

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Kardiologie
Direktor: Prof. Dr. B. Maisch
Arbeitsgruppe Präventive Kardiologie: Prof. Dr. J. Schäfer
des Fachbereichs der Philipps-Universität Marburg

In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Untersuchungen zur Assoziation von Polymorphismen in regulatorischen Elementen der Lipoproteinlipase und des Apolipoprotein E mit KHK und Triglyzerid-Stoffwechsel

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Johanna Kristina Schell
aus Bonn

Marburg 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Phillips-Universität Marburg am: 13.09.2011
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referent:	Prof. Dr. Jürgen Schäfer
1. Korreferent:	PD Dr. Nockher

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Atherosklerose und Koronare Herzkrankheit.....	1
1.1.1	Bedeutung der Atherosklerose	1
1.1.2	Risikofaktoren der Koronaren Herzkrankheit.....	1
1.1.3	Triglyzeride als eigenständiger Risikofaktor	3
1.1.4	Pathogenese der Atherosklerose und Einfluss der Triglyzeride.....	3
1.2	Lipoproteine und Apolipoproteine.....	6
1.2.1	Übersicht über die menschlichen Lipoproteine und Apolipoproteine.....	6
1.2.2	Apolipoprotein E (Apo E).....	9
1.3	Enzyme und Rezeptoren.....	11
1.3.1	Enzyme und Rezeptoren des Lipidstoffwechsels	11
1.3.2	VLDL-Rezeptor	13
1.3.3	Lipoproteinlipase (LPL)	13
1.4	Stoffwechsel der Lipoproteine	16
1.4.1	Der exogene Lipidtransportweg (Chylomikronen-Stoffwechsel)	17
1.4.2	Der endogene Lipidtransportweg (VLDL-, LDL-Stoffwechsel)	19
1.4.3	Der reverse Cholesterintransport (HDL-Stoffwechsel).....	20
1.5	Die Marburger KHK-Präventions-Allianz	21
2	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	22
3	Material und Methoden.....	24
3.1	Verwendete Materialien	24
3.1.1	Geräte.....	24
3.1.2	Reagenzien.....	25
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	26
3.1.4	Standardpuffer und Lösungen.....	27
3.1.5	Software.....	28
3.2	Verwendete Methoden.....	28
3.2.1	DNA-Isolierung.....	29
3.2.2	Polymerase Chain Reaction (PCR)	30
3.2.3	Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE).....	33
3.2.4	Mutationsdetektion, Sequenzierung	37
3.3	Statistische Auswertung.....	38
4	Ergebnisse	40
4.1	Studiendesign	40
4.2	Untersuchte Sequenzen	40
4.2.1	Apolipoprotein E (Apo E).....	40

4.2.2	Lipoproteinlipase (LPL)	42
4.3	PCR	44
4.3.1	Primerdesign	44
4.3.2	Bestimmung der optimalen PCR-Bedingungen	45
4.3.3	Amplifizierung der Fragmente	46
4.4	DGGE	48
4.4.1	Schmelzkurven der untersuchten Fragmente	48
4.4.2	Bestimmung der optimalen DGGE-Bedingungen	50
4.4.3	DGGE der einzelnen Fragmente	52
4.5	Identifizierte Mutationen	53
4.5.1	Mutationen in regulatorischen Elementen von Apo E	54
4.5.2	Mutationen im Promotor der Lipoproteinlipase	55
4.6	Statistische Auswertung	56
4.6.1	Verteilung der untersuchten Parameter im Kollektiv	57
4.6.2	Mutation -95G/T des Promotors der Lipoproteinlipase	58
4.6.3	Mutation -93T/G des Lipoproteinlipase-Promotors	67
5	Diskussion	76
5.1	Ursachen für erhöhte Triglyzeride	76
5.2	Genregulatorische Elemente von Apolipoprotein E	76
5.2.1	Apo E, Hepatic Control Region 1	77
5.2.2	Apo E, Hepatic Control Region 2	79
5.2.3	Apo E, Multienhancer 1	80
5.2.4	Apo E, Multienhancer 2	82
5.2.5	Polymorphismus Apo E2, E3, E4	84
5.3	Promotor der Lipoproteinlipase	85
5.3.1	vorbeschriebene SNPs	85
5.3.2	Mutation -95G/T des Lipoproteinlipase Promotors	87
5.3.3	Mutation -93T/G des Lipoproteinlipase Promotors	89
5.3.4	Funktionen der Lipoproteinlipase, Wirkung in verschiedenen Geweben und Beeinflussung durch gefundene SNPs	95
5.4	Schlussfolgerung	96
6	Zusammenfassung	98
7	Abstract	100
8	Literaturverzeichnis	102
9	Anhang	113
9.1	Abkürzungsverzeichnis	113
9.2	Abbildungsverzeichnis	115

9.3	Tabellenverzeichnis	116
9.4	Verzeichnis der akademischen Lehrer	118
9.5	Danksagungen.....	118

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose und Koronare Herzkrankheit

1.1.1 Bedeutung der Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen als Folge von Atherosklerose sind die Haupttodesursache in der westlichen Welt (World Health Organization, 2004). Zu ihnen zählen die koronare Herzkrankheit (KHK) und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) sowie cerebrale und viszerale Durchblutungsstörungen. In Deutschland starben 2009 356.462 Menschen an Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems (knapp 42% der Todesfälle). Da es sich hierbei v.a. um Erkrankungen älterer Menschen handelt, waren bedingt durch die höhere Lebenserwartung von Frauen rund 58% der Betroffenen weiblich. 60.153 Menschen starben durch einen akuten Myokardinfarkt, hierbei handelte es sich in ca. 56% der Fälle um Männer und nur in 44% um Frauen (Statistisches Bundesamt, 2009).

1.1.2 Risikofaktoren der Koronaren Herzkrankheit

Die Bedeutung für und der Einfluss verschiedener Risikofaktoren auf die Entstehung der Atherosklerose und besonders der KHK wurde in zahlreichen epidemiologischen Langzeit-Studien untersucht.

Für die vermutlich bedeutendste Studie in diesem Zusammenhang, die Framingham-Studie, wurden in der amerikanischen Kleinstadt Framingham 1948 über 5000 Männer und Frauen im Alter zwischen 32 und 60 Jahren rekrutiert, die bis heute kontinuierlich gesundheitlich überwacht werden (Dawber et al., 1951). 1971 und 2002 wurden zahlreiche Kinder und Enkel der ursprünglichen Kohorte ebenfalls in die Studie aufgenommen.

1979 wurde in Deutschland ein ähnliches Projekt gestartet, die multizentrische PROCAM-Studie (Prospective Cardiovascular Münster-Studie), in die bis heute über 50.000 Menschen aus der Umgebung um Münster eingeschlossen wurden. Eine weitere großangelegte Studie mit deutschen Teilnehmern zu dieser Fragestellung ist das WHO MONICA Projekt in der Region um Augsburg (Hense et al., 2003).

Aus den Daten dieser und anderer Studien lassen sich folgende Risikofaktoren ableiten, die in nicht-beeinflussbare und beeinflussbare Risikofaktoren unterteilt wer-

den können (Castelli et al., 1986; Assmann et al., 1997; Grundy et al., 1998; Grundy et al., 2000; Yusuf et al., 2004):

Nicht beeinflussbare Risikofaktoren:

- familiäre Disposition
- Lebensalter
- männliches Geschlecht

Etablierte beeinflussbare Risikofaktoren:

- erhöhtes Gesamt-Cholesterin, erhöhtes LDL-Cholesterin
- erniedrigtes HDL-Cholesterin
- erhöhte Triglyzeride
- arterielle Hypertonie
- Rauchen
- Diabetes mellitus

Weitere potenzielle Risikofaktoren, deren Bedeutung derzeit weiter untersucht wird:

- Adipositas
- hoher Lipoprotein (a)- Plasmaspiegel
- genetische Polymorphismen
- psychosoziale Faktoren
- Alkoholkonsum
- Ernährung
- körperliche Inaktivität
- Hyperhomocysteinämie
- Hyperfibrinogenämie
- Fibrinogen, CRP
- Menopause

Durch Kombination verschiedener Risikofaktoren miteinander wird das Risiko zusätzlich erhöht, zum Teil potenzieren sich die Faktoren. Besonders bei den zuletzt genannte Risikofaktoren wird zur Zeit weiter untersucht, in wie weit sie als unabhängige Risikofaktoren zu werten sind beziehungsweise einfach zur Potenzierung der beschriebenen Hauptfaktoren beitragen (Grundy et al., 2000).

1.1.3 Triglyzeride als eigenständiger Risikofaktor

Während erhöhte Cholesterinspiegel aufgrund der eindeutigen Studiendatenlage seit langer Zeit als unabhängige Risikofaktoren für Koronare Herzerkrankungen akzeptiert sind und insbesondere die Rolle des LDL-Cholesterins in der Pathogenese der Atherosklerose gut untersucht ist (s. dazu 1.1.4), gibt es über die Bedeutung von Triglyzeriden als unabhängige Risikofaktoren geteilte Meinungen. Zahlreiche epidemiologische Studien haben jedoch auch einen Zusammenhang zwischen sowohl Nüchtern- als auch Nicht-Nüchtern-Triglyzeridwerten und dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen gezeigt (Austin, 1991; Kannel und Vasan, 2009). Erhöhte Triglyzeride sind über verschiedene pathophysiologische Mechanismen häufig mit Veränderungen im restlichen Lipidprofil wie einem erhöhtem LDL-Cholesterin oder erniedrigtem HDL assoziiert (Austin et al., 1990) und beeinflussen damit unbestrittene Risikofaktoren.

Einige durchgeführte epidemiologische Studien konnten zudem zeigen, dass erhöhte Triglyzeridspiegel einen unabhängigen Risikofaktor zumindest für einige Subgruppen ihres Kollektivs darstellen (Castelli, 1992; Assmann et al., 1996; Jeppesen et al., 1998). In anderen Kollektiven ist dieser Einfluss nach Verrechnung mit anderen Risikofaktoren jedoch nicht nachweisbar (Criqui et al., 1993; Menotti et al., 1994; Iso et al., 2001).

Daneben gibt es unbestritten Krankheiten, die sich durch deutlich erhöhte Triglyzeride auszeichnen und mit einem stark erhöhten Atherosklerose-Risiko einhergehen, wie z.B. die Typ III-Hyperlipidämie nach Fredrickson (Utermann et al., 1977; Mahley et al., 1999).

1.1.4 Pathogenese der Atherosklerose und Einfluss der Triglyzeride

Definition und Einteilung der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist charakterisiert durch eine variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus fokaler Akkumulation von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, fibrösem Gewebe sowie Kalzium-Ablagerungen, und Veränderungen der Media großer und mittlerer Arterien (World Health Organization, 1958). Pathophysiologisch handelt es sich dabei um ein kom-

plexes Zusammenspiel von Endothelzellen, Monozyten, T-Lymphozyten, glatten Muskelzellen, Thrombozyten, LDL-Partikeln, Zytokinen, Chemokinen, Entzündungsmediatoren u.v.m. (Ross, 1993; Libby, 2000; Libby, 2002).

Pathophysiologische Mechanismen

Die "Response-to-injury" Hypothese besagt, dass bestimmte Risikofaktoren (s. o.) zu einer endothelialen Dysfunktion führen (Ross und Glomset, 1976a; Ross und Glomset, 1976b; Ross, 1986). An diesen Stellen gelangen LDL-Partikel abhängig von ihrem Plasmaspiegel durch das Endothel in den subendothelialen Raum (Goldstein und Brown, 1977), wo sie chemischen Veränderungen wie z.B. Oxidierungen unterliegen (Steinbrecher et al., 1984), die toxisch auf die umgebenden Zellen wirken können (Hessler et al., 1983), daneben sind auch zahlreiche nicht-oxidative chemisch-enzymatische Modifikationen beschrieben (Klouche et al., 2000). Die Bedeutung dieser Entzündungsreaktion in der Entwicklung der Atherosklerose wird zunehmend deutlicher (Libby, 2002; Libby et al., 2009).

Entzündungsmediatoren wie IL-1 β oder TNF- α tragen zur Ausbildung von Adhäsionsmolekülen für Monozyten, wie z.B. VCAM-1, P- und E-Selektin, auf Endothelzellen bei (Dong et al., 1998; Collins und Cybulsky, 2001). Verschiedene Chemokine, unter ihnen Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (Gu et al., 1998), IFN-induziertes-T-Cell- α -Chemoattractant (I-TAC) (Mach et al., 1999) sowie Eotaxin (Haley et al., 2000) führen zur Ansammlung von Monozyten und T-Lymphozyten in prädisponierten Bereichen. Monozyten differenzieren sich in der Intima zu Makrophagen und nehmen über Scavenger-Rezeptoren unkontrolliert modifiziertes LDL auf (Krieger und Herz, 1994; Stary, 1995). Es entstehen Schaumzellen, ein Hauptcharakteristikum der atherosklerotischen Plaques. Von den T-Lymphozyten ausgeschüttete Zytokine verstärken die Entzündungsreaktion, es entstehen "fatty-streaks".

Wachstumsfaktoren wie Platelet-Derived-Growth-Factor PDGF regen glatte Muskelzellen der Media zum Wachstum und zur Migration in die Intima an (Ross, 1993). Dort bilden sie Kollagenfasern, die sich zusammen mit den dort befindlichen Zellen zu der fibrösen Kappe des Plaques entwickeln. Unterhalb der Kappe befindet sich ein Kern aus abgestorbenen Schaumzellen und frei gesetzten Lipiden.

Während man früher davon ausging, dass es durch kontinuierliches Plaque-Wachstum zu Stenosierung der Gefäße bis zum Verschluss und damit zu Durchblutungsstörungen bis hin zum Infarkt kommt, setzt sich heute zunehmend die Er-

kenntnis durch, dass die meisten Stenosen und Verschlüsse durch plötzliche Plaque-Rupturen zustande kommen (Libby, 2002).

Besonders gefährdet sind dabei Plaques mit einer verdünnten fibrösen Kappe, einem großen Lipidpool und vielen Makrophagen. Entzündungsmediatoren wie IFN- γ können die Stabilität des Plaques beeinträchtigen und damit eine Ruptur erleichtern (Amento et al., 1991; Libby, 2009). Durch Ruptur der fibrösen Kappe kommt es zur Freilegung der Schaumzellen, die unter anderem Tissue-Factor auf ihrer Oberfläche präsentieren, so dass es bei Kontakt mit Thrombozyten zur Thrombosierung und zum Gefäßverschluss kommt. Nach Auflösung des Thrombus (natürlich oder durch Medikamente) kommt es zum Heilungsprozess, die fibröse Kappe verschließt sich wieder, durch Narbenbildung wird der Plaque allerdings häufig größer als zuvor.

Triglyzeride und Atherosklerose

Über die Beeinflussung etablierter unabhängiger Risikofaktoren, v.a. des LDL-Cholesterins, hinaus können Triglyzeridreiche Lipoproteine (TRL) über verschiedene pathophysiologische Mechanismen direkt zur Entstehung der Atherosklerose beitragen. Unter dem Begriff TRL werden folgende Lipoproteine zusammengefasst: VLDL und Chylomikronen sowie ihre jeweiligen Remnants (Remnant lipoproteins, RLP), die bei der Triglyzerid-Hydrolyse durch die Lipoproteinlipase entstehen (Fujioka und Ishikawa, 2009; Kannel und Vasan, 2009). Besonders atherogen scheinen dabei die RLPs zu wirken (Kawakami et al., 2001)

TRL können wie LDL-Partikel die Arterienwand durchdringen und werden in menschlichen atherosklerotischen Plaques gefunden (Rapp et al., 1994). Sie scheinen u.a. mitbeteiligt zu sein an der endothelialen Dysfunktion (Kugiyama et al., 1998) und Apoptose von Endothelzellen (Kawasaki et al., 2000; Hufnagel et al., 2005), sowie der Proliferation glatter Muskelzellen (Kawakami et al., 2003). Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden hier nur beispielhaft einige Mechanismen aufgezeigt: In vitro führen sie zu erhöhter Expression verschiedener an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligter Moleküle wie MCP-1 (Maeno et al., 2000; Domoto et al., 2003), VCAM-1 (Doi et al., 2000), Tissue-Factor (Doi et al., 2000), IL-1 β (Okumura et al., 2006) und CD40 (Kamemura et al., 2006).

All diese und noch viele weitere Pathomechanismen sind zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung, mit dem Ziel, neue Ansätze in der Therapie der Atherosklerose zu entwickeln.

Lipoproteinlipase und Atherosklerose

Die mögliche proatherogene Wirkung der Lipoproteinlipase ist schon seit vielen Jahren im Fokus der Aufmerksamkeit (Zilversmit, 1973). In atherosklerotischen Plaques wird Lipoproteinlipase von einem Teil der Makrophagen und glatten Muskelzellen gebildet (Yla-Herttuala et al., 1991), dabei wird die Expression unter anderem durch oben beschriebene Cytokine reguliert (Mead et al., 1999). Durch Hydrolyse der TG-reichen Lipoproteine kommt es lokal zu hohen Konzentrationen von RLPs, dies erleichtert den Einstrom in die Endothelwände. Zusätzlich wird durch die entstehenden Produkte TRL und freie Fettsäuren (FFS) die Permeabilität der Endothelwände verändert und ein Eindringen erleichtert (Eiselein et al., 2007). In vitro werden LDL und VLDL durch die Lipoproteinlipase in der subendothelialen Matrix zurückgehalten, vermutlich durch Bindung an Proteoglykane (Saxena et al., 1992). Durch chemische Modifizierung der Lipoproteine entwickeln diese dann direkt vor Ort atherogene Wirkung (s.o.).

In atherosklerotischen Läsionen hat die LPL damit am ehesten proatherogene Wirkung, während sie im restlichen Gefäßbett durch effektive Senkung des Triglyzerid-Spiegels neutrale bis anti-atherogene Wirkung entfaltet (Mead et al., 1999).

1.2 Lipoproteine und Apolipoproteine

1.2.1 Übersicht über die menschlichen Lipoproteine und Apolipoproteine

Bedingt durch ihre Wasserunlöslichkeit können Lipide nicht frei im menschlichen Plasma zirkulieren, ihr Transport erfolgt daher in sogenannten Lipoproteinen. Diese bestehen aus einem lipophilen Kern aus Cholesterinestern und Triglyzeriden und einer hydrophilen Hülle aus amphipatischen Phospholipiden, freiem Cholesterin und Apolipoproteinen. Die Einteilung der Lipoproteine erfolgt meist nach ihrer vom Lipidanteil abhängigen Dichte, alternativ auch nach ihrer Mobilität im elektrischen Feld.

In Tabelle 1 sind die physikochemischen Eigenschaften der Lipoproteine aufgezeigt.

Tabelle 1: Einteilung und Eigenschaften der Plasmalipoproteine, modifiziert nach (Richter und von Eckardstein, 2006)

Lipoprotein	Elektrophorese (Mobilität)	Dichte g/ml	Masse (MDa)	Größe (nm)	Apolipoproteine
Chylomikronen	keine	< 0,9	< 150	75-1200	A-I, A-IV, B-48, C-I, C-II, C-III, E
HDL ₂	α	1,063-1,125	0,36	9-12	A-I, A-II, A-IV, A-V, C-I, C-II, C-III, M, E
HDL ₃		1,125-0,21	0,20	5-9	
VLDL	prä-β	< 1,006	5-130	30-80	A-V, B-100, C-I, C-II, C-III, E
Lp(a)	prä-β ₁	1,051-1,082	5,5	25-30	B-100, (a)
IDL	broad-β	1,006-1,019	3,5	25-35	B-100, C-III, E
LDL	β	1,019-1,063	2,5	18-25	B-100

Jede Lipoproteinklasse enthält neben Apolipoproteinen einen charakteristischen Lipidanteil. Chylomikronen und VLDL sind Triglyzeridreiche Lipoproteine, in LDL und HDL hingegen überwiegen Cholesterin und Phospholipide. Tabelle 2 zeigt die Lipidzusammensetzung der Lipoproteine.

Tabelle 2: Lipidzusammensetzung der Plasmalipoproteine in % (Richter und von Eckardstein, 2006)

	Lipid-gehalt	Phospho-lipide	freies Cho-lesterin	Cholesterin-Ester	Triglyzeride
Chylomikronen	98	5	1,5	1,5	90
VLDL	90	16	7	13	54
IDL	83	20	9	34	30
LDL	77	21	11	41	4
HDL ₂	58	35	13	13	5
HDL ₃	44	23	3	15	3

Apolipoproteine sind wichtige Bestandteile der Hülle der Lipoproteine, neben ihrer stabilisierenden Funktion und der Vermittlung der Löslichkeit der Lipoproteine im Blut haben sie zahlreiche weitere Aufgaben wie z.B. die Bindung an spezifische Lipoproteinrezeptoren und Interaktionen mit anderen Lipoproteinen.

Eine kurze Übersicht über die wichtigsten menschlichen Apolipoproteine gibt Tabelle 3.

Tabelle 3: Übersicht über die wichtigsten menschlichen Apolipoproteine modifiziert nach (Richter und von Eckardstein, 2006; Kostner et al., 2006)

Apoli- poprotein	Vorkommen	Syntheseort	Funktion
A-I	HDL	Leber, Darm	Strukturprotein, Aktivierung der LCAT, Bindung an den HDL-Rezeptor, Prosta-zyklin-Stabilisierung
A-II	HDL	Leber	Aktivierung der hepatischen Triglyzeridli-pase?
A-IV	HDL, CM	Darm	Aktivierung der LCAT
A-V	VLDL, HDL	Leber	Aktivierung der hepatischen Triglyzeridli-pase
B-100	CM, VLDL, IDL, LDL	Leber	Hauptligand des LDL-Rezeptors, Struktur-protein, Sekretion von Triglyzeriden und Cholesterin aus Leber und Dünndarm, Aktivierung Lysolecithin-Acetyltransferase
B-48	CM, VLDL	Darm	Strukturprotein der CM, Bindung an LRP, Resorption von Lipiden und lipidlöslichen Vitaminen aus der Nahrung
C-I	HDL, CM, VLDL	Leber	Aktivierung der LCAT, Unterdrückung der Bindung naszierender Lipoproteine an den LDLR und LRP
C-II	CM, VLDL	Leber	Aktivierung der LPL
C-III	HDL, CM, VLDL	Leber	Inhibitor der LPL, Interferenz mit Lipopro-teinen an Leberrezeptoren
C-IV	VLDL, HDL	Leber?	Erhöhung Plasmatriglyzeride
D (= A-IV)	HDL, VLDL	Leber	Aktivierung und Stabilisierung der LCAT
E	HDL, IDL, CM, VLDL	Leber	Ligand des LDL-/VLDL-Rezeptors und LRP, Ausschleusung von Cholesterin aus peripheren Zellen, wichtig für intrazerebra-len Cholesterin-Stoffwechsel

Apoli- poprotein	Vorkommen	Syntheseort	Funktion
(a)	HDL, LDL, Lp(a)	Leber	Funktion noch unklar, Sequenzhomologie mit Plasminogen
M	HDL	Leber, Niere	Bildung von pre- β -HDL, Cholesterinefflux

1.2.2 Apolipoprotein E (Apo E)

Funktionen des Apolipoprotein E

Apolipoprotein E ist als wichtiges Strukturprotein Bestandteil der Lipoproteine VLDL, IDL, HDL sowie Chylomikronen und vermittelt deren Bindung an die LDL-Rezeptor-Familie, nämlich den LDL-Rezeptor, das LRP (LDL-Rezeptor-related-protein) und den VLDL-Rezeptor (s.u.). Dadurch ist es am Lipidtransport einerseits zwischen Zellen verschiedener Gewebe, andererseits innerhalb eines Gewebes beteiligt und hat somit sowohl endokrine als auch parakrine bzw. autokrine Wirkung (Mahley, 1988). Neben seiner Schlüsselfunktion beim Lipidtransport spielt Apo E eine wichtige Rolle bei kognitiven Funktionen, im Immunsystem, bei der Regeneration peripheren Nervengewebes, bei der Entwicklung der Alzheimerschen Erkrankung sowie vermutlich auch bei Infektionskrankheiten (Mahley und Rall, Jr., 2000).

Genetik, Struktur und Vorkommen von Apolipoprotein E

Das Gen des Apolipoprotein E liegt auf Chromosom 19 in einem Cluster mit den Genen für Apo C-I, C-II, C-IV sowie einem Apo C-I Pseudogen (Scott et al., 1985; Allan et al., 1995a), ist ca. 3,6 kb lang und enthält 4 Exons. 299 Aminosäuren bilden das fertige Protein, das aus 2 unterschiedlichen Domänen besteht: der aminoterminalen Teil ist für die Rezeptor-Bindung, das carboxyterminale Ende für die Lipoprotein-Bindung verantwortlich (Mahley, 1988). Hauptsynthesort für Apo E ist die Leber, aber auch die meisten anderen Gewebe können Apo E synthetisieren, darunter die Niere, die Nebennieren, die Muskulatur, Gliazellen sowie Adipozyten und Makrophagen (Basu et al., 1981; Zechner et al., 1991).

Apolipoprotein E-Polymorphismus

Das Enzym Apo E existiert in mehreren Isoformen mit unterschiedlichen Auswirkungen auf die Plasmalipid-Spiegel, siehe dazu 5.2.5 (Utermann et al., 1977). Die 3 Hauptformen werden durch 3 Allele kodiert, das Wildtyp-Allel ist Apo E3, Apo E2 und E4 unterscheiden sich jeweils in einer Base und dadurch in einer Aminosäure. Bei Apo E2 befindet sich an Position 158 ein Cystein statt einem Arginin, bei Apo E4 an Position 112 ein Arginin statt einem Cystein (Weisgraber et al., 1981).

Apo E3 ist in allen bislang untersuchten Bevölkerungsgruppen weltweit das häufigste Allel, in Populationen europäischer Abstammung beträgt seine Frequenz ca. 77-78%, gefolgt von Apo E4 mit ca. 15% und Apo E2 mit 7-8% (Davignon et al., 1988; Burman et al., 2009). Aus den 3 Allelen ergeben sich 6 Phänotypen, 3 homozygote und 3 heterozygote, mit folgenden Häufigkeiten: 1% E2/2, 13% E2/3, 2% E2/4, 59% E3/3, 22% E3/4, 3% E4/4 (Richter und von Eckardstein, 2006).

Genregulatorische Elemente von Apolipoprotein E

Schon seit ca. 20 Jahren ist bekannt, dass spezielle genregulatorische Elemente für die Expression von Apo E in bestimmten Organen verantwortlich sind (Simonet et al., 1991). In der Leber wird die Apo E-Synthese durch sog. Hepatic Control Regions (HCR) kontrolliert, in Makrophagen und Adipozyten lenken sog. Multienhancer (ME) die Expression (Zannis et al., 2001).

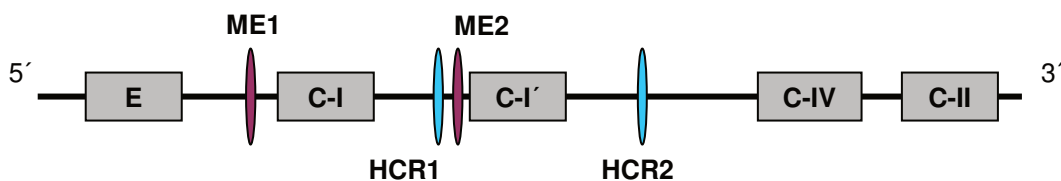


Abbildung 1: Apo E Gen Cluster, modifiziert nach (Shih et al., 2000)

Simonet et al wiesen nach, dass es durch Interaktionen der Hepatic Control Region 1 (HCR1) mit Enhancer-Elementen im Apo E Promotor zu starker Synthese von Apo E in der Leber kam. Ohne HCR1 war keine Expression nachweisbar, der Beweis dafür, dass der Promotor nicht allein für die gewebsabhängige Expression verantwortlich sein konnte. Da es ohne Promotor aber auch zu keiner Expression kam, scheint dieser für die Transkriptionsaktivierung zuständig zu sein (Simonet et al., 1993). HCR1 befindet sich ca. 19 kb downstream des Apo E Promotors. Es enthält

mehrere Bindungsstellen für Proteine z.B. aus der Familie der HNF3 und HNF4-Transkriptionsfaktoren (Dang et al., 1995) sowie multiple TGTTTGC-Motive, die auch in anderen Promotoren und Enhancern von Genen zu finden ist, die ebenfalls bevorzugt in der Leber exprimiert werden.

Eine weitere Hepatic Control Region (HCR2) befindet sich 10 kb downstream von HCR1 und ist zu ca. 86% homolog zu dieser, s. 4.2.1 (Allan et al., 1995b). Beide Regionen können unabhängig voneinander die Expression aller Gene des Clusters steuern, HCR1 scheint dabei vorrangig für Apo E und Apo C-I verantwortlich zu sein, HCR2 eher für Apo C-II und Apo C-IV (Zannis et al., 2001).

Die beiden Multienhancer ME1 und ME2 befinden sich 3,3 kb bzw. 15,9 kb downstream von Apo E. Sie sind zu 95% homolog (s. 4.2.1) und verantwortlich für die Steuerung der Expression von Apo E in reifen Makrophagen und Adipozyten (Shih et al., 2000). Sie enthalten u.a. Bindungsstellen für den Glucokortikoid-Rezeptor (GR), den Transkriptionsfaktor Liver-X-Rezeptor (LXR), sowie für Mitglieder der Transkriptionsfaktorfamilie der CAAT-element-binding proteins (C/EBP). Sowohl GR als auch C/EBP spielen in der Entwicklung und Reifung von Makrophagen und Adipozyten wichtige Rollen. Der LXR hat eine wichtige regulatorische Rolle bei zahlreichen Genen des Lipidstoffwechsels (Edwards et al., 2002), unter anderem als Schlüsselfunktion in der Kontrolle des Cholesterinhaushaltes in Makrophagen (Laffitte et al., 2001).

1.3 Enzyme und Rezeptoren

1.3.1 Enzyme und Rezeptoren des Lipidstoffwechsels

Am Lipidstoffwechsel sind eine ganze Reihe von Enzymen und Rezeptoren beteiligt. Die nachfolgenden Tabellen 4 und 5 geben eine kurze Übersicht über die wichtigsten Schlüsselenzyme und Rezeptoren, im Rahmen der Erläuterungen des Lipoproteinstoffwechsels in Kapitel 1.4 erfolgt eine genauere Darstellung der Zusammenhänge.

Tabelle 4: Enzyme im Lipoproteinstoffwechsel (Richter und von Eckardstein, 2006)

Enzym	Hauptfunktion
Lipoproteinlipase (LPL)	Hydrolyse von Triglyceriden aus Chylomikronen und VLDL
Hepatische Triglyceridlipase (HL)	Konversion von IDL zu LDL sowie von HDL ₂ zu HDL ₃ durch Hydrolyse von Triglyceriden und Phospholipiden
endotheliale Lipase (EL)	Hydrolyse von Phospholipiden und Triglyceriden aus HDL, wichtige Funktion im HDL-Katabolismus.
Lecithin-Cholesteryl-Acyl-Transferase (LCAT)	Veresterung von freiem Cholesterin mit Fettsäuren aus Lecithin
Cholesterin-Transferprotein (CETP)	Transport von Cholesterinestern aus HDL zu VLDL und LDL, Triglyceridtransport in umgekehrter Reihenfolge
Phospholipid-Transferprotein (PLTP)	Übertragung von Phospholipiden von Remnant-Lipoproteinen, Beteiligung an Remodellierung von HDL

Tabelle 5: Rezeptoren im Lipoproteinstoffwechsel (Richter und von Eckardstein, 2006)

Rezeptor	Hauptaufgabe
LDL-Rezeptor	Aufnahme ApoB- und ApoE-haltiger Lipoproteine in allen Geweben
VLDL-Rezeptor	Aufnahme ApoE-haltiger Lipoproteine in Muskulatur und Fettgewebe
LDL-Rezeptor-related Protein (LRP)	Aufnahme von Chylomikronen-Remnants in der Leber
Scavenger-Rezeptor A	Aufnahme von modifiziertem und oxidiertem LDL durch Makrophagen
Scavenger-Rezeptor B-1	Aufnahme von HDL in die Leber
ATP-bindender Kassettentransporter 1 (ABCA1)	Ausschleusung von überschüssigem unverestertem Cholesterin aus Zellen zur Übertragung auf Pre-β-HDL
ABCG 5/8	Ausschleusung von pflanzlichen Phytosterolen aus den Enterozyten zurück ins Darmlumen

1.3.2 VLDL-Rezeptor

Der zur Familie der LDL-Rezeptoren gehörende VLDL-Rezeptor (VLDLR) wurde erstmals 1992 beschrieben (Takahashi et al., 1992). Das Gen des VLDL-Rezeptors ist auf Chromosom 9 lokalisiert, besteht aus 19 Exons und umfasst insgesamt ca. 40kb. Der Rezeptor besteht aus 846 Aminosäuren und weist wie alle Mitglieder der LDL-Familie eine charakteristische Struktur mit 5 funktionellen Domänen auf (Sakai et al., 1994). Der VLDL-Rezeptor wird vornehmlich in Muskel-, Herz- und Fettgewebe exprimiert und an der Endotheloberfläche kleiner Arteriolen sowie Kapillaren dieser Gewebe gefunden, in atherosklerotischen Läsionen produzieren auch Makrophagen sowie glatte Muskelzellen VLDL-Rezeptoren (Takahashi et al., 2004). Seine Hauptaufgabe besteht in der Versorgung von Muskel- und Fettgewebe mit freien Fettsäuren (Yamamoto et al., 1993). Dazu bindet er ApoE-haltige Lipoproteine wie VLDL, IDL und Chylomikronen in Zusammenarbeit mit der Lipoproteinlipase und ermöglicht ihre Hydrolyse mit nachfolgender Aufnahme der freien Fettsäuren (Niemeier et al., 1996; Takahashi et al., 2004).

1.3.3 Lipoproteinlipase (LPL)

Vorkommen der Lipoproteinlipase

Die Lipoproteinlipase wird wie der VLDL-Rezeptor vor allem in Muskel- und Fettgewebe exprimiert, denen eine wichtige Rolle im Lipoproteinstoffwechsel zugeschrieben wird. Darüber hinaus konnte auch eine Expression in Nervengewebe, Lunge, Niere, Nebenniere, Pankreas, laktierender Mamma und Makrophagen nachgewiesen werden (Kirchgessner et al., 1989b; Merkel et al., 2002a). Nach der Synthese wird die LPL sezerniert und zur luminalen Seite von Endothelzellen transportiert, wo sie über nicht-kovalente Bindung an Proteoglykane verankert wird.

Funktionen der Lipoproteinlipase

Die Lipoproteinlipase hat sowohl katalytische als auch nicht-katalytische Funktionen. Als Schlüsselenzym im Triglyzerid-Stoffwechsel ist sie verantwortlich für die Hydrolyse von Triglyzeriden aus Chylomikronen und VLDL (Goldberg, 1996). Durch diese lipolytische Funktion senkt die LPL die TG-Spiegel im Serum und ist das entscheidende Enzym zum Abbau von Chylomikronen zu Chylomikronen-Remnants sowie der Initiierung der Konversion der VLDL zu LDL und VLDL-Remnants. Die entste-

henden freien Fettsäuren werden entweder vom Fettgewebe gespeichert oder dienen direkt der Energieversorgung von Herz- und Skelettmuskel.

Unabhängig von ihrer katalytischen Aktivität vermittelt die LPL die Interaktion von Lipoproteinen mit Proteoglykanen auf Zelloberflächen (Eisenberg et al., 1992). Die dadurch bedingte Akkumulation von Lipoproteinen in Rezeptornähe kann eine Apo E- oder Apo B- vermittelte Aufnahme von Lipoproteinen über Rezeptoren fördern (Mulder et al., 1993). In atherosklerotischen Plaques bindet die LPL auf diesem Weg LDL-Partikel und kann damit atherogene Wirkung entwickeln.

Auch über direkte Interaktion mit Lipoprotein-Rezeptoren wie dem LDL-Rezeptor (Medh et al., 1996), dem LRP (Beisiegel et al., 1991; Williams et al., 1994) sowie dem VLDL-Rezeptor (Argraves et al., 1995) kann die LPL die Aufnahme von Lipoproteinen fördern. Katalytisch inaktive LPL steigert darüber hinaus die selektive Aufnahme von Cholesterinestern in Zellen ohne dass es zu einer kompletten Aufnahme der Lipoproteine kommt, in Anwesenheit von katalytisch aktiver LPL wird zusätzlich die Triglyzerid-Hydrolyse gesteigert (Merkel et al., 2002b). Eine weitere Funktion ist die Unterstützung des Austausches von Lipiden und Apolipoproteinen zwischen VLDL und HDL mit Hilfe des CETP sowie der LCAT und somit Veränderungen ihrer jeweiligen Eigenschaften, siehe hierzu die nachfolgende Abbildung (Murdoch und Breckenridge, 1995; Murdoch und Breckenridge, 1996).

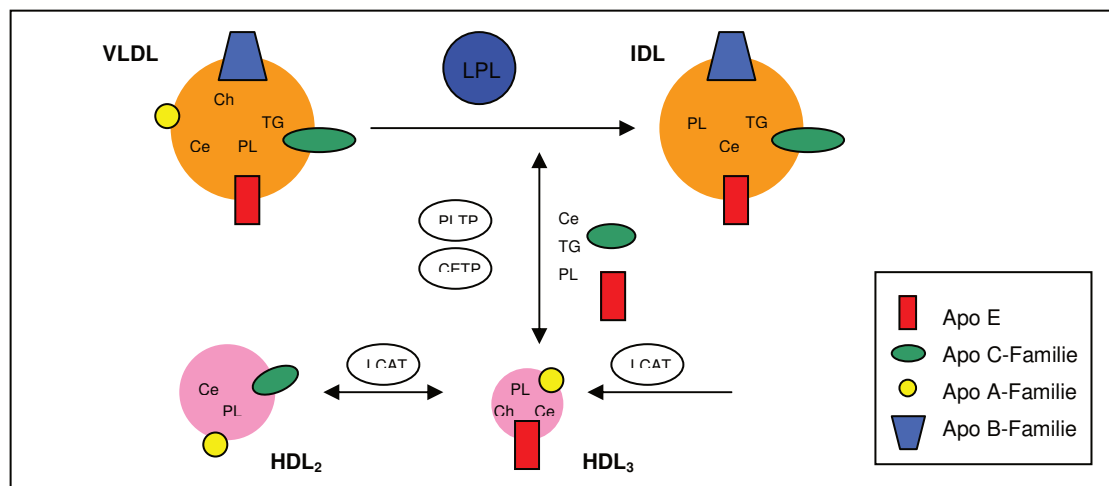


Abbildung 2: Lipid- und Apolipoprotein-Austausch zwischen VLDL, IDL und HDL

Durch Übertragung von Lipiden und Apolipoproteinen auf HDL während der Triglyzerid-Hydrolyse steigert die LPL u.a. auf diese Weise den HDL-Spiegel im Blut (Goldberg, 1996).

