

Aus der Forschungsgruppe Geriatrie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Rekrutierung, Charakterisierung und Validierung einer
Stichprobe zur Replikation von Befunden zu genetischen
Assoziationen im Bereich des Lipidstoffwechsels aus der
Berliner Altersstudie II

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Larissa Kindermann
aus Berlin

Datum der Promotion: 05.12.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Kurzfassung/Abstract	6
1 Einleitung	8
1.1 Berliner Altersstudie II (BASE-II)	8
1.2 Genetische Replikationsstudien	8
1.3 Dyslipoproteinämien und kardiovaskuläres Risiko	9
1.4 Lipoprotein(a)	13
1.4.1 Struktur	13
1.4.2 Funktion	14
1.4.3 Genetik	14
1.4.4 Metabolismus	15
1.4.5 Plasmakonzentration	15
1.5 Lipoprotein(a) als kardiovaskulärer Risikofaktor	16
1.6 Modifikationen der Lp(a)-Plasmakonzentrationen	17
1.6.1 Nicht-medikamentöse Modifikationen	17
1.6.2 Medikamentöse und invasive Modifikationen	17
1.7 Genetische Polymorphismen mit Einfluss auf den Lipoprotein(a)-Plasmaspiegel	20
1.7.1 Genetische Polymorphismen im <i>LPA</i> -Gen	21
1.7.2 Genetische Polymorphismen außerhalb des <i>LPA</i> -Gens	24
2 Fragestellung	26
3 Methoden	29
3.1 Rekrutierung der Replikationskohorte	29
3.2 Bestimmung der kardiovaskulären Hochrisikopatienten	32
3.3 Messung und Analyse der Lipidparameter	32
3.4 DNA-Extraktion	33
3.5 TaqMan® Genotypisierung und statistische Auswertung	33
4 Ergebnisse	36
4.1 Relevante Vorerkrankungen der Studienpopulation	36
4.2 Familiäre Disposition der Studienpopulation	37
4.3 Lipidwerte der Studienpopulation	38

4.4	Kardiovaskuläres Risiko der Studienpopulation	41
4.5	Ergebnisse der Genotypisierung	43
4.5.1	Analyse bekannter SNPs zur Validierung der Studienpopulation	43
4.5.2	Analyse von Kandidaten-SNPs	46
5	Diskussion	50
5.1	Diskussion der Studienpopulation	50
5.2	Limitationen der Studienpopulation	51
5.3	Diskussion der Ergebnisse der Genotypisierungsstudie	51
5.3.1	Diskussion der Analyse bekannter SNPs zur Validierung der Replika- tionskohorte	52
5.3.2	Diskussion der Analyse von Kandidaten - SNPs	54
5.3.3	Limitationen der genetischen Assoziationsstudie	55
6	Literaturverzeichnis	57
7	Anhang (Lebenslauf, Erklärung)	69

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Apo	Apolipoprotein
ASS	Acetylsalicylsäure
BASE-II	Berliner Altersstudie II
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CAAD	Arteriosklerose der Arteria carotis
CETP	Cholesterol-Transferprotein
CREB	cAMP response element-binding protein
dbSNP	single nucleotide polymorphism database
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESC-SCORE	European Society of Cardiology-systemic coronary risk estimation
G	Guanin
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HDL	high density lipoprotein
HDL-C	HDL-Cholesterol
HRP	Hochrisikopatient
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases
ID	Identifikationsnummer
IDL	intermediate density lipoprotein
IL-6	Interleukin-6
K IV-2	Kringle IV-Typ 2
kDA	kiloDalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	low density lipoprotein
LDL-C	LDL-Cholesterol
Lp(a)	Lipoprotein(a)
MAF	minor allele frequency
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-kappa B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
OSBPL6	oxysterol-binding protein-related protein 6
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNRP	Pentanukleotid-Sequenzpolymorphismus
QTL	Quantitative Trait Locus
SNP	single nucleotide polymorphism
T	Thymin
Taq	Thermus Aquaticus
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TNFRSF11A	tumor necrosis factor receptor superfamily ,member 11a
TRPC4	transient receptor potential cation channel 4
VLDL	very low density lipoprotein

Abbildungsverzeichnis

1	Beispielhafte Darstellung eines TaqMan®-Genotypisierungsassays	34
2	Verteilung der Lp(a)-Plasmaspiegel der Replikationskohorte	40
3	Verteilungen der Lp(a)-Plasmaspiegel der BASE-II-Teilpopulation und der Replikationskohorte mit Angabe des Medians (schwarze Horizontallinien)	41
4	Kardiovaskuläres Risikoprofil und Lp(a)-Erhöhung der Studienpopulation	42

Tabellenverzeichnis

1	Sterbefälle 2010 an Krankheiten des Kreislaufsystems in Deutschland [1]	9
2	Einteilung primärer Hyperlipoproteinämien [2]	12
3	p-Werte und Lokalisation der SNPs mit Assoziation zur Lp(a)-Plasmakonzentration in der Studienpopulation und Replikationskohorte von Ober et al. [3]	22
4	p-Werte der SNPs mit Assoziation mit der Lp(a)-Plasmakonzentration aus drei Genotypisierungsstudien mit Verwendung des HumanCVD BeadChips; die kursiv gedruckten SNPs zeigen eine zusätzliche Assoziation mit der Anzahl der K IV Typ 2 Kopien [4, 5, 6].	23
5	p-Werte der SNPs mit Assoziation mit der Lp(a)-Plasmakonzentration in der Studienpopulation von Dumitrescu et al. [7]	24
6	Ausgewählte SNPs zur Assoziationstestung mit Lp(a)-Plasmaspiegeln	28
7	Verwendete Assays für die Genotypisierung	34
8	Anzahl der Vorerkrankungen der Studienpopulation	36
9	Verteilung der ApoE-Genotypen der Studienpopulation	37
10	Familiäre Disposition der Studienpopulation	38
11	Durchschnittliche Lipid - Plasmakonzentrationen	38
12	Übersicht der Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudie	44
13	Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudie für rs6919346	45
14	Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudie für rs10455872	46
15	Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudie für rs17210569	47
16	Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudie für rs7586970	48
17	Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudie für rs17069904	49

Kurzfassung

Einleitung: Im Rahmen der Berliner Altersstudie II (BASE-II) ist die Durchführung von genomweiten Assoziationsanalysen geplant, in denen Assoziationen von Polymorphismen mit speziellen Lipidparametern untersucht werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Replikationskohorte zur Überprüfung dieser genetischen Assoziationen zu rekrutieren und in Hinblick auf genetische Polymorphismen mit Einfluss auf den Lipoprotein(a)-Spiegel zu validieren. Der Schwerpunkt der genetischen Analysen lag auf der Genotypisierung von drei außerhalb von *LPA* auf Chromosom 6 gelegenen Kandidaten-SNPs, die im Verdacht stehen, einen Einfluss auf die Lp(a)-Plasmakonzentration zu haben. Zusätzlich wurden zwei SNPs auf *LPA* mit bereits bekannter Assoziation zur Validierung der Methoden getestet. Neben der genetischen Untersuchung erfolgte eine genaue Charakterisierung der Studienpopulation insbesondere hinsichtlich ihres kardiovaskulären Risikos.

Methoden: In der Lipidambulanz der Charité-Universitätsmedizin Berlin wurden rund 500 Patienten rekrutiert. Ein breites Spektrum an Lipidparametern wurde untersucht und bekannte Vorerkrankungen, die Aufschluss über das jeweilige kardiovaskuläre Risiko geben sollten, erfasst. Zur Genotypisierung der fünf SNPs bei den 500 Teilnehmern kamen kommerzielle Assays basierend auf der TaqMan® SNP-Genotypisierungstechnologie zum Einsatz. Die statistische Auswertung dieser Ergebnisse erfolgte mittels der Software PLINK v 1.07 und multivariater additiver Testung. In die Assoziationstestung wurde neben dem Lp(a)-Spiegel das Alter, das Geschlecht, der Body-Mass-Index und die Apolipoprotein B-Plasmakonzentration mit einbezogen.

Ergebnisse: Die Analyse des kardiovaskulären Risikoprofils der Studienpopulation nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie ergab einen ausgesprochen hohen Anteil von über 60 % an Hochrisikopatienten. Die Analysen der Genotypisierung ergaben für den SNP rs10455872 im *LPA*-Gen, für den bereits mehrfach ein Einfluss auf den Lp(a)-Spiegel nachgewiesen wurde eine hochsignifikante Assoziation mit der Lp(a)-Plasmakonzentration. Für drei weitere SNPs auf *LPA*, *TNFRSF11A* auf Chromosom 18 und *TFPI* auf Chromosom 2 konnte keine Assoziation bestätigt werden. Auch für rs17210569 nahe *TRPC4* auf Chromosom 13 lässt sich mit den vorliegenden Ergebnissen keine eindeutig signifikante Assoziation ($p = 0,08274$) nachweisen. Da es sich hier jedoch um die Replikation eines bereits publizierten Ergebnisses handelt, lassen sich die vorliegenden Untersuchungen als starken Hinweis auf eine Bestätigung der Assoziation zwischen rs17210569 auf Chromosom 13 und dem Lp(a)-Plasmapiegel werten.

Schlussfolgerung: Die Validierung der Replikationskohorte war erfolgreich und für die Funktion dieser Population als künftige Replikationskohorte für Ergebnisse genetischer Assoziationen mit Lipidparametern der BASE-II wurden somit gute Voraussetzungen geschaffen. Darüberhinaus lassen sich die Analysen für rs17210569 als starken Hinweis für eine Assoziation mit der

Lp(a)-Plasmakonzentration werten, so dass dieser SNP in einer künftigen größer gewählten Studienpopulation nochmals untersucht werden sollte.

Abstract

Introduction: In the Berlin Aging Study II (BASE-II) a genomwide association study (GWAS) will be performed to examine the association of polymorphisms with special lipid parameters. The goal of the present study was to recruit a cohort which could be used to replicate GWAS data from BASE-II. In order to validate this study concentrated on three potential SNPs located outside of *LPA* on chromosome 6 which were genotyped as being under high suspicion to influence Lp(a) levels. To validate the used methods we tested two SNPs on *LPA* with a well known association. Additional to the genetic analysis a characterization of the study population especially for cardiovascular risk was performed.

Methods: 500 patients of the outpatient department of lipid metabolism of the Charité-Universitätsmedizin Berlin were selected. All five SNPs were genotyped at Max-Planck-Institute for Molecular Genetics using commercially available assays based on TaqMan® chemistry following the manufacturer's recommendations. Association analyses were carried out using the software PLINK v 1.07 and Lp(a) plasma levels as quantitative traits in an additive linear model, adjusted for age, sex, body mass index and apolipoprotein B plasma levels.

Results: According to the guidelines of the German Cardiac Society the analysis of cardiovascular risk showed that 60 % of our study population is classified as high risk subjects. The genotype analysis demonstrated a highly significant association for SNP rs10455872 on *LPA* with Lp(a) levels. There were no associations for three additional SNPs on *LPA*, *TNFRSF11A* on chromosome 18 and *TFPI* on chromosome 2. rs17210569, located near *TRPC4* on chromosome 13, showed no significant association ($p = 0,08274$), either. Regarding previous results these analyses indicate an association of rs17210569 with Lp(a) levels.

Conclusions: We successfully validated our replication cohort and created an acceptable basis for further genetic association analysis with lipid parameters of the BASE-II cohort. Our study corroborates previous evidence regarding the involvement of rs17210569 near *TRPC4* on chromosome 13 in controlling Lp(a) plasma levels. The repetition of these results in a bigger study population is in process of planning.

1 Einleitung

1.1 Berliner Altersstudie II (BASE-II)

Ein möglichst aktiv und gesund gestaltetes Altern ist bei steigender Lebenserwartung der deutschen Bevölkerung ein zentrales Anliegen der geriatrischen Medizin und Forschung.

Faktoren, die Gesundheit und Krankheit bedingen, sollen in der derzeit noch laufenden Berliner Altersstudie II (BASE-II) identifiziert und charakterisiert werden [8].

Insgesamt wurden 2200 Individuen aus Berlin eingeschlossen. 1600 Studienteilnehmer sind zwischen 60 - 80 Jahre und 600 als Vergleichsgruppe zwischen 20 - 35 Jahre. Die multizentrisch und multidisziplinär durchgeführte BASE-II untersucht die körperlichen, geistigen und sozialen Bedingungen, die zu einem möglichst erfolgreichen Altern beitragen.

Dabei erfolgen u.a. eine körperliche Untersuchung, funktionale und psychologische sowie kognitive Tests, Blutentnahmen für die Bestimmung zahlreicher Laborwerte wie z. B. des Lipoprotein(a) -Plasmaspiegels und genetische Untersuchungen.

In einer genomweiten Assoziationsanalyse (GWAS) soll die Assoziation von Polymorphismen mit speziellen Lipidparametern untersucht werden.

1.2 Genetische Replikationsstudien

Die Bewertung der aus genetischen Assoziationsstudien gewonnenen Ergebnisse kann aufgrund bestimmter Störfaktoren erschwert sein. Die Größe der Studienkohorte oder die falsche Wahl von Kovariablen bei der multivariaten Regression können solche Störfaktoren darstellen [9].

Um Zufallsergebnisse auszuschließen, muss die Durchführung der Replikationsanalysen in einer geeigneten unabhängigen Studienpopulation erfolgen. Erst bei erfolgreicher Replikation kann von einer tatsächlichen Genotyp-Phänotyp-Assoziation ausgegangen werden [9].

Auch hierbei können jedoch die oben beschriebenen Störfaktoren Einfluss nehmen und sollten darum bei der Interpretation der Replikationsanalysen in Betracht gezogen werden.

Die Rekrutierung einer Studienpopulation für die künftige Replikation von genetischen Assoziationen mit Lipidparametern aus der BASE-II ist das Ziel dieser Arbeit. Um die besagten möglichen Störfaktoren auszuschließen bzw. aufzudecken sollen in diesem Zusammenhang

sowohl bereits bekannte als auch Kandidaten-SNPs auf Assoziation mit der Lipoprotein(a)-Plasmakonzentration getestet werden und somit die verwendeten Methoden zum Aufbau dieser Replikationskohorte validiert werden.

Die Charakterisierung der Studienpopulation und die Darlegung der Bedeutung des Lipoprotein (a) (Lp(a)) sind weitere zentrale Anliegen der vorliegenden Arbeit.

1.3 Dyslipoproteinämien und kardiovaskuläres Risiko

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind laut statistischem Bundesamt 2010 die häufigste Todesursache in Deutschland. 41 % der Todesfälle sind diesen Erkrankungen zuzusprechen [10]. Zur genaueren Einteilung der Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit Sterbefällen siehe Tabelle 1. Des Weiteren lassen sich 8 von den "20 häufigsten Hauptdiagnosen der vollstationär behandelten Patienten insgesamt (einschließlich Sterbe- und Stundenfälle) nach der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10) 2010" den Herz-Kreislauf-Erkrankungen zuordnen [11].

Todesursachen	männlich	weiblich	insgesamt
Insgesamt	409022	449746	858768
Krankheiten des Kreislaufsystems	149471	203218	352689
Hypertonie	9447	22819	32266
Ischämische Herzkrankheiten	67403	65723	133126
Akuter oder rezidivierender Myokardinfarkt	32975	26132	59107
Zerebrovaskuläre Krankheiten	23576	37974	61550
Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet	8422	15253	23675
Krankheiten der Arterien, Arteriolen und Kapillare	8687	10553	19240
Sonstige Formen der Herzkrankheit	30604	50448	81052

Tab. 1: Sterbefälle 2010 an Krankheiten des Kreislaufsystems in Deutschland [1]

Häufigste Ursache der Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind eine Manifestation sowie Komplikation einer Arteriosklerose. Zu deren unbeeinflussbaren Risikofaktoren gehören die familiäre Disposition, männliches Geschlecht und Lebensalter. Hyperlipoproteinämien, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus und Diabetes mellitus Typ II zählen zu den häufigsten Risikofaktoren.

Bei einer telefonischen Erhebung von 2009 wurde die 12-Monats-Prävalenz von Hyperlipoproteinämien mit ca. 21 % angegeben [12]. Da sich viele Patienten dieser Erkrankung jedoch nicht bewusst sind, muss von einer weit größeren Häufigkeit ausgegangen werden.

Fettstoffwechselstörungen können durch primäre oder sekundäre Ursachen hervorgerufen werden. Primäre Ursachen sind durch hereditäre Defekte von Enzymen, Transportproteinen oder Rezeptoren begründet. Sekundäre Formen können u.a. durch einen Diabetes mellitus oder Erkrankungen der Niere, Leber oder Schilddrüse hervorgerufen werden.

Sowohl sekundäre als auch primäre Fettstoffwechselstörungen gehen meist mit einer Erhöhung des Low Density Lipoproteins (LDL), einer Transportform des Cholesterols einher und je nach Art der Störung liegt ein unterschiedliches Arteriosklerosisrisiko vor (siehe Tabelle 2 auf Seite 12). Die genaue Pathogenese der Arteriosklerose ist noch nicht vollständig geklärt. Oxidierte LDL haben jedoch eine Schlüsselfunktion in der Entstehung atheromatöser Plaques. Reaktive Sauerstoffradikale (vermehrtes Auftreten durch z.B. Rauchen), hohe Plasma-LDL-Konzentrationen und niedrige Plasma-HDL (High Density Lipoprotein)-Konzentrationen begünstigen dabei die Bildung von oxidiertem LDL. Kleine dichte LDL-Partikel sind dabei atherogener als normal dichte LDL-Partikel [13]. Ausschlaggebend ist also nicht nur die Höhe der LDL-Cholesterol-Plasmakonzentration, sondern auch die genaue Zusammensetzung und Beschaffenheit der LDL-Partikel. Die Mehrheit der kardiovaskulären Infarkte wird durch die Ruptur bereits länger bestehender Plaques der Arterienwand hervorgerufen [14]. Plaques mit ausgeprägten Lipid- und Nekrosekernen und einer dünnen fibrösen Kappe sind prädestiniert zu rupturieren und werden als vulnerable Plaques bezeichnet [15, 16]. Dieser Plaquetyp wird darüberhinaus mit einer hohen Dichte an infiltrierten Makrophagen und einer verstärkten Expression von Metalloproteinasen in der fibrösen Kappe in Verbindung gebracht [17]. In der Folge einer Plaqueruptur kann es durch das gleichzeitige Vorliegen einer erhöhten lokalen Koagulabilität zu einem kompletten Verschluss des arteriellen Gefäßes kommen [15]. Neben der Plaqueruptur wird die Plaqueerosion in Verbindung mit einem intraluminalen Thrombus als Ursache für ein akutes koronares Ereignis vor dem Hintergrund einer Arteriosklerose diskutiert.

In den Frühstadien der koronaren Herzkrankheit treten in der Regel keine klinischen Symptome auf. So können zur weiteren Eingrenzung des kardiovaskulären Risikos folgende Faktoren hinzugezogen werden:

- erhöhtes hochsensitives C-reaktives Protein (> 3 mg/l)
- Hyperhomocysteinämie (> 12 µmol/l)
- erhöhtes Lipoprotein(a) (> 30 mg/dl)
- Hyperfibrinogenämie (> 300 mg/dl)
- Bewegungsmangel
- psychosoziale Risikofaktoren: negativer Stress, niedriger sozialer Status u.a.

Für die Atheroprotektion ist eine adäquate Einstellung der Lipidparameter somit unerlässlich. In der klinischen Praxis ist die Einschätzung des kardiovaskulären Gesamtrisikos mittels verschiedener Score-Systeme wie z.B. dem Framingham-, PROCAM- oder Reynolds-Score sinnvoll. Der ESC-SCORE (European Society of Cardiology-Systemic Coronary Risk Estimation) ist zur Zeit in Deutschland führend und in den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie zu finden [18]. Dabei handelt es sich um das absolute Risiko eines Patienten in den nächsten zehn Jahren ein tödliches kardiovaskuläres Ereignis zu entwickeln. Es wird aus den Risikofaktoren Alter, Geschlecht, Rauchverhalten, systolischer Blutdruck und Gesamtcholesterol mit Hilfe von Tabellen errechnet, so dass entsprechende Interventionsstrategien eingeleitet werden können. Personen, bei denen bereits eine kardiovaskuläre Erkrankung, ein Diabetes mellitus Typ 2 oder Typ 1 mit Mikroalbuminurie, eine mäßige oder schwere chronische Nierenerkrankung bekannt ist, werden der höchsten Risikokategorie "sehr hohes Risiko" zugeordnet. Das gleiche gilt für Patienten mit einem errechneten 10-Jahres-Risiko von 10 % auf der Basis von SCORE. Für Hochrisikopatienten ist beispielsweise eine Senkung des LDL-Cholesterols (LDL-C) < 70 mg/dl anzustreben.

Ein SCORE zwischen 5 - 10 % oder eine starke Erhöhung einzelner Risikofaktoren wie familiäre Dyslipoproteinämien sind in der Risikokategorie "hohes Risiko" inbegriffen. Der LDL-C Zielwert liegt bei < 100 mg/dl. Ein mäßig erhöhtes Risiko gilt für Personen mit einem SCORE von 1-5 % mit anzustrebenden LDL-Werten < 115 mg/dl gefolgt von der Kategorie "niedriges Risiko". Bei besonders ausgeprägten vorliegenden Risikofaktoren sind noch weitere Modifizierungen möglich.

