

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg / Saar
Direktor: Prof. Dr. Thomas Vogt

Assoziation von Genvarianten mit Bezug zur Hautpigmentierung und Vitamin D Status

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von: Willi Paul Roßberg

geb. am: 14.05.1990 in Kulmbach

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Zusammenfassung	4
1.1. <i>Deutsche Zusammenfassung</i>	4
1.2. <i>Englische Zusammenfassung</i>	6
2. Einleitung	7
2.1. <i>Physiologische Bedeutung von Vitamin D</i>	7
2.2. <i>Vitamin D Versorgung in Deutschland</i>	8
2.3. <i>Biochemie von Vitamin D</i>	9
2.4. <i>Einflussgrößen auf den Bildungsprozess von Vitamin D</i>	12
2.5. <i>Zielorgane des Calcitriols</i>	14
2.6. <i>Hautpigmentierung</i>	15
2.7. <i>Assoziation von Hautpigmentierung und Vitamin D Status</i>	18
3. Material und Methoden	21
3.1. <i>“Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC)”- Studie</i>	21
3.2. <i>Relevante Daten aus der LURIC-Datenbank</i>	22
3.3. <i>Statistische Methoden</i>	24
3.3.1. <i>Genotypbasierte Tests</i>	24
3.3.2. <i>Allelbasierte Tests</i>	26
3.3.3. <i>Bestimmtheitsmaß</i>	27
3.3.4. <i>Überlebensanalyse</i>	27
4. Ergebnisse	28
4.1. <i>Schematischer Algorithmus des Studiendesigns</i>	28
4.2. <i>Datensammlung und Testauswahl</i>	29
4.3. <i>Screeningtest: Kruskal-Wallis-/Mann-Whitney-U-Test</i>	29
4.4. <i>Fehlerkorrektur nach Benjamini-Hochberg</i>	31
4.5. <i>Assoziationen zu anderen Markern des Vitamin D Spiegels</i>	31
4.6. <i>Test auf Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Equilibrium</i>	32
4.7. <i>Allelische Tests</i>	35
4.8. <i>Bestimmtheitsmaß R^2</i>	36

<i>4.9. Lineare Regression</i>	36
<i>4.10. SNPs mit hohen $\Delta 25(OH)D$ Werten</i>	37
<i>4.11. Überlebensanalyse: Cox-Regression</i>	37
<i>4.12. Überlebensanalyse: Kaplan-Meyer-Kurven</i>	39
5. Diskussion	50
6. Literaturverzeichnis	54
7. Publikationen/Dank	57

1. Zusammenfassung

1.1. Deutsche Zusammenfassung

Hintergrund: In der kaukasischen Bevölkerung besteht häufig ein Vitamin D Mangel. Dieser ist bei vielen Erkrankungen, wie zum Beispiel diversen Krebserkrankungen, Autoimmunkrankheiten, Infektionen und kardiovaskulären Krankheiten mit erhöhten Inzidenzen sowie einem ungünstigeren klinischen Verlauf assoziiert. Vorherige Arbeiten haben bereits einige der Faktoren, welche den Vitamin D Status beeinflussen, identifiziert, jedoch liegen bisher sehr wenige Untersuchungen zur Relevanz von genetischen Variationen für die 25(OH)D Serumkonzentration vor.

Diese Arbeit analysiert die Hypothese, dass Varianten von Genen (SNPs), welche mit der Hautpigmentierung im Zusammenhang stehen, den 25(OH)D Serumspiegel einer Person beeinflussen.

Patienten und Methoden: In einer Kohorte der LURIC Studie (n=2974) wurde die mögliche Assoziation von 25(OH)D Serumkonzentration (Median der Kohorte: 15,5 ng/ml) und SNPs (n=244) in der Nähe von bzw. in Genen, welche die Hautpigmentierung beeinflussen (n=15) untersucht. Dies erfolgte mithilfe des Statistikprogrammes SPSS (SPSS 20, IBM Co., Armonk, US). Es wurden Gene analysiert, die an der Biogenese des Melanins beteiligt sind (*ATP7A*, *DTNBP1*, *BLOC1S5*, *PLDN*, *PMEL*), die mit dem Transport und Transfer im Melanozyten assoziiert sind (*RAB27A*, *MYO5A*, *MLPH*), welche als Regulatoren im Melanozyten fungieren (*MC1R*, *MITF*, *PAX3*, *SOX10*) oder die über andere Mechanismen mit der Hautpigmentierung im Zusammenhang stehen (*DKK1*, *RACK1*, *CNR1*).

Ergebnisse: Ein Kolmogorov-Smirnov-Test zeigte, dass der 25(OH)D Spiegel in der untersuchten Kohorte nicht normalverteilt ist. Aufgrund dessen wurden die weiteren statistischen Untersuchungen mit den Medianen der 25(OH)D Konzentration durchgeführt. Von den 244 getesteten erreichten 11 SNPs aus den Genen *PAX3* (n=1), *MLPH* (n=4), *BLOC1S5* (n=1), *CNR1* (n=1), *PMEL* (n=1), *ATP7A* (n=3) das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) und waren mit einer höheren oder niedrigeren 25(OH)D Serumkonzentration assoziiert. 3 SNPs waren nach der Korrektur für multiples Testen (nach Benjamini-Hochberg) weiterhin signifikant. Diese 3 SNPs erreichten auch das geforderte Signifikanzniveau einer Abweichung der PTH Konzentration und blieben auch nach der Korrektur für multiples Testen weiterhin signifikant. 2 SNPs aus dem Gen *ATP7A* zeigten zusätzlich eine Assoziation mit der

Deutsche Zusammenfassung

1,25(OH)₂D Serumkonzentration. Weiterhin wurde analysiert welcher Anteil der Varianz der 25(OH)D Konzentration von den „signifikanten“ SNPs erklärt wird. Der Determinationskoeffizient (R^2) für die 11 signifikanten SNPs betrug 1,6 %. Außerdem wurden die Auswirkungen der SNPs auf die Lebenserwartung innerhalb dieser Kohorte (Patienten mit KHK) untersucht. In der Cox-Regression zeigte sich eine Assoziation des SNP rs2292881 (*MLPH*) mit dem Überleben. Die Kaplan-Meier Analyse ergab kein signifikantes Ergebnis.

Schlussfolgerungen: Varianten von Genen, welche die Hautpigmentierung beeinflussen, haben einen Einfluss auf die 25(OH)D Konzentration des Menschen. Insgesamt zeigten sich in 6 der 15 getesteten Genen (*PAX3*, *MLPH*, *BLOC1S5*, *CNR1*, *PMEL*, *ATP7A*) Varianten, welche einen signifikanten Einfluss auf den Vitamin D Status haben.

1.2. Englische Zusammenfassung

Association of variants of genes involved in skin pigmentation and vitamin D status

Background: In Caucasians, vitamin D deficiency is common and associated with higher risk for and unfavourable outcome of many diseases, including various types of cancer, infectious, cardio-vascular, and autoimmune diseases. Individual factors that predispose for a person's vitamin D status, including skin type, have been identified, but limited data exist on genetic determinants of serum 25(OH)D concentration.

Patients and Methods: In a cohort of the LURIC study, we tested the hypothesis that variants (SNPs, n=244) of several genes involved in skin pigmentation (n=15) *ATP7A*, *DTNBP1*, *BLOC1S5*, *PLDN*, *PMEL* (involved in melanosomal biogenesis); *RAB27A*, *MYO5A*, *MLPH* (encoding transfer proteins relevant for melanosomal transport within melanocytes); *MC1R*, *MITF*, *PAX3*, *SOX10*, *DKK1*, *RACK1*, *CNR1* (involved in melanocyte signaling pathways) are predictive of serum 25(OH)D levels. We included 2974 patients (29.83% females, 70.17% males) with a mean 25(OH)D concentration of 17.3 ng/ml (median 15.5 ng/ml).

Results: 11 SNPs located in 6 genes were associated ($p < 0.05$) with lower or higher serum 25(OH)D levels (medians from highest to lowest): rs6454677 (*CNR1*), 22.5 ng/ml, $p = .046$; rs2069408 (*PMEL*), 17.05 ng/ml, $p = .015$; rs2292881 (*MLPH*), 16.8 ng/ml, $p = .041$; rs7569427 (*MLPH*), 15.3 ng/ml, $p = .026$; rs9328451 (*BLOC1S5*), 14.6 ng/ml, $p = .028$; rs10932949 (*PAX3*), 13.9 ng/ml, $p = .004$; rs7565264 (*MLPH*), 13.1 ng/ml, $p = .000992$; rs17139617 (*ATP7A*), 12.85 ng/ml, $p = .000096$; rs2227291 (*ATP7A*), 12.8 ng/ml, $p = .000047$; rs10521358 (*ATP7A*), 12.8 ng/ml, $p = .000025$; rs12469812 (*MLPH*), 12.5 ng/ml, $p = .030$. 3 out of these 11 SNPs reached the aimed significance level after correction for multiple comparisons (FDR). In the linear regression model adjusted for sex, body mass index (BMI), year of birth and month of blood sample 3 SNPs showed a significant association with 25(OH)D: rs7565264 (*MLPH*), rs10932949 (*PAX3*), rs9328451 (*BLOC1S5*). The combined impact on the variation of 25(OH)D serum levels (coefficient of determination (R^2)) for the 11 SNPs was 1.6% and for the 3 SNPs after FDR 0.3%. In Cox Regression we identified rs2292881 (*MLPH*) for having a significant association (advantage) with overall survival. Kaplan-Meier analysis did not show a significant impact of individual SNPs on overall survival.

Conclusion: These results have a fundamental importance to understand the role of sunlight, skin pigmentation and vitamin D for the human evolution.

2. Einleitung

2.1. Physiologische Bedeutung von Vitamin D

Der Vitamin D Mangel der kaukasischen Bevölkerung stellt ein großes Gesundheitsproblem dar [20]. In der Vergangenheit wurde dem Vitamin abseits der damals bekannten physiologischen Funktionen keine große Bedeutung beigemessen. Zu diesen Funktionen gehört die Mineralisation und das Wachstum des Skeletts sowie die damit verbundene Regulation des Kalziumstoffwechsel [12]. Bekannt ist, dass Krankheiten wie Rachitis und Osteomalazie eng mit dem Vitamin D Status verknüpft sind [21, 22]. Doch das ist nur die Spitze des Eisbergs: In den letzten Jahren konnten viele weitere Effekte dem Vitamin D zugeordnet werden, wodurch das Vitamin zunehmend an Bedeutung gewonnen hat und in den Fokus wissenschaftlichen Interesses gerückt ist [12]. Die Forschung an diesen Effekten erbrachte vielversprechende neue Erkenntnisse für Behandlung und Prävention, welche im Folgenden genauer erläutert werden.

Das Vitamin hat einen wichtigen Einfluss auf die Muskelkraft [22]. Als Voraussetzung für die optimale Zellfunktion einer Skelettmuskelzelle zeigte sich die Stimulation eines membranständig exprimierten Vitamin D Rezeptors (VDR) [21]. In einer Metaanalyse von 5 placebokontrollierten, randomisierten klinischen Studien (mit insgesamt 1237 Patienten) konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die Einnahme von Vitamin D (gegenüber nur Kalzium und Placebo) die Sturzwahrscheinlichkeit um 22% verringerte und damit das Risiko für eine Hüftfraktur abnahm (verbundenes, korrigiertes Odds Ratio 0,78; 95% CI 0,64 bis 0,92) [7].

Vitamin D ist ein potenter Immunmodulator. Wenn Monozyten oder Makrophagen in Kontakt mit Mykobakterium tuberculosis kommen regulieren sie Gene des Vitamin D Rezeptors (VDR) sowie der 25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase hoch, wodurch mehr 1,25(OH)₂D in den Zellen produziert wird. Hierdurch wird die Produktion von Cathelicidin gefördert, was in der Lage ist die Angreifer zu zerstören [22]. Bei Vitamin D insuffizienten Personen (25(OH)D < 20 ng/ml) können Makrophagen oder Monozyten diesen Weg der Immunantwort nicht initiieren [22].

Auch auf die Insulinsensitivität und die Funktion der β -Zellen im Pankreas hat das Vitamin D einen Einfluss. Studien zeigten, dass eine positive Korrelation zwischen 25(OH)D Konzentration und Insulinsensitivität und ein negativer Effekt bei Vitaminmangel auf die

Vitamin D Versorgung in Deutschland

Funktion der β -Zellen besteht [10]. Dies erklärt, dass Populationen, in denen ein Mangel an Vitamin D herrscht, eine höhere Prävalenz von Diabetes mellitus haben [39].

Eine weitere Erkrankungsgruppe, die eine Assoziation mit Vitamin D zeigt, sind Tumorerkrankungen. Eine Studie mit 32 826 Teilnehmern zeigte, dass das Odds Ratio von kolorektalen Karzinomen invers mit dem 25(OH)D Serumspiegel assoziiert ist (Odds Ratio bei 16,2 ng/ml 1,0; Odds Ratio bei 39,9 ng/ml 0,53) [22]. Andere Studien zeigten, dass ein niedrigeres Brustkrebsrisiko oder ein reduziertes Risiko an einem malignen Melanom zu versterben, sobald es sich einmal entwickelt hat, ebenso mit der 25(OH)D Serumkonzentration assoziiert ist [6, 16].

Darüber hinaus beschrieben viele Studien, wie auch die „Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health“ (LURIC-) Studie, deren Datenbank für die Untersuchungen dieser Arbeit genützt wurde, den Zusammenhang zwischen Vitamin D Status und Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems, wie koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt, Herzfehler und Schlaganfall [4, 13, 53]. Sowohl das Auftreten der Ereignisse, als auch das Vorhandensein von kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonie, Hyperlipidämie, peripherer Gefäßerkrankung und Diabetes mellitus ist hierbei signifikant mit dem Vitamin D Mangel assoziiert. Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems gehören zu den häufigsten Todesursachen [42] und es zeigte sich eine Assoziation zwischen Vitamin D Mangel und gesteigerter Mortalität [4].

Die vorangegangenen Beispiele veranschaulichen die in den letzten Jahren neu entdeckten Einflüsse von Vitamin D. Vor allem aber der Einfluss auf bösartige Neubildungen und auf Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems, welche zusammen nach der Todesstatistik der Bundesrepublik Deutschland, die Todesursache der Mehrheit der deutschen Bevölkerung darstellen [42], verdeutlichen die Relevanz der weiteren Erforschung von Vitamin D und seiner Derivate. Hierfür sprechen auch gesundheitsökonomische Aspekte, da Belastungen des Gesundheitssystems durch weniger Arbeitsausfälle sowie durch effizientere Therapien von Krankheiten sinken könnten, wenn man die genaueren Verbindungen zwischen dem Vitamin und den Erkrankungen verstünde und Lösungsansätze dafür erforschte [18].

2.2. *Vitamin D Versorgung in Deutschland*

Wie viel Potential hierin liegt zeigte ein Blick auf den Vitamin D Status der deutschen Bevölkerung: In einer Studie wurde beschrieben, dass 56,8% aller Männer und 57,8% aller

Biochemie von Vitamin D

Frauen der Bundesrepublik Deutschland einen 25(OH)D Spiegel von ≤ 20 ng/ml besitzen [20]. Die Tabelle 1 zeigt, ab welchen Blutwerten man von einem Mangel ausgehen kann.

Schwerer Mangel	Mäßiger Mangel	Leichter Mangel	Optimal	Intoxikation
< 5 ng/ml	5 – 10 ng/ml	10 – 20 ng/ml	> 20 ng/ml	> 150 ng/ml

Tabelle 1: Definition von Vitamin D Mangel und Optimum (nach [20]) und Intoxikation (nach [22])

Demzufolge hat über die Hälfte der deutschen Bevölkerung einen Mangel an Vitamin D. Hinzuzufügen ist, dass einige Autoren den optimalen Wert nicht bei > 20 ng/ml sondern erst bei >30 ng/ml definieren [22], wodurch sich der Anteil an Personen mit einem Vitamin D Mangel noch vergrößern würde.

All diese Tatsachen zeigten die enorme Wichtigkeit sich tiefergehend mit diesem Vitamin zu beschäftigen. Um jedoch die spätere Fragestellung in Bezug auf genetische Varianten verstehen und beantworten zu können, ist zunächst ein Überblick über die Eigenschaften, die Möglichkeiten der Bereitstellung und die Stoffwechselwege des Vitamin D notwendig.

2.3. Biochemie von Vitamin D

Als Vitamin D fasst man eine Gruppe von Stoffen zusammen, welche zu den fettlöslichen Vitaminen gezählt wird. Die beiden wichtigsten Vertreter der Gruppe sind Vitamin D₃ (Cholecalciferol, molare Masse von $384,64 \frac{g}{mol}$) und Vitamin D₂ (Ergocalciferol, molare Masse von $396,65 \frac{g}{mol}$) [11, 35]. Die chemische Struktur ähnelt den Steroidhormonen [12]. In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts fand man heraus, dass es sich definitionsgemäß eher um ein Prohormon als um ein klassisches Vitamin handelt, da der Mensch es auch unabhängig von der Nahrungsaufnahme selbst synthetisieren kann [11].

Vitamin D₂ wird von Pflanzen und Hefen produziert. Hierfür wird Ergosterol von Licht mit Wellenlängen < 315 nm durch eine photochemische Reaktion in Previtamin D₂ umgewandelt, welches dann durch thermische Isomerisierung zu Vitamin D₂ werden kann [45]. Vom Menschen kann es nur durch die Nahrung aufgenommen werden, weshalb es für den Vitamin D Haushalt im Vergleich zu Vitamin D₃ eine untergeordnete Rolle spielt. Cholecalciferol kann in geringen Mengen auch durch das Essen tierischer Produkte wie z.B. Makrele oder Lachs aufgenommen werden. Die Nahrungsaufnahme deckt insgesamt jedoch nur 5% der Vitamin D Versorgung des Menschen [35]. Nicht nur der relativ niedrige Vitamin D - Gehalt

Biochemie von Vitamin D

der Nahrungsmittel, sondern auch intestinale Pathologien limitieren die Aufnahme des fettlöslichen Vitamin D. So zeigte sich bei Menschen mit Fettabsorptionsstörungen nach oraler Aufnahme von Vitamin D kein Anstieg des 25(OH)D Serumspiegels. Patienten mit solch einer Erkrankung sind deswegen vollständig auf die eigene Produktion des Vitamins angewiesen [35].

Der größte Anteil (etwa 95%) der Versorgung mit Vitamin D₃ wird in Anwesenheit von Sonnenlicht in der Haut produziert [24]. Diese Biosynthese ist ein komplexer Prozess, der die Bildung verschiedenster Zwischenprodukte beinhaltet. Zum besseren Verständnis sind die beteiligten Stoffe in Tabelle 2 zusammengefasst.

