

Aus dem Lehrstuhl für
Innere Medizin II
Lehrstuhlinhaber: Professor Dr. med. G. Riegger
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

**Die Rolle genetischer Varianten des Adipozytokins
Visfatin und des Signaltransduktors Phosphatidylinositol-
3-kinase bei kardiometabolischen Erkrankungen**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät der
UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Daniel Schmalenberger

2009

Aus dem Lehrstuhl für
Innere Medizin II
Lehrstuhlinhaber: Professor Dr. med. G. Riegger
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

**Die Rolle genetischer Varianten des Adipozytokins
Visfatin und des Signaltransduktors Phosphatidylinositol-
3-kinase bei kardiometabolischen Erkrankungen**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät der
UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Daniel Schmalenberger

2009

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Hengstenberg

2. Berichterstatter: PD Dr. Thomas Langmann

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Dezember 2009

*Für meine Frau Fabiola
und meine Familie*

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	8
1.1. Definition und Epidemiologie des metabolischen Syndroms	8
1.1.1. Definition	
1.1.2. Genetische Grundlagen	
1.1.3. Erworbene Risikofaktoren	
1.2. Definition und genetische Komponente der koronaren Herzerkrankung (KHK)	11
1.2.1. Definition	
1.2.2. Genetische Komponente der koronaren Herzerkrankung (KHK)	
1.3. Charakteristika des Adipozytokins Visfatin	13
1.4. Charakteristika des Signaltransduktors Phosphatidylinositol-3-kinase	16
1.5. Kandidatengenuntersuchungen und SNP-Assoziationen	19
1.6. Fragestellung und Zielsetzung der durchgeführten Experimente	20
2. PROBANDEN, METHODEN UND MATERIAL	21
2.1. Populationen	21
2.1.1. Allgemeinbevölkerung	
2.1.2. Herzinfarktfamilien	
2.1.3. Herzinfarktpopulation	
2.2. Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNPs)	24
2.2.1. SNP-Auswahl des PBEF1-Gens	
2.2.2. SNP-Auswahl des PIK3CA-Gens	
2.3. Genotypisierungsmethoden, Materialien und Versuchsdurchführung	26
2.3.1. Taqman 5`Exonuklease Assay	
2.3.2. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Methode (RFLP)	
2.3.3. DNA-Sequenzierung	
2.4. Definitionen der Phänotypen	34
2.5. Statistische Auswertungen	36
2.5.1. Hardy-Weinberg-Äquilibrium	
2.5.2. Linkage Disequilibrium	
2.5.3. Chi-Quadrat-Test	
2.5.4. Varianzanalyse	
3. ERGEBNISSE	40
3.1. Ergebnisse in der Visfatingenanalyse	40
3.1.1. Genotypisierungsraten und Laborauswertung	
3.1.2. LD-Evaluation und Haplotypauswertung in der Allgemeinbevölkerung	
3.1.3. Assoziationsanalyse einzelner SNPs im PBEF1-Gen	
3.1.3.1. Allgemeinbevölkerung: MONICA-LVH-Substudie	
3.1.3.2. Herzinfarktfamilien: Regensburger Herzinfarktfamilienstudie (HIFAM)	
3.1.3.3. Herzinfarktpopulation: KORA	
3.1.3.4. Signifikanzen der SNPs zum Erkrankungsphänotyp akuter Myokardinfarkt	
3.1.3.4.1. MONICA-LVH-Substudie vs. Indexpatienten der HIFAM	
3.1.3.4.2. MONICA-LVH-Substudie vs. KORA	

3.1.4. Haplotyp-Assoziationsanalyse	
3.1.4.1. Allgemeinbevölkerung: MONICA-LVH-Substudie	
3.1.4.2. Herzinfarktfamilien: Regensburger Herzinfarktfamilienstudie (HIFAM)	
3.1.4.3. Herzinfarktpopulation: KORA	
3.1.4.4. Signifikanzen der SNPs zum Erkrankungsphänotyp akuter Myokardinfarkt	
3.1.4.4.1. MONICA-LVH-Substudie vs. Indexpatienten der HIFAM	
3.1.4.4.2. MONICA-LVH-Substudie vs. KORA	
3.2. Ergebnisse in der PIK3CA-Analyse	59
3.2.1. Genotypisierungsraten	
3.2.2. LD-Evaluation und Haplotypauswertung in der Allgemeinbevölkerung	
3.2.3. Assoziationsanalyse einzelner SNPs im PIK3CA-Gen	
3.2.3.1. Allgemeinbevölkerung: MONICA-LVH-Substudie	
3.2.3.2. MONICA-LVH-Substudienprobanden gegen Patienten der HIFAM-Studie	
3.2.4. Haplotyp-Assoziationsanalyse der Allgemeinbevölkerung	
3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	68
4. DISKUSSION	71
4.1. Diskussion der Methoden	71
4.1.1. Studienpopulationen	
4.1.2. Auswahl und Lage der SNPs	
4.1.3. SNP-Genotypisierung	
4.1.3.1. 5`Exonuklease Assay	
4.1.3.2. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Methode (RFLP)	
4.1.3.3. DNA-Sequenzierung	
4.1.4. Definitionen der Phänotypen	
4.1.5. Statistische Auswertungen	
4.2. Diskussion der Visfatingenanalyse	76
4.2.1. Assoziationen zum Lipidstoffwechsel	
4.2.2. Assoziationen zum Glukosestoffwechsel	
4.2.3. Assoziationen zum akuten Myokardinfarkt	
4.3. Diskussion der PIK3CA-Analyse	79
4.3.1. Assoziationen zum Lipidstoffwechsel	
4.3.2. Assoziationen zum Glukosestoffwechsel	
4.3.3. Assoziationen zur arteriellen Hypertonie	
4.3.4. Assoziationen zum akuten Myokardinfarkt	
4.4. Möglichkeiten und Limitationen von Kandidatengenuntersuchungen	81
5. ZUSAMMENFASSUNG	82
6. ANHANG	84
Literaturangaben	

1. EINLEITUNG

1.1. Definition und Epidemiologie des metabolischen Syndroms

1.1.1. Definition

Das metabolische Syndrom, auch genannt Syndrom X, Insulinresistenzsyndrom oder umgangssprachlich „Das tödliche Quartett“ (*Grundy et al.*), ist definitionsgemäß eine Erkrankung, die durch verschiedene metabolische Risikofaktoren für Diabetes mellitus Typ II und der kardiovaskulären Erkrankung (CVD) festgelegt wird. Zu diesen Risikofaktoren gehören Adipositas, Hyperglykämie, Dyslipidämie und Hypertonie. Diese stellen jeweils eigenständige Erkrankungen dar. Für das metabolische Syndrom (MetS) gibt es unterschiedliche Definitionen von verschiedenen Gesundheitsorganisationen, die jeweils etwas unterschiedliche Grenzwerte für die einzelnen Parameter haben.

Phänotypen/ Parameter	WHO 1999	EGIR 1999	ATPIII 2001/ AHA 2005	IDF 2005
	Diabetes oder Insulinresistenz oder verminderte Glukosetoleranz plus ≥ 2 der folgenden Punkte:	Insulinresistenz oder Hyperinsulinämie (nur bei Nicht-Diabetikern) plus ≥ 2 der folgenden Punkte:	≥ 3 der folgenden Punkte:	Adipositas: Taillenumfang ≥ 94 cm (m) bzw. 80 cm (w) plus ≥ 2 der folgenden Punkte:
Adipositas	- BMI > 30 kg/m ² oder WHR $> 0,9$ (m) bzw. 0,85 (w)	- Taillenumfang ≥ 94 cm (m) bzw. 80 cm (w)	- Taillenumfang > 102 cm (m) bzw. 88 cm (w)	
Dyslipidämie	- Triglyzeride ≥ 150 mg/dl oder HDL-Chol. < 35 mg/dl (m) bzw. 39 mg/dl (w)	- Triglyzeride > 177 mg/dl oder HDL-Chol. < 39 mg/dl	- Triglyzeride ≥ 150 mg/dl; - HDL-Chol. < 40 mg/dl (m) bzw. 50 mg/dl (w)	- Triglyzeride ≥ 150 mg/dl oder Medikation - HDL-Chol. < 40 mg/dl (m) bzw. 50 mg/dl (w)
Arterielle Hypertonie	- Blutdruck $\geq 140/90$ mmHg	- Blutdruck $\geq 140/90$ mmHg oder Medikation	- Blutdruck $\geq 135/85$ mmHg oder Medikation	- systol. Blutdruck ≥ 130 mmHg oder diastol. ≥ 85 mmHg oder Medikation
Diabetische Stoffwechsellage		- Nüchtern glukose ≥ 110 mg/dl	- Nüchtern glukose ≥ 110 mg/dl	- Nüchtern glukose ≥ 100 mg/dl oder Diabetes Typ II
Sonstige	- Mikroalbuminurie: Albuminausscheidung ≥ 20 μ g/min oder Albumin-Kreatin-Ratio ≥ 30 mg/g			

Tab. 1: Definitionen metabolisches Syndrom (*Zimmet, berti KG, and Serrano*)

Neben den Einzelparametern (wie Blutdruck, high-density-lipoprotein- und low-density-lipoprotein-Cholesterin, Triglyzeride, Taillenumfang oder Nüchternblutzucker) des MetS gibt es auch potentielle neue biochemische Marker. Diese betonen den proinflammatorischen, prothrombotischen Charakter des MetS. Allerdings ist deren Wert in der Klassifizierung des Erkrankungskomplexes jedoch noch nicht klar ist. Zu diesen biochemischen Markern gehören das C-reaktive Protein (CRP), Interleukin 6 (IL-6) und der Plasminogenaktivatorinhibitor-1 (PAI1) (*Koh, Han, and Quon*). Da in verschiedenen Studien unterschiedliche Definitionen des MetS verwendet werden, ist die Vergleichbarkeit der vorhandenen Daten begrenzt. Einige Experten sind z. B. der Meinung, dass die Diagnose „Diabetes mellitus Typ II“ nicht Bestandteil der Definition sein soll, da der Zweck der Diagnose „MetS“ darin besteht, dass Patienten mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Diabetes identifiziert und einer adäquaten Therapie zugeführt werden. Zusätzlich zu den Unklarheiten der Definition gibt es die offene Frage, ob das MetS ein eigenes Syndrom oder ein Sammelbegriff für die o.g. Erkrankungen ist. Um dies genauer zu erörtern, wäre eine Betrachtung der Pathophysiologie der einzelnen Komponenten des Syndroms sinnvoll. Gäbe es eine gemeinsame Grundlage der Pathophysiologie, so würde dies den Begriff des „Syndroms“ implizieren (*Kahn et al.*) und rechtfertigen. Fest steht nur, dass es ein Cluster von bestimmten Risikofaktoren für Diabetes mellitus Typ II und CVD gibt. Die verbindende Pathogenese für die Einzelkomponenten ist jedoch unklar (*Kahn et al.*). So ist beispielsweise nicht gesichert, dass die Insulinresistenz den anderen Faktoren des MetS unterliegt. Dies zeigt sich auch daran, dass das Kriterium der Insulinresistenz in manchen Definitionen gar nicht aufgenommen ist. Gegen die Annahme der Existenz eines eigenen Syndroms, welche die o.g. Risikofaktoren vereint, spricht auch die Erkenntnis, dass das CVD-Risiko assoziiert mit dem MetS nicht größer ist als das Risiko der Summe seiner Einzelkomponenten (*Kahn et al.*). Im medizinischen Alltag wird dieser Beobachtung der unklaren Pathophysiologie insofern Rechnung getragen, als die Behandlung nicht anders ist als die Therapie der Einzelkomponenten (*Kahn et al.*). Die Diagnose „Syndrom“ ist also durchaus kritisch zu sehen und sollte auch aus genetischer Perspektive kritisch betrachtet werden.

1.1.2. Genetische Grundlagen

Man geht grundsätzlich davon aus, dass das MetS auf dem Boden einer komplexen genetischen Disposition entstehen kann und somit nicht dem Mendelschen Erbgang unterliegt. Es wird vielmehr angenommen, dass in unterschiedlichen Familien mit MetS unterschiedliche Kombinationen von dispositionsverändernden genetischen Varianten, sogenannten

Suszeptibilitätsgenen bestehen. Unter diesem Begriff versteht man eine genetische Variante, die zwar das Risiko einer Erkrankung signifikant erhöht, aber für die Erkrankungsausprägung weder notwendig noch ausreichend ist (*Greenberg*). Das MetS ist somit eine oligogenetische Erkrankung, deren genetische Disposition sich aus der Summe der Effekte der Suszeptibilitätsallele ergibt. In der Fachliteratur sind viele solcher Suszeptibilitätsgene und ihre Beteiligung an der Ausprägung einer Komponente des MetS genauer beschrieben worden. Ein Beispiel hierfür ist das INSIG2-Gen, in dessen Bereich sich genetische Varianten befinden, die zur Ausbildung einer Adipositas sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern beitragen (*Herbert et al.*). Allerdings ist bislang nicht bekannt, dass das MetS eigene genetische Mutationen als Ursache hat, sondern nur, dass bestimmte Clusterungen von Suszeptibilitätsgenen und Mutationen für das phänotypische Erscheinungsbild dieses Syndroms verantwortlich sind. Aufgrund der hohen Prävalenz des MetS in der westlichen Bevölkerung ist anzunehmen, dass solche Allelveränderungen und deren Cluster relativ häufig vorkommen.

1.1.3. Erworbene Risikofaktoren

Neben genetischen Risikofaktoren spielen auch erworbene Faktoren eine wichtige Rolle. Ein Hauptfaktor ist dabei das Übergewicht, welches in vielen Fällen die Folge von Überernährung und körperlicher Inaktivität darstellt: Laut National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) spielte das MetS nur bei 5 Prozent der Normalgewichtigen eine Rolle, während 22 Prozent der Übergewichtigen und 60 Prozent der Patienten mit einer Adipositas von dem Syndrom betroffen waren (*Park et al.*). Weiterhin ergab sich in der „Framingham Heart Study“, dass eine Gewichtszunahme um 2,25 kg oder mehr über 16 Jahre mit einem Risikoanstieg in Bezug auf das MetS um 21 bis 45 Prozent assoziiert war (*Wilson et al.*). Vor allem bei Kindern und jungen Erwachsenen ist das Übergewicht neben zu hohen Triglyzeridwerten ein hoher Risikofaktor für eine spätere Erkrankung. In einer Kohortenstudie mit neun und zehnjährigen Mädchen aus verschiedenen ethnischen Gruppierungen, die über 10 Jahre auf Triglyzeride und Taillenumfang untersucht wurden, stellte man nach Ablauf der Studie bei insgesamt 0,2 Prozent der Mädchen ein MetS fest. Dabei errechnete man, dass das Risiko, ein MetS zu entwickeln, mit jedem Zentimeter, den die Probanden im zweiten Jahr an Taillenumfang zugenommen haben, um 7,4 Prozent erhöht ist; für den Anstieg des Triglyzeridbasiswert von 1 mg/dl wurde eine Risikozunahme von 1,3 Prozent ermittelt (*Morrison et al.*). Langzeitergebnisse in Bezug auf das kardiovaskuläre Risiko bei Kindern und jungen Erwachsenen mit MetS stehen noch aus (*Morrison et al.*).

Die Frage, ob die ethnische Zugehörigkeit eine Rolle bei der Entstehung dieser Erkrankung spielt, wurde ebenfalls in der NHANES III Studie aufgegriffen. Dabei war im Vergleich zu den Weißen und Afro-Amerikanern die altersbereinigte Prävalenz unter den Mexiko-Amerikanern mit 31,9 Prozent am größten (*Ford, Giles, and Dietz*). Wie zu erwarten war, bestand auch eine Abhängigkeit der Prävalenz bezüglich des Alters: bei 20- bis 29-Jährigen betrug die Prävalenz 6,7 Prozent, bei 60- bis 69-Jährigen 43,5 Prozent und bei über 70-Jährigen war eine Rate von 42 Prozent zu verzeichnen (*Ford, Giles, and Dietz*). Weitere Risikofaktoren, die sich in dieser Studie als solche ergaben, waren Rauchen und postmenopausaler Status (*Park et al.*).

1.2. Definition und genetische Komponente der koronaren Herzerkrankung (KHK)

1.2.1 Definition

Die Entwicklung eines MetS stellt - wie oben schon beschrieben – einen großen Risikofaktor für das In-Gang-Setzen eines gravierenden atherosklerotischen Veränderungsprozesses der arteriellen Gefäße dar. Sind davon die Koronararterien betroffen, spricht man von der koronaren Herzerkrankung (KHK), welche sich durch einen Myokardinfarkt, eine Angina pectoris, eine Herzinsuffizienz oder durch plötzlichen Herztod erkennbar macht. Diese Manifestationsform der kardiovaskulären Erkrankung (CVD) ist mit einem Anteil zwischen einem Drittel und der Hälfte an der CVD-Prävalenz sehr häufig. Das Risiko, dass ein Individuum im Laufe seines Lebens eine KHK entwickelt, wurde in der Framingham-Herz-Studie untersucht: Das Lebenszeitrisiko lag bei 40-jährigen männlichen Probanden bei 49% und bei 40 Jahre alten Frauen bei 32 % (*Lloyd-Jones et al.*). Bezüglich des Risikos, ein kardiales Ereignis zu erleiden, ist weiterhin zu vermuten, dass Patienten, die unter einer nichtkoronaren artherosklerotischen vaskulären Erkrankung (pAVK) leiden, dasselbe Risiko wie bei Vorliegen einer KHK haben, zukünftig ein solches kardiales Ereignis zu bekommen (*Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report*).

1.2.2. Genetische Komponente der koronaren Herzerkrankung (KHK)

Die Genese der KHK ist überwiegend multifaktoriell und wird - wie auch das MetS – aus genetischer Sicht zu den komplexen Erkrankungen gezählt. Der Anteil der KHK-Erkrankungen, der nach Mendel vererbt wird, ist sehr gering und wird an dieser Stelle nicht weiter beschrieben. Eine Kohorten-Zwillingsstudie verdeutlicht, dass der erblichen

Komponente bei der Entstehung der KHK eine entscheidende Bedeutung zuzumessen ist: In einem 36-Jahre-Follow-Up von 20.966 schwedischen Zwillingen konnte gezeigt werden, dass die Erbllichkeit einer letalen KHK bei den Männern 57 % und bei den Frauen 38 % beträgt (*Marenberg et al.*). In Studien zur komplexen KHK wurden bereits ca. 300 Kandidatengene (Definition Kandidatengen: siehe Kapitel 1.5) identifiziert, von denen man annimmt, dass sie an der Entstehung dieser Erkrankung beteiligt sind. Erfolge der Kandidatengenuntersuchungen zur KHK konnten vor allem im Gebiet der Immunologie verbucht werden: Grundlage dafür bildet die Erkenntnis, wonach Agentien der Entzündungsreaktion und der angeborenen Immunität in die Pathophysiologie der Atherosklerose involviert sind. Beispielsweise wurden Komponenten des Leukotrien-Stoffwechselweg für eine KHK-Suszeptibilität identifiziert: Promotorvarianten des Arachidonsäure-5-Lipoxygenasegens (ALOX5-Gen) wurden mit einem präklinischen Marker der Atherosklerose, der Intima-Media-Wanddicke der A. carotis, assoziiert. Zudem konnte ein Zusammenhang dieser Genvarianten mit den Serumwerten des unspezifischen Entzündungsmarkers C-reaktives Protein (CRP) hergestellt werden, welches zum einen ein mittelstarker Prädiktor der KHK ist, zum anderen eine direkte Rolle in der Plaquentstehung spielen kann (*Watkins and Farrall*).

Allerdings war keine der durchgeführten Assoziationsuntersuchungen bisher so robust, dass sie in der klinischen Praxis relevant gewesen wäre. Die meisten Kandidatengenanalysen konnten nicht reproduziert werden (*Watkins and Farrall*), sodass ihnen nur geringe Bedeutung zugemessen werden konnte. In den letzten Jahren konnten durch neuartige genetische Methoden große Fortschritte erzielt werden. Hierzu zählen das genomweite Linkage Mapping, Large-Scale-Genassoziationsstudien und vergleichende Genomstudien, die im Gegensatz zu den Kandidatengenuntersuchungen nicht von der vorherigen Information über Pathophysiologie und biochemische Stoffwechselwege abhängig sind und eine viel größere Anzahl von Genvarianten auf mögliche Assoziationen überprüfen können (*Watkins and Farrall*). So wurden Gene mit unterschiedlichen Funktionen identifiziert. Diese umfassen Transskriptionsfaktoren im Bereich der Vaskulogenese (Myozytenverstärkerfaktor 2A: MEF2A-Gen), Signalmoleküle, die in die Inflammation, angeborene und erworbene Immunität involviert sind (Lymphotoxin α : LTA-Gen) und neue Apolipoproteine (Apolipoprotein A5: APOA5-Gen) und Gene (wie Galectin 2: LGALS2-Gen), deren physiologische Rollen noch unklar sind (*Watkins and Farrall*). Seit 2007 gibt es verschiedene, unabhängige Untersuchungen mittels genomweiter 500K-Assoziationsanalyse (Wellcome Trust Case Control Consortium Studie und die deutsche

Herzinfarktfamilienstudie), die mehrere übereinstimmende Herzinfarktloci identifizieren konnten. Die stärkste Assoziation zur KHK zeigte in beiden Studien der Locus rs1333049 auf Chromosom 9p21.3 (*Samani et al.*). Dieser wurde inzwischen auch in Globalisierungsstrategien mittels Metaanalysen (*Schunkert et al.; Hinohara et al.*) eindeutig reproduziert.

1.3. Charakteristika des Adipozytokins Visfatin

Das in diesem Abschnitt beschriebene Adipozytokin Visfatin und der Signaltransduktor Phosphatidylinositol-3-kinase, welcher im nächsten Kapitel behandelt wird, könnten bei Betrachtung der Pathophysiologie und der Stoffwechsellugehörigkeiten künftig wichtige Rollen im kardiometabolischen Stoffwechsel zugeordnet werden, wobei vermutlich bestimmte Genvarianten an der Entstehung von kardiometabolischen Erkrankungen wie der KHK beteiligt sind.

Der Name „Visfatin“ ist abgeleitet von „visceral fat“, welches der hauptsächliche Bildungsort des Visfatins darstellt (*Fukuhara et al.*). Weitere Bildungsorte sind der Skelettmuskel, die Leber, das Knochenmark und die Leukozyten. In letzteren Zellen war das Visfatin als Wachstumsfaktor PBEF (Pre-B-cell enhancing factor) und als Antiapoptosefaktor schon vorher bekannt: Man wusste bereits, dass PBEF die Proliferation von B-Zellen im Frühstadium fördert und die Apoptose von Neutrophilen durch einen Caspase-Mechanismus hemmt (*Sethi and Vidal-Puig*). Fukuhara beschreibt 2005 das Visfatin als ein 52-kD-Protein, welches insulinmimetische Wirkung besitzt: an verschiedenen Mausmodellen (sowohl an insulinresistenten-, an nicht-insulinresistenten wie auch an insulindefizienten Mäusen) wurde bei intravenöser Injektion von Visfatin ein signifikanter Abfall des Glukosespiegels registriert. Weiterhin verursachte eine chronische Verabreichung von Visfatin mittels Adenovirusvektor bei insulin- und nicht-insulinresistenten Mäusen eine Senkung sowohl des Plasmaglukosespiegels als auch des Insulinspiegels, da es zu einer Glukoseaufnahme in den Adipozyten und Myozyten kommt und zugleich die Glukosefreisetzung in den Hepatozyten unterdrückt wird. Die Annahme der glukosenenkenden Wirkung wird durch Visfatin-Knockout-Mausversuche bekräftigt: Visfatinheterozygote Mäuse wiesen eine deutlich niedrigere Visfatinplasmakonzentration und einen signifikant höheren Plasmaglukosewert im Vergleich zu Visfatinwildtypmäusen auf (*Fukuhara et al.*). Die Tatsache, dass alle Visfatin -/- Mäuse während der Embryogenese starben, weist auf die vitale Funktion des Visfatins hin. Diese Erkenntnis sowie der Nachweis, dass PBEF im Laufe der Evolution stark konserviert

wurde, lässt die Vermutung zu, dass es sich beim Visfatin um ein Housekeeperprotein handelt (*Sethi and Vidal-Puig*).

Sicher ist, dass dem Visfatin insulinmimetische Eigenschaften zufallen. Zu einem geringen Teil sind diese Eigenschaften darauf zurückzuführen, dass es in Anwesenheit von Visfatin zu einer Verbesserung der systemischen Insulinsensitivität kommt (*Sethi and Vidal-Puig*), was eine der endokrinen Funktionen darstellt. Dies kann evtl. in Zusammenhang mit der induzierenden Wirkung der Adiponektinexpression stehen. Aufgrund der Verbesserung der Insulinsensitivität könnten sich therapeutische Optionen für die Zukunft z. B. bei der Behandlung von Diabetes mellitus Typ II ergeben. Ein aussichtsreicherer Kandidat für eine Behandlung von Diabetes- oder Adipositaspatienten mit Adipozytokinen ist jedoch das Adiponektin, da die Signaltransduktionswege und somit die Kenntnisse über mögliche Angriffspunkte von Therapeutika wesentlich besser sind. Die Rolle des Visfatins hingegen ist bei menschlicher Insulinresistenz und Fettleibigkeit zu wenig definiert, um als Variante mit großem therapeutischen Potential zu gelten (*Kralisch et al.*). Hierzu sind noch weitere Studien nötig.

Neben den endokrinen Funktionen besitzt PBEF auch parakrine Wirkungen. So induziert es die Akkumulation von Triglyzeriden in Präadipozyten sowohl des viszeralen als auch des subkutanen Fettgewebes und fördert die Triglyzeridsynthese aus Glukose (*Fukuhara et al.*). Daraus resultiert die Differenzierung der Präadipozyten zu reifen Adipozyten (*Sethi and Vidal-Puig*). Dies wiederum könnte theoretisch zu einer starken Vermehrung des abdominalen Fettgewebes mit den daraus resultierenden Folgen wie kardiovaskuläre Erkrankungen oder Adipositas führen. In diesem Falle wären therapeutische Aspekte des Visfatins von der Hand zu weisen.

Da zuvor schon über Therapiekonzepte mit Adipozytokinen gesprochen wurde, stellt sich nun die Frage, ob es sich beim Visfatin überhaupt wie z. B. bei Adiponektin oder Leptin, welches als eine mögliche Option für die Therapie von Patienten mit Leptindefizienz betrachtet wird (*Kralisch et al.*), um ein Adipozytokin handelt. Dieser Nachweis kann zur Zeit noch nicht erbracht werden. Einerseits wurde festgestellt, dass die Aminosäuresequenz des Visfatins keine Signalsequenz enthält (*Hug and Lodish*) und Visfatin vorwiegend im Zellkern und im Zytoplasma der viszeralen Adipozyten vorkommt (*Kitani, Okuno, and Fujisawa*), was gegen die Rolle des Visfatins als Adipozytokin spricht. Andererseits ist bekannt, dass dieses Protein auch extrazellulär im Plasma zu finden ist und von dort seine Effekte erzielen kann, was eher für das Vorliegen eines Fettgewebshormons spricht. Es würde sich in diesem Falle vermutlich um ein Hormon handeln, welches nicht sezerniert wird, sondern auf andere Weise

in den extrazellulären Raum gelangt: Nachdem nach Blockierung der Sekretionswege von Adipozyten festgestellt wurde, dass sich die Visfatinsekretion nicht verändert (*Rongvaux et al.*), wird vermutet, dass Visfatin durch Zellyse in den Extrazellularraum freigesetzt wird.

Über den Extrazellularraum gelangt das PBEF zu seiner Zielzelle und bindet dort an einen Insulinrezeptor mit ähnlicher Affinität zum Rezeptor wie das Insulin selbst, aber an unterschiedlicher Bindungsstelle (*Fukuhara et al.*). Es kommt dann zu einer Signaltransduktionskaskade (Abb. 1), die der des Insulins ganz ähnlich zu sein scheint: Am Mausmodell kommt es zur Phosphorylierung des Tyrosinkinase-Rezeptors und der Insulinrezeptorsubstrate 1 und 2 (IRS-1 und IRS-2), in einer Adipozytenkultur wird ebenfalls der Rezeptor, IRS-1 und IRS-2 phosphoryliert, wobei wie bei der Aktivierung durch Insulin die Transduktion über den Phosphaditylinositol-3-kinase (PI3K)-Pathway läuft. Hierbei bindet die PI3K an IRS-1 und IRS-2 und führt zu deren Phosphorylierung (*Fukuhara et al.*).

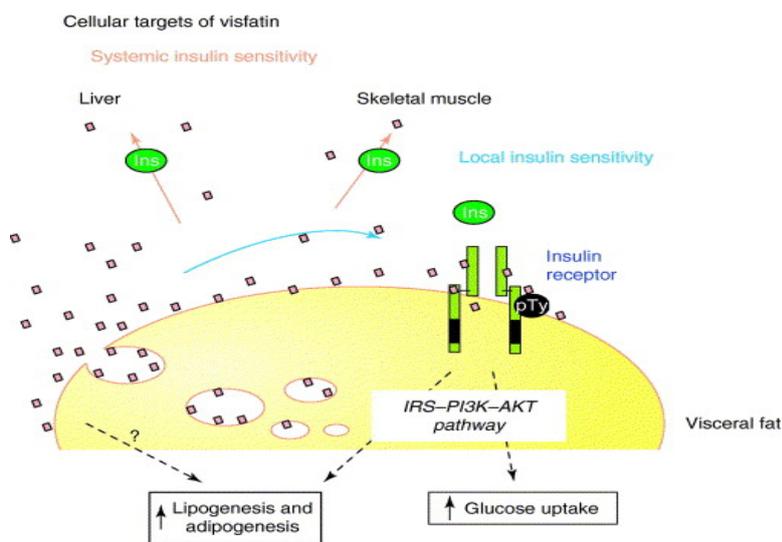


Abb. 1: Visfatintransduktion im viszeralen Fettgewebe (*Sethi and Vidal-Puig*)

Genauer über den Ablauf der Signaltransduktion des Visfatins ist noch nicht bekannt und muss noch weiter erforscht werden.

Fest steht, dass das Visfatin dem Insulin sowohl vom Wirkmechanismus als auch von den erzielten Effekten her sehr ähnlich ist und sich deswegen eine gewisse Wirkungsadditivität ergibt (*Fukuhara et al.*). Allerdings ist die Aufsummierung von insulinmimetischen Wirkungsspitzen durch bestimmte Faktoren eingeschränkt: Zum Ersten beträgt die Visfatinkonzentration im Blutplasma unter physiologischen, Nicht-Adipositas-Bedingungen nur 3-10 % der des Insulins (*Fukuhara et al.*) bei ähnlicher Affinität zum Rezeptor und ähnlicher Fähigkeit, den Rezeptor zu aktivieren. Zum Zweiten weisen Insulin und Visfatin ein unterschiedliches Zeit-Sekretions-Profil auf: Während die Ausschüttung des Insulins nach

dem Essen erhöht wird, ist die Visfatinfreisetzung von der Nahrungsaufnahme unabhängig (Fukuhara et al.).

1.4. Charakteristika des Signaltransduktors Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)

Wie oben bereits beschrieben, ist die PI3K an der Weiterleitung des Visfatin- und des Insulinsignals beteiligt und stellt einen der Hauptsignaltransduktoren dar. Phosphatidylinositol-3-kinasen sind heterodimere Lipidkinasen, die aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit bestehen. Die Experimente in der vorliegenden Arbeit beziehen sich allerdings nur auf das Gen, welches die katalytische Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-kinase (PIK3CA) kodiert. Das Genprodukt ist ein 124 kDa Protein, welches im Zytoplasma, genauer gesagt im PI3K-Komplex in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran, vorkommt. PIK3CA wird ubiquitär exprimiert und spielt in den unterschiedlichsten Geweben als Onkogen eine Rolle: So kommt es z. B. bei Mutationen zu Karzinomen der Mamma, des Kolon, der Ovarien, des Magens, des Gehirns, der Lunge usw. Besonders wichtig ist die Bildung von PIK3CA in den Adipozyten, den Myozyten und den Hepatozyten: Denn in diesen Zellen ist es von vorrangiger Bedeutung, dass das Insulin- bzw. das Visfatinsignal weitergeleitet wird.

