

1.	Einleitung	4
1.1	Atherosklerose und koronare Herzerkrankung	4
1.1.1	Definition der Atherosklerose	4
1.1.2	Historische Übersicht	4
1.1.3	Struktur der normalen Arterien	6
1.1.4	Risikofaktorenkonzept der koronaren Herzerkrankung	7
1.1.5	Fettstoffwechselstörungen und Prävention der KHK	8
1.2.	Stoffwechsel der Lipoproteine und Apolipoproteine	10
1.2.1	Nomenklatur, Einteilung und Eigenschaften der Lipoproteine	11
1.2.2	Apolipoproteine	13
1.2.3	Enzyme und Rezeptoren des Lipoproteinstoffwechsels	14
1.2.4	Stoffwechsel der Lipoproteine	16
1.2.4.1	Der exogene Weg	16
1.2.4.2	Der endogene Weg	17
1.2.4.3	Der reverse Cholesterintransport	18
1.3	Störungen im Lipoproteinstoffwechsels	19
1.3.1	Genetisch bedingter Störungen des Lipoproteinstoffwechsels	20
1.3.2	Familiäre Hypercholesterinämie	21
1.4	LDL-Rezeptor	22
1.4.1	Struktur des LDL-Rezeptor	23
1.4.2	Mutationen des LDL-Rezeptor	24
1.4.3	LDL und Atherosklerose	25
1.5	Apolipoprotein B	27
1.6	Hyperlipidämie	27

2.	Aufgabenstellung	28
3.	Patienten, Material und Methoden	29
3.1	Material	29
3.1.1	Patienten	29
3.1.2	Technisches Material und Chemikalien	29
3.2	Methoden	33
3.2.1	Isolierung humaner DNA	33
3.2.2	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)	34
3.2.3	Sequenzieren des LDL Rezeptor Gens	37
3.2.4	DNA-Sequenzierung nach Sanger	38
3.2.5	PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)	39
3.2.6	Gelelektrophorese	41
3.2.7	Aufreinigung des PCR-Produktes QIAquick PCR Purification Kit	42
3.2.8	Cycle Sequenzierung	43
3.2.9	Prinzip des benutzten Sequenzgerätes	45
3.2.10	Die Aufreinigung mit DyeEx Spin Kit Qiagen	45
3.2.11	Vorbereitung zum Sequenzieren	46
3.3	Etablierung eines Bestätigungsassays für neue Mutationen	46
3.3.1	Analyse von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP)	46
3.3.2	Allelspezifische PCR	48
3.3.3	Restriktionsenzymanalyse ApoB 3500 und ApoB 3531	49
4.	Ergebnisse	52
4.1	Charakterisierung der Patienten	52
4.2	Klinische Parameter	52
4.3	Mutationsscreening in der deutschen Patientengruppe	53
4.4	Genetische und klinische Charakterisierung der neu identifizierten	

	Mutationen aus der deutschen Patientengruppe	56
4.5	Mutationscreening in der griechischen Patientengruppe	62
4.6	Fallbericht von einem Patienten aus Griechenland mit einer neuen LDL-Rezeptor Splice Site Mutation	64
4.7	LDL-Rezeptor Mutationen in Deutschland und in Griechenland	65
4.8	Apo B Mutation	68
4.9	Polymorphismen p.L575L [L554L], p.N591N [N570N]	68
5.	Diskussion	70
6.	Zusammenfassung	81
7.	Literaturverzeichnis	82
8.	Abkürzungsverzeichnis	99
9.	Danksagung	101
10.	Erklärung	102
11.	Lebenslauf	103

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose und koronare Herzerkrankung

1.1.1 Definition der Atherosklerose

Gemäß WHO definiert der Begriff Atherosklerose eine variable Kombination von *Intima*-Veränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterien-*Media*. Atherosklerose ist ein Sammelbegriff für primär nicht-entzündliche Arterienerkrankungen, bei denen ein fibröser Umbau stattfindet, der zu einer Verdickung und Verhärtung und somit zu einem Elastizitätsverlust der Gefäßwand führt (WHO 2003).