Eine weitere Einschätzung des atherogenen Potenzials der Blutfettwerte eines Individuums kann mittels einer Messung der Apolipoprotein B (Apo B)-Serumkonzentration erfolgen. Das Apo B-100 ist ein Strukturprotein und dient dem jeweiligen Lipoprotein der Bindung an den LDL-Rezeptor und damit der Aufnahme in die Zelle. Zusätzlich hat es enzymatische Eigenschaften und aktiviert die Lysolecithin-Acyltransferase. Es ist auf dem VLDL (Very Low Density Lipoprotein), IDL (Intermediate Density Lipoprotein), LDL und Lp(a) enthalten, nicht jedoch auf dem HDL. Die Anzahl der Apo B tragenden Partikel stellt in diesem Zusammenhang einen besseren Vorhersagewert für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung dar als das LDL-C [2, 19].

Lp(a) kann isoliert oder im Rahmen von kombinierten Hyperlipoproteinämien im Blutplasma erhöht sein. Die isolierte Lp(a)-Erhöhung ist sehr selten, so dass im Folgenden nicht zwischen einer isolierten und kombinierten Lp(a)-Erhöhung unterschieden wird [20].

Die Bedeutung des Lipoprotein(a) und der Hyperlipoproteinämie(a) soll in dieser Arbeit näher erläutert und neben dem kardiovaskulären vor allem in den genetischen Kontext eingefügt werden.

Hyperlipoproteinämie	Veränderte Plasmalipide	Erbgang	Genbeteiligung	Häufigkeit	Arteriosklerose- risiko
Polygene Hypercholesterinämie	Cholesterol ↑, LDL-C ↑	polygen	polygen	sehr häufig	hoch
Familiäre Hypercholesterinämie	Cholesterol ↑, LDL-C ↑	dominant	<i>LDLR</i> (70-80 %), <i>APOB</i> (5,5 %), <i>PCSK9</i> (1,5 %)	heterozygot 1:500, homozygot 1:1 Mio.	hoch, extrem hoch
Familiär kombinierte Hyperlipoproteinämie	Cholesterol ↑, Triglyzeride ↑	dominant	<i>APOA1/CIII/AIV</i> ; <i>LPL</i>	1:300	hoch
Familiäre Dysbetalipoproteinämie	Cholesterol ↑, Triglyzeride ↑	rezessiv	<i>APOE</i>	1:5000	hoch
Sporadische Hypertriglyzeridämie	Triglyzeride ↑	polygen	polygen	häufig	unklar
Familiäre Hypertriglyzeridämie	Triglyzeride ↑	dominant	<i>LPL</i> , <i>APOC2</i> , <i>APOA5</i> , <i>APOE</i>	1:500	keines
Familiärer Lipoproteinlipase- oder Apolipoprotein-C-II Mangel	Triglyzeride ↑, Chylomikronen ↑	rezessiv	<i>APOC2</i> , <i>APOA5</i>	sehr selten	keines
Familiäre Hypoalpha- lipoproteinämie	HDL-Cholesterol ↓	rezessiv	<i>APOA1</i> , <i>LCAT</i> , <i>ABCA1</i>	selten	erhöht
Abetalipoproteinämie	Cholesterol stark ↓, APOB-haltige Lipoproteine ↓	rezessiv	<i>MTP</i>	selten	erniedrigt
Familiäre Hypobetalipoproteinämie	homozygot wie Abetalipoproteinämie, heterozygot Cholesterol ↓ / Triglyzeride ↓	dominant	<i>APOB</i> (64 %)	selten	erniedrigt
Hyperlipoproteinämie(a)	Lipoprotein(a) ↑	polygen	<i>LPA</i>	häufig	hoch

Tab. 2: Einteilung primärer Hyperlipoproteinämien [2]

1.4 Lipoprotein(a)

Lipoprotein(a) wurde 1963 das erste Mal von K. Berg beschrieben [21]. Nach nun 50 Jahren ist jedoch sowohl über die pathophysiologische als auch die primäre physiologische Rolle dieses Lipoproteins wenig bekannt und auch die genetische Determinierung ist noch nicht vollständig geklärt.

1.4.1 Struktur

Lp(a) besteht aus einem cholesterolreichen LDL-ähnlichen Partikel, dessen Apo B-100 über eine Disulfidbrücke an ein zusätzliches Apolipoprotein(a) (Apo(a)) im Verhältnis 1:1 gebunden ist [22]. Die Disulfidbrücke wird vom Cystein 67 des Apo(a) Kringle IV-Typ 9 und Cystein 3734 des Apo B-100 gebildet [23, 24]. Zusätzlich spielen nicht-kovalente Bindungen beim Zusammenbau des Komplexes eine Rolle [25].

Apo(a) ist ein Glykoprotein und gehört zur Superfamilie der Plasminogene. Es weist eine starke Strukturhomologie zu dem antikoagulatorisch wirksamen Proenzym Plasminogen auf und es ist davon auszugehen, dass es sich im Laufe der Evolution durch Duplikation, Deletion, Genkonversion und Mutation aus diesem entwickelt hat [26, 27].

Plasminogen besitzt neben einer Proteasedomäne fünf Kringle-Domänen, die Kringle (K I bis K V) genannt werden. Während die Protease des Apo(a) als inaktiv gilt, sind die Kringle Domänen IV und V sehr ähnlich. K V stellt bei beiden Proteinen eine einfache Struktur dar. K IV besteht aus zehn unterschiedlichen Typen, wobei die Typen 1 und 3-10 einfach vorkommen, während die K IV-Typ 2-Struktur des Apo(a) aus 2 bis 40 Kopien besteht und dadurch dessen Molekulargewicht zwischen 300 und >700 kDa variiert. Anhand des Molekulargewichts lassen sich über 30 Apo(a)-Isoformen ableiten [26, 28, 29, 30, 31]. Kleine Apo(a)-Isoformen enthalten weniger als 22 K IV-Typ 2-Kopien und sind dementsprechend niedermolekular [31].

Personen, die heterozygot für Apo(a) sind, besitzen im Plasma zwei verschiedene Apo(a)-Isoformen mit differierender Dichte, wobei die kleinere Isoform meist in der höheren Konzentration vorliegt [31]. Manche Allele sind mit einer so geringen Konzentration assoziiert, dass sie als "operative Null-Allele" bezeichnet worden sind [32].

Im Gegensatz zu Plasminogen kann die Protease des Apo(a) nicht durch tissue plasminogen activator (tPA), Urokinase oder Streptokinase aktiviert werden [33].

1.4.2 Funktion

Eine mögliche physiologische Funktion des Lp(a) könnte ursprünglich ein Beitrag zur Wundheilung bei einem Gewebeschaden oder einer Gefäßverletzung gewesen sein. Apo(a) fungiert dabei als Akute-Phase-Protein und wird im Falle eines Gewebe- oder Gefäßschadens Interleukin 6 (IL-6)-abhängig verstärkt hepatisch synthetisiert [34]. Lp(a) kann daraufhin im Bereich des verletzten Gewebes über zahlreiche Rezeptorfunktionen neben Fibrin u.a. an Komponenten subendothelialer Matrix, Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und Thrombozyten binden und akkumulieren [35, 36]. So wird zum einen die Fibrinolyse gehemmt und zum anderen durch wachstumsfaktorähnliche Eigenschaften die Zellregeneration und Wundheilung gefördert. Lp(a) stellt dabei einen wichtigen Cholesterollieferanten dar, der weitgehend unabhängig von ernährungsbedingten schwankenden Cholesterols-Serumkonzentrationen funktioniert [37].

Des Weiteren könnte Lp(a) im Falle eines Vitamin C-Mangels dessen Funktionen teilweise ersetzen und zu einer Verstärkung extrazellulärer Matrix und verzögerter Oxidation von Lipiden führen [38]. Genauere Untersuchungen zu diesen Zusammenhängen stehen noch aus.

Eine weitere Rolle in der Hemmung der Angiogenese wird für die Kringle-Komponenten des Lp(a) diskutiert. Bei der Kanzerogenese ist die ausreichende Gefäßversorgung des proliferierenden Gewebes ein wichtiger Faktor. Die Inhibition der Angiogenese würde zum Gewebeeruntergang führen oder zumindest einer Ausbreitung entgegenwirken. In Tierversuchen und Experimenten mit Zelllinien konnten für die Kringle Typen 1-5 tumorverkleinernde und metastasenhemmende Eigenschaften beobachtet werden [39]. Beim Menschen wurden erhöhte Lp(a)-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit Brust- und Lungenkrebs beschrieben [40, 41]. Inwiefern Lp(a) allerdings als Gesamtkomplex Einfluss auf die Kanzerogenese hat, ist unklar. So publizierten Marrer et al. 2012, dass keine sichere Evidenz für einen Zusammenhang einer Lp(a)-Erhöhung mit verschiedenen Karzinomformen (u.a. Prostata, Lunge, Kolon) besteht [42].

Trotz der oben genannten möglichen physiologischen Funktionen von Lp(a) hat dessen Fehlen scheinbar keine Auswirkungen bei Individuen mit so genannten Null-Allelen im Sinne eines Defizienz-Syndroms [43]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die ursprüngliche Funktion des Lp(a) im Laufe der Evolution verloren gegangen oder anderweitig ersetzt worden ist.

Erhöhte Lp(a)-Plasmakonzentrationen gelten als unabhängiger genetischer Risikofaktor für die Entwicklung einer frühzeitigen Arteriosklerose und somit hat dessen weitere Erforschung eine besondere Relevanz [44, 45].

1.4.3 Genetik

Das für Apo(a) kodierende Gen *LPA* ist auf dem langen Arm von Chromosom 6q26-27 lokalisiert und besteht aus 134892 Basenpaaren (bp) (160952515-161087407). Aus *LPA* können drei

Transkripte angefertigt werden:

- LPA 001 bestehend aus 6414 bp mit 39 proteinkodierenden Exons
- LPA 201 bestehend aus 6490 bp mit 39 proteinkodierenden Exons
- LPA 002 bestehend aus 465 bp, nicht proteinkodierend

Trotz der unterschiedlichen Basensequenz kodieren die Transkripte LPA 001 und 201 das gleiche Protein.

LPA ist neben dem Plasminogenen (*PLG*) lokalisiert und mit diesem eng gekoppelt [28].

Ein K IV-Motiv hat eine genomische Größe von 5,5 kb und besteht aus zwei Exons und zwei Introns. Der Größenpolymorphismus der K IV-Typ 2-Isoformen lässt sich durch multiple kodominant vererbte Allele an einem Genort erklären [31].

Eine weitere Besonderheit des Apo(a)-Gens stellt der Pentanukleotid-Sequenzpolymorphismus (PNRP) mit sechs bis elf Wiederholungen der TTTTA-Sequenz in der *LPA* Promotor-Region dar.

1.4.4 Metabolismus

Lp(a) wird in der Leber produziert und zirkuliert im Blutplasma [46]. Nach Sekretion des Apo(a) durch die Hepatozyten wird es vermutlich erst extrazellulär an der Plasmamembran an ein LDL-Partikel und Apo B gebunden [47]. Das endoplasmatische Retikulum sezerniert große Apo(a)-Isoformen mit vielen K IV-2 Kopien weniger stark als kleine Apo(a) Partikel und trägt somit zu erniedrigten Lp(a)-Plasmakonzentrationen bei [48]. Der Abbau ist noch weitgehend unklar, wobei von einer Beteiligung der Nieren auszugehen ist [49]. So sind Lp(a)-Plasmakonzentrationen bei Individuen mit chronischer Niereninsuffizienz erhöht und zudem wurden Apo(a)-Fragmente im Urin nachgewiesen [50].

1.4.5 Plasmakonzentration

Die Lp(a)-Plasmakonzentration ist in hohem Maß genetisch determiniert. Kodiert wird der Lp(a)-Plasmaspiegel durch ein Hauptgen mit mehreren Allelen vor einem polygenen Hintergrund [51]. Variationen zwischen <0,5 bis 400 mg/dl konnten beobachtet werden, wobei der Plasmaspiegel bei einem einzelnen Individuum relativ konstant bleibt [31].

Zudem konnten populationsspezifische Unterschiede sowohl in der Verteilung als auch im Mittelwert festgestellt werden. Während sich bei europäischen und asiatischen Populationen

eine schiefe Verteilung der Lp(a)-Plasmakonzentration mit starker Tendenz zu niedrigen Werten zeigt, liegt bei der schwarzafrikanischen Bevölkerung eine eher Gauß'sche Verteilung mit zudem viel höheren Mittelwerten vor [52]. Von einer Erhöhung der Lp(a)-Plasmakonzentration wird bei Werten > 30 mg/dl gesprochen.

Reguliert wird die Lp(a)-Plasmakonzentration über die Apo(a)-Sekretionsrate. Die Apo(a)-Synthese und Sekretion wird u.a. transkriptional und posttranslational modifiziert. Hohe Lp(a)-Spiegel gehen mit einer erhöhten Promotoraktivität mindestens eines der Allele einher. Die Höhe der Lp(a)-Plasmakonzentration wird dabei von dem Allel mit der höheren Promotoraktivität bestimmt [53]. Die posttranslationale Glykosylierung des Apo(a) stellt einen wichtigen Faktor für dessen Sekretion und damit auch für die Lp(a)-Plasmakonzentration dar [54].

Weiteren Einfluss auf den Lp(a)-Spiegel nehmen genetische Polymorphismen die in Abschnitt 1.5 genauer diskutiert werden.

1.5 Lipoprotein(a) als kardiovaskulärer Risikofaktor

Erhöhte Lp(a)-Plasmakonzentrationen gelten als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse inklusive peripherer vaskulärer und zerebrovaskulärer Erkrankungen, sowie frühzeitiger koronarer Herzkrankheit (KHK) [45, 55, 56].

Danesh et al. beschrieben in einer Metaanalyse aus 27 prospektiven Studien ein um 70% erhöhtes Risiko für die Entstehung einer KHK bei Vorliegen von Lp(a)-Plasmakonzentrationen im oberen Drittel im Vergleich zu denen im unteren Drittel [55]. In der Copenhagen City Heart Study mit insgesamt 9330 Teilnehmern und einem Beobachtungszeitraum von 10 Jahren konnte ein 3-4 fach erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt bei Lp(a)-Plasmakonzentrationen über der 95. Percentile gezeigt werden, wobei ein Ansteigen des Risikos schon für moderat erhöhte Lp(a)-Spiegel beobachtet wurde [57].

Die atherogene Wirkung von Lp(a) ist dabei unabhängig von LDL-Cholesterol und HDL-Cholesterol, wobei das relative Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit hohen Lp(a)-Plasmakonzentrationen signifikant mit hohen LDL-Cholesterolwerten steigt [58].

Ein möglicher Ansatz für die Erklärung des prothrombotischen Pathomechanismus ist dabei die Strukturhomologie zwischen Apo(a) und Plasminogen, wobei Apo(a) die Plasminogenbindung an Endothelzellen kompetitiv hemmt und die Proliferation glatter Muskelzellen steigert. Sowohl die Bildung einer Thrombose als auch arteriosklerotischer Plaques könnte dadurch stimuliert werden [26, 59, 60].

Eine weitere Erklärung kann die Fähigkeit des Lp(a) sein, oxidierte Phospholipide zu binden [61]. Im Vergleich zu anderen Lipoproteinen bindet Lp(a) mit der Apo B-00 Komponente

bevorzugt oxidierte Phospholipide, die bei Vorliegen von erhöhten Plasmakonzentrationen mit der Arteriosklerose der A. carotis und A. femoralis assoziiert wurden [62]. So wurde auch direkt die Akkumulation von Lp(a) an den Arterienwänden als Hinweis für einen Zusammenhang zur Arteriosklerose beschrieben [63]. In-vitro-Studien haben gezeigt, dass es hier auch die Invasion von Monozyten auslöst und die Schaumzellbildung verstärkt [31].

Auf genetischer Ebene sind Apo(a)-Isoformen mit weniger als 22 K IV-2 Kopien mit einem erhöhten Risiko für kardio- und zerebrovaskuläre Ereignisse assoziiert [64]. In einer Studie von Kamstrup et al. wurde sogar ein schrittweises Ansteigen des Risikos für einen Myokardinfarkt mit abnehmenden K IV-2 Kopien beschrieben [65].

Eine ähnliche Korrelation konnte für den Polymorphismus PNRP in der *LPA*-Promotor-Region gezeigt werden. Individuen mit weniger als 16 Wiederholungen der Pentanukleotidsequenz haben ein erhöhtes Risiko für eine KHK [66].

Darüber hinaus wurden mehrere single nucleotide polymorphisms (SNPs) im *LPA*-Gen identifiziert, die sowohl mit erhöhten Lp(a)-Plasmakonzentrationen, als auch mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert sind. Die weitere Erforschung dieser SNPs und ihre mögliche Tauglichkeit als kardiovaskuläre Biomarker werden zukünftig noch intensiviert werden.

1.6 Modifikationen der Lp(a)-Plasmakonzentrationen

Nach der Entdeckung von Lp(a) als kardiovaskulären Risikofaktor wurden zahlreiche Therapiemöglichkeiten zur Senkung der Lp(a)-Plasmaspiegel etabliert und erforscht. Die am weitesten verbreiteten Ansätze werden im Folgenden kurz dargestellt.

1.6.1 Nicht-medikamentöse Modifikationen

Lebensstilmodifikation im Sinne von Ernährungsoptimierung, Nikotinkarenz und sportlicher Aktivität beeinflussen die Lp(a)-Plasmaspiegel nicht [67]. Eine Senkung der LDL-Cholesterolspiegel bei Patienten mit erhöhten Lp(a)-Plasmakonzentrationen bewirken allerdings eine Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse, so dass eine Anpassung des Lebensstils trotzdem empfohlen werden sollte [68].

1.6.2 Medikamentöse und invasive Modifikationen

Bislang waren Nikotinsäurepräparate die einzig etablierte medikamentöse Therapie, für die in hohen Dosen wiederholt eine Senkung von Lp(a)-Plasmakonzentrationen von 30-40% nachge-

wiesen werden konnten [69]. Nikotinsäure (Niacin) reduziert den Fluß von freien Fettsäuren aus dem viszeralen Fettgewebe in die Leber. Dieser antilipolytische Effekt bewirkt eine Abnahme von Apo B-100 enthaltenen Lipoproteinen [70, 71]. Der genaue Wirkmechanismus von Niacin ist noch weitgehend unklar. Neben der Senkung der Plasmaspiegel von Gesamtcholesterol, LDL-Cholesterol, VLDL-Cholesterol, Lp(a) und Triglyzeriden hat es einen steigernden Effekt auf HDL-Cholesterolspiegel und Apolipoprotein A-1 [72]. Dabei reduziert es insbesondere die kleinen, dichten LDL-Partikel, für die ein besonders ausgeprägtes atherogenes Potenzial belegt wurde. Der Einsatz dieser Präparate war durch u.a. gastrointestinale Nebenwirkungen und Flushsymptomatik limitiert. Das im Jahr 2009 auf den Markt gebrachte Tredaptive® kombinierte 1g Niacin mit retardierter Freisetzung und 20 mg Laropiprant, einem Prostaglandin D2-Rezeptor-Subtyp 1-Antagonisten zur Flushhemmung. Es war indiziert zur Behandlung der kombinierten Dyslipoproteinämie und der primären Hypercholesterinämie. Es sollte bei Patienten angewandt werden, bei denen eine Statin-Monotherapie nur zu unzureichender Senkung der Lipidwerte geführt hat, wobei in erster Linie eine Kombinationstherapie von Tredaptive® mit dem jeweiligen Statin angestrebt werden sollte. Nur bei einer Statinunverträglichkeit oder anderen Kontraindikationen für eine Statintherapie sollte Tredaptive® als Monotherapie verabreicht werden.

In der HPS2-THRIVE-Studie der Oxford Universität wurde die Statin-Monotherapie mit der Tredaptive®/Statin-Kombinationstherapie verglichen. Der primäre Endpunkt war die Reduktion schwerwiegender vaskulärer Ereignisse [73]. Im Januar 2013 wurde der Vertrieb von Tredaptive® nach vorläufigen Ergebnissen der besagten Studie eingestellt. Zum einen wurde der primäre Endpunkt nicht erreicht, so dass in der Studienpopulation mit der verabreichten Kombinationstherapie nicht signifikant weniger vaskuläre Ereignisse auftraten, als in der Gruppe mit der Monotherapie. Zusätzlich stieg in der Studienpopulation, die Tredaptive® erhielt die Inzidenz einiger schwerwiegender, nicht-tödlicher unerwünschter Ereignisse wie z. B. in besonders ausgeprägtem Maße bei der chinesischen Studienpopulation die Myopathie [73]. Zur Zeit stehen damit keine etablierten medikamentösen Therapien zur Senkung der Lp(a)-Plasmakonzentration in Europa zur Verfügung. Weitere Therapieansätze befinden sich jedoch in der klinischen Testung.

In einer doppelblinden placebokontrollierten Studie mit Patienten mit Hypercholesterinämie und Statinunverträglichkeit konnten Visser et al. für Mipomersen neben der Reduktion von LDL-Cholesterol, Gesamt-Cholesterol, Apo B und Triglyzeriden auch eine signifikante Senkung der Lp(a)-Plasmakonzentration um 27 % nachweisen [74]. Dabei handelt es sich um einen Apo B-100-Synthesehemmer, einem Anti-Sense-Oligonukleotid, das die hepatische Apo B-100 mRNA bindet und somit dessen Translation blockiert. Es befindet sich zur Zeit in der Phase III einiger klinischer Studien und soll für Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie und hohem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen zugelassen werden. Weitere Voraussetzungen sind LDL-Cholesterol-Spiegel, die sich trotz ausgereizter lipidsenkender Medikation nicht im

angestrebten Zielbereich befinden oder bei Vorliegen einer Statinunverträglichkeit. Der Ausschuss für Humanarzneimittel (CHMP) der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) hat sich im Dezember 2012 allerdings vorerst gegen eine Zulassung von Mipomersen zur Behandlung von Patienten mit homozygoter familiärer Hypercholesterinämie ausgesprochen.

