

# GENETICA E CARDIOPATIA ISCHEMICA: IL LEGAME SI FA PIÙ STRETTO

*M. F. Notarangelo, M. A. Demola, D. Ardissino*

**Unità Operativa di Cardiologia  
Azienda Ospedaliero-Universitaria, Parma.**

La cardiopatia ischemica, principale causa di mortalità e morbilità nei paesi industrializzati, è una patologia ad eziologia multifattoriale, derivante cioè dall'interazione tra fattori di rischio ambientali e genetici. Gli studi epidemiologici, tra cui il più recente INTERHEART Study, hanno chiaramente definito il ruolo dei fattori di rischio ambientali in popolazioni provenienti da differenti aree geografiche e diverse etnie<sup>1</sup>.

È noto che la familiarità per cardiopatia ischemica, definita come la presenza di almeno un parente di primo grado che ha sviluppato tale malattia entro i 55 anni per i maschi ed entro i 65 anni per le femmine, sia un fattore di rischio indipendente e significativamente associato al rischio di infarto miocardico. Tale rischio è, infatti, 2-11 volte più alto nei fratelli di pazienti con infarto miocardico e la concordanza nello sviluppo di tale patologia è più alta nei gemelli monozigoti, che condividono lo stesso patrimonio genetico, rispetto ai gemelli dizigoti<sup>2-4</sup>.

Sulla base di questi dati, nell'ultimo decennio sono stati effettuati numerosi tentativi, mediante studi di geni candidati ed analisi di linkage, per identificare varianti genetiche associate al rischio di infarto miocardico. Tuttavia, i risultati sono stati poco incoraggianti, perché le varianti genetiche analizzate spiegavano solo una minima parte (<1%) dei casi di malattia e le varianti genetiche più frequentemente rappresentate nella popolazione non sono mai state riprodotte<sup>5</sup>. Il potenziale limite di tale tipologia di studio è riconducibile alla restrizione dell'analisi di associazione ad una singola o a pochissime varianti genetiche considerate causative, di solito coinvolte nei pathways molecolari riconosciuti come determinanti la patologia aterosclerotica. La cardiopatia ischemica, e l'infarto miocardico in particolare, sono patologie complesse, ovvero malattie comuni causate da interazioni multiple di diversi geni che, interagendo tra loro e con fattori ambientali di rischio, creano un gradiente di suscettibilità genetica alla patologia. Tali malattie sono, pertanto, nettamente

differenti dai disordini monogenici a trasmissione mendeliana, in cui la mutazione di un singolo gene è causativa e responsabile di gran parte del fenotipo della malattia. Inoltre, è stato chiaramente dimostrato che la familiarità per cardiopatia ischemica è un fattore di rischio largamente indipendente dagli altri fattori di rischio tradizionali, a supporto dell'ipotesi che la componente genetica potrebbe non influenzare il rischio di tale patologia attraverso lo stesso meccanismo già conosciuto per i fattori di rischio tradizionali.

### **Locus genico 9p21 e cardiopatia ischemica**

Recentemente, una nuova metodica di analisi genomica, chiamata "genome-wide association study" ha consentito di identificare una serie di loci genici associati al rischio di infarto miocardico in maniera significativa e riproducibile. Tale metodica, partendo dalla mappatura del genoma umano, ed in particolare dalla mappa degli aplotipi (Haplotype Map) che individua le varianti genetiche (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) più frequentemente e stabilmente presenti nel genoma umano, utilizzando chip che permettono di analizzare sino ad 1.000.000 SNP per ogni individuo, è in grado di individuare piccole regioni del DNA che massimamente si differenziano tra i sani ed i malati. Tuttavia, questi SNP massimamente diversi tra sani e malati non necessariamente costituiscono essi stessi le sequenze genetiche che causano la malattia ma, piuttosto, sono sequenze nucleotidiche ubicate in vicinanza o all'interno della regione genetica che determina la malattia.

Tale approccio di analisi genetica, inoltre, è indipendente da qualsiasi ipotesi aprioristica, consentendo l'identificazione di comuni varianti genetiche, associate ad una determinata patologia, la cui funzione non è ancora nota. In questo modo, tali studi possono essere considerati un utile strumento per migliorare la conoscenza dei meccanismi patogenetici della malattia.