Die Atherosklerose und ihre Folgeschäden sind trotz aller Fortschritte in der Diagnostik und Therapie weiterhin die Haupttodesursachen in den westlichen Industrienationen. Die Atherosklerose kann sich in vielen Formen manifestieren. Zahlenmässig am bedeutendsten sind die kardiale Manifestation in Form der koronaren Herzerkrankung (KHK) und die zerebrovaskuläre Manifestation (Schlaganfall) (Schäfer JP et al., 1998).

1.1.2 Historische Übersicht

Leonardo da Vinci hat im 15. Jahrhundert als erster die makroskopischen Veränderungen beschrieben, die wir heute als Atherosklerose bezeichnen. Er schrieb die Arterienverletzungen, die er bei der Autopsie eines älteren Mannes fand, einer „exzessiven Ernährung“ durch das Blut zu. Der Begriff Atherosklerose wurde erst im 19. Jahrhundert geprägt, um die pathologisch-anatomischen Befunde eines weichen Atheroms und harter Sklerose in der innersten Schicht der Aorta und anderer größerer Arterien zu beschreiben. Seitdem wurden die unterschiedlichsten Theorien der Atherogenese entwickelt und umfangreiche Forschung betrieben (Schuster H et al., 1998).

Virchow stellte die Verletzungshypothese auf und gab die erste histologisch begründete Erklärung der Entstehung der Atherosklerose. Nach seiner Meinung entstanden die ersten Veränderungen durch einen vermehrten Einstrom „*flüssiger Elemente aus dem Blutstrom in die bindegewebige Substanz unterhalb der Intima und verursachen eine Schwellung dieser Substanz*“. Die anschwellenden bindegewebigen Zellen teilen sich und verursachen eine lokalisierte Auftreibung der Intima, die sich in eine arteriosklerotische Läsion umwandelt. Virchows Theorie von der „*Schwellung der Arterienwand*“ setzte von Rokitansky eine „*thrombogenetische Theorie*“ über die Entstehung der Arteriosklerose entgegen. Gemeinsam ist beiden die Vorstellung von der Ansammlung von Blutbestandteilen, Zellen und flüssigen Bestandteilen in der Arterienwand (Schuster H et al., 1998).

Der französische Pathologe Lobstein prägte 1833 den Begriff der Atherosklerose mit einer zur Verhärtung führenden Umwandlung der Arterien und publizierte eine Arbeit über die chemische Analyse kalzifizierter arterieller Plaques (Just et al., 1994).

Cholesterin wurde bereits im 18. Jahrhundert aus Gallenstein gewonnen und 1816 erstmalig als Cholesterin bezeichnet (Schuster H et al., 1998). Obwohl Cholesterin bereits 1847 in arteriosklerotischen Läsionen der Gefäßwand nachgewiesen wurde, wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Serumcholesterin und Atheromen erst zu Beginn des 20. Jahrhundert vermutet. Es bedurfte weitere 75 Jahre bis der russische Wissenschaftler Ignatovski 1908 erstmalig bei Tieren (Kaninchen) bestimmte Nahrungsmittel in Zusammenhang mit dem Auftreten von Atherosklerose brachte und damit das moderne Zeitalter der Atheroskleroseforschung prägte. Er verabreichte den Kaninchen eine Diät aus Milch und Eigelb. Anitschkov verfolgte diese Tierexperimente weiter und konnte nachweisen, dass eine cholesterinreiche Ernährung die Entwicklung der Atherosklerose begünstigt (Steinberg D., et al 2004). Anschließend war es der deutsche Chemiker Windaus, der 1910 Cholesterin als einen wesentlichen Bestandteil atherosklerotischer Plaques auch beim Menschen nachwies (Steinberg D et al., 2004). Stary teilte die atherosklerotischen Läsionen in sieben, fließend ineinander übergehende Stadien ein: Ausgehend von kleinen Initialläsionen im Kindes- und Jugendalter, über „*fatty streaks*“, Präatherom, Atherom und Fibroatherom, bis hin zu den manifesten komplizierten Läsionen, die am Ende sklerosieren und kalzifizieren können (Stary HC et al., 1987; 1990).