Ebenfalls noch in der klinischen Testung befindet sich der Cholesterolester-Transferprotein (CETP)-Inhibitor Anacetrapib. CETP ist zum einen beim Cholesterolestertransport von HDL auf LDL und VLDL beteiligt und zum anderen beim Transfer zwischen den HDL-Frakturen. Cannon et al. konnten in einer doppelblinden placebokontrollierten Studie mit Patienten, bei denen bereits eine KHK bekannt ist oder die in die Hochrisikokategorie nach SCORE eingeordnet werden können, die erwartete signifikante Reduktion des LDL-Cholesterols und Erhöhung des HDL-Cholesterols und als Nebeneffekt eine Senkung der Lp(a)-Plasmakonzentration um 36,4 % nachweisen [75].

Für das Schilddrüsenhormonanalogen Eprotirom wurde bei Patienten mit Hypercholesterinämie, die bereits eine Statintherapie mit Simvastatin oder Atorvastatin erhielten, zusätzlich zur Senkung von LDL-Cholesterol, Apo B und Triglyzeriden auch eine Reduktion der Lp(a)-Plasmakonzentration beschrieben [76].

Eine vielversprechende Lp(a)-Senkung von bis zu 32 % wurde kürzlich in der LAPLACE-TIMI 57 Studie für den humanen monoklonalen PCSK9-Antikörper AMG145 beschrieben [77]. PCSK9 bindet an den LDL-Rezeptor und führt über dessen lysosomalen Abbau zu erhöhten LDL-Konzentrationen. AMG145 führte bei Patienten mit Hypercholesterinämie, die gleichzeitig eine Statintherapie erhielten dosisabhängig zu einer LDL-Cholesterol-Reduktion von bis zu 66 % [77].

Die Interaktion zwischen IL-6 und Lp(a) im Falle einer Akuten-Phase-Reaktion wurde bereits beschrieben. Dieser Ansatz wurde weiterverfolgt, als der Therapieeffekt des IL-6-Rezeptorantagonisten Tocilizumab auf den Lp(a)-Spiegel untersucht wurde und dessen signifikante Senkung gezeigt werden konnte [78]. Weitere Studien zu diesem Zusammenhang müssen noch folgen.

Bei Patienten mit bekannter KHK bewirkt Acetylsalicylsäure (ASS) vermutlich über mehrere Mechanismen eine Reduktion der Lp(a)-Plasmakonzentration. Angriffspunkt des ASS ist hierbei die Apo(a)-Promotorregion. Die Expression der Apo(a)-mRNA wird durch ASS dosisabhängig unterdrückt. Die hepatische Syntheserate des Apo(a) ist somit reduziert. Zudem wird die IL-6 abhängige Apo(a)-Bildung durch ASS gehemmt [79]. Inwiefern der bereits bekannte antiatherogene Effekt des ASS durch diese Mechanismen unterstützt wird, ist unklar.

Die effektivste Methode mit einer Senkung der Lp(a)-Plasmaspiegel von 50% und mehr ist eine Lipidapherese [80, 81]. Bei diesem Verfahren wird dem Blut extrakorporal mittels verschiedener Techniken Lipoprotein entzogen. Es ist bei Vorliegen einer isolierten Hyperlipoproteinämie(a) ab

einer Lp(a)-Konzentration von > 60 mg/dl und dem gleichzeitigen Vorliegen einer progredienten kardiovaskulären Erkrankung unter ausreichender Behandlung weiterer Risikofaktoren indiziert [20]. In einer retrospektiven klinischen Studie mit 37 Apheresepatienten mit Hyperlipoproteinämie(a) wurden signifikant weniger kardiovaskuläre Ereignisse während der Apheresetherapie im Vergleich zu dem Zeitraum über ein Jahr vor Beginn der Apherese beobachtet [82]. Daraus lässt sich abschätzen, dass möglicherweise das Fortschreiten einer bereits bestehenden Arteriosklerose durch die Apheresetherapie unterbunden bzw. abgeschwächt wird [82]. Aufgrund fehlender randomisierter klinischer Studien ist ein eindeutiger Nutzen dieses Verfahrens jedoch weiterhin nicht belegt.

2009 untersuchten Jaeger et al. in einer multizentrischen klinischen Studie die Wirksamkeit einer Lipidapherese in Kombination mit maximal verträglicher lipidsenkender Medikation im Vergleich zur alleinigen medikamentösen Therapie bei 120 Patienten mit bekannter KHK. Als Endpunkte wählte man die Reduktion der Lp(a)-Plasmakonzentration und die Senkung schwerer kardialer Ereignisse. Bei den Patienten, die eine Kombinationstherapie erhielten, konnte eine mittlere Senkung der Lp(a)-Spiegel von 4 µmol/l auf 1,07 µmol/l erreicht werden und zudem traten signifikant seltener schwerwiegende kardiale Ereignisse auf [80]. Die Studienpopulation zeichnete sich durch extrem hohe, allerdings nicht isoliert erhöhte Lp(a)-Spiegel aus und ist in die Hochrisikokategorie für kardiovaskuläre Ereignisse einzustufen. Diese Aspekte müssen bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Die Apheresetherapie ist ein kostenaufwändiges und invasives Verfahren, das wöchentlich über mehrere Stunden angewandt werden muss. Die Lebensqualität bei Patienten, die regelmäßig eine Apheresetherapie erhalten, wurde in einer in der Lipidambulanz der Charité-Campus Virchow Klinikum durchgeführten Studie als herabgesetzt im Vergleich zur Normalbevölkerung mit besonderem Schwerpunkt der psychischen Komponente eingestuft [83].

Trotz der zahlreichen medikamentösen und interventionellen Ansätze den Lp(a)-Spiegel zu senken, muss dennoch angemerkt werden, dass Endpunktstudien, die eine tatsächliche signifikante Senkung kardiovaskulärer Ereignisse durch die herbeigeführte Lp(a)-Reduktion bestätigen bislang fehlen.

1.7 Genetische Polymorphismen mit Einfluss auf den Lipoprotein(a)-Plasmaspiegel

Folgende Angaben der Lp(a)-Plasmaspiegelvariabilität sind auf die kaukasische Bevölkerungsgruppe bezogen, die auch die Population dieser Studie darstellt.

Das für Apo(a) kodierende Gen *LPA* befindet sich auf Chromosom 6q26-27. 70-90% der Lp(a)-Plasmalevelvariabilität lassen sich durch Sequenzvariationen im *LPA*-Gen erklären [28, 84]. Die

Identifizierung dieser Polymorphismen ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen. Der Einfluss darüber hinaus gehender Loci ist weitgehend unklar. Bei der Interpretation genetischer Einflussfaktoren auf den Lp(a)-Spiegel muss durch den starken Einfluss des *LPA*-Hauptgens auf Kopplungsungleichgewichte besonders zur K IV-2 Struktur geachtet werden, wenn man die tatsächliche Signifikanz eines genetischen Polymorphismus belegen möchte [31].

Die betreffende Chromosomenposition kann individuell zwei unterschiedliche Allele aufweisen. Das ursprüngliche Allel unterscheidet sich im Falle des SNPs durch einen Nukleotidaustausch vom neuen Allel, für das ein Zusammenhang zur Lp(a)-Plasmakonzentration bereits beschrieben wurde bzw. eine Assoziation vermutet wird. Guanin (G) und Adenin (A) gehören dabei zu den Purinbasen und Cytosin (C) und Thymin (T) zu den Pyrimidinbasen.

1.7.1 Genetische Polymorphismen im *LPA*-Gen

Sequenzpolymorphismen

Den stärksten Einfluss auf den Lp(a)-Plasmaspiegel nimmt der K IV-2 Sequenzpolymorphismus mit ca. 40% [28, 85]. Weitere 10-14 % lassen sich durch den Pentanukleotid-Sequenzpolymorphismus in der *LPA*-Promotor-Region erklären [34, 86].

K IV-2 Sequenzpolymorphismus

Die Anzahl der K IV-2 Wiederholungseinheiten ist genetisch determiniert und liegt zwischen zwei und 40 Kopien. Aus diesem Grund sind mehrere Apo(a)-Isoformen abzugrenzen, deren Molekulargewicht und damit auch die Lp(a)-Plasmaspiegel sehr variabel sind [28].

Das Molekulargewicht bzw. die Größe von Apo(a) ist invers mit dem Lp(a)-Plasmaspiegel korreliert, wobei für die jeweilige Apo(a)-Isoform keine durchschnittliche Lp(a)-Plasmakonzentration abgeleitet werden kann [28, 32]. Diese Abhängigkeit lässt sich durch eine gesteigerte Syntheserate und Abgabe der Leber von kleinen Apo(a)-Partikeln erklären [87].

Pentanukleotid-Sequenzpolymorphismus (PNRP)

Der PNRP in der *LPA*-Promotor-Region umfasst sechs bis elf Wiederholungen der TTTTA-Sequenz, die vermutlich eine Veränderung der Promotoraktivität und damit der Lp(a)-Plasmaspiegel bewirken [34]. Die Wiederholungsrate von acht TTTTA-Sequenzen ist dabei am häufigsten vertreten [86]. Ebenso wie der K IV-2, jedoch davon unabhängig ist der PNRP invers

mit dem Lp(a)-Plasmaspiegel korreliert [86, 88]. Eine systematische Korrelation zwischen der Anzahl der PNR-Sequenzen und dem durchschnittlichen Lp(a)-Plasmaspiegel konnte nicht festgestellt werden [86].

Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

In einer GWAS mit einer Studienpopulation von 386 Hutterern konnten Ober et al. sechs SNPs identifizieren, die signifikant mit der Lp(a)-Plasmakonzentration assoziiert sind (siehe Tabelle 3). In einer Replikationskohorte (CLEAR-Kohorte) bestehend aus 1054 Teilnehmern, die nach Vorliegen einer Arteriosklerose der A. carotis (CAAD) selektiert wurden, konnte der SNP rs6919346 im *LPA*-Gen Intron 37 mit zusätzlicher Assoziation zur CAAD und Unabhängigkeit von K IV-2 Kopien repliziert werden [3].

SNPs	Gen auf Chromosom 6	Studienpopulation Lp(a) p-Wert	Replikationskohorte Lp(a) p-Wert
rs7745725	<i>SYNE 1</i> , Intron 3	0.00064	nicht durchgeführt
rs6917698	<i>ARID1B</i> , Intron 6	0.00057	nicht signifikant
rs9364496	<i>SYTL3</i> , Intron 5	0.00322	nicht signifikant
rs8191829	<i>IGF2R</i> , Intron 21	0.00164	nicht signifikant
rs14224	<i>PLG</i> , Exon 7	0.00944	0.0036
rs6919346	<i>LPA</i> , Intron 37	0.00030	3.83×10^{-11}

Tab. 3: p-Werte und Lokalisation der SNPs mit Assoziation zur Lp(a)-Plasmakonzentration in der Studienpopulation und Replikationskohorte von Ober et al. [3]

Die relevanten SNPs aus drei Genotypisierungsstudien, in denen der HumanCVD BeadChip mit 40 enthaltenen SNPs der *LPA*-Region verwendet wurde, sind in der folgenden Tabelle 4 auf der nächsten Seite zusammengefasst. Dabei handelt es sich um einen Genchip zur Diagnostik von Markern, die u.a. im Zusammenhang mit kardiovaskulären Ereignissen beschrieben wurden.

Clarke et al. untersuchten dabei 1822 Teilnehmer aus der PROCARDIS-Kohorte, die nach Vorliegen einer KHK ausgewählt wurden. Eine Replikation der Ergebnisse wurde in drei unabhängigen Populationen, die ebenfalls nach kardiovaskulären Erkrankungen selektiert wurden, durchgeführt [4].

Lanktree et al. selektierten eine multiethnische Population mit u.a. 272 Europäern nach kardiovaskulären Risikofaktoren und berücksichtigten bei ihrer Analyse die Assoziation der untersuchten *LPA*-SNPs mit den K IV-2 Kopien [5].

Die Studienpopulation bei Ronald et al. bestand aus 530 Teilnehmern mit CAAD und 770 Kontrollen. Eine Assoziation der untersuchten SNPs zusätzlich zur Lp(a)-Plasmakonzentration konnte für die CAAD nicht bestätigt werden [89].

Der SNP rs10455872 im *LPA*-Gen Intron 25 zeigte dabei in allen Populationen signifikante Assoziationen mit Lp(a)-Plasmaspiegeln und bei Clarke et al. zusätzlich mit der koronaren Herzkrankung und niedriger Anzahl der K IV-2 Kopien [4, 5, 89]. Gemeinsam mit dem rs3798220 (gleiche Assoziationen wie rs10455872) wurde für diese beiden SNPs eine Beteiligung an der Lp(a)-Plasmaspiegelvariabilität zu 36% beschrieben [4].

SNPs auf <i>LPA</i>	Clarke et al. Lp(a) p-Wert	Lanktree et al. Lp(a) p-Wert	Ronald et al. Lp(a) p-Wert
<i>rs3798220</i>	5.9×10^{-51} , OR bei Replikation 1.68 (1.43-1.98)	nicht durchgeführt	9.5×10^{-14}
<i>rs10455872</i>	3.6×10^{-166} , OR bei Replikation 1.47 (1.35-1.60)	4.2×10^{-23}	6.2×10^{-62}
rs3127596	1.5×10^{-14}	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
rs11751605	5.9×10^{-28}	7.6×10^{-6}	9.4×10^{-8}
rs10755578	3.4×10^{-13}	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
<i>rs6415084</i>	2.7×10^{-9}	5.3×10^{-7}	5.6×10^{-3}
rs9365171	4.0×10^{-11}	2.9×10^{-6}	nicht durchgeführt
rs6923877	2.4×10^{-11}	6.2×10^{-8}	nicht durchgeführt
<i>rs3798221</i>	2.0×10^{-9}	2.5×10^{-6}	1.7×10^{-7}
rs7765781	2.1×10^{-11}	8.1×10^{-8}	nicht durchgeführt
<i>rs13202636</i>	2.0×10^{-14}	1.3×10^{-6}	nicht durchgeführt
rs9355813	2.8×10^{-17}	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
rs10945682	1.8×10^{-17}	2.5×10^{-9}	nicht durchgeführt
rs7765803	2.4×10^{-11}	8.5×10^{-8}	nicht durchgeführt
rs1321195	4.0×10^{-7}	nicht durchgeführt	2.4×10^{-6}
rs6919346	1.6×10^{-16}	6.0×10^{-6}	6.3×10^{-1}

Tab. 4: p-Werte der SNPs mit Assoziation mit der Lp(a)-Plasmakonzentration aus drei Genotypisierungsstudien mit Verwendung des HumanCVD BeadChips; die kursiv gedruckten SNPs zeigen eine zusätzliche Assoziation mit der Anzahl der K IV Typ 2 Kopien [4, 5, 6].

Dumitrescu et al. identifizierten in einer multiethnischen Studie mit u.a. 2269 “non-hispanic whites” drei SNPs, die insgesamt zu 7% an der Lp(a)-Plasmaspiegelvariabilität beteiligt sind. Die zusätzliche Assoziation mit den K IV-2 Kopien wurde in dieser Studie jedoch nicht untersucht (siehe Tabelle 5) [7].

SNPs auf <i>LPA</i>	Lp(a) p-Wert
rs6926458	5.29×10^{-6}
rs12194138	2.05×10^{-13}
rs6919346	1.18×10^{-30}

Tab. 5: p-Werte der SNPs mit Assoziation mit der Lp(a)-Plasmakonzentration in der Studienpopulation von Dumitrescu et al. [7]

Eine G => A Substitution in der 1+ donor splice site von K IV-8 wurde mit einer Lp(a)-Defizienz bei Kaukasiern unabhängig von der Anzahl der K IV-2 Kopien beschrieben und ist die Ursache von etwa einem Viertel aller “Null-Allele” [43].

Eine Nonsense Mutation im ersten Exon von K IV-2 g.61C>T führt zu einer trunkierten Apo(a)-Isoform mit daraus resultierenden erniedrigten Lp(a)-Plasmaspiegeln [90].

1.7.2 Genetische Polymorphismen außerhalb des *LPA*-Gens

Nur wenige Studien konnten signifikant assoziierte SNPs identifizieren, die außerhalb von *LPA* liegen. Ober et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Lp(a)-Plasmaspiegel und einem SNP (rs14224) im *PLG*-Gen Exon 7 und validierten diesen Befund in einer Replikationskohorte (siehe Tabelle 3) [3]. Ebenso wurden drei weitere SNPs im *PLG*-Gen von Ronald et al. beschrieben [6].

Wie in Abschnitt 1.6.2. beschrieben, konnte für den IL-6-Rezeptorantagonisten Tocilizumab eine Lp(a)-Reduktion nachgewiesen werden [91]. Für den SNP -174G/C in der IL-6- Promotorregion wurde zudem eine Beeinflussung der IL-6-Plasmakonzentration gezeigt. Dabei sind die beschriebenen Assoziationen je nach Studie nicht konsistent. Bei Wypasek et al. hatten Träger des C-Allels signifikant höhere IL-6-Spiegel als Träger des GG-Wildtyps [92]. Andere Studien konnten eher eine umgekehrte Tendenz feststellen [93]. Nach diesen Erkenntnissen sollte auch der Zusammenhang zwischen dem SNP -174G/C und der Höhe der Lp(a)-Plasmakonzentration untersucht werden. Berthold et al. konnten diese Assoziation nachweisen, wobei Träger des C-Allels mit einer höheren Prävalenz für eine Hyperlipoproteinämie(a) assoziiert sind als Träger des GG-Wildtyps [91]. Lag der Lp(a)-Wert > 60 mg/dl wurde bei dieser Studie von einem erhöhten Lp(a)-Plasmaspiegel gesprochen.

Zum jetzigen Stand der Wissenschaft besteht keine abschließende Bestätigung für genetische Polymorphismen mit signifikanter Assoziation mit der Lp(a)-Plasmakonzentration außerhalb von Chromosom 6.

Zabaneh et al. genotypisierten 48,032 SNPs des HumanCVD BeadChips in einer Studienpopulation mit 5059 Teilnehmern der Whitehall II study und beschrieben vier signifikant assoziierte Loci außerhalb von Chromosom 6. In einer sich anschließenden Metaanalyse konnten diese Ergebnisse mit Ausnahme für den rs17069904 im *TNFRSF11A*-Gen (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a) auf Chromosom 18 mit geringer Signifikanz nicht bestätigt werden [94].

Zwei weitere Loci wurden auf den Chromosomen 2 im *TFPI*-Kandidatengen und 13 nahe *TRPC4* beschrieben [3, 95].

2 Fragestellung

Im Rahmen der BASE-II werden umfangreiche Daten zur Bearbeitung verschiedener Fragestellungen aus dem Bereich des Lipidstoffwechsels und der damit assoziierten Krankheiten erhoben. Zu diesen Analysen gehört auch die Untersuchung von genetischen Assoziationen, wie z.B. der Assoziation mit einzelnen Lipid-Laborparametern. Bei erstmals identifizierten genetischen Assoziationen aus genomweiten Assoziationsstudien ist die Replikation der Ergebnisse an einer unabhängigen Studiengruppe unumgänglich, um Zufallsergebnisse auszuschließen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine solche Replikationskohorte zur Überprüfung von genetischen Assoziationen mit speziellen Lipidparametern zu rekrutieren und in Hinblick auf bereits bekannte genetische Polymorphismen mit Einfluss auf den Lp(a)-Spiegel zu validieren.

Den weitaus größten Einfluss auf die Lp(a)-Plasmaspiegelvariabilität haben verschiedene genetische Polymorphismen im *LPA*-Gen auf Chromosom 6. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Polymorphismen lassen sich in Zukunft wahrscheinlich noch weitere Varianten mit signifikanter Assoziation mit der Lp(a)-Plasmakonzentration finden, da die derzeit bekannten Polymorphismen nicht das gesamte Ausmaß der Lp(a)-Plasmaspiegelvariabilität erklären.

Bisher konnten keine genetischen Assoziationen mit der Lp(a)-Plasmakonzentration außerhalb von Chromosom 6 abschließend bestätigt werden [94].

In dieser Studie wurde ein Untersuchungskollektiv aus ca. 500 Patienten der Fettstoffwechselambulanz der Charité-Universitätsmedizin Berlin rekrutiert, um neben den Routine-Lipidparametern die Lp(a)-Plasmakonzentrationen zu bestimmen. Die Verteilung der Lp(a)-Spiegel der Replikationskohorte sollte dabei mit der BASE-II-Studienpopulation verglichen werden.

Darüber hinaus sollten SNPs, die außerhalb von *LPA* und Chromosom 6 liegen und die aufgrund anderer Studien Kandidaten für eine Assoziation mit Lp(a)-Plasmaspiegeln sind, genotypisiert werden, um weiteren Aufschluss über deren Rolle bei der genetischen Determinierung dieses Lipidparameters zu erhalten (siehe Tabelle 6 auf Seite 28) .

Von Lopez et al. wurde *TFPI* (tissue factor pathway inhibitor / lipoprotein-associated coagulation inhibitor) als Kandidatengen auf dem langen Arm von Chromosom 2 beschrieben. Weitere Untersuchungen in diesem Bereich haben sich allerdings bisher als nicht signifikant erwiesen [95]. *TFPI* kodiert ein Protein mit antithrombotischen Eigenschaften. Der SNP rs7586970 im *TFPI*-Gen soll auf seine Assoziation mit der Lp(a)-Plasmakonzentration überprüft werden.

