N-Kontrollen für 90% Power
rs6025	1,49	0,884	1875 / 1152
rs1799963	1,33	0,246	11572 / 7087
rs2227589	0,97	0,067	124504 / 76644
rs1613662	1,08	0,219	13319 / 8245
rs3087505	0,84	0,617	3651 / 2246
rs13146272	1,02	0,068	116481 / 71985
rs3756008	1,12	0,663	3292 / 2181

Die Assoziationsanalyse für den Phänotyp Varikosis und Subphänotyp Phlebitis zeigen für die SNPs rs6025 und rs3756008 ein signifikantes Ergebnis nach Bonferroni, der SNP rs1799963 ist lediglich für den Subphänotyp formal signifikant. Da an unserer Kohorte sieben Marker hinsichtlich eines Unterschiedes zur Kontrollgruppe untersucht wurden, steigt die Irrtumswahrscheinlichkeit, also die Wahrscheinlichkeit, dass ein signifikantes Ergebnis erreicht wird, ohne dass es einen wahren Unterschied zur Kontrollgruppe gibt (Weiß 2010). Es erfolgte daher die Korrektur nach Bonferroni und ein signifikantes Ergebnis wird erst ab einem p -Wert $< 0,007$ erreicht. Diese Methode gilt als äußerst konservativ, da das Auffinden von Unterschieden deutlich erschwert ist (Bortz 2008). Dennoch ist dieses Verfahren, insbesondere im Rahmen multiplen Testens, etabliert und reduziert die Irrtumswahrscheinlichkeit der vorliegenden Ergebnisse. Da in dieser Studie allerdings auch eine logistische Regression in Bezug der wichtigsten Confounder (Alter und Geschlecht) sowie unterschiedliche Berechnungsmodelle (dominant, rezessiv und multipikativ) erfolgten, sollten die Ergebnisse deutlicher das Signifikanzniveau nach Bonferroni erreichen. Es ist anzumerken, dass Berichte über Assoziationen häufig überinterpretiert werden (Cardon et al., 2003; Colhoun et al., 2003) und gefundene Gen-Krankheits-Assoziationen sich häufig nicht bestätigen lassen. Die Gründe dafür sind insbesondere

durch Populationsstratifikationen sowie durch das multiple Testproblem bedingt (Cardon et al., 2001). Populationsstratifikationen lassen sich allerdings durch sorgfältige Auswahl der Fallgruppe und Kontrollgruppe, wie in der vorliegenden Studie erfolgt, soweit reduzieren, dass keine großen Auswirkungen auf die Ergebnisse zu erwarten sind (Wachholder et al., 2002).

4.7 Ausblick

In dieser Studie konnte zwar eine signifikante Assoziation bekannter Thrombosefaktoren (Bezemer et al., 2008) mit einer klinisch relevanten Varikosis ausgeschlossen werden, dennoch zeigen die nominal schwach signifikanten Ergebnisse von rs6025 und rs3756008 sowie die nominal signifikante Assoziation von rs3756008 mit dem Subphänotyp Phlebitis, dass weitere genetische Untersuchungen folgen müssen um die komplexe polygenetische Erkrankung Varikosis zu entschlüsseln. Da der Einfluss einzelner Genvarianten auf das Krankheitsbild gering ist, kann die Identifikation einzelner Gene schwierig sein. Eine passende Lösung sind genomweite Assoziationsstudien (GWAS), diesbezüglich erfolgte eine GWAS des IKMB Kiel an 2296 Patienten und 7765 Kontrollen und konnte drei weitere Genvarianten mit einer Assoziation zur chronisch venösen Insuffizienz identifizieren (Ellinghaus et al., 2017). Um jedoch diese polygenetische Volkskrankheit Varikosis ausreichend zu verstehen, sind weitere GWAS Studien mit größeren Kohorten sowie weiteren funktionellen Studien notwendig, um in Zukunft eine individuelle Risikoeinschätzung einzelner Patienten vorzunehmen sowie individuelle Heilverfahren und Vorsorgemaßnahmen ergreifen zu können.

5 Zusammenfassung

Die Volkskrankheit Varikosis ist aus medizinischer, sozialer und ökonomischer Sicht eine bedeutende Erkrankung mit hoher Prävalenz in den Industriestaaten. Neben den bekannten Risikofaktoren konnte an einer aussagekräftigen Stichprobe von 2701 Patienten mit Stammvenenvarikosis erstmalig die Heritabilität ($h^2 = 17,3\%$) geschätzt werden (Fiebig et al., 2010).

Ziel dieser Arbeit war es Risikogene dieser polygenetischen Erkrankung zu identifizieren. Als Grundlage dienten sieben bekannte und etablierte genetische Risikofaktoren einer tiefen Beinvenenthrombose (Bezemer et al., 2008). Die Genotypisierung an 2388 randomisierten Probanden der Mosel-Eifel-Klinik Bad Bertrich und 1472 Kontrollen des popgen Instituts in Kiel erfolgte als Fall-Kontroll-Assoziationsstudie.

Die Einzelnukleotid-Polymorphismen **rs6025** (Faktor 5 Leiden Mutation), **rs1799963** (Prothrombinmutation), **rs2227589** (SERPINC1 Polymorphismus), **rs1613662** (Glykoprotein 6 Polymorphismus), **rs3087505** (KLKB1 Polymorphismus), **rs13146272** (CYP4V2 Polymorphismus) und **rs3756008** (Faktor 11 Polymorphismus) wurden mittels Assoziationsanalysen verifiziert sowie von den wichtigen Einflussgrößen Alter und Geschlecht mittels logistischer Regressionsanalyse bereinigt.

Die Genotypisierung erfolgte für den Phänotyp Varikosis und den Subphänotyp Phlebitis. Die Assoziationsanalysen für rs6025 und rs3756008 zeigten ein nominal statistisch signifikantes Ergebnis bei nur schwacher Aussagekraft nach Bonferroni-Korrektur. Die anderen untersuchten Marker zeigten keine signifikante Assoziation mit dem Phänotyp Varikosis. Die Genotypisierung für den Subphänotyp Phlebitis zeigte ein nominal signifikantes Ergebnis für rs1799963 und rs3756008 nach Bonferroni-Korrektur. Aufgrund der niedrigen Allelfrequenz von rs1799963 ist der Einfluss der Prothrombinmutation allenfalls als gering einzustufen. Erstmalig konnte eine schwache Assoziation des Polymorphismus rs3756008 mit dem Subphänotyp Phlebitis nachgewiesen werden. Obschon sieben Einzelnukleotid-Polymorphismen ausgewählt und mehrere genetische Modelle verwendet wurden, weisen die Assoziationsanalysen nach Korrektur für multiples Testen nur nominal signifikante

Ergebnisse bei niedriger Teststärke auf. Resümierend ist davon auszugehen, dass der Phänotyp Varikosis sowie der Subphänotyp Phlebitis allenfalls eine geringe Assoziation mit den genannten etablierten Einzelpunktmutationen einer hereditären Thrombophilie (Bezemter et al., 2008) haben, vermutlich aber unabhängig von diesen sind, sodass weitere Analysen mit größeren Stichproben notwendig sind.

Ferner erfolgte eine umfangreiche epidemiologische Darstellung des Subphänotyps Phlebitis. Bei ca. 35% der Patienten, mit Fokussierung des weiblichen Geschlechts, konnte eine Phlebitis nachgewiesen werden. Außerdem zeigt die Phlebitis einen progressiven Charakter mit Fokussierung auf ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium und offenbart sich insbesondere im mittleren und fortgeschrittenen Lebensalter. Der bis dato vernachlässigte Subphänotyp Phlebitis ist somit ein Kennzeichen einer progressiven Varikosis mit hohem Maß an Beschwerden und Leidensdruck für die Patienten und bedarf besonderer Aufmerksamkeit.

6 Literaturverzeichnis

Abudureheman K, Mahemut A., Xia Y.N., Hu X.M. Association between gene polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine in Uygur patients with venous thromboembolism. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2012; 40: 1030-1036.

Abramson JH, Hopp C, Epstein LM: The epidemiology of varicose veins. A survey in western Jerusalem. *J. Epidemiol. Community Health* 1981;35-213-217.

Agu O, Hamilton G, Baker DM, Dashwood MR. Endothelin receptors in the aetiology and pathophysiology of varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002 Feb;23(2):165-71.

Ahn, SJ et al., PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post PCR. *Nucleic Acids Res.* 1996 Jul 1; 24(13):2623-5.

Al-Batayneh KM, Al Battah RM. Genetic variation in the proximal 5' UTR of FOXC2 gene in varicose veins and hemorrhoids patients. *Int J Integ Biol* 2008;4(2):78-80.

Almasy L, Blangero J. Multipoint quantitative-trait linkage analysis in general pedigrees. *Am J Hum Genet* 1998;62(5):1198-1211.

