

Aus dem Institut für Experimentelle
und Klinische Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**ASSOZIATION VON MYELOPEROXIDASE- UND ABCA1-TRANSPORTER-
VARIANTEN ZUM RISIKO DER KORONAREN HERZKRAKHEIT**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
MARCO DIEKMANN
aus **Amsterdam**
Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Laudes

Tag der mündlichen

Prüfung: 13.03.2013

Zum Druck genehmigt,

Kiel, den 13.03.2013

gez. Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Stoffwechsel des Cholesterols und der Lipoproteine	2
1.2 ATP-Binding cassette transporter	2
1.3 Die ABCA-Familie	3
1.4 Das ABC-Transportprotein ABCA1	4
1.4.1 Aufbau und Funktion der Lipoproteine	6
1.5 Die Myeloperoxidase	9
1.5.1 Funktionelle Bedeutung genetischer Varianten der MPO	
1.6. Zusammenhang zwischen dem ABCA1-Transporter und der Myeloperoxidase	10
1.7 Ziel der Arbeit	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Studienpopulation	12
2.2 Geräte, Materialien und Puffer	13
2.3 Genotypisierung	15
2.4 Kontrollsequenzierung	19
2.5 Statistische Methoden	19
3 Ergebnisse	20
3.1 Charakterisierung der Studienpopulation	20
3.2 Verteilung der ABCA1- und MPO-Polymorphismen in der Studienpopulation	21
3.3 Einfluss der Polymorphismen auf die Lipidparameter	22
3.3.1 Einfluss des ABCA1 -14C>T Polymorphismus auf die Lipidparameter	22
3.3.2 Einfluss des ABCA1 1051G>A Polymorphismus auf die Lipidparameter	22
3.3.3 Einfluss des MPO -463G>A Polymorphismus auf die Lipidparameter	22
3.3.4 Einfluss der Kombination des ABCA1 -14C>T Polymorphismus und des MPO -463G>A Polymorphismus auf die Lipidparameter	23

3.3.5 Einfluss der Kombination des ABCA1 1051G>A Polymorphismus und des MPO -463G>A Polymorphismus auf die Lipidparameter	30
3.4 Ergebnisse des Raucherkollektives im rezessiven Modell	30
4 Diskussion	32
4.1 Besonderheiten der Studienpopulation	32
4.2 Veränderungen in den Lipidparametern	33
4.2.1 Lp(a)	39
4.3 Einfluss des Zigarettenrauchens	40
5 Zusammenfassung	42
6 Literaturverzeichnis	44
7 Danksagung	51
8 Lebenslauf	52

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-Binding Cassette
ADP	Adenosintriphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APO A	Apolipoprotein A
APO B	Apolipoprotein B
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	<i>Body Mass Index</i>
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CE	Cholesterolester
CETP	Cholesterolester-Transfer-Protein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dATP α S	Desoxyadenosine alpha-thiotriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNDP	Desoxyribonukleosiddiphosphat
dNMP	Desoxyribonukleosidmonophosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
et al.	<i>et alii</i>
FC	Freies Cholesterol
G	Guanin
HCit	Homocitrullin
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HDL-c	<i>High density lipoprotein-Cholesterol</i>
IDL	<i>Intermediate density lipoprotein</i>
kDa	Kilo-Dalton
KHK	koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
LCAT	<i>Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LDL-c	<i>Low density lipoprotein-Cholesterol</i>
Lp(a)	Lipoprotein A
MPO	Myeloperoxidase

n	Anzahl
NBD	<i>Nucleotide binding domain</i>
OR	Odds ratio
p	Fehlerwahrscheinlichkeit, Maß für die Signifikanz
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPAR	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>
PPi	Pyrophosphat
PSQ	<i>Pyrosequencing</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SA	Standardabweichung
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SRA	<i>Scavenger-Receptor A</i>
SRB	<i>Scavenger-Receptor B</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TG	Triglyceride
TMD	Transmembran-Domäne
Tyr	Tyrosin
VHDL	<i>Very high density lipoprotein</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
WHR	<i>Waist to hip ratio</i>

1. Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie die koronare Herzkrankheit (KHK) sind durch ihre steigende Prävalenz und ihres hohen Mortalitäts- und Morbiditätsrisikos ein großes gesundheitspolitisches und auch sozioökonomisches Problem.

Im Jahr 2005 wurden weltweit 17,5 Millionen Todesfälle aufgrund von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (30 % der weltweiten Gesamtmortalität) verzeichnet.

6 Millionen Todesfälle konnten auf einen Herzinfarkt und 5,7 Millionen auf einen Apoplex zurückgeführt werden. Dieser Trend wird sich, bis zum Jahr 2015 auf jährlich 20 Millionen Todesfälle erhöhen (WHO Fact Sheet no. 317, 2009).

Die KHK ist eine Erkrankung, bei der es meist durch eine Atherosklerose zu einer Ischämie des Myokards kommt. Das heißt, es kommt zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels. Häufigste Ursache ist eine atherosklerotische Erkrankung der epikardialen Koronararterien. Risikofaktoren, die eine KHK begünstigen sind nach der Framingham-Studie in beeinflussbare und nicht beeinflussbare Faktoren einzuteilen (Kannel WB 1979). Die vier klassischen beeinflussbaren Risikofaktoren sind Hypercholesterinämie, arterieller Hypertonus, Nikotinabusus und Diabetes mellitus. Des Weiteren spielt der Body-Mass-Index bzw. der Bauchumfang eine entscheidende Rolle. Zu den nicht beeinflussenden Risikofaktoren werden das Geschlecht und das Alter gerechnet. Weitere nennenswerte Risikofaktoren sind erhöhtes Lipoprotein-(a), c-reaktives Protein, Bewegungsmangel und negativer Stress.

Zusätzlich gibt es zunehmende Hinweise, dass in der Ätiologie der KHK auch genetische Faktoren berücksichtigt werden sollten.

Da die Plasma-LDL-Cholesterol-Konzentration mit dem KHK-Risiko assoziiert ist, stellt sich die Frage, ob genetische Varianten des Cholesteroltransporters ABCA1 und Modulatoren desselben einen zusätzlichen hereditären Risikofaktor darstellen könnten.

1.1 Stoffwechsel des Cholesterols und der Lipoproteine

Cholesterol ist ein polyzyklischer Alkohol, welcher der Gruppe der Steroide zugeordnet wird und einen amphiphilen Charakter besitzt.

Für den Körper ist es ein essenzielles Lipid und Hauptbestandteil von Steroidhormonen, der Gallensäuren und Plasmamembranen, denen es als Membranstabilisator dient.

Cholesterol ist ein überaus wichtiger Bestandteil des Körpers und wird größtenteils von diesem selbst produziert. Der geringere Teil wird über die Nahrung aufgenommen. Um den Tagesbedarf hinreichend abzudecken, werden ca. 700-900 mg Cholesterol pro Tag überwiegend hepatisch endogen synthetisiert.

Exogen zugeführtes Cholesterol, wird zusammen mit den Triglyceriden im Darm über Niemann-Pick C1 Like 1-Transporterproteine der Enterozyten resorbiert und in Chylomikronen aufgenommen. Diese werden dann über die Lymphwege und anschließend über das venöse System weiter bis zur Leber transportiert (Altmann *et al.*, 2004).

In der Leber werden das aufgenommene exogene, sowie das endogen produzierte Cholesterol in Lipoproteine, vorwiegend low-density-Lipoprotein (LDL) verpackt und in das Plasma abgegeben.

1.2 ATP-binding cassette transporter (ABC)

Die ABC-Transporter sind die größte Gruppe der transmembranären Transporter, sie lassen sich in sieben Untergruppen von A-G aufteilen. Insgesamt sind bis heute 49 humane ABC-Transporter bekannt (Dean and Annilo, 2005).

ABC-Transporter sind eine strukturell verwandte Familie aus Transmembranproteinen, welche die Aufgabe haben verschiedenste Substrate z.B. Lipide, Kohlenhydrate, Peptide, aber auch Chemotherapeutika durch extra- und intrazelluläre Membranen entgegen eines Konzentrationsgradienten aktiv zu transportieren (Dean and Annilo, 2005; Higgins *et al.*, 1990a).

Die ABC-Transporter bestehen aus mindestens zwei transmembranären Domänen (TMD), die sich zu einem Transmembrantransporter zusammenlagern. Die TMDs

bestehen jeweils aus fünf oder sechs Helices und zwei „ATP-Binding-Domains“ oder auch „Nucleotide-Binding-Domains“ (NBD) (siehe Abb. 1.1) (Davidson and Maloney, 2007).

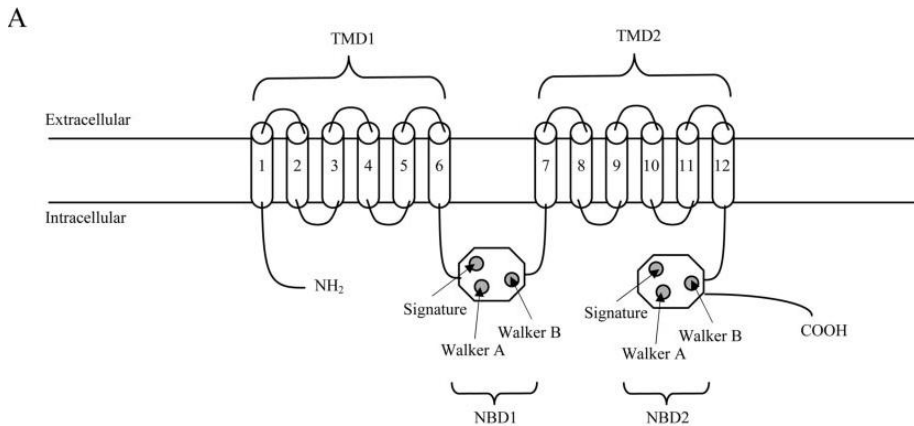


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines ABC-Transporters (Couture et al., 2006) (TMD: Transmembrane-Domain, NBD: Nucleotide-Binding-Domains, COOH: Carbonsäure)

Die NBDs befinden sich immer im Zytoplasma der Zelle, wo sie durch ATP-Hydrolyse Energie gewinnen, um den aktiven Transport der Substrate entgegen eines Konzentrationsgradienten zu ermöglichen (Higgins et al., 1990b; Higgins, 1992).

1.3 Die ABCA-Familie

Die ABCA-Familie besteht aus insgesamt 12 Mitgliedern, ABCA1 bis ABCA10, ABCA12 und ABCA13 (Tab. 1.1).

In dieser Familie sind der ABCA1- und der ABCA4-Transporter die am besten untersuchten Mitglieder, da Mutationen in diesen Genen mit klinisch manifesten Krankheiten korrelieren. Beim ABCA1-Gen manifestieren sich verschiedene Mutationen z.B. in der Tangier-Krankheit und im ABCA4-Gen im Morbus Stargardt.

Tab. 1.1: Genomik und Funktion der ABCA-Transportergruppe

Symbol	Synonym	Expressionsort	Genlokus	Funktion
ABCA1	ABC1	Ubiquitär	9q31.1	überträgt Cholesterol auf HDL, kann α -Tocopherol transportieren
ABCA2	ABC2	Gehirn	9q34.3	kann Estramustin aus Zellen transportieren
ABCA3	ABC3, ABCC	Lunge	16p13.3	Surfactant-Sekretion?
ABCA4	ABCR	Photorezeptoren	1p21.3	N-Retinyl - phosphatidylethanolamin-Efflux
ABCA5		Herz, Muskeln, Testes	17q24.3	Funktion unbekannt
ABCA6		Leber	17q24.3	Funktion unbekannt
ABCA7		Milz, Thymus	19p13.3	Funktion unbekannt
ABCA8		Ovar	17q24.3	Funktion unbekannt
ABCA9		Herz	17q24.3	Funktion unbekannt
ABCA10		Herz, Muskeln	17q24.3	Funktion unbekannt
ABCA12		Magen	2q34	Funktion unbekannt
ABCA13		gering in allen Geweben	7p12.3	Funktion unbekannt

1.4 Das ABC-Transporterprotein ABCA1

Das ABCA1-Gen besteht aus 50 Exons und hat eine Länge von 140 Kilobasen. Es kodiert ein Protein welches aus 2261 Aminosäuren besteht und eine Größe von 220 kDa aufweist. Der ABCA1-Transporter wird primär in der Placenta, der Leber, der Lunge, den Nebennieren und in fetalem Gewebe exprimiert (Probst *et al.*, 2004a; Hong *et al.*, 2002).

Der ABCA1-Transporter ist ein membranständiger Cholesterol- und Phospholipid-Transporter, der mit dem Apolipoprotein A1 (ApoA1) interagiert und Cholesterol aus peripheren Zellen wie z.B. Makrophagen auf das präbeta-HDL überträgt. Zusätzlich wird das sich im LDL und HDL befindende Vitamin α -Tocopherol auch über den ABCA1-Transporter transportiert.

Die Aktivierung des ABCA1-Transporters *in-vitro* erfolgt über Proteinkinasen; die

Genexpression wird über einen Import oder Export von Sterolen in bzw. aus Makrophagen reguliert (Hong *et al.*, 2002c). Des Weiteren kann die Genexpression durch nukleäre Hormonrezeptoren wie Oxysterol- und Gallensäure-Rezeptoren reguliert werden (Repa *et al.*, 2000).

Das ABCA1-Gen ist auf Chromosom 9q31 lokalisiert (Luciani *et al.*, 1994). Später konnte gezeigt werden, dass das Gen mit der Tangier-Krankheit assoziiert ist. Sie ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Krankheit, bei der der Cholesterol-Metabolismus im reticulo-endothelialen System gestört ist. Außerdem ist sie durch das Fehlen von HDL im Blutplasma gekennzeichnet. Zusätzliche Symptome der Krankheit sind eine Splenomegalie, Lymphknoten- und Tonsillenhypertrophie (Bodzioch *et al.*, 1999).

Es sind derzeit mindestens 21 verschiedene Mutationen im ABCA1-Gen bei Patienten mit der Tangier-Krankheit bekannt (Probst *et al.*, 2004b).

Ferner wurden andere Krankheiten wie die familiäre Hypoalphaproteinämie, die mit extrem niedrigen HDL-Spiegeln assoziiert ist, mit dem ABCA1-Gen in Verbindung gebracht. Darüber hinaus ist das Risiko eine juvenile bzw. vorzeitige KHK zu entwickeln bei der Hypoalphaproteinämie deutlich erhöht (Hong *et al.*, 2002b).

Des Weiteren wurden Polymorphismen auf dem ABCA1-Gen identifiziert, die mit erhöhten oder erniedrigten Plasmalipid-(HDL)-Konzentrationen einhergehen. Folglich könnte das Risiko für eine KHK moduliert werden.