Nel 2007 quattro studi tra loro indipendenti hanno documentato, pressoché contemporaneamente, l'associazione fra alcune varianti genetiche ubicate in "linkage disequilibrium" tra loro nella regione cromosomica 9p21.3 e lo sviluppo di cardiopatia ischemica e infarto miocardico<sup>6-9</sup> (fig. 1). Questi dati, per la prima volta in quest'ambito, sono stati replicati in varie coorti di differente origine etnica<sup>10-15</sup>, a conferma della validità dei risultati ottenuti e validati in una recente metanalisi<sup>16</sup>.

È doveroso ricordare che l'effetto fenotipico delle varianti geniche localizzate nella regione cromosomica 9p21.3 è modesto e la presenza di ciascun allele non incrementa enormemente il rischio di infarto miocardico. Ciò significa che un individuo omozigote ha un incremento del rischio solo del 60% se confrontato con un individuo "wild type", cioè non portatore degli alleli di rischio<sup>17</sup> (fig. 2).

Tuttavia, le varianti genetiche localizzate nella regione cromosomica 9p21.3 sono molto frequenti nella popolazione europea: infatti, in questa popolazione, la probabilità di essere eterozigote è del 50% e la probabilità di essere omozigote è del 25%. Inoltre, questo significa che solo il 25% della popolazione non è portatore delle varianti genetiche associate all'infarto miocardico. Tenendo in considerazione quest'ultimo dato, è facilmente comprensibile che queste varianti genetiche hanno, quindi, un'elevata probabilità di contribuire all'epidemiologia dell'infarto miocardico<sup>17</sup>.

### Meccanismo d'azione del locus genico 9p21

Al momento non è noto il meccanismo mediante il quale le varianti genetiche della regione cromosomica 9p21.3 influenzino il rischio di infarto miocardico e nessuno SNP è risultato essere associato ai fattori di rischio tradi-

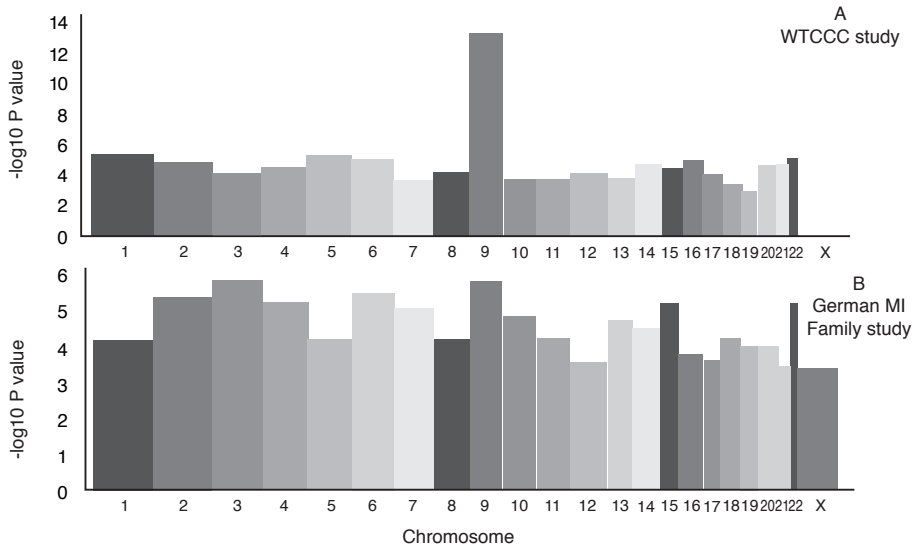


Fig. 1. Varianti genetiche localizzate nella regione cromosomica 9p21.3 e rischio di infarto miocardico. Risultati degli studi genome-wide (da Samani et al, N Engl J Med 2007; 357: 443-53).