Genetik, Aufbau und Struktur der Lipoproteinlipase

Das Gen der Lipoproteinlipase ist auf dem Chromosom 8p22 codiert (Sparkes et al., 1987) und umfasst ca. 30 kb mit insgesamt 10 Exons (Deeb und Peng, 1989; Kirchgessner et al., 1989a). Das fertige Enzym wird aus 448 Aminosäuren gebildet (Wion et al., 1987) und besteht aus zwei Domänen. Die größere N-terminale Domäne enthält das katalytische Zentrum sowie die Bindungsregion für den Kofaktor Apo C-II. Die kleinere C-terminale Domäne ist für die Bindung an die Proteoglykane der kapillären Endothelien, die Lipoproteinrezeptoren und die Interaktion des Enzyms mit den Lipoproteinen verantwortlich (Davis et al., 1992; Dugi et al., 1995). Katalytisch aktive Lipoproteinlipase liegt als Dimer vor, Dissoziation führt zu Aktivitätsverlust (Garfinkel et al., 1983; Osborne, Jr. et al., 1985).

Regulatorische Elemente im Promotor der Lipoproteinlipase

Im Promotor des menschlichen LPL-Gens wurden wichtige Cis-acting Elemente gefunden, die DNA-bindende-Proteine binden und die basale und/oder ligandenvermittelte LPL-Transkription vermitteln können. In Abbildung 3 auf der folgenden Seite ist ein Teil des ersten Exons sowie der 5'-Region des LPL-Gens abgebildet. Der Transkriptionsstart sowie einige regulatorische Elemente sind markiert.

Der LPL-Promotor scheint keine direkte TATA-Box zu haben, die über Bindung des TATA-Bindeproteins (TBP) die Transkription initiiert. Diese Funktion wird vermutlich von dem Octamer-Element an Pos. -46 übernommen, das zusammen mit der NF-Y bindende CCAAT-box an Pos. -65 essentiell für die basale Promoteraktivität zu sein scheint (Nakshatri et al., 1995). Neben diesen für die basale Transkription verantwortlichen Regionen gibt es zahlreiche Elemente, die für die gewebsspezifische Transkription wichtig sind. So spielen z.B. in der LPL-Expression während der Adipozyten-Differenzierung die Elemente LP- α und LP- β eine wichtige Rolle, die beide eine starke Ähnlichkeit zu bekannten Sequenzen haben, die die Transkriptionsfaktoren HNF-3 und fork head binden (Enerback et al., 1992). Über das sterol-regulatory-element SRE greift der zelluläre Cholesterinstoffwechsel in die Expression von LPL ein (Schoonjans et al., 2000), an dieses Element können auch die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 binden (Yang und Deeb, 1998). Liganden für die Familie der Transkriptionsfaktoren der Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptoren (PPAR), wie z.B. ungesättigte Fettsäuren, Prostaglandine, Glucose, Fibrate oder auch Glitazone, wirken über das Peroxisome-Proliferator-Response-Element (PPRE) auf die Expression (Schoonjans et al., 1996).

-900	TGCTTTTAGT	ATATTTACAG	AGTTGTGCAG	CATCAGCATA	ATGTAATCTA	GAACATTGTC
-840	ATCAACTACC	CCCAAATCTC	TATTCTTCCC	TTCCCCTATT	AATTACCCAG	CCCCAGGCAA
-780	GCACTGATCT	ACTTTTGGTC	TCTATGGATT	TGTCTATTTG	TGGACACTTT	AAATGGAATC
-720	ATACAATATG	TGTCTTTTGC	GACTATCTTC	TTTCACTTAT	CATAACTCAA	TACGGCTTTA
-660	GATTATTTGA	CCTCGATGTT	CTGCCCTGA	ACATAAAATA	TTATCCTTGC	ATTCCTTGAT
-600	GAGTTTGAGG	ATTGAGAATA	ATTTGCATGA	GACAAAAATT	AGAACTAGT	TAGAGCAAGT
-540	AGGCTTTTCT	CCATCACATA	AGCTGATCCA	TCTTGCCAAT	GTTAAAAACAC	CAGATTGTAC
-480	AAGCACAAGC	TGGGACGCAA	TGTGTGTCCC	TCTATCCCTA	CATTGACTTT	GCGGGGGTGG
-420	GGATGGGGTG	CGGGGTGAGT	GAGGGAGGAC	TGCAAGTGAC	AAACAGGATT	CGTCAAAGA
-360	GAGGTGTATT	AAAGTGCCGA	TCAAATGTAA	TTTAACAGCT	AACTTTCCC	TCCTTGAAA
-300	ACAGGTGATT	GTTGAGTATT	TACGTGAAT	CGATGTAAAC	CTGTGTTTGG	TGCTTAGACA
-240	GGGGCCCCC	GGGTAGAGTG	GAACCCCTTA	AGCTAAGCGA	ACAGGAGCCT	AACAAAGCAA
-180	ATTTTCCGT	CTGCCCTTC	CCCCTCTTCT	CGTTGGCAGG	GTTGATCCTC	ATTACTGTTT
-120	GCTCAAACGT	TTAGAAGTGA	ATTAGGTCC	CTCCCCCAA	CTTATGATTT	TATAGCCAAT
-60	AGGTGATGAG	GTATTTTGC	ATATTTCCAG	TCACATAAGC	AGCCTTGGCG	TGAAAACAGT
+1	GTCAGACTCG	ATTCCCCCTC	TTCCTCCTCC	TCAAGGGAAA	GCTGCCCACT	TCTAGCTGCC
+61	CTGCCATCCC	CTTTAAAGGG	CGACTTGCTC	AGCGCCAAAC	CGCGGCTCCA	GCCCTCTCCA
+121	GCCTCCGGCT	CAGCCGGCTC	ATCAGTCGGT	CCGCGCCTTG	CAGCTCCTCC	AGAGGGACGC
+181	GCCCCGAGAT	G				

Abbildung 3: Teile des ersten Exons und der 5'-flankierenden Region des LPL-Gens mit Markierung einiger regulatorischer Elemente (Deeb und Peng, 1989; Kirchgessner et al., 1989a; Enerback et al., 1992; Preiss-Landl et al., 2002; Merkel et al., 2002a)

1.4 Stoffwechsel der Lipoproteine

Im Stoffwechsel der Lipoproteine werden 3 Transportsysteme unterschieden: im exogenen System (Chylomikronen-Stoffwechsel) werden Nahrungslipide transportiert, das endogene System (VLDL-, LDL-Stoffwechsel) dient der Versorgung der Gewebe mit Lipiden hepatischen Ursprungs. Die Rückführung von Cholesterin peripherer Zellen zur Leber erfolgt im reversen Cholesterin-Transport (HDL-Stoffwechsel). Die folgende Abbildung 4 gibt einen Gesamtüberblick über den Lipidstoffwechsel, Erläuterungen folgen im Text (Schaefer, 1998; Richter und von Eckardstein, 2006).

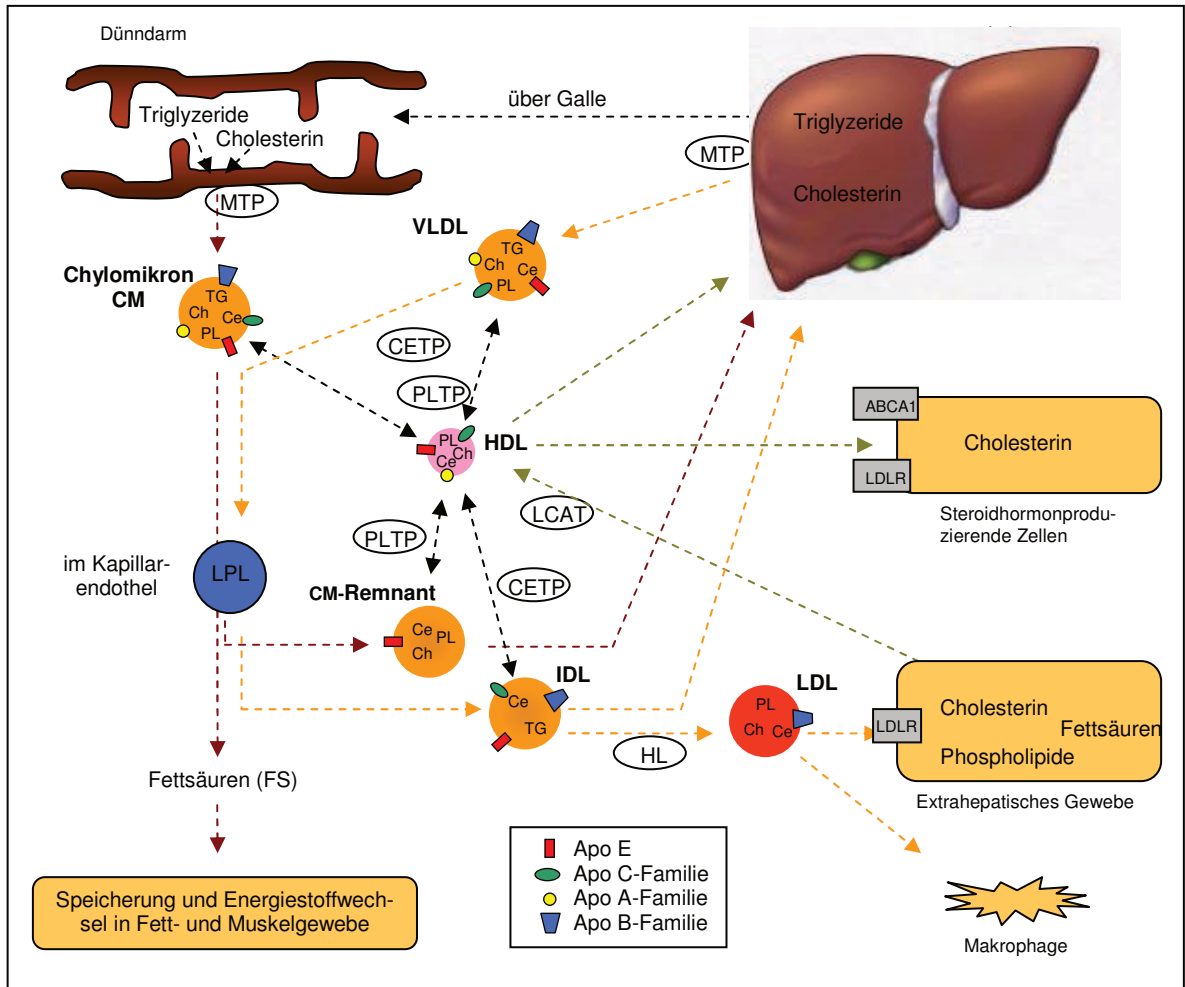


Abbildung 4: Übersicht über den Lipidstoffwechsel; TG: Triglyzeride, Ch: Cholesterin, Ce: Cholesterinester, PL: Phospholipide, MTP: Mikrosomales Triglyzerid-Transferprotein, LPL: Lipoproteinlipase, LDLR: LDL-Rezeptor, CETP: Cholesterinester-Transferprotein, HL: Hepatische Lipase, LCAT: Lecithin-Cholesteryl-Acyl-Transferase, PLTP: Phospholipid-Transferprotein, ABCA1: ATP-bindender Kassettentransporter 1

1.4.1 Der exogene Lipidtransportweg (Chylomikronen-Stoffwechsel)

Mit der Nahrung aufgenommene Triglyzeride werden von der Pankreaslipase gespalten, ihre Einzelbestandteile werden in die Enterozyten aufgenommen und dort rasch wieder zu Triglyzeriden zusammengebaut. Aufgenommenes Cholesterin wird durch die zelluläre Acyl-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT)-2 verestert. Unter Mitwirkung des Mikrosomalen Triglyzerid-Transferproteins (MTP) erfolgt in den Enterozyten die Assemblierung der Chylomikronen aus Triglyzeriden, Cholesterinestern, Phospholipiden sowie den Apolipoproteinen A-I, A-IV und B-48. Nach ihrer Sekretion

on in die Lymphbahnen und Wanderung in den Blutkreislauf über den Ductus thoracicus nehmen die Chylomikronen Apo E und C-Apolipoproteine aus HDL-Partikeln auf. Besondere Bedeutung hat hierbei die Aufnahme von Apo E sowie Apo C-II, das als Kofaktor für die Aktivierung der Lipoproteinlipase benötigt wird.

Über Apo E binden Chylomikronenpartikel an den VLDL-Rezeptor (Niemeier et al., 1996). Die Lipoproteinlipase befindet sich über Proteoglykane gebunden auf Endothelzellen (s.o.), kann aber auch über eine carboxyterminale Bindungsstelle direkt an den VLDL-Rezeptor binden (Argraves et al., 1995). Nach Bindung der VLDL an diesen Komplex kommt es zur Hydrolyse der Chylomikronen und Freisetzung von Fettsäuren (FS), die von den Zellen aufgenommen werden können (Tacken et al., 2001). Abbildung 5 zeigt schematisch diese Bindung der Chylomikronen mit nachfolgender Hydrolyse durch LPL und VLDLR.

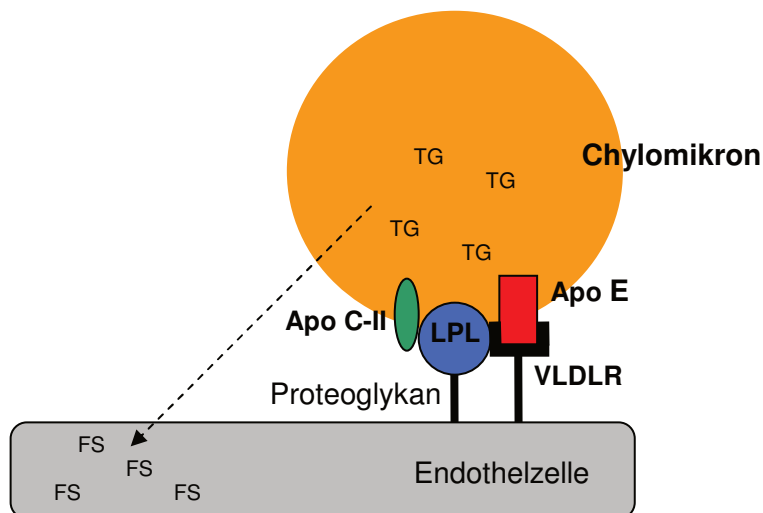


Abbildung 5: Hydrolyse von Chylomikronen, adaptiert nach (Soufi, 2008)

Durch die Hydrolyse verlieren die Chylomikronen ca. 70-90% ihres Triglyzerid-Gehaltes, gleichzeitig nehmen sie weiteres Apo E und Cholesterinester aus HDL auf und geben Apo A-I und C an diese ab. Die entstehenden Chylomikronen-Remnants sind entsprechend reich an Cholesterinestern und Apo E. In der Leber erfolgt die rezeptorvermittelte Aufnahme der Chylomikronen-Remnants über Bindung von Apo E an den LDL-Rezeptor sowie das LRP.

1.4.2 Der endogene Lipidtransportweg (VLDL-, LDL-Stoffwechsel)

Über den endogenen Transportweg werden die peripheren Gewebe mit Triglyceriden und Cholesterin aus der Leber versorgt. In der Leber werden Triglyceridreiche VLDL-Partikel unter Mitwirkung des MTP gebildet und in die Blutbahn sezerniert. Ihr wichtigster Proteinbestandteil ist das Apo B-100, daneben enthält es auch Apo E und C, u.a. durch Austausch von Lipoproteinen mit HDL-Partikeln. Apo C-I hemmt die sofortige Re-Aufnahme in die Leber, Apo C-II aktiviert die LPL, durch Apo C-III wird diese gehemmt. Apo E dient wie bei den Chylomikronen zur Bindung an den Komplex aus VLDLR und LPL (Takahashi et al., 1992; Tacke et al., 2001), diese Bindung mit nachfolgender Hydrolyse ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

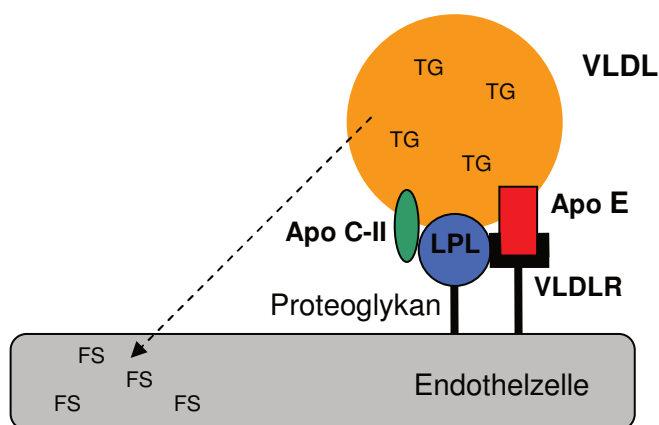


Abbildung 6: Hydrolyse von VLDL, adaptiert nach (Soufi, 2008)

Durch diese LPL-vermittelte Hydrolyse und den durch Cholesterinester-Transferproteine (CETP) vermittelten Erwerb von Cholesterinestern aus HDL entstehen aus den VLDL kleinere Lipoproteine, die VLDL-Remnants oder IDL. Bei dieser Konversion werden der größte Teil der C-Apolipoproteine sowie ein Teil des freien Cholesterins auf HDL übertragen, die entstehenden IDL sind reich an Cholesterinestern sowie Apo E. Sie werden entweder über den LDL-Rezeptor in die Leber aufgenommen oder zu LDL abgebaut. Bei diesem Abbau vermittelt die hepatische Triglyceridlipase (HL) die Hydrolyse der restlichen Triglyceride, durch Vermittlung des CETP kommt es zu weiterer Aufnahme von Cholesterinestern aus HDL. Die IDL verlieren bis auf Apo B-100 alle ihre Lipoproteine, dieses dient als Ligand für den LDL-Rezeptor. Die so entstandenen LDL versorgen das extrahepatische Gewebe

mit Cholesterin und regulieren dort die Cholesterinbiosynthese. Nach Bindung der LDL-Partikel an den LDL-Rezeptor kommt es zur Endozytose des Komplexes. In sekundären Lysosomen dissoziiert der LDL-Rezeptor vom LDL und wird wieder zur Zelloberfläche zurücktransportiert. Die Cholesterinester werden durch lysosomale saure Lipase in freie Fettsäuren und Cholesterin zerlegt. Das freie Cholesterin aktiviert einerseits in der Zelle die ACAT, durch erneute Veresterung wird das Cholesterin in eine Speicherform überführt. Andererseits hemmt das Cholesterin die Transkription der an der Cholesterin-Biosynthese beteiligten Enzyme sowie des LDL-Rezeptors und reguliert dadurch den Cholesterin-Haushalt der Zelle.

30-40% der LDL werden nicht über den LDL-Rezeptor sondern über den sog. Scavenger-Pathway eliminiert, an dem mehrere Mechanismen beteiligt sind: Endozytose über niedrig-affine Rezeptoren, Pinozytose und Aufnahme über Scavenger-Rezeptoren, die chemisch modifizierte LDL erkennen. Diese Scavenger-Rezeptoren befinden sich vor allem auf Makrophagen und Zellen des retikuloendothelialen Systems. Im Gegensatz zum LDL-Rezeptor ist der Scavenger-Pathway nicht sättigbar, so dass es bei einem Überangebot von LDL zu unkontrollierter LDL-Aufnahme kommt, was u.a. zur Schaumzellbildung führt, einem entscheidenden Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose.

1.4.3 Der reverse Cholesterintransport (HDL-Stoffwechsel)

Der Transport von Cholesterin aus dem extrahepatischen Gewebe zurück zur Leber wird durch HDL gewährleistet. Ihre diskoidalen Vorstufen stammen aus der Leber, dem Darm und dem Metabolismus von Chylomikronen und VLDL. Sie sind reich an Apo A und Apo E sowie Cholesterin und Phospholipiden. Apo A-I aktiviert die LCAT, es kommt zur Veresterung des Cholesterins. Die Ester sind hydrophober als freies Cholesterin und reichern sich im Kern der HDL an, die dadurch ihre spätere Kugelform annehmen. Zunächst sind die entstehenden Partikel noch klein und werden als HDL₃ bezeichnet, sie nehmen weiterhin Cholesterin aus peripheren Zellen auf. Durch fortschreitende LCAT-vermittelte Cholesterinveresterung sowie Erwerb von phospholipid- und apolipoproteinhaltigen Oberflächen-Remnants der Chylomikronen und VLDL durch PLTP entstehen HDL₂. Für die Entfernung der HDL-Lipide aus der Zirkulation gibt es indirekte und direkte Wege. Zu den indirekten Wegen zählen der CETP-vermittelte Transfer von Cholesterinestern aus HDL auf VLDL und LDL sowie die HDL-vermittelte Hydrolyse der Triglyzeride und Phospholipide durch Lipasen. Eine wichtige Rolle bei den direkten, HDL-Rezeptor-vermittelten, Wegen spielt die

sog. selektive Cholesterinaufnahme über den Scavenger-Rezeptor B1 in Hepatozyten und Steroidhormon-produzierenden Geweben. Die in die Leber aufgenommenen Lipide der HDL werden biliär sezerniert oder dienen der Synthese von Gallensäuren.

1.5 Die Marburger KHK-Präventions-Allianz

Die Marburger KHK-Präventions-Allianz wurde 1998 gestartet mit dem Ziel, die sekundärpräventive Versorgung von KHK-Patienten zu optimieren (Schaefer et al., 2000). Jedem Patienten, der in der Universitätsklinik Marburg eine Herzkatheteruntersuchung erhält, werden bei vorliegendem Einverständnis im Rahmen der Untersuchung 5 ml Serum und 2 ml EDTA-Blut entnommen zur Bestimmung KHK-relevanter Blutwerte wie z.B. Cholesterin, Triglyzeride, HDL- und LDL-Cholesterin, LP(a) etc. Zusätzlich werden weitere Risikofaktoren erhoben wie Alter, Gewicht, Vorliegen eines Diabetes mellitus etc. Diese Daten werden mithilfe eines speziellen Computerprogramms mit den erhobenen Angiographiebefunden verknüpft und ermöglichen so eine individuelle Therapieplanung.

Aktuell liegen komplette Datensätze von 7200 Patienten vor, die in dieses Projekt aufgenommen wurden. Die entnommenen Blutproben werden nach den erfolgten Untersuchungen zur weiteren Verwendung eingefroren und aufbewahrt.

Ein Votum zur Durchführung von Studien mit diesem Kollektiv, welches auf der Basis der Helsinki-Deklaration von 1975 in revidierter Form von 1996 beruht, wurde von der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg erteilt (Aktenzeichen Studie: 10/03).

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Goudriaan et al entdeckten 2001, dass Mäuse, die keinen VLDL-Rezeptor exprimierten, trotz hochkalorischer Ernährung kein Übergewicht entwickelten (Goudriaan et al., 2001). Dazu züchteten sie Mäuse ohne VLDL-Rezeptor-Gen und ernährten sie sowie gesunde Mäuse als Vergleichsgruppe zunächst für 6 Monate mit normaler Nahrung, danach folgte eine fettreiche hochkalorische Ernährung für weitere 17 Wochen. Bei normaler Ernährung gab es keinen Unterschied in den Plasmalipiden sowie dem Körpergewicht von Mäusen mit oder ohne VLDL-Rezeptor. Unter fettreicher Diät dagegen kam es bei den Wildtyp-Mäusen zu steigender Gewichtszunahme, die VLDLR-defizienten Mäuse hingegen nahmen nur gering an Gewicht zu und ihre Adipozyten waren deutlich kleiner als die der gesunden Mäuse. Die Triglyzerid-Spiegel der VLDLR-knock-out-Mäuse lagen dagegen deutlich höher als die ihrer gesunden Verwandten, es handelte sich vor allem um Triglyzeride in der VLDL-Fraktion. Cholesterin-Werte sowie freie Fettsäuren im Blut unterschieden sich nicht zwischen den beiden Gruppen.

Der VLDL-Rezeptor ist zusammen mit der Lipoproteinlipase verantwortlich für die Bindung und Hydrolyse von ApoE-haltigen Lipoproteinen und somit der Versorgung der Gewebe mit freien Fettsäuren, diese Bindung ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Die Daten obiger Studie zeigen deutlich, dass der Komplex dieser Proteine eine wichtige Rolle in der Regulation des Triglyzerid-Spiegels und eventuell auch in der Entwicklung von Adipositas spielt.

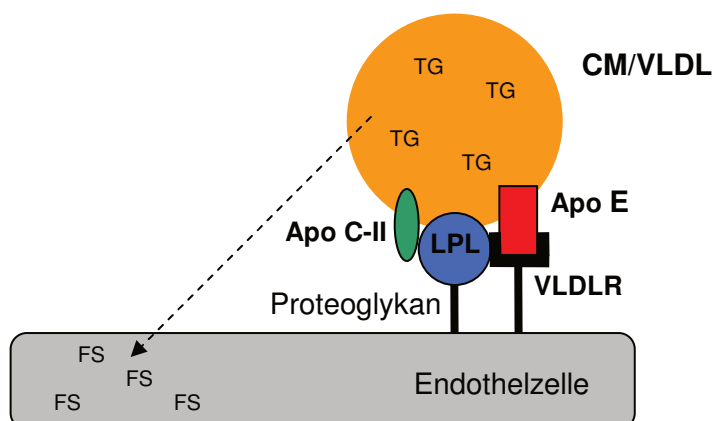


Abbildung 7: Komplex aus VLDL-Rezeptor, LPL und Apo E zur Hydrolyse von Triglyzeridhaltigen Lipoproteinen (Soufi, 2008)

Im Rahmen eines durch das Nationale Genomforschungsnetzwerk (NGFN) geförderten Projektes wurde von unserer Arbeitsgruppe erstmals die Rolle des VLDL-Rezeptors und seiner modulierenden Faktoren wie den Apolipoproteinen und der Lipoproteinlipase auf die Entwicklung von Adipositas, KHK und Lipidwerten im Blut von Patienten des Kollektivs der Marburger Präventionsambulanz untersucht. Patienten der Fallgruppe hatten bei erhöhten Triglyzeriden (> 150 mg/dl) einen normalen BMI (< 25 kg/m²) und entsprachen damit mit ihrem Lipidprofil in etwa den VLDLR-knock-out-Mäusen nach hochkalorischer Ernährung, in der Kontrollgruppe untersuchten wir Patienten mit normalen Triglyzerid-Werten (< 150 mg/dl) und normalen BMI (< 25 kg/m²). Unser Ziel war es, durch eine Häufung von Mutationen in einer der beiden Gruppen einen Einfluss auf den Triglyzerid-Stoffwechsel und einen Zusammenhang mit der Regulierung des Körpergewichtes nachweisen zu können. Untersuchungen des kompletten VLDL-Rezeptors zeigten in einer Fallgruppe von 129 Patienten insgesamt 6 Mutationen sowohl im Promotor als auch in verschiedenen Exons. Sie befanden sich alle in funktionell relevanten Regionen und führten zu einem erniedrigten BMI und erhöhten Triglyzeriden. 4 dieser Mutationen wurden erstmals im Rahmen dieses Projektes von unserer Arbeitsgruppe beschrieben, in der Kontrollgruppe von 135 Patienten war nur 1 dieser neu entdeckten Mutationen nachweisbar.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit 2 weiteren Proteinen des Triglyzerid-regulierenden Komplexes, dem Apolipoprotein E und der Lipoproteinlipase. Bei beiden Proteinen wurden spezielle regulatorische Elemente auf Mutationen untersucht, die die Expression der Proteine beeinflussen und so durch Mutations-bedingte veränderte Mengen an Enzym den Triglyzerid-Stoffwechsel mit all seinen Folgen verändern können.

Erhöhte Triglyzeride sowie Adipositas sind wichtige Risikofaktoren für Atheroskleroseentwicklung mit all ihren Folgeerkrankungen. Es ist daher essentiell, den Stoffwechsel der Triglyzeride in seiner Komplexität zu entschlüsseln, um neue Therapieansätze entwickeln zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Geräte

Tabelle 6: verwendete Geräte

verwendetes Gerät	Hersteller
Elektrophorese-Kammer (Mini-Sub Cell GT System with 7 x 10 cm Tray)	Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, California, USA
Magnetrührer (Heidolph MR 2002)	Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland
Magnetrührer (RH basic KT/C IKAMAG® safety control)	Fa. IKA®-Werke GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland
Mikrowelle	Fa. Sharp Electronics (Europe) GmbH, Hamburg, Deutschland
peristaltische Pumpe zum Gießen von DGGE-Gelen (Minipuls3 Peristaltic Pump)	Fa. Gilson, Inc., Middleton, Wisconsin, USA
pH-Meter (pH-Meter 761 Calimatic)	Fa. Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co KG, Berlin, Deutschland
Pipetten P10, P20	Fa. Gilson, Middleton, USA
Pipetten P10, P20, P250, P1000, P5000	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pumpe (groß) für DGGE-Lauf (NDP Pump Range 35/3)	Fa. Totton Pumps, Southampton, England
Pumpe (klein) für DGGE-Lauf (Variable-Speed-Pump – Medium Flor 0,4-85,0/min)	Fa. Control Company, Friedswood, Texas, USA
Schüttler Köttermann 4010	Fa. Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Häningsen, Deutschland
Stromaggregat für DGGE-Lauf (Power Pac 300)	Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, California, USA
Stromaggregat für Gelelektrophorese (Power Pac 3000)	Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, California, USA
Thermocycler PCT-200 (MJ Research Pelletier Thermalcycler)	Fa. Global Medical Instrumentation, Inc, Minnesota, USA
Thermostat für DGGE-Lauf (LKB Bromma 2219 MultitempII)	Fa. LKB Bromma, Schweden
Transilluminator 4000	Fa. Stratagene, La Jolla, California, USA
Vortexer (Heidolph Reax 2000)	Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland

verwendetes Gerät	Hersteller
Waage (SBC 51)	Fa. Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Wasserstrahlpumpe	
Zentrifuge 3200 (Eppendorf Zentrifuge 3200)	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5414S (Eppendorf Zentrifuge 5414S)	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.1.2 Reagenzien

Tabelle 7: verwendete Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
10x PCR(-MgCl ₂) Rxn Buffer 1,25 ml	Fa. Invitrogen, Carlsbad, California, USA
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40)	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose (Certified Molecular Biology Agarose)	Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Ammoniumperoxidsulfat	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Betaine 5M	Fa. ICN Biomedicals Inc., MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Bromphenolblau 2%	Fa. Riedel-de Haën, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
dNTP Set1 (>98%, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 4x 25µmol, 100 mM per dNTP)	Fa. Invitrogen, Carlsbad, California, USA
EDTA (>99%) Dinatriumsalz Dihydrat Titrierkomplex, pH 8,0	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure 100%	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol vergällt (Sorte 642)	Fa. Stockmeier Chemie Dillenburg, Dillenburg, Deutschland
Ethanol absolute	Fa. Riedel-de Haën, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland
Ethidiumbromid	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Formamid (deionisiert)	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin 87%	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerol (Ultra pure™)	Fa. Invitrogen, Carlsbad, California, USA

Reagenzien	Hersteller
Guanidiniumisothiocyanat	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O (Aqua ad iniectionem)	Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
H ₂ O (bidest)	
H ₂ O (steril) (HiPerSolv Chromanorm for HPLC)	Fa. VWR International GmbH, Wien, Österreich
Harnstoff (> 99,5%, p.a.)	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol (p.a.)	Fa. Acros Organics, New Jersey, USA
Lithium-Chloride	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂ 50 mM 1ml	Fa. Invitrogen, Carlsbad, California, USA
PCR-Marker (Bench Top PCR Markers)	Fa. Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Platinum® Taq Polymerase 250 rxn (5U/μl)	Fa. Invitrogen, Carlsbad, California, USA
QIAEX II Gel Extraction Kit	Fa. Qiagen, Venlo, Niederlande
Phenol (Roti®-phenol, in TE equilibriert pH 8,0)	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, 37%, rauchend, LabGrade ACS	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (Temed)	Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, USA
Tris Pufferan® (>99,9%, p.a.)	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X-100	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filter für DGGE-Lösungen (Minisart® 0,2μl Syringe Filter Holdings)	Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland
Filterpapier (Filter Paper)	Fa. Munktell Filter AB, Falun, Schweden
Glasplatten für DGGE-Gele (PROTEAN II xi 2-D cell)	Fa. Biorad Laboratories, Inc. Hercules, California USA
Kämme für DGGE-Gele (PROTEAN II xi 2-D cell)	Fa. Biorad Laboratories, Inc. Hercules, California USA
Kanülen (BD Microlance 3)	Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Material	Hersteller
Filter (Papier)	Fa. Schleicher & Schuell, jetzt Whatman, Maidstone, England
Parafilm (PARAFILM®M Verschlussfolie)	Fa. Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
PCR-Platten und Caps	Fa. Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Sandwich-Clamps für DGGE-Gele (PROTEAN II xi 2-D cell)	Fa. Biorad Laboratories, Inc. Hercules, California USA
Spacer für DGGE-Gele (PROTEAN II xi 2-D cell)	Fa. Biorad Laboratories, Inc. Hercules, California USA
Spritze zum Auftragen der DGGE-Proben (Model 1810 100µl Pst2)	Fa. Mplus GmbH, Bremen, Deutschland
Thermometer (ama-digit ad 14th)	Fa. Amarell GmbH & Co KG, Kreuzwertheim, Deutschland
Transferpipetten (Sarstedt Transferpipette 1ml)	Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

3.1.4 Standardpuffer und Lösungen

Die Zusammensetzung und Herstellung von in dieser Arbeit häufig verwendeten Lösungen und Puffer ist kurz in den folgenden Tabellen 9-11 zusammengefasst.

Tabelle 9: Zusammensetzung des DNA-Auftragspuffers (Loading-Buffer)

Reagenzien	Menge
Bromphenol blau 2%	0,5 ml
Glycerol 87%	8 ml
H ₂ O (steril)	2,5 ml

Tabelle 10: Zusammensetzung 50x TAE(Tris-Acetat-EDTA)-Puffer

Reagenzien	Menge
Tris	242 g
100% Essigsäure	57,1 ml
0,5 M EDTA-Lösung, pH 8,0	100 ml
H ₂ O (bidest)	ad 1000 ml

Die Lösung wurde gemischt und konnte anschließend bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Tabelle 11: Zusammensetzung 10% Ammoniumpersulfat (APS)

Reagenzien	Menge
Ammoniumperoxidsulfat	1g
H ₂ O (bidest)	ad 10 ml

3.1.5 Software

Folgende Software wurde verwendet:

Bio Edit Sequence Alignment Editor, Version 7.0.0 (Copyright © 1997-2007, Tom Hall)

Chromas MFC Application, Version 2.0.0.0 (Copyright © 2000 Technelysium Pty. Ltd)

Winmelt™, Version 2.0.10.0, Bio-Rad Laboratories Inc (Copyright © 1998 MedProbe AS. Portions Copy)

Microsoft Winword, Version 9.0.0.2823 (Copyright© Microsoft Corporation 1983-1999)

Microsoft Office 2000 (Excel), Version 9.0.0.2719, (Copyright © Microsoft Corporation 1985-1999)

WinSTAT für Excel (Copyright © 2009 by R. Fitch Software)

Online-Datenbanken:

Bioinformatic Harvester III (beta): www.harvester.fzk.de/harvester (KIT, 2010);

Ensembl Genome Browser: www.ensembl.org (EBI und WTSI, 2010)

3.2 Verwendete Methoden

Zunächst wurde die DNA der Patienten aus den vorliegenden Vollblut-Proben isoliert und mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt.

Die so gewonnene DNA-Menge wurde mit Hilfe der Denaturierenden Gradienten-Gel-Elektrophorese auf Mutationen untersucht. Auffällige Proben sowie mindestens eine unauffällige Probe pro Fragment wurden aufgereinigt und zur Sequenzierung geschickt.

3.2.1 DNA-Isolierung

Die für die PCR benötigte DNA wurde aus den eingefrorenen EDTA-Blutproben der Patienten gewonnen.

Durch Zugabe von 10 ml Phenol zu 30 ml einer Isolations-Stammlösung wurde die benötigte DNA-Isolationslösung hergestellt. Die Zusammensetzung dieser Stammlösung ist in Tabelle 12 aufgezeigt.

Tabelle 12: Zusammensetzung der DNA-Isolations-Stammlösung

Reagenzien	Menge
Harnstoff	36 g
Guanidiniumisothiocyanat	70,80 g
SDS	1,0 g
Tris	0,72 g
Triton-X-100	400 µl
EDTA	1,116 g
Lithium-Chloride	16,8 g
H ₂ O (bidest)	ad 200 ml

Diese Isolations-Stammlösung wurde über Nacht auf dem Magnetrührer gerührt, anschließend durch Papierfilter filtriert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Isolierung der DNA

200 µl Vollblut wurden mit 600 µl der DNA-Isolationslösung gemischt und sorgfältig gevortext, anschließend wurde die Mischung aus Blut und Isolationslösung ca. 2 Minuten bei 13000 Rpm zentrifugiert. Ca. 800 µl des so entstehenden wässrigen Überstandes mit gelöster DNA wurden mit einer Einweg-Transferpipette (1 ml) in ein 2 ml Eppendorf-Cup überführt und mit 750 µl Isopropanol durch vorsichtiges Umkippen gemischt.

Auch diese Mischung wurde ca. 2 Minuten bei 13000 Rpm zentrifugiert und der entstandene Überstand vorsichtig mit einer Wasserstrahl-Pumpe abgesaugt, wobei darauf zu achten war, dass das DNA-Pellet nicht versehentlich mitabgesaugt wurde. Zu dem Pellet wurden 1250 µl 70%iges Ethanol gegeben, das Ganze wurde erneut 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Das so gewonnene DNA-Pellet trocknete über Nacht unter dem Abzug und wurde am nächsten Tag in 350 µl H₂O (Aqua ad iniectabilia) aufgenommen. Diese in Wasser gelöste DNA konnte bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

3.2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Methode zur in-vitro Vervielfältigung von DNA-Fragmenten und wurde Mitte der 80er Jahre erstmals von Mullis und Faloona beschrieben (Mullis und Faloona, 1987).