Neben Insulin (Abb. 2) oder Visfatin kann eine PI3K-Aktivierung durch weitere verschiedene Liganden (z. B. bestimmte Wachstumsfaktoren) induziert werden. Diese Liganden binden an einen Tyrosinkinase-Rezeptor, welcher über IRS-Proteine die regulatorische PI3K-Untereinheit (wichtig: Isoform p85) aktiviert. Diese wiederum bindet dann die PIK3CA (wichtig: Isoform p110 α), worauf letztere in ihrem aktiven Zustand verschiedene weitere Signaltransduktionskaskaden triggert (Karakas, Bachman, and Park).

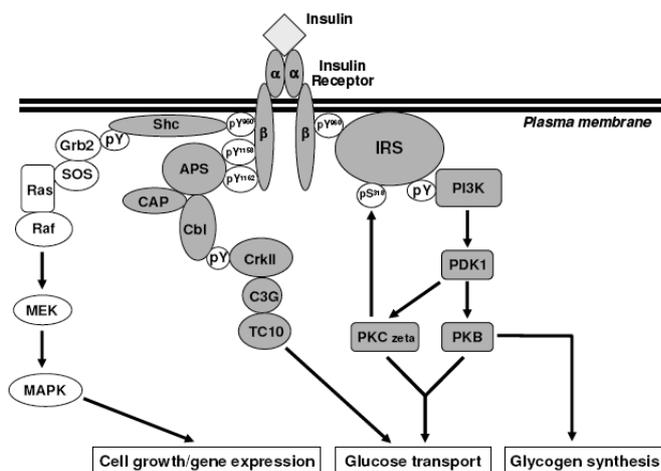


Abb. 2: Insulintransduktionsmechanismen in Adipozyten (PI3K- und MAPK-Pathway)

Dazu gehört der Umbau von Lipiden der Zellmembran (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) (*Chang, Chiang, and Saltiel*), welches Serinkinasen (Proteinkinase B oder C; PKB oder PKC) zur Plasmamembran transloziert. Diese wiederum übernehmen dort wichtige Aufgaben in der Aktivierung oder Deaktivierung von Proteinen und sind somit unverzichtbare Effektoren des PI3K-Pathways. Die Abschwächung der PIK3CA-Aktivierung erfolgt durch PIP₃-Dephosphorylierung via 3'-Phosphatasen, wie phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) oder via 5'-Phosphatasen wie Src homology inositol phosphatase 2 (SHIP2) (*Chang, Chiang, and Saltiel*).

Das SHIP2 Knockout-Mausmodell zeigt, was passiert, wenn diese negative Rückkopplung der PIK3CA-Aktivierung außer Kraft gesetzt wird: Bei Mäusen, die SHIP2 nicht exprimieren können, kommt es zur Entwicklung einer erhöhten Insulinsensitivität, da PIP₃ nicht durch die o.g. Phosphatase gespalten werden kann und somit das Insulinsignal weitertransduziert wird. Diese Beobachtung, sowie die Feststellung, dass beim Menschen eine steigende SHIP2-Expression mit einer erhöhten Insulinresistenz einhergeht, lässt vermuten, dass eine Inhibition der SHIP2 der Insulinresistenz entgegenwirken kann (*Baumgartener*).

Wie schon oben erwähnt, fällt der PIK3CA vor allem in den Leber-, Muskel- und Fettzellen eine vorrangige Bedeutung zu: dabei handelt es sich um Gewebe, an welchem das Insulin vorwiegend seine Wirkung entfalten soll. Die katalytische Untereinheit der PI3K spielt in diesen Geweben eine wichtige Rolle bei der Glukoseaufnahme und ist bedeutend für die Glut4-Translokation: Eine Hemmung der Kinase durch pharmakologische Inhibitoren blockiert komplett die Stimulation der Glukoseaufnahme durch Insulin. Weiterhin zeigt ein Mausexperiment, dass eine gezielte Inaktivierung der p85 regulatorischen Untereinheit zu einer gesteigerten Insulinsensitivität führt, während ein Gen-Knockout der PIK3CA zur Insulinresistenz und Glukoseintoleranz führt (*Chang, Chiang, and Saltiel*). Eine Überexpression hingegen kann teilweise Insulinwirkung hervorrufen, ersetzt aber keineswegs die Insulinwirkung: Eine Stimulation der Kinaseuntereinheit mittels platelet-derived growth factor (PDGF) oder IL-4 steigert die Glukoseaufnahme ebenso wenig wie die Zugabe von PIP₃. So wichtig die Rolle der Kinase bei der Glukoseaufnahme auch ist: Es bleibt festzuhalten, dass die zuletzt genannten Tatsachen darauf hinweisen, dass es neben der PI3K-Signaltransduktion noch weitere Pathways geben muss, die zu einer kompletten Insulinwirkung führen (*Chang, Chiang, and Saltiel*).

Neben der Rolle, den die PIK3CA in der Entwicklung der Insulinresistenz und somit in der Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ II spielt, ist das PIK3CA-Gen auch im Hinblick auf die Entstehung von Tumorerkrankungen von Bedeutung: Es handelt sich bei diesem Gen

um ein Onkogen, d. h. Mutationen in diesem Bereich führen zur Entstehung von verschiedenen Tumorerkrankungen als Folge von gestörtem Zellwachstum, Zelltransformation, Zelladhäsion bzw. Zellmigration und Störungen in Apoptose und Zellüberleben. Die einwandfreie Regulation dieser Mechanismen gehört allgemein zum Aufgabenbereich der PI3Ks (*Cantley*). Welche Rolle der PI3K-Pathway in der Tumorigenese spielt, unterstreicht das folgende Ergebnis einer Tumorstudie: Durch die Hemmung der PI3K-Signaltransduktion an glandulären Elementen eines Kolonkarzinoms mit small interfering RNA (si-RNA), welche zur Blockade der Expression von PI3K-Pathwaygenen führt, konnte eine Abnahme des Zellüberlebens in vitro und eine Unterdrückung des Metastasenwachstums in vivo erreicht werden (*Rychahou et al.*).

Eine weitere Assoziationsstudie postuliert eine Beteiligung der p110 δ Untereinheit der PI3K in der Pathophysiologie von allergischen Reaktionen: Bei Mäusen wurde mittels Ovalbumin (OVA) eine Atemwegseosinophilie, eine Schleimhauthypersekretion, ein Anstieg der Zytokinspiegel und eine Hochregulation der Expression des intrazellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und des vaskulären Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) als Zeichen einer Atemwegshyperreagibilität erzeugt. Anschließend wurde den Tieren intratracheal IC87114, ein selektiver p110 δ -Inhibitor, verabreicht. Es kam zu einer signifikanten Abnahme der OVA-induzierten Einwanderung von Eosinophilen, Neutrophilen und Lymphozyten bzw. zu einer Abnahme der IL-4, -5, -13 sowie der IgE Spiegel im Blut (*Lee et al.*). Dieses Ergebnis lässt sich gut nachvollziehen, wenn man sich die Effekte der o.g. Isoform auf die Rekrutierung und Aktivierung von bestimmten inflammatorischen Zellen ansieht: es kann gezeigt werden, dass die Aktivität dieser Isoform zu einer allergen-IgE-induzierten Mastzellaktivierung und zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität beiträgt (*Lee et al.*). Dabei handelt es sich um eine anaphylaktische allergische Reaktion vom Typ I und äußert sich z. B. in einer Entzündung der Atemwege, wie dies beim allergischen Asthma der Fall ist. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse über den obigen Pathomechanismus, der zur Entstehung einer Typ-I-Reaktion beiträgt, lassen sich bestimmte Therapieoptionen ableiten. Eine Möglichkeit stellt, wie auch schon im Experiment angewendet, die Inaktivierung der p110 δ Isoform dar (www.licr.org/D_programs/d2a2a_PI3K.php).

Wenn man die Rolle der PIK3CA bei der Entstehung der Insulinresistenz und bestimmten Tumorerkrankungen betrachtet, lässt sich auch hier auf verschiedene Therapiemöglichkeiten eingehen: Eine Hemmung bestimmter Phosphatasen (z. B. SHIP2) könnte die Insulinsensitivität verbessern und bei der Behandlung von Diabetes mellitus Typ II von Bedeutung sein. Die Tumorthherapie könnte von bestimmten Kinaseinhibitoren, welche die

wachstumsfaktorinduzierte PI3K-Signaltransduktion hemmen, profitieren. Es sind hier bereits Agentien wie z. B. si-RNA bekannt, die adjuvante oder neoadjuvante Effekte aufweisen (*Rychahou et al.*).

1.5. Kandidatengenuntersuchungen und SNP-Assoziationen

Im Abschnitt „Definiton und Epidemiologie des MetS - Genetische Grundlagen“ wurde ein Beispiel für ein Gen genannt, dessen Variante das Risiko, eine bestimmte Krankheit zu entwickeln, erhöht und zusammen mit anderen krankheitsfördernden Allelen zur Manifestation dieser Erkrankung führen kann. Gene, die im Verdacht stehen, solche Suszeptibilitätsgene zu sein und somit Anteil an einer Erkrankungsdisposition haben, werden als Kandidatengene bezeichnet. Es handelt sich dabei um Gene, die aufgrund ihrer biologischen Funktion oder ihrer chromosomalen Lokalisation möglicherweise zur Ätiologie einer bestimmten Erkrankung beitragen können (*Boddeker and Ziegler*). Analysen, die die Pathophysiologie der jeweiligen Erkrankung zur Identifizierung eines Suszeptibilitätsgens als Grundlage heranziehen, werden als Kandidatengenuntersuchungen bezeichnet. Häufig untersuchte, spezielle Genvarianten, die für ein bestimmtes Erkrankungsrisiko mitverantwortlich sein können und somit im Rahmen von Assoziationsuntersuchungen in Beziehung zu bestimmten Phänotypen gesetzt werden, sind die sogenannten Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNPs). Bis Ende des Jahres 2000 wurden über 1,5 Millionen solcher SNPs im menschlichen Genom entdeckt (*Kwok*), bis zum Jahre 2005 wuchs die Zahl der detektierten SNPs auf über 10 Millionen an (*Crawford, Akey, and Nickerson*). Sie stellen den Großteil der DNA-Sequenzvarianten dar und bieten somit eine Möglichkeit, die genetische Basis von komplexen genetischen Erkrankungen besser verstehen zu lernen (*Kwok*). Spezielle SNP-Kombinationen werden auch als Haplotypen bezeichnet. Dabei handelt es sich um abgegrenzte Gruppen von miteinander gekoppelten bzw. assoziierten SNPs. Damit die verschiedenen Haplotypen ermittelt werden können, bedarf es einer speziellen Analyse (Linkage-Disequilibrium-Analyse). In dieser Untersuchung kann gezeigt werden, ob die ausgewählten SNPs in den verschiedenen Versuchspopulationen einen oder mehrere abgegrenzte LD-Blöcke bilden. SNPs, die zu demselben LD-Block gehören, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit miteinander assoziiert. Auf die Linkage-Disequilibrium-Analyse soll im Kapitel 2.5.2. noch näher eingegangen werden.

1.6. Fragestellung und Zielsetzung der durchgeführten Experimente

Im Bezug auf die Erkrankung „MetS“ sind Kandidatengene in Gengruppen zu suchen, die für die Insulinwirkung und Insulinresistenz sowie für den Lipoproteinmetabolismus und die Blutdruckregulation verantwortlich sind. Da diese Voraussetzungen bezüglich des MetS und CVD bei PBEF1 und PIK3CA erfüllt sind und beide Gene in Bezug auf mögliche krankheitsmitverursachende Allele noch unzureichend erforscht sind, wurden beide Gene für die vorliegende Arbeit als Analyseobjekte herangezogen.

Dabei wurden die folgenden Fragestellungen und Untersuchungsziele definiert:

1. Gibt es eine Assoziation zwischen SNPs der Gene PBEF1 und PIK3CA und der Ausprägung von bestimmten metabolischen Parametern, definierten metabolischen Erkrankungsphänotypen oder dem Auftreten von kardialen Ereignissen?
2. Ist ein signifikanter Zusammenhang zwischen häufigen Haplotypen und den oben genannten Parametern, Erkrankungsphänotypen oder kardialen Ereignissen erkennbar?
3. Gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede in den genannten SNP- oder Haplotyp-Assoziationen?

2. PROBANDEN, METHODEN UND MATERIAL

2.1. Populationen

2.1.1. Allgemeinbevölkerung: MONICA-LVH-Substudie

Kontrollpopulationsdaten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammen aus der MONICA-LVH (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease, Augsburg; left ventricular hypertrophy)-Substudie. Diese ist Teil der dritten MONICA-Studie, die heute im Rahmen der KORA-Studie (Cooperative Health Research in the Augsburg Area) fortgeführt wird.

Studiendesign:

Die drei MONICA-Studien, die von der WHO ins Leben gerufen wurden, sind bevölkerungsrepräsentative Querschnittsstudien und wurden weltweit, u. a. in der Region Augsburg, durchgeführt. Für diese drei Studien rekrutierte man drei voneinander unabhängige Zufallsstichproben (S1: 1984/85; S2: 1989/90; S3: 1994/95). Ziel der MONICA-Studien war es, die zeitlichen Trends und Determinanten der Morbidität und Mortalität von kardiovaskulären Erkrankungen in der Gesamtpopulation zu erörtern.

Die Population der dritten MONICA-Studie und somit auch die Population der LVH-Substudie wurde in den Jahren 1994/1995 zufällig per 2-stufiger Clusterstichprobe aus der Gesamtpopulation der Stadt Augsburg und der Bevölkerung von 16 Kommunen in den beiden angrenzenden Landkreisen ausgewählt.

Die von dieser Substudie selektierte Bevölkerung bildet eine alters- und geschlechtsstratifizierte Population, wobei Individuen vom 25. bis zum 74. Lebensjahr repräsentiert sind. Pro Lebensdekade innerhalb dieser Altersspanne sind ca. 300 Individuen nach randomisierter Auswahl vertreten. Insgesamt gaben 1.678 von 2.376 Personen ihr Einverständnis zur Teilnahme an dieser Substudie. An der gesamten dritten MONICA-Studie beteiligten sich 4.856 von 6.640 möglichen Teilnehmern.

Um die einzelnen Probanden detailliert phänotypisieren zu können, wurden Fettleibigkeitsparameter (Körpergewicht, BMI, % Übergewicht, Waist-to-hip-Ratio, Fett-Masse, Fettmasse-Körpergewicht-Ratio, FFM, FFM-Körpergewicht-Ratio) und LVH-Parameter (LV-Masse, LV-Masse/BSA, Septumdicke, Vorderwanddicke, LVESD, LVEDD) bestimmt. Für die apparative Untersuchung wurden die Verfahren der bioelektrischen Impedanzanalyse (BIA) und der Echokardiographie angewendet. Die Messungen im Rahmen dieser Verfahren verliefen nach standardisierten Kriterien (Echokardiographie: Kriterien der

American Society of Echokardiography; BIA: Validierung gegen eine Vielzahl von anderen Techniken).

Die Bioproben (DNAs) der rekrutierten Patienten sowie phänotypische Information und Daten zu Umwelteinflüssen stammen von KORA-Gen, einer Ressource für genetisch-epidemiologische Forschung, die sich auf die KORA-Plattform stützt. Das Alter der Teilnehmer, welches zum Zeitpunkt der Rekrutierung zwischen 25 und 74 Jahre lag, betrug im Jahr 2005 30 bis 90 Jahre (*The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators*); „Das Gesundheitswesen“, Thieme Verlag).

2.1.2. Herzinfarktfamilien: Regensburger Herzinfarktfamilienstudie (HIFAM)

Damit eine Assoziation zwischen dem Auftreten bestimmter Genotypen im Visfatin-Gen von kardiovaskulären, evtl. an einem MetS leidenden Patienten und deren Phänotypen möglich ist, wurden Patienten der HIFAM-Studie bezüglich unten genannter SNPs genotypisiert.

Studiendesign:

Im Rahmen der HIFAM wurde eine DNA-Bank mit Patienten aus Herzinfarktfamilien angelegt. Die Patienten, die in diese Studie aufgenommen wurden, stammen aus unterschiedlichen Regionen: So wurden in den Jahren 1997 und 1998 z. B. 93.500 Patientenkarteen auf sog. Indexpatienten (Patienten, die vor dem 60. Lebensjahr einen Myokardinfarkt erlitten) durchsucht. Diese Karteien stammen aus sieben über ganz Deutschland verteilten kardiologischen Reha-Kliniken und wurden im Zeitraum 1994 bis 1998 erstellt. Falls ein Geschwister dieses Indexpatienten an einem Myokardinfarkt oder an einer schweren koronaren Herzerkrankung (frühere PTCA oder Bypass) litt, wurde die gesamte Familie (wenn verfügbar die Eltern, der Indexpatient und die Geschwister) kontaktiert und bei Teilnahme an der Studie phänotypisiert. Dazu gehörte eine standardisierte Untersuchung einschließlich Befragung, Anthropometrie, EKG, Echokardiographie und eine umfassende Laboranalytik. Insgesamt konnten bei dieser Rekrutierungsaktion 609 Familien zur Teilnahme gewonnen werden.

Weitere Patienten stammen aus dem Kollektiv des KORA-Herzinfarktregisters (siehe unten). Hierzu wurden 1.120 Probanden ebenfalls nach oben genannten Methoden (EKG, Echo, usw.) phänotypisiert, wobei 507 Geschwister darunter waren. Diese wurden dann ebenfalls in die Studie aufgenommen.

Die Anzahl der an der HIFAM-Studie teilnehmenden Familien betrug zum April 2006 1.486. Dies entsprach 7.577 Individuen, von denen 1.458 Indexpatienten waren (folglich befindet

sich nicht in jeder Familie ein Indexpatient). Von den 7.577 Patienten waren 4.215 männlich und 3.362 weiblich, die Altersspanne ging von 3 bis 97 Jahren. Das durchschnittliche Alter der Teilnehmer betrug 56,7 Jahre.

2.1.3 Herzinfarktpopulation: KORA

Eine weitere Population mit Herzinfarktanamnese stammt von der KORA-Plattform. Diese Studie wurde 1996 eingerichtet, um das MONICA-Projekt in Augsburg fortzusetzen und zu erweitern, einschließlich des Herzinfarktregisters, welches für die vorliegende Arbeit von Bedeutung ist. Ein wichtiger Aspekt der Erweiterung stellt die genetische Epidemiologie dar, da in den letzten zehn Jahren enorme technische Fortschritte in den Bereichen Genetik und molekularer Medizin erzielt werden konnten. KORA stellt eine „Forschungsplattform für bevölkerungsbasierte Gesundheitssurveys und darauf aufbauende Follow-up-Studien zu Themen der Epidemiologie, Gesundheitsökonomie und Versorgungsforschung“ („*Das Gesundheitswesen*“, Thieme Verlag) dar.

Studiendesign:

Die Studienpopulation beschränkt sich, wie schon bei den MONICA-Studien, auf die Stadt Augsburg und die beiden angrenzenden Landkreise. Die Gesamtpopulation in der Studienregion zählt rund 200.000 männliche und 200.000 weibliche Einwohner im Alter zwischen 25 und 74 Jahre. Alle Patienten in dieser Altersgruppe mit einem im Krankenhaus bestätigten Herzinfarkt (von 1985 bis 1998 Q-Zacken und Nicht-Q-Zacken Infarkt, ab 1999 zusätzlich ST-Hebungs- und Nicht-ST-Hebungsinfarkt, seit 2000 neue Definition als akutes Koronarsyndrom: zusätzlich Patienten mit symptomatischer Angina Pectoris und Laborwerten der Ischämie, auch ohne persistierende ST-Segmenterhöhungen) wurden um Einwilligung zur Eintragung in ein Herzinfarktregister gebeten. Von 1985 bis 2002 wurden insgesamt 17.884 Personen (12.798 Männer und 5.086 Frauen) mit Herzinfarktanamnese inkl. Patienten mit plötzlichem Herztod in das Register aufgenommen. Die Patienten wurden nach den Umständen des Herzinfarktes, der familiären Belastung und ihrer Medikation befragt. Außerdem wurden medizinische Daten, die während ihres Krankenhausaufenthaltes entstanden, gesammelt.

Die Bioproben (DNAs) der rekrutierten Patienten sowie phänotypische Information und Daten zu Umwelteinflüssen stammen von KORA-Gen.

2.2. Single-Nucleotid-Polymorphisms (SNPs)

2.2.1. SNP-Auswahl des PBEF1-Gens

Um das Visfatingen (PBEF1) so weit wie möglich abzudecken, wurden durch die SNP-Datenbank dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) 12 SNPs ausgewählt (Tab. 2), die das Visfatingen und dessen angrenzende Bereiche erfassen (Abb. 3).

Eigenschaften der SNPs bzw. der erfassten Genregion:

- a) Validierung
- b) mehr als 1 Submitter und TSC submitted
- c) MAF [= (Anzahl der homozygoten Individuen mit seltenem Allel x 2 + Anzahl der Heterozygoten)/Gesamtanzahl der genotypisierten Individuen] größer 5 %
- d) durchschnittliche Auflösung: 1 SNP pro 45 kb
- e) insgesamt abgedeckte Region: 544 kb

SNP	Assay ID	Position (bp)	Inter-SNP-distanz (bp)	Allele	MAF (MONICA)	Lokalisation
rs1029980	C_2673226_10	105432256	49327	C-T	0.22	intergenic
rs10953501	C_2673281_10	105481583	4799	A-G	0.22	intergenic
rs10953502	C_31761492_10	105486382	4096	C-T	0.426	Intron 1
rs3801272	C_2673282_10	105490478	286	C-T	0.387	Intron 3
rs10953503	C_2673284_10	105490764	7121	A-G	0.378	Intron 3
rs2302559	RFLP-Methode	105497885	216	C-T	0.768	Exon 7
rs4730153	C_2673294_10	105498101	6516	A-G	0.436	Intron 5
rs6947766	C_337019_10	105504617	5971	C-T	0.242	Intron 7
rs2058539	C_11613113_10	105510588	5886	A-C	0.413	Intron 9
rs1319313	C_11613106_10	105516474	7496	A-G	0.28	Intron 10
rs2110385	C_16125685_10	105523970	367812	G-T	0.438	intergenic
rs7808289	C_2623545_10	105891782		A-G	0.392	FLJ36031

Tab. 2: Bezeichnung, Lokalisation und Allelbeschreibung der 12 ausgewählten PBEF1-SNPs

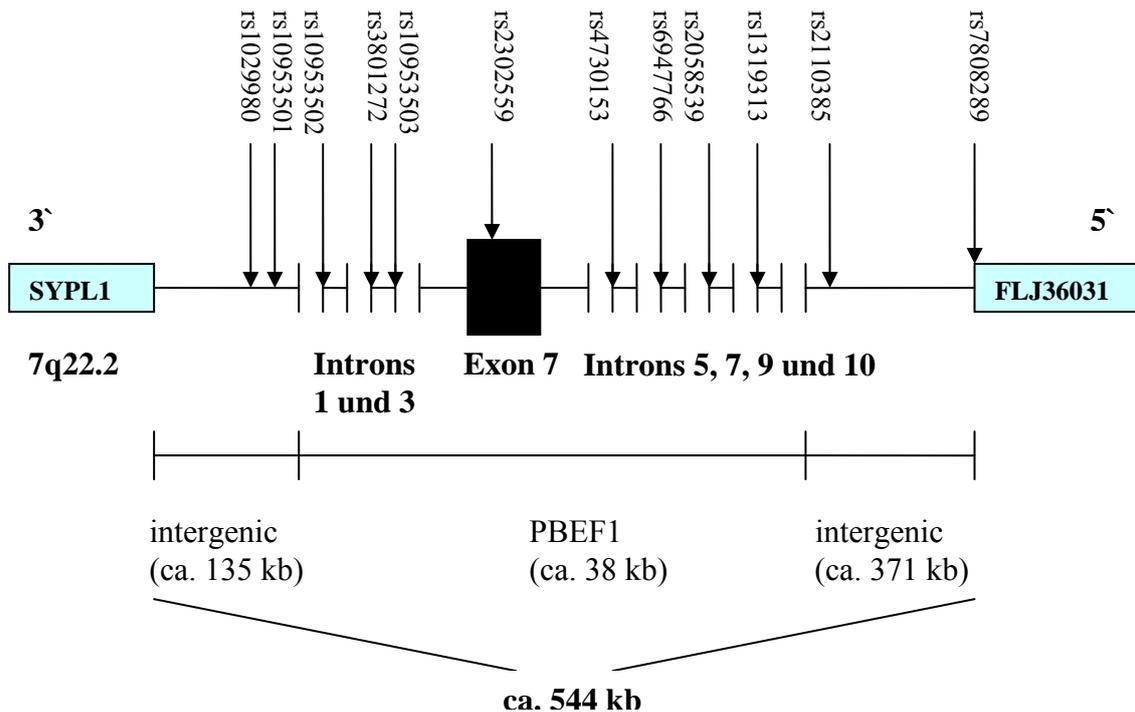


Abb. 3: Struktur der menschlichen PBEF1-Genregion und Lage der 12 SNPs

2.2.2. SNP-Auswahl des PIK3CA-Gens

Da der PI3K-Pathway bei der Signaltransduktion des Insulin- und Visfatinsignals eine wichtige Rolle spielt, wurde das Gen der katalytischen Untereinheit der PI3K auf das Vorkommen geeigneter SNPs untersucht. Hierbei wurden mit Hilfe der SNP-Datenbank dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) 12 SNPs ausgewählt (Tab. 3), die sich sowohl über das PIK3CA-Gen und dessen angrenzenden Bereiche erstrecken (Abb. 4), als auch zwei kleine benachbarte Gene (KCNMB3 und WIG1) und dessen angrenzende Gebiete abdecken.

Eigenschaften der SNPs bzw. der erfassten Genregion:

- Validierung
- mindestens 1 Submitter, vier SNPs sind TSC submitted
- MAF größer 5 %
- durchschnittliche Auflösung: 1 SNP pro 24 kb
- insgesamt abgedeckte Region: 297 kb

SNP	Assay ID	Position (bp)	Inter-SNP-distanz (bp)	Allele	MAF (MONICA)	Lokalisation
rs6794956	2714	180225914	49384	C-T	0.477	WIG1/Intron 1
rs6784495	4495	180275298	71084	G-T	0.488	intergenic
rs7615076	5076	180346382	36179	C-T	0.378	intergenic
rs9878005	8005	180382561	17138	C-T	0.127	PIK3CA/Intron 1

rs3729674	0104	180399699	4634	A-G	0.402	PIK3CA/Intron 2
rs2699895	4118	180404333	14160	A-C	0.932	PIK3CA/Intron 5
rs1568205	8205	180418493	14498	C-T	0.396	PIK3CA/Intron 9
rs1607237	5212	180432991	9963	C-T	0.769	PIK3CA/Intron20
rs6443628	3628	180442954	22709	C-T	0.399	intergenic
rs1468924	7469	180465663	35310	G-T	0.769	KCNMB3/Intron8
rs9290679	1659	180500973	21898	A-C	0.611	intergenic
rs2032700	1083	180522871		A-G	0.343	intergenic

Tab. 3: Bezeichnung, Lokalisation und Allelbeschreibung der 12 ausgewählten PIK3CA-SNPs

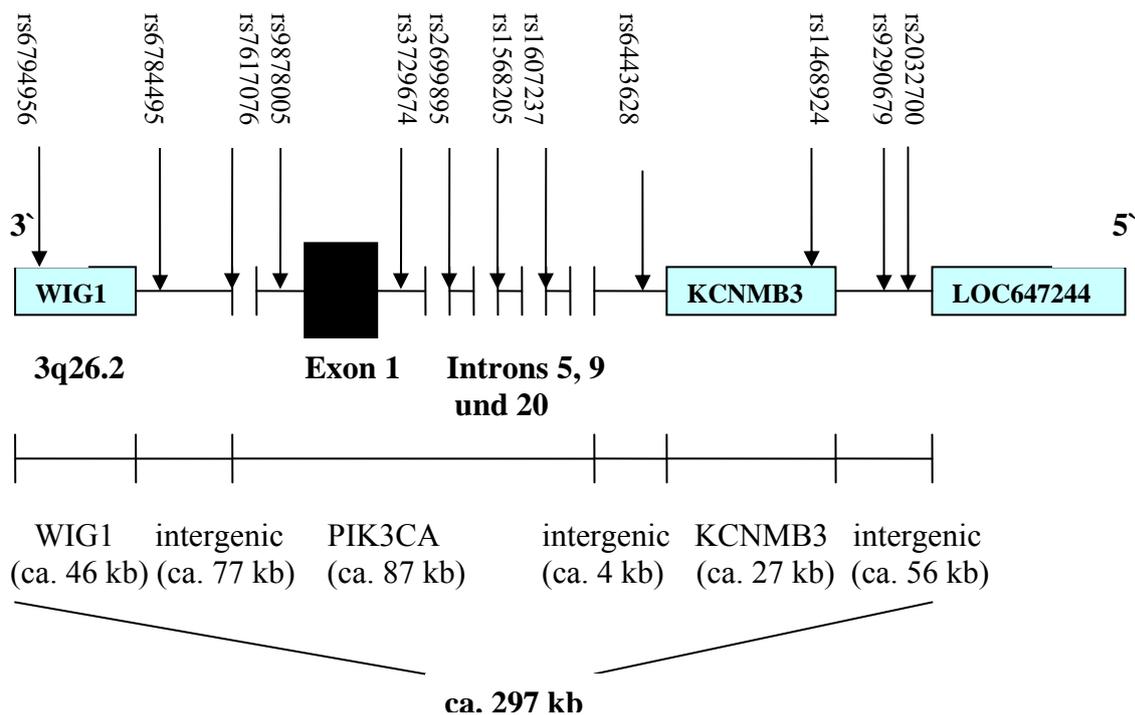


Abb. 4: Struktur der menschlichen PIK3CA-Genregion und Lage der 12 SNPs

2.3. Genotypisierungsmethoden, Materialien und Versuchsdurchführung

2.3.1. Taqman 5'Exonuklease Assay

Dieser Assay wurde zur Genotypisierung aller SNPs außer des PBEF-Exon-SNPs (rs2302559) verwendet. Es handelt sich hierbei um eine homogene fluoreszenzfarbstoffbasierte Methode. Es werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die unterschiedliche Spektralbereiche zwischen 500 und 650 nm aufweisen und durch einen Sensor lokalisiert werden können.

Funktionsprinzip (Abb. 5):

Der Taqman-Assay enthält zwei verschiedene Oligonukleotidsonden, welche mit je einem Reporterfluoreszenzfarbstoff und einem Quencherkomplex (quenchen: Löschen der

Fluoreszenz) gekoppelt sind. Während den PCR-Zyklen binden die Sonden nur an perfekt komplementäre DNA (die eine Sonde ist perfekt komplementär zur Wildtyp-Sequenz, während das andere Oligonukleotid perfekt komplementär zur SNP-tragenden Sequenz ist) und nicht an Regionen mit einem Ein-Basen-Austausch. Die Ablösung der hybridisierten Sonde erfolgt durch die Nukleaseaktivität der Taq DNA Polymerase während der Replikation und trennt den Sender vom Empfänger, wobei abhängig von der abgelösten Sonde (entweder Wildtyp- oder SNP-Sonde) ein bestimmter Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird. Nicht gebundene Sonden werden nicht von der Polymerase erfasst und erzeugen auch keine Fluoreszenz, da Reporter und Quencher nicht getrennt werden und somit der Quencher die Fluoreszenz des Reporters weiter unterdrücken kann. Man kann somit den Genotyp eines Probanden bezüglich eines bestimmten SNPs durch die Fluoreszenzbeobachtung bestimmen (KWOK et al. 2001). Die Farbstoffdetektion erfolgt nach der PCR im Schritt der allelischen Diskriminierung. Dabei wird für jede Probe der fluoreszierende Anteil der beiden Reporterfarbstoffe bestimmt und zweidimensional dargestellt (Abb. 5B). Wenn nur Wildtyp-DNA vorliegt, entsteht lediglich Fluoreszenz entlang der x-Achse, wenn es sich um mutierte DNA handelt, ist ausschließlich Fluoreszenz entlang der y-Achse nachzuweisen. Bei heterozygoter DNA entsteht Fluoreszenz von beiden Typen und die entsprechenden Datenpunkte liegen in der Mitte (*Pfeifer und Pahl*).