1.1.3 Struktur der normalen Arterien

Die Wand einer Arterie besteht von innen nach außen aus drei folgenden Schichten:

1. *Tunica intima*: Sie wird durch ein *monolayer* an Endothelzellen vom Blut und durch die *Membrana elastica interna* von der anschließenden *Media* abgegrenzt. Die *Lamina propria intima* enthält in extrazelluläre Matrix eingebettete glatte Muskelzellen. Die *Intima* dient dem Stoff-, Flüssigkeits- und Gasaustausch durch die Gefäßwand.

2. *Tunica media*: Sie enthält ringförmig verlaufende Lagen glatter Muskelzellen, die von kollagen- und elastinreicher extrazellulärer Matrix umgeben sind. Elastische Arterien, wie beispielweise die Aorta, enthalten konzentrische Lamellen von glatten Muskelzellen, die in dichte Elastinbänder eingebunden sind. Muskuläre Arterien zeigen dagegen eine lockerere Verteilung der glatten Muskelzellen in der extrazellulären Matrix. Die *Media* reguliert durch die vegetative Innervation ihrer Muskelschicht die Gefäßweite der Arterien und damit die Zirkulation des Blutes.

3. *Tunica adventitia*: Sie wird durch die *Membrana elastica externa* von der anschließenden *Media* abgegrenzt. Die *Adventitia* enthält Nerven und Mastzellen, und ist der Ursprung der *Vasa vasorum*, die die äußeren zwei Drittel der *Media* mit Blut versorgen, während die inneren Abschnitte des Gefäßes über Diffusion ernährt werden. Die *Adventitia* verbindet die Gefäße locker mit der Umgebung.

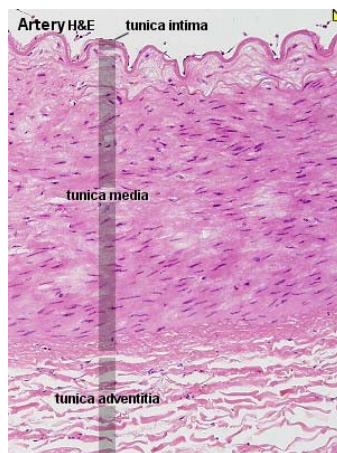


Abb. 1: Histologischer Querschnitt einer muskulären Arterie, Hämalaun-Orceinfärbung. 120fache Vergrößerung (modifiziert nach Kühnel. Taschenatlas der Zytologie, 1995).

Die wesentlichen zellulären Komponenten der Gefäße sind somit glatte Muskelzellen (Myozyten) und Endothelzellen. Über die endotheliale Produktion von Faktoren, die die Myozyten der *Media* an der Proliferation hindern, sind beide Zellsysteme strukturell und metabolisch miteinander verkoppelt. In der normalen Gefäßwand liegen die Myozyten der *Media* in einer kontraktilen Form. Sie können sich zusammenziehen, eine mitotische Teilung ist jedoch aufgrund endothelialer Hemmstoffe nicht möglich.

1.1.4 Risikofaktorenkonzept der koronaren Herzerkrankung

Das Risikofaktorenkonzept ist ein theoretisches Modell zur Erklärung der Entstehung von Krankheiten. Es zeichnet sich dadurch aus, dass sowohl medizinische als auch psychologische und soziale Faktoren berücksichtigt werden. Dieses multifaktorielle Konzept hat sich insbesondere zur Erklärung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen durchgesetzt. Beginnend mit der Framingham-Studie wurden in den letzten 50 Jahren viele epidemiologische Studien durchgeführt, die zur Identifizierung von Risikofaktoren beitrugen. Besonders erwähnenswert ist hierbei die Framingham-Studie, die seit 1948 in der Ortschaft Framingham, Massachusetts, USA durchgeführt wird und prospektiv begünstigende Faktoren für die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen untersucht. Insgesamt 5209 Männer und Frauen im Alter von 30-62 Jahren wurden über Jahrzehnte hinweg beobachtet. Hierdurch konnten folgende kardiovaskuläre Risikofaktoren identifiziert werden (Castelli WP, Anderson K et al., 1986; Castelli WP, Garrison RJ et al., 1986): männliches Geschlecht, hohes Lebensalter, familiäre KHK-Belastung, Hypercholesterinämie, niedriger HDL-Cholesterinwert, Zigarettenrauchen, hoher Blutdruck, Diabetes mellitus, körperliche Inaktivität und Übergewicht.