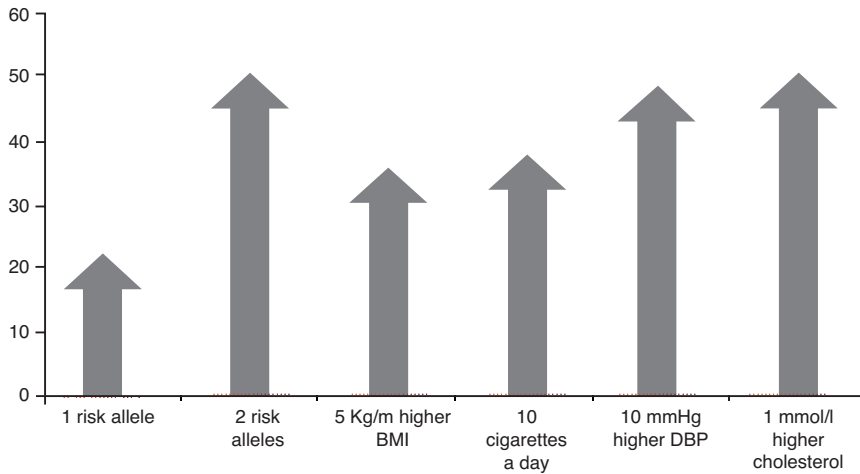


Fig. 2. Entità del rischio conferito dalle varianti genetiche localizzate nella regione cromosomica 9p21 ed entità del rischio conferito dai fattori di rischio tradizionali.

zionali. Dati indiretti suggeriscono che le varianti genetiche localizzate sul cromosoma 9 agiscano promuovendo lo sviluppo e la progressione dell'aterosclerosi coronarica. Horne et al, in uno studio prospettico che valutava l'incidenza di infarto miocardico in una coorte di pazienti con cardiopatia ischemica, non ha rilevato alcuna associazione tra le suddette varianti genetiche e l'incidenza di eventi trombotici acuti, suggerendo la possibilità che queste varianti influenzino piuttosto l'aterosclerosi coronarica e non gli eventi trombotici acuti o l'instabilizzazione di placca<sup>14</sup>.

Tali varianti sono risultate essere associate, inoltre, anche al calcium score, alla presenza di aterosclerosi prematura severa, alla prevalenza di coronaropatia valutata mediante angiografia coronarica, e alla progressione dell'aterosclerosi carotidea<sup>8,15,18-20</sup>. Sono in linea con tali dati anche i risultati dello "Studio Genetico Italiano nell'Infarto Miocardico Giovanile", di prossima pubblicazione. Tale studio, condotto in circa 125 Unità Coronariche italiane, ha rilevato un'associazione significativa tra la variante genetica *rs1333040*, localizzata sul cromosoma 9p21, e la prevalenza di coronaropatia, valutata mediante esame angiografico eseguito al momento dell'ospedalizzazione per l'evento indice, in 1508 pazienti con infarto miocardico giovanile, che si verifica cioè prima dei 45 anni di età. Inoltre la stessa variante ha mostrato un'influenza significativa sulla progressione dell'aterosclerosi nei pazienti che hanno ripetuto l'esame angiografico durante 15 anni di follow-up. La variante *rs1333040* infatti è risultata associata significativamente al rischio di andare incontro a rivascolarizzazione miocardica durante il follow-up, ma non al rischio di re-infarto o di morte (unpublished data).

Oltre all'infarto miocardico e alla cardiopatia ischemica, la regione cromosomica 9p21 è risultata associata anche ad altre patologie tra cui lo stroke, l'arteriopatia obliterante periferica, l'aneurisma dell'aorta addominale e gli aneurismi intracranici<sup>21</sup>.

È plausibile ipotizzare, pertanto, che la regione cromosomica 9p21 sia coinvolta nei processi che regolano il rimodellamento delle pareti vasali, la proliferazione e la senescenza cellulare.

Le varianti geniche associate alla cardiopatia ischemica sono localizzate in una regione di DNA di 58 kilobasi priva di geni codificanti proteine. In tale regione è stata riscontrata solo la presenza di un cluster di geni non codificanti chiamati ANRIL (Antisense noncoding RNA in the INK4 locus), che trascrivono RNA che regola l'espressione di altri geni<sup>22</sup>. ANRIL è espresso in tessuti e cellule coinvolte nel processo aterosclerotico, tra cui le cellule muscolari lisce delle pareti vasali e i monociti. È stato dimostrato che l'espressione di ANRIL a livello dei monociti periferici è ridotta nei pazienti con cardiopatia ischemica, stroke ed aneurisma dell'aorta addominale<sup>23</sup>.

È possibile pertanto ipotizzare che le varianti geniche localizzate nella regione cromosomica 9p21 influenzino la predisposizione alla cardiopatia ischemica mediante un'alterazione dei livelli trascrizionali di ANRIL e che questi, a loro volta, alterino la proliferazione cellulare<sup>24,25</sup>.