Stoff	Synonym	Abkürzung
Acetyl-CoA	-	-
Cholesterin	Cholesterol	-
Provitamin D ₃	7-Dehydrocholesterin	7-DHC
Prävitamin D ₃	s-cis, s-cis-Prävitamin D ₃	-
Vitamin D ₃	Cholecalciferol	-
25-Hydroxy-Vitamin D ₃	Calcidiol	25(OH)D
1 α ,25-Hydroxy-Vitamin D ₃	Calcitriol	1 α ,25(OH) ₂ D
Provitamin D ₂	Ergosterol, Ergosterin	-
Previtamin D ₂	-	-
Vitamin D ₂	Ergocalciferol	-

Tabelle 2: Übersicht über die für die Synthese des Vitamin D₂ und des Vitamin D₃ wichtigen Stoffe sowie über die aktiven Metaboliten nach [11, 26, 35]

Die Synthese von Vitamin D beginnt mit 7-Dehydrocholesterin (7-DHC), welches sich zum Großteil in den Lipiddoppelmembranen der Hautzellen des menschlichen Organismus befindet [23] und im Rahmen der Cholesterinbiosynthese produziert wird. Der Ausgangsstoff der Cholesterinbiosynthese ist das bei dem Abbau von Kohlenhydraten und manchen Aminosäuren sowie der β -Oxidation von Fettsäuren entstehende Acetyl-CoA. Dieses Molekül wird in mehreren Reaktionsschritten zu einem 27 C-Atome besitzenden Cholesterinmolekül umgebaut [26]. Das Cholesterin besitzt folgende Aufgaben im Körper: Es ist Bestandteil der zellulären Membranen und der mitochondrialen Innenmembran, es ist die Muttersubstanz für die Biosynthese der Steroidhormone und es ist Ausgangspunkt der Herstellung von Gallensäuren. Das Cholesterin in der Haut befindet sich im chemischen Reaktionsgleichgewicht mit 7-DHC, wobei dieses stark auf der Seite des Cholesterins liegt. Die Gleichgewichtseinstellung wird durch das Enzym 7-DHC- Δ 7-Reduktase katalysiert [35].

Biochemie von Vitamin D

Ultraviolette B Strahlen der Wellenlänge 290nm - 315nm werden von 7-Dehydrocholesterin absorbiert. Etwa 65% des 7-DHC lagern in der Epidermis und 35% in der Dermis [23]. Durch die Lichtabsorption spaltet sich eine Bindung im 7-DHC zwischen den C-Atomen 9 und 10, wodurch das s-cis, s-cis-Prävitamin D₃ entsteht. Das Produkt ist thermodynamisch instabil und reorganisiert sich deshalb schnell in das thermodynamisch stabile Vitamin D₃ [24].

In der Haut synthetisiertes Vitamin D₃ kann durch Diffusion in das Kapillarbett gelangen und wird dort, mithilfe von Transportproteinen, mit dem Blut überwiegend in Richtung Leber transportiert [35]. Zu diesen zählen das D-Bindungsprotein (DBP) und Albumin. Ein Teil des Vitamin D wird im Fettgewebe und in geringen Mengen im Muskelgewebe gespeichert, um es in Mangelzuständen dem Körper langsam wieder zur Verfügung zu stellen. Die Halbwertszeit beträgt etwa zwei Monate. Das, mit der Nahrung aufgenommene, Vitamin D wird nach der intestinalen Resorption im Blut an Chylomikronen gebunden. Es geht nur sehr langsam auf DBP über, was erklären könnte, wieso oral aufgenommenes Vitamin D leichter im Gewebe gespeichert werden kann [35]. Aufgrund der niedrigeren Bindungsaffinität des in Hefen und Pflanzen produzierten Vitamin D₂ zum DBP resultiert sowohl ein Aktivitätsunterschied der beiden Vitamin D-Formen, als auch eine kürzere Halbwertszeit von Vitamin D₂ [35].

Die Umsetzung zum Metaboliten 25-Hydroxy-Vitamin D (25(OH)D oder Calcidiol) findet in der Leber statt. Sowohl über die Nahrung aufgenommenes Vitamin D₂ und D₃ als auch das in der Haut produzierte Vitamin D₃ werden fortan in analogen Schritten aktiviert, weshalb beide Formen von nun an unter Vitamin D zusammengefasst werden. Die 25-Hydroxilierung wird hauptsächlich durch das mikrosomale Enzym *CYP2R1* katalysiert. Das Enzym unterliegt keiner strikten Regulierung. Das Produkt wird nach seiner Bildung in den Blutkreislauf abgegeben, wo es, hauptsächlich an DBP gebunden, zirkuliert und es besitzt eine Halbwertszeit von 10 Tagen [35].

Der Komplex aus 25(OH)D und DBP wird durch Endozytose, mithilfe der Proteine Cubilin und Megalin, in die Nierenzellen aufgenommen. Durch Peptidasen wird das DBP abgespalten und der ungebundene Vitaminmetabolit wird im proximalen Tubulus der Niere durch das Enzym *CYP27B1* in 1 α -Position hydroxiliert. Hierbei entsteht das aktive Hormon 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D oder Calcitriol). Es wird nahezu vollständig an DBP gebunden wieder in den Blutkreislauf abgegeben, womit es an seine Zielorgane gelangt. Es besitzt eine Halbwertszeit von 4 - 6 Stunden [35]. Der Bildungsprozess des aktiven Hormons unterliegt einer strengen Regulation. Die Produktion wird gehemmt durch negative

Biochemie von Vitamin D

Rückkopplung, hohe Phosphat- (PO_4^{3-}) und Kalzium (Ca^{2+})- Serumspiegel, das Herabsetzen der Gentranskription von *CYP27B1* bei Ligandenbindung an den Vitamin D-Rezeptor (VDR) und durch den von Osteoblasten und Osteoklasten gebildeten Fibroblasten-Growth-Faktor 23 (FGF-23) [24, 35]. Dem gegenüber erhöhen nachfolgende Aktivatoren die Hormonproduktion: Eine Hypokalzämie im Serum und die Aktivierung des Parathormon-Rezeptors (PTH-Rezeptor) durch seinen Liganden führen jeweils zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration in den Nierenzellen des proximalen Tubulus, was zu einer Zunahme der Aktivität der 1α -Hydroxylase führt [26, 35].

Neben dem zuvor beschriebenen Weg der renalen Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ besitzen weitere Gewebe (Keratinozyten, Makrophagen, B- und T-Zellen, dendritische Zellen, Knochen-, Plazenta-, Prostata-, Hirn-, Lungen- und verschiedene Krebszellen) das Enzym *CYP27B1* und sind somit in der Lage das aktive Hormon zu synthetisieren [24, 35]. Dieser Vorgang wird als extrarenale Bildung von Calcitriol bezeichnet. Im Unterschied zum renal gebildeten Calcitriol wirkt es lokal am Bildungsort und nimmt somit keinen wesentlichen Einfluss auf den Kalziumstoffwechsel. Man geht davon aus, dass die extrarenale Produktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ für einen Großteil der nicht kalziumassoziierten Effekte von Vitamin D verantwortlich ist [24].

Der Abbau des Vitamin D erfolgt durch das Enzym *CYP24A1*, welches eine Hydroxylierung an C24 katalysiert. Dies ist sowohl bei $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (wird zu Calcitonsäure umgebaut) als auch bei $25(\text{OH})\text{D}$ möglich. Die Produkte sind wasserlöslicher und können mit der Galle ausgeschieden werden [22]. Eine erhöhte Konzentration von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ stimuliert die Aktivität des Abbauenzym [26].

2.4. Einflussgrößen auf den Bildungsprozess von Vitamin D

Der Bildungsprozess des Vitamin D_3 in der Haut unterliegt sowohl äußeren sowie individuellen Einflussgrößen, welche im Folgenden genauer erläutert werden.

Ein, den Vitamin D Spiegel regulierender, Faktor ist die Wellenlänge des Lichtes. Bei Wellenlängen $>300\text{nm}$ kann sich das Prävitamin D_3 durch Photokonversion in seine Photoisomere Lumisterol $_3$ oder Tachysterol $_3$ umwandeln. Diese können irreversibel zu Toxisterol reagieren, welches einem Abbruch der Vitamin D_3 Synthese entspricht [35]. Bei einer Wellenlänge von 310 nm werden lediglich 22% der maximalen Effektivität der Vitaminproduktion, die bei 298 nm liegt, erreicht [35]. Eine Studie zeigte, dass die oben genannten Photoisomere bei kaukasischen Personen nach zehnminütiger Bestrahlung mit

Biochemie von Vitamin D

simulierter Äquatorialsonne in der Haut noch nicht nachweisbar sind. Nach acht Bestrahlungsstunden hatten sich circa 60% des Prävitamin D₃ in Photoisomere umgewandelt [23], sodass davon auszugehen ist, dass auch die Bestrahlungsdauer einen Einfluss auf den Vitamin D Spiegel hat. Es ist außerdem bekannt, dass es bei längerer Lichteinwirkung und zunehmender Wellenlänge vermehrt zur Photolyse von bereits synthetisiertem Vitamin D₃ kommt. Hierbei wird Vitamin D₃ irreversibel in Suprasterol I und II sowie 5,6-Transvitamin D₃ umgewandelt, wodurch es nicht biologisch aktiv werden kann. Diese Prozesse sind physiologisch, um sich vor einer übermäßigen Bildung von Vitamin D₃ zu schützen [23].

Eine weitere äußere Einflussgröße ist der Sonneneinfallswinkel, welcher an die geografische Breite und die Jahreszeit gebunden ist. So konnte gezeigt werden, dass Probanden mit dem Hauttyp II in Boston, USA (42°N) von Dezember bis Februar, in Edmonton, Kanada (52°N) von November bis März und in Bergen, Norwegen (61°N) sogar von Oktober bis März kein Prävitamin D₃ bilden können [23]. Neben der geografischen Lage hat auch die Tageszeit Einfluss auf die Vitaminbildung. Man fand heraus, dass an einem sonnigen Tag im Juni in Boston zwischen 7 Uhr und 18 Uhr Prävitamin D₃ gebildet werden kann. Die Produktion lag dabei von 8 bis 10 Uhr und von 16 bis 18 Uhr unter 20% derer, welche um 12 Uhr mittags stattfand [23]. An einem sonnigen Tag im Oktober in Boston konnte um 12 Uhr nur 20% der Vitaminproduktion im Vergleich zu Juni stattfinden, welches die saisonale Verknüpfung andeutet [23].

Auch das Wetter hat einen Einfluss auf die Bildung von Vitamin D₃. Ein Vergleich der Vitamin D Produktion an einem sonnigen Junitag mit jener an einem bewölkten Junitag zeigte nach einer Stunde, dass die Vitamin D Bildung bei bewölktem Himmel um 20% abnahm [23].

Ein individueller Faktor ist der Gebrauch von Sonnenschutzmitteln und das Abschirmen der Haut durch Kleidung. Auch wenn der Benefit durch den Gebrauch von Sonnencreme als Hautschutz außer Frage steht, benötigt der Körper die Strahlung, die für einen Sonnenbrand, Hautalterung und Hautkrebs verantwortlich ist auch zur Bildung von Vitamin D₃. Es wurde gezeigt, dass der Vitamin D Spiegel bei regelmäßigem Gebrauch von Sonnencreme signifikant niedriger ist [23]. Ein ähnlicher Effekt wird durch das Tragen von Kleidung erzielt. Eine Studie von Erkal et al. stellte fest, dass türkische Frauen in Deutschland zu 30% einen Vitamin D Mangel aufwiesen, türkische Männer in Deutschland hingegen nur zu 8%. Dies wurde mit der Verschleierung der türkischen Frauen erklärt, wodurch diese kaum Vitamin D₃ in der Haut bilden können [15].

Zielorgane des Calcitriols

Es wird vermutet, dass die Aktivität der 7-DHC- Δ 7-Reduktase an verschiedenen Körperstellen unterschiedlich ausgeprägt ist, wodurch der 7-DHC-Spiegel lokal stark schwankt. Dadurch kann sich bei einer Person, die derselben definierten Menge UV-Strahlung an verschiedenen Stellen der Haut ausgesetzt wird, jeweils eine unterschiedliche Menge an Prävitamin D₃ bilden. Hieraus geht hervor, dass die Variable kutane 7-DHC Konzentration ein individueller Faktor ist, der den Vitamin D Spiegel beeinflusst [35].

Weiterhin hängt die Vitaminbildung vom Hauttyp ab. Die Hauttypen wurden von Fitzpatrick entsprechend Tabelle 3 in sechs Typen unterteilt [14]. Auf die Vorgänge der für diese Arbeit wichtigen Prozesse der Hautpigmentierung wird später noch genauer eingegangen.

Hautfarbe/Merkmale	Hauttyp	Sonnenbrand	Sonnenbräune
sehr helle Haut, Sommersprossen, rote Haare, helle Augen	Keltischer Typ (I)	sehr häufig Sonnenbrand	nahezu keine Sonnenbräune
helle Haut, blonde Haare, helle Augen	Nordischer Typ (II)	häufig Sonnenbrand	langsame, minimale Bräunung
hellbraune Haut, hellbraune bis dunkel braune Haare, helle oder braune Augen	Mischtyp (III)	manchmal Sonnenbrand	langsame, aber fortschreitende Bräunung bis hellbraun
mittelbraune Haut, dunkle Haare, dunkle Augen	Mediterraner Typ (IV)	selten Sonnenbrand	schnelle Bräunung bis mittelbraun
dunkelbraune Haut	Dunkler Hauttyp (V)	kaum Sonnenbrand	schnelle Bräunung bis dunkelbraun
schwarze Haut	Schwarzer Hauttyp (VI)	praktisch nie Sonnenbrand	-

Tabelle 3: Die sechs verschiedenen Hauttypen nach Fitzpatrick [14]

Es konnte gezeigt werden, dass Individuen mit einem niedrigeren Hauttyp bei gleicher Lichtexposition eine signifikant höhere Produktion von Vitamin D₃ aufweisen [23].

2.5. Zielorgane des Calcitriols

An den Zielorganen des Calcitriols nehmen die Zellen den Komplex aus 1,25(OH)₂D und DBP endozytosevermittelt auf. Wirkungsort ist ein überwiegend im Zellkern lokalisierter Rezeptor, der VDR, welcher strukturell zu der Großfamilie der Steroidhormonrezeptoren gehört. Der aktive Vitamin D-Rezeptor liegt als Heterodimer mit einem Retinoid-X-Rezeptor des Typs RXR vor. Durch Aktivierung des Rezeptorkomplexes wird die Expression von

Hautpigmentierung

Genen induziert oder reprimiert [26]. In Untersuchungen fanden Morris et al. im Jahr 2010 3065 Gene, welche potentiell durch Vitamin D regulatorisch beeinflusst werden können [29].

Bei Aktivierung des VDR durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ im Osteoblasten wird die Expression des NF κ B-Ligand (RANKL) gesteigert. Dieses Protein bindet und aktiviert RANK, einen Rezeptor der Präosteoklasten, wodurch eine Signaltransduktion startet, die zur Ausreifung der mehrkernigen Osteoklasten führt. Diese sind in der Lage Salzsäure (HCL) freizusetzen, um die Knochenmatrix aufzulösen, wodurch Kalzium freigesetzt und so der Kalziumspiegel im Blut erhöht wird [24].

Findet die Aktivierung des VDR im Darmtrakt statt, wird die Expression des epithelialen Kalziumkanals, des Kalzium-bindenden-Proteins (Calbindin) und der basolateralen Kalzium-ATPase erhöht, wodurch der transzelluläre Transport von Kalziumionen gefördert wird [24, 26]. Weiterhin wird vermutet, dass eine intestinale Aktivierung des VDR zu einer gesteigerten Expression eines Na^+/P_i -Symporters führt, wodurch die Phosphatresorption im Intestinaltrakt zunimmt [26].

Weitere Zielorgane sind die Nebenschilddrüsen (Hemmung der Parathormon-Biosynthese), das hämatopoetische System (Stimulierung der Differenzierung von Zellen), das Immunsystem (Modulation der Aktivität) und epidermale Zellen (Stimulierung der Differenzierung) [26].

2.6. *Hautpigmentierung*

Für diese Arbeit kommt einer Einflussgröße auf die Bildung des Vitamin D eine besondere Bedeutung zu - der Hautpigmentierung [22]. Um die Zusammenhänge zu verdeutlichen, wird im Folgenden der Vorgang der Pigmentierung genauer erläutert.

Die Melanoblasten, Vorstufen der Melanozyten, entstammen der Neuralleiste und migrieren von dort in die Haut, die Haarfollikel, die Leptomeningen, die Cochlea und die Uvea. Dort differenzieren sie sich zu Melanozyten und verteilen sich typischerweise suprabasal entlang der Basalmembran [28]. Diese Zellen sind durch spezialisierte Zellorganellen, den sogenannten Melanosomen, in der Lage das Chromophor Melanin zu produzieren, von dem es zwei Typen, das Pheomelanin und das Eumelanin, gibt [46]. In der Haut versorgt ein Melanozyt typischerweise etwa 36 Keratinozyten mit Melanin, was als epidermale Melanineinheit bezeichnet wird. Das Melanin wird an die Keratinozyten abgegeben, um diese vor DNA-Schäden durch UV-Strahlen zu schützen, was als „nuclear capping“ bezeichnet

Hautpigmentierung

wird [28]. Melanin absorbiert Strahlung der Wellenlänge 290nm bis 700nm, wodurch diese nicht mit der DNA interagieren kann [23].

Die Funktion der Melanozyten unterliegt multiplen Einflussgrößen. Eine wichtige Rolle spielt hierbei der Wnt-Signalweg. Dieser nimmt durch die Aktivierung der Rezeptoren der Frizzled-Familie Einfluss auf die Melanozytenfunktion. Die sezernierten Glykoproteine verhindern durch komplexe Vorgänge den Abbau von β -Catenin im Proteasom, wodurch es akkumuliert und im Zellkern an den Transkriptionsfaktor *LEF/TCF* bindet. Hierdurch wird die Transkription der Wnt Zielgene verstärkt [46]. Ein Gen, welches Einfluss auf den Wnt-Signalweg nimmt ist dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1 (*DKK1*). Es ist ein Inhibitor des Wnt-Signalweges, wodurch es wiederum hemmend auf die Melanozytenproliferation wirkt [17, 51]. Ein weiteres Zielgen des Wnt-Signalweges ist der Transkriptionsfaktor microphthalmia transcription factor (*MITF*). Er steigert die Transkription wichtiger Gene für die Melaninsynthese. Mutationen in diesem Gen führen zum Waardenburg Syndrom Typ 2 [44]. Der Promotor von *MITF* wird von verschiedenen Transkriptionsfaktoren reguliert. Hierzu gehören unter anderen paired box 3 (*PAX3*) und SRY (sex determining region Y) - box 10 (*SOX10*) [51].

Der bekannteste Rezeptor, welcher die Funktion der Melanozyten reguliert ist der membranständige Melanocortin-1 Rezeptor (MC1R) [33]. Agonisten des Rezeptors sind das Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH) und mit schwächerer Rezeptoraffinität das Adrenocorticotropin (ACTH), welche beide aus dem hypophysären Prohormon Proopiomelanocortin (POMC) gebildet werden [27]. Durch Bindung der Liganden an den transmembranösen G-Protein-gekoppelten Rezeptor MC1R wird die Adenylatcyclase aktiviert. Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, woraus die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) resultiert. Über diesen Signalweg wird eine Modulation der Produktion von Pheomelanin und Eumelanin erreicht [33].

Auf den Melanozyten ist der Cannabinoid-Rezeptor 1 (CNR1) exprimiert. Unter UV-Strahlung schütten Keratinozyten Endocannabinoide aus. Über die Stimulation des CNR1 durch diese Liganden erhöht sich die nukleäre Aktivität des Transkriptionsfaktors MITF, woraus eine verstärkte Expression von Tyrosinase (TYR) erfolgt. Dies hat einen direkten verstärkenden Effekt auf die Melaninsynthese, welche durch UV-Strahlung angeregt wird. Eine zu hohe Konzentration der Endocannabinoide hingegen, welche bei sehr intensiver UV-Strahlung entstehen kann, schickt die Zelle über die Aktivierung des p53-Signalwegs in die Apoptose [32].