Die „Prospektive Cardiovasculäre Münster“-Studie (PROCAM) ist weltweit eine der größten epidemiologischen Studien zur Erforschung der Ursachen der koronaren Herzkrankheit. Den potenzierenden Effekt von Einzelrisikofaktoren konnte die seit 1979 von Prof. Dr. med. Gerd Assmann et al. in Münster geleitete PROCAM-Studie an über 18000 Personen darstellen, wenn diese bei einem Patienten kombiniert vorkommen (Assmann G, Cullen P, Schulte H et al., 1998; Assmann G, Schulte H et al., 1988). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten eine Inzidenz eines Herzinfarktes in 4 Jahren bei alleinigem Vorliegen einer Hypertonie in 14/1000 Personen, bei alleinigem

Vorliegen eines Diabetes mellitus in 15/1000 Personen und bei der Kombination Diabetes mellitus und Hypertonie in 48/1000 Personen. Eine Inzidenz von 96/1000 in 4 Jahren wurde für das alleinige Vorliegen einer Hyperlipidemie beobachtet; kommt eine Hypertonie und/oder Diabetes mellitus hinzu, erhöht sich diese Inzidenz auf 114/1000 Personen.

1.1.5 Fettstoffwechselstörungen und Prävention der KHK

Störungen des Lipoproteinstoffwechsels, insbesondere eine Erhöhung der Plasma-LDL- Cholesterinkonzentration sind die führenden Ursachen für die Entstehung einer atherosklerotischen Gefäßerkrankung. So weisen etwa 70% der Patienten mit einer vorzeitigen koronaren Herzerkrankung eine Störung des Lipoproteinstoffwechsels auf (Mathes P, Thiery J et al., 2005). Die Bedeutung der Hyperlipidämie für die Entwicklung der KHK und ihrer verschiedenen Manifestationsformen ist seit der Framingham-Studie bekannt. Alleine schon die am Ende des vergangenen Abschnitts genannten Zahlen zur Herzinfarktinzidenz, die der PROCAM-Studie entstammen, verdeutlichen diese Position: die Inzidenz eines Herzinfarktes innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 4 Jahren ist bei alleinigem Vorliegen einer Hyperlipidämie etwa 6-7 mal höher als bei alleinigem Vorliegen einer Hypertonie bzw. eines Diabetes mellitus (Assmann G, Schulte H et al., 1988).

In der Theorie der Atherosklerosebildung wird als wesentlicher Faktor die Ablagerung von Cholesterin in der Gefäßwand, die über das Stadium des „*fatty streak*“ zur Bildung eines Atheroms führt und letztlich über eine Plaqueruptur zur Gerinnungsaktivierung und so zum thrombotischen Verschluss des Gefäßes führen kann (Stary HC et al., 1995). Die zentrale Rolle in diesem Modell der Atherogenese spielen die Lipoproteine geringer Dichte (LDL), die abhängig von ihrer Plasmakonzentration in den subendothelialen Raum eindringen und dort oxidativ modifiziert werden (Steinberg D et al., 1987, 1993). Über den sogenannten Scavenger-Rezeptor wird dieses oxidativ modifizierte LDL von Makrophagen aufgenommen. Diese Makrophagen transformieren bei LDL-Überladung zu sog. Schaumzellen, die durch verschiedene Mediatoren zu einer Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen führen. Folglich entsteht, ausgehend von der primär reversiblen Läsion des „*fatty streak*“, die Bildung fortgeschrittener und komplizierter Plaques (Stary HC et al., 1995). Nicht nur für die primäre Ätiologie der

