



Technische Universität München

Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen,
Deutsches Herzzentrum München des Freistaates Bayern

Untersuchung der Assoziation von Polymorphismen der APOE-APOC1-Genregion mit dem Myokardinfarkt

Johannes Kirchhofer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Adnan Kastrati
2. Prof. Dr. Karl-Ludwig Laugwitz

Die Dissertation wurde am 07.09.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.07.2017 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	4
2	Abbildungsverzeichnis.....	5
3	Tabellenverzeichnis	6
4	Einleitung	7
4.1	Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt.....	7
4.1.1	Epidemiologie	7
4.1.2	Pathogenese	8
4.1.3	Risikofaktoren.....	11
4.2	Die Rolle der Apolipoproteine APOE und APOC1 im Lipidstoffwechsel und ihre kardiovaskuläre Risikoassoziation	11
4.3	Beschreibung der APOE-C1-C4-C2-Genregion.....	14
4.4	Assoziation der SNPs der APOE-APOC1- Genregion mit dem kardiovaskulären Risiko	16
4.5	Haplotypanalyse.....	21
5	Ziel der Arbeit.....	22
6	Studienpopulation und Methoden	23
6.1	Studienpopulation.....	23
6.2	DNA- Isolierung	25
6.3	Auswahl der SNPs	26
6.4	Genotypisierung	27
6.5	Statistische Analysen	33
7	Ergebnisse	35
7.1	Genotypverteilung und Allelrisikobewertung der SNPs	35
7.1.1	rs445925 (C>T)	36
7.1.2	rs584007 (G>A), rs1064725 (T>G), rs4420638 (A>G)	37
7.2	Haplotypanalyse und Risikoabschätzung	37

8	Diskussion.....	39
8.1	Vergleich der Haplotypanalyse mit der Untersuchung einzelner SNPs	40
8.2	Gegenüberstellung der Ergebnisse dieser Arbeit und der aktuellen Studienlage.....	41
8.2.1	Studien mit zu der vorliegenden Arbeit konkordanten Ergebnissen.....	41
8.2.2	Studien mit zu der vorliegenden Arbeit diskordanten Ergebnissen ..	43
8.2.3	Beziehung zwischen Studien zu Biomarkern und den Ergebnissen dieser Arbeit	46
8.2.4	Bisher keine Studien zu rs1064725.....	49
9	Zusammenfassung.....	50
10	Literaturverzeichnis	52
11	Danksagung.....	60
12	Lebenslauf	61

1 Abkürzungsverzeichnis

95%-KI	95%-Konfidenzintervall
APOB	Apolipoprotein B
APOC1	Apolipoprotein C1
APOC2	Apolipoprotein C2
APOC4	Apolipoprotein C4
APOE	Apolipoprotein E
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
CRP	C-reaktives Protein
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HCR	Hepatische Kontrollregion
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (engl.: High Density Lipoprotein)
IDL	Lipoprotein intermediärer Dichte (engl.: Intermediate Density Lipoprotein)
kb	Kilobasenpaare
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Lipoprotein niederer Dichte (engl.: Low Density Lipoprotein)
Lp-PLA2	Lipoprotein-assoziierte Phospholipase A2
MI	Myokardinfarkt
OR	Quotenverhältnis (engl: Odds Ratio)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl.: Single Nucleotide Polymorphism)
VLDL	Lipoprotein sehr niedriger Dichte (engl.: Very Low Density Lipoprotein)

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathogenese der Atherosklerose (modifiziert nach Ross, 1999)	10
Abbildung 2: Die APOE/C1/C4C2-Genregion im Bereich q13.2 auf Chromosom 19.....	14
Abbildung 3: SNPs der APOE-APOC1-Genregion in der Bande q13.2 auf Chromosom 19 mit Hinweisen für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko	18
Abbildung 4: APOE-APOC1-Genregion in der Bande q13.2 auf Chromosom 19 mit den Positionen der die Region repräsentierenden SNPs.....	26
Abbildung 5: Schematische Darstellung der TaqMan-Methode.....	29
Abbildung 6: Auswertung der Fluoreszenzsignale am Beispiel von rs445925	33
Abbildung 7: Prozentuale Allelverteilung der SNPs in Fall- und Kontrollgruppe	36
Abbildung 8: OR der einzelnen Haplotypen mit zugehörigen 95%-KI	38

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: SNPs der APOE-APOC1-Genregion mit Hinweisen für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko	19
Tabelle 2: Basale Charakteristika der Studienpopulation.....	25
Tabelle 3: Nukleotidsequenzen der Primer und TagMan-Sonden	31
Tabelle 4: Genotypverteilung der SNPs in Fall- und Kontrollgruppe	35
Tabelle 5: Analyse der sechs häufigsten Haplotypen und deren Risikobewertung.....	37

4 Einleitung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Untersuchung der Assoziation von vier Einzelnukleotid-Polymorphismen (eng: Single Nucleotide Polymorphism = SNP), die sich in enger Nachbarschaft zu den Genen von Apolipoprotein E (APOE) und Apolipoprotein C1 (APOC1) befinden, mit dem Myokardinfarkt (MI). Die Genprodukte von APOE und APOC1 sind wesentlich am Fettstoffwechsel beteiligt und damit auch für die Pathogenese der Atherosklerose relevant. Die koronare Herzkrankheit (KHK) bzw. der MI stellen Manifestationsformen der Atherosklerose am Herzen dar (Herold, 2012). In der Folge wird daher die Epidemiologie und Pathogenese der KHK bzw. des MI erläutert. Zudem werden die bisher bekannten Funktionen von APOE und APOC1 im Fettstoffwechsel dargelegt und die erweiterte Genregion, die die vier SNP beinhaltet, näher beleuchtet.

4.1 Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt

4.1.1 Epidemiologie

Die KHK ist sowohl in Europa als auch in den USA die häufigste Todesursache (Weltgesundheitsorganisation Regionalbüro für Europa, Der Europäische Gesundheitsbericht 2012: Ein Wegweiser zu mehr Wohlbefinden, 2014; Go et al., 2014). Laut Daten des Statistischen Bundesamtes (2014) starben in Deutschland im Jahr 2012 insgesamt 349.217 Menschen an Herz-Kreislauf-Erkrankungen; der überwiegende Anteil davon wiederum an den Folgen einer KHK. Krankheiten, denen eine KHK zugrunde liegt, stellten darüber hinaus die drei häufigsten ICD-10-bezogenen (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) Todesursachen dar. So verstarben 71.655 Personen (8,2%) an einer chronisch ischämischen Herzkrankheit, 52.516 Menschen (6,0%) aufgrund eines akuten MI und 46.410 Personen (5,2%) in Folge einer Herzinsuffizienz. Kumulativ bedeutet dies einen Anteil von fast 20% von Herzkreislauf-bedingten Todesfällen an der Gesamtheit der Todesursachen. Männer haben mit 30% Lebenszeitprävalenz ein circa doppelt so hohes Risiko wie Frauen (15%), an einer KHK zu erkranken (Herold, 2012). Die Verteilung zeigt dabei eine deutliche Zunahme im Alter. So waren nach Angaben der GEDA-Studie (GEDA: Gesundheit in Deutschland aktuell) des Robert Koch-Instituts (2010) in der Altersgruppe bis zum 44. Lebensjahr knapp 1% der

Frauen und 2% der Männer an einer KHK erkrankt. Die Prävalenz erhöhte sich in der Gruppe der 45- bis 65-Jährigen bei Frauen auf 4% und Männern auf 10%. In der Altersgruppe über 65 Jahren lag schließlich bei 18% der Frauen und 28% der Männer eine KHK vor (Robert Koch-Institut, 2010). Wie in den USA und den meisten westeuropäischen Staaten geht die Sterblichkeit an der KHK auch in Deutschland seit Beginn der 1980er Jahre zurück, was auf verbesserte präventive Maßnahmen und optimierte Therapiemöglichkeiten zurückzuführen ist (Robert Koch-Institut, 2010). Die hohe Prävalenz von Herz-Kreislaufkrankungen führt zusammen mit steigenden Ausgaben für Prävention und Therapie dazu, dass Krankheiten dieses Formenkreises im Jahr 2008 mit durchschnittlich 450€ pro Einwohner am kostenintensivsten waren (Statistisches Bundesamt, 2014).

4.1.2 Pathogenese

Der KHK und dem MI liegt eine Veränderung der Herzkranzgefäße im Sinne einer Atherosklerose zugrunde (Herold, 2012) . Sie tritt bevorzugt an Stellen auf, an denen der Blutfluss von einer laminaren in eine turbulente Strömung übergeht, was überwiegend an Gefäßverzweigungen der Fall ist (Libby, 2002). Zur Erklärung der Entstehung einer Atherosklerose hat sich die „Response-to-Injury“-Hypothese von Ross aus dem Jahr 1999 weitgehend durchgesetzt. Die Genese der Atherosklerose ähnelt dabei chronisch inflammatorischen Prozessen in vielerlei Hinsicht (Ross, 1999). Er beschreibt die erste Phase der Pathogenese als eine endotheliale Dysfunktion der Gefäßintima, die durch verschiedenste Ursachen bedingt sein kann. Dabei kommen für ihn veränderte bzw. oxidierte Lipoproteine niederer Dichte (engl: Low Density Lipoprotein = LDL), freie Radikale durch Zigarettenrauch, arterielle Hypertension, Diabetes mellitus, genetisch bedingte Veränderungen, erhöhte Plasmakonzentrationen an Homocystein oder infektiöse Mikroorganismen in Betracht. Stickstoffmonoxid, gewebespezifischer Plasminogenaktivator und Prostacyclin werden durch das geschädigte Endothel vermindert gebildet. Daraus resultiert ein prothrombotisches Milieu mit Gefäßkonstriktion und erleichterter Adhäsion von Leukozyten, Monozyten und Thrombozyten (Libby, 2002). Die Adhäsion wird vorwiegend durch eine vermehrte Expression von E- und P-Selektinen, vaskulärem Zelladhäsionsmolekül-1 und interzellulärem Adhäsionsmolekül-1 an der Gefäßintima vermittelt (Altman, 2003; Pierangeli et al., 2001). Gleichzeitig steigt die Permeabilität für Lipoproteine in den dysfunktionalen

Bereichen (Lefkowitz und Willerson, 2001). Folge der leichteren Adhäsion und Permeabilität der Gefäßintima ist eine forcierte Migration von Leukozyten wie Monozyten und aktivierten T-Lymphozyten aus dem Blut in die Intima (Ross, 1999). Die eingewanderten Monozyten differenzieren sich zu Makrophagen und nehmen mittels eines Scavenger-Rezeptors oxidierte LDL-Partikel auf. Das Cytoplasma der Zellen weist schließlich erhebliche Ansammlungen von Lipidtröpfchen auf, weshalb die Makrophagen nun aufgrund ihres mikroskopischen Aussehens als Schaumzellen bezeichnet werden (Libby, 2002). Dysfunktionale Gefäßintimabereiche, die neben Monozyten und Makrophagen (Schaumzellen) auch aktivierte T-Lymphozyten beinhalten, werden als sogenannte Fatty Streaks bezeichnet und können bereits bei Kleinkindern nachgewiesen werden (Ross, 1999). Durch ein komplexes Zusammenspiel von Mediatoren und Chemokinen, die von Entzündungszellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen sezerniert werden, kommt es in der geschädigten Gefäßintima im Wesentlichen zu zwei Vorgängen: Erstens wird so ein sich selbst erhaltender Entzündungsprozess initiiert, mit ständig neuer Einwanderung von Entzündungszellen vom Blut in das geschädigte Areal; zweitens werden die glatten Muskelzellen zur Migration aus der Tunica media und zur Proliferation angeregt, was weitreichende strukturelle Veränderungen der Intima zur Folge hat (Lefkowitz und Willerson, 2001). Mit der Zeit kommt es in der Intima zu immer größer werdenden extrazellulären Ansammlungen von Lipiden. Diese formen zusammen mit den Schaumzellen (akkumulierte Makrophagen) und Zelltrümmern einen nekrotischen Kern, der durch eine bindegewebige Kappe vom Gefäßlumen abgegrenzt wird. Eine Gefäßwandschädigung dieser Art wird „fortgeschrittene Plaque“ genannt (Ross, 1999). Ab einer gewissen Größe des so entstandenen Atheroms geht die Umstrukturierung der Gefäßwand mit einer zunehmenden Lumeneinengung einher (Libby, 2002). Fortgeschrittene Plaques werden in der Folge als stabil oder instabil klassifiziert. Instabilität einer Plaque wird durch Ausdünnen der bindegewebigen Kappe durch Metalloproteasen und andere proteolytische Enzyme gefördert, die von Makrophagen sezerniert werden (Ross, 1999). Gleichzeitig finden sich weniger glatte Muskelzellen in der bindegewebigen Kappe. Zudem wird die von ihnen durchgeführte Synthese von extrazellulären Matrixproteinen durch T-Zellen gehemmt, was einen zusätzlichen Strukturverlust bedeutet (Finn et al., 2010). Mit wachsendem Durchmesser des nekrotischen Kerns, steigender Anzahl von Makrophagen und Ausdünnen der bindegewebigen Kappe in der Läsion erhöht sich

die Rupturgefahr einer so entstandenen instabilen fibrösen Plaque (Finn et al., 2010). Kommt es durch die Instabilität zum Zerreißen der Plaque, so kann durch die Freilegung subendothelialen Kollagens und Von-Willebrand-Faktors, durch Blutung von Mikrogefäßen und Freisetzung großer Mengen gerinnungsfördernden Materials ein Gefäßverschluss resultieren. Dieser kann sich je nach Ausdehnung beispielsweise am Herzen als MI manifestieren (Libby, 2002). In Abbildung 1 sind die zentralen Vorgänge der Pathogenese der Atherosklerose veranschaulicht.

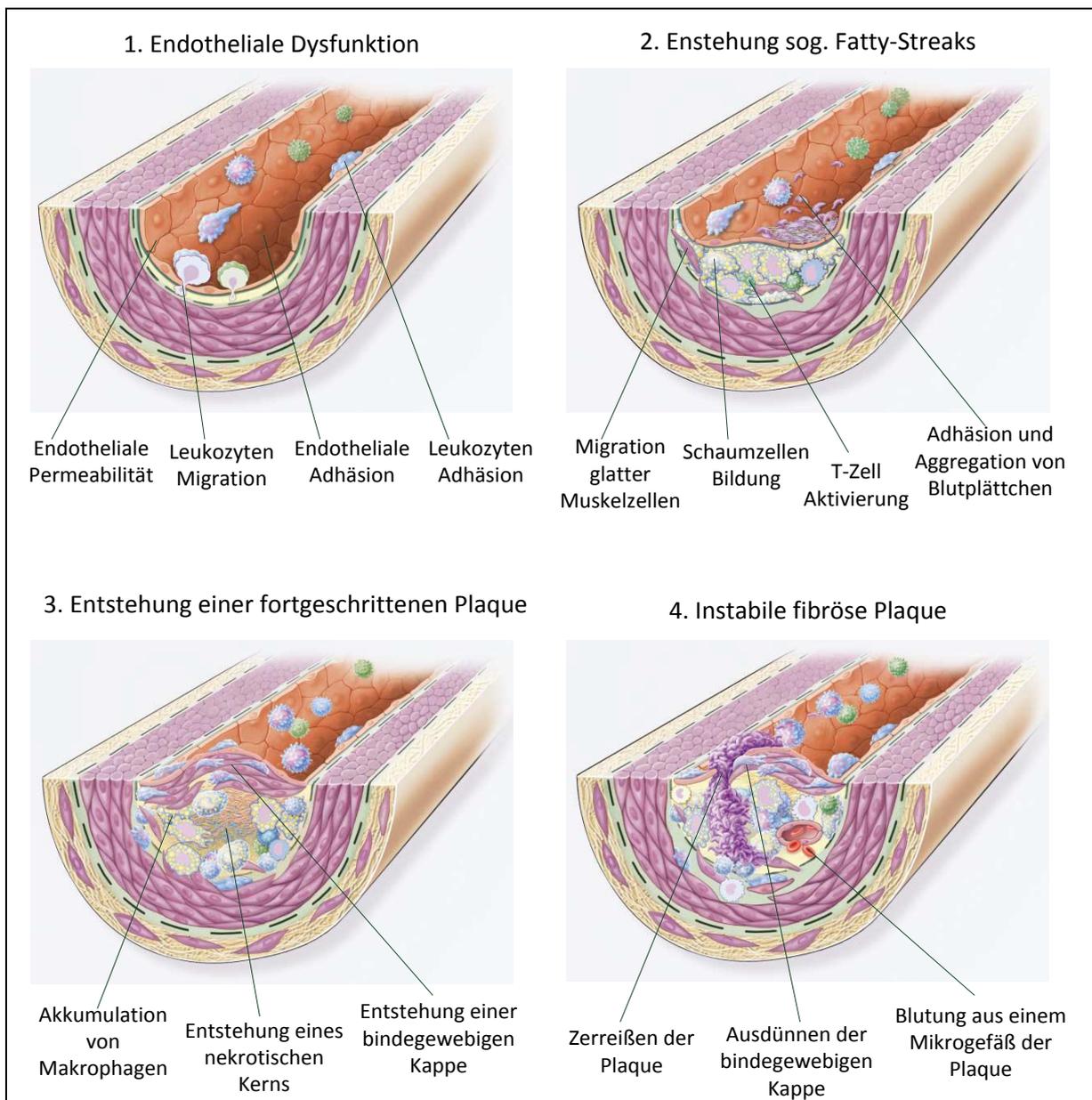


Abbildung 1: Pathogenese der Atherosklerose (modifiziert nach Ross, 1999)

4.1.3 Risikofaktoren

Viele Risikofaktoren der KHK sind seit längerer Zeit bekannt (Blankenhorn und Hodis, 1993). Sie können in verschiedene Kategorien eingeteilt werden, wobei traditionell zwischen Hauptrisikofaktoren und weiteren Risikofaktoren unterschieden wird. Zu den Hauptrisikofaktoren gehören:

- erhöhte LDL-Cholesterinwerte
- verminderte Werte an Lipoprotein hoher Dichte (engl: High Density Lipoprotein = HDL)
- arterielle Hypertension
- Diabetes mellitus
- Rauchen
- KHK oder MI erstgradiger Familienangehöriger vor dem 55. Lebensjahr bei Männern und vor dem 65. Lebensjahr bei Frauen
- Lebensalter von mehr als 45 Jahren bei Männern und mehr als 55 Jahren bei Frauen

Zu den weiteren Risikofaktoren gehören: atherogene Diät (Herold, 2012), abdominelle Adipositas, körperliche Inaktivität, Hypertriglyceridämie, erhöhter Lipoprotein(a)-Wert, Glukosetoleranzstörung, allgemeine Entzündungszustände bei KHK-Patienten (Herold, 2012), Thromboseneigung, Hyperfibrinogenämie (Herold, 2012), ein erhöhtes LDL/HDL-Verhältnis (Greene et al., 2005) und die familiäre Hypercholesterinämie (Soutar und Naoumova, 2007).

4.2 Die Rolle der Apolipoproteine APOE und APOC1 im Lipidstoffwechsel und ihre kardiovaskuläre Risikoassoziation

Die Apolipoproteine APOE und APOC1 sind Bestandteile von Lipoproteinen und erfüllen wichtige Funktionen beim Transport und der Verteilung von Fetten zwischen den einzelnen Geweben. Die Assoziation von vom Normwert abweichenden Blutfettkonzentrationen geht mit einem veränderten kardiovaskulären Risiko einher. (Kannel et al., 1961). Im Folgenden werden sowohl die Rolle der beiden Apolipoproteine im Fettstoffwechsel, als auch deren Zusammenhang mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko näher erläutert.