Andreozzi GM, Cordova RM, Scomparin A, Martini R, D'Eri A, Andreozzi F; Quality of Life Working Group on Vascular Medicine of SIAPAV. Quality of life in chronic venous insufficiency. An Italian pilot study of the Triveneto Region. *Int Angiol.* 2005 Sep;24(3):272-7.

Antòn AI, Teruel R, Corral J, Minano A, Martinez-Martinez I, Ordonez A, Vicente V, Sanchez-Vega B. Functional consequences of prothrombotic SERPINC1 rs2227589 polymorphism on antithrombin levels. *Haematologica.* 2009 Apr;94(4):589-92. Epub 2009 Feb 19.

Arndt JO, Klement W. Pain evoked by polymodal stimulation of hand veins in humans. *J Physiol.* 1991;440:467-78.

Augustin M, Zschocke I, Vanscheidt W, Schöpf E. Lebensqualität bei chronischer Veneninsuffizienz. Der Freiburger Fragebogen zur Erfassung der Lebensqualität bei Venenerkrankungen. *Dtsch Ärztebl* 1999;96(30):A1971–A1973.

Austin H, De Staercke C, Lally C, Bezemer I.D., Rosendaal F.R., Hooper W.C. New gene variants associated with venous thrombosis: replication study in White and Black Americans. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2011;3:489-495.

Badier-Commander C, Verbeuren T, Lebard C, Michel JB, Jacob MP. Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins: a possible explanation for extracellular matrix accumulation. *J Pathol.* 2000 Sep;192(1):105-12.

Barrett JC1, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005 Jan 15;21(2):263-5. Epub 2004 Aug 5.

Barthels M, Poliwoda H. Gerinnungsanalysen. 5. Auflage. Stuttgart: Thieme; 1996.

Balding DJ, (2006). "A tutorial on statistical methods for population association studies." *Nat Rev Genet* 7(10): 781-91.

Bearden J, et al., Isolation of nucleolar proteins by ethanol precipitation of nucleic acids. *Biochim Biophys Acta.* 1974 Aug 15; 361(1):109-113.

Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendall FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994 May 5;369(6475):64-7.

Bertrand C, Batt AM, Cytochromes P450, vascular tone varicose, *Ann Pharm Fr*, 2003 Jul;61(4):234-42.

Bezemer ID, BARE LA, Doggen JM et al., Gene Variants Associated With Deep Vein Thrombosis. JAMA 2008;299:1306-1314.

Bharath V, Kahn SR, Lazo-Langner A. Genetic polymorphisms of vein wall remodeling in chronic venous disease: a narrative and systematic review. Blood. 2014 Aug 21;124(8):1242-50.

Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. JAMA 2005; 293: 715-722.

Bortz J, Lienert GA. Kurzgefasste Statistik für die Klinische Forschung, 3. Auflage. Springer Medizin Verlag. Heidelberg.

Bradbury A, Evans C, Allan P, Lee A, Ruckley CV, Fowkes FGR. What are the symptoms of varicose veins? Edinburgh vein study cross sectional population survey. *BMJ : British Medical Journal*. 1999;318(7180):353-356.

Braun A, Müller B, Rosche AA. Population study of the G1691A mutation (R506Q, FV Leiden) in the human factor V gene that is associated with resistance to activated protein C. Human Genet. 1996 Feb; 97(2):263-4.

Bretthauer K, Assoziationsstudie zum Einfluss eines intronischen Polymorphismus im GRM3-Gen auf kognitive Leistungen. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München. 2013.

Bruzelius M, Ljungqvist M, Bottai M, Bergendal A, Strawbridge RJ, Holmström M, Silveira A, Kieler H, Hamsten A, Lärfars G, Odeberg J. F11 is associated with recurrent VTE in women. A prospective cohort study. Thromb Haemost. 2016 Jan;115(2):406-14.

Buddecke E, Pathobiochemie der Venenwand. Phlebologie 1995;24:153-162.

Button KS, Ioannidis JP, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ES, Munafò MR. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience.

Nat Rev Neurosci. 2013 May;14(5):365-76.

Chang SL, Huang YL, Lee MC, Hu S, Hsiao YC, Chang SW, Chang CJ, Chen PC. Association of Varicose Veins With Incident Venous Thromboembolism and Peripheral Artery Disease. JAMA. 2018 Feb 27;319(8):807-817.

Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. Nat Rev Genet. 2001 Feb;2(2):91-9.

Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. Lancet. 2003 Feb 15;361(9357):598-604.

Carpentier PH, Maricq HR, Biro C, Ponçot-Makinen CO, Franco A. Prevalence, risk factors, and clinical patterns of chronic venous disorders of lower limbs: a population-based study in France. J Vasc Surg 2004;40(4):650–659.

Castro-Ferreira R, Cardoso R, Leite-Moreira A, Mansilha A. The Role of Endothelial Dysfunction and Inflammation in Chronic Venous Disease. Ann Vasc Surg. 2017 Jul 6. pii: S0890-5096(17)30843-9.

Chakravarti, A. Population genetics—making sense out of sequence. *Nat Genet* **21**, 56–60 (1999).

Chiesa R, Marone EM, Limoni C, Volonté M, Schaefer E, Petrini O. Demographic factors and their relationship with the presence of CVI signs in Italy: the 24-cities cohort study. Eur J Vasc Endovasc Surg 2005;30(6):674–680.

Christensen K, Murray JC. What genome-wide association studies can do for medicine. N Engl J Med 2007;356:1094-1097.

Cohen W., Castelli C., Suchon P., Bouvet S., Aillaud M.F., Bru- net D., Barthet M.C., Alessi M.C., Trégouët D.A., Morange P.E. Risk assessment of venous thrombosis in families with known hereditary thrombophilia: the MARseilles-Nîmes prediction model. J Thromb Haemost 2014; 12: 138-146.

Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. Lancet. 2003 Mar 8;361(9360):865-72.

Conrad, CC, Validierung bekannter genetischer Risikofaktoren für eine Beinvenenthrombose in einer populationsrepräsentativen Kohorte und deren Untersuchung auf ihre prädisponierenden Eigenschaften für eine chronisch venöse Erkrankung (2014). Kiel, Univ., Diss., 2015.

Coon WW, Willis PW 3rd, Keller JB. Venous thrombo-embolism and other venous disease in the Tecumseh community health study. Circulation 1973;48: 839-846.

Cumming AM, Shiach CR. The investigation and management of inherited thrombophilia. Clin Lab Haematol 1999; 21: 77-92.

Danziger N. [Pathophysiology of pain in venous disease]. J Mal Vasc. 2007 Feb;32(1):1-7.

Darvall Katy A.L., Rachel C. Sam, Donald J. Adam, Stanley H. Silverman, Christopher D. Fegan, Andrew W. Bradbury, Higher prevalence of thrombophilia in patients with varicose veins and venous ulcers than controls, Journal of Vascular Surgery, Volume 49, Issue 5, 2009, Pages 1235-1241.

De Backer G. Epidemiology of chronic venous insufficiency. Angiology.1997;48:569-576.

Delluc A, Montavon S, Cancéil O, Carpentier M, Nowak E, Mercier B, Bressollette L, Etienne S, Walter M, Mottier D, Lacut K. Incidence of venous thromboembolism in psychiatric units. Thromb Res. 2012 Dec;130(6):e283-8. doi: 10.1016/j.thromres.2012.10.002. Epub 2012 Oct 23. PMID: 23092750.

Eklof, Rutherford, Bergan, Carpentier, Gloviczki. Revision of the CEAP-classification for chronic venous disorders: A consensus statement.; *J Vasc. Surg.* 2004; 40: 1248-1252.

Eklof B, Rutherford RB, Bergan JJ, Carpentier PH, Gloviczki P, Kistner RL, Meissner MH, Moneta GL, Myers K, Padberg FT, Perrin M, Ruckley CV, Smith PC, Wakefield TW; American Venous Forum International Ad Hoc Committee for Revision of the CEAP Classification. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. *J Vasc Surg* 2004;40(6):1248–1252.

Ellinghaus E, Ellinghaus D, Krusche P, et al. Genome-wide association analysis for chronic venous disease identifies *EFEMP1* and *KCNH8* as susceptibility loci. *Scientific Reports.* 2017;7:45652.

Elsharawy MA, Naim MM, Abdelmaguid EM, A-Mulhim AA. Role of saphenous vein wall in the pathogenesis of primary varikose veins. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2007;6(2):219-224.

Erdmann, J, A. Grosshennig, et al. (2009). "New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3." *Nat Genet* 41(3): 280-2.

Erguzel N, Yetkin E, Erdem G, Erdil N, Yetkin G, Heper G, Celik T, Senen K. Plasminogen activator inhibitor-1 levels in patients with primary varicose vein. *Int Angiol.* 2012 Apr;31(2):176-80.

Evans CJ, Fowkes FG, Ruckley CV, Lee AJ. Prevalence of varicose veins and chronic venous insufficiency in men and women in the general population: Edinburgh Vein Study. *J Epidemiol Community Health* 1999;53(3):149–153.

Fiebig A. et al., Heritability of chronic venous disease. *Hum Genet.* 2010 Jun; 127(6):669-74.