Atherosklerose und somit auch der KHK stellt die Hyperlipidämie einen zentralen Faktor dar, auch für den Verlauf einer bereits manifesten Erkrankung ist der Lipidstoffwechsel bzw. die Einflussnahme auf denselben von entscheidender Bedeutung. Vor allem einer Vielzahl von großangelegten Interventionsstudien ist es zu verdanken, dass hierüber mittlerweile gesicherte Daten vorliegen. Hier seien nur exemplarisch einige der Wichtigsten erwähnt. In der „*Multiple Risk Factor Intervention Trial*“-Studie (MRFIT) wurden etwa 350.000 männliche Amerikaner 12 Jahre lang beobachtet. In dieser Studie konnte ein linearer Zusammenhang zwischen ansteigenden Serumcholesterinwerten und der Herz-Kreislauf-Sterblichkeit gezeigt werden. In der Quintile der Serumcholesterinkonzentrationen stieg das relative Todesrisiko an Herz-Kreislauf-Erkrankungen alterskorrigiert von 1,0 kontinuierlich an und erreichte in der 4. Quintile 2,2 und der 5. Quintile 3,4 (Stamler J et al., 1986).

Die „*Scandinavian Simvastatin Survival Study*“ (4S-Studie) ist die wohl bekannteste CSE-Hemmer Studie. Die 4S-Studie umfaßte 4444 hypercholesterinämische Patienten mit koronarer Herzerkrankung (Angina pectoris oder abgelaufener Infarkt) und Serum-Cholesterinkonzentrationen zwischen 5,5 – 8,0 mmol/l (212 – 309 mg/dl). Sie wurden durchschnittlich 5,4 Jahre lang entweder mit Simvastatin (20 – 40 mg/Tag) oder mit Plazebo behandelt. Einschlußkriterium waren bei der 4S-Studie erhöhte Cholesterinwerte zwischen 210 und 310 mg/dl. Erstmals konnte im Rahmen einer Lipidsenkerstudie eine eindeutige Reduktion der Gesamtmortalität um -30% sowie eine Senkung der KHK-Mortalität um -42% nachgewiesen werden (Pedersen TR, Olsson AG, et al., 1998, 2000).

Die „*Cholesterol and Recurrent Event*“ (CARE)-Studie untersuchte die Wirkung des HMG-CoA-Reduktase-Hemmers Pravastatin auf die koronare Ereignissrate bei Patienten mit durchgemachtem Myokardinfarkt, aber hier erstmals normalen Blutfettwerten, bei insgesamt 4159 (3583 Männer, 576 Frauen) Postinfarkt-Patienten mit einem mittleren Cholesterinwert von 209 mg/dl (Einschlußkriterium:<240 mg/dl). Es wurde entweder mit Plazebo oder 40 mg Pravastatin behandelt. Der Beobachtungszeitraum betrug 5 Jahre. Durch die Pravastatin Einnahme konnte unter anderem eine 24% Risikoreduktion bezüglich eines tödlichen oder nicht-tödlichen Herzinfarktes erreicht werden (Sacks FM et al., 1998).

Die Studie „*West of Scotland Coronary Prevention Study*“ (WOSCOPS) ist eine Primärprävention Studie an 6595 Männern im Alter von 45 bis 64 Jahren mit einem Cholesterinwert von 272 mg/dl. Die Studienteilnehmer wurden mit 40 mg Pravastatin versus Plazebo behandelt und über durchschnittlich 4,9 Jahre beobachtet.

Erstaunlicherweise kam es nicht nur zur erwarteten Absenkung des LDL-Cholesterins um 26% in der Verum-Gruppe, sondern auch zu einer signifikanten Reduktion der Häufigkeit eines tödlichen oder nicht-tödlichen Myokardinfarktes (-28% bzw. -31%) und der Gesamtmortalität (-22%) (Maher V et al., 1997; The WOSCOPS-Investigators et al., 1998).

Hier sei die „*Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease*“ (LIPID)-Studie als letztes Beispiel aufgeführt. Die LIPID-Studie ist bislang die weltweit größte Lipidsenker-Studie und wurde mit dem CSE-Hemmer Pravastatin (40 mg) gegen Placebo bei insgesamt 9014 Patienten (mit durchgemachtem Myokardinfarkt oder Angina pectoris Beschwerden) durchgeführt. Der mittlere Cholesterinwert lag bei 218 mg/dl. Die Therapie mit Pravastatin führte unter anderem zu einer signifikanten Senkung der Herzinfarktrate (-28%). Im Rahmen der LIPID-Studie wurde die Schlaganfallrate signifikant gesenkt (-19%) (MacMahon S, Tonkin A et al., 2000).