APOE wird vom gleichnamigen Gen kodiert, welches sich auf dem langen Arm von Chromosom 19 befindet (Mahley, 1988). Das reife Protein setzt sich aus 299 Aminosäuren zusammen und besitzt eine Masse von 34,2 Kilodalton. APOE wird in zahlreichen Geweben wie Leber, Gehirn, Milz und Nieren hergestellt und ins Blutplasma sezerniert (Mahley, 1988). Dort ist es Bestandteil von Chylomikronen, von Lipoproteine sehr niedriger Dichte (engl: Very Low Density Lipoprotein, VLDL), von Lipoproteine intermediärer Dichte (engl: Intermediate Density Lipoprotein, IDL) und von HDL. APOE ist der Ligand des LDL-Rezeptors und vermittelt so die Aufnahme und Verteilung von Cholesterin und anderen Fetten zwischen verschiedenen Geweben des Körpers (Mahley, 1988). Es ist in der Lage, zwischen den einzelnen Lipoproteinfraktionen zu wechseln (Rosenson, 2014). So wird es im Blutplasma von HDL auf Chylomikronen übertragen. Letztere entwickeln sich durch Abgabe von Triglyceriden zu sogenannten Remnants, welche APOE-vermittelt via Endozytose in die Leber aufgenommen werden. Zudem wechselt APOE im Blutplasma von HDL zu VLDL. VLDL wird durch die Abgabe von Triglyceriden und Phospholipiden zu IDL. Solange IDL APOE enthält, besteht die Möglichkeit der APOE-abhängigen Aufnahme, hauptsächlich in die Leber. Verliert IDL hingegen APOE, entwickelt es sich dadurch zu LDL (Rosenson, 2014). Letztlich sorgt APOE auch in HDL-Partikeln für deren Aufnahme in die Leber, was dem Transport von Fetten und Cholesterin aus peripheren Geweben hin zur Leber entspricht (Rosenson, 2014). Die hohe Relevanz von APOE für kardiovaskuläre Erkrankungen wird unter anderem dadurch deutlich, dass es bei Mutationen im APOE-Gen, die die Bindung von APOE zum LDL-Rezeptor schwächen, zur Hyperlipoproteinämie Typ 3 kommt, einer Erkrankung mit extrem erhöhtem kardiovaskulären Risiko und oft frühzeitig auftretender KHK (Mahley, 1988).

APOC1 wird vom APOC1-Gen kodiert, welches circa 5 kb stromabwärts des APOE-Gens, auf dem langen Arm von Chromosom 19 liegt (Tata et al., 1985). APOC1 setzt sich aus 57 Aminosäuren zusammen, besitzt eine Masse von 6,6 Kilodalton und wird vorwiegend in der Leber exprimiert (Tata et al., 1985). Eine wesentlich geringere Expression findet sich in Lunge, Haut, Hoden und Nieren (Jong et al., 1999). APOC1 ist Bestandteil von Chylomikronen, VLDL und HDL, wobei es nach fettreichen Mahlzeiten und entsprechend hohen Konzentration an Triglyceriden im Plasma hauptsächlich (>90%) in Chylomikronen und VLDL nachgewiesen wird. Bei Fasten wechselt APOC1 hingegen überwiegend zu HDL (Shulman et al., 1974). APOC1 ist

ein potenter Aktivator der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (Soutar et al., 1975), einem Enzym, das an HDL gebunden die Veresterung von Cholesterin aus Chylomikronen und VLDL-Remnants mit Fettsäuren aus Lecithin katalysiert, welches beispielsweise aus abgestorbenen Zellen stammt (Dobiášová und Frohlich, 1999). HDL erlangt durch die Beladung mit Cholesterinestern seine Dichte und sphärische Struktur. Somit ist APOC1 durch die Aktivierung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase wesentlich an der Entwicklung von HDL-Partikeln beteiligt und daher auch indirekt am Rücktransport von Cholesterin zur Leber (Dobiášová und Frohlich, 1999). Lauer et al. (1988) zeigten, dass die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen mit einer Aktivierung des APOC1-Gens einhergeht. Dieser Vorgang ist nach der „Response-to-Injury“-Hypothese von Ross (1999) ein Bestandteil der Pathogenese der Atherosklerose. Eine weitere wichtige Funktion von APOC1 ist die Hemmung des Enzyms Cholesterinester-Transferprotein (CETP) (Gautier et al., 2000). CETP ist ein porenbildendes Transferprotein zwischen Lipoproteinen, dessen Hauptaufgabe der Austausch von Cholesterinestern und Triglyceriden zwischen selbigen ist (Tall, 1993). CETP besitzt eine atherogene und eine anti-atherogene Komponente. Atherogen ist dabei die Nettoübertragung von HDL-Cholesterinester auf LDL und VLDL (Hesler et al., 1987). Anti-atherogen wirkt sich dagegen die Beteiligung von CETP an der Reifung von HDL-Partikeln aus (Eckardstein et al., 2001). Experimente mit transgenen Mäusen legen einen hemmenden Einfluss von APOC1 auf die hepatische Lipase nahe, was eine verminderte Beseitigung (clearance) von Lipoproteinen durch die Leber zur Folge hat und zu einer vermehrten Atheroskleroseausprägung führt (Conde-Knape et al., 2002; Westerterp et al., 2006). Weisgraber et al. (1990) zeigten in diesem Zusammenhang, dass auch die Beseitigung von VLDL und IDL durch APOC1 gehemmt wird, was durch Konformationsänderung oder Maskierung von APOE als hepatischer Rezeptor bedingt sein könnte. Diese Erkenntnisse dienen zudem als Erklärungsmodell für die entstehende Hyperlipidämie bei Überexpression von APOC1 in transgenen Mäusen (Jong et al., 1999). Außerdem stellte sich heraus, dass sich die Lipopolysaccharid-induzierte Atheroskleroseausprägung bei Mäusen entscheidend durch hohe APOC1-Plasmaspiegel verstärkte. APOC1 scheint in diesem Zusammenhang die Entzündungsantwort auf Lipopolysaccharide zu intensivieren. Dieser Vorgang ist ein Erklärungsmodell für die gesteigerte Atheroskleroseausprägung bei Menschen mit chronischen Entzündungen (Westerterp et al., 2007). Zusätzlich wird eine

Auswirkung von APOC1 auf die Zunahme der Plaque-Instabilität diskutiert, da APOC1-reiche HDL-Moleküle in vivo zu schnellerer Apoptose glatter Muskelzellen führten (Kolmakova et al., 2004). Es existiert eine um zwei Aminosäuren verkürzte Isoform von APOC1 (APOC1') (Bondarenko et al., 1999). Moore et al. (2011) untersuchten in einer Kohortenstudie von Patienten mit und ohne KHK mittels Massenspektroskopie das Auftreten dieser neuen Isoform. Dabei stellte sich heraus, dass die verkürzte Isoform APOC1' nur in Patienten mit KHK vorkam, während sie in keiner der Personen der Vergleichsgruppe nachweislich war. Darüber hinaus zeichnete sich APOC1' durch erhöhte Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress im Rahmen einer KHK aus. Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Arbeiten über APOE und APOC1 einen entscheidenden Einfluss der beiden Apolipoproteine auf den Fettstoffwechsel und damit indirekt auf die Entstehung einer KHK bzw. eines MI.

4.3 Beschreibung der APOE-C1-C4-C2-Genregion

Die Gene von APOE und APOC1 liegen in enger Nachbarschaft auf dem langen Arm von Chromosom 19 an der Stelle q13.2 (Jong et al., 1999). In der Nähe befinden sich die Gene für Apolipoprotein C4 (APOC4) und Apolipoprotein C2 (APOC2). Die Gensequenzen der vier Gene weisen viele Übereinstimmungen untereinander sowie mit anderen Apolipoproteinen auf. Aus diesem Grund wird von einer evolutionären Verwandtschaft ausgegangen (Luo et al., 1986). Der Bereich, der die vier Gene sowie ein Pseudogen von APOC1 beinhaltet, wird daher als eine Genregion angesehen (siehe Abbildung 2).

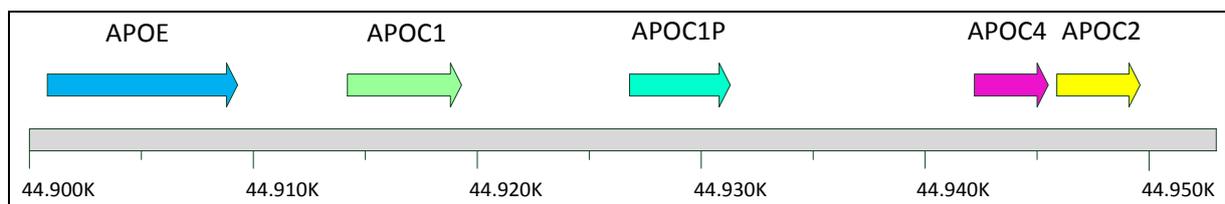


Abbildung 2: Die APOE/C1/C4C2-Genregion im Bereich q13.2 auf Chromosom 19

Insgesamt umfasst die Genregion einen Abschnitt von 48 Kilobasenpaaren (kb). Die Funktionen ihrer Genprodukte als Bestandteile und Regulatoren von Lipoproteinen bedingt ihre Zuordnung zur Familie der Apolipoproteine. Die große Relevanz dieser

Genregion für das kardiovaskuläre Risiko spiegelt sich unter anderem in den Ergebnissen von Chasman et al. (2009) wieder, wonach die Genregion einen relativ großen Anteil der Varianz der Konzentration einiger wichtiger Moleküle des Fettstoffwechsels erklärt. So war der DNA-Abschnitt für 8,9% der Varianz der Apolipoprotein B-Teilchenkonzentration (APOB), 8,4% der absoluten LDL-Teilchenkonzentration und 7,1% der Varianz der LDL-Konzentration verantwortlich. Da die Varianz ein Streuungsmaß eines Erwartungswerts ist, entspricht eine erklärte Varianz einem bestimmten Einfluss. Diesen Einfluss übt die genetische Variabilität der Genregion nach dieser Arbeit auf die Varianz wesentlicher Bestandteile des Fettstoffwechsels aus, die bei einer veränderten Konzentration mit einem erhöhten Risiko für die KHK bzw. den MI einhergehen. Die Expression der Gene APOE/C1/C2/C4 wird von zwei Zentren gesteuert, die als hepatische Kontrollregion (HCR) bezeichnet werden. Eine davon (HCR1) befindet sich 17 kb stromabwärts von APOE bzw. 9 kb stromabwärts von APOC1, während sich die andere (HCR2) 27 kb stromabwärts von APOE befindet (Shachter et al., 1993).

Circa 4 kb stromabwärts von APOC1 existiert eine beinahe identische Kopie dieses Gens, das sich nur in etwa neun Prozent der Exon-Nukleotide von APOC1 unterscheidet. Da man bisher kein entsprechendes Boten-RNA-Produkt fand, wurde es als Pseudogen (APOC1P) interpretiert (Lauer et al., 1988). Bei Menschenaffen wiesen Puppionea et al. (2010) hingegen eine Expression und ein Protein-Produkt dieses „Pseudogens“, APOC1P, nach.

Das APOC4-Gen, dessen 3'-Ende nur 555 Basenpaare stromaufwärts von APOC2 liegt, wird nur in sehr geringen Mengen exprimiert und dabei ausschließlich in der Leber (Allan et al., 1997). Die genauen Funktionen von APOC4 sind weitgehend unerforscht, jedoch wird auch für dieses Apolipoprotein eine Rolle im Fettstoffwechsel angenommen. So wurde in transgenen Mäusen bereits eine Assoziation mit VLDL nachgewiesen, wobei es bei Überexpression von APOC4 zur Hypertriglyceridämie kam (Allan et al., 1997).

Das APOC2-Gen kodiert für das gleichnamige Apolipoprotein, das als Kofaktor des Enzyms Lipoproteinlipase die Spaltung von Triglyceriden, und so die Freisetzung von Fettsäuren, katalysiert. Es ist damit wesentlich am Abbau von Chylomikronen und VLDL beteiligt (Breckenridge et al., 1978; Hospattankar et al., 1984). Wie bei APOE zeigt sich auch bei APOC2 die wichtige Rolle im Fettstoffwechsel darin, dass es bei Mangel von APOC2 zur Hyperlipoproteinämie, hier Typ2b, kommt, mit einem

immensen Risikozuwachs für die Ausbildung einer KHK (Baggio et al., 1986; Connelly et al., 1987).

4.4 Assoziation der SNPs der APOE-APOC1- Genregion mit dem kardiovaskulären Risiko

Die größte Aufmerksamkeit bezüglich der Assoziation der genetischen Varianten des APOE-APOC1 Genorts mit der KHK lag lange Zeit auf den sogenannten Epsilon-SNPs von APOE. Dabei handelt es sich um drei Varianten: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$, die aus der Kombination der Allele der SNPs von rs429358 (T>C) und rs7412 (C>T) hervorgehen (Koch et al., 2002). Die $\epsilon 2$ -Variante entsteht dabei durch die Kombination des häufigeren Allels von rs429358 mit dem selteneren Allel von rs7412; $\epsilon 3$ durch die Kombination des je häufigeren Allels von rs429358 und rs7412 und $\epsilon 4$ ist bedingt durch die Kombination des selteneren Allels von rs429358 mit dem häufigeren Allel von rs7412. Beide SNPs stellen jeweils das erste Nukleotid eines Codons dar, wobei das T-Allel posttranslational zur Aminosäure Cystein und das C-Allel posttranslational zur Aminosäure Arginin im reifen APOE führt (Koch et al., 2002; Koch et al., 2008). In den Fokus traten die Epsilonvarianten von APOE vor allem in der Alzheimerforschung. Hier zeigte sich für die Träger der jeweils selteneren Allele von rs429358 und rs7412 eine Assoziation mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer Alzheimererkrankung (Bennet et al., 2010). Nach vielen kleineren Studien, die oftmals einen starken Zusammenhang zwischen den Epsilon-Varianten von APOE mit der KHK bzw. mit veränderten Lipidfraktionen im Blut festgestellt hatten, gilt der Streit um die Bedeutsamkeit der Epsilon-SNPs für das KHK-Risiko nach der Studie von Bennet et al. (2007) mehr oder minder als geklärt. Diese hatte in einer großen Metaanalyse lediglich einen schwachen Zusammenhang zwischen den Epsilon-SNPs von APOE und dem kardiovaskulären Risiko bzw. atherogenen Lipidveränderungen im Blut nachgewiesen. Der größte Unterschied ergab sich dabei beim Vergleich des Genotypen $\epsilon 2/\epsilon 2$ gegenüber dem $\epsilon 4/\epsilon 4$ Genotyp für die Blutkonzentration von LDL; der $\epsilon 2/\epsilon 2$ Genotyp war hier mit signifikant niedrigeren LDL-Konzentrationen assoziiert. Außerdem ging der $\epsilon 2/\epsilon 2$ -Genotyp in dieser Metaanalyse auch mit einer signifikanten Risikoreduktion für die KHK einher (Bennet et al., 2007). Auch die Ergebnisse einer großen Fall-Kontrollstudie von Koch et al. (2008) wiesen in diese Richtung. Hier war lediglich für das $\epsilon 2$ -Allel und den $\epsilon 2/\epsilon 3$ -

Genotyp im Vergleich mit dem $\epsilon 3/\epsilon 3$ -Genotyp eine Tendenz hin zur Signifikanz bezüglich der Assoziation mit einem verminderten MI-Risiko festzustellen. Ein starker Zusammenhang zwischen Trägern des $\epsilon 4$ -Allels mit erhöhten LDL-Werten im Blut sowie mit einem erhöhten Auftreten von KHK bzw. MI war nicht nachweisbar (Koch et al., 2008).

Da sich bei der Untersuchung der Epsilon-SNPs kein gänzlich zufriedenstellendes Ergebnis bezüglich des kardiovaskulären Risikos ergab und sich gerade in Studien mit großer Fallzahl ein eher schwacher Zusammenhang zwischen den Epsilon-SNPs und dem kardiovaskulären Risiko zeigte (Bennet et al. 2007; Koch et al. 2008), stellt sich die Frage, ob eine Ausweitung der untersuchten Genregion SNPs enthält, die eine klare Assoziation mit dem kardiovaskulären Risiko aufweisen und so den vielfach erforschten Zusammenhang zwischen der Variabilität der Genregion mit dem KHK-Risiko erklären können. Zudem existiert bisher keine systematische Analyse der SNPs dieser Genregion in Hinblick auf eine Assoziation mit dem kardiovaskulären Risiko. Es empfiehlt sich daher eine systematische Analyse der umliegenden Genregion, im Sinne der Analyse anhand von SNPs, die durch Kopplungsungleichgewichte mit weiteren SNPs die genetische Variabilität der unmittelbaren Genregion widerspiegeln. Eine Ausdehnung dieser Analyse auf das nächstliegende APOC1-Gen ist sinnvoll, um nach weiteren Assoziationen von SNPs mit dem KHK-Risiko zu suchen und gleichzeitig die neuen Erkenntnisse durch Kopplungsungleichgewichte mit den bereits erforschten Risikoassoziationen in Bezug setzen zu können. Zur Analyse bieten sich SNPs an, die durch Kopplungsungleichgewichte sowohl die Variabilität von APOE als auch des nächstliegenden APOC1-Gens erfassen. Eine Beschränkung auf die APOE-APOC1-Genregion bietet dabei den Vorteil einer leichteren Interpretierbarkeit der Ergebnisse. Mit der Untersuchung der Assoziation der genetischen Variabilität des APOC1-Gens mit dem KHK-Risiko gelangt mit APOC1 ein Gen in den Fokus, für das in letzter Zeit wichtige Funktionen im Fettstoffwechsel sowie in der Pathogenese der Atherosklerose postuliert wurden (siehe Kapitel 4.2.).

Abbildung 3 zeigt die SNPs der APOE-APOC1-Genregion, für die Hinweise auf eine Assoziation mit dem kardiovaskulären Risiko vorliegen und die in Tabelle 1 genannt werden. Die Reihenfolge orientiert sich dabei an der jeweiligen Lage auf der DNA, wobei dieser Arbeit die neueste Zusammenschau des menschlichen Genoms des

Genome Reference Consortium (GRCh38), nach Daten des National Center for Biotechnology Information, zugrunde liegen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

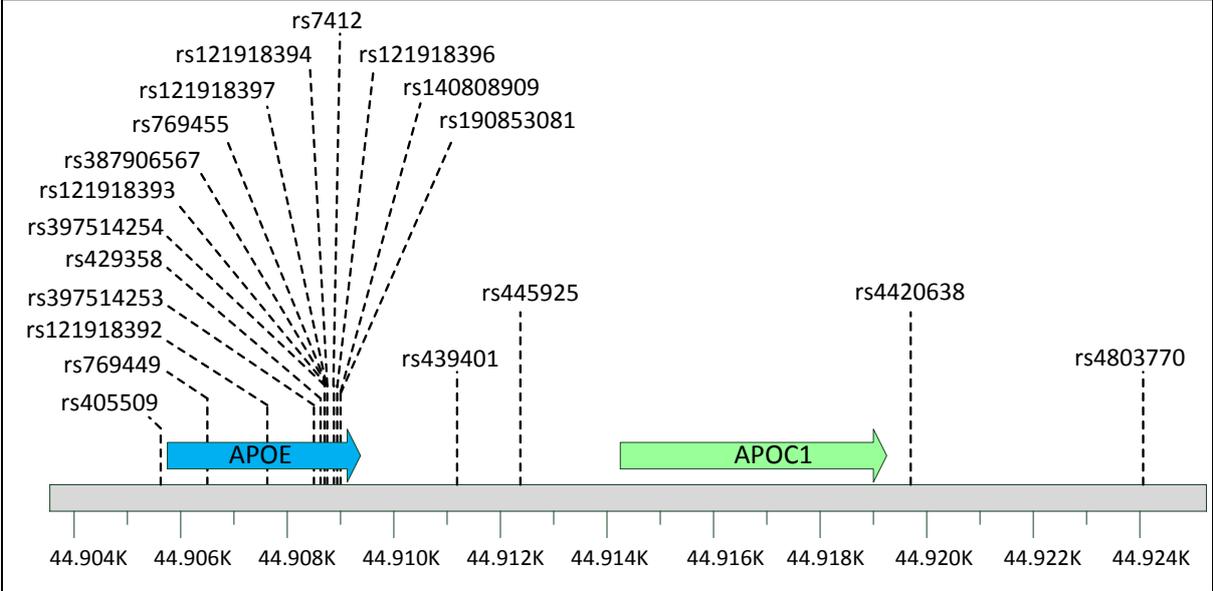


Abbildung 3: SNPs der APOE-APOC1-Genregion in der Bande q13.2 auf Chromosom 19 mit Hinweisen für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko

Tabelle 1: SNPs der APOE-APOC1-Genregion mit Hinweisen für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko

Poly-morphismus (Allele)	Assoziationen	Referenz
rs405509 (A>C)	-Selteneres Allel mit erhöhten LDL-Werten und erhöhten APOB-Werten assoziiert	Paré et al., 2007 Ken-Dror et al., 2010
rs769449 (G>A)	-Selteneres Allel mit erhöhten APOB-Werten assoziiert	Chasman et al., 2008
rs121918392 (G>A)	-Selteneres Allel bei Patienten mit Hyperlipoproteinämie und KHK nachgewiesen	Tajima, Yamamura, Yamamoto 1988
rs397514253 (A>G)	-Selteneres Allel führt zur Hyperlipoproteinämie Typ 3 mit Fehlen von APOE	Ghiselli et al., 1981 Cladaras et al., 1987
rs429358 (T>C)	-In Kombination mit rs7412 Grundlage der Epsilon-Varianten von APOE; - $\epsilon 4/\epsilon 4$ -Genotyp im Vergleich mit $\epsilon 2/\epsilon 2$ - Genotyp mit erhöhten LDL-Werten und erhöhtem KHK-Risiko assoziiert; - $\epsilon 2$ -Allel und $\epsilon 2/\epsilon 3$ -Genotyp im Vergleich mit dem $\epsilon 3/\epsilon 3$ -Genotyp mit Tendenz zu niedrigerem MI-Risiko	Koch et al., 2002 Bennet et al., 2007 Koch et al., 2008
rs397514254 Insertions-polymorphismus	-Insertionspolymorphismus mit Hyperlipoproteinämie Typ 3 assoziiert; -Insertionspolymorphismus führt im Mausmodell zu deutlichen Atheroskleroseausprägungen	Wardell et al., 1989 Knijff et al., 1991 Breslow, 1989
rs121918393 (C>T)	-Selteneres Allel mit dominanter Ausprägung der Hyperlipoproteinämie Typ 3 assoziiert	Wardell et al., 1987 Solanas-Barca et al., 2012
rs387906567 (C>T)	-Selteneres Allel mit dominanter Ausprägung der Hyperlipoproteinämie Typ 3 assoziiert	Horie et al., 1992
rs769455 (C> T)	-Selteneres Allel mit niedrigerer Bindefähigkeit von APOE am LDL-Rezeptor in Patienten mit Hyperlipoproteinämie Typ 3 assoziiert	Rall et al., 1982 Lohse et al., 1991
rs7412 (C>T)	Siehe rs429358	
rs121918397 (G>A)	- Vorkommen des selteneren Allels bei Patienten mit einer der Hyperlipoproteinämie Typ 3 ähnelnden Stoffwechsellaage	Suehiro et al., 1990
rs121918394 (A>C)	-Selteneres Allel mit Prädisposition zur Hyperlipoproteinämie Typ 3 assoziiert	Smit et al., 1990
rs121918396 (G>A)	-Selteneres Allel bedingt Stop-Codon mit der Folge des Auftretens der Hyperlipoproteinämie Typ 3	Lohse et al., 1992

rs140808909 (G>A) rs190853081 (G>A)	-Kombination der beiden selteneren Allele mit der Hyperlipoproteinämie Typ 3 assoziiert	Maeda et al., 1989 Tajima et al., 1989
rs439401 (C>T)	-Selteneres Allel mit erhöhtem MI-Risiko assoziiert -Häufigeres Allel mit erhöhtem Gesamtcholesterin, LDL- und Triglycerid-Werten und verringerten HDL-Werten assoziiert -Selteneres Allel mit verringerten VLDL- und Triglycerid-Werten assoziiert -Selteneres Allel mit verminderten Triglycerid-Werten assoziiert	Shiffman et al., 2008 Aulchenko et al., 2008 Chasman et al., 2009 Teslovich et al., 2010
rs445925 (C>T)	- Häufigeres Allel mit erhöhtem KHK-Risiko assoziiert; - Häufigeres Allel mit erhöhten LDL-Werten assoziiert; -Selteneres Allel mit verminderter Aktivität von Lipoprotein-assoziierte Phospholipase A ₂ (Lp-PLA2) assoziiert	Bis et al., 2011 Smith et al., 2010 Trompet et al., 2011 Chu et al., 2012
rs4420638 (A>G)	- Selteneres Allel mit erhöhtem KHK-Risiko assoziiert - Selteneres Allel mit erhöhten LDL-Werten assoziiert -Selteneres Allel mit verminderten HDL-Werten assoziiert -Selteneres Allel mit erhöhter Aktivität von Lp-PLA2 assoziiert	Willer et al., 2008 Elliott et al., 2009 Teslovich et al., 2010 Waterworth et al., 2010 Wallace et al., 2008 Willer et al., 2008 Kathiresan et al., 2008 Elliott et al., 2009 Suchindran et al., 2010 Teslovich et al., 2010 Waterworth et al., 2010 Braun et al., 2012 Suchindran et al., 2010
rs4803770 (C>G)	-Selteneres Allel mit erhöhten LDL- und APOB-Werten sowie verminderten HDL-Werten assoziiert; unabhängig von Gesamtcholesterin mit erhöhtem KHK-Risiko assoziiert	Ken-Dror et al., 2010

4.5 Haplotypanalyse

Der vorhergehende Abschnitt zeigt, dass in der APOE-APOC1-Genregion bisher hauptsächlich einzelne SNPs auf die Assoziation mit der KHK und mit Risikofaktoren der KHK untersucht wurden. Dabei standen vor allem die Epsilon-SNPs von APOE im Vordergrund. Eine Haplotypanalyse berechnet im Gegensatz zur einzelnen Analyse von SNPs das kombinierte Risiko mehrerer SNPs. Grundlage einer Haplotypanalyse ist dabei zunächst die Analyse des Risikos einzelner SNPs. Durch die Auswahl von repräsentativen SNPs besitzt eine Haplotypanalyse potentiell eine genauere Risikoabschätzung für die genetische Variabilität einer Genregion als die Einzelanalyse von SNPs. Im Bezug auf die APOE-APOC1-Genregion sollte daher eine Haplotypanalyse anhand repräsentativer SNPs der Analyse mit einzelnen SNPs, sowie der, der Epsilonvarianten, überlegen sein.

5 Ziel der Arbeit

Trotz der wichtigen Funktionen der Apolipoproteine APOE und APOC1 im Fettstoffwechsel, deren Bedeutung bei der Entstehung der KHK und der großen Zahl an Publikationen bezüglich der Assoziation von SNPs dieser Genregion mit der KHK, liegt bisher kein entscheidendes Ergebnis über das Risiko der genetischen Variabilität dieser Genregion mit der KHK vor. Eine Haplotypanalyse unter Verwendung von SNPs, die die Gesamtvarianz der APOE-APOC1-Genregion zu einem Großteil repräsentieren, kann grundsätzlich in Bezug auf alle bisherigen Studien über die Assoziation von genetischen Varianten von APOE und APOC1, einschließlich der Epsilon-SNPs, als überlegen angesehen werden. Um eine solche Haplotypanalyse und damit eine systematische Analyse der APOE-APOC1-Genregion durchzuführen, müssen zuerst die für die Genregion repräsentativen SNPs festgestellt werden. Zu diesem Zweck wurden auf der Basis von HapMap-Daten (www.ncbi.nlm.nih.gov) unter circa 100 SNPs diejenigen ermittelt, welche die Gesamtvarianz der APOE-APOC1-Genregion zu einem Großteil ($r^2 \geq 0,8$) widerspiegeln. Dies trifft für die folgenden vier SNPs zu: rs445925 (C>T), rs584007 (G>A), rs1064725 (T>G), rs4420638 (A>G).

Die Voraussetzung für eine Haplotypanalyse ist die Bestimmung der Genotypverteilung der einzelnen SNPs in der gesamten Studienpopulation, die in dieser Arbeit aus 4.868 Personen besteht. Die Fallgruppe wird dabei von 3.657 Personen mit koronarangiographisch gesichertem MI gebildet, während sich die Kontrollgruppe aus 1.211 Personen zusammensetzt, bei denen ein MI koronarangiographisch ausgeschlossen wurde. Für die Genotypisierung wird die TaqMan-Methode angewandt, eine Kombination aus Polymerasekettenreaktion mit allelspezifischen DNA-Sonden. Um die Assoziation der SNPs mit dem MI zu überprüfen, ist ein separater Vergleich der Allel- und Genotypverteilung zwischen Fall- und Kontrollgruppe nötig. Der erste Schritt einer Haplotypanalyse ist die Auswahl von Haplotypen, bestehend aus den Allelkombinationen der vier untersuchten SNPs. In dieser Arbeit sollen diejenigen Haplotypen auf eine Assoziation mit dem MI untersucht werden, die mit einer Häufigkeit von mehr als einem Prozent in der Bevölkerung vorkommen. Insgesamt soll so ein Vergleich zwischen der Haplotypanalyse und der Analyse mittels einzelner SNPs ermöglicht werden.

6 Studienpopulation und Methoden

6.1 Studienpopulation

Die vorliegende Fall-Kontrollstudie zur Assoziation von vier SNPs mit dem MI, die eine anschließende Haplotypanalyse zum Ziel hatte, schließt 4.868 Personen ein, die zwischen 1993 und 2002 konsekutiv rekrutiert wurden. Bei allen Personen wurde zur Evaluation pektanginöser Beschwerden bzw. aufgrund des Verdachts auf einen MI im oben genannten Zeitraum am Deutschen Herzzentrum München oder in der 1. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München eine Koronarangiographie durchgeführt. Es wurden folgende Kriterien aufgestellt, die als Grundlage für die Zuordnung zu Fall- und Kontrollgruppe dienen: Ein akuter MI wurde diagnostiziert, wenn neben anhaltenden retrosternalen Schmerzen (>20min) typische Veränderungen im 12-Kanal-EKG im Sinne von ST-Streckenhebungen und/oder in Form von pathologischen Q-Zacken auftraten. Die mithilfe der Koronarangiographie dargestellten infarkttypischen Gefäßverschlüsse und/oder regionalen Gefäßwandveränderungen mussten mit den im EKG diagnostizierten Infarktlokalisationen in Übereinstimmung stehen. Ferner wurde die Diagnose eines MI durch erhöhte Troponin-T-Werte oder eine erhöhte MB-Fraktion der Kreatinkinase erhärtet. Ein MI in der Vorgeschichte wurde durch charakteristische 12-Kanal-EKG-Veränderungen belegt. Alle Personen, bei denen auf Grundlage dieser Kriterien ein MI diagnostiziert wurde, stellten in der Folge die Fallgruppe dar. Personen, bei denen sich ein MI durch einen normalen koronarangiologischen Befund ausschließen ließ, wobei die Gefäßverengungen maximal 10% des Lumens betragen durften, wurden der Kontrollgruppe zugeordnet. Weitere Kriterien für die Zuteilung zur Kontrollgruppe waren: Kein MI in der Anamnese, keine infarkttypischen EKG-Veränderungen, keine typischen Symptome eines Herzinfarkts und keine regionalen Gefäßwandveränderungen.

Auch das Vorliegen von Risikofaktoren der KHK wurde untersucht: Von einer arteriellen Hypertension wurde entsprechend der WHO-Kriterien ausgegangen, wenn bei zwei unabhängigen Blutdruckmessungen jeweils ein systolischer Druck von mindestens 140 mmHg und/oder ein diastolischer Druck von mindestens 90 mmHg gemessen wurde, oder wenn der Patient antihypertensive Medikamente einnahm

(Koch et al., 2013). Eine Hypercholesterinämie wurde diagnostiziert, wenn sich bei nüchternen Patienten die Konzentration des Gesamtcholesterins im Serum auf mehr als 240 mg/dl ($>6,2$ mmol/l) belief. Hier wurden die Definitionen der TIMI-Arbeitsgruppe angewendet: TIMI Definitions for Commonly Used Terms in Clinical Trials (<http://www.timi.org/wp-content/uploads/2010/10/TIMI-Definitions.pdf>). Personen, die in der Anamnese in den zurückliegenden sechs Monaten Zigarettenkonsum angaben, wurden als Raucher bezeichnet. Die Diagnose eines Diabetes mellitus wurde gestellt, wenn die dafür geltenden WHO-Kriterien erfüllt waren (http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/en/index1.html): Es mussten klassische Symptome einer Hyperglykämie sowie ein pathologischer Bluttest vorliegen mit Werten der nüchternen Plasmaglukose von mehr als 126 mg/dl (>7 mmol/l) oder von mehr als 200 mg/dl ($>11,1$ mmol/l) nach oralem Glukosetoleranztest mit 75 g Glukose. Auch bei HbA1c-Anteilen von mehr als 6,5 % (≥ 48 mmol/mol) wurde ein Diabetes mellitus diagnostiziert, wohingegen bei Patienten ohne klassische Diabetessymptome zwei abnorme Bluttests vorliegen mussten. Bei Patienten, die eine diätetische Therapie durchführten, wurde die Diagnose durch eines der oben genannten Kriterien ergänzt. Bei insulinpflichtigen oder mit oralen Antidiabetika behandelten Patienten wurde gleichfalls von einem Diabetes mellitus ausgegangen.

Die Personen der gesamten Studienpopulation wurden hinsichtlich folgender Merkmale einander gegenübergestellt: Alter, Geschlecht, arterielle Hypertension, Hypercholesterinämie, aktueller Zigarettenkonsum und Diabetes mellitus. Die Definition der einzelnen Kriterien erfolgte wie oben beschrieben. Die Grundcharakterisierung für die Fall- und Kontrollgruppe sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

In der Fallgruppe betrug der Altersdurchschnitt 64,0 Jahre; in der Kontrollgruppe waren die Personen mit durchschnittlich 60,3 Jahren deutlich jünger. Frauen waren mit 24,2 % in der Fallgruppe nur etwa halb so oft wie in der Kontrollgruppe (49,4 %) vertreten. Bei 61,4 % der Patienten in der Fallgruppe war eine arterielle Hypertension bekannt, während es in der Kontrollgruppe knapp 13 % weniger waren. Eine Hypercholesterinämie trat bei 56,5 % in der Fallgruppe und in 49,7 % der Personen in der Kontrollgruppe auf. Die Frage nach dem aktuellen Zigarettenkonsum bejahten 50,6 % der Patienten in der Fallgruppe; in der Kontrollgruppe waren es lediglich 15,2 %. Nach den oben genannten Kriterien wiesen in der Fallgruppe

20,6 % einen Diabetes mellitus auf, wohingegen in der Kontrollgruppe nur bei 5,4 % dieser Risikofaktor vorlag.

Tabelle 2: *Basale Charakteristika der Studienpopulation*

	Fallgruppe (n=3657)	Kontrollgruppe (n=1211)
Alter (Jahren)	64,0 ± 12,0	60,3 ± 11,9
Frauen	885 (24,2)	598 (49,4)
Arterielle Hypertension	2246 (61,4)	589 (48,6)
Hypercholesterinämie	2067 (56,5)	602 (49,7)
Aktueller Zigarettenkonsum	1849 (50,6)	184 (15,2)
Diabetes mellitus	754 (20,6)	65 (5,4)

Altersangabe: Durchschnitt ± Standardabweichung; die übrigen Daten sind absolut und (prozentual) von Fall- und Kontrollgruppe angegeben

6.2 DNA- Isolierung

Die DNA wurde fertig aufbereitet bei -25°C zur Verfügung gestellt. Folgende Arbeitsschritte waren zuvor erfolgt: Das Blut der Studienteilnehmer wurde nach der Abnahme bei -25°C tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurde die DNA mittels der NucleoSpin Blood QuickPure Reagenzien der Firma Macherey-Nagel (Düren) isoliert. Die einzelnen Reagenzien waren: eine Säule mit Silicatmembran, Lysepuffer, Waschpuffer, Elutionspuffer, Proteinase K gelöst im Lysepuffer und Proteinasepuffer sowie zwei 2-ml Auffanggefäße. Im ersten Arbeitsschritt wurden 200 µl EDTA-Blut mit 25 µl Proteinase K - Lösung und 200 µl Lysepuffer unter Rühren vermischt und zehn Minuten lang auf 70°C erhitzt. Durch diese Prozeduren wurde die DNA aus den Leukozyten freigesetzt. Durch Hinzugeben von 200 µl Ethanol präzipierte die DNA an der Silicatmembran. Das 2-ml Auffanggefäß, in dem sich die Silicatmembran mit der DNA befand, wurde anschließend eine Minute lang mit 11.000 Umdrehungen pro Minute in einer Tischzentrifuge, Modell A14, der Firma Jouan (Unterhaching) zentrifugiert, um die löslichen Bestandteile von der DNA abzutrennen. Die Säule, die an die Silicat-Membran gebundene DNA enthielt, wurde daraufhin in ein weiteres

2-ml Auffanggefäß transferiert, wo sie mit 350 µl Waschpuffer zur Reinigung behandelt wurde. Anschließend wurde wieder drei Minuten lang bei 11.000 Umdrehungen pro Minute in der Tischzentrifuge zentrifugiert. In einem 1,5-ml Reaktionsgefäß wurde die DNA durch Zugabe von 200 µl Elutionspuffer gelöst. Nach einer Minute bei Raumtemperatur wurde in der Tischzentrifuge ein letztes Mal mit 11.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Reaktionsgefäß wurde bei -25°C bis zur Genotypisierung tiefgefroren.

6.3 Auswahl der SNPs

Auf der Grundlage aktueller Daten des HapMap-Konsortiums wurde unter circa 100 SNPs eine Auswahl repräsentativer SNPs ermittelt, die die genetische Gesamtvarianz der APOE-APOC1-Region (Position 44.905 k bis 44.921 k auf Chromosom 19) in einer Population westeuropäischer Abstammung zu einem Großteil ($r^2 \geq 0,8$) abdeckt (The International HapMap Consortium, 2007). Die Untersuchung ergab, dass hierfür die vier SNPs, nämlich rs445925, rs584007, rs1064725 und rs4420638, ausreichend sind, die daraufhin die experimentelle Grundlage dieser Arbeit darstellten (Abbildung 4).