1.4.1 Aufbau und Funktion der Lipoproteine

Die Lipoproteine bestehen aus Lipiden und Proteinen, sie bilden Mizellen, um das hydrophobe Cholesterol im Blutplasma zu transportieren. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte werden die Lipoproteine in 5 Gruppen unterteilt:

1. High density lipoprotein (HDL)
2. Very low density lipoprotein (VLDL)
3. Low density lipoprotein (LDL)
4. Intermediate density lipoprotein (IDL)
5. Very high density lipoprotein (VHDL)

VLDLs transportieren hauptsächlich Triglyceride und etwas Cholesterol, sie werden in der Leber produziert und enthalten als typischen Baustein das Apolipoprotein B-100 (ApoB-100).

Bei der Verstoffwechslung der VLDLs durch die Lipoproteinlipase entstehen IDLs,

welche weiter abgebaut werden oder enzymatisch zu LDLs umgewandelt werden.

LDLs bestehen hauptsächlich (ca. 45 %) aus Cholesterol und dem ApoB-100, ihre Aufgabe ist es, das Cholesterol in die Peripherie zu Cholesterol-verbrauchenden Zellen, wie z.B. den Nebennieren und den Gonaden, und anschließend zurück zur Leber zu transportieren.

Zirkuliert ein Überschuss von LDLs im Blut, werden sie von Makrophagen phagozytiert. Phagozytieren die Makrophagen jedoch übermäßig viele LDLs, werden sie zu Schaumzellen, welche den Beginn eines Atheroms darstellen.

HDLs sind Makromoleküle, die chemisch betrachtet aus Apolipoprotein A1, Apolipoprotein A2, Apolipoprotein C, Phospholipiden, Cholesterol/Cholesterolester und Triglyceriden bestehen. Die Funktion des HDL ist es Cholesterol bzw. Cholesterol aus der Peripherie hämatogen in die Leber zur weiteren Verstoffwechslung zu transportieren.

Apolipoprotein A1 macht mit 30-35 % den größten Anteil aus. Es gelangt mit der Nahrung durch Chylomikronen in den Kreislauf, kann jedoch auch von der Leber neu synthetisiert werden (Schmitz *et al.*, 1985). Apolipoprotein A1 (ApoA1) interagiert mit dem ABCA1-Transporter, dabei wird freies Cholesterol aus den peripheren Zellen wie z.B. Makrophagen auf das prä-Beta-HDL übertragen (siehe Abb. 1.2). Dies verhindert einen intrazellulären Anstieg des Cholesterols.

Anschließend erfolgt eine Veresterung des Cholesterols durch die Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCAT) mit ApoA1 als Co-Faktor. Auf diese Weise entsteht das discordiale dichte HDL-2 und das kleinere, aber weniger dichte HDL-3. Durch den ABCG1-Transporter können diese beiden Partikel weiteres Cholesterol aus Zellen z.B. Makrophagen aufnehmen und zur Leber transportieren. In der Leber interagiert das ApoA1 mit dem hepatozytären Scavenger-Rezeptor vom Typ B1 (SRB1) mit nachfolgender Exkretion des Cholesterols in die Galle.

Würde es bei dem beschriebenen Stoffwechselfvorgang zu einem Funktionsverlust des ABCA1-Transporters kommen, würde Cholesterol in der Zelle akkumulieren und dazu führen, dass ApoA1 nicht mehr auf das prä-Beta-HDL übertragen wird und dadurch die Plasmakonzentration des prä-Beta-HDL rapide sinkt. Folglich kommt der HDL-Metabolismus zum Stillstand (siehe Abb. 1.3) (Young *et al.*, 1999).

Ein anderer Weg der Metabolisierung des Cholesterols ist ein Austausch zwischen Cholesterolestern des HDL, Triglyceriden des LDL und der VLDL-Remnants mittels des Cholesterolester-Transfer-Proteins (CETP). Dieser Transfer ermöglicht die

Ausscheidung des Cholesterolesters über LDL-Rezeptoren der Leber (Goldberg, 2001). Gleichzeitig werden die Triglyceride der HDL-Partikel gespalten und es entstehen kleine HDL-Partikel, die wiederum Cholesterolester aus der Peripherie entfernen können.

Dementsprechend korrelieren hohe HDL-Spiegel mit niedrigen Cholesterolester-Spiegeln. Folglich bewirkt eine gesteigerte Aktivität des ABCA1-Transporters einen niedrigen Cholesterolester-Spiegel und hat deshalb auch eine positive Auswirkung auf die KHK (Abb. 1.3). Die Abbildungen 1.4 und 1.5, erläutern die physiologische Bedeutung und die Konsequenz eines Funktionsverlustes des ABCA1-Transporters (Young *et al.*, 1999).

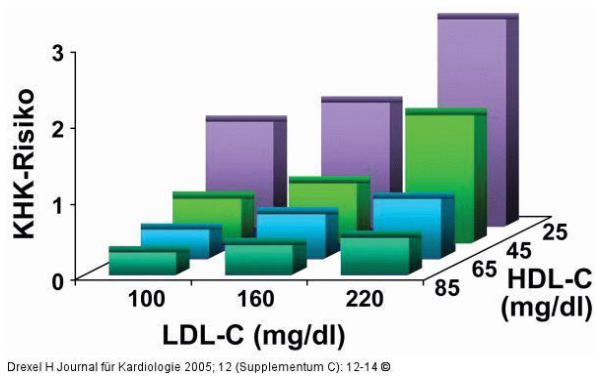


Abb. 1.2: Zusammenhang zwischen LDL-, HDL-Konzentration und dem Risiko eine koronare Herzkrankheit zu entwickeln (LDL-C: Low density Lipoprotein Cholesterol, HDL-C: High density Lipoprotein Cholesterol) (Drexel H, 2005)

Kommentar [M1]: Zitat eingefügt

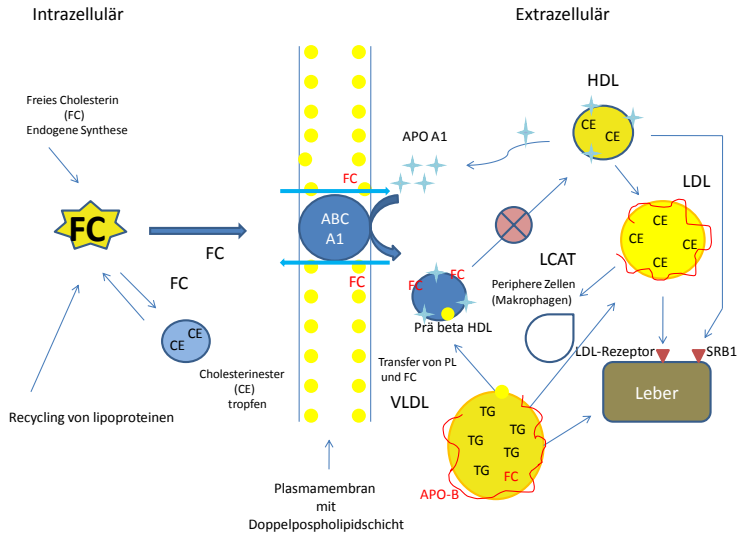


Abb. 1.3: Die Rolle des ABCA1-Transporters im Lipidstoffwechsel (FC: freies Cholesterin, CE: Cholesterolester, TG: Triglycerid, LCAT: Lecithin-Cholesterol-Acytransferase, SRB1: Scavenger-Rezeptor vom Typ B, APO A1: Apolipoprotein A1, APO B: Apolipoprotein B) (Young et al., 1999)

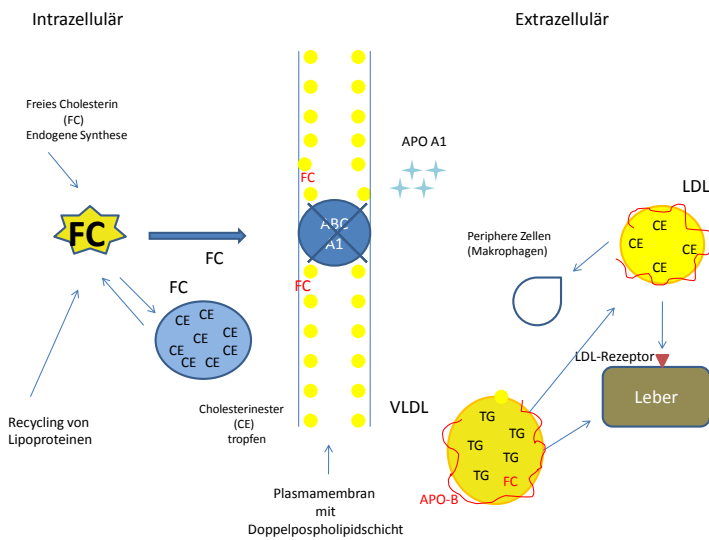


Abb. 1.4: Konsequenz des Funktionsverlusts des ABCA1-Transporters (FC: freies Cholesterin, CE: Cholesterolester, TG: Triglycerid, LCAT: Lecithin-Cholesterol-Acytransferase, SRB1: Scavenger-Rezeptor vom Typ B, APO A1: Apolipoprotein A1, APO B: Apolipoprotein B) (Young et al., 1999)

1.5 Die Myeloperoxidase

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein kationisches, grün gefärbtes Hämprotein, welches primär in neutrophilen Granulozyten sowie in Monozyten vorkommt.

Der Entdecker der MPO, Kjell Agner, isolierte dieses Enzym zum ersten Mal im Jahre 1941 aus Leukozyten (Agner, 1941).

Die MPO besteht aus zwei leichten und zwei schweren Ketten, die ein Tetramer formen. Synthetisiert und posttranslatorisch modifiziert wird die MPO am rauen endoplasmatischen Retikulum von Leukozyten. Am Golgi-Apparat wird die Oligosaccharidseitenkette mit einem Mannose-6-Phosphatrest phosphoryliert, um als Signal für den Transport von Enzymen in die Lysosomen zu fungieren (Hasilik *et al.*, 1984). Als wesentlicher Bestandteil der Immunantwort von Granulo- und Monozyten, wirkt die MPO als „Radikaldonor“. Sie halogeniert mikrobielle Proteine, indem Sie aus H_2O_2 in Gegenwart exogener oder endogener Halidionen Hypohalogenite bildet. Die Reaktion, also die Entstehung der Hypohalogenite kann in der Zelle oder auch extrazellulär im Interstitium stattfinden. Die Sauerstoffradikale, auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) genannt, interagieren bzw. oxidieren Strukturen wie z.B. Alkohol-Aldehyd-Gruppen, SH-Gruppen, Amino-Gruppen und Lipide.

Dementsprechend wirken die ROS antimikrobiell. Um funktionierende Zellen zu schützen besitzen unsere Zellen antioxidative Enzyme wie z.B. die Katalasen und Peroxidasen, die in der Lage sind H_2O_2 abzubauen. So werden autoimmune Reaktionen verhindert. Durch das hohe Reaktionspotenzial der ROS ist die MPO auch in pathologischen Prozessen maßgeblich involviert.

Das MPO-Gen zeigt sich als ein polymorphes Gen, welches sich auf Chromosom 17q22-q24 befindet (Miki *et al.*, 1988) und durch diese Vielgestaltigkeit zu Funktionsstörungen der MPO beitragen kann (siehe unten).

In atherosklerotisch verändertem Gewebe wurde beobachtet, dass sich durch die MPO oxidiertes HDL sowie LDL anreichert, nicht jedoch in der Arterienintima von gesunden Gefäßen (Carr *et al.*, 2000a;Daugherty *et al.*, 1994b;Malle *et al.*, 2001a;Shao *et al.*, 2006d). Auch korrelierten erhöhte MPO-Plasmakonzentrationen im Blutplasma bei Patienten mit dem Risiko und dem Ausmaß der KHK (Duzguncinar *et al.*, 2008;Zhang *et al.*, 2001;Ndrepepa *et al.*, 2008).

1.5.1 Funktionelle Bedeutung genetischer Varianten der MPO

Es sind verschiedene Mutationen beschrieben, die die Aktivität der MPO beeinflussen, z.B. führen R569W (Nauseef *et al.*, 1998), Y173C (DeLeo *et al.*, 1998) und M251T (Romano *et al.*, 1997) zu einem vollständigen Funktionsverlust.

Bei der Regulation der MPO ist ein dem MPO-Gen vorgeschaltetes Alu-Element in der Promoterregion von großer Bedeutung: Im Mittelpunkt vieler Studien steht der -463G>A Polymorphismus, welcher sich 463 Basenpaare upstream von Exon 1 befindet und zur Verminderung der MPO-mRNA-Expression führt. Cascorbi *et al.*, 2000 beschrieben für Träger der A-Variante ein geringeres Risiko an Larynxkarzinomen zu erkranken (Cascorbi *et al.*, 2000). Es wurde vermutet, dass es bei diesen Genotypen zu einer geringeren Aktivierung von kanzerogenen Substanzen kommt. Mehrere weitere Studien dokumentieren ein reduziertes Risiko für Lungenkarzinome (Dally *et al.*, 2003; Dally *et al.*, 2002; Feyler *et al.*, 2002; Kantarci *et al.*, 2002; Le Marchand *et al.*, 2000; Schabath *et al.*, 2002; Schabath *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2003).

1.6 Einfluss der Myeloperoxidase auf die Funktion von ABCA1

Es konnte gezeigt werden, dass die Myeloperoxidase (MPO) den ABCA1-Transportweg negativ beeinflussen kann, sodass der Transport von Cholesterol aus der Zelle und somit aus der Peripherie zurück zur Leber gestört ist (Shao *et al.*, 2006c). Hierbei bewirkt die Chlorierung des Tyrosins-192 zu 3-Chlortyrosin, kombiniert mit der Oxidation von Methionin, den Funktionsverlust von ApoA1. In der Folge kann Cholesterol nicht mehr aus der Zelle über den ABCA1-Transportweg entfernt werden (Shao *et al.*, 2006b). Die durch die MPO katalysierten Oxidationsprodukte Nitrotyrosin, sowie Chlortyrosin, werden häufiger bei KHK-Patienten beobachtet. Des Weiteren wurde eine Anreicherung des Nitrotyrosin im Apolipoprotein A1 mit einer daraus resultierenden Beeinträchtigung des ABCA1-Transporters *in-vivo* und *in-vitro* dokumentiert (Zheng *et al.*, 2004).

1.7 Ziel der Arbeit

Wie oben beschrieben, weisen sowohl der Cholesteroltransporter ABCA1, als auch die Myeloperoxidase funktionelle genetische Varianten auf. Es stellte sich daher die Frage, ob die Berücksichtigung beider Gene das Risiko der koronaren Herzkrankheit und die Plasmakonzentrationen von Cholesterol beeinflussen kann.

Hierzu sollten die Genotypen ABCA1 -14C>T und 1051G>A sowie MPO -463G>A an einem großen Kollektiv mit 1000 angiographisch gesicherten KHK-Patienten sowie an 1000 Hospitalkontrollen ohne klinische Zeichen einer KHK verglichen werden. Zusätzlich erfolgte eine univariate Analyse des Einflusses dieser genetischen Varianten auf die Plasmalipidkonzentrationen.