In der bereits erwähnten Metaanalyse von Zabaneh et al. wurde rs17069904 im *TNFRSF11A* (auch bekannt als *RANK*)-Gen auf Chromosom 18 bereits als signifikant mit Lp(a) assoziiert beschrieben, konnte in unabhängigen Kohorten aber nicht repliziert werden [94]. Dieser SNP soll in unserer unabhängigen Stichprobe genotypisiert und auf Assoziation mit Lp(a) getestet

werden. Dabei unterscheidet sich das jetzige Untersuchungskollektiv von den bisherigen Studienpopulationen durch die zu erwartenden deutlich höheren Lp(a)-Plasmaspiegel und durch ein häufig besonders ausgeprägtes kardiovaskuläres Risiko.

TNFRSF11A kodiert ein zur TNF-Rezeptor Superfamilie gehöriges Protein, das sowohl an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappa B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) als auch der Kinase MAPK8/JNK (Mitogen-activated protein kinase 8/Janus-Kinase) beteiligt ist. So hat dieser Rezeptor mit dem dazugehörigen Liganden einerseits immunologische Funktion und reguliert das Zusammenspiel von T-Zellen und dendritischen Zellen und vermittelt andererseits u.a. die Osteoklastendifferenzierung [96, 97]. Hierbei lässt sich wieder ein direkter Bezug zu den Lipoproteinen herstellen. Da Osteoklasten selber kaum Cholesterin herstellen können, sind sie auf dessen exogene Zufuhr und Regulation angewiesen, so dass bei Entzug dieser Energiequelle die Apoptoserate steigt [98].

In der GWAS von Ober et al. ließ sich eine Lp(a)-Assoziation mit dem in der Nähe des *TRPC4*-Gens (transient receptor potential cation channel 4) lokalisierten SNP rs17210569 auf Chromosom 13 nachweisen. Dies ist der einzige Kandidaten-SNP für eine Assoziation mit dem Lp(a)-Spiegel außerhalb von *LPA* auf Chromosom 6, auf dessen weitere Untersuchung bislang jedoch verzichtet wurde [3]. Dies soll im Rahmen dieser Studie nachgeholt werden. Ein nicht-selektiver calciumabhängiger Kationenkanal wird durch *TRPC4* kodiert. SNPs in diesem Gen wurden bisher mit der idiopathischen generalisierten Epilepsie und Photosensibilität in Verbindung gebracht [99].

Zudem sollen zwei weitere SNPs im *LPA*-Gen genotypisiert werden, deren signifikante Assoziation mit Lp(a)-Plasmaspiegeln bereits in zahlreichen Studien eindeutig beschrieben wurde, so dass der Nachweis einer Lp(a)-Assoziation mit diesen Polymorphismen für die hier untersuchte Kohorte der methodischen Validierung der unternommenen genetischen Assoziationsstudien dienen kann (siehe Tabelle 6 auf der nächsten Seite).

Dafür wurde zum einen rs10455872 im Intron 25 ausgewählt, dessen hohe Signifikanz in einer kürzlich beschriebenen Metaanalyse nochmals bestätigt wurde [94]. Für diesen SNP ist zudem eine Abhängigkeit mit der niedermolekularen Apo(a)-Isoform mit wenigen K IV-Typ 2 Kopien bekannt [94].

Als fünfter SNP soll rs6919346 auf Chromosom 6 in diese Untersuchung einbezogen werden, für den ebenfalls eine Assoziation mit Lp(a)-Plasmaspiegeln durchgängig und hoch signifikant beschrieben wurde. Die Lp(a)-Werte werden durch diesen Polymorphismus unabhängig von den K IV-Typ 2 Kopien beeinflusst [3]. Zudem konnte eine Assoziation mit der CAAD nachgewiesen werden. Da der SNP in einem Intron (Intron 37) gelegen ist und sich in der Nähe des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP response element-binding protein) befindet, kann von einem Einfluss auf die Genexpression ausgegangen werden [3].

dbSNP	Gen	Chromosom	Position	assoziierter Alleltyp
rs7586970	<i>TFPI</i>	2	188343497	C
rs17210569	near <i>TRPC4</i>	13	38523096	T
rs17069904	<i>TNFRSF11A</i>	18	60032949	A
rs10455872	<i>LPA</i>	6	161010118	G
rs6919346	<i>LPA</i>	6	160880349	T

Tab. 6: Ausgewählte SNPs zur Assoziationstestung mit Lp(a)-Plasmaspiegeln

Diese Studie soll weiteren Aufschluss über genetische Assoziationen mit der Lp(a)-Plasmaspiegelvariabilität geben, die außerhalb der *LPA*-Region und Chromosom 6 gelegen sind.

Darüberhinaus soll der Anteil der kardiovaskulären Hochrisikopatienten der Studienpopulation anhand der Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie nach SCORE ermittelt werden. Die Identifizierung der Hochrisikopatienten soll die Ausprägung der Morbidität dieser Studienpopulation verdeutlichen.

Zudem soll das besondere Patientenkollektiv der Fettstoffwechselambulanz als Replikationskohorte genauer charakterisiert werden. Die meisten bisher durchgeführten Studien zu diesem Themenkomplex fanden an primär kardiologischen bzw. kardiovaskulär erkrankten Patienten statt, so dass die Auswahl unseres Patientenkollektivs als ein neuer Ansatz zu werten ist.

3 Methoden

3.1 Rekrutierung der Replikationskohorte

Aus dem Patientenpool der Hochschulambulanz für Fettstoffwechselstörungen der Charité-Universitätsmedizin Berlin wurden 500 Patienten willkürlich unabhängig von Alter, Geschlecht, Lipidstatus und Anamnese rekrutiert. Dadurch konnte eine relative Heterogenität des Patientenkollektivs erreicht werden, das gleichzeitig einen hohen Anteil an Probanden mit Hyperlipoproteinämien aufweist.

Die Patienten werden überwiegend von ihren Hausärzten aufgrund auffälliger Lipidparameter oder zur Ursachenabklärung nach kardiovaskulären Ereignissen in die Ambulanz überwiesen. Weitere Gründe sind Unverträglichkeiten gegen bereits verordnete Lipidsenker oder die Abklärung von möglichen Fettstoffwechselstörungen bei bekannter familiärer Disposition.

Im Rahmen einer Routineuntersuchung erfolgte ein ausführliches Arzt-Patient-Gespräch, wobei das Ziel der Studie, Nutzen, Risiko und Konsequenzen mit dem Studienteilnehmer erörtert wurden.

Bei mündlicher und schriftlicher Einwilligung des Patienten wurden zusätzlich zur Routinelaboruntersuchung zwei 10 ml EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Röhrchen abgenommen, die für die weitere genetische Diagnostik verwendet wurden. Zudem wurde der Puls und Blutdruck gemessen, sowie das Gewicht und die Körpergröße bestimmt.

Folgende Ausschlusskriterien wurden für die Studienpopulation festgelegt:

- Person < 18 Jahre
- Einnahme eines nikotinsäurehaltigen Präparats
- Vorliegen einer Niereninsuffizienz
- Vorliegen einer unbehandelten Hypothyreose
- Teilnahme eines Verwandten 1.Grades
- Teilnahme an der BASE-II

Zur genaueren Charakterisierung der Studienpopulation wurden neben den persönlichen Daten und den Lipidparametern Informationen über Vorerkrankungen und Familienanamnese, sowie bereits bestehender lipidsenkender Medikation erhoben und in einer Excel-Tabelle gesammelt. Sämtliche Analysen zur Charakterisierung der Studienpopulation fanden ebenfalls mit Excel statt.

Die erhobenen Daten wurden pseudonymisiert, d. h. der Patientennamen wurde durch eine Identifikationsnummer (ID) ersetzt. Die Blutproben für die weiteren genetischen Bestimmungen, sowie die in der Lipidambulanz gespeicherten Patienten ID's wurden von dem Datentreuhänder umkodiert und in anonymisierter Form an den Kooperationspartner im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik AG Dr. Lars Bertram weitergeleitet. Die genetischen Daten konnten nach Abschluss der DNA-Untersuchungen wieder über den Datentreuhänder mit den Patienten ID's zusammengefügt werden. Die Zusammenführung der genetisch erhobenen Informationen mit den weiteren o.g. Studiendaten wurde vom Studienpersonal der Lipidambulanz gewährleistet.

Ein Antrag zur Beratung durch die Ethikkommission zur Rekrutierung der Replikationskohorte und Durchführung dieser Genotypisierungsstudie wurde gestellt und mit einem positiven Votum auch von Seiten des Datenschutzbeauftragten beschieden.

Folgende relevante Vorerkrankungen wurden abgefragt bzw. aus entsprechenden Untersuchungsbefunden entnommen:

- kardiovaskuläre Erkrankungen (arterielle Hypertonie, KHK, Apoplex, PAVK)
- Diabetes mellitus Typ 2
- Nachweis von Plaques der Arteria carotis mittels Duplex-Sonographie
- genetischer Befund einer Faktor V-Leiden-Mutation
- Dyslipoproteinämie
- genetischer Befund einer Apolipoprotein E-Untersuchung
- Nikotinabusus

Die Statusabfrage über bestehende kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ 2 und Nikotinabusus gehören dabei zur Routine des ersten Aufnahmegesprächs in der Fettstoffwechselambulanz. Zum Nachweis von einer bestehenden oder fortschreitenden Arteriosklerose in Form von Carotisplaques wird den Patienten in einem Abstand von ca. 1-1,5 Jahren die Durchführung einer Duplex-Sonographie der A. carotis empfohlen. Die Ergebnisse können einen Hinweis auf den Behandlungserfolg der durchgeführten lipidsenkenden Therapie geben oder eine entsprechende intensiviertere Interventionsstrategie nach sich ziehen. Das Ausmaß und die Beschaffenheit der Carotisplaques wurden in dieser Studie nicht berücksichtigt.

Der Nachweis einer Faktor V-Leiden-Mutation oder die genetische Untersuchung des Apolipoprotein E (Apo E) werden nur vereinzelt bei besonderen Indikationen, wie z.B. nach sehr frühem kardiovaskulären Ereignis angestrebt. Das Apo E-Gen auf Chromosom 19 zeigt einen Polymorphismus, bei dem der homozygote E3-Typ bei dem Großteil der Bevölkerung auftritt. Das

ϵ 4-Allel ist mit der koronaren Herzkrankheit und dem Morbus Alzheimer assoziiert [100]. Der homozygote Apo E2-Genotyp begünstigt die familiäre Dysbetalipoproteinämie mit hohem Arterioskleroserisiko (siehe Tabelle 2 auf Seite 12). Im Rahmen der Genotypisierung wurden auch die noch nicht bekannten Apo E-Genotypen vom Kooperationspartner im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik bestimmt.

Die Faktor V-Leiden-Mutation ist ein erblicher Risikofaktor für die Entstehung einer Thrombose.

Zur Abklärung einer familiären Disposition wurden bekannte Fettstoffwechselstörungen, insbesondere der Lp(a)-Erhöhung und Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie KHK, Apoplex und PAVK abgefragt. Eine Grenze für ein bestimmtes Erkrankungsalter des Familienmitglieds wurde dabei nicht festgelegt.

Charakteristika der Studienpopulation:

- 500 Teilnehmer
- 248 Männer, 252 Frauen
- Durchschnittsalter: 59 Jahre (Max: 84 Jahre, Min: 20 Jahre)
- Durchschnittlicher Body-Mass-Index: 26,9 (nicht gemessen bei n = 3)
- Systolischer Blutdruck:
 - Mittelwert: 140 mmHg
 - Standardabweichung: 20 mmHg
 - nicht gemessen bei n = 14

Die Blutdruckwerte wurden unter eventuell bestehender antihypertensiver Medikation bestimmt und lassen somit keine Aussage über eine mögliche Hypertonie zu.

Die Messung der Lipidparameter erfolgte unabhängig von der meist bestehenden lipidsenkenden Medikation. Hinweise auf mögliche Dyslipoproteinämien können außer für Lp(a) daraus nicht abgeleitet werden. Da die Einnahme von Nikotinsäure ein Ausschlusskriterium dieser Studie darstellte, kann bei diesem Wert eine medikamentöse Beeinflussung nahezu ausgeschlossen werden.

3.2 Bestimmung der kardiovaskulären Hochrisikopatienten

Das kardiovaskuläre Risiko soll nach den Vorgaben der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie mittels ESC-SCORE für die vorliegende Studienpopulation bestimmt werden. Es werden insgesamt vier Risikokategorien unterteilt, wobei nur die Zuordnung zu den Hochrisikopatienten ermittelt werden soll. Patienten mit bestehender KHK, Diabetes mellitus Typ II, ischämischen Insult, PAVK oder Nachweis von Carotisplaques werden dabei dieser Risikokategorie zugeordnet. Das Vorliegen von Carotisplaques muss sonographisch nachgewiesen werden. Die genauere Beschaffenheit und Ausdehnung der Plaques wurde dabei nicht berücksichtigt. Die anderen oben genannten Vorerkrankungen wurden anamnestisch erhoben oder aus vorliegenden Befunden abgeleitet.

Das absolute 10-Jahres-Risiko $\geq 10\%$ auf der Basis von SCORE würde ebenfalls zur Einordnung in die Hochrisikogruppe führen, würde allerdings das Vorliegen von Nativ-Lipidparametern voraussetzen.

3.3 Messung und Analyse der Lipidparameter

Sowohl in der BASE-II-Population, als auch in der Replikationskohorte wurde ein breites Spektrum an Lipidparametern bestimmt. Dazu gehörte standardmäßig die Messung des Gesamt-Cholesterols, LDL-Cholesterols, HDL-Cholesterols, Lp(a), Apo B und der Triglyzeride.

Die Blutentnahme zur Messung der Lipidparameter erfolgte peripher venös in je einem Heparin- und Serumröhrchen. Das Zentrallabor der Charité bestimmte die oben genannten Werte und leitete die Ergebnisse an die Lipidambulanz weiter.

Die quantitative Bestimmung von Lp(a) im Serum beruht auf dem Prinzip des immunologischen Trübungstests. Dabei wird die zu untersuchende Probe mit einem Puffer und einem Lp(a)-Antikörper gemischt, der sich mit dem Lp(a) des Probenmaterials verbindet und ein unlösliches Aggregat bildet. Dabei wird eine Trübung im Testansatz herbeigeführt, die optisch gemessen werden kann und proportional zur Menge von Lp(a) in der Probe ist. Das Messsignal wird über eine nicht-lineare mathematische Funktion in eine Konzentrationsangabe (mg/dl) umgewandelt. Die untere Nachweisgrenze von Lp(a) liegt bei < 3 mg/dl.

Die Lp(a)-Serumspiegel dieser Replikationsstudie und einer BASE-II-Teilpopulation wurden im Rahmen dieser Arbeit verglichen. Die Auswertung dieser Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism 6. Die Signifikanz der Übereinstimmung beider Verteilungen wurde mittels des Mann Whitney U Tests überprüft.

3.4 DNA-Extraktion

Für die genetische Untersuchung wurden 20 ml EDTA-Vollblut peripher venös entnommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -72 Grad Celsius gekühlt. Die Isolierung der DNA wurde von der Firma LGC-Genomics mittels des PLUS XL manual Kits durchgeführt. Dabei wird zuerst das DNA-haltige Zellmaterial angereichert. Weitere Arbeitsschritte bestehen in einer Lyse von noch vorhandenen Proteinen, einer Fällung der DNA, Waschung, Trocknung und Resuspendierung. Die extrahierte DNA wurde im Anschluss an den Kooperationspartner im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik AG Dr. Lars Bertram zur Genotypisierung weitergeleitet.

3.5 TaqMan® Genotypisierung und statistische Auswertung

Zur Genotypisierung der fünf SNPs bei den 500 Teilnehmern dieser Studie kamen kommerzielle Assays basierend auf der TaqMan® SNP-Genotypisierungstechnologie zum Einsatz.

Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine PCR (polymerase chain reaction)-basierte Methode zur Alleldiskriminierung von SNPs.

Die eingesetzten PCR-Primer werden dabei so gewählt, dass sie einen maximal 150 bp langen Bereich mit enthaltener Punktmutation flankieren. Zusätzlich werden zwei Oligonukleotid-Sonden eingesetzt, die den zu untersuchenden SNP relativ mittig enthalten. Am 5´-Ende sind die Sonden mit zwei unterschiedlichen fluoreszierenden Reporterfarbstoffen markiert. Die Fluoreszenz der Reporterfarbstoffe wird bei intakten Sonden durch Energieübertragung des Quenchers am 3´-Ende unterdrückt.

Die vollständige Hybridisierung der Sonden erfolgt spezifisch in Abhängigkeit von dem an der polymorphen Base jeweils vorliegenden Allel. Die am DNA-Strang vollständig hybridisierte Sonde wird während der Amplifikation durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Der Quencher entfernt sich vom Reporter, so dass dessen Fluoreszenz nicht mehr unterdrückt wird und somit ein Fluoreszenzsignal sendet. Nicht vollständig hybridisierte Sonden werden durch die Taq-Polymerase zwar verdrängt, bleiben aber intakt und erzeugen somit kein Fluoreszenzsignal.

Die entstandene Fluoreszenz wird anschließend auf einem 7900HT Fast Real-Time PCR System der Fa. Applied Biosystems gemessen und ausgewertet (siehe Abbildung 1 auf der nächsten Seite).

Die entsprechenden TaqMan® SNP-Genotypisierungsassays inklusive der Primer und der Sonden wurden direkt von der Fa. Applied Biosystems bezogen. Das vom Hersteller vorgeschriebene Protokoll zur Durchführung der Genotypisierung wurde befolgt. In der folgenden Tabelle 7 auf der nächsten Seite sind die entsprechenden Assay-ID's angegeben.

SNP	Assay-ID
rs6919346	C_1550877_20
rs10455872	C_30016089_10
rs17210569	C_34707097_10
rs17069904	C_33484524_10
rs7586970	C_2671101_30

Tab. 7: Verwendete Assays für die Genotypisierung

Dabei wurden pro Teilnehmer 5 ng DNA auf 384-well Mikrotiterplatten unter Verwendung des entsprechenden Assays analysiert.

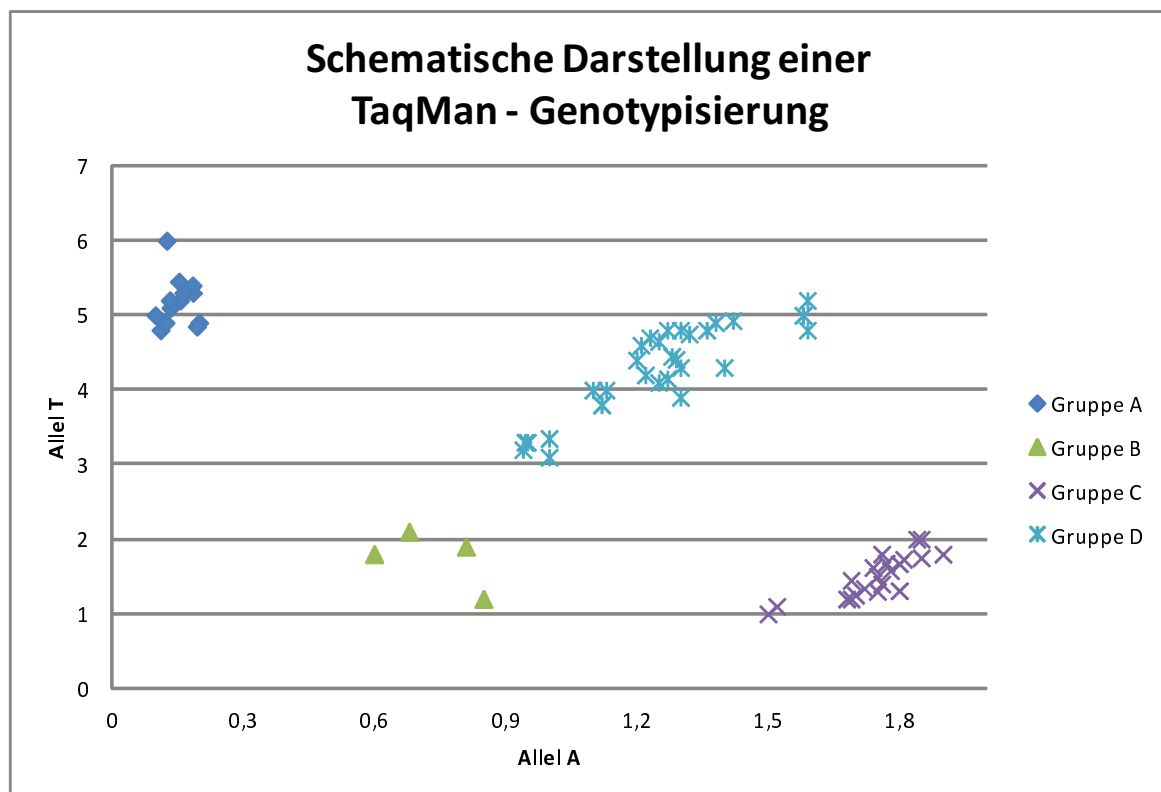


Abb. 1: Beispielhafte Darstellung eines TaqMan®-Genotypierungsassays
 Gruppe A: homozygot für T-Allel, Gruppe C: homozygot für A-Allel, Gruppe D: heterozygot für T/A, Gruppe B: Negativkontrolle

Die Bestimmung der Apo E-Genotypen auf Chromosom 19 erfolgte nach dem gleichen wie oben beschriebenen Prinzip. Der Einfachheit halber wurde hier die in der Literatur häufig gebräuchliche Haplotypnomenklatur ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) verwendet, die sich aus zwei miteinander korrelierenden SNPs (rs7412 und rs429358) ergibt. Für rs7412 wurde das Assay mit der ID C_904973_10 und für rs429358 C_3084793_20 verwendet.