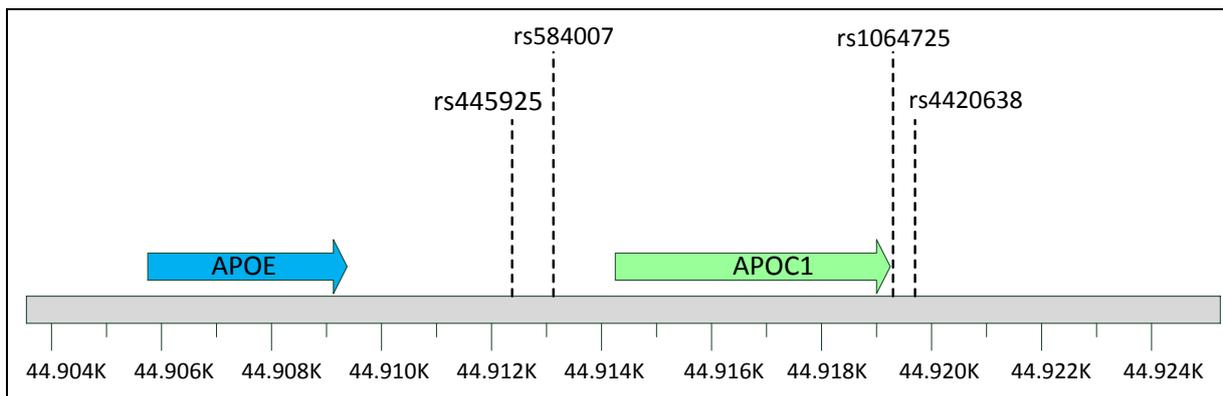


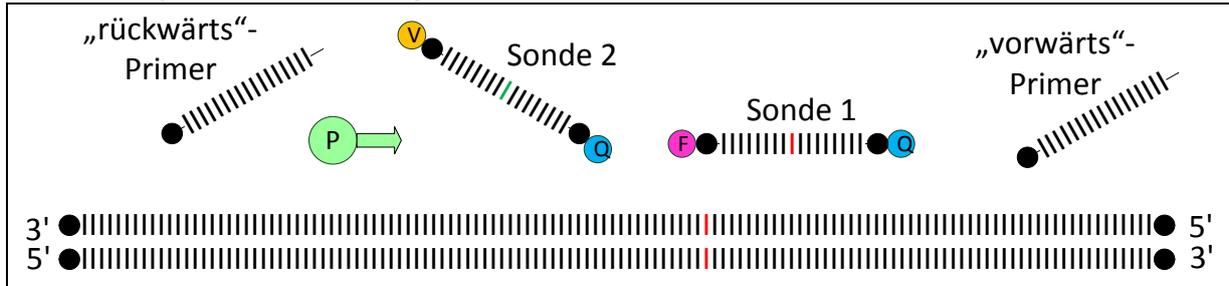
Abbildung 4: APOE-APOC1-Genregion in der Bande q13.2 auf Chromosom 19 mit den Positionen der die Region repräsentierenden SNPs

6.4 Genotypisierung

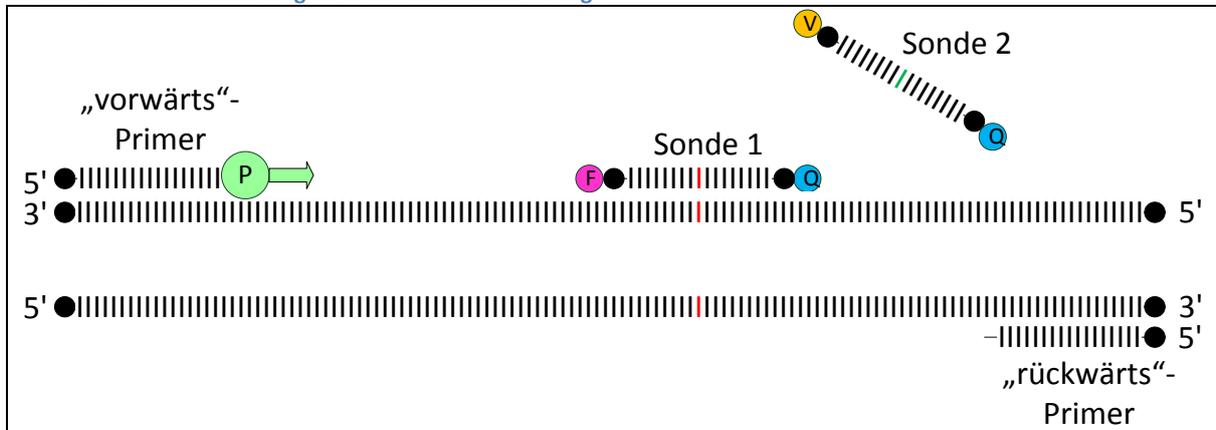
Der wesentliche praktische Teil dieser Arbeit bestand in der Genotypisierung der Studienteilnehmer. Die Ermittlung des Genotyps erfolgte durch die TaqMan-Methode, einer Weiterentwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (Livak, 1999). Das Verfahren wurde möglich, nachdem Holland et al. (1991) das Potential der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Thermus aquaticus* DNA Polymerase (Taq-Polymerase) für die genauere Analyse eines DNA-Abschnitts entdeckten. Zu Beginn der Reaktion steht wie bei einer herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion die Denaturierung der DNA-Stränge bei 95°C. Daraufhin wird die Temperatur zum sogenannten Annealing auf 60°C reduziert. Dabei lagern sich „vorwärts“- und „rückwärts“- Primer an ihre Zielsequenzen an. Gleichzeitig bindet nun eine von zwei Sonden. Jedes dieser aus 15-20 Basenpaaren bestehenden Oligonukleotide ist genau komplementär zu einem Allel. Die Sonden sind an ihrem 5'-Ende mit einem unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoff (Reporter) markiert (FAM = 6-Methylfluoreszin bzw. VIC = Reporterfarbstoff im Eigentum der Firma Applied Biosystems), dessen Signal allerdings durch einen Quencherfarbstoff am 3'-Ende unterdrückt wird, solange sich beide innerhalb desselben Moleküls befinden. Außerdem befindet sich am 3'-Ende ein sogenannter minor groove binder (MGB). Dabei handelt es sich um ein Dihydrocyclopyrrolindol-Triptid (DPI₃), das sich in die kleine Furche der DNA einlagert und damit die Bindung verstärkt (Kutyavin et al., 2000). Die Taq-Polymerase beginnt nach der Anlagerung der Primer, einen zum jeweiligen DNA-Abschnitt komplementären Strang zu synthetisieren. Trifft sie auf die gebundene Sonde, spaltet sie diese mittels ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Dadurch werden Fluoreszenz- und Quencherfarbstoff voneinander getrennt. Das emittierte Signal des Fluoreszenzfarbstoffs wird nun nicht mehr durch den Quencherfarbstoff unterdrückt. Die jeweils andere Sonde hat auch die Möglichkeit, an den polymorphen Abschnitt zu binden, da sich dieser nur in einer Base unterscheidet. Die Bindung ist allerdings schwach, wegen des Fehlens einer vollständigen Komplementarität. Daher wird die Sonde wieder verdrängt, sobald die Taq-Polymerase diesen Abschnitt polymerisiert. Das verdrängte Fluoreszenzsignal der verdrängten Sonde wird so weiterhin unterdrückt. Auf diese Weise wird an einem Template nur ein Sondentyp hydrolysiert und damit - im homozygoten Fall - nur ein Reporter aktiviert, während bei Heterozygotie beide Reporter aktiviert werden, sodass ein gemischtes Signal

entsteht. In insgesamt 40 Zyklen wird der gesuchte DNA-Abschnitt amplifiziert. Gleichzeitig entsteht so eine dazu direkt proportionale Menge an freiem Fluoreszenzfarbstoff, der dem jeweiligen Genotyp entspricht. Die TaqMan-Methode ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

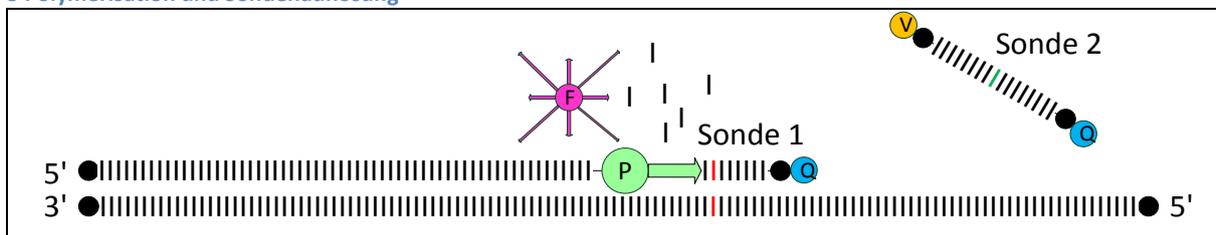
1 Versuchskomponenten und DNA-Stränge



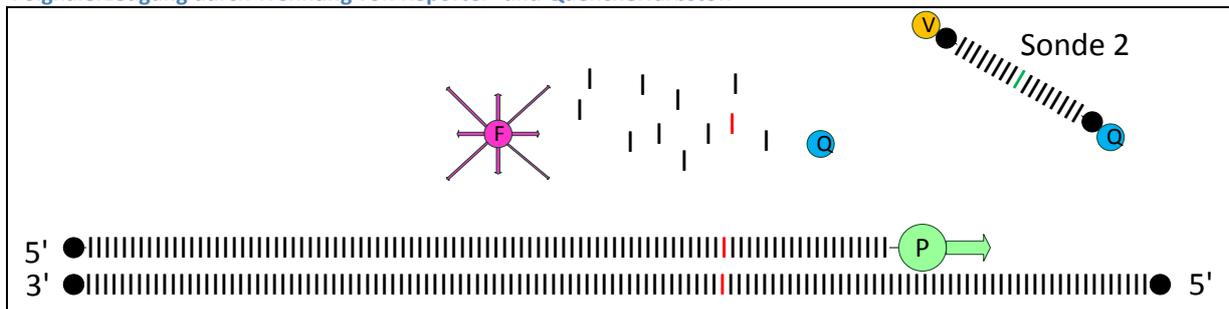
2 Primer- und Sondenbindung an denaturierte DNA-Stränge



3 Polymerisation und Sondenauflösung



4 Signalerzeugung durch Trennung von Reporter- und Quencherfarbstoff



5 Legende

	Taq-DNA-Polymerase		Polymorphe Stelle
	Quencherfarbstoff		DNA-Strang
	Reporterfarbstoff (FAM)		
	Reporterfarbstoff (VIC)		

Abbildung 5: Schematische Darstellung der TaqMan-Methode; In der gezeigten Situation liegt ein DNA-Strang vor, zu dem die FAM-Sonde (Sonde 1) vollständig komplementär ist; deshalb wird die FAM-Sonde hydrolysiert und ein FAM-Reportersignal erzeugt

Zur Genotypisierung wurden neben der DNA der Studienteilnehmer folgende Komponenten verwendet: Primer und Sonden (Applied Biosystems, Darmstadt), Mastermix (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) und Wasser. Die Sequenzen der Primer und Sonden waren vor Beginn dieser Arbeit durch die Primer Express Software, Version 2.0 (Applied Biosystems) ermittelt worden und werden in Tabelle 3 aufgeführt. Die Herstellung der Primer und Sonden erfolgte durch Applied Biosystems. Der Mastermix setzte sich aus AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, den Desoxyribonukleosidtriphosphaten, einem passiven Standard und optimierten Pufferkomponenten zusammen.

Tabelle 3: Nukleotidsequenzen der Primer und TagMan-Sonden

SNP	Allele	Primer (5'→3')	Sonden (5'→3')
rs445925	C>T	CAGCTTGGGTGACAGAGTGAGA ACCCAGCAACCATCCACAGA	FAM- CAAAG <u>A</u> GCCCCCTTT VIC- ACAAAA <u>A</u> GCCCCCTTT
rs584007	G>A	GGGGACGGATGTAGTGATGGT GCTCTGCGTGTAGTGCCCTTCT	FAM- TCTATCTGCT <u>C</u> TTATTACAC VIC- CTCTATCTGCT <u>T</u> TTATTCA
rs1064725	T>G	GAAGGAGAAACTCAAGATTGACTCATGTC CCCAGAGTAAAGAAGCACTCA	FAM- ACTCCC <u>I</u> CCATGTGG VIC- ACTCCC <u>G</u> CCATGTG
rs4420638	A>G	GTCACACAGCCAGGAAGTAGAGAAC GAGAGAGTGAGTCTGCCTCAAACA	FAM- ACTTTTCCT <u>A</u> GTGTGGTCT VIC- TTTTCCT <u>G</u> GTGTGGTCT

FAM: 6-Methylfluoreszin; VIC: Reporterfarbstoff im Eigentum der Firma Applied Biosystems

Die TaqMan-Methode wurde folgendermaßen umgesetzt: Es wurde eine Lösung der Komponenten von insgesamt 1500 µl hergestellt, die für 100 Bestimmungen ausreicht. Diese enthielt 565 µl H₂O, 850 µl Mastermix (Thermo Fisher Scientific), 25,5 µl „vorwärts“-Primer (Konzentration: 20 µM), 25,5 µl „rückwärts“-Primer (Konzentration: 20 µM), 17 µl Sonde 1 (Konzentration: 10 µM) und 17 µl Sonde 2 (Konzentration: 10 µM). Sonde 1 war mit dem Reporterfarbstoff FAM (6-Methylfluoreszin) und Sonde 2 mit dem Reporterfarbstoff VIC (Reporterfarbstoff im Eigentum der Firma Applied Biosystems) markiert. Nun wurden jeweils 15 µl Lösung in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte der Firma Kisker (Steinfurt) pipettiert. In 90 der 96 Vertiefungen, wurden je 2 µl der DNA von Probanden pipettiert, deren Genotyp bestimmt werden sollte. Jeweils zweimal pro Platte wurden in die Vertiefungen je 2 µl DNA von zwei Probanden gegeben, deren Genotyp zuvor durch Sequenzanalyse ermittelt worden war, wobei einer der beiden homozygot für das häufigere und der andere homozygot für das seltenere Allel war (Standard-DNA). In die verbleibenden beiden Vertiefungen wurden jeweils 2 µl Wasser pipettiert, um ein Maß für die Grundfluoreszenz zu erhalten (Negativkontrollen). Die 96-Loch-Platte wurde mit einer Folie abgedichtet und zehn Sekunden bei 3.000 Umdrehungen pro Minute in einer Zentrifuge, Modell 5430, der Firma Eppendorf (Wesseling-Berzdorf) zentrifugiert, um die gesamte Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu konzentrieren. Die TaqMan-Reaktion wurde in einem 2720 Thermal Cycler oder einem GeneAmp PCR System 9700 von Applied Biosystems durchgeführt. Die Denaturierungsphase bei 95°C betrug 15 Sekunden. Das Programm zur Anlagerung der Primer und Sonden und die nachfolgende DNA-Synthese dauerte eine Minute und wurde bei 60°C durchgeführt. 40 dieser Zyklen erwiesen sich als ausreichend um die erforderliche Signalstärke zu erreichen. Danach wurde die Platte wiederum zehn Sekunden lang bei 3.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, um die Flüssigkeit wiederum am Boden des Gefäßes zu konzentrieren. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte im ABI PRISM 7000 Sequenz Detection System (Applied Biosystems). Dabei wurden die Fluoreszenzfarbstoffe durch eine Lichtquelle via FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) angeregt (Bustin, 2000). Eine Kamera nahm das Fluoreszenzsignal jeder Probe auf. Anschließend wurden alle Signale in einem Diagramm dargestellt. Auf den Achsen des Diagramms befanden sich die beiden unterschiedlichen Fluoreszenzsignale. Dadurch ergaben sich drei klar abtrennbare Punktwolken, bei denen sich entweder einer der beiden homozygoten

oder ein heterozygoter Genotyp unterschieden ließ. Beispielhaft ist die Auswertung anhand von rs445925 in Abbildung 6 dargestellt.

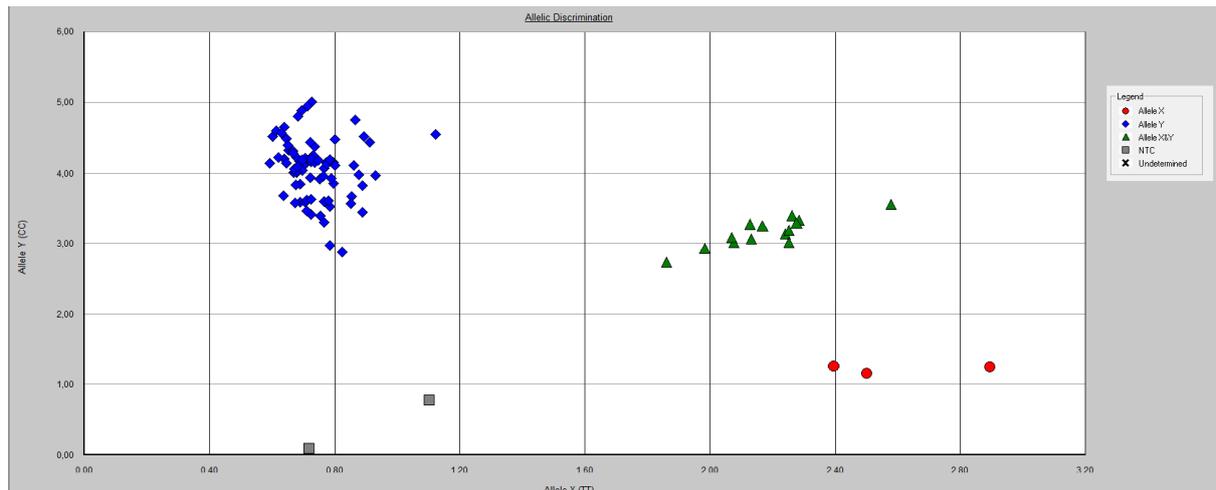


Abbildung 6: Auswertung der Fluoreszenzsignale am Beispiel von rs445925. Die homozygoten Genotypen sind durch blaue Rauten beziehungsweise rote Kreise gekennzeichnet, während ein heterozygoter Genotyp durch ein grünes Dreieck charakterisiert wird. Die grauen Quadrate repräsentieren die beiden Negativkontrollen (NTC: NO Template Control)

Die Auswertung wurde durch den Verfasser dieser Arbeit sowie einen Betreuer dieser Arbeit vorgenommen und erfolgte unabhängig voneinander. Es lag keine Kenntnis über die Zuordnung zu Fall- und Kontrollgruppe vor.

6.5 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden von einem Betreuer dieser Arbeit durchgeführt. Allel- und Haplotyphäufigkeiten werden absolut und prozentual bezogen auf Fall- und Kontrollgruppe angegeben. Sie wurden mittels Chi-Quadratstest verglichen. Das durchschnittliche Alter der Gruppen wurde als Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung angegeben und durch einen t-Test ungepaarter Stichproben verglichen. Um zu prüfen, ob eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) für die Studienpopulation vorliegt, wurde in der Kontrollgruppe die Genotypenverteilung für jeden SNP unter Verwendung eines Signifikanzniveaus von 5 % geprüft. Aus den Ergebnissen der Genotypenverteilung wurden per PHASE-Software (Stephens et al., 2001) die Haplotypen ermittelt, die mit einer Häufigkeit von mindestens einem Prozent auftreten. Mittels logistischer Regression wurden die

Quotenverhältnisse (OR) mit den entsprechenden 95%-Konfidenzintervallen (95%-KI) für jedes häufigere Allel berechnet. Die Wahrscheinlichkeiten der einzelnen Haplotypen, bezogen auf jeden Probanden, wurden in einer logistischen Regression auf eine Assoziation mit dem MI geprüft und die Häufigkeiten der Haplotypen berechnet.

7 Ergebnisse

7.1 Genotypverteilung und Allelrisikobewertung der SNPs

Bei 4.868 Personen, die die gesamte Studienpopulation bildeten, wurde die Genotypverteilung der vier SNPs rs445925 (C>T), rs584007 (G>A), rs1064725 (T>G) und rs4420638 (A>G) bestimmt (Tabelle 4). Bei 20% der Studienteilnehmer wurde von einem Betreuer dieser Arbeit nochmals unabhängig der Genotyp geprüft, wobei kein Widerspruch zwischen Erst- und Zweitbestimmungen auftrat. Nach der finalen Genotypzuordnung erfolgte die Offenlegung von Fall- und Kontrollgruppe (3.657 Fälle, 1.211 Kontrollen). Zur Ermittlung des Risikos wurden zunächst die Allelfrequenzen aus den Genotypverteilungen bestimmt. Für das häufigere Allel wurde jeweils die OR mit zugehörigem 95%-KI berechnet und unter Anwendung eines Signifikanzniveaus von $p < 0,05$ geprüft.

Tabelle 4: Genotypverteilung der SNPs in Fall- und Kontrollgruppe

SNP	Allele	Gruppe	Genotyp NN	Genotyp Nn	Genotyp nn	p_{HWG}^a
rs445925	C>T	Fallgruppe	3004 (82,1)	616 (16,8)	37 (1,0)	0,16
		Kontrollgruppe	953(78,7)	248 (20,5)	10 (0,8)	
rs584007	G>A	Fallgruppe	1473 (40,3)	1677 (45,9)	507 (13,9)	0,89
		Kontrollgruppe	508 (41,9)	551 (45,5)	152 (12,6)	
rs1064725	T>G	Fallgruppe	3262 (89,2)	380 (10,4)	15 (0,4)	0,55
		Kontrollgruppe	1094 (90,3)	113 (9,3)	4 (0,3)	
rs4420638	A>G	Fallgruppe	2465 (67,4)	1080 (29,5)	112 (3,1)	0,17
		Kontrollgruppe	813 (67,1)	367 (30,3)	31 (2,6)	

Die Daten sind absolut und (prozentual) von Fall- und Kontrollgruppe angegeben;

^aAbweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) in der Kontrollgruppe wurden mittels Chi-Quadrat-Test ermittelt; die p-Werte sind aufgeführt; N = häufigeres Allel; n = selteneres Allel

7.1.1 rs445925 (C>T)

Beim Vergleich der Allelfrequenzen zwischen Fall- und Kontrollgruppe ergab sich ein signifikant ($p=0,019$) erhöhter Anteil des C-Allels in der Fallgruppe. Die OR wurde für dieses Allel auf einen Wert von 1,19 (95%-KI: 1,03-1,39) quantifiziert. Damit ist das häufigere Allel von rs445925 signifikant mit dem erhöhten Auftreten eines MI assoziiert (Abbildung 7). Bezüglich des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts lag in der Kontrollgruppe keine signifikante Abweichung vor ($p>0,05$) (Tabelle 4).