2 Material und Methoden

2.1 Studienpopulation

Für die Untersuchung wurde DNA von 1000 angiografisch gesicherten KHK-Patienten und 1000 klinisch unauffälligen Hospitalkontrollen genotypisiert.

Die Studienteilnehmer wurden zwischen Oktober 1995 und Januar 1997 an der Berliner Charité rekrutiert (Laule *et al.*, 1999).

Die Patienten wurden aufgrund klinisch pathologischer bzw. nicht pathologischer Merkmale wie anhand der klinischen Anamnese, körperliche Untersuchung, Angiographie, Elektrokardiographie und Echokardiographie ausgewählt. Als Definition der KHK galt eine 50%ige oder höhere Stenose der Hauptkoronaräste, bei den Kontrollen fand sich klinisch keinerlei Hinweis auf eine Herzerkrankung.

Typische Risikofaktoren der KHK, wie Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Hypercholesterolämie, Rauchen und Übergewicht (BMI >25) wurden einbezogen. Desweiteren wurden die Lipidparameter Cholesterol, Triglyceride, HDL, LDL, ApoAI, Apo-B bei allen Teilnehmern bestimmt. Es lag das informierte schriftliche Einverständnis aller Patienten vor und die Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Charité Berlin befürwortend bewertet.

2.2 Geräte, Materialien und Puffer

Geräte

Thermocycler: GeneAmp®, PCR System 9700	Applied Biosystems
Multifuge 3 S-R	Heraeus
Sub-Cell Model 192	Bio Rad
Kodak Imager Station	Kodak
Monoschake	H+P Labortechnik
Vakuum Prep Tool	Biotage
Pyrosequencer	Biotage
Hotplate/Stirrer	VWR
Multifuge 3 S-R	Heraeus

Materialien

Aqua ad injektabilia Braun	B-Braun Melsung AG
50mM Magnesiumchlorid	Invitrogen
10xPCR-Puffer(ohne MgCl ₂)	Invitrogen
Taq DNA Polymerase 5U/μl	Invitrogen
dNTPs	Biozym
Primer	TiBMolbiol
BlueJuice	Invitrogen
Agarose Neeo	Roth
Ethidium-Bromid	Invitrogen
GeneRuler 100bp DNA Ladder	Fermentas
Ultra pure Water	Biochrom Ag
Binding Buffer	Biotage
Annealing Buffer	Biotage
Washing Buffer	Biotage
Streptavidin Sepharose Beads	Amersham
Ethanol 96 %	J.T Baker
NaOH	Merck
Thermo-Fast 96 PCR Plates	Peqlab

PSQ HS 96-Platte	Biotage
Thermwell Sealers	Corning Incorporated
PyroGold Reagents (Substrat, Enzym, Nukleotide)	Biotage
Omni-Tube Plate	Thermo Scientific
PSQ HS SNP Reagent Kit	Biotage
PSQ HS Reagent Dispensing Tips	Biotage
PSQ HS Nucleotide Dispensing Tips	Biotage
PSQ HS Capillary Dispensing Tips	Biotage
PSQ HS Dispensing Tip Holder/Cartridge	Biotage
PCR Purification Kit	Qiagen

Puffer

TBE-Puffer

1M	Tris
833mM	Borsäure
100mM	EDTA (pH 8.0)

TE Puffer

10ml 1M	Tris (pH 7.5)
2ml 0.5M	EDTA (pH 8.0)

2.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung aller Probanden und Patienten für die Promotervariante -463G>A der Myeloperoxidase stand aus einer früheren Untersuchung zur Verfügung.

Für die Genotypisierung der ABCA1-Varianten -14C>T und 1051G>A wurde die Methodik des Pyrosequencings angewendet. Hierzu erfolgte zunächst eine Amplifikation der entsprechenden DNA-Abschnitte des ABCA1-Gens.

Die Primer wurden mit Hilfe des PSQ-Assay-Design-Programms (Biotage) entwickelt (Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Primernamen und Primersequenzen für die Genotypisierung der ausgewählten SNPs mittels Pyrosequencing.

SNP	Primernamen	Sequenz (5'-3')
-14C>T	PSQA1-14F	5'-Bio-AGCACAGGCTTTGACGATAGTAA
	PSQA1-14R	5'-ACTCACTCTCGCTCGCAATTAC
1051G>A (R219K)	PSQA1219F	5'-Bio-ACCCAGCTTCCAATCTTCATAATC
	PSQA1219R	5'-CACCAGGATTGGCTTCAGGATAC

Die unterschiedlichen PCR-Reaktionsansätze und Bedingungen für den Thermocycler sind in den Tabellen 2.2 bis 2.4 zusammengefasst.

Die Produkte wurden anschließend mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese auf ihre Größe und Qualität überprüft und mit Hilfe des Pyrosequencers genotypisiert.

Tab. 2.2: PCR-Reaktionsansatz für ABCA1 -14C>T

Komponente	Volumen in µl
Puffer	2,5
50mM MgCl ₂	1,5
dNTPs	2,5
Forward Primer	0,5
Reverse Primer	0,5
Taq DNA-Polymerase	0,15

H ₂ O	17,85
------------------	-------

Tab. 2.3: PCR-Reaktionsansatz für ABCA1 1051G>A

Komponente	Volumen in µl
Puffer	2,5
50mM MgCl ₂	1,25
dNTPs	2,5
Forward Primer	0,5
Reverse Primer	0,5
Taq DNA-Polymerase	0,15
H ₂ O	18,1

Tab.2.4: Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der ABCA1-DNA-Fragmente

	3 min	94 °C	Denaturierung	
35 Cyclen	}	30 s	94 °C	Denaturierung
		30 s	56 °C	Annealing
		30 s	72 °C	Elongation
		7 min	72 °C	terminale Elongation

Für die Agarosegelelektrophorese wurde ein 2 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromid verwendet. 7 µl des PCR-Produkts wurden mit 2 µl Blue Juice in das Gel eingebracht und bei 120 V über einen Zeitraum von 45 min aufgetrennt.

Mit Hilfe eines 100-bp-Markers konnte die Größe des PCR-Produkts mit der zu erwartenden Größe verglichen werden.

Pyrosequencing ist eine DNA-Sequenziermethode, welche auf der Detektion von freier Pyrophosphat (PPi) während der DNA-Synthese beruht.

In einer Kaskade von enzymatischen Reaktionen wird ein Lichtsignal proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide erzeugt. (Abb. 2.1 A & B)

Als erstes wird anorganisches PPi während des Einbaus der Nukleotide durch eine Polymerase freigesetzt. Dieses wird sofort durch die ATP-Sulfurylase zu ATP umgewandelt. Das entstandene ATP liefert die nötige Energie um die Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin zu katalysieren. Bei diesem Schritt wird das Lichtsignal erzeugt, welches in einen linearen Zusammenhang zur Menge des entstandenen

Pyrophosphats und somit auch zur Anzahl der eingebauten Nukleotide steht.

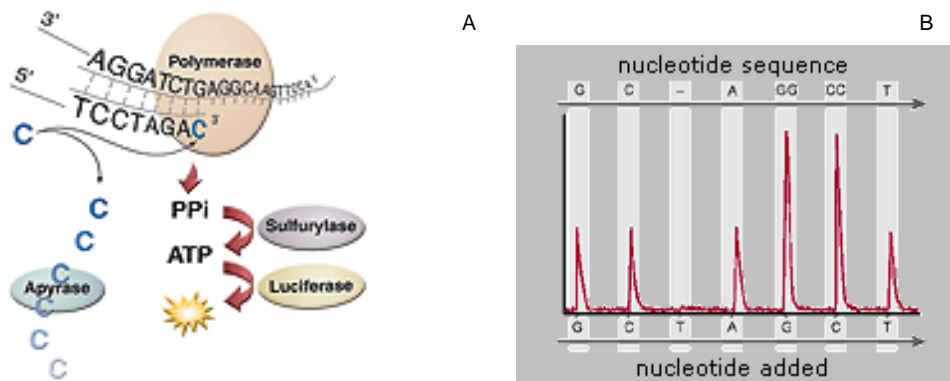


Abb. 2.1: (A) Schematische Darstellung der Enzymkaskade (B) Einbau einzelner Nucleotide bis zum fertigen komplementären DNA-Strang (www.pyrosequencing.com), (PPi: Pyrophosphate, ATP: Adenosintriphosphat)

Um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, wird anstelle von dATP dATP α S als Substrat verwendet. Das Enzym Apyrase baut die nicht eingebauten dNTPs zu dNDPs und letztlich zu dNMPs ab, dadurch werden Waschschrte zwischen den Nucleotidzugaben überflüssig. (Abb.2.2)

Das detektierte Lichtsignal wird als Peak in einem Pyrogramm dargestellt und mit Hilfe der SQA-Software des Pyrosequencers der Genotyp ermittelt.

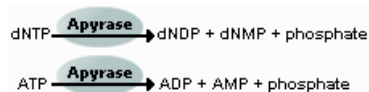


Abb. 2.2: Abbau von nicht eingebauten dNTPs und überflüssigem ATP (dNTP: Desoxyribonucleosidtriphosphat, dNDP: Desoxyribonucleosiddiphosphat, dNMP: Desoxyribonucleosidmonophosphat, ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat, AMP: Adenosinmonophosphat (www.pyrosequencing.com))

1. Sequenzierprimer und Assay-Design

Genau wie die Primer zur Amplifikation des biotinylierten PCR-Produktes wurde auch der Sequenzierprimer mit Hilfe des PSQ-Assay-Design-Programms kreiert. Die Reihenfolge der Nucleotidzugabe und die benötigten Mengen an Nucleotiden, Enzymen und Substrat wurde mit Hilfe der PSQ-Gerätesoftware ermittelt.

2. Vorbereitung der Einzelstrang-Matrize

Die biotinylierten PCR-Produkte müssen zur Trennung der DNA-Stränge an Streptavidin-Sepharosebeads gebunden werden. Der Ansatz (Tab. 2.5) wird dazu 15 min schüttelnd inkubiert.

Tab. 2.5: Reaktionsansatz für die Bindung der biotinylierten PCR-Produkte

Komponente	Volumen in μ l
Ultra Pure Water	30
Binding Buffer	37
Streptavidin-Sepharose Beads	3
biotinyliertes PCR-Produkt	10

Nach der Inkubation erfolgt mit 70 % Ethanol und 0,1 M NaOH (Denaturierungslösung) die Auftrennung des PCR-Produktes in Einzelstränge. Durch das anschließende Waschen werden die nicht-biotinylierten Einzelstränge entfernt. Die biotinylierten Einzelstränge werden zu 11 μ l Annealing Puffer und 1 μ l Sequenzierprimer gegeben. Der Sequenzierprimer (Tab. 2.6) wird für 2 min bei 80°C an die Einzelstrangmatrize angelagert.

Tab. 2.6 Sequenzierprimer

SNP	Primername	Primersequenz
-14C>T	PSQA1-14S	5'-TTACGGGGTTTTTGC
1051G>A (R219K)	PSQA1219S	5'-GCAGCCAGTTTCTCC

3. Vorbereitung der Nukleotide, Enzyme und des Substrats

Den Volumeninformationen der PSQ-Software folgend werden die entsprechenden Mengen Nukleotide (1:1 verdünnt mit TE-Puffer), Enzyme und Substrat in die Dispensing-Tips gegeben. Diese werden mit dem Dispensing-Tip-Holder in das Gerät gestellt. Aus den einzelnen Kartuschen werden die Substanzen automatisch in die wells mit dem PCR-Produkt und dem Sequenzierprimer pipettiert.

4. Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse bzw. die Bestimmung der Genotypen, erfolgt mit Hilfe der SQA-Software

2.4 Kontrollsequenzierung

Die Pyrosequencing-Assays wurde stichprobenartig durch eine Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger et al., 1977 kontrolliert. Dafür wurden PCR-Produkte nach den gleichen Protokollen wie unter 2.3 angegeben erstellt. Diese wurden anschließend mit dem Qiagen PCR-Purification-Kit aufgereinigt. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC Biotech (Konstanz), die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgt mit dem Programm Chromas, Version 1.45.

2.5 Statistische Methoden

Für die ermittelten Genotypen wurden die Frequenzen ermittelt und es wurde mit dem „Clinical Trials Design Program 1.0“ überprüft, ob die Studienpopulation im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht liegt.

Mögliche Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen hinsichtlich verschiedener Merkmale wurden mit dem Chi²-Test nach Spearman untersucht und als Odds Ratio mit 95 % Vertrauensintervall angegeben. Der Mann-Whitney-U-Test und der Kruskal-Wallis-Test wurden verwendet um Unterschiede zwischen Lipidparametern bei den einzelnen Genotypen zu berechnen. Als signifikant wurden p-Werte unter 0,05 angesehen. Beim Raucherkollektiv wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS® 15.0 für Windows.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Studienpopulation

In der Studie wurden ein Patientenkollektiv mit angiographisch nachgewiesener KHK und einer Kontrollgruppe von Hospitalpatienten ohne klinische Anzeichen einer KHK mit jeweils 1000 Probanden untersucht, die hinsichtlich Alter und Geschlecht eine Gleichverteilung aufwiesen.

Es wurden die wesentlichen Risikofaktoren wie Hypercholesterolämie, Hyperlipidämie, arterieller Hypertonus, Nikotinabusus und Diabetes mellitus, die Lipidparameter LDL, HDL, Cholesterol und Lipoprotein a (Lp(a)), sowie der Body Mass Index (BMI) und die Waist to Hip Ratio (WHR) in die Analyse mit einbezogen.

Tab. 3.1: Charakterisierung der Studienpopulation (Angaben mit Standardabweichung)

	KHK-Patienten	Kontrollen
Geschlecht m/w	759/241	759/241
Alter (Jahre)	60,6 ± 9,5	60,5 ± 9,8
BMI (kg/m ²)	26,7 ± 3,6	26,5 ± 3,9
WHR (cm)	0,95 ± 0,07	0,95 ± 0,07
Diabetes mellitus (n)	228	114
Hypertonie (n)	552	359
Hypercholesterolämie (n)	527	303
Hyperlipidämie (n)	116	9
Raucher (n)	440	352
Myokardinfarkt (n)	667	0

3.2 Verteilung der ABCA1- und MPO-Polymorphismen in der Studienpopulation

Es wurden die Polymorphismen -14C>T und 1051G>A des ABCA1-Gens und der -463G>A Polymorphismus der MPO untersucht. Alle Genotypfrequenzen lagen im Hardy-Weinberg-Equilibrium. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den KHK-Patienten und der Kontrollgruppe beobachtet (Tab. 3.2 und 3.3).