Hautpigmentierung

Das Guaninnukleotid-bindende-Protein, beta polypeptide 2-like 1 (GNB2L1), welches zu der Rezeptorfamilie der aktivierten Proteinkinase C (RACK) gehört, nimmt Einfluss auf die Melanozyten. Durch seine stabilisierende Wirkung auf die aktive Form der Proteinkinase C (PKC), reguliert GNB2L1 die Zellproliferation, zelluläre Interaktionen, die Funktionen des Zytoskeletts, die Transkription von Genen, die Apoptose und die Transformation in ein Malignom [48].

Für die Bildung des Melanins sind die Melanosomen verantwortlich. Grundsätzlich gilt es Pheomelanin und Eumelanin produzierende Melanosomen zu unterscheiden. Diese können während ihrer Reifung morphologisch in vier Phasen unterteilt werden. Im Stadium I, dem Prämelanosom, handelt es sich um abgeschnürte Vesikel des glatten Endoplasmatischen Retikulums, welche in kernnahen Regionen zu finden sind [46]. Der Unterschied zu frühen Endosomen in anderen Zellen besteht in unregelmäßigen Arrays von Amyloidfibrillen, welche durch das Protein PMEL (aus dem gleichnamigen Gen *PMEL*) angeordnet werden [41]. Wichtige Enzyme und Strukturproteine des Melanosoms werden im rauen Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und danach im Golgi-Apparat in Vakuolen verpackt. Diese können mit den Prämelanosomen verschmelzen, wodurch sie in Stadium II gelangen. Während Pheomelanin produzierende Melanosomen in allen Phasen unter dem Elektronenmikroskop rund erscheinen, wirken die anderen ab Stadium II eher ellipsoid [46]. Die Pheomelanin produzierenden Melanosomen sind ab diesem Stadium in der Lage Melanin zu synthetisieren. Die Eumelanin produzierenden Melanosomen nehmen weitere Enzyme auf, wodurch sie in Stadium III und IV gelangen [38, 46].

Während des Reifungsprozesses bewegen sich die Melanosomen von der kernnahen Region in Richtung Plasmamembran. Dies geschieht vor allem durch Mikrotubuli, Aktinfilamente und Myosin. Dynein und Kinesin sind dabei Mediatoren am mikrotubuliabhängigen Intrazellulärtransport. Gene der Hautpigmentierung, die Einfluss auf die dynamische Bewegung der Melanosomen haben sind zum Beispiel *RAB27A*, *MLPH* und *MYO5A*. Mutationen in einem dieser Gene führt zu einer Akkumulation der Pigmente in der kernnahen Region [51].

Melanin ist das von den Melanozyten gebildete Produkt und hauptverantwortlich für die Unterschiede in der Hautfarbe des Menschen. Bei der Bildung von Eumelanin hydroxiliert und oxidiert das Schlüsselenzym Tyrosinase (TYR) Tyrosin zu Dopachinon. Dieses wird über das Zwischenprodukt Leucodopachrom zu Dopachrom umgewandelt [40]. Dopachrom kann auf zwei verschiedene Arten weiterreagieren: Einerseits durch Decarboxylierung zu 5,6-

Assoziation von Hautpigmentierung und Vitamin D

Dihydroxyindol (DHI) und anschließend über Indol-5,6-chinon zum sogenannten DHI-Melanin, welches eine dunkelbraune bis schwarze Farbe besitzt. Andererseits kann Dopachrom durch das Enzym Dopachrom-Tautomerase (DCT) zu 5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure (DHICA) und weiter durch die DHICA-Oxygenase (TRP1) zum DHICA-Melanin umgesetzt werden, welches eine hellbraune Farbe besitzt [40, 46]. Beide Endprodukte fasst man als Eumelanin zusammen. Bei der Bildung von Pheomelanin wird ebenso Tyrosin durch TYR zu Dopachinon umgewandelt. In Anwesenheit von Cystein kann dieses zu Cysteinyldopa werden, was über Benzothiazin zum Pheomelanin reagiert [40].

Das Enzym TYR ist ein Schlüsselenzym der Melaninsynthese, welches im neutralen pH-Bereich optimal arbeitet. Defekte in diesem Enzym führen zum Okulokutanen Albinismus Typ 1 (OCA1). Defekte am P-Protein (aus dem Gen *OCA2*), einem Transporter für kleine Moleküle zur Stabilisation des intrazellulären pH-Wertes, führen zum namensgebenden Okulokutanen Albinismus Typ 2 (OCA2) [8]. Der Transporter copper-transporting ATPase 1 (aus dem Gen *ATP7A*) siedelt sich im Trans-Golgi-Netzwerk mit TYR an und sie arbeiten daraufhin zusammen im Melanosom [51]. Die korrekte Zusammenarbeit dieser Komponenten hängt vom sogenannten Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex (BLOC) – 1 ab, welcher die Aktivität von TYR reguliert [51]. BLOC-1 besteht aus acht Untereinheiten, für die unter anderen die Gene *PLDN*, *DTNBP1* und *BLOC1S5* kodieren [41].

2.7. Assoziation von Hautpigmentierung und Vitamin D

Doch wie ist die Pigmentierung mit Vitamin D assoziiert? Zum einen besitzen Melanozyten Vitamin D-Rezeptoren und bilden in Anwesenheit von Vitamin D vermehrt Melanin [2]. Zum anderen liegt das Lichtabsorptionsspektrum des Melanins (290nm bis 700nm) im Wellenlängenbereich (290nm - 315nm) der Vitamin D Synthese [23]. In einer Studie wurde Probanden mit den unterschiedlichen Hauttypen II-V eine Dosis von 75% der minimalen Erythemdosis, dreimal wöchentlich, über zwölf Wochen verabreicht. Zur Messung der Vitaminproduktion der Probanden wurde 25(OH)D im Serum als Parameter erfasst. Am Ende der Studie zeigten die Hauttypen II, III, IV und V einen Anstieg von 25(OH)D um 210%, 187%, 125% und 40% [23]. Dieses Ergebnis und der Zusammenhang der Vitaminbildung zur geographischen Lage beweist, dass Menschen mit einem helleren Hauttyp in unseren Breiten in der Lage sind mehr Vitamin D zu bilden als Menschen mit einem dunklen Hauttyp. Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus dafür verantwortlich ist, dass unsere Vorfahren, welche aus der äquatorialen Region in Richtung Süden und Norden auswanderten, im Sinne

Assoziation von Hautpigmentierung und Vitamin D

einer natürlichen Selektion im Laufe der Generationen eine hellere Hautpigmentierung annahmen, um ihre Vitamin D Versorgung sicher zu stellen [34].

Die Vielfalt der Varianten der Hautpigmentierung auch innerhalb der verschiedenen Hauttypen ist sehr umfassend. Heutzutage sind wahrscheinlich noch immer nicht alle Gene und deren Polymorphismen bekannt, welche die Hautpigmentierung beeinflussen. Diese Arbeit versucht der Frage näher zu kommen, inwiefern SNPs von bekannten Genen mit Bezug zur Hautpigmentierung eine Auswirkung auf die 25(OH)D Serumkonzentration des Menschen haben. Eine vorherige Arbeit zeigte, dass es Assoziationen zwischen einigen Genen mit Bezug zum Hautpigmentierungsprozess wie EXOC2, TYR, TYRP1 und DCT und dem Vitamin D Status gibt [37]. Aufgrund dieser hochinteressanten Ergebnisse beschlossen wir nach weiteren Genen zu suchen und uns auf andere Mechanismen des Pigmentationsprozesses zu fokussieren. Eine Zusammenfassung der für diese Arbeit relevanten Gene und deren Wirkung auf die Pigmentierung zeigt Abbildung 1.

Assoziation von Hautpigmentierung und Vitamin D

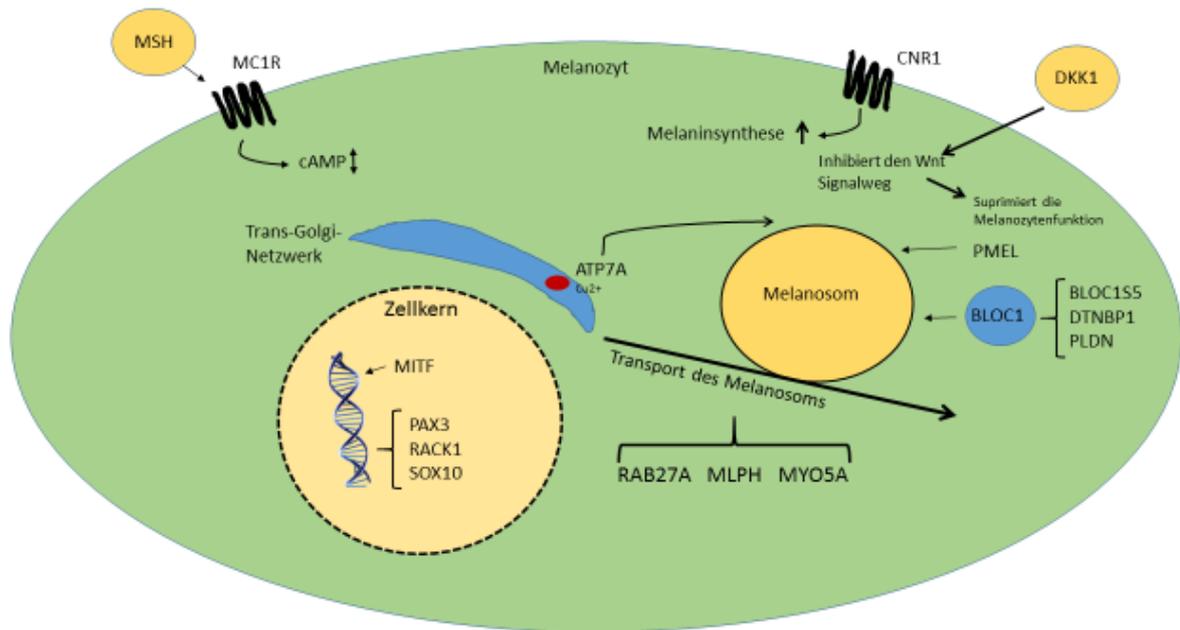


Abbildung 1: **Illustration der Funktion der analysierten Gene und wie sie in den Pigmentierungssignalweg involviert sind**

Abgebildet ist die Wirkung der von dieser Arbeit untersuchten Gene auf den Pigmentierungssignalweg, der Tyrosinase-Signalweg wurde dabei nicht gezeigt, da er schon in einer anderen Arbeit untersucht wurde. MSH: Melanozyten stimulierendes Hormon, MC1R: Melanocortin 1 Rezeptor, cAMP: 3',5'-zyklisches AMP, CNR1: Cannabinoid Rezeptor 1, DKK1: Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1, PMEL: Premelanosomales Protein, BLOC1S5: Biogenesis of lysosomal organelles complex-1 subunit 5, DTNBP1: Dystrobrevin binding protein 1, PLDN: Biogenesis of lysosomal organelles complex-1subunit 6, BLOC1: Biogenesis of lysosomal organelles complex-1, ATP7A: Cu^{2+} -transporting alpha polypeptide, MITF: Microphthalmia-assoziiertes Transkriptionsfaktor, PAX3: Paired box 3, RACK1: Guaninnukleotid bindendes Protein, SOX10: SRY (Sex determining region Y)-box 10, RAB27A: Member RAS oncogene family, MLPH: Melanophilin, MYO5A: Myosin VA (Myoxin)

3. Material und Methoden

3.1. *“Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC)”- Studie*

Die in dieser Arbeit verwendeten Daten stammten aus der so genannten LURIC Studie und wurden uns von Mitarbeitern dieser Studie zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um eine prospektive klinikbasierte Kohortenstudie, in welcher biochemische, genetische und umweltbedingte Risikofaktoren für das Auftreten einer koronaren Herzerkrankung (KHK) untersucht werden [50]. Die Studie enthält 3316 kaukasische Patienten, bei welchen zwischen 1997 und 2000 im Klinikum Ludwigshafen eine Koronarangiographie durchgeführt wurde [50].

Die KHK wurde mittels Koronarangiographie beurteilt, wobei eine sichtbare Stenose von größer oder gleich 20% in mindestens einem von 15 Koronarsegmenten als KHK definiert wurde. Patienten mit kleineren Stenosen wurden als Kontrollgruppe hinzugezogen. Zur Wahrung der klinischen Homogenität der Population wurden Patienten aus der Studie ausgeschlossen, wenn sie unter einer weiteren akuten Erkrankung litten, eine chronische nichtkardiale Vorerkrankung hatten oder in den vorangegangenen fünf Jahren eine maligne Erkrankung diagnostiziert wurde. Genehmigt wurde die Studie durch die Ethikkommission der Ärztekammer Rheinland-Pfalz und wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Teilnehmer hatten schriftlich eingewilligt. [50]

Insgesamt 115ml venöses Blut wurde den Patienten am frühen Morgen unter standardisierten Bedingungen abgenommen, nachdem sie die Nacht über nüchtern geblieben waren. Die genomische DNS wurde in EDTA antikoaguliertem Blut im üblichen Aussalzungsprozess isoliert. Innerhalb von 30 Minuten wurde das restliche Blut bei 3000g für 10 Minuten zentrifugiert, sofort danach aufgeteilt (aliquotiert) und bei -80 Grad Celsius eingefroren für weitere Analysen. Der Serumspiegel von 25(OH)D wurde mittels Radioimmunoassay (DiaSorin Sa, Antony, Frankreich) bestimmt. Der Intra- bzw. der Inter-Assay-Koeffizient des Radioimmunoassays unterlag einer Schwankung von 8,6 % bzw. 9,2 % [37]. Der Serumspiegel von 1,25(OH)₂D wurde ebenso durch Radioimmunoassay (Nichols Institute Diagnostika GmbH, Bad Nauheim, Deutschland) mittels eines Mehrkristallzählers (Berthold LB2014, DiaSorin, SA, USA) bestimmt [31]. Das intakte Parathormon (PTH) wurde mit ElectroChemiLuminescence Immunoassay (ECLIA) an einem Elecsys 2010 bestimmt (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Der Inter-Assay-Koeffizient hatte eine Schwankung von 5,7–6,3% [31]. In der LURIC Studie wurde die Genotypisierung durchgeführt, indem der

Relevante Daten aus der LURIC-Datenbank

Affymetrix Human SNP Array 6.0 in Heidelberg verwendet wurde. Die Genotypimputation wurde mit Daten von MACH 1.0 und HapMap II CEU (release 22, NCBI build 36, dbSNP 126) als Referenz durchgeführt. Nach der Imputation waren 2 543 887 SNPs verfügbar. SNPs mit einer Quadratkorrelation von größer oder gleich 0,3 zwischen den wahren und den hinzugerechneten Genotypen wurden als gut hinzugerechnet gewertet. Von diesen Daten wurden SNPs in der Nähe oder innerhalb von 15 Genen ausgewählt und analysiert.

3.2. Relevante Daten aus der LURIC-Datenbank

Die benötigten Daten wurden aus der LURIC-Datenbank genommen. In dieser Arbeit wurden 15 Gene betrachtet, es handelt sich dabei um *ATP7A*, *BLOC1S5*, *CNR1*, *DKK1*, *DTNBP1*, *MC1R*, *MITF*, *MLPH*, *MYO5A*, *PAX3*, *PLDN*, *PMEL*, *RAB27A*, *RACK10* und *SOX10*. Bei diesen Genen besteht eine Assoziation zur Hautpigmentierung die bereits in der Einleitung beschrieben wurde [1, 32, 41, 51].

Die Tabelle 4 zeigt die 15 analysierten Gene mit ihrem jeweiligen Genprodukt, dem vollständigen Namen, der Lokalisation auf ihrem Chromosom und einer Kurzbeschreibung ihrer Funktion.

Gen [19]	Genprodukt [1, 32, 41, 51]	Vollständiger Name [19]	Chromosomen-lokalisation [19]	Funktion [1, 32, 41, 51]
ATP7A	copper-transporting ATPase 1	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, alpha polypeptide	Xq21.1	Kupfertransporter im trans-Golgi Netzwerk
BLOC1S5	BLOC1S5	biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 5	6p25.1-p24.3	BLOC-1 Untereinheit
CNR1	CNR1	cannabinoid receptor 1	6q14-q15	Rezeptor für Cannabinoide, kann Melaninbildung fördern
DKK1	DKK1	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	10q11.2	Inhibiert die Melanozytenproliferation
DTNBP1	DTNBP1	dystrobrevin binding protein 1	6p22.3	BLOC-1 Untereinheit
MC1R	MC1R	melanocortin-1 receptor	16q24.3	Modulierung der Eumelanin versus Pheomelanin

Relevante Daten aus der LURIC-Datenbank

				Produktion
MITF	MITF	microphthalmia-associated transcription factor	3p14.1-p12.3	Teil der Signaltransduktion der Melanozyten
MLPH	MLPH	melanophilin	2q37.2	Transport der Melanosomen
MYO5A	MYO5A	myosin VA (heavy chain 12, myosin)	15q21	Transport der Melanosomen
PAX3	PAX3	paired box 3	2q36.1	Transkriptionsfaktor im Melanozyten
PLDN	pallidin	biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 6, pallidin	15q21.1	BLOC-1 Untereinheit
PMEL	PMEL	premelanosome protein	12q13-q14	Hauptstrukturkomponente des Melanosoms
RAB27A	RAB27A	RAB27A, member RAS oncogene family	15q15-q21.1	Transport der Melanosomen
RACK1	GNB2L1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	5q35.3	Regulator der Signaltransduktion im Melanozyten
SOX10	SOX10	SRY (sex determining region Y)-box 10	22q13.1	Transkriptionsfaktor im Melanozyten

Tabelle 4: Auflistung der ausgewählten Gene, der Genprodukte, des vollständigen Namens, der Lokalisation und einer kurzen Beschreibung der Funktion

Innerhalb der Gene und up- und downstream davon wurden insgesamt 244 Single Nucleotid Polymorphisms (SNPs) von 2974 Menschen untersucht. Bei einigen Patienten fehlte der Datensatz einzelner SNPs. Diese wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen.

3.3. Statistische Methoden

3.3.1. Genotypbasierte Tests

Zunächst berechneten wir für jeden der drei möglichen Genotypen (zum Beispiel AA, AT und TT) der 244 SNPs den Mittelwert, Median und die Standardabweichung der 25(OH)D Serumkonzentration. Ein Beispiel ist in Tabelle 5 dargestellt.

25-hydroxy vitamin D (ng/ml) * rs2292881				
25-hydroxy vitamin D (ng/ml)				
rs2292881	Mittelwert	N	Standardabweichung	Median
C C	17,0813	2506	9,73767	15,3000
T C	18,2442	441	9,69728	16,8000
T T	16,9370	27	8,61556	15,4000
Insgesamt	17,2524	2974	9,72798	15,5000

Tabelle 5: Beispiel für die Bestimmung des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Medians der verschiedenen Genotypvarianten an einem SNP

Danach führten wir den Kolmogorov-Smirnov-Test durch, um herauszufinden, ob die 25(OH)D Serumkonzentration in unserer analysierten Kohorte normalverteilt ist. Hierbei zeigte sich, dass keine Normalverteilung vorliegt. Aufgrund dessen wählten wir nichtparametrische Tests für unsere weiteren Untersuchungen.