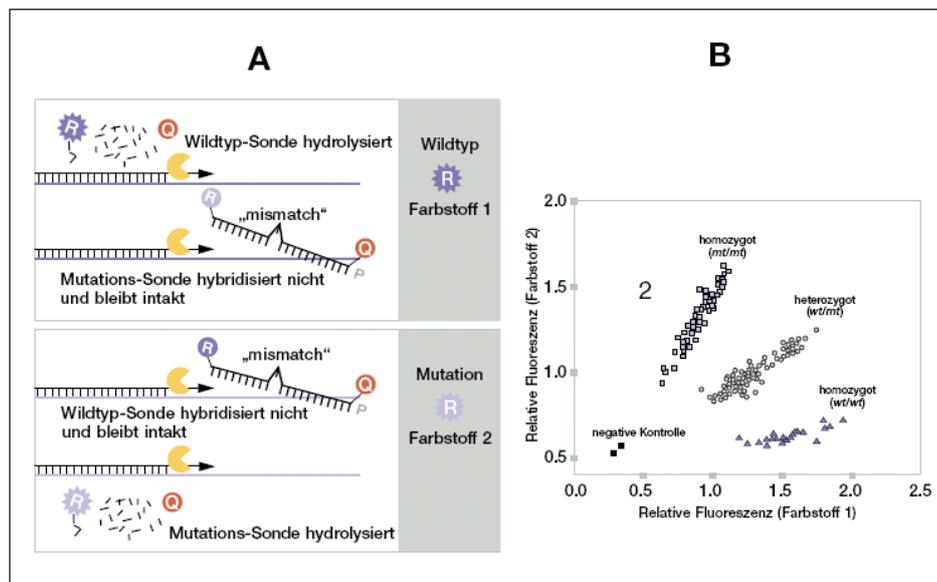


Abb. 5: TaqMan™-Assay (www.dzkgf.de)

A: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips; B: Ergebnis einer SNP-Analyse

Materialien:

Pro Ansatz: TaqMan® Universal PCR MasterMix 2,5 µl; Assay-on Demand™ SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems) 0,25 µl; destilliertes Wasser 2,25 µl bei 20fachem Assay

DNA: 10 ng bei HIFAM und KORA-Population

16 ng bei Kontrollpopulation

PCR-Einstellungen: 40 Zyklen, Initialisierung bei 95°C für 10 min, Denaturierung bei 92°C für 15 sec., Annealing und Extension bei 60°C für 1 min

PCR-Gerät: HT 7900 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany)

Software: zur Dokumentation Microsoft Excel, zur Auswertung SDS 2.2 von Applied Biosystems

2.3.2. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Methode (RFLP)

Mittels dieser Methode wurde der Exon-SNP rs2302559 genotypisiert, da der Taqman-5'Exonuklease Assay zu diesem SNP nicht von Applied Biosystems angeboten wird und schwierig zu designen ist.

Mechanismus:

Bei der RFLP-Analyse handelt es sich um eine der ältesten und gebräuchlichsten Methoden zur Bestimmung von SNPs. Spezifische Regionen der DNA werden zunächst mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte werden dann mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten und die Schnittprodukte mittels Gelelektrophorese als Bandenmuster sichtbar gemacht. Dabei wird die Restriktionsendonuklease so gewählt, dass durch den SNP eine Schnittstelle für dieses Enzym entweder neu entsteht oder verloren geht. Dadurch ergeben sich bei der Gelelektrophorese unterschiedliche Bandenmuster, je nachdem, ob der SNP vorliegt oder nicht.

Beim Exon-SNP rs2302559 heißt das konkret: Es wird mittels PCR ein DNA-Abschnitt mit einer Länge von 547 bp amplifiziert, in dessen Mitte auch der Exon-SNP liegt. Die Restriktionsendonuklease Taq I spaltet diesen DNA-Abschnitt an der Exon-SNP-Stelle in zwei Fragmente mit der Länge 334 und 213 bp, wenn an dieser Stelle ein „C“-Allel vorliegt. Ist ein „T“-Allel vorhanden, kann das Enzym den Abschnitt nicht in seine zwei Fragmente spalten und der 547 bp-Abschnitt bleibt erhalten. Durch die im Agarosegel sichtbare Anzahl und Lage der Banden kann dann eindeutig der entsprechende Genotyp zugeordnet werden.

Materialien:

Primersequenzen:

Left primer (Oligoname: ON-PBEF1_Exon7_a, Oligo ID 60310B3-0944G09 34/35):

5`-TAT GGT TGA CCC AGC TAC TTC AT-3`

Right primer (Oligoname: ON-PBEF1_Exon7_b, Oligo ID 60310B3-0944H09 35/35):

5`-CTA TTA CTC TCT CTG GGC TGC AA-3`

Die Primer wurden von der Firma Metabion International AG synthetisiert.

Pro Ansatz (50 µl): 31,75 µl RNase-freies Wasser

5 µl 10fach PCR-Puffer Gold

4 µl MgCl₂ 25 mM -> Endkonzentration: 2 mM

4 µl dNTPs 2,5 mM each -> Endkonz.: 200 µM

2 µl Primer 10 µM each -> Endkonz.: 0,4 µM

0,25 µl AmpliTaq Gold 5 U/µl -> Endaktivität: 1,25 U

Die Materialien für den Ansatz stammen von der Firma Applied Biosystems.

DNA: 20-50 ng template DNA (entspricht 3 µl)

PCR-Einstellungen: 35 Zyklen, Initialisierung für 7,5 min bei 95°C, Denaturierung für

1 min bei 95°C, Annealing für 45 Sek. bei 61,8°C, Elongation für

1 min bei 72°C, finale Elongation für 7 min bei 72°C

PCR-Gerät: GeneAmp® PCR-System 9700 von Applied Biosystems

Agarosegel zur PCR-Kontrolle (200 ml):

1,2 % (400-700 bp) Agarose (Biozym®)

3,75 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 100 ml (Carl Roth GmbH)

pro Tasche 1 µl 10fach Loading Dye

pro Tasche 10 µl PCR-Produkt

10 µl Standard (0,1 µg/µl Cat.-No. mi-E8200 Metabion International AG)

Enzymverdau: Mastermix:

0,5 µl Enzym (Taq I 10 U/µl Metabion International AG) -> Aktivität: 5 U

3,5 µl RNase-freies Wasser

3 µl 10fach Taq I Puffer (Metabion International AG)

3 µl 10fach BSA (1 mg/ml) von Metabion International AG

Pro Ansatz (30 µl): 10 µl Mastermix + 20 µl PCR-Produkt

Inkubation für 1 Stunde bei 65°C im Brutschrank

Agarosegel zur Genotypisierung (350 ml): 1,5 % (200-300 bp) Agarose (Biozym®)

3,75 µl Ethidiumbromid (siehe oben)

pro Tasche 3 µl 10fach Loading Dye
pro Tasche 30 µl Ansatz
10 µl Standard (0,1 µg/ml; siehe oben)

Software zur Dokumentation: Microsoft Excel

Vorarbeiten zur Etablierung:

Zur erfolgreichen Durchführung der PCR der o.g. Primern musste die optimale Annealingtemperatur bestimmt werden. Dazu wurden 4 Test-DNAs (20-50 ng) mit 5 verschiedenen Schmelztemperaturen (55 °C; 57 °C; 59,4 °C; 61,8 °C; 65 °C) polymerisiert und mittels Agarose-Gelelektrophorese (1,2 % Agarose) analysiert. Die optimale Bande ergab sich bei 61,8 Grad Celsius.

Bei Vorversuchen zur Überprüfung der Validität wurden 47 Genotypen der Kontrollpopulation der LVH-Substudie (S3, Platte I) sequenziert (Sequenzierungsmethode: siehe unten). Die Sequenzierungsergebnisse stimmten mit denen der RFLP-Methode überein, so dass die Validität als sehr gut bezeichnet werden kann. Der Ansatz für die Sequenzierungs-PCR entspricht dem o.g. PCR-Ansatz.

Um beim Enzymverdau die benötigte Enzymaktivität zu ermitteln, wurden in einem Vorversuch jeweils 4 polymerisierte DNA-Proben mit 1 µl Enzym (entspricht einer Aktivität von 10 Units) und jeweils 4 Proben mit 0,5 µl Enzym (entspricht einer Aktivität von 5 Units) bei sonst unveränderten Verhältnissen versehen. Es ergab sich nach Kontrolle mittels Gelelektrophorese eine bessere Beurteilungsmöglichkeit der Genotypen bei einer Aktivität von 5 Units.

Auswertungsprinzip:

Anhand der Anzahl der auf dem Agarosegel vorhandenen Banden kann eine Aussage über den vorliegenden Genotyp getroffen werden:

- 1 Bande bei 547 bp: Genotyp „TT“ (Taq I kann nicht spalten)
- 2 Banden bei 334 und 213 bp: Genotyp „CC“ (Taq I spaltet alle Amplikons)
- 3 Banden bei 547, 334 und 213 bp: Genotyp „TC“ (Taq I kann nicht alle Amplikons spalten, da „T“-Allele vorhanden)

2.3.3. DNA-Sequenzierung

Da mit dieser Methode nur ein geringer Probendurchsatz erreicht werden kann, wurde die DNA-Sequenzierung zur Bestimmung der Validität der RFLP-Methode eingesetzt. Da sich die Validität als gut erwiesen hat, wurde die RFLP zur Genotypisierung des rs2302559-SNPs verwendet.

Mechanismus:

Bei der DNA-Sequenzierung wird die physikalische Abfolge der vier Nukleotide (A,T,G,C) in der DNA bestimmt. Durchgesetzt hat sich in den letzten Jahren das sog. Sanger-Verfahren, bei welchem ein Primer in einer Sequenzreaktion von einer DNA-Polymerase verlängert wird. Es werden aber im Gegensatz zur PCR nicht nur normale Nukleotide als Bausteine verwendet, sondern auch Didesoxynukleotide in molekularer Unterzahl. Werden diese in einen DNA-Strang eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch an dieser Stelle, da eine weitere chemische Verknüpfung mit Nukleotidbausteinen nicht möglich ist. In der „Dye-Terminator“-Sequenzierung werden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide eingesetzt, d.h. jede abgebrochene Kette enthält an ihrem Ende ein detektierbares Fluoreszenzmolekül. Für jedes der vier Nukleotide der DNA gibt es ein entsprechendes Didesoxy-Abbruchnukleotid mit einem eigenen Fluoreszenzmarker. Statistisch kann es somit an jeder Stelle zum Abbruch der Sequenzreaktion kommen und es entsteht eine Mischung aus unterschiedlich langen DNA-Fragmenten, wobei der Fluoreszenzmarker am Ende der Kette Auskunft über die entsprechende Base in der DNA gibt (*Pfeifer und Pahl*).

Dieses Fragmentgemisch wird nun nach der Größe der Fragmente in einem elektrophoretischen Verfahren getrennt und es entsteht eine Art DNA-Fragmentleiter, wobei die „Sprossen“ der Leiter jeweils ein Nukleotid voneinander entfernt sind (Abb. 6A). Die DNA-Sequenz kann durch die Abfolge der Fluoreszenzmarker in dieser Leiter im Laserstrahlengang abgelesen und in einem Chromatogramm (Abb. 6B) dargestellt werden (*Pfeifer und Pahl*).

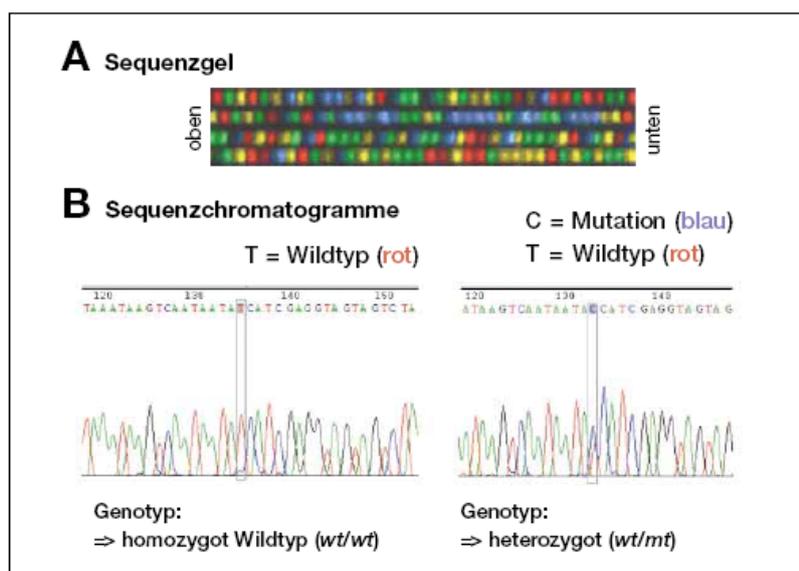


Abb. 6: DNA-Sequenzierung (www.dzmf.de)

Vor der Durchführung der Sequenzierreaktion muss die DNA mittels PCR amplifiziert werden und der dabei angefallene Überschuss an freien Nukleotiden, Salzen und Enzymen, die sich in der PCR-Lösung befinden, durch eine PCR-Aufreinigung entfernt werden. Dies geschieht durch eine Technologie, bei der magnetische Partikel zur Selektion von PCR-Amplifikons eingesetzt werden. Zwischen Sequenzierreaktion und elektrophoretischer Auftrennung des Fragmentgemisches erfolgt ebenfalls ein Aufreinigungsschritt mit Anwendung der Magnetpartikeltechnologie, bei dem neben freien Nukleotiden, Salzen und Enzymen auch freie Farbstoffpartikel entfernt werden.

Vorgehen:

Vor Durchführung der eigentlichen Sequenzierung wurden 96 DNA-Proben (S3, Platte I) nach demselben Schema wie bei der RFLP-Methode mittels PCR amplifiziert, von denen nur 48 Proben zur weiteren Sequenzierung verwendet werden konnten. Von diesen 48 DNAs wiederum konnten 47 eindeutig sequenziert werden.

Materialien:

1) Zur PCR:

Primersequenzen:

Left primer (Oligoname: ON-PBEF1_Exon7_a, Oligo ID 60310B3-0944G09 34/35):

5'-TAT GGT TGA CCC AGC TAC TTC AT-3'

Right primer (Oligoname: ON-PBEF1_Exon7_b, Oligo ID 60310B3-0944H09 35/35):

5'-CTA TTA CTC TCT CTG GGC TGC AA-3'

Die Primer wurden von der Firma Metabion International AG synthetisiert.

Pro Ansatz (50 µl):

31,75 µl RNase-freies Wasser

5 µl 10fach PCR-Puffer Gold

4 µl MgCl₂ 25 mM -> Endkonzentration: 2 mM

4 µl dNTPs 2,5 mM each -> Endkonz.: 200 µM

2 µl Primer 10 µM each -> Endkonz.: 0,4 µM

0,25 µl AmpliTaq Gold 5 U/µl -> Endaktivität: 1,25 U

Die Materialien für den Ansatz stammen von der Firma Applied Biosystems.

DNA: 20-50 ng template DNA (entspricht 3 µl)

PCR-Einstellungen: 35 Zyklen, Initialisierung für 7,5 min bei 95°C, Denaturierung für

1 min bei 95°C, Annealing für 45 Sek. bei 61,8°C, Elongation für

1 min bei 72°C, finale Elongation für 7 min bei 72°C

PCR-Gerät: GeneAmp® PCR-System 9700 von Applied Biosystems

Agarosegel zur PCR-Kontrolle (200 ml):

1,2 % (400-700 bp) Agarose (Biozym®)

3,75 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 100 ml (Carl Roth GmbH)

pro Tasche 1 µl 10fach Loading Dye

pro Tasche 10 µl PCR-Produkt

10 µl Standard (0,1 µg/µl Cat.-No. mi-E8200 Metabion International AG)

2) zur PCR-Aufreinigung:

Agencourt®AMPure-Kit von BC-Biotech: in 384-well-Platten

Pro Ansatz (28 µl): 10 µl PCR-Produkt

18 µl Agencourt®AMPure®-Lösung (mit Magnetpartikel)

-> Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur

-> Platzierung der 384er Reaktionsplatte auf eine Agencourt SPRI-Platte384 (Magnetplatte)
für 5 min

-> Abpipettieren und Verwerfen des Überstandes

-> 2-maliges Waschen mit 30 µl Ethanol (70 %) und Verwerfen des Überstandes,
anschließend 7 min Trocknen der Platte

-> Zugabe von 30 µl Elutionspuffer (LCTS) und Inkubation von 3 min bei Raumtemperatur

-> Transfer von 15 µl aufgereinigter PCR-Lösung pro Ansatz

Nach Kontrolle durch Agarosegelelektrophorese (2 % Agarose) werden 2 µl pro Ansatz für
die Sequenzierreaktion verwendet.

3) Sequenzierreaktion:

Big Dye Mix pro Ansatz (2,19 µl): 0,19 µl Big Dye (V. 3.1. von BC-Biotech)

2 µl 5-fach Puffer

Reaktion pro Ansatz (10 µl): 2 µl Big Dye Mix

5,68 µl LCTS-Wasser

0,32 µl Primer 10 µM each (Primer: siehe PCR!)

2 µl aufgereinigtes PCR-Amplifikat

Cycler-Einstellungen: 25 Zyklen, Initialisierung für 1 min bei 96°C, Denaturierung für
10 Sek. bei 96°C, Annealing für 5 Sek. bei 50°C, Elongation für
1 min bei 60°C

Cycler-Gerät: GeneAmp® PCR-System 9700 von Applied Biosystems

4) Aufreinigung der Sequenzierreaktion:

Agencourt®CleanSeq®-Kit von BC-Biotech: in 384-well-Platten

Pro Ansatz (36,43 µl): 10 µl Sequenzierreaktionsprodukt
 5 µl Agencourt®CleanSeq®-Lösung (mit Magnetpartikel)
 21,43 µl Ethanol (85 %)
-> Platzierung der 384er Reaktionsplatte auf eine SPRI-
 Platte384 (Magnetplatte) für 2 min
-> Abpipettieren und Verwerfen des Überstandes
-> 2-maliges Waschen mit 30 µl Ethanol (85 %) und Verwerfen
 des Überstandes, anschließend 5 min Trocknen der Platte
-> Zugabe von 30 µl Elutionspuffer (75 % HID: Formamid)
 und Inkubation von 6 min bei Raumtemperatur

Für die anschließende Auftrennung im Kapillarsequenzierer werden 20 µl der aufgereinigten Sequenzierreaktion verwendet.

5) Elektrophoretische Auftrennung und automatische Basenbestimmung:

Sequenzierer: 48-Kapillarsequenzierer AB3730 (Applied Biosystems, Darmstadt)

36 cm Kapillare

POP7 Polymer

Software zur automatischen Basenbestimmung und zum Vergleich der Sequenziererergebnisse:
SeqScape 2.5 (Applied Biosystems, Darmstadt)

2.4. Definitionen der Phänotypen

Zur Phänotypisierung der Populationen wurden neben o.g. Fettleibigkeits- und LVH-Parameter noch weitere Parameter (Normbereiche nach *Dörner, Thieme Verlag*) bestimmt.

Dazu gehören:

- Systolischer Blutdruck nach RR: Normbereich < 140 mmHg
- Diastolischer Blutdruck nach RR: Normbereich < 90 mmHg
- HbA_{1c} als Langzeitparameter für die Güte der Diabeteseinstellung:
Optimale Einstellung: Anteil des HbA_{1c} am Gesamt-Hb < 6 %
- Bodymass Index (BMI): Adipositasparameter
Definition: Körpermasse in kg/Körperlänge² in m²
Normbereich: 20 bis 24,9 kg/m²
- Taillenumfang: Fettleibigkeitsparameter
Definition: Umfang des Bauches in cm zwischen Rippenbogen und Spinae illiaca
Normbereich: Männer unter 94 cm, Frauen unter 80 cm Taillenumfang

Kritischer Bereich: Männer über 102 cm, Frauen über 88 cm Taillenumfang

- Gesamtcholesterin: Suchparameter für Hypercholesterinämie
Referenzbereich: alters- und geschlechtsabhängig:
Frauen (30 Jahre): 150 bis 240 mg/dl
Frauen (60 Jahre): 195 bis 275 mg/dl
Männer (30 Jahre): 150 bis 220 mg/dl
Männer (60 Jahre): 175 bis 240 mg/dl
- LDL-Cholesterin: Risikoparameter für Atherosklerose
Referenzbereich: alters- und geschlechtsabhängig:
Frauen (30 Jahre): 60 bis 160 mg/dl
Frauen (60 Jahre): 100 bis 235 mg/dl
Männer (30 Jahre): 60 bis 175 mg/dl
Männer (60 Jahre): 90 bis 215 mg/dl
- HDL-Cholesterin: Parameter zur Bestimmung des Atheroskleroserisiko
Referenzbereich:
33 bis 77 mg/dl (Frauen)
27 bis 65 mg/dl (Männer)
- Triglyzeride: Suchparameter für Hypertriglyzeridämie
Referenzbereich: alters- und geschlechtsabhängig:
Frauen (30 Jahre): 40 bis 128 mg/dl
Frauen (60 Jahre): 55 bis 247 mg/dl
Männer (30 Jahre): 44 bis 185 mg/dl
Männer (60 Jahre): 62 bis 288 mg/dl

Mit Hilfe dieser Parameter kann die Definition der Einzelparameter des MetS erfolgen. Hier wurden die folgenden Definitionen angewandt:

- Hypertonie:
Mindestens eines der folgenden Kriterien muss erfüllt sein:
 - Systolischer Blutdruck ≥ 140 mmHg
 - Diastolischer Blutdruck ≥ 90 mmHg
 - Blutdrucksenkende Medikamente
- Diabetische Stoffwechsellage:
Mindestens eines der folgenden Kriterien muss erfüllt sein (*Greici et al.*):
 - Vorhandener Diabetes mellitus
 - HbA_{1c}-Anteil am Gesamt-Hb $> 6\%$

- Fettleibigkeit : BMI $> 30 \text{ kg/m}^2$ und
Taillenumfang $> 102 \text{ cm}$ bei Männern
 $> 88 \text{ cm}$ bei Frauen
- Dyslipidämie: HDL $\leq 40 \text{ mg/dl}$ bei Männern
 $< 50 \text{ mg/dl}$ bei Frauen
- MetS: Hierzu müssen mindestens drei der vorherigen vier
Phänotypen (Hypertonie, diabetische Stoffwechsellage,
Adipositas und Dyslipidämie) vorhanden sein.

2.5. Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung des gewonnenen Datenmaterials erfolgte mit dem Softwarepaket JMP (SAS Institute, NC, USA). Im Rahmen dieser statistischen Auswertung wurden folgende Tests verwendet:

2.5.1. Hardy-Weinberg-Äquilibrium

Dieses Äquilibrium beschreibt eine konstante Allelhäufigkeit in einer Population. Ausscheidende Allele, z. B. durch den Verlust von homozygoten Individuen, die aufgrund dieses Genotyps an einer schweren Krankheit leiden, werden in dieser Population durch neu mutierte Allele ersetzt. Es besteht daher ein Gleichgewicht zwischen dem Ausscheiden von bestimmten Allelen und der Mutationshäufigkeit.

Den mathematischen Zusammenhang zwischen den Allelhäufigkeiten und dem Vorkommen der Genotypen in einer Population beschreibt folgende Formel:

$$\text{Formel nach Hardy-Weinberg: } 1 = p^2 + 2pq + q^2$$

p: Allelhäufigkeit des Allels a_1 q: Allelhäufigkeit des Allels a_2

Mit dieser Formel lassen sich die Häufigkeiten der drei möglichen Genotypen, nämlich den beiden homozygoten und dem heterozygoten Genotyp, aus den bekannten Allelfrequenzen berechnen. Diese Formel dient somit der Überprüfung der experimentell ermittelten Genotypen in einer Population. Eine fehlende Übereinstimmung zwischen experimentell ermittelter und berechneter Genotyp-Frequenz kann einen Hinweis auf grobe systematische Fehler in der experimentellen Durchführung geben. Voraussetzung für die Gültigkeit dieser Formel ist eine ausreichende Größe der genotypisierten Population. Da dies bei den Populationen der Fall war, wurden alle untersuchten SNPs mit ihren Genotypen auf eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium getestet.

2.5.2. Linkage Disequilibrium

Der Begriff Linkage Disequilibrium (LD) heisst übersetzt „Kopplungsungleichgewicht“ und beschreibt die statistische, nicht dem Zufallsprinzip unterliegende Assoziation von Sequenzvarianten (in der vorliegenden Arbeit die sogenannten SNPs), wie sie in den Gameten vorkommen, an verschiedenen Positionen entlang des Chromosoms (*Weiss and Clark*). Daraus folgt, dass bei Anwesenheit eines SNP Aussagen über das Vorhandensein anderer SNPs gemacht werden können. Abgegrenzte Gruppen von miteinander gekoppelten bzw. assoziierten SNPs werden als Haplotypen bezeichnet. Damit verschiedene Haplotypen definiert werden können, muss eine LD-Auswertung gemacht werden, d. h. die einzelnen SNPs müssen auf ihren Assoziationsgrad hin überprüft werden. Das Ausmaß der unterschiedlichen Assoziationen wird hierbei graphisch dargestellt. Die LD-Struktur in einer bestimmten Gen-Region ist nicht konstant, sondern u. a. abhängig von ethnischen Aspekten einer Population, sodass die SNP-Assoziationen nicht im Voraus bestimmt werden können. Sie muss also empirisch an den untersuchten Populationen ermittelt werden. Ursachen des inkonstanten LD-Musters bezogen auf das menschliche Genom sind beispielsweise Genkonversions- oder Rekombinationsprozesse, aber auch natürliche Selektion und demographische Aspekte (*Weiss and Clark*). Diese Vorgänge der Veränderung des LD-Musters sind auch im Hinblick auf die Rekonstruktion der Genomevolution von großem Interesse.

Es existieren verschiedene LD-Definitionen; die beiden wichtigsten sind die Standarddefinition von r^2 (*Ardlie, Kruglyak, and Seielstad*) und D' , deren Aussagekraft in Kapitel 4.1.5. diskutiert wird. In der PIK3CA-Analyse wurde die LD-Struktur paarweise zwischen allen SNPs mit r^2 bestimmt. Ein Haploblock wurde hierbei definiert als eine Genregion, in der alle paarweisen r^2 -Werte über 0,45 liegen. Bei beiden Kandidatengenen wurde eine D' -Messung durchgeführt, die zur Ermittlung der Haploblockeingrenzung herangezogen wurde. Die Frequenzen der durch diese Verfahren ermittelten Haplotypen wurden mit Hilfe des Expectation-Maximization-Algorithmus, welcher eine statistische Berechnung der nicht genotypisierbaren Individuen gewährleistet, abgeschätzt (*Slatkin and Excoffier*).

Trotz der Erkenntnis, dass das exakte LD-Muster populationsabhängig ist, werden Ergebnisse von Kopplungsuntersuchungen auch vor der Genotypisierung einer Population verwendet. Die bei anderen Populationen bereits ermittelten Haplotypen in einer speziellen Genregion dienen als Orientierung für die SNP-Auswahl und die Detektion von Haplotypen bei der zu untersuchenden Population. Mit Hilfe der LD-Analyse lässt sich also eine mehr oder weniger

genaue „Landkarte“ von Haplotypen (siehe Internationales HapMap Projekt: www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap) und somit von Genen erstellen, die in die Genese einer bestimmten Erkrankung (v.a. einer nach Mendel vererbten Erkrankung) involviert sind. Ob sich jedoch diese Idee einer „Landkarte“ für Suszeptibilitätsgene bezüglich genetisch komplexen Erkrankungen erfolgreich realisieren lässt, bleibt abzuwarten (Jorde).

2.5.3. Chi-Quadrat-Test

Der Chi-Quadrat-Test ist eine mögliche statistische Methode zur Auswertung von Kontingenztafeln. Er kann feststellen, ob eine Assoziation zwischen zwei Variablen besteht oder nicht. Dies bedeutet, dass er überprüft, ob die Nullhypothese H_0 zutrifft oder die Alternativhypothese H_1 . Folgende Hypothesen werden also festgelegt (Bland, Oxford University Press):

- H_0 : Zwischen den beiden Variablen besteht keine Assoziation
- H_1 : Es gibt irgendeine Assoziation zwischen beiden Variablen

Es wird allerdings keine Aussage darüber getroffen, wie stark die Beziehung zwischen den Variablen ist.

Testprinzip: In jedem Feld der Kontingenztafel finden wir eine Frequenzangabe, wobei grundsätzlich davon ausgegangen wird, dass die Nullhypothese zutrifft. Bei exakt proportionsgemäßer Verteilung würde die Frequenz eines Feldes der erwarteten Frequenz entsprechen, die durch folgende Formel beschrieben ist:

$$\frac{\text{Marginalwahrscheinlichkeit (Reihe)} \times \text{Marginalwahrscheinlichkeit (Spalte)}}{\text{Gesamtwahrscheinlichkeit}}$$

In den meisten Fällen gibt es jedoch Abweichungen von den erwarteten Werten, sodass geklärt werden muss, ob die tatsächlichen Frequenzwerte in einem Bereich liegen, der noch durch Zufallsvariation gemäß einer annähernd proportionalen Verteilung oder schon mit einer handfesten Assoziation der beiden Variablen erklärt werden kann. Der exakteste Test, der diesen Bereich miteinbezieht, ist der Chi-Quadrat-Test (χ^2):

$$\text{Chi-Quadrat} = \sum \frac{(\text{tatsächliche Frequenz} - \text{erwartete Frequenz})^2}{\text{Erwartete Frequenz}}$$

In der vorliegenden Arbeit wurde mit diesem Test die Assoziation zwischen verschiedenen Allelen (Genotypen) und der Erkrankungsausprägung (Phänotyp) erfasst. Zur Testung der SNPs wurden 6-Felder-Tafeln (zwei Freiheitsgrade), bei den Haplotypen 4-Felder-Tafeln (ein Freiheitsgrad) erstellt. Das Signifikanzniveau war bei $\alpha = 0,05$ festgelegt, somit wurde ein P-Wert $< 0,05$ als signifikant gewertet, d. h. die Nullhypothese H_0 wurde in diesem Fall aufgrund eines Assoziationshinweises bezüglich den beiden Variablen abgelehnt.

2.5.4. One-way-Varianzanalyse (One-way Anova)

Dieser Test wird zur kontinuierlichen Assoziationsbestimmung von zwei Variablen verwendet. Der Unterschied der Anwendung im Vergleich zum Chi-Quadrat-Test besteht darin, dass sich eine der beiden Variablen auch in der Intervallskala befinden kann (*Bland, Oxford University Press*). Sind die Werte der Intervallskala normalverteilt, so lässt sich die one-way-Varianzanalyse zur Auswertung heranziehen. Sind beide Variablen in der Nominalskala, so lässt sich sowohl der Chi-Quadrat-Test als auch die one-way-Varianzanalyse verwenden.