Fischer R, Sachs UJ, Heidinger KS, Eisenburger D, Kemkes-Matthes B. Prevalence of hereditary antithrombin mutations is higher than estimated in patients with thrombotic events. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2013 Jun;24(4):444-8.

Fischer H, editor. Venenleiden – Eine repräsentative Untersuchung in der Bundesrepublik Deutschland (Tübinger Studie). München: Urban und Schwarzenberg; 1981.

Fowkes FG, A.J. Lee, C.J. Evans, P.L. Allan, A.W. Bradbury, C.V. Ruckley Lifestyle risk factors for lower limb venous reflux in the general population: Edinburgh Vein Study *Int J Epidemiol*, 30 (2001), pp. 846-852

Franks PJ, Wright DD, Fletscher, AE, Moffat CJ: A questionnaire to asses risk factors, quality of life, and use of health resources in patients with venous disease. *Eur.J. Surg.* 1992;158:149-155.

Franke A, Wollstein A, Teuber M et al. Genomizer: an integrated analysis system for genome-wide assoziation data. *Human Mutat* 2006; 27:583-588.

Franco R.F., Reitsma, P.H. Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet* 109, 369–384 (2001).

Fukaya E, Flores AM, Lindholm D, Gustafsson S, Zanetti D, Ingelsson E, Leeper NJ. Clinical and Genetic Determinants of Varicose Veins. *Circulation*. 2018 Dec 18;138(25):2869-2880.

Gambaro G, Anglani F, D'Angelo A (2000) Association studies of genetic polymorphisms and complex disease. *Lancet* 355: 308-311.

Gohil R., Peck G., Sharma P. genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls. *Thromb Haemostas* 2009; 102: 360-370.

Göretzlehner G, Simon E. Auswirkung der Sexualsterioide auf die Gefäßwand.
Phlebologie 1999;28 (2):40-44.

Grant Y, Onida S, Davies A. Genetics in chronic venous disease. Phlebology.
2017 Feb;32(1):3-5.

Grzela T, Bialoszewska A. Genetic risk factors of chronic venous leg ulceration: Can molecular screening aid in the prevention of chronic venous insufficiency complications? Mol Med Rep 2010;3(2):205-211.

Hach W., Girth E., Lechner W.: Einteilung der Stammvarikosis der Vena saphena magna in vier Stadien. Phlebol. Proktol. (1977) 6:117.

Hampe J., Wollstein,A., Lu, T., Frevel, H.J., Will, M., Manaster, C., Schreiber, S. An integrated system for high throughput TaqMan based SNP genotyping. Bioinformatics. 2001; 17 (7), 654-655.

Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, et al. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Thromb Haemost*. 2001;86(1):452-463.

Heit JA, Cunningham JM, Petterson TM, Armasu SM, Rider DN, Mariza A. Genetic Variation within the Anticoagulant, Procoagulant, Fibrinolytic and Innate Immunity Pathways as Risk Factors for Venous Thromboembolism. *J Thromb Haemost*. 2011; 9(6):1133-1142.

Heath EM et al., Optimization of an automated DNA purification protocol for neonatal screening. *Arch Pathol Lab Med*. 1999 Dec. 123(12):1154-1160.

Herold G., Innere Medizin, Köln; 2017.

Hohlbaum GG. Pathogenetische Theorien und chirurgische Therapie der Varizen im 19. und 20. Jahrhundert – Teil 1. Phlebologie 1998;27:138–146.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(16):7276-7280.

Hollingsworth SJ, Powell G, Barker SGE, Cooper DG. Primary varicose veins: altered transcription of VEGF and its receptors (KDR, flt-1, soluble flt-1) with sapheno-femoral junction incompetence. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;27(3):259-268.

Hylckama Vlieg van A, Flinterman LE, Bare LA, Cannegieter SC, Reitsma PH, Arellano AR, Tong CH, Devlin JJ, Rosendaal FR. Genetic variations associated with recurrent venous thrombosis. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014 Dec;7(6):806-13.

In May R., PartschH., Staubesand J.: *Venae perforantes*. Urban & Schwarzenberg, München 1981.

Jacob T et al., Over expression of transforming growth factor beta1 correlates with increased synthesis of nitric oxide synthase in varicose veins. *J Vasc Surg*. 2005 Mar;41(3):523-30.

Jawien A, The influence of environmental factors in chronic venous insufficiency. *Angiology* 2003;54 Suppl 1:S19–S31.

Jin Y, Xu G, Huang J, Zhou D, Huang X, Shen L. Analysis of the association between an insertion/deletion polymorphism within the 3' untranslated region of COL1A2 and chronic venous insufficiency. *Ann Vasc Surg* 2013;27(7):959-963.

Kane WH, Davie EW. Cloning of a cDNA coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83(18):6800-4.

Kappert A (1979); Lehrbuch und Atlas der Angiologie – Erkrankungen der Arterien, Venen, Kapillaren und Lymphgefäße; Huber: Bern-Stuttgart-Wien.

Kapur RK, Mills LA, Spitzer SG, Hultin MB A prothrombin gene mutation is significantly associated with venous thrombosis. *Arterioscler thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2875-2879.

Kirsch D, Schreiber J, Dienes HP, Böttger T, Juninger T. Alterations of the extracellular matrix of venous walls in varicous veins. *Vasa* 1999;28(2):95-99.

Kirsch D, Wahl W, Böttger T, Juninger T. Primary varicose veins-changes in the venous wall and elastic behaviour. *Chirurg* 2000; 71(3):300-305.

Kirsch D, Schreiber J, Dienes HP, Böttger T, Junginger T. Alterations of the extracellular matrix of venous walls in varicous veins. *Vasa* 1999;28 (2):95-99.

Kistner Straub Foundation. Classification and grading of chronic venous disease in the lower limb: A consensus statement; *Phlebology* 10:42-5, 1995.

Kistner RL, Eklof B, Masuda EM. Diagnosis of chronic venous disease of the lower extremities: the »CEAP« classification. *Mayo Clin Proc* 1996;71(4):338–345.

Klerk M, Verhoef P, Clarke R et al.: MTHFR 677C-T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 2002; 288: 2023–2031.

Knaapen MW, Somers P, Bortier H, De Meyer GR, Kockx MM. Smooth muscle cell hypertrophy in varicose veins is associated with expression of estrogen receptor-beta. *J Vasc Res* 2005;42 (1):8-12.

Kopetsch CA, Genomweite Assoziationsstudie zu Varikosis – Genetische Charakterisierung von rs10082399 (STOX1). Kiel, Univ., Diss., 2010.

Kowalewski R, Malkowski A, Sobolewski K, et al. Vascular endothelial growth factor and its receptors in the varicose vein wall. *Acta Angiol* 2011;17(2):141-149.

Krawczak M, Nikolaus S, von Eberstein H, Crocher PJ, Mokhtari NE, Schreiber S, PopGen: Population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotypes-phenotypes relationships. *Com. Genet.* 2006;9: 55-61.

Krusche, P, Rekrutierung einer großen Patientenkollektiv und Berechnung der Heritabilität für die Ausbildung einer Varikosis an der unteren Extremität. Med. Diss. Uni Kiel.

Krysa J, Jones GT, van Rij AM. Evidence for a genetic role in varicose veins and chronic venous insufficiency. *Phlebology*, 27 (2012), pp. 329–335.

Kumar, R, Chan, AKC, Dawson, JE, Forman-Kay, JD, Kahr, WHA & Williams, S (2014) Clinical presentation and molecular basis of congenital antithrombin deficiency in children: a cohort study. *British Journal of Haematology*, 166, 130–139.

Labropoulos N. CEAP in clinical practice. *Vasc Surg* 1997;31:224-5.

Lasken RS, Egholm M. Whole genome amplification: abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens. *Trends Biotechnol.* 2003 Dec;21(12):531-5.

Larsen TB, Sorensen HT, Skytthe A, Johnsen SP, Vaupel JW, Christensen K. Major genetic susceptibility for venous thromboembolism in men: a study of Danish twins. *Epidemiology*. 2003;14(3):328-332.

Launois R, Reboul-Marty J, Henry B. Construction and validation of a quality of life questionnaire in chronic lower limb venous insufficiency (CIVIQ). *Qual Life Res.* 1996 Dec;5(6):539-54.

Lee AJ, Evans CJ, Allan PL, Ruckley CV, Fowkes FG. Lifestyle factors and the risk of varicose veins: Edinburgh Vein Study. *J Clin Epidemiol* 2003;56(2):171–179.

Levi M, Keller TT, Van Gorp E, Ten Cate H. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res.* 2003;60:26–39.

Lim CS, Davies AH. Pathogenesis of primary varicose veins. British Journal of Surgery Volume 96, Issue 11, pages 1231–1242, November 2009.

Lim CS, Shalhoub J, Gohel MS, Shepherd AC, Davies AH. Matrix metalloproteinases in vascular disease – a potential therapeutic target? *Curr Vasc Pharmacol* 2010.