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest		25(OH)D (ng/ml)
N		2974
Parameter der Normalverteilung ^a	Mittelwert	17,2524
	Standardabweichung	9,72798
Extremste Differenzen	Absolut	,075
	Positiv	,075
	Negativ	-,072
Kolmogorov-Smirnov-Z		4,089
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,000

a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

Statistische Methoden

Tabelle 6: Ergebnis des Kolmogorov-Smirnov-Tests: Es liegt keine Normalverteilung vor

Um zu testen, ob zwischen den drei möglichen Genotypkombinationen jedes SNPs ein relevanter Unterschied der 25(OH)D Serumkonzentrationen vorliegt, wurde für jeden SNP ein Kruskal-Wallis-oneway analysis of variance (ANOVA)-Test bzw. ein Mann-Whitney-U-Test mit dem SPSS-Programm durchgeführt (SPSS 20, IBM Co., Armonk, US). Auf diesen Test wird sich in der Arbeit später als der „Screeningtest“ bezogen. Das SPSS-Programm traf dabei die Entscheidung ob der Kruskal-Wallis-Test oder der Mann-Whitney-U-Test bei einem SNP durchgeführt wurde. Die Nullhypothese dieses Tests lautete jeweils: „Die Verteilung von 25(OH)D ist über alle Kategorien (also die drei möglichen Genotypkombinationen z.B. AA, AT und TT) von SNP X gleich.“[37] Es wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ gewählt.

Übersicht über Hypothesentest

	Nullhypothese	Test	Sig.	Entscheidung
1	Die Verteilung von 25-hydroxy vitamin D ($\mu\text{g/L}$) ist über Kategorien von rs11639418 gleich.	Kruskal-Wallis-Test unabhängiger Stichproben	,206	Nullhypothese behalten.

Asymptotische Signifikanzen werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

Abbildung 2: Beispiel für den ersten Test um Assoziationen zwischen den Kategorien eines SNPs und dem 25(OH)D Spiegel zu finden

Mithilfe dieses Tests identifizierten wir 11 SNPs. Diese wurden einem Korrekturverfahren unterzogen um das Auftreten von statistischen Fehlern erster Art zu minimieren. Hierfür verwendeten wir die Benjamini-Hochberg Prozedur zur Kontrolle der False Discovery Rate (FDR) [5]. Für diese Prozedur müssen die p-Werte der Größe nach sortiert werden. Der kleinste p-Wert wird nun mit der so genannten Bonferroni-Schranke verglichen. Diese errechnet sich durch das gewählte ursprüngliche Signifikanzniveau ($\alpha = 0,05$) geteilt durch die Anzahl der Hypothesen der Testreihe (bei uns entspricht das der Anzahl der getesteten SNPs $n = 244$). Der erste p-Wert musste also mit $\frac{0,05}{244} = 2,04918 \cdot 10^{-4}$ verglichen werden, der zweitkleinste p-Wert mit dem mit 2 multiplizierten Niveau, der drittkleinste p-Wert mit dem mit 3 multiplizierten Niveau. Dieses Verfahren wurde für alle p-Werte fortgesetzt. Für p-Werte, welche kleiner waren als der größte p-Wert der seine zugehörige Schranke unterschritt, wurde die Nullhypothese abgelehnt [47].

Mit den 11 identifizierten SNPs wurde außerdem erneut ein Kruskal-Wallis-oneway analysis of variance (ANOVA)-Test bzw. ein Mann-Whitney-U-Test mit dem SPSS-Programm durchgeführt (SPSS 20, IBM Co., Armonk, US), um zu testen, ob zwischen den drei

möglichen Genotypkombinationen dieser SNPs ein relevanter Unterschied der 1,25(OH)₂D oder der Parathormon (PTH) Serumkonzentrationen vorliegt. Diese Tests wurden durchgeführt um unsere Ergebnisse zu verifizieren, da zwischen diesen Hormonen bekannte Verbindungen bestehen [3, 43]. Auch hier wurden die Ergebnisse mithilfe der Benjamini-Hochberg Prozedur verglichen, um Fehler erster Art zu vermeiden [5].

Zur weiteren Analyse der 11 identifizierten SNPs wurden diese auf das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) getestet. Die Nullhypothese besagte: “Es besteht kein Unterschied zwischen den erwarteten und beobachteten Genotypfrequenzen“. Liegt das HWE nicht vor, kann es bei allelbasierten Tests zu Abweichungen kommen. [25] Das Hardy-Weinberg-Equilibrium beschreibt die zufällige Verteilung der Allele in einer Population. Dadurch kann man anhand der Allelfrequenz die erwartete Genotypfrequenz berechnen. Mithilfe des Chi-Quadrat-Tests kann nun ein Vergleich zwischen erwarteter und beobachteter Genotypfrequenz gemacht werden und somit das Vorliegen eines HWE überprüft werden. Ein Beispiel zur Veranschaulichung: Wir betrachten einen Genlocus mit den Allelen A und T. Die Allelfrequenz von A wird mit p und die Allelfrequenz von T wird mit q bezeichnet. Die Gesamthäufigkeit der Allele A und T ist beträgt $p + q = 1$. Die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung eines homozygoten Genotyps beträgt p^2 für AA bzw. q^2 für TT, für die eines heterozygoten Genotyp AT beträgt sie pq und für den Genotyp TG qp . Die Gesamtwahrscheinlichkeit für einen heterozygoten Genotyp beträgt somit $2pq$ und die Summe aller Genotypfrequenzen beträgt $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. [37] Um die erwartete Anzahl an Genotypen zu erhalten müssen die einzelnen Genotypfrequenzen noch mit der Anzahl der Individuen der Kohorte multipliziert werden. Mithilfe eines Chi-Quadrat-Tests können nun die beobachtete Anzahl der Genotypen mit der erwarteten Anzahl verglichen werden. Ein HWE liegt vor, d.h. die Nullhypothese wird angenommen wenn das beobachtete χ^2 kleiner als der kritische Wert (χ^2_{krit}) 3,84 ($p < 0,05$) ist [37]. Zur Berechnung des HWE wurde der Online-Kalkulator auf der Internetseite <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml> verwendet [36].

3.3.2. Allelbasierte Tests

Von den 11 identifizierten SNPs befanden sich 8 im HWE. Für die SNPs rs10521358 (ATP7A), rs2227291 (ATP7A) und rs17139617 (ATP7A) konnte kein allelischer Test durchgeführt werden, da sich diese SNPs nicht im HWE befanden. Die anderen SNPs wurden einem allelischen Test unterzogen. Da es aktuell noch keine Daten gibt, ob die untersuchten SNPs dominant, kodominant oder rezessiv vererbt werden, haben wir für jedes SNP alle drei

Statistische Methoden

Modelle getestet: Das multiplikative Modell für Kodominanz beider Allele, das dominante Modell, wenn das seltener auftretende Allel dominant über das andere Allel ist und das rezessive Modell, wenn das seltener auftretende Allel rezessiv gegenüber dem anderen Allel ist [25]. In Abbildung 3 soll dies veranschaulicht werden.

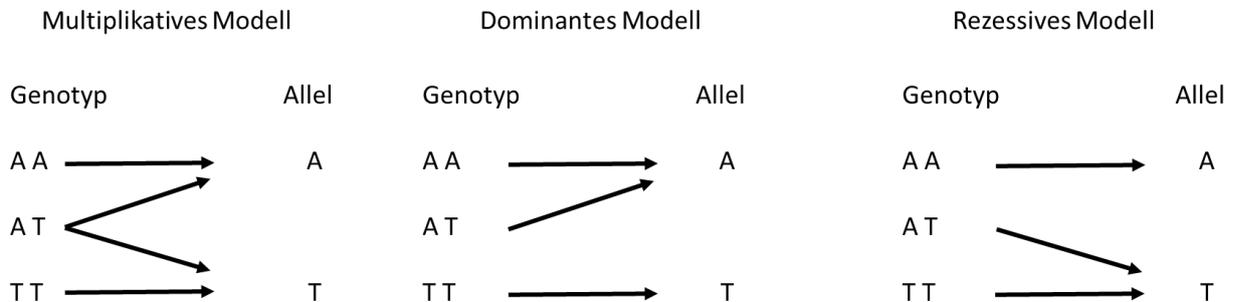


Abbildung 3. Zuordnung der Genotypen zu einem der Allele, das Allel A steht hier für das seltener auftretende Allel

Im multiplikativen Modell wurden die heterozygoten Probanden doppelt in die Untersuchung einbezogen indem sie jeweils zu einem der beiden Allele zugeordnet wurden.

3.3.3. Bestimmtheitsmaß

Zur Bewertung des Einflusses der einzelnen SNPs auf den Vitamin D Status wurde das Bestimmtheitsmaß, auch Determinationskoeffizient genannt, mithilfe von SPSS bestimmt. Dieses wird mit R^2 abgekürzt. Es kann durch Erstellung einer Regressionsanalyse mit natürlichen Logarithmuswerten der 25(OH)D Serumkonzentration berechnet werden. Durch dieses Maß kann man eine Aussage dazu treffen, welcher Anteil der Varianz durch die identifizierten SNPs erklärbar ist.

3.3.4. Überlebensanalyse

Zuletzt wurde eine Analyse zum Einfluss der einzelnen SNPs auf das Überleben der Patienten durchgeführt. Für die Überlebenszeiten nutzten wir einen Wert aus der Datenbank der LURIC Studie, welcher angibt, nach wie vielen Jahren nach Studieneinschluss ein Patient verstorben war oder ob er bis 2010 am Leben war. Für die Analyse wurde mit einem Log Rank Test (Mantel-Cox) überprüft, ob die verschiedenen Genotypvarianten eines SNPs einen signifikanten Unterschied in der Überlebenszeit aufweisen. Dies wurde in Kaplan-Meier-Kurven veranschaulicht. Weiterhin wurde mittels Cox-Regression getestet, ob ein SNP einen signifikanten Einfluss auf das Überleben hat.

4. Ergebnisse

4.1. Schematischer Algorithmus des Studiendesigns

Abbildung 4 zeigt zum besseren Verständnis schematisch den Algorithmus des Studiendesigns:

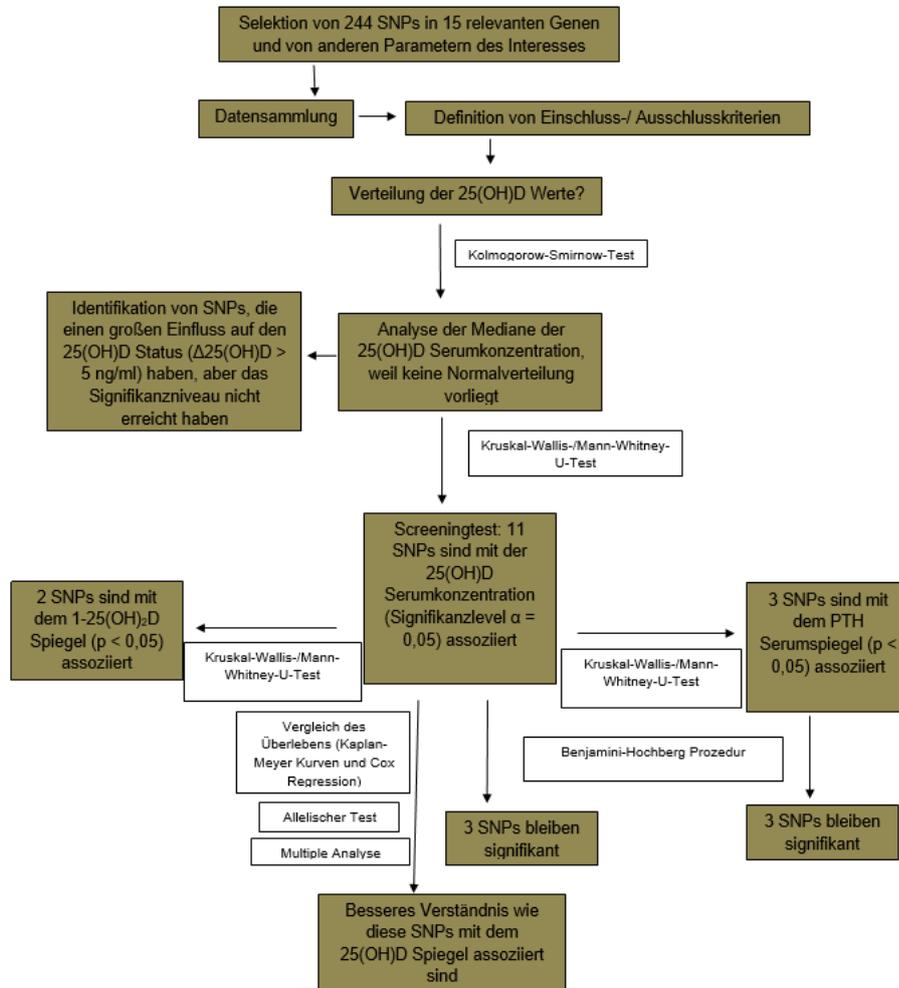


Abbildung 4: Algorithmus des Studiendesigns

Datensammlung und Testauswahl

4.2. Datensammlung und Testauswahl

Wir haben die Hypothese untersucht, dass Gene mit Bezug zur Hauptpigmentierung wie *ATP7A*, *DTNBP1*, *BLOC1S5*, *PLDN*, *PMEL* (involviert in die Biogenese des Melanosoms); *RAB27A*, *MYO5A*, *MLPH* (kodieren für Transportproteine, welche relevant für den Transport der Melanosomen im Melanozyten sind); *MC1R*, *MITF*, *PAX3*, *SOX10* (Regulatoren im Melanozyten) und *DKK1*, *RACK1*, *CNR1* (über andere Mechanismen in den Pigmentierungsprozess involviert) einen Einfluss auf den Vitamin D Status eines Individuums besitzen. Dafür haben wir zunächst SNPs ($n = 244$) mit Bezug zu diesen 15 relevanten Genen sowie für diese Arbeit relevante Parameter selektiert. Hieraus erstellten wir eine Datensammlung und definierten Ein- und Ausschlusskriterien. In unserer Untersuchung analysierten wir 2974 Patienten (29,83% Frauen, 70,17% Männer) mit einem 25(OH)D Mittelwert von 17,3 ng/ml und einem Median von 15,5 ng/ml. Patienten bei denen einzelne Daten fehlten wurden ausgeschlossen. Für unsere Tests benutzten wir den 25(OH)D Spiegel, weil es der beste Marker für den Vitamin D Status eines Patienten ist. Dieser Wert korreliert mit sekundärem Hyperparathyroidismus, Osteomalazie und Rachitis. Des Weiteren hatte die von uns untersuchte Population im Durchschnitt einen Vitamin D Mangel, weshalb sich ein Marker mit einer langen Halbwertszeit besonders anbot [21]. Daraufhin führten wir den Kolmogorov-Smirnov-Test durch, um herauszufinden, ob die 25(OH)D Serumkonzentration in unserer analysierten Kohorte normalverteilt ist. Hierbei zeigte sich, dass keine Normalverteilung vorliegt. Aufgrund dessen wählten wir nichtparametrische Tests für unsere weiteren Untersuchungen.

4.3. Screeningtest: Kruskal-Wallis-/Mann-Whitney-U-Test

Von den 244 von uns untersuchten SNPs zeigten 11 SNPs in 7 verschiedenen Genen eine Assoziation mit einem niedrigen oder höheren 25(OH)D Spiegel auf einem Signifikanzlevel von $\alpha = 0,05$ verglichen mit der Kohorte oder den verschiedenen Genotypvarianten. Diese SNPs wurden identifiziert (25(OH)D Mediane vom höchsten zum niedrigsten): rs6454677 (*CNR1*), 22,5 ng/ml, $p = 0,046$; rs2069408 (*PMEL*), 17,05 ng/ml, $p = 0,015$; rs2292881 (*MLPH*), 16,8 ng/ml, $p = 0,041$; rs7569427 (*MLPH*), 15,3 ng/ml, $p = 0,026$; rs9328451 (*BLOC1S5*), 14,6 ng/ml, $p = 0,028$; rs10932949 (*PAX3*), 13,9 ng/ml, $p = 0,004$; rs7565264 (*MLPH*), 13,1 ng/ml, $p = 0,000992$; rs17139617 (*ATP7A*), 12,85 ng/ml, $p = 0,000096$; rs2227291 (*ATP7A*), 12,8 ng/ml, $p = 0,000047$; rs10521358 (*ATP7A*), 12,8 ng/ml, $p = 0,000025$; rs12469812 (*MLPH*), 12,5 ng/ml, $p = 0,030$. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengetragen.

Screeningtest: Kruskal-Wallis-/Mann-Whitney-U-Test

Gen (inkl. up- und downstream)	SNP	p-Wert	Genotypvarianten	25(OH)D Konzentration	ΔMedian (M(ges)-M(SNP))
ATP7A	rs10521358	0,000025	C C (n = 489)	16,2 ng/ml	-0,7 ng/ml
			C G (n = 307)	12,8 ng/ml	2,7 ng/ml
			G G (n = 2162)	15,7 ng/ml	-0,2 ng/ml
			Total (n = 2958)	15,5 ng/ml	
ATP7A	rs2227291	0,000047	C C (n = 505)	16,1 ng/ml	-0,6 ng/ml
			C G (n = 298)	12,8 ng/ml	2,7 ng/ml
			G G (n = 2133)	15,9 ng/ml	-0,4 ng/ml
			Total (n = 2936)	15,5 ng/ml	
ATP7A	rs17139617	0,000096	A A (n = 505)	16,1 ng/ml	-0,6 ng/ml
			A C (n = 308)	12,85 ng/ml	2,65 ng/ml
			C C (n = 2158)	15,7 ng/ml	-0,2 ng/ml
			Total (n = 2971)	15,5 ng/ml	
MLPH	rs7565264	0,000992	T T (n = 22)	13,1 ng/ml	2,4 ng/ml
			T C (n = 402)	17,7 ng/ml	-2,2 ng/ml
			C C (n = 2543)	15,2 ng/ml	0,3 ng/ml
			Total (n = 2967)	15,5 ng/ml	
PAX3	rs10932949	0,004	A A (n = 116)	13,9 ng/ml	1,6 ng/ml
			A G (n = 933)	16,4 ng/ml	-0,9 ng/ml
			G G (n = 1918)	15,2 ng/ml	0,3 ng/ml
			Total (n = 2967)	15,5 ng/ml	
PMEL	rs2069408	0,015	G G (n = 318)	17,05 ng/ml	-1,55 ng/ml
			G A (n = 1313)	15,0 ng/ml	0,5 ng/ml
			A A (n = 1343)	15,6 ng/ml	-0,1 ng/ml
			Total (n = 2974)	15,5 ng/ml	
MLPH	rs7569427	0,026	G G (n = 21)	15,3 ng/ml	0,2 ng/ml
			G A (n = 464)	16,95 ng/ml	-1,45 ng/ml
			A A (n = 2489)	15,3 ng/ml	0,2 ng/ml
			Total (n = 2974)	15,5 ng/ml	
BLOC1S5	rs9328451	0,028	T T (n = 87)	14,6 ng/ml	0,9 ng/ml
			T C (n = 867)	14,7 ng/ml	0,8 ng/ml
			C C (n = 2017)	16,0 ng/ml	-0,5 ng/ml
			Total (n = 2971)	15,5 ng/ml	
MLPH	rs12469812	0,03	T T (n = 17)	12,5 ng/ml	3 ng/ml
			T C (n = 408)	17,2 ng/ml	-1,7 ng/ml
			C C (n = 2548)	15,3 ng/ml	0,2 ng/ml
			Total (n = 2973)	15,5 ng/ml	
MLPH	rs2292881	0,041	T T (n = 27)	15,4 ng/ml	0,1 ng/ml
			T C (n = 441)	16,8 ng/ml	-1,3 ng/ml
			C C (n = 2506)	15,3 ng/ml	0,2 ng/ml
			Total (n = 2974)	15,5 ng/ml	
CNR1	rs6454677	0,046	T T (n = 22)	22,9 ng/ml	-7,4 ng/ml
			T A (n = 518)	15,45 ng/ml	0,05 ng/ml
			A A (n = 2422)	15,5 ng/ml	0 ng/ml
			Total (n = 2962)	15,5 ng/ml	

Tabelle 7: Auflistung der 11 identifizierten SNPs, welche eine Assoziation ($p < 0,05$) zu 25(OH)D zeigen, sortiert nach dem p-Wert

Fehlerkorrektur nach Benjamini-Hochberg

4.4. Fehlerkorrektur nach Benjamini-Hochberg

Diese 11 SNPs wurden daraufhin mit der Fehlerkorrektur nach Benjamini-Hochberg auf Signifikanz untersucht. Hierbei zeigte sich bei nachfolgenden 3 SNPs ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Genotypvarianten: rs10521358 (*ATP7A*), rs2227291 (*ATP7A*), rs17139617 (*ATP7A*). Die Tabelle 8 veranschaulicht dies.