Die Berechnung der statistischen Analysen der Assoziationstestungen erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Kooperationspartner im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik mittels der Software PLINK (v1.07) [101].

Im Rahmen einer multivariaten linearen Regression wurde die Assoziation der ausgewählten SNPs zur logarithmierten Lp(a)-Plasmakonzentration untersucht. Dabei wurde korrigiert für das Alter, das Geschlecht, dem BMI und dem logarithmierten Apo B-Spiegel.

Die Ergebnisse der genetischen Analysen der hier untersuchten SNPs wurden mit 32 Kontrollen mit bekanntem Haplotyp aus dem HapMap-Projekt verglichen. Hierbei war für keinen der genotypisierten SNPs eine Diskrepanz zu den öffentlich verfügbaren Kontrollgenotypen festzustellen.

4 Ergebnisse

4.1 Relevante Vorerkrankungen der Studienpopulation

Die vorliegende Studie wurde in einer Fettstoffwechselambulanz durchgeführt, so dass, wie in Tabelle 8 dargestellt, bei dem Großteil (97,4 %) der Studienteilnehmer eine Dyslipoproteinämie bekannt ist. Bei 39,2 % der Teilnehmer konnte diese näher als Hyperlipoproteinämie(a) klassifiziert werden, d. h. die gemessene Lp(a)-Plasmakonzentration lag über 30 mg/dl. Hierbei wurde nicht unterschieden, ob die Hyperlipoproteinämie(a) isoliert oder im Rahmen weiterer Hyperlipoproteinämien vorliegt. Eine weitere Spezifizierung der bekannten Dyslipoproteinämie wurde nicht durchgeführt.

Vorerkrankung	Anzahl	Prozent	keine Angabe (n)
Arterielle Hypertonie	284	56,8	1
Diabetes mellitus Typ II	95	19	1
KHK	98	19,6	1
Apoplex	22	4,4	1
PAVK	20	4	1
Carotisplaques	199	39,8	1
Dyslipoproteinämie	487	97,4	1
Hyperlipoproteinämie(a)	196	39,2	1
Faktor V-Leiden-Mutation	1	0,2	1

Tab. 8: Anzahl der Vorerkrankungen der Studienpopulation

Zur weiteren Einschätzung des kardiovaskulären Risikos der Studienteilnehmer wurden vorliegende Faktoren erfasst, die zur Einstufung als kardiovaskulärer Hochrisikopatient führen würden. Dazu zählen neben einer KHK u.a. ein Apoplex, Diabetes mellitus Typ II, PAVK und das Vorliegen von Carotisplaques als Hinweis auf die Manifestation einer Arteriosklerose.

Bei 39,8 % der Studienpopulation wurden Plaques der A. carotis diagnostiziert. Die genaue Lokalisation oder Beschaffenheit der Plaques bzw. die mögliche resultierende Durchblutungsstörung wurden dabei nicht spezifiziert.

Bei 19,6 % der Teilnehmer ist eine KHK bekannt. Auf eine nähere Klassifizierung der KHK wurde im Rahmen dieser Studie verzichtet.

Als Risikofaktoren 1. Ordnung für die Entstehung einer Arteriosklerose wurden die arterielle Hypertonie und bestehender Nikotinabusus erfasst. Bei 56,8 % der Studienteilnehmer besteht demnach eine arterielle Hypertonie. Die im Rahmen der Studie durchgeführte Blutdruckmessung kann nicht als Hinweis auf eine mögliche Hypertonie einbezogen werden, da sowohl

bereits therapierte als auch nicht therapierte Hypertonien erfasst wurden. 23,2 % der Studienteilnehmer waren aktive Raucher, wobei auf eine Quantifizierung des Zigarettenkonsums verzichtet wurde.

Bei besonderer Indikation wird den Patienten der Lipidambulanz die Durchführung einer Apo E-Genotypisierung angeboten. Dies war zum Zeitpunkt der Datenerhebung bei 9,8 % der Studienteilnehmer bereits erfolgt. Die fehlenden Apo E-Genotypen wurden im Rahmen der Genotypisierung vom Kooperationspartner im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik untersucht.

Das *Apo E*-Gen ist auf Chromosom 19 lokalisiert und trägt einen ausgeprägten Polymorphismus mit drei häufigeren Alleltypen $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$. Daraus ergeben sich die in der Tabelle 9 beschriebenen Apo E-Genotypen.

Apo E-Genotyp	Anzahl (n)
E2/E2	9
E2/E3	45
E2/E4	12
E3/E3	296
E3/E4	124
E4/E4	12
unbekannt	2

Tab. 9: Verteilung der ApoE-Genotypen der Studienpopulation

Der in der Bevölkerung am häufigsten auftretende homozygote Apo E3-Genotyp wurde auch bei der vorliegenden Studienpopulation mit 59,2 % am häufigsten beobachtet. Alle anderen Alleltypträger haben ein genetisch erhöhtes Risiko an einer Hyperlipoproteinämie zu erkranken. Das $\epsilon 4$ -Allel ist sowohl mit dem frühzeitigen Auftreten einer KHK als auch der late-onset Form des Morbus Alzheimer assoziiert [100]. 24,8 % der Studienteilnehmer sind Träger des Apo E3/E4-Genotyps. Jeweils 2,4 % der Patienten sind Träger des E4/E4- und E2/E4-Genotyps. 1,8 % der Studienpopulation sind homozygote Träger des $\epsilon 2$ -Allels und haben damit ein erhöhtes Risiko für eine familiäre Dysbetalipoproteinämie und dadurch für eine Arteriosklerose [102].

Eine Faktor V-Leiden-Mutation konnte für einen von fünf untersuchten Studienteilnehmern bestätigt werden.

4.2 Familiäre Disposition der Studienpopulation

Die familiäre Disposition zählt zu den unbeeinflussbaren Risikofaktoren für eine Arteriosklerose.

Erkrankung	Anzahl (%)	Unbekannt (%)
Dyslipoproteinämie	195 (39)	297 (59,4)
Hyperlipoproteinämie(a)	10 (2)	488 (97,6)
KHK	241 (48,2)	205 (41)
Apoplex	155 (31)	271 (54,2)
PAVK	21 (4,2)	410 (82)

Tab. 10: Familiäre Disposition der Studienpopulation

Bei 39 % der Studienpopulation ist eine Dyslipoproteinämie bei mindestens einem Verwandten ersten Grades bekannt (siehe Tabelle 10). Dies kann u.a. ein Grund für die Vorstellung des Patienten in der Fettstoffwechselambulanz gewesen sein. 59,4 % haben über eine diesbezügliche familiäre Disposition keine Information. Bei nur etwa 2 % der Studienteilnehmer konnte die Hyperlipoproteinämie des Verwandten näher als Lp(a)-Erhöhung klassifiziert werden.

Bei fast der Hälfte der Studienpopulation ist mit 48,2 % eine familiäre KHK bekannt. Auch dies kann ein möglicher Beweggrund für die Vorstellung in der Lipidambulanz gewesen sein. 41 % der Studienteilnehmer hatten darüber jedoch keine Information.

Das familiäre Vorkommen eines Apoplex konnten 31 % der Studienteilnehmer bestätigen. Die familiäre Disposition für eine PAVK war nur bei 4,2 % bekannt

Ein Erkrankungsalter wurde für die kardiovaskuläre familiäre Disposition nicht festgelegt und so können die ausgewerteten Erkrankungen nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie streng genommen auch nicht durchgängig als Risikofaktor für eine Arteriosklerose gewertet werden.

4.3 Lipidwerte der Studienpopulation

Lipidparameter	Mittelwert (mg/dl)	Standardabweichung (mg/dl)	keine Angabe (n)
Gesamtcholesterol (mg/dl)	205	49,4	1
LDL-Cholesterol (mg/dl)	81	39,1	1
HDL-Cholesterol (mg/dl)	54,4	19,3	1
Triglyzeride (mg/dl)	193,4	263,8	1
Lipoprotein(a) (mg/dl)	42,1	53,4	4
Apolipoprotein B (mg/dl)	103,9	27,6	43

Tab. 11: Durchschnittliche Lipid - Plasmakonzentrationen

Der Mittelwert der Gesamtcholesterol-Plasmakonzentration der Studienpopulation lag bei 205 mg/dl und somit leicht über der empfohlenen Höchstgrenze von 200 mg/dl (siehe Tabelle 11).

Der höchste gemessene Gesamtcholesterolverwert lag bei 410 mg/dl und der niedrigste bei 118 mg/dl.

Mit 81 mg/dl liegt der Mittelwert der LDL-Cholesterol-Plasmakonzentration je nach Vorerkrankung entweder im Zielbereich oder leicht darüber (siehe Abschnitt 1.3 auf Seite 9). Der höchste LDL-Cholesterol-Wert wurde mit 298 mg/dl gemessen und birgt somit ein hohes atherogenes Potenzial. Der niedrigste LDL-Cholesterol-Wert lag bei 36 mg/dl und war durch eine hohe Statindosis beeinflusst.

Der Mittelwert der HDL-Cholesterol-Plasmakonzentration liegt mit 54,4 mg/dl sowohl für Frauen (> 42 mg/dl) als auch Männer (> 35 mg/dl) im angestrebten Zielbereich. Der höchste HDL-Cholesterol-Wert wurde mit 145 mg/dl und der niedrigste mit 22 mg/dl gemessen.

Zur genaueren Einschätzung des vorhandenen atherogenen Potenzials wurde auch der Apo B-Spiegel bestimmt. Der Referenzbereich liegt für Frauen zwischen 55-125 mg/dl und für Männer zwischen 55-140 mg/dl und somit befindet sich der Apo B-Mittelwert der Studienpopulation mit 103,9 mg/dl im angestrebten Zielbereich. Der höchste Apo B-Wert lag bei 231 mg/dl und der niedrigste bei 54 mg/dl.

Der festgelegte Grenzwert der Triglyzerid-Plasmakonzentration von 150 mg/dl wurde durch den Triglyzerid-Mittelwert der Studienpopulation mit 193,4 mg/dl weit überschritten. Darüberhinaus zeigte sich für diesen Lipidwert ein sehr breites Spektrum. So lag die höchste Triglyzerid-Plasmakonzentration bei 4291 mg/dl und die niedrigste bei 42 mg/dl.

Alle bisher ausgewerteten Lipidwerte sind zum größten Teil durch eine entsprechende lipid-senkende Medikation beeinflusst. Die Einnahme von Lp(a) senkenden Nikotinsäurepräparaten stellte ein Ausschlusskriterium für die vorliegende Studie dar, so dass bei diesem Wert eine medikamentöse Einflussnahme nahezu ausgeschlossen werden kann. Mit rund 42 mg/dl liegt der Lp(a)-Mittelwert der Studienpopulation deutlich über der Höchstgrenze von 30 mg/dl. Der höchste Lp(a)-Plasmaspiegel lag bei 320 mg/dl und der niedrigste bei < 3 mg/dl.

Die Lp(a)-Plasmaspiegel der Studienpopulation weisen die typische europäische schiefe Verteilung mit starker Tendenz zu niedrigen Werten auf (siehe Abbildung 2 auf der nächsten Seite).

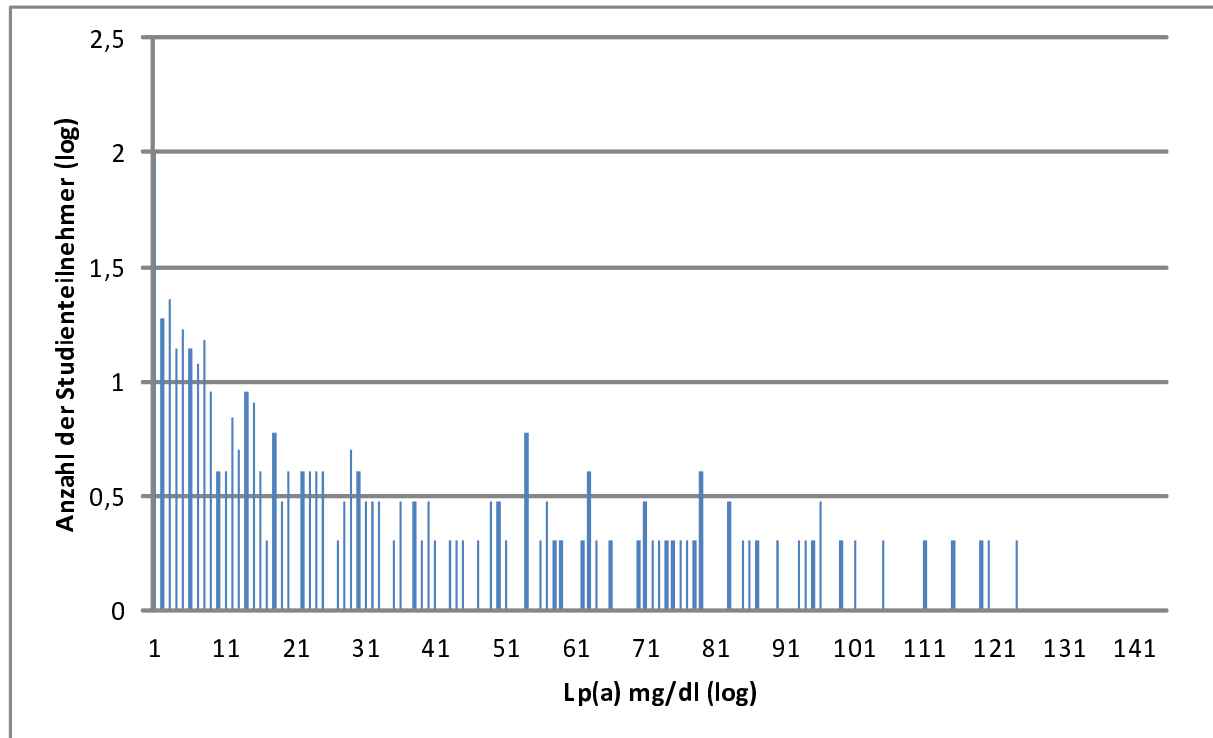


Abb. 2: Verteilung der Lp(a)-Plasmaspiegel der Replikationskohorte

Beim Vergleich der Verteilungen der Lp(a)-Plasmakonzentrationen dieser Studie mit einer Teilpopulation der BASE-II lässt sich ein ähnlicher Trend erkennen. Dazu wurden die Lp(a)-Werte von 500 Probanden (je 250 Männer und Frauen) der BASE-II den Lp(a)-Werten der 500 Teilnehmer der Replikationsstudie gegenübergestellt (siehe Abbildung 3 auf der nächsten Seite).

Der Median der Lp(a)-Plasmakonzentration der Replikationsstudie liegt bei 16 mg/dl und ist damit signifikant höher als der Median der BASE-II mit 11 mg/dl ($p = 0,0003$). Der höchste Lp(a)-Wert der BASE-II-Teilpopulation liegt bei 252 mg/dl und der niedrigste bei < 3 mg/dl. Bei 26 % der analysierten BASE-II-Teilnehmer liegt mit einem Lp(a)-Serumspiegel > 30 mg/dl eine Hyperlipoproteinämie(a) vor.

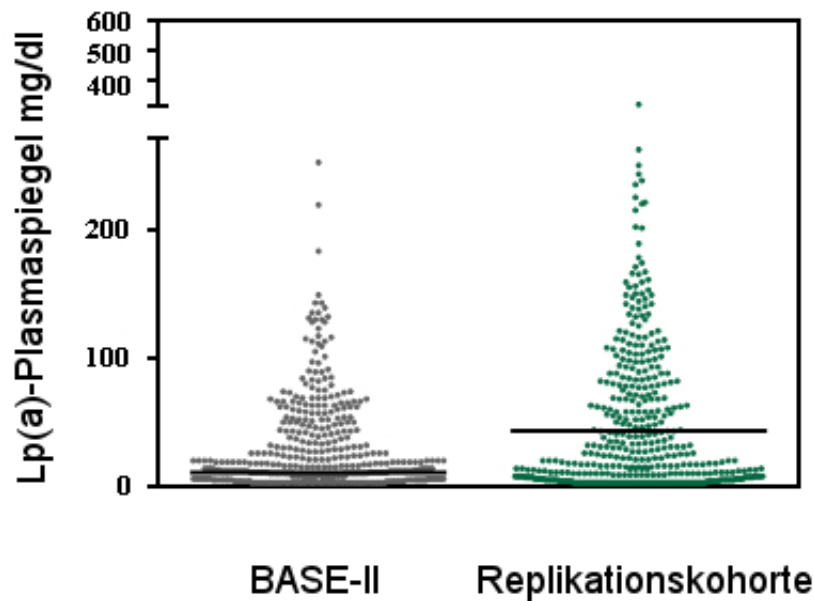


Abb. 3: Verteilungen der Lp(a)-Plasmaspiegel der BASE-II-Teilpopulation und der Replikationskohorte mit Angabe des Medians (schwarze Horizontallinien)

4.4 Kardiovaskuläres Risiko der Studienpopulation

Zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos müssen Patienten laut der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie nicht nur bezüglich ihres Lipidstatus, sondern im “Zusammenhang mit ihrem globalen Risiko, welches sich aus dem Vorliegen und der synergistischen Interaktion von verschiedenen Risikofaktoren, Organschäden und Erkrankungen ergibt”, beurteilt werden [103].

Dementsprechend lassen sich vier Risikokategorien unterscheiden, wobei für die vorliegende Studienpopulation nur die erste Kategorie “sehr hohes kardiovaskuläres Risiko” bestimmt werden sollte. Folgende Vorerkrankungen führen zur Einteilung eines Patienten in diese Risikokategorie:

- KHK
- Carotisplaque im Ultraschall
- ischämischer Insult

- PAVK
- Diabetes mellitus II
- Diabetes mellitus I mit Organschäden
- mäßige oder schwere chronische Niereninsuffizienz
- ein berechnetes 10-Jahres-Risiko $\geq 10\%$ auf der Basis von SCORE

Diese Patienten sollen bezüglich ihrer Risikofaktoren intensiv beraten und therapiert werden. Der anzustrebende LDL-Cholesterol-Zielwert liegt beispielsweise bei < 70 mg/dl.

Nur die ersten fünf Faktoren konnten in die Risikobeurteilung für die vorliegende Studienpopulation mit einbezogen werden. Das Vorliegen einer Niereninsuffizienz stellte ein Ausschlusskriterium für die Studienteilnahme dar. Ein Diabetes mellitus Typ I mit Organschäden wurde nicht erfasst.

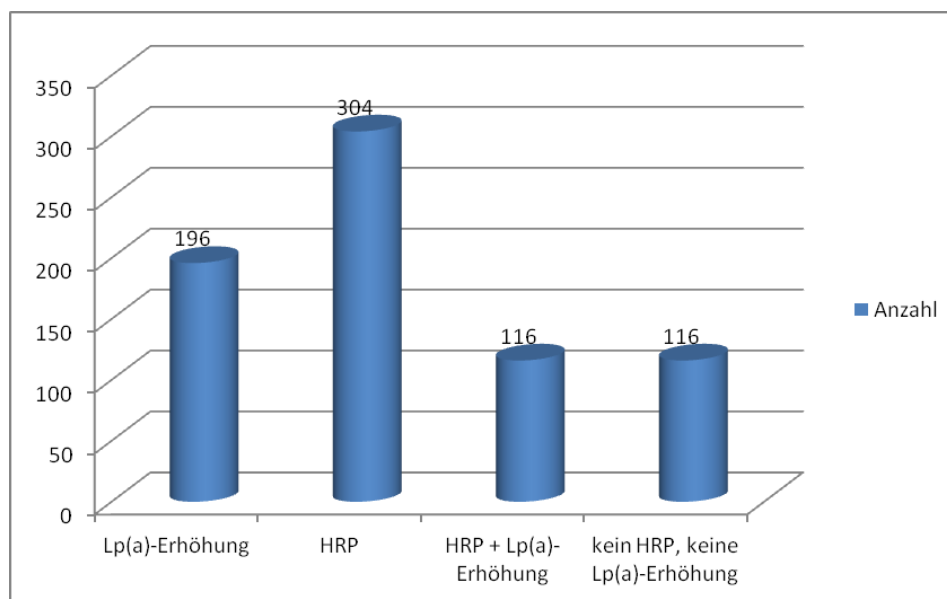


Abb. 4: Kardiovaskuläres Risikoprofil und Lp(a)-Erhöhung der Studienpopulation
HRP = kardiovaskulärer Hochrisikopatient (Vorliegen von KHK/PAVK/Apoplex/Carotisplaques/Diabetes mellitus II)

Demnach müssen 304 Studienteilnehmer bzw. 60,8 % als Hochrisikopatienten eingestuft werden (siehe Abbildung 4). Dieser hohe Prozentsatz verdeutlicht die ausgeprägte Morbidität dieser relativ kleinen Studienpopulation. 38,2 % der Hochrisikopatienten leiden zudem an einer Hyperlipoproteinämie(a), so dass die Rolle von Lp(a) als kardiovaskulärer Risikofaktor auch in der vorliegenden Studie gut nachvollzogen werden kann.