Testprinzip: Die Varianzanalyse vergleicht die Variation der Messwerte in den einzelnen Variablengruppen mit der Variation der Mittelwerte der Variablengruppen. Der Wert, der das Verhältnis beider Varianzen bei bestimmten Freiheitsgraden festlegt, ist die sog. Varianzratio oder auch F-Ratio. Hohe F-Ratiowerte korrelieren dabei mit einem niedrigen P-Wert und zeigen somit eine Ablehnung der beim Chi-Quadrat-Test genannten Nullhypothese an.

In der Ergebnisauswertung wurde wie beim Chi-Quadrat-Test ein P-Wert $< 0,05$ als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied der Variablen angesehen.

Die graphische Messwertedarstellung der Intervallskalavariablen in Abhängigkeit von der anderen Variablen erfolgte durch den sog. Whisker-Blot (Box-Plot). Dabei entsprach die Variable mit Intervallskalierung den metabolischen Parametern (Phänotyp), die nominalskalierte Variable erfasste die verschiedenen Allele (Genotyp).

3. ERGEBNISSE

3.1. Ergebnisse in der Visfatingenanalyse (PBEF1)

3.1.1. Genotypisierungsraten und Laborauswertung

Nach der Genotypisierung der SNPs muss die jeweilige Genotypisierungsrate eines Assays bestimmt werden, um abschätzen zu können, ob die Ergebnisse in die statistische Auswertung miteinbezogen werden können. Zuvor wurde für die „Failure Rate“ ein Cut-off-Wert von 5 % festgelegt. Bei 11 SNP-Tests konnte eine Genotypisierungsrate von über 95 % erreicht werden und somit zur weiteren Auswertung herangezogen werden. Der Exon-SNP rs2302559 kam allerdings nur auf eine Rate von 90,56 % und wurde in den weiteren Analyseverfahren nicht mehr verwendet.

Im Folgenden sind zwei Beispiele von Genotypisierungsergebnissen dargestellt (Abb. 7 und Abb. 8), die im Labor der kardiogenetischen Forschungsgruppe der Universität Regensburg erarbeitet wurden:

- Auswertung des SNP rs10953502 bei 384 männlichen Kontrollprobanden der HIFAM-Population nach der 5`Exonuklease-Methode (Abb. 7)

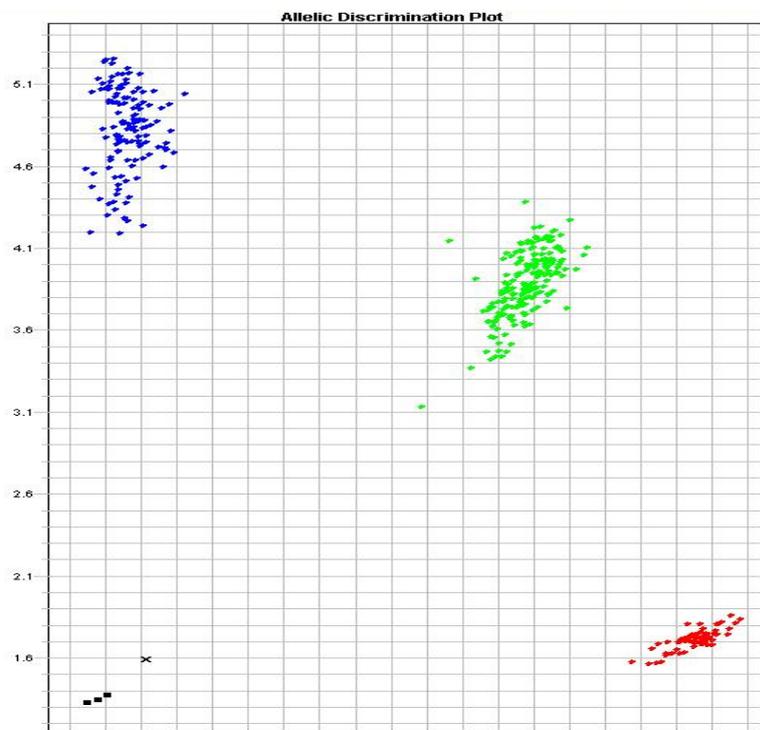


Abb. 7: Oben links entlang der y-Achse: homozygot-T-Probanden, unten rechts entlang der x-Achse: homozygot-C-Probanden, in der Winkelhalbierenden der beiden Achsen: heterozygote Genotypen

- Auswertung des SNP rs2302559 bei 96 Probanden der MONICA-LVH-Kontrollpopulation nach der RFLP-Methode (Abb. 8)

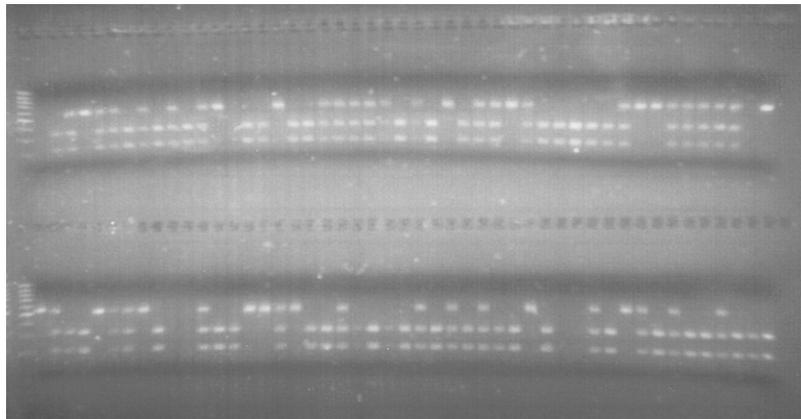


Abb. 8: Visualisierung der einzelnen Fragmente durch einen UV-Fluoreszenzfarbstoff. Das Vorkommen eines Fragmentes bedeutet Genotyp homozygot-T, zwei Fragmente entsprechen den C-Homozygoten, drei Fragmente sind den Heterozygoten zuzuordnen.

3.1.2. LD-Evaluation und Haplotypstruktur in der Allgemeinbevölkerung

Die LD-Evaluation und die Haplotypstrukturanalyse wurden bei allen Populationen durchgeführt, wobei sich keine nennenswerten Unterschiede in der Definition der Haplotypen ergaben, sodass an dieser Stelle nur die Allgemeinbevölkerung graphisch dargestellt wurde.

Die paarweise LD-Block-Struktur, die durch die 11 zur Analyse verwendeten SNPs definiert und mit Hilfe der D' -Messung ermittelt wurde, ist in Abb. 9 aufgeführt:

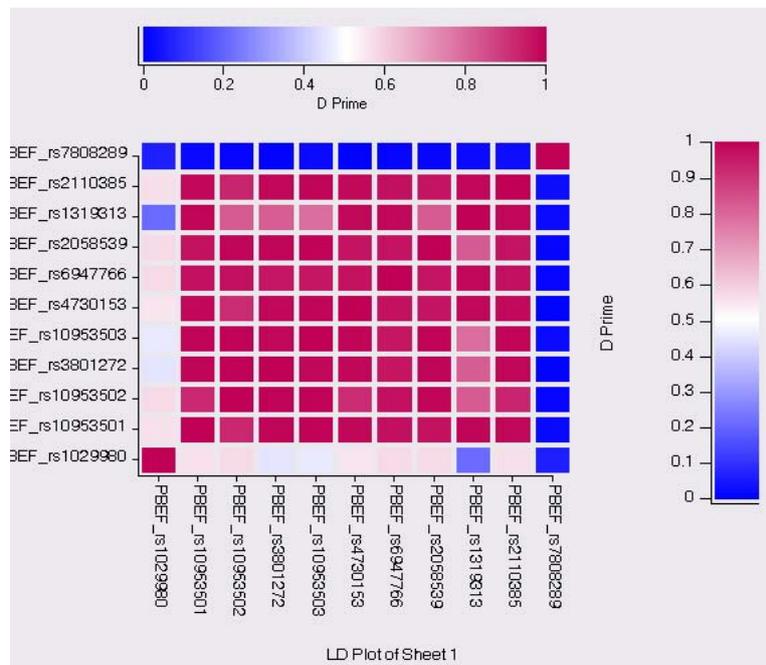
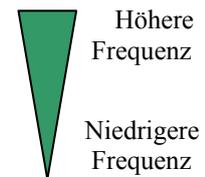


Abb. 9: D' -Messung Allgemeinbevölkerung: rosarote Farbcodierung zeigt hohes LD, blaue Färbung niedriges LD an von links nach rechts (unterer Rand): PIK3CA-SNPs von 3' nach 5' von unten nach oben (linker Rand): PIK3CA-SNPs von 3' nach 5'

In D' ergaben sich signifikant hohe LD-Werte zwischen 9 SNPs (rs10953501, rs10953502, rs3801272, rs10953503, rs4730153, rs6947766, rs2058539, rs1319313 und rs2110385), ein geringes LD konnte jeweils zwischen den beiden äußeren SNPs (rs1029980, rs7808289) und den umgrenzten oben genannten SNPs festgestellt werden.

Folglich erhält man einen starken LD-Block von neun SNPs mit einer Ausdehnung von 42,39 kb. Dies bedeutet, dass das gesamte Visfatingen von diesem LD-Block überzogen ist und dass die Grenzen dieses Blocks bis in beide angrenzenden Zwischengenregionen reichen. Entsprechend des 9er-LD-Blocks wurden 9-Marker-Haplotypen konstruiert, wobei nur 5 (für die Kontrollpopulation) bzw. 4 (für HIFAM und KORA) von 2^9 möglichen Haplotypen mit Hilfe der Expectation-Maximization-Methode (EM-Methode) auf eine Frequenz von über 0,02 geschätzt werden konnten (Tab. 4). Haplotypen mit einer Frequenz kleiner 0,02 wurden nicht berücksichtigt, da es bei Anwendung der EM-Methode in diesem niederfrequenten Bereich zu signifikanten Ungenauigkeiten kommt.

Haplotypen	Haplotypcodierung	Allelkombination	Frequenz
Haplotyp 1	1_1_1_1_1_1_1_1_1	A-C-C-A-A-C-A-A-G	0,30447
Haplotyp 2	2_2_2_2_2_1_2_2_2	G-T-T-G-G-C-C-G-T	0,23768
Haplotyp 3	1_1_1_1_1_2_1_1_1	A-C-C-A-A-T-A-A-G	0,23730
Haplotyp 4	2_2_2_2_2_1_2_1_2	G-T-T-G-G-C-C-A-T	0,13361
Haplotyp 5	2_1_1_1_2_1_1_2_2	G-C-C-A-G-C-A-G-T	0,02841



Tab. 4: häufigste Haplotypen für die MONICA-Kontrollpopulation mit Allelbezeichnung und Frequenz
1 = häufiges Allel; 2 = seltenes Allel; C,G,A,T = Basencodes

Die Gesamtfrequenz der häufigsten drei Haplotypen betrug in allen drei untersuchten Populationen über 80 %. Zusätzlich zu den Einzelmarkern (SNPs) wurde die Assoziation der häufigsten Haplotypen (über 0,02) zu den verschiedenen Parameter und Phänotypen, die in der Einleitung und im Methodenteil bereits beschrieben wurden, untersucht.

3.1.3. Assoziationsanalyse einzelner SNPs im PBEF1-Gen

3.1.3.1. Allgemeinbevölkerung: MONICA-LVH-Substudie

Bei den Untersuchungen bezüglich der metabolischen Parameter waren zwei wichtige Blutlipidassoziationen auffällig. Die One-way-Varianzanalyse zwischen den möglichen Genotypen und dem HDL-Cholesterin brachte sowohl beim geschlechtsspezifischen, als auch beim nicht-geschlechtsspezifischen Test signifikante Unterschiede: bei letzterem Test wurden 8 SNPs (rs10953501, rs10953502, rs3801272, rs4730153, rs6947766, rs2058539, rs1319313 und rs2110385) signifikant auf HDL-Cholesterin getestet (Tab. 5, Abb. 10).

SNP und Geschlecht	Homozygot häufiges Allel	Heterozygot	Homozygot seltenes Allel	P-Werte
rs10953501 (ges)	55,07 +/- 16,574	52,54 +/- 15,882	55,21 +/- 18,250	0,018
rs10953502 (ges)	55,40 +/- 16,642	52,67 +/- 16,376	54,36 +/- 17,075	0,024
rs3801272 (ges)	55,12 +/- 16,564	52,55 +/- 16,291	54,78 +/- 17,519	0,024
rs4730153 (ges)	55,14 +/- 16,599	52,47 +/- 15,768	55,33 +/- 18,439	0,011
rs6947766 (ges)	53,05 +/- 16,584	55,48 +/- 17,233	51,77 +/- 12,445	0,021
rs2058539 (ges)	55,23 +/- 16,722	52,56 +/- 16,294	54,68 +/- 16,952	0,022
rs1319313 (ges)	53,53 +/- 15,975	53,12 +/- 16,266	59,70 +/- 20,629	0,002
rs2110385 (ges)	55,02 +/- 16,369	52,41 +/- 15,928	55,52 +/- 18,370	0,008
rs10953501 (m)	50,20 +/- 15,194	46,49 +/- 13,062	48,81 +/- 15,101	0,009
rs10953502 (m)	50,18 +/- 15,365	46,97 +/- 14,306	47,47 +/- 11,301	0,029
rs3801272 (m)	49,87 +/- 14,926	46,64 +/- 14,335	48,20 +/- 11,705	0,026
rs4730153 (m)	50,11 +/- 15,222	46,59 +/- 13,073	48,75 +/- 15,132	0,015
rs2058539 (m)	49,97 +/- 15,340	46,93 +/- 14,256	47,89 +/- 11,293	0,043
rs2110385 (m)	50,10 +/- 15,176	46,28 +/- 12,997	49,20 +/- 15,293	0,005
rs1319313 (w)	59,20 +/- 15,992	59,76 +/- 17,120	65,12 +/- 18,897	0,030

Tab. 5: P-Werte, Mittelwerte und Standardabweichungen signifikanter SNPs in der SNP-HDL-Cholesterin-Assoziation der MONICA-Kontrollpopulation (PBEF1); HDL-Cholesterin-Werte in mg/dl; ges = gesamt; m = männlich; w = weiblich

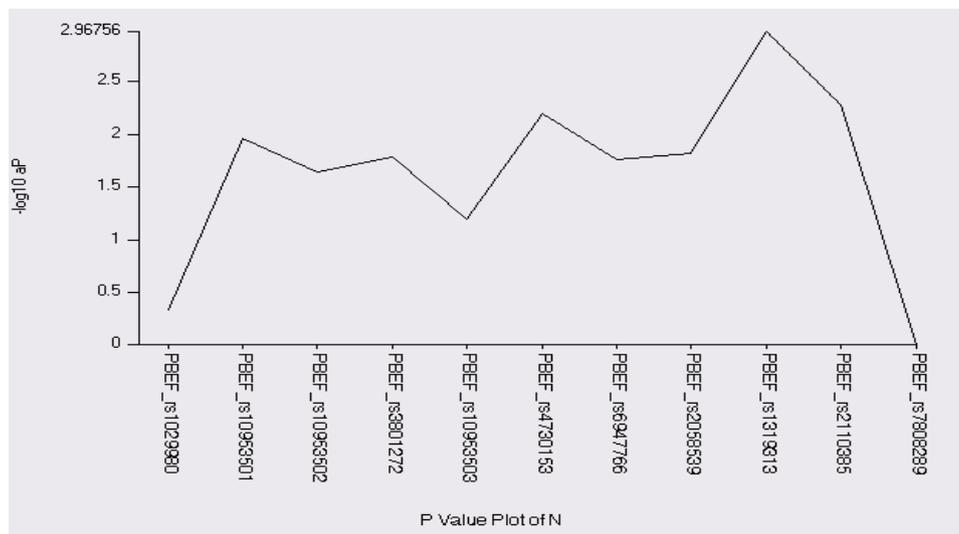


Abb. 10: Graphische Darstellung der P-Werte für die Assoziation von SNPs im PBEF1-Gen mit HDL-Cholesterin-Serumspiegeln; y-Achse: $-\log_{10}P$ -Werte; x-Achse: SNPs

Bei 4 der o.g. SNPs (rs10953501, rs4730153, rs1319313 und rs2110385) waren hohe HDL-Cholesterin-Werte signifikant mit dem Vorkommen des homozygoten Genotyp des seltenen Allels vergesellschaftet (MW +/- SD und P-Werte: Tab. 5, Abb. 11; MW sind die Mittelwerte, SD bedeutet Standardabweichung).

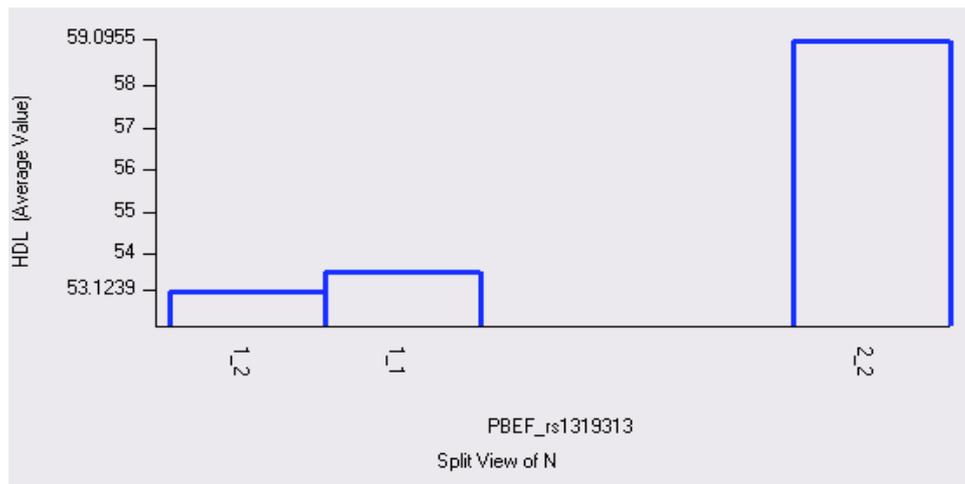


Abb. 11: Nicht-geschlechtsspezifisches Histogramm von rs1319313: die HDL-Cholesterin-Werte waren bei Probanden mit dem häufigen Allel signifikant niedriger als bei Personen mit dem seltenen Allel (MW +/- SD: Genotyp 1_2: 53,12 +/- 16,266 mg/dl; Genotyp 1_1: 53,53 +/- 15,975 mg/dl; Genotyp 2_2: 59,70 +/- 20,629 mg/dl; p for trend: 0,002; Allel 1 = häufiges Allel, Allel 2 = seltenes Allel)

In der geschlechtsspezifischen Analyse waren bei den Männern sechs der o.g. SNPs signifikant (rs10953501, rs10953502, rs3801272, rs4730153, rs2058539 und rs2110385). Dabei hatten die Heterozygoten im Durchschnitt die niedrigsten HDL-Cholesterin-Werte, den Homozygoten bezüglich des häufigen Allels waren die höchsten Mittelwerte zugeordnet (MW +/- SD und P-Werte: Tab. 5). Bei den Frauen war nur ein SNP als signifikant zu werten (rs1319313; MW +/- SD: Tab. 5), wobei die HDL-Cholesterin-Wert-Zuordnung dem nicht-geschlechtsspezifischen Histogramm ähnelt (Unterschied: der HDL-Cholesterin-Mittelwert liegt bei den weiblichen heterozygoten Testpersonen mit 59,76 mg/dl zwischen den Mittelwerten der beiden weiblichen homozygoten Probandengruppen; Tab. 5).

Der andere auffällige Blutlipidparameter in der Assoziation war der Triglyzeridwert: bei der nicht-geschlechtsspezifischen Varianzanalyse waren 7 SNPs (rs10953501, rs10953502, rs3801272, rs4730153, rs2058539, rs1319313 und rs2110385) mit signifikanten Triglyzeridwerten assoziiert (Tab. 6, Abb. 12).

SNP und Geschlecht	Homozygot häufiges Allel	Heterozygot	Homozygot seltenes Allel	P-Werte
rs10953501 (ges)	173,53 +/- 141,61	190,70 +/- 152,67	167,82 +/- 115,34	0,044
rs10953502 (ges)	172,68 +/- 139,47	190,64 +/- 154,04	168,37 +/- 112,20	0,044
rs3801272 (ges)	172,36 +/- 136,58	192,01 +/- 155,31	167,83 +/- 114,49	0,028
rs4730153 (ges)	173,93 +/- 142,05	190,89 +/- 152,70	166,38 +/- 113,91	0,035
rs2058539 (ges)	174,59 +/- 141,01	190,58 +/- 153,74	167,19 +/- 112,18	0,013
rs1319313 (ges)	176,99 +/- 136,03	193,24 +/- 158,77	147,93 +/- 97,66	0,006
rs2110385 (ges)	173,59 +/- 142,31	189,71 +/- 150,26	170,20 +/- 123,97	0,011

Tab. 6: P-Werte, Mittelwerte und Standardabweichungen signifikanter SNPs in der SNP-Triglyzeride-Assoziation der MONICA-Kontrollpopulation (PBEF1); Triglyzeridwerte in mg/dl

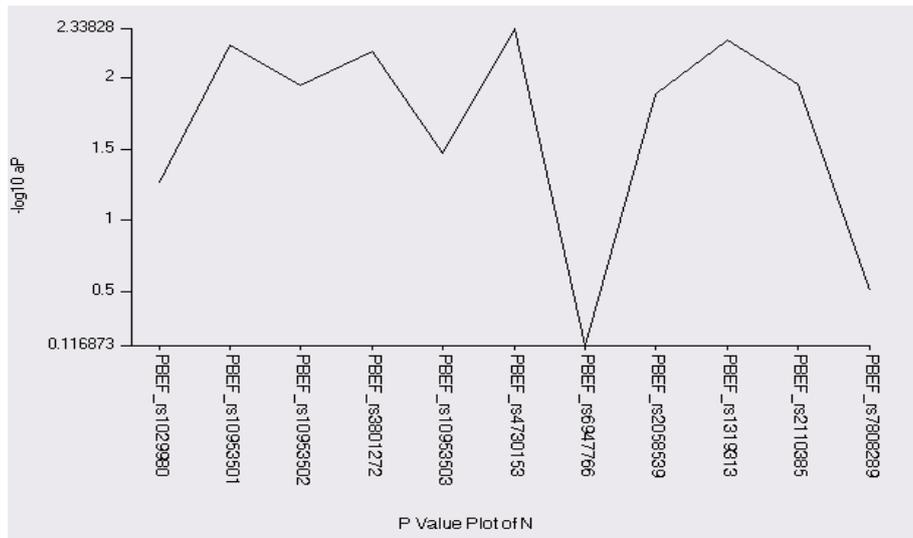


Abb. 12: Graphische Darstellung der P-Werte von SNPs im PBEF1-Gen bezüglich der logarithmischen Triglyzeridwerte (y-Achse: $-\log_{10}$ -P-Werte; x-Achse: SNPs)

Hierbei erzielten die Heterozygoten den höchsten Durchschnittswert. Dem niedrigsten Triglyzeridwert war in allen 7 SNPs das seltene Allel in homozygoter Form zugeordnet. (MW \pm SD mit P-Wert: Tab. 6). Abb. 13 zeigt am Beispiel von rs1319313, dass den Personen mit häufigem Allel signifikant hohe Triglyzeridwerte zuzuweisen sind. In Zusammenschau mit der HDL-Cholesterin-Auswertung scheint das häufige Allel der ausgewerteten SNPs eine eher ungünstige, das seltene Allel eine günstige Wirkung auf die Entwicklung der beiden prognostisch wichtigen Blutfettwerte zu entfalten. Da die Heterozygoten-Mittelwerte bezüglich HDL-Cholesterin und Triglyzeride in den allermeisten Fällen nicht zwischen den beiden Homozygoten-Mittelwerten liegen, handelt es sich wohl nicht um einen Genotypeneffekt, sondern um einen Alleleffekt.

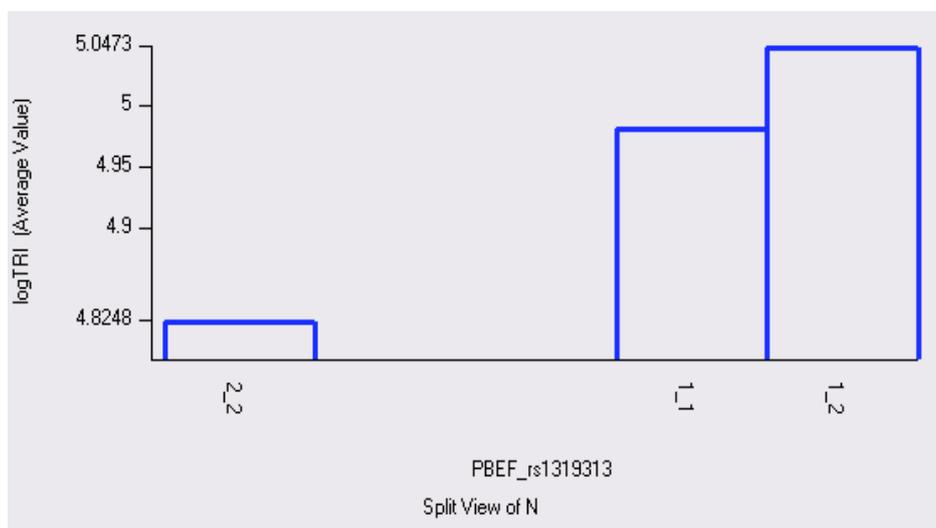


Abb. 13: nicht-geschlechtsspezifisches Histogramm von rs1319313: signifikante \log Triglyzeridwert-Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Allelträgern (MW \pm SD Triglyzeride: Genotyp 1_2: 193,24 \pm 158,77 mg/dl; Genotyp 1_1: 176,99 \pm 136,03 mg/dl; Genotyp 2_2: 147,93 \pm 97,66 mg/dl; p for trend: 0,006; Allel 1 = häufiges Allel, Allel 2 = seltene Allel)

Bei der Auswertung der Assoziationen der Genotypen bezüglich metabolischen Erkrankungsphänotypen in Form von Kontingenztafeln und Chi-Quadrat-Test konnte eine Abhängigkeit im Bereich der Dyslipidämie festgestellt werden. 8 SNPs (rs10953501, rs10953502, rs3801272, rs10953503, rs4730153, rs2058539, rs1319313 und rs2110385) waren in der nicht-geschlechtsspezifischen Analyse signifikant mit dem Vorkommen einer Dyslipidämie dahingehend assoziiert, dass die Diagnose Dyslipidämie bei allen SNPs im Durchschnitt am häufigsten bei den Heterozygoten gestellt wurde. Am geringsten war die Diagnosehäufigkeit beim homozygoten Genotyp bestehend aus den beiden seltenen Allelen (MW +/- SD und P-Werte: Tab. 7). In der geschlechtsspezifischen Auswertung zeigten sich nur bei den männlichen Teilnehmern signifikante Assoziationen (bei den Frauen: in allen SNPs: $p > 0,05$), wobei 7 der 8 oben genannten SNPs (rs10953501, rs10953502, rs3801272, rs10953503, rs4730153, rs2058539 und rs2110385) betroffen waren. Die Verteilung der Diagnose Dyslipidämie bezüglich des Genotyps entspricht mit einer Ausnahme (rs10953502) der nicht-geschlechtsspezifischen Analyse (Tab. 7). Bei rs10953502 war der homozygote Genotyp bezüglich der beiden häufigen Allele mit der geringsten Diagnosehäufigkeit einer Dyslipidämie (in 23,39 % der Fälle; Tab. 7) assoziiert. Alle anderen SNPs waren in der Dyslipidämieauswertung nicht signifikant ($p > 0,05$).

SNP und Geschlecht	Homozygot häufiges Allel	Heterozygot	Homozygot seltenes Allel	P-Werte
rs10953501 (ges)	26,54 % (n=437)	22,25 % (n=645)	25,10 % (n=240)	0,039
rs10953502 (ges)	25,56 % (n=446)	32,82 % (n=655)	25,00 % (n=240)	0,011
rs3801272 (ges)	26,46 % (n=514)	32,96 % (n=619)	23,56 % (n=208)	0,010
rs10953503 (ges)	26,96 % (n=523)	32,47 % (n=619)	23,62 % (n=199)	0,023
rs4730153 (ges)	26,10 % (n=433)	32,36 % (n=649)	25,48 % (n=259)	0,032
rs2058539 (ges)	26,28 % (n=468)	32,75 % (n=632)	24,03 % (n=233)	0,012
rs1319313 (ges)	29,40 % (n=704)	30,89 % (n=518)	19,64 % (n=112)	0,048
rs2110385 (ges)	26,51 % (n=430)	32,55 % (n=639)	24,23 % (n=260)	0,017
rs10953501 (m)	24,19 % (n=215)	34,20 % (n=345)	23,44 % (n=128)	0,011
rs10953502 (m)	23,39 % (n=218)	34,39 % (n=346)	24,19 % (n=124)	0,008
rs3801272 (m)	24,21 % (n=252)	35,19 % (n=324)	22,32 % (n=112)	0,014
rs10953503 (m)	24,81 % (n=258)	34,77 % (n=325)	21,90 % (n=105)	0,007
rs4730153 (m)	24,06 % (n=212)	33,91 % (n=348)	24,22 % (n=128)	0,010
rs2058539 (m)	24,89 % (n=229)	33,83 % (n=337)	22,69 % (n=119)	0,018
rs2110385 (m)	24,53 % (n=212)	34,71 % (n=340)	22,48 % (n=129)	0,006

Tab. 7: P-Werte signifikanter SNPs und Erkrankungshäufigkeiten in der SNP-Dyslipidämie-Assoziation der MONICA-Kontrollpopulation (PBEF1); n=Anzahl der Probanden, die den Genotyp der entsprechenden Spalte aufweisen

In den SNP-Assoziationsuntersuchungen im Hinblick auf die übrigen metabolischen Parameter und Erkrankungsphänotypen konnten keine signifikanten Ergebnisse nachgewiesen werden (p in allen Analysen $> 0,05$).

3.1.3.2. Herzinfarktfamilien: Regensburger Herzinfarktfamilienstudie (HIFAM)

Bei den Kontrollpatienten gab es bezüglich der Parameter HDL-Cholesterin, Triglyzeride und Dyslipidämie keine signifikanten Assoziationen (alle p-Werte >0,05). Lediglich in der Gesamtbevölkerung und bei den Frauen ergab sich im Hinblick auf HbA1c eine Signifikanz bei rs1319313. Bei den Familienangehörigen, welche noch keinen akuten Myokardinfarkt hatten, ließen sich signifikante Abhängigkeiten bei HDL-Cholesterin, Triglyzeride und Dyslipidämie nachweisen. In der nicht-geschlechtsspezifischen HDL-Cholesterin-Testung zeigten sich bei insgesamt 8 SNPs Auffälligkeiten (die gleichen SNPs wie bei der HDL-Cholesterin-Auswertung in der MONICA-Kontrollpopulation: rs10953501, rs10953502, rs3801272, rs4730153, rs6947766, rs2058539, rs1319313 und rs2110385; MW +/- SD und P-Werte: Tab 8). Die Heterozygoten hatten pro SNP durchschnittlich die niedrigsten HDL-Cholesterin-Werte - mit einer Ausnahme (rs6947766: hier waren die HDL-Cholesterin-Werte am höchsten). Bei 5 der 8 SNPs waren die homozygoten Genotypen mit dem häufigerem Allel mit höheren HDL-Cholesterin-Werten assoziiert wie die Homozygoten mit dem selteneren Allel (rs10953502, rs3801272, rs4730153, rs6947766 und rs2058539).