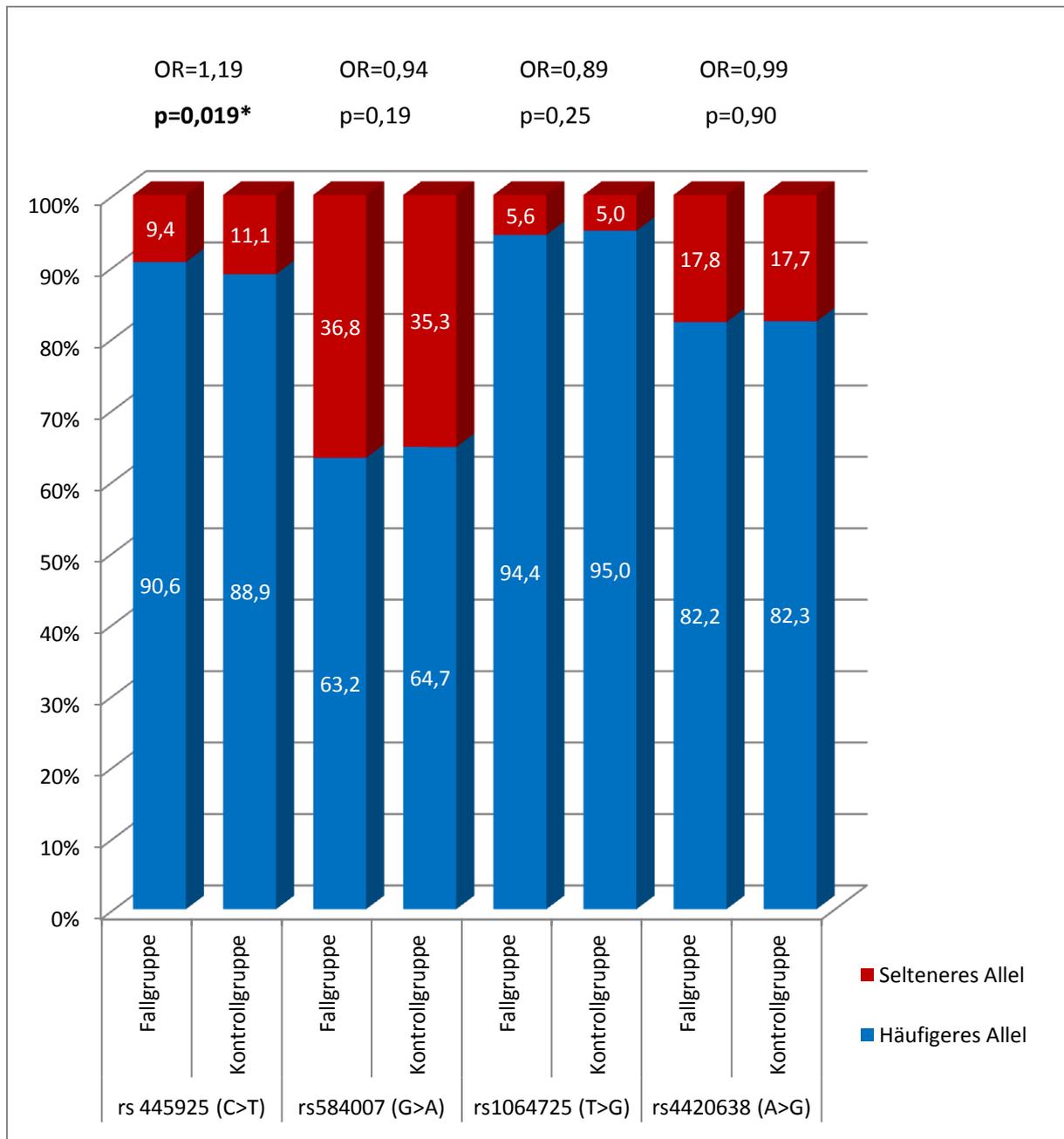


Abbildung 7: Prozentuale Allelverteilung der SNPs in Fall- und Kontrollgruppe; OR für das häufigere Allel angegeben; *signifikanter Unterschied bei rs445925 (das häufigere Allel stellt ein Risikoallel dar)

7.1.2 rs584007 (G>A), rs1064725 (T>G), rs4420638 (A>G)

Beim Vergleich der Allelfrequenzen zwischen Fall- und Kontrollgruppe ergab sich bei den SNPs rs584007 (G>A), rs1064725 (T>G) und rs4420638 (A>G) keine signifikant unterschiedliche Verteilung ($p>0,05$). Damit ist keines der Allele der drei SNPs signifikant mit einem häufigeren Auftreten eines MI assoziiert (Abbildung 7). Bezüglich des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts lag bei diesen drei SNPs keine signifikante Abweichung in der Kontrollgruppe vor ($p>0,05$) (Tabelle 4).

7.2 Haplotypanalyse und Risikoabschätzung

Die Abfolge der SNPs in den Haplotypen orientiert sich an deren Lage im APOE-APOC1-Genbereich (Abbildung 4): rs445925 (C>T), rs584007 (G>A), rs1064725 (T>G), rs4420638 (A>G). Die sechs häufigsten Haplotypen CGTA, CATA, CGTG, TGTA, CAGA und TGTG wiesen eine Frequenz von mehr als einem Prozent in der Versuchspopulation auf. Für jeden Genotyp wurde das Risiko für einen MI mit der Gesamtheit der übrigen Haplotypen verglichen. Das Ergebnis der Haplotypanalyse wird in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Analyse der sechs häufigsten Haplotypen und deren Risikobewertung

Haplotyp	Fallgruppe (7314 Haplotypen)	Kontrollgruppe (2422 Haplotypen)	OR (95%-KI) ^a	p-Wert
CGTA	0,373	0,373	1,00 (0,91-1,10)	0,99
CATA	0,310	0,303	1,04 (0,94-1,14)	0,50
CGTG	0,164	0,163	1,01 (0,89-1,15)	0,86
TGTA	0,083	0,097	0,84 (0,71-0,98)	0,025*
CAGA	0,056	0,050	1,13 (0,91-1,39)	0,26
TGTG	0,012	0,013	0,88 (0,58-1,32)	0,53

^aOR-Wert und 95%-KI für den jeweiligen Haplotyp;

* Signifikanter Haplotyp mit $p<0,05$ im Chi-Quadrat-Test

Die OR der sechs häufigsten Haplotypen mit entsprechendem 95%-KI sind in Abbildung 8 veranschaulicht. Für die Allelkombination TGTA ergab sich eine signifikante Risikoreduktion ($p=0,025$) hinsichtlich eines MI verglichen mit der Summe der anderen Haplotypen. Diese Kombination fand sich bei 8,3 % der Patienten in der Fallgruppe und in 9,7 % der Personen in der Kontrollgruppe. Die OR wurde auf 0,84 berechnet bei einem 95%-KI von 0,71 - 0,98. Dadurch verringert sich für die Allelkonfiguration TGTA das Risiko für das Auftreten eines MI um durchschnittlich 16 %.

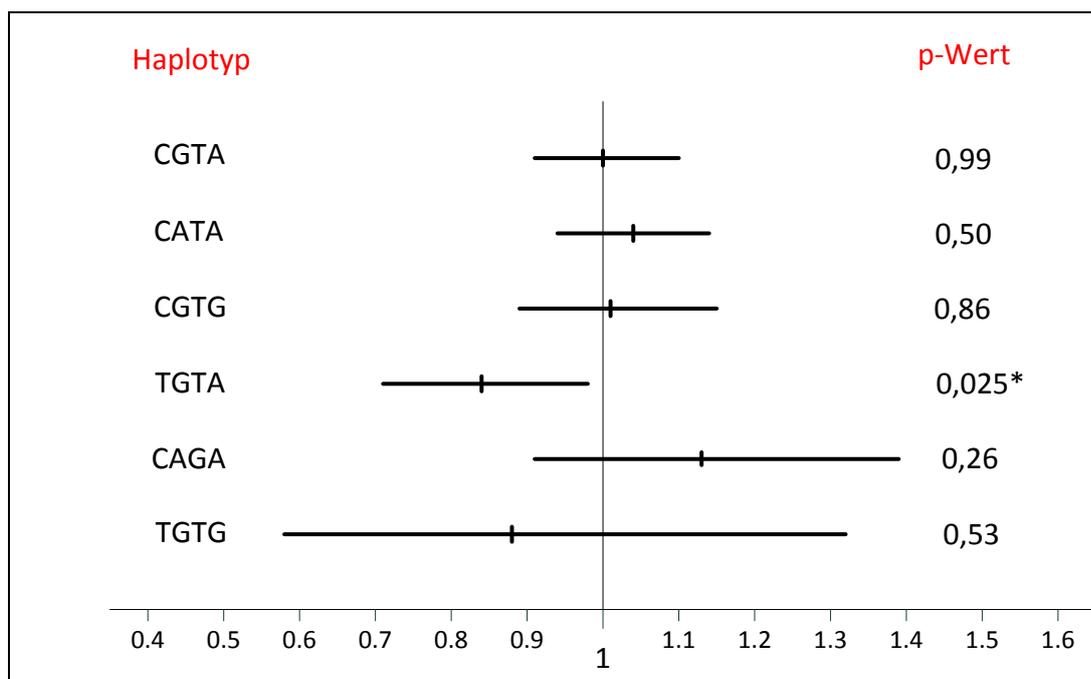


Abbildung 8: OR der einzelnen Haplotypen mit zugehörigen 95%-KI; *Signifikanter Haplotyp mit einem gegenüber der Summe der anderen Haplotypen signifikant niedrigerem MI-Risiko

8 Diskussion

Eine Vielzahl von publizierten Befunden legt nahe, dass die APOE-APOC1-Genregion mit der KHK assoziiert ist (Tabelle 1). Um den Zusammenhang zwischen der genetischen Variabilität dieser Genregion und dem KHK-Risiko im Vergleich zu bisherigen Studien besser abschätzen zu können, wurde neben der einzelnen Analyse von vier SNPs, welche die genetische Varianz der APOE-APOC1-Genregion zu einem Großteil repräsentieren, eine Haplotypanalyse durchgeführt. Die vorliegende Arbeit basiert dabei auf sehr zuverlässigen Daten, da der Arbeit eine relativ große Versuchspopulation von 4.868 Personen zugrunde liegt, wobei bei allen Versuchsteilnehmern der Koronararterienstatus mittels eines Linksherzkatheters untersucht wurde. Während in der Fallgruppe so ein MI bestätigt wurde, bestand die Kontrollgruppe nur aus Personen, die eine höchstens zehnpromtente Verengung der Koronararterien aufwiesen. Somit wurde nicht nur zwischen Personen mit und ohne MI unterschieden, sondern zwischen Personen mit bestätigtem MI und Personen, deren Koronargefäße weitgehend frei von Atherosklerose waren. Dies bedeutet eine genauere Zuordnung. Um eine sichere Allelbestimmung zu gewährleisten, wurden 20% der Proben ein zweites Mal unabhängig untersucht. Dabei gab es keinen Widerspruch zwischen Erst- und Zweitbestimmung.

In einem ersten Schritt wurden die SNPs einzeln auf eine Assoziation mit dem MI untersucht. In der Folge wurde das kombinierte Risiko mittels Haplotypanalyse berechnet. Die vier für die APOE-APOC1-Genregion repräsentativen SNPs waren rs445925 (C>T), rs584007 (G>A), rs1064725 (T>G) und rs4420638 (A>G). Lediglich der SNP rs445925 war mit dem MI-Risiko assoziiert ist. Das häufigere Allel dieses SNP erwies sich als Risikoallel. In der anschließenden Haplotypanalyse, unter Verwendung der vier SNPs, zeigte sich, dass unter den sechs häufigsten Allelkombinationen (Häufigkeit > 1%) ausschließlich der Haplotyp TGTA im Vergleich zur Summe der übrigen Haplotypen eine signifikante Risikoreduktion bezüglich des MI aufweist.

8.1 Vergleich der Haplotypanalyse mit der Untersuchung einzelner SNPs

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Frage zu beantworten, ob eine Haplotypanalyse im Fall der APOE-APOC1-Genregion der Untersuchung einzelner SNPs bezüglich der Assoziation mit dem MI überlegen ist. Dies wäre dann gegeben, wenn sie im Vergleich zur Untersuchung einzelner SNPs einen Informationszuwachs generierte. In der vorliegenden Arbeit war bei der Analyse der sechs häufigsten Haplotypen der vier untersuchten SNPs lediglich die Kombination TGTA im Sinne einer Risikoreduktion signifikant mit einem verringerten MI-Risiko assoziiert. Der p-Wert wurde auf 0,025 berechnet. Die OR ergab einen Wert von 0,84 (95%-KI: 0,71-0,98). An der ersten Stelle dieses Haplotyps befindet sich das seltenere Allel (T) von rs445925, für das in der vorliegenden Arbeit ein protektiver Effekt bezüglich des MI-Risikos nachgewiesen wurde. Es ist daher anzunehmen, dass auch der Haupteffekt dieses Haplotyps von rs445925 ausgeht. Dies bedeutet jedoch nicht, dass rs445925, oder nur rs445925, die Grundlage für die Assoziation des Genlocus mit der KHK ist, da dieser SNP in der vorliegenden Haplotypanalyse lediglich als Stellvertreter für alle mit ihm gekoppelten SNPs ($r^2 \geq 0,8$) steht. Somit könnte der Haupteffekt der Assoziation der APOE-APOC1-Genregion mit der KHK auch von einem oder mehreren Stellvertretern von rs445925 ausgehen. Interessant wäre es in einer weiteren Untersuchung zu prüfen, ob der Haplotyp GTA ohne das T-Allel von TGTA auch einen protektiven Effekt bezogen auf das MI-Risiko aufweist; dies wäre insofern denkbar, da der häufigste Haplotyp CGTA auch GTA enthält und den Risikoeffekt des C-Allels von rs445925 neutralisiert. Der sechsthäufigste Haplotyp TGTG enthält wie der Risikohaplotyp TGTA das seltenere Allel von rs445925. Die OR von 0,88 deutet auch für diesen Haplotyp einen protektiven Effekt bezüglich des MI an, allerdings kommt er zu selten vor (1,2-1,3%) um in einer Studienpopulation wie in der der vorliegenden Arbeit statistische Signifikanz zu erlangen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Haplotypanalyse der Untersuchung mit einzelnen SNPs im Fall der APOE-APOC1-Genregion nicht überlegen ist. Ein Grund dafür ist, dass in der vorliegenden Arbeit kein nennenswerter Wissenszuwachs über den der klassischen Untersuchung einzelner SNPs hinaus entstand.

8.2 Gegenüberstellung der Ergebnisse dieser Arbeit und der aktuellen Studienlage

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit mit Studien in Beziehung gesetzt, die dieselben SNPs wie in der vorliegenden Arbeit auf eine Assoziation mit dem kardiovaskulären Risiko untersuchten. Zuerst folgen Studiendaten, welche die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich des Verhältnisses zwischen den SNPs und dem KHK-Risiko bekräftigen. Anschließend werden Publikationen angeführt, bei denen sich beim Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit widersprüchliche Aussagen bezüglich der SNPs und dem KHK-Risiko ergeben. Zuletzt werden Studien diskutiert, die die SNPs hinsichtlich der Assoziation mit Biomarkern analysierten, welche für die Atherosklerose bedeutsamen sind.

8.2.1 Studien mit zu der vorliegenden Arbeit konkordanten Ergebnissen

Bis et al. (2011) untersuchten in einer Metaanalyse genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) mit insgesamt 31.211 Teilnehmern europäischer Abstammung und einer anschließenden Studie mit 11.273 Teilnehmern europäischer Abstammung die Assoziation genetischer Varianten mit der KHK und der Intima-Media-Dicke der Karotiden bzw. dem Auftreten von Plaque in den Karotiden (*Meta-analysis of genome-wide association studies from the CHARGE consortium identifies common variants associated with carotid intima media thickness and plaque*). Für das häufigere Allel von rs445925 deutete sich in dieser Studie bei einem p-Wert von 0,02 und einer OR von 1,11 (95%-KI: 1,02-1,20) eine Assoziation mit einem erhöhten KHK-Risiko an. Außerdem war das seltenere Allel von rs445925 signifikant ($p=1,7 \times 10^{-8}$) mit einer geringeren Intima-Media-Dicke der Karotiden assoziiert. Dieser Befund ist einerseits wichtig, da ein klarer Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Atherosklerose in den Karotiden und den Koronararterien besteht (Lorenz et al., 2007). Andererseits wird das häufigere Allel von rs445925 nicht nur im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit erstmalig als Risikoallel für die KHK bestätigt, sondern es deutet für diesen SNP, aufgrund der Assoziation mit einer zunehmenden Intima-Media-Dicke der Karotiden, eine generelle Bewandnis in der Pathogenese der Atherosklerose an. Die Studienergebnisse werden allerdings dadurch limitiert, dass kein einheitliches Ultraschallprotokoll in den beteiligten Teilstudien der Metaanalyse von Bis et al. (2011) verwendet wurde. So war eine

atherosklerotische Plaque in den meisten Teilstudien als jedwedes Plaque-Vorkommen definiert, während in einigen eine mehr als 25-prozentige Stenosierung vorliegen musste. Zusätzlich wurde in nur wenigen Teilstudien die maximale innere Intima-Media-Dicke der A. carotis gemessen, die im Vergleich mit der durchschnittlichen Intima-Media-Dicke eine bessere Risikoklassifikation bezüglich kardiovaskulärer Krankheiten zulässt (Polak et al., 2011). Die Daten von Bis et al. (2011) lassen sich aufgrund dieser Tatsachen nur bedingt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Beziehung setzen.

Shiffman et al. (2008) testeten 17.576 SNPs in drei aufeinander folgenden Fall-Kontrollstudien bei Populationen europäischen Ursprungs auf eine Assoziation mit dem MI (*Analysis of 17,576 potentially functional SNPs in three case-control studies of myocardial infarction*). Die erste Versuchspopulation enthielt 762 Fälle und 857 Kontrollen, die zweite 579 Fälle und 1.159 Kontrollen und die dritte 475 Fälle und 619 Kontrollen. Alle SNPs, für die sich in der ersten Studie eine Assoziation mit dem MI ergeben hatte, wurden in der zweiten Studie getestet; alle SNPs, die auch dort eine Assoziation mit dem MI aufwiesen, wurden wiederum in der dritten Studie untersucht. In der Studie von Shiffman et al. (2008) wurde unter anderem auch rs439401 verwendet, der zu 100% mit rs584007 korreliert und der stattdessen in der vorliegenden Arbeit getestet wurde. Das seltenere Allel von rs439401 war in den ersten beiden Fall-Kontrollstudien signifikant ($p=0,03$; $p=0,01$) mit einem erhöhten Auftreten des MI assoziiert. In der dritten Fall-Kontrollgruppe war keine Assoziation nachweisbar. Zwar wurde in den beiden präliminären Studien jeweils ein anderes Ergebnis erzielt als in der vorliegenden Arbeit, jedoch stimmt das Ergebnis der entscheidenden dritten Studie mit dem der vorliegenden Arbeit überein.

Teslovich et al. (2010) suchten in einer großen Metaanalyse mit mehr als 100.000 beteiligten Personen europäischer Herkunft nach SNPs, die mit veränderten Plasmalipidkonzentrationen und der KHK assoziiert sind (*Biological, clinical, and population relevance of 95 loci for blood lipids*). Die so evaluierten SNPs wurden anschließend auch in drei weiteren Versuchspopulationen getestet: einer ostasiatischen Population mit mehr als 15.000 Beteiligten, einer südasiatischen Population mit mehr als 9.000 Beteiligten und einer afroamerikanischen Population mit mehr als 8.000 Studienteilnehmern. In der Versuchspopulation mit europäischer Abstammung waren 24.607 Personen mit KHK und 66.197 ohne KHK enthalten. Anhand dieser Versuchsgruppe wurde getestet, ob die SNPs, die mit veränderten

Plasmalipidkonzentrationen assoziiert waren, auch mit der KHK in Zusammenhang standen. Dabei wurde rs439401 bezüglich der genannten Assoziationen evaluiert. rs439401 steht im kompletten Kopplungsungleichgewicht mit dem in der vorliegenden Arbeit stattdessen verwendeten rs584007; beide befinden sich im intergenen Raum zwischen dem APOE- und dem APOC1-Gen. Für rs439401 lag in der Studie von Teslovich et al. (2010) keine Assoziation mit einem veränderten KHK-Risiko vor. Damit verhält sich das Ergebnis in der Studie von Teslovich et al. (2010) konkordant zu dem bezüglich rs584007 in der vorliegenden Arbeit. Auch hier bestand keine Assoziation mit einem erhöhten MI-Risiko.