Das Prinzip der PCR

Die PCR beruht auf dem Prinzip der DNA-Replikation. Ein Amplifikations-Zyklus besteht aus mehreren aufeinanderfolgenden Schritten, die je nach gewünschter DNA-Menge wiederholt werden:

1. Denaturierung: durch Erwärmen auf 94°C wird die doppelsträngig vorliegende DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen
2. Primer-Annealing: nach Abkühlung lagern sich die für das gewünschte DNA-Segment spezifischen Primer an zu ihnen komplementäre Sequenzen auf den DNA-Einzelsträngen an

Die optimale Annealing-Temperatur ist abhängig von der Sequenz der verwendeten Primer. In dieser Arbeit wurden Annealing-Temperaturen von 62°C und 56°C verwendet.

3. Strangverlängerung: Synthetisierung des gewünschten DNA-Fragmentes mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase bei 72°C (Saiki et al., 1988)

Nested-PCR und Multiplex-PCR

Im menschlichen Genom gibt es viele Homologien, die es unter Umständen erschweren, spezifisch ein bestimmtes DNA-Fragment aus der Gesamtheit der menschlichen DNA zu amplifizieren. Um dieses Problem zu umgehen, wurde für die vorliegende Arbeit das Prinzip der Nested-PCR benutzt.

Hierbei wird zunächst ein größeres DNA-Teilstück amplifiziert, das das gewünschte Fragment enthält. In einer zweiten PCR wird dann mit neuen Primern das gewünschte Fragment amplifiziert (Mullis et al., 1986).

Diese Methode hat 2 Vorteile: Zum einen wird das gewünschte Fragment spezifischer amplifiziert als bei einer "direkten" PCR, zum anderen erhält man bei dieser

Vorgehensweise deutlich mehr DNA zur weiteren Untersuchung als bei einer einzelnen PCR.

Die erste PCR kann als Multiplex-PCR durchgeführt werden, d.h. es werden mehrere größere Fragmente gleichzeitig in einer PCR vervielfältigt, aus denen dann jeweils in der nachfolgenden Nested-PCR die gewünschten kleineren Fragmente einzeln amplifiziert werden können.

Verwendete PCR-Reagenzien

Für die einzelnen PCRs wurden folgende Reagenzien verwendet: 10x PCR(-MgCl₂) Rxn Buffer, 50 mM MgCl₂, Platinum® Taq Polymerase, dNTP Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), H₂O (steril), Betaine, DMSO und Glycerin 87%.

Aus den 4 Einzelbestandteilen des dNTP Sets wurde ein dNTP-Mix hergestellt, der 25 mM dNTPs enthielt, indem jeweils gleiche Mengen der 4 dNTPs miteinander gemischt wurden.

Glycerol (Nagai et al., 1998), DMSO (Sun et al., 1993) und Betaine (Henke et al., 1997) werden in der Literatur als Additive beschrieben, die zur Verbesserung der PCR-Amplifikation führen können. Für diese Arbeit wurden folgende Mischungen hergestellt:

5 M Betaine : Glycerin 1:1

5 M Betaine : DMSO 1:1

DMSO : Glycerin 1:1

5 M Betaine : DMSO : Glycerin 1:1:1

Je nach Fragment wurden aus obigen Reagenzien unterschiedliche Mastermixes (Ansatz jeweils für mehrere PCRs) hergestellt und pro PCR 20 µl dieses Mastermixes mit 5 µl DNA-Template gemischt (Einzelheiten s. Ergebnisteil).

Für die vorgeschaltete erste PCR wurde die aus dem Vollblut isolierte und in H₂O aufgenommene Patienten-DNA als Template verwendet. Nach erfolgreicher PCR wurden 150 µl H₂O (steril) zu den 25 µl PCR-Ansatz gegeben. 5 µl dieser Mischung dienten wiederum als Template für die nachgeschaltete Nested-PCR.

Verwendete Primer

Die Sequenzen der untersuchten Fragmente entnahmen wir den Online-Datenbanken "Bioinformatic Harvester" (KIT, 2010) sowie "Ensembl Genome Browser" (EBI und WTSI, 2010). Mit Hilfe des Computer-Programms "BioEdit Sequence

Alignment Editor, Version 7.0.0." wurde anhand dieser Sequenzen die benötigte Primer-Sequenz bestimmt und dann bei der Firma Invitrogen bestellt. Die genaue Angabe der Sequenzen erfolgt im Ergebnisteil.

Die gelieferten Primer wurden jeweils in H₂O (steril) aufgenommen, so dass eine Stock-Lösung mit 100 pmol entstand. Aus diesen Stock-Lösungen wurden die sogenannten "working-solutions" hergestellt. Dazu wurden für jedes Fragment jeweils 10 µl des Upstream- und des Downstream-Primers mit 680 µl H₂O (steril) gemischt, so dass eine 5 pmol Primer-Lösung entstand.

Für die Multiplex-PCRs wurden jeweils gleiche Mengen der "working-solutions" der gewünschten Fragmente, die amplifiziert werden sollten, gemischt und als Primer-Mix verwendet.

Gelelektrophorese der PCR

Die Produkte der Nested-PCR wurden mit 25 µl DNA-Auftragspuffer versetzt und zur Überprüfung in einem 2%igen Agarose-Gel aufgetrennt, das Rezept für dieses Gel ist in Tabelle 13 aufgeführt. Parallel wurde auf dem Gel ein DNA-Längenstandard (PCR-Marker) aufgetragen, um die Größe der amplifizierten Fragmente bestimmen zu können.

Tabelle 13: Rezept 2%iges Agarose-Gel

Reagenzien	Menge
Agarose	0,6 g
1 % TAE-Puffer	ad 30 ml

In der Mikrowelle wurde der Puffer mit der Agarose kurz aufgeköcht und anschließend unter kaltem fließendem Wasser wieder abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid wurde das Gel in das vorbereitete Tray gegossen und der Kamm konnte gesetzt werden. Nach Aushärten des Gels wurde es bis zur weiteren Verwendung bei +4 °C aufbewahrt.

8 µl des PCR-Produkt+Auftragspuffer-Gemisches wurden auf dem Gel aufgetragen und 30 Minuten bei konstanten 70 Volt aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel unter einer UV-Lampe beurteilt und photographiert, das mit der DNA interkalierende Ethidiumbromid diente dabei als Fluoreszenzfarbstoff.

3.2.3 Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE)

Das Prinzip der DGGE

Die Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese, erstmals beschrieben von Fischer und Lerman (Fischer und Lerman, 1979), ist eine hoch-sensitive Methode, die DNA-Fragmente entsprechend ihres Schmelzverhaltens in einem Gradienten-Gel (linear ansteigender Gradient aus Formamid und Harnstoff) auftrennt. Dieses Schmelzverhalten der DNA ist in erster Linie sequenzabhängig, so dass sich mittels der DGGE DNA-Fragmente differenzieren lassen, die sich nur in einem einzigen Basenpaar unterscheiden.

In einem Acrylamid-Gel mit einem linear ansteigenden Gradienten aus Formamid und Harnstoff wandern DNA-Fragmente bis an eine Position, an der die niedrigste Schmelzdomäne ihr Schmelztemperatur T_m erreicht.

Diese Schmelztemperatur T_m ist definiert als die Temperatur, bei der die DNA-Doppelstränge zur Hälfte dissoziiert sind, sie ist abhängig von der Sequenz des entsprechenden Fragmentes, nicht von seiner Länge. Das Aufschmelzen des Doppelstranges kann sowohl durch steigende Temperaturen als auch durch eine steigende Konzentration an Denaturans verursacht werden.

Die Konformationsänderung in einem Teil des untersuchten Fragmentes führt zu einer abrupt eingeschränkten Mobilität ("mobility-shift") des gesamten Fragmentes im Gel. Ein einziges Basenpaar Unterschied führt dazu, dass dieser mobility-shift an unterschiedlichen Positionen im Gel stattfindet, so dass man Mutationen gegenüber einem Wildtyp erkennen kann (Myers et al., 1987).

Die meisten Fragmente besitzen mehrere Schmelzdomänen mit unterschiedlicher Schmelztemperatur, der mobility-shift erfolgt dann nach dem Aufschmelzen der Domänen mit der geringsten Schmelztemperatur, so dass nur Mutationen in diesen Domänen das Wanderungsverhalten beeinflussen.

Um optimale DGGE-Ergebnisse zu erzielen müssen zunächst 2 Bedingungen erfüllt sein:

1. Das Fragment muss mehr als eine Schmelzdomäne haben, da es sonst nach dem Aufschmelzen sofort in Einzelstränge zerfallen würde
2. Die zu untersuchende Region darf nicht in der Domäne mit der höchsten Schmelztemperatur liegen, da nach Aufschmelzen dieser Domäne das Fragment in Einzelstränge zerfällt

Beide Bedingungen können durch Einfügen einer GC-reichen Sequenz, GC-Clamp genannt, an eines der Enden des untersuchten Fragmentes erreicht werden (Myers et al., 1985), da GC-reiche Sequenzen eine sehr hohe Schmelztemperatur haben. Dies erfolgt in einer der DGGE vorgeschalteten PCR, in der einer der beiden Primer mit der GC-Clamp versehen wird, die im weiteren Verlauf der PCR in das Fragment eingebaut und amplifiziert wird (Sheffield et al., 1989). Eine solche vorgeschaltete PCR hat weiterhin den Vorteil, dass auch kleinste Mengen an DNA für die DGGE ausreichen.

Der Effekt der GC-Clamp bezüglich der Herstellung optimaler Schmelzbedingungen ist dabei abhängig von der Position des GC-Clamp (am 5'-oder am 3'-Ende).

Mit Hilfe eines Computer-Programms kann das zu erwartende Schmelzverhalten des untersuchten Fragmentes simuliert werden, in dieser Arbeit verwendeten wir dazu das Programm "Winmelt™, Version 2.0.10.0".

Aus dieser Simulation lässt sich einerseits ablesen, welches die optimale Lage und Länge des GC-Clamps ist, andererseits erkennt man so den theoretisch optimalen Gradienten für das untersuchte Fragment.

Doppel-Gradienten-DGGE (DG-DGGE)

Für bestmögliche DGGE-Ergebnisse muss für jedes untersuchte Fragment sowohl der optimale Gradient als auch die optimale Laufzeit individuell bestimmt werden. Lange Laufzeiten, die besonders für die Unterscheidung von Homo- und Heteroduplexen von Bedeutung sind, können zu unscharfen Banden und Geschmier führen. Ein Porositätsgradient kann diese Banden-Ausbreitung unterdrücken und so zu scharfen Banden auch bei langer Laufzeit führen (Cremonesi et al., 1997; Cremonesi et al., 1999).

Bei der Doppel-Gradienten-DGGE wird dazu über den linearen Gradienten aus Formamid und Harnstoff ein zweiter Gradient aus Acrylamid gelegt. Durch diesen zweiten Gradienten ist es möglich, für alle Fragmente die gleiche Laufzeit zu verwenden.

Verwendete Puffer und Gel-Lösungen

Der Puffertank, in dem die DGGE-Gele während der Elektrophorese bei konstanten Temperatur stehen, wurde mit einem 1x TAE-Puffer befüllt. Dieser wurde durch Zugabe von H₂O (bidest) zu einem 50x TAE-Puffer hergestellt.

Folgende Reagenzien werden für die Herstellung von DGGE-Gelen benötigt: Acrylamid, 50x TAE-Puffer, Glycerol (ultrapure), Harnstoff, Formamid, H₂O (bidest), 10%

APS und TEMED. Eine genaue Auflistung der Gelzusammensetzungen erfolgt im Ergebnisteil.

Herstellung von Parallelen DG-DGGE-Gelen

Zur Herstellung von 2 Gradienten-Gelen werden 3 Glasplatten (1 Außenplatte, 1 Zwischenplatte und 1 Innenplatte), 4 Spacer à 1 mm, 2 sog. Sandwich-Klammern sowie 2 Kämmen mit je 48 Zähnen benötigt. Die Glasplatten, die Spacer und die Kämmen wurden zunächst unter fließendem Wasser abgespült und nach dem Trocknen mit Ethanol gereinigt.

Die Spacer wurden als Abstandhalter zwischen die Glasplatten gelegt, das Ganze mit den Sandwich-Klammern fixiert und im Gießständer positioniert. Vor dem Gießen der Gele wurden die so entstandenen Gel-Kammern mit H₂O (bidest) auf Dichtigkeit geprüft.

Zur Herstellung eines DGGE-Gels benötigt man je 15 ml zweier Denaturanslösungen, die unmittelbar vor dem Gießen mit je 100 µl des 10%igen APS sowie 10 µl des Temed als Polymerisationsinitiatoren bzw. -Katalysatoren gemischt werden.

Die Lösungen wurden in die zwei Kammern eines Gradienten-Mischers gegeben und von dort mittels einer peristaltischen Pumpe in die Gel-Kammer geleitet, dabei wurde der höher konzentrierten Gel-Lösung kontinuierlich die niedriger konzentrierte Lösung beigemischt, so dass ein von unten nach oben hin abnehmender Gradient entstand. Der obere Zentimeter der Gel-Kammer wurde frei gelassen und nach Polymerisation des Geles mit der Stacking-Lösung befüllt, in die der Kamm gesetzt wurde.

Für 1 Kamm benötigte man 2,5 ml Stacking-Lösung, 25 µl APS und 2,5 µl Temed. Die fertigen Gele konnten nach Herstellung bis zu 1 Woche bei +4 °C aufbewahrt werden.

Gel-Lauf

Der Puffer-Tank wurde mit 5 Liter 1x TAE-Puffer befüllt. Über eine angeschlossene Pumpe sowie einen Thermostat wurde das Puffer-System auf 50 °C bzw. 60 °C erwärmt. Die peristaltische Pumpe sorgte während des gesamten Laufes für einen ständigen Austausch des Puffers und damit für konstante Temperaturverhältnisse.

Die Kämmen wurden vorsichtig gezogen und die fertigen Gele in die Elektrophorese-Einheit eingespannt. Nachdem das System mit H₂O (bidest) auf Dichtigkeit geprüft worden war, wurde es mit 1x TAE-Puffer befüllt und die Taschen mit diesem Puffer

gespült, um nicht polymerisierte Gel-Lösung und schnell kristallisierenden Harnstoff zu entfernen. Anschließend erfolgte das Auftragen der Proben (PCR-Produkte, mit Auftragspuffer gemischt). Nach dem Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese-Einheit in den Puffer-Tank gestellt und die Elektrophorese gestartet. Abbildung 8 zeigt den Aufbau des DGGE-Systems.

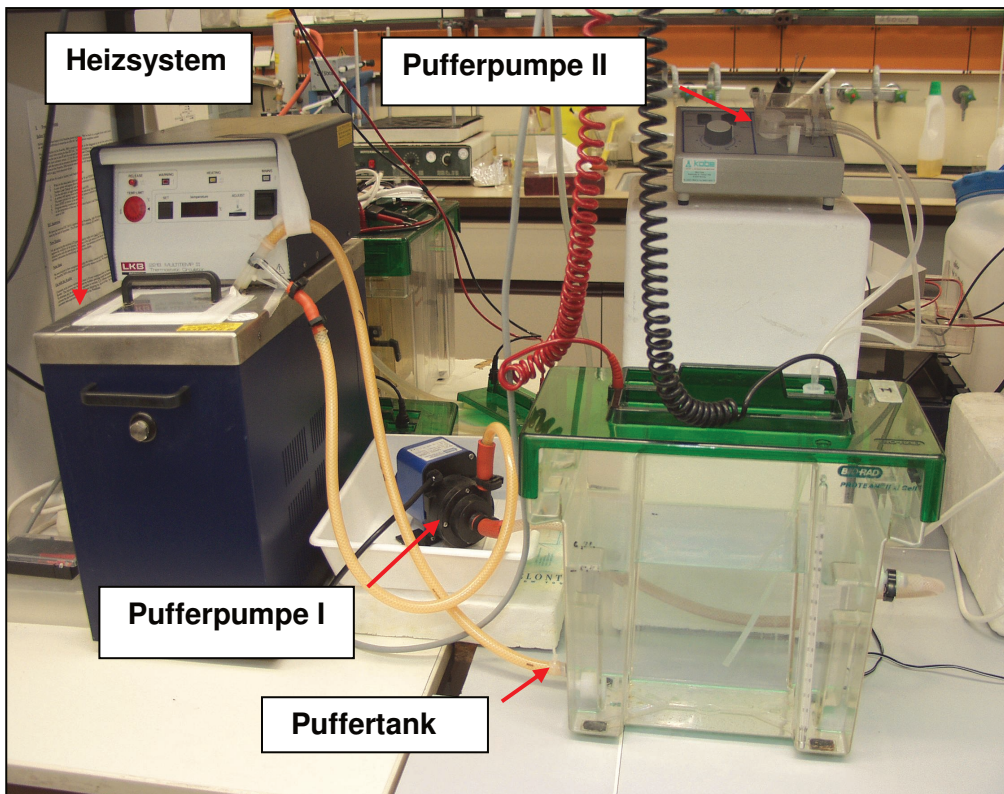


Abbildung 8: Darstellung des DGGE-Systems, mit dem alle DGGEs dieser Arbeit durchgeführt wurden

Auswertung der DGGE-Gele

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele 10-15 min. in einer Ethidiumbromid-Lösung (25 μ l Ethidiumbromid auf 400 ml H_2O (bidest)) auf einem Schüttler gefärbt, anschließend 10 min. in H_2O (bidest) wieder entfärbt.

Unter UV-Licht wurde das Gel beurteilt und anschließend photographiert, das Ethidiumbromid diente dabei als interkalierender Farbstoff.

3.2.4 Mutationsdetektion, Sequenzierung

Von jedem untersuchten Fragment wurden die auffälligen Proben sowie je mindestens eine unauffällige Probe als Wildtyp zur Sequenzierung an die Firma Seqlab geschickt.

Aufreinigung der DNA-Proben

Zur Aufreinigung der Proben wurde das "QIAEX II Gel Extraction Kit" (Firma Qia-gen) verwendet, das folgende Reagenzien enthält: Buffer QX1 Solubilization buffer 100 ml, Qiaex II Suspension 500 µl und Buffer PE Wash buffer 20 ml concentrate.

10-15 µl des mit Auftragspuffer versetzten PCR-Produktes der zu untersuchenden Probe wurden in einem 2%igen Agarose-Gel bei konstanten 70 Volt mindestens 45 Minuten aufgetrennt. Anschließend wurden unter UV-Licht (bei möglichst kurzer Belichtungszeit, da sonst die Gefahr der Bildung von Thymin-Dimeren besteht) die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und jeweils in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup gegeben.

Diese Agarose-Stücke wurden gewogen und für je 10 mg Agarose wurden 20 µl des Buffer QX1 in das Eppendorf-Cup hinzugefügt, mindestens jedoch 200 µl. Zu diesem Gemisch wurden 10 µl der Qiaex II Suspension hinzugegeben, an diese Glasmatrix bindet die DNA.

Um die Agarose in dem Puffer zu lösen wurde das Gemisch bis zur Lösung abwechselnd gevortext und ruhen gelassen, anschließend wurde diese Lösung ca. 15 Sekunden bei 13000 Rpm zentrifugiert und der so entstandene Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Um auch letzte Reste der Agarose zu entfernen wurden noch einmal 500 µl des Buffer QX1 in das Eppendorf-Cup gegeben, es wurde gevortext, anschließend zentrifugiert und der Überstand wieder mit der Wasserstrahlpumpe entfernt.

Das so entstandene Pellet wurde anschließend zweimal mit dem Buffer PE gewaschen, dazu wurden jeweils 500 µl des Puffers zu dem Pellet gegeben, das ganze wurde gevortext, zentrifugiert und mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Nach Trocknen des Pellets wurde es in H₂O (steril) aufgenommen, gevortext und nach kurzem Stehenlassen abzentrifugiert, wodurch sich die DNA von der Glasmatrix löst und nun frei im Überstand gelöst ist.

5 µl dieses Überstandes wurden für die Sequenzierung gebraucht, der Rest wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Vorbereitung zur Sequenzierung

Die Firma SeqLab benötigt einen der beiden verwendeten Primer zum Start der Sequenzierungsreaktion.

Zunächst wurden 2 µl der jeweiligen Stock-Lösung des Primers ohne GC-Clamp mit 10 µl H₂O (steril) versetzt, so dass eine Lösung mit 10 pmol/µl entstand.

Die Sequenzierung erfordert 20 pmol Primer in insgesamt 7 µl Volumen, so dass 2 µl der obigen Primer-Lösung mit 5 µl der DNA-Lösung zusammen in ein 200 µl Cup mit flachem Deckel gegeben wurden. Dieses Gemisch wurde dann an die Firma SeqLab zur Sequenzierung geschickt.

Beurteilung der Sequenzierungen

Die Auswertung und Analyse dieser Sequenzierungen erfolgte mit dem Computerprogramm "Bio Edit Sequence Alignment Editor, Version 7.0.0". Es wurde jeweils ein Alignment der sequenzierten Probe mit den Wildtyp-Sequenz aus den Online-Datenbanken des "Bioinformatic Harvester" (KIT, 2010) und des "Ensembl Genome Browsers" (EBI und WTSI, 2010) durchgeführt.

3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel unter Einsatz des Zusatzpaketes WinSTAT für Excel. Folgende Daten wurden, soweit verfügbar, aus der Datenbank der Marburger KHK-Präventions-Projektes erhoben: Alter, Geschlecht, BMI, Triglyzeride, Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin sowie das Vorliegen einer KHK, einer arteriellen Hypertonie oder eines Diabetes mellitus. Für die einzelnen erfassten metrischen Parameter wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung sowie das 95. Konfidenzintervall berechnet, für kategoriale Parameter wurden die absoluten sowie relativen Häufigkeiten bestimmt. Mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Testes für kontinuierliche Variablen sowie des Chi-Quadrat-Testes für stetige Variablen wurden die Parameter auf Normalverteilung geprüft, sofern die jeweilige Gruppengröße eine schließende Statistik zuließ. Bei Vorliegen von Normalverteilung erfolgte der Vergleich der Daten untereinander mit einem 2-seitigen T-Test für unabhängige Stichproben, die übrigen Daten wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Testes verglichen. Häufigkeiten bzgl. Diagnosen und Geschlecht wurden mit Kreuztabellen sowie dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson oder dem exakten Fisher-Test auf Zusammenhän-

ge mit dem jeweiligen Genotyp überprüft. Statistische Signifikanz wurde angenommen bei einem p-Wert $< 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Studiendesign

Alle Patienten wurden konsekutiv aus dem Kollektiv der Marburger-KHK-Präventions-Allianz rekrutiert, alle hatten der Durchführung dieser Studie zugestimmt. Ein Votum zur Durchführung von Studien in diesem Kollektiv wurde von der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg erteilt (Aktenzeichen Studie: 10/03). Die Einschlusskriterien für die Fallgruppe waren Triglyzeride > 150 mg/dl und ein BMI < 25 kg/m², für die Kontrollgruppe Triglyzeride < 150 mg/dl und ein BMI < 25 kg/m².

Die Fallgruppe umfasste 134 Patienten, die Kontrollgruppe 130 Patienten.

Wie bereits im Methodenteil dargestellt, wurde die DNA der Patienten zunächst aus den vorliegenden Vollblut-Proben isoliert und mittels PCR vervielfältigt. Das Mutationscreening erfolgte mit der DGGE, auffällige Proben wurden anschließend sequenziert. Die erhobenen Daten aus der Datenbank der Marburger KHK-Präventions-Allianz wurden mithilfe statistischer Tests auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen Mutationsträgern und Wildtypen untersucht.

4.2 Untersuchte Sequenzen

Die Sequenzen des Promotors der Lipoproteinlipase sowie der Hepatic Control Regions (HCR) und Multienhancer (ME) des Apolipoprotein E entnahmen wir den Online-Datenbanken des "Bioinformatic Harvester" (KIT, 2010) und des "Ensembl Genome Browsers" (EBI und WTSI, 2010).

4.2.1 Apolipoprotein E (Apo E)

In den Hepatozyten der Leber, wo der größte Teil des Apolipoproteins E produziert wird, kontrollieren 2 Hepatic Control Regions (HCR) die ApoE-Genexpression. In den Adipozyten des Fettgewebes dagegen erfolgte dies durch 2 Multienhancer (ME) (s. 1.2.2). Bei Störungen bzw. Veränderungen der Funktion dieser regulatorischen Elemente z.B. durch funktionell relevante Mutationen bzw. komplettes Fehlen der

Sequenzen ist die Expression von Apo E gestört mit vielfältigen Folgen auf den Stoffwechsel. Alle 4 Sequenzen liegen relativ weit vom Gen des Apo E entfernt und beeinflussen auch die Expression der anderen Gene des Clusters (Apo C-I, C-I', C-IV, C-II). Bedingt durch ihre wahrscheinliche Entwicklung durch Genduplikation sind die Sequenzen von HCR1 und HCR2 sowie ME1 und ME2 zu einem großen Teil homolog.

Die für die Leber-spezifische Expression funktionell wichtige Region in HCR1 umfasst 321 bp (Basen 5-325) (Dang et al., 1995), HCR2 enthält eine zu ca. 85% homologe Region (Allan et al., 1995b). Innerhalb dieser Region finden sich wichtige Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie z.B. das leberspezifische Motif TGTGGC oder Bindungsstellen für HNF3 oder HNF4. Benachbart zu HCR1 befindet sich eine Alu Sequenz (ab Position 525), diese repetitiven DNA-Sequenzen finden sich häufig im menschlichen Genom, sie hat jedoch wie auch die dazwischenliegenden Basen keine tragende Rolle für die Expression, obwohl auch sie Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren enthalten. Abbildung 9 zeigt die starke Homologie von HCR1 und HCR2.

HCR1	CCAGGGATGG	AGAGAAAGAG	ATGAGAGTGG	TTTGGGGGCT	TGGTGACTIONA	GAGAACAGAG
HCR2	CCAGGGGTAG	AGAGAAAGAT	TTGAGAGTGG	TTTTGGGGCT	TGGTGACTIONA	GAGAACAGAG
1						
HCR1	CTGCAGGCTC	AGAGGCACAC	AGGAGTTTCT	GGGCTCACCC	TGCCCCCTTC	CAACCCCTCA
HCR2	TTGCAGGCTC	TG-----	-----TTTTT	GGGCCGCC	TGCCCCCTTC	CGACCTCTTA
61						
HCR1	GTTCCATCC	TCCAGCAGCT	GTTTGTGTGC	TGCCTCTGAA	GTCCACACTG	AACAAACTTC
HCR2	GTTCCATCC	TCCAGCAGCT	GTTTGTGTGC	TGCCTCTGAA	GTCCACACTG	AATGACCTTC
121						
HCR1	AGCCTACTCA	TGTCCCTAAA	ATGGGCAAAC	ATTGCAAGCA	GCAAACAGCA	AACACACAGC
HCR2	AGCCTGTTCC	CGTCCCTGAT	ATGGGCAAAC	ATTGCAAGCA	GCAAACAGCA	AACACATAGC
181						
HCR1	CCTCCCTGCC	TGCTGACCTT	GGAGCTGGGG	CAGAGGTCAG	AGACCTCTCT	GGGCCCATGC
HCR2	CCTCCCTGCG	TGCTGACCTT	GGAGCTGGGG	CAGAGGTCAG	AGACCTCTCA	GGGCCCATAC
241						
HCR1	CACCTCCAAC	ATCCACTCGA	CCCTTGGA	TTTCGGTGGA	GAGGAGCAGA	GGTTGTCCCTG
HCR2	CACCTCCAAC	ATCCACTCGA	TCTCTTGGA	TTTGGTGGA	GAGGAGCAGA	GGTTGTCCCTG
301						
HCR1	GCCGTGGTTA	GGTAGTGTGA	GAGGGTCCCG	GTTCAAAACC	AC---TTGCT	GGGTGGGGAG
HCR2	GCCGTGGTTA	GGTAGTGTGA	GAGGGTCCCG	GTTCAAAACC	ACCACTTGCT	GGTTGAGGAG
361						
HCR1	TCGTAGTAA	GTGGCTATGC	CCCGACCCCG	AAGCCTGTTT	CCCCATCTGT	ACAATGGAAA
HCR2	TCGTAGTAA	GTGGCTGCGC	CCCCACCCCTG	AGGCTTGT	CTCCATCTGT	ACAATGGAAA
421						
HCR1	TGATAAAGAC	GCCCACCTGA	TAGGGTTTTT	GTGGCAAATA	AACATTTGGT	TTTTTTGTTT
HCR2	TGATGAAGAT	GCCCACCTGA	TAGGGTTTTT	GTGGCAAATA	AGTAAGTAGT	TTTTTTGTTT

Abbildung 9: Homologie Apo E HCR1 und HCR2, jeweils mit flankierenden Sequenzen, funktionell wichtige Region in schwarz, Sequenzunterschiede sind schwarz hinterlegt (EBI und WTSI, 2010), Nummerierung nach (Dang und Taylor, 1996)

ME1 und ME2 unterscheiden sich nur durch 29 Basenpaare und sind damit zu 95% homolog, Abbildung 10 zeigt diese Homologie. ME1 ist insgesamt 620 bp lang, ME2 619 bp. In beiden Fragmenten finden sich zahlreiche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie LXR, GR und C/EBP (s. 1.2.2).

ME1	TCCGCCCACC	TTGGCCTCCC	AAAGTTCTGG	GAATACAGGC	GTGAGCCACT	GCAACCAGCC
ME2	TCCTCCTGCC	TCAGCTTCCC	AAAGTGGTGG	GATTATAGGT	GTGAGCCACT	GCGCCCAGTC
	1					
ME1	AGTAGCCCC	ATCTTTGCC	CTCGCTGAGC	CCTACTGGAT	GTTCTTGGTT	ATGCGACAGT
ME2	AGTAGCCCC	TCTTTGCC	CTCACTGAGC	CCTACTGGAT	GTTCTTGGTT	GTGTGACAGT
	61					
ME1	TTCCCCATCT	ATTAAAGAGA	AACCCCTATA	GCAGAGGGGA	GGATGAGGTT	GGAAAAGCAG
ME2	TTCCCCATCT	ATTAAACAGA	AACCCCTATA	GCAGAGGGGA	GGATGAGGTT	GGAAAATCAG
	121					
ME1	GAGCATTGTT	ATGCTATTCT	TGTGGGGTCT	GGGAAGCAGA	CATCTGGGTG	GATGTTTGGG
ME2	GAGCATTGTT	ATCTATTCT	TGTGGGATCG	GGGAAGCAGA	CATCTGGGTG	GATGTTTGGG
	181					
ME1	GGGTGCTGGG	CTTAGTTGGG	GAAGTAGGGG	GGCCCCTGGG	GCTGACAGGG	ACTGGAAGCT
ME2	GAATGCTGGG	CTCAGTTGAG	GAAGTAGGGG	GGCCCCTGGG	GCTTACAGGG	ACTGGAAGCT
	241					
ME1	CTGAGCTGGC	CAGAGGGATG	TTGCAATCCT	GCCAGGGTCT	TGTCTATGCT	GTCCCTTTTCA
ME2	CTGAGCTGGC	CAGAGGGATG	TTGCAATCCT	GCCAGGGTCT	TGTCTATGCT	GTCCCTTTTCA
	301					
ME1	CAACCATCCC	CCTACTGCCA	GGCTGACACG	TGTTTGGGG	GGCACAAGGC	CAGCCAACT
ME2	CAACCATCCC	CCTACCGCCA	GGCTGACACG	TGTTTGGGG	GGCACAAGGC	CAGCCGACT
	361					
ME1	AGAGTCTGAG	GCTAGGCGGA	GGACACCCTC	CCCACAGCT	GCCAGGGTCA	CTGGCGGTCA
ME2	AGAGTCTGAG	GCTGGCTGA	GGACACCCTC	CCCATCAGCT	GCCAGGGTCA	CTGGCGGTCA
	421					
ME1	AAGGCAGCTG	GTGGGGAAGG	CATTGGACTC	CAGCCCTGGG	GGACGGATGT	AGTGATGGTG
ME2	AAGGCAGCTG	GTGGGGAAGG	AATTGGACTC	CAGCCCTGGG	GGACGGATGT	GGTGATGGTG
	481					
ME1	GGAAGCAGGC	TTGGTGCCAG	GAGGGGCGTC	AGAGGGTGAA	TAAAAGCAGA	TAGAGTGTTT
ME2	GGAAGCAGGC	TTGGTGCCAG	GAGGGGCATC	AGAGGGTGAA	TAAGAGCAGA	TAGAGTGTTT
	541					
ME1	GGGGGAGGTA	GCCAGCCAAA	GGGGGTGAGG	CCCGGTGGAA	GGGAAGAAGG	GACATACAG
ME2	GGGGGAGGTA	GCCAGCCAAA	GGGGGTGAGG	CCCGGTGGAA	GGGAAGAAGG	GGCATACT
	601					
ME1	CAGAGCTTTG	CAGCTGACGG	TTTTAATTTT	TTGAGATGGG	GTCTC---T	GTCCCACCAG
ME2	CAGAGCTTTG	CAGCTGAAGG	TTTTAATTTT	TTGAGATGGG	GTCTCACTCT	GTCTCACCAG

Abbildung 10: Homologie Apo E ME1 und ME2, jeweils mit flankierenden Sequenzen, ME1 bzw. ME2 in schwarz, Sequenzunterschiede sind schwarz hinterlegt (Shih et al., 2000; EBI und WTSI, 2010)

4.2.2 Lipoproteinlipase (LPL)

Die Expression der LPL wird durch ihren Promotor gesteuert, s. Punkt 1.3.3. Er enthält zahlreiche regulatorische Elemente, die teilweise die basale Expression, teil-

weise aber auch die ligandenvermittelte Expression vermitteln. Wir haben uns in dieser Arbeit auf die ersten ca. 800 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart beschränkt, in denen sich die wichtigsten Elemente befinden, welche in Abbildung 11 dargestellt sind.

-780	GCACTGATCT	ACTTTTGGTC	TCTATGGATT	TGTCTATTTG	TGGACACTTT	AAATGGAATC
				<i>LP-α</i>		
-720	ATACAATATG	TGTCTTTTGC	GACTATCTTC	TTTCACTTAT	CATAACTCAA	TACGGCTTTA
-660	GATTATTTGA	CCTCGATGTT	CTGCCTCTGA	ACATAAAATA	TTATCCTTGC	ATTCCTTGAT
-600	GAGTTTGAGG	ATTGAGAATA	ATTTGCATGA	GACAAAAATT	AGAACTAGT	TAGAGCAAGT
				<i>CCAAT-box</i>		
-540	AGGCTTTTCT	CCATCACATA	AGCTGATCCA	TCTTGCCAAT	GTTAAAAACAC	CAGATTGTAC
				<i>LP-β</i>		
-480	AAGCACAAGC	TGGGACGCAA	TGTGTGTCCC	TCTATCCCTA	CATTGACTTT	GCGGGGGTGG
-420	GGATGGGGTG	CGGGGTGAGT	GAGGGAGGAC	TGCAAGTGAC	AAACAGGATT	CGTCAAAAAGA
-360	GAGGTGTATT	AAAGTGCCGA	TCAAATGTAA	TTTAACAGCT	AAACTTTCCC	TCCTTGGA
-300	ACAGGTGATT	GTTGAGTATT	TAACGTGAAT	CGATGTAAAC	CTGTGTTTGG	TGCTTAGACA
-240	GGGGGCCCCC	GGGTAGAGTG	GAACCCCTTA	AGCTAAGCGA	ACAGGAGCCT	AACAAAGCAA
			<i>PPRE</i>			
-180	ATTTTCCCGT	CTGCCCTTTC	CCCCTCTTCT	CGTTGGCAGG	GTTGATCCTC	ATTACTGTTT
				<i>SRE</i>		<i>CCAAT-box</i>
-120	GCTCAAACGT	TTAGAAGTGA	ATTTAGGTCC	CTCCCCCAA	CTTATGATTT	TATAGCCAAT
			<i>Octamer</i>			
-60	AGGTGATGAG	GTTTATTTGC	ATATTTCCAG	TCACATAAGC	AGCCTTGGCG	TGAAAACAGT
			<i>Transkriptionsstart</i>			
+1	GTCAGACTCG	ATCCCCCTC	TTCCTCCTCC	TCAAGGGAAA	GCTGCCCACT	TCTAGCTGCC

Abbildung 11: Lipoproteinlipase Promotor; wichtige regulatorische Sequenzen sind markiert, schwarz: untersuchte Fragmente; grau: nicht untersuchte Fragmente, (Deeb und Peng, 1989; Kirchgessner et al., 1989a; Enerback et al., 1992; Preiss-Landl et al., 2002; Merkel et al., 2002a)

Für die Mutations-Analyse mit der DGGE ist das Schmelzverhalten der DNA- Fragmente von großer Bedeutung (s. Punkt 3.2.3), dieses wiederum ist abhängig von ihrer Sequenz. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, unterteilten wir den zu untersuchenden DNA-Bereich des LPL-Promotor daher in 2 Fragmente, die unabhängig voneinander untersucht wurden. Das 1. Fragmente (LPL-P1) enthält die Basen von Position -743 bis -383 mit den regulatorischen Elementen LP- α und LP- β , das 2. Fragment erstreckt sich von Position -272 bis -20 und enthält weitere wichtige regulatorische Sequenzen.

Mit diesen beiden Fragmenten werden die meisten der in der von uns ausgewerteten Literatur beschriebenen regulatorischen Elemente abgedeckt.

4.3 PCR

4.3.1 Primerdesign

Die Homologie von HCR1 und 2 sowie ME1 und 2 des Apolipoprotein E erschwert es, Primer zu designen, die zur spezifischen Amplifikation des gewünschten Fragmentes führen. Besonders für solche Fragmente bietet sich eine Nested-PCR-Amplifikationsstrategie an, in der zunächst ein größeres Fragment amplifiziert wird, für das man effektivere Primer finden kann, um dann in einem zweiten Schritt das gewünschte Fragment in größerer Menge spezifisch zu amplifizieren. Bedingt durch diese Umstände umfassen die von uns untersuchten Fragmente mehr Basen als nur die funktionell relevanten Regionen.