SNP und Geschlecht	Homozygot häufiges Allel	Heterozygot	Homozygot seltenes Allel	P-Werte
rs10953501 (ges)	55,07 +/- 16,574	52,54 +/- 15,882	55,21 +/- 18,250	0,018
rs10953502 (ges)	55,40 +/- 16,642	52,67 +/- 16,376	54,36 +/- 17,075	0,024
rs3801272 (ges)	55,12 +/- 16,564	52,55 +/- 16,291	54,78 +/- 17,519	0,024
rs4730153 (ges)	55,14 +/- 16,599	52,47 +/- 15,768	55,33 +/- 18,439	0,011
rs6947766 (ges)	53,05 +/- 16,584	55,48 +/- 17,233	51,77 +/- 12,445	0,021
rs2058539 (ges)	55,23 +/- 16,722	52,56 +/- 16,294	54,68 +/- 16,952	0,022
rs1319313 (ges)	53,53 +/- 15,975	53,12 +/- 16,266	59,70 +/- 20,629	0,002
rs2110385 (ges)	55,02 +/- 16,369	52,41 +/- 15,928	55,52 +/- 18,370	0,008

Tab. 8: P-Werte, Mittelwerte und Standardabweichungen signifikanter SNPs in der SNP-HDL-Cholesterin-Assoziation der HIFAM-Probanden ohne Myokardinfarkt (PBEF1); HDL-Cholesterin-Werte in mg/dl

Bei der Triglyzeridauswertung (nicht-geschlechtsspezifisch) waren 5 auffällige SNPs (rs10953501, rs10953502, rs3801272, rs4730153 und rs1319313) zu verzeichnen. Bei allen SNPs ging ein hoher Triglyzeridwert mit einem heterozygoten Genotyp einher. Die niedrigsten Triglyzeridwerte hatten die Homozygoten, welche die zwei seltenen Allele besaßen (MW +/- SD und P-Werte: Tab. 9).

SNP und Geschlecht	Homozygot häufiges Allel	Heterozygot	Homozygot seltenes Allel	P-Werte
rs10953501 (ges)	173,53 +/- 141,61	190,70 +/- 152,67	167,82 +/- 115,34	0,044
rs10953502 (ges)	172,68 +/- 139,47	190,64 +/- 154,04	168,37 +/- 112,20	0,044
rs3801272 (ges)	172,36 +/- 136,58	192,01 +/- 155,31	167,83 +/- 114,49	0,028
rs4730153 (ges)	173,93 +/- 142,05	190,89 +/- 152,70	166,38 +/- 113,91	0,035
rs1319313 (ges)	176,99 +/- 136,03	193,24 +/- 158,77	147,93 +/- 97,66	0,006

Tab. 9: P-Werte, Mittelwerte und Standardabweichungen signifikanter SNPs in der SNP-Triglyzeride-Assoziation der HIFAM-Probanden ohne Myokardinfarkt (PBEF1); Triglyzeridwerte in mg/dl

Bei der Auswertung bezüglich des Erkrankungsphänotyps Dyslipidämie waren 8 verschiedene SNPs mit diesem Krankheitsbild vergesellschaftet (die gleichen SNPs wie bei der Dyslipidämieauswertung in der MONICA-Kontrollpopulation: rs10953501, rs10953502, rs3801272, rs10953503, rs4730153, rs2058539, rs1319313 und rs2110385). Auch hier war wie in der MONICA-Population bei allen signifikanten SNPs der heterozygote Genotyp mit dem höchsten Vorkommen und die Homozygoten in Bezug auf das seltene Allel mit der niedrigsten Prävalenz einer Dyslipidämie assoziiert (MW +/- SD und P-Werte: Tab. 10).

SNP und Geschlecht	Homozygot häufiges Allel	Heterozygot	Homozygot seltenes Allel	P-Werte
rs10953501 (ges)	26,54 % (n=437)	22,25 % (n=645)	25,10 % (n=240)	0,039
rs10953502 (ges)	25,56 % (n=446)	32,82 % (n=655)	25,00 % (n=240)	0,011
rs3801272 (ges)	26,46 % (n=514)	32,96 % (n=619)	23,56 % (n=208)	0,010
rs10953503 (ges)	26,96 % (n=523)	32,47 % (n=619)	23,62 % (n=199)	0,023
rs4730153 (ges)	26,10 % (n=433)	32,36 % (n=649)	25,48 % (n=259)	0,032
rs2058539 (ges)	26,28 % (n=468)	32,75 % (n=632)	24,03 % (n=233)	0,012
rs1319313 (ges)	29,40 % (n=704)	30,89 % (n=518)	19,64 % (n=112)	0,048
rs2110385 (ges)	26,51 % (n=430)	32,55 % (n=639)	24,23 % (n=260)	0,017

Tab. 10: P-Werte signifikanter SNPs und Erkrankungshäufigkeiten in der SNP-Dyslipidämie-Assoziation der HIFAM-Probanden ohne Myokardinfarkt (PBEF1); n=Anzahl der Probanden, die den Genotyp der entsprechenden Spalte aufweisen

Die statistische Erhebung bei den Indexpatienten konnte in Bezug auf die beiden metabolischen Parameter HDL-Cholesterin (Tab. 11) und Triglyzeride sowie bezüglich der Dyslipidämie keine signifikanten Abhängigkeiten nachweisen (aP-Werte > 0,05).

SNP	P-Wert	aP-Wert	bP-Wert
rs4730153	0,091945809	0,238129159	1
rs10953501	0,028547193	0,072775315	1
rs2058539	0,088719516	0,229662616	1
rs2110385	0,055337603	0,142338716	1
rs3801272	0,068363448	0,176346334	1
rs10953503	0,027281808	0,069506899	1
rs10953502	0,19155951	0,501059467	1
rs1029980	0,035203156	0,089997709	1
rs1319313	0,143610104	0,374180251	1
rs6947766	0,039644343	0,101514461	1
rs7808289	0,241797904	0,241797904	1

Tab. 11: P-Werte (nicht geschlechtsspezifisch) für die SNP-Assoziation bezüglich HDL-Cholesterin im Überblick (HIFAM-Indexpatienten; PBEF1)

Vereinzelt zeigten sich jedoch bei den beiden SNPs, welche den LD-Block begrenzen, Signifikanzen: bei rs1029980 ergab sich eine Abhängigkeit bezüglich der Gesamtcholesterinwerte (Tab. 12), bei rs7808289 wurde eine Assoziation zu den Phänotypen „diabetische Stoffwechsellaage“ (Tab. 12) und „Hypertonie“ (Tab. 12) angezeigt.

SNP und Phänotyp	Homozygot häufiges Allel	Heterozygot	Homozygot seltenes Allel	P-Werte
rs1029980 (Gesamtcholesterin)	227,94 +/- 49,63	218,44 +/- 43,10	228,37 +/- 42,11	0,020
rs7808289 (Diabetes)	36,12 % (n=335)	27,77 % (n=443)	34,67 % (n=150)	0,006
rs7808289 (Hypertonie)	60,30 % (n=330)	50,90 % (n=442)	64,43 % (n=149)	0,003

Tab. 12: P-Werte, Mittelwerte und Standardabweichungen signifikanter SNPs in verschiedenen SNP-Assoziationen der HIFAM-Population (PBEF1); n=Anzahl der Probanden, die den Genotyp der entsprechenden Spalte aufweisen; Gesamtcholesterinwerte in mg/dl; Erkrankungshäufigkeiten in %

3.1.3.3. Herzinfarktpopulation: KORA

Wie zuvor bei den Indexpatienten beschrieben, gab es auch in der KORA-Population keine besonderen Hinweise auf eine genetische Assoziation der getesteten SNPs bezüglich den Variablen HDL-Cholesterin, Triglyzeride und Dyslipidämie (P-Werte > 0,05). Auffälligkeiten ließen sich jedoch bezüglich anderen Parametern eruieren: In den geschlechtsunabhängigen Analysen konnten vereinzelt Assoziationen hinsichtlich des systolischen Blutdrucks, des BMI, der Diagnose Adipositas und zweier Lipidparameter (Gesamt- und LDL-Cholesterin) festgestellt werden. Der systolische Blutdruck wies bei 3 SNPs (rs10953501, rs4730153 und rs2110385) Signifikanzen auf, wobei die homozygoten Patienten bezüglich des seltenen Allels die höchsten Blutdruckwerte aufwiesen, die andere homozygote Gruppe die Niedrigsten. Dazwischen lagen bei allen drei SNPs die Heterozygoten (MW +/- SD und P-Werte: Tab. 13).

SNP und Geschlecht	Homozygot häufiges Allel	Heterozygot	Homozygot seltenes Allel	P-Werte
rs10953501 (ges)	130,21 +/- 15,937	132,70 +/- 16,979	135,38 +/- 18,638	0,040
rs4730153 (ges)	129,99 +/- 15,999	132,85 +/- 16,883	135,40 +/- 18,733	0,026
rs2110385 (ges)	129,68 +/- 15,843	132,86 +/- 16,826	135,70 +/- 18,916	0,010

Tab. 13: P-Werte, Mittelwerte und Standardabweichungen signifikanter SNPs in der SNP-Blutdruck-Assoziation der KORA-Population (PBEF1); Systolische Blutdruckwerte in mmHg

Bei 5 SNPs (rs10953501, rs10953502, rs4730153, rs1319313 und rs2110385) konnte eine Signifikanz hinsichtlich des BMI belegt werden. Wie bei den zuvor genannten systolischen Blutdruckwerten wiesen die Homozygoten bezüglich des seltenen Allels bei allen 5 SNPs die höchsten Parameterwerte auf, die Homozygoten hinsichtlich des häufigen Allels hatten durchschnittlich die niedrigsten BMI-Werte. Dazwischen lagen wiederum die Heterozygoten (MW +/- SD und P-Werte: Tab. 14).

SNP und Geschlecht	Homozygot häufiges Allel	Heterozygot	Homozygot seltenes Allel	P-Werte
rs10953501 (ges)	27,94 +/- 3,199	28,53 +/- 3,856	29,16 +/- 4,197	0,024
rs10953502 (ges)	28,20 +/- 3,707	28,31 +/- 3,520	29,25 +/- 4,176	0,049
rs4730153 (ges)	27,95 +/- 3,200	28,52 +/- 3,850	29,17 +/- 4,218	0,026
rs1319313 (ges)	28,17 +/- 3,378	28,55 +/- 4,079	29,77 +/- 3,764	0,035
rs2110385 (ges)	27,89 +/- 3,134	28,56 +/- 3,898	29,14 +/- 4,165	0,016

Tab. 14: P-Werte, Mittelwerte und Standardabweichungen signifikanter SNPs in der SNP-BMI-Assoziation der KORA-Population (PBEF1); BMI-Werte in kg/m²

Die Diagnose Adipositas war mit 4 SNPs (rs10953501, rs10953502, rs4730153 und rs2110385) signifikant verknüpft. Im Durchschnitt am häufigsten wurde das Vorkommen der Adipositas beim Auftreten des homozygoten Genotyps mit zwei seltenen Allelen beobachtet, die niedrigste Diagnoserate war mit der Genotypisierung der anderen homozygoten Gruppe verknüpft (MW +/- SD und P-Werte: Tab. 15).

SNP und Geschlecht	Homozygot häufiges Allel	Heterozygot	Homozygot seltenes Allel	P-Werte
rs10953501 (ges)	24,26 % (n=202)	32,86 % (n=283)	37,76 % (n=98)	0,031
rs10953502 (ges)	26,32 % (n=209)	29,78 % (n=272)	42,16 % (n=102)	0,018
rs4730153 (ges)	24,26 % (n=202)	32,75 % (n=284)	38,14 % (n=97)	0,029
rs2110385 (ges)	24,50 % (n=200)	32,50 % (n=280)	38,24 % (n=102)	0,033

Tab. 15: P-Werte, Mittelwerte und Standardabweichungen signifikanter SNPs in der SNP-Adipositas-Assoziation der KORA-Population (PBEF1); n=Anzahl der Probanden, die den Genotyp der entsprechenden Spalte aufweisen

Diese Verteilung der Genotypen in Bezug auf die Parameterwerte bzw. auf die Diagnosehäufigkeit des Erkrankungsphänotyps entspricht den zuvor bei systolischem Blutdruck und BMI erfassten Befunden. Bei der Testung des rs6947766 konnten Signifikanzen zu zwei Variablen (Gesamtcholesterin: p=0,033 und LDL-Cholesterin: p=0,034) ermittelt werden. Bei beiden Tests waren den Heterozygoten die höchsten Werte (Gesamtcholesterin: 230,37 +/- 47,949 mg/dl; LDL-Cholesterin: 137,71 +/- 40,829 mg/dl), den Homozygoten bezüglich des häufigeren Allels die niedrigsten Parameterwerte (Gesamtcholesterin: 220,44 +/- 41,943 mg/dl; LDL-Cholesterin: 129,29 +/- 35,936 mg/dl) zugeordnet. Dazwischen lagen die anderen Homozygoten (Gesamtcholesterin: 221,87 +/- 34,593 mg/dl; LDL-Cholesterin: 136,32 +/- 30,439 mg/dl).

3.1.3.4. Signifikanzen der SNPs zum Erkrankungsphänotyp akuter Myokardinfarkt

Um Signifikanzen der einzelnen SNPs hinsichtlich des Vorkommens eines akuten Myokards zu erfassen, müssen die Genotypen von Kontrollprobanden mit denen einer Herzinfarktpopulation verglichen werden. Als Kontrollpopulation diente die Population der MONICA-LVH-Substudie, die mit den zwei Herzinfarktpopulationen der HIFAM- und der KORA-Studie assoziiert wurde. Dadurch können in zwei Analysenkomplexen (MONICA-

Kontrollprobanden gegen HIFAM-Index-Probanden und MONICA-Kontrollprobanden gegen KORA-Probanden) eventuelle Signifikanzen gemessen werden.

3.1.3.4.1. MONICA-LVH-Substudienprobanden gegen Indexpatienten der HIFAM

Es ergaben sich sowohl in der nicht-geschlechtsspezifischen Auswertung (Tab. 16) als auch bei den Männern ($p > 0,05$) keine signifikanten Assoziationen zwischen dem Auftreten eines akuten Myokardinfarktes und dem Vorkommen von getesteten SNP-Allelen.

SNP	P-Wert	aP-Wert	bP-Wert
rs1029980	0,096666488	0,251617116	1
rs10953501	0,170296659	0,390566555	1
rs10953502	0,341220266	0,635766086	1
rs3801272	0,111185052	0,28121203	1
rs10953503	0,16675515	0,384454431	1
rs4730153	0,150420212	0,355586332	1
rs6947766	0,13934957	0,335356938	1
rs2058539	0,136000857	0,329126336	1
rs1319313	0,101022736	0,260628607	1
rs2110385	0,15093987	0,356522359	1
rs7808289	0,505053523	0,800793976	1

Tab. 16: P-Werte (nicht geschlechtsspezifisch) für die SNP-Assoziation bezüglich dem Vorkommen eines akuten Myokardinfarkt im Überblick (MONICA-Kontrollpopulation versus HIFAM-Indexpatienten; PBEF1)

Eine frauenbezogene Auswertung konnte nicht vorgenommen werden, da die getesteten Indexpatienten der HIFAM ausschließlich männlich waren.

3.1.3.4.2. MONICA-LVH-Substudienprobanden gegen KORA-Probanden

In der nicht-geschlechtsspezifischen Analyse wurde ebenfalls keine Assoziation bezüglich eines akuten Myokardinfarkts festgestellt (Tab. 17).

SNP	P-Wert	aP-Wert	bP-Wert
rs1029980	0,795321639	0,966913678	1
rs10953501	0,156870478	0,367121268	1
rs10953502	0,339993328	0,634300585	1
rs3801272	0,283057617	0,562085534	1
rs10953503	0,298152922	0,582094008	1
rs4730153	0,141645072	0,339597556	1
rs6947766	0,367743524	0,666550497	1
rs2058539	0,211520496	0,458188417	1
rs1319313	0,145426268	0,346529799	1
rs2110385	0,266087958	0,538834584	1
rs7808289	0,107883085	0,274589263	1

Tab. 17: P-Werte (nicht geschlechtsspezifisch) für die SNP-Assoziation bezüglich dem Vorkommen eines akuten Myokardinfarkt im Überblick (MONICA-Kontrollpopulation versus KORA-Herzinfarktpopulation; PBEF1)

Allerdings konnte bei den Männern ein signifikantes Ergebnis festgehalten werden: Zwei SNPs (rs3801272 und rs2058539) zeigten hinsichtlich ihrer P-Werte Auffälligkeiten (alle anderen SNPs wiesen P-Werte $> 0,05$ auf). Bei rs3801272 wurde ein P-Wert von 0,0482, bei rs2058539 ein Wert von 0,0498 ermittelt, sodass dieses Ergebnis als schwacher Hinweis für eine Assoziation gelten kann. Die Diagnose Herzinfarkt wurde dabei durchschnittlich am häufigsten bei den mit dem häufigen Allel homozygoten Probanden gestellt, am niedrigsten lag die Diagnoserate bei der anderen homozygoten Gruppe. Dazwischen befanden sich die Heterozygoten (Erkrankungshäufigkeiten Myokardinfarkt: Tab. 18). Bei den Frauen ergab sich kein Hinweis auf eine signifikante Abhängigkeit ($p > 0,05$).

SNP und Geschlecht	Homozygot häufiges Allel	Heterozygot	Homozygot seltenes Allel	P-Werte
rs3801272 (m)	46,11 % (n=475)	40,97 % (n=554)	36,00 % (n=175)	0,0482
rs2058539 (m)	46,67 % (n=435)	40,90 % (n=577)	37,04 % (n=189)	0,0498

Tab. 18: P-Werte signifikanter SNPs und Erkrankungshäufigkeiten in der SNP-Myokardinfarkt-Assoziation (MONICA-Kontrollpopulation versus KORA-Herzinfarktpopulation; PBEF1)
n=Anzahl der Probanden, die den Genotyp der entsprechenden Spalte aufweisen

3.1.4. Haplotyp-Assoziationsanalyse

Bei der Ermittlung der Haplotypassoziationsergebnisse wurden die oben genannten fünf häufigsten Haplotypen herangezogen und deren Vorkommen in Beziehung zu den Parameter und Phänotypen gesetzt. In einigen Analysen wurde auch beobachtet, ob die Anzahl der Haplotypkopien eine Rolle in der Entstehung pathologischer Parameterwerte bzw. Phänotypen spielt.

3.1.4.1. Allgemeinbevölkerung: MONICA-LVH-Substudie

Die ermittelten Haplotyphäufigkeiten in der Allgemeinbevölkerung sind in Tab. 19 zu finden:

Haplotyp	EM-Frequenz	Konfidenzintervall
Haplotyp 1	0.3044692	0.009663789
Haplotyp 2	0.2376793	0.008713364
Haplotyp 3	0.2372969	0.009465281
Haplotyp 4	0.1336057	0.007235512
Haplotyp 5	0.02840973	0.004018123

Tab. 19: Haplotypfrequenzen und Konfidenzintervalle der fünf häufigsten Haplotypen in der MONICA-Kontrollpopulation (PBEF1)

Signifikante Assoziationen in der nicht-geschlechtsspezifischen Auswertung zeigten sich bezüglich des HDL-Cholesterin-Parameters: hier waren die Haplotypen 3, 4 und 5 auffällig. Bei Vorhandensein des Haplotyp 3 waren die HDL-Cholesterin-Werte höher als bei Fehlen des Haplotypen (MW +/- SD und P-Werte: Tab. 20), wobei das Vorliegen von nur einer

Kopie des Haplotypen mit den höchsten HDL-Cholesterin-Werten (MW +/- SD: 55,48 +/- 17,067 mg/dl), das Vorliegen von zwei Kopien mit den niedrigsten Werten einherging (MW +/- SD: 51,86 +/- 12,659 mg/dl; keine Kopie: 53,03 +/- 16,612; P-Wert: 0,022). Bei Fehlen des Haplotyp 4 ergaben sich signifikant erhöhte HDL-Cholesterin Werte (Abb. 14; Übereinstimmung mit der Betrachtung der Kopienanzahl: keine Kopie: 54,80 +/- 16,842 mg/dl; eine Kopie: 50,71 +/- 15,861 mg/dl; zwei Kopien: 53,95 +/- 12,245 mg/dl), während die Anwesenheit des Haplotyp 5 zu erhöhten Werten führte (MW +/- SD und P-Werte: Tab. 20; die Kopienanalyse war hier nicht signifikant). Bei den Männern war Haplotyp 4 in gleicher Weise wie zuvor in der Gesamtauswertung auffällig (MW +/- SD und P-Werte: Tab. 20).

Haplotyp und Geschlecht	Haplotyp nicht vorhanden	Haplotyp vorhanden	P-Werte
Haplotyp 3 (ges)	53,03 +/- 16,612	54,99 +/- 16,573	0,034
Haplotyp 4 (ges)	54,80 +/- 16,842	50,99 +/- 15,597	0,0003
Haplotyp 5 (ges)	53,63 +/- 16,299	57,73 +/- 21,178	0,042
Haplotyp 4 (m)	48,87 +/- 14,841	45,95 +/- 12,373	0,016

Tab. 20: P-Werte, Mittelwerte und Standardabweichungen signifikanter Haplotypen in der Haplotyp-HDL-Cholesterin-Assoziation der MONICA-Kontrollpopulation (PBEF1); HDL-Cholesterin-Werte in mg/dl

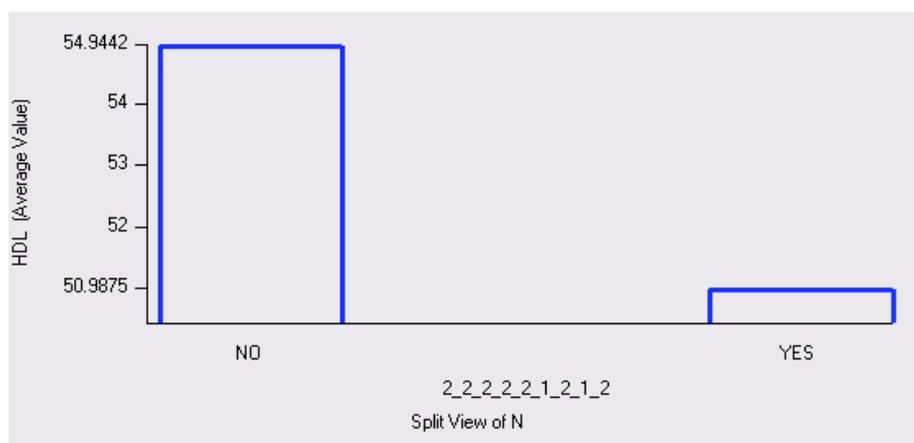


Abb. 14: nicht-geschlechtsspezifisches Histogramm der Haplotyp-4-Assoziation: signifikant erhöhte HDL-Cholesterin-Werte bei Fehlen dieses Haplotyp (MW +/- SD HDL-Cholesterin-Werte: Vorhandensein von Haplotyp 4: 50,99 +/- 15,597 mg/dl; Abwesenheit von Haplotyp 4: 54,80 +/- 16,842 mg/dl; P-Wert: 0,0003; y-Achse: HDL-Cholesterin-Mittelwert; x-Achse: Anwesenheit Haplotyp ja/nein)

Insgesamt zeigt sich, dass der Assoziationshinweis bei Haplotyp 4 bezüglich des HDL-Cholesterins am stärksten ist (Abb. 15; P-Wert von 0,0003).

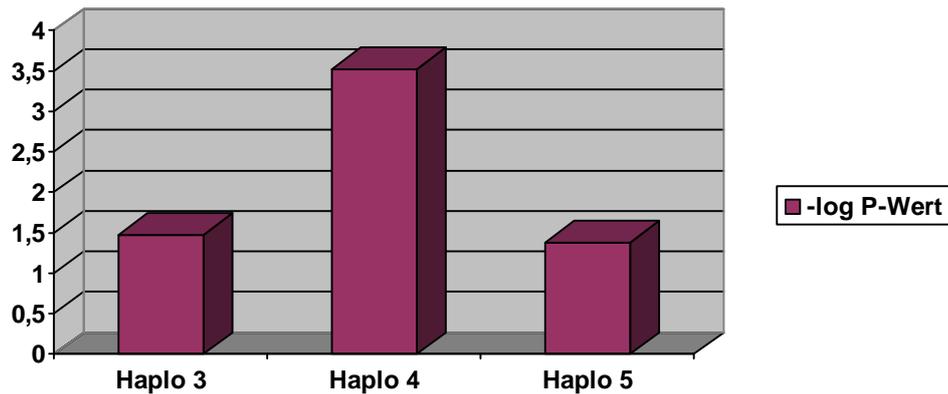


Abb. 15: Graphische Darstellung der P-Wertes der signifikanten Haplotypen bezüglich des HDL-Cholesterins; besonders herausragend ist der hohe Assoziationspeak bei Haplotyp 4; y-Achse: $-\log_{10}$ P-Werte; x-Achse: Haplotypen

Haplotyp 4 ist aber nicht nur beim HDL-Cholesterin auffällig, sondern zeigt auch Signifikanzen bei der Triglyzeridtestung (Abb. 16). Hier war er als einziger der fünf häufigsten Haplotypen im Signifikanzbereich (Tab. 21).

Haplotyp	P-Wert	aP-Wert	bP-Wert
Haplotyp 1 (ges)	0,453132436	0,453132436	1
Haplotyp 3 (ges)	0,432307944	0,432307944	1
Haplotyp 2 (ges)	0,749495777	0,749495777	1
Haplotyp 5 (ges)	0,812134592	0,812134592	1
Haplotyp 4 (ges)	0,019065482	0,019065482	0,629160915

Tab. 21: P-Werte für die Haplotyp-Assoziation bezüglich den logarithmischen Triglyzeridwerten im Überblick (MONICA-Kontrollpopulation; PBEF1)

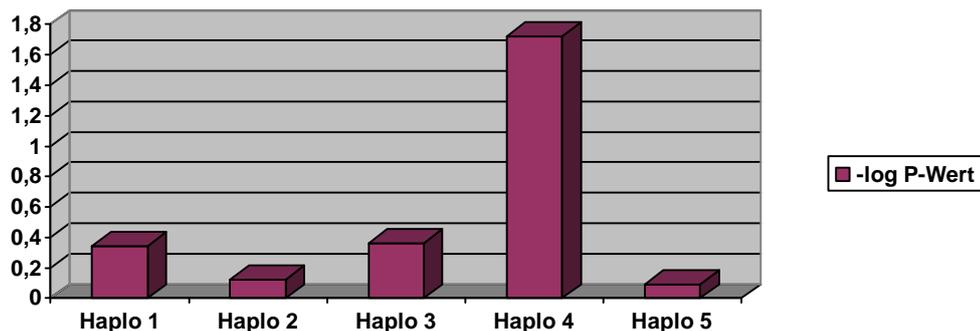


Abb. 16: Graphische Darstellung des P-Wertes der häufigsten Haplotypen bezüglich der logarithmischen Triglyzeridwerte; y-Achse: $-\log_{10}$ P-Werte; x-Achse: Haplotypen

Neben HDL-Cholesterin und Triglyzeriden ist auch der Erkrankungsphänotyp Dyslipidämie mit dem Haplotyp 4 assoziiert. Das Vorhandensein dieses Haplotypen ging mit einer erhöhten Prävalenz der Diagnose Dyslipidämie einher (MW +/- SD: „Haplotyp vorhanden“: 33,74 % bei n=329; „Haplotyp nicht vorhanden“: 27,44 % bei n=995; p-Wert: 0,031). Bei einer Kopie des Haplotypen war die Diagnoserate am höchsten, bei Vorliegen von zwei Kopien am

niedrigsten (MW +/- SD: eine Kopie: 35,22 % bei n=301; zwei Kopien: 17,86 % bei n=28; keine Kopie: 27,44 % bei n=995; P-Wert: 0,014), was sich auch in der männerspezifischen Auswertung erwies (MW +/- SD: eine Kopie: 35,84 % bei n=173; zwei Kopien: 11 % bei n=18; keine Kopie: 27,40 % bei n=489; P-Wert: 0,021). Bei den Männern war allerdings kein Assoziationsnachweis bezuglich dem Vorhandensein bzw. Fehlen von bestimmten Haplotypen festzustellen (für alle Haplos $p > 0,05$). In der Dyslipidamieanalyse spielt auch der Haplotyp 3 eine wichtige Rolle: Bei Probanden mit fehlendem Haplotyp war die Dyslipidämierate signifikant erhöhet im Vergleich zu Patienten mit nachgewiesenem Haplotyp (MW +/- SD: „Haplotyp nicht vorhanden“: 31,20 % bei n=766; „Haplotyp vorhanden“: 25,99% bei n=558; P-Wert: 0,038). Zur Anzahl der Kopien gab es keine Assoziationen ($p > 0,05$).

3.1.4.2. Herzinfarktfamilien: Regensburger Herzinfarktfamilienstudie (HIFAM)

Die Frequenzen der vier häufigsten Haplotypen sind in Tab. 22 zusammengestellt. Der Haplotyp 5 spielte in dieser Auswertung keine Rolle und wurde daher in der Tabelle nicht aufgeführt.

Haplotyp	EM-Frequenz	Konfidenzintervall
Haplotyp 1	0.3433207	0.02801773
Haplotyp 2	0.2351319	0.02533254
Haplotyp 3	0.2251569	0.02376992
Haplotyp 4	0.1232116	0.0197678

Tab. 22: Haplotypfrequenzen und Konfidenzintervalle der vier häufigsten Haplotypen in der HIFAM- und KORA-Population

Bei der Kontrollpopulation der HIFAM waren bei keinen der Parameter und Phänotypen Auffälligkeiten zu sehen ($p > 0,05$). Bei den Familienangehörigen ohne akuten Myokardinfarkt steht wieder Haplotyp 4 im Mittelpunkt: gleich bei mehreren Parametern bzw. Erkrankungsphänotypen weist er Signifikanzen auf, wobei neben dem HDL-Cholesterin auch das Gesamtcholesterin, das LDL-Cholesterin, der Taillenumfang und die Dyslipidämie betroffen sind. Hohe Werte des Gesamtcholesterin, des LDL-Cholesterin und des Taillenumfangs sind dabei mit einem vorhandenen Haplotyp assoziiert (MW +/- SD: Gesamtcholesterin mit $p=0,027$: „Haplotyp vorhanden“: 238,98 +/- 44,450 mg/dl, „Haplotyp nicht vorhanden“: 232,70 +/- 44,126 mg/dl; LDL-Cholesterin mit $p=0,003$: „Haplotyp vorhanden“: 150,52 +/- 43,258 mg/dl, „Haplotyp nicht vorhanden“: 142,27 +/- 42,964 mg/dl; Taillenumfang mit $p=0,009$: „Haplotyp vorhanden“: 90,96 +/- 12,425 cm, „Haplotyp nicht vorhanden“: 88,86 +/- 12,436 cm), hohe HDL-Cholesterin-Werte und eine geringe Dyslipidämierate mit dem Fehlen des besagten Marker (MW +/- SD: HDL-Cholesterin mit

p=0,001: „Haplotyp nicht vorhanden“: 54,73 +/- 16,825 mg/dl, „Haplotyp vorhanden“: 51,15 +/- 15,643 mg/dl; Dyslipidämie mit p=0,044: „Haplotyp nicht vorhanden“: 27,60 % bei n=989, „Haplotyp vorhanden“: 33,54 % bei n=322). Bei der Dyslipidämiedarstellung ist auch Haplotyp 3 betroffen: ein fehlender Nachweis dieses Haplotypen ist mit einer hohen Prävalenz unter den Probanden gekoppelt (MW +/- SD: „Haplotyp nicht vorhanden“: 31,18 % bei n=757, „Haplotyp vorhanden“: 26,17 % bei n=554; P-Wert: 0,048). Die Triglyzeride waren in allen Assoziationen dieser Teilpopulation unauffällig (p > 0,05).

In der Analyse der Indexpatienten zeigte sich ein zum größten Teil unauffälliges Bild. Die HDL-Cholesterin-Auswertung war ebenso ohne Assoziationsergebnis wie die Triglyzerid- und Dyslipidämieanalyse (p > 0,05). Allerdings war ein vorhandener Haplotyp 1 mit signifikant erhöhten HbA_{1c}-Werten in Zusammenhang zu bringen (MW +/- SD: Anwesenheit des Haplotypen: 5,86 +/- 1,623 %, Fehlen des Haplotypen: 5,63 +/- 1,196 %; P-Wert: 0,015).