8.2.2 Studien mit zu der vorliegenden Arbeit diskordanten Ergebnissen

Willer et al. (2008) suchten in einer Metaanalyse dreier GWAS mit insgesamt 8.816 Versuchsteilnehmern europäischer Abstammung und einer Folgestudie mit 11.569 Probanden europäischer Abstammung nach genetische Varianten, die einen Einfluss auf das KHK-Risiko sowie die Fettzusammensetzung im Blut haben (*Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease*). Das seltenere Allel von rs4420638 war in dieser Studie signifikant ($p=1,0 \times 10^{-4}$) mit einem gesteigerten Risiko für die KHK verknüpft. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, bei denen sich keine Assoziation von rs4420638 mit einem erhöhten MI-Risiko ergab.

Elliott et al. (2009) forschten in einer GWAS mit 17.967 Probanden und einer Replikationsstudie mit 14.747 Versuchsteilnehmern, die bis auf einen geringen Anteil an Personen indischer Abstammung überwiegend europäischer Herkunft waren, nach genetischen Varianten, die mit erhöhten Werten an C-reaktivem Protein (CRP) im Blutplasma assoziiert sind. In einem zweiten Schritt testeten sie in einer Metaanalyse mit 14.365 Personen mit KHK in der Fallgruppe und 32.069 Personen in der Kontrollgruppe, ob die so evaluierten SNPs eine Assoziation mit der KHK aufweisen. Den Versuchspopulationen lag dabei keine homogene Abstammung zugrunde (*Genetic loci influencing C-reactive protein levels and risk of coronary heart disease*). Das seltenere Allel von rs4420638 war in dieser Studie mit einem erhöhten KHK-Risiko assoziiert. Eine solche Assoziation wurde in der vorliegenden Arbeit für den MI nicht nachgewiesen. Daher stehen die Ergebnisse von Elliott et al. (2009) im Widerspruch zu denen der vorliegenden Arbeit.

In der bereits erwähnten Studie von Teslovich et al. (2010) (Biological, clinical, and population relevance of 95 loci for blood lipids) wurde rs4420638 wiederum auf eine Assoziation mit der KHK untersucht. Das seltenere Allel von rs4420638 war dabei signifikant ($p < 0,001$) mit einem höheren KHK-Risiko assoziiert. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da in letzterer kein Zusammenhang von rs4420638 mit einem erhöhten KHK-Risiko bestand.

Waterworth et al. (2010) forschten in einer Metaanalyse von acht GWAS mit insgesamt 17.723 Teilnehmern europäischer Abstammung nach genetischen Varianten, die mit den Plasmalipidkonzentrationen assoziiert waren (*Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease*). Die auf diese Weise evaluierten SNPs wurden in einer Replikationsstudie mit 37.774 Personen europäischer Abstammung und in einer Population 9.665 Beteiligter indischer Abstammung getestet. In einer Metaanalyse von neun Fall-Kontrollstudien zur KHK mit 9.633 Fällen und 38.684 Kontrollen europäischer Abstammung analysierten Waterworth et al. die mit den Plasmalipidkonzentrationen assoziierten SNPs auf einen Zusammenhang mit der KHK. Das seltenere Allel von rs4420638 war in dieser Metaanalyse signifikant ($p = 1,5 \times 10^{-6}$) mit einem erhöhten KHK-Risiko assoziiert. Auch viele weitere SNPs in für die Atherosklerose relevanten Genregionen waren in dieser Studie mit einem erhöhten KHK-Risiko assoziiert. Beispielhaft seien hier rs515135 auf Chromosom 2 an Position 21.2 in der Nähe des APOB-Gens und rs9989419 auf Chromosom 16 an Position 55.5 in der Nähe des CETP-Gens genannt. Die einzelnen Studienergebnisse bezüglich dieser Assoziation waren bei rs4420638 allerdings sehr unterschiedlich, was sich in einem signifikanten p-Wert von 0,02 für die Heterogenität niederschlug. Zusätzlich gab es in den einzelnen Studien Unterschiede bei der Definition der KHK. Daher lässt sich die Verknüpfung des selteneren Allels von rs4420638 mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko nur unter Vorbehalt herstellen. Die Studienergebnisse von Waterworth et al. (2010) widersprechen den Resultaten der vorliegenden Arbeit, da in dieser keine Assoziation von rs4420638 mit einem veränderten KHK-Risiko vorlag.

Kathiresan et al. (2008) analysierten bei 5.414 Teilnehmern europäischer Abstammung der Malmö Diet and Cancer Study SNPs in 9 Genregionen auf eine Assoziation mit veränderten HDL- und LDL-Werten und versuchten durch die kombinierte Analyse verschiedener Genotypen eine bessere Risikoeinschätzung bezüglich der KHK zu erstellen (*Polymorphisms associated with cholesterol and risk*

of cardiovascular events). Dazu wurden aus der Versuchspopulation 4.232 Personen ausgewählt, für die die Konzentrationen der einzelnen Blutfette vorlagen und die bisher keinen MI oder Schlaganfall erlitten hatten. Nach einer medianen Nachbeobachtung von 10,6 Jahren wurde für 238 Personen dieser Versuchspopulation ein „kardiovaskuläres Ereignis“ angegeben. Als „kardiovaskuläres Ereignis“ zählten hier ein überlebter MI, ein ischämischer Schlaganfall und Tod aufgrund einer KHK. Die so gewonnenen Daten wurden mit der Kombination der Allele der SNPs, für die eine Assoziation mit erhöhten LDL- oder erniedrigten HDL- nachgewiesen wurde, in Beziehung gesetzt. Der Zweck war dabei zu einer besseren Risikovorhersage für das „erste kardiovaskulären Ereignis“ zu gelangen. Insgesamt waren die Risikoallele von neun SNPs in der Abschätzung des kardiovaskulären Risikos enthalten, darunter neben dem selteneren Allel von rs4420638 auch beispielsweise die Risikoallele von rs693 im kodierenden Bereich des APOB-Gens und rs688 im kodierenden Bereich des LDL-Rezeptor-Gens. Die Analyse dieser Allelkombinationen zeigte eine Risikovorhersage für das „erste kardiovaskuläre Ereignis“, die über die Vorhersage anhand der Anfangswerte der Blutfette und bekannter Risikofaktoren hinaus ging. Die Assoziation der Allelkombinationen mit dem „ersten kardiovaskulären Ereignis“ legt für das seltene Allel von rs4420638 eine Assoziation mit einem erhöhten KHK-Risiko nahe, auch wenn durch den berechneten Effekt der Allelkombinationen nicht auf die einzelnen SNPs geschlossen werden kann. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache widersprechen die Ergebnisse von Kathiresan et al. (2008) denen der vorliegenden Arbeit, in der keine Assoziation von rs4420638 mit einem erhöhten KHK-Risiko bestand.

Grallert et al. (2012) eruierten in einer Metaanalyse von fünf GWAS mit insgesamt 13.664 Probanden europäischer und US-amerikanischer Abstammung einen möglichen Zusammenhang zwischen genetischen Varianten und der Masse und Aktivität der Lp-PLA2 (*Eight genetic loci associated with variation in lipoprotein-associated phospholipase A2 mass and activity and coronary heart disease: meta-analysis of genome-wide association studies from five community-based studies*). SNPs, für die sich eine solche Assoziation nachweisen ließ, wurden in einer weiteren Metaanalyse mit mehr als 22.000 Personen mit KHK und/oder MI (Fallgruppe) und mehr als 60.000 Personen in der Kontrollgruppe auf einen Zusammenhang mit der KHK bzw. dem MI untersucht. Grundlage dieser Herangehensweise sind Studien, die

zeigten, dass erhöhte Masse und Aktivität von Lp-PLA2 Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose bzw. der KHK sind (The Lp-PLA2 Studies Collaboration, 2010). Das häufigere Allel von rs4420638 war in der Studie von Grallert et al. (2012) mit einem geringeren Risiko für die KHK bzw. den MI assoziiert. Limitiert wird diese Aussage jedoch dadurch, dass in den Versuch hauptsächlich symptomatische KHK-Patienten gingen und nicht-symptomatische Personen mit KHK eventuell falsch klassifiziert wurden (Grallert et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit bestand im Gegensatz zur Studie von Grallert et al. (2012) keine Assoziation von rs4420638 mit einem erhöhten MI-Risiko.

8.2.3 Beziehung zwischen Studien zu Biomarkern und den Ergebnissen dieser Arbeit

In einer GWAS mit 5.244 Teilnehmern europäischer Herkunft wurde von Trompet et al. (2011) unter 55.7192 SNPs nach genetischen Varianten geforscht, die mit veränderten LDL-Werten im Zusammenhang stehen (*Replication of LDL GWAs hits in PROSPER/PHASE as validation for future (pharmaco)genetic analyses*). Das häufigere Allel von rs445925 war in dieser Studie bei einem p-Wert von $2,8 \times 10^{-30}$ signifikant mit erhöhten LDL-Werten vergesellschaftet. Erhöhte LDL-Werte stellen einen zentralen Risikofaktor für die Entstehung einer KHK dar (Herold, 2012). Somit ist das häufigere Allel von rs445925 nach der Studie von Trompet et al. (2011) mit einem Risikofaktor der KHK assoziiert. Dies weist in die gleiche Richtung wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, in der das häufigere Allel von rs445925 mit einem erhöhten Risiko für einen MI assoziiert ist.

Ähnliche Resultate ergaben sich bei Smith et al. (2010) bei der kombinierten Analyse zweier GWAS: der Bogalusa Heart Study (Louisiana, USA) mit 525 Teilnehmern europäischer Abstammung und der Young Finns Study mit 2.442 Personen finnischer Abstammung. Zuerst wurde in der Bogalusa Heart Study nach SNPs gesucht, die mit Risikofaktoren der KHK assoziiert sind. Die Young Finns Study hatte den Zweck, diese Assoziationen zu replizieren. (*Longitudinal Genome-Wide Association of Cardiovascular Disease Risk Factors in the Bogalusa Heart Study*). In der Bogalusa Heart Study war rs445925 nicht enthalten. Dort wurde anstatt dieses SNP rs7412 verwendet. Für das seltene Allel von rs7412 ergab sich eine Assoziation mit verringerten LDL-Werten. Bei der Auswertung der Young Finns Study war das häufigere Allel von rs445925 signifikant ($p=4,1 \times 10^{-15}$) mit erhöhten LDL-Werten assoziiert. rs445925 diente in der Young Finns Study als Stellvertreter für

rs7412. Da rs445925 und rs7412 nicht in einem starken Kopplungsungleichgewicht stehen ($r^2=0,76$), stellt dies den Ansatz einer Replikationsstudie jedoch in Frage. Isoliert betrachtet wird in der Young Finns Study für das häufigere Allel von rs445925, aufgrund der Assoziation mit erhöhten LDL-Werten, allerdings eine Assoziation mit einem Risikofaktor der KHK postuliert. Dies unterstreicht die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, bei der das häufigere Allel von rs445925 mit einem Endpunkt der KHK, dem MI, assoziiert ist.

In der bereits diskutierten Metaanalyse dreier GWAS von Willer et al. (2008) wurde der Zusammenhang von genetischen Varianten mit der Fettzusammensetzung im Blut untersucht. In der ersten Studienpopulation stellte sich bei einem p-Wert von $3,2 \times 10^{-21}$ eine signifikante LDL-Zunahme für das seltenere Allel von rs4420638 heraus. Bei der kombinierten Analyse mit der zweiten Studienpopulation war das seltenere Allel von rs4420638 wiederum signifikant ($p=3,0 \times 10^{-43}$) mit einem erhöhten LDL-Spiegel assoziiert. Da das seltenere Allel von rs4420638 in dieser Studie sowohl mit einer erhöhten LDL-Konzentration im Blut als auch mit einem erhöhten KHK-Risiko assoziiert ist, unterstreicht dies den etablierten Befund, dass erhöhte LDL-Werte einen Risikofaktor der KHK darstellen. In der vorliegenden Arbeit stellte sich für rs4420638 jedoch kein verändertes KHK-Risiko heraus.

Auch beim Vergleich der bereits vorgestellten Metaanalyse von Teslovich et al. (2010) mit der vorliegenden Arbeit weisen die Ergebnisse nicht in die gleiche Richtung: Das seltenere Allel von rs4420638 ist in der Studie von Teslovich et al. (2010) signifikant ($p=9 \times 10^{-147}$) mit erhöhten LDL-Werten in allen untersuchten Versuchspopulationen (europäisch, ost- und südasiatisch) assoziiert. Da erhöhte LDL-Werte im Blutplasma ein etablierter Risikofaktor der KHK sind, ist eine Assoziation mit einem erhöhten KHK-Risiko für das seltenere Allel von rs4420638 theoretisch naheliegend. Eine solche Assoziation wurde von Teslovich et al. (2010) angegeben. In der vorliegenden Arbeit war rs4420638 jedoch nicht mit einem veränderten KHK-Risiko verknüpft. Ferner wurde in der Studie von Teslovich et al. (2010) für das seltenere Allel von rs439401 eine signifikante ($p=1 \times 10^{-30}$) Assoziation mit einer verringerten Konzentration an Triglyceriden festgestellt. Diese Assoziation war neben der primären Metaanalyse auch in einer europäischen, ost- und südasiatischen Population nachweisbar. Aufgrund der kompletten Korrelation von rs439401 mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten rs584007 und der Tatsache, dass erhöhte Triglycerid-Werte im Blutplasma einen Risikofaktor der KHK

darstellen, würde bei der gedanklichen Verknüpfung dieser Resultate ein bezüglich der KHK protektiver Effekt des selteneren Allels von rs584007 naheliegen. Ein solcher Effekt geht aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht hervor. In der Studie von Waterworth et al. (2010) (*Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease*) war das seltenere Allel von rs4420638 in der ersten Phase der Arbeit mit einer verringerten HDL-Konzentration ($p=2,0 \times 10^{-7}$), erhöhten Triglycerid-Konzentration ($p=5,5 \times 10^{-7}$) und erhöhten LDL-Konzentration ($p=1,7 \times 10^{-40}$) im Sinne einer atherogenen Dyslipidämie vergesellschaftet. Allerdings waren diese Ergebnisse in keiner der Replikationsstudien wiederholbar. Daher weisen die Ergebnisse von Waterworth et al. (2010) aufgrund des Fehlens einer Assoziation von rs4420638 mit einer atherogenen Dyslipidämie größtenteils in die gleiche Richtung wie die Resultate der vorliegenden Arbeit: auch hier war keine Assoziation zwischen rs4420638 und einem erhöhten MI-Risiko feststellbar.

In der bereits erwähnten Studie von Kathiresan et al., (2008) (*Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events*) ergaben sich für die Genotypen AA, AG, GG von rs4420638 beinahe linear ansteigende LDL-Werte. Kathiresan et al. wiesen jedoch darauf hin, dass zwischen den Cholesterinwerten und dem kardiovaskulären Risiko nicht zwangsläufig eine lineare Beziehung vorausgesetzt werden kann, auch wenn die Entwicklung der LDL-Konzentrationen eine solche Vermutung suggeriert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen diese Feststellung, da hier kein Zusammenhang zwischen rs4420638 und einem erhöhten MI-Risiko bestand.

In einer weiteren GWAS mit 19.840 Teilnehmern europäischer Abstammung und einer Replikationsstudie mit 20.623 Probanden europäischer Abstammung suchten Kathiresan et al. (2009) nach SNPs, die mit veränderten Lipidfraktionen im Blut assoziiert waren (*Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia*). Auch in dieser Arbeit war das seltenere Allel von rs4420638 bei einem p-Wert von 4×10^{-27} mit erhöhten LDL-Werten assoziiert. Da in beiden Studien von Kathiresan et al. das seltenere Allel von rs4420638 mit einer erhöhten LDL-Konzentration assoziiert war, die wiederum einen Risikofaktor der KHK darstellt, weisen die Resultate von Kathiresan et al. nicht in die gleiche Richtung wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit; hier war keine Assoziation zwischen rs4420638 und einem veränderten MI-Risiko nachweisbar.

Aulchenko et al. (2008) untersuchten in einer GWAS mit 16 beteiligten Populationen europäischer Abstammung einen möglichen Zusammenhang zwischen genetischen Varianten und den Konzentrationen von Gesamtcholesterin, LDL, HDL und Triglyceriden (*Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts*). Die Studienteilnehmerzahl variierte abhängig von der jeweils zu messenden Lipidfraktion zwischen 17.797 und 22.562. Für das häufigere Allel von rs439401 wurde ein signifikanter Zusammenhang hinsichtlich eines erhöhten Gesamtcholesterins ($p=3,7 \times 10^{-4}$), erhöhten LDL-Werten ($p=1,1 \times 10^{-2}$), erhöhten Triglycerid-Werten ($p=1,8 \times 10^{-9}$) und verringerten HDL-Werten ($p=2,7 \times 10^{-3}$) ermittelt. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist das häufigere Allel von rs439401 mit einer atherogenen Dyslipidämie assoziiert. Dadurch wäre für dieses Allel theoretisch auch ein erhöhtes KHK-Risiko denkbar, welches in der vorliegenden Arbeit für den Stellvertreter rs584007, der mit rs439401 zu 100% korreliert, nicht bestand.

8.2.4 Bisher keine Studien zu rs1064725

Der SNP rs1064725 wurde bisher nicht im Zusammenhang mit kardiovaskulären Krankheiten oder deren Risikofaktoren untersucht. Es ergab sich in der vorliegenden Arbeit für diesen SNP keine statistisch signifikante Risikoassoziation mit dem MI.

9 Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund der Bedeutung der APOE-APOC1-Genregion für das KHK-Risiko und diesbezüglich uneinheitlicher Studienergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit die genetische Variabilität der APOE-APOC1-Genregion systematisch auf eine Assoziation mit dem MI untersucht. Ziel war es festzustellen, ob eine Haplotypanalyse auf der Basis von repräsentativen SNPs der Analyse mittels einzelner SNPs überlegen ist. Dazu wurde zuerst auf der Basis von HapMap-Daten nach SNPs gesucht, die die genetische Variabilität der APOE-APOC1-Genregion zum Großteil widerspiegeln, wobei sich die folgenden vier SNPs ergaben: rs445925 (C>T), rs584007 (G>A), rs1064725 (T>G), rs4420638 (A>G). Für diese SNPs wurde anschließend die Genotypverteilung und die Allelhäufigkeiten mittels TaqMan-Methode bei insgesamt 4.868 Personen ermittelt, wobei die Fallgruppe von 3.657 Patienten mit gesichertem MI gebildet wurde und sich die Kontrollgruppe aus 1.211 Personen mit normalem koronarangiographischen Befund zusammensetzte. Beim Vergleich der Allel- und Genotypverteilung zwischen den Versuchspopulationen ergab sich ausschließlich für rs445925 eine Assoziation mit einem veränderten MI-Risiko. Das häufigere Allel stellte sich als Risikoallel für einen MI heraus. Keiner der anderen SNPs war statistisch signifikant mit dem MI-Risiko assoziiert. Bei der Verteilung der Genotypen lag keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vor. Um eine Haplotypanalyse auf der Basis der vier untersuchten SNPs durchzuführen, wurden alle Haplotypen bestimmt, die mit einer Häufigkeit von mehr als einem Prozent in der Bevölkerung vorkommen. Die sechs so ermittelten Haplotypen wurden anschließend auf eine Assoziation mit dem MI getestet, wobei sich ausschließlich für die Allelkombination TGTA eine statistisch signifikante Risikoreduktion hinsichtlich eines MI zeigte. Es stellte sich heraus, dass eine Haplotypanalyse gegenüber der klassischen Untersuchung einzelner SNPs für die APOE-APOC1-Genregion keine Überlegenheit bezüglich der Einschätzung des kardiovaskulären Risikos besitzt.