Infatti, è noto che la regione cromosomica 9p21 è localizzata in prossimità delle sequenze geniche codificanti per le chinasi ciclina-dipendenti CDKN2A e CDKN2B. La complessa relazione tra la regione cromosomica 9p21 e i geni CDKN2A e CDKN2B è stata elegantemente descritta da Visel et al in un recente studio pubblicato sulla rivista scientifica internazionale

“Nature”. I ricercatori hanno prodotto topi mutanti privi di una regione genica di 70Kb localizzata sul cromosoma 4, corrispondente alla regione cromosomica 9p21 umana, osservando una significativa riduzione nell’espressione dei geni CDKN2A e CDKN2B.

Circa la metà dei topi sviluppava tumori e presentava un incremento di ben due volte della proliferazione in vitro di cellule muscolari lisce aortiche<sup>26</sup> (fig. 3). È plausibile ipotizzare, pertanto, che la ridotta espressione dei geni CDKN2A e CDKN2B, normalmente deputati alla regolazione della proliferazione cellulare, si associ ad un’alterazione della replicazione cellulare, della senescenza e dell’apoptosi, tutti processi correlati all’insorgenza e alla progressione del processo aterosclerotico.

I dati di Visel et al sono stati confermati anche nell’uomo. È stato dimostrato infatti che le placche aterosclerotiche di pazienti omozigoti per la variante genetica *rs1333040* hanno una ridotta espressione dei geni CDKN2A e CDKN2B, confermando l’ipotesi che il locus genico 9p21 influenzi l’insorgenza e la progressione dell’aterosclerosi mediante l’alterazione dei processi di proliferazione cellulare (unpublished data).

### Oltre il cromosoma 9: nuovi loci genici associati alla cardiopatia ischemica

Attualmente sono circa 30 le regioni geniche risultate associate alla cardiopatia ischemica mediante gli studi genome-wide (fig. 4). Tra questi ultimi ricordiamo brevemente i più prestigiosi: lo studio del MIGEN Consortium e il più recente studio del CARDIoGRAM Consortium.

Lo studio genome-wide del MIGEN (Myocardial Infarction Genetics) Consortium, pubblicato sulla prestigiosa rivista internazionale “Nature Gene-

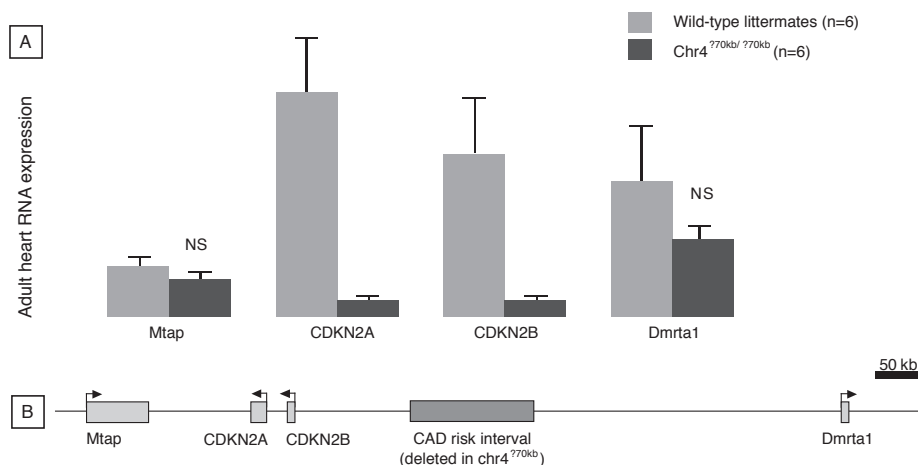


Fig. 3. Effetto delle varianti genetiche localizzate nella regione cromosomica 9p21 sull’espressione di CDKN2a e CDKN2b. Dati prodotti nel topo (da Visel et al, Nature 2010; 464:409-412).