3.1.4.3. Herzinfarktpopulation: KORA

Die Frequenzen der häufigsten Haplotypen entsprechen in etwa der Häufigkeitsverteilung in der HIFAM-Population (Tab. 22). Auch in dieser Population ist der Haplotyp 4 mit signifikanten Ergebnissen vertreten: Ein fehlender Haplotyp begünstigt gemäß der statistischen Auswertung die Entwicklung einer Dyslipidämie (MW +/- SD: Fehlen des Haplotypen: 39,69 % bei n=451, Anwesenheit des Haplotypen: 28,46 % bei n=130; P-Wert: 0,018), hohe systolische Blutdruckwerte korrelieren allerdings mit einem Nachweis dieses Haplotypen (MW +/- SD: Nachweis: 135,02 +/- 17,533 mmHg, fehlender Nachweis: 131,49 +/- 16,783 mmHg; P-Wert: 0,037). Auch bei den Haplotypen 1 und 3 zeigen sich Auffälligkeiten: Ein vorhandener Haplotyp 3 ist signifikant assoziiert mit hohen Gesamtcholesterin und LDL-Cholesterin-Werten (MW +/- SD: Gesamtcholesterin mit p=0,024: „Haplotyp vorhanden“: 229,03 +/- 46,396 mg/dl, „Haplotyp nicht vorhanden“: 220,74 +/- 41,999 mg/dl; LDL-Cholesterin mit p=0,015: „Haplotyp vorhanden“: 137,31 +/- 39,486 mg/dl, „Haplotyp nicht vorhanden“: 129,61 +/- 36,055 mg/dl), das Fehlen von Haplotyp 1 geht mit hohen Gesamtcholesterin-, LDL-Cholesterin- und BMI-Werten genauso wie mit einer hohen Adipositasdiagnoserate einher (MW +/- SD und P-Werte: Tab. 23).

Parameter/Phänotyp	Haplotyp 1 nicht vorhanden	Haplotyp 1 vorhanden	P-Werte
Gesamtcholesterin	229,12 +/- 44,91 mg/dl	220,04 +/- 43,10 mg/dl	0,013
LDL-Cholesterin	136,70 +/- 36,81 mg/dl	129,64 +/- 38,54 mg/dl	0,026
Body-Mass-Index	28,97 +/- 4,040 kg/m ²	27,92 +/- 3,331 kg/m ²	0,001
Adipositas	36,97 % (n=284)	24,92 % (n=297)	0,002

Tab. 23: P-Werte, Mittelwerte und Standardabweichungen der Haplotyp-1-Analyse bei signifikanten Parameter- und Phänotyp-assoziationen der KORA-Population (PBEF1); n=Anzahl der Probanden, die den Genotyp der entsprechenden Spalte aufweisen

In der gesamten KORA-Population zeigen sich allerdings keine Haplotyp-Assoziationen zu den sonst auffälligen HDL-Cholesterin- und Triglyzeridparameter (P-Werte: > 0,05).

3.1.4.4. Signifikanzen der Haplotypen zum Erkrankungsphänotyp akuter Myokardinfarkt

Genau wie bei der SNP-Assoziationsermittlung zum Phänotyp akuter Myokardinfarkt wurden die Genotypen einer Kontrollpopulation mit denen einer Herzinfarktpopulation verglichen. Die Ergebnisse sind in den zwei nachfolgenden Unterpunkten erläutert.

3.1.4.4.1. MONICA-LVH-Substudienprobanden gegen Indexpatienten der HIFAM

In der nicht-geschlechtsspezifischen Auswertung ergaben sich keinerlei Anhaltspunkte für eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein oder Fehlen der häufigsten Haplotypen und dem Vorkommen eines akuten Myokardinfarkt (Tab. 24).

Haplotyp	P-Wert	aP-Wert	bP-Wert
Haplotyp 3	0,138170949	0,138170949	0,552683795
Haplotyp 1	0,56037153	0,56037153	1
Haplotyp 2	0,453305396	0,453305396	1
Haplotyp 4	0,51969811	0,51969811	1

Tab. 24: P-Werte (nicht geschlechtsspezifisch) für die Haplotyp-Assoziation bezüglich dem Vorkommen eines akuten Myokardinfarkt im Überblick (MONICA-Kontrollpopulation versus HIFAM-Indexpatienten; PBEF1)

Bei den Männern konnte jedoch eine Signifikanz bezüglich Haplotyp 4 demonstriert werden (Abb. 17): Das Fehlen des Haplotyp begünstigt laut statistischer Auswertung der Kontingenztafel das Eintreten eines akuten Myokardinfarkts, während die Rate der Infarkte bei den Probanden mit Haplotypnachweis signifikant erniedrigt ist (MW +/- SD: fehlender Haplotyp: 59,37 % bei n=1.201 haben eine Herzinfarktanamnese; nachgewiesener Haplotyp: 53,58 % bei n=405 hatte einen Myokardinfarkt; P-Wert: 0,042).

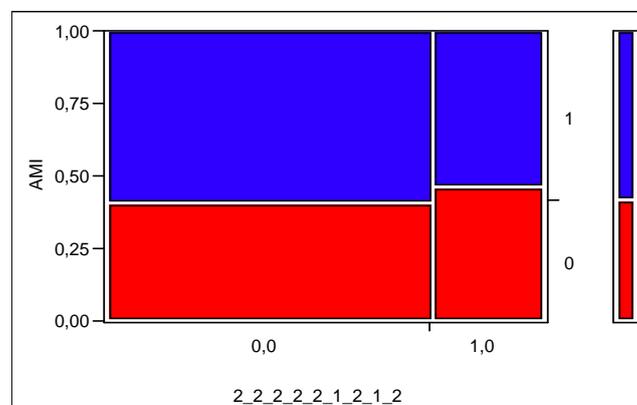


Abb. 17: Kontingenztafel der Assoziation akuter Myokardinfarkt-Haplotyp 4 (MONICA vs. HIFAM-Index); y-Achse: prozentualer Anteil MONICA/(MONICA+HIFAM-Index), x-Achse: 1,0=Haplotyp vorhanden (53,58 %); 0,0=Haplotyp nicht vorhanden (59,37 %); Farbe rot: MONICA-Pop.; Farbe blau: HIFAM-Index-Pop.; p=0,042

3.1.4.4.2. MONICA-LVH-Substudienprobanden gegen KORA-Probanden

In der nicht-geschlechtsspezifischen Auswertung (Tab. 25) waren keine signifikanten Ergebnisse nachzuweisen ebenso wie bei den weiblichen Probanden ($p > 0,05$).

Haplotyp	P-Wert	aP-Wert	bP-Wert
Haplotyp 3	0,232991483	0,232991483	1
Haplotyp 1	0,783527726	0,783527726	1
Haplotyp 2	0,910889293	0,910889293	1
Haplotyp 4	0,305061704	0,305061704	1

Tab. 25: P-Werte (nicht geschlechtsspezifisch) für die Haplotyp-Assoziation bezüglich dem Vorkommen eines akuten Myokardinfarkt im Überblick (MONICA-Kontrollpopulation versus KORA-Herzinfarktpopulation; PBEF1)

Bei den Männern konnte eine Signifikanz bezüglich Haplotyp 4 beschrieben werden (Abb. 18), deren Interpretation sich mit dem vorherigen Ergebnis in den Vergleichsanalysen MONICA-Kontrollpopulation gegen HIFAM-Indexpatienten deckt: ein fehlender Haplotyp 4 ist mit einer signifikanten Erhöhung der Infarktrate assoziiert (MW +/- SD: Fehlen des Haplotypen: 44,73 % bei n=883 haben eine Herzinfarktanamnese; Vorhandensein des Haplotypen: 37,33 % bei n=300 hatten einen Myokardinfarkt; P-Wert: 0,025).

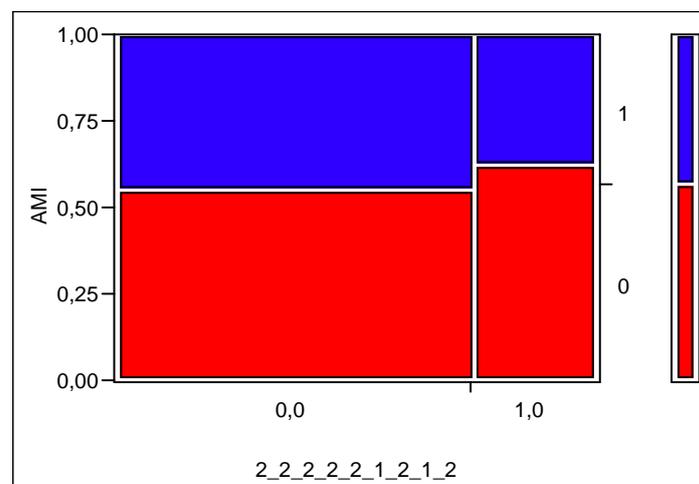


Abb. 18: Kontingenztabelle der Assoziation akuter Myokardinfarkt-Haplotyp 4 (MONICA vs. KORA); y-Achse: prozentualer Anteil MONICA/(MONICA+HIFAM-Index), x-Achse: 1,0=Haplotyp Vorhanden (37,33 %); 0,0=Haplotyp nicht vorhanden (44,73 %); Farbe rot: MONICA-Pop.; Farbe blau: HIFAM-Index-Pop.; $p=0,025$

3.2. Ergebnisse in der PIK3CA-Genanalyse

3.2.1. Genotypisierungsraten

Die Callrates aller 12 SNPs lagen über 95% und wurden zur weiteren statistischen Auswertung herangezogen. Zum Erreichen dieser Genotypisierungsraten konnte ausschließlich die 5'Exonuklease-Methode angewandt werden. Zusätzliche Genotypisierungsmethoden wurden nur im Rahmen der Visfatingenanalyse verwendet.

3.2.2. LD-Evaluation und Haplotypstruktur in der Allgemeinbevölkerung

Bei den einzelnen Populationen ergab sich auch bei der PIK3CA-Genanalyse kein nennenswerter Unterschied in der LD-Struktur, sodass im Folgenden (Abb. 19 und Abb. 20) nur die Ergebnisse der LD-Auswertung der Allgemeinbevölkerung dargestellt wurden:

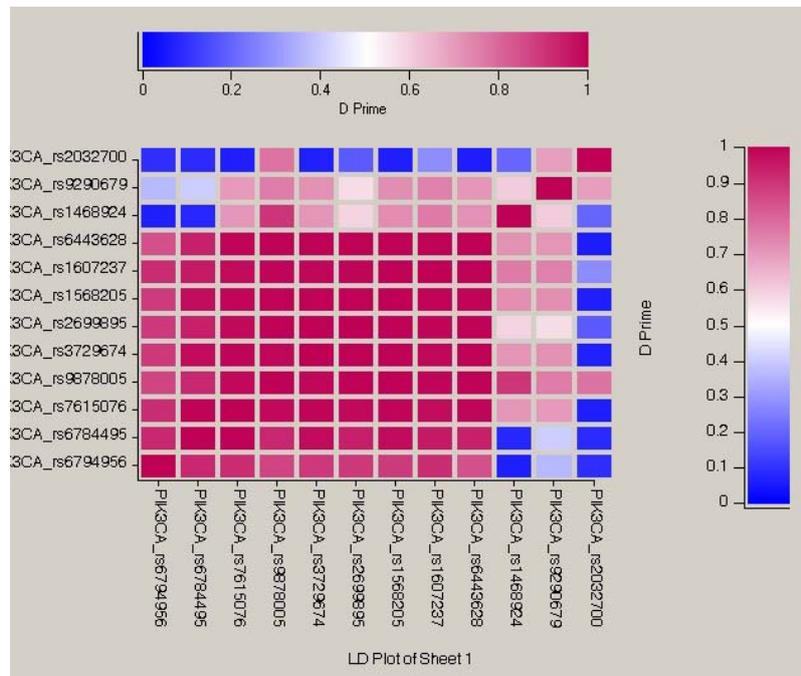


Abb. 19: D'-Messung Allgemeinbevölkerung:
rosarote Farbcodierung zeigt ein hohes LD, blaue Färbung ein niedriges LD an
von links nach rechts (unterer Rand): PIK3CA-SNPs von 3' nach 5'
von unten nach oben (linker Rand): PIK3CA-SNPs von 3' nach 5'

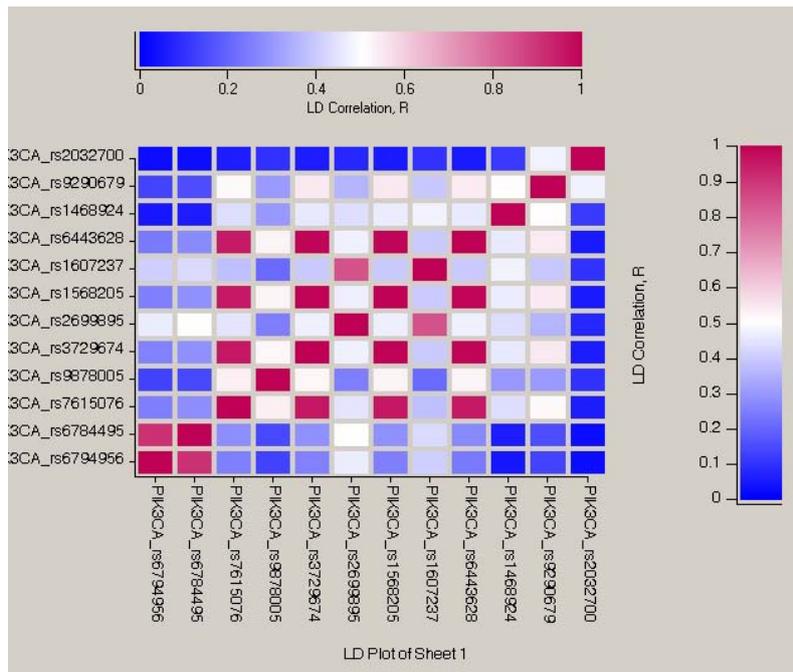
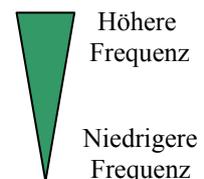


Abb. 20: r^2 -Analyse Allgemeinbevölkerung:
 rosarote Farbcodierung zeigt ein hohes LD, blaue Färbung ein niedriges LD an
 von links nach rechts (unterer Rand): PIK3CA-SNPs von 3' nach 5'
 von unten nach oben (linker Rand): PIK3CA-SNPs von 3' nach 5'

In der D' -Analyse (Abb. 19) zeigen sich besonders hohe LD-Werte zwischen neun der untersuchten SNPs (rs6794956, rs6794495, rs7615076, rs9878005, rs3729674, rs2699895, rs1568205, rs1607237 und rs6443628), mittlere bis hohe LD-Werte können zum einen zwischen rs1468424 und rs7615076, rs 9878005, rs3729674, rs1568205, rs1607237 oder rs6443628, zum anderen zwischen rs9290679 und rs7615076, rs9878005, rs3729674, rs1568205, rs1607237 oder rs6443628 erreicht werden. Eine schwache Korrelation zeigt der Rand-SNP rs2032700 (Ausnahme: Korrelation zu den SNPs rs9878005 und rs9290679) und stellt somit die äußerste Grenze zu einem LD-Block dar. Wenn man nur die besonders hohen Korrelationswerte zur Abgrenzung heranzieht, so ergibt sich rs644362 als LD-Blockgrenze. Zur anderen Seite hin kann in der D' -Analyse aufgrund der hohen LD-Werte kein Grenz-SNP benannt werden. Um weitere Aussagen über einen möglichen LD-Block zu treffen, muss die r^2 -Messung herangezogen werden. Die r^2 -Analyse (Abb. 20) zeigt, dass signifikant hohe LD-Korrelationen ($r^2 > 0,45$) vor allem in einem Bereich zu finden sind, dessen Grenzen bei rs7615076 und rs644362 liegen und der die SNPs rs9878005, rs3729674, rs2699895, rs1568205 und rs1607237 beinhaltet. Anhand schwachen, nicht signifikanten LD-Werten zwischen rs6794956/rs6794495 und den übrigen SNPs lässt sich im Gegensatz zur D' -Analyse der Grenz-SNP rs7615076 bestimmen. Allerdings zeigt sich bei der r^2 -Auswertung nicht das Muster eines geschlossenen LD-Blocks; die LD-Korrelationen zwischen manchen SNPs im Bereich zwischen rs7615076 und rs644362 liegen unterhalb der Signifikanzgrenze. Mit Hilfe der D' -Abgrenzung konnte jedoch ein LD-Block zwischen rs7615076 und

rs6443628 festgelegt werden, sodass man einen starken LD-Block von sieben SNPs mit einer Ausdehnung von 96,57 kb erhält. Dies bedeutet, dass das gesamte PIK3CA-Gen von diesem LD-Block überzogen ist und dass die Grenzen dieses Blocks bis in beide angrenzenden Zwischengenregionen reichen. Entsprechend des 7er-LD-Blocks wurden 7-Marker-Haplotypen konstruiert, wobei nur 5 von 2^7 möglichen Haplotypen in allen drei Populationen mit Hilfe der Expectation-Maximization-Methode (EM-Methode) auf eine Frequenz von über 0,02 geschätzt werden konnte (Tab. 26).

Haplotypen	Haplotypcodierung	Allelkombination	Frequenz
Haplotyp 1	1_1_1_2_1_2_1	C-C-A-C-C-T-C	0,38197
Haplotyp 2	1_1_1_1_1_1_1	C-C-A-A-C-C-C	0,32963
Haplotyp 3	2_1_2_1_2_1_2	T-C-G-A-T-C-T	0,12457
Haplotyp 4	1_1_1_2_1_1_1	C-C-A-C-C-C-C	0,08174
Haplotyp 5	2_2_2_1_2_1_2	T-T-G-A-T-C-T	0,06571



Tab. 26: häufigste Haplotypen für alle Populationen mit Allelbezeichnung und Frequenz
1 = häufiges Allel; 2 = seltenes Allel; C,G,A,T = Basencodes

Die Gesamtfrequenz der häufigsten drei Haplotypen betrug in der Allgemeinpopulation über 95 %. Zusätzlich zu den Einzelmarker (SNPs) wurde wiederum die Assoziation der häufigsten Haplotypen (über 0,02) zu den verschiedenen Parameter und Phänotypen untersucht.

3.2.3. Assoziationsanalyse einzelner SNPs im PIK3CA-Gen

3.2.3.1. Allgemeinbevölkerung: MONICA-LVH-Substudie

In der SNP-Assoziationsanalyse zeigten sich Auffälligkeiten in der Beziehung einzelner SNPs zum HbA1c-Wert. Sowohl bei der nicht-geschlechtsspezifischen Untersuchung als auch bei der Untersuchung der Männerpopulation ergaben sich Signifikanzen bei zwei SNPs (rs9290679 und rs2032700). In beiden Untersuchungen gab es zwischen dem häufigem Allel beider SNPs und einem hohem HbA1c-Wert negative Assoziationen: die homozygoten Probanden mit seltenem Allel wiesen signifikant höhere HbA1c-Werte auf als die heterozygoten Probanden. Diese wiederum hatten höhere Werte als die homozygoten Probanden mit dem häufigen Allel (MW +/- SD und P-Werte: Tab. 27).

SNP und Geschlecht	Homozygot häufiges Allel	Heterozygot	Homozygot seltenes Allel	P-Werte
rs9290679 (ges)	5,25 +/- 0,859	5,27 +/- 0,743	5,47 +/- 1,179	0,029
rs9290679 (m)	5,18 +/- 0,826	5,20 +/- 0,836	5,55 +/- 1,484	0,006
rs2032700 (ges)	5,24 +/- 0,824	5,32 +/- 0,876	5,66 +/- 1,367	0,007
rs2032700 (m)	5,19 +/- 0,845	5,26 +/- 0,998	5,67 +/- 1,772	0,048

Tab. 27: P-Werte, Mittelwerte und Standardabweichungen signifikanter SNPs in der SNP-HbA1c-Assoziation der MONICA-Kontrollpopulation (PIK3CA); HbA1c-Werte in %

Eine weitere Assoziation (rs1607237) ließ sich bei den Männern darstellen: hier war das Vorkommen des seltenen Allels mit einem niedrigerem HbA1c-Wert assoziiert (MW +/- SD HbA1c-Werte: Genotyp homozygot häufiges Allel: 5,31 +/- 1,05 %; Genotyp homozygot seltenes Allel: 5,03 +/- 0,09 %; p-Wert: 0,033).

In der Diabetes-mellitus-Evaluation der Gesamtbevölkerung ergaben sich Auffälligkeiten bei rs2032700 (häufiges Allel geht mit geringem Vorkommen eines Diabetes mellitus einher), bei den Männern waren Signifikanzen bei zwei SNPs (rs7615076 und rs9290679) vorhanden. Bei Letzterem war die Assoziation entsprechend dem SNP rs2032700 in der nicht-geschlechtsspezifischen Analyse (MW +/- SD und P-Werte: Tab. 28).

SNP und Geschlecht	Homozygot häufiges Allel	Heterozygot	Homozygot seltenes Allel	P-Werte
rs2032700 (ges)	-0,05 +/- 1,187	0,04 +/- 1,309	0,43 +/- 1,997	0,041
rs9290679 (m)	-0,84 +/- 0,076	-0,04 +/- 0,081	0,36 +/- 0,162	0,041

Tab. 28: P-Werte, Mittelwerte (PC-Werte) und Standardabweichungen signifikanter SNPs in der SNP-Diabetes-Assoziation der MONICA-Kontrollpopulation (PIK3CA)

Bei rs7615076 war der Heterozygote Genotyp mit dem häufigsten Vorkommen des Diabetes assoziiert, die Homozygoten mit dem seltenen Allel hatten die niedrigste Diabetesrate.

Die Cholesterin-bezogene Auswertung erbrachte ein signifikantes Ergebnis bei rs6794956: die heterozygoten Probanden hatten die niedrigsten Gesamtcholesterinwerte, die homozygoten Probanden mit dem seltenen Allel wiesen die höchste Cholesterinkonzentration auf (MW +/- SD Cholesterinwerte: heterozygoter Genotyp: 229,9 +/- 41,2 mg/dl; Genotyp homozygot seltenes Allel: 237,0 +/- 49,3 mg/dl).

Eine weitere signifikante SNP-Parameter-Assoziation wurde bei der nicht-geschlechtsspezifischen als auch bei der frauenspezifischen Hypertonieauswertung gefunden. Dabei war rs9878005 in beiden Fällen signifikant: Sowohl in der Gesamtpopulation als auch bei den Frauen ging ein bezüglich des häufigen Allels homozygoter Genotyp mit einer geringeren Prävalenz der arteriellen Hypertonie einher (Hypertoniehäufigkeit Gesamtpopulation: 41,58 % bei n=1229; Hypertoniehäufigkeit Frauen: 37,32 % bei n=611). In der Gesamtpopulation konnte weiterhin dargestellt werden, dass in Bezug auf rs1607237 das seltene Allel mit einem geringen Vorkommen, das häufige Allel mit einer hohen Hypertonierate assoziiert ist. In der weiblichen Probandengruppe war rs7615076 in umgekehrter Assoziation signifikant (Erkrankungshäufigkeiten und P-Werte zur Hypertonieauswertung: Tab. 29).

SNP und Geschlecht	Homozygot häufiges Allel	Heterozygot	Homozygot seltenes Allel	P-Werte
rs9878005 (ges)	41,58 % (n=1229)	53,57 % (n=168)	42,02 % (n=7)	0,014
rs9878005 (w)	37,32 % (n=611)	54,32 % (n=81)	100 % (n=1)	0,006
rs1607237 (ges)	47,93 % (n=532)	40,86 % (n=673)	37,69 % (n=199)	0,012
rs7615076 (w)	36,20 % (n=442)	42,92 % (n=233)	61,11 % (n=18)	0,038

Tab. 29: P-Werte signifikanter SNPs und Erkrankungshäufigkeiten in der SNP-Hypertonie-Assoziation der MONICA-Kontrollpopulation (PIK3CA); n=Anzahl der Probanden, die den Genotyp der entsprechenden Spalte aufweisen

Die Adipositas-bezogene, nicht-geschlechtsspezifische Untersuchung demonstriert einen auffälligen SNP (rs1468924): Probanden, die bezogen auf das seltene Allel einen Homozygoten Genotyp besitzen, zeigen das niedrigste Adipositasvorkommen, Patienten, die homozygot bezüglich des häufigen Allels sind, weisen eine hohe Adipositasrate auf (MW +/- SD der PC-Werte der Adipositasauswertung: homozygoter Genotyp seltenes Allel: -0,24 +/- 1,523; homozygoter Genotyp häufiges Allel: 0,09 +/- 1,605; P-Wert: 0,047). Die geschlechtsspezifische Untersuchung bezüglich Fettleibigkeit erbrachte ebenso unauffällige Ergebnisse wie die Assoziationen bezüglich den restlichen oben genannten Parametern und Phänotypen (P-Werte > 0,05).

3.2.3.2. MONICA-LVH-Substudienprobanden gegen Patienten der HIFAM-Studie

Um Unterschiede in der Genotypenverteilung bei nicht kardiogenetisch vorbelasteten Probanden im Vergleich zu einem Patientengut zu eruieren, welches einen oder mehrere akute Myokardinfarkte in der Familie aufweist, wurde die Kontrollpopulation der MONICA-LVH-Substudie den Patienten der HIFAM-Studie gegenübergestellt und sowohl in nicht-geschlechtsspezifischen Untersuchungen als auch in Abhängigkeit vom Geschlecht versucht, Signifikanzen herauszufinden. Bei Miteinbeziehung von beiden Geschlechtern waren zwei SNPs (rs7615076 und rs9290679) auffällig.

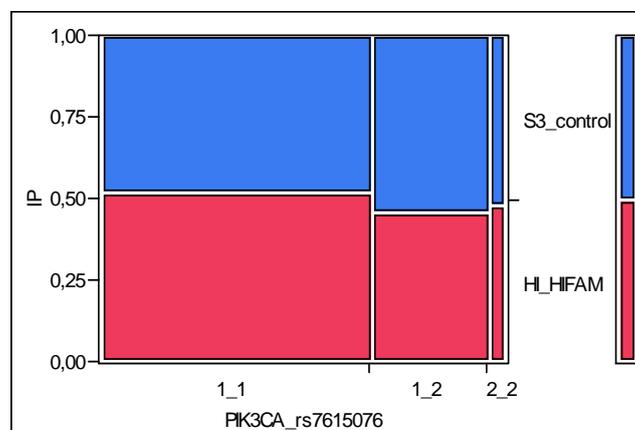


Abb. 21: Kontingenztabelle Genotypenverteilung HIFAM vs. Kontrollgruppe (rs7615076); 1_1: homozygot häufiges Allel (51,69 %); 1_2: heterozygot (45,97 %); 2_2: homozygot seltenes Allel (47,87 %); p=0,022
IP: Prozentualer Anteil der HIFAM-Population an den jeweiligen Genotypen

Hierbei konnte dargestellt werden, dass die Probanden der HIFAM-Population einen signifikant hohen Anteil an der Gesamtzahl der homozygoten Genotypen bezüglich des häufigen Allels einnahmen (bei rs7615076: 51,69 % von insgesamt 1894 Probanden mit dem Genotyp „homozygot in Bezug auf das häufige Allel“ waren Teilnehmer der HIFAM-Studie; im Vergleich: nur 45,97 % der insgesamt 818 Heterozygoten gehörten zu den Herzinfarktfamilien; siehe Tab. 30, Abb. 21).

SNP und Geschlecht	Homozygot häufiges Allel	Heterozygot	Homozygot seltenes Allel	P-Werte
rs7615076 (ges)	51,69 % (n=1894)	45,97 % (n=818)	47,87 % (n=94)	0,022
rs9290679 (ges)	51,71 % (n=1400)	48,92 % (n=1155)	43,64 % (n=236)	0,0499
rs9290679 (m)	61,00 % (n=864)	57,83 % (n=709)	50,00 % (n=154)	0,033
rs7615076 (w)	37,57 % (n=708)	29,39 % (n=330)	48,57 % (n=35)	0,010
rs3729674 (w)	37,74 % (n=681)	30,52 % (n=344)	42,50 % (n=40)	0,047
rs1568205 (w)	37,93 % (n=675)	30,59 % (n=340)	42,50 % (n=40)	0,045

Tab. 30: Genotyphäufigkeiten der HIFAM-Studienteilnehmer in Bezug auf signifikante SNPs im Vergleich MONICA-Kontrollpopulation versus HIFAM-Population und die dazugehörigen P-Werte (PIK3CA)
n=Anzahl der Probanden, die den Genotyp der entsprechenden Spalte aufweisen

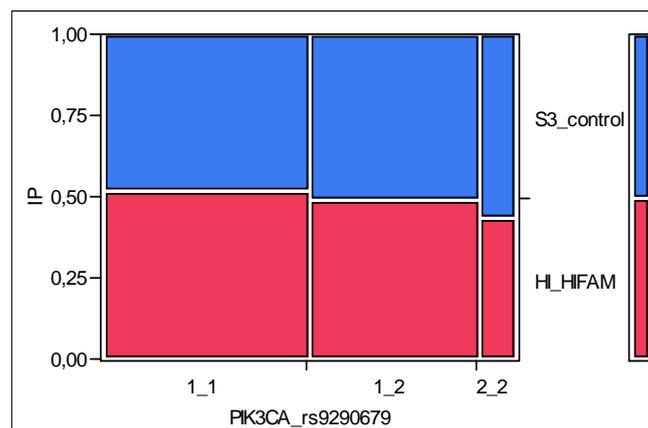


Abb. 22: Kontingenztabelle Genotypenverteilung HIFAM vs. Kontrollgruppe (rs9290679); 1_1: homozygot häufiges Allel (51,69 %); 1_2: heterozygot (48,92 %); 2_2: homozygot seltenes Allel (43,64 %); p=0,0499
IP: Prozentualer Anteil der HIFAM-Population an den jeweiligen Genotypen

Der P-Wert der rs9290679-Assoziation lag grenzwertig bei 0,0499 und konnte lediglich nur als schwache Assoziation gewertet werden. In dieser Untersuchung zeigten sich die homozygoten Genotypen als randständig in Bezug auf die Vorkommenshäufigkeiten (Abb. 22). Wie auch bei der vorherigen Kontingenzanalyse waren die meisten Probanden, welche den Genotyp „homozygot häufiges Allel“ besaßen, HIFAM-Studienteilnehmer (51,71 % von 1400 Probanden). Das seltene Allel war zu einem hohen Anteil bei den Kontrollprobanden vorhanden. In der männerbezogenen Auswertung ergaben sich bei diesem SNP diesselben Assoziationen (Tab. 30). Unter den Frauen waren drei auffällige SNPs auszumachen: Es handelte sich bei diesen um die Polymorphismen rs7615076, rs3729674 und rs1568205. Dabei verhielten sie sich in Bezug auf die Genotypverteilung unter den Populationen auf eine

ähnliche Weise (Tab. 30). Ein Unterschied zu den vorangegangenen Untersuchungen war lediglich in der geringeren Anzahl der weiblichen HIFAM-Studienteilnehmer im Vergleich zur Gesamtzahl der Frauen in der Kontrollgruppe zu sehen. Entsprechend geringer zeigten sich also die Anteile der HIFAM-Genotypen. Die restlichen SNPs wiesen keinerlei Signifikanzen auf (P-Werte > 0,05).