Tab. 3.2: Häufigkeitsverteilung der ABCA1- und MPO-Genotypen bei 1000 KHK-Patienten und 1000 Kontrollen

SNP		KHK-Patienten		Kontrollen		p-Wert
		n	%	n	%	
ABCA1	CC	391	42,9	391	41,2	0,79
-14C>T	CT	408	44,7	440	46,3	
	TT	113	12,4	119	12,5	
ABCA1	TT	483	54,3	471	50,4	0,15
1051G>A	GA	344	38,7	380	40,6	
(R219K)	AA	63	7,1	84	9,0	
MPO	GG	619	64,5	631	65,1	0,70
-463G>A	GA	309	32,1	300	31,0	
	AA	32	3,3	38	3,9	

Tab. 3.3: Häufigkeitsverteilung der ABCA1- und MPO-Allele bei 1000 KHK-Patienten und 1000 Kontrollen

SNP	KHK-Patienten	Kontrollen		p-Wert		
		n	%		n	%
ABCA1	C	1192	65,2	1227	64,4	0,65
-14C>T	T	636	34,8	677	35,6	
ABCA1	G	1310	73,6	1322	70,7	0,055

1051G>A (R219K)	A	470	26,4	548	29,3	
MPO	G	1547	80,6	1562	80,6	0,98
-463G>A	A	373	19,4	376	19,4	

3.3 Effekte auf Lipidparameter

3.3.1 Einfluss von ABCA1 -14C>T auf Lipidparameter

In Abhängigkeit des ABCA1 -14C>T-Polymorphismus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den LDL-, HDL- und Cholesterolkonzentrationen. Es konnte jedoch ein Trend zu erhöhten LDL-Werten bei den KHK-Patienten ($p=0,13$) und zu erniedrigten LDL-Werten bei den Kontrollen ($p=0,29$) gezeigt werden.

In der Kontrollgruppe zeigte sich das Lp(a) ($p=0,012$) signifikant verändert.

Auch bei der Genotypkombination von ABCA1 -14CT+TT gegenüber des homozygoten Genotyps -14CC ($p=0,03$) ist das Lp(a) signifikant verändert (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Plasma-Lipidkonzentrationen bei Kontrollpatienten in Abhängigkeit des ABCA1 -14C>T-Polymorphismus (Kontrollgruppe) (Mittelwert \pm Standardabweichung)

ABCA1 -14C>T	HDL-Cholesterol (mmol/l)	LDL-Cholesterol (mmol/l)	Cholesterol (mmol/l)	Lp(a) (mg/l)
C/C	1,18 \pm 0,38	3,67 \pm 0,99	5,62 \pm 1,16	494 \pm 423
C/T	1,18 \pm 0,38	3,62 \pm 1,03	5,54 \pm 1,20	396 \pm 346
T/T	1,18 \pm 0,37	3,47 \pm 1,02	5,42 \pm 1,24	445 \pm 451
CT+TT	1,18 \pm 0,38	3,58 \pm 1,03	5,51 \pm 1,21	405 \pm 370

3.3.2 Einfluss von ABCA1 1051G>A auf Lipidparameter

Keiner der untersuchten Plasma-Lipidparameter wies eine signifikante Assoziation mit dem 1051G>A-Polymorphismus im ABCA1-Gen auf. Dies gilt sowohl für die Kontroll- als auch für das Patientenkollektiv.

3.3.3 Einfluss des MPO -463G>A Polymorphismus auf die Lipidparameter

Analog zu ABCA1 wies auch keiner der untersuchten Plasma-Lipidparameter eine signifikante Assoziation mit dem -463G>A Polymorphismus im MPO-Gen in der KHK- und in der Kontrollgruppe auf (Tab. 3.6).

Tab. 3.5: Plasma-Lipidkonzentrationen bei Kontrollpatienten in Abhängigkeit des MPO -463G>A-Polymorphismus (Mittelwert \pm Standardabweichung)

MPO	HDL-Cholesterol (mmol/l)	LDL-Cholesterol (mmol/l)	Cholesterol (mmol/l)	Lp(a) (mg/l)
A/A	1,17 \pm 0,40	4,03 \pm 1,43	5,97 \pm 1,59	507 \pm 448
G/A	1,17 \pm 0,41	3,63 \pm 1,06	5,57 \pm 1,21	415 \pm 377
G/G	1,18 \pm 0,37	3,58 \pm 0,95	5,51 \pm 1,13	453 \pm 403

Bei KHK-Patienten zeigten sich signifikante Unterschiede in den LDL-Werten zwischen den Trägern unterschiedlicher MPO-Genotypen ($p=0,039$).

Tab. 3.6: Plasma-Lipidkonzentrationen der KHK-Patienten in Abhängigkeit des -463G>A MPO-Polymorphismus (Mittelwert \pm Standardabweichung)

MPO	HDL-Cholesterol (mmol/l)	LDL-Cholesterol (mmol/l)	Cholesterol (mmol/l)	Lp(a) (mg/l)
A/A	1,24 \pm 0,32	3,95 \pm 1,21	5,95 \pm 1,27	605 \pm 463
G/A	1,17 \pm 0,37	3,99 \pm 1,05	5,99 \pm 1,24	422 \pm 3950
G/G	1,15 \pm 0,36	3,79 \pm 1,07	5,80 \pm 1,26	447 \pm 393
AG +AA	1,18 \pm 0,36	3,98 \pm 1,06	5,98 \pm 1,24	436 \pm 402

Der seltene homozygote Genotyp AA wurde mit dem heterozygoten Genotypen AG kombiniert und gegen den häufig vorkommenden homozygoten Genotyp GG verglichen. Hierbei zeigen sich signifikante Unterschiede beim LDL-Cholesterol ($p = 0,01$) und beim Cholesterol ($p = 0,027$) zwischen homozygoten Wildtyp-Trägern (GG) und Trägern der Variante (AG oder AA) (Tab. 3.7).

3.3.4 Einflüsse der Kombination des ABCA1 -14C>T Polymorphismus und des MPO -463G>A Polymorphismus auf Lipidparameter

Die Stratifizierung nach Kombinationen von ABCA1- und MPO-Genotypen zeigte in der Kontrollgruppe einen signifikanten Anstieg des Cholesterols auf 6,5 mmol/l ($p=0,025$), des LDL-Cholesterols (4,5 mmol/l) ($p=0,018$) und des Lp(a) (652 mg/l) ($p=0,026$) bei Trägern der seltenen homozygoten ABCA1 -14CC und MPO -436AA-Varianten im Vergleich zum Wildtyp (siehe Tabelle 3.9).

Tab. 3.8: Plasma-Lipidkonzentrationen bei Kontrollpatienten in Abhängigkeit der ABCA1 und MPO-Genotypkombinationen (Mittelwert \pm Standardabweichung)

ABCA1-14C>T MPO -463G>A	HDL- Cholesterol (mmol/l)	LDL- Cholesterol (mmol/l)	Cholesterol (mmol/l)	Lp(a) (mg/l)
-14CC + -463AA	1,23 \pm 0,45	4,49 \pm 1,31	6,51 \pm 1,52	653 \pm 439
-14CC + -463AG+GG	1,18 \pm 0,38	3,66 \pm 0,95	5,60 \pm 1,12	486 \pm 425
-14CT+TT + -463AA	1,13 \pm 0,34	3,77 \pm 1,52	5,68 \pm 1,61	453 \pm 470
-14CT+TT + -463AG+GG	1,18 \pm 0,38	3,57 \pm 1,00	5,51 \pm 1,18	407 \pm 369

Abb. 3.1 verdeutlicht die Unterschiede der Lp(a) Werte bei den einzelnen Genotypvarianten.

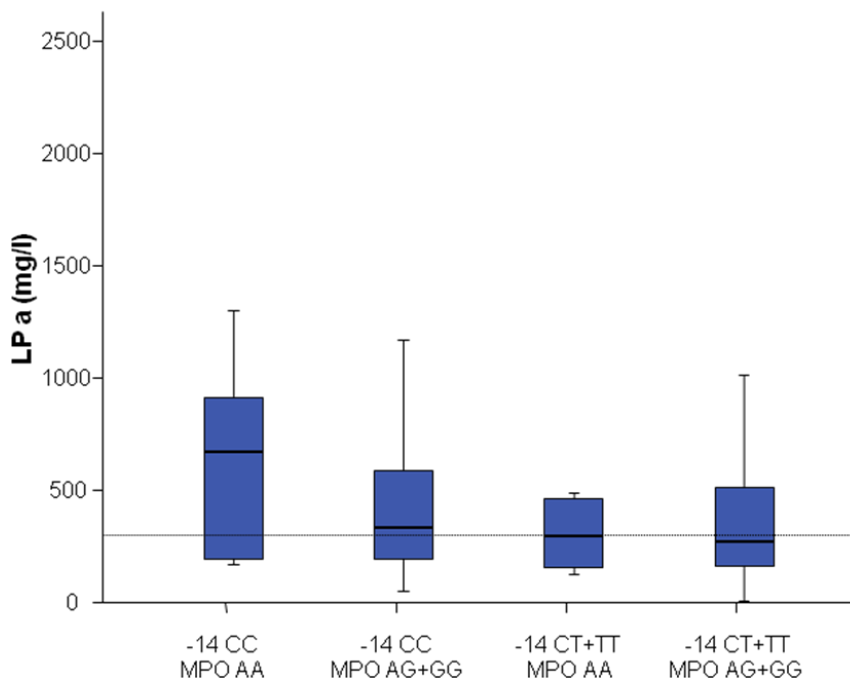


Abb. 3.1: Lp(a)-Konzentrationen bei Kontrollpatienten in Abhängigkeit der ABCA1- und MPO Genotypkombinationen -----: Referenzbereich für Lp(a) < 300 mg/l

In der Kontrollgruppe ist der Lp(a)-Wert bei Trägern von ABCA1 -14CC und MPO -463AA gegenüber Trägern anderer Genotypkombinationen um mindestens 166 mg/l erhöht. Unterteilt man diese Gruppen nach Geschlecht, so fällt auf, dass der deutliche Anstieg des Lp(a)-Werts nur beim männlichen Geschlecht auftritt. Bei den weiblichen Kontrollen konnte keine signifikante Änderung festgestellt werden (Tab. 3.11).

KHK-Patienten, die eine Kombination der Genotypen ABCA1-14CC und MPO -463AA aufwiesen, hatten ein (nicht signifikantes) höheres Lp(a) von mindestens 313 mg/l als Träger anderer Genotypen. Die LDL-, HDL-, und die Cholesterolverte weisen keine großen oder statistisch signifikanten Abweichungen zwischen den verschiedenen Genotypkombinationen auf (siehe Tabelle 3.9 und Abb. 3.2).

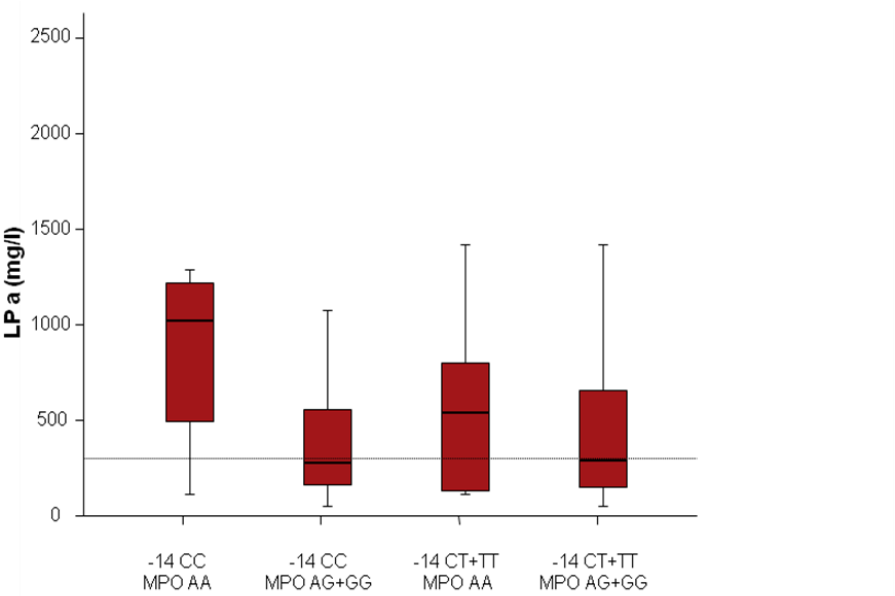


Abb. 3.2: Lp(a)-Konzentrationen der KHK-Patienten in Abhängigkeit zu ABCA1 und MPO Genotypkombinationen, -----: Referenzbereich für Lp(a) < 300 mg/l

Tab. 3.9: Plasma-Lipidkonzentrationen bei KHK-Patienten in Abhängigkeit der ABCA1- und MPO-Genotypkombinationen (Mittelwert \pm Standardabweichung)

	HDL- Cholesterol (mmol/l)	LDL- Cholesterol (mmol/l)	Cholesterol (mmol/l)	Lp(a) (mg/l)
ABCA1-14C>T MPO -463G>A -14CC+ -463AA	1,07 \pm 0,35	4,25 \pm 1,07	6,20 \pm 0,92	857 \pm 526
-14CC + -463AG+GG	1,16 \pm 0,35	3,82 \pm 1,05	5,82 \pm 1,23	397 \pm 335
-14CT+TT + -463AA	1,33 \pm 0,28	3,90 \pm 1,22	5,93 \pm 1,36	544 \pm 439
-14CT+TT + -463AG+GG	1,15 \pm 0,36	3,90 \pm 1,10	5,89 \pm 1,30	461 \pm 421

Einen geringen, aber signifikanten Anstieg des LDL-Cholesterols ist bei Trägern der varianten Genotypen (ABCA1 -14CT+TT + MPO -463AG+AA) im Vergleich zu den Wildtyp-Trägern zu erkennen ($p=0,048$) (siehe Tabelle 3.12).

Obwohl es sich hier um das KHK-Patientenkollektiv handelt, fällt auf, dass im Durchschnitt der Referenzwert des LDL nicht überschritten wird.

Teilt man die Patienten entsprechend ihres Alters in zwei Gruppen ein, fällt auf, dass nur bei Patienten mit einem Alter jünger als 61 Jahre signifikante Unterschiede in den LDL-Werten zu sehen sind. Bei den Patienten über 61 Jahre konnte eine solche Beobachtung nicht gemacht werden.