Auch für die Fragmente des LPL-Promotors wurde das Prinzip der Nested-PCR angewendet. Dazu wurden LPL-P1 und -P2 zunächst in einer gemeinsamen PCR in einem einzigen Fragment amplifiziert, um eine möglichst große Menge an DNA für die nachfolgende DGGE zu gewinnen.

In Tabelle 14 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgeführt.

Tabelle 14: verwendete Primer

Fragment	Fragmentlänge	Primer-Lokalisation	Primer-Sequenz
Apo E ME1	962 bp	äußere PCR downstream 5'-3'	TGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGAC
		äußere PCR upstream 5'-3'	CGAGCGTGTTGGCGCATG
	723 bp	Nested-PCR downstream 5'-3':	^a TGCAACCAGC
		Nested-PCR upstream 5'-3':	CAGCCTGGTGGGACAG

Fragment	Fragmentlänge	Primer-Lokalisation	Primer-Sequenz
Apo ME2	967 bp	äußere PCR downstream 5'-3'	CACCTAGGCCTCCCAAAGTGCACAGAT
		äußere PCR upstream 5'-3'	TGAGCGTGGTGGCGCACA
	721 bp	Nested-PCR downstream 5'-3':	^a TGCGCCAGT
		Nested-PCR upstream 5'-3':	TGGTGAGACAGAGTG
Apo HCR1	779 bp	äußere PCR downstream 5'-3'	TCTTTTTTACCCTAGACTTTCCTACC
		äußere PCR upstream 5'-3'	GGAGGCTGAGGCAGGGGAAGGTTGTG
	647 bp	Nested-PCR downstream 5'-3'	GATTCAGACTAGGGCC
		Nested-PCR upstream 5'-3'	^b CAGAGCAAAC
Apo HCR2	777 bp	äußere PCR downstream 5'-3'	CCTTTTTTACCCCAGCCTTCCCTGCA
		äußere PCR upstream 5'-3'	CTTGAACCCGGGAGGTGGAGTTGGCA
	645 bp	Nested-PCR downstream 5'-3'	GATTCAGACCAGGGTA
		Nested-PCR upstream 5'-3'	^b CAGAGTGAGA
LPL-Multiplex	1013 bp	äußere PCR downstream 5'-3'	GTAATCTAGAACATTGTCATC
		äußere PCR upstream 5'-3'	CGCGGACCGACTGATGAGCC
LPL-P1	389 bp	Nested-PCR downstream 5'-3'	^a TTGTGGACACTTTAAATGGAAT
		Nested-PCR upstream 5'-3'	CACTTGCAGTCCTCCCTCACTCAC
LPL-P2	263 bp	Nested-PCR downstream 5'-3'	TAGAGTGAACCCCTTAAGCTA
		Nested-PCR upstream 5'-3'	^b GGCTGCTTATGTGACTGGAAATA

^a GC-Clamp1 (52 bp): CgccccgcgcgccccgcgcccTccccgcgccccgcgcccCccccCC

^b GC-Clamp2 (52 bp): GgggggGgcccggggcggggcggcgggAcgggcgccccgcgcccgggcG

4.3.2 Bestimmung der optimalen PCR-Bedingungen

Für jedes untersuchte Fragment wurden zunächst die jeweils optimale Zusammensetzung des Mastermixes sowie die optimale Annealing-Temperatur für die Primer experimentell evaluiert. Hierzu führten wir PCRs mit unterschiedlichen Bedingungen durch, in dem wir einerseits die Zusammensetzung des Mastermixes veränderten und andererseits die Primer-Annealing-Temperaturen zwischen 56°C und 62°C variierten. Tabelle 15 zeigt die verschiedenen getesteten PCR-Bedingungen, Tabelle 16 die beiden verwendeten Programme des Thermalcyclers.

Tabelle 15: getestete PCR-Bedingungen, Ansatz jeweils für 1 PCR

Reagenzien	Menge in µl											
10x PCR Buffer	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
DMSO/Glycerol 1:1			2,5									
Betaine				2,5				2,5				
Betaine/Glycerol 1:1					2,5				2,5			
Betaine/DMSO 1:1						2,5				2,5		
Betaine/DMSO/ Glycerol 1:1:1							2,5					2,5
50 mM MgCl ₂	1,5	0,75	1,16	1,5	1,5	1,5	1,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
25 mM dNTPs	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
5 pmol Primer	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
H ₂ O	10,7	11,45	8,95	8,2	8,2	8,2	8,2	8,95	8,95	8,95	8,95	8,95
Taq Polymerase	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Bedingung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	

Tabelle 16: benutzte Programme des Thermalcyclers für die PCR

Programmschritt	Programm 1	Programm 2
1	94 °C für 5 Min.	94 °C für 5 Min.
2 Denaturierung	94 °C für 20 Sekunden	94 °C für 20 Sekunden
3 Annealing	56 °C für 30 Sekunden	62 °C für 30 Sekunden
4 Extension	72 °C für 3 Minuten	72 °C für 3 Minuten
5	go to 2 44 times	go to 2 44 times
6	20 °C für 5 Minuten	20 °C für 5 Minuten
7	Ende	Ende

4.3.3 Amplifizierung der Fragmente

Für die schlussendlich durchgeführten Experimente wurden die im folgenden Abschnitt beschriebenen Bedingungen verwendet, da sie in den PCR-Evaluierungsexperimenten die besten Ergebnisse lieferten.

Amplifizierung von HCR1, HCR2, ME1 und ME2 des Apolipoprotein E

Alle 4 Fragmente wurden zunächst in einer gemeinsamen Multiplex-PCR vervielfältigt, dazu wurde die Bedingung 10 sowie das Programm 1 mit einer Annealing-Temperatur von 56 °C verwendet (s.o.). In der Primer-Lösung befanden sich neben

den Primern für die Apo E Fragmente zu gleichen Anteilen auch Primer für folgende weitere Fragmente: Promotor des Apolipoproteins A-I, Promotor des Apolipoproteins A-IV, Enhancer des Apolipoproteins C-III. Diese Sequenzen wurden zeitgleich ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe untersucht (Daten noch nicht veröffentlicht).

Das Produkt der Multiplex-PCR wurde in 150 µl H₂O (steril) aufgenommen und sorgfältig gevortext.

Die Nested-PCRs, in denen der GC-Clamp für die DGGE zu den Sequenzen hinzugefügt wurde, wurden ebenfalls mit dem Programm 1 durchgeführt, für die Fragmente HCR1, HCR2 und ME1 wurde die Bedingung 1 verwendet, für ME2 Bedingung 2.

Nach erfolgter PCR wurden die amplifizierten Fragmente in einem analytischen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf ihre korrekte Fragmentlänge überprüft. Die Ergebnisse der Agarose-Gel-Elektrophorese sind in den folgenden Abbildungen 12-15 aufgezeigt.

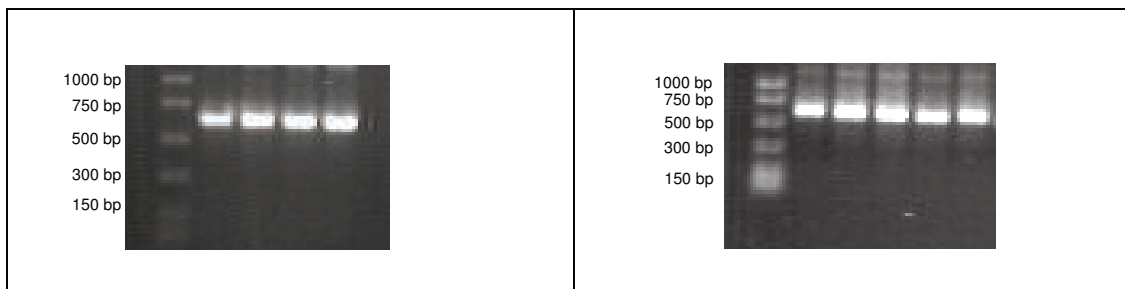


Abbildung 12: Apo E HCR1 (647 bp)

Abbildung 13: Apo E HCR2 (645 bp)

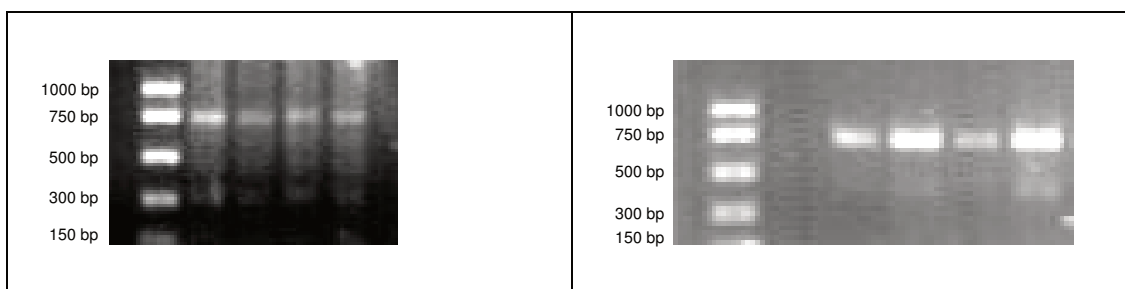


Abbildung 14: Apo E ME1 (723 bp)

Abbildung 15: Apo E ME2 (721 bp)

Amplifizierung von LPL-P1 und LPL-P2 der Lipoproteinlipase

Da die beiden untersuchten Fragmente des Promotors der Lipoproteinlipase sehr nah beieinander liegen, wurden sie in der ersten PCR in einem einzigen Fragment amplifiziert. Als Primer wurde die "working-solution" für LPL verwendet, der Mastermix entsprach Bedingung 1 und die Annealing-Temperatur betrug 56°C (Programm 1).

Auch dieses Produkt wurde mit 150µl H₂O (steril) verdünnt und vor dem weiteren Gebrauch sorgfältig gevortext. Die Nested-PCR erfolgte für LPL-P1 und LPL-P2 jeweils mit Programm 2 und dem Mastermix der Bedingung 1.

Auch diese PCRs wurden mit einer Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft, die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen 16 und 17 dargestellt.

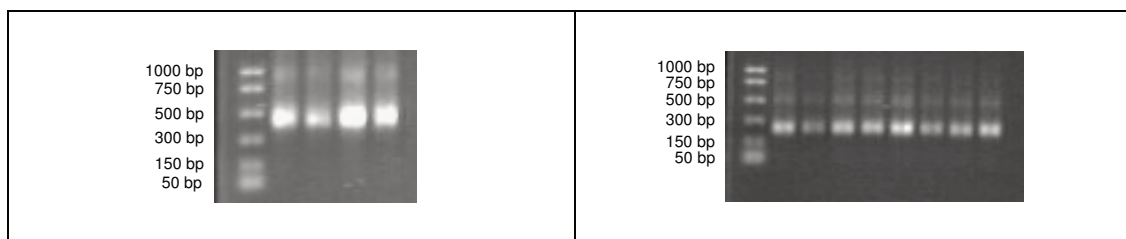


Abbildung 16: LPL-P1 (389 bp)

Abbildung 17: LPL-P2 (263 bp)

4.4 DGGE

4.4.1 Schmelzkurven der untersuchten Fragmente

Wie bereits unter Punkt 3.2.3 dargestellt wurde, ist es für die Mutationsdetektion mithilfe der DGGE wichtig, dass die zu untersuchende Region nicht in der Domäne mit der höchsten Schmelztemperatur liegt. Durch Anfügen eines GC-Clamps an das Fragment konnte dies in allen 6 untersuchten Fragmenten erreicht werden. Mit Hilfe des Computer-Programms Winmelt™ stellten wir das zu erwartende Schmelzverhalten der Fragmente dar, exemplarisch zeigen die Abbildungen 18 und 19 den Graphen des Fragmentes Apo E ME1 einmal vor und einmal nach Einfügen eines GC-Clamps.

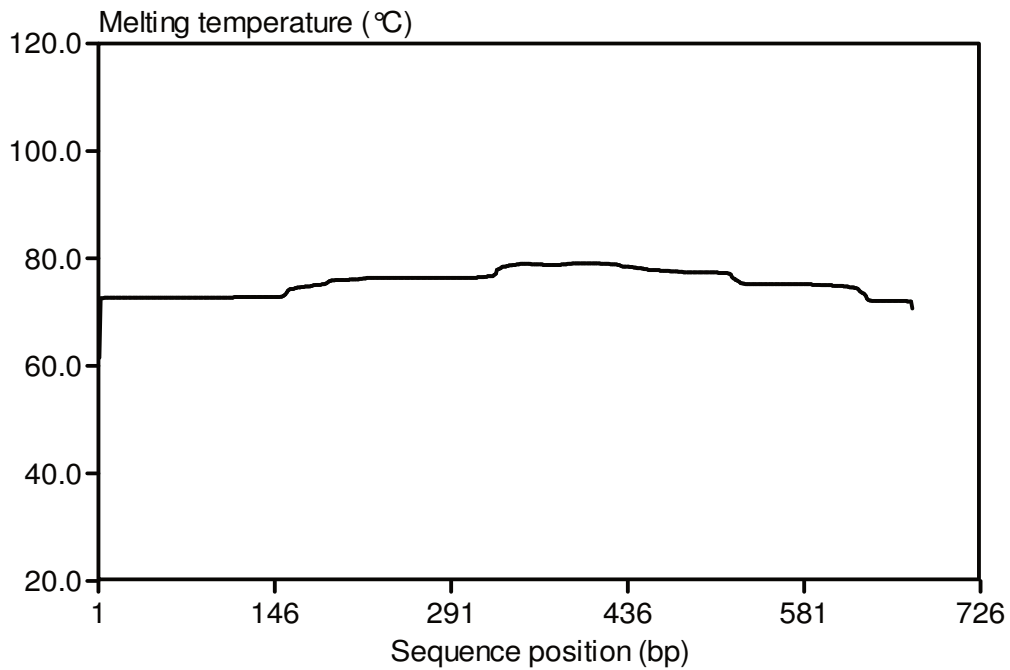


Abbildung 18: Schmelzkurve von ME1 vor Einfügen eines GC-Clamps

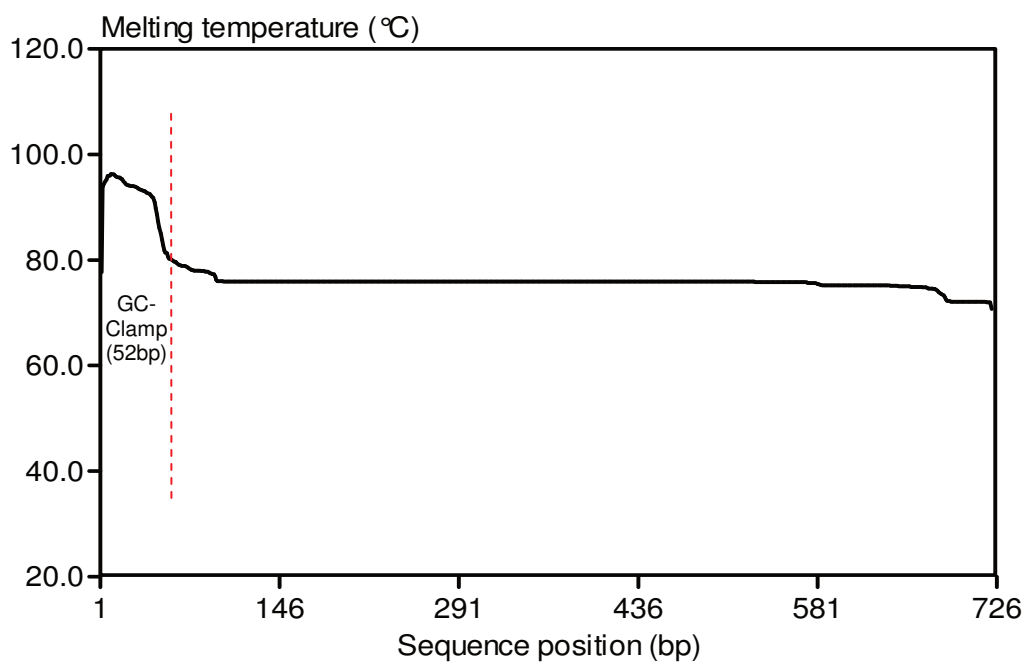


Abbildung 19: Schmelzkurve von ME1 nach Einfügen eines GC-Clamps

In der Abbildung 19 lässt sich sehr schön erkennen, dass der Großteil des Fragments durch Anfügen eines GC-Clamps eine gemeinsame Schmelzdomäne erhält, so dass Basensubstitutionen innerhalb dieses Bereiches gut zu erkennen sein

müssten. Im Bereich des GC-Clamps ist die benötigte Schmelztemperatur deutlich höher als im restlichen Fragment, so dass ein komplettes Aufschmelzen des Fragmentes verhindert wird.

4.4.2 Bestimmung der optimalen DGGE-Bedingungen

Die Computer-Simulation mit Winmelt™ zeigt den theoretisch optimalen Gradienten für die DGGE der einzelnen Fragmente, es gibt jedoch noch zahlreiche andere Einflussfaktoren, die in der Simulation nicht berücksichtigt werden. Um auch in der Praxis das bestmögliche Ergebnis zu erzielen wurden zu Beginn der Arbeit zunächst einige Versuche mit unterschiedlichen Gel- und Elektrophorese-Bedingungen durchgeführt. Diese sind in den nachfolgenden Tabellen 17 und 18 zusammengefasst.

Tabelle 17: getestete Gel-Bedingungen für die DGGE-Analysen

Denaturans-Gradient	Acrylamid-Gehalt bzw. Acrylamid-Gradient
0-80%	4%
0-80%	6%
0-80%	6-10%
30-50%	8%
30-50 %	9%
50-65%	6-10%
50-65%	7,5%
50-65%	8%
50-65%	9%
60-70%	6%
60-70%	6-10%

Tabelle 18: getestete Elektrophorese-Bedingungen

Volt (V)	Zeit (h)	Temperatur (°C)
120	6	50
120	6	60
120	7	60
120	8	50
170	6	60
200	6	50
200	6	60

Zusätzlich zu den oben angegebenen untersuchten DGGE-Parametern variierten wir noch die jeweils applizierte PCR- Probenmenge zwischen 5 µl, 10 µl, 15 µl und 20 µl.

Für jedes Fragment wurden so die optimalen Bedingungen in Evaluierungs-Experimenten ermittelt. Die folgenden Tabellen 19-22 zeigen die für unsere Fragmente benötigten Gellösungen.

Tabelle 19: Zusammensetzung 0% denaturierende Lösung mit 6% Acrylamid

Reagenzien	Menge
Acrylamid	15 ml
50x TAE-Puffer	2 ml
Glycerol (ultra pure)	10 ml
H ₂ O (bidest)	ad 100 ml

Tabelle 20: Zusammensetzung 80% denaturierende Lösung mit 10% Acrylamid

Reagenzien	Menge
Harnstoff	33,6 g
Formamid	32 ml
Acrylamid	25 ml
50x TAE-Puffer	2 ml
Glycerol (ultra pure)	10 ml
H ₂ O (bidest)	ad 100 ml

Tabelle 21: Zusammensetzung 60% denaturierende Lösung mit 6% Acrylamid

Reagenzien	Menge
Harnstoff	25,2 g
Formamid	24 ml
Acrylamid	15 ml
50x TAE-Puffer	2 ml
Glycerol (ultra pure)	10 ml
H ₂ O (bidest)	ad 100 ml

Tabelle 22: Zusammensetzung 70% denaturierende Lösung mit 10% Acrylamid

Reagenzien	Menge
Harnstoff	29,4 g
Formamid	28 ml
Acrylamid	25 ml
50x TAE-Puffer	2 ml
Glycerol (ultra pure)	10 ml
H ₂ O (bidest)	ad 100 ml

Die Lösungen wurden gemischt, filtriert (Filter: Minisart® 0,2 µl) und anschließend bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Für den oberen Bereich des Geles, in dem sich die Taschen für die Proben befinden, wurde eine extra Stacking-Lösung mit hohem Acrylamid-Gehalt hergestellt, die es erleichterte, den Kamm zu ziehen ohne die Taschen zu beschädigen. Tabelle 23 zeigt das hierfür benötigte Rezept.

Tabelle 23: Zusammensetzung Stacking (0% Denaturans, 10% Acrylamid)

Reagenzien	Menge
Acrylamid	25 ml
50x TAE-Puffer	2 ml
Glycerol (ultra pure)	10 ml
H ₂ O (bidest)	ad 100 ml

4.4.3 DGGE der einzelnen Fragmente

DGGE der regulatorischen Elemente des Apolipoprotein E

Für die einzelnen Fragmente der regulatorischen Elemente des Apolipoprotein E-Gens wurden die in der folgenden Tabelle 24 aufgeführten Gele und Elektrophorese-Bedingungen verwendet, bei allen Gelen handelte es sich um Doppelgradienten-Gele.

Tabelle 24: DGGE der regulatorischen Elemente des Apolipoprotein E-Gens

Fragment	Gel		Elektrophorese-Bedingungen			aufgetragene Menge (μ l)
	Denaturans-Gradient (%)	Acrylamid-Gradient (%)	Volt (V)	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Zeit (h)	
ME1	0-80	6-10	120	50	6	10
ME2	0-80	6-10	120	50	6	10
HCR1	60-70	6-10	200	60	6	5
HCR2	60-70	6-10	200	60	6	10

DGGE der Elemente des Promotors der Lipoproteinlipase

Für die einzelnen Fragmente des Promotors der Lipoproteinlipase wurden die in Tabelle 25 dargestellten Gele und Elektrophorese-Bedingungen verwendet, auch bei diesen Untersuchungen wurden in beiden Fällen Doppelgradienten-Gele verwendet.

Tabelle 25: DGGE der Fragmente des Promotors der Lipoproteinlipase

Fragment	Gel		Elektrophorese-Bedingungen			aufgetragene Menge (μ l)
	Denaturans-Gradient (%)	Acrylamid-Gradient (%)	Volt (V)	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Zeit (h)	
LPL-P1	0-80	6-10	120	50	6	5
LPL-P2	0-80	6-10	120	60	6	15

4.5 Identifizierte Mutationen

Die in der DGGE identifizierten Proben mit auffälligem Bandenmuster wurden für die DNA-Sequenzierung aufgearbeitet und anschließend durch eine kommerzielle Firma für Auftragssequenzierungen (Firma SEQLAB GmbH, Göttingen) zusammen mit jeweils einer unauffälligen Probe als Wildtyp-Kontrolle (s. Punkt 3.2.4) sequenziert. Bei einigen Fragmenten gab es in der DGGE keine Auffälligkeiten, in diesem Fall wurden zur Kontrolle exemplarisch einige willkürlich ausgesuchte Proben zur Sequenzierung geschickt.

4.5.1 Mutationen in regulatorischen Elementen von Apo E

HCR1

Im Fragment HCR1 wurden keine Mutationen gefunden, alle Proben lieferten identische Bandenmuster in der DGGE und die sequenzierten Proben entsprachen der publizierten Sequenz.

HCR2

Auch bei HCR2 waren alle Banden in der DGGE identisch, wir konnten keine Mutationen nachweisen.

ME1

Alle Proben des Fragmentes ME1 zeigten in der DGGE ein identisches Bandenmuster, die Sequenzierung 3er willkürlich ausgewählter Proben ergab bei allen eine identische Basenabfolge.

ME2

Im Fragment ME2 wurden keine Mutationen gefunden, in der DGGE lieferten alle Proben identische Banden, alle sequenzierten Proben entsprachen der publizierten Sequenz.

Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse noch einmal zusammen.

Tabelle 26: Überblick über gefundene Mutationen Apolipoprotein E

Fragment	Fallgruppe (TG > 150 mg/dl, BMI < 25 kg/m ²)	Kontrollgruppe (TG < 150 mg/dl, BMI < 25 kg/m ²)
HCR1	keine Auffälligkeiten im Bandenmuster	keine Auffälligkeiten im Bandenmuster
HCR2	keine Auffälligkeiten im Bandenmuster	keine Auffälligkeiten im Bandenmuster
ME1	keine Auffälligkeiten im Bandenmuster	keine Auffälligkeiten im Bandenmuster
ME2	keine Auffälligkeiten im Bandenmuster	keine Auffälligkeiten im Bandenmuster

4.5.2 Mutationen im Promotor der Lipoproteinlipase

LPL-P1

Im Fragment LPL-P1 wurde keine Mutation gefunden, auch hier waren alle Proben in der DGGE identisch und alle sequenzierten Proben entsprachen der publizierten Sequenz.

LPL-P2

Im Fragment LPL-P2 konnten 2 unterschiedliche Mutationen nachgewiesen werden, die eine befand sich an Position -93, die andere an Position -95. In beiden Fällen handelte es sich bei allen betroffenen Personen um heterozygote Anlageträger, kein Patient war Träger beider Mutationen. Die Mutation -93T/G (K) war insgesamt bei 8 Patienten vorhanden, 6 davon waren Teil der Fallgruppe, 2 gehörten zur Kontrollgruppe. Die Mutation -95G/T (K) konnte insgesamt 6 mal nachgewiesen werden, bei je 3 Patienten der Fallgruppe und der Kontrollgruppe.

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der DGGE-Untersuchungen aufgezeigt. Abbildung 21 zeigt die Sequenzierung der DNA-Proben mit auffälligem Bandenmuster.

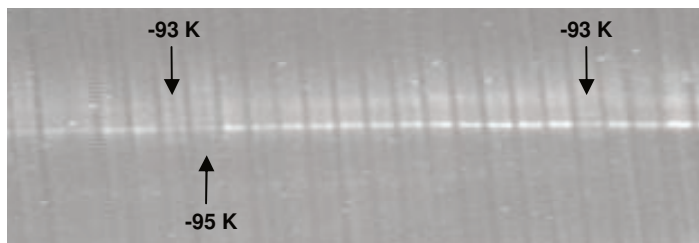


Abbildung 20: DGGE LPL-P2, Darstellung von 2 heterozygoten Mutanten -93T/G (K) und einer heterozygoten Mutante -95G/T (K) im Vergleich mit Wildtypen

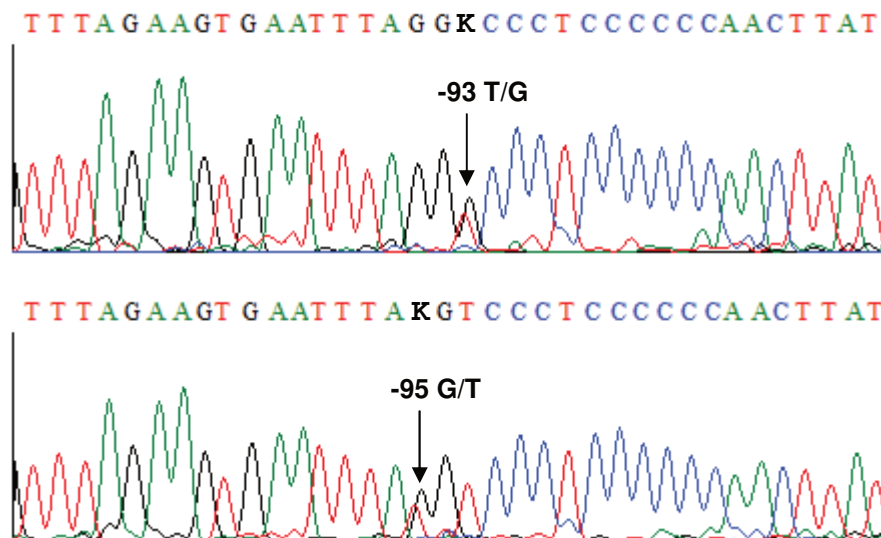


Abbildung 21: Mutation -93T/G (K) und -95G/T (K)

Bei beiden Mutationen handelt es sich um SNPs, die in der Literatur vorbeschrieben sind.

Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse bzgl. der Lipoproteinlipase noch einmal zusammen.

Tabelle 27: Überblick über gefundene Mutationen Lipoproteinlipase

Fragment	Fallgruppe (TG > 150 mg/dl, BMI < 25 kg/m ²)	Kontrollgruppe (TG < 150 mg/dl, BMI < 25 kg/m ²)
LPL-P1	kein SNP gefunden	kein SNP gefunden
LPL-P2	6x -93T/G 3x -95G/T	2x -93T/G 3x -95G/T

4.6 Statistische Auswertung

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit und Übersichtlichkeit werden die homozygoten Wildtyp-Allelträger in diesem Kapitel kurz Wt-Allelträger genannt, die heterozygoten Mutations-Allelträger kurz Mut-Allelträger. Bei der Beurteilung v.a. der Lipidparameter ist zu bedenken, dass eine große Zahl der untersuchten Patienten aufgrund ihres Risikoprofils unter medikamentöser Therapie standen, die nicht erfasst wurde. Bis auf wenige Ausnahmen waren die Angaben in der Datenbank des Marburger KHK-Präventionsprojektes vollständig, fehlende Daten daher zur besseren Berechenbarkeit nicht berücksichtigt.

4.6.1 Verteilung der untersuchten Parameter im Kollektiv

Insgesamt wurde die DNA von 264 normalgewichtigen Patienten ($\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$) auf Mutationen in den beschriebenen regulatorischen Sequenzen untersucht, 134 gehörten der Fallgruppe mit hohen Triglyzeriden ($> 150 \text{ mg/dl}$) an, 130 der Kontrollgruppe mit normalen Triglyzeriden ($< 150 \text{ mg/dl}$).

Aufgrund der Einschlusskriterien für die Gruppenzuordnung war der durchschnittliche BMI in beiden Gruppen annähernd gleich ($22,80 \pm 1,65$ vs. $22,96 \pm 1,52 \text{ kg/m}^2$). Bezüglich des Alters ($61,86 \pm 13,58$ vs. $60,82 \pm 16,48$ Jahre) sowie der Geschlechterverteilung gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Männer waren in beiden Gruppen beinahe doppelt so häufig vertreten wie Frauen ($63,43 : 36,57\%$ vs. $62,31 : 37,69\%$), dies ist auf die deutlich größere Zahl von Männern im Kollektiv der Marburger KHK-Präventions-Allianz zurückzuführen.

Das gesamte Lipidprofil der beiden Gruppen jedoch unterschied sich aufgrund der von uns vorgenommenen Einteilung wie erwartet statistisch signifikant voneinander, in der Fallgruppe waren neben den Triglyzeriden ($291,67 \pm 83,38$ vs. $93,41 \pm 29,35 \text{ mg/dl}$) auch das Gesamt-Cholesterin ($199,76 \pm 47,47$ vs. $172,77 \pm 41,59 \text{ mg/dl}$, $p < 0,01$) sowie das LDL-Cholesterin ($118,73 \pm 42,36$ vs. $107,59 \pm 35,92 \text{ mg/dl}$, $p < 0,05$) signifikant höher als in der Kontrollgruppe, das HDL ($38,66 \pm 12,70$ vs. $46,50 \pm 14,46 \text{ mg/dl}$, $p < 0,01$) lag signifikant niedriger.

Die Prävalenz der KHK war jedoch in beiden Gruppen annähernd gleich ($65,67\%$ vs. $69,27\%$, $p = 0,54$), auch bezüglich der Risikofaktoren arterielle Hypertonie sowie Diabetes mellitus gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede. Tabelle 28 fasst die Charakteristika der Fall- und Kontrollgruppe zusammen.

Tabelle 28: Charakterisierung der Fall- und Kontrollgruppe, angegeben sind jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung, bei kategorialen Merkmalen die relativen Häufigkeiten, m=männlich, w=weiblich, n=Anzahl der Individuen pro Gruppe

Parameter	Fallgruppe		Kontrollgruppe		p-Wert
	n		n		
BMI (kg/m^2)	134	$22,80 \pm 1,65$	130	$22,96 \pm 1,52$	0,448
Alter (Jahre)	134	$61,86 \pm 13,58$	130	$60,82 \pm 16,48$	0,576
Cholesterin (mg/dl)	134	$199,76 \pm 47,47$	130	$172,77 \pm 41,59$	0,00000162
Triglyzeride (mg/dl)	134	$219,67 \pm 83,38$	130	$93,41 \pm 29,35$	
HDL (mg/dl)	134	$38,66 \pm 12,70$	130	$46,50 \pm 14,46$	0,00000474
LDL (mg/dl)	128	$118,73 \pm 42,36$	130	$107,59 \pm 35,92$	0,02340632

Parameter	Fallgruppe		Kontrollgruppe		p-Wert
	n		n		
Geschlechterverteilung	134	85 m (63,43%) 49 w (36,57%)	130	81m (62,31%) 49w (37,69%)	0,85
KHK	134	34,33% keine KHK 65,67% KHK	130	30,77% keine KHK 69,27% KHK	0,537
Hypertonie	134	7,46% früher 63,43% ja 29,10% nein	128	6,25% früher 70,31% ja 23,44% nein	0,298
Diabetes	125	75,2% nein 24,8% ja	125	83,20% nein 16,80% ja	0,119

4.6.2 Mutation -95G/T des Promotors der Lipoproteinlipase

Die heterozygote Mutation -95G/T des Lipoproteinlipase Promotors wurde insgesamt 6 mal in unserem Kollektiv gefunden, je 3 mal in der Fall- und in der Kontrollgruppe. Daraus ergeben sich folgende Allelfrequenzen: Major-Allel 0,9886, Minor-Allel 0,0114.

Aufgrund der geringen Anzahl von Mut-Allelträgern in den beiden Gruppen führten wir lediglich eine deskriptive Statistik durch, eine schließende Statistik erschien bei der Betrachtung der einzelnen Gruppen nicht sinnvoll möglich.

Fallgruppe

In der Fallgruppe betrug das Durchschnittsalter der Wt-Allelträger $62,12 \pm 13,48$ Jahre, das der Mut-Allelträger $50,33 \pm 15,31$ Jahre. Die Geschlechterverteilung der beiden Untergruppen entsprach mit ca. 2/3 männlichen und 1/3 weiblichen Probanden der Häufigkeit in der gesamten Fallgruppe (63,36 : 36,64% vs. 66,67 : 33,33%). Der Durchschnitts-BMI der Wt-Allelträger betrug $22,81 \pm 1,65$ kg/m², die Mut-Allelträger waren mit $22,04 \pm 1,60$ kg/m² im Schnitt etwas leichter, s. Abbildung 22. Bei Einzelbetrachtung war 1 Mut-Allelträger schwerer, die anderen beiden leichter als der Durchschnitt der Wt-Allelträger.

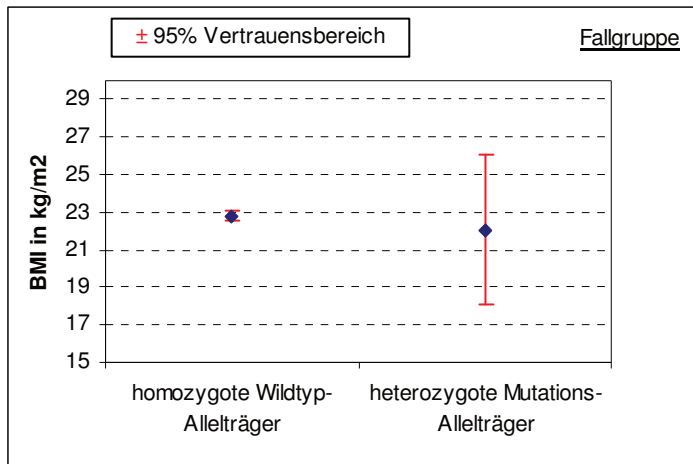


Abbildung 22: Vergleich des durchschnittlichen BMIs von Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -95G/T der Fallgruppe, dargestellt sind der Mittelwert sowie das 95. Konfidenzintervall

Alle 3 Mut-Allelträger der Fallgruppe hatten niedrigere Triglyzeride als der Durchschnitt der Wt-Allelträger mit 170 und 2x 165 mg/dl vs. $220,89 \pm 83,93$ mg/dl, s. Abbildung 23.

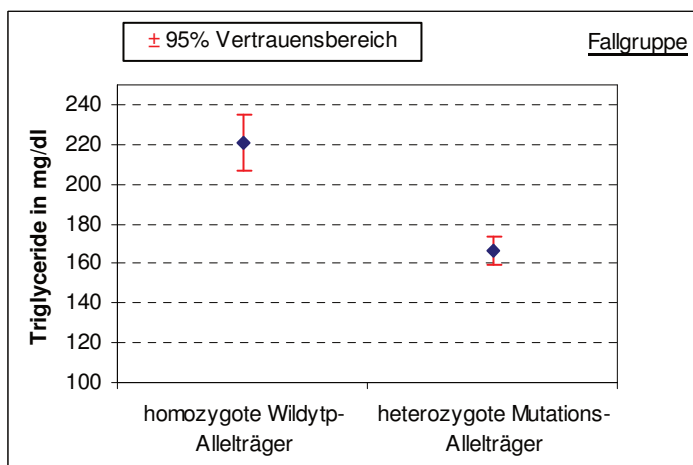


Abbildung 23: Vergleich der durchschnittlichen Triglyzerid-Werte von Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -95G/T der Fallgruppe, dargestellt sind der Mittelwert sowie das 95. Konfidenzintervall

Das durchschnittliche Gesamt-Cholesterin der Mut-Allelträger innerhalb der Fallgruppe war mit $246,67 \pm 27,54$ mg/dl höher als das der Wt-Allelträger mit $198,69 \pm 47,45$ mg/dl, genauso verhielt es sich beim LDL-Cholesterin ($159 \pm 28,16$ vs. $117,77 \pm 42,25$ mg/dl) und beim HDL-Cholesterin ($54,33 \pm 11,50$ vs. $38,30 \pm 12,54$ mg/dl).

Unter den Mut-Allelträger hatte nur einer der 3 Patienten eine KHK, in der Gruppe der Wt-Allelträger war die Diagnose KHK mit 66,41% prozentual gesehen fast doppelt so häufig vertreten, s. Abbildung 24. Bei diesem Vergleich ist allerdings zu berücksichtigen, dass ein einziger zusätzlicher Mut-Allelträger das Gesamtergebnis nachhaltig verändern könnte und aufgrund der geringen Fallzahl keine belastbare statistische Auswertung möglich ist.