3.2.4. Haplotyp-Assoziationsanalyse der Allgemeinbevölkerung

Die berechneten Haplotyphäufigkeiten mit Konfidenzintervalle sind in Tabelle 31 zu finden:

Haplotyp	EM-Frequenz	Konfidenzintervall
Haplotyp 1	0.381974	0.01854904
Haplotyp 2	0.3296329	0.01791987
Haplotyp 3	0.124571	0.01260818
Haplotyp 4	0.0817355	0.01046441
Haplotyp 5	0.06571423	0.009459056

Tab. 31: Haplotyphäufigkeiten und Konfidenzintervalle der fünf häufigsten Haplotypen in der MONICA-Kontrollpopulation (PIK3CA)

Bei der Ermittlung der Haplotypassoziationsergebnisse wurden die oben genannten fünf häufigsten Haplotypen herangezogen und deren Vorkommen in Beziehung zu den Parameter und Phänotypen gesetzt.

In der nicht-geschlechtsspezifischen BMI-Analyse konnten drei der fünf häufigsten Haplotypen herausgehoben werden (Abb. 23):

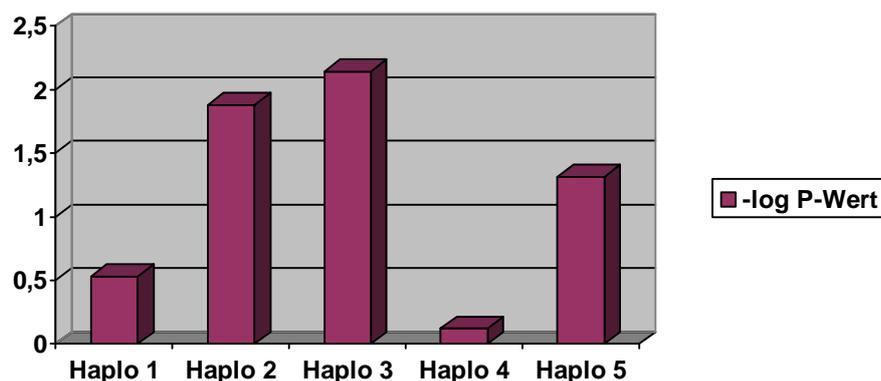


Abb. 23: Graphische Darstellung (BMI-Analyse) des P-Wertes der fünf häufigsten Haplotypen; y-Achse: -log₁₀ P-Wert; x-Achse: häufigste Haplotypen

die Haplotypen 2, 3 und 5 zeigten signifikante aP-Werte (Tab. 32). Zusätzlich zum Phänotyp „erhöhter BMI“ wurde eine Assoziationsuntersuchung bezüglich des Phänotyps „BMI über 30“ durchgeführt. Hierbei konnte nur ein Haplotyp (Haplotyp 5) Signifikanzen aufweisen (Tab. 33, Abb. 24).

Haplotyp	P-Wert	aP-Wert	bP-Wert
Haplotyp 2	0,013250251	0,013250251	0,066251254
Haplotyp 1	0,293833605	0,293833605	1
Haplotyp 4	0,753132939	0,753132939	1
Haplotyp 5	0,048476718	0,048476718	0,242383591
Haplotyp 3	0,00725144	0,00725144	0,036257201

Tab. 32: P-Werte (nicht-geschlechtsspezifisch) für die Haplotyp-Assoziation bezüglich den BMI-Werten im Überblick (MONICA-Kontrollpopulation; PIK3CA)

Haplotyp	P-Wert	aP-Wert	bP-Wert
Haplotyp 2	0,214620621	0,214620621	1
Haplotyp 1	0,665631615	0,665631615	1
Haplotyp 4	0,540303299	0,540303299	1
Haplotyp 5	0,01920651	0,01920651	0,09603255
Haplotyp 3	0,22523574	0,22523574	1

Tab. 33: P-Werte (nicht-geschlechtsspezifisch) für die Haplotyp-Assoziation bezüglich dem Vorkommen von BMI-Werten über 30 kg/m² im Überblick (MONICA-Kontrollpopulation; PIK3CA)

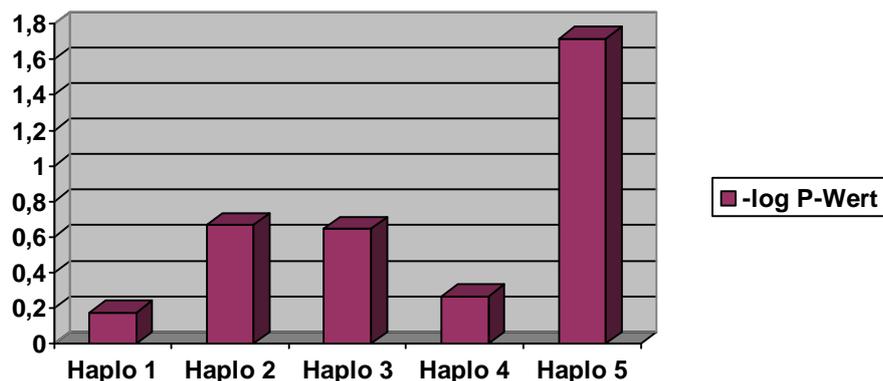


Abb. 24: Graphische Darstellung („BMI > 30“) des P-Wertes der fünf häufigsten Haplotypen; y-Achse: -log₁₀ P-Wert; x-Achse: häufigste Haplotypen

In weiteren geschlechtsunabhängigen Auswertungen konnte das Vorliegen von verschiedenen Haplotypen mit dem Vorkommen von bestimmten Phänotypen assoziiert werden. So war z. B. das Vorkommen des Haplotyp 5 mit signifikanten Abweichungen des diastolischen Blutdrucks (Tab. 34), Haplotyp 3 mit Veränderungen der HDL-Cholesterin-Werte (Tab. 35).

Haplotyp	P-Wert	aP-Wert	bP-Wert
Haplotyp 2	0,991731139	0,991731139	1
Haplotyp 1	0,325696515	0,325696515	1
Haplotyp 4	0,330678565	0,330678565	1
Haplotyp 5	0,011197381	0,011197381	0,055986906
Haplotyp 3	0,683972283	0,683972283	1

Tab. 34: P-Werte (nicht-geschlechtsspezifisch) für die Haplotyp-Assoziation bezüglich diastolischer Blutdruckwerte (MONICA-Kontrollpopulation, PIK3CA)

Haplotyp	P-Wert	aP-Wert	bP-Wert
Haplotyp 2	0,233850497	0,233850497	1
Haplotyp 1	0,526803172	0,526803172	1
Haplotyp 4	0,849389098	0,849389098	1
Haplotyp 5	0,1897569	0,1897569	0,9487845
Haplotyp 3	0,0022541	0,0022541	0,011270498

Tab. 35: P-Werte (nicht-geschlechtsspezifisch) für die Haplotyp-Assoziation bezüglich den HDL-Werten (MONICA-Kontrollpopulation; PIK3CA)

Haplotyp 1 und 5 zeigte Signifikanzen in Bezug auf den Phänotyp „arterielle Hypertonie“ (Tab. 36), Haplotyp 2, 3 und 5 waren mit dem Vorliegen eines metabolischen Syndroms (Tab. 37), Haplotyp 1 mit Veränderungen bezüglich des systolischen Blutdrucks (Tab. 38) und Haplotyp 3 mit signifikanten Werten der Triglyzeride im Blut (Tab. 39) bzw. auffälligen Werten des Taillenumfangs (Tab. 40) assoziiert.

Haplotyp	P-Wert	aP-Wert	bP-Wert
Haplotyp 2	0,180181262	0,180181262	0,900906311
Haplotyp 1	0,003041896	0,003041896	0,01520948
Haplotyp 4	0,170168372	0,170168372	0,850841862
Haplotyp 5	0,003382134	0,003382134	0,016910672
Haplotyp 3	0,847012575	0,847012575	1

Tab. 36: P-Werte (nicht-geschlechtsspezifisch) für die Haplotyp-Assoziation bezüglich dem Vorkommen der Hypertonie (MONICA-Kontrollpopulation; PIK3CA)

Haplotyp	P-Wert	aP-Wert	bP-Wert
Haplotyp 2	0,02594612	0,02594612	0,129730598
Haplotyp 1	0,246315722	0,246315722	1
Haplotyp 4	0,923849101	0,923849101	1
Haplotyp 5	0,016157563	0,016157563	0,080787815
Haplotyp 3	0,001942096	0,001942096	0,009710479

Tab. 37: P-Werte (nicht-geschlechtsspezifisch) für die Haplotyp-Assoziation bezüglich dem metabolischen Syndrom (MONICA-Kontrollpopulation; PIK3CA)

Haplotyp	P-Wert	aP-Wert	bP-Wert
Haplotyp 2	0,409500571	0,409500571	1
Haplotyp 1	0,009249616	0,009249616	0,046248082
Haplotyp 4	0,238343488	0,238343488	1
Haplotyp 5	0,074289211	0,074289211	0,371446057
Haplotyp 3	0,986848295	0,986848295	1

Tab. 38: P-Werte (nicht-geschlechtsspezifisch) für die Haplotyp-Assoziation bezüglich systolischer Blutdruckwerte (MONICA-Kontrollpopulation; PIK3CA)

Haplotyp	P-Wert	aP-Wert	bP-Wert
Haplotyp 2	0,885792033	0,885792033	1
Haplotyp 1	0,722018267	0,722018267	1
Haplotyp 4	0,925203552	0,925203552	1
Haplotyp 5	0,148092392	0,148092392	0,740461958
Haplotyp 3	0,002613415	0,002613415	0,013067077

Tab. 39: P-Werte (nicht-geschlechtsspezifisch) für die Haplotyp-Assoziation bezüglich den Triglyzeridwerten (MONICA-Kontrollpopulation; PIK3CA)

Haplotyp	P-Wert	aP-Wert	bP-Wert
Haplotyp 2	0,069208798	0,069208798	0,346043991
Haplotyp 1	0,204971468	0,204971468	1
Haplotyp 4	0,377026419	0,377026419	1
Haplotyp 5	0,064114251	0,064114251	0,320571255
Haplotyp 3	0,002060272	0,002060272	0,010301359

Tab. 40: P-Werte (nicht-geschlechtsspezifisch) für die Haplotyp-Assoziation bezüglich des Taillenumfanges (MONICA-Kontrollpopulation; PIK3CA)

3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Durch die Analyse der genomischen Struktur in den PBEF1- und PIK3CA-Genregionen konnte jeweils ein LD-Block festgestellt werden. Im Falle der Visfatingenregion war ein LD zwischen den innen gelegenen neun untersuchten SNPs festzustellen, bei der PIK3CA-Untersuchung ergab sich ein Haploblock zwischen sieben der zwölf einbezogenen SNPs. In beiden Genregionen konnten für die untersuchten Populationen fünf relevante Haplotypen (9-Marker-Haplotypen in der PBEF1-Region und 7-Marker-Haplotypen in der PIK3CA-Region) zur weiteren Assoziation konstruiert werden.
2. In der Visfatingenanalyse bezüglich der Allgemeinbevölkerung und der Population der Familienangehörigen ohne Myokardinfarktanamnese innerhalb der HIFAM-Studie ergeben sich folgende auffällige SNP-Assoziationen: die in Bezug auf das seltene Allel homozygoten Genotypen der SNPs rs10953501, rs10953502, rs3801272, rs4730153 und rs1319313 gehen mit günstigen metabolischen Parameterwerten und einer eher verminderten Rate an kardiometabolischen Erkrankungsphänotypen einher. So sind in der nicht-geschlechtsspezifischen Analyse, z. B. hohe HDL-Cholesterin-Werte (rs1319313: $p=0,002$), signifikant erniedrigte Triglyzeridwerte (rs1319313: $p=0,006$) und eine niedrige Dyslipidämierate zu verzeichnen. In der geschlechtsspezifischen Auswertung bezüglich der HDL-Cholesterin-Auswertung und Dyslipidämievorkommen betreffen Signifikanzen unter der weiblichen Bevölkerung vorwiegend den SNP rs1319313. Bei den Männern sind durchgehend die restlichen o.g. SNPs auffällig.

3. In der Visfatingenanalyse bezüglich der Kontrollbevölkerung innerhalb der HIFAM-Population gab es sowohl in der nicht-geschlechtsspezifischen als auch in der frauenspezifischen Auswertung eine Signifikanz bei rs1319313: der homozygote Genotyp mit dem seltenen Allel geht mit einem niedrigen HbA_{1c}-Wert einher und passt somit zu den Ergebnissen der Allgemeinbevölkerung.
4. Bei der PBEF1-SNP-Analyse der HIFAM-Population mit Myokardinfarktnachweis und der KORA-Population konnten keine Signifikanzen in Bezug auf Blutfettwerte und Dyslipidämie nachgewiesen werden. Allerdings waren signifikante BMI-Werte und Auffälligkeiten der Adipositasrate zu verzeichnen: die in Bezug auf das seltene Allel homozygoten Genotypen der SNPs rs 10953501, rs10953502, rs4730153 und rs1319313 gehen mit hohen BMI-Werten und einem erhöhten Vorkommen an Adipositas (rs10953502: p=0,018) im Vergleich zu den anderen Homozygoten einher und erweisen sich hier als prognostisch ungünstige Genotypen.
5. Eine Gegenüberstellung von Kontrollpopulation und Herzinfarktpopulationen im Rahmen der SNP-Visfatingenauswertung erbrachte folgende Ergebnisse: die nicht-geschlechtsspezifische Untersuchung zeigte keine signifikanten Assoziationen. Lediglich im KORA-Vergleich konnten bei den Männern zwei schwache Signifikanzen (rs 3801272: p=0,0482 und rs2058539: p=0,0498) getestet werden.
6. Die Visfatin-Haplotypauswertung in der Allgemeinbevölkerung zeigte vorwiegend drei signifikante Haplotypen: Das Vorhandensein der Haplotypen 3 und 5 ging vorwiegend mit prognostisch günstigen Blutfettwerten einher, während die Anwesenheit von Haplotyp 4 mit niedrigen HDL-Cholesterin-Werten (p=0,0003) und einer hohen Dyslipidämiehäufigkeit korreliert. Letzterer Haplotyp zeigt sich auch in der myokardinfarktnegativen HIFAM-Population in gleicher Weise auffällig. Zusätzlich sind hier noch hohe Taillenumfangwerte (p=0,009) sowie hohe Gesamt- und LDL-Cholesterinwerte (p=0,003) mit dem Vorhandensein des Haplotyp 4 assoziiert. In der KORA-Population zeigt dieser Genotyp auch eine Verbindung zu hohen systolischen Blutdruckwerten.
7. Stellt man Kontrollpopulation und Herzinfarktpopulationen im Zuge der Haplotyp-PBEF1-Assoziationsuntersuchung gegenüber, so fallen in der nicht-geschlechtsspezifischen Auswertung keine signifikanten Abhängigkeiten auf. In der männerspezifischen Analyse zeigt sich, dass die Anwesenheit des Haplotyp 4 entgegen den Erwartungen, die man aufgrund der vorher genannten Ergebnisse haben könnte, mit

einer geringeren Herzinfarktrate assoziiert ist (HIFAM vs. Kontrollpopulation: $p=0,042$; KORA vs. Kontrollpopulation: $p=0,025$).

8. Die Ergebnisse der Abhängigkeitsuntersuchung bestimmter metabolischer Parameter bzw. Erkrankungsphänotypen von der Anzahl der Haplotypkopien waren signifikant. Die Erwartung, dass die Anzahl der Haplotypkopien mit den Parameterwerten bzw. dem Vorkommen bestimmter Erkrankungsphänotypen korreliert, ließ sich in den wenigen Analysen jedoch nicht bestätigen (beispielsweise wird die Diagnose Dyslipidämie am häufigsten beim Vorhandensein einer Haplotypkopie des Haplotyp 4 gestellt).
9. In der PIK3CA-SNP-Analyse konnten bezüglich der Allgemeinbevölkerung einige Risiko-SNPs identifiziert werden: so sind z. B. die mit dem seltenen Allel homozygoten Patienten in Bezug auf die SNPs rs9290679 und rs2032700 mit einem größeren Risiko belastet, hohe HbA_{1c}-Werte zu entwickeln (rs2032700: $p=0,007$) und die Diagnose Diabetes mellitus zu bekommen. Der Erkrankungsphänotyp Hypertonie war mit dem seltenen Allel des SNPs rs9878005 und dem häufigen Allel von rs1607237 ($p=0,012$) assoziiert.
10. Die PIK3CA-Haplotyp-Analyse zeigte innerhalb der Allgemeinbevölkerung Signifikanzen vor allem der Haplotypen 2, 3, und 5: Diese waren in der BMI-Assoziation sowie in der Beziehung zum Erkrankungsphänotyp „MetS“ von Bedeutung.
11. In der Gegenüberstellung von Kontrollpopulation und Probanden der HIFAM-Studie waren in der nicht-geschlechtsspezifischen Auswertung zwei SNPs auffällig, wobei einer davon (rs9290679) an der Signifikanzgrenze lag. Der andere SNP (rs7615076) zeigte eine deutlich strengere Assoziation ($p=0,022$). Das homozygot häufige Allel ging dabei mit einer erhöhten Rate an Herzinfarkten in der Familie einher.

4. DISKUSSION

4.1. Diskussion der Methoden

4.1.1. Studienpopulationen

Die Kontrollpopulation als Teil der dritten MONICA-Studie wurde zufällig in einer 2-stufigen Clusterstichprobe aus der Gesamtpopulation von Augsburg und Umgebung ausgewählt. Es handelt sich hierbei also um ein Probandengut, das nicht vorselektiert wurde z.B. im Rahmen von Krankenhausaufenthalten der Studienteilnehmer. Man kann aufgrund der großen Einwohneranzahl von Augsburg und den 16 umliegenden Kommunen in den beiden angrenzenden Landkreisen davon ausgehen, dass zwischen den teilnehmenden Personen keine nahen Verwandtschaftsverhältnisse bestehen. Selbst wenn der äußerst unwahrscheinliche Fall einer näheren Verwandtschaft von Probanden gegeben wäre, würde dies aus statistischer Sicht wegen der großen Studienteilnehmeranzahl von 1678 Personen keinen signifikanten Effekt bedeuten. Auch andere individuelle Störgrößen und nichtsystematische Fehler können deswegen nur geringe oder gar keine Auswirkungen haben. Systematische Fehler versuchte man zu vermeiden, indem man in der apparativen Diagnostik nach standardisierten Kriterien vorging (z.B. nach den Kriterien der American Society of Echokardiography bei der Echokardiographie). In der Labordiagnostik wurde auf gut etablierte und validierte Techniken (z.B. Triglyzerid- und Cholesterinspiegel im Blut) bei der Parameterbestimmung vertraut. Die verwendeten Parameter sind zudem sehr aussagekräftig und auch im klinischen Alltag viel beachtet und gebräuchlich (z.B. systolischer- und diastolischer Blutdruck). Die Kontrollpopulation bildet eine alters- und geschlechtsstratifizierte Population, sodass auch geschlechtsspezifische Analysen vorgenommen werden konnten.

Ein großer Nachteil bei der Bestimmung der Genotypen war das Alter des analysierten Erbguts: Die Population der MONICA-LVH-Substudie wurde im Jahre 1994/1995 ausgewählt. Somit fand die Entnahme der Bioproben (DNAs) ca. 10 Jahre vor der Erbgutanalyse, welche als Grundlage für die vorliegende Arbeit dient, statt. Die extrahierte DNA wurde zwar kryokonserviert, allerdings konnte man aufgrund von manchen Genotypisierungsergebnissen (hohe Rate an „Undetermined“ bei bestimmten DNA-Platten) vermuten, dass das Alter der Bioproben seinen Teil zu diesem Problem beigetragen hat.

Die Herzinfarktfamilienpopulation HIFAM wurde 1997 und 1998 aus Rehakliniken in ganz Deutschland mit Hilfe von Patientenkarteen rekrutiert, während die KORA-Plattform seit 1996 existiert. Die DNA der Herzinfarktpopulationen ist somit etwas besser erhalten

geblieben. Bezüglich des Einzugsgebietes der Probanden unterscheiden sich HIFAM- und KORA-Population bzw. MONICA-LVH-Substudienteilnehmer: Während die Kontrollpopulation und KORA-Probanden aus Augsburg und Umgebung kommen, sind in der HIFAM-Studie Teilnehmer aus ganz Deutschland vereint. Obwohl es in der Auswertung zur Gegenüberstellung von Studienteilnehmern aus unterschiedlichen Regionen kam, ist jedoch positiv zu vermerken, dass Daten von über tausend Probanden mit Herzinfarktanamnese in diese Arbeit mit einfließen konnten. Einen weiteren Unsicherheitsfaktor stellen die unterschiedlichen Definitionen des Herzinfarkts im Laufe der Zeit dar: So sind z. B. in die KORA-Studie Patienten mit einem im Krankenhaus bestätigten Herzinfarkt aufgenommen worden, der bis 1998 Q-Zacken und Nicht-Q-Zackeninfarkt umfasste. Ab 1999 wurden zusätzlich ST-Hebungs- und Nicht-ST-Hebungsinfarkte mit einbezogen. Seit 2000 gilt wiederum die neue Definition des akuten Koronarsyndroms, nach der Patienten mit symptomatischer Angina Pectoris und Laborwerten der Ischämie auch ohne persistierende ST-Segmenterhöhungen dem Studienkollektiv zugeordnet wurden.

4.1.2. Auswahl und Lage der SNPs

Zur Erfassung von möglichen, krankheitsmitbestimmenden Genotypen wurden in der PBEF1-Region und im Bereich des PIK3CA-Gens mit Hilfe einer SNP-Datenbank je 12 verschiedene SNPs ausgewählt. Alle ausgewählten SNPs wurden als validiert beschrieben und hatten mindestens einen Submitter. Während alle PBEF1-SNPs TSC-submitted waren, wurden nur 4 von 12 PIK3CA-SNPs als solche gekennzeichnet. Die von den SNPs abgedeckte Region betrug bei der PBEF1-Analyse 544 kb mit einer durchschnittlichen Auflösung von 1 SNP auf 45 kb, während sich die 12 PIK3CA-SNPs auf ein Gebiet von nur 297 kb erstreckte (durchschnittliche Auflösung von 1 SNP auf 24 kb). Sieben der zwölf „Visfatin-Marker“ lagen in Introns. Der einzige Exon-SNP konnte aufgrund der schlechten Genotypisierungsrate von knapp über 90 % trotz Einsatz von alternativen Genotypisierungsmethoden nicht zur Auswertung herangezogen werden. Auch in der PIK3CA-Auswahl befand sich kein Exon-SNP, allerdings wurden Introns in benachbarten Genen mit erfasst.

4.1.3. SNP-Genotypisierung

Seit Gründung des Human-Genom-Projektes konnten mehrere Millionen SNPs identifiziert und in öffentlichen Datenbanken abgelegt werden. Diese stehen seitdem genetischen Assoziationsstudien zur Verfügung und bilden eine wichtige Grundlage zur Erfassung der genetischen Komponente von „complex diseases“. Um gut verwertbare Aussagen über

Genotyp-Phänotyp-Beziehungen treffen zu können, sollte zudem eine große Anzahl von Probanden genotypisiert werden. Die ideale Genotypisierungsmethode muss also möglichst viele SNPs pro Anwendung genotypisieren können (Multiplexfähigkeit), wobei der Zeitfaktor aufgrund der rasant zunehmenden Zahl der SNP-Identifizierung und der benötigten großen Probandenanzahl von entscheidender Bedeutung ist. Eine weitere wichtige Eigenschaft der Genotypisierungsmethode sollte sein, dass eine robuste Reaktion hervorgebracht wird. Somit können auch bei suboptimal erhaltener DNA Ergebnisse mit hoher Reliabilität erzielt werden (*Kwok*). Von großem Vorteil ist es auch, wenn die Durchführung der Methode gut automatisiert stattfinden kann, da zum Einen Zeit gespart werden kann, zum Anderen eine „Minimal-Handling-Methode“ individuelle Fehlerquellen und Verfälschungen nach Kontamination mit Fremd-DNA reduziert. Es ist außerdem aufgrund der großen Menge der gewonnenen Information sinnvoll, wenn die Datenanalyse einfach gestaltet ist z. B. durch eine möglichst automatisierte, akurate Genotypbestimmung (*Kwok*). Der ideale Assay sollte natürlich auch möglichst preisgünstig sein.

4.1.3.1. 5'Exonuklease Assay

Letzterer Punkt trifft keineswegs auf den Taqman 5'Exonuklease Assay zu: Die Investitionskosten zur Durchführung dieser Methode sind beträchtlich. Ein weiterer Nachteil dieses Assay ist, dass keine Multiplexfähigkeit besteht, d. h. pro PCR kann nur ein SNP detektiert werden. Somit ist diese Methode am geeignetsten, wenn für eine größere Anzahl von Proben nur wenige SNPs bestimmt werden sollen (*Pfeifer und Pahl*).

Einer der großen Vorteile dieser homogenen fluoreszenzfarbstoffbasierten Methode ist, dass keine Notwendigkeit besteht, verschiedene Reagenzien und Produkte in vielen verschiedenen Schritten zu transferieren (deswegen *homogen*). Dies spart Arbeit und Zeit und eliminiert einige Fehlerquellen. Zeitsparend ist ebenfalls, dass durch die computergestützte, größtenteils automatische Auswertung jegliche post-PCR-Schritte entfallen. Da die neuesten Geräte auch 384er Mikrotiterplatten prozessieren, kann mit dieser Methode ein hoher Probendurchsatz erreicht werden (*Pfeifer und Pahl*).

4.1.3.2. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Methode (RFLP)

Der große Vorteil dieser Methode liegt im Gegensatz zum Taqman 5'Exonuklease Assay darin, dass keine großen Investitionen zur Durchführung nötig sind. Jedes molekularbiologische Labor kann die RFLP-Analyse anwenden (*Pfeifer und Pahl*).

Nachteile bestehen allgemein darin, dass manche Enzyme nur unvollständig schneiden und dies die Eindeutigkeit der Resultate verfälschen kann (*Pfeifer und Pahl*). Weiterhin kann das Verfahren nur auf bekannte Polymorphismen angewandt werden, bei denen der polymorphe Bereich in einer Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym lokalisiert ist (*Pfeifer und Pahl*). Das Prozedere zur Analyse eines einzigen SNPs ist sehr zeitaufwendig und enthält viele manuelle Arbeitsschritte, die zur Verfälschung der Ergebnisse beitragen können. Multiplex-Analysen ergeben oft sehr komplexe Bandenmuster, die ohne zusätzlichen Analyseaufwand häufig nur schwer zu interpretieren sind. Daher kommt diese Methode nur in Betracht, wenn die Zahl der zu bestimmenden SNPs relativ klein ist (*Pfeifer und Pahl*).

4.1.3.3. DNA-Sequenzierung

Der Wert dieser Methode liegt darin, dass in der sequenzierten Region auch unbekannte Polymorphismen nachgewiesen werden können (*Pfeifer und Pahl*). Da die Ergebnisse dieses Verfahrens sehr zuverlässig sind, wird die Sequenzierung auch als Goldstandard betrachtet. Befinden sich mehrere Polymorphismen in dem sequenzierten Abschnitt, so können diese auch parallel detektiert werden. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass sich mehrere Polymorphismen in einem sequenzierten Bereich (bis ca. 1000 Basen groß) befinden, da viele Polymorphismen sich auf weiter entfernte Bereiche eines Gens oder auf viele verschiedene Gene verteilen (*Pfeifer und Pahl*). Somit kann die Multiplexfähigkeit nur als sehr klein klassifiziert werden. Weitere Nachteile stellen der Zeitaufwand und die Kosten dar: Für jeden Sequenzierungsbereich (und somit höchstwahrscheinlich für jeden Polymorphismus) muss eine separate Sequenzreaktion angesetzt werden (*Pfeifer und Pahl*).

4.1.4. Definitionen der Phänotypen

Die verwendeten Parameter systolischer und diastolischer Blutdruck, HbA_{1c} als Langzeitparameter für die Güte der Diabeteseinstellung und Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin und Triglyzeride als Parameter der Hyperlipidämie bzw. der Atherosklerose sind im Allgemeinen etablierte, anerkannte und verlässliche Parameter. In manchen Fällen ist jedoch die Aussagefähigkeit einiger Parameter als eingeschränkt zu betrachten. Bei der HbA_{1c}-Bestimmung kann es einerseits zu falsch hohen Ergebnissen kommen, wenn der Patient an einer Niereninsuffizienz leidet, andererseits können falsch niedrige Werte z.B. bei Patienten mit verkürzter Lebenszeit der Erythrozyten auftreten (*Dörner, Thieme Verlag*). Bei hohen Triglyzeridwerten sollte vorher eine medikamentöse Genese ausgeschlossen werden, da manche Medikamente (z.B. Corticoide) eine

HyperTriglyzeridämie verursachen können (*Dörner, Thieme Verlag*). Dies ist auch bei der Interpretation der Gesamtcholesterinwerte zu berücksichtigen.

Auch die beiden Adipositasparameter BMI und Taillenumfang sind in der Klinik gängige Parameter zur Diagnose der Fettleibigkeit. Bezüglich der Erfassung der abdominellen Fettverteilung bei Männern inklusive der Quantifizierung des viszeralen Anteils als wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung von kardiometabolischen Erkrankungen ist der Taillenumfang allerdings ein besserer Prädiktor als der BMI (*Chan et al.*). Bei der Berechnung des BMI wird nicht zwischen Fett- und Muskelgewebe unterschieden, so dass bei muskulösen Menschen der Index trotz normalem abdominellen Fettanteil erhöht sein kann. Die Hauptvariable des Taillenumfangs ist hingegen das Bauchfett, die Muskeldicke und meistens auch das subkutane Fett spielen hierbei nur eine untergeordnete Rolle. Einige Studien konnten jedoch einen Hinweis auf eine Assoziation zwischen Taillenumfang und subkutanem Fett geben (*Ross et al.*) und somit die Aussagekraft dieses Parameters etwas vermindern. Die oben diskutierten Parameter und Indices sind in den Definitionen der Erkrankungsphänotypen enthalten und bestimmen diese maßgeblich. Die spezielle Problematik in der Definition des metabolischen Syndroms wurde im Einleitungsteil schon eingehend diskutiert und soll nicht weiter dargelegt werden.

4.1.5. Statistische Auswertungen

An dieser Stelle werden vorwiegend die verschiedenen LD-Definitionen und ihre Aussagekraft betrachtet. Zum Einen kann die LD-Struktur nach der Standarddefinition von r^2 (*Ardlie, Kruglyak, and Seielstad*) bestimmt werden, zum Anderen besteht die Möglichkeit, die D' -Messung zur Beurteilung der Haploblockeingrenzung heranzuziehen. Das r^2 -Maß ist typischerweise niedriger und stellt eine eher konservative Definition dar. Im Gegensatz zu D' führt diese Messung bei kleinen Stichproben nicht zu übertrieben hohen LD-Werten, während es im Rahmen von D' bei dieser Konstellation zu Überbewertungen des LD kommen kann. Somit sind hier hohe Werte nötig (in der Nähe von 1), um sinnvolle Aussagen über die wirkliche Haplotypstruktur machen zu können. Mittlere Werte sollten idealerweise nicht als „Kopplungsungleichgewicht“ interpretiert werden. Ein Vorteil der D' -Messung gegenüber der r^2 -Anwendung ist eine weniger starke Abhängigkeit der LD-Werte von der Allelfrequenz. Optimalerweise sollte also die Haploblockeingrenzung nicht auf einer LD-Definition alleine basieren, sondern beide Maße bei diesem Prozedere berücksichtigen. Aufgrund der hohen Anzahl der genotypisierten Probanden und der klaren LD-Block-Eingrenzung basierte die Haplotypbestimmung in der PBEF1-Untersuchung ausschließlich auf der D' -Messung,

während in der PIK3CA-Analyse wegen der schwer zu beurteilenden Haploblockgrenze am 3'-Rand beide LD-Maße als Entscheidungsgrundlage verwendet wurden.

