

Endbericht zum Forschungsprojekt

„A genome-wide association study to identify susceptibility genes for peripheral arterial disease and cardiovascular disease“

1. Genomweite Assoziationsstudie in 21 Kohorten

Wie im letzten Bericht angekündigt wurde versucht, die in der Metaanalyse aller genomweiten Analysen (GWAS) in 40.000 Studienteilnehmern gefundenen, vielversprechendsten Gene in Replikationsanalysen in anderen Kollektiven basierend auf fast 17.000 Probanden zu bestätigen. Die Ergebnisse dieser Replikationskohorten wurden in eine Metaanalyse mit über 50.000 Probanden eingebracht. Es wurde angestrebt, den Tophit aus der Metaanalyse aller genomweiten Analysen und die 5 stärksten Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) Assoziationen zu replizieren. Die Assoziation des einzigen genomweit signifikanten Genlokus auf Chromosom 9 konnte eindeutig bestätigt werden und wurde in der kombinierten Metaanalyse sogar noch stärker. Kein anderer Genlocus erreichte eine genomweite Signifikanz. Dennoch zeigten zwei zuvor berichtete Kandidatengene und ein SNP, der mit koronarer Herzerkrankung assoziiert ist, eine Assoziation mit den von uns untersuchten Phänotypen Knöchel-Arm-Index und periphere arterielle Verschlusskrankheit. In Abbildung 1 ist die Region um den Top Hit auf Chromosom 9 nach Einbeziehung der Replikationskohorten in die Metaanalyse in Form eines "regional plots" dargestellt.

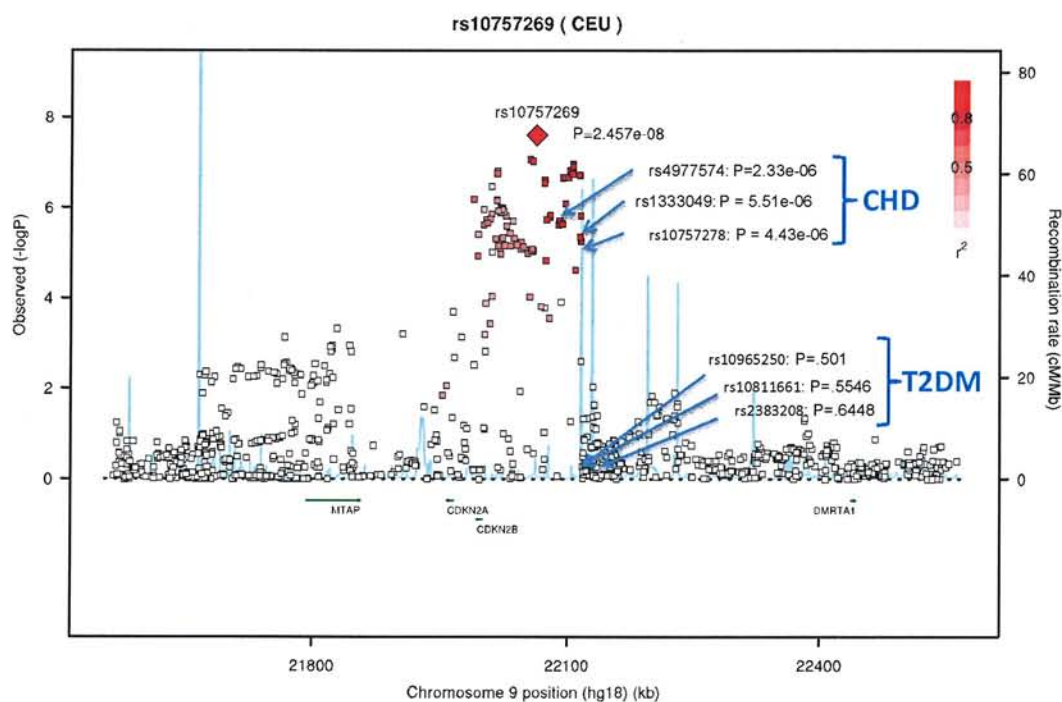


Abbildung 1: Regional plot der Ergebnisse zum Top Hit auf Chromosom 9 aus der Metaanalyse der genomweiten Assoziationsstudien und Replikationskohorten zum Knöchel-Arm-Index im ENGAGE-CHARGE Konsortium. Dieser SNP korreliert mit SNPs in der Region die mit koronarer Herzerkrankung oder Myokardinfarkt (CHD) assoziiert sind, aber nicht mit Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM) assoziierten Varianten.