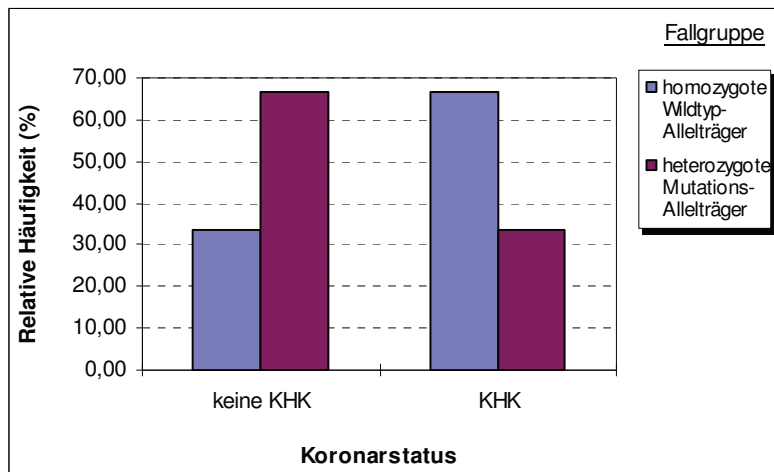


Abbildung 24: Vergleich der relativen Häufigkeiten der Diagnose KHK bei Wt- und Mut-Allelträger der Mutation -95G/T der Fallgruppe

2 der 3 Mutationsträger hatten eine arterielle Hypertonie, bei den Wt-Allelträgern waren es 63,36%. Keiner der Mut-Allelträger litt an Diabetes, in der Wt-Allelträger-Gruppe waren dies nur 74,59%.

Die folgenden 2 Tabellen 29 und 30 fassen die Ergebnisse in der Fallgruppe bzgl. der Mutation -95G/T noch einmal zusammen, Tabelle 31 zeigt die Ergebnisse der Herzkatheteruntersuchung der Mut-Allelträger sowie deren Begleiterkrankungen und Medikation.

Tabelle 29: Vergleich Durchschnittswerte Wt- und Mut-Allelträger der Mutation -95G/T der Fallgruppe, angegeben sind jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung, bei kategorialen Merkmalen die relativen Häufigkeiten, m=männlich, w=weiblich, n=Anzahl Individuen pro Gruppe

Parameter	komplette Fallgruppe		Wt-Allelträger		Mut-Allelträger	
	n		n		n	
BMI (kg/m ²)	134	22,80 ±1,65	131	22,81 ±1,65	3	22,04 ±1,60

Parameter	komplette Fallgruppe		Wt-Allelträger		Mut-Allelträger	
	n		n		n	
Alter (Jahre)	134	61,86 ±13,58	131	62,12 ±13,48	3	50,33 ±15,31
Cholesterin (mg/dl)	134	199,76 ±47,47	131	198,69 ±47,45	3	246,67 ±27,54
Triglyzeride (mg/dl)	134	219,67 ±83,38	131	220,89 ±83,93	3	166,67 ±2,89
HDL (mg/dl)	134	38,66 ±12,70	131	38,30 ±12,54	3	54,33 ±11,50
LDL (mg/dl)	128	118,73 ±42,36	125	117,77 ±42,25	3	159,00 ±28,16
Geschlechterverteilung	134	85 m (63,43%) 49 w (36,57%)	131	83 m (63,36%) 48 w (36,64%)	3	2 m (66,67%) 1 w (33,33%)
KHK	134	34,33% keine KHK 65,67% KHK	131	33,59% keine KHK 66,41% KHK	3	66,67% keine KHK 33,33% KHK
Hypertonie	134	7,46% früher 63,43% ja 29,10% nein	131	7,63% früher 63,36% ja 29,01% nein	3	66,67% ja 33,33% nein
Diabetes	125	75,2% nein 24,8% ja	122	74,59% nein 25,41% ja	3	100% nein

Tabelle 30: Vergleich Wt- und Mut-Allelträger der Mutation -95G/T der Fallgruppe, angegeben sind jeweils der Mittelwert sowie ggf. die Standardabweichung, bei kategorialen Merkmalen die relativen Häufigkeiten, m=männlich, w=weiblich, n=Anzahl Individuen pro Gruppe

	Wt-Allelträger		Mut-Allelträger		
	n		1	2	3
BMI (kg/m ²)	131	22,81 ±1,65	21,13	23,89	21,11
Alter (Jahre)	131	62,12 ±13,48	42	68	41
Cholesterin (mg/dl)	131	198,69 ±47,45	260	215	265
Triglyzeride (mg/dl)	131	220,89 ±83,93	170	165	165
HDL (mg/dl)	131	38,30 ±12,54	43	54	66
LDL (mg/dl)	125	117,77 ±42,25	183	128	166
Geschlechterverteilung	131	83 m (63,36%) 48 w (36,64%)	m	m	w
KHK	131	33,59% keine KHK 66,41% KHK	nein	ja	nein
Hypertonie	131	7,63% früher 63,36% ja 29,01% nein	ja	ja	nein
Diabetes	122	74,59% nein 25,41% ja	nein	nein	nein

Tabelle 31: Herzkatheterergebnis, Medikation und Begleiterkrankungen Mut-Allelträger -95K Fallgruppe

Mut-Allelträger	Herzkatheteranlass und – ergebnis	Medikation	Begleiterkrankungen
1	V.a. Perimyokarditis, Z.n. Linksherzdekompensation, aktuell NYHA II -dilatative Kardiomyopathie	-	Hypercholesterinämie, art. Hypertonie
2	instabile Angina pectoris -KHK-2	ACE-Hemmer, β -Blocker, Statin, Sitosterin, Nitrate, ASS, Iscover, Marcumar	bek. KHK-3 mit Z.n. VWI 1994, art. Hypertonie, Z.n. Nierenbeckenplastik 1995, HLP, kompensierte Niereninsuffizienz, benigne Prostatahyperplasie
3	V.a. restriktive Kardiomyopathie und pulmonalart. Hypertonie -Mitralklappeninsuffizienz, dtl. Endokardfibrose, k.H. auf Myokarditis, Ausschluss KHK	Marcumar, ACE-Hemmer	Z.n. Lungenembolie bei Sectio

Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe betrug das Durchschnittsalter der Wt-Allelträger $60,53 \pm 16,51$ Jahre, die drei Mut-Allelträger waren jeweils älter mit 65, 69 und 85 Jahren. Alle 3 waren männlich, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, in der 38,58% der Patienten weiblich waren.

Der durchschnittliche BMI der Wt-Allelträger betrug $22,95 \pm 1,53 \text{ kg/m}^2$, alle drei Mut-Allelträger waren schwerer (23,89, 23,03 und $23,40 \text{ kg/m}^2$), s. Abbildung 25, im Gegensatz zu den Mut-Allelträgern der Fallgruppe, die im Schnitt etwas leichter waren als die Wt-Allelträger.

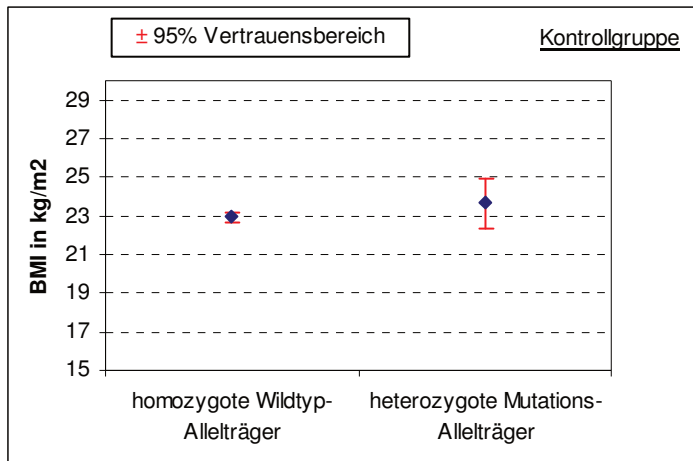


Abbildung 25: Vergleich des durchschnittlichen BMIs von Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -95G/T der Kontrollgruppe, dargestellt sind der Mittelwert sowie das 95. Konfidenzintervall

Die durchschnittlichen Triglyzeride der Mut-Allelträger der Kontrollgruppe waren, wie in der Fallgruppe, mit $86,67 \pm 16,08$ mg/dl niedriger als die der Wt-Allelträger ($93,57 \pm 29,61$ mg/dl), s. Abbildung 26, dabei hatte ein Mut-Allelträger höhere Werte, die beiden anderen niedrigere als die Wt-Allelträger.

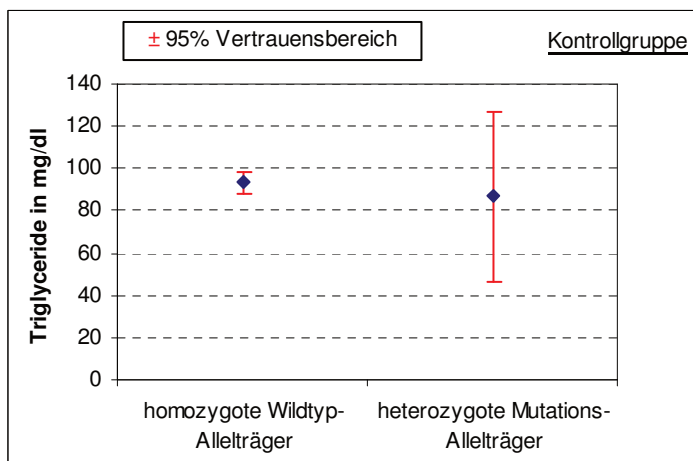


Abbildung 26: Vergleich der durchschnittlichen Triglyzerid-Werte von Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -95G/T der Kontrollgruppe, dargestellt sind der Mittelwert sowie das 95. Konfidenzintervall

Mit den anderen Lipidparametern verhielt es sich ebenso wie in der Fallgruppe, das Gesamtcholesterin ($186,67 \pm 57,52$ vs. $172,44 \pm 41,40$ mg/dl), das LDL-Cholesterin

($117 \pm 50,51$ vs. $107,37 \pm 35,76$ mg/dl) sowie das HDL-Cholesterin ($52,33 \pm 4,16$ vs. $46,36 \pm 14,60$ mg/dl) waren jeweils bei den Mut-Allelträgern höher als bei den Wt-Allelträgern.

Im Gegensatz zur Fallgruppe hatten alle 3 Mut-Allelträger der Kontrollgruppe eine KHK, bei den Wt-Allelträgern waren es 68,50%, s. Abbildung 27.

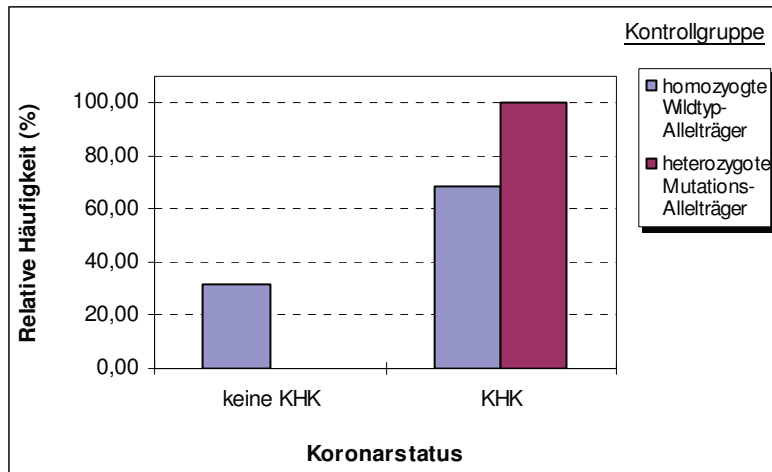


Abbildung 27: Vergleich der relativen Häufigkeiten der Diagnose KHK bei Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -95G/T der Kontrollgruppe

Alle drei Mut-Allelträger hatten eine arterielle Hypertonie, keiner litt an Diabetes mellitus. Dies war ein deutlicher allerdings nicht signifikanter Unterschied zu den Wt-Allelträgern, bei denen eine arterielle Hypertonie in knapp 75% der Fälle vorlag sowie ein Diabetes mellitus bei 17,21% der Patienten.

Die folgenden Tabellen 32 und 33 fassen die Ergebnisse für die Kontrollgruppe noch einmal zusammen, Tabelle 34 zeigt die Ergebnisse der Herzkatheteruntersuchung sowie der Begleiterkrankungen und Medikation der Mut-Allelträger.

Tabelle 32: Vergleich Durchschnittswerte Wt- und Mut-Allelträger der Mutation -95G/T der Kontrollgruppe, angegeben sind jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung, bei kategorialen Merkmalen die relativen Häufigkeiten, m=männlich, w=weiblich, n=Anzahl Individuen pro Gruppe

Parameter	komplette Kontrollgruppe		Wt-Allelträger		Mut-Allelträger	
	n		n		n	
BMI (kg/m ²)	130	22,96 ±1,52	127	22,95 ±1,53	3	23,64 ±0,53

Parameter	komplette Kontrollgruppe		Wt-Allelträger		Mut-Allelträger	
	n		n		n	
Alter (Jahre)	130	60,82 ±16,48	127	60,53 ±16,51	3	73 ±10,58
Cholesterin (mg/dl)	130	172,77 ±41,59	127	172,44 ±41,40	3	186,67 ±57,52
Triglyzeride (mg/dl)	130	93,41 ±29,35	127	93,57 ±29,61	3	86,68 ±16,07
HDL (mg/dl)	130	46,5 ±14,46	127	46,36 ±14,60	3	52,33 ±4,16
LDL (mg/dl)	130	107,59 ±35,92	127	107,37 ±35,76	3	117 ±50,51
Geschlechterverteilung	130	81m (62,31%) 49w (37,69%)	127	78 m (61,42%) 49 w (38,58%)	3	3 m (100%)
KHK	130	30,77% keine KHK 69,27% KHK	127	31,50% keine KHK 68,50% KHK	3	100% KHK
Hypertonie	128	6,25% früher 70,31% ja 23,44% nein	125	6,40% früher 59,60% ja 24,0% nein	3	100% ja
Diabetes	125	83,20% nein 16,80% ja	122	82,79% nein 17,21% ja	3	100% nein

Tabelle 33: Vergleich Wt- und Mut-Allelträger der Mutation -95G/T der Kontrollgruppe, angegeben sind jeweils der Mittelwert sowie ggf. die Standardabweichung, bei kategorialen Merkmalen die relativen Häufigkeiten, m=männlich, w=weiblich, n=Anzahl Individuen pro Gruppe

	Wt-Allelträger		Mut-Allelträger		
	n		4	5	6
BMI (kg/m ²)	127	22,95 ±1,53	23,89	23,03	23,40
Alter (Jahre)	127	60,53 ±16,51	69	85	65
Cholesterin (mg/dl)	127	172,44 ±41,40	185	130	245
Triglyzeride (mg/dl)	127	93,57 ±29,61	80	75	105
HDL (mg/dl)	127	46,36 ±14,60	51	49	55
LDL (mg/dl)	127	107,37 ±35,76	118	66	167
Geschlechterverteilung	127	78 m (61,42%) 49 w (38,58%)	m	m	m
KHK	127	31,50% keine KHK 68,50% KHK	ja	ja	ja
Hypertonie	125	6,40% früher 59,60% ja 24,0% nein	ja	ja	ja
Diabetes	122	82,79% nein 17,21% ja	nein	nein	nein

Tabelle 34: Herzkatheterergebnis, Medikation und Begleiterkrankungen Mut-Allelträger -95K Kontrollgruppe

Mut-Allelträger	Herzkatheteranlass und – ergebnis	Medikation	Begleiterkrankungen
4	TNI-neg. akutes Koronarsyndrom -KHK-3	MTX, Urbasone, ASS, β -Blocker	Z.n. ACB, Z.n. multiplen PCAs, HLP, arterielle Hypertonie, rheumatoide Arthritis
5	rhythmogene Synkope, intermittierende TAA -KHK-2	β -Blocker, 5a-Reduktasehemmer, ASS, Iscover, ACE-Hemmer, Statin	Tachykardie/Bradykardie-Syndrom, VHF, art. Hypertonie, rhythmogene Synkope, Prostatahyperplasie
6	TNI-positives akutes Koronarsyndrom -KHK-3	ASS, Iscover, β -Blocker, ACE-Hemmer, Pantozol, Statin	Z.n. Ulcus duodeni, Soorösophagitis, art. Hypertonie

Gesamtkollektiv

Betrachtet man alle 6 Mut-Allelträger zusammen und vergleicht sie mit allen Wt-Allelträgern beider Gruppen, so haben die die Mut-Allelträger insgesamt leicht erniedrigte Triglyzeride ($126,67, \pm 45,01$ vs. $158,21 \pm 89,78$ mg/dl, n.s.), ein leicht erhöhtes Gesamt-Cholesterin ($216,67 \pm 52,03$ vs. $185,77 \pm 46,34$ mg/dl, n.s.) sowie LDL-Cholesterin ($138 \pm 43,21$ vs. $112,52 \pm 39,38$ mg/dl, n.s.), leicht erhöhtes HDL-Cholesterin ($53,33 \pm 7,81$ vs. $42,27 \pm 14,15$ mg/dl, n.s.) sowie einen nahezu gleichen BMI ($22,84 \pm 1,38$ vs. $22,88 \pm 1,59$ kg/m²). 66,67% der Mut-Allelträger und 65,91% der Wt-Allelträger hatten eine KHK.

Insgesamt konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in den erhobenen Daten zwischen homozygoten Wildtyp-Allelträgern und heterozygoten Mutations-Allelträgern bezüglich der Mutation -95G/T nachgewiesen werden.

4.6.3 Mutation -93T/G des Lipoproteinlipase-Promotors

Die Mutation -93T/G im Lipoproteinlipase-Promotor konnte insgesamt 8 mal in unserem Kollektiv nachgewiesen werden, 6 mal in der Fallgruppe und 2 mal in der Kontrollgruppe ($p=0,151$, n.s.). Insgesamt ergibt sich daraus eine Allelfrequenz von 0,9848 für das Major-Allel und 0,0152 für das Minor-Allel in der Gesamtgruppe. In der Fallgruppe betrug die Major-Allelfrequenz 0,9776, die Minor-Allelfrequenz 0,0224; in der Kontrollgruppe ergaben sich die Werte Major-Allelfrequenz 0,9923 und Minor-Allelfrequenz 0,0077.

Die geringe Mutations-Frequenz in der Kontrollgruppe lässt keine belastbare Statistik zu, so dass diese lediglich für die Fallgruppe durchgeführt werden konnte.

Fallgruppe

Die Wt-Allelträger der Fallgruppe waren im Durchschnitt $61,59 \pm 13,53$ Jahre alt, die Mut-Allelträger $67,67 \pm 14,60$ Jahre ($p=0,285$, n.s.). Die Geschlechterverteilung entsprach in etwa der der gesamten Fallgruppe mit jeweils ca. 2/3 männlichen Probanden und ca. 1/3 weiblichen ($63,28 : 36,72\%$ vs. $66,67 : 33,33\%$).

Der durchschnittliche BMI der Wt-Allelträger der Fallgruppe betrug $22,83 \pm 1,63$ kg/m^2 , der der Mut-Allelträger $22,13 \pm 1,98$ kg/m^2 (n.s.), s. Abbildung 28. 4 der Mut-Allelträger waren leichter als der Durchschnitt der Wt-Allelträger, 2 waren schwerer.

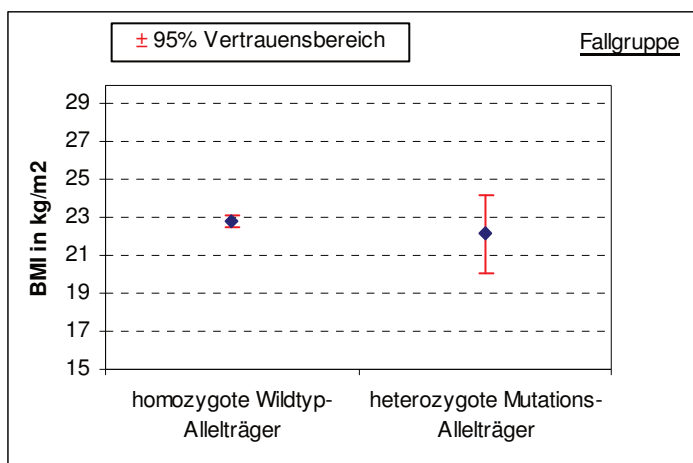


Abbildung 28: Vergleich des durchschnittlichen BMIs von Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -93T/G der Fallgruppe, dargestellt sind der Mittelwert sowie das 95. Konfidenzintervall

Der Mittelwert der Triglyzeride der Mut-Allelträger war mit $242,50 \pm 96,89$ mg/dl höher als bei den Wt-Allelträgern mit $218,60 \pm 82,98$ mg/dl ($p=0,742$, n.s.), s. Abbildung 29, 3 der Mut-Allelträger hatten allerdings niedrigere Triglyzerid-Werte als der Durchschnitt der Wt-Allelträger, die anderen 3 z.T. deutlich erhöhte Werte.

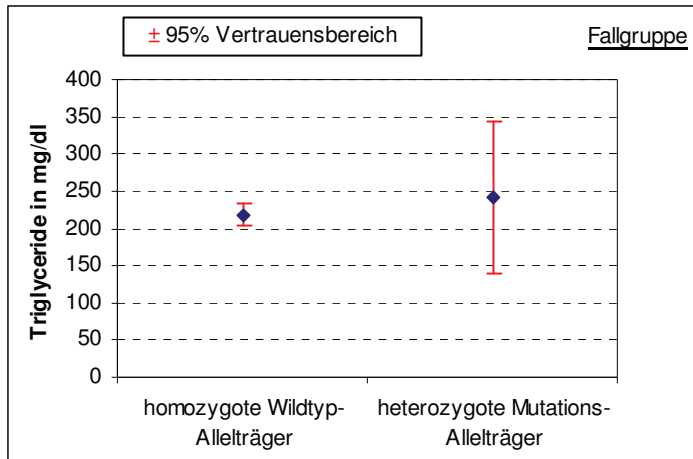


Abbildung 29: Vergleich der durchschnittlichen Triglyzerid-Werte von Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -93T/G der Fallgruppe, dargestellt sind der Mittelwert sowie das 95. Konfidenzintervall

Auch im restlichen Lipidprofil gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Wt- und den Mut-Allelträgern in der Fallgruppe. Das durchschnittliche Gesamtcholesterin war bei beiden annähernd gleich hoch ($199,79 \pm 47,76$ vs. $199,17 \pm 44,66$ mg/dl), das durchschnittliche LDL-Cholesterin war bei den Mut-Allelträger mit $112,60 \pm 44,90$ mg/dl etwas niedriger als bei den Wt-Allelträger mit $118,98 \pm 42,43$ mg/dl ($p=0,743$, n.s.). Das durchschnittliche HDL-Cholesterin der Mut-Allelträger war mit $41,00 \pm 17,46$ mg/dl höher als das der Wt-Allelträger mit $38,55 \pm 12,51$ mg/dl ($p=0,646$, n.s.).

Die Mut-Allelträger hatten mit 33,33% vs. 67,19% seltener eine koronare Herzerkrankung als die Wt-Allelträger, mit $p=0,087$ nahe an der statistischen Signifikanz.

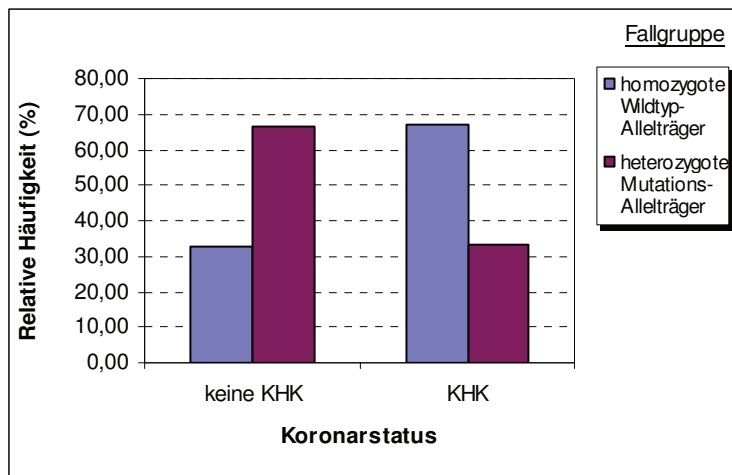


Abbildung 30: Vergleich der relativen Häufigkeit der Diagnose KHK bei Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -93T/G der Fallgruppe

4 der Mut-Allelträger hatten eine arterielle Hypertonie (66,67%), 2 litten an Diabetes mellitus (33,33%). Bei den Wt-Allelträgern waren es knapp 70% mit einer arteriellen Hypertonie ($p=0,772$, n.s.) und 24,37% mit einem Diabetes mellitus ($p=0,62$, n.s.). Die folgenden 2 Tabellen 35 und 36 fassen die Ergebnisse in der Fallgruppe kurz zusammen, Tabelle 37 zeigt die Ergebnisse der Herzkatheteruntersuchungen sowie die Begleiterkrankungen und Medikation der Mut-Allelträger.

Tabelle 35: Vergleich der Durchschnittswerte der Wt- und Mut-Allelträger der Mutation -93T/G der Fallgruppe, angegeben sind jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung, bei kategorialen Merkmalen die relativen Häufigkeiten, m=männlich, w=weiblich, n=Anzahl Individuen pro Gruppe

Parameter	komplette Fallgruppe		Wt-Allelträger		Mut-Allelträger		p-Wert
	n		n		n		
BMI (kg/m^2)	134	22,80 $\pm 1,65$	128	22,83 $\pm 1,63$	6	22,13 $\pm 1,98$	0,317
Alter (Jahre)	134	61,86 $\pm 13,58$	128	61,59 $\pm 13,53$	6	67,67 $\pm 14,60$	0,285
Cholesterin (mg/dl)	134	199,76 $\pm 47,47$	128	199,79 $\pm 47,76$	6	199,17 $\pm 44,66$	0,975
Triglyzeride (mg/dl)	134	219,67 $\pm 83,38$	128	218,60 $\pm 82,98$	6	242,50 $\pm 96,89$	0,742
HDL (mg/dl)	134	38,66 $\pm 12,70$	128	38,55 $\pm 12,51$	6	41,00 $\pm 17,46$	0,646
LDL (mg/dl)	128	118,73 $\pm 42,36$	127	118,98 $\pm 42,43$	5	112,6 $\pm 44,90$	0,743

Parameter	komplette Fallgruppe		Wt-Allelträger		Mut-Allelträger		p-Wert
	n		n		n		
Geschlechterverteilung	134	85 m (63,43%) 49 w (36,57%)	128	81 m (63,28%) 47 w (36,72%)	6	4 m (66,67%) 2 w (33,33%)	0,982
KHK	134	34,33% keine KHK 65,67% KHK	128	32,81% keine KHK 67,19% KHK	6	66,67% keine KHK 33,33% KHK	0,087
Hypertonie	134	7,46% früher 63,43% ja 29,10% nein	128	7,81% früher 63,28% ja 28,91% nein	6	66,67% ja 33,33% nein	0,772
Diabetes	125	75,2% nein 24,8% ja	119	75,63%nein 24,37%ja	6	66,67% nein 33,33% ja	0,62

Tabelle 36: Vergleich Wt- und Mut-Allelträger der Mutation -93T/G der Fallgruppe, angegeben sind jeweils der Mittelwert sowie ggf. die Standardabweichung, bei kategorialen Merkmalen die relativen Häufigkeiten, m=männlich, w=weiblich, n=Anzahl Individuen pro Gruppe

Parameter	Wt-Allelträger		Mut-Allelträger					
	n		1	2	3	4	5	6
BMI (kg/m ²)	128	22,83 ±1,63	24,11	18,37	22,41	22,06	22,68	23,18
Alter (Jahre)	128	61,59 ±13,53	59	44	83	66	74	80
Cholesterin (mg/dl)	128	199,79 ±47,76	240	245	140	230	175	165
Triglyzeride (mg/dl)	128	218,60 ±82,98	195	400	240	155	155	310
HDL (mg/dl)	128	38,55 ±12,51	54	70	31	31	36	24
LDL (mg/dl)	127	118,98 ±42,43	147	-	61	168	108	79
Geschlechterverteilung	128	81 m (63,28%) 47 w (36,72%)	w	w	m	m	m	m
KHK	128	32,81% keine KHK 67,19% KHK	nein	nein	nein	ja	nein	ja
Hypertonie	128	7,81% früher 63,28% ja 28,91% nein	ja	nein	ja	ja	nein	ja
Diabetes	119	75,63%nein 24,37%ja	ja	nein	ja	ja	nein	nein

Tabelle 37: Herzkatheterergebnis, Medikation und Begleiterkrankungen Mut-Allelträger -95K Kontrollgruppe

Mut-Allelträger	Herzkatheteranlass und – ergebnis	Medikation	Begleiterkrankungen
1	atypische Angina pectoris -Ausschluss KHK	-	HLP, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ II
2	unklare Sinustachykardie mit atypischer Angina pectoris und Belastungs-dyspnoe NYHA 2 -chron. virus-neg. Myokarditis	β-Blocker	-
3	Trikuspidalklappenendokarditis -Empfehlung zum Klappenersatz	Magnesium	SM bei Sinusbradykardie 2000, art. Hypertonie, Diabetes mellitus Typ II, komp. Niereninsuffizienz, Sigmadivertikulose, Glasaugelinks
4	instabile Angina pectoris bei bek. KHK -KHK	Diuretikum, Digitalis, Sulfonylharnstoff, ASS, Allopurinol	bek. KHK, Z.n. HWI 1994, Z.n. VWI 1995, Z.n. ACVB 1995, Herzinsuffizienz, art. Hypertonie, Diabetes mellitus, Coxarthrose, V.a. Fettleberhepatitis
5	instabile Angina pectoris, Dyspnoe NYHA III-IV -Aortenklappenstenose, Aorteninsuffizienz II, Ausschluss KHK	Diuretikum, Digoxin	Z.n. Prostatektomie 2001, Z.n. Cholezystektomie 1995
6	mehrfache Linksherzdekompensation, aktuell NYHA III -KHK-3, aktuell nicht interventionsbedürftig, Mitralklappeninsuffizienz, VHF	β-Blocker, Diuretikum, Marcumar, Digoxin, Statin, ACE-Hemmer	AA bei VHF, Z.n. mehrmaliger Linksherzdekompensation, bek. KHK mit Z.n. HWI 1992 und ACVB 1993, Aorten- und Mitralklappeninsuffizienz II°, Trikuspidalklappeninsuffizienz, art. Hypertonie, mittelschweres Lungenemphysem, inaktive Polymyalgia rheumatica, HLP, Z.n. Tbc

Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe betrug das Durchschnittsalter der Wt-Allelträger $60,52 \pm 16,43$ Jahre, die beiden männlichen Mut-Allelträger waren mit jeweils 80 Jahren deutlich älter.

Der durchschnittliche BMI der Wt-Allelträger betrug $22,94 \pm 1,52 \text{ kg/m}^2$, beide Mut-Allelträger waren schwerer ($24,62$ und $24,29 \text{ kg/m}^2$), s. Abbildung 31, im Gegensatz zu den Mut-Allelträgern der Fallgruppe, die im Schnitt leichter waren als die Wt-Allelträger.

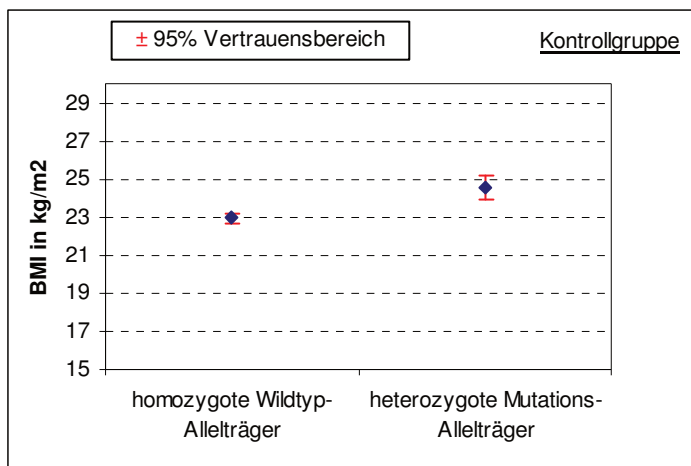


Abbildung 31: Vergleich des durchschnittlichen BMIs von Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -93T/G der Kontrollgruppe, dargestellt ist der Mittelwert sowie das 95. Konfidenzintervall

Der Triglyzeride waren mit 90 und 80 mg/dl niedriger als die durchschnittlichen Triglyzerid-Werte der Wt-Allelträger mit $93,54 \pm 29,56 \text{ mg/dl}$, s. Abbildung 32, auch hier genau das Gegenteil zur Fallgruppe, in der die durchschnittlichen Triglyzeride der Mut-Allelträger höher waren als die der Wt-Allelträgern, allerdings in der Einzel-fallbetrachtung breit gestreut lagen.

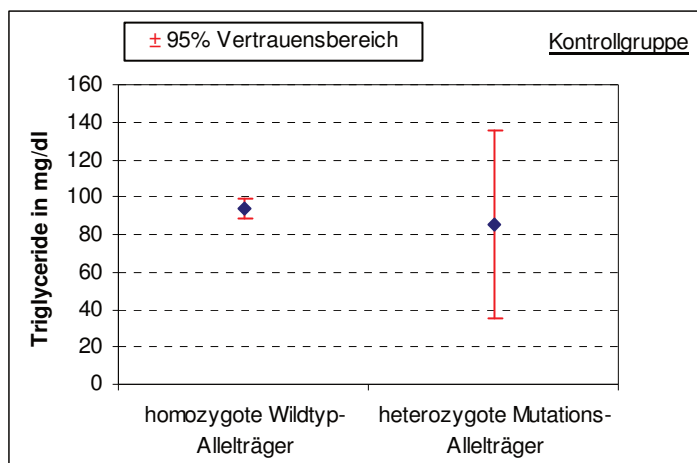


Abbildung 32: Vergleich der durchschnittlichen Triglyzerid-Werte von Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -93T/G in der Kontrollgruppe, dargestellt sind der Mittelwert sowie das 95. Konfidenzintervall

Das restliche Lipidprofil war sehr heterogen, beim Gesamt-Cholesterin hatte ein Mut-Allelträger höhere und einer niedrigere Wert ($172,78 \pm 41,91$ vs. 180 bzw. 165 mg/dl), die HDL-Werte lagen bei beiden Mut-Allelträgern niedriger als bei den Wt-Allelträgern ($46,66 \pm 14,51$ vs. 39 bzw. 33 mg/dl), die LDL-Cholesterinwerte waren höher ($107,04 \pm 36,17$ vs. 123 bzw. 116 mg/dl), ein weiterer Unterschied zur Fallgruppe.

Beide Mut-Allelträger hatten eine koronare Herzkrankheit, im Gegensatz zu den Wt-Allelträgern, bei denen 68,75% eine KHK hatten. Aufgrund der geringen Fallzahl an Mut-Allelträgern sind diese Daten sowie das Risikoprofil nicht sinnvoll statistisch zu vergleichen, da z.B. ein einzelner weiterer Mut-Allelträger die Daten weitreichend beeinflussen könnte.

Die folgende Tabelle 38 fasst die Daten in der Kontrollgruppe zusammen, Tabelle 39 zeigt die Ergebnisse der Herzkatheteruntersuchung sowie die Begleiterkrankungen und Medikation der Mut-Allelträger.

Tabelle 38: Vergleich Wt- und Mut-Allelträger der Mutation -93T/G der Kontrollgruppe, angegeben sind jeweils der Mittelwert sowie ggf. die Standardabweichung, bei kategorialen Merkmalen die relativen Häufigkeiten, m=männlich, w=weiblich, n=Anzahl Individuen pro Gruppe

Parameter	komplette Kontrollgruppe		Wt-Allelträger		Mut-Allelträger			
	n		n		n		7	8
BMI (kg/m ²)	130	22,96 $\pm 1,52$	128	22,94 $\pm 1,52$	2	24,56 $\pm 0,09$	24,62	24,29

Parameter	komplette Kontrollgruppe		Wt-Allelträger		Mut-Allelträger			
	n		n		n		7	8
Alter (Jahre)	130	60,82 ±16,48	128	60,52 ±16,43	2	80	80	80
Cholesterin (mg/dl)	130	172,77 ±41,59	128	172,78 ±41,91	2	172,5 ±10,61	180	165
Triglyzeride (mg/dl)	130	93,41 ±29,35	128	93,54 ±29,56	2	85 ±7,07	90	80
HDL (mg/dl)	130	46,5 ±14,46	128	46,66 ±14,51	2	36 ±4,24	39	33
LDL (mg/dl)	130	107,59 ±35,92	128	107,04 ±36,17	2	119,50 ±4,95	123	116
Geschlechterverteilung	130	81m (62,31%) 49w (37,69%)	128	79 m (61,72%) 49 w (38,28%)	2	2 m (100%)	m	m
KHK	130	30,77% keine KHK 69,27% KHK	128	31,25% keine KHK 68,75% KHK	2	100% KHK	ja	ja
Hypertonie	128	6,25% früher 70,31% ja 23,44% nein	126	6,35% früher 69,84% ja 23,81% nein	2	100% ja	ja	ja
Diabetes	125	83,20% nein 16,80% ja	123	82,93% nein 17,07% ja	2	100% nein	nein	nein

Tabelle 39: Katheterergebnis, Medikation und Begleiterkrankungen der Mut-Allelträger -93K Kontrollgruppe

Mut-Allelträger	Herzkatheteranlass und – ergebnis	Medikation	Begleiterkrankungen
7	TNI positives akutes Koronarsyndrom -KHK-1	Statin, ASS, ACE-Hemmer, Diuretikum, Kalziumantagonist	bek. KHK-3, Z.n. ACB 1991, art. Hypertonie, HLP, latente Hyperthyreose
8	instabile Angina pectoris -subakuter HWI bei KHK-1	β-Blocker, ACE-Hemmer, Statin, ASS, Iscover	latente Hyperthyreose, art. Hypertonie, Hüft-TEP bds. 1998/99

Gesamtkollektiv

Betrachtet man alle 8 Mut-Allelträger zusammen und vergleicht sie mit allen Wt-Allelträgern beider Gruppen, so haben die die Mut-Allelträger insgesamt erhöhte Triglyzeride ($203,125 \pm 109,67$ vs. $156,07 \pm 88,26$, n.s.), ein leicht erhöhtes Gesamt-Cholesterin ($192,5 \pm 39,91$ vs. $186,28 \pm 46,84$ mg/dl, n.s.) sowie minimal erhöhtes LDL-Cholesterin ($114,57 \pm 36,87$ vs. $113,08 \pm 39,71$ mg/dl, n.s.), leicht niedriges HDL-Cholesterin ($39,75 \pm 15,02$ vs. $42,61 \pm 14,12$ mg/dl, n.s.) sowie einen nahezu gleichen

BMI ($22,74 \pm 2,01$ vs. $22,88 \pm 1,57$ kg/m²). 50% der Mut-Allelträger und 67,97% der Wt-Allelträger hatten eine KHK (n.s.).