Lovmar L et al., Multiple displacement amplification to create a long lasting source of DNA for genetic studies. *Hum Mutat* 2006, 27, 603-614.

Luxembourg, B, Pavlova, A, Geisen, C, Spannagl, M, Bergmann, F, Krause, M, Alesci, S, Seifried, E & Lindhoff-Last, E (2013) Impact of the type of SERPINC1 mutation and subtype of antithrombin deficiency on the thrombotic phenotype in hereditary antithrombin deficiency. *Thrombosis and Haemostasis*, 111,249–257.

MacKenzie R.K., C.A. Ludlam, C.V. Ruckley, P.L. Allan, P. Burns, A.W. Bradbury
The prevalence of thrombophilia in patients with chronic venous leg ulceration
J Vasc Surg, 35 (2002), pp. 718-722.

Mahrle, G., Orfanos, C.E.: Stereo-elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Venenwand gesunder und klappeninsuffizienter Venen. Das normale Venenendothel. *Arch. Derm. Forsch.* (im Druck) (1971).

Mann BK, West JL. Tissue engineering in the cardiovascular system: progress toward a tissue engineered heart. *Anat Rec* 2001;263:367-371.

Majerus, PW, Bad blood by mutation. *Nature* 369:14-15,1994

Marshall M, Schwahn-Schreiber C. Die oberflächliche Thrombophlebitis, ein Nicht-der-Rede-wert Krankheitsbild, Phlebologie. Was ist gesichert, was ist Emperie? , 2008;37:122-129.

Marshall M, Breu FX, Handbuch der Angiologie. Landsberg:ecomed 1999-2007.

Meghdadi S, Rodrigues M, Oguogho A, Santler R, Sinzinger H, 8-Epi-PGF2alpha and 6-oxo-PGF1alpha in human (varicose) veins: influence of age, sex and risk factors. *Angiology*, 2003 May-Jun, 54(3):317-24.

Meer FJ van der, Koster T, Vandebroucke JP et al. (1997) The Leiden Thrombophilia Study (LETS). *Thromb Haemost* 78: 631–635.

Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med*. 2000;342(10):696-701.

Mellor RH, Brice G, Stanton AWB, et al; Lymphoedema Research Consortium. Mutations in FOXC2 are strongly associated with primary valve failure in veins of the lower limb. *Circulation* 2007;115(14):1912-1920.

Michaels JA, Campbell WB, Brazier JE, Macintyre JB, Palfreyman SJ, Ratcliffe J, et al. Randomised clinical trial, observational study and assessment of cost-effectiveness of the treatment of varicose veins (REACTIV trial). *Health Technol Assess*, 10 (13) (2006), pp. 1–114.

Miletich J, Sherman L, BrozeG Jr. Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med*. 1987;317(16):991-996.

Michiels C, Bouaziz N, Remacle J. Role of the endothelium and blood stasis in the development of varicose veins. *Int Angiol*. 2002 Jun;21(2 Suppl 1):18-25.

Nakano M, Kelly EJ, Rettie AE. Expression and characterization of CYP4V2 as a fatty acid omega-hydroxylase. *Drug Metab Dispos*. 2009;37(11):2119-22 Epub 2009.

Morin PA, Saiz R, Monjazeb A. High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping by fluorescent 5' exonuclease assay. *Biotechniques*. 1999 Sep;27(3):538-40.

Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrom J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost*. 2007;5(4):692-699.

Naess I.A., Christiansen S.C., Romundstad P.R., Cannegieter S.C., Blom H.J., Rosendaal F.R., Hammerstrøm J. Prospective study of homocysteine and MTHFR 677TT genotype and risk for venous thrombosis in a general population: results from the HUNT 2 study. *Br J Haematol* 2008; 141: 529-535.

Narayanan S, Multifunctional roles of thrombin. *Ann Clin Lab Sci*. 1999;29:275–280.

Neer PA van, Veraart JC, Neumann HA.: Venae perforantes: a clinical review. *Dermatol Surg*. 2003 Sep;29(9):931-42.

Neuerburg-Heussler D, Hennerici M. Gefäßdiagnostik mit Ultraschall. Lehrbuch und Atlas. Thieme-Verlag, Stuttgart-New York, 1999.

Ng MYM, Andrew T, Spector TD, Jeffery S; Lymphoedema Consortium. Linkage to the FOXC2 region of chromosome 16 for varicose veins in otherwise healthy, unselected sibling pairs. *J Med Genet* 2005;42(3):235-239.

Niermann H, Zwillingsdermatologie. Eine Studie über den Erblichkeitsgrad bei 89 Hautkrankheiten nach Untersuchung von 370 Zwillingspaaren. Heidelberg: Springer, 1964.

Nothnagel M, Rohde K. "The effect of single-nucleotide polymorphism marker selection on patterns of haplotype blocks and haplotype frequency estimates." *Am J Hum Genet*. 2005;77(6): 988-98.

Nöthlings U, Krawczak M, PopGen. Eine populationsbasierte Biobank mit Langzeitverfolgung der Kontrollkohorte. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. 2012 Volume 55, Issue 6/7, 831.

Palmer LJ, Cardon LR, Shaking the tree:mapping complex disease genes with linkage disequilibrium. Lancet. 2005 Oct 1;366(9492):1223-34.

Pascarella L et al., Venous hypertension and inflammatory cascade: major manifestations and trigger mechanism. Angiology. 2005 Sept-Oct; 56 Suppl 1 S3- 10.

Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3_-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996;88(10):3698-3703.

Prandoni P, Lensing AW, Cogo A, Cuppini S, Villalta S, Carta M, Cattelan AM, Polistena P, Bernardi E, Prins MH. The long-term clinical course of acute deep venous thrombosis. Ann Intern Med. 1996; 125: 1-7.

Purcell S1, Cherny SS, Sham PC. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. Bioinformatics. 2003 Jan;19(1):149-50.

Purcell S1, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. Am J Hum Genet. 2007 Sep;81(3):559-75. Epub 2007 Jul 25.

Porter JM, Moneta GL. Reporting standards in venous disease: an update. International Consensus Committee on Chronic Venous Disease. J Vasc Surg 1995;21(4):635–645.

Rabe E, Berboth G, Pannier F. [Epidemiology of chronic venous diseases]. Wien Med Wochenschr. 2016 Jun;166(9-10):260-3.

Rabe E, Die pudendale Varikose-eine selten diagnostizierte Entität. Phlebologie 1999 11: 194-196.

Rabe E, Pannier-Fischer F, Bromen K, Schuldt K, Stang A, Poncar C, Wittenhorst M, Bock E, Weber S, Jöckel KH. Bonner Venenstudie der Deutschen Gesellschaft für Phlebologie – Epidemiologische Untersuchung zur Frage der Häufigkeit und Ausprägung von chronischen Venenkrankheiten in der städtischen und ländlichen Wohnbevölkerung. *Phlebologie* 2003; 32:1–14.

Rabe E, Bauersachs RM, Pannier F, List SM. Venenerkrankungen der Beine. Berlin: Robert-Koch-Institut; 2009 (Gesundheitsberichterstattung des Bundes; H. 44).

Raffetto JD, et al., Pathophysiology of chronic venous disease. *Int Angiol* 33,212-21 (2014).

Raffetto JD, Khalil RA. Mechanisms of varicose vein formation: valve dysfunction and wall dilation. *Phlebology* 2008; 23: 85–98.

Raffetto JD, Ross RL, Khalil RA. Matrix metalloproteinase 2-induced venous dilation via hyperpolarization and activation of K⁺ channels: relevance to varicose vein Formation. *J Vasc Surg* 2007; 45: 373–380.

Rice TK, Schork NJ, Rao DC. Methods for handling multiple testing. *Adv Genet* 2008;60:293-308.

Ridker PM, Hennekes CH, Lindpainter K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl j Med*. 1995 Apr 6;332(14):912-7.

Rijcke PA de, Schenk T, van Gent WB, Kleinrensink GJ, Wittens CH: Surgical anatomy for subfascial endoscopic perforating vein surgery of laterally located perforating veins. *J Vasc Surg*. 2003 Dec;38(6):1349-52

Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet*. 1999;353(9159):1167-1173.

Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Jullien ND, Lembrez N, Mestries-Dubois P, Fabiani JN, Verbeuren TJ, Decreased production of collagen Type III in cultured smooth muscle cells from varicose vein patients is due to a degradation by MMPs: possible implication of MMP-3. *J Vasc Res*, 2005 Sep-Oct, 42(5):388-98.

Sadick NS. Predisposing factors of varicose and telangiectatic leg veins. *J Dermatol Surg Oncol* 1992;18(10):883–886.

Sanchez-Hanke M, Püschel K, Leuwer R. Zur Anatomie der Venenklappen der V. jugularis interna. *Laryngorhinootology* 2000;79:332-336.

Schlittgen, Einführung in die Statistik Oldenbourg, 3. Auflage 1991.

Schulte KL, editor. Kappert – Lehrbuch und Atlas der Angiologie. Bern: Verlag Hans Huber; 1998. 271 p.