Ein entsprechendes Manuskript unter der gemeinsamen Federführung von Framingham und Innsbruck mit dem Titel „Association between chromosome 9p21 variants and the Ankle-brachial Index identified by a meta-analysis of 21 genome-wide association studies“ konnten wir in der Zeitschrift „*Circulation: Cardiovascular Genetics*“ Anfang 2012 publizieren (siehe Beilage).

2. Genomweite Assoziationsstudie im CARE-Konsortium mittels Spezialchip

Im zweiten Teil des Projektes wurden Genotypisierungen im Rahmen des CARE-Konsortiums durchgeführt. Diese Typisierungen wurden nun mithilfe eines Spezialchips von kardiovaskulären Kandidatengenen in Hinblick auf die Phänotypen Knöchel-Arm-Index und periphere arterielle Verschlusskrankheit untersucht. Durch die Spezialisierung dieses Chips auf kardiovaskuläre Kandidatengene erhoffte man sich eine Erhöhung der Power bei den durchgeführten Assoziationsanalysen.

In dieser zweistufigen Metaanalyse wurden über 50.000 Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in über 2.100 Kandidatengenen untersucht um genetische Varianten für den Knöchel-Arm-Index zu identifizieren. In der ersten Stufe konnten zwei signifikante SNPs gefunden werden, die mit dem Knöchel-Arm-Index assoziiert waren (rs2171209 in *SYTL3*, $p = 6.02 \times 10^{-7}$ und rs290481 in *TCF7L2*, $p = 7.01 \times 10^{-7}$). Der Top SNP rs290481 liegt in einem Gen (*TCF7L2*), das bereits mit Typ2 Diabetes assoziiert wurde. Aus diesem Grund testeten wir, ob eine Interaktion zwischen Diabetes und rs290481 die Assoziation mit dem Knöchel-Arm-Index beeinflusst. Es konnte ein stärkerer Effekt pro Kopie des seltenen Allels im Hinblick auf einen reduzierten Knöchel-Arm-Index in Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern gefunden werden.

In Abbildung 2 ist die Region um den Top SNP rs290481 im *TCF7L2* Gen auf Chromosom 10 nach Einbeziehung der Kohorten der ersten Analysestufe in die Metaanalyse in Form eines "regional plots" dargestellt. In diesem plot sind unter anderem auch SNPs im *TCF7L2* Gen dargestellt, die mit Typ 2 Diabetes in genomweiten Assoziationsstudien assoziiert gefunden wurden (repräsentiert durch den SNP rs7903146) (Voight BF, et al., *Nat Genet* 2010; 42:579–89). In der aktuellen Analyse wurde aber keine signifikante Assoziation dieses bekannten „Diabetes - SNPs“ (rs7903146) mit dem Knöchel-Arm-Index gefunden.