Insgesamt konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in den erhobenen Daten zwischen homozygoten Wildtyp-Allelträgern und heterozygoten Mutations-Allelträgern bezüglich der Mutation -93T/G nachgewiesen werden.

5 Diskussion

5.1 Ursachen für erhöhte Triglyzeride

Die Regulierung des Triglyzerid-Spiegels im Körper ist ein komplexes Geschehen mit vielen verschiedenen beteiligten Systemen, so dass eine Menge von Faktoren einen mehr oder weniger starken Einfluss auf den Triglyzerid-Stoffwechsel haben. Neben genetisch bedingten primären Hypertriglyzeridämien gibt es zahlreiche Ursachen für sekundäre Hypertriglyzeridämien, teilweise kommt es zu einem gemischten Auftreten mit Hypercholesterinämien (Richter und von Eckardstein, 2006).

Genetisch bedingte Hypertriglyzeridämien sind z.B. die Familiäre Hypertriglyzeridämie, die kein erhöhtes Atherosklerose-Risiko mit sich bringt, die familiäre Dysbetalipoproteinämie durch Polymorphismen im Apolipoprotein E mit erhöhtem Atherosklerose-Risiko sowie sporadische Hypertriglyzeridämien durch polygene Veränderungen u.a. in den Genen der Lipoproteinlipase, der Fettsäuresynthetase oder der Apolipoproteine. Zu den zahlreichen Ursachen von sekundären Hypertriglyzeridämien zählen ein starker Alkoholkonsum, kalorien- und zuckerreiche Ernährung, ein unzureichend eingestellter Diabetes mellitus Typ II, das metabolisches Syndrom, Adipositas oder auch Schwangerschaften sowie eine Therapie mit Steroiden, die alle auf unterschiedlichem Weg Einfluss auf den Triglyzerid-Stoffwechsel nehmen.

Ziel unserer Untersuchungen war es, den Einfluss von Mutationen in regulatorischen Elementen zweier an der Hydrolyse von Triglyzeriden beteiligten Proteinen auf den Triglyzerid-Stoffwechsel und das Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung zu untersuchen, nämlich dem Apolipoprotein E und der Lipoproteinlipase. Zusammen mit dem VLDL-Rezeptor und dem Cofaktor Apo C-II senken diese Proteine durch Hydrolyse den Triglyzerid-Spiegel und erhöhen gleichzeitig das HDL-Cholesterin.

5.2 Genregulatorische Elemente von Apolipoprotein E

Die Datenbank des Ensembl Genome Browsers gibt neben der Wildtyp-Sequenz auch bereits bekannte Single Nucleotid Polymorphisms (SNPs) an. Da die von uns untersuchten genregulatorischen Sequenzen des Apolipoprotein E erst kürzlich ge-

funden und laut intensivem Literaturstudium noch nicht eingehend auf Mutationen untersucht wurden, konnten wir in der Literatur nur wenige Angaben zu den SNPs finden, besonders bezüglich deren Häufigkeit und funktioneller Relevanz. Auch besteht durchaus die Möglichkeit, dass nicht alle genetischen Variationen in diesen Segmenten bereits bekannt sind, da man bis vor wenigen Jahren noch keine Informationen über die Bedeutung dieser DNA-Abschnitte hatte.

5.2.1 Apo E, Hepatic Control Region 1

In dem für die leberspezifische Expression des Apolipoprotein E wichtigen HCR1 werden nur 2 vorbeschriebene SNPs angegeben, einer davon liegt außerhalb der funktionell relevanten Region. Abbildung 33 zeigt die Position dieser SNPs, in Tabelle 40 sind die beschriebenen Allelfrequenzen in unterschiedlichen Populationen aufgezeigt.

					G ATTCAGACTA GGGCCAGGAC
	CCAGGGATGG	AGAGAAAGAG	ATGAGAGTGG	TTTGGGGGCT	TGGTGACTIONA GAGAACAGAG
1	CTGCAGGCTC	AGAGGCACAC	AGGAGTTTCT	GGGCTCACCC	TGCCCCCTTC CAACCCCTCA
61	GTTCCCATCC	TCCAGCAGCT	GTTTGTGTGC	TGCCTCTGAA	GTCCCACTG AACAACTTC
	C/G				
121	AGCCTA ST CA	TGTCCCTAAA	ATGGGCAAAC	ATTGCAAGCA	GCAAACAGCA AACACACAGC
181	CCTCCCTGCC	TGCTGACCTT	GGAGCTGGGG	CAGAGGTCAG	AGACCTCTCT GGGCCCATGC
241	CACCTCCAAC	ATCCACTCGA	CCCCTTGGA	TTTCGGTGGA	GAGGAGCAGA GGTGTCTCTG
301	GCGTGGTTTA	GGTAGTGTGA	GAGGGTCCGG	GTTCAAACC	AC---TTGCT GGGTGGGGAG
					A/G
361	TCGTCAGTAA	GTGGCTATGC	CCCGACCCCG	AAGCCTGTTT	CCCCATCTGT AC R ATGGAAA
421	TGATAAAGAC	GCCCATCTGA	TAGGGTTTTT	GTGGCAAATA	AACATTTGGT TTTTTTGT
481	TG-----	--TTTTGTTT	TGTTTTTTGA	GATGGAGGTT	TGCTCTG

Abbildung 33: vorbeschriebene SNPs HCR1, funktionell relevante Region schwarz, SNPs rot, Zählweise aus Gründen der Übersichtlichkeit wie in Abbildung 9 (EBI und WTSI, 2010)

Tabelle 40: Allelfrequenzen vorbeschriebener SNPs HCR1 (Klos et al., 2008; Bethesda (MD), 2010), n=Anzahl untersuchter Individuen, CARDIA: Coronary Artery Risk Development in Young Adults

Position	rs-Nummer	untersuchte Population	n	Allelfrequenz	
127 C/G	4803771	Amerikaner europäischer Wurzeln	59	C = 0,966	G = 0,034
		Asiaten (China)	45	C = 0,989	G = 0,011
		Asiaten (Japan)	44	C = 0,989	G = 0,011
		Afrikaner der Subsahara	60	C = 1	
413 A/G	157599	Amerikaner europäischer Wurzeln	60	T = 1	
		Asiaten (China)	44	T = 1	
		Asiaten (Japan)	44	T = 1	
		Afrikaner der Subsahara	60	T = 0,658	C = 0,342
		Amerikaner europäischer Wurzeln	24	T = 1	
		Amerikaner afrikanischer Wurzeln	22	T = 0,955	C = 0,045
		Asiaten (Chinesen)	23	T = 1	
		Afro-Amerikaner (CARDIA-Studie)	2054	T = 0,72	G = 0,28
		Kaukasier (CARDIA)	1939	T = 0,996	G = 0,004

In einer großen genomischen Studie, dem CARDIA (Coronary Artery Risk Development in Young Adults)-Projekt, wurde nur der SNP 413 A/G gefunden, der insgesamt bei Populationen afrikanischer Herkunft häufiger zu sein scheint als bei Populationen anderer Herkunft, er hatte keinerlei funktionelle Auswirkung (Klos et al., 2008). Die Bedeutung des SNP 127C/G für die Funktion von HCR1 scheint noch nicht erforscht zu sein, er trat in den untersuchten Kollektiven, die allerdings recht klein waren, nur sehr selten auf. Dieses seltene Auftreten erklärt vermutlich das Fehlen in der CARDIA-Studie.

Auch in unserem Kollektiv konnte keiner der SNPs nachgewiesen werden. Diese starke Konservierung von HCR1 werten wir als Zeichen für die Wichtigkeit der richtigen Basenabfolge für die Funktion, eine Theorie, die durch die Auswirkungen eines SNP in dem zu HCR1 sehr homologen HCR2 gestützt wird.

5.2.2 Apo E, Hepatic Control Region 2

HCR2 hat wie HCR1 eine wichtige Bedeutung für die leberspezifische Expression von Apolipoprotein E. In der Sequenz von HCR2 sind in der Datenbank des Ensembl Genome Browsers 3 bekannte SNPs vermerkt, nur einer davon liegt in der funktionell relevanten Region, in der Literatur fand sich neben diesen noch ein weiterer SNP (Klos et al., 2008). Abbildung 34 zeigt die Lage dieser SNPs, in Tabelle 41 sind die beschriebenen Allelhäufigkeiten in unterschiedlichen Populationen dargestellt.

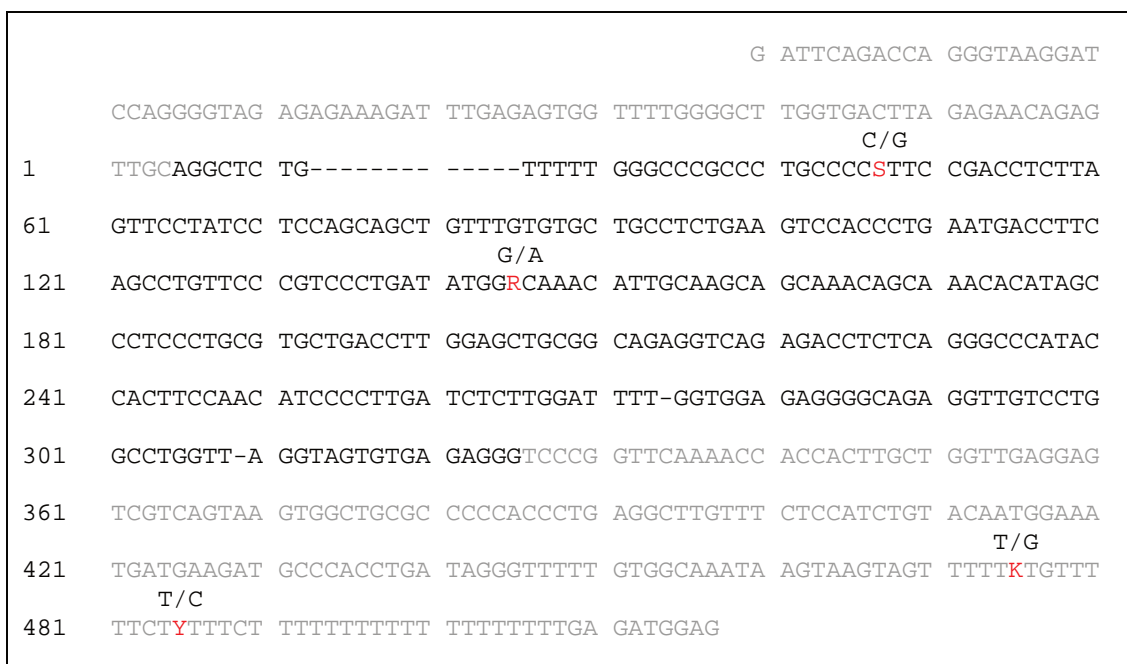


Abbildung 34: vorbeschriebene SNPs HCR2, funktionell relevante Region schwarz, SNPs rot, Zählweise aus Gründen der Übersichtlichkeit wie in Abbildung 9 (Klos et al., 2008; EBI und WTSI, 2010)

Tabelle 41: Allelfrequenzen vorbeschriebener SNPs HCR2 (Klos et al., 2008; Bethesda (MD), 2010), n=Anzahl untersuchter Individuen, CARDIA: Coronary Artery Risk Development in Young Adults, GENOA: Genetic Epidemiology Network of Arteriopathy, ARIC: Atherosclerosis Risk in Communities

Position	rs-Nummer	untersuchte Population	n	Allelfrequenz	
47 C/G	35136575	Nordamerikaner	36	C = 0,750	G = 0,250
		Ostasiaten	44	C = 0,727	G = 0,273
		Westafrikaner	25	C = 0,940	G = 0,060

Position	rs-Nummer	untersuchte Population	n	Allelfrequenz	
		Afro-Amerikaner (CARDIA-Studie)	1939	C = 0,82	G = 0,18
		Kaukasier (CARDIA)	2054	C = 0,74	G = 0,26
		Afro-Amerikaner (GENOA-Studie)	1616	C = 0,81	G = 0,19
		Kaukasier (GENOA)	1334	C = 0,75	G = 0,25
		Mexiko-Amerikaner (ARIC-Studie)	1481	C = 0,83	G = 0,17
		Afro-Amerikaner (ARIC)	3679	C = 0,82	G = 0,18
		Kaukasier (ARIC)	10427	C = 0,75	G = 0,25
145 G/A	APOS-047628	Afroamerikaner (CARDIA)	2054	G = 0,96	A = 0,04
		Kaukasier (CARDIA)	1939	G = 0,999	A = 0,001
475 T/G	7259505	keine Daten vorhanden			
485 T/C	9749583	keine Daten vorhanden			

Klos et al fanden in den Populationen der CARDIA-Studie in HCR2 nur einen der 3 veröffentlichten SNPs, zusätzlich wurde ein weiterer beschrieben. 47 C/G scheint bei Menschen kaukasischer Abstammung etwas häufiger vorzukommen als bei Menschen afrikanischer Abstammung und ist statistisch signifikant assoziiert mit erhöhtem LDL-Cholesterin bei Menschen kaukasischer Abstammung sowohl in der CARDIA-Studie als auch in der ARIC-Studie, unabhängig vom Polymorphismus des Apolipoprotein E. Des weiteren kommt es zu erhöhten Triglyzeriden, erhöhtem HDL-Cholesterin und erhöhtem Gesamt-Cholesterin, so dass ein pleiotroper Effekt zu vermuten ist (Klos et al., 2008). Es besteht keinerlei Genkopplung zwischen diesem SNP und dem ApoE-Polymorphismus. Der noch nicht vorbeschriebene SNP 145 G/A kam in den untersuchten Kollektiven deutlich seltener vor, es war kein Einfluss auf die Funktion von HCR2 nachweisbar.

In unserem Kollektiv konnte keiner der SNPs nachgewiesen werden.

5.2.3 Apo E, Multienhancer 1

Die Multienhancer des Apolipoprotein E steuern die Expression von Apo E in reifen Makrophagen und Adipozyten (Shih et al., 2000). Für ME1 sind in der Datenbank

insgesamt 7 SNPs beschrieben. Abbildung 35 zeigt die Lage dieser SNPs, Tabelle 42 die Allelhäufigkeiten in unterschiedlichen Populationen.

1	AGTAGCCCC	ATCTTTGCC	CTCGCTGAGC	CCTACTGGAT	GTTCTTGGTT	ATGCGACAGT
61	TTCCCCATCT	ATTAAAGAGA	AACCCCTATA	GCAGAGGGGA	GGATGAGGTT	GGAAAAGCAG
			G/A			
121	GAGCATTGTT	ATGCTATTCT	TGTG R GGTCT	GGGAAGCAGA	CATCTGGGTG	GATGTTTGGG
					G/T	
181	GGGTGCTGGG	CTTAGTTGGG	GAAGTAGGGG	GGCCCTGGG	GCT K ACAGGG	ACTGGAAGCT
241	CTGAGCTGGC	CAGAGGGATG	TTGCAATCCT	GCCAGGGTCT	TGTCTATGCT	GTCCTTTTCA
		C/T		C/T		
301	CAACCATCC Y	CCTACTGCCA	GGCTGACACG	TGGTTG Y GGG	GGCACAAGGC	CAGCCAACCT
361	AGAGTCTGAG	GCTAGGCGGA	GGACACCCTC	CCCACCAGCT	GCCAGGGTCA	CTGGCGGTCA
	G/A					
421	A A RG C AGCTG	GTGGGGAAGG	CATTGGACTC	CAGCCTTGGG	GGACGGATGT	AGTGATGGTG
			G/A		A/G	
481	GGAAGCAGGC	TTGGTGCCAG	GAGGGG R TC	AGAGGGTGAA	TAA R AGCAGA	TAGAGTGTTT
541	GGGGGAGGTA	GCCAGCCAAA	GGGGGTGAGG	CCCGGTGGAA	GGGAAGAAGG	GACATACACG
601	CAGAGCTTTG	CAGCTGAGGG				

Abbildung 35: vorbeschriebene SNPs ME1, Zählweise aus Gründen der Übersichtlichkeit wie in Abbildung 10 (EBI und WTSI, 2010)

Tabelle 42: Allelfrequenzen vorbeschriebener SNPs ME1 (Klos et al., 2008; Bethesda (MD), 2010), n=Anzahl untersuchter Individuen, CARDIA: Coronary Artery Risk Development in Young Adults

Position	rs-Nummer	untersuchte Population	n	Allelfrequenz	
145 G/A	72654437	Nordamerikaner	372	G = 0,965	A = 0,035
224 G/T	483082	Nordamerikaner	372	G = 0,801	T = 0,199
		Europäer	91	C = 0,48	A = 0,52
		Europäer	5	C = 0,5	A = 0,5
		Afro-Amerikaner	11	C = 0,5	A = 0,5
		Afro-Amerikaner (CARDIA-Studie)	2054	G = 0,55	T = 0,45
		Kaukasier (CARDIA)	1939	G = 0,75	T = 0,25
310 G/T	72654438	Nordamerikaner	372	C = 0,999	A = 0,001
337 C/T	59325138	Nordamerikaner	372	C = 0,593	T = 0,407
		Afro-Amerikaner (CARDIA-Studie)	2054	C = 0,76	T = 0,24
		Kaukasier (CARDIA)	1939	C = 0,6	T = 0,4

Position	rs-Nummer	untersuchte Population	n	Allelfrequenz	
423 G/A	72654439	Nordamerikaner	372	G = 0,999	A = 0,001
508 G/A	72654440	Nordamerikaner	372	G = 0,987	A = 0,013
524 A/G	584007	Nordamerikaner	371	A = 0,365	G = 0,635
		Europäer/Amerikaner	92	A = 0,28	G = 0,72
		Afro-Amerikaner (CARDIA-Studie)	2054	A = 0,84	G = 0,16
		Kaukasier (CARDIA)	1939	A = 0,63	G = 0,37

Die meisten SNPs wurden in relativ kleinen Kollektiven vorbeschrieben, außer den von Klos et al untersuchten Gruppen umfasste kein Kollektiv mehr als 500 Personen (Klos et al., 2008; EBI und WTSI, 2010). Die Allelfrequenzen in der CARDIA-Studie stimmen bis auf den SNP 524 A/G mit den in der Datenbank beschriebenen Frequenzen weitestgehend überein. Für 524 A/G wurden in den großen Kollektiven jedoch deutliche Unterschiede bezüglich der Allelhäufigkeiten gefunden, auch wurde die Base A als Wildtyp-Sequenz angegeben anstatt der Base G wie in der Datenbank (Klos et al., 2008).

224 G/T, 337 C/T sowie 524 A/G scheinen keine funktionellen Auswirkungen zu haben (Klos et al., 2008), über die anderen SNPs fand sich in der Literatur diesbezüglich keinerlei Aussagen, ein recht eindeutiges Zeichen dafür, dass in diese Richtung bis jetzt noch sehr wenig geforscht wurde.

In unserem Kollektiv waren die Banden aller Proben in der DGGE identisch, ein SNP war somit nicht nachweisbar.

5.2.4 Apo E, Multienhancer 2

In der Sequenz des ME2 ist in der Datenbank nur 1 SNP vermerkt. Dieser Basenaustausch mit einem A statt einem G entspricht einer Homologie zu ME1 an dieser Stelle. Abbildung 36 zeigt die Lage dieses SNP, Tabelle 43 die Allelhäufigkeit in unterschiedlichen Populationen.

```

1  AGTAGCCCC -TCTTTGCCC CTCACTGAGC CCTACTGGAT GTTCTTGGTT GTGTGACAGT
61  TTCCCCATCT ATTAAACAGA AACCCCTATA GCAGAGGGGA GGATGAGGTT GGAAAATCAG
121 GAGCATTGTT ATTCTATTCT TGTGGGATCG GGGAAGCAGA CATCTGGGTG GATGTTTGGG
181 GAATGCTGGG CTCAGTTGAG GAAGTAGGGG GGCCCTGGG GCTTACAGGG ACTGGAAGCT
241 CTGAGCTGGC CAGAGGGATG TTGCAATCCT GCCAGGTCT TGTCTATGCT GTCCCTTCA
301 CAACCATCCC CCTACCGCCA GGCTGACACG TGGTTGTGGG GGCACAAGGC CAGCCGAACT
361 AGAGTCTGAG GCTGGGCTGA GGACACCCTC CCCATCAGCT GCCAGGGTCA CTGGCGGTCA
421 AAGGCAGCTG GTGGGGAAGG AATTGGACTC CAGCCCTGGG GGACGGATGT GGTGATGGTG
481 GGAAGCAGGC TTGGTGCCAG GAGGGGCATC AGAGGGTGAA TAAGAGCAGA TAGAGTGTTT
                    G/A
541 GGGGGAGGTA GCCAGCCAAA GGGGGTGAGG CCCGGTGAA GGAAGAAGR GGCATACACT
601 CAGAGCTTTG CAGCTGAAGG
    
```

Abbildung 36: vorbeschriebene SNPs ME2, Zählweise aus Gründen der Übersichtlichkeit wie in Abbildung 10 (EBI und WTSI, 2010)

Tabelle 43: Allelfrequenzen des vorbeschriebenen SNP ME2 (Bethesda (MD), 2010), n=Anzahl untersuchter Individuen, CARDIA: Coronary Artery Risk Development in Young Adults

Position	rs-Nummer	untersuchte Population	n	Allelfrequenz	
590 G/A	10424663	Amerikaner europäischen Wurzeln	58	G = 1	
		Asiaten (China)	35	G = 0,986	A = 0,014
		Asiaten (Japan)	41	G = 1	
		Afro-Amerikaner (CARDIA-Studie)	2054	G = 0,9	A = 0,1
		Kaukasier (CARDIA)	1939	G = 0,997	A = 0,003

Dieser in allen Populationen recht selten vorkommende SNP hat keinerlei funktionelle Auswirkung (Klos et al., 2008) und konnte in unserem Kollektiv nicht nachgewiesen werden.

Für die insgesamt recht geringe Zahl an vorbeschriebenen SNPs, insbesondere mit funktionellen Auswirkungen, gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Da die Bedeutung der untersuchten regulatorischen Elemente erst seit kurzem bekannt ist, sind sie noch nicht sehr gründlich untersucht, dies belegt auch die relativ geringen Zahlen, die wir in der Datenbank des Ensembl Genome Browsers fanden sowie die

fehlende ausführliche Beschreibung in der Literatur. Es ist also durchaus möglich, dass in Zukunft noch weitere SNPs entdeckt werden.

Auf der anderen Seite handelt es sich um wichtige genregulatorische Sequenzen, die durch Mutationen in ihrer Funktion beeinträchtigt werden könnten, so dass es im Laufe der Evolution zu einer Konservierung dieser Sequenzen gekommen ist. Diese Theorie wird zum einen durch die starke Homologie der Fragmente untereinander unterstützt, zum anderen auch durch die Tatsache, dass wir in unseren insgesamt 264 Patienten keine SNPs nachweisen konnten.

5.2.5 Polymorphismus Apo E2, E3, E4

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, existieren für das Apolipoprotein E 3 Allele, die unterschiedliche Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel haben, Apo E2, E3 und E4.

Der Einfluss des Allel-Status auf diverse Lipidparameter wurde in zahlreichen Studien untersucht. Besonders für das LDL-Cholesterin gibt es statistisch signifikante Zusammenhänge, aber auch für HDL-Cholesterin und Triglyzeride sind Assoziationen zu beobachten (Davignon et al., 1988; Klos et al., 2008; Burman et al., 2009). Individuen mit Apo E2-Allelen haben niedrigere Cholesterin-Werte und erhöhte Triglyzerid-Werte im Serum als Apo E3 Allel-Träger, bei Apo E4 verhält es sich genau umgekehrt. Durch den Aminosäure-Austausch im Apo E2-Allel ist die metabolische Funktion gestört, alle Stoffwechselforgänge Apo E betreffend wie z. B. Interaktionen mit Rezeptoren, Enzymen oder auch die Plasma-Clearance laufen langsamer ab. Es kommt zum Anstau von Triglyzeridreichen Lipoproteinen im Serum und zu einer verminderten Konversion von VLDL zu IDL. Kompensatorisch wird der LDL-Rezeptor hochreguliert, so dass die LDL-Cholesterin-Konzentration im Serum weiter abfällt (Davignon et al., 1988).

5 % der Individuen, die homozygot für Apo E2/2 sind, leiden an Typ III Hyperlipidämie nach Fredrickson. Dabei kommt es zu einem ausgeprägten Anstieg der β -VLDL mit deutlich erhöhtem Atherosklerose-Risiko. Fast alle Patienten mit Typ III Hyperlipidämie haben den Genotyp E 2/2, es sind darüber hinaus aber noch weitere Einflussfaktoren nötig zur Manifestation der Erkrankung (Mahley et al., 1999).

Apo E4 Allel-Träger haben erhöhte Cholesterin- und erniedrigte Triglyzerid-Werte, (Davignon et al., 1988), mit insgesamt ebenfalls erhöhtem Risiko für die Entwicklung einer Atherosklerose.

Der Apo E-Polymorphismus hat damit starke Auswirkungen auf die Plasmalipid-Spiegel sowie das Risiko einer Atherosklerose-Entwicklung. Für das von uns untersuchte Kollektiv liegen Daten bezüglich des Polymorphismus nur für die gefundenen SNP-Träger vor, so dass wir Auffälligkeiten bei den Lipidparametern nicht auf diese zurückführen bzw. einen Zusammenhang ausschließen können.

5.3 Promotor der Lipoproteinlipase

5.3.1 vorbeschriebene SNPs

Die Expression der Lipoproteinlipase wird durch ihren Promotor reguliert. In diesem sind lediglich 2 SNPs in der Datenbank des Ensembl Genome Browsers aufgezeigt, zusätzlich konnten wir weitere 4 in der Literatur zu finden, für die es keine rs-Nummern gibt. Abbildung 37 zeigt die Lage dieser SNPs sowie wichtiger Sequenzen innerhalb des Promotors, in Tabelle 44 sind die beschriebenen Allelhäufigkeiten in unterschiedlichen Populationen aufgezeigt.

-780				TTG TGGACACTTT AAATGGAATC		
			<i>Lp-α</i>			
-720	ATACAATATG TGTCTTTTGC GACTATCTTC TTTCACTTAT CATAACTCAA TACGGCTTTA					
		C/T				
-660	GATTATTTGA CCTCGATGTT CTGCCTYTGA ACATAAAATA TTATCCTTGC ATTCCCTTGAT					
-600	GAGTTTGAGG ATTGAGAATA ATTTGCATGA GACAAAAATT AGAAACTAGT TAGAGCAAGT					
			<i>CCAAT-box</i>			
-540	AGGCTTTTCT CCATCACATA AGCTGATCCA TCTTGCCAAT GTTAAACAC CAGATTGTAC					
			<i>LP-β</i>			
-480	AAGCACAAGC TGGGACGCAA TGTGTGTCCC TCTATCCCTA CATTGACTTT GCGGGGGTGG					
-420	GGATGGGGTG CGGGGTGAGT GAGGGAGGAC TGCAAGTGAC AAACAGGATT CGTCAAAAGA					
-360	GAGGTGTATT AAAGTGCCGA TCAAATGTAA TTTAACAGCT AAACTTTCCC TCCTTGGA					
-300	ACAGGTGATT GTTGAGTATT TAACGTGAAT CGATGTAAAC CTGTGTTTGG TGCTTAGACA					
-240	GGGGCCCCC GGGTAGAGTG GAACCCCTTA AGCTAAGCGA ACAGGAGCCT AACAAAGCAA					
			<i>PPRE</i>			
-180	ATTTTTCCGT CTGCCCTTTC CCCCTCTTCT CGTTGGCAGG GTTGATCCTC ATTACTGTTT					
		G/T T/G	<i>SRE</i>	T/G		<i>CCAAT-box</i>
-120	GCTCAAACGT TTAGAAGTGA ATTTAKGKCC CTCCCCCAA CKTATGATTT TATAGCCAAT					
	G/C	<i>Octamer</i>	T/C			
-60	AGGTGATSAG GTTTATTTGC AYATTTCCAG TCACATAAGC A					

Abbildung 37: vorbeschriebene SNPs des Promotors der Lipoproteinlipase (Yang et al., 1996; EBI und WTSI, 2010)

Tabelle 44: Allelfrequenzen vorbeschriebener SNPs des Promotors der Lipoproteinlipase (Yang et al., 1996; Ehrenborg et al., 1997; Bethesda (MD), 2010), n=Anzahl untersuchter Individuen

Position	rs-Nummer	untersuchte Population	n	Allelfrequenz	
-634 C/T	rs17091742	Amerikaner europäischer Wurzeln	24	C = 0,979	T = 0,021
		Amerikaner afrikanischer Wurzeln	23	C = 0,86	T = 0,174
		Asiaten (Chinesen)	24	C = 1	
		Amerikaner europäischer Wurzeln	57	C = 0,982	T = 0,018
		Asiaten (China)	44	C = 0,977	T = 0,023
		Asiaten (Japan)	43	C = 0,988	T = 0,012
		Afrikaner der Subsahara	55	C = 0,745	T = 0,255
-95 G/T		Kaukasier	292	G = 0,990	T = 0,010
-93 T/G	rs1800590	Amerikaner europäischer Wurzeln	23	T = 0,978	G = 0,022
		Amerikaner afrikanischer Wurzeln	23	T = 0,630	G = 0,370
		Asiaten (Chinesen)	23	T = 1	
-79 T/G		Kaukasier	20	T = 0,975	G = 0,025
-53 G/C		Kaukasier	19	G = 0,974	C = 0,026
		Kaukasier	232	G = 0,996	C = 0,004
		Südafrikaner	161	G = 1	
		Asiaten (Chinesen)	120	G = 1	
-39 T/C		Kaukasier	19	T = 0,974	C = 0,026
		Kaukasier	308	T = 1	
		Südafrikaner	161	T = 1	
		Asiaten (Chinesen)	120	T = 1	

Wie aus obiger Abbildung und Tabelle ersichtlich ist, gibt es im Lipoproteinlipase Promotor eine relativ große Anzahl von SNPs, die sich bezüglich ihrer Häufigkeiten deutlich unterscheiden.

Über den SNP -634C/T konnten keinerlei Aussagen gefunden werden, er scheint genau wie -93T/G in afrikanischen Populationen häufiger zu sein als in kaukasischen und asiatischen, allerdings wurden nur jeweils sehr kleine Populationen untersucht.

Die SNPs -79T/G, -53G/C und -39CT wurden alle drei erstmalig in einem Kollektiv von Patienten mit familiärer kombinierter Hyperlipidämie (FCHL) beschrieben. Während -79T/G bei in-vitro Untersuchungen keinen Einfluss auf die Promotor-Aktivität hatte, führte -53G/C zu einer um 25-30% und -39T/C, da es in der Region der Octamer-Bindung liegt, zu einer um 85% reduzierten Promotor-Aktivität, die Lipid-Werte waren bei diesem Patienten nicht signifikant unterschiedlich zu den ebenfalls an FCHL erkrankten Kontrollpersonen (Yang et al., 1996). In einer anderen Studie hatten Patienten mit dem -53C-Allel ein niedrigeres Risiko für die Entwicklung einer Adipositas oder einem Diabetes mellitus Typ II als Wildtyp-Allelträger (Radha et al., 2007). Der SNP -39T/C scheint ein insgesamt eher seltener SNP zu sein, der bislang nur in Patienten mit FCHL und niedriger Plasma-LPL-Aktivität nachgewiesen werden konnte, in einem Kollektiv von 589 gesunden Patienten aus 3 unterschiedlichen ethnischen Gruppen sowie 116 Patienten mit FCHL und normalem LPL-Spiegel konnte er nicht nachgewiesen werden (Ehrenborg et al., 1997; Hall et al., 1997).

Zusammengefasst konnte eine größere Anzahl von Studien und Funktionsuntersuchungen über die Bedeutung dieser einzelnen SNPs trotz intensiver Literaturrecherche nicht gefunden werden. Es existieren lediglich 2 Veröffentlichungen, in denen diese SNPs beschrieben wurden, so dass hier noch ein großer Bedarf an weiteren Studien zu bestehen scheint, sowohl bezüglich ihrer Funktion in-vitro als auch ihrer Auswirkung in vivo.

Unsere 2 untersuchten LPL-Promotor-Fragmente decken die Bereiche mit den vorbeschriebenen SNPs ab, wir konnten dort die SNPs -95G/T und -93T/G nachweisen, eine ausführliche Beschreibung erfolgt in den nachfolgenden Kapiteln.

5.3.2 Mutation -95G/T des Lipoproteinlipase Promotors

Allelfrequenzen und Auswirkungen des SNP -95G/T in der Literatur

Die Mutation -95G/T des Lipoproteinlipase-Promotors wurde insgesamt 6 mal in unserem Kollektiv gefunden, je 3 mal in der Fall- und in der Kontrollgruppe. Daraus ergibt sich eine Major-Allelfrequenz von 0,9886 und eine Minor-Allelfrequenz von 0,0114, alle gefundenen Patienten waren jeweils heterozygot für diese Mutation und hatten keine weitere Mutation an Position -93 oder an einer anderen Stelle der untersuchten Sequenzen.

Diese von uns gefundenen Frequenzen sind weitestgehend identisch mit den von Yang et al berichteten, die diesen SNP erstmals sowohl bei Patienten mit FCHL als auch in einem KHK-Kollektiv und bei gesunden Kontrollpersonen beschrieben (Yang et al., 1996). In-vitro-Experimente durch diese Arbeitsgruppe wiesen keinen Einfluss dieses SNP auf die Aktivität des LPL-Promotors in Myoblasten und Monozyten nach. Es gibt bislang keine Daten zu in-vivo Auswirkungen. Da -95G/T in unmittelbarer Nachbarschaft zu -93T/G liegt und für diesen sehr wohl funktionelle Auswirkungen beschrieben wurden (s.u.), sollten weitere Studien unternommen werden, um -95G/T weiter zu untersuchen.

Beobachtungen zur Auswirkung von -95G/T in unserer Studie

Wir konnten insgesamt aufgrund der kleinen Gruppengröße keine statistisch signifikanten Unterschiede für die untersuchten Lipidparameter sowie das KHK-Risiko zwischen Mutations-Allelträgern und Wildtyp-Allelträgern sehen, bei einigen Lipidparametern war allerdings ein eindeutiger Trend zu beobachten.

Die Triglyzeride der -95T-Allelträger lagen sowohl in der Fall- als auch in der Kontrollgruppe niedriger als bei den -95G-Allelträgern, nur ein einziger Patient der Kontrollgruppe hatte dabei höhere Triglyzeride als der -95G-Durchschnitt, die anderen 5 hatten jeweils niedrigere. Vergleicht man alle Mutations-Allelträger mit den Wildtyp-Allelträgern aus beiden Gruppen, so sind die Triglyzeride mit $126,67 \pm 45,01$ vs. $158,21 \pm 89,78$ mg/dl ebenfalls niedriger (n.s.).

Auch bezüglich der Cholesterin-Werte war der beobachtete Trend in beiden Gruppen jeweils gleich. -95T-Allelträger hatten sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Fallgruppe jeweils ein erhöhtes Gesamt-Cholesterin sowie LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin gegenüber -95G-Allelträgern. Betrachtet man auch hier alle 6 Mutations-Allelträger gemeinsam, so ist das Gesamt-Cholesterin mit $216,67 \pm 52,03$ vs. $185,77 \pm 46,43$ mg/dl erhöht (n.s.). Beim LDL-Cholesterin hatten 5 der 6 -95T-Allelträger ein höheres Cholesterin, einer allerdings mit 66 mg/dl ein deutlich niedrigeres ($138 \pm 43,21$ vs. $112,52 \pm 39,38$ mg/dl, n.s.). Auch beim HDL-Cholesterin war der Wert bei 5 der Mutations-Allelträger höher als beim Durchschnitt der Wildtyp-Allelträger ($53,33 \pm 7,81$ vs. $42,27 \pm 14,15$ mg/dl, mit $p=0,058$ nahe an der Signifikanz).

Die KHK-Prävalenz war bei den 6 Mutations-Allelträgern mit 66,67% nahezu gleich wie bei den Wildtyp-Allelträgern mit 65,91%. Die erniedrigten Triglyzeride sowie das erhöhte HDL-Cholesterin sind zwar eher mit einem erniedrigten KHK-Risiko assoziiert, allerdings waren auch das Gesamt-Cholesterin sowie das LDL-Cholesterin bei

den Mutations-Allelträgern erhöht, das einen der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose darstellt

Insgesamt lässt sich aus unseren Daten ableiten, dass das Allel -95T zumindest bei unseren Patienten tendenziell mit erniedrigten Triglyzeriden und erhöhtem HDL-Cholesterin assoziiert ist, so dass die Vermutung nahe liegt, dass diese Mutation die Promotor-Aktivität der Lipoproteinlipase fördert. Um statistisch signifikante Werte zur Stützung dieser Hypothese zu erreichen, sollte die Studie an einer größeren Patientenzahl weitergeführt werden, außerdem erscheinen weitere in-vitro Untersuchungen sinnvoll.

5.3.3 Mutation -93T/G des Lipoproteinlipase Promotors

Allelfrequenzen

Die Mutation -93T/G im Lipoproteinlipase-Promotor konnte insgesamt 8 mal in unserem Kollektiv nachgewiesen werden, 6 mal in der Fallgruppe und 2 mal in der Kontrollgruppe ($p=0,151$, n.s.). Insgesamt ergibt sich daraus eine Allelfrequenz von 0,9848 für das Major-Allel und 0,0152 für das Minor-Allel in der Gesamtgruppe. In der Fallgruppe betrug die Major-Allelfrequenz 0,9776, in Minor-Allelfrequenz 0,0224; in der Kontrollgruppe ergaben sich die Werte Major-Allelfrequenz 0,9923 und Minor-Allelfrequenz 0,0077.