Gen	Rangfolge der signifikanten SNPs	Signifikanzniveau	Geforderte Signifikanz nach Benjamini-Hochberg-Korrekturverfahren
ATP7A	rs10521358	0,000025	2,04918*10⁽⁻⁴⁾
ATP7A	rs2227291	0,000047	4,09836*10⁽⁻⁴⁾
ATP7A	rs17139617	0,000096	6,14754*10⁽⁻⁴⁾
MLPH	rs7565264	0,000992	8,1967*10 ⁽⁻⁴⁾
PAX3	rs10932949	0,004	0,00102
PMEL	rs2069408	0,015	0,00122
MLPH	rs7569427	0,026	0,00143
BLOC1S5	rs9328451	0,028	0,00164
MLPH	rs12469812	0,03	0,00184
MLPH	rs2292881	0,041	0,002
CNR1	rs6454677	0,046	0,00225

Tabelle 8: Die 11 SNPs, die mittels des ersten Screening Tests eine Assoziation gezeigt haben sind hier der Rangfolge nach geordnet. Die markierten SNPs unterschreiten das geforderte Signifikanzniveau nach Benjamini-Hochberg

4.5. Assoziationen zu anderen Markern des Vitamin D Spiegels

Weiterhin testeten wir, ob die von uns identifizierten 11 SNPs auch Assoziationen zu anderen Markern des Vitamin D Status zeigen. Die SNPs rs2227291 (*ATP7A*) und rs17139617 (*ATP7A*) zeigten einen signifikanten Unterschied der Genotypvarianten bei 1,25(OH)₂D. Die SNPs rs10521358 (*ATP7A*), rs2227291 (*ATP7A*) und rs17139617 (*ATP7A*) zeigten dies auch für das Parathormon. Alle Ergebnisse für das Parathormon waren auch nach Verwendung des Korrekturverfahrens signifikant. Die Tabellen 9 und 10 zeigen die Ergebnisse.

Test auf Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Equilibrium

1,25(OH)₂D

Rang	Gen	SNP	p-Wert
1	ATP7A	rs17139617	0,006
2	ATP7A	rs2227291	0,014

Tabelle 9: P-Werte der SNPs für die Assoziation mit 1,25(OH)₂D

PTH

Rang	Gen	SNP	p-Wert	Geforderte Signifikanz nach Benjamini-Hochberg-Korrekturverfahren
1	ATP7A	rs17139617	0,000075	0,00454545
2	ATP7A	rs2227291	0,000209	0,00909091
3	ATP7A	rs10521358	0,008561	0,01363636

Tabelle 10: P-Werte und die geforderte Signifikanz nach Benjamini-Hochberg für die Assoziation der SNPs mit Parathormon

4.6. Test auf Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Equilibrium

Zur weiteren Analyse der 11 im Screening Test identifizierten SNPs wurden diese auf das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) getestet. Die Nullhypothese besagt: "Es besteht kein Unterschied zwischen den erwarteten und beobachteten Genotypfrequenzen". Ein HWE liegt vor, d.h. die Nullhypothese wird angenommen, wenn das beobachtete χ^2 kleiner als der kritische Wert (χ^2_{krit}) 3,84 ($p < 0,05$) ist. Bei 8 SNPs lag ein HWE vor. Die SNPs rs10521358 (*ATP7A*), rs2227291 (*ATP7A*) und rs17139617 (*ATP7A*) befanden sich nicht im HWE. Die nachfolgenden Tabellen zeigen das Ergebnis.

$\chi^2 = 1427.95$
(2958 samples counted)
for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	1812.56	2162
Heterozygotes	1005.89	307
Rare homozygotes	139.56	489

p allele freq = 0.78; q allele freq = 0.22

Tabelle 11: Kreuztabelle für rs10521358 (*ATP7A*) auf Vorliegen eines HWE. HWE liegt nicht vor, da das beobachtete $\chi^2 > \chi^2_{\text{krit}}$ ist.

Test auf Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Equilibrium

$$X^2 = 1467.05$$

(2936 samples counted)

for likelihoods of calculated X^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	1773.68	2133
Heterozygotes	1016.64	298
Rare homozygotes	145.68	505

$$p \text{ allele freq} = 0.78; q \text{ allele freq} = 0.22$$

¹ Tabelle 12: Kreuztabelle für rs2227291 (*ATP7A*) auf Vorliegen eines HWE. HWE liegt nicht vor, da das beobachtete $\chi^2 > \chi^2_{\text{krit}}$ ist.

$$X^2 = 1454.56$$

(2971 samples counted)

for likelihoods of calculated X^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	1799.17	2158
Heterozygotes	1025.65	308
Rare homozygotes	146.17	505

$$p \text{ allele freq} = 0.78; q \text{ allele freq} = 0.22$$

Tabelle 13: Kreuztabelle für rs17139617 (*ATP7A*) auf Vorliegen eines HWE. HWE liegt nicht vor, da das beobachtete $\chi^2 > \chi^2_{\text{krit}}$ ist.

$$X^2 = 1.91$$

(2967 samples counted)

for likelihoods of calculated X^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	16.76	22
Heterozygotes	412.48	402
Rare homozygotes	2537.76	2543

$$p \text{ allele freq} = 0.08; q \text{ allele freq} = 0.92$$

Tabelle 14: Kreuztabelle für rs7565264 (*MLPH*) auf Vorliegen eines HWE. HWE liegt vor, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist.

$$X^2 = 0.04$$

(2967 samples counted)

for likelihoods of calculated X^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	114.36	116
Heterozygotes	936.28	933
Rare homozygotes	1916.36	1918

$$p \text{ allele freq} = 0.2; q \text{ allele freq} = 0.8$$

Tabelle 15: Kreuztabelle für rs10932949 (*PAX3*) auf Vorliegen eines HWE. HWE liegt vor, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist.

Test auf Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Equilibrium

$$\chi^2 = 0.01$$

(2974 samples counted)

for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	319.32	318
Heterozygotes	1310.36	1313
Rare homozygotes	1344.32	1343

$$p \text{ allele freq} = 0.33; q \text{ allele freq} = 0.67$$

Tabelle 16: Kreuztabelle für rs2069408 (*PMEL*) auf Vorliegen eines HWE. HWE liegt vor, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist.

$$\chi^2 = 0.02$$

(2974 samples counted)

for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	21.52	21
Heterozygotes	462.95	464
Rare homozygotes	2489.52	2489

$$p \text{ allele freq} = 0.09; q \text{ allele freq} = 0.91$$

Tabelle 17: Kreuztabelle für rs7569427 (*MLPH*) auf Vorliegen eines HWE. HWE liegt vor, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist.

$$\chi^2 = 0.28$$

(2971 samples counted)

for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	91.19	87
Heterozygotes	858.62	867
Rare homozygotes	2021.19	2017

$$p \text{ allele freq} = 0.18; q \text{ allele freq} = 0.82$$

Tabelle 18: Kreuztabelle für rs9328451 (*BLOC1S5*) auf Vorliegen eines HWE. HWE liegt vor, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist.

$$\chi^2 = 0.02$$

(2973 samples counted)

for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	16.43	17
Heterozygotes	409.14	408
Rare homozygotes	2547.43	2548

$$p \text{ allele freq} = 0.07; q \text{ allele freq} = 0.93$$

Tabelle 19: Kreuztabelle für rs12469812 (*MLPH*) auf Vorliegen eines HWE. HWE liegt vor, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist.

Allelische Tests

$$\chi^2 = 2.37$$

(2974 samples counted)

for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	20.6	27
Heterozygotes	453.81	441
Rare homozygotes	2499.6	2506

$$p \text{ allele freq} = 0.08; q \text{ allele freq} = 0.92$$

Tabelle 20: Kreuztabelle für rs2292881 (*MLPH*) auf Vorliegen eines HWE. HWE liegt vor, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist.

$$\chi^2 = 0.99$$

(2962 samples counted)

for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	26.66	22
Heterozygotes	508.68	518
Rare homozygotes	2426.66	2422

$$p \text{ allele freq} = 0.09; q \text{ allele freq} = 0.91$$

Tabelle 21: Kreuztabelle für rs6454677 (*CNRI*) auf Vorliegen eines HWE. HWE liegt vor, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist

4.7. Allelische Tests

In den allelbasierten Tests zeigten sich bei nachfolgenden SNPs ein signifikanter Unterschied in den Genotypvarianten: rs7565264 (*MLPH*), rs7569427 (*MLPH*), rs2292881 (*MLPH*), rs12469812 (*MLPH*), rs9328451 (*BLOC1S5*), rs10932949 (*PAX3*) hatten p - Werte $< 0,05$ im dominanten Modell, rs7565264 (*MLPH*), rs9328451 (*BLOC1S5*), rs2292881 (*MLPH*), rs7569427 (*MLPH*), rs12469812 (*MLPH*) im kodominanten (multiplikativen) Modell und rs2069408 (*PMEL*) sowie rs6454677 (*CNRI*) im rezessiven Modell. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle dargestellt.

Gen	SNP	multiplikatives Modell	dominantes Modell	Rezessives Modell
MLPH	rs7565264	0,016	0,006	0,138
PAX3	rs10932949	0,248	0,042	0,069
PMEL	rs2069408	0,175	0,933	0,005
MLPH	rs7569427	0,026	0,012	0,595
BLOC1S5	rs9328451	0,02	0,027	0,836
MLPH	rs12469812	0,036	0,021	0,275
MLPH	rs2292881	0,022	0,014	0,984
CNRI	rs6454677	0,229	0,454	0,029

Tabelle 22: P-Werte der SNPs in den verschiedenen allelischen Modellen

Bestimmung des Bestimmtheitsmaß R^2

4.8. Bestimmung des Bestimmtheitsmaß R^2

Daraufhin wurde zur Bewertung des Einflusses der einzelnen SNPs auf den Vitamin D Status das Bestimmtheitsmaß R^2 bestimmt. R^2 lag für die 11 nach dem ersten Screening Test identifizierten SNPs bei 1,6% und für die 3 SNPs, welche nach der Korrektur nach Benjamini-Hochberg weiterhin signifikante Ergebnisse hatten, bei 0,3%. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Modellzusammenfassung ^b				
Modell	R	R-Quadrat	Korrigiertes R- Quadrat	Standardfehler des Schätzers
1	,125 ^a	,016	,012	9,66700

Tabelle 23: Bestimmtheitsmaß R^2 der im ersten Test identifizierten 11 SNPs

Modellzusammenfassung ^b				
Modell	R	R-Quadrat	Korrigiertes R- Quadrat	Standardfehler des Schätzers
1	,056 ^a	,003	,002	9,69200

Tabelle 24: Bestimmtheitsmaß R^2 der 3 SNPs, die nach der Benjamini-Hochberg Prozedur weiterhin signifikant waren

4.9. Lineare Regression

Als nächstes führten wir eine lineare Regression durch, welche an die Parameter Geschlecht, "Body mass index" (BMI), Geburtsjahr und Monat der Blutentnahme angepasst wurde. Hierbei ergaben sich signifikante Ergebnisse für die SNPs rs7565264 (*MLPH*), rs10932949 (*PAX3*), rs9328451 (*BLOC1S5*). Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse.

	Regressionskoeffizient	Standardfehler	Beta	T	Sig.
(Konstante)	-214,920	32,379		-6,638	,000
sex (1=male,2=female)	-2,124	,440	-,099	-4,831	,000
body mass index (kg/m ²)	-,110	,043	-,045	-2,532	,011
Monat	,510	,051	,181	10,092	,000

SNPs mit hohen $\Delta 25(\text{OH})\text{D}$ Werten

Jahrgang	,118	,017	,128	7,064	,000
rs10521358	-,477	,577	-,025	-,827	,409
rs2227291	1,052	2,722	,056	,387	,699
rs17139617	-,581	2,724	-,031	-,213	,831
rs7565264	3,277	,920	,120	3,562	,000
rs10932949	,713	,331	,039	2,154	,031
rs2069408	,502	,264	,034	1,900	,057
rs7569427	,428	1,094	,016	,391	,696
rs9328451	,663	,327	,036	2,029	,043
rs12469812	-2,655	1,467	-,096	-1,811	,070
rs2292881	,334	,352	,024	,950	,342
rs6454677	-,157	,444	-,006	-,353	,724

Tabelle 25: Lineare Regression mit Anpassung an die Parameter Alter, Geschlecht, BMI und Monat der Blutentnahme

4.10. SNPs mit hohen $\Delta 25(\text{OH})\text{D}$ Werten

Außerdem identifizierten wir eine Gruppe von SNPs, welche mit hohen $\Delta 25(\text{OH})\text{D}$ Werten assoziiert sind, jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichen. Diese SNPs zeigt Tabelle 26.

Nahestes Gen	SNP	Δ Median (M(ges) - M(SNP))	Anzahl n des seltenen Genotyps
MLPH	rs6705903	-14,7 ng/ml	1
DTNBP1	rs2056943	-7,5 ng/ml	4
CNR1	rs2057276	-7,4 ng/ml	1
SOX10	rs3026645	-7,1 ng/ml	7
MYO5A	rs12899847	-7 ng/ml	13
MYO5A	rs12592429	-7 ng/ml	9
MYO5A	rs12915892	-7 ng/ml	9
CNR1	rs9450901	-6,1 ng/ml	23
MITF	rs10510992	-5,6 ng/ml	5

Tabelle 26: SNPs mit hohen $\Delta 25(\text{OH})\text{D}$ Werten, die nicht das geforderte Signifikanzniveau erreicht haben

4.11. Überlebensanalyse: Cox-Regression

Zuletzt untersuchten wir, ob die zuvor identifizierten SNPs einen Einfluss auf das Überleben der Patienten haben. In der Cox-Analyse zeigte der SNP rs2292881 (*MLPH*) einen signifikanten Einfluss auf das Überleben zwischen den Genotypvarianten. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse.

Überlebensanalyse: Cox-Regression

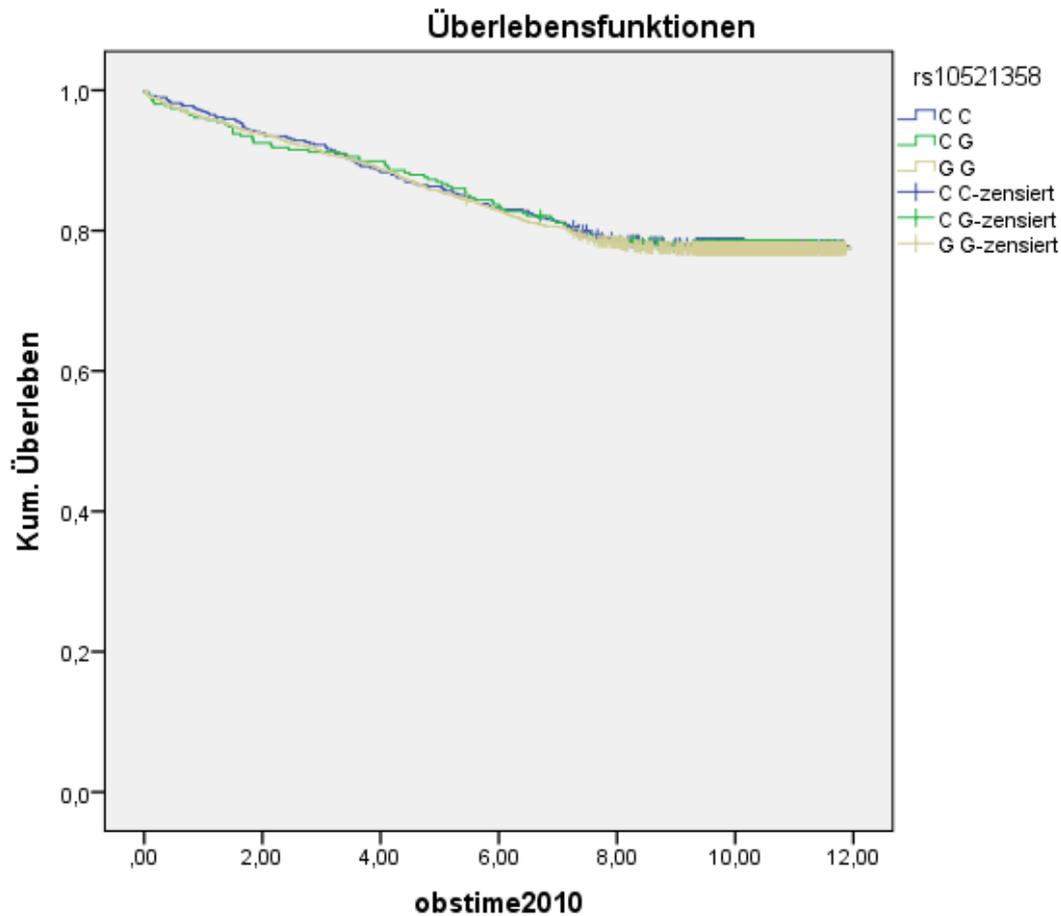
Variablen in der Gleichung						
	B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)
rs10521358			3,677	2	,159	
rs10521358(1)	,332	,184	3,245	1	,072	1,393
rs10521358(2)	,215	,223	,924	1	,336	1,239
rs2227291			,425	2	,809	
rs2227291(1)	-,358	1,267	,080	1	,778	,699
rs2227291(2)	,423	,722	,344	1	,557	1,527
rs17139617			,950	2	,622	
rs17139617(1)	-,092	1,268	,005	1	,942	,912
rs17139617(2)	-,703	,723	,945	1	,331	,495
rs7565264			,828	2	,661	
rs7565264(1)	,820	1,034	,629	1	,428	2,271
rs7565264(2)	,658	1,007	,427	1	,513	1,931
rs10932949			1,143	2	,565	
rs10932949(1)	,148	,193	,593	1	,441	1,160
rs10932949(2)	-,054	,087	,390	1	,532	,947
rs2069408			,432	2	,806	
rs2069408(1)	,011	,137	,007	1	,935	1,011
rs2069408(2)	,061	,137	,198	1	,657	1,063
rs7569427			1,235	2	,539	
rs7569427(1)	-,247	1,040	,056	1	,813	,782
rs7569427(2)	,035	1,008	,001	1	,973	1,035
rs9328451			1,006	2	,605	
rs9328451(1)	-,004	,235	,000	1	,986	,996
rs9328451(2)	-,092	,242	,145	1	,703	,912
rs12469812			,543	2	,762	
rs12469812(1)	6,338	25,942	,060	1	,807	565,645
rs12469812(2)	6,600	25,939	,065	1	,799	735,013
rs2292881			6,454	2	,040	
rs2292881(1)	1,461	1,016	2,071	1	,150	4,312
rs2292881(2)	1,042	1,007	1,071	1	,301	2,834
rs6454677			1,483	2	,476	
rs6454677(1)	,840	,709	1,402	1	,236	2,315
rs6454677(2)	,866	,714	1,470	1	,225	2,377

Tabelle 27: Ergebnisse der Cox-Analyse aufs Überleben

Überlebensanalyse: Kaplan-Meyer-Kurven

4.12. Überlebensanalyse: Kaplan-Meyer-Kurven

Im Log Rank Test zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse. Die Untersuchungen wurden in Kaplan-Meyer Kurven veranschaulicht und werden im Folgenden dargestellt.