4.5 Ergebnisse der Genotypisierung

Bei 500 Patienten der Fettstoffwechselambulanz der Charité-Universitätsmedizin Berlin wurden zusätzlich zu den Routine-Lipidparametern wie Gesamt-Cholesterol, LDL-Cholesterol, HDL-Cholesterol und Triglyzeride der Lp(a)-Spiegel und die Apo B-Konzentration bestimmt. Anschließend wurden bei diesem Untersuchungskollektiv fünf SNPs genotypisiert und auf ihre Assoziation mit der Lp(a)-Plasmakonzentration getestet. Neben zwei bereits bekannten SNPs auf Chromosom 6, für die eine Assoziation hinreichend belegt ist, untersuchten wir drei SNPs außerhalb von Chromosom 6, für die bisher kein Einfluss auf Lp(a)-Plasmaspiegel repliziert werden konnte. Die Genotypisierung der beiden SNPs auf Chromosom 6 dienen dabei zum Test der Validität der Methoden dieser Replikationsstudie.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse der TaqMan® SNP Genotypisierung erfolgte mittels der PLINK Software und multivariater additiver Testung. In die Assoziationstestung wurde neben dem Lp(a)-Spiegel das Alter, das Geschlecht, der BMI und die Apo B-Plasmakonzentration mit einbezogen. Die Lp(a)- und Apo B-Spiegel wurden wegen der schiefen Verteilung als Logarithmen in die Analysen mit einbezogen, so dass im Folgenden die logarithmierten (log) Werte angegeben sind. 27 Teilnehmer mussten für die Auswertung der Genotypisierung ausgeschlossen werden, da sie nicht der kaukasischen Ethnie angehörten und somit die Möglichkeit einer abweichenden genetischen Determinierung des Lp(a)-Plasmaspiegels besteht.

Die Beschreibung der SNPs und die Ergebnisse der Assoziationstestung mit der Lp(a)-Plasmakonzentration sind in der Tabelle 12 auf der nächsten Seite zusammengefasst.

Der mit dem erhöhten Lp(a)-Spiegel assoziierte Alleltyp kommt jeweils mit einer bestimmten Häufigkeit vor, die in diesem Fall der global minor allele frequency (MAF) entspricht. Per definitionem ist die MAF der zweit häufigste auftretende Alleltyp. Diese Allelfrequenzen der vorliegenden Studie werden direkt mit der jeweiligen MAF aus der NCBI SNP-Datenbank verglichen, um beurteilen zu können, ob die Allelfrequenzen in der vorliegenden Studie von den bekannten Allelfrequenzen abweichen. Im Nachfolgenden ist in den Klammern nach der MAF das assoziierte Allel mit der MAF und der Anzahl der Individuen angegeben (z.B. T=0,085/186), die im "1000 Genome Projekt" Träger dieses Alleltyps waren.

4.5.1 Analyse bekannter SNPs zur Validierung der Studienpopulation

rs6919346 In den bisherigen Studien wurde für den SNP rs6919346 eine hochsignifikante Assoziation mit Lp(a)-Plasmaspiegeln beschrieben, die unabhängig von der Anzahl der K IV-Typ 2-Kopien zu betrachten ist. Zudem wurde mehrfach eine Assoziation mit der CAAD gezeigt (siehe Abschnitt 1.7.1 auf Seite 22).

SNP	Gen	Chromosom	Assoziierter Alleltyp	Anzahl (n)	MAF (%)	p-Wert
rs6919346	<i>LPA</i>	6	T	422	17,5	0.068
rs10455872	<i>LPA</i>	6	G	425	8,8	2.006×10^{-22}
rs17210569	near <i>TRPC4</i>	13	T	424	4	0.083
rs7586970	<i>TFPI</i>	2	C	423	31,8	0.981
rs17069904	<i>TNFRSF11A</i>	18	A	424	10,3	0.801

Tab. 12: Übersicht der Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudie

Der assoziierte T-Alleltyp dieses SNPs (T/C) ist in der SNP-Datenbank mit einer MAF von 8,5 % ($T=0,085/186$) angegeben. Sowohl Thymin als auch Cytosin gehören zu den Pyrimidinbasen, so dass in diesem Fall die Gruppe der Nukleinsäuren nicht wechselt.

In der vorliegenden Replikationsstudie wurde die Assoziation von rs6919346 mit der Lp(a)-Plasmakonzentration untersucht. Mögliche Zusammenhänge mit kardiovaskulären Erkrankungen oder der Anzahl der K IV-Typ 2-Kopien wurden aufgrund einer recht kleinen Studienpopulation nicht berücksichtigt. Da diese Zusammenhänge mehrfach in bisherigen Studien belegt wurden, würde eine weitere Untersuchung zu keinem Zuwachs an Erkenntnissen führen.

Die Allelfrequenz des assoziierten T-Alleltyps beträgt in der vorliegenden Studie 17,5 % und liegt damit deutlich über der MAF von 8,5 %, die in der SNP-Datenbank beschrieben wird. Bei 146 Studienteilnehmern konnte das T-Allel nachgewiesen werden. Eine signifikante Assoziation dieses SNPs mit der Lp(a)-Plasmakonzentration konnte in der durchgeführten Genotypisierung mit einem p -Wert = 0,068 nicht nachgewiesen werden. Es besteht jedoch ein Trend einer Assoziation. Die mittlere log Lp(a)-Plasmakonzentration liegt bei den homozygoten T-Allelträgern bei 0,991 mg/dl. Dies entspricht einem Lp(a)-Spiegel von ungefähr 9,8 mg/dl. Die heterozygoten T/C-Allelträger haben eine mittlere log Lp(a)-Plasmakonzentration von 1,168 mg/dl.

68,3 % der Studienpopulation (315 Teilnehmer) sind Träger des C/C-Genotyps. Der heterozygote T/C-Genotyp wurde bei 131 Patienten entsprechend einem Anteil von 28,4 % der Replikationskohorte nachgewiesen. 15 Teilnehmer und damit 3,3 % der Studienpopulation sind Träger des homozygoten T-Alleltyps. Die Allelfrequenz des nicht assoziierten C-Allels beträgt 82,5 %.

Genotyp	T/T	T/C	C/C
Anzahl (n)	15	131	315
Frequenz (%)	3,3	28,4	68,3
mittlerer log Lp(a) (mg/dl)	0,991	1,168	1,309
Standardabweichung (mg/dl)	0,5546	0,6186	0,6053

Tab. 13: Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudie für rs6919346

rs10455872 Bei diesem SNP (G/A) ist das G-Allel mit erhöhten Lp(a)-Plasmaspiegeln assoziiert. Die MAF des assoziierten G-Alleltyps ist in der SNP-Datenbank mit 3,1 % ($G=0,0031/68$) angegeben.

Für rs10455872 wurde mehrfach eine zusätzliche Assoziation mit der Anzahl der K IV-Typ 2-Kopien beschrieben. Die niedermolekulare Apo(a)-Isoform mit wenigen K IV-Typ 2-Kopien geht dabei mit erhöhten Lp(a)-Plasmaspiegeln einher. Darüberhinaus konnte in mehreren Studien

ein Zusammenhang mit dem Vorliegen einer KHK hergestellt werden (siehe Abschnitt 1.7.1 auf Seite 22).

Auch dieser SNP wurde in der vorliegenden Studie zur Validierung der Methoden in die Untersuchung eingeschlossen. Die Testung auf Assoziation mit der niedermolekularen Apo(a)-Isoform wurde nicht durchgeführt.

78 Teilnehmer der untersuchten Studienpopulation sind Träger des assoziierten G-Alleltyps, davon sind vier Patienten homozygot (siehe Tabelle 14. Die MAF des G-Allels in der durchgeführten Genotypisierungsstudie beträgt 8,8 % und liegt auch hierbei wieder deutlich über der angegebenen MAF der SNP-Datenbank. Für rs10455872 konnte eine hoch signifikante Assoziation mit der Lp(a)-Plasmakonzentration mit einem p-Wert = $2,01 \times 10^{-22}$ festgestellt werden. Der mittlere log Lp(a)-Spiegel liegt bei den Trägern des homozygoten G/G-Genotyps bei 2,237 mg/dl. Dies entspricht einer Lp(a)-Plasmakonzentration von ungefähr 172,6 mg/dl. Der Lp(a)-Wert des G/G-Genotyps liegt damit deutlich über dem Niveau des heterozygoten G/A-Genotyps. 83,2 % der Studienteilnehmer sind homozygote Träger des nicht assoziierten A-Allels. Die mittlere log Lp(a)-Plasmakonzentration ist bei dieser Allelvariante im Vergleich zum assoziierten G-Alleltyp am niedrigsten und beträgt 1,138 mg/dl, entsprechend einem Lp(a)-Plasmaspiegel von ungefähr 13,7 mg/dl. Die Allelfrequenz des A-Allels beträgt 91,2 %.

Genotyp	G/G	G/A	A/A
Anzahl (n)	4	74	386
Frequenz (%)	0,9	16	83,2
mittlerer log Lp(a) (mg/dl)	2,237	1,867	1,138
Standardabweichung (mg/dl)	0,1367	0,3758	0,5734

Tab. 14: Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudie für rs10455872

4.5.2 Analyse von Kandidaten-SNPs

rs17210569 In einer GWAS von Ober et al. wurde rs17210569 als Kandidaten-SNP für eine Assoziation mit der Lp(a)-Plasmakonzentration identifiziert. Bisher wurde auf die weitere Untersuchung jedoch verzichtet. Dieser SNP (T/A) ist auf Chromosom 13 gelegen und bildet in diesem Bereich ein solitäres Signal, so dass im Vergleich zur *LPA*-Region die Basis bestehend aus weiteren Signalen fehlt.

Die in der SNP-Datenbank angegebene MAF des assoziierten T-Allels ist mit 2,2 % (T=0,022/48) sehr gering. Dieser Trend lässt sich auch in der vorliegenden Genotypisierungsstudie erkennen, bei der bei nur einem Studienteilnehmer das homozygote T-Allel mit einem log Lp(a)-Spiegel von 0,778 mg/dl nachweisbar ist (siehe Tabelle 15). 36 Patienten tragen insgesamt das assoziierte T-Allel. Die MAF liegt in diesem Fall bei 4 %. Dementsprechend ausgeprägt ist das Vorkommen des nicht assoziierten A-Allels mit einer Allelfrequenz von 96 %. 92,2 % der Studienteilnehmer sind Träger des homozygoten A/A-Genotyps. Eine signifikante Assoziation von rs17210569 mit der Lp(a)-Plasmakonzentration lässt sich in der durchgeführten Studie mit einem p-Wert = 0,083 nicht aufzeigen. Auch hierbei besteht ein Trend einer möglichen Assoziation.

Genotyp	T/T	T/A	A/A
Anzahl (n)	1	35	427
Frequenz (%)	0,2	7,6	92,2
mittlerer log Lp(a) (mg/dl)	0,778	1,417	1,251
Standardabweichung (mg/dl)	0	0,654	0,609

Tab. 15: Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudie für rs17210569

rs7586970 Der SNP rs7586970 (C/T) ist auf Chromosom 2 im *TFPI*-Gen lokalisiert und wurde für diese Genotypisierungsstudie ausgewählt, weil Lopez et al. *TFPI* als Kandidatengen für eine Assoziation mit der Lp(a)-Plasmakonzentration identifiziert haben.

TFPI kodiert ein Protein mit antithrombotischen Eigenschaften. Es handelt sich um einen Proteasehemmer, der die tissue factor abhängige Blutgerinnungskaskade reguliert. Dieses Protein befindet sich hauptsächlich in Gefäßendothelien und dem Blutplasma, wo es entweder in freier Form vorliegt oder an Lipoproteine gebunden ist. LDL hat dabei die wichtigste Trägerfunktion. Die TFPI-Plasmakonzentration korreliert dabei mit dem LDL-Spiegel, wobei Individuen mit niedrigen LDL-Spiegeln und dementsprechend niedrigen TFPI-Konzentrationen keinen prothrombotischen Phänotyp aufweisen [104, 105].

Die MAF des assoziierten C-Alleltyps ist in der SNP-Datenbank mit 27,2 % (C= 0,272/595) angegeben.

36 Teilnehmer der Studienpopulation tragen das homozygote C-Allel (siehe Tabelle 16 auf der nächsten Seite). Der Anteil der Träger des heterozygoten C/T-Genotyps liegt bei 48 %. Die MAF beträgt in der vorliegenden Studie 31,8 % und liegt damit leicht über den Angaben der SNP-Datenbank. Der Trend zu einem relativ häufigen Vorkommen dieses Polymorphismus lässt sich in der Replikationskohorte bestätigen. 44,1 % der Studienpopulation sind Träger des homozygoten T/T-Genotyps. Die Allelfrequenz des nicht assoziierten T-Allels beträgt 68,2 %. Die mittleren log Lp(a)-Werte sind bei allen drei Genotyp-Gruppen mit rund 1,2 mg/dl ähnlich

hoch und somit lassen die durchgeführten Analysen keine Assoziation ($p = 0,981$) des SNPs mit dem Lp(a)-Plasmaspiegel erkennen.

Genotyp	C/C	C/T	T/T
Anzahl (n)	36	221	203
Frequenz (%)	7,8	48	44,1
mittlerer log Lp(a) (mg/dl)	1,229	1,264	1,262
Standardabweichung (mg/dl)	0,632	0,614	0,612

Tab. 16: Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudie für rs7586970

rs17069904 Für diesen SNP (A/G) wurde in einer von Zabaneh et al. durchgeführten Metaanalyse eine signifikante Assoziation mit der Lp(a)-Plasmakonzentration mit $p = 2,15 \times 10^{-3}$ bereits beschrieben [94]. Die Replikation in einer unabhängigen Studienpopulation war bisher jedoch nicht gelungen. Dieser SNP wurde in die Genotypisierungsstudie eingeschlossen, um eine Assoziation in dieser neuen Kohorte mit Schwerpunkt auf einer vorliegenden Fettstoffwechselstörung nochmal zu testen.

rs17069904 ist auf dem Chromosom 18 in der Intronregion des *TNFRSF11A*-Gens lokalisiert, das ein Rezeptorprotein der TNF-Rezeptor Superfamilie (TNFRSF) kodiert. Zur TNFRSF gehören ungefähr 50 membrangebundene und teilweise lösliche Proteine, die Einfluss auf die Zellfunktion im Sinne von Zelldifferenzierung und Zellteilung nehmen. Sie sind maßgeblich an Entzündungs- und Autoimmunreaktionen beteiligt [106]. Dies könnte einen Zusammenhang zum Lipoprotein(a) darstellen. Mögliche Funktionen des Lp(a) im Rahmen einer Entzündungsreaktion und der Kanzerogenese wurden bereits beschrieben.

Die MAF des assoziierten A-Allels beträgt in der SNP-Datenbank 10,9 % ($A = 0,109/239$). Auch in diesem Fall ist die Anzahl der homozygoten Träger des A-Allels mit drei Studienteilnehmern sehr gering. 19,4 % der Replikationskohorte sind Träger des heterozygoten A/G-Genotyps (siehe Tabelle 17 auf der nächsten Seite). Die MAF in der vorliegenden Studie beträgt 10,3 % und ist damit den Angaben aus der SNP-Datenbank ähnlich. Der mittlere log Lp(a)-Spiegel ist bei den homozygoten A-Allelträgern mit 1,351 mg/dl am höchsten. Die Lp(a)-Werte des nicht assoziierten homozygoten G-Allels liegen mit 1,28 mg/dl in diesem Fall jedoch leicht über dem mittleren log Lp(a)-Plasmaspiegel des A/G-Genotyps mit 1,201 mg/dl. Eine Assoziation dieses SNPs mit der Lp(a)-Plasmakonzentration kann dementsprechend nicht belegt werden ($p = 0,801$). Die Allelfrequenz des nicht assoziierten G-Allels beträgt 89,6 %.

Genotyp	A/A	A/G	G/G
Anzahl (n)	3	90	370
Frequenz (%)	0,6	19,4	79,9
mittlerer log Lp(a) (mg/dl)	1,351	1,201	1,28
Standardabweichung (mg/dl)	0,803	0,631	0,606

Tab. 17: Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudie für rs17069904

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Studienpopulation

Im Rahmen der BASE II werden u.a. genetische Assoziationen mit verschiedenen Lipidparametern untersucht. Diese Ergebnisse müssen in einer unabhängigen Studienkohorte repliziert werden, um Zufallsergebnisse auszuschließen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine solche Replikationskohorte zu rekrutieren und in Hinblick auf genetische Polymorphismen mit Einfluss auf den Lp(a)-Spiegel zu validieren.

Die Rekrutierung der Studienpopulation erfolgte in der Hochschulambulanz für Fettstoffwechselstörungen, so dass über 97 % der Patienten eine Fettstoffwechselstörung aufweisen. Davon haben 39,2 % Studienteilnehmer eine laborchemisch diagnostizierte Hyperlipoproteinämie(a). Die Rekrutierung dieses besonderen Klientels für eine derartige genetische Untersuchung ist nahezu einzigartig. Die Auswahl der Patienten in bisherigen Studien erfolgte meist unter dem Gesichtspunkt einer vorliegenden kardiovaskulären Erkrankung bzw. der dazugehörigen Kontrollgruppe. Das Ziel dieser und folgender Replikationsstudien durchgeführt an dieser Kohorte war bzw. wird es jedoch sein, SNPs mit Einfluss auf den Lp(a)-Spiegel bzw. andere Lipidparameter zu identifizieren und somit lag es nahe, Patienten mit einer entsprechenden Disposition zu untersuchen. SNPs, die in vorigen Studien nur schwache Signale bezüglich des Einflusses auf den Lp(a)-Spiegel zeigten, sollten in dieser Studie unter Betrachtung des besonderen Rekrutierungsortes neu interpretiert werden.

Gleichzeitig dient diese Arbeit der Charakterisierung der Replikationskohorte. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Identifizierung der kardiovaskulären Hochrisikopatienten. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Studienpopulation bezüglich ihres kardiovaskulären Risikos mit bisherigen Genotypisierungsstudien vergleichbar ist. 60,8 % der Studienteilnehmer können laut der ESC in die höchste Risikokategorie eingruppiert werden. Das Risiko innerhalb der nächsten zehn Jahre an einem kardiovaskulären Ereignis zu versterben, liegt bei diesen Patienten bei 10 %. Der hohe Anteil an Patienten mit besonders ausgeprägtem kardiovaskulären Risiko kann in der vorliegenden Studie u.a. auf das Vorliegen einer Fettstoffwechselstörung zurückgeführt werden, da erhöhte Serumlipidwerte einen kardialen Risikofaktor erster Ordnung darstellen.

Ein weiterer Vorteil einer Rekrutierung der Studienpopulation in einer Fettstoffwechselambulanz zeigt sich in dem sehr hohen Lp(a)-Mittelwert von rund 42 mg/dl im Vergleich zu bisherigen Studien. Damit liegt der Lp(a)-Mittelwert bei ca. 39 % der Studienpopulation über der festgelegten Höchstgrenze von 30 mg/dl. In keiner in Abschnitt 1.5 erwähnten Studie wurde auch nur ansatzweise ein derartig hoher Lp(a)-Plasmaspiegelmittelwert erreicht.

Beim Vergleich der Verteilungen der Lp(a)-Plasmakonzentrationen dieser Studie mit der BASE-II lässt sich ein ähnlicher Trend erkennen.

Die Lp(a)-Werte von 500 Probanden (je 250 Männer und Frauen) der BASE-II wurden den Lp(a)-Werten der 500 Teilnehmer der vorliegenden Studie verglichen (siehe Abbildung 3 auf Seite 41).

Der Median der Lp(a)-Plasmakonzentration der vorliegenden Genotypisierungsstudie ist mit 16 mg/dl signifikant höher als der Median der BASE-II mit 11 mg/dl ($p = 0,0003$). Das schiefe Verteilungsmuster mit starker Tendenz zu niedrigen Lp(a)-Plasmaspiegeln stimmt bei beiden Studien nahezu überein. Die Streuung der Lp(a)-Serumspiegel fällt in der BASE-II Teilpopulation kleiner aus. Die BASE-II-Kohorte kann in diesem Zusammenhang repräsentativ für die Normalbevölkerung betrachtet werden, da sie nicht nach vorliegenden Fettstoffwechselstörungen ausgewählt wurde und die Höhe der Lp(a)-Plasmakonzentration unabhängig vom Alter ist.

Dieser Vergleich beschreibt einmal mehr das ausgeprägte Vorkommen überdurchschnittlich hoher Lp(a)-Werte bei der Studienpopulation der Fettstoffwechselambulanz und prädestiniert diese Population für die Durchführung von Studien mit dem behandelten Themenkomplex. Für die Verwendung dieser Population als künftige Replikationskohorte zur Untersuchung genetischer Assoziationen zu Lipidparametern in der BASE-II wurden somit gute Voraussetzungen geschaffen.

5.2 Limitationen der Studienpopulation

Bezüglich der Einschätzung des kardiovaskulären Risikos muss eingeräumt werden, dass nur eine relativ ungenaue Berechnung erfolgt ist, so dass keine weitere Klassifizierung des kardiovaskulären Risikos unternommen wurde. Eine Gruppierung in die Kategorien hohes, mäßig hohes und niedriges Risiko ist somit nicht erfolgt und wurde für die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse der Genotypisierung auch nicht benötigt. Ebenso wurden evtl. vorliegende Carotidplaques nicht näher quantifiziert. Die Erfassung der Familienanamnese beschränkte sich auf das anamnestische Vorliegen von kardiovaskulären Erkrankungen und Fettstoffwechselstörungen bei Verwandten 1. Grades. Das Erkrankungsalter war für die meisten Studienteilnehmer jedoch nicht mehr eruierbar.