Bei dem Vergleich von Ergebnissen anderer Studien mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit wurde eine Übereinstimmung bezüglich rs445925 deutlich. Auch eine andere Studie postuliert für das häufigere Allel dieses SNP ein erhöhtes KHK-Risiko. Für den zu 100 Prozent korrelierenden Stellvertreter rs439401 von rs584007, der in der vorliegenden Arbeit analysiert wurde, existieren ebenfalls Ergebnisse, die

keine Assoziation zu einem veränderten KHK-Risiko nachweisen. Dagegen herrschen bezüglich rs4420638 Widersprüche bei dem Vergleich mit anderen Studien, da mehrere Studien im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit eine Assoziation dieses SNP mit einem veränderten KHK-Risiko beschreiben.

Zudem weisen einige Studien zur Assoziation von Biomarkern mit den hier untersuchten SNPs in die gleiche Richtung wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. So war das häufigere Allel von rs445925 beispielsweise in mehreren Studien mit erhöhten LDL-Konzentrationen im Blut, einem Risikofaktor der KHK, assoziiert. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da hier das häufigere Allel von rs445925 mit einem erhöhten MI-Risiko assoziiert war.

Ein besseres Verständnis der KHK durch das Erforschen von genetischen Risikovarianten kann in der Zukunft zu einer genaueren Risikostratifizierung für Personen beitragen, die noch nicht an einer KHK erkrankt sind. Das Wissen um ein erhöhtes KHK-Risiko ermöglicht frühzeitige präventive Maßnahmen, wie eine Änderung des Lebensstils oder den präventiven Einsatz von Medikamenten.

10 Literaturverzeichnis

- Allan, C.M., Taylor, S., Taylor, J.M., 1997. Two hepatic enhancers, HCR.1 and HCR.2, coordinate the liver expression of the entire human Apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster. *Journal of Biological Chemistry* 272, 29113–29119.
- Altman, R., 2003. Risk factors in coronary atherosclerosis athero-inflammation: the meeting point. *Thrombosis Journal* 1.
- Aulchenko, Y.S., Ripatti, S., Lindqvist, I., Boomsma, D., Heid, I.M., Pramstaller, P.P., Penninx, Brenda W J H, Janssens, A Cecile J W, Wilson, J.F., Spector, T., Martin, N.G., Pedersen, N.L., Kyvik, K.O., Kaprio, J., Hofman, A., Freimer, N.B., Jarvelin, M.-R., Gyllenstein, U., Campbell, H., Rudan, I., Johansson, Å., Marroni, F., Hayward, C., Vitart, V., Jonasson, I., Pattaro, C., Wright, A., Hastie, N., Pichler, I., Hicks, A.A., Falchi, M., Willemsen, G., Hottenga, J.-J., de Geus, Eco J C, Montgomery, G.W., Whitfield, J., Magnusson, P., Saharinen, J., Perola, M., Silander, K., Isaacs, A., Sijbrands, Eric J G, Uitterlinden, A.G., Witteman, Jacqueline C M, Oostra, B.A., Elliott, P., Ruukonen, A., Sabatti, C., Gieger, C., Meitinger, T., Kronenberg, F., Döring, A., Wichmann, H.-E., Smit, J.H., McCarthy, M.I., van Duijn, Cornelia M, Peltonen, L., 2008. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nature Genetics* 41, 47–55.
- Baggio, G., Manzato, E., Gabelli, C., Fellin, R., Martini, S., Enzi, G.B., Verlato, F., Baiocchi, M.R., Sprecher, D.L., Kashyap, M.L., Brewer, H. B. [JR.], Crepaldi, G., 1986. Apolipoprotein C-II deficiency syndrome. Clinical features, lipoprotein characterization, lipase activity, and correction of hypertriglyceridemia after Apolipoprotein C-II administration in two affected patients. *The Journal of Clinical Investigation* 77, 520–527.
- Bennet, A.M., Di Angelantonio, E., Ye, Z., Wensley, F., Dahlin, A., Ahlbom, A., Keavney, B., Collins, R., Wiman, B., Faire, U. de, Danesh, J., 2007. Association of Apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *Journal of the American Medical Association* 298, 1300–1311.
- Bennet, A.M., Reynolds C. A., Gatz M., Blennow K., Pedersen N. L., Prince J. A., 2010. Pleiotropy in the presence of allelic heterogeneity: alternative genetic models for the influence of APOE on serum LDL, CSF Aβ42, and Dementia. *Journal of Alzheimer's Disease* 22, 129–134.
- Bis, J.C., Kavousi, M., Franceschini, N., Isaacs, A., Abecasis, G.R., Schminke, U., Post, W.S., Smith, A.V., Cupples, L.A., Markus, H.S., Schmidt, R., Huffman, J.E., Lehtimäki, T., Baumert, J., Münzel, T., Heckbert, S.R., Dehghan, A., North, K., Oostra, B., Bevan, S., Stoegerer, E.-M., Hayward, C., Raitakari, O., Meisinger, C., Schillert, A., Sanna, S., Völzke, H., Cheng, Y.-C., Thorsson, B., Fox, C.S., Rice, K., Rivadeneira, F., Nambi, V., Halperin, E., Petrovic, K.E., Peltonen, L., Wichmann, H.E., Schnabel, R.B., Dörr, M., Parsa, A., Aspelund, T., Demissie, S., Kathiresan, S., Reilly, M.P., Taylor, K., Uitterlinden, A., Couper, D.J., Sitzer, M., Kähönen, M., Illig, T., Wild, P.S., Orru, M., Lüdemann, J., Shuldiner, A.R., Eiriksdottir, G., White, C.C., Rotter, J.I., Hofman, A., Seissler, J., Zeller, T., Usala, G., Ernst, F., Launer, L.J., D'Agostino, R.B., O'Leary, D.H., Ballantyne, C., Thiery, J., Ziegler, A., Lakatta, E.G., Chilukoti, R.K., Harris, T.B., Wolf, P.A., Psaty, B.M., Polak, J.F., Li, X., Rathmann, W., Uda, M., Boerwinkle, E., Klopp, N., Schmidt, H., Wilson, J.F., Viikari, J., Koenig, W., Blankenberg, S., Newman, A.B., Witteman, J., Heiss, G., van Duijn, C., Scuteri, A., Homuth, G., Mitchell, B.D., Gudnason, V., O'Donnell, C.J., 2011. Meta-analysis of genome-wide association studies from the CHARGE consortium identifies common variants associated with carotid intima media thickness and plaque. *Nature Genetics* 43, 940–947.
- Blankenhorn, D., Hodis, H., 1993. Atherosclerosis-reversal with therapy. *The Western Journal Of Medicine* 159, 172–179.
- Bondarenko, P.V., Cockrill, S.L., Watkins, L.K., Cruzado, I.D., Macfarlane, R.D., 1999. Mass spectral study of polymorphism of the apolipoproteins of very low density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 543–555.
- Braun, T.R., Been, L.F., Singhal, A., Worsham, J., Ralhan, S., Wander, G.S., Chambers, J.C., Kooner, J.S., Aston, C.E., Sanghera, D.K., Montgomery, C.G., 2012. A replication

- study of GWAS-derived lipid genes in asian indians. The chromosomal region 11q23.3 harbors loci contributing to triglycerides. *Public Library of Science ONE* 7, e37056.
- Breckenridge, W.C., D, P., Little, J.A., D, M., Steiner, G., Chow, A., Sc, B., Poapst, M., 1978. Hypertriglyceridemia associated with deficiency of Apolipoprotein C-II. *New England Journal of Medicine* 298, 1265–1273.
- Breslow, J.L., 1989. Genetic basis of lipoprotein disorders. *Journal of Clinical Investigation* 84, 373–380.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25.
- Chasman, D.I., Pare, G., Zee, R.Y., Parker, A.N., Cook, N.R., Buring, J.E., Kwiatkowski, D.J., Rose, L.M., Smith, J.D., Williams, P.T., Rieder, M.J., Rotter, J.I., Nickerson, D.A., Krauss, R.M., Miletich, J.P., Ridker, P.M., 2008. Genetic loci associated with plasma concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol, High-Density Lipoprotein Cholesterol, Triglycerides, Apolipoprotein A1, and Apolipoprotein B among 6382 white women in genome-wide analysis with replication. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 1, 21–30.
- Chasman, D.I., Paré, G., Mora, S., Hopewell, J.C., Peloso, G., Clarke, R., Cupples, L.A., Hamsten, A., Kathiresan, S., Mälarstig, A., Ordovas, J.M., Ripatti, S., Parker, A.N., Miletich, J.P., Ridker, P.M., Abecasis, G.R., 2009. Forty-three loci associated with plasma lipoprotein size, concentration, and cholesterol content in genome-wide analysis. *Public Library of Science Genetics* 5, e1000730.
- Chu, A.Y., Guilianini, F., Grallert, H., Dupuis, J., Ballantyne, C.M., Barratt, B.J., Nyberg, F., Chasman, D.I., Ridker, P.M., 2012. Genome-wide association study evaluating lipoprotein-associated phospholipase A2 mass and activity at baseline and after Rosuvastatin therapy. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 5, 676–685.
- Cladaras, C.S., Hadzopoulou-Cladaras, M., Felber B. K., Pavlakis, G., Zannis, V., 1987. The molecular basis of a familial ApoE deficiency. *The Journal of Biological Chemistry* 262, 2310–2315.
- Conde-Knape, K., Bensadoun, A., Sobel, J.H., Cohn Jeffrey S., Shachter, N.S., 2002. Overexpression of apoC-I in apoE-null mice: severe hypertriglyceridemia due to inhibition of hepatic lipase. *The Journal of Lipid Research* 43, 2136–2145.
- Connelly, P.W., Graham, F.M., Little, J.A., 1987. Apolipoprotein CII. Familial Apolipoprotein CII deficiency associated with premature vascular disease. *Journal of Clinical Investigation* 80, 1597–1606.
- Dobiášová, M., Frohlich, J.J., 1999. Advances in understanding of the role of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) in cholesterol transport. *Clinica Chimica Acta* 286, 257–271.
- Eckardstein, A. von, Nofer, J.-R., Assmann, G., 2001. High Density Lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21, 13–27.
- Elliott, P., Chambers, J.C., Zhang, W., Clarke, R., Hopewell, J.C., Peden, J.F., Erdmann, J., Braund, P., Engert, J.C., Bennett, D., Coin, L., Ashby, D., Tzoulaki, I., Brown, I.J., Mt-Isa, S., McCarthy, M.I., Peltonen, L., Freimer, N.B., Farrall, M., Ruukonen, A., Hamsten, A., Lim, N., Froguel, P., Waterworth, D.M., Vollenweider, P., Waeber, G., Jarvelin, M.R., Mooser, V., Scott, J., Hall, A.S., Schunkert, H., Anand, S.S., Collins, R., Samani, N.J., Watkins, H., Kooner, J.S., 2009. Genetic loci associated with C-Reactive Protein levels and risk of coronary heart disease. *Journal of the American Medical Association* 302, 37–48.
- Finn, A.V., Nakano, M., Narula, J., Kolodgie, F.D., Virmani, R., 2010. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, 1282–1292.
- Gautier, T., Masson, D., Pais de Barros, Jean-Paul, Athias, A., Gambert, P., Dominique, A., Metz-Boutigue, M.-H., Lagrost, L., 2000. Human Apolipoprotein C-I accounts for the ability of plasma High Density Lipoproteins to inhibit the Cholesteryl Ester Transfer Protein activity. *Journal of Biological Chemistry* 275, 37504–37509.

- Ghiselli, G., Schaefer, E.J., Gascon, P., Breser, H.B., JR., 1981. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science* 214, 1239–1241.
- Go, A.S., Mozaffarian, D., Roger, V.L., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Blaha, M.J., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., Franco, S., Fullerton, H.J., Gillespie, C., Hailpern, S.M., Heit, J.A., Howard, V.J., Huffman, M.D., Judd, S.E., Kissela, B.M., Kittner, S.J., Lackland, D.T., Lichtman, J.H., Lisabeth, L.D., Mackey, R.H., Magid, D.J., Marcus, G.M., Marelli, A., Matchar, D.B., McGuire, D.K., Mohler, E.R., Moy, C.S., Mussolino, M.E., Neumar, R.W., Nichol, G., Pandey, D.K., Paynter, N.P., Reeves, M.J., Sorlie, P.D., Stein, J., Towfighi, A., Turan, T.N., Virani, S.S., Wong, N.D., Woo, D., Turner, M.B., 2014. Executive summary: Heart disease and stroke statistics--2014 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 129, 399–410.
- Grallert, H., Dupuis, J., Bis, J.C., Dehghan, A., Barbalic, M., Baumert, J., Lu, C., Smith, N.L., Uitterlinden, A.G., Roberts, R., Khuseynova, N., Schnabel, R.B., Rice, K.M., Rivadeneira, F., Hoogeveen, R.C., Fontes, J.D., Meisinger, C., Keaney, J.F., Lemaitre, R., Aulchenko, Y.S., Vasani, R.S., Ellis, S., Hazen, S.L., van Duijn, C. M., Nelson, J.J., Marz, W., Schunkert, H., McPherson, R.M., Stirraddel-Farrant, H.A., Psaty, B.M., Gieger, C., Siscovick, D., Hofman, A., Illig, T., Cushman, M., Yamamoto, J.F., Rotter, J.I., Larson, M.G., Stewart, A. F. R., Boerwinkle, E., Witteman, J. C. M., Tracy, R.P., Koenig, W., Benjamin, E.J., Ballantyne, C.M., 2012. Eight genetic loci associated with variation in lipoprotein-associated phospholipase A2 mass and activity and coronary heart disease: meta-analysis of genome-wide association studies from five community-based studies. *European Heart Journal* 33, 238–251.
- Greene, C.M., Zern, T.L., Wood R. J., Shrestha, S., Aggarwal, D., Sharman, M.J., Volek, J.S., Fernandez M. L., 2005. Maintenance of the LDL Cholesterol:HDL Cholesterol ratio in an elderly population given a dietary cholesterol challenge. *The Journal of Nutrition* 135, 2793–2798.
- Herold, G. (Ed.), 2012. *Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung.* Gerd Herold, Köln.
- Hesler, C.B., Swenson, T.L., Tall, A.R., 1987. Purification and characterization of a human plasma Cholesteryl Ester Transfer Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 262, 2275–2282.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 88, 7276–7280.
- Horie, Y., Fazio, S., Westerlund, J.R., Weisgraber, K.H., Rall, S.C., JR., 1992. The functional characteristics of a human apolipoprotein E variant (cysteine at residue 142) may explain its association with dominant expression of type III hyperlipoproteinemia. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 1962–1968.
- Hospattankar, A.V., Fairwell, T., Ronan, R., Brewer, B., JR., 1984. Amino acid sequence of human plasma apolipoprotein C-II and hyperlipoproteinemic subjects. *The Journal of Biological Chemistry* 259, 318–322.
- Jong, M.C., Hofker, M.H., Havekes, L.M., 1999. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism. Functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19, 472–484.
- Kannel, W.B., Dawber, T.R., Kagan, A., Revotskie, N., Stokes, J., 1961. Factors of risk in the development of coronary heart disease—Six-year follow-up experience: The Framingham Study. *Annals of Internal Medicine* 55, 33–50.
- Kathiresan, S., D, M., Melander, O., D, P., Anevski, D., Guiducci, C., S, B., Burt, N.P., Roos, C., Sc, M., Hirschhorn, J.N., Berglund, G., Hedblad, B., Groop, L., Altshuler, D.M., Newton-Cheh, C., H, M.P., Orho-Melander, M., 2008. Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events. *New England Journal of Medicine* 258, 1240–1249.
- Kathiresan, S., Willer, C.J., Peloso, G.M., Demissie, S., Musunuru, K., Schadt, E.E., Kaplan, L., Bennett, D., Li, Y., Tanaka, T., Voight, B.F., Bonnycastle, L.L., Jackson, A.U., Crawford, G., Surtees, A., Guiducci, C., Burt, N.P., Parish, S., Clarke, R., Zelenika, D.,

- Kubalanza, K.A., Morken, M.A., Scott, L.J., Stringham, H.M., Galan, P., Swift, A.J., Kuusisto, J., Bergman, R.N., Sundvall, J., Laakso, M., Ferrucci, L., Scheet, P., Sanna, S., Uda, M., Yang, Q., Lunetta, K.L., Dupuis, J., de Bakker, Paul I W, O'Donnell, C.J., Chambers, J.C., Kooner, J.S., Hercberg, S., Meneton, P., Lakatta, E.G., Scuteri, A., Schlessinger, D., Tuomilehto, J., Collins, F.S., Groop, L., Altshuler, D., Collins, R., Lathrop, G.M., Melander, O., Salomaa, V., Peltonen, L., Orho-Melander, M., Ordovas, J.M., Boehnke, M., Abecasis, G.R., Mohlke, K.L., Cupples, L.A., 2009. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet* 41, 56–65.
- Ken-Dror, G., Talmud, P.J., Humphries, S.E., Drenos, F., 2010. APOE/C1/C4/C2 gene cluster genotypes, haplotypes and lipid levels in prospective coronary heart disease risk among UK healthy men. *Molecular Medicine* 16, 389–399.
- Knijff, P. de, van den Maagdenberg, A M, Stalenhoef, A.F., Leuven, J.A., Demacker, P.N., Kuyt, L.P., Frants, R.R., Havekes, L.M., 1991. Familial dysbetalipoproteinemia associated with apolipoprotein E3-Leiden in an extended multigeneration pedigree. *Journal of Clinical Investigation* 88, 643–655.
- Koch, W., Ehrenhaft, A., Griesser, K., Pfeufer, A., Müller, J., Schömig, A., Kastrati, A., 2002. TaqMan systems for genotyping of disease-related polymorphisms present in the gene encoding Apolipoprotein E. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 40.
- Koch, W., Hoppmann, P., Schömig, A., Kastrati, A., 2008. Apolipoprotein E gene $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ polymorphism and myocardial infarction: Case-control study in a large population sample. *International Journal of Cardiology* 125, 116–117.
- Koch, W., Mueller, J.C., Schrempf, M., Wolferstetter, H., Kirchhofer, J., Schömig, A., Kastrati, A., 2013. Two rare variants explain association with acute myocardial infarction in an extended genomic region including the Apolipoprotein(A) gene. *Annals of Human Genetics* 77, 47–55.
- Kolmakova, A., Kwiterovich, P., Virgil, D., Alaupovic, P., Knight-Gibson, C., Martin, S.F., Chatterjee, S., 2004. Apolipoprotein C-I induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells via recruiting neutral sphingomyelinase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24, 264–269.
- Kutyavin, I.V., Afonina, I.A., Mills, A., Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A., Belousov, E.S., Singer, M.J., Walburger, D.K., Lokhov, S.G., Gall, A.A., Dempcy, R., Reed, M.W., Meyer, R.B., Hedgpeth, J., 2000. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research* 28, 655–661.
- Lauer, S.J., Walker, D., Elshourbagy, N.A., Reardon, C.A., Levy-Wilson, B., Taylor, J.M., 1988. Two copies of the human Apolipoprotein C-I gene are linked closely to the Apolipoprotein E gene. *The Journal of Biological Chemistry* 263, 7277–7286.
- Lefkowitz, R., Willerson, J., 2001. Prospects for cardiovascular research. *Journal of the American Medical Association* 285, 581–587.
- Libby, P., 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868–874.
- Livak, K.J., 1999. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5% nuclease assay. *Genetic Analysis* 14, 143–149.
- Lohse, P., Brewer, H.B., Meng, M.S., Skarlatos, S.I., LaRosa, J.C., Brewer, H. B. [JR.], 1992. Familial apolipoprotein E deficiency and type III hyperlipoproteinemia due to a premature stop codon in the apolipoprotein E gene. *Journal of Lipid Research* 33, 1583–1590.
- Lohse, P., Mann, W.A., Stein, E.A., Brewer, H.B. [JR], 1991. Apolipoprotein E-4^{Philadelphia} (Glu13----Lys,Arg145----Cys). Homozygosity for two rare point mutations in the apolipoprotein E gene combined with severe type III hyperlipoproteinemia. *Journal of Biological Chemistry* 266, 10479–10484.
- Lorenz, M.W., Markus, H.S., Bots, M.L., Rosvall, M., Sitzer, M., 2007. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness. A systematic review and meta-analysis. *Circulation* 115, 459–467.
- Luo, C.-C., Li, W.-H., Moore, M.N., Chan, L., 1986. Structure and evolution of the apolipoprotein multigene family. *Journal of Molecular Biology* 187, 325–340.
- Maeda, H., Nakamura, H., Kobori, S., Okada, M., Mori, H., Niki, H., Ogura, T., Hiraga, S., 1989. Identification of human apolipoprotein E variant gene: apolipoprotein E7 (Glu244,245----Lys244,245). *Journal of Biochemistry* 105, 51–54.