Tab. 3.10: Plasma-Lp(a)-Konzentrationen bei KHK-Patienten in Abhängigkeit der ABCA1 und MPO-Genotypkombinationen A stratifiziert nach dem Geschlecht (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Genotypen	n	Lp(a) (mg/dl)	p	n	Lp(a) (mg/dl)	p
		männlich			weiblich	
ABCA1 -14CC	188	507 \pm 424		50	446 \pm 423	
ABCA1 -14CT+TT	224	394 \pm 363	0.001	75	444 \pm 391	0.96
MPO -463AG+GG	397	442 \pm 394		122	436 \pm 340	
MPO -463AA	15	542 \pm 491	0.71	8	443 \pm 375	0.90
ABCA1 -14CC MPO -463AA	6	718 \pm 490		4	673 \pm 425	
ABCA1 -14CC MPO -463AG+GG	177	502 \pm 426	0.29	46	426 \pm 421	0.14
ABCA1 -14CT+TT MPO -463AA	8	459 \pm 504	0.23	3	211 \pm 84	0.11
ABCA1 -14CT+TT MPO -463AG+GG	212	391 \pm 360	0.10	72	454 \pm 360	0.23

Tab. 3.11: Plasma-Lp(a)-Konzentrationen bei Kontrollpatienten in Abhängigkeit der ABCA1 und MPO-Genotypkombination stratifiziert nach dem Alter (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Genotypen	n =	LDL	p =	n =	LDL	p =
		(mmol/l)			(mmol/l)	
		< 61 Jahre			> 61 Jahre	
MPO -463GG	297	3.83 \pm 1.12		320	3.76 \pm 1.02	
MPO -463AG+AA	149	4.11 \pm 1.04	0.005	191	3.88 \pm 1.07	0.30
ABCA1 -14CC	179	3.83 \pm 1.05		211	3.79 \pm 1.04	
ABCA1 -14CT+TT	248	4.01 \pm 1.15	0.13	275	3.81 \pm 1.05	1.00
ABCA1 -14CC MPO -463GG	116	3.70 \pm 1.07		131	3.77 \pm 1.07	
ABCA1 -14CT+TT MPO -463GG	160	3.92 \pm 1.17	0.14	165	3.76 \pm 0.99	0.84
ABCA1 -14CC MPO -463AG+AA	59	4.12 \pm 0.96	0.01	74	3.84 \pm 1.04	0.84
ABCA1 -14CT+TT MPO -463AG+AA	82	4.18 \pm 1.09	0.002	103	3.90 \pm 1.12	0.58

Tab. 3.12: Plasma-Lipidkonzentrationen in Abhängigkeit der Kombination der Genotypen ABCA1 -14C>T und MPO -463G>A (Patientenkollektiv) (Mittelwert \pm Standardabweichung)

ABCA1 -14C>T +MPO -463G>A	HDL- Cholesterol (mmol/l)	LDL- Cholesterol (mmol/l)	Cholesterol (mmol/l)	Lp(a) (mg/l)
-14CC + -463GG	1,14 \pm 0,33	3,74 \pm 1,07	5,73 \pm 1,24	404,65 \pm 330,92
14CC + -463AG+AA	1,19 \pm 0,38	3,96 \pm 1,01	5,98 \pm 1,19	392,95 \pm 359,34
-14CT+TT + -463GG	1,15 \pm 0,37	3,84 \pm 1,09	5,83 \pm 1,30	461,31 \pm 417,39
-14CT+TT + -463AG+AA	1,17 \pm 0,34	4,03 \pm 1,11	6,02 \pm 1,29	473,82 \pm 432,99

Die ABCA1 -14CC + MPO -463AA-Kombination zeigt einen signifikant erniedrigten HDL-Cholesterol-Spiegel (p=0,029) gegenüber den anderen Kombinationen (siehe Tabelle 3.9).

3.3.5 Einflüsse der Kombination des ABCA1 1051G>A Polymorphismus und des MPO -463G>A Polymorphismus

Tab. 3.13: Plasma-Lipidkonzentrationen der KHK-Patienten in Abhängigkeit der Kombination der Genotypen ABCA1 1051G>A und MPO -463G>A (Mittelwert \pm Standardabweichung)

ABCA1 1051G>A +MPO -463G>A	HDL- Cholesterol (mmol/l)	LDL- Cholesterol (mmol/l)	Cholesterol (mmol/l)	Lp(a) (mg/l)
1051GG + -463AA	1,16 \pm 0,34	4,56 \pm 1,03	6,42 \pm 1,16	398 \pm 433
1051 GG + 463AG+GG	1,14 \pm 0,35	3,83 \pm 1,07	5,80 \pm 1,26	431 \pm 384
1051 GA+AA + -463AA	1,30 \pm 0,30	3,61 \pm 1,12	5,73 \pm 1,24	868 \pm 397
1051GA+AA + -463AG+GG	1,16 \pm 0,35	3,87 \pm 1,07	5,89 \pm 1,25	437 \pm 397

Bei der Kombination des ABCA1 1051G>A Polymorphismus mit der Variante der MPO fällt ein signifikanter Unterschied ($p=0,41$) bei den Lp(a)-Werten auf. Bei der Genotypenkombination ABCA1 1051GA+AA + MPO -463AG+GG ist der höchste Lp(a)-Wert zu notieren (867,71 mg/l), wo hingegen der niedrigste Lp(a)-Wert beim ABCA1 1051GG + MPO -463AA-Polymorphismus zu sehen ist.

Die heterozygote Kombination unterscheidet sich beim Lp(a)-Wert um 469 mg/l von der gemischten Kombination aus homozygoten und heterozygoten Genotypen.

Es ist zu beobachten, dass die homozygote AA-Variante beider Polymorphismen (ABCA1 1051G>A und MPO -463G>A) mit erhöhten Lp(a)-Werten korreliert.

3.4 Einfluss des Rauchens

Bei Rauchern konnte beobachtet werden, dass vermehrt Individuen aus der Kontrollgruppe den seltenen homozygoten AA-Polymorphismus der MPO besitzen. Dieses Ergebnis deutet auf einen protektiven Effekt des Polymorphismus gegenüber der Entstehung einer KHK hin. Hierbei ist jedoch die geringe Fallzahl von 23 Personen bei den Kontrollen und 14 Personen bei den Patienten zu berücksichtigen (Tab. 3.14).

Tab. 3.14: Einfluss der ABCA1 1051G>A und MPO -463G>A Genotypen bei Rauchern auf das Risiko der koronaren Herzkrankheit. (KI: Konfidenzintervall)

Polymorphismus	Genotyp	Häufigkeit		Odds ratio
		KHK-Patienten	Kontrollen	
ABCA1 1051G>A	GG	0,56	0,48	0,73 (95 % KI: 0,55-0,98) p=0,021
	GA+AA	0,44	0,52	
MPO -463G>A	GG+GA	0,97	0,93	0,48 (95 % KI: 0,24-0,95) p=0,003
	AA	0,03	0,07	

4 Diskussion

Der Zusammenhang zwischen erhöhten LDL-Cholesterol-Konzentrationen im Plasma und der Entwicklung einer Atherosklerose bis hin zur KHK und letztlich bis hin zum Herzinfarkt ist klinisch erwiesen (De Backer et al., 2003). Klassische Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose sind eine Hyperlipoproteinämie, ein arterieller Hypertonus, ein Nikotinabusus und der Diabetes mellitus. Als weitere Risikofaktoren werden das Geschlecht und das Alter gerechnet. Außerdem spielen ein erhöhtes Lipoprotein(a), c-reaktives Protein, Bewegungsmangel und negativer Stress eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der KHK (Ridker et al., 1998; Eckardstein et al., 2001).

Kommentar [M2]: Zitat eingefügt

Der Rücktransport von Cholesterol aus Endothel-Zellen oder Makrophagen hinaus, verhindert die Bildung von Schaumzellen und Atheromen und hat somit fundamentale Bedeutung für die Reduzierung des KHK-Risikos. Um diesen Rücktransport zu gewährleisten, müssen im Körper verschiedene Transporter und Enzyme miteinander interagieren. Wird der Transport verlangsamt, so steigt das Risiko der KHK (Barter et al., 1996).

Kommentar [M3]: Zitat eingefügt

In der vorliegenden Arbeit wurden genetische Varianten in zwei Kandidatengenen hinsichtlich eines möglichen Zusammenhangs mit dem Risiko der KHK untersucht. Ziel war es herauszufinden, ob diese einen unmittelbaren Einfluss auf das KHK-Risiko besitzen oder ob sie über eine Änderung des Lipidprofils Einfluss auf die KHK-Genese haben könnten.

Kommentar [M4]: Zitat eingefügt

Das ABCA1-Gen sowie das MPO-Gen enthalten genetische Varianten, die zu einer Beeinträchtigung des Cholesteroltransportes führen können (Evans and Beil, 2003a; Hong et al., 2002a; Nagra et al., 1997; Shao et al., 2006a). Die Auswirkung und Bedeutung einer solchen Variante kann unterschiedlich sein, sie kann zum völligen Funktionsverlust der Proteine/Enzyme führen oder die Expression des Proteins reduzieren. Sie kann aber auch klinisch ohne Relevanz sein.

4.1 Besonderheiten der Studienpopulation

Bei dem herangezogenen Kollektiv handelt es sich um angiografisch gesicherte

KHK-Patienten und 1000 klinisch unauffällige Hospitalkontrollen. Allein die Tatsache, dass es sich hier ausschließlich um Krankenhauspatienten handelt, zeigt, dass es sich nicht um einen Ausschnitt aus der Normalbevölkerung handelt. Bei den Kontrollpatienten muss berücksichtigt werden, dass sie aus verschiedenen Fachbereichen der Medizin herangezogen wurden. Einige stammen idealerweise aus der Traumatologie, andere aber auch aus Bereichen wie der Onkologie. Für die Einordnung wurden klinisch-pathologische bzw. nicht-pathologische Merkmale wie z.B. Anamnese, körperliche Untersuchung, Angiographie, Elektrokardiographie und Echokardiographie herangezogen. Als Definition der KHK galt eine 50-prozentige oder höhere Stenose der Hauptkoronaräste, bei den Kontrollen fand sich keinerlei Hinweis auf eine Herzerkrankung. Zu dieser Einteilung wurden keine Laborparameter berücksichtigt.

Bei der Betrachtung der Blutlipidparameter ist zu beobachten, dass die Kontrollgruppe eher pathologischere Werte aufwies als das Patientenkollektiv. Eine Erklärung hierfür wäre die Unwissenheit der Kontrollpatienten, schlecht eingestellte oder nicht diagnostizierte Stoffwechselstörungen wie z.B. einer Hyperlipoproteinämie. Hingegen ist bei den klinisch gesicherten KHK-Patienten anzunehmen, dass sie medikamentös behandelt werden. Bei der Datenerhebung wurden Herz-Kreislauf Arzneimittel wie z.B. Beta-Blocker und ACE-Hemmer berücksichtigt, es wurden aber keine Daten über Statine oder andere Lipid-senkende Arzneistoffe erhoben.

4.2 Veränderungen in den Lipidparametern

Der Zusammenhang zwischen ABCA1-Polymorphismen und verschiedenen Lipidparametern, insbesondere HDL-Cholesterol, aber auch LDL-Cholesterol, und Lp(a) ist bereits in diversen Studien untersucht worden. Studien haben gezeigt, dass z.B. der -14C>T SNP und der TCCT Haplotyp um die Kombination (-564C>T, -407G>C, -278G>C, und -14C>T) in Menschen mit niedrigen HDL-Werten überrepräsentiert wird (Slatter *et al.*, 2008c). Der Haplotyp beschreibt spezifische Allele, die durch die Abfolge mehrerer SNP-Loci entlang eines einzelnen Chromosoms definiert sind. Ein Haplotyp kann für ein Gen, für eine chromosomale Region, aber auch für jedes lange, zusammenhängende DNA-Fragment definiert

sein.

Ein weiterer SNP, der in der türkischen Bevölkerung mit erhöhten HDL Werten einhergeht, ist der R219K Aminosäureaustausch in Kombination mit dem -14C>T SNP (Hodoglugil *et al.*, 2005c). Diese Kombination von SNPs, kann folglich funktionell verschiedene Konsequenzen haben. Tabelle 1.2 gibt eine Übersicht der Studien, die Assoziationen zwischen ABCA1-Varianten und veränderten Lipidkonzentrationen sowie erniedrigtem Atheroskleroserisiko beschreiben.

Tab. 4.1: Studien und eigene Ergebnisse zur Assoziation von ABCA1-Genotypen auf Plasmalipoproteine und Risiko der KHK

SNP	Bedeutung	Quelle
-14C>T	-14T wird bei Menschen mit niedrigen HDL-Werten überrepräsentiert	(Slatter <i>et al.</i> , 2008b)
-14C>T	Erhöhte LP(a)-Werte bei homozygoten Trägern des Wildtyps -14C	Vorliegende Arbeit
-14C>T	-14CC Trend zu erhöhten LDL-Werten bei KHK-Patienten gegenüber -14TT	Vorliegende Arbeit
-14C>T + 1051G>A	-14T signifikant höhere HDL-C Level, besonders deutlich in Kombination mit 1051G>A	(Hodoglugil <i>et al.</i> , 2005b)
1051G>A	Erhöhte HDL Werte	(Yamakawa-Kobayashi <i>et al.</i> , 2004b)
1051G>A	Erhöhte HDL und Lp(a) Werte bei Patienten mit K Variante	(Evans and Beil, 2003b)
1051G>A	Signifikant weniger Herzinfarkte bei KK Trägern gegenüber RR Trägern	(Clee <i>et al.</i> , 2001)
1051G>A	K Variante protektiv gegen KHK bei Rauchern	(Cenarro <i>et al.</i> , 2003)

In einigen dieser Untersuchungen konnte eine Änderung der HDL-Werte in Abhängigkeit von verschiedenen Genotypen gezeigt werden. So konnte beispielsweise für die Variante 1051G eine geringere HDL-C-Konzentration in einem

Kollektiv von gesunden japanischen Schulkindern gezeigt werden (Yamakawa-Kobayashi *et al.*, 2004a). Eine türkische Datenbank zu Herzerkrankungen wurde auf den gleichen Zusammenhang hin untersucht. Hier war beobachtet worden, dass sowohl die ABCA1 -14TT-Variante als auch die Kombination mit der 1051AA-Variante zu erhöhten HDL-C-Konzentrationen führte (Hodoglugil *et al.*, 2005a).

Die Probanden einer neuseeländischen KHK- und Apoplex-Datenbank, der Otago „Vascular Disease Study“, wurden aufgrund von stark erhöhten oder sehr niedrigen HDL-Cholesterolverwerten ausgewählt. Es konnte eine geringere Prävalenz von ABCA1-Varianten bei Teilnehmern mit niedrigen HDL-Cholesterospiegeln nachgewiesen werden. Die Studie zeigte entgegen der Hodoglugil-Studie, dass die -14TT Variante mit niedrigen HDL-Cholesterospiegeln assoziiert werden konnte. Als Erklärung ist die ethnische Herkunft der Teilnehmer zu berücksichtigen. In diesem Zusammenhang war beobachtet worden, dass die Polymorphismen an Position -14C>T- und -564C>T zur Bildung unterschiedlicher Haplotypen in Abhängigkeit von der Kohorte führen. Während in der türkischen Bevölkerung die Variante -14T immer gemeinsam mit der Variante -564C auftritt, ist in der neuseeländischen Kohorte immer an beiden Positionen ein Thymin-Nukleotid zu beobachten (Slatter *et al.*, 2008a).