1.2 Stoffwechsel der Lipoproteine und Apolipoproteine

Da Lipide wasserunlöslich sind, müssen sie im Blut entweder an spezifische Transportproteine gebunden werden oder sie bilden mizellare Komplexe mit Proteinen. In diesen Lipoproteinen sind die Cholesterinester und Triglyzeride im Kernbereich angeordnet und werden von Phospholipiden und freiem Cholesterin umgeben. Die physiologische Funktion der Plasmalipoproteine besteht im Transfer der Lipide zu den verschiedenen Geweben und Organen. Die Lipide dienen hier der Energieversorgung, dem Membranaufbau, der Produktion von Steroidhormonen und der Bildung von Gallensäuren. Die Eiweißanteile der Lipoproteine, die Apolipoproteine spielen eine wesentliche Rolle im Stoffwechsel der Lipide und haben mizellenstabilisierende Eigenschaften (Greten H, Windler E et al., 1985).

1.2.1 Nomenklatur, Einteilung und Eigenschaften der Lipoproteine

Der Transport von exogenen und endogenen Lipiden im menschlichen Organismus erfolgt in Form von Lipoproteinen. Lipoproteine variieren in Dichte und Größe; alle kommen als sphärische Mikroemulsionen im Plasma vor. Sie bestehen aus einem unpolaren Kern, der Cholesterinester, Triglyzeride und andere fettlösliche Stoffe (z. B. Vitamine) enthält, und einer Hülle aus polaren Phospholipiden (Lezithin, Sphingomyelin), freies Cholesterin, Fettsäuren, Apolipoproteine und Kohlenhydrat-Ester. Die polaren Lipide und Proteine vermitteln die Wasserlöslichkeit, die Apolipoproteine regulieren zusätzlich den Stoffwechsel der Lipoproteine.

Basierend auf der Dichte, den funktionellen Eigenschaften und der chemischen Zusammensetzung lassen sich Lipoproteine in Klassen auftrennen. Durch Trennung mittels der präparativen Ultrazentrifuge können die Lipoproteine nach ihrer Dichte in fünf Hauptklassen unterschieden werden: Chylomikronen ($d < 1,000$ g/dl), *Very Low Density Lipoproteins*, Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL, $d < 1,006$ g/dl), *Intermediate Density Lipoproteins*, Lipoproteine mittlerer Dichte (IDL, $d < 1,019$ g/dl), *Low Density Lipoproteins*, Lipoproteine geringer Dichte (LDL, $d < 1,063$ g/dl), *High Density Lipoproteins*, Lipoproteine hoher Dichte (HDL₂, $d < 1,125$ g/dl und HDL₃, $d < 1,210$ g/dl) (siehe Tab 1). Da Synthese und Abbau der Lipoproteine im wesentlichen durch ihre Proteinkomponenten, die Apolipoproteine, vermittelt werden, können die Lipoproteine nach ihrem Proteinanteil in Lipoprotein-Familien (Alaupovic et al., 1972) eingeteilt werden. Dabei ist in den meisten Lipoproteinen nicht ausschließlich eine Apolipoproteinklasse zu finden, sondern viele unterschiedliche Kombinationen aus zwei oder mehr Apolipoprotein-Klassen. Somit gibt es eine große Anzahl an Lipoproteinen, die sich in Lipid- und Proteinzusammensetzung, dem Lipid-Protein-Verhältnis und absolutem Gehalt an Apolipoproteinen unterscheiden (siehe Tabelle 2, 3). Lipoproteine müssen als Momentaufnahme betrachtet werden, da durch Transfer sowohl einzelner Lipide als auch Apolipoproteinen sowie durch lipolytische Spaltung eine dynamische Verteilung erreicht wird.