- Mahley, R.W., 1988. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622–630.
- Moore, D., McNeal, C., Macfarlane, R., 2011. Isoforms of apolipoprotein C-I associated with individuals with coronary artery disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404, 1034–1038.
- Paré, G., Serre, D., Brisson, D., Anand, S.S., Montpetit, A., Tremblay, G., Engert, J.C., Hudson, T.J., Gaudet, D., 2007. Genetic analysis of 103 candidate genes for coronary artery disease and associated phenotypes in a founder population reveals a new association between Endothelin-1 and High-Density Lipoprotein Cholesterol. *The American Journal of Human Genetics* 80, 673–682.
- Pierangeli, S.S., Espinola, R.G., Liu, X., Harris, E.N., 2001. Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by Inter cellular Cell Adhesion Molecule-1, Vascular Cell Adhesion Molecule-1, and P-Selectin. *Circulation Research* 88, 245–250.
- Polak, J.F., Pencina, M.J., Pencina, K.M., O'Donnell, C.J., Wolf, P.A., D'Agostino, Ralph B. Sr., 2011. Carotid-wall intima–media thickness and cardiovascular events. *New England Journal of Medicine* 365, 213–221.
- Puppionea, D.L., Ryanb, C.M., Bassilianb, S., Soudab, P., Xinshu, Xiaoa, Ryderd, O.A., Whiteleggea, J.P., 2010. Detection of two distinct forms of apoC-I in great apes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 5, 73–79.
- Rall, S.C., Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L., Mahley, R.W., 1982. Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. *Genetics* 79, 4696–4700.
- Robert Koch-Institut, 2010. Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2010", 96.
- Rosenson, R.S., 2014. Lipoprotein classification; metabolism; and role in atherosclerosis. www.uptodate.com (Feb 18, 2014).
- Ross, R., 1999. Atherosclerosis — An inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine* 340, 115–126.
- Shachter, N.S., Zhu, Y., Walsh, A., Breslow, J.L., Smith, J.D., 1993. Localization of a liver-specific enhancer in the apolipoprotein E/C-I/C-II gene locus. *Journal of Lipid Research* 34, 1699–1707.
- Shiffman, D., Kane, J.P., Louie, J.Z., Arellano, A.R., Ross, D.A., Catanese, J.J., Malloy, M.J., Ellis, S.G., Devlin, J.J., Kronenberg, F., 2008. Analysis of 17,576 potentially functional SNPs in three case–control studies of myocardial infarction. *Public Library of Science ONE* 3, e2895.
- Shulman, R.S., Herbert, P.N., Wehrly, K., Fredrickson, D.S., 1974. The complete amino acid sequence of C-I (ApoLp-Ser), an apolipoprotein from human Very Low Density Lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* 250, 182–190.
- Smit, M., Knijff, P. de, van der Kooij-Meijis E., Groenendijk, C., van den Maagdenberg, A.M., Gevers Leuven, J.A., Stalenhoef, A.F., Stuyt, P.M., Frants, R.R., Havekes, L.M., 1990. Genetic heterogeneity in familial dysbetalipoproteinemia. The E2(lys146----gln) variant results in a dominant mode of inheritance. *Journal of Lipid Research* 31, 45–53.
- Smith, E.N., Chen, W., Kähönen, M., Kettunen, J., Lehtimäki, T., Peltonen, L., Raitakari, O.T., Salem, R.M., Schork, N.J., Shaw, M., Srinivasan, S.R., Topol, E.J., Viikari, J.S., Berenson, G.S., Murray, S.S., Gibson, G., 2010. Longitudinal genome-wide association of cardiovascular disease risk factors in the Bogalusa Heart Study. *Public Library of Science Genetics* 6, e1001094.
- Solanas-Barca, M., Castro-Orós, I. de, Mateo-Gallego, R., Cofán, M., Plana, N., Puzo, J., Burillo, E., Martín-Fuentes, P., Ros, E., Masana, L., Pocoví, M., Civeira, F., Cenarro, A., 2012. Apolipoprotein E gene mutations in subjects with mixed hyperlipidemia and a clinical diagnosis of familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 222, 449–455.
- Soutar, A.K., Garner, C.W., Nordean Baker, H., Sparrow, J.T., Jackson, R.L., Gotto, A.M., Smith, L.C., 1975. Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: Cholesterol Acyltransferase. *Biochemistry* 14, 3057–3064.

- Soutar, A.K., Naoumova, R.P., 2007. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 4, 214–225.
- Statistisches Bundesamt, 2014. Gesundheit. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankheitskosten/Tabellen/KrankheitsklassenAlter.html> (May 16, 2014).
- Stephens, M., Smith, N.J., Donnelly, P., 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics* 68, 978–989.
- Suchindran, S., Rivedal, D., Guyton, J.R., Milledge, T., Gao, X., Benjamin, A., Rowell, J., Ginsburg, G.S., McCarthy, J.J., McCarthy, M.I., 2010. Genome-wide association study of Lp-PLA2 activity and mass in the Framingham Heart Study. *Public Library of Science Genetics* 6, e1000928.
- Suehiro, T., Yoshida, K., Yamano, T., Ohno, F., 1990. Identification and characterization of a new variant of apolipoprotein E (apo E-Kochi). *Japanese journal of medicine* 29, 587–594.
- Tajima, S., Yamamura, T., Menju, M., Yamamoto, A., 1989. Analysis of apolipoprotein E7 (apolipoprotein E-Suita) gene from a patient with hyperlipoproteinemia. *Journal of Biochemistry* 105, 249–253.
- Tajima, S., Yamamura, T., Yamamoto, A., 1988. Analysis of Apolipoprotein E5 gene from a patient with hyperlipoproteinemia. *The Journal of Biochemistry* 104, 48–52.
- Tall, A.R., 1993. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *Journal of Lipid Research* 34, 1255–1274.
- Tata, F., Henry, I., Markham, A.F., Wallis, S.C., Weil, D., Grzeschik, K.H., Junien, C., Williamson, R., Humphries, S.E., 1985. Isolation and characterisation of a cDNA clone for human apolipoprotein CI and assignment of the gene to chromosome 19. *Human Genetics* 69, 345–349.
- Teslovich, T.M., Musunuru, K., Smith, A.V., Edmondson, A.C., Stylianou, I.M., Koseki, M., Pirruccello, J.P., Ripatti, S., Chasman, D.I., Willer, C.J., Johansen, C.T., Fouchier, S.W., Isaacs, A., Peloso, G.M., Barbalic, M., Ricketts, S.L., Bis, J.C., Aulchenko, Y.S., Thorleifsson, G., Feitosa, M.F., Chambers, J., Orho-Melander, M., Melander, O., Johnson, T., Li, X., Guo, X., Li, M., Shin Cho, Y., Jin Go, M., Jin Kim, Y., Lee, J.-Y., Park, T., Kim, K., Sim, X., Twee-Hee Ong, R., Croteau-Chonka, D.C., Lange, L.A., Smith, J.D., Song, K., Hua Zhao, J., Yuan, X., Luan, J., Lamina, C., Ziegler, A., Zhang, W., Zee, Robert Y. L., Wright, A.F., Witteman, Jacqueline C. M., Wilson, J.F., Willemsen, G., Wichmann, H.-E., Whitfield, J.B., Waterworth, D.M., Wareham, N.J., Waeber, G., Vollenweider, P., Voight, B.F., Vitart, V., Uitterlinden, A.G., Uda, M., Tuomilehto, J., Thompson, J.R., Tanaka, T., Surakka, I., Stringham, H.M., Spector, T.D., Soranzo, N., Smit, J.H., Sinisalo, J., Silander, K., Sijbrands, Eric J. G., Scuteri, A., Scott, J., Schlessinger, D., Sanna, S., Salomaa, V., Saharinen, J., Sabatti, C., Ruukonen, A., Rudan, I., Rose, L.M., Roberts, R., Rieder, M., Psaty, B.M., Pramstaller, P.P., Pichler, I., Perola, M., Penninx, Brenda W. J. H., Pedersen, N.L., Pattaro, C., Parker, A.N., Pare, G., Oostra, B.A., O'Donnell, C.J., Nieminen, M.S., Nickerson, D.A., Montgomery, G.W., Meitinger, T., McPherson, R., McCarthy, M.I., McArdle, W., Masson, D., Martin, N.G., Marroni, F., Mangino, M., Magnusson, Patrik K. E., Lucas, G., Luben, R., Loos, Ruth J. F., Lokki, M.-L., Lettre, G., Langenberg, C., Launer, L.J., Lakatta, E.G., Laaksonen, R., Kyvik, K.O., Kronenberg, F., König, I.R., Khaw, K.-T., Kaprio, J., Kaplan, L.M., Johansson, Å., Jarvelin, M.-R., Cecile J. W. Janssens, A., Ingelsson, E., Igl, W., Kees Hovingh, G., Hottenga, J.-J., Hofman, A., Hicks, A.A., Hengstenberg, C., Heid, I.M., Hayward, C., Havulinna, A.S., Hastie, N.D., Harris, T.B., Haritunians, T., Hall, A.S., Gyllensten, U., Guiducci, C., Groop, L.C., Gonzalez, E., Gieger, C., Freimer, N.B., Ferrucci, L., Erdmann, J., Elliott, P., Ejebe, K.G., Döring, A., Dominiczak, A.F., Demissie, S., Deloukas, P., de Geus, Eco J. C., Faire, U. de, Crawford, G., Collins, F.S., Chen, Y.-d.I., Caulfield, M.J., Campbell, H., Burt, N.P., Bonnycastle, L.L., Boomsma, D.I., Boehholdt, S.M., Bergman, R.N., Barroso, I., Bandinelli, S., Ballantyne, C.M., Assimes, T.L., Quertermous, T., Altshuler, D., Seielstad, M., Wong, T.Y., Tai, E.-S., Feranil, A.B., Kuzawa, C.W., Adair, L.S., Taylor Jr, Herman A., Borecki, I.B., Gabriel, S.B., Wilson, J.G., Holm, H., Thorsteinsdottir, U., Gudnason, V., Krauss, R.M., Mohlke, K.L., Ordovas, J.M., Munroe, P.B., Kooner, J.S., Tall, A.R., Hegele, R.A.,

- Kastelein, J.J., Schadt, E.E., Rotter, J.I., Boerwinkle, E., Strachan, D.P., Mooser, V., Stefansson, K., Reilly, M.P., Samani, N.J., Schunkert, H., Cupples, L.A., Sandhu, M.S., Ridker, P.M., Rader, D.J., van Duijn, Cornelia M., Peltonen, L., Abecasis, G.R., Boehnke, M., Kathiresan, S., 2010. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 466, 707–713.
- The International HapMap Consortium, 2007. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449, 851–861.
- The Lp-PLA2 Studies Collaboration, 2010. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet* 375, 1536–1544.
- Trompet, S., de Craen, Anton JM, Postmus, I., Ford, I., Sattar, N., Caslake, M., Stott, D.J., Buckley, B.M., Sacks, F., Devlin, J.J., Slagboom, P., Westendorp, R.G.J., Jukema, J., 2011. Replication of LDL GWAs hits in PROSPER/PHASE as validation for future (pharmaco)genetic analyses. *BMC Medical Genetics* 12, 131–137.
- Wallace, C., Newhouse, S.J., Braund, P., Zhang, F., Tobin, M., Falchi, M., Ahmadi, K., Dobson, R.J., Marçano, A.C.B., Hajat, C., Burton, P., Deloukas, P., Brown, M., Connell, J.M., Dominiczak, A., Lathrop, G.M., Webster, J., Farrall, M., Spector, T., Samani, N.J., Caulfield, M.J., Munroe, P.B., 2008. Genome-wide association study identifies genes for biomarkers of cardiovascular disease. Serum urate and dyslipidemia. *The American Journal of Human Genetics* 82, 139–149.
- Wardell, M.R., Brennan, S.O., Janus, E.D., Fraser, R., Carrell, R.W., 1987. Apolipoprotein E2-Christchurch (136 Arg----Ser). New variant of human apolipoprotein E in a patient with type III hyperlipoproteinemia. *Journal of Clinical Investigation* 80, 483–490.
- Wardell, M.R., Weisgraber, K.H., Havekess, L.M., Rall, S.C., JR., 1989. Apolipoprotein E3-Leiden contains a seven-amino acid insertion that is a tandem repeat of residues 121-127. *Journal of Biological Chemistry* 264, 21205–21210.
- Waterworth, D.M., Ricketts, S.L., Song, K., Chen, L., Zhao, J.H., Ripatti, S., Aulchenko, Y.S., Zhang, W., Yuan, X., Lim, N., Luan, J., Ashford, S., Wheeler, E., Young, E.H., Hadley, D., Thompson, J.R., Braund, P.S., Johnson, T., Struchalin, M., Surakka, I., Luben, R., Khaw, K.-T., Rodwell, S.A., Loos, R. J. F., Boekholdt, S.M., Inouye, M., Deloukas, P., Elliott, P., Schlessinger, D., Sanna, S., Scuteri, A., Jackson, A., Mohlke, K.L., Tuomilehto, J., Roberts, R., Stewart, A., Kesaniemi, Y.A., Mahley, R.W., Grundy, S.M., McArdle, W., Cardon, L., Waeber, G., Vollenweider, P., Chambers, J.C., Boehnke, M., Abecasis, G.R., Salomaa, V., Jarvelin, M.-R., Ruukonen, A., Barroso, I., Epstein, S.E., Hakonarson, H.H., Rader, D.J., Reilly, M.P., Witteman, J. C. M., Hall, A.S., Samani, N.J., Strachan, D.P., Barter, P., van Duijn, C. M., Kooner, J.S., Peltonen, L., Wareham, N.J., McPherson, R., Mooser, V., Sandhu, M.S., 2010. Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, 2264–2276.
- Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., Kowal, R.C., Herz, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1990. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of Apolipoprotein E with β -migrating Very Low Density Lipoproteins (β -VLDL) and inhibits binding of β -VLDL to Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 265, 22453–22459.
- Weltgesundheitsorganisation Regionalbüro für Europa, 2014. Der Europäische Gesundheitsbericht 2012: Ein Wegweiser zu mehr Wohlbefinden. http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0010/250399/EHR2012-Ger.pdf?ua=1 (Mar 24, 2016).
- Westerterp, M., Berbee, J.F., Pires, N.M., van Mierlo, G. J.D., Kleemann, R., Romijn, J.A., Havekes, L.M., Rensen, P.C., 2007. Apolipoprotein C-I is crucially involved in lipopolysaccharide-induced atherosclerosis development in Apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 116, 2173–2181.
- Westerterp, M., Haan, W. de, Berbée, Jimmy F. P., Havekes, Louis M., Rensen, Patrick C. N., 2006. Endogenous apoC-I increases hyperlipidemia in apoE-knockout mice by stimulating VLDL production and inhibiting LPL. *The Journal of Lipid Research* 47, 1203–1211.

Willer, C.J., Sanna, S., Jackson, A.U., Scuteri, A., Bonnycastle, L.L., Clarke, R., Heath, S.C., Timpson, N.J., Najjar, S.S., Stringham, H.M., Strait, J., Duren, W.L., Maschio, A., Busonero, F., Mulas, A., Albai, G., Swift, A.J., Morken, M.A., Narisu, N., Bennett, D., Parish, S., Shen, H., Galan, P., Meneton, P., Hercberg, S., Zelenika, D., Chen, W.-M., Li, Y., Scott, L.J., Scheet, P.A., Sundvall, J., Watanabe, R.M., Nagaraja, R., Ebrahim, S., Lawlor, D.A., Ben-Shlomo, Y., Davey-Smith, G., Shuldiner, A.R., Collins, R., Bergman, R.N., Uda, M., Tuomilehto, J., Cao, A., Collins, F.S., Lakatta, E., Lathrop, G.M., Boehnke, M., Schlessinger, D., Mohlke, K.L., Abecasis, G.R., 2008. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nature Genetics* 40, 161–169.

11 Danksagung

Prof. Dr. med. Adnan Kastrati sei Dank für die Möglichkeit der Mitarbeit in seiner Forschungsgruppe.

Mein ganz besonderer Dank gilt Priv. Doz. Dr. rer. nat. Werner Koch für die Überlassung dieser Arbeit, die ausgezeichnete Betreuung und die Korrektur dieser Arbeit.

Bester Dank sei Wolfgang Latz für die hervorragende Einarbeitung und alle weiteren Ratschläge ausgesprochen.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe der experimentellen Kardiologie für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung sowie für die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Schließlich ein herzliches Dankeschön an Lucia Gahbler, Anna Kirchhofer und Josef Kirchhofer für das Korrekturlesen der Arbeit.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Johannes Kirchhofer
Geburtsdatum und -ort: 09.07.1987 in Peißenberg

Beruflicher Werdegang

08/2016 – heute Assistenzarzt Innere Medizin am Krankenhaus Weilheim (Oberbayern)

Studium

04/2016 Approbation als Arzt
11/2015 Abschluss der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote „sehr gut“ (1,33)
10/2014 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: „gut“)
04/2011 – 11/2015 Medizinstudium klinischer Abschnitt TU München
03/2011 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung/Physikum (Note 1,0)
10/2008 – 03/2011 Medizinstudium vorklinischer Abschnitt LMU München

Schulbildung

06/2007 Abitur (Note: 1,3)
09/1998 – 06/2007 Besuch des Welfen-Gymnasiums Schongau
09/1994 – 07/1998 Besuch der Grundschule Schwabsoien

Praktisches Jahr

11/2014 – 03/2015	PJ-Tertial in der Inneren Medizin am Klinikum St. Georg, Leipzig
03/2015 – 06/2015	PJ-Tertial in der Orthopädie am Rotkreuzklinikum München
06/2015 - 10/2015	PJ-Tertial in der Chirurgie am CHU de Toulouse, Hôpital de Rangueil, Toulouse, Frankreich

Famulaturen

09/2013	Famulatur im Fach Augenheilkunde in der Augenklinik am Flughafen München
03/2013	Famulatur im Fach Urologie im Klinikum Harlaching
09/2012	Famulatur im Fach Neuroradiologie/Radiologie an der University of Pennsylvania, Philadelphia, USA
09/2011	Famulatur im Fach Allgemein- und Viszeralchirurgie an der Charité Berlin (Campus Virchow)

Dissertation

10/2010 – 07/2017	Experimentelle Doktorarbeit am deutschen Herzzentrum München in der experimentellen Kardiologie zum Thema: „Untersuchung der Assoziation von Polymorphismen der APOE-APOC1-Genregion mit dem Myokardinfarkt“
-------------------	--

Stipendium

10/2010 – 12/2015	Stipendiat der Hanns-Seidel-Stiftung
-------------------	--------------------------------------

Zusatzqualifikation

10/2009 – 02/2011	Präparier-Co-Assistent im Fach Makroskopische Anatomie und Neuroanatomie
-------------------	--

Zivildienst

10/2007 – 07/2008
Zivildienst im Pflegedienst in der Diakonie München und im Verein „Soziale Betreuung durch Musik e.V.“

Ehrenamtliche Tätigkeit

10/2008 – 03/2015
Leitung des Medizinerchors von LMU und TU München

10/2005 - heute
Pianist der Singgemeinschaft Schwabsoien

10/2005 – 05/2009
Leitung des Kinder- und Jugendchors der Singgemeinschaft Schwabsoien

Sprachkenntnisse

Deutsch
Muttersprache

Englisch
sehr gute Kenntnisse in Sprache und Schrift

Französisch
gute Kenntnisse in Sprache und Schrift

Persönliche Interessen

Musik
Klavier, Cello, Chorleitung, Gesang, Orgel;
Mitglied des Medizinerorchesters München;
Leitung des Medizinerchors München;
Aufnahmeprüfung für gymnasiales Lehramt Musik (bestanden);
Teilnahme an einer kirchenmusikalischen Ausbildung in Augsburg;

Sport
Fußball, Bergsteigen, Skifahren