Es wurden aber auch keine Assoziationen von ABCA1-Polymorphismen mit veränderten Blutlipidspiegeln beschrieben. Brousseau *et al.* konnte keine Assoziation zwischen der 1051G>A, der 2589A>G und der 3456G>C ABCA1-Variante mit veränderten HDL-c Spiegeln feststellen (Brousseau *et al.*, 2001). Die Studie fand in den Vereinigten Staaten von Amerika statt und umfasste eine Vielzahl verschiedener ethnischer Gruppen. Dies ist vielleicht eine Erklärung, warum die Ergebnisse von anderen Studien abweichen (Singaraja *et al.*, 2003).

Zu einem ähnlichen Ergebnis führte auch unsere Untersuchung, denn es konnte keine signifikante Veränderung der HDL-, ApoA1- oder Cholesterolverwerte nachgewiesen werden. Dagegen konnte ein Einfluss des ABCA1-Polymorphismus auf die Lp(a)-Konzentration in der Kontrollgruppe gezeigt werden. So war LP(a) bei homozygoten Trägern des Wildtyps ABCA1 -14C mit 494,02 mg/l signifikant höher als bei Trägern von mindestens einem Allel der -14T Variante, bei denen eine Konzentration von 405 mg/l beobachtet wurde. Erhöhte Lp(a)-Konzentrationen sind ein Risikofaktor für die Entstehung der KHK, daher wäre es interessant zu wissen,

wie viele der Kontrollen tatsächlich in der Folge eine koronare Herzkrankheit entwickelt haben. In der Patienten-Gruppe war ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Genotyp und Lp(a) erkennbar, dieser war aber statistisch nicht signifikant.

Unterschiede in den LDL-Konzentrationen in Abhängigkeit des -14C>T Polymorphismus waren nicht signifikant. Es konnte nur ein Trend von -14CC zu -14TT zu erhöhten LDL-Werten in dem Patientenkollektiv und zu erniedrigten LDL-Werten bei den Kontrollen gezeigt werden.

Die Ergebnisse des ABCA1 1051G>A Polymorphismus in unserer Studie zeigten, entgegen unserer Erwartungen, keinen signifikanten Einfluss auf die Lipidparameter, weder bei den KHK-Patienten noch bei den Kontrollen.

Dass der ABCA1 Transporter einen funktionellen Wert in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen besitzt zeigte bereits ein Tierversuch mit Mäusen, die das humane ABCA1 überexprimieren und im Vergleich zu ABCA1 armen Mäusen eine deutlich geringere Inzidenz an Artherosklerose aufweisen.

Beim Menschen konnte z.B. Regieli et al. (2011) in seiner Studie zeigen, dass nach 10 Jahren die Mortalitätsrate durch kardiovaskuläre Ereignisse bei KHK Patienten mit einem T Allel des -477C>T SNP signifikant geringer ausfielen. In vitro konnte für den oben genannten SNP eine geringere Expression von ABCA1 mRNA in Makrophagen, die aus atherosklerotisch Veränderten Arterien gewonnen wurden verzeichnet werden.

Die Studie untersuchte auch den -14C>T Polymorphismus, kam hier allerdings zu keinem signifikanten Ergebnis.

Insgesamt deuten die Ergebnisse der gegenwärtigen Literatur darauf hin, dass bestimmte ABCA1-Polymorphismen eine funktionelle Bedeutung haben könnten. In wie weit und vor allem in welchem Zusammenspiel die SNPs klinisch relevant werden, ist Gegenstand weiterer Studien. Eine Studie von Dumitrescu et al. (2011) untersuchte gängige funktionelle SNPs in Individuen mit europäischem Hintergrund und kontrollierte, ob die gleiche funktionelle Bedeutung in anderen ethnischen Gruppen vorhanden war. Trotz einer großen „Power“ der Studie konnte bei den funktionellen SNPs keine generalisierte Assoziation zwischen den ethnischen Gruppen gefunden werden. Hierbei handelt es sich am wahrscheinlichsten um ein Kopplungsungleichgewicht zwischen den nicht funktionellen SNPs und den zuvor als funktionell identifizierten SNP der Genom-weiten Assoziationsstudie

Da der -14C>T Polymorphismus in der o.g. Studie nicht untersucht wurde, lässt sich auch hier nur mutmaßen, dass es sich bei diesem SNP auch um ein Kopplungsungleichgewicht handeln könnte.

Der direkte Einfluss der Myeloperoxidase (MPO) auf das kardiovaskuläre System konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden (Carr *et al.*, 2000b; Daugherty *et al.*, 1994a; Malle *et al.*, 2001b). So konnte vermehrt das von der MPO oxidierte LDL in atherosklerotischen Plaques von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen nachgewiesen werden. Die Proben wurden aus Gefäßabschnitten mit fortgeschrittenen arteriosklerotischen Veränderungen gewonnen. Malle *et al.* untersuchten z.B. Gefäßwände von Patienten, die kürzlich an einer zerebralen Blutung verstorben sind und von Patienten die gefäßchirurgisch wegen einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit oder eines Aortenaneurysmas versorgt worden sind. Immunhistochemisch konnte nachgewiesen werden, dass durch die MPO oxidierte Lipoproteine vermehrt in Makrophagen wieder zu finden sind. Des Weiteren konnte auch der Einfluss des -463G>A Polymorphismus auf die LDL-Konzentration gezeigt werden, vor allem Individuen, die mindestens ein A-Allel des -463G>A Polymorphismus tragen, wiesen signifikant höhere LDL-Konzentrationen auf (Hoy *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass vor allem KHK-Patienten mit der homozygoten oder der heterozygoten MPO-Variante erhöhte LDL-Werte aufwiesen. Homozygote Träger der MPO -463G-Variante wiesen eine LDL-Cholesterolkonzentration von 3,79 mmol/l auf. Träger der heterozygoten MPO -463GA-Varianten sowie die homozygote MPO -463AA-Variante zeigten hingegen höhere LDL-Konzentrationen (3,99 mmol/l) und (3,95 mmol/l).

Dolley *et al.* (2008) zeigten entgegen unseren Beobachtungen verringerte LDL-Konzentrationen bei Probanden mit einem MPO -463AA Genotyp. Eine Erklärung für die voneinander abweichenden Ergebnisse könnte der Unterschied in der Geschlechtsverteilung in den Studien sein. In der Studie von Dolley *et al.* lag der Frauenanteil bei fast 60 %, während in der vorliegenden Untersuchung nur 25 % der Teilnehmer Frauen waren. Es konnten daher auch nur 7 Trägerinnen der MPO -463AA-Variante identifiziert werden. Ähnlich wie in der Studie von Dolley *et al.* zeigten diese Patientinnen deutlich niedrigere LDL-Konzentrationen als die

männlichen Patienten mit dieser Variante. Die Tatsache, dass das Geschlecht gemeinsam mit dem Genotyp einen Einfluss auf die Lipidparameter aufweist könnte dadurch erklärt werden, dass sich der Polymorphismus in einem ALU-Element mit einer PPAR γ -Bindungsstelle befindet. Wird nun an Position -463 das G durch ein A ersetzt, so entsteht ein Estrogenrezeptor-Bindungsmotiv. Dadurch wird die Induzierbarkeit der MPO verändert, während normalerweise PPAR γ -Liganden die MPO in ihrer Expression modulieren, kann dies nach der Veränderung des MPO-Promotors durch die Bindung von 17-Beta-Estradiol verhindert werden (Reynolds *et al.*, 2006). Der AA-Genotyp könnte für Frauen somit einen protektiven Faktor hinsichtlich der Regulation der LDL-Spiegel und des Risikos der Entwicklung einer KHK darstellen.

Der ABCA1-Polymorphismus an Position 1051G>A zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentrationen der Lipidparameter. Der -14C>T ABCA1-Polymorphismus zeigte nur in den Kontrollen erhöhte Lp(a)-Werte. Hingegen konnte der -463G>A MPO-Polymorphismus signifikante Veränderungen bei KHK-Patienten zeigen. Aus dieser Beobachtung entsteht der Eindruck, dass die MPO einen wichtigeren Aspekt als der ABCA1-Transporter zum Risiko der KHK darstellt. Betrachtet man nun die Ergebnisse der Kombination des ABCA1 und des Myeloperoxidase-Polymorphismus, so fällt generell auf, dass beim Zusammenspiel der beiden Proteine ein stärkerer Anstieg der LDL-, LP(a)- und Cholesterolkonzentration im Vergleich zu den einzelnen Varianten zu verzeichnen ist. Besonders die Kombinationen von ABCA1 -14CT+TT/MPO -463AG+AA (4,03 mmol/l) zeigen bei den Patienten erhöhte LDL- und Lp(a) Werte gegenüber den Patienten mit ABCA1 -14CC und MPO -463GG (3,74 mmol/l).

Teilt man nun die Patienten entsprechend ihres Alters in zwei Gruppen ein, fällt auf, dass nur bei Patienten unter 61 Jahren, Unterschiede in den LDL Werten zu sehen sind. Bei den Patienten über 61 Jahren konnte eine solche Beobachtung nicht gemacht werden.

4.2.1 LP(a)

Lp(a) ist ein Teil des LDL-Komplex, des Glykoproteins Apo(a) und als unabhängiger

Risikofaktor der KHK wird er kontrovers diskutiert. Der Trend geht jedoch in die Richtung, ihn als einen solchen anzuerkennen.

Insbesondere gilt dies für das Auftreten erhöhter Lp(a)-Spiegel in Kombination mit weiteren Hyperlipidämien. Vor allem sind hier hohe LDL-Cholesterol-Spiegel gemeint (Homma, 2004).

Eine erhöhte Inzidenz von Myokardinfarkten in der dänischen Bevölkerung wurde mit erhöhten Lp(a) Werten in Zusammenhang gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass die Höhe der Lp(a) Konzentration mit der Wahrscheinlichkeit eines Myokardinfarktes korreliert. Die Ergebnisse zeigten ein 3-4 fach erhöhtes Risiko für Probanden, deren Lp(a)-Wert über der 95. Perzentile lag. Die Studie konnte jedoch keinen Richtwert/Konzentration für ein erhöhtes Risiko festmachen. Sie schlägt vor, Lp(a) vermehrt als klinischen Laborparameter für Myokardinfarkt gefährdete Patienten zu nutzen (Kamstrup *et al.*, 2008). Auch eine japanische Studie beschreibt, dass das Lp(a) in Japan zum klinischen Routinelabor gehört und vor allem im Zusammenhang mit erhöhten LDL-Werten berücksichtigt und behandelt werden sollte (Homma, 2004). Nicht nur Studien sondern auch angesehene Lehrbücher wie z.B. Harrison's Principles of Internal Medicine schreibt, dass Personen mit Lp(a)-Spiegeln von über 300 mg/l ein erhöhtes Atheroskleroserisiko besitzen (Dietel *et al.*, 2005). Diese Empfehlung unterstreicht die Wichtigkeit, Lp(a) als Risikofaktor der KHK zu berücksichtigen.

In unserer Studie zeigte die Kontrollgruppe signifikante Unterschiede in den Lp(a)-Konzentrationen, vor allem zwischen der ABCA1 -14CC/MPO -463AA-Genotypenkombination (653,64 mg/l) und der -14CT+TT/-463AG+GG Kombination (406,73 mg/l). Dieser deutliche Anstieg des Lp(a)-Wertes konnte jedoch nur beim männlichen Geschlecht beobachtet werden. Bei den weiblichen Kontrollen konnte keine signifikante Änderung festgestellt werden. Die gleiche Beobachtung konnte in einer Studie aus Island gemacht werden. Hier zeigte sich auch, dass vor allem Männer erhöhte Lp(a)-Konzentrationen aufwiesen. Des Weiteren dokumentierte die Studie höhere Lp(a)-Werte bei den Patienten als bei den Kontrollen (Bennet *et al.*, 2008). In der vorliegenden Untersuchung konnten auch wir die höchsten Lp(a)-Konzentrationen im Patientenkollektiv feststellen.

Wiederum konnte diese drastische Erhöhung bei der ABCA1 -14CC/MPO -463AA-Genotypenkombination (856,75 mg/l) nachgewiesen werden. Obwohl der

Unterschied zwischen den Kombinationen im Patientenkollektiv 400 mg/l betrug, konnten keine signifikanten Unterschiede der Genotypenkombinationen gesehen werden. Eine Erklärung für das nicht Erreichen der Signifikanz könnte die halb so hohe Fallzahl der ABCA1 -14CC/MPO -463AA-Kombination bei den Patienten sein. Insgesamt sind die Fallzahlen der seltenen Kombination gering, bei den Kontrollen mit erhöhten Lp(a)-Spiegel waren es 9 und bei den Patienten nur 4 Teilnehmer.

Anders als bei vorherigen Lp(a)-Studien wurden hier zum ersten Mal der Einfluss von ABCA1- und MPO-Promotervarianten berücksichtigt. Der vorliegenden Studie fehlt jedoch eine Anschlussuntersuchung, um das spätere Auftreten einer KHK bei den Kontrollen zu beobachten.

4.3 Einfluss des Zigarettenrauchens

Die Stratifizierung nach dem Raucherstatus zeigte, dass homozygote Träger der niedrig aktiven MPO -463A-Variante ein niedrigeres Risiko für eine KHK aufwiesen, als Träger der hoch-aktiven Wildtypvariante. Die -463AA-Variante trat in der Kontrollgruppe etwa doppelt so häufig auf wie in der Patientengruppe.

Ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus wurde erst kürzlich beschrieben. Rauchen sowie die Ernährungsweise können die Bildung von Thiocyanaten (SCN^-) im Blut bewirken. Wang et al. 2007 zeigten, dass SCN^- ein weiteres Substrat der MPO ist und von ihr zu Cyanat (OCN^-) carbamyliert wird. Das Cyanat modifiziert nun Lysinrückstände auf Proteinen und Lipoproteinen welches zu der Entstehung von Homocitrullin führt. Bei den Lipoproteinen wurde gezeigt, dass LDL-Homocitrullin eine höhere Affinität zum Scavenger-Rezeptor SR-A1 hat und deshalb erstens zu einer vermehrten Phagozytose durch Makrophagen führt, zweitens die Proliferation von vasculären glatten Muskelzellen fördert und drittens die Apoptose von Endothelzellen begünstigt. Alle drei Veränderungen begünstigen die Pathogenese einer KHK. Des Weiteren wurde die Funktion des HDL-Lipoproteines an den Scavenger-Rezeptor SR-B1 zu binden gestört, sobald das HDL von der MPO oxidiert wurde. Dies resultiert in der Apoptose der Endothelzellen (siehe Abb. 4.1). Erhöhte SCN^- Werte führen zu erhöhten Protein-Homocitrullin Blutwerten und zu einer Steigerung des kardiovaskulären Risikos (Exner et al., 2004; Wang et al., 2007).