5.3 Diskussion der Ergebnisse der Genotypisierungsstudie

Die Lp(a)-Plasmakonzentration ist in hohem Maß genetisch determiniert. Sequenzvariationen im *LPA*-Gen auf Chromosom 6 sind für ca. 90% der Plasmavariabilität verantwortlich. Das gesamte Ausmaß der Lp(a)-Expression und Variabilität lässt sich durch die bekannten *LPA*-Polymorphismen jedoch nicht erklären. Kopplungsstudien lassen vermuten, dass auch

außerhalb von *LPA* und Chromosom 6 gelegene genetische Determinanten den Lp(a)-Spiegel beeinflussen, auch wenn bis jetzt keine signifikanten Assoziationen identifiziert werden konnten bzw. diese nicht an einer unabhängigen Kohorte repliziert wurden.

Zur Validierung dieser künftigen Replikationskohorte der BASE-II wurden zwei SNPs auf dem *LPA*-Gen untersucht, deren signifikante Assoziationen mit Lp(a)-Plasmaspiegeln durch zahlreiche Studien hinreichend belegt wurden.

Um weiteren Aufschluss über die genetische Determination der Lp(a)-Plasmakonzentration zu erlangen, wurde in dieser Studie die Testung auf Assoziation mit drei weiteren SNPs, die außerhalb von Chromosom 6 gelegen sind, einbezogen.

5.3.1 Diskussion der Analyse bekannter SNPs zur Validierung der Replikationskohorte

rs6919346 Der SNP rs6919346 war 2009 in einer GWAS von Ober et al. hochsignifikant mit Lp(a)-Plasmaspiegeln assoziiert und wurde seitdem mehrfach repliziert [3]. Die von Ober et al. ausgewählten Kovariablen für die statistische Analyse umfassten Alter, BMI und gegenwärtiges Rauchen. Für diesen SNP konnte in mehreren Studien eine Unabhängigkeit von der Anzahl der KIV-2-Kopien und eine Assoziation mit der CAAD gezeigt werden.

In der vorliegenden Studie ist die Assoziation dieses SNPs mit der Lp(a)-Plasmakonzentration mit einem $p = 0,068$ nicht signifikant. Die mittleren log Lp(a)-Werte des nicht assoziierten C-Allels liegen über denen des homozygoten T-Allels.

17,5 % der jetzigen Studienpopulation sind Träger des mit der Lp(a)-Plasmakonzentration assoziierten T-Allels. Die MAF der SNP-Datenbank beschreibt einen deutlich niedrigeren Wert von 8,5 %. Relativ hoch wird die Allelfrequenz des T-Allels bei einer GWAS von Ober et al. mit 24 % beschrieben. Die Größenordnung der Studienpopulation ist hingegen mit 386 Hutterern bei Ober et al. mit 422 Studienteilnehmern der jetzigen Studie vergleichbar. Zurückführen lässt sich das relativ ausgeprägte Vorkommen des T-Allels in dieser Population auf den Gründereffekt. Die Hutterer sind eine relativ kleine Gruppe von Individuen, die weitgehend isoliert in den USA leben und sich im 16. Jahrhundert von ihrer Stammpopulation abspalteten. Die Allelfrequenzen der Gründerpopulation können somit auch über nachfolgende Generationen dementsprechend stark von der Stammpopulation abweichen. In der ebenfalls von Ober et al. beschriebenen Clear-Kohorte mit 1054 Teilnehmern, die der Replikation der GWAS diente, lag die MAF nur noch bei 16 % und war damit der vorliegenden Genotypisierungsstudie sehr ähnlich [3].

Da die Durchführung der Genotypisierung und die statistische Auswertung standardisiert verlief und zudem die Assoziation für rs10455872 hoch signifikant repliziert werden konnte, war die ausgewählte Studienpopulation zu klein, um diese genetische Assoziation signifikant bestätigen zu können.

rs10455872 In einer kürzlich publizierten Metaanalyse zeigte der SNP rs10455872 im Vergleich zu allen anderen untersuchten Polymorphismen die stärkste signifikante Assoziation mit Lp(a)-Plasmaspiegeln [94]. Dieses herausragende Ergebnis konnte die jetzige Studie mit einem p-Wert = $2,006 \times 10^{-22}$ untermauern. Die MAF der vorliegenden Genotypisierungsstudie war mit 8,8 % zwar höher als die angegebene MAF der SNP-Datenbank mit 3,1 %, ähnelte doch stark einer von Clarke et al. durchgeführten Studie, in der 7 % der Studienpopulation das assoziierte G-Allel trugen [4]. Die mittleren log Lp(a)-Spiegel liegen bei den homozygoten G-Allelträgern bei 2,237 mg/dl und damit deutlich höher als bei den homozygoten A-Allelträgern (1,138 mg/dl) oder den heterozygoten G/A-Allelen (1,867 mg/dl). Zudem zeichnen sich die Lp(a)-Werte der G/G-Allelträger durch eine sehr niedrige Standardabweichung (0,137 mg/dl) aus. In der PROCARDIS-Kohorte, die nach Vorliegen einer KHK ausgewählt wurde, konnte zudem eine Assoziation mit der niedermolekularen Apo(a)-Isoform und KHK nachgewiesen werden. Ca. 25 % der Lp(a)-Plasmapvariabilität sind auf die genetische Determination dieses SNPs zurückzuführen [4].

Limitationen der Analysen bekannter SNPs zur Validierung der Studienpopulation

Das Molekulargewicht der Apo(a)-Isoformen und die Anzahl der K IV-Typ 2-Kopien wurden in der vorliegenden Studie nicht untersucht. Somit konnte keine Assoziationstestung der genetischen Polymorphismen im *LPA*-Gen mit diesen Strukturen erfolgen. Für den SNP rs10455872 wurde diese Assoziation allerdings von mehreren Studien bestätigt. Ebenso konsistente Ergebnisse können aus der aktuellen Studienlage für den SNP rs6919346 zusammengefasst werden, für den durchgängig eine Unabhängigkeit von der K IV-Typ 2-Struktur nachgewiesen wurde. Ziel dieser Studie war es nicht, diese beiden gut erforschten Polymorphismen tiefgehender zu untersuchen. Deren alleiniger Assoziationsnachweis in dieser unabhängigen Stichprobe sollte dazu dienen die Methoden dieser Studie zu validieren und die rekrutierte Studienpopulation als künftige Replikationskohorte zu etablieren. Durch den Nachweis von rs10455872 wurde somit das Ziel dieser Studie erreicht. Ein Aufstocken der Studienpopulation auf 1000 Teilnehmer ist in Planung. Auch SNPs mit einem geringen Einfluss auf den Lp(a)-Spiegel sollen auf diese Weise künftig repliziert werden können.

Aus den gleichen Gründen wurde auch auf die Assoziationstestung mit der CAAD und KHK verzichtet. Ober et al. haben in ihrer Replikationskohorte (n=1053) mit 493 Patienten mit bekannter Arteriosklerose der A. carotis, zusätzlich zur Assoziation mit dem Lp(a)-Spiegel, einen Zusammenhang von rs6919346 und dem Bestehen einer CAAD zeigen können [3]. In einem weit größeren Patientenkollektiv mit 4846 Fällen verifizierten Clarke et al. den Zusammenhang von rs10455872 und der KHK [4].

5.3.2 Diskussion der Analyse von Kandidaten - SNPs

Außerhalb des *LPA*-Locus konnten keine signifikanten genetischen Assoziationen mit der Lp(a)-Plasmakonzentration identifiziert werden. Diese Ergebnisse reihen sich damit in mehrere kürzlich publizierte Studien ein, so dass die vollständige genetische Determinierung der Lp(a)-Plasmakonzentration ungeklärt bleibt [94, 95].

rs7586970 auf Chromosom 2 im *TFPI*-Gen In einer genomweiten Kopplungsanalyse von Lopez et al. wurde neben dem bekannten QTL (quantitative trait locus) im *LPA*-Bereich ein weiterer Locus auf dem langen Arm von Chromosom 2 mit einem LOD-Score von 2.01 beschrieben. Dieser Bereich enthält mehrere Kandidatengene u.a. das *TFPI*-Gen. 12 SNPs wurden auf ihre Assoziation mit dem Lp(a)-Plasmaspiegel untersucht, zeigten jedoch keine Signifikanz [95].

In dieser Studie wurde ein ebenfalls im *TFPI*-Gen gelegener anderer Polymorphismus (rs 7586970) genotypisiert, doch auch für diesen SNP konnte keine signifikante Assoziation nachgewiesen werden. Die MAF dieser Studie war wie in bisheriger Literatur beschrieben mit 31,8 % relativ ausgeprägt. Die Lp(a)-Werte aller drei Genotypen unterschieden sich jedoch kaum. *TFPI* kodiert ein Protein mit antithrombotischen Eigenschaften und der Fähigkeit Lipoproteine im Plasma zu binden, wodurch sich ein Einfluss auf den Lp(a)-Plasmaspiegel vermuten lässt [95]. Es besteht weiter die Möglichkeit, dass andere Polymorphismen in diesem Gen den Lp(a)-Spiegel beeinflussen. Der Einfluss auf die Lp(a)-Variabilität durch die beschriebenen oder andere mögliche SNPs könnte sehr gering ausfallen, so dass sowohl bei Lopez et al. als auch in dieser Studie die Teilnehmerzahlen möglicherweise zu klein gewählt wurden, um signifikante Assoziationen zu detektieren.

Zudem hatten Lopez et al. vermutet, dass das Signal bei ihrer Kopplungsanalyse durch ein anderes Gen und nicht durch *TFPI* verursacht wurde. In dem beschriebenen QTL auf Chromosom 2 befinden sich nämlich noch vier weitere mögliche Kandidatengene, die in folgenden Studien noch näher untersucht werden sollten [95]. Für das *OSBPL6*-Gen (oxysterol-binding protein-related protein 6) ist beispielsweise eine Funktion im Lipidtransport und -metabolismus sowie in der Cholesterollhomöostase bekannt, so dass auch hier ein möglicher Einfluss auf Lp(a)-Plasmawerte nahe liegt [107].

rs17069904 auf Chromosom 18 im *TNFRSF11A*-Gen Die Assoziation dieses SNPs mit der Lp(a)-Plasmakonzentration wurde in einer von Zabaneh et al. durchgeführten Metaanalyse bereits beschrieben, konnte bisher jedoch nicht repliziert werden. Die vorliegende Genotypisierungsstudie konnte erneut keine Assoziation feststellen. Die Allelfrequenz des assoziierten

A-Allels liegt bei 10,3 % und ist damit sowohl mit den Angaben der SNP-Datenbank mit 10,9 % als auch der von Zabaneh et al. festgestellten MAF von 10 % nahezu identisch. Für die Untersuchung dieses SNPs, der vermutlich einen sehr geringen Einfluss auf den Lp(a)-Spiegel haben wird, sind die Assoziationsanalysen durch die geringe Teilnehmerzahl nicht aussagekräftig.

rs17210569 auf Chromosom 13 nahe dem *TRPC4*-Gen In der GWAS von Ober et al. wurde die Assoziation dieses SNPs mit der Lp(a)-Plasmakonzentration mit einem $p = 3,5 \times 10^{-10}$ erstmals beschrieben, seitdem jedoch nicht weiter verfolgt. Dieser SNP ist nahe dem *TRPC4*-Gen auf Chromosom 13 gelegen.

Die Allelfrequenz des assoziierten T-Alleltyps ist sowohl in der SNP-Datenbank mit 2,2 % als auch in der vorliegenden Studie mit 4 % sehr gering. Die vorliegenden Analysen ergaben einen Trend einer Assoziation ($p = 0,083$) mit der Lp(a)-Plasmakonzentration.

Bei genauerer Betrachtung des rs17210569-Signals auf Chromosom 13 in der GWAS von Ober et al. fällt im Vergleich zu den Signalen im *LPA*-Gen auf Chromosom 6 eine differierende Morphologie auf. Die Signale im *LPA*-Gen bilden eine etwas breitere Basis und haben dann mit kleiner werdenden p-Werten einen zunehmend spitzen Verlauf. Außerdem ist dieser gesamte Bereich sehr signalstark, da nahe beieinander liegende SNPs gekoppelt sind. Auf Chromosom 13 findet sich nur solitär das beschriebene Signal von rs17210569 ohne Basis. Die Wahrscheinlichkeit, dass nur dieser SNP mit dem Lp(a)-Spiegel assoziiert ist, erscheint eher gering. Möglicherweise war dieser Bereich durch die verwendeten Genchips nicht gut genug abgedeckt.

Andererseits handelt es sich hier um die Replikation eines bereits publizierten Ergebnisses, so dass sich die vorliegenden Analysen als starken Hinweis auf eine Bestätigung der Assoziation zwischen rs17210569 und dem Lp(a)-Plasmaspiegel werten lassen. Eine nochmalige Untersuchung dieses SNPs im Rahmen der auf 1000 Teilnehmer ausgeweiteten Studienpopulation sollte weiteren Aufschluss geben.

5.3.3 Limitationen der genetischen Assoziationsstudie

Der Zusammenhang der untersuchten SNPs mit der Anzahl der K IV-Typ 2-Kopien wurde nicht getestet. Für die beiden auf dem *LPA*-Gen gelegenen SNPs wurde dies in vorher gehenden Studien hinreichend geklärt. Die verbleibenden drei SNPs sind außerhalb von *LPA* gelegen und somit ist von keiner gekoppelten Vererbung auszugehen, so dass auf diese Assoziationstestung verzichtet wurde.

Mit ca. 500 Teilnehmern ist die vorliegende Studienpopulation für das Vorhaben einer genetischen Assoziationsstudie relativ klein gewählt. Trotz der neuartigen Rekrutierung der Patienten

in einer Fettstoffwechselambulanz und dem damit verbundenen Vorliegen von relativ hohen Lp(a)-Plasmaspiegeln war diese Stichprobe für die Erfassung von schwachen genetischen Assoziationen mit dem Lp(a)-Spiegel nicht ausreichend groß.

Auch die nicht signifikante genetische Assoziation von rs6919346 mit der Lp(a)-Plasmakonzentration lässt sich auf die zu geringe Teilnehmerzahl zurückführen. Die Ausweitung der Stichprobe auf 1000 Teilnehmer ist jedoch in Planung. Somit wird für die künftig geplanten Replikationsanalysen für Ergebnisse der BASE-II optimale Bedingungen geschaffen. In diesem Zusammenhang sollte auch der starke Hinweis der Assoziation zwischen rs17210569 nahe *TRPC4* und dem Lp(a)-Plasmaspiegel abschließend geklärt werden können.

6 Literaturverzeichnis

Literatur

- [1] © Statistisches Bundesamt W: Statistisches Bundesamt Deutschland - GENESIS-Online, 2012. URL <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/link/tabelleErgebnis/23211-0002>.
- [2] Parhofer KG: Klassifikationen von Dyslipoproteinämien. In Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. Schattauer, Stuttgart, 3. Auflage, 2007.
- [3] Ober C, Nord AS, Thompson EE et al.: Genome-wide association study of plasma lipoprotein(a) levels identifies multiple genes on chromosome 6q. *J Lipid Res*, Band 50(5), 2009:Seiten 798–806. PMID: 19124843 PMCID: PMC2666166.
- [4] Clarke R, Peden JF, Hopewell JC et al.: Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease. *N. Engl. J. Med.*, Band 361(26), 2009:Seiten 2518–2528. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20032323>, PMID: 20032323.
- [5] Lanktree MB, Anand SS, Yusuf S und Hegele RA: Comprehensive Analysis of Genomic Variation in the LPA Locus and Its Relationship to Plasma Lipoprotein(a) in South Asians, Chinese, and European Caucasians CLINICAL PERSPECTIVE. *Circ Cardiovasc Genet*, Band 3(1), 2010:Seiten 39–46. URL <http://circgenetics.ahajournals.org/content/3/1/39>.
- [6] Ronald J, Rajagopalan R, Cerrato F et al.: Genetic variation in LPAL2, LPA, and PLG predicts plasma lipoprotein(a) level and carotid artery disease risk. *Stroke*, Band 42(1), 2011:Seiten 2–9. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3020902/>, PMID: 21127300 PMCID: PMC3020902.
- [7] Dumitrescu L, Glenn K, Brown-Gentry K et al.: Variation in LPA Is Associated with Lp(a) Levels in Three Populations from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *PLoS One*, Band 6(1), 2011. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3030597/>, PMID: 21305047 PMCID: PMC3030597.
- [8] Bertram L, Bockenhoff A, Demuth I et al.: Cohort Profile: The Berlin Aging Study II (BASE-II). *International Journal of Epidemiology*, 2013. URL <http://www.ije.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/ije/dyt018>, cited by 0001.
- [9] Pearson TA und Manolio TA: HOw to interpret a genome-wide association study. *JAMA*, Band 299(11), 2008:Seiten 1335–1344. URL <http://dx.doi.org/10.1001/jama.299.11.1335>, 00495.

- [10] Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Statistisches Bundesamt (Destatis) - Todesursachen- Statistisches Bundesamt (Destatis). URL <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html>.
- [11] Staat & Gesellschaft - Krankenhäuser - Krankenhauspatienten - Statistisches Bundesamt (Destatis). URL <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankenhaeuser/Tabellen/DiagnosenInsgesamt.html>.
- [12] 12-Monats Prävalenz.pdf. Technischer Bericht, Berlin, 2011.
- [13] Coresh J, Kwiterovich PO, Smith HH und Bachorik PS: Association of plasma triglyceride concentration and LDL particle diameter, density, and chemical composition with premature coronary artery disease in men and women. *J. Lipid Res.*, Band 34(10), 1993:Seiten 1687–1697. URL <http://www.jlr.org/content/34/10/1687>, PMID: 8245719.
- [14] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A und Schwartz SM: Lessons From Sudden Coronary Death A Comprehensive Morphological Classification Scheme for Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Band 20(5), 2000:Seiten 1262–1275. URL <http://atvb.ahajournals.org/content/20/5/1262>, PMID: 10807742.
- [15] Muller JE, Tofler GH und Stone PH: Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation*, Band 79(4), 1989:Seiten 733–743. PMID: 2647318.
- [16] Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE et al.: A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Band 15(9), 1995:Seiten 1512–1531. URL <http://atvb.ahajournals.org/content/15/9/1512>, PMID: 7670967.
- [17] Shah PK, Falk E, Badimon JJ et al.: Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation*, Band 92(6), 1995:Seiten 1565–1569. PMID: 7664441.
- [18] Reiner Ž, Catapano AL, Backer GD et al.: ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*, Band 32(14), 2011:Seiten 1769–1818. URL <http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/32/14/1769>.
- [19] Benn M: Apolipoprotein B levels, APOB alleles, and risk of ischemic cardiovascular disease in the general population, a review. *Atherosclerosis*, Band 206(1), 2009:Seiten 17–30. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021915009000136>.

- [20] Apheresebehandlung bei isolierter Lp(a)-Erhöhung. Technischer Bericht, Unterausschuss „Ärztliche Behandlung“ des Gemeinsamen Bundesausschusses, 2008.
- [21] BERG K: A NEW SERUM TYPE SYSTEM IN MAN–THE LP SYSTEM. *Acta Pathol Microbiol Scand*, Band 59, 1963:Seiten 369–382. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14064818>, PMID: 14064818.
- [22] Dieplinger H und Utermann G: The seventh myth of lipoprotein(a): where and how is it assembled? *Curr. Opin. Lipidol.*, Band 10(3), 1999:Seiten 275–283. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10431664>, PMID: 10431664.
- [23] Brunner C, Kraft HG, Utermann G und Müller HJ: Cys4057 of apolipoprotein(a) is essential for lipoprotein(a) assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Band 90(24), 1993:Seiten 11643–11647. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7505444>, PMID: 7505444.
- [24] Guevara J J, Valentinova NV, Garcia O et al.: Interaction of apolipoprotein[a] with apolipoproteinB-100 Cys3734 region in lipoprotein[a] is confirmed immunochemically. *J. Protein Chem.*, Band 15(1), 1996:Seiten 17–25. PMID: 8838586.
- [25] Gabel BR und Koschinsky ML: Sequences within apolipoprotein(a) kringle IV types 6-8 bind directly to low-density lipoprotein and mediate noncovalent association of apolipoprotein(a) with apolipoprotein B-100. *Biochemistry*, Band 37(21), 1998:Seiten 7892–7898. PMID: 9601051.
- [26] McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ et al.: cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature*, Band 330(6144), 1987:Seiten 132–137. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3670400>, PMID: 3670400.
- [27] Tomlinson JE, McLean JW und Lawn RM: Rhesus monkey apolipoprotein(a). Sequence, evolution, and sites of synthesis. *J. Biol. Chem.*, Band 264(10), 1989:Seiten 5957–5965. URL <http://www.jbc.org/content/264/10/5957>.
- [28] Kraft HG, Köchl S, Menzel HJ, Sandholzer C und Utermann G: The apolipoprotein (a) gene: a transcribed hypervariable locus controlling plasma lipoprotein (a) concentration. *Hum. Genet.*, Band 90(3), 1992:Seiten 220–230. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1336760>, PMID: 1336760.
- [29] Lackner C, Cohen JC und Hobbs HH: Molecular definition of the extreme size polymorphism in apolipoprotein(a). *Hum. Mol. Genet.*, Band 2(7), 1993:Seiten 933–940. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8395942>, PMID: 8395942.