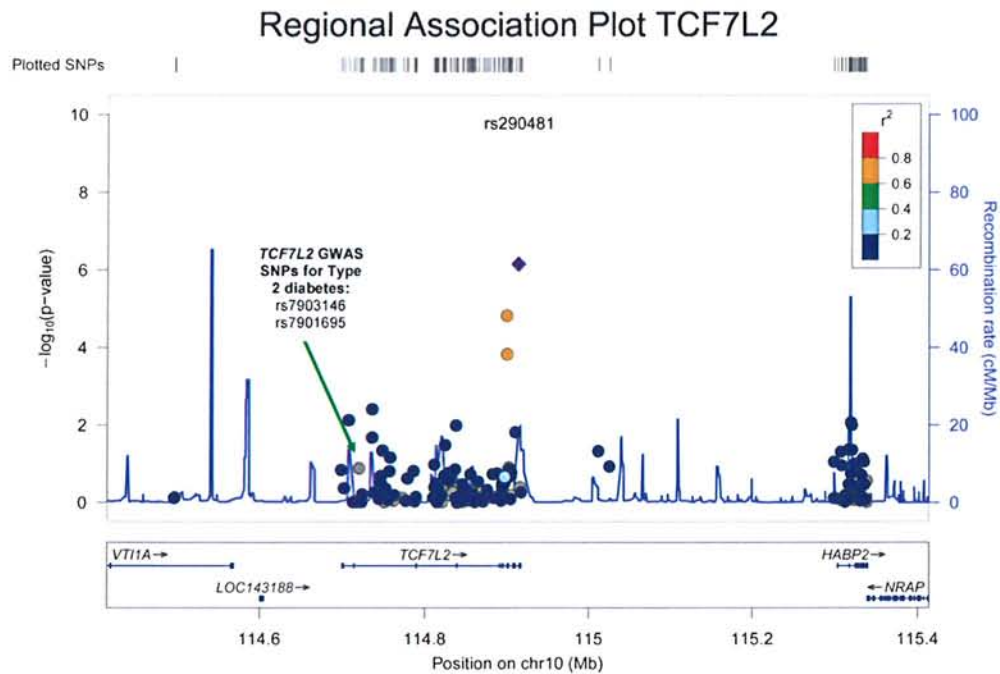


Abbildung 2: Regional plot der p Werte des Top Hits rs290481 und weiterer SNPs in der Region um rs290481 auf Chromosom 10 aus der Metaanalyse der Kohorten der ersten Analysestufe zum Knöchel-Arm-Index.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass die Assoziation zwischen dem *SYTL3* Gen und dem Knöchel-Arm-Index möglicherweise durch Lipoprotein(a) beeinflusst wird, da sich *SYTL3* in der erweiterten Region um das *LPA* Gen befindet. In einer genomweiten Assoziationsstudie wurde eine Assoziation von SNPs in *SYTL3* mit Lipoprotein(a) gefunden (Ober C et al., *J Lipid Res* 2009; 50:798–806). Es kann daher durchaus angenommen werden, dass Varianten im *SYTL3* Gen ein Signal aus der *LPA* Gen Region aufnehmen. Lipoprotein(a) Konzentrationen sind zu über 90% durch genetische Varianten in der *LPA* Gen Region determiniert (Utermann G., *Curr Opin Lipidol* 1999;10:133–41). Die Lipoprotein(a) Konzentrationen und genetische Varianten im *LPA* Gen gelten darüber hinaus als Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen (Erqou S et al., *J Am Coll Cardiol* 2010; 55:2160–7). SNPs aus der *LPA* Gen Region als auch Lipoprotein(a) Konzentrationen sind bereits in früheren Studien mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit in Zusammenhang gebracht worden (Volpato S et al., *Am J Cardiol* 2010; 105:1825–30).

In Abbildung 3 ist die Region um den Top SNP rs2171209 im *SYTL3* Gen auf Chromosom 6 nach Einbeziehung der Kohorten der ersten Analysestufe in die Metaanalyse in Form eines "regional plots" dargestellt.