Diese von uns gefundenen Häufigkeiten entsprechen weitestgehend denen, die in zahlreichen Papern beschrieben wurden, ist allerdings niedriger als von uns erwartet, da vielfach beschrieben ist, dass das Allel -93G mit einem erhöhten KHK-Risiko assoziiert ist (Kastelein et al., 1998; Wittrup et al., 1999; Hokanson, 1999; Sagoo et al., 2008) und wir ein Kollektiv mit relativ hoher KHK-Prävalenz untersucht haben.

Die Minor-Allelfrequenz variiert deutlich zwischen den verschiedenen ethnischen Gruppen, am häufigsten kommt -93G bei Menschen afrikanischen Ursprungs vor, bei denen bis zu 76,4% Träger dieses Allels sind (Ehrenborg et al., 1997). Bei Menschen karibischen Ursprungs beträgt die Minor-Allelfrequenz zwischen 0,104 und 0,407 (Hall et al., 2000; Smith et al., 2010), bei Asiaten 0,00 bis 0,0442 (Ehrenborg et al., 1997; Hall et al., 2000). Bei Menschen kaukasischer Abstammung werden Minor-Allelfrequenzen von 0,0145 bis 0,052 angegeben (Wittrup et al., 1999; Hall et al., 2000; Sagoo et al., 2008), so dass wir uns mit unserem Kollektiv eher am unteren Rand der vorbeschriebenen Frequenz-Häufigkeit bewegen.

Das Ur-Allel scheint -93G zu sein, dieses ist auch konserviert in anderen Spezies, im Laufe der Menschheitsentwicklung vom afrikanischen Kontinent aus kam es zu den unterschiedlichen Allelfrequenzen, die heute zu beobachten sind (Yang et al., 1996; Ehrenborg et al., 1997; Hall et al., 1997).

Vorbeschriebene Auswirkungen des SNP -93T/G in der Literatur

Der SNP an Position -93 des Lipoproteinlipase Promotors ist damit ein recht häufiger SNP, der im Gegensatz zu einigen anderen SNPs in allen bisher untersuchten ethnischen Bevölkerungsgruppen gefunden wurde. Erstmals beschrieben wurde er 1995, in-vitro Untersuchungen zeigten eine um ca. 50% erniedrigte Promotor-Aktivität, die auf eine gestörte Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an das in unmittelbarer Nachbarschaft liegende SRE-Element zurückzuführen sei (Yang et al., 1995; Yang und Deeb, 1998). Untersuchungen in einer anderen Arbeitsgruppe kurze Zeit später zeigten in-vitro dagegen eine erhöhte Promotor-Aktivität durch das Allel -93G, bedingt durch Bindung eines noch nicht identifizierten Transkriptionsfaktors an -93G, aber nicht an -93T (Hall et al., 1997). Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse ist die Verwendung unterschiedlicher Zellen mit jeweils unterschiedlichen Expressionsmustern für die In-vitro-Experimente, Yang et al arbeiteten mit Monozyten und Myoblasten, Hall et al mit glatten Muskel- und Nebennierenzellen (Talmud et al., 1998). Sowohl eine erhöhte als auch eine erniedrigte Promotor-Aktivität und damit verbunden mehr oder weniger LPL ist mit in der Literatur veröffentlichten Daten vereinbar (s.u.), so dass weitere Studien zu dieser Problematik sinnvoll erscheinen.

In der kaukasischen Bevölkerung besteht eine starke Genkopplung des SNP -93T/G mit einem weiteren Basenaustausch im Lipoproteinlipase Gen an Position 280 (Yang et al., 1995; Kastelein et al., 1998; Hall et al., 2000), bei Asiaten und Afrikanern ist diese Kopplung ebenfalls zu beobachten, allerdings deutlich schwächer ausgeprägt (Ehrenborg et al., 1997). Die Substitution des Wildtyp-Allels G an Position 280 durch ein A im Exon 2 führt zu einem Aminosäureaustausch im fertigen LPL-Enzym, an Position 9 wird anstelle eines Aspartat ein Asparagin eingebaut, Asp9Asn (D9N) (Mailly et al., 1995). Menschen mit der 9N-Variante haben gegenüber 9D-Trägern erhöhte Triglyzeride und ein erniedrigtes HDL-Cholesterin, bedingt durch eine Funktionsstörung der LPL (Mailly et al., 1995; Gerdes et al., 1997; Wittrup et al., 1999; Sagoo et al., 2008).

Aufgrund dieser Genkopplung ist es in kaukasischen Bevölkerung schwierig, den alleinigen Einfluss von -93G zu beobachten, daher gibt es in vielen publizierten Stu-

dien widersprüchliche Ergebnisse, insbesondere, wenn nicht erwähnt wurde, ob neben -93G auch die andere Mutation untersucht wurde. Bei kaukasischen Patienten, die heterozygot für beide Mutationen waren, wurden in einigen Studien signifikant höhere Triglyzeride sowie bei Männern ein deutlich erhöhtes KHK-Risiko gefunden, kein statistischer Unterschied bestand in Bezug auf HDL-Cholesterin, Gesamt-Cholesterin oder BMI (Wittrup et al., 1999). In derselben Studie hatten auch Patienten mit nur -93G oder einer homozygoten Mutation an beiden Positionen tendenziell erhöhte Triglyzeride, allerdings war aufgrund der geringen Fallzahlen keine statistische Signifikanz zu beobachten. Das KHK-Risiko wurde durch Auftreten des ApoE-Polymorphismus Apo E2/3 oder Apo E3/4 von 1,6 auf 2,5 erhöht, allerdings gab es auch hier aufgrund der geringen Fallzahlen keine statistische Signifikanz (Wittrup et al., 2006).

In anderen Studien an kaukasischen oder afrikanischen KHK-Patienten und gesunden Kontrollgruppen wurde bei doppelt-heterozygoten Patienten weder erhöhte Triglyzeride noch ein erhöhtes KHK-Risiko nachgewiesen (Talmud et al., 1998; Ferencak et al., 2003; Rios et al., 2003), dafür aber ein signifikant erhöhtes Gesamt-Cholesterin und niedrigeres HDL-Cholesterin (Kastelein et al., 1998).

Da die Genkopplung der beiden Mutationen bei Menschen afrikanischer Abstammung deutlich geringer ist, können in diesen Populationen der Einfluss des Allels -93G ohne 9N besser als in kaukasischen Populationen untersucht werden. Menschen afrikanischer Herkunft mit nur -93G hatten signifikant niedrigere Triglyzeride, ein Unterschied bzgl. HDL- oder LDL-Cholesterin ließ sich nicht signifikant nachweisen (Ehrenborg et al., 1997; Talmud et al., 1998). Bei insgesamt sehr niedrigem Triglyzerid-Spiegel in der untersuchten Population war allerdings kein signifikanter Unterschied bzgl. der Nüchtern-Triglyzeride bei alleiniger Betrachtung der Mutation -93 nachweisbar (Hall et al., 2000), so dass die Theorie entstand, dass das Allel -93G vor allem eine Rolle spielt in der Steigerung der Expression der Lipoproteinlipase nach Mahlzeiten, wenn die Triglyzerid-Spiegel nahrungsbedingt ansteigen. Des weiteren scheint die Triglyzerid-senkende Wirkung des Allels -93G in Zusammenhang mit dem BMI der betroffenen Patienten zu stehen, bei kaukasischen Patienten mit einem BMI $< 26 \text{ kg/m}^2$ konnte kein signifikanter Unterschied im Triglyzerid-Spiegel zwischen einfach- oder doppelt-heterozygoten Mutationsträger und Wildtypen nachgewiesen werden, bei Patienten mit einem BMI $> 26,5 \text{ kg/m}^2$ führte das alleinige Allel -93G zu signifikant niedrigeren Triglyzeriden während doppelt-heterozygote Patienten signifikant höhere Triglyzeride als Wildtyp-Allelträger hatten (Hall et al., 1997). In derselben Studie wurde außerdem beobachtet, dass Wildtyp-

Allelträger mit einem BMI $<26,5 \text{ kg/m}^2$ um 25% niedrigere Triglyzeride hatten als Wildtyp-Allelträger mit BMI $>26,5 \text{ kg/m}^2$, bei doppelt-heterozygoten Allel-Träger waren die Triglyzeride in der Gruppe mit dem höheren BMI um 40% höher als in der Gruppe mit niedrigem BMI. Die Steigerung war signifikant und ein weiterer Hinweis darauf, dass das Allel -93G mit oder ohne Kombination mit 9N je nach BMI des Patienten unterschiedlich starke Auswirkung auf den Triglyzerid-Spiegel hat. In einer asiatischen Population aus Indien war das Allel -93G signifikant assoziiert mit der Entwicklung einer Adipositas (Odds ratio 1,766), nicht aber mit Diabetes mellitus Typ II (Radha et al., 2007).

Das Allel -93G ist bei den meisten untersuchten Patienten mit erniedrigten Triglyzeriden assoziiert, wenn es mit dem Wildtyp-Allel 9D auftritt. Bei doppelt-heterozygoten Menschen scheint dagegen insgesamt der Triglyzerid-steigernde Effekt von 9N den Triglyzerid-senkenden Effekt von -93G zu übersteigen. Patienten mit nur 9N ohne -93G werden nur sehr selten gefunden, so dass alleinige Aussagen über diese Variante schwer getroffen werden können. Vermutlich führt bei doppelt-heterozygoten Menschen die durch -93G gesteigerte Expression des defekten Proteins zu den insgesamt gesteigerten Triglyzeriden, diese wiederum könnten den erhöhten BMI und das erhöhte Adipositas-Risiko erklären (Hall et al., 1997; Talmud et al., 1998).

Eine Kombination des Allels -93G mit der Mutation S19W im Apolipoprotein A5 führte zu signifikant erhöhtem BMI sowie Taillen- und Hüftumfang gegenüber Wildtyp-Allelträgern, die Mutation -93G (ohne Aussage bezüglich D9N) allein führte lediglich zu erniedrigtem HDL-Cholesterin, ansonsten waren keine signifikanten Veränderungen nachweisbar (Smith et al., 2010). Da die Patienten dieser Studie mit einem durchschnittlichen BMI von ca. 31 kg/m^2 sehr kräftig waren, ist es nicht auszuschließen, dass das erniedrigte HDL-Cholesterin eher auf diesen Umstand zurückzuführen ist als auf die Mutation. Insgesamt hatten in dieser Studie doppelt-heterozygote Patienten eine Odds ratio von 4,02 für die Entwicklung einer extremen Adipositas mit einem BMI $> 40 \text{ kg/m}^2$, keine erhöhte Odds ratio bestand für einen BMI $>30 \text{ kg/m}^2$.

Beobachtungen zur Auswirkung von -93G in unserer Studie

Die Mutation -93T/G wurde in dieser Studie insgesamt 6x in der Fallgruppe gefunden (Trägerfrequenz 4,5%), in der Kontrollgruppe gab es nur 2 Allel-Träger (Trägerfrequenz 1,5%, n.s.), es handelte sich jeweils um heterozygote Genotypen ohne Mutationen an Position -95. Diese Verteilung entspricht von der Tendenz her den

Beobachtungen von Kastelein et al, in deren Studie die Mutations-Trägerfrequenz bei Patienten mit Triglyzeriden >171,23 mg/dl mit 5,9% deutlich höher lag als in der Gruppe mit Triglyzeriden <171,23 mg/dl mit 3,1% (Kastelein et al., 1998).

Für unsere Mutations-Allelträger bzgl. -93K lagen in unserer Arbeitsgruppe die Informationen bzgl. des Gen-Status D9N im LPL-Gen sowie S19W im Apo A5-Gen und der Apo E- Allelstatus vor. Obwohl es sich um ein Kollektiv kaukasischen Ursprungs handelt, in dem -93G in der Regel gekoppelt an LPL 9N auftritt, war diese Koppelung bei unseren Mutations-Allelträger nur in 50% zu beobachten.

Wir hatten in unserem Kollektiv insgesamt 2 Patienten mit Triglyzeriden <150mg/dl die lediglich die Mutation -93 G aufwiesen, 2 Patienten mit Triglyzeriden > 150mg/dl die lediglich die Mutation -93G aufwiesen sowie 4 Patienten mit Triglyzeriden > 150mg/dl, die heterozygot sowohl für -93G als auch für 9N waren.

Im Apo A5-Genprodukt waren alle unsere Mutations-Allelträger homozygot für den Wildtyp 19S, siehe hierzu Tabelle 45.

Tabelle 45: ApoE-, LPL D9N- und Apo A5 S19W-Status bei den Mut- Allelträgern des SNP -93K

Mut- Allelträger	Apo E Allele	LPL D9N	Apo A5 S19W
1 (FG)	3/3	9N heterozygot	19S homozygot
2 (FG)	3/3	9N heterozygot	19S homozygot
3 (FG)	2/4	9D homozygot	19S homozygot
4 (FG)	2/3	9D homozygot	19S homozygot
5 (FG)	3/3	9N heterozygot	19S homozygot
6 (FG)	4/4	9N heterozygot	19S homozygot
7 (KG)	3/3	9D homozygot	19S homozygot
8 (KG)	3/3	9D homozygot	19S homozygot

Die niedrige Fallzahl in den einzelnen Gruppen lässt leider keine statistische Untersuchung zu, so dass lediglich eine beschreibende Statistik durchgeführt wird, die schließende Statistik bezieht sich jeweils auf die Gesamtheit der Mutations-Allelträger.

In der Fallgruppe hatten die doppelt-heterozygoten Mutationsträger tatsächlich wie zu erwarten im Durchschnitt höhere Triglyzeride als homozygote Träger des Wild-

typ-Allels ($265,25 \pm 11,43$ vs. $218,60 \pm 82,98$ mg/dl), die beiden lediglich für -93G heterozygoten Mutationsträger hatten mit 155 mg/dl und 240 mg/dl niedrigere Triglyceride als der Durchschnitt der doppelt-heterozygoten.

Die beiden Mutations-Allelträger der Kontrollgruppe hatten niedrigere Triglyceride als die -93T-Allelträger und bestätigten damit die Theorie, dass die alleinige Folge von -93G durchschnittlich niedrigere Triglyceride bedeutet, zudem wurde von Hall et al beschrieben, dass die Auswirkungen des SNPs auf den Triglyzerid-Stoffwechsel bei Patienten mit insgesamt eher niedrigeren Triglyzeriden schwierig zu beobachten sind (Hall et al., 2000). Betrachtet man alle 8 Mutations-Allelträger gemeinsam und vergleicht sie mit allen Wildtyp-Allelträgern beider Gruppen, so sind die Triglyzeride mit $203,13 \pm 109,67$ vs. $156,07 \pm 88,26$ mg/dl zwar insgesamt erhöht (n.s.), einzeln betrachtet haben allerdings die 4 doppelt-heterozygoten Mutations-Allelträger im Durchschnitt mit $265 \pm 111,43$ mg/dl höhere Triglyceride als die lediglich für -93G heterozygoten Mut-Allelträger mit $141,25 \pm 73,75$ mg/dl, wobei diese Zahlen natürlich durch die Zuordnung der Patienten zu Fall- und Kontrollgruppe mit beeinflusst werden.

Der durchschnittliche BMI der Mut-Allelträger der Fallgruppe war niedriger als der der Wt-Allelträger ($22,13 \pm 1,98$ vs. $22,83 \pm 1,63$ kg/m², n.s.), auch hier ergab sich keine statistische Signifikanz, die 4 doppelt-heterozygoten Mut-Allelträger hatten einen durchschnittlichen BMI von $22,08 \pm 2,56$ kg/m².

In der Kontrollgruppe hatten beide Mutations-Allelträger einen erhöhten BMI gegenüber dem Durchschnitt der homozygoten Wildtyp-Allelträger ($24,56 \pm 0,09$ vs. $22,94 \pm 1,52$ kg/m²), eine Signifikanz-Berechnung war aufgrund der geringen Datenzahl nicht sinnvoll. Bei Betrachtung des Gesamtkollektivs war der BMI der Wildtyp-Allelträger mit $22,88 \pm 1,57$ kg/m² etwas höher als der der Mutations-Allelträger mit $22,74 \pm 2,01$ kg/m² (n.s.).

Insgesamt konnten wir aufgrund unserer Daten die These, dass das Allel -93G mit einem höheren BMI assoziiert ist als das Allel -93T (Radha et al., 2007) nicht unterstützen. Es gibt nach unseren Kenntnissen in der Literatur allerdings noch keine vergleichbare Studie, in der normalgewichtige Patienten auf Auswirkungen des SNP auf ihren BMI untersucht wurden, so dass direkte Vergleiche nicht möglich sind.

Die Aussage, dass doppelt-heterozygote Patienten ein erhöhtes KHK-Risiko hätten (Wittrup et al., 1999), ließ sich in unserer Studie ebenfalls nicht bestätigen, unsere 4 doppelt-heterozygoten Mutations-Allelträger hatten mit 25% gegenüber 67,97% sogar deutlich seltener eine KHK. Es ist nicht auszuschließen, dass dies lediglich durch unsere geringen Fallzahlen bedingt ist, besonders bei den -93G-Allelträgern könnten einige wenige zusätzliche Patienten das Ergebnis massiv verändern, zu-

sätzlich wurden einige Confounder wie z.B. Diabetes mellitus, Hypertonie oder Alter in diesen Berechnungen nicht berücksichtigt.

Nach Auswertung unserer Daten können wir keinen funktionell relevanten Einfluss des SNP -93T/G auf die Expression der Lipoproteinlipase nachweisen, weder in positive noch in negative Richtung. Hierfür gibt es mehrere denkbare Ursachen: Die Daten bzgl. des ApoE-Status sowie des LPL-Status an Position 9 lag uns lediglich bei den Mutations-Allelträger vor und wich teilweise stark von den zu erwartenden Werten ab, über die Wildtyp-Allelträger lagen uns keine Daten vor, so dass wir diesen Einfluss nicht sicher beurteilen können. Zudem hatte unser gesamtes Kollektiv einen eher niedrigen BMI ($< 25 \text{ kg/m}^2$), bei solchen Patienten ist der Einfluss der Mutationen auf den Triglyzerid-Stoffwechsel anscheinend geringer als bei Patienten mit höherem BMI (Hall et al., 1997). Des weiteren war unser Kollektiv relativ klein, so dass statistisch signifikante Werte bei der niedriger als erwarteten Allelfrequenz, die teilweise keine schließende Statistik zuließ, schwer zu erreichen sind. Weiterhin ist zu bedenken, dass ein Großteil unseres Kollektivs unter lipidsenkender Medikation steht, so dass man die hier gefunden Werte nicht ohne weiteres mit denen in der Literatur veröffentlichten Werten vergleichen darf, in denen sehr häufig gesunde Probanden untersucht wurden. Man sollte daher in einer weiteren Studie gezielt sowohl nach der Mutation -93T/G als auch nach der an Position 9 und dem ApoE Polymorphismus bei einer größeren Patientenzahl in Kollektiv der Marburger KHK-Präventions-Allianz forschen, um statistisch signifikante Ergebnisse für dieses Kollektiv zu erhalten.

5.3.4 Funktionen der Lipoproteinlipase, Wirkung in verschiedenen Geweben und Beeinflussung durch gefundene SNPs

Die Lipoproteinlipase hat zahlreiche verschiedene Funktionen, sowohl katalytische als auch nicht-katalytische. Ihre Hauptfunktion ist die Hydrolyse von Triglyzeriden aus VLDL und Chylomikronen nach deren Apolipoprotein E-vermittelten Bindung an den VLDL-Rezeptor (Goldberg, 1996; Tacke et al., 2001) mit anschließender Aufnahme der freien Fettsäuren und Übertragung frei werdender Lipide auf andere Lipoproteinklassen. Dadurch wird der Triglyzerid-Spiegel im Blut gesenkt sowie der HDL-Cholesterin-Spiegel erhöht, so dass die LPL insgesamt eher atheroprotektive Wirkung hat. Eine erniedrigte LPL-Aktivität ist nachgewiesenermaßen assoziiert mit

einem verstärkten Auftreten von Angina Pectoris bei Patienten mit vorbekannter KHK (Kastelein et al., 2000), eine erhöhte LPL-Aktivität, z.B. durch die Mutation S447X im Exon 9, führt zu einer erniedrigten Odds ratio für die Entwicklung einer KHK (Sagoo et al., 2008).

In atherosklerotischen Plaques wird die Lipoproteinlipase in Makrophagen und glatten Muskelzellen synthetisiert (Yla-Herttuala et al., 1991), die Hydrolyse von Triglyzerid-reichen Lipoproteinen führt hier zu einer lokal sehr hohen Konzentration von RLPs. Diese können die Permeabilität der Endothelwände verändern und so das Eindringen von LDL-Partikeln und TRL erleichtern (Eiselein et al., 2007), die dort ihrer atherogene Wirkung entfalten, u.a. begünstigt durch Retention in der subendothelialen Matrix durch die LPL (Saxena et al., 1992). In atherosklerotischen Plaques führt eine gesteigerte LPL-Aktivität somit vermutlich eher zur Verstärkung der atherogenen Wirkung.

Die Expression der Lipoproteinlipase in den Makrophagen der atherosklerotischen Plaques wird durch zahlreiche Zytokine und Lipopolysaccharide reguliert, es existiert vermutlich ein zellspezifischer Regulationsmechanismus (Mead et al., 1999). Zu einem ähnlichen Schluss führen auch die unterschiedlichen in-vitro Ergebnisse bezüglich der Auswirkung des SNP -93T/G auf die Promotoraktivität (Yang et al., 1996; Hall et al., 1997; Talmud et al., 1998). Nach unserem Wissen gibt es bislang keine Studien, die sich gezielt mit der Bedeutung von SNPs in regulatorischen Elementen der LPL vor dem Hintergrund dieser zellspezifischen Regulierung beschäftigen, die für die Bedeutung der LPL in der Entwicklung der Atherosklerose eine entscheidende Rolle spielt. Es erscheint uns daher sinnvoll, weitere Untersuchungen zur Auswirkung der einzelnen SNPs auf die Aktivität des Promotors in verschiedenen Zellen sowohl in-vitro als auch in-vivo durch Messung der LPL-Aktivität durchzuführen, sowie Studien zur Progression der KHK bei Patienten mit und ohne den gefunden SNPs zu beginnen.

5.4 Schlussfolgerung

Goudriaan et al zeigten 2001, dass ein Fehlen des VLDL-Rezeptors bei Mäusen dazu führte, dass diese trotz deutlich erhöhter Triglyzeride unter hochkalorischer Ernährung keine Adipositas entwickelten (Goudriaan et al., 2001). Der VLDL-Rezeptor ist zusammen mit der Lipoproteinlipase, dem Apolipoprotein E und dem Apolipoprotein C-II beteiligt an der Hydrolyse von Triglyzeriden und Aufnahme der freien Fettsäuren in die Zellen (Tacke et al., 2001; Takahashi et al., 2004). Ein

Fehlen des VLDL-Rezeptors führt zu verminderter Triglyzerid-Hydrolyse, dadurch gesteigerten Triglyzerid-Spiegeln sowie verminderte Entstehung von freien Fettsäuren, die als Speicherfett Grundlage der Adipositas bilden. Ziel dieser Arbeit war es, genregulatorische Elemente von 2 weiteren an diesem Prozess beteiligten Proteinen auf Mutationen zu untersuchen, die durch Veränderung der Expression einen ähnlichen oder genau komplementären Effekt hervorrufen wie das beschriebene Fehlen des VLDL-Rezeptors.

In den genregulatorischen Sequenzen HCR1, HCR2, ME1 und ME2 des Apolipoprotein E konnten wir keinerlei SNPs nachweisen, ein deutliches Zeichen für die Konservierung dieser Elemente und deren Bedeutung für die Expression des Apolipoprotein E, das für den Lipidstoffwechsel von sehr großer Bedeutung ist.

Im Promotor der Lipoproteinlipase konnten wir 2 SNPs nachweisen, -95G/T und -93T/G. -95T führte zu leicht erniedrigten Triglyzeriden und einem leicht erhöhten HDL-Cholesterin gegenüber -95G, so dass eine Verstärkung der Promotor-Aktivität durch das Allel -95T möglich scheint. Der BMI der Mutations-Allelträger unterschied sich nur minimal von dem der Wildtyp-Allelträger und war somit durch die Mutation nicht beeinflusst.

Das Allel -93G führte gegenüber dem Wildtyp-Allel -93T bei unserem Kollektiv zu erhöhten Triglyzeriden. Da eine starke Genkopplung mit dem Aminosäureaustausch D9N in kaukasischen Bevölkerungen beschrieben ist, der zu erhöhten Triglyzeriden führt, ist diese Beobachtung vermutlich darauf zurückzuführen, dass die meisten unserer Patienten neben -93G auch Träger von 9N waren. In der Literatur wird meist eine erhöhte Promotor-Aktivität durch -93G beschrieben, die insgesamt zu erniedrigten Triglyzeriden bei Patienten führt, bei denen keine Kopplung mit 9N vorliegt (Ehrenborg et al., 1997; Hall et al., 1997; Sagoo et al., 2008). Der BMI unseres Kollektives wurde von der Mutation kaum beeinflusst, in anderen Studien führt -93G dagegen zu einem erhöhten Adipositas Risiko, allerdings geht aus der Studie nicht hervor, ob die untersuchten Patienten an Aminosäureposition 9 ein Asparagin oder ein Aspartat hatten (Radha et al., 2007).

Beide gefundenen SNPs scheinen also die Promotoraktivität der Lipoproteinlipase eher zu erhöhen als zu erniedrigen, durch verstärkte Hydrolyse der Triglyzeride sinkt der Triglyzerid-Spiegel im Blut.

Zusammengefasst konnten wir keine Mutationen nachweisen, die die Expression der Lipoproteinlipase oder des Apolipoprotein E erniedrigen und damit als Erklärung dienen könnten, warum in der Fallgruppe unserer Untersuchung Patienten mit hohen Triglyzeriden im Blut einen normalen BMI vorweisen.

6 Zusammenfassung

Durch Atherosklerose bedingte Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Haupttodesursache in der westlichen Welt. Neben der familiären Disposition, dem Geschlecht und dem Lebensalter gibt es zahlreiche beeinflussbare Risikofaktoren für diese Erkrankungen. Zusätzlich zum Nikotin-Konsum, der arteriellen Hypertonie und dem Diabetes mellitus Typ II spielen dabei vor allem die Lipidparameter wie der Cholesterin- und der Triglyzerid-Spiegel eine entscheidende Rolle.

Ziel dieser Arbeit war es, genregulatorische Elemente der Lipoproteinlipase und des Apolipoprotein E, die beide eine entscheidende Rolle bei der Hydrolyse von Triglyzeriden spielen, auf Mutationen zu untersuchen, die die Expression dieser Proteine verändern und somit Einfluss auf den Triglyzerid-Spiegel ausüben.

Apolipoprotein E vermittelt die Bindung von Triglyzerid-reichen Lipoproteinen an den VLDL-Rezeptor, die Lipoproteinlipase senkt durch Hydrolyse von Triglyzeriden den Triglyzerid-Spiegel im Blut und erhöht gleichzeitig durch Unterstützung der Übertragung von diversen Lipiden den HDL-Cholesterin-Spiegel. Beide Effekte sind verantwortlich für die insgesamt eher atheroprotektive Wirkung der Lipoproteinlipase im Gefäßbett.

In atherosklerotischen Plaques dagegen entwickelt die LPL atherogene Wirkung, durch Erhöhung der RLP-Konzentration werden die Endothel-Eigenschaften verändert und LDL- und VLDL-Partikel werden in der subendothelialen Matrix der Plaques zurückgehalten, wo sie entscheidend zur Entwicklung der Atherosklerose beitragen. Die Expression der LPL wird durch ihren Promotor gesteuert, die Expression des Apolipoprotein E in der Leber wird durch die Hepatic Control Regions (HCR) 1 und 2 kontrolliert, in reifen Makrophagen und Adipozyten durch die Multienhancer (ME) 1 und 2.

Wir untersuchten diese Sequenzen in der DNA von 264 Patienten mit einem BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$ des Kollektivs der Marburger KHK-Präventions-Allianz, 134 Patienten hatten erhöhte Triglyzeride ($> 150 \text{ mg/dl}$), 130 hatten normale Triglyzeride ($< 150 \text{ mg/dl}$). Die Sequenzen wurden zunächst durch eine PCR amplifiziert und anschließend in der DGGE auf Mutationen gescreent, auffällige Proben sowie unauffällige Proben als Kontrolle wurden sequenziert. Aus den Daten der Marburger KHK-Präventions-Allianz entnahmen wir die Lipidprofile, den BMI sowie den Koronarstatus und einige weitere Risikofaktoren der Patienten und werteten sie statistisch auf Unterschiede zwischen Mutations- und Wildtyp-Allelträgern aus.

In den regulatorischen Elementen des Apolipoprotein E konnten wir keine Mutationen nachweisen, diese Sequenzen scheinen stark konserviert zu sein, auch in der Literatur werden keine funktionell relevanten SNPs beschrieben.

Im Promotor der LPL fanden wir 2 bereits in der Literatur vorbeschriebene SNPs, -93T/G und -95G/T.

-95G/T hatte in der Literatur bei In-vitro-Untersuchungen keine Auswirkungen auf die Aktivität des LPL-Promotors, über die Auswirkungen in-vivo gibt es keine Berichte. Bei unseren insgesamt 6 Patienten, die diesen SNP vorwiesen, war das Allel -95T assoziiert mit erniedrigten Triglyzeriden und einem leicht erhöhten HDL-Cholesterin (n.s.), beides Hinweise auf eine erhöhte Promotor-Aktivität, kein Unterschied konnte beobachtet werden bezüglich der KHK-Prävalenz.

Über -93T/G gibt es in der Literatur widersprüchliche Aussagen, sowohl eine erhöhte als auch eine erniedrigte Promotor-Aktivität sind beschrieben. In unserem Kollektiv konnten wir diesen SNP 8 mal nachweisen, 6x bei Patienten mit Triglyzeriden > 150 mg/dl, 2 mal bei Patienten mit Triglyzeriden < 150 mg/dl. Tendenziell haben unsere Patienten mit -93G-Allel erhöhte Triglyzeride, so wie es auch in einigen Studien beschrieben wurde, das erhöhte KHK-Risiko sowie das erniedrigte HDL-Cholesterin konnten wir bei unseren Patienten nicht nachweisen, genauso wenig wie eine Prädisposition für einen höheren BMI.

Obwohl in den letzten Jahren intensiv über die Bedeutung des Apolipoprotein E und der Lipoproteinlipase für den Triglyzerid-Stoffwechsel und das KHK-Risiko geforscht wurde, bleiben immer noch viele Fragen offen, die es in weiteren Studien und Funktionsuntersuchungen zu klären gilt.

7 Abstract

Cardiovascular diseases caused by atherosclerosis are the major causes of death in the western world. Beside a positive family history, gender and age there are many other risk factors, that can be influenced by mankind. Next to smoking, high blood pressure and Diabetes mellitus these are especially serum cholesterol- and Triglyzerid-level.

Lipoprotein lipase and apolipoprotein E are important factors for the hydrolysis of Triglyzerides and in that way they have a big influence on Triglyzerid-level. Aim of this study was to screen certain gene-regulatory sequences of these proteins for mutations that have influence on their expression.

Apolipoprotein E mediates the binding of Triglyzerid-rich-lipoproteins to the VLDL-receptor. Lipoprotein lipase lowers Triglyzerid-levels in serum through hydrolysis and raises HDL-level by supporting the exchange of other lipids between lipoproteins. These two effects are responsible for the atheroprotective impact of this enzyme.

In atherosclerotic plaques lipoprotein lipase has atherogenic impact by the increase of the amount of remnant lipoproteins which change the endothelial characteristics. LDL and VLDL are kept to the subendothelial matrix and support the progress of atherosclerosis.

The expression of lipoprotein lipase is controlled by its promoter, the expression of apolipoprotein E in the liver requires 2 hepatic control regions (HCR1 and HCR2), expression in mature macrophages and adipocytes requires multienhancer (ME1 and ME2).

We studied these sequences in the DNA of 264 patients with an BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$ from the Marburger KHK-Präventions-Allianz. 134 of them had elevated Triglyzerides ($> 150 \text{ mg/dl}$), 130 had normal Triglyzerid-levels ($< 150 \text{ mg/dl}$). The sequences were first amplified using PCR and then screened for mutations by DGGE, suspicious probes were sequenced.

From the data of the Marburger KHK-Präventions-Allianz we took the lipid levels, BMI and the result of the coronary angiography as well as some other risk factors and made a statistical analysis between wildtyp- and mutation-patients.

Within the regulatory elements of apolipoprotein E we could not find any mutation, the sequences seem to be strongly conserved, even in literature there are no important mutations described.

Within the promoter of the lipoprotein lipase we found 2 already described SNPs, -93T/G and -95G/T.

Described studies of -95G/T showed no influence of this SNP on promoter-activity in vitro, and statements on in-vivo-experiments could not be found. In our study we found six carriers of this mutations, the -95T-Allel was associated with lower Triglyzerid-level and moderate elevated HDL-level. Both effects can be seen as hints that -95T eventually increases the promoter-activity. We could not find any differences relating to risk of developing coronary heart disease.

Different effects of -93T/G are described in literature, an increased activity as well as a lowered activity. Within our study we had 8 patients with this mutation, two of them had Triglyzerides > 150 mg/dl, two < 150 mg/dl. There was a trend of slightly elevated Triglyzerides as described in other studies, the elevated risk of coronary heart disease and lower HDL-levels as well as an higher BMI could not be confirmed with our data.

Also there has been lots of research concerning apolipoprotein E and lipoprotein lipase and their influence on Triglyzerid-level and CHD, there still remain lots of open questions that need to be cleared by further studies.