Eigenschaften der Plasmalipoproteine

Lipoprotein	Größe (nm)	Dichte (g/dl)	Masse (MDa)	Konzentration (g/l)	
				Männer	Frauen
Chylomikronen	<10	<1,000	<150	<0.1	<0.1
VLDL	50	<1,005	5-130	0,5-2,0	0,5-1,5
IDL	30	<1,019	3,5		
LDL	21	<1,063	2,50	2,0-3,5	2,0-3,0
Lp (a)	25	<1,090	5,50	0,01-0,5	0,01-0,5
HDL ₂	10	<1,125	0,36	0,5-1,0	1,0-1,5
HDL ₃	8	<1,210	0,20	1,0-2,0	1,0-2,0
VHDL	7	<1,210	0,15	0,1-0,2	0,1-0,2

modifiziert nach Kostner und März, 2001

Tab.1: Eigenschaften der Plasmalipoproteine

Lipoproteinklassen des menschlichen Plasmas

Elektrophorese	Ultrazentrifugation	Proteinanteil Apolipoproteine
Keine Mobilität	Chylomikronen	A-I, IV, Lp B-48
Alpha Lipoprotein	HD	A-I, II, IV, Lp C-I, II, III, E
Beta Lipoprotein	LDL	B-100
Prä-beta Lipoprotein	VLDL	B-100, Lp C-I, II, III, Lp E
	IDL	B-100, Lp C-III, Lp E

modifiziert nach Kostner und März, 2001

Tab. 2: Lipoproteinklassen des menschlichen Plasmas

Chemische Zusammensetzung der Plasmalipoproteine

Lipoprotein	Protein	PL Phospholipide In % der Lipoproteinmasse	FC Freies Cholesterin	CE Cholesterinester	TG Triglyceride
Chylomikronen	2	5	1	2	90
VLDL	10	16	7	13	54
IDL	17	20	9	34	20
LDL	23	21	11	41	4
Lp (a)	34	18	9	36	3
HDL ₂	42	35	5	13	5
HDL ₃	56	23	3	15	3
VHDL	72	20	2	5	1

modifiziert nach Kostner und März, 2001

Tab. 3: Chemische Zusammensetzung der Lipoproteine

1.2.2 Apolipoproteine

Apolipoproteine sind die Proteinkomponenten der Lipoproteine, die nach immunologischen Eigenschaften, Aminosäuresequenz und Kohlenhydratanteil differenziert werden können. Als Strukturbestandteile und Stabilisatoren der Lipoproteine sorgen die Apolipoproteine für die Löslichkeit von Lipiden im Blut. Weiterhin sind sie von großer Bedeutung für die Regulation des Lipoproteinstoffwechsels. Sie dienen als Liganden für spezifische, innerhalb der Plasmamembran lokalisierte Lipoproteinrezeptoren und fungieren als Effektoren von Enzymen des intravasalen Lipoproteinstoffwechsels. Lipoproteine enthalten jeweils spezifische Kompositionen verschiedener Apolipoproteine. In der Tabelle 4 ist eine Übersicht über die verschiedenen Apolipoproteine und ihre Funktion wiedergegeben.

Wichtige Apolipoproteine des menschlichen Plasmas

Apo	Dichteklassen	Masse (kDa)	Konzentration	Funktion
A-I	HDL	28,5	1200-1400	Aktivierung der LCAT, Bindung an HDL-Rezeptor, Strukturprotein
A-II	HDL	17	350-500	Aktivierung der hepatischen Lipase?
A-IV	Chylo, HDL	46	<50	Aktivierung der LCAT
A-V	HDL	39	?	Noch unbekannte Rolle im Stoffwechsel triglycerid-reicher Lipoproteine
B-100	VLDL, IDL	550	700-900	Bindung an LDL-Rezeptor, Strukturprotein
B-48	Chylo, VLDL	265	<50	Strukturprotein der Chylomikronen
C-I	Chylo, VLDL	6,5	50-80	Aktivierung der LCAT
C-II	Chylo, VLDL	8,8	30-70	Aktivierung der LPL
C-III	Chylo, VLD	8,9	100-120	Inhibitor der LPL
D	HDL	29	80-100	Aktivierung und Stabilisierung der LCAT
E	Chylo, VLDL,	34	30-50	Ligand für LDL-Rezeptor HDL und LRP
J	HDL	80	ca. 100	„Clustern“ unbekannte Funktion im HDL-Stoffwechsel; Rolle in der Apoptose
a	Lp(a)	350-900	Variabel	Unbekannte Funktion in Blutgerinnung und Fibrinolyse

modifiziert nach Kostner und März, 2001

Tab. 4: Wichtige Apolipoproteine des menschlichen Plasmas

1.2.3 Enzyme und Rezeptoren des Lipoproteinstoffwechsels

In Tabelle 5 und 6 werden die wichtigsten Vertreter aufgelistet, da neben den Apolipoproteinen noch andere unterschiedliche plasmatische Enzyme sowie Rezeptoren an den Zelloberflächen eine wichtige Rolle für den Stoffwechsel der Lipoproteine spielen.