Aufgrund der Tatsache, dass die erhöhten Homocitrullin-Werte mit der Aktivität der

MPO korrelieren, ist ein Funktionsverlust der MPO mit niedrigeren Homocitrullin-Werten assoziiert. Somit ist auch mit einem geringeren KHK Risiko zu rechnen. Es ist denkbar, dass die -463G>A Variante durch eine Funktionseinschränkung der MPO die Bildung von Homocitrullin und dadurch auch die daraus resultierenden pro-atherosklerotischen Prozesse verhindert.

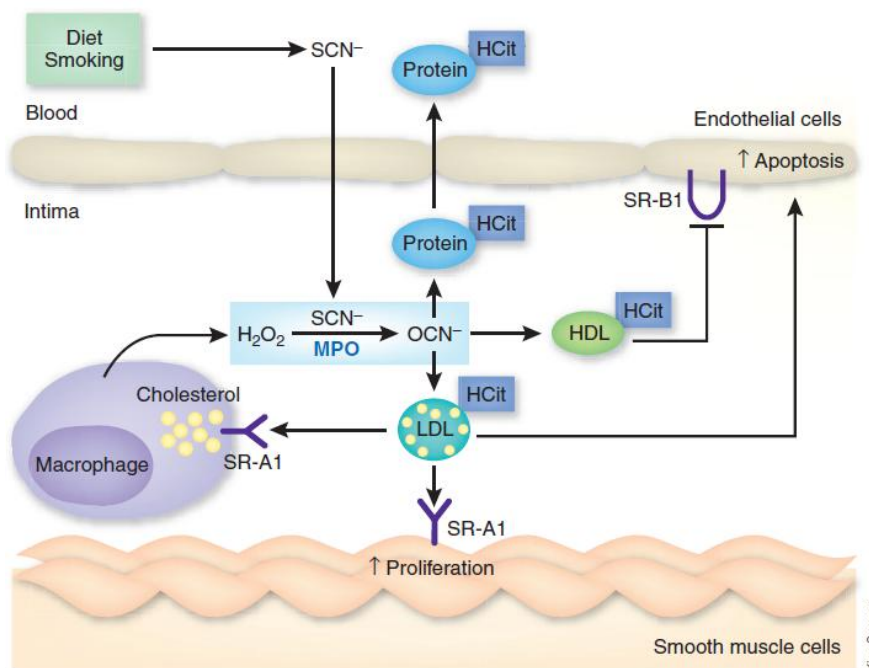


Abb. 4.1 Carbamylierung von Lipoproteinen durch die MPO in atherosklerotische Plaques. SCN⁻: Thiocyanat, OCN⁻: Cyanat, HCit: Homocitrullin, LDL: low-density lipoprotein, HDL: high-density lipoprotein, MPO: Myeloperoxidase, SR-A1: Scavenger-Rezeptor A1, SR-B1: Scavenger-Rezeptor B1, H₂O₂: Wasserstoffperoxid (Rader and Ischiropoulos, 2007)

Ein ähnlicher Effekt konnte auch für die Variante 1051G>A im ABCA1 Gen gezeigt werden. Hatten Raucher wenigstens ein A-Allel, so wiesen sie auch ein geringeres KHK Risiko auf. Ob auch hier die Thiocyanat-Bildung beeinflusst wird, ist vorerst unklar.

5 Zusammenfassung

Der reverse Cholesteroltransport ist ein wichtiger Stoffwechselweg im menschlichen Organismus mit dem Ziel, überschüssiges Cholesterol über die Kopplung an ApoA1-Proteine und Transport und Metabolismus in der Leber auszuscheiden. Erhöhte Bluffettwerte gehören zu den klassischen Risikofaktoren für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit, daneben spielen möglicherweise auch genetische Einflussfaktoren eine wichtige Rolle. Zwei maßgebliche Faktoren in diesem System sind der ABCA1-Transporter und die Myeloperoxidase. In dieser Arbeit sollte der Einfluss von genetischen Varianten dieser Gene auf die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit und auf die Plasmakonzentrationen der Lipide HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol und Lipoprotein a (LP(a)) untersucht werden.

Hierfür wurde ein Kollektiv aus 1000 angiografisch gesicherten KHK-Patienten und 1000 klinisch unauffälligen Hospitalkontrollen herangezogen und hinsichtlich der MPO -463G>A und ABCA1-Gens -14C>T und 1051G>A genotypisiert.

Die Verteilung der Genotypen in den beiden untersuchten Gruppen wies sowohl für die Variante MPO -463G>A als auch für die beiden Polymorphismen im ABCA1-Gen an Position -14C>T und 1051G>A statistisch keine Unterschiede auf. Dagegen ergab eine Stratifizierung nach dem Risikofaktor Rauchen einen protektiven Effekt für Patienten, die homozygote Träger der seltenen niedrig aktiven A-Variante im MPO-Gen waren. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Träger der GA oder AA-Variante für ABCA1 1051G>A. Diese Beobachtung konnte auch in einer weiteren Studie gemacht werden (Cenarro et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass α -Tocopherol ebenfalls ein Substrat des ABCA1-Transporters ist und die Entstehung von oxidierten Lipoproteinen abschwächt.

Alpha-Tocopherol ist die aktivste Form des Vitamin E und akkumuliert zum größten Teil in Zellmembranen des gesamten menschlichen Organismus. Im Plasma befindet sich das Vitamin vermehrt in LDLs und HDLs. Es gilt als ein starkes Antioxidans und wirkt der Entstehung von oxidativem Stress entgegen (Oram et al., 2001) Bei Rauchern kommt es zu einer vermehrten Oxidation von Lipoproteinen und folglich zu einem höheren oxidativem Stress, was wiederum günstig für die Entstehung einer KHK ist. Dementsprechend würde eine vermehrte Aktivität des ABCA1-Transporters die Entstehung des oxidativen Stresses, und gleichzeitig das

Risiko für Raucher an einer KHK zu erkranken verringern.

Zwischen den untersuchten Polymorphismen und den Plasma-Lipidkonzentration konnten signifikante Unterschiede beim LDL-Cholesterol und beim Lp(a) gesehen werden. Bei beiden Lipidparametern konnte der Unterschied vor allem bei der Genotypenkombination ABCA1 -14 CC und MPO AA beobachtet werden. Hier zeigt sich ein signifikanter Anstieg des Cholesterols auf 6,5mmol/l ($p = 0,025$), des LDL-Cholesterol (4,5 mmol/l) ($p = 0,018$) und des Lp(a) (652 mg/l) ($p = 0,026$) in der Kontrollgruppe.

Auch die homozygote AA Variante in der Kombination beider Polymorphismen ABCA1 1051G>A und MPO -463G>A konnte mit erhöhten Lp(a)-Werten korreliert werden ($p=0,41$).

Dies ist insbesondere für das Lp(a) eine wichtige Erkenntnis, da immer wieder beschrieben wurde, dass das Lp(a) vor allem in Verbindung mit weiteren Fettstoffwechselstörungen ein wichtiger KHK-Risikofaktor zu sein scheint. Das LDL-Cholesterol war im Gegensatz zum Lp(a) auch bei dem -463G>A MPO-Polymorphismus erhöht.

Des Weiteren war zu beobachten, dass bei der ABCA1 -14CC und MPO -463AA-Kombination Männer einen signifikanten Anstieg des Lp(a)s hatten. Bei Frauen konnte dies nicht beobachtet werden.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass die untersuchten genetischen Polymorphismen vor allem einen Einfluss auf die LDL-Cholesterol, HDL-Cholesterol und Lp(a)-Werte besitzen. Bei Rauchern, die homozygote Träger der niedrig aktiven MPO -463A-Variante sind kann sogar von einem protektiven Effekt gegenüber der KHK ausgegangen werden. Sie sind jedoch nicht als eigenständige KHK-Risikofaktoren zu betrachten.

6 Literaturverzeichnis

Agner K (1941) Verdoperoxidase: a Ferment Isolated From Leukocytes. *Acta Physiol Scand* pp 1-62.

Altmann S W, Davis H R, Jr., Zhu L J, Yao X, Hoos L M, Tetzloff G, Iyer S P, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N and Graziano M P (2004) Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption. *Science* **303**: pp 1201-1204.

Barter P J, Rye KA (1996) High density lipoproteins and coronary heart disease. *Atherosclerosis* **121**: pp 1-12

Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski W E, Hahmann H W, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner K J and Schmitz G (1999) The Gene Encoding ATP-Binding Cassette Transporter 1 Is Mutated in Tangier Disease. *Nat Genet* **22**: pp 347-351.

Brousseau M E, Bodzioch M, Schaefer E J, Goldkamp A L, Kielar D, Probst M, Ordovas J M, Aslanidis C, Lackner K J, Bloomfield R H, Collins D, Robins S J, Wilson P W and Schmitz G (2001) Common Variants in the Gene Encoding ATP-Binding Cassette Transporter 1 in Men With Low HDL Cholesterol Levels and Coronary Heart Disease. *Atherosclerosis* **154**: pp 607-611.

Carr A C, Myzak M C, Stocker R, McCall M R and Frei B (2000b) Myeloperoxidase Binds to Low-Density Lipoprotein: Potential Implications for Atherosclerosis. *FEBS Lett* **487**: pp 176-180.

Carr A C, Myzak M C, Stocker R, McCall M R and Frei B (2000a) Myeloperoxidase Binds to Low-Density Lipoprotein: Potential Implications for Atherosclerosis. *FEBS Lett* **487**: pp 176-180.

Cascorbi I, Henning S, Brockmoller J, Gephart J, Meisel C, Muller J M, Loddenkemper R and Roots I (2000) Substantially Reduced Risk of Cancer of the Aerodigestive Tract in Subjects With Variant--463A of the Myeloperoxidase Gene. *Cancer Res* **60**: pp 644-649.

Cenarro A, Artieda M, Castillo S, Mozas P, Reyes G, Tejedor D, Alonso R, Mata P, Pocovi M and Civeira F (2003) A Common Variant in the ABCA1 Gene Is Associated With a Lower Risk for Premature Coronary Heart Disease in Familial Hypercholesterolaemia. *J Med Genet* **40**: pp 163-168.

Clee S M, Zwinderman A H, Engert J C, Zwarts K Y, Molhuizen H O, Roomp K, Jukema J W, van Wijland M, van Dam M, Hudson T J, Brooks-Wilson A, Genest J Jr,

Kastelein J J, Hayden M R (2001) Common Genetic Variation in ABCA1 is associated with Altered Lipoprotein Levels and a Modified Risk for Coronary Artery Disease. *Circulation* **103**: pp 1198-205

Dally H, Bartsch H and Risch A (2003) Correspondence Re: Feyler Et Al., Point: Myeloperoxidase (-463)G --> a Polymorphism and Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 11: 1550-1554, 2002, and Xu Et Al., Counterpoint: The Myeloperoxidase (-463)G --> a Polymorphism Does Not Decrease Lung Cancer Susceptibility in Caucasians. 11: 1555-1559, 2002. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**: pp 683.

Dally H, Gassner K, Jager B, Schmezer P, Spiegelhalder B, Edler L, Drings P, Dienemann H, Schulz V, Kayser K, Bartsch H and Risch A (2002) Myeloperoxidase (MPO) Genotype and Lung Cancer Histologic Types: the MPO -463 A Allele Is Associated With Reduced Risk for Small Cell Lung Cancer in Smokers. *Int J Cancer* **102**: pp 530-535.

Daugherty A, Dunn J L, Rateri D L and Heinecke J W (1994a) Myeloperoxidase, a Catalyst for Lipoprotein Oxidation, Is Expressed in Human Atherosclerotic Lesions. *J Clin Invest* **94**: pp 437-444.

Daugherty A, Dunn J L, Rateri D L and Heinecke J W (1994b) Myeloperoxidase, a Catalyst for Lipoprotein Oxidation, Is Expressed in Human Atherosclerotic Lesions. *J Clin Invest* **94**: pp 437-444.

Davidson AL and Maloney P C (2007) ABC Transporters: How Small Machines Do a Big Job. *Trends Microbiol* **15**: pp 448-455.

Dean M and Annilo T (2005) Evolution of the ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily in Vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**: pp 123-142.

De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, et al. (2003) European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Executive Summary. Third Joint Task Force of European and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J* **24**: pp 1601-1610.

DeLeo FR, Goedken M, McCormick S J and Nauseef W M (1998) A Novel Form of Hereditary Myeloperoxidase Deficiency Linked to Endoplasmic Reticulum/Proteasome Degradation. *J Clin Invest* **101**: pp 2900-2909.

Dietel M, Suttorp N and Zeitz M (2005) *Harrisons Innere Medizin*.

Dolley G, Lamarche B, Despres J P, Bouchard C, Perusse L and Vohl M C (2008) Myeloperoxidase Gene Sequence Variations Are Associated With Low-Density-Lipoprotein Characteristics. *J Hum Genet* **53**: pp 439-446.

- Drexel H (2005) Neue Argumente und Strategien zur Behandlung des HDL-Cholesterins. *Aust J of Cardiol* **12**: pp 12-13
- Dumitrescu L, Carty C L, Taylor K, Schumacher F R, Hindorff L A, et al. (2011) Genetic Determinants of Lipid Traits in Diverse Populations from the Population Architecture using Genomics and Epidemiology (PAGE) Study. *PLoS Genet* **7(6)**: e1002138. doi:10.1371/journal.pgen.10021
- Duzguncinar O, Yavuz B, Hazirolan T, Deniz A, Tokgozoglu S L, Akata D and Demirpence E (2008) Plasma Myeloperoxidase Is Related to the Severity of Coronary Artery Disease. *Acta Cardiol* **63**: pp 147-152.
- von Eckardstein A, Schulte H, Cullen P, Assmann G (2001) Lipoprotein(a) further increases the risk of coronary events in men with high global cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* **37**: pp 434-9
- Evans D and Beil F U (2003a) The Association of the R219K Polymorphism in the ATP-Binding Cassette Transporter 1 (ABCA1) Gene With Coronary Heart Disease and Hyperlipidaemia. *J Mol Med* **81**: pp 264-270.
- Evans D and Beil F U (2003b) The Association of the R219K Polymorphism in the ATP-Binding Cassette Transporter 1 (ABCA1) Gene With Coronary Heart Disease and Hyperlipidaemia. *J Mol Med* **81**: pp 264-270.
- Exner M, Hermann M, Hofbauer R, Hartmann B, Kapiotis S and Gmeiner B (2004) Thiocyanate Catalyzes Myeloperoxidase-Initiated Lipid Oxidation in LDL. *Free Radic Biol Med* **37**: pp 146-155.
- Feyler A, Voho A, Bouchardy C, Kuokkanen K, Dayer P, Hirvonen A and Benhamou S (2002) Point: Myeloperoxidase -463G --> a Polymorphism and Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**: pp 1550-1554.
- Goldberg IJ (2001) Clinical Review 124: Diabetic Dyslipidemia: Causes and Consequences. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: pp 965-971.
- Hasilik A, Pohlmann R, Olsen R L and von Figura K (1984) Myeloperoxidase Is Synthesized As Larger Phosphorylated Precursor. *EMBO J* **3**: pp 2671-2676.
- Higgins C F (1992) ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annu Rev Cell Biol* **8**: pp 67-113.
- Higgins C F, Hyde S C, Mimmack M M, Gileadi U, Gill D R and Gallagher M P (1990b) Binding Protein-Dependent Transport Systems. *J Bioenerg Biomembr* **22**: pp 571-592.
- Higgins C F, Hyde S C, Mimmack M M, Gileadi U, Gill D R and Gallagher M P (1990a) Binding Protein-Dependent Transport Systems. *J Bioenerg Biomembr* **22**: pp 571-592.