Regional Association Plot SYTL3

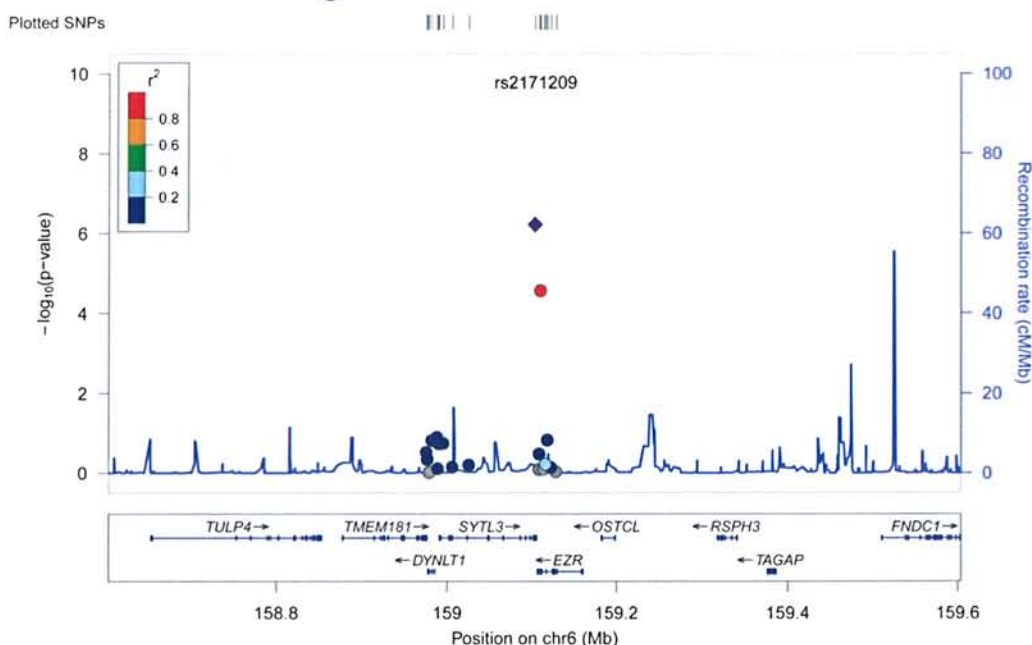


Abbildung 3: Regional plot der p Werte des Top Hits rs2171209 und weiterer SNPs in der Region um rs2171209 auf Chromosom 6 aus der Metaanalyse der Kohorten der ersten Analysestufe zum Knöchel-Arm-Index.

Ein SNP im *CYP2B6* Gen ($p = 4.99 \times 10^{-5}$) zeigte einen grenzwertigen Zusammenhang mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit. Es wurde in einer früheren Studie diskutiert, dass *CYP2B6* das Rauchverhalten beeinflussen könnte (Thorgeirsson TE et al., *Nature* 2008; 452:638–42).

In der nachfolgenden Replikation konnte allerdings keiner dieser drei SNPs bestätigt werden. Da diese drei Gene wie oben beschrieben mit Risikofaktoren wie Lipoprotein(a), Typ 2 Diabetes und Rauchen assoziiert sind, kann sich aus diesem Ergebnis ein interessanter Anknüpfungspunkt für weitere funktionelle Analysen und möglicherweise relevante Gen-Umwelt Interaktionen ergeben, um die Pathogenese der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit besser verstehen zu können. Wir haben diese Arbeit im Jahr 2012 in "**Atherosclerosis**" publiziert.

Erfolgsaspekt in diesem Projekt

Unsere Gruppe konnte bei beiden Arbeiten und in beiden weltweit agierenden Konsortien aufgrund der Verantwortung für die beiden großen Studien KORA F3 und F4 und den eingebrachten Replikationskohorten eine federführende Rolle einnehmen. Wie auch schon im letzten Bericht beschrieben, haben uns unsere Beiträge in den Bereichen genomweite Assoziationsstudien, Replikationsgenotypisierung, Kandidatengensuche und Evaluierung in den GWAS-Kohorten sowie den bioinformatischen Analysen in einer sehr frühen Phase dieses Projektes in eine Führungsrolle gebracht. Aufgrund dessen konnte unsere Gruppe im ersten Manuskript in "*Circulation: Cardiovascular Genetics*" bei fast 130 AutorInnen eine "shared first author"-Position für Dr. Claudia Lamina und die letzte Letztautorenposition sowie korrespondierende Autorenposition für Prof. Kronenberg einnehmen. Darüber hinaus kommen 15

Autoren auf diesem Manuskript aus den von uns eingebrachten Kohorten. Im zweiten in "Atherosclerosis" publizierten Manuskript mit 61 AutorInnen konnte das Innsbrucker Team eine "shared first author"-Position für Dr. Claudia Lamina und Mag. Stefan Coassin und die "shared senior-author"-Position für Prof. Kronenberg einnehmen. Darüber hinaus kommen 16 Autoren auf diesem Manuskript aus den von uns eingebrachten Kohorten.

In diesem Konsortium sind Studien wie Framingham, ARIC, National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES), Cardiovascular Health Study oder die Copenhagen City Heart Study (CCHS) involviert, daher können die Anzahl der von uns eingebrachten Autoren und die erreichten führenden Autorenpositionen als großer Erfolg gewertet werden.