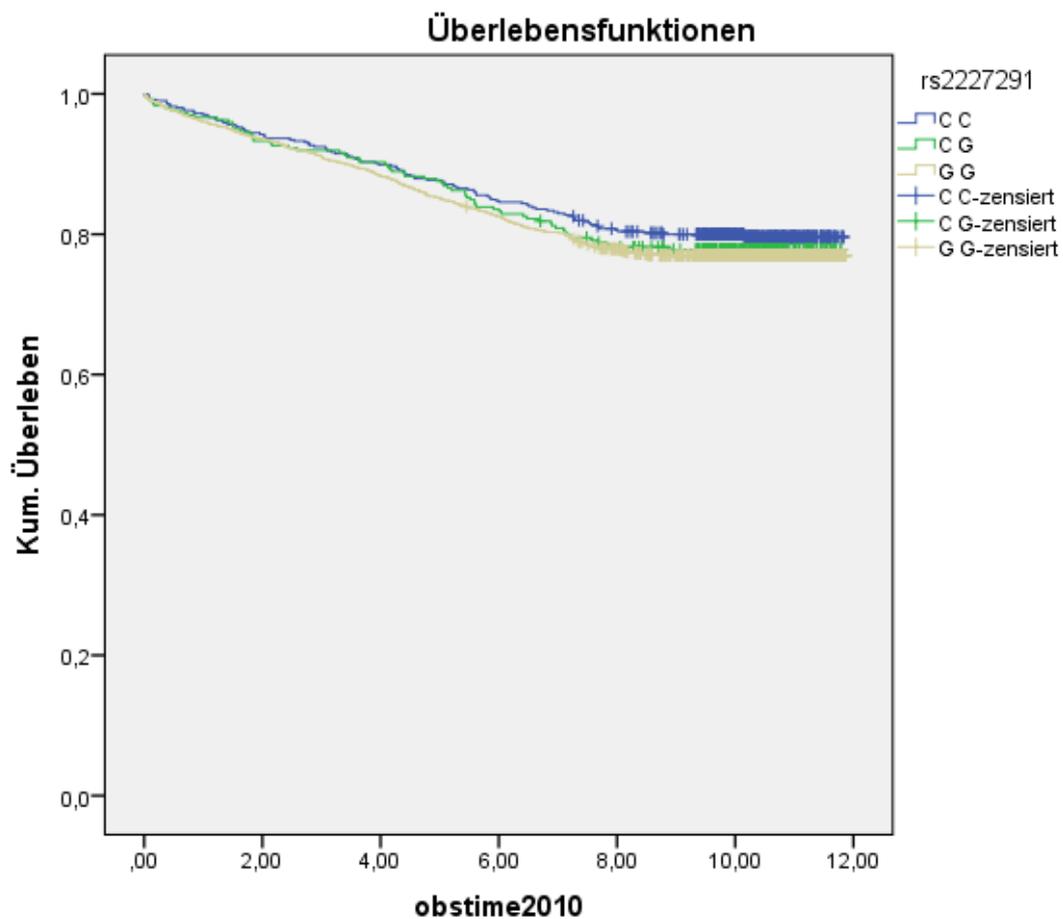
Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,066	2	,968

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von rs10521358 (*ATP7A*).

Abbildung 5: Kaplan-Meyer-Kurve für den SNP rs10521358 (*ATP7A*)

Überlebensanalyse: Kaplan-Meyer-Kurven



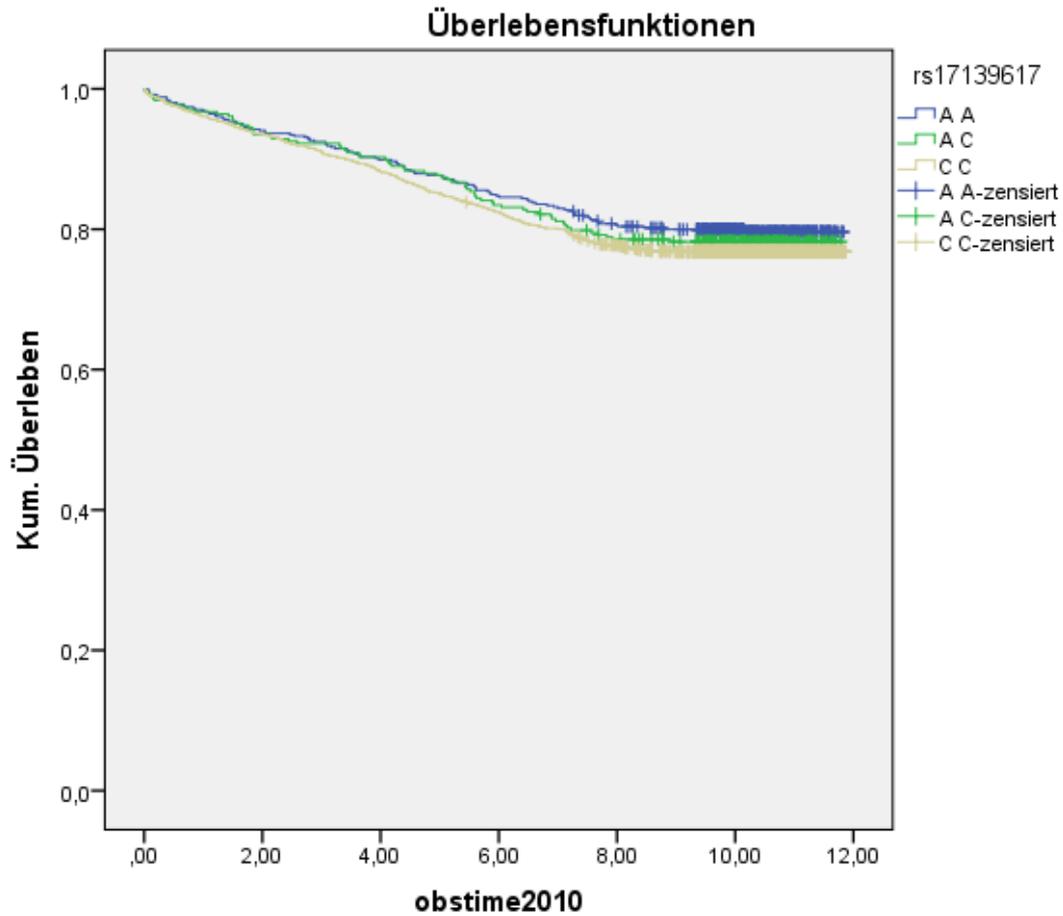
Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,944	2	,378

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von rs2227291 (*ATP7A*).

Abbildung 6: Kaplan-Meyer-Kurve für den SNP rs2227291 (*ATP7A*)

Überlebensanalyse: Kaplan-Meyer-Kurven



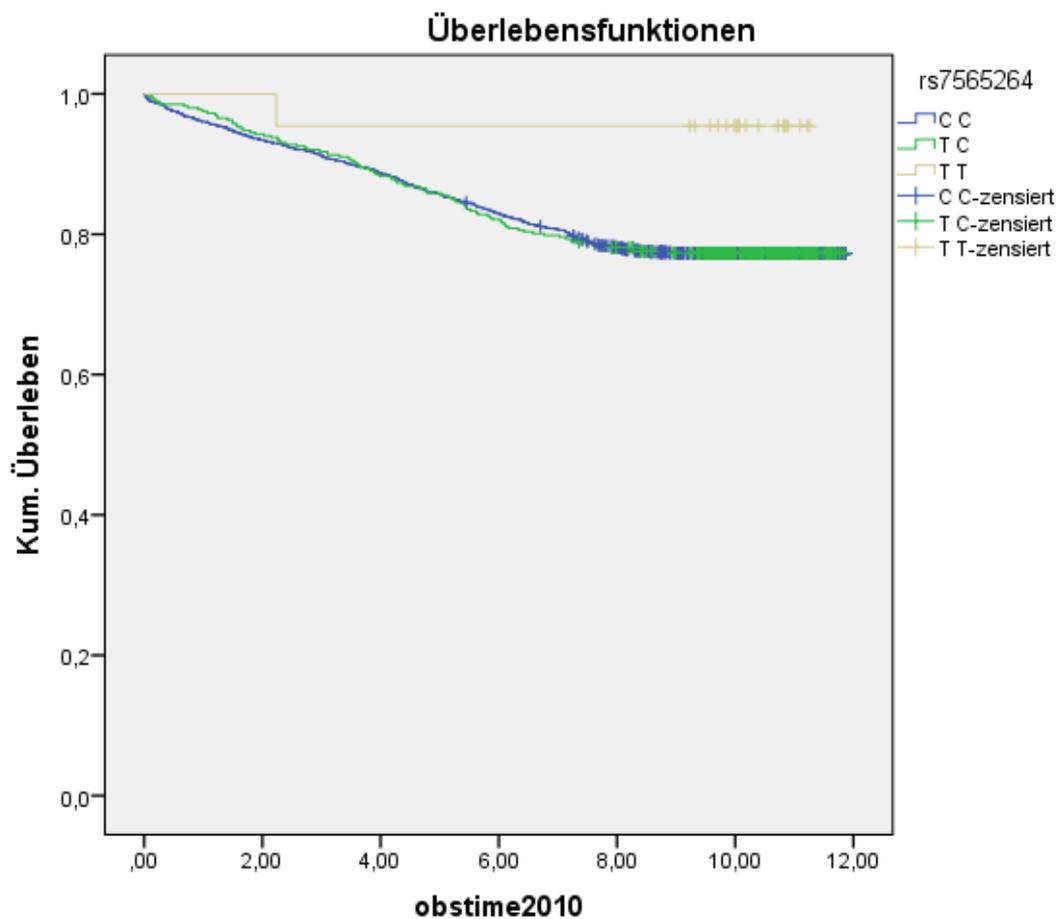
Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2,245	2	,325

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von rs17139617 (*ATP7A*).

Abbildung 7: Kaplan-Meyer-Kurve für den SNP rs17139617 (*ATP7A*)

Überlebensanalyse: Kaplan-Meyer-Kurven



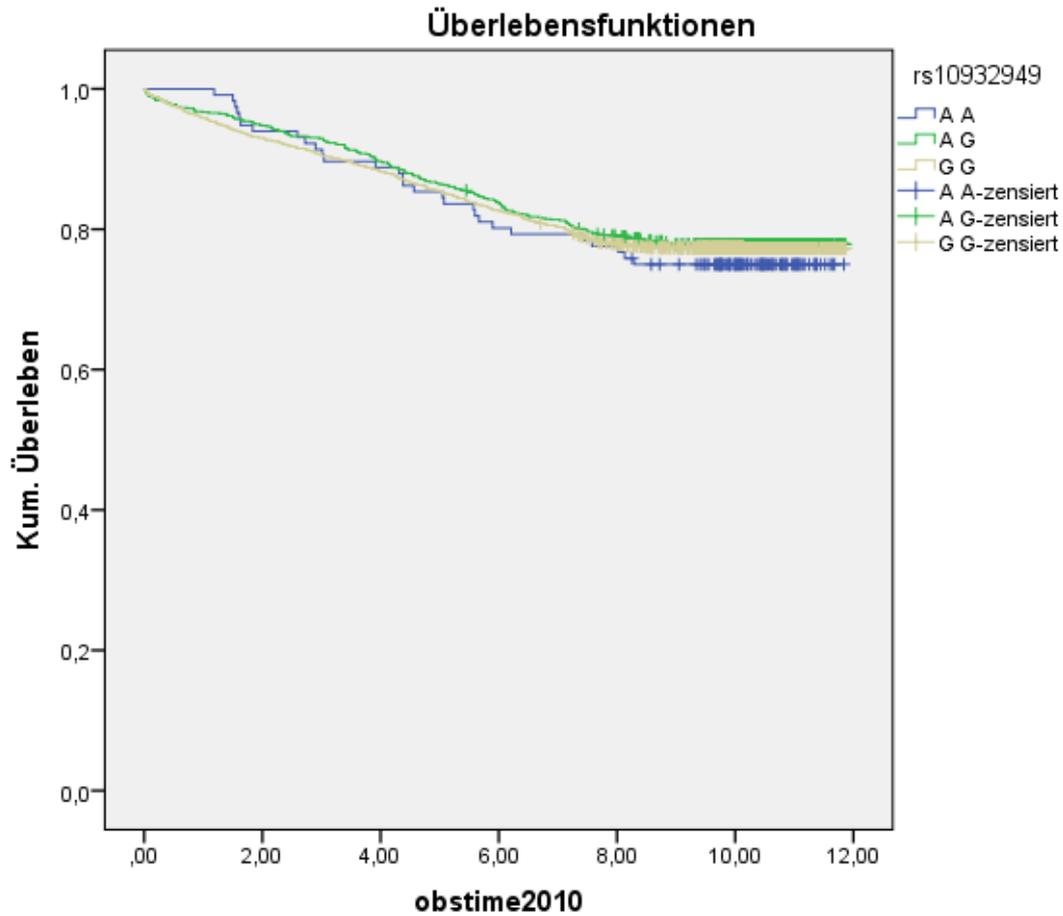
Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,657	2	,161

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von rs7565264 (*MLPH*).

Abbildung 8: Kaplan-Meyer-Kurve für den SNP rs7565264 (*MLPH*)

Überlebensanalyse: Kaplan-Meyer-Kurven



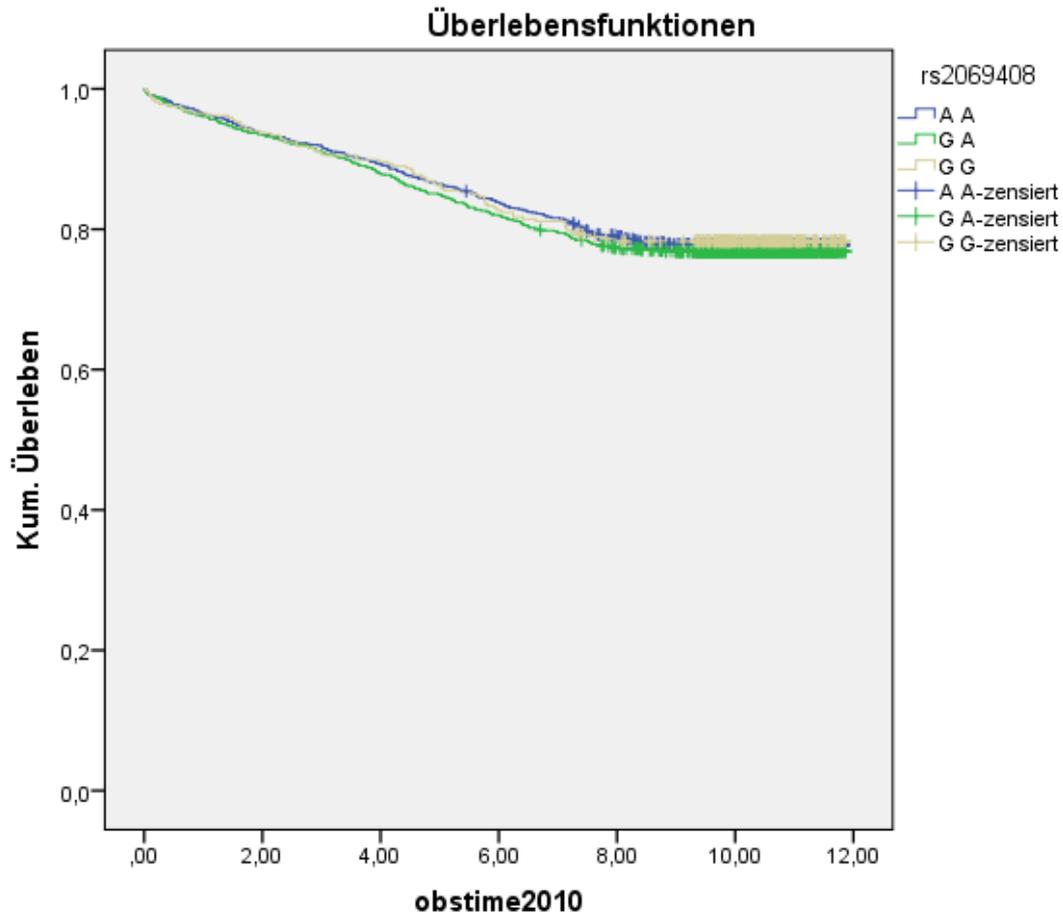
Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,531	2	,767

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von rs10932949 (*PAX3*).

Abbildung 9: Kaplan-Meyer-Kurve für den SNP rs10932949 (*PAX3*)

Überlebensanalyse: Kaplan-Meyer-Kurven



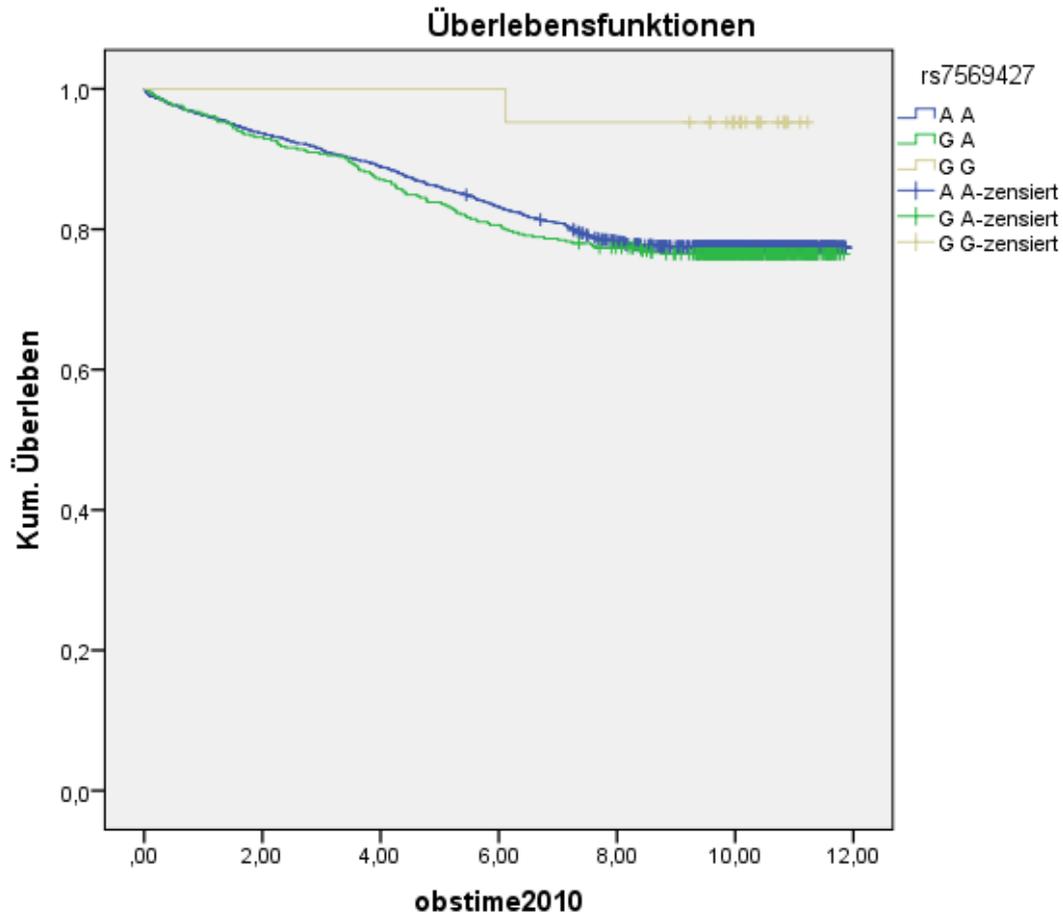
Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,593	2	,744

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von rs2069408 (*PMEL*).