- [30] Haibach C, Kraft HG, Köchl S, Abe A und Utermann G: The number of kringle IV repeats 3-10 is invariable in the human apo(a) gene. *Gene*, Band 208(2), 1998:Seiten 253–258. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9524278>, PMID: 9524278.
- [31] Kraft HG und Utermann G: Lipoprotein(a). In *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schattauer, Stuttgart, 3. Auflage, 2007, (Seiten 216 – 230).
- [32] Utermann G, Menzel HJ, Kraft HG, Duba HC, Kemmler HG und Seitz C: Lp(a) glycoprotein phenotypes. Inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J Clin Invest*, Band 80(2), 1987:Seiten 458–465. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC442258/>, PMID: 2956279 PMCID: PMC442258.
- [33] Salonen EM, Jauhiainen M, Zardi L, Vaheri A und Ehnholm C: Lipoprotein(a) binds to fibronectin and has serine proteinase activity capable of cleaving it. *EMBO J*, Band 8(13), 1989:Seiten 4035–4040. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC401578/>, PMID: 2531657 PMCID: PMC401578.
- [34] Wade DP, Clarke JG, Lindahl GE et al.: 5' control regions of the apolipoprotein(a) gene and members of the related plasminogen gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 90(4), 1993:Seiten 1369–1373. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC45874/>, PMID: 7679504 PMCID: PMC45874.
- [35] Pillarisetti S, Paka L, Obunike JC, Berglund L und Goldberg IJ: Subendothelial retention of lipoprotein (a). Evidence that reduced heparan sulfate promotes lipoprotein binding to subendothelial matrix. *J. Clin. Invest.*, Band 100(4), 1997:Seiten 867–874. PMID: 9259586.
- [36] Hughes SD, Lou XJ, Ighani S et al.: Lipoprotein(a) vascular accumulation in mice. In vivo analysis of the role of lysine binding sites using recombinant adenovirus. *J. Clin. Invest.*, Band 100(6), 1997:Seiten 1493–1500. PMID: 9294116.
- [37] Lippi G und Guidi G: Lipoprotein(a): from ancestral benefit to modern pathogen? *QJM*, Band 93(2), 2000:Seiten 75–84. PMID: 10700477.
- [38] Rath M und Pauling L: Hypothesis: lipoprotein(a) is a surrogate for ascorbate. *PNAS*, Band 87(16), 1990:Seiten 6204–6207. URL <http://www.pnas.org/content/87/16/6204>, PMID: 2143582.
- [39] Yu HK, Kim JS, Lee HJ et al.: Suppression of colorectal cancer liver metastasis and extension of survival by expression of apolipoprotein(a) kringles. *Cancer Res.*, Band 64(19), 2004:Seiten 7092–7098. PMID: 15466205.

- [40] Yang Hh, Chen Xf, Hu W et al.: Lipoprotein(a) level and its association with tumor stage in male patients with primary lung cancer. *Clin. Chem. Lab. Med.*, Band 47(4), 2009:Seiten 452–457. PMID: 19222374.
- [41] Kökoğlu E, Karaarslan I, Karaarslan HM und Baloğlu H: Elevated serum Lp(a) levels in the early and advanced stages of breast cancer. *Cancer Biochem. Biophys.*, Band 14(2), 1994:Seiten 133–136. PMID: 7889493.
- [42] Marrer E, Wagner A, Montaye M et al.: Lipoprotein(a) plasma levels and the risk of cancer: the PRIME study. *Eur. J. Cancer Prev.*, 2012. PMID: 23010950.
- [43] Ogorelkova M, Gruber A und Utermann G: Molecular Basis of Congenital Lp(A) Deficiency: A Frequent Apo(A) Null Mutation in Caucasians. *Hum. Mol. Genet.*, Band 8(11), 1999:Seiten 2087–2096. URL <http://hmg.oxfordjournals.org/content/8/11/2087>.
- [44] Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K et al.: Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J*, Band 31(23), 2010:Seiten 2844–2853. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3295201/>, PMID: 20965889 PMCID: PMC3295201.
- [45] Erqou S, Kaptoge S, Perry PL et al.: Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality. *JAMA*, Band 302(4), 2009:Seiten 412–423. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19622820>, PMID: 19622820.
- [46] Kraft HG, Menzel HJ, Hoppichler F, Vogel W und Utermann G: Changes of genetic apolipoprotein phenotypes caused by liver transplantation. Implications for apolipoprotein synthesis. *J. Clin. Invest.*, Band 83(1), 1989:Seiten 137–142. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2521341>, PMID: 2521341.
- [47] White AL und Lanford RE: Cell surface assembly of lipoprotein(a) in primary cultures of baboon hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, Band 269(46), 1994:Seiten 28716–28723. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7961823>, PMID: 7961823.
- [48] Brunner C, Lobentanz EM, Pethö-Schramm A et al.: The Number of Identical Kringle IV Repeats in Apolipoprotein(a) Affects Its Processing and Secretion by HepG2 Cells. *J. Biol. Chem.*, Band 271(50), 1996:Seiten 32403–32410. URL <http://www.jbc.org/content/271/50/32403>.
- [49] Kronenberg F, Trenkwalder E, Lingenhel A et al.: Renovascular arteriovenous differences in Lp[a] plasma concentrations suggest removal of Lp[a] from the renal circulation. *J. Lipid Res.*, Band 38(9), 1997:Seiten 1755–1763. URL <http://www.jlir.org/content/38/9/1755>.

- [50] Kronenberg F: Epidemiology, pathophysiology and therapeutic implications of lipoprotein(a) in kidney disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, Band 2(5), 2004:Seiten 729–743. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350174>, PMID: 15350174.
- [51] Sing CF, Schultz JS und Shreffler DC: The genetics of the Lp antigen. II. A family study and proposed models of genetic control. *Ann. Hum. Genet.*, Band 38(1), 1974:Seiten 47–56. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4460864>, PMID: 4460864.
- [52] Sandholzer C, Hallman DM, Saha N et al.: Effects of the apolipoprotein(a) size polymorphism on the lipoprotein(a) concentration in 7 ethnic groups. *Hum. Genet.*, Band 86(6), 1991:Seiten 607–614. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2026424>, PMID: 2026424.
- [53] Wu JH und Lee IN: Studies of apolipoprotein (a) promoter from subjects with different plasma lipoprotein (a) concentrations. *Clin. Biochem.*, Band 36(4), 2003:Seiten 241–246. PMID: 12810151.
- [54] Hsieh Wu J: Lipoprotein(a) in vascular disease, cancer and longevity. *Chang Gung Med J*, Band 34(6), 2011:Seiten 555–564. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22196058>, PMID: 22196058.
- [55] Danesh J, Collins R und Peto R: Lipoprotein(a) and Coronary Heart Disease Meta-Analysis of Prospective Studies. *Circulation*, Band 102(10), 2000:Seiten 1082–1085. URL <http://circ.ahajournals.org/content/102/10/1082>.
- [56] Berglund L und Ramakrishnan R: Lipoprotein(a): an elusive cardiovascular risk factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Band 24(12), 2004:Seiten 2219–2226. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15345512>, PMID: 15345512.
- [57] Kamstrup PR, Benn M, Tybjaerg-Hansen A und Nordestgaard BG: Extreme lipoprotein(a) levels and risk of myocardial infarction in the general population: the Copenhagen City Heart Study. *Circulation*, Band 117(2), 2008:Seiten 176–184. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18086931>, PMID: 18086931.
- [58] Seed M, Hoppichler F, Reaveley D et al.: Relation of serum lipoprotein(a) concentration and apolipoprotein(a) phenotype to coronary heart disease in patients with familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.*, Band 322(21), 1990:Seiten 1494–1499. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2139920>, PMID: 2139920.
- [59] Discepolo W, Wun T und Berglund L: Lipoprotein(a) and thrombocytes: potential mechanisms underlying cardiovascular risk. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, Band 35(3-4), 2006:Seiten 314–321. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16877880>, PMID: 16877880.

- [60] Grainger DJ, Kirschenlohr HL, Metcalfe JC, Weissberg PL, Wade DP und Lawn RM: Proliferation of human smooth muscle cells promoted by lipoprotein(a). *Science*, Band 260(5114), 1993:Seiten 1655–1658. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8503012>, PMID: 8503012.
- [61] Tsimikas S, Brilakis ES, Miller ER et al.: Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.*, Band 353(1), 2005:Seiten 46–57. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16000355>, PMID: 16000355.
- [62] Tsimikas S, Kiechl S, Willeit J et al.: Oxidized phospholipids predict the presence and progression of carotid and femoral atherosclerosis and symptomatic cardiovascular disease: five-year prospective results from the Bruneck study. *J. Am. Coll. Cardiol.*, Band 47(11), 2006:Seiten 2219–2228. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16750687>, PMID: 16750687.
- [63] Nielsen LB, Grønholdt ML, Schroeder TV, Stender S und Nordestgaard BG: In vivo transfer of lipoprotein(a) into human atherosclerotic carotid arterial intima. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Band 17(5), 1997:Seiten 905–911. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9157954>, PMID: 9157954.
- [64] Erqou S, Thompson A, Di Angelantonio E et al.: Apolipoprotein(a) Isoforms and the Risk of Vascular Disease: Systematic Review of 40 Studies Involving 58,000 Participants. *Journal of the American College of Cardiology*, Band 55(19), 2010:Seiten 2160–2167. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109710009046>.
- [65] Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R und Nordestgaard BG: Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *JAMA*, Band 301(22), 2009:Seiten 2331–2339. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19509380>, PMID: 19509380.
- [66] Kamstrup PR, Tybjærg-Hansen A, Steffensen R und Nordestgaard BG: Pentanucleotide Repeat Polymorphism, Lipoprotein(a) Levels, and Risk of Ischemic Heart Disease. *JCEM*, Band 93(10), 2008:Seiten 3769–3776. URL <http://jcem.endojournals.org/content/93/10/3769>.
- [67] Marcovina SM, Koschinsky ML, Albers JJ und Skarlatos S: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop on Lipoprotein(a) and Cardiovascular Disease: Recent Advances and Future Directions. *Clinical Chemistry*, Band 49(11), 2003:Seiten 1785–1796. URL <http://www.clinchem.org/content/49/11/1785>.
- [68] Maher VM, Brown BG, Marcovina SM, Hillger LA, Zhao XQ und Albers JJ: Effects of lowering elevated LDL cholesterol on the cardiovascular risk of lipoprotein(a). *JAMA*,

- Band 274(22), 1995:Seiten 1771–1774. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7500507>, PMID: 7500507.
- [69] Chapman MJ, Redfern JS, McGovern ME und Giral P: Niacin and fibrates in atherogenic dyslipidemia: pharmacotherapy to reduce cardiovascular risk. *Pharmacol. Ther.*, Band 126(3), 2010:Seiten 314–345. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20153365>, PMID: 20153365.
- [70] Guyton JR: Niacin in cardiovascular prevention: mechanisms, efficacy, and safety. *Curr. Opin. Lipidol.*, Band 18(4), 2007:Seiten 415–420. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17620858>, PMID: 17620858.
- [71] Sanyal S, Karas RH und Kuvin JT: Present-day uses of niacin: effects on lipid and non-lipid parameters. *Expert Opin Pharmacother*, Band 8(11), 2007:Seiten 1711–1717. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17685887>, PMID: 17685887.
- [72] Scanu AM und Bamba R: Niacin and lipoprotein(a): facts, uncertainties, and clinical considerations. *Am. J. Cardiol.*, Band 101(8A), 2008:Seiten 44B–47B. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18375241>, PMID: 18375241.
- [73] Haynes R, Jiang L, Hopewell JC et al.: HPS2-THRIVE randomized placebo-controlled trial in 25 673 high-risk patients of ER niacin/laropiprant: trial design, pre-specified muscle and liver outcomes, and reasons for stopping study treatment. *Eur Heart J*, Band 34(17), 2013:Seiten 1279–1291. URL <http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/34/17/1279>, PMID: 23444397.
- [74] Visser ME, Wagener G, Baker BF et al.: Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, lowers low-density lipoprotein cholesterol in high-risk statin-intolerant patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Heart J*, Band 33(9), 2012:Seiten 1142–1149. URL <http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/33/9/1142>.
- [75] Cannon CP, Shah S, Danksy HM et al.: Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.*, Band 363(25), 2010:Seiten 2406–2415. PMID: 21082868.
- [76] Ladenson PW, Kristensen JD, Ridgway EC et al.: Use of the thyroid hormone analogue eprotirome in statin-treated dyslipidemia. *N. Engl. J. Med.*, Band 362(10), 2010:Seiten 906–916. PMID: 20220185.
- [77] Desai NR, Kohli P, Giugliano RP et al.: AMG145, a Monoclonal Antibody Against Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9, Significantly Reduces Lipoprotein(a) in Hypercholesterolemic Patients Receiving Statin Therapy: An Analysis From the LDL-C Assessment

- With Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Monoclonal Antibody Inhibition Combined With Statin Therapy (LAPLACE)-Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 57 Trial. *Circulation*, Band 128(9), 2013:Seiten 962–969. 00000.
- [78] Schultz O, Oberhauser F, Saech J et al.: Effects of Inhibition of Interleukin-6 Signalling on Insulin Sensitivity and Lipoprotein (A) Levels in Human Subjects with Rheumatoid Diseases. *PLoS One*, Band 5(12), 2010. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3001451/>, PMID: 21179199 PMCID: PMC3001451.
- [79] Kagawa A, Azuma H, Akaike M, Kanagawa Y und Matsumoto T: Aspirin Reduces Apolipoprotein(a) (Apo(a)) Production in Human Hepatocytes by Suppression of Apo(a) Gene Transcription. *J. Biol. Chem.*, Band 274(48), 1999:Seiten 34111–34115. URL <http://www.jbc.org/content/274/48/34111>, PMID: 10567380.
- [80] Jaeger BR, Richter Y, Nagel D et al.: Longitudinal cohort study on the effectiveness of lipid apheresis treatment to reduce high lipoprotein(a) levels and prevent major adverse coronary events. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, Band 6(3), 2009:Seiten 229–239. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234501>, PMID: 19234501.
- [81] Keller C: Apheresis in coronary heart disease with elevated Lp (a): a review of Lp (a) as a risk factor and its management. *Ther Apher Dial*, Band 11(1), 2007:Seiten 2–8. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17309568>, PMID: 17309568.
- [82] Rosada A, Kassner U, Vogt A, Willhauck M, Parhofer K und Steinhagen-Thiessen E: Does Regular Lipid Apheresis in Patients With Isolated Elevated Lipoprotein(a) Levels Reduce the Incidence of Cardiovascular Events? *Artificial Organs*, 2013. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aor.12135/abstract>, cited by 0000.
- [83] Banisch DM: Die Lebensqualität von Patienten mit Lipidapherese. Doktorarbeit, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, 2012.
- [84] Boerwinkle E, Leffert CC, Lin J, Lackner C, Chiesa G und Hobbs HH: Apolipoprotein(a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein(a) concentrations. *J Clin Invest*, Band 90(1), 1992:Seiten 52–60. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC443062/>, PMID: 1386087 PMCID: PMC443062.
- [85] Boerwinkle E, Menzel HJ, Kraft HG und Utermann G: Genetics of the quantitative Lp(a) lipoprotein trait. III. Contribution of Lp(a) glycoprotein phenotypes to normal lipid variation. *Hum. Genet.*, Band 82(1), 1989:Seiten 73–78. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2523852>, PMID: 2523852.
- [86] Trommsdorff M, Köchl S, Lingenhel A et al.: A pentanucleotide repeat polymorphism in the 5' control region of the apolipoprotein(a) gene is associated with lipoprotein(a) plasma

- concentrations in Caucasians. *J. Clin. Invest.*, Band 96(1), 1995:Seiten 150–157. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7615785>, PMID: 7615785.
- [87] Rader DJ, Cain W, Ikewaki K et al.: The inverse association of plasma lipoprotein(a) concentrations with apolipoprotein(a) isoform size is not due to differences in Lp(a) catabolism but to differences in production rate. *J Clin Invest*, Band 93(6), 1994:Seiten 2758–2763. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC294537/>, PMID: 8201014 PMCID: PMC294537.
- [88] Mooser V, Mancini FP, Bopp S et al.: Sequence polymorphisms in the apo(a) gene associated with specific levels of Lp(a) in plasma. *Hum. Mol. Genet.*, Band 4(2), 1995:Seiten 173–181. URL <http://hmg.oxfordjournals.org/content/4/2/173>.
- [89] Ronald J, Rajagopalan R, Cerrato F et al.: Genetic variation in LPAL2, LPA, and PLG predicts plasma lipoprotein(a) level and carotid artery disease risk. *Stroke*, Band 42(1), 2011:Seiten 2–9. PMID: 21127300 PMCID: PMC3020902.
- [90] Parson W, Kraft HG, Niederstätter H et al.: A common nonsense mutation in the repetitive Kringle IV-2 domain of human apolipoprotein(a) results in a truncated protein and low plasma Lp(a). *Human Mutation*, Band 24(6), 2004:Seite 474 bis 480. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.20101/abstract>.
- [91] Berthold HK, Laudes M, Krone W und Gouni-Berthold I: Association between the Interleukin-6 Promoter Polymorphism -174G/C and Serum Lipoprotein(a) Concentrations in Humans. *PLoS One*, Band 6(9), 2011. PMID: 21935443 PMCID: PMC3173458.
- [92] Wypasek E, Undas A, Sniezek-Maciejewska M et al.: The increased plasma C-reactive protein and interleukin-6 levels in patients undergoing coronary artery bypass grafting surgery are associated with the interleukin-6-174G > C gene polymorphism. *Ann. Clin. Biochem.*, Band 47(Pt 4), 2010:Seiten 343–349. PMID: 20592333.
- [93] Fernández-Real JM, Broch M, Vendrell J, Richart C und Ricart W: Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Band 85(3), 2000:Seiten 1334–1339. PMID: 10720087.
- [94] Zabaneh D, Kumari M, Sandhu M et al.: Meta analysis of candidate gene variants outside the LPA locus with Lp(a) plasma levels in 14,500 participants of six White European cohorts. *Atherosclerosis*, Band 217(2), 2011:Seiten 447–451. URL [http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(11\)00357-1/abstract](http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150(11)00357-1/abstract).
- [95] Lopez S, Buil A, Ordenez J et al.: Genome-wide Linkage Analysis for Identifying Quantitative Trait Loci Involved in the Regulation of Lipoprotein a (Lpa) Levels. *Eur J Hum Genet*, Band 16(11), 2008:Seiten 1372–1379. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2749722/>, PMID: 18560444 PMCID: PMC2749722.

- [96] Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL et al.: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, Band 390(6656), 1997:Seiten 175–179. PMID: 9367155.
- [97] Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR et al.: Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Band 96(7), 1999:Seiten 3540–3545. PMID: 10097072.
- [98] Luegmayer E, Glantschnig H, Wesolowski GA et al.: Osteoclast formation, survival and morphology are highly dependent on exogenous cholesterol/lipoproteins. *Cell Death & Differentiation*, Band 11, 2004:Seiten S108–S118. URL <http://www.nature.com/cdd/journal/v11/n1s/full/4401399a.html>.
- [99] von Spiczak S, Muhle H, Helbig I et al.: Association study of TRPC4 as a candidate gene for generalized epilepsy with photosensitivity. *Neuromolecular Med.*, Band 12(3), 2010:Seiten 292–299. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20574736>, PMID: 20574736.
- [100] Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P und Gauthier S: Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet*, Band 342(8873), 1993:Seiten 697–699. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8103819>, PMID: 8103819.
- [101] Purcell S, Neale B, Todd-Brown K et al.: PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.*, Band 81(3), 2007:Seiten 559–575. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17701901>, PMID: 17701901.
- [102] Walden CC und Hegele RA: DNA analysis in type III hyperlipoproteinemia. *CMAJ*, Band 149(4), 1993:Seiten 445–446. Cited by 0000.
- [103] Koenig W, Marx N, Thiery J und Klose G: 2012_Pocket-Leitlinien_Dyslipidaemie.pdf. Technischer Bericht, Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V., 2011.
- [104] Novotny WF, Brown SG, Miletich JP, Rader DJ und Broze J G J: Plasma antigen levels of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor in patient samples. *Blood*, Band 78(2), 1991:Seiten 387–393. PMID: 2070076.
- [105] Broze J George J und Girard TJ: Tissue factor pathway inhibitor: structure-function. *Front. Biosci.*, Band 17, 2012:Seiten 262–280. PMID: 22201743.
- [106] Croft M, Duan W, Choi H, Eun SY, Madireddi S und Mehta A: TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights. *Trends Immunol.*, Band 33(3), 2012:Seiten 144–152. PMID: 22169337.

- [107] Olkkonen VM und Lehto M: Oxysterols and oxysterol binding proteins: role in lipid metabolism and atherosclerosis. *Ann. Med.*, Band 36(8), 2004:Seiten 562–572. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15768828>, PMID: 15768828.

7 Anhang (Lebenslauf, Erklärung)

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Larissa Kindermann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Rekrutierung, Charakterisierung und Validierung einer Stichprobe zur Replikation von Befunden zu genetischen Assoziationen im Bereich des Lipidstoffwechsels aus der Berliner Altersstudie II selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Larissa Kindermann

Der Lebenslauf ist aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Fassung der Arbeit nicht enthalten und befindet sich ausschließlich in der gedruckten Fassung.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. rer. nat. I. Demuth für seine überaus engagierte und motivierende Betreuung meiner Dissertation.

Ich möchte mich ganz herzlich beim gesamten Team der Lipidambulanz der Charité-Universitätsmedizin Berlin für die Unterstützung bei der Etablierung der Studienkohorte und Durchführung der Replikationsstudie bedanken.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch ganz herzlich Frau Prof. Dr. E. Steinhagen-Thiessen für die Aufnahme in die Forschungsgruppe Geriatrie und die wertvolle Unterstützung danken.

Einen herzlichen Dank an Dr. med. U. Kassner für ihre unschätzbare stetige Hilfe und Unterstützung.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Dr. med. L. Bertram vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik bedanken für die Durchführung der Genotypisierung und wertvolle Unterstützung bei der Interpretation der genetischen Assoziationsstudie.

Lieber Markus, lieber Leonard: Danke! Euch ist diese Arbeit gewidmet.