Segal, JB et al., Predictive value of factor V Leiden and prothrombin G20210A in adults with venous thromboembolism and in family members of those with mutation: a systematic review. *JAMA*. 2009 Jun 17;301(23):2472-85.

Shapiro DJ, Quantitative ethanol precipitation of nano gram quantities of DNA and RNA. *Anal Biochem*. 1981 Jan 1; 110(1): 229-231.

Shadrina A, Tsepilov Y, Sokolova E, Smetanina M, Voronina E, Pakhomov E, Sevost'ianova K, Shevela A, Ilyukhin E, Seliverstov E, Zolotukhin I, Filipenko M. Genome-wide association study in ethnic Russians suggests an association of the MHC class III genomic region with the risk of primary varicose veins. *Gene*. 2018 Jun 15;659:93-99.

Shadrina A, Sharapov SZ, Shashkova TI, Tsepilov YA. Varicose veins of lower extremities: Insights from the first large-scale genetic study. *PLoS Genet*. 2019 Apr 18;15(4)

Sobotta, J (2006); *Anatomie des Menschen, Atlas in 2 Bänden*

In: R.Putz, R. Pabst (Hrsg.) Urban & Fischer bei Elsevier, 22. Auflage, 2006.

Souto JC, Almasy L, Borrell M, et al. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study. *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia*. *Am J Hum Genet*. 2000; 67(6):1452-1459.

Sprague AH, Khalil RA, Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction and Vascular Disease, *Biochem Pharmacol*. 2009 September 15, 78(6): 539-552.

Staubesand J. Matrixvesikel und Mediadysplasie; ein neues Konzept zur formalen Pathogenese der Varikose. *Phlebol Proktol* 1978;7:109-140.

Staubesand (1984) Die anatomischen Grundlagen der sog. Sprunggelenkspumpe; *Siss Med* 2:48.

Staubesand (1984); Zur systematischen, funktionellen und praktischen Anatomie der Venen des Beines; In: Schneider W., Walker J. (Hrsg): *Die chronische Veneninsuffizienz in Theorie und Praxis*. Universitätsdruckerei und Verlag Dr. Wolf, München, 9-140, 1984.

Storch V, Welsch U. Blutgefäß und lymphatische Systeme. In: *Kurzes Lehrbuch der Zoologie*. 7. Auflage. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1994.

Strukova SM, Thrombin as a regulator of inflammation and reparative processes in tissues. *Biochemistry (Mosc)* 2001;66:8–18.

Sullivan, P. F. (2007). Spurious genetic associations. *Biological Psychiatry*, 61(10), 1121–1126.

Thum T, Haverich A, Borlak J. Cellular dedifferentiation of endothelium is linked to activation and silencing of certain nuclear transcription factors: implications for endothelial dysfunction and vascular biology. *FASEB J* 2000;14:740-751.

Tobler R, Short S, Andersen MR, Wenz M, et al., The SNPlex Genotyping System: A Flexible and Scalable Platform for SNP Genotyping. *J Biomol Tech.* 2005; 16(4):398-406.

Torbicki A, Beek EJR van, Chabonniere B et al. (2000) Guidelines on diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J* 21:1301–1336

Tregouet DA, Heath S, Sauvage N, Biron-Andreani C, Schved JF, Pernod G, Galan P, Drouet L, Zelenika D, Juhan-Vague I, Alessi MC, Tiret L, Lathrop M, Emmerich J, Morange PE. Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach. *Blood* 2009; 113: 5298–303.

Tregouet DA, I. R. Konig, et al. (2009). "Genome-wide haplotype association study identifies the SLC22A3-LPAL2-LPA gene cluster as a risk locus for coronary artery disease." *Nat Genet* 41(3): 283-5.

Tucker EI, Verbout NG, Leung PY, Hurst S, McCarty OJ, Gailani D, Gruber A. Inhibition of factor XI activation attenuates inflammation and coagulopathy while improving the survival of mouse polymicrobial sepsis. *Blood*. 2012 May 17;119(20)

Vanhoutte PM, Corcaud S, de Montrion C, Venous disease: from pathophysiology to quality of life. *Angiology*. 1997 Jul;48(7):559-67.

van Linborgh J., Hage R.W.: Anatomische Merkmale einiger Venae perforantes des Unterschenkels, die oft und die selten insuffizient werden. Urban & Schwarzenberg, München 1981.

Vosken CY, Conard, J, Fontcuberta, J, Makris, M, FJ, VDM, Pabinger, I, Palareti, G, Preston, FE, Scharrer, I, Souto, JC, Svensson, P, Walker, ID & Rosendaal, FR (2005) Risk of a first venous thrombotic event in carriers of a familial thrombophilic defect. The European Prospective Cohort on Thrombophilia (EPCOT). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3, 459 – 464.

Vuytske ME, Thomis S, Guillaume G, Modiszewski ML, Weides N, Staelens I. Epidemiological Study on Chronic Venous Disease in Belgium and Luxembourg: Prevalence, Risk Factors, and Symptomatology. *Eur J Vasc Endovasc Surg* (2015) 49, 432e439.

Wacholder S, Rothman N, Caporaso N. Counterpoint: bias from population stratification is not a major threat to the validity of conclusions from epidemiological studies of common polymorphisms and cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Jun;11(6):513-20.

Weiß C, Basiswissen Medizinische Statistik, 5. Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg 2010.

Wienert V, Epidemiologie und Risikofaktoren der Venenerkrankungen. Handbuch der Angiologie. Landsberg:ecomed 1999.

Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet*. 2005 May;76(5):887-93. Epub 2005 Mar 23.

Widmer LK, Stählin HB, Nissen C, Da Silva A, editors. Venen-, Arterien-Krankheiten, koronare Herzkrankheit bei Berufstätigen, Prospektiv-epidemiologische Untersuchung. Baseler Studie I–III 1959–1978. Bern, Stuttgart, Wien: Hans Huber; 1981.

Wilcockson J, The differential precipitation of nucleic acids and proteins from aqueous solutions by ethanol. *Anal Biochem*. 1975 May 26; 66(1):64-68.

Ziegler A, (2002). "Genetische Epidemiologie – Gegenwart und Zukunft." *Dtsch Ärztebl* 99(2342–2346).

Zöller B, García de Frutos P, Hillarp A, Dahlbäck B. Thrombophilia as a multigenic disease. *Haematologica*. 1999 Jan;84(1):59-70. PMID: 10091393.

7 Anhang

Patienteninformation, Patientenaufklärung und Einwilligungserklärung sowie Fragebogen

**UK
SH**

popgen, 1. Med. Klinik, UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein
Campus Kiel, Schittenhelmstraße 12, 24105 Kiel

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Schleswig-Holstein**

→ Campus Kiel
1. Medizinische Klinik
MOSEL-EIFEL-KLINIK
Bad Bertrich

Forschungsprojekt **popgen**
Studienzentrale

Tel: 0431 / 597-3710
Fax: 0431 / 597-3730
E-Mail: info@popgen.de
Internet: www.popgen.de

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient!

Wir sind eine Forschungsgruppe am Universitätsklinikum in Kiel. Zur Zeit bauen wir eine bundesweit einmalige medizinische Datenbank auf. Wir sammeln Informationen über den Zusammenhang von Krankheiten und menschlichen Erbanlagen.

Gerade die weit verbreiteten Krankheiten wie Darmkrebs, Herzinfarkt, Asthma, chronische Darmentzündungen, Krampfaderleiden (Varikosis) oder Zahnfleischerkrankungen nehmen immer mehr zu. Wir wollen wissen, wie solche Krankheiten durch Veränderungen des genetischen Bauplanes eines Menschen mitverursacht werden. Mithilfe dieses neuen Wissens können solche Krankheiten in Zukunft besser und schneller diagnostiziert werden. Dadurch hoffen wir, zukünftig gefährdeten sowie bereits erkrankten Menschen frühzeitiger und besser helfen zu können.

Deshalb wenden wir uns heute an Sie.
Bitte helfen Sie uns, das Krampfaderleiden aufzuklären!

Wir möchten Sie einladen, an unserer Untersuchung teilzunehmen und bitten um eine Blutprobe und die Beantwortung eines Fragebogens.

Aus dem Blut wird die DNA (Erbsubstanz) gewonnen. Sie enthält die genetische Information eines Menschen. Wir vergleichen darin bestimmte Risikofaktoren für das Krampfaderleiden (so genannte Risikogene) mit uns vorliegenden Kontrolldaten von gesunden Menschen. So wird sich herausstellen, ob die Risikogene tatsächlich die Rolle spielen, die wir vermuten.