tics”, ha consentito l’identificazione di 9 regioni geniche associate significativamente al rischio di infarto miocardico giovanile; tra queste vi sono sei loci già segnalati, in particolare i loci 1p13, 10q11, 1q11, 19p13, 1p32 e 9p21.3, e tre loci mai descritti in precedenza: 21q22, 6p24 e 2q33. Tale studio ha testato l’associazione tra comuni varianti geniche frequentemente rappresentate nella popolazione e lo sviluppo di infarto miocardico giovanile in 2.967 casi e 3.075 controlli ad essi appaiati, riproducendo i risultati ottenuti anche in popolazioni indipendenti, per un totale di 19.492 individui<sup>27</sup>. Fondamentale per questo studio è stato il contributo apportato dai ricercatori italiani del gruppo Aterosclerosi, Trombosi e Biologia Vascolare (ATVB) coordinato dal dott. Diego Ardissino dell’Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, dalla dott.ssa Piera Angelica Merlini dell’Ospedale Niguarda Cà Granda di Milano, dal dott. Pier Mannuccio Mannucci e dalla dott.ssa Flora Peyvandi della Fondazione Ospedale Maggiore di Milano.

Lo studio del CARDIoGRAM Consortium, mediante l’analisi dei dati genome-wide relativi a 22.233 individui con cardiopatia ischemica e 64.762 controlli sani, ha consentito l’individuazione di 13 nuovi loci genici associati alla cardiopatia ischemica (1p32, 6p21, 6p23, 7q32, 9q34, 10q24, 11q23, 13q34, 14q32, 15q25, 17p11, 17p13, 17q21) oltre alla conferma di 10 loci precedentemente segnalati. La maggior parte dei loci genici individuati sono risultati essere localizzati in regioni non precedentemente correlate all’aterosclerosi, né tantomeno ai fattori di rischio tradizionali (unpublished data).

### Varianti genetiche e predizione del rischio cardiovascolare

Sebbene i dati finora esposti, relativi alla genetica della cardiopatia ische-

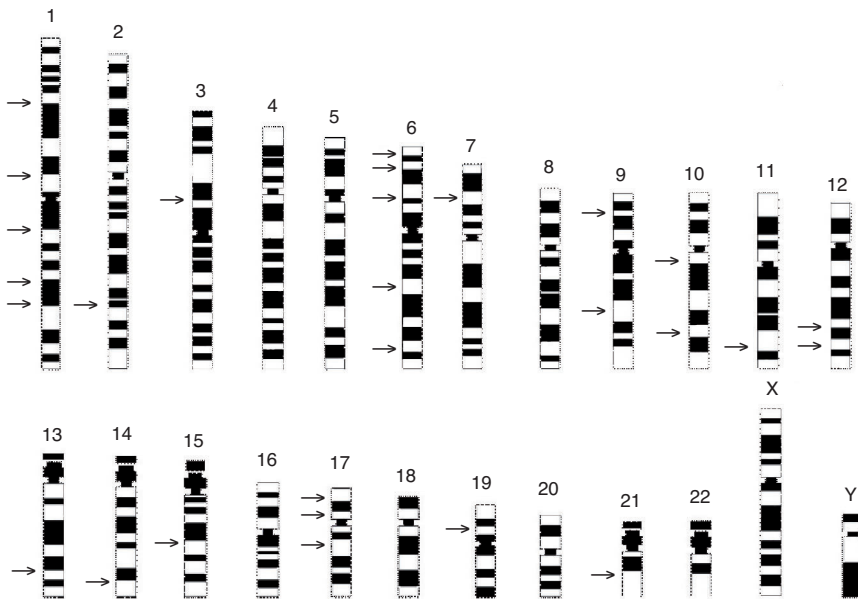


Fig. 4. Loci genici attualmente correlati alla cardiopatia ischemica.

mica, siano rilevanti sul piano scientifico, è attualmente lecito domandarsi se questi abbiano un risvolto clinico e possano essere utilizzati per la predizione del rischio cardiovascolare.

Diversi studi sono stati condotti per valutare il contributo incrementale delle varianti genetiche localizzate nella regione cromosomica 9p21 alla predizione del rischio cardiovascolare rispetto ai soli fattori di rischio tradizionali<sup>28-30</sup>. Tuttavia, sebbene questo locus genico risulti consistentemente associato al rischio di cardiopatia ischemica in tutte le popolazioni studiate, l'integrazione delle informazioni genetiche con i fattori di rischio tradizionali non è riuscita a migliorare significativamente la predizione del rischio. L'utilizzo di un singolo marker genetico è risultato quindi poco utile nella pratica clinica.

Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che la cardiopatia ischemica, in quanto malattia multifattoriale, è causata da interazioni multiple di numerose varianti genetiche relativamente comuni, ognuna con un effetto fenotipico modesto che, interagendo tra loro e con fattori ambientali di rischio, creano un gradiente di suscettibilità genetica alla patologia. Inoltre, sta chiaramente emergendo che le varianti genetiche identificate mediante gli studi di associazione genome-wide, pur essendo molto comuni, considerate singolarmente hanno solo un debole effetto sul rischio di sviluppare malattia e riescono a spiegare solo una modesta frazione dell'ereditabilità totale<sup>31,32</sup>.

È stato quindi ipotizzato che l'aggregazione di numerosi polimorfismi genetici in un singolo score di rischio, combinando il relativamente debole effetto di ogni variante, potesse essere utile per identificare l'aplotipo di rischio e incrementare la probabilità di predire il rischio di cardiopatia ischemica e infarto miocardico.

Sebbene finora siano stati effettuati numerosi sforzi tesi a costruire score di rischio genetici per la predizione del rischio cardiovascolare, i risultati ottenuti non sono stati univoci e hanno ancora scarso impatto clinico<sup>33-36</sup>. In particolare, Kathiresan et al ha riportato che uno score genetico, costituito da 9 polimorfismi associati ai livelli di colesterolo, è risultato significativamente correlato al rischio di eventi cardiovascolari. L'aggiunta di tale score ad un modello di predizione del rischio comprensivo dei fattori di rischio tradizionali non ha incrementato, però, la capacità di predizione. Lo score genetico era tuttavia in grado di consentire la riclassificazione del 26% dei pazienti considerati a rischio cardiovascolare intermedio mediante l'ATP III panel in pazienti a basso o elevato rischio cardiovascolare<sup>33</sup>.

Il limite potenziale di questo approccio potrebbe essere quello di utilizzare, per la costruzione degli score genetici, polimorfismi che agiscono influenzando i fattori di rischio classici. È stato ipotizzato che le varianti genetiche che non agiscono sui fattori di rischio tradizionali abbiano un impatto clinico maggiore, se utilizzate per la costruzione di uno score di rischio. Tuttavia l'uso di uno score costituito da più di 100 varianti, molte delle quali indipendenti dai fattori di rischio classici, non ha migliorato la predizione del rischio cardiovascolare nella coorte prospettica del Women's Menome Health Study<sup>36</sup>.

Ulteriori studi saranno necessari per identificare la combinazione di polimorfismi da inserire in uno score genetico in grado di migliorare la predizione e la stratificazione del rischio rispetto ai fattori di rischio tradizionali. Tali studi dovrebbero essere condotti in popolazioni in cui il peso della componente genetica ed il rischio di eventi siano maggiori, come ad esempio i pazienti

con infarto miocardico giovanile o pazienti in prevenzione secondaria.

Solo in questo modo la conoscenza della base genetica dell'infarto miocardico potrà condurre all'ambizioso obiettivo della medicina personalizzata, vale a dire la medicina modulata sulle specifiche caratteristiche biologiche del singolo individuo.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S *et al.* Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364:937-952
- 2) Murabito JM, Pencina MJ, Nam BH *et al.* Sibling cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults. *JAMA* 2005; 294:3117-23
- 3) Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* 1994; 330:1041-46
- 4) Zdravkovic S, Wienke A, Pedersen NL, Marenberg ME, Yashin AI, De Faire U. Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins. *J Intern Med* 2002; 252:247-54
- 5) Morgan TM, Krumholz HM, Lifton RP, Spertus JA. Nonvalidation of reported genetic risk factors for acute coronary syndrome in a large-scale replication study. *JAMA* 2007; 297:1551-61
- 6) Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, *et al.* Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med* 2007; 357:443-53
- 7) Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, *et al.* A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 2007; 316:1491-3
- 8) McPherson R, Pertsemlidis A, Kavavlar N, *et al.* A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007; 316:1488-91
- 9) Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447:661-78
- 10) Shen GQ, Rao S, Martinelli N, *et al.* Association between four SNPs on chromosome 9p21 and myocardial infarction is replicated in an Italian population. *J Hum Genet* 2008; 53:144-50
- 11) Shen GQ, Li L, Rao S, *et al.* Four SNPs on chromosome 9p21 in a South Korean population implicate a genetic locus that confers high cross-race risk for development of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:360-5
- 12) Schunkert H, Gotz A, Braund P, *et al.* Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease. *Circulation* 2008; 117:1675-84
- 13) Hinohara K, Nakajima T, Takahashi M, *et al.* Replication of the association between a chromosome 9p21 polymorphism and coronary artery disease in Japanese and Korean populations. *J Hum Genet* 2008; 53:357-9
- 14) Horne BD, Carlquist JF, Muhlestein JB, Bair TL, Anderson JL. Association of variation in the chromosome 9p21 locus with myocardial infarction versus chronic coronary artery disease. *Circulation Cardiovascular Genetics* 2008; 1:85-92
- 15) Assimes TL, Knowles JW, Basu A, *et al.* Susceptibility locus for clinical and sub-clinical coronary artery disease at chromosome 9p21 in the multi-ethnic ADVANCE study. *Hum Mol Genet* 2008; 17:2320-8
- 16) Palomaki GE, Melillo S, Bradley LA. Association between 9p21 genomic markers