4.2. Diskussion der Visfatingenanalyse

4.2.1. Assoziationen zum Lipidstoffwechsel

In der vorliegenden Untersuchung konnten entlang des PBEF1-Gens und darüber hinaus verschiedenste Assoziationen genetischer Varianten und Haplotypstrukturen zu metabolischen Parametern und Erkrankungsphänotypen hergestellt werden. Es ließ sich unter anderem vermuten, dass bestimmte SNPs (wie rs10953501, rs10953502, rs3801272, rs4730153 und rs1319313) Einfluss auf Fettstoffwechselvorgänge ausüben können. Die Beeinflussung dieser genetischen Varianten von HDL-Cholesterin- und Triglyzeridwerten sowie des Dyslipidämie-Phänotyps werden durch andere, unabhängige Untersuchungen bestätigt: In einer Visfatinstudie mit japanischen Probanden (*Tokunaga et al.*) zeigte sich ein SNP in der Promotorregion (-1535T>C), welcher in der Kontrollgruppe signifikant mit SerumTriglyzeride und HDL-Cholesterinwerte assoziiert ist. Der T/T-Genotyp dieses Polymorphismus ging dabei ebenso wie die mit dem seltenen Allel homozygoten Genotypen o.g. SNPs mit niedrigen Triglyzeridwerten und hohem HDL-Cholesterin einher. In einer anderen Studie (*Bailey et al.*) war ein SNP der Promotorregion (rs7789066) signifikant mit der Apolipoprotein-B-Komponente des VLDL assoziiert. Der SNP rs4730153 zeigte sich in der Assoziation von *Bailey et al.* im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit unauffällig. Insgesamt weisen die Resultate auf die zentrale Funktion, die dem Visfatin im Lipoproteinmetabolismus unterstellt wird, hin. Laut *Fukuhara et al.* induziert PBEF1 infolge eines parakrinen Wirkmechanismus eine Akkumulation von Triglyzeriden in Präadipozyten sowohl des subkutanen als auch des viszeralen Fettgewebes und fördert die Triglyzeridsynthese aus Glukose. Somit wären Auswirkungen bestimmter SNPs in dieser Genregion auf die Vermehrung des abdominellen Fettgewebes und somit auf das Auftreten der Dyslipidämie durchaus begründbar. Dass das Visfatin die Förderung der Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten beeinflusst (*Sethi and Vidal-Puig*), lässt sich auch beim Betrachten der SNP-Ergebnisse in der myokardinfarktpositiven HIFAM-Population sowie im KORA-Herzinfarkt Kollektiv nachvollziehen: Die in Bezug auf das seltene Allel homozygoten Genotypen der SNPs rs10953501, rs10953502, rs4730153 und rs1319313 gehen mit hohen BMI-Werten und einem erhöhten Vorkommen an Adipositas im Vergleich zu den anderen Homozygoten einher. Während sich hier der homozygot seltene Genotyp in Bezug auf den Phänotyp als prognostisch ungünstig herausstellt, konnte bei der HDL-

Cholesterin, Triglyzerid- und Dyslipidämieassoziation der Allgemeinbevölkerung sowie der HIFAM-Familienangehörigen ohne Herzinfarktanamnese, in der neben den vorher genannten SNPs noch rs3801272 in gleicher Weise auffällig war, nachgewiesen werden, dass der homozygot seltene Genotyp mit günstigen Faktoren wie hohen HDL-Cholesterin-Werten, niedrigen Triglyzeridwerten und einer geringen Dyslipidämierate einhergeht. Wie die verschiedenen Ergebnisse aus den beiden Populationen zu vereinen sind, kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden. Auch die Haplotypauswertung macht Einflüsse von bestimmten „Superallelen“ in der Visfatingenregion deutlich und zeigt deren Auswirkung auf die Parameter und Phänotypen des Fettstoffwechsels. Die Anwesenheit von Haplotyp 3 und 5 zeigten in der Allgemeinbevölkerung positive Effekte auf die wichtigsten Blutfettwerte, während Haplotyp 4 in Bezug auf die Allgemeinbevölkerung negative Auswirkungen auf HDL-Cholesterin und Dyslipidämie demonstriert. Außerdem wurden in der HIFAM-Bevölkerung ohne Myokardinfarktanamnese in Assoziation mit diesem Haplotyp zusätzlich hohe LDL- und Gesamtcholesterinwerte sowie eine Zunahme des Taillenumfangs registriert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Vorliegen des Haplotyp 4 mit Störungen des Fettstoffwechsels assoziiert ist. Im Rahmen dieser Assoziationsuntersuchungen sollte auch ermittelt werden, ob die Anzahl der Haplotypkopien einen Einfluss auf die Ausprägung von Blutfettwerten und Erkrankungen des Fettstoffwechsels zeigen. Zu erwarten wäre, dass mit zunehmender Anzahl der vorhandenen Haplotypen die Erkrankungshäufigkeit bzw. die Lipidwerte im Blut je nach Auswirkung des „Superallels“ entweder zu- oder abnimmt. Im Schnitt sollten die Erkrankungshäufigkeiten bzw. die Blutlipidwerte der Bevölkerungsgruppen, die nur eine Kopie eines Haplotypen aufweisen, zwischen den Häufigkeiten bzw. Werten der beiden anderen Testgruppen liegen, welche entweder keine oder zwei Haplotypkopien aufweisen. Diese Erwartung konnte jedoch sowohl in der HDL-Cholesterin- als auch in der Dyslipidämieuntersuchung nicht bestätigt werden.

Um geschlechtsspezifische Unterschiede in den einzelnen SNP- und Haplotypassoziationen herauszuarbeiten, wurde in den meisten Analysen das Geschlecht berücksichtigt. In den Assoziationen bezüglich des Lipidstoffwechsels konnte beobachtet werden, dass ein einzelner SNP (rs1319313) vorwiegend in den weiblichen Bevölkerungsgruppen signifikant war, während die anderen auffälligen SNPs eher die männerspezifischen Analysen betrafen. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis dafür sein, dass das Auftreten von krankheitsfördernden Polymorphismen an bestimmten Positionen im menschlichen Genom vom Geschlecht abhängig ist.

4.2.2. Assoziationen zum Glukosestoffwechsel

Der SNP rs1319313 war neben den oben genannten Assoziationen auch in Analysen von Bedeutung, die den Glukosestoffwechsel betreffen: Sowohl in der nicht-geschlechtsspezifischen Auswertung als auch bei den Frauen der Kontrollpopulation der HIFAM-Studie ließ sich der homozygote Genotyp mit dem seltenen Allel einem niedrigen HbA_{1c}-Wert zuordnen und passt somit zu den Ergebnissen der Lipidstoffwechsellanalysen in der Allgemeinbevölkerung. Dort geht dieser Genotyp mit günstigen Markern und Phänotypen einher. Eine Analyse zu Promotorpolymorphismen (*Bailey et al.*) des Visfatingens konnte zwei SNPs herausheben (rs9770242 und rs1319501), die eine Assoziation zu Nüchtern-Plasmainsulin- und Nüchternglukosewerten in einer französisch-kanadischen Population aufwiesen. Die Haplotypenassoziation zeigt einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Haplotyp 1 und signifikant erhöhten HbA_{1c}-Werten und untermauert die Bedeutung des Visfatins im Glukosestoffwechsel. Gemäß *Fukuhara et al.* handelt es sich beim PBEF1 um ein Protein, welches insulinmimetische Eigenschaften besitzt. Die HbA_{1c}-Untersuchungen sowie die Analyse von *Bailey et al.* sind mit dem Knockout-Mausmodell von *Fukuhara et al.* in Einklang zu bringen, wonach visfatinheterozygote Mäuse einen deutlich höheren Plasmaglukosespiegel aufwiesen als die Visfatinwildtypiere. Es ist durchaus vorstellbar, dass bestimmte Polymorphismen oder „Superallele“ zu einer Beeinflussung der Regulation der Visfatinexpression führen können und somit signifikante Schwankungen des Plasmaglukosewertes bzw. langfristig gesehen pathologische Veränderungen des HbA_{1c}-Wertes zur Folge haben.

4.2.3. Assoziationen zum akuten Myokardinfarkt

Um eine mögliche KHK-Suszeptibilität des PBEF1-Gen zu untersuchen, beschäftigten sich einige Untersuchungen der Visfatingenregion mit dem Vorkommen des akuten Myokardinfarktes in Abhängigkeit von bestimmten SNPs und Haplotypen. Im KORA-Vergleich konnten bei den Männern zwei schwache Signifikanzen (rs3801272 und rs2058539) getestet werden. Die beiden P-Werte von 0,0482 und 0,0498 in der männerspezifischen Untersuchung reichen allerdings nicht aus, um diese SNPs als mögliche prädisponierende Genvarianten zu identifizieren. Die Assoziationen von bestimmten Haplotypen bezüglich des Auftretens eines akuten Myokardinfarktes zeigen dagegen härtere Ergebnisse: Bei den Männern ist die Anwesenheit des Haplotyp 4 mit einer geringeren Herzinfarktrate signifikant assoziiert. Wie dieses Ergebnis mit den Resultaten der

Lipidstoffwechselassoziationen zu vereinbaren sind, wonach die Anwesenheit des Haplotyp 4 mit Störungen des Fettstoffwechsels verknüpft ist, kann nur unzureichend erklärt werden.

4.3. Diskussion der PIK3CA-Genanalyse

4.3.1. Assoziationen zum Lipidstoffwechsel

Wie schon in der Einleitung beschrieben wurde, ist der PI3K-Pathway maßgeblich an der Weiterleitung des Visfatin- bzw. Insulinsignals beteiligt und spielt somit eine wichtige Rolle in der Entfaltung der insulinmimetischen Wirkung. Bestimmte Polymorphismen bzw. Allele, die Einfluss auf die Regulierung der PIK3CA-Genexpression haben, könnten an der Entstehung von kardiometabolischen Erkrankungen beteiligt sein. Deswegen kommen ähnliche Auswirkungen auf Stoffwechselprozesse in Frage wie bei bestimmten Polymorphismen bzw. Allelen im Visfatingen. Dazu gehören maßgeblich die Vorgänge des Lipidstoffwechsels. Hier erwiesen sich die Haplotypenanalysen als signifikant: Die Haplotypen 2, 3 und 5 waren dabei am häufigsten mit entsprechenden Parameterabweichungen (BMI, HDL-Cholesterin, Triglyzeride und Taillenumfang) und Phänotypen (MetS) assoziiert. In der Literatur wurden bis jetzt noch keine Haplotypassoziationen zum PIK3CA-Gen beschrieben.

4.3.2. Assoziationen zum Glukosestoffwechsel

Die katalytische Untereinheit der PI3K ist ein zentraler Baustein des Glukosestoffwechsels: Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Glukoseaufnahme und ist bedeutend für die Glut4-Translokation. So blockiert z.B. eine Hemmung der Kinase durch pharmakologische Inhibitoren komplett die Stimulation der Glukoseaufnahme durch Insulin (*Chang, Chiang, and Saltiel*) und führt damit zur Insulinresistenz. Andererseits resultiert die Abwesenheit von bestimmten 5'-Phosphatasen, die die Aktivität der PIK3CA abschwächen, in einer Erhöhung der Insulinsensitivität (*Baumgartener*). Basierend auf diesen Erkenntnissen stellte sich die Frage, ob bestimmte SNPs oder Haplotypen mit erhöhten HbA_{1c}-Werten bzw. mit dem Erkrankungsphänotyp Diabetes mellitus Typ II assoziiert sind. Wie die Ergebnisse zeigen, sind die mit dem seltenen Allel homozygoten Patienten in Bezug auf die SNPs rs9290679 und rs2032700 mit einem größeren Risiko belastet, hohe HbA_{1c}-Werte zu entwickeln und die Diagnose Diabetes mellitus zu bekommen. In der männerspezifischen Auswertung sind zusätzlich noch zwei weitere SNPs signifikant: rs1607237 bezogen auf den HbA_{1c}-Wert und rs7615076 in Assoziation mit dem diabetischen Phänotyp. Diese Ergebnisse unterstreichen neben der Wichtigkeit der PIK3CA für den Glukosestoffwechsel noch eine andere Tatsache: Nicht nur Polymorphismen oder Mutationen der proteincodierenden Genregionen sind an der

Genese von komplexen, genetischen Erkrankungen beteiligt. Keiner der vier untersuchten SNPs liegt in einem Exon von PIK3CA: rs7615076 ist wie rs9290679 und rs2032700 zwischen zwei Genen positioniert, rs1607237 hat seinen Platz in einem Intron des PIK3CA-Gens. Die Hypothese, dass regulatorische Elemente, Transkriptionsinitiationsprozesse oder die Promotorregion in die Manifestation von genetischen Variationen in Form von komplexen Erkrankungen involviert sind, wird auch durch diese Resultate bestärkt.

4.3.3. Assoziationen zur arteriellen Hypertonie

Als Folge der gestörten Glukosetoleranz im Rahmen eines Diabetes mellitus Typ II oder bei lang andauernden Hyperlipoproteinämien kommt es zu atherosklerotischen Gefäßveränderungen und infolge dessen zur arteriellen Hypertonie als Teilerkrankung des metabolischen Syndroms. Ob nun gemessene Signifikanzen zu diesem Erkrankungsphänotyp die unmittelbare Folge von den gerade genannten vorausgehenden Stoffwechselstörungen darstellen und die Hypertonie somit laut WHO-Definition sekundär ist oder ob auffällige statistische Erhebungen unmittelbar auf die untersuchten Polymorphismen bzw. Haplotypen zurückzuführen sind, lässt sich im Allgemeinen nur schwer eruieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnten bereits Assoziationen zur diabetischen Stoffwechsellage, Hyperlipoproteinämie und zur arteriellen Hypertonie gezeigt werden. Vergleicht man die Ergebnisse miteinander, so lässt sich ein Zusammenhang zwischen den genannten Erkrankungen vermuten: Beispielsweise ist im Hinblick auf die rs1607237-Assoziation das häufige Allel mit hohen HbA_{1c}-Werten und mit einer hohen Prävalenz der arteriellen Hypertonie verknüpft. Zur Hypertonie-Suszeptibilität von PIK3CA wurde bis jetzt noch keine Publikation herausgegeben, sodass eine Diskussion dieser Ergebnisse nicht weiter erfolgen kann.

4.3.4. Assoziationen zum akuten Myokardinfarkt

Aufgrund der engen Verknüpfung der Visfatintransduktion mit dem PI3K-Pathway können Polymorphismen in der PIK3CA-Genregion theoretisch ähnliche Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System haben wie in der Visfatingenregion. Die Ergebnisse zeigen, dass Risiko-SNPs vorhanden sind, die zur Genese von familiären Herzinfarkten beitragen könnten. Am deutlichsten konnte in der nicht-geschlechtsspezifischen Untersuchung eine Assoziation zwischen rs7615076 und der Familienherzinfarktrate gezeigt werden. Dabei ging das homozygot vorkommende häufige Allel mit einer erhöhten Rate an Herzinfarkten in der Familie einher. Dieses Assoziationsergebnis weist in die gleiche Richtung wie das Resultat

der frauenfokussierten Hypertonieanalyse: Der homozygote Genotyp bezüglich des häufigen Allels war hier mit einer erhöhten Hypertoniehäufigkeit vergesellschaftet. Somit lässt sich der Verdacht erhärten, dass bestimmte Polymorphismen im PIK3CA-Gen an der Entstehung von kardiometabolischen Erkrankungen beteiligt sind.

4.4. Möglichkeiten und Limitationen von Kandidatengenuntersuchungen

Kandidatengenanalysen sind im Gegensatz zu den großflächigen Genomuntersuchungen relativ einfach auszuführen und wurden bereits in großer Anzahl durchgeführt. Während die genomanalytischen Methoden nicht von der vorherigen Kenntnis der Pathophysiologie und des entsprechenden Stoffwechselweges abhängig sind, ist diese zur Durchführbarkeit von Kandidatengenuntersuchungen unerlässlich. Ein weiterer grundlegender Nachteil dieser Methode ist, dass nur eine geringe Anzahl von Genvarianten auf Assoziationen bezüglich bestimmten Parametern und Phänotypen getestet werden kann, während systematische Genomstudien in der Lage sind nach Assoziationen bezüglich einer unbefangenen Auswahl von Genvarianten im gesamten Genom zu suchen (*Watkins and Farrall*). Das bedeutet, dass die A-Priori-Wahrscheinlichkeit für die Identifizierung von wichtigen Genvarianten im Vergleich relativ gering ist (*Watkins and Farrall*). Zudem ist die Rate der falsch positiven Testergebnisse bei Kandidatengenuntersuchungen größer als bei den großflächig angelegten Genomanalysen, sodass sich das Feld der Identifizierung von Suszeptibilitätsgenen immer mehr in Richtung der systematischen Genomuntersuchungen verschiebt (*Watkins and Farrall*). Trotzdem können mit Hilfe der Kandidatengenuntersuchungen immer wieder neue Forschungsfelder eröffnet werden, wie man am Beispiel eines Agens des Leukotrienpathways sehen kann: Die bereits schon beschriebene Identifizierung von Genvarianten des Kandidatengens ALOX5 führte in der Folge im Rahmen von Linkage-basierten Familienstudien zur Entdeckung des ALOX5-Aktivierungsprotein-Gens (ALOX5AP), welches ein Suszeptibilitätsgen für Myokardinfarkt und Hirnschlag darstellt (*Watkins and Farrall*).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Experimente und Assoziationsanalysen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, beschäftigten sich mit der Frage, ob es sich bei den beiden Genen PBEF1 und PIK3CA um Suszeptibilitätsgene bezüglich bestimmten kardiometabolischen Erkrankungsphänotypen handelt. Es soll die Hypothese bestätigt werden, dass genetische Varianten, die in diesen beiden Genregionen lokalisiert sind, mit bestimmten Parametern des Lipid- oder Glucosestoffwechsels bzw. mit definierten kardiometabolischen Krankheitsbildern assoziiert sind. Hierzu erfolgten Assoziationsuntersuchungen zum Einen von Single-Nucleotid-Polymorphismen, zum Anderen von häufigen Haplotypen bezüglich o.g. metabolischen Parametern, dem Erkrankungsphänotyp „metabolisches Syndrom“, seinen Einzelkomponenten und dem (familiären) Vorkommen eines kardialen Ereignisses in Form eines Myokardinfarktes. In einer Linkage Disequilibrium Analysis konnten für das Visfatingen 5 häufige 9-Marker-Haplotypen, für das PIK3CA-Gen 5 relevante 7-Marker-Haplotypen konstruiert werden, welche in den Beziehungsanalysen verwendet wurden. In der Visfatingenregion wurden 11 SNPs zur weiteren Assoziation herangezogen, während die Anzahl der in den PIK3CA-Analysen eingesetzten SNPs 12 betrug. Die Genotypisierung wurde an insgesamt drei verschiedenen Populationen durchgeführt: Als Kontrollpopulation bzw. Allgemeinbevölkerung dienten Probanden der MONICA-LVH-Substudie, die beiden anderen Gruppen wurden von Studienteilnehmern der Herzinfarktfamilienstudie und der KORA-Plattform repräsentiert. Sowohl in der Visfatin- als auch in der PIK3CA-Genregion konnten auffällige SNP- und Haplotypassoziationen festgestellt werden. In den Haplotypenanalysen der Visfatingenregion können vor allem drei Haplotypen herausgehoben werden: Zwei davon zeigten in der Allgemeinbevölkerung positive Effekte bezüglich wichtiger Blutfettwerte wie HDL-Cholesterin, während die Anwesenheit des dritten Haplotypen in Bezug auf die Allgemeinbevölkerung mit niedrigen HDL-Cholesterin-Spiegel und hohen Dyslipidämieraten assoziiert war. In der HIFAM-Bevölkerung ohne Myokardinfarktanamnese in Assoziation mit diesem Haplotyp konnten zusätzlich hohe LDL- und Gesamtcholesterinwerte sowie eine Zunahme des Taillenumfangs registriert werden. Allerdings ist mit diesem Ergebnis die Assoziation zum akuten Myokardinfarkt, die eine Abnahme der Myokardinfarkttrate bei Anwesenheit dieses Haplotypen ergab, nur schlecht zu vereinen. Die Anzahl der Haplotypkopien zeigte keinen Einfluss auf die Ausprägung von Blutfettwerten und Erkrankungen des Fettstoffwechsels. Geschlechtsspezifische Unterschiede wurden v.a. in den Visfatin-Assoziationen bezüglich des Lipid- und Glukosestoffwechsels

beobachtet: Hier war ein einzelner SNP (rs1319313) vorwiegend in den weiblichen Bevölkerungsgruppen signifikant, was darauf schließen lässt, dass das Auftreten von krankheitsfördernden Polymorphismen vom Geschlecht abhängig sein kann. Die PIK3CA-Untersuchung konnte in der Allgemeinbevölkerung zwei signifikante SNP-Assoziationen im Hinblick auf den Glukosestoffwechsel darstellen: Die mit dem seltenen Allel homozygoten Patienten in Bezug auf diese SNPs sind mit einem größeren Risiko belastet, hohe HbA_{1c}-Werte zu entwickeln und die Diagnose Diabetes mellitus zu bekommen. Weitere SNP-Analysen zeigen, dass Risiko-SNPs vorhanden sind, die zur Genese von familiären Herzinfarkten beitragen könnten. Am deutlichsten konnte in der nicht-geschlechtsspezifischen Untersuchung eine Assoziation zwischen einem SNP und der Familienherzinfarktrate gezeigt werden: Dabei ging das homozygot häufige Allel mit einer erhöhten Rate an Herzinfarkten in der Familie einher. Diese PBEF1- und PIK3CA-Assoziationsergebnisse weisen darauf hin, dass einzelne genetische Varianten in diesen Genregionen mit Parametern des Lipid- und Glukosestoffwechsels (v.a. Taillenumfang, BMI, HDL-, LDL-, und Gesamt-Cholesterin, Triglyzeride und HbA_{1c}) als auch mit dem Vorkommen von kardiometabolischen Erkrankungen (v.a. akuter Myokardinfarkt, Dyslipidämie und Diabetes mellitus Typ II) assoziiert sind. Man kann vermuten, dass es sich bei PBEF1 und PIK3CA um Genregionen handelt, deren Varianten Anteil an einer Erkrankungsdisposition haben und somit in die Genese von komplexen Erkrankungen involviert sind.

6. ANHANG

Literaturangaben

1. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. Circulation 106.25 (2002): 3143-421.
2. The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators. J.Clin.Epidemiol. 41.2 (1988): 105-14.
3. Ardlie, K. G., L. Kruglyak, and M. Seielstad. "Patterns of linkage disequilibrium in the human genome." Nat.Rev.Genet. 3.4 (2002): 299-309.
4. Bailey, S. D., et al. "Common polymorphisms in the promoter of the visfatin gene (PBEF1) influence plasma insulin levels in a French-Canadian population." Diabetes 55.10 (2006): 2896-902.
5. Baumgartener, J. W. "SHIP2: an emerging target for the treatment of type 2 diabetes mellitus." Curr.Drug Targets.Immune.Endocr.Metabol.Disord. 3.4 (2003): 291-98.
6. Boddeker, I. and A. Ziegler. "[Association and linkage studies for the analysis of candidate genes]." Dtsch.Med.Wochenschr. 125.25-26 (2000): 810-15.
7. Cantley, L. C. "The phosphoinositide 3-kinase pathway." Science 296.5573 (2002): 1655-57.
8. Chan, D. C., et al. "Waist circumference, waist-to-hip ratio and body mass index as predictors of adipose tissue compartments in men." QJM. 96.6 (2003): 441-47.
9. Chang, L., S. H. Chiang, and A. R. Saltiel. "Insulin signaling and the regulation of glucose transport." Mol.Med. 10.7-12 (2004): 65-71.
10. Crawford, D. C., D. T. Akey, and D. A. Nickerson. "The patterns of natural variation in human genes." Annu.Rev.Genomics Hum.Genet. 6 (2005): 287-312.
11. Ford, E. S., W. H. Giles, and W. H. Dietz. "Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey." JAMA 287.3 (2002): 356-59.
12. Fukuhara, A., et al. "Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin." Science 307.5708 (2005): 426-30.
13. Greci, L. S., et al. "Utility of HbA(1c) levels for diabetes case finding in hospitalized patients with hyperglycemia." Diabetes Care 26.4 (2003): 1064-68.
14. Greenberg, D. A. "Linkage analysis of "necessary" disease loci versus "susceptibility" loci." Am.J.Hum.Genet. 52.1 (1993): 135-43.

15. Grundy, S. M., et al. "Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition." Circulation 109.3 (2004): 433-38.
16. Herbert, A., et al. "A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity." Science 312.5771 (2006): 279-83.
17. Hinohara, K., et al. "Replication of the association between a chromosome 9p21 polymorphism and coronary artery disease in Japanese and Korean populations." J.Hum.Genet. 53.4 (2008): 357-59.
18. Hug, C. and H. F. Lodish. "Medicine. Visfatin: a new adipokine." Science 307.5708 (2005): 366-67.
19. Jorde, L. B. "Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes." Genome Res. 10.10 (2000): 1435-44.
20. Kahn, R., et al. "The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes." Diabetes Care 28.9 (2005): 2289-304.
21. Karakas, B., K. E. Bachman, and B. H. Park. "Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers." Br.J.Cancer 94.4 (2006): 455-59.
22. Kitani, T., S. Okuno, and H. Fujisawa. "Growth phase-dependent changes in the subcellular localization of pre-B-cell colony-enhancing factor." FEBS Lett. 544.1-3 (2003): 74-78.
23. Koh, K. K., S. H. Han, and M. J. Quon. "Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions." J.Am.Coll.Cardiol. 46.11 (2005): 1978-85.
24. Kralisch, S., et al. "Therapeutic perspectives of adipocytokines." Expert.Opin.Pharmacother. 6.6 (2005): 863-72.
25. Kwok, P. Y. "Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms." Annu.Rev.Genomics Hum.Genet. 2 (2001): 235-58.
26. Lee, A. J., et al. "Improved prediction of fatal myocardial infarction using the ankle brachial index in addition to conventional risk factors: the Edinburgh Artery Study." Circulation 110.19 (2004): 3075-80.
27. Lee, K. S., et al. "Inhibition of phosphoinositide 3-kinase delta attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine asthma model." FASEB J. 20.3 (2006): 455-65.
28. Lloyd-Jones, D. M., et al. "Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring." JAMA 291.18 (2004): 2204-11.
29. Marenberg, M. E., et al. "Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins." N.Engl.J.Med. 330.15 (1994): 1041-46.

30. Morrison, J. A., et al. "Development of the metabolic syndrome in black and white adolescent girls: a longitudinal assessment." Pediatrics 116.5 (2005): 1178-82.
31. Park, Y. W., et al. "The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994." Arch.Intern.Med. 163.4 (2003): 427-36.
32. Rongvaux, A., et al. "Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis." Eur.J.Immunol. 32.11 (2002): 3225-34.
33. Ross, R., et al. "Adipose tissue distribution measured by magnetic resonance imaging in obese women." Am.J.Clin.Nutr. 57.4 (1993): 470-75.
34. Rychahou, P. G., et al. "Targeted molecular therapy of the PI3K pathway: therapeutic significance of PI3K subunit targeting in colorectal carcinoma." Ann.Surg. 243.6 (2006): 833-42.
35. Samani, N. J., et al. "Genomewide association analysis of coronary artery disease." N.Engl.J.Med. 357.5 (2007): 443-53.
36. Schunkert, H., et al. "Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease." Circulation 117.13 (2008): 1675-84.
37. Sethi, J. K. and A. Vidal-Puig. "Visfatin: the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes?" Trends Mol.Med. 11.8 (2005): 344-47.
38. Slatkin, M. and L. Excoffier. "Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm." Heredity 76 (Pt 4) (1996): 377-83.
39. Tokunaga, A., et al. "The -1535 promoter variant of the visfatin gene is associated with serum Triglyceride and HDL-cholesterol levels in Japanese subjects." Endocr.J. 55.1 (2008): 205-12.
40. Watkins, H. and M. Farrall. "Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress." Nat.Rev.Genet. 7.3 (2006): 163-73.
41. Weiss, K. M. and A. G. Clark. "Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits." Trends Genet. 18.1 (2002): 19-24.
42. Wilson, P. W., et al. "Clustering of metabolic factors and coronary heart disease." Arch.Intern.Med. 159.10 (1999): 1104-09.
43. Zimmet, P., M. M. berti KG, and Rios M. Serrano. "[A new international diabetes federation worldwide definition of the metabolic syndrome: the rationale and the results]." Rev.Esp.Cardiol. 58.12 (2005): 1371-76.

BUCHREFERENZEN:

44. Bland, M.: An introduction to medical statistics.
Oxford University Press, 3. Auflage August 2000, Seiten 230-233
45. „Das Gesundheitswesen“
Thieme Verlag, August 2005, Seiten 13-15, 19
46. Dörner, K.: Klinische Chemie und Hämatologie.
Thieme Verlag, 5. Auflage Juli 2003, Seiten 158-165, 143-146
47. Pfeifer, D., Pahl, A.: Von den Genen lernen.
Deutsche Zeitschrift für klinische Forschung Heft 9/10, 51-58, 2002

INTERNETREFERENZEN:

48. www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap
49. www.licr.org/D_programs/d2a2a_PI3K.php
50. www.ndbi.nlm.nih.gov/SNP

Danksagung

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

Ich möchte ganz besonders der Betreuerin dieser Arbeit, Frau PD Dr. Andrea Bässler, für die vielen Tipps und Anregungen danken, die wesentlich zum Gelingen des „Unternehmens Doktorarbeit“ beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht auch an Herrn PD Dr. Marcus Fischer, der mein Ansprechpartner in Sachen statistische Auswertung war. Ich weiß sehr zu schätzen, dass er sich für meine fachlichen Anliegen viel Zeit genommen hat.

Ebenso ein besonderes Dankeschön an das Forschungsteam der Kardiogenetik der Universität Regensburg. Die vielen Stunden im Labor kamen mir dank der netten und kompetenten Betreuung nicht so lange vor. Ich möchte an dieser Stelle Frau Martina Köhler und Frau Michaela Vöstner nennen, die mich mit der hohen Kunst der Labortätigkeit vertraut gemacht haben. Ebenso will ich Herrn Dr. Klaus Stark danken, der die Laborarbeit als Laborleiter koordiniert hat.

Herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Christian Hengstenberg, der die Doktorvaterschaft für diese Arbeit übernommen hat. Er hat viel Geduld bis zur Fertigstellung der schriftlichen Zusammenfassung bewiesen.

Zum Schluss möchte ich noch ein Dankeschön an das Institut für funktionelle Genomik (Prof. Peter Oefner), Biopark Regensburg, richten, wo freundlicherweise die DNA-Sequenzierung durchgeführt werden konnte.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Daniel Schmalenberger
Geburtsdatum 11.05.1983
Geburtsort Kaiserslautern
Familienstand verheiratet

Schulbildung

09/1989-07/1993 Grundschule Neukirchen/Inn
09/1993-07/2002 Gymnasium Fürstzell, Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

10/2002-12/2008 Humanmedizin an der Universität Regensburg
09/2004 Ärztliche Vorprüfung
12/2008 Ärztliche Prüfung (nach neuer ÄAppO)

Famulaturen

02-03/2005 Innere Medizin, St. Josef Krankenhaus Regensburg
09-10/2005 Viszeral- und Transplantationschirurgie, Inselspital Bern
03/2006 Radiologie, Barmherzige Brüder Regensburg
09-10/2006 Neurologische Ambulanz, Bezirksklinikum Regensburg
03/2007 Anästhesie, Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Murnau

Praktisches Jahr

08/2007-12/2007 Chirurgie, Barmherzige Brüder Regensburg
12/2007-04/2008 Pädiatrie, St. Hedwig Regensburg
04/2008-07/2008 Innere Medizin, Barmherzige Brüder Regensburg

Berufliche Laufbahn

seit 01/2009 Assistenzarzt Innere Medizin, Klinikum St. Elisabeth Straubing

Hobbies und Interessen

Rennradfahren, Klavierspielen, Tanzen, Astronomie