MEDIZINISCHE LEITUNG: Dr. med. Susanna Nikolaus Telefon: +49-431 / 597-4118	STUDIENZENTRALE: Telefon +49-431 / 597-3710 Telefax +49-431 / 597-3730 Email: info@popgen.de Internet: www.popgen.de	PROJEKTLITIGATION: Dipl. soz. Huberta von Eberstein Telefon +49-431 / 597-3170
MEDIZINISCHE MITARBEIT: Frau Krusche Tel: +49		PROJEKTWISSENSCHAFTLER: Dr. rer. nat. Andreas Flebrig Telefon: +49-431 / 597-3862

Ihre Daten werden streng vertraulich behandelt. Die Mosel- Eifel- Klinik und das Universitätsklinikum Schleswig- Holstein haben jahrzehntelange Erfahrung mit dem Schutz von Patientendaten. Die Forschungsergebnisse werden ohne Namen, nur mit einem Code versehen gespeichert. Da unser Projekt unter ärztlicher Leitung steht, unterliegen alle Mitarbeiter der ärztlichen Schweigepflicht. Zudem überwacht das schleswig-holsteinische Landesdatenschutzzentrum unser Projekt zusammen mit der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig- Holstein.

Warum ist die Erforschung des Krampfaderleidens wichtig?

Das Krampfaderleiden ist als Volkskrankheit zu bezeichnen, die, je nach Auswahl der Kriterien, bis zu 23% der Bevölkerung betrifft (Bonner Venenstudie von Prof. Rabe, 2003). Folgeerkrankungen der Varikosis sind häufig tiefe Beinvenenthrombosen und daraus resultierende Lungenarterienembolien. Die Kosten, die durch die Behandlung von Varikosis bzw. der Folgeerkrankungen entstehen, belaufen sich für die Krankenkassen auf über 1 Milliarde Euro im Jahr (Angaben der Deutschen Venen-Liga e.V.). Die Erkrankung zeigt eine deutliche familiäre Häufung. Wenn die Ursachen für die Varikosis, an der immer mehr Menschen leiden, nicht gefunden werden, wird es keine bessere Therapie geben. Die in unserem Projekt gefundenen Erkenntnisse über die Krankheitsursachen werden wir der Öffentlichkeit zugänglich machen, so dass sie allen Menschen nutzen. Daher wird dieses Forschungsprojekt vom Bundesministerium für Bildung und Forschung finanziell gefördert.

Ihre Teilnahme wird uns sehr helfen!

Sollten Sie noch Fragen haben, wenden Sie sich bitte an uns. Sie erreichen unser Studienbüro in Kiel unter der Telefonnummer



0431/597-3710.



GEFÖRDERT VOM



Vorname:

Name:

Straße:

PLZ

Ort:

UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Schleswig-Holstein

→ Campus Kiel

1. Medizinische Klinik

Biobank popgen

Arnold-Heller-Str.3

24105 Kiel

Telefon +49-431 / 597-3710

Telefax +49-431 / 597-3730

Email: info@popgen.deInternet: www.popgen.de**POPGEN-STUDIE:****GENETISCHE URSACHEN DES KRAMPFADERLEIDENS (VARIKOSIS)****Patientenaufklärung / Einwilligungserklärung**

Wir führen an der Klinik für Allgemeine Innere Medizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel das Forschungsvorhaben **popgen** zur genetischen Veranlagung von weit verbreiteten Krankheiten durch. Untersucht werden dabei neben *chronischen Venenerkrankungen u.a. auch chronische entzündliche Darmerkrankungen, Reizdarm, Darmkrebs, Gallensteine, Erkrankungen der Herzkranzgefäße (KHK), entzündliche Erkrankungen des Zahnfleisches und des Zahnhalteapparates und einige neurologische Erkrankungen wie Krampfleiden und Morbus Parkinson (Schüttellähmung)*. Um unsere Forschungserkenntnisse überprüfen zu können, bitten wir Sie um die Einwilligung, Ihnen

 30 ml peripher venöses Blut

entnehmen zu dürfen und die daran gewonnenen genetischen Daten ebenso wie Ihre zusätzlichen Angaben auf dem beiliegenden Fragebogen ausschließlich zu den oben genannten Forschungszwecken zu speichern. Wir beabsichtigen, aus Ihrem Blut DNA (Erbsubstanz) zu gewinnen, um die genetische Veranlagung zu einer der oben genannten Erkrankungen zu überprüfen. Die dafür verantwortlichen Gene können sich überall im gesamten Erbgut befinden. Es werden jedoch nur die jeweils als relevant bekannten Gene untersucht.

Risiken der Blutentnahme:

Wie zu einer Routineblutentnahme werden Ihnen unter sterilen Bedingungen 30 ml Blut aus einer peripheren Vene entnommen. Dazu ist die Punktions einer Vene notwendig. Die Risiken einer Blutentnahme sind: Lokale Infektion ("bakterielle Entzündung, Vereiterung"), Fehlpunktion der Vene und anschließende Ausbildung eines Blutergusses (Hämatom), sehr selten Fehlpunktion einer Schlagader, Schädigung eines Hautnervs mit der möglichen Folge dauerhafter Schmerzen und/oder bleibenden Funktionseinschränkungen. Alle oben genannten Risiken sind bei sachgemäßer Durchführung **extrem selten**.

Speicherung von Daten:

Ihre persönlichen Daten (Name, Vorname, Adresse, Geburtsdatum) werden getrennt von den Probendaten gespeichert. Die Proben werden durch eine fortlaufende Strichkodierung pseudonymisiert. Die mit der Probe verbundenen Informationen (d.h. Angaben aus dem Fragebogen, Genotypen) sind nur über diese Kodierung abrufbar. Zur Qualitätskontrolle unserer Daten bitten wir Sie um die Genehmigung, vorhandene Patientenunterlagen einsehen zu dürfen. Für diese spezielle Situation entbinden Sie den behandelnden Arzt von der Schweigepflicht gegenüber verantwortlichen ärztlichen Mitarbeitern des Forschungsvorhabens.

Auf die Daten haben nur autorisierte Mitarbeiter des Forschungsprojektes Zugriff. Da das Projekt unter ärztlicher Leitung steht, unterliegen alle Mitarbeiter der ärztlichen Schweigepflicht. Eine Weitergabe Ihrer Daten an unberechtigte Dritte (insbesondere Arbeitgeber, Versicherungen) ist ausgeschlossen. Die Weitergabe von Proben und Informationen an wissenschaftliche Kooperationspartner erfolgt ohne Angaben zu Ihrer Person. Bei Beendigung der Forschungsaktivitäten (frühestens nach 20 Jahren) werden die Proben und die dazu gehörenden Daten vernichtet. Das Konzept zur Sammlung und Speicherung aller Daten wurde vom Unabhängigen Landeszentrum für Datenschutz Schleswig-Holstein (AZ LD4-16.1/03.001) und der Medizinischen Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (AZ A 156/03) geprüft und positiv bewertet.

Die Herausgabe einzelner persönlicher Untersuchungsergebnisse ist aus forschungsmethodischen Gründen nicht möglich. Durch diese Untersuchungen wird eine Vielzahl von genetischen Merkmalen getestet werden. Es ist der Zweck der Untersuchung, eine Risikoabschätzung für bestimmte genetische Erkrankungen in der „Durchschnittsbevölkerung“ zu erstellen. Dieses schließt eine persönliche Risikobewertung nicht ein. Es ist daher nicht zu erwarten, dass sich durch die Untersuchungen persönlichkeitsrelevante Erkenntnisse ergeben. Auf Ihren Wunsch informieren wir Sie gerne über den allgemeinen Fortgang des Forschungsprojektes. In diesem Fall würden wir Ihren Namen, Ihren Vornamen und Ihre Adresse gemäß den datenschutzrechtlichen Bestimmungen des Landes Schleswig Holstein in einer gesonderten Adressdatei speichern, um Ihnen einen Projektbericht zusenden zu können.

Patentrechte

Es kann sein, dass im Rahmen zukünftiger Forschungsergebnisse Patente entstehen, die auf Erkenntnissen basieren, die aus Ihren Proben gewonnen wurden. Solche Patente sind die Voraussetzung für die Entwicklung neuer Medikamente. In diesem Fall besteht kein individueller Patentanspruch, basierend auf Ihrem individuellen biologischen oder genetischen Material.

Widerruf

Die Teilnahme an diesen wissenschaftlichen Untersuchungen ist absolut freiwillig. Solange Ihre persönlichen Daten nicht gelöscht sind, kann Ihre Zustimmung jederzeit widerrufen werden. Daraus entstehen Ihnen keinerlei Nachteile. Gegebenenfalls bereits entnommene Proben werden dann unverzüglich vernichtet, und Ihre Daten werden umgehend gelöscht. Einen etwaigen Widerruf Ihrer Zustimmung richten Sie bitte schriftlich an die administrative Leitung **popgen**, 1. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel, Arnold-Heller-Str. 3, D- 24105 Kiel.

Weitere Fragen

Wünschen Sie ein weitergehendes, ausführliches Arztgespräch, so vereinbaren Sie bitte einen Termin unter 0431/597-3710.