8 Literaturverzeichnis

- Allan, C. M., Walker, D., Segrest, J. P., Taylor, J. M. (1995a) Identification and characterization of a new human gene (APOC4) in the apolipoprotein E, C-I, and C-II gene locus. *Genomics* 28, 291-300
- Allan, C. M., Walker, D., Taylor, J. M. (1995b) Evolutionary duplication of a hepatic control region in the human apolipoprotein E gene locus. Identification of a second region that confers high level and liver-specific expression of the human apolipoprotein E gene in transgenic mice. *J.Biol.Chem.* 270, 26278-26281
- Amento, E. P., Ehsani, N., Palmer, H., Libby, P. (1991) Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.* 11, 1223-1230
- Argraves, K. M., Battey, F. D., MacGalman, C. D., McCrae, K. R., Gafvels, M., Kozarsky, K. F., Chappell, D. A., Strauss, J. F., Strickland, D. K. (1995) The very low density lipoprotein receptor mediates the cellular catabolism of lipoprotein lipase and urokinase-plasminogen activator inhibitor type I complexes. *J.Biol.Chem.* 270, 26550-26557
- Assmann, G., Schulte, H., Cullen, P. (1997) New and classical risk factors--the Munster heart study (PROCAM). *Eur.J.Med.Res.* 2, 237-242
- Assmann, G., Schulte, H., von Eckardstein, A. (1996) Hypertriglyceridemia and elevated lipoprotein(a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men. *Am.J.Cardiol.* 77, 1179-1184
- Austin, M. A. (1991) Plasma triglyceride and coronary heart disease. *Arterioscler.Thromb.* 11, 2-14
- Austin, M. A., King, M. C., Vranizan, K. M., Krauss, R. M. (1990) Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk [see comments]. *Circulation* 82, 495-506
- Basu, S. K., Brown, M. S., Ho, Y. K., Havel, R. J., Goldstein, J. L. (1981) Mouse macrophages synthesize and secrete a protein resembling apolipoprotein E. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78, 7545-7549
- Beisiegel, U., Weber, W., Bengtsson Olivecrona, G. (1991) Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88, 8342-8346
- Bethesda (MD) National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine: Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP) (2010) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
- Burman, D., Mente, A., Hegele, R. A., Islam, S., Yusuf, S., Anand, S. S. (2009) Relationship of the ApoE polymorphism to plasma lipid traits among South Asians, Chinese, and Europeans living in Canada. *Atherosclerosis* 203, 192-200
- Castelli, W. P. (1992) Epidemiology of triglycerides: a view from Framingham. *Am.J.Cardiol.* 70, 3H-9H

- Castelli, W. P., Garrison, R. J., Wilson, P. W., Abbott, R. D., Kalousdian, S., Kannel, W. B. (1986) Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 256, 2835-2838
- Collins, T. und Cybulsky, M. I. (2001) NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J.Clin.Invest* 107, 255-264
- Cremonesi, L., Carrera, P., Fumagalli, A., Lucchiari, S., Cardillo, E., Ferrari, M., Righetti, S. C., Zunino, F., Righetti, P. G., Gelfi, C. (1999) Validation of double gradient denaturing gradient gel electrophoresis through multigenic retrospective analysis. *Clin.Chem.* 45, 35-40
- Cremonesi, L., Firpo, S., Ferrari, M., Righetti, P. G., Gelfi, C. (1997) Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations. *Biotechniques* 22, 326-330
- Criqui, M. H., Heiss, G., Cohn, R., Cowan, L. D., Suchindran, C. M., Bangdiwala, S., Kritchevsky, S., Jacobs, D. R., Jr., O'Grady, H. K., Davis, C. E. (1993) Plasma triglyceride level and mortality from coronary heart disease. *N.Engl.J.Med.* 328, 1220-1225
- Dang, Q. und Taylor, J. (1996) In vivo footprinting analysis of the hepatic control region of the human apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene locus. *J.Biol.Chem.* 271, 28667-28676
- Dang, Q., Walker, D., Taylor, S., Allan, C., Chin, P., Fan, J., Taylor, J. (1995) Structure of the hepatic control region of the human apolipoprotein E/C-I gene locus. *J.Biol.Chem.* 270, 22577-22585
- Davignon, J., Gregg, R. E., Sing, C. F. (1988) Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 8, 1-21
- Davis, R. C., Wong, H., Nikazy, J., Wang, K., Han, Q., Schotz, M. C. (1992) Chimeras of hepatic lipase and lipoprotein lipase. Domain localization of enzyme-specific properties. *J.Biol.Chem.* 267, 21499-21504
- Dawber, T. R., MEADORS, G. F., MOORE, F. E., Jr. (1951) Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am.J.Public Health Nations.Health* 41, 279-281
- Deeb, S. S. und Peng, R. L. (1989) Structure of the human lipoprotein lipase gene. *Biochemistry* 28, 4131-4135
- Doi, H., Kugiyama, K., Oka, H., Sugiyama, S., Ogata, N., Koide, S. I., Nakamura, S. I., Yasue, H. (2000) Remnant lipoproteins induce proatherothrombogenic molecules in endothelial cells through a redox-sensitive mechanism. *Circulation* 102, 670-676
- Domoto, K., Taniguchi, T., Takaishi, H., Takahashi, T., Fujioka, Y., Takahashi, A., Ishikawa, Y., Yokoyama, M. (2003) Chylomicron remnants induce monocyte chemoattractant protein-1 expression via p38 MAPK activation in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 171, 193-200
- Dong, Z. M., Chapman, S. M., Brown, A. A., Frenette, P. S., Hynes, R. O., Wagner, D. D. (1998) The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J.Clin.Invest* 102, 145-152

- Dugi, K. A., Dichek, H. L., Santamarina Fojo, S. (1995) Human hepatic and lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity. *J.Biol.Chem.* 270, 25396-25401
- EBI und WTSI (European Bioinformatics Institute und Wellcome Trust Sanger Institute) Ensembl Genome Browser (2010) www.ensembl.org
- Edwards, P. A., Kennedy, M. A., Mak, P. A. (2002) LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascul.Pharmacol.* 38, 249-256
- Ehrenborg, E., Clee, S. M., Pimstone, S. N., Reymer, P. W., Benlian, P., Hoogendijk, C. F., Davis, H. J., Bissada, N., Miao, L., Gagne, S. E., Greenberg, L. J., Henry, R., Henderson, H., Ordovas, J. M., Schaefer, E. J., Kastelein, J. J., Kotze, M. J., Hayden, M. R. (1997) Ethnic variation and in vivo effects of the -93t->g promoter variant in the lipoprotein lipase gene. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17, 2672-2678
- Eiselein, L., Wilson, D. W., Lame, M. W., Rutledge, J. C. (2007) Lipolysis products from triglyceride-rich lipoproteins increase endothelial permeability, perturb zonula occludens-1 and F-actin, and induce apoptosis. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 292, H2745-H2753
- Eisenberg, S., Sehayek, E., Olivecrona, T., Vlodavsky, I. (1992) Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J.Clin.Invest* 90, 2013-2021
- Enerback, S., Ohlsson, B. G., Samuelsson, L., Bjursell, G. (1992) Characterization of the human lipoprotein lipase (LPL) promoter: evidence of two cis-regulatory regions, LP-alpha and LP-beta, of importance for the differentiation-linked induction of the LPL gene during adipogenesis. *Mol.Cell Biol.* 12, 4622-4633
- Ferencak, G., Pasalic, D., Grskovic, B., Cheng, S., Fijal, B., Sesto, M., Skodlar, J., Rukavina, A. S. (2003) Lipoprotein lipase gene polymorphisms in Croatian patients with coronary artery disease. *Clin.Chem.Lab Med.* 41, 541-546
- Fischer, S. G. und Lerman, L. S. (1979) Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16, 191-200
- Fujioka, Y. und Ishikawa, Y. (2009) Remnant lipoproteins as strong key particles to atherogenesis. *J.Atheroscler.Thromb.* 16, 145-154
- Garfinkel, A. S., Kempner, E. S., Ben Zeev, O., Nikazy, J., James, S. J., Schotz, M. C. (1983) Lipoprotein lipase: size of the functional unit determined by radiation inactivation. *J.Lipid Res.* 24, 775-780
- Gerdes, C., Fisher, R. M., Nicaud, V., Boer, J., Humphries, S. E., Talmud, P. J., Faergeman, O. (1997) Lipoprotein lipase variants D9N and N291S are associated with increased plasma triglyceride and lower high-density lipoprotein cholesterol concentrations: studies in the fasting and postprandial states: the European Atherosclerosis Research Studies. *Circulation* 96, 733-740
- Goldberg, I. J. (1996) Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J.Lipid Res.* 37, 693-707
- Goldstein, J. L. und Brown, M. S. (1977) Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism* 26, 1257-1275

- Goudriaan, J. R., Tacke, P. J., Dahlmans, V. E., Gijbels, M. J., Van Dijk, K. W., Havekes, L. M., Jong, M. C. (2001) Protection from obesity in mice lacking the VLDL receptor. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21, 1488-1493
- Grundy, S. M., Balady, G. J., Criqui, M. H., Fletcher, G., Greenland, P., Hiratzka, L. F., Houston-Miller, N., Kris-Etherton, P., Krumholz, H. M., LaRosa, J., Ockene, I. S., Pearson, T. A., Reed, J., Washington, R., Smith, S. C., Jr. (1998) Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham: a statement for healthcare professionals from the AHA Task Force on Risk Reduction. American Heart Association. *Circulation* 97, 1876-1887
- Grundy, S. M., Bazzarre, T., Cleeman, J., D'Agostino, R. B., Sr., Hill, M., Houston-Miller, N., Kannel, W. B., Krauss, R., Krumholz, H. M., Lauer, R. M., Ockene, I. S., Pasternak, R. C., Pearson, T., Ridker, P. M., Wood, D. (2000) Prevention Conference V: Beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention: medical office assessment: Writing Group I. *Circulation* 101, E3-E11
- Gu, L., Okada, Y., Clinton, S. K., Gerard, C., Sukhova, G. K., Libby, P., Rollins, B. J. (1998) Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol.Cell* 2, 275-281
- Haley, K. J., Lilly, C. M., Yang, J. H., Feng, Y., Kennedy, S. P., Turi, T. G., Thompson, J. F., Sukhova, G. H., Libby, P., Lee, R. T. (2000) Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation* 102, 2185-2189
- Hall, S., Chu, G., Miller, G., Cruickshank, K., Cooper, J. A., Humphries, S. E., Talmud, P. J. (1997) A common mutation in the lipoprotein lipase gene promoter, -93T/G, is associated with lower plasma triglyceride levels and increased promoter activity in vitro. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17, 1969-1976
- Hall, S., Talmud, P. J., Cook, D. G., Wicks, P. D., Rothwell, M. J., Strazzullo, P., Sagnella, G. A., Cappuccio, F. P. (2000) Frequency and allelic association of common variants in the lipoprotein lipase gene in different ethnic groups: the Wandsworth Heart and Stroke Study. *Genet.Epidemiol.* 18, 203-216
- Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D., Loening, S. A. (1997) Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 25, 3957-3958
- Hense, H. W., Schulte, H., Lowel, H., Assmann, G., Keil, U. (2003) Framingham risk function overestimates risk of coronary heart disease in men and women from Germany--results from the MONICA Augsburg and the PROCAM cohorts. *Eur.Heart J.* 24, 937-945
- Hessler, J. R., Morel, D. W., Lewis, L. J., Chisolm, G. M. (1983) Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis* 3, 215-222
- Hokanson, J. E. (1999) Functional variants in the lipoprotein lipase gene and risk cardiovascular disease. *Curr.Opin.Lipidol.* 10, 393-399
- Hufnagel, B., Dworak, M., Soufi, M., Mester, Z., Zhu, Y., Schaefer, J. R., Klumpp, S., Kriegelstein, J. (2005) Unsaturated fatty acids isolated from human lipoproteins activate protein phosphatase type 2Cbeta and induce apoptosis in endothelial cells. *Atherosclerosis* 180, 245-254

- Iso, H., Naito, Y., Sato, S., Kitamura, A., Okamura, T., Sankai, T., Shimamoto, T., Iida, M., Komachi, Y. (2001) Serum triglycerides and risk of coronary heart disease among Japanese men and women. *Am.J.Epidemiol.* 153, 490-499
- Jeppesen, J., Hein, H. O., Suadicani, P., Gyntelberg, F. (1998) Triglyceride concentration and ischemic heart disease: an eight-year follow-up in the Copenhagen Male Study. *Circulation* 97, 1029-1036
- Kamemura, K., Fujioka, Y., Takaishi, H., Takahashi, A., Taniguchi, T., Ishikawa, Y., Yokoyama, M. (2006) Chylomicron remnants upregulate CD40 expression via the ERK pathway and a redox-sensitive mechanism in THP-1 cells. *Atherosclerosis* 187, 257-264
- Kannel, W. B. und Vasan, R. S. (2009) Triglycerides as vascular risk factors: new epidemiologic insights. *Curr.Opin.Cardiol.* 24, 345-350
- Kastelein, J. J., Groenemeyer, B. E., Hallman, D. M., Henderson, H., Reymer, P. W., Gagne, S. E., Jansen, H., Seidell, J. C., Kromhout, D., Jukema, J. W., Brusckhe, A. V., Boerwinkle, E., Hayden, M. R. (1998) The Asn9 variant of lipoprotein lipase is associated with the -93G promoter mutation and an increased risk of coronary artery disease. The Regress Study Group. *Clin.Genet.* 53, 27-33
- Kastelein, J. J., Jukema, J. W., Zwinderman, A. H., Clee, S., van Boven, A. J., Jansen, H., Rabelink, T. J., Peters, R. J., Lie, K. I., Liu, G., Brusckhe, A. V., Hayden, M. R. (2000) Lipoprotein lipase activity is associated with severity of angina pectoris. REGRESS Study Group. *Circulation* 102, 1629-1633
- Kawakami, A., Tanaka, A., Chiba, T., Nakajima, K., Shimokado, K., Yoshida, M. (2003) Remnant lipoprotein-induced smooth muscle cell proliferation involves epidermal growth factor receptor transactivation. *Circulation* 108, 2679-2688
- Kawakami, A., Yoshida, M., Tanaka, A., Nakajima, K., Yasukochi, Y., Shimokado, K., Numano, F. (2001) Remnant lipoproteins and atherogenesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 947:366-9., 366-369
- Kawasaki, S., Taniguchi, T., Fujioka, Y., Takahashi, A., Takahashi, T., Domoto, K., Taguchi, M., Ishikawa, Y., Yokoyama, M. (2000) Chylomicron remnant induces apoptosis in vascular endothelial cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 902, 336-341
- Kirchgessner, T. G., Chuat, J. C., Heinzmann, C., Etienne, J., Guilhot, S., Svenson, K., Ameis, D., Pilon, C., d'Auriol, L., Andalibi, A., . (1989a) Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86, 9647-9651
- Kirchgessner, T. G., LeBoeuf, R. C., Langner, C. A., Zollman, S., Chang, C. H., Taylor, B. A., Schotz, M. C., Gordon, J. I., Lusis, A. J. (1989b) Genetic and developmental regulation of the lipoprotein lipase gene: loci both distal and proximal to the lipoprotein lipase structural gene control enzyme expression. *J.Biol.Chem.* 264, 1473-1482
- KIT (Karlsruhe Institute of Technology) Bioinformatic Harvester (2010)
<http://harvester.fzk.de/harvester>
- Klos, K., Shimmin, L., Ballantyne, C., Boerwinkle, E., Clark, A., Coresh, J., Hanis, C., Liu, K., Sayre, S., Hixson, J. (2008) APOE/C1/C4/C2 hepatic control region polymorphism influences plasma apoE and LDL cholesterol levels. *Hum.Mol.Genet.* 17, 2039-2046

- Klouche, M., Rose-John, S., Schmiedt, W., Bhakdi, S. (2000) Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. *Circulation* 101, 1799-1805
- Kostner, G. M., Scharnagl, H., Kostner K., Maerz, W. (2006). Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine In Handbuch der Fettstoffwechselstörungen von Schwandt, P., (Schattauer Verlag, pp. 2:65
- Krieger, M. und Herz, J. (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu.Rev.Biochem.* 63, 601-637
- Kugiyama, K., Doi, H., Motoyama, T., Soejima, H., Misumi, K., Kawano, H., Nakagawa, O., Yoshimura, M., Ogawa, H., Matsumura, T., Sugiyama, S., Nakano, T., Nakajima, K., Yasue, H. (1998) Association of remnant lipoprotein levels with impairment of endothelium-dependent vasomotor function in human coronary arteries. *Circulation* 97, 2519-2526
- Laffitte, B. A., Repa, J. J., Joseph, S. B., Wilpitz, D. C., Kast, H. R., Mangelsdorf, D. J., Tontonoz, P. (2001) LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 507-512
- Libby, P. (2000) Changing concepts of atherogenesis. *J.Intern.Med.* 247, 349-358
- Libby, P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874
- Libby, P. (2009) Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J.Lipid Res.* 50 *Suppl*, S352-S357
- Libby, P., Ridker, P. M., Hansson, G. K. (2009) Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J.Am.Coll.Cardiol.* 54, 2129-2138
- Mach, F., Sauty, A., Iarossi, A. S., Sukhova, G. K., Neote, K., Libby, P., Luster, A. D. (1999) Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J.Clin.Invest* 104, 1041-1050
- Maeno, Y., Kashiwagi, A., Nishio, Y., Takahara, N., Kikkawa, R. (2000) IDL can stimulate atherogenic gene expression in cultured human vascular endothelial cells. *Diabetes Res.Clin.Pract.* 48, 127-138
- Mahley, R. W. (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622-630
- Mahley, R. W., Huang, Y., Rall, S. C., Jr. (1999) Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J.Lipid Res.* 40, 1933-1949
- Mahley, R. W. und Rall, S. C., Jr. (2000) Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* 1:507-37., 507-537
- Maily, F., Tugrul, Y., Reymer, P. W., Bruin, T., Seed, M., Groenemeyer, B. F., Asplund Carlson, A., Vallance, D., Winder, A. F., Miller, G. J., et al (1995) A common variant in the gene for lipoprotein lipase (Asp9-->Asn). Functional implications and prevalence in normal and hyperlipidemic subjects. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 15, 468-478

- Mead, J. R., Cryer, A., Ramji, D. P. (1999) Lipoprotein lipase, a key role in atherosclerosis? *FEBS Lett.* *462*, 1-6
- Medh, J. D., Bowen, S. L., Fry, G. L., Ruben, S., Andracki, M., Inoue, I., Lalouel, J. M., Strickland, D. K., Chappell, D. A. (1996) Lipoprotein lipase binds to low density lipoprotein receptors and induces receptor-mediated catabolism of very low density lipoproteins in vitro. *J.Biol.Chem.* *271*, 17073-17080
- Menotti, A., Scanga, M., Morisi, G. (1994) Serum triglycerides in the prediction of coronary artery disease (an Italian experience). *Am.J.Cardiol.* *73*, 29-32
- Merkel, M., Eckel, R. H., Goldberg, I. J. (2002a) Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J.Lipid Res.* *43*, 1997-2006
- Merkel, M., Heeren, J., Dudeck, W., Rinninger, F., Radner, H., Breslow, J. L., Goldberg, I. J., Zechner, R., Greten, H. (2002b) Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake. *J.Biol.Chem.* *277*, 7405-7411
- Mulder, M., Lombardi, P., Jansen, H., van Berkel, T. J., Frants, R. R., Havekes, L. M. (1993) Low density lipoprotein receptor internalizes low density and very low density lipoproteins that are bound to heparan sulfate proteoglycans via lipoprotein lipase. *J.Biol.Chem.* *268*, 9369-9375
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* *51 Pt 1*, 263-273
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* *155*, 335-350
- Murdoch, S. J. und Breckenridge, W. C. (1995) Influence of lipoprotein lipase and hepatic lipase on the transformation of VLDL and HDL during lipolysis of VLDL. *Atherosclerosis* *118*, 193-212
- Murdoch, S. J. und Breckenridge, W. C. (1996) Effect of lipid transfer proteins on lipoprotein lipase induced transformation of VLDL and HDL. *Biochim.Biophys.Acta* *1303*, 222-232
- Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S., Maniatis, T. (1985) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* *13*, 3131-3145
- Myers, R. M., Maniatis, T., Lerman, L. S. (1987) Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* *155*, 501-527
- Nagai, M., Yoshida, A., Sato, N. (1998) Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. *Biochem.Mol.Biol.Int.* *44*, 157-163
- Nakshatri, H., Nakshatri, P., Currie, R. A. (1995) Interaction of Oct-1 with TFIIB. Implications for a novel response elicited through the proximal octamer site of the lipoprotein lipase promoter. *J.Biol.Chem.* *270*, 19613-19623

- Niemeier, A., Gafvels, M., Heeren, J., Meyer, N., Angelin, B., Beisiegel, U. (1996) VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. *J.Lipid Res.* 37, 1733-1742
- Okumura, T., Fujioka, Y., Morimoto, S., Masai, M., Sakoda, T., Tsujino, T., Kashiwamura, S., Okamura, H., Ohyanagi, M. (2006) Chylomicron remnants stimulate release of interleukin-1beta by THP-1 cells. *J.Atheroscler.Thromb.* 13, 38-45
- Osborne, J. C., Jr., Bengtsson-Olivecrona, G., Lee, N. S., Olivecrona, T. (1985) Studies on inactivation of lipoprotein lipase: role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry* 24, 5606-5611
- Preiss-Landl, K., Zimmermann, R., Hammerle, G., Zechner, R. (2002) Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr.Opin.Lipidol.* 13, 471-481
- Radha, V., Vimalaswaran, K. S., Ayyappa, K. A., Mohan, V. (2007) Association of lipoprotein lipase gene polymorphisms with obesity and type 2 diabetes in an Asian Indian population. *Int.J.Obes.(Lond)* 31, 913-918
- Rapp, J. H., Lespine, A., Hamilton, R. L., Colyvas, N., Chaumeton, A. H., Tweedie Hardman, J., Kotite, L., Kunitake, S. T., Havel, R. J., Kane, J. P. (1994) Triglyceride-rich lipoproteins isolated by selected-affinity anti-apolipoprotein B immunosorption from human atherosclerotic plaque. *Arterioscler.Thromb.* 14, 1767-1774
- Richter, W. O. und von Eckardstein, A. (2006). Fettstoffwechsel In Klinische Pathophysiologie von Siegenthaler, W. und Blum, M., (Geord Thieme Verlag, Stuttgart, New York) pp. 137:163
- Rios, D. L., Vargas, A. F., Ewald, G. M., Torres, M. R., Zago, A. J., Callegari-Jacques, S. M., Hutz, M. H. (2003) Common variants in the lipoprotein lipase gene in Brazil: association with lipids and angiographically assessed coronary atherosclerosis. *Clin.Chem.Lab Med.* 41, 1351-1356
- Ross, R. (1986) The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N.Engl.J.Med.* 314, 488-500
- Ross, R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990's. *Nature* 362, 801-809
- Ross, R. und Glomset, J. A. (1976a) The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N.Engl.J.Med.* 295, 369-377
- Ross, R. und Glomset, J. A. (1976b) The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N.Engl.J.Med.* 295, 420-425
- Sagoo, G. S., Tatt, I., Salanti, G., Butterworth, A. S., Sarwar, N., van Maarle, M., Jukema, J. W., Wiman, B., Kastelein, J. J., Bennet, A. M., De Faire, U., Danesh, J., Higgins, J. P. (2008) Seven lipoprotein lipase gene polymorphisms, lipid fractions, and coronary disease: a HuGE association review and meta-analysis. *Am.J.Epidemiol.* 168, 1233-1246
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491

- Sakai, J., Hoshino, A., Takahashi, S., Miura, Y., Ishii, H., Suzuki, H., Kawarabayasi, Y., Yamamoto, T. (1994) Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene. *J.Biol.Chem.* *269*, 2173-2182
- Saxena, U., Klein, M. G., Vanni, T. M., Goldberg, I. J. (1992) Lipoprotein lipase increases low density lipoprotein retention by subendothelial cell matrix. *J.Clin.Invest* *89*, 373-380
- Schaefer, J. R. (1998) Präventive Kardiologie. Prophylaxe der koronaren Herzkrankheit. (Schattauer Verlag, Stuttgart -- New York)
- Schaefer, J. R., Simon, B., Soufi, M., Sattler, A., Noll, B., Herzum, M., Maisch, B. (2000) Strategies to optimize CAD prevention in modern cardiology. The "Marburg CAD Prevention Project". *Herz* *25*, 113-116
- Schoonjans, K., Gelman, L., Haby, C., Briggs, M., Auwerx, J. (2000) Induction of LPL gene expression by sterols is mediated by a sterol regulatory element and is independent of the presence of multiple E boxes. *J.Mol.Biol.* *304*, 323-334
- Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A. M., Heyman, R. A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B., Auwerx, J. (1996) PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* *15*, 5336-5348
- Scott, J., Knott, T. J., Shaw, D. J., Brook, J. D. (1985) Localization of genes encoding apolipoproteins CI, CII, and E to the p13---cen region of human chromosome 19. *Hum.Genet.* *71*, 144-146
- Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S., Myers, R. M. (1989) Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *86*, 232-236
- Shih, S. J., Allan, C., Grehan, S., Tse, E., Moran, C., Taylor, J. M. (2000) Duplicated downstream enhancers control expression of the human apolipoprotein E gene in macrophages and adipose tissue. *J.Biol.Chem.* *275*, 31567-31572
- Simonet, W. S., Bucay, N., Lauer, S. J., Taylor, J. M. (1993) A far-downstream hepatocyte-specific control region directs expression of the linked human apolipoprotein E and C-I genes in transgenic mice. *J.Biol.Chem.* *268*, 8221-8229
- Simonet, W. S., Bucay, N., Pitas, R. E., Lauer, S. J., Taylor, J. M. (1991) Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/C- I gene locus in transgenic mice. *J.Biol.Chem.* *266*, 8651-8654
- Smith, C. E., Tucker, K. L., Lai, C. Q., Parnell, L. D., Lee, Y. C., Ordovas, J. M. (2010) Apolipoprotein A5 and lipoprotein lipase interact to modulate anthropometric measures in Hispanics of Caribbean origin. *Obesity.(Silver.Spring)* *18*, 327-332
- Soufi, M. (2008) Funktionelle Charakterisierung neu identifizierter Defekte des LDL-Rezeptors und des Apolipoprotein B-100 (Thesis/Dissertation)
- Sparkes, R. S., Zollman, S., Klisak, I., Kirchgessner, T. G., Komaromy, M. C., Mohandas, T., Schotz, M. C., Lusis, A. J. (1987) Human genes involved in lipolysis of plasma lipoproteins: mapping of loci for lipoprotein lipase to 8p22 and hepatic lipase to 15q21. *Genomics* *1*, 138-144

- Sary, H. C. (1995). Pathologie der Atherosklerose In Handbuch der Fettstoffwechselstörungen von Schwandt, P. und Richter, W. O., (Schattauer Verlag, Stuttgart) pp. 48:64
- Statistisches Bundesamt Todesursachenstatistik 2009
- Steinbrecher, U. P., Parthasarathy, S., Leake, D. S., Witztum, J. L., Steinberg, D. (1984) Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81, 3883-3887
- Sun, Y., Hegamyer, G., Colburn, N. H. (1993) PCR-direct sequencing of a GC-rich region by inclusion of 10% DMSO: application to mouse c-jun. *Biotechniques* 15, 372-374
- Tacken, P. J., Hofker, M. H., Havekes, L. M., Van Dijk, K. W. (2001) Living up to a name: the role of the VLDL receptor in lipid metabolism. *Curr.Opin.Lipidol.* 12, 275-279
- Takahashi, S., Kawarabayasi, Y., Nakai, T., Sakai, J., Yamamoto, T. (1992) Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89, 9252-9256
- Takahashi, S., Sakai, J., Fujino, T., Hattori, H., Zenimaru, Y., Suzuki, J., Miyamori, I., Yamamoto, T. T. (2004) The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *J.Atheroscler.Thromb.* 11, 200-208
- Talmud, P. J., Hall, S., Holleran, S., Ramakrishnan, R., Ginsberg, H. N., Humphries, S. E. (1998) LPL promoter -93T/G transition influences fasting and postprandial plasma triglycerides response in African-Americans and Hispanics. *J.Lipid Res.* 39, 1189-1196
- Utermann, G., Hees, M., Steinmetz, A. (1977) Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature* 269, 604-607
- Weisgraber, K. H., Rall, S. C., Jr., Mahley, R. W. (1981) Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J.Biol.Chem.* 256, 9077-9083
- Williams, S. E., Inoue, I., Tran, H., Fry, G. L., Pladet, M. W., Iverius, P. H., Lalouel, J. M., Chappell, D. A., Strickland, D. K. (1994) The carboxyl-terminal domain of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2- macroglobulin receptor (LRP) and mediates binding of normal very low density lipoproteins to LRP. *J.Biol.Chem.* 269, 8653-8658
- Wion, K. L., Kirchgessner, T. G., Lusic, A. J., Schotz, M. C., Lawn, R. M. (1987) Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence. *Science* 235, 1638-1641
- Wittrup, H. H., Andersen, R. V., Tybjaerg-Hansen, A., Jensen, G. B., Nordestgaard, B. G. (2006) Combined analysis of six lipoprotein lipase genetic variants on triglycerides, high-density lipoprotein, and ischemic heart disease: cross-sectional, prospective, and case-control studies from the Copenhagen City Heart Study. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 91, 1438-1445

- Wittrup, H. H., Tybjaerg-Hansen, A., Steffensen, R., Deeb, S. S., Brunzell, J. D., Jensen, G., Nordestgaard, B. G. (1999) Mutations in the lipoprotein lipase gene associated with ischemic heart disease in men. The Copenhagen city heart study. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19, 1535-1540
- World Health Organization (1958) Classification of atherosclerotic lesions; report of a study group. *World Health Organ Tech.Rep.Ser.* 57, 1-20
- World Health Organization (2004) The World Health report 2004 annex Table 2. Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2003. Geneva: World Health Organization
- Yamamoto, T., Takahashi, S., Sakai, J., Kawarabayasi, Y. (1993) The very low density lipoprotein receptor: A second lipoprotein receptor that may mediate uptake of fatty acids into muscle and fat cells. *Trends Cardiovasc.Med.* 3, 144-148
- Yang, W. S. und Deeb, S. S. (1998) Sp1 and Sp3 transactivate the human lipoprotein lipase gene promoter through binding to a CT element: synergy with the sterol regulatory element binding protein and reduced transactivation of a naturally occurring promoter variant. *J.Lipid Res.* 39, 2054-2064
- Yang, W. S., Nevin, D. N., Iwasaki, L., Peng, R., Brown, B. G., Brunzell, J. D., Deeb, S. S. (1996) Regulatory mutations in the human lipoprotein lipase gene in patients with familial combined hyperlipidemia and coronary artery disease. *J.Lipid Res.* 37, 2627-2637
- Yang, W. S., Nevin, D. N., Peng, R., Brunzell, J. D., Deeb, S. S. (1995) A mutation in the promoter of the lipoprotein lipase (LPL) gene in a patient with familial combined hyperlipidemia and low LPL activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92, 4462-4466
- Yla-Herttuala, S., Lipton, B. A., Rosenfeld, M. E., Goldberg, I. J., Steinberg, D., Witztum, J. L. (1991) Macrophages and smooth muscle cells express lipoprotein lipase in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 10143-10147
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J., Lisheng, L. (2004) Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 364, 937-952
- Zannis, V. I., Kan, H. Y., Kritis, A., Zanni, E., Kardassis, D. (2001) Transcriptional regulation of the human apolipoprotein genes. *Front Biosci.* 6, D456-D504
- Zechner, R., Moser, R., Newman, T. C., Fried, S. K., Breslow, J. L. (1991) Apolipoprotein E gene expression in mouse 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue and its regulation by differentiation and lipid content. *J.Biol.Chem.* 266, 10583-10588
- Zilversmit, D. B. (1973) A proposal linking atherogenesis to the interaction of endothelial lipoprotein lipase with triglyceride-rich lipoproteins. *Circ.Res.* 33, 633-638

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

ACAT	Acyl-Cholesterin-Acyltransferase
ACB	Aorto-coronarer-Bypass
Apo	Apolipoprotein
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ARIC	Atherosclerosis Risk in Communities
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
bp	Basenpaare
CARDIA	Coronary Artery Risk Development in Young Adults
C/EBP	CAAT-element-binding protein
CD	Cluster of Differentiation
Ce	Cholesterinester
CETP	Cholesterylester-Transferprotein
Ch	Cholesterin
CM	Chylomikrone
D	Aspartat
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCHL	familiäre kombinierte Hyperlipidämie
FS	Fettsäuren
FFS	Freie Fettsäuren
GENOA	Genetic Epidemiology Network of Arteriopathy
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
HCR	Hepatic Control Region
HDL	High Density Lipoprotein
HL	Hepatische Lipase
HLP	Hyperlipoproteinämie
HWI	Hinterwandinfarkt
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KHK	Koronare Herzkrankheit

LCAT	Lecithin Cholesterin Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	LDL-Rezeptor
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL-Rezeptor related protein
LXR	Liver X Receptor
MCP	Monocyte chemoattractant protein
ME	Multienhancer
MTP	Mikrosomales Triglyzerid-Transferprotein
Mut.	Mutante
N	Asparagin
n.s.	nicht signifikant
NTP	Nukleosid-Triphosphat
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PL	Phospholipide
PLTP	Phospholipid Transferprotein
PPAR	Peroxisom-Prolifertor-aktivierter Rezeptor
PPRE	Peroxisome-Prolifertor-Responsive-Element
PROCAM-Studie	Prospective Cardiovascular Münster-Studie
RLP	Remnant Lipoproteins
Rpm	Rounds per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRE	sterol-regulatory-element
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Bindeprotein
Temed	Tetramethylethylendiamin
TG	Triglyzeride
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRL	Triglyzerid-reiche Lipoproteine
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VLDLR	VLDL-Rezeptor
VWI	Vorderwandinfarkt
Wt	Wildtyp

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Apo E Gen Cluster, modifiziert nach	10
Abbildung 2: Lipid- und Apolipoprotein-Austausch zwischen VLDL, IDL und HDL..	14
Abbildung 3: Teile des ersten Exons und der 5´-flankierenden Region des LPL-Gens mit Markierung einiger regulatorischer Elemente	16
Abbildung 4: Übersicht über den Lipidstoffwechsel.....	17
Abbildung 5: Hydrolyse von Chylomikronen	18
Abbildung 6: Hydrolyse von VLDL.....	19
Abbildung 7: Komplex aus VLDL-Rezeptor, LPL und Apo E zur Hydrolyse von Triglyzeridhaltigen Lipoproteinen.....	22
Abbildung 8: Darstellung des DGGE-Systems.....	36
Abbildung 9: Homologie Apo E HCR1 und HCR2.....	41
Abbildung 10: Homologie Apo E ME1 und ME2	42
Abbildung 11: Lipoproteinlipase Promotor	43
Abbildung 12: Apo E HCR1 (647 bp).....	47
Abbildung 13: Apo E HCR2 (645 bp).....	47
Abbildung 14: Apo E ME1 (723 bp)	47
Abbildung 15: Apo E ME2 (721 bp)	47
Abbildung 16: LPL-P1 (389 bp)	48
Abbildung 17: LPL-P2 (263 bp)	48
Abbildung 18: Schmelzkurve von ME1 vor Einfügen eines GC-Clamps.....	49
Abbildung 19: Schmelzkurve von ME1 nach Einfügen eines GC-Clamps.....	49
Abbildung 23: DGGE LPL-P2, Darstellung von 2 heterozygoten Mutanten -93T/G (K) und einer heterozygoten Mutante -95G/T (K) im Vergleich mit Wildtypen.....	55
Abbildung 24: Mutation -93T/G (K) und -95G/T (K)	56
Abbildung 25: Vergleich des durchschnittlichen BMIs von Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -95G/T der Fallgruppe	59
Abbildung 26: Vergleich der durchschnittlichen Triglyzerid-Werte von Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -95G/T der Fallgruppe.....	59
Abbildung 27: Vergleich der relativen Häufigkeiten der Diagnose KHK bei Wt- und Mut-Allelträger der Mutation -95G/T der Fallgruppe	60
Abbildung 28: Vergleich des durchschnittlichen BMIs von Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -95G/T der Kontrollgruppe	63
Abbildung 29: Vergleich der durchschnittlichen Triglyzerid-Werte von Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -95G/T der Kontrollgruppe	63

Abbildung 30: Vergleich der relativen Häufigkeiten der Diagnose KHK bei Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -95G/T der Kontrollgruppe	64
Abbildung 31: Vergleich des durchschnittlichen BMIs von Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -93T/G der Fallgruppe	67
Abbildung 32: Vergleich der durchschnittlichen Triglyzerid-Werte von Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -93T/G der Fallgruppe.....	68
Abbildung 33: Vergleich der relativen Häufigkeit der Diagnose KHK bei Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -93T/G der Fallgruppe.....	69
Abbildung 34: Vergleich des durchschnittlichen BMIs von Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -93T/G der Kontrollgruppe	72
Abbildung 35: Vergleich der durchschnittlichen Triglyzerid-Werte von Wt- und Mut-Allelträgern der Mutation -93T/G in der Kontrollgruppe.....	73
Abbildung 36: vorbeschriebene SNPs HCR1.....	77
Abbildung 37: vorbeschriebene SNPs HCR2.....	79
Abbildung 38: vorbeschriebene SNPs ME1	81
Abbildung 39: vorbeschriebene SNPs ME2.....	83
Abbildung 40: vorbeschriebene SNPs des Promotors der Lipoproteinlipase	85

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung und Eigenschaften der Plasmalipoproteine.....	7
Tabelle 2: Lipidzusammensetzung der Plasmalipoproteine in %	7
Tabelle 3: Übersicht über die wichtigsten menschlichen Apolipoproteine	8
Tabelle 4: Enzyme im Lipoproteinstoffwechsel	12
Tabelle 5: Rezeptoren im Lipoproteinstoffwechsel	12
Tabelle 6: verwendete Geräte	24
Tabelle 7: verwendete Reagenzien	25
Tabelle 8: verwendete Verbrauchsmaterialien.....	26
Tabelle 9: Zusammensetzung des DNA-Auftragspuffers (Loading-Buffer).....	27
Tabelle 10: Zusammensetzung 50x TAE(Tris-Acetat-EDTA)-Puffer	27
Tabelle 11: Zusammensetzung 10% Ammoniumpersulfat (APS).....	28
Tabelle 12: Zusammensetzung der DNA-Isolations-Stammlösung	29
Tabelle 13: Rezept 2%iges Agarose-Gel.....	32
Tabelle 14: verwendete Primer.....	44

Tabelle 15: getestete PCR-Bedingungen, Ansatz jeweils für 1 PCR.....	46
Tabelle 16: benutzte Programme des Thermalcyclers für die PCR.....	46
Tabelle 17: getestete Gel-Bedingungen für die DGGE-Analysen.....	50
Tabelle 18: getestete Elektrophorese-Bedingungen	50
Tabelle 19: Zusammensetzung 0% denaturierende Lösung mit 6% Acrylamid.....	51
Tabelle 20: Zusammensetzung 80% denaturierende Lösung mit 10% Acrylamid...	51
Tabelle 21: Zusammensetzung 60% denaturierende Lösung mit 6% Acrylamid....	51
Tabelle 22: Zusammensetzung 70% denaturierende Lösung mit 10% Acrylamid...	52
Tabelle 23: Zusammensetzung Stacking (0% Denaturans, 10% Acrylamid).....	52
Tabelle 24: DGGE der regulatorischen Elemente des Apolipoprotein E-Gens.....	53
Tabelle 25: DGGE der Fragmente des Promotors der Lipoproteinlipase	53
Tabelle 26: Überblick über gefundene Mutationen Apolipoprotein E.....	54
Tabelle 27: Überblick über gefundene Mutationen Lipoproteinlipase	56
Tabelle 28: Charakterisierung der Fall- und Kontrollgruppe.....	57
Tabelle 29: Vergleich Durchschnittswerte Wt- und Mut-Allelträger der Mutation - 95G/T der Fallgruppe	60
Tabelle 30: Vergleich Wt- und Mut-Allelträger der Mutation -95G/T der Fallgruppe	61
Tabelle 31: Herzkatheterergebnis, Medikation und Begleiterkrankungen Mut- Allelträger -95K Fallgruppe.....	62
Tabelle 32: Vergleich Durchschnittswerte Wt- und Mut-Allelträger der Mutation - 95G/T der Kontrollgruppe	64
Tabelle 33: Vergleich Wt- und Mut-Allelträger der Mutation -95G/T der Kontrollgruppe.....	65
Tabelle 34: Herzkatheterergebnis, Medikation und Begleiterkrankungen Mut- Allelträger -95K Kontrollgruppe	66
Tabelle 35: Vergleich der Durchschnittswerte der Wt- und Mut-Allelträger der Mutation -93T/G der Fallgruppe	69
Tabelle 36: Vergleich Wt- und Mut-Allelträger der Mutation -93T/G der Fallgruppe	70
Tabelle 37: Herzkatheterergebnis, Medikation und Begleiterkrankungen Mut- Allelträger -95K Kontrollgruppe	71
Tabelle 38: Vergleich Wt- und Mut-Allelträger der Mutation -93T/G der Kontrollgruppe.....	73
Tabelle 39: Katheterergebnis, Medikation und Begleiterkrankungen der Mut- Allelträger -93K Kontrollgruppe	74
Tabelle 40: Allelfrequenzen vorbeschriebener SNPs HCR1	78
Tabelle 41: Allelfrequenzen vorbeschriebener SNPs HCR2	79
Tabelle 42: Allelfrequenzen vorbeschriebener SNPs ME1.....	81

Tabelle 43: Allelfrequenzen des vorbeschriebenen SNP ME2.....	83
Tabelle 44: Allelfrequenzen vorbeschriebener SNPs des Promotors der Lipoproteinlipase	86
Tabelle 45: Apo-E-, LPL D9N- und Apo A5 S19W-Status bei den Mut- Allelträgern des SNP -93K	93

9.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren: Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Becker, Behr, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, Dietrich, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Görg, Gress, Grimm, Grzeschik, Hegele, Hertl, Hofmann, Hoyer, Klose, Kann, Kircher, Kohlmann, Kroll, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Plant, Renz, Richter, Röhm, Röper, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer J., Schäfer H., Schmidt, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf.

9.5 Danksagungen

Mein ganz besonderer Dank gilt

... Herrn Prof. Dr. J. Schäfer für die Bereitstellung des Themas.

... Muhidien Soufi für die hervorragende Betreuung und unendliche Geduld sowie die immer gute Stimmung im Labor.

... meinen Eltern und meiner ganzen Familie. Ohne eure fortwährende Unterstützung wäre mein Studium und besonders diese Arbeit nie möglich gewesen.

... meinem Laborpartner Malte Stünckel. Ohne dich hätte die Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht (und hätte vermutlich um einiges länger gedauert!).

... meinen Freunden, die mir immer und jederzeit die Kraft gegeben haben, meinen Weg zu gehen.