Abbildung 10: Kaplan-Meyer-Kurve für den SNP rs2069408 (*PMEL*)

Überlebensanalyse: Kaplan-Meyer-Kurven



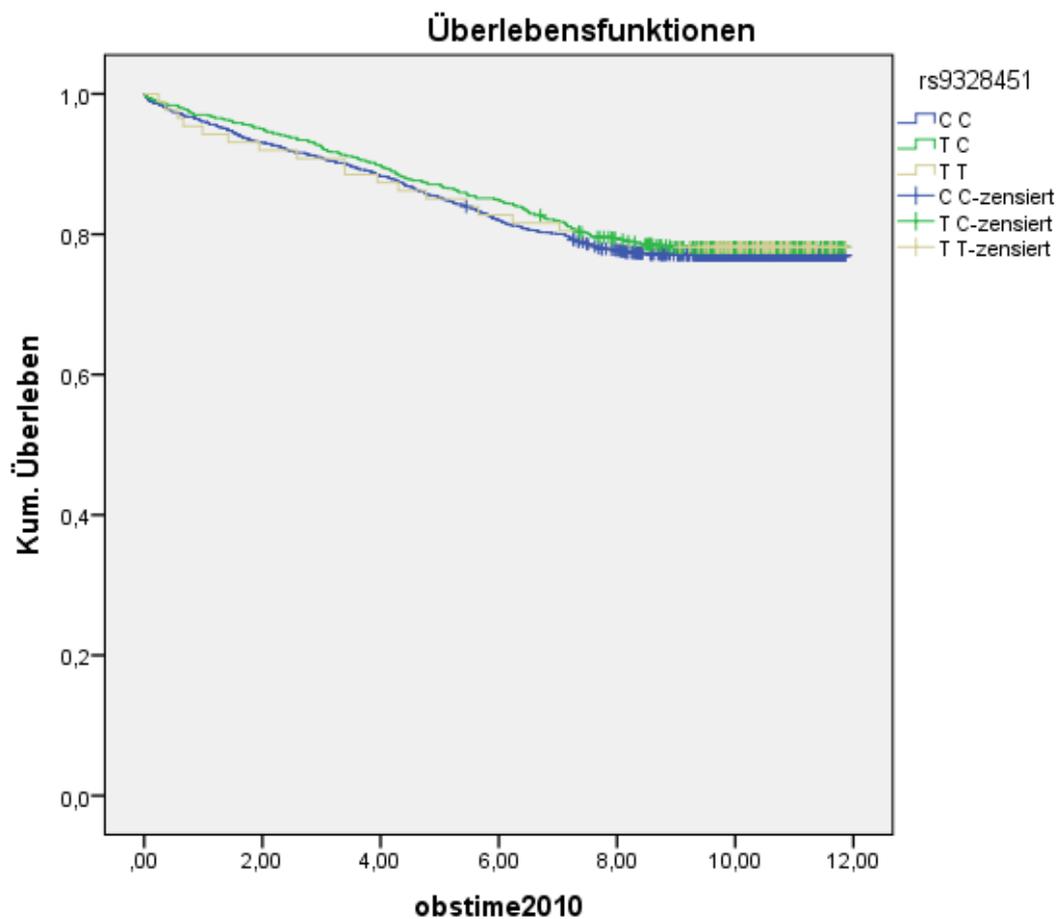
Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,826	2	,148

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von rs7569427 (*MLPH*).

Abbildung 11: Kaplan-Meyer-Kurve für den SNP rs7569427 (*MLPH*)

Überlebensanalyse: Kaplan-Meyer-Kurven



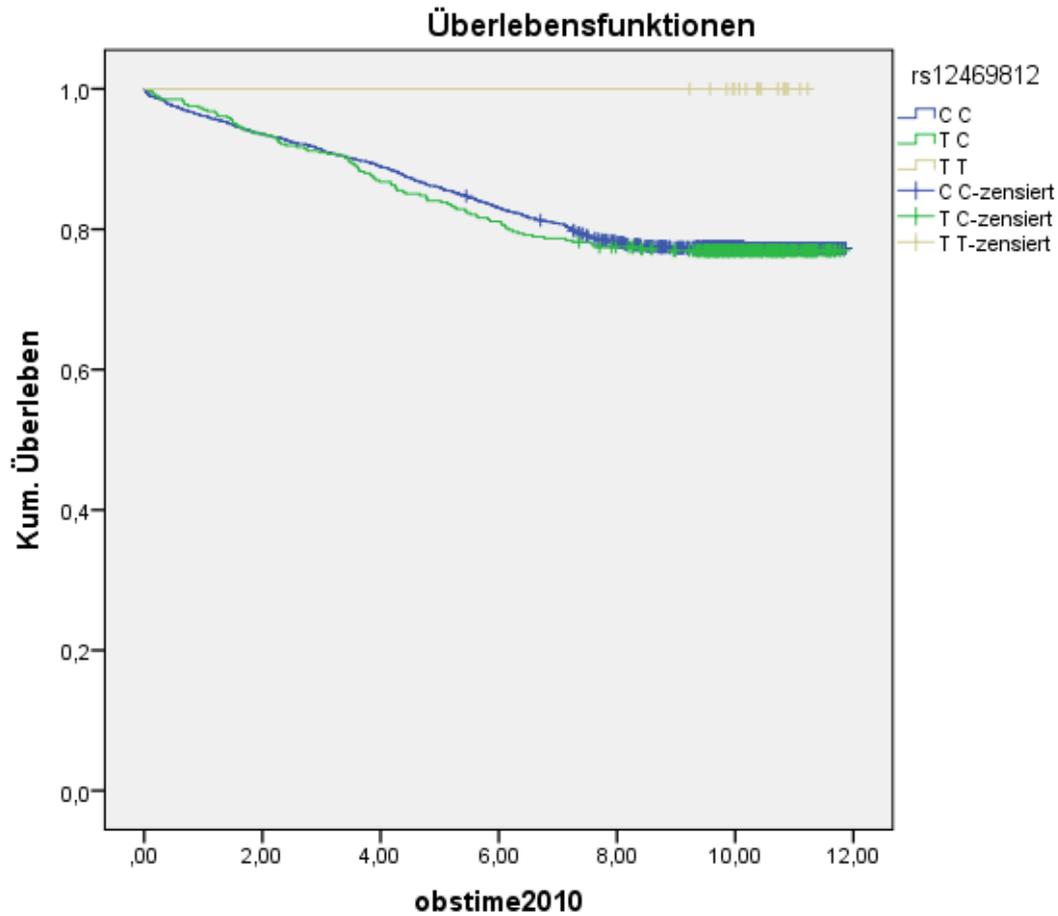
Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,656	2	,720

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von rs9328451 (*BLOC1S5*).

Abbildung 12: Kaplan-Meyer-Kurve für den SNP rs9328451 (*BLOC1S5*)

Überlebensanalyse: Kaplan-Meyer-Kurven



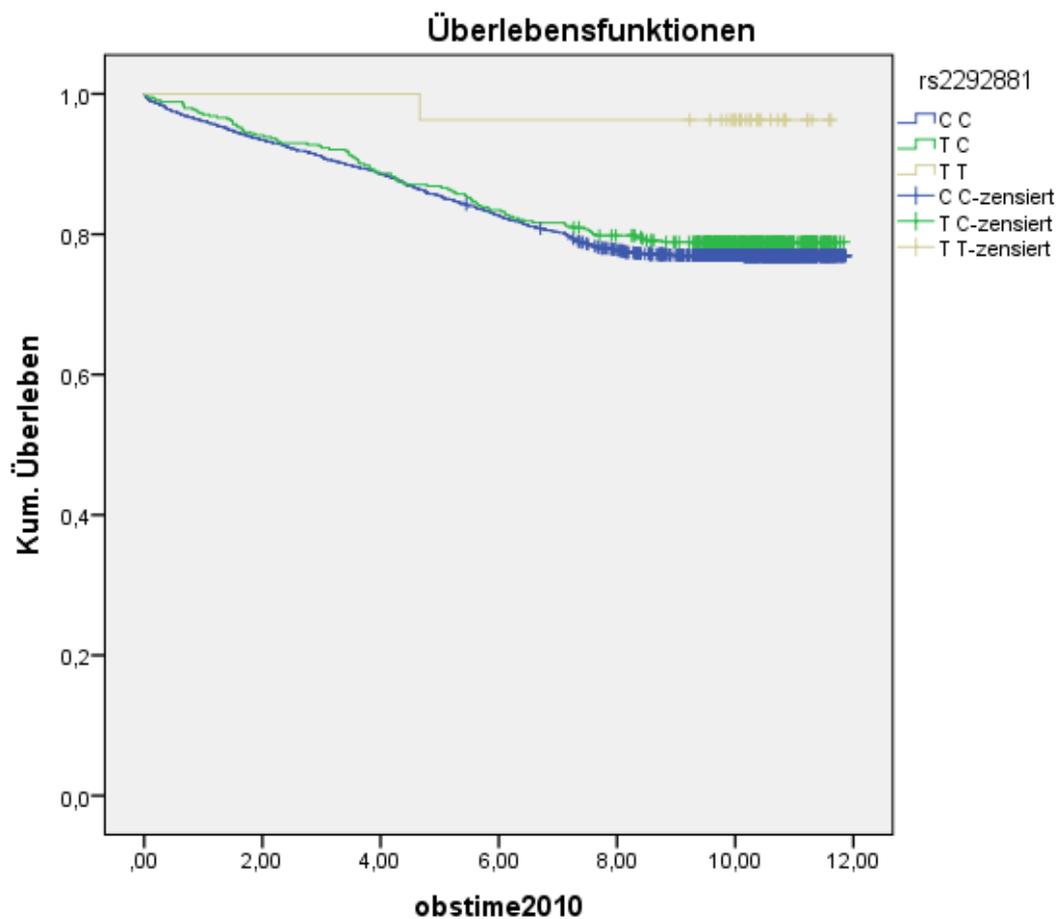
Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	4,450	2	,108

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von rs12469812 (*MLPH*).

Abbildung 13: Kaplan-Meyer-Kurve für den SNP rs12469812 (*MLPH*)

Überlebensanalyse: Kaplan-Meyer-Kurven



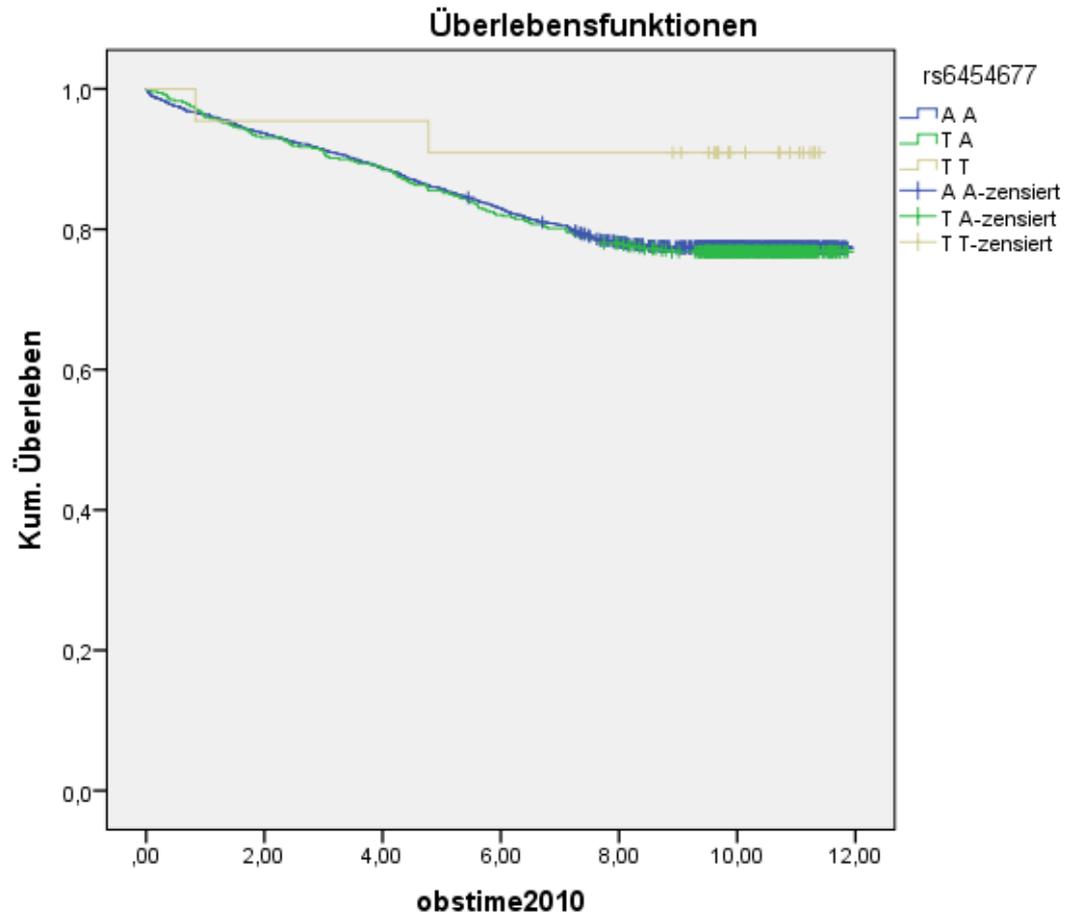
Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	5,789	2	,055

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von rs2292881 (*MLPH*).

Abbildung 14: Kaplan-Meyer-Kurve für den SNP rs2292881 (*MLPH*)

Überlebensanalyse: Kaplan-Meyer-Kurven



Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2,152	2	,341

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von rs6454677 (CNRI).

Abbildung 15: Kaplan-Meyer-Kurve für den SNP rs6454677 (CNRI)

5. Diskussion

Unsere Untersuchungen haben in dieser Patientenkohorte einige SNPs mit Bezug zum Prozess der Hautpigmentierung gefunden, welche mit signifikanten Unterschieden der 25(OH)D Konzentration zwischen den verschiedenen Genotypvarianten assoziiert sind. Der Pigmentierungsprozess der Haut ist ein sehr komplexes, strikt reguliertes System diverser Hormone, korrespondierender Rezeptoren und anderen Faktoren (Abbildung 1), was bis heute nicht komplett verstanden wurde [1, 32, 41, 51]. Es besteht die Hypothese, dass das Hautkolorit des Menschen, um weiterhin eine suffiziente Vitamin D Quelle durch Herstellung in der Haut zu besitzen, heller werden musste bevor es möglich war vom Äquator in Richtung Norden zu ziehen. Auch wenn in den letzten Jahren einige neue Erkenntnisse gewonnen wurden bleibt die Diversität der Hautpigmentation eine der großen unbeantworteten Fragen der menschlichen Genetik [30]. Erst in den letzten Jahren ist es technisch möglich geworden, sich dieser Fragen mittels Populationsgenetik zu nähern. Basierend auf Voruntersuchungen bei Tieren und auf Studien an Menschen mit mendelschen Erbkrankheiten konnten durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) viele Gene identifiziert werden, die die Variabilität der Hautpigmentation bedingen [9, 51].

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden in einer vorausgehenden Pilotstudie SNPs in 29 verschiedenen Genen mit Bezug zu Hauptmechanismen der Hautpigmentierung (Melaninsynthese, Tyrosintransport und melanogene Signalwirkung) auf die Hypothese untersucht, ob Varianten dieser Gene mit dem 25(OH)D Serumspiegel assoziiert sind [37]. Die Daten zeigten, dass in 11 Genen, darunter *EXOC2*, *TYR*, *TYRP1*, *OCA2* und *DCT*, Varianten vorliegen, welche einen Einfluss auf den Vitamin D Status haben [37]. Aufgrund dieser wissenschaftlich hochinteressanten Ergebnisse entschieden wir uns weitere Analysen durchzuführen und uns dabei auf andere Mechanismen des Pigmentierungsprozesses und die dazugehörigen Gene zu konzentrieren. Dafür wählten wir 15 Gene mit Relevanz an verschiedenen Aspekten der Hautpigmentierung aus, wie der melanosomalen Biogenese (*ATP7A*, *PMEL*, *PLDN*), dem melanosomalen Transport (*RAB27A*, *MLPH*) oder verschiedener Signalwege der Melanozyten (*MITF*, *PAX3*). Hierbei sollte jedoch angemerkt werden, dass diese Gene weitere Funktionen erfüllen, welche nichts mit dem Pigmentierungsprozess zu tun haben. Ein Beispiel hierfür ist die Kupfer-ATPase *ATP7A*, welche auf dem X-Chromosom lokalisiert ist [52]. Sie spielt eine wichtige Rolle in der intrazellulären Kupferhomöostase durch Pumpen von Kupfer in den Golgi-Apparat der Zelle sowie das Entfernen von übermäßigem Kupfer durch Verlagerung in die Plasmamembran.

Diskussion

Mutationen im Gen *ATP7A* können entweder zum sogenannten Menkes-Syndrom, einer milderen Variante namens Okzipital-Horn Syndrom oder zu einer phänotypischen Variante, die mit einer später auftretenden distalen motorischen Neuropathie (DMN) einhergeht, führen [52].

In den Tests dieser Arbeit, welche wir auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ durchführten, haben wir 11 SNPs identifiziert, die mit einem erniedrigten oder erhöhten 25(OH)D Serumspiegel assoziiert sind. Interessanterweise zeigt ein SNP (rs6454677, *CNRI*, $P = 0,046$) einen sehr starken Effekt auf den Vitamin D Status ($\Delta 25(\text{OH})\text{D} = -7,4 \text{ ng/ml}$) während der Effekt bei den anderen 10 SNPs (rs10521358 (*ATP7A*), rs2227291 (*ATP7A*), rs17139617 (*ATP7A*), rs7565264 (*MLPH*), rs7569427 (*MLPH*), rs12469812 (*MLPH*), rs2292881 (*MLPH*), rs10932949 (*PAX3*), rs2069408 (*PMEL*), rs9328451 (*BLOC1S5*)) deutlich weniger stark ausgeprägt ist ($\Delta 25(\text{OH})\text{D} < 5 \text{ ng/ml}$). Die Relevanz des Ergebnisses von rs6454677 (*CNRI*) wird unterstrichen, wenn man es mit der vorausgehenden Pilotstudie vergleicht: Dieser SNP zeigt einen höheren $\Delta 25(\text{OH})\text{D}$ als alle SNPs ($n=46$) die auf dem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ aus insgesamt 960 genetischen Varianten identifiziert wurden. Als nächstes verwendeten wir allelische Tests um herauszufinden, ob ein Allel (z.B. C oder G) mit einem signifikanten Unterschied der 25(OH)D Konzentration assoziiert ist. Da es bis jetzt keine Daten darüber gibt, ob ein spezieller SNP dominant, rezessiv oder kodominant vererbt wird, haben wir alle SNPs in den verschiedenen Modellen getestet (dominantes Modell, rezessives Modell und multiplikatives Modell (für Kodominanz)). Bei dieser Untersuchung mussten wir 3 SNPs ausschließen, da sie sich nicht im Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) [37] befanden. Mithilfe der allelischen Tests konnten wir die Signifikanz der restlichen 8 SNPs (rs7565264 (*MLPH*), rs10932949 (*PAX3*), rs2069408 (*PMEL*), rs7569427 (*MLPH*), rs9328451 (*BLOC1S5*), rs12469812 (*MLPH*), rs2292881 (*MLPH*), rs6454677 (*CNRI*)) bestätigen.