Verantwortliche ärztliche Leitung

Dr. med. Susanna Nikolaus

Klinische Kooperationspartner

Dr. med. Norbert Frings, Arzt für Chirurgie- Gefäßchirurgie- Phlebologe
Petra Krusche, Ärztin für Physikalische und Rehabilitative Medizin- Phlebologin

Projektwissenschaftler

Dr. rer. nat. Andreas Fiebig

Administrative Leitung

Dipl. soz. Huberta von Eberstein

Ich willige in die Entnahme von 30 ml Blut und die Speicherung der in diesem Zusammenhang gewonnenen Daten ein. Das Eigentum an diesem Material geht damit an das Universitätsklinikum Schleswig-Holstein über.

Ich hatte ausreichend Zeit und Gelegenheit zur Entscheidung. Mir ist bekannt, dass durch eine Nicht-Teilnahme keinerlei Nachteile für mich entstehen können.

Ich erteile die Genehmigung zur Einsicht in vorhandene Patientenunterlagen in der Mosel-Eifel-Klinik durch den/die verantwortliche Studienarzt/-ärztin.

Ich weiß, dass ich meine Zustimmung jederzeit widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

Mir ist bekannt, dass ich zusätzliche Fragen in einem persönlichen Gespräch mit dem/der verantwortlichen Studienarzt/-ärztin klären kann.

....., den 2009

Unterschrift:

***Fragebogen zur
Studie***

**Genetische Ursachen der Ausbildung von Krampfadern
(Varikosis)**



popgen



**UK
SH**

UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Schleswig-Holstein

NGFN

Nationales
Genomforschungsnetz

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

BARCODE
VAR

Herzlich willkommen! Wir freuen uns darüber, dass Sie an unserer Studie teilnehmen. Zu Beginn haben wir einige allgemeine Fragen zu Ihrer Person und Ihrer Herkunft, bzw. der Herkunft Ihrer Eltern.

1)	Heutiges Datum	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"><tr><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td></tr><tr><td>Tag</td><td>Monat</td><td colspan="3">Jahr</td></tr></table>	<input type="text"/>	Tag	Monat	Jahr						
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>								
Tag	Monat	Jahr										
2)	Geschlecht	<input type="checkbox"/> männlich <input type="checkbox"/> weiblich										
3)	Geburtsdatum	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"><tr><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td></tr><tr><td>Tag</td><td>Monat</td><td colspan="3">Jahr</td></tr></table>	<input type="text"/>	Tag	Monat	Jahr						
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>								
Tag	Monat	Jahr										
4)	Körpergröße (cm):	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"><tr><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td></tr></table>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>							
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>										
	Gewicht (kg):	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"><tr><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td></tr></table>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>							
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>										
5)	Sind Sie in Deutschland geboren?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein										
	Sind Sie in Schleswig-Holstein geboren?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein										
	Wenn nicht in Schleswig-Holstein, in welchem Bundesland sind Sie dann geboren? Bundesland:	<hr/>										
	Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land sind Sie dann geboren? Land:	<hr/>										
6)	Wo sind Sie aufgewachsen?	<input type="checkbox"/> ländliche Gegend (Dorf) <input type="checkbox"/> Stadt										
	Wo leben Sie heute?	<input type="checkbox"/> ländliche Gegend (Dorf) <input type="checkbox"/> Stadt										
7)	Ist Ihr Vater in Deutschland geboren?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein										
	Ist Ihr Vater in Schleswig-Holstein geboren?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein										
	Wenn nicht in Schleswig-Holstein, in welchem Bundesland ist Ihr Vater dann geboren? Bundesland:	<hr/>										
	Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land ist Ihr Vater dann geboren? Land:	<hr/>										
8)	Ist Ihre Mutter in Deutschland geboren?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein										
	Ist Ihre Mutter in Schleswig-Holstein geboren?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein										
	Wenn nicht in Schleswig-Holstein, in welchem Bundesland ist Ihre Mutter dann geboren? Bundesland:	<hr/>										
	Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land ist Ihre Mutter dann geboren? Land:	<hr/>										

9) Wie schätzen Sie Ihre gegenwärtige körperliche Verfassung ein?

- sehr gut
- gut
- weniger gut
- schlecht

10) Falls Sie gesundheitliche Beschwerden haben, welche sind das?

Im Folgenden werden Ihnen Fragen zu Ihrer Erkrankung Krampfadern (Varikosis) gestellt:

11) Haben Sie sichtbare Krampfadern?

- ja
- nein

Wenn ja, wann traten die ersten Anzeichen dafür auf?

Jahr:

--	--	--

 oder damaliges Alter:

--	--

12) Hatten Sie jemals eine tiefe Beinvenen-Thrombose (Blutgerinnung)?

- ja
- nein

13) Hatten Sie jemals eine Lungen-Embolie?

- ja
- nein

14) Hatten Sie jemals eine Venenentzündung?

- ja
- nein

15) Nehmen Sie Medikamente zur Blutverdünnung ein?

- nein
- Marcumar oder ähnliche Medikamente
- Aspirin oder ähnliche Medikamente
- Sonstige Medikamente

16) Hatten Sie schon schwere Operationen?

- ja
- nein

Wenn mehr als einmal, wann zum letzten Mal?

Jahr:

--	--	--	--

Wie häufig insgesamt?

Anzahl:

--	--

17) Waren Sie schon einmal schwanger?

- ja
- nein

Wenn ja, wann zum ersten Mal?

Jahr:

--	--	--	--

Wenn mehr als einmal, wann zum letzten Mal?

Jahr:

--	--	--	--

Wie häufig insgesamt?

Anzahl:

--	--

Hatten Sie schon einmal eine Mehrlingsschwangerschaft?

- nein
- ja, Anzahl:

--

18) Nehmen Sie die Hormone?

- nein
- ja, Anti-Baby-Pille
- ja, Wechseljahrshormone
- ja, andere: _____

19) Haben Sie Fettstoffwechselstörungen?

- ja
- nein

20) Tragen Sie regelmäßig Kompressionsstrümpfe?

- ja
- nein

21) Leiden Sie unter Schweregefühl oder Spannungsgefühl der Beine?

- ja
- nein

22) Haben Sie vor allem abends auftretende Beinschwellungen?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
23) Leiden Sie unter Ekzemen an den Beinen?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
24) Haben Sie Schmerzen nach längerem Stehen oder Sitzen?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
25) Haben Sie Schmerzen nach längerem Gehen?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
26) Leiden Sie unter Juckreiz der Beine?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
27) Leiden Sie häufig unter Wärme- bzw. Hitzegefühl der Beine?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
28) Haben Sie Fuß- oder Wadenkrämpfe?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
29) Ihre berufliche Tätigkeit ist überwiegend verbunden mit	<input type="checkbox"/> Stehen <input type="checkbox"/> Sitzen <input type="checkbox"/> sich abwechselnder körperlicher Belastung <input type="checkbox"/> körperlicher Schwerstarbeit
30) Treiben Sie Sport, wenn ja welchen regelmäßig?	<input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> Wandern & Walking <input type="checkbox"/> Joggen <input type="checkbox"/> Schwimmen <input type="checkbox"/> Skilanglauf <input type="checkbox"/> Skibfahrt <input type="checkbox"/> Gymnastik <input type="checkbox"/> Krafttraining <input type="checkbox"/> Ballsportarten <input type="checkbox"/> Sonstiges: _____

Die nächsten Fragen beschäftigen sich mit weiteren wichtigen Informationen zu Ihren Krampfadern:

31) Um Ihr Leiden zu lindern wurden folgende therapeutische Maßnahmen vorgenommen:

- eine Operation
- Verödung / Laser
- Kompressionsstrumpf oder Verband
- andere: _____
- keine

32) Leiden Ihre Eltern, Ihre Geschwister oder Ihre Kinder unter Krampfadern (Varikosis)?

Bitte kreuzen Sie in der folgenden Tabelle an (X), wie viele Geschwister und / oder Kinder Sie haben und wer davon verstorben ist. Geben Sie das jetzige Alter an bzw. das Alter zum Todeszeitpunkt. Bitte tragen Sie ein, wer aus Ihrer Familie ebenfalls unter Krampfadern (Varikosis) leidet.

Auch wenn keiner Ihrer Familienangehörigen unter Krampfadern leidet, füllen Sie bitte den dickumrandeten Teil der Tabelle aus.

Familienangehörige/r			jetziges Alter bzw. Alter bei Todeszeitpunkt	leidet unter Krampfadern
	Haben / hatten Sie ...	verstorben		
Mutter	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Vater	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Bruder 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Bruder 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Bruder 3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Schwester 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Schwester 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Schwester 3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Tochter 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Tochter 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Sohn 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Sohn 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

Haben Sie weitere Kinder oder Geschwister, und wer leidet unter Krampfadern?

33) Im Folgenden geht es um die exakte medizinische Beurteilung Ihrer Krampfadern:
(Vom Arzt auszufüllen!)