Weiterführende Arbeiten

Aufgrund der interessanten Ergebnisse in der Region des *SYTL3* Gens (und damit der Nähe des *LPA* Gens) sind wir gerade dabei, eine genauere Untersuchung der Bedeutung der durch das *LPA* Gen determinierten Apo(a) Isoformen vor allem in Hinblick auf periphere arterielle Verschlusskrankheit auf Populationsebene zu untersuchen. Diese Untersuchung findet vor allem in den beiden KORA Populationen (KORA F3 und F4) sowie in der CAVASIC-Studie statt. Diese Arbeiten werden wir im Jahr 2013 abschließen.

Zusätzliche Arbeiten, in denen der Österreichische Herzfonds Erwähnung findet

Nachdem wir schon in der Vergangenheit im Rahmen anderer Projekte durch den Österreichischen Herzfonds großzügig unterstützt worden sind, wurde dadurch die Basis für Nachfolgearbeiten gelegt, in denen der Fonds entsprechend bedankt wird. Diese sind dem Bericht ebenfalls beiliegend und sind wie folgt:

1. Kollerits B, Sturm G, Lamina C, Hammerer-Lercher A, Rantner B, Stadler M, Ziera T, Struck J, Klein-Weigel P, Fraedrich G, Kronenberg F: Comparison and evaluation of cardiac biomarkers in patients with intermittent claudication: Results from the CAVASIC Study. **Clin. Chem.** (in press).
2. Sturm G, Lamina C, Zitt E, Lhotta K, Haider F, Neyer U, Kronenberg F: Association of HbA1c values with mortality and cardiovascular events in diabetic dialysis patients. The INVOR Study and review of the literature. **PLoS One** 6:e20093, 2011.
3. Böger CA, Chen MH, Tin A, Olden M, Köttgen A, Deboer IH, Fuchsberger C, O'Seaghdha CM, Pattaro C, Teumer A, Liu CT, Glazer NL, Li M, O'Connell JR, Tanaka T, Peralta CA, Kutalik Z, Luan J, Zhao JH, Hwang SJ, Akyzbekova E, Kramer H, van der Harst P, Smith AV, Lohman K, de AM, Hayward C, Kollerits B, Tonjes A, Aspelund T, Ingelsson E, Eiriksdottir G, Launer LJ, Harris TB, Shuldiner AR, Mitchell BD, Arking DE, Franceschini N, Boerwinkle E, Egan J, Hernandez D, Reilly M, Townsend RR, Lumley T, Siscovick DS, Psaty BM, Kestenbaum B, Haritunians T, Bergmann S, Vollenweider P, Waeber G, Mooser V, Waterworth D, Johnson AD, Florez JC, Meigs JB, Lu X, Turner ST, Atkinson EJ, Leak TS, Aasarod K, Skorpén F, Syvanen AC, Illig T, Baumert J, Koenig W, Krämer BK, Devuyst O, Mychaleckyj JC, Minelli C, Bakker SJ, Kedenko L, Paulweber B, Coassin S, Endlich K, Kroemer HK, Biffar R, Stracke S, Volzke H, Stumvoll M, Magi R, Campbell H, Vitart V, Hastie ND, Gudnason V, Kardia SL, Liu Y, Polasek O, Curhan G, Kronenberg F, Prokopenko I, Rudan I, Arnlov J, Hallan S, Navis G, Parsa A, Ferrucci L, Coresh J, Shlipak MG, Bull SB, Paterson AD, Wichmann HE, Wareham NJ, Loos RJ, Rotter JI, Pramstaller PP, Cupples LA, Beckmann JS, Yang Q, Heid IM, Rettig R, Dreisbach AW, Bochud M, Fox CS, Kao WH: CUBN Is a Gene Locus for Albuminuria. **J. Am. Soc. Nephrol.** 22:555-570, 2011.

Abschließend möchte ich mich sehr herzlich für die finanzielle Unterstützung des Projektes durch den Österreichischen Herzfonds bedanken. Ohne diesen hätten wir das Projekt sicherlich nicht in diesem umfassenden Ausmaß durchführen können.

Mit herzlichen Grüßen

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'F. Kronenberg', written in a cursive style.

Univ.-Prof. Dr. Florian Kronenberg