- and heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 2010; 303:648-56
- 17) *Schunkert H, Erdmann J, Samani NJ*. Genetics of myocardial infarction: a progress report. *Eur Heart J* 2010; 31:918-925
  - 18) *Anderson JL, Horne BD, Kolek MJ, et al*. Genetic variation at the 9p21 locus predicts angiographic coronary artery disease prevalence but not extent and has clinical utility. *Am Heart J* 2008; 156:1155-62
  - 19) *Ye S, Willeit J, Kronenberg F, Xu Q, Kiechl S*. Association of genetic variation on chromosome 9p21 with susceptibility and progression of atherosclerosis: a population-based, prospective study. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52:378-84
  - 20) *Muendlein A, Saely CH, Rhomberg S, et al*. Evaluation of the association of genetic variants on the chromosomal loci 9p21.3, 6q25.1, and 2q36.3 with angiographically characterized coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2009; 205:174-80
  - 21) *Helgadottir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, et al*. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet* 2008; 40 (2):217-24
  - 22) *Broadbent HM, Peden JF, Lorkowski S, et al*. PROCARDIS Consortium. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum Mol Genet* 2008; 17 (6):806-14
  - 23) *Liu Y, Sanoff HK, Cho H et al*. INK4/ARF transcript expression is associated with chromosome 9p21 variants linked to atherosclerosis. *PLoS One* 2009; 4:e5027
  - 24) *Jarinova O, et al*. Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery disease risk locus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29:1671-77
  - 25) *Holdt LM, et al*. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:620-627
  - 26) *Visel A, et al*. Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature* 2010; 464:409-12
  - 27) *Myocardial Infarction Genetics Consortium*. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat Genet* 2009; 41: 334-41
  - 28) *Paynter NP, Chasman DI, Buring JE et al*. Cardiovascular disease risk prediction with and without knowledge of genetic variation at chromosome 9p21.3. *Ann Intern Med* 2009; 150:65-72
  - 29) *Brautbar A, Ballantyne M, Lawson K et al*. Impact of adding a single allele in the 9p21 locus to traditional risk factors on reclassification of coronary heart disease risk and implications for lipid-modifying therapy in the atherosclerosis risk in communities study. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2(3):279-85
  - 30) *Talmud PJ, Cooper JA, Palmen J et al*. Chromosome 9p21.3 coronary heart disease locus genotype and prospective risk of CHD in healthy middle-aged men. *Clin Chem* 2008; 54(3):467-474
  - 31) *Feero WG, Guttmacher AE*. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 2010; 363:166-76
  - 32) *Humphries S, Drenos F, Ken-Dror G, Talmud PJ*. Coronary heart disease risk prediction in the era of genome-wide association studies. *Circulation* 2010; 121:2235-48
  - 33) *Kathiresan S, Melander O, Anevski D, et al*. Polymorphism associated with cholesterol and risk of cardiovascular events. *N Engl J Med* 2008; 358:1240-9
  - 34) *Morrison AC, Bare LA, Chambless LE et al*. Prediction of coronary artery disease risk using a genetic risk score: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 2007; 166:28-35
  - 35) *Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I et al*. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat Genet* 2009; 41:47-55
  - 36) *Paynter NP, Chasman DI, Parè G et al*. Association between a literature-based genetic risk score and cardiovascular events in women. *JAMA* 2010; 303:631-7