Klassifikationsgruppe	C = Klinische Zeichen	Rechtes Bein	Linkes Bein	Beide Beine
C ₀	Keine sichtbaren oder tastbaren Zeichen einer Venenerkrankung			
C ₁	Besenreiser, retikuläre Varizen, Corona phlebectatica			
C ₂	Varizen			
C ₃	Ödeme ohne Hautveränderungen			
C ₄	Hautveränderungen - Ekzem - Siderose - Dermatoliposklerose - Hypodermitis - Atrophie blanche			
C ₅	Abgeheiltes Ulkus			
C ₆	Florides Ulkus			
E = Ätiologie				
E _C	Kongenital			
E _P	Primär			
E _S	Sekundär			
A = Anatomische Lokalisation				
A _S	Superfizial (oberflächliche Venen			
A _{S1}	Besenreiser / retikuläre Varizen			
A _{S2}	V. saphena magna - Oberschenkel			
A _{S2R}	Crossenrezidiv V. saphena magna			
A _{S2NA}	Neo-Angiogenese			
A _{S3}	V. saphena magna- Unterschenkel			
A _{S4}	V. saphena parva			

Klassifikationsgruppe	C = Klinische Zeichen	Rechtes Bein	Linkes Bein	Beide Beine
A _{S4R}	Crossenrezidiv V. saphena parva			
A _{S5}	Seitenäste			
A _O	Deep (tiefen Venen)			
A _{OV}	varizenbedingt			
A _{OP}	postthrombotisch			
A _P	Perforansvenen			
A _{P17}	Perforansvenen Oberschenkel			
A _{P18}	Perforansvenen Unterschenkel			
P = Pathologische Klassifikation				
P _R	Reflux			
P _O	Obstruktion			
P _{RO}	Reflux und Obstruktion			

Nun kommen wir zu anderen weit verbreiteten Krankheiten:

34) Ist Ihr Blutzuckerspiegel erhöht?
<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> ich weiß nicht <input type="checkbox"/> nein Wenn nein, bitte weiter mit Frage 39.
35) Ist bei Ihnen eine Zuckerkrankheit (Diabetes) von einem Arzt diagnostiziert worden?
<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
36) Welcher Diabetes-Typ liegt nach Ihrem Wissen vor?
<input type="checkbox"/> „Jugendlicher Diabetes“ (Typ 1) <input type="checkbox"/> „Altersdiabetes“ (Typ 2) <input type="checkbox"/> sonstiger Diabetes (z.B. Diabetes nach Bauchspeicheldrüsenentzündung, Schwangerschaftsdiabetes) <input type="checkbox"/> ich weiß nicht
37) Geben Sie bitte an, wann Ihre Diabetes-Erkrankung festgestellt wurde.
Jahr: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> oder damaliges Alter: <input type="text"/> <input type="text"/>

38) Wie wird Ihre Blutzuckerkrankheit behandelt?

- nur mit Tabletten
- nur mit Insulin (Spritzen)
- mit Insulin und Tabletten
- nur über eine angemessene Ernährung
- keine Behandlung

39) Leiden Sie an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (M. Crohn, Colitis ulcerosa, Colitis intermedia)?

- ja
- nein
- ich weiß nicht

40) Hatten Sie von einem Arzt festgestellte Gallensteine?

- ja
- nein

41) Wurde bei Ihnen ein Nierenleiden festgestellt?

- ja
- nein

Wenn ja, nehmen Sie regelmäßig an einem Dialyse-Programm (Blutwäsche) teil?

- ja
- nein

42) Ist bei Ihnen eine Krebserkrankung festgestellt worden?

- ja
- nein

Wenn ja, um welche handelt es sich:

<input type="checkbox"/> Brustkrebs	<input type="checkbox"/> Magenkrebs
<input type="checkbox"/> Lungenkrebs	<input type="checkbox"/> Hautkrebs
<input type="checkbox"/> Prostatakrebs	<input type="checkbox"/> Blutkrebs
<input type="checkbox"/> Darmkrebs	<input type="checkbox"/> Sonstige, welche: _____

43) Sind Sie an einem Krampfleiden (Epilepsie) erkrankt?

- ja
- nein

44) Besteht bei Ihnen eine von einem Arzt festgestellte Atemwegserkrankung?

- ja
- nein

Wenn ja, um welche handelt es sich?

- chronische Bronchitis
- Asthma
- Sarkoidose (Morbus Boeck)
- sonstige, welche: _____

45) Hat ein Arzt bei Ihnen eine der folgenden Hautkrankheiten festgestellt?

- Neurodermitis (atopisches Ekzem, Milchschorf)
- Schuppenflechte (Psoriasis)
- sonstige, welche: _____
- keine

46) Wie häufig haben Sie in den letzten 2 Jahren im Durchschnitt Alkohol getrunken?

- Mehr als 1–2 mal pro Woche
- 1–2 mal pro Woche
- seltener als 1 mal pro Woche
- nie

47) Haben Sie in Ihrem Leben über einen längeren Zeitraum (mehr als 2 Jahre) mindestens 5 Zigaretten pro Tag geraucht?

- ja
- nein

Herzlichen Dank für Ihre Mitwirkung!

Bitte beachten Sie auch die nächste Seite.

Wir haben noch einige abschließende Fragen an Sie:

Wir können Ihnen leider keine persönlichen Untersuchungsergebnisse mitteilen.

Aufgrund vieler Rückfragen von Patienten führen wir jedoch eine separate Adressendatei für die Zusendung allgemeiner Informationen zum Fortgang des Projektes. Wünschen Sie die Zusendung per E-Mail, geben Sie bitte Ihre E-Mail Adresse an.

Möchten Sie weiter über die allgemeinen Ergebnisse der Studie auf dem Laufenden gehalten werden? Wenn ja, werden wir Ihren Namen und Ihre Adresse aufbewahren, um Sie über die neuesten Fortschritte zu informieren. Diese Daten werden natürlich getrennt von Ihren persönlichen Untersuchungsdaten gespeichert.

- ja, ich möchte weiter informiert werden
- nein, ich möchte nicht weiter informiert werden

E-Mail- Adresse: _____

In Zukunft werden Folgestudien zu dieser Untersuchung durchgeführt. Wir würden uns freuen, wenn auch Sie wieder daran teilnehmen. In diesem Fall werden wir Ihren Namen und Ihre Adresse getrennt von Ihren Studiendaten für eine erneute Kontaktaufnahme zu Beginn der Folgestudie speichern.

Sind Sie bereit, an einer Folgestudie teilzunehmen?

- ja
- nein

Haben Sie Fragen, wenden Sie sich bitte an das popgen -Team (Tel.: 0431/597-3710). Sie können uns auch eine E-mail schicken: info@popgen.de

Nochmals vielen Dank! Und alles Gutes für Sie!



Ihr popgen Forschungsteam

Danksagung

Nach vielen Jahren intensiver Arbeit liegt sie nun vor Ihnen: meine Dissertation. Damit ist es an der Zeit, mich bei denjenigen zu bedanken, die mich in dieser Phase meiner akademischen Laufbahn beruflich und privat begleitet haben.

Mein besonderer Dank geht an Herrn **Prof. Dr. med. Stefan Schreiber** für die Bereitstellung des Themas sowie Nutzung der Labore und Mitarbeit im Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB).

Ich bedanke mich herzlich bei Frau **Prof. Dr. med. Susanna Nikolaus** für die freundliche und konstruktive Betreuung.

Herrn **Dr. rer. nat. Andreas Fiebig** danke ich für die jahrelange Betreuung, dem Ideenaustausch und für die konstruktiven Verbesserungsvorschläge im Rahmen der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. Michael Nothnagel**, aktuell *Cologne Center for Genomics, Department of Statistical Genetics and Bioinformatics* der Universität zu Köln, für die statistischen Analysen am Institut für Medizinische Informatik und Statistik der CAU zu Kiel.

Frau **Dr. rer. nat. Silke Szymczak** aus dem Institut für Medizinische Informatik und Statistik der CAU zu Kiel danke ich für die konstruktiven Vorschläge und Betreuung bezüglich der statistischen Aufarbeitung.

Dem Laborteam insbesondere **Ilona Urbach, Catharina Fürstenau, Irene Pauselius, Catharina von der Lancken, Tanja Henke, Jan Sebastian Tammen und Susan Ehlers** danke ich für die Unterstützung im Rahmen der Labortätigkeit und der freundlichen Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank gilt auch der Biodatenbank popgen insbesondere **Birgit Timm und Lukas Tittmann** für die Unterstützung in der Arbeit mit der Biodatenbank.

Der Capio Mosel-Eifel-Klinik insbesondere Herrn **Dr. med. Norbert Frings** sowie **Dr. med. Petra Krusche** und Herrn **Aljoscha Greiner** danke ich für die Rekrutierung der Patienten und der freundlichen Kooperation, welches den Grundstein für die anschließende Studie legte.

Herrn **Dr. med. Christoph Alexander Kopetsch** und Herrn **Dr. med. Claudio Cim Conrad** danke ich für die Unterstützung und der gemeinsamen Arbeit im Rahmen der DNA-Isolation und Eingabe der Patientendaten in die Biodatenbank.

Bei meinen Eltern **Elke und Jörg Gawlick** möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.