Hodoglugil U, Williamson D W, Huang Y and Mahley R W (2005c) Common Polymorphisms of ATP Binding Cassette Transporter A1, Including a Functional Promoter Polymorphism, Associated With Plasma High Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Turks. *Atherosclerosis* **183**: pp 199-212.

Hodoglugil U, Williamson D W, Huang Y and Mahley R W (2005b) Common Polymorphisms of ATP Binding Cassette Transporter A1, Including a Functional Promoter Polymorphism, Associated With Plasma High Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Turks. *Atherosclerosis* **183**: pp 199-212.

Hodoglugil U, Williamson D W, Huang Y and Mahley R W (2005a) Common Polymorphisms of ATP Binding Cassette Transporter A1, Including a Functional Promoter Polymorphism, Associated With Plasma High Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Turks. *Atherosclerosis* **183**: pp 199-212.

Homma Y (2004) Predictors of Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* **11**: pp 265-270.

Hong S H, Rhyne J, Zeller K and Miller M (2002a) ABCA1(Alabama): a Novel Variant Associated With HDL Deficiency and Premature Coronary Artery Disease. *Atherosclerosis* **164**: pp 245-250.

Hong S H, Rhyne J, Zeller K and Miller M (2002b) ABCA1(Alabama): a Novel Variant Associated With HDL Deficiency and Premature Coronary Artery Disease. *Atherosclerosis* **164**: pp 245-250.

Hong S H, Rhyne J, Zeller K and Miller M (2002c) ABCA1(Alabama): a Novel Variant Associated With HDL Deficiency and Premature Coronary Artery Disease. *Atherosclerosis* **164**: pp 245-250.

Hoy A, Tregouet D, Leininger-Muller B, Poirier O, Maurice M, Sass C, Siest G, Tiret L and Visvikis S (2001) Serum Myeloperoxidase Concentration in a Healthy Population: Biological Variations, Familial Resemblance and New Genetic Polymorphisms. *Eur J Hum Genet* **9**: pp 780-786.

Kamstrup P R, Benn M, Tybjaerg-Hansen A and Nordestgaard B G (2008) Extreme Lipoprotein(a) Levels and Risk of Myocardial Infarction in the General Population: the Copenhagen City Heart Study. *Circulation* **117**: pp 176-184.

Kantarci O H, Lesnick T G, Yang P, Meyer R L, Hebrink D D, McMurray C T and Weinschenker B G (2002) Myeloperoxidase -463 (G-->A) Polymorphism Associated With Lower Risk of Lung Cancer. *Mayo Clin Proc* **77**: pp 17-22.

Laule M, Cascorbi I, Stangl V, Bielecke C, Wernecke K D, Mrozikiewicz P M, Felix S B, Roots I, Baumann G and Stangl K (1999) A1/A2 Polymorphism of Glycoprotein IIIa and Association With Excess Procedural Risk for Coronary Catheter Interventions: a Case-Controlled Study. *Lancet* **353**: pp 708-712.

Le Marchand L, Seifried A, Lum A and Wilkens L R (2000) Association of the Myeloperoxidase -463G-->A Polymorphism With Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**: pp 181-184.

Malle E, Wag G, Thiery J, Sattler W and Grone H J (2001b) Hypochlorite-Modified (Lipo)Proteins Are Present in Rabbit Lesions in Response to Dietary Cholesterol. *Biochem Biophys Res Commun* **289**: pp 894-900.

Malle E, Wag G, Thiery J, Sattler W and Grone H J (2001a) Hypochlorite-Modified (Lipo)Proteins Are Present in Rabbit Lesions in Response to Dietary Cholesterol. *Biochem Biophys Res Commun* **289**: pp 894-900.

Nagra R M, Becher B, Tourtellotte W W, Antel J P, Gold D, Paladino T, Smith R A, Nelson J R and Reynolds W F (1997) Immunohistochemical and Genetic Evidence of Myeloperoxidase Involvement in Multiple Sclerosis. *J Neuroimmunol* **78**: pp 97-107.

Nauseef W M, Cogley M, Bock S and Petrides P E (1998) Pattern of Inheritance in Hereditary Myeloperoxidase Deficiency Associated With the R569W Missense Mutation. *J Leukoc Biol* **63**: pp 264-269.

Ndrepepa G, Braun S, Mehilli J, Beckerath N, Schomig A, and Kastrati A (2008) Myeloperoxidase level in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes. *Eur J Clin Invest*. **38**: pp 90-96.

Probst M C, Thumann H, Aslanidis C, Langmann T, Buechler C, Patsch W, Baralle F E, Dallinga-Thie G M, Geisel J, Keller C, Menys V C and Schmitz G (2004b) Screening for Functional Sequence Variations and Mutations in ABCA1. *Atherosclerosis* **175**: pp 269-279.

Probst M C, Thumann H, Aslanidis C, Langmann T, Buechler C, Patsch W, Baralle F E, Dallinga-Thie G M, Geisel J, Keller C, Menys V C and Schmitz G (2004a) Screening for Functional Sequence Variations and Mutations in ABCA1. *Atherosclerosis* **175**: pp 269-279.

Rader D J and Ischiropoulos H (2007) 'Multipurpose Oxidase' in Atherogenesis. *Nat Med* **13**: pp 1146-1147.

Regieli J J, Doevendans P A, Grobbee D E, Zwinderman AH, van der Graaf Y, Kastelein J J P, Jukema J W (2011) ABCA1 impacts atherothrombotic risk and 10-year survival in a contemporary secondary prevention setting *Atherosclerosis* **218**: pp 457–463

Repa J J, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro J M, Shimomura I, Shan B, Brown M S, Goldstein J L and Mangelsdorf D J (2000) Regulation of Mouse Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c Gene (SREBP-1c) by Oxysterol Receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* **14**: pp 2819-2830.

Reynolds W F, Kumar AP and Piedrafita F J (2006) The Human Myeloperoxidase Gene Is Regulated by LXR and PPARalpha Ligands. *Biochem Biophys Res Commun* **349**: pp 846-854.

Ridker P M, Buring J E, Shih J, Matias M, Hennekens CH (1998) Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* **98**: pp 731

Romano M, Dri P, Dadalt L, Patriarca P and Baralle FE (1997) Biochemical and Molecular Characterization of Hereditary Myeloperoxidase Deficiency. *Blood* **90**: pp 4126-4134.

Schabath M B, Spitz M R, Delclos G L, Gunn G B, Whitehead L W and Wu X (2002) Association Between Asbestos Exposure, Cigarette Smoking, Myeloperoxidase (MPO) Genotypes, and Lung Cancer Risk. *Am J Ind Med* **42**: pp 29-37.

Schabath M B, Spitz M R, Zhang X, Delclos G L and Wu X (2000) Genetic Variants of Myeloperoxidase and Lung Cancer Risk. *Carcinogenesis* **21**: pp 1163-1166.

Shao B, Oda M N, Bergt C, Fu X, Green P S, Brot N, Oram J F and Heinecke J W (2006a) Myeloperoxidase Impairs ABCA1-Dependent Cholesterol Efflux Through Methionine Oxidation and Site-Specific Tyrosine Chlorination of Apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* **281**: pp 9001-9004.

Shao B, Oda M N, Bergt C, Fu X, Green P S, Brot N, Oram J F and Heinecke J W (2006b) Myeloperoxidase Impairs ABCA1-Dependent Cholesterol Efflux Through Methionine Oxidation and Site-Specific Tyrosine Chlorination of Apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* **281**: pp 9001-9004.

Shao B, Oda M N, Bergt C, Fu X, Green P S, Brot N, Oram J F and Heinecke J W (2006c) Myeloperoxidase Impairs ABCA1-Dependent Cholesterol Efflux Through Methionine Oxidation and Site-Specific Tyrosine Chlorination of Apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* **281**: pp 9001-9004.

Shao B, Oda M N, Bergt C, Fu X, Green P S, Brot N, Oram J F and Heinecke J W (2006d) Myeloperoxidase Impairs ABCA1-Dependent Cholesterol Efflux Through Methionine Oxidation and Site-Specific Tyrosine Chlorination of Apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* **281**: pp 9001-9004.

Singaraja R R, Brunham L R, Visscher H, Kastelein J J and Hayden M R (2003) Efflux and Atherosclerosis: the Clinical and Biochemical Impact of Variations in the ABCA1 Gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**: pp 1322-1332.

Slatter T L, Jones G T, Williams M J, van Rij A M and McCormick S P (2008a) Novel Rare Mutations and Promoter Haplotypes in ABCA1 Contribute to Low-HDL-C Levels. *Clin Genet* **73**: pp 179-184.

Slatter T L, Jones G T, Williams M J, van Rij A M and McCormick S P (2008b) Novel Rare Mutations and Promoter Haplotypes in ABCA1 Contribute to Low-HDL-C Levels. *Clin Genet* **73**: pp 179-184.

Slatter T L, Jones G T, Williams M J, van Rij A M and McCormick S P (2008c) Novel Rare Mutations and Promoter Haplotypes in ABCA1 Contribute to Low-HDL-C Levels. *Clin Genet* **73**: pp 179-184.

Wang Z, Nicholls S J, Rodriguez E R, Kummu O, Horkko S, Barnard J, Reynolds W F, Topol E J, DiDonato J A and Hazen S L (2007) Protein Carbamylation Links Inflammation, Smoking, Uremia and Atherogenesis. *Nat Med* **13**: pp 1176-1184.

Wu X, Schabath M B and Spitz M R (2003) Myeloperoxidase Promoter Region Polymorphism and Lung Cancer Risk. *Methods Mol Med* **75**: pp 121-133.

Yamakawa-Kobayashi K, Yanagi H, Yu Y, Endo K, Arinami T and Hamaguchi H (2004a) Associations Between Serum High-Density Lipoprotein Cholesterol or Apolipoprotein AI Levels and Common Genetic Variants of the ABCA1 Gene in Japanese School-Aged Children. *Metabolism* **53**: pp 182-186.

Yamakawa-Kobayashi K, Yanagi H, Yu Y, Endo K, Arinami T and Hamaguchi H (2004b) Associations Between Serum High-Density Lipoprotein Cholesterol or Apolipoprotein AI Levels and Common Genetic Variants of the ABCA1 Gene in Japanese School-Aged Children. *Metabolism* **53**: pp 182-186.

Zhang R, Brennan M L, Fu X, Aviles R J, Pearce G L, Penn M S, Topol E J, Sprecher D L and Hazen S L (2001) Association Between Myeloperoxidase Levels and Risk of Coronary Artery Disease. *JAMA* **286**: pp 2136-2142.

Zheng L, Nukuna B, Brennan M L, Sun M, Goormastic M, Settle M, Schmitt D, Fu X, Thomson L, Fox P L, Ischiropoulos H, Smith J D, Kinter M and Hazen S L (2004) Apolipoprotein A-I Is a Selective Target for Myeloperoxidase-Catalyzed Oxidation and Functional Impairment in Subjects With Cardiovascular Disease. *J Clin Invest* **114**: pp 529-541.

7 Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit möchte ich einigen Menschen herzlich danken.

Meinem Doktorvater Professor Dr. Dr. Ingolf Cascorbi danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, die wissenschaftliche Betreuung und seine Unterstützung bei der Durchführung der Experimente dieses Projekts.

Besonderer Dank gilt an dieser Stelle Frau Dr. Cornelia Remmler für die kompetente Betreuung. Sie ermöglichte mir fortwährend auch kurzfristige Termine. Dabei waren die Gespräche stets motivierend; sowohl inhaltlich als auch in Bezug auf die Struktur der Dissertation erhielt ich sehr gute Ratschläge.

Des Weiteren danke ich Dr. Sierk Haenisch, Dr. Jihong Zhu, Frau Marion Pauer und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie für ihre Unterstützung.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und meinen beiden Großmüttern dafür danken, dass sie mir das Studium der Medizin ermöglicht, und mich auf meinem Weg immer unterstützt haben. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geb. am 31.01.1983 in Amsterdam

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Konfession: evangelisch

Studium

2003-2009 Studium der Medizin, Christian Albrecht Universität, Kiel

Arbeitserfahrung

Seit 02/2012 Assistenzarzt in der Weiterbildung Orthopädie/Unfallchirurgie an der Lubinuslinik, Kiel

01/2011-02/2012 Assistenzarzt in der Allgemeinchirurgie des Schlei-Klinikums, Schleswig

07/2010-09/2010 Honorararzt in der Chirurgie/Unfallchirurgie des Heliosklinikums, Bad Gandersheim

12/2009-04/2010 Honorararzt in der Chirurgie/Unfallchirurgie des Heliosklinikums, Bad Gandersheim

Praktisches Jahr

04/2009-07/2009 Innere (Kreiskrankenhaus Eckernförde)

12/2008-04/2009 Chirurgie (Uniklinik Kiel)

08/2008-12/2008 Diagnostische Radiologie/ Strahlentherapie/Nuklearmedizin (Uniklinik Kiel)

Famulaturen

02/2008-03/2008 Innere Medizin (Royal North Shore Hospital, Sydney, Australien)

07/2007-08/2007 Chirurgie/Orthopädie Notfallambulanz (Lubinuslinik, Kiel)

02/2007-03/2007 Pharmakologie (Uniklinik, Kiel)

09/2006-10/2006 Dermatologie (Uniklinik, Kiel)

03/2005 Visceral- und Thoraxchirurgie (Remigius Krankenhaus Leverkusen/Opladen)

Forschung/Promotion

Vorliegende Promotion über die Assoziation von Myeloperoxidase- und ABCA1-Transporter-Varianten zum Risiko der koronaren Herzkrankheit

Praktische Tätigkeiten

2007-2008 Chirurgischer Assistent in der Endoprothetik der Lubinuslinik, Kiel

2006-2007 Allgemeinchirurgischer Assistent in der Parkklinik, Kiel

Lehrtätigkeiten

04/2007-06/2007 Für 6 Wochen Tutor im Untersuchungskurs der Vorklinik

12/2005-02/2005 Für 4 Wochen Tutor im Präparierkurs