Bei der erneuten Testung der Signifikanz der 11 SNPs, die durch unseren ersten Screening Tests identifiziert werden konnten, mittels einer bekannten Prozedur für mehrfache Analysen (Benjamini-Hochberg Prozedur) um die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers I. Art zu minimieren, blieben 3 der 11 SNPs weiterhin im angezielten Signifikanzniveau: rs10521358 (*ATP7A*) $p= 0,000025$, rs2227291 (*ATP7A*) $p= 0,000047$ und rs17139617 (*ATP7A*) $p= 0,000096$ (Tabelle 8).

Es ist bekannt, dass viele individuelle Faktoren den Vitamin D Spiegel beeinflussen. Hierzu gehören unter anderen das Alter, das Geschlecht, der Body Mass Index (BMI) und saisonale Einflüsse [20]. In der linearen Regression, welche wir an diese Faktoren angepasst haben,

Diskussion

zeigten drei SNPs (rs7565264 (*MLPH*), rs10932949 (*PAX3*) und rs9328451 (*BLOC1S5*)) signifikante Assoziationen mit der 25(OH)D Serumkonzentration.

Bei der Berechnung des Einflusses der SNPs auf den Vitamin D Status erreichten die 11 SNPs, die im ersten Screening Test identifiziert wurden und die 3 SNPs, die nach der Fehlerkorrektur weiterhin signifikant blieben, ein Bestimmtheitsmaß (R^2) von 1,6% und 0,3%. Das bedeutet, dass bis zu 1,6% der Varianz der 25(OH)D Serumkonzentration durch diese 11 SNPs erklärt werden kann. In einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) im Jahre 2010 wurden häufig vorkommende genetische Faktoren identifiziert, welche zu einem Vitamin D Mangel führen [49]. In der Studie erreichen SNPs an drei verschiedenen Loci eine genomweite Signifikanz in der Discovery Kohorte und wurden in der Replication Kohorte bestätigt: 4p12 ($p = 1,9 \times 10^{-109}$), rs2282679 im *GC*-Gen); 11q12 ($p = 2,1 \times 10^{-27}$), rs12785878 nahe dem Gen *DHCR7*); und 11p15 ($p = 3,3 \times 10^{-20}$), rs10741657, nahe dem Gen *CYP2R1*). Patienten mit einem Genotypscore (alle drei SNPs vorhanden) zeigten ein erhöhtes Risiko im obersten Quartil eine 25(OH)D Serumkonzentration niedriger als 75 nmol/L (Odds Ratio= 2,47, 95%- Konfidenzintervall= 2,20-2,78, $p=2,3 \times 10^{-48}$) oder im untersten Quartil niedriger als 50 nmol/L (OR 1,92, 95% KI 1,70-2,16, $p=1,0 \times 10^{-26}$) zu haben [49]. In dieser Studie ergab sich für die drei Loci ein Bestimmtheitsmaß von 1% - 4% [49]. Es wurden hierbei jedoch keine Gene identifiziert, die den Vorgang der Hautpigmentierung steuern. Da in der GWAS jedoch mögliche Assoziationen übersehen worden sein könnten (Fehler 2. Art), zum Beispiel durch die sehr konservative Datenauswertung, sowie eine sehr große Heterogenität der Kohorte, erachteten wir es als sinnvoll weitere Untersuchungen durchzuführen.

Das Studiendesign, nur kaukasische Patienten aus Ludwigshafen und der Umgebung im akuten Koronarsyndrom zu untersuchen hat sowohl Stärken als auch Schwächen. Im Vergleich zur oben erwähnten GWAS, welche mit einer heterogenen Population durchgeführt wurde [49], zeichnet sich unsere Untersuchung durch eine Homogenität aus. Faktoren, welche einen großen Einfluss auf den Vitamin D Spiegel einer Person haben können, wie zum Beispiel der geografische Wohnsitz der Person, die meteorologische Situation oder der Lifestyle sind aufgrund der Auswahl der Kohorte sehr ähnlich. Dies minimiert den Einfluss dieser Faktoren auf den Vitamin D Status [37]. Eine Schwäche unseres Studiendesigns hingegen ist, dass wir den nun identifizierten SNPs keinen Hauttyp und keine Details zur Hautpigmentierung des Patienten zuordnen können, da hierfür keine Daten dieser Kohorte verfügbar waren [37]. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass wir Assoziationen von SNPs mit relativ seltenen Genotypvarianten (niedrige „minor allele frequency“) übersehen haben

Diskussion

(Fehler 2. Art). Deshalb haben wir eine weitere Gruppe von SNPs (rs6705903 (*MLPH*), rs2056943 (*DTNBPI*), rs2057276 (*CNIR*), rs9450901 (*CNIR*), rs3026645 (*SOX10*), rs12899847 (*MYO5A*), rs12592429 (*MYO5A*), rs12915892 (*MYO5A*) und rs10510992 (*MITF*)) identifiziert, die einen großen Einfluss auf die 25(OH)D Serumkonzentration haben ($\Delta 25(\text{OH})\text{D} > 5 \text{ ng/ml}$), das angestrebte Signifikanzniveau jedoch nicht erreichten (Tabelle 26).

Vieles deutet, den neueren Studien zufolge, darauf hin, dass die Häufigkeit des Auftretens vieler Erkrankungen wie z.B. verschiedene Krebsformen, Infektionen, Autoimmunerkrankungen und kardiovaskuläre Krankheiten mit einem Vitamin D Mangel assoziiert ist [20, 22]. Bei unserer Untersuchung der 11 SNPs, welche im Screeningtest identifiziert wurden, bezüglich Überleben erreichte ein SNP (rs2292881 (*MLPH*)) die angezielte Signifikanz in der Cox Regression und war nahe dran ($p = 0,55$) in der Kaplan-Meier Analyse. Jedoch ist es, aufgrund des relativ geringen Einflusses auf den Vitamin D Status ($\Delta 25(\text{OH})\text{D} = 1,3 \text{ ng/ml}$), sehr unwahrscheinlich, dass die Assoziation des SNPs mit dem Überleben durch Effekte der 25(OH)D Serumkonzentration entsteht.

Zuletzt demonstrierten wir, dass von den im ersten Screening Test identifizierten 11 SNPs rs2227291 (*ATP7A*) und rs17139617 (*ATP7A*) eine Assoziation mit dem 1,25(OH)₂D Serumspiegel und rs17139617 (*ATP7A*), rs2227291 (*ATP7A*) und rs10521358 (*ATP7A*) eine Assoziation mit dem PTH Serumspiegel zeigten. Nach der Fehlerkorrektur nach Benjamini-Hochberg blieben die Assoziationen zwischen den SNPs und PTH signifikant. Dies bestätigt unsere Untersuchung, da Serumkonzentrationen von PTH und 25(OH)D korrelieren [3, 43]. Für 1,25(OH)₂D und 25(OH)D Serumkonzentrationen könnte dies in Vitamin D insuffizienten Individuen auch gelten [3, 43].

Hauttyp und Hautpigmentierung sind individuelle Faktoren, welche den Vitamin D Status einer Person prädisponieren [20]. Zusammenfassend unterstützt diese Arbeit jenes Konzept und zeigt einige SNPs mit Bezug zur Hautpigmentierung, welche als neue genetische Determinante der 25(OH)D Serumkonzentration der kaukasischen Bevölkerung angesehen werden können.

6. Literaturverzeichnis

1. **Adams DR, Ron D, Kiely PA (2011)** RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Communication and Signaling : CCS* 9:22-22
2. **AlGhamdi K, Kumar A, Moussa N (2013)** The role of vitamin D in melanogenesis with an emphasis on vitiligo
3. **Almquist M, Bondeson A-G, Bondeson L, Malm J, Manjer J (2010)** Serum levels of vitamin D, PTH and calcium and breast cancer risk—a prospective nested case–control study. *International Journal of Cancer* 127:2159-2168
4. **Anderson JL, May HT, Horne BD, Bair TL, Hall NL, Carlquist JF, Lappé DL, Muhlestein JB (2010)** Relation of Vitamin D Deficiency to Cardiovascular Risk Factors, Disease Status, and Incident Events in a General Healthcare Population. *The American Journal of Cardiology* 106:963-968
5. **Benjamini Y, Hochberg Y (1995)** Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 57:289-300
6. **Berwick M, Armstrong BK, Ben-Porat L, Fine J, Kricker A, Eberle C, Barnhill R (2005)** Sun Exposure and Mortality From Melanoma. *Journal of the National Cancer Institute* 97:195-199
7. **Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B (2006)** Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *The American Journal of Clinical Nutrition* 84:18-28
8. **Brilliant M, Gardner J (2001)** Melanosomal pH, Pink Locus Protein and their Roles in Melanogenesis. 117:386-387
9. **Candille SI, Absher DM, Beleza S, Bauchet M, McEvoy B, Garrison NA, Li JZ, Myers RM, Barsh GS, Tang H, Shriver MD (2012)** Genome-Wide Association Studies of Quantitatively Measured Skin, Hair, and Eye Pigmentation in Four European Populations. *PLoS ONE* 7:e48294
10. **Chiu KC, Chu A, Go VLW, Saad MF (2004)** Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and β cell dysfunction. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79:820-825
11. **DeLuca HF (2004)** Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80:1689S-1696S
12. **DeLuca HF (2008)** Evolution of our understanding of vitamin D. *Nutrition Reviews* 66:S73-S87
13. **Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, et al. (2008)** INdependent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Archives of Internal Medicine* 168:1340-1349
14. **Eilers S, Bach DQ, Gaber R, et al. (2013)** ACcuracy of self-report in assessing fitzpatrick skin phototypes i through vi. *JAMA Dermatology* 149:1289-1294
15. **Erkal MZ, Wilde J, Bilgin Y, Akinci A, Demir E, Bödeker RH, Mann M, Bretzel RG, Stracke H, Holick MF (2006)** High prevalence of vitamin D deficiency, secondary hyperparathyroidism and generalized bone pain in Turkish immigrants in Germany: identification of risk factors. *Osteoporosis International* 17:1133-1140
16. **Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF (2006)** The Role of Vitamin D in Cancer Prevention. *American Journal of Public Health* 96:252-261
17. **Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C (1998)** Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391:357-362
18. **Grant WB, Cross HS, Garland CF, Gorham ED, Moan J, Peterlik M, Porojnicu AC, Reichrath J, Zittermann A (2009)** Estimated benefit of increased vitamin D status in reducing the economic burden of disease in western Europe. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 99:104-113

Literaturverzeichnis

19. **Gray KA, Yates B, Seal RL, Wright MW, Bruford EA (2014)** Genenames.org: the HGNC resources in 2015. *Nucleic Acids Research*
20. **Hintzpeter B, Mensink GBM, Thierfelder W, Muller MJ, Scheidt-Nave C (2007)** Vitamin D status and health correlates among German adults. *Eur J Clin Nutr* 62:1079-1089
21. **Holick MF (2006)** Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *The Journal of Clinical Investigation* 116:2062-2072
22. **Holick MF (2007)** Vitamin D Deficiency. *New England Journal of Medicine* 357:266-281
23. **Holick MF, Chen T, Lu Z (2010)** Vitamin D: Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications
24. **Holick MF (2011)** Vitamin D: Evolutionary, Physiological and Health Perspectives. *Current Drug Targets* Vol. 12 No. 1:4-18
25. **Lewis CM, Knight J (2012)** Introduction to Genetic Association Studies. *Cold Spring Harbor Protocols* 2012:pdb.top068163
26. **Löffler G, Pertides P (2003)** *Biochemie & Pathobiochemie: 7. Auflage*, Springer Verlag
27. **Lowry P (2015)** 60 YEARS OF POMC: Purification and biological characterisation of melanotrophins and corticotrophins. *Journal of Molecular Endocrinology*
28. **Moll I, Jung EG, Augustin M (2010)** *Dermatologie*
29. **Morris HA, Anderson PH (2010)** Autocrine and Paracrine Actions of Vitamin D. *The Clinical Biochemist Reviews* 31:129-138
30. **Norton HL, Kittles RA, Parra E, McKeigue P, Mao X, Cheng K, Canfield VA, Bradley DG, McEvoy B, Shriver MD (2007)** Genetic Evidence for the Convergent Evolution of Light Skin in Europeans and East Asians. *Molecular Biology and Evolution* 24:710-722
31. **Pilz S, Tomaschitz A, Drechsler C, Ritz E, Boehm BO, Grammer TB, März W (2010)** Parathyroid hormone level is associated with mortality and cardiovascular events in patients undergoing coronary angiography. *European Heart Journal* 31:1591-1598
32. **Pucci M, Pasquariello N, Battista N, Di Tommaso M, Rapino C, Fezza F, Zuccolo M, Jourdain R, Finazzi Agrò A, Breton L, Maccarrone M (2012)** Endocannabinoids Stimulate Human Melanogenesis via Type-1 Cannabinoid Receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 287:15466-15478
33. **Rees JL (2000)** The Melanocortin 1 Receptor (MC1R): More Than Just Red Hair. *Pigment Cell Research* 13:135-140
34. **Rees JL, Harding RM (2012)** Understanding the Evolution of Human Pigmentation: Recent Contributions from Population Genetics. *J Invest Dermatol* 132:846-853
35. **Reichrath J, Lehmann B, Spitz J (2012)** *Vitamin D Update 2012 Von der Rachitisprophylaxe zur allgemeinen Gesundheitsvorsorge: Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle*
36. **Rodriguez S, Gaunt TR, Day INM (2009)** Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *American Journal of Epidemiology*
37. **Saturnus R, Pilz S, Gräber S, Kleber M, März W, Vogt T, Reichrath J (2015)** A Closer Look at Evolution: Variants (SNPs) of Genes Involved in Skin Pigmentation, Including EXOC2, TYR, TYRP1, and DCT, Are Associated With 25(OH)D Serum Concentration. *Endocrinology* 156:39-47
38. **Scherer D, Kumar R (2010)** Genetics of pigmentation in skin cancer — A review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 705:141-153
39. **Scragg R, Holdaway I, Singh V, Metcalf P, Baker J, Dryson E (1995)** Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels decreased in impaired glucose tolerance and diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 27:181-188
40. **Simon JD, Peles D, Wakamatsu K, Ito S (2009)** Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell & Melanoma Research* 22:563-579
41. **Sitaram A, Marks MS (2012)** Mechanisms of protein delivery to melanosomes in pigment cells. *Physiology (Bethesda, Md)* 27:85-99
42. **Statistisches Bundesamt (2013)** *Todesursachenstatistik*

43. **Steingrimsdottir L, Gunnarsson O, Indridason OS, Franzson L, Sigurdsson G (2005)** Relationship between serum parathyroid hormone levels, vitamin d sufficiency, and calcium intake. *JAMA* 294:2336-2341
44. **Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA (2004)** Melanocytes and the Microphthalmia Transcription Factor Network. *Annual Review of Genetics* 38:365-411
45. **Urbain P, Jakobsen J (2015)** Dose–Response Effect of Sunlight on Vitamin D2 Production in *Agaricus bisporus* Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63:8156-8161
46. **Uyen L, Nguyen D, Kim E-K (2008)** Mechanism of skin pigmentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 13:383-395
47. **Victor A, Elsässer A, Hommel G, Blettner M (2010)** Judging a Plethora of p-Values. *Dtsch Arztebl International* 107:50-56
48. **Wang S, Chen J-z, Zhang Z, Gu S, Ji C, Tang R, Ying K, Xie Y, Mao Y (2003)** Cloning, expression and genomic structure of a novel human GNB2L1 gene, which encodes a receptor of activated protein kinase C (RACK)*. *Molecular Biology Reports* 30:53-60
49. **Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, Kiel D, Streeten EA, Ohlsson C, Koller DL, Palotie L, Cooper JD, O'Reilly PF, Houston DK, Glazer NL, Vandenput L, Peacock M, Shi J, Rivadeneira F, McCarthy MI, Anneli P, de Boer IH, Mangino M, Kato B, Smyth DJ, Booth SL, Jacques PF, Burke GL, Goodarzi M, Cheung C-L, Wolf M, Rice K, Goltzman D, Hidiroglou N, Ladouceur M, Hui SL, Wareham NJ, Hocking LJ, Hart D, Arden NK, Cooper C, Malik S, Fraser WD, Hartikainen A-L, Zhai G, Macdonald H, Forouhi NG, Loos RJJ, Reid DM, Hakim A, Dennison E, Liu Y, Power C, Stevens HE, Jaana L, Vasani RS, Soranzo N, Bojunga J, Psaty BM, Lorentzon M, Foroufard T, Harris TB, Hofman A, Jansson J-O, Cauley JA, Uitterlinden AG, Gibson Q, Järvelin M-R, Karasik D, Siscovick DS, Econs MJ, Kritchevsky SB, Florez JC, Todd JA, Dupuis J, Hyppönen E, Spector TD (2010)** Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 376:180-188
50. **Winkelmann BR, März W, Boehm BO, Zott R, Hager J, Hellstern P, Senges J (2001)** Rationale and design of the LURIC study - a resource for functional genomics, pharmacogenomics and long-term prognosis of cardiovascular disease. *Pharmacogenomics* 2:1-73
51. **Yamaguchi Y, Hearing VJ (2009)** Physiological factors that regulate skin pigmentation. *BioFactors* (Oxford, England) 35:193-199
52. **Yi L, Kaler S (2014)** ATP7A trafficking and mechanisms underlying the distal motor neuropathy induced by mutations in ATP7A. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1314:49-54
53. **Zittermann A (2006)** Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 92:39-48

7. Publikationen/Dank

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind bereits publiziert worden (Anticancer Research März 2016 Vol. 36 No. 3 1429 - 1437).

Die vorliegende Arbeit wäre ohne den Rat und die Unterstützung anderer nicht möglich gewesen.

Ich danke deshalb:

Prof. Dr. Thomas Vogt für die Möglichkeit an der dermatologischen Fakultät zu promovieren.

Prof. Dr. Jörg Reichrath für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas sowie die zielgerichtete und herzliche Betreuung meiner Arbeit.

Dr. Roman Saternus für die Beantwortung vieler Fragen zum Ablauf der statistischen Tests und der Arbeit. Seine wertvollen Hilfestellungen habe ich stets sehr geschätzt.

Prof. Dr. Stefan Wagenpfeil für die Hilfe bei der Auswahl der statistischen Verfahren und die nette Beantwortung von Fragen zu den Tests.

Prof. Dr. Winfried März und Dr. Marcus Kleber für die Bereitstellung der Daten der LURIC Studie und die Beantwortung vieler Mails mit Rückfragen dazu.