Enzyme des Lipoproteinstoffwechsels im Blut

Enzym	Funktion
Lipoproteinlipase (LPL)	Hydrolyse exogener Triglyceride in Chylomikronen
Hepatische Triglyceridlipase (HTGL)	Hydrolyse von Triglyceriden und Phospholipiden in IDL und HDL
Endotheliale Lipase (EL)	Noch unbekannte Rolle im Lipoproteinmetabolismus, wird von Endothelzellen produziert
Lezithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT)	Bereitstellung von >80% der Cholesterinester aus freiem Cholesterin und Lezithin
Cholesterinester-transfer-protein (CETP)	Austausch von Cholesterinestern der HDL gegen Triglyceride der VLDL; Austausch und Transfer von Kern-Lipiden

modifiziert nach Kostner und März, 2001

Tab. 5: Enzyme des Lipoproteinstoffwechsels im Blut

Lipoproteinrezeptoren menschlicher Zellen

Bezeichnung	Organ, Zelle	Funktion
LDL-Rezeptor (ApoB, E-Rezeptor)	Alle Zellen (Leber)	Aufnahme und Katabolismus ApoB- und ApoE-haltiger Lipoproteine
LDL-Rezeptor related Protein (LRP)	Leber	Katabolismus der Chylomikronen-Remnants und anderer ApoE-haltiger Lipoproteine
ATP-Bindender Kassettentransporter 1 (ABC1)	Makrophagen, Schaumzellen, periphere Zellen	Ausschleusung von Cholesterin aus Zellen und Geweben
Scavenger-Rezeptor A	Makrophagen, Schaumzellen, Kupperzellen	Katabolismus von modifizierten und oxidierten LDL
Scavenger-Rezeptor B-1	Leberzellen	Aufnahme von HDL in die Leber

modifiziert nach Kostner und März, 2001

Tab. 6: Lipoproteinrezeptoren menschlicher Zellen

1.2.4 Stoffwechsel der Lipoproteine

Im Stoffwechsel der Plasmalipoproteine werden ein exogenes, ein endogenes und ein reverses Cholesterintransportsystem unterschieden. Mit der Nahrung aufgenommene Lipide beschreiten den exogenen Weg, der endogene Weg wird von den Lipoproteinen hepatischen Ursprungs eingeschlagen und über den reversen Cholesterintransport gelangt Cholesterin aus der Peripherie in die Leber. Im folgenden werden diese drei Wege näher erläutert.

1.2.4.1 Der exogene Weg

Der exogene Stoffwechselweg der Lipide beginnt mit der intestinalen Absorption von Sterolen und Fettsäuren. Im Dünndarm bilden Cholesterin und Pflanzensterole gemeinsam mit Gallensäuren Mizellen. Sterole werden nach neueren Erkenntnissen über selektive Wege wie das Nieman-Pick C1 Like 1 Protein (NPC1L1) oder die Aminopeptidase N (CD13) in die Darmmukosa aufgenommen. Triglyceride und Cholesterinester sowie freies Cholesterin werden im Enterozyten weiter mit ApoB48 als Transporteiweiß zu Chylomikronen zusammengebaut und über die Lymphe an die Zirkulation abgegeben. In der Zirkulation vermittelt die Lipoproteinlipase die Hydrolyse von Triglyceriden und damit die Freisetzung von freien Fettsäuren aus dem Kern des Lipoproteinpartikels. Dadurch kommt es zu einer fortschreitenden Verkleinerung der Chylomikronen mit Anlagerung kleiner Apolipoproteine. Die freien Fettsäuren werden direkt als Energiequelle von verschiedenen Organen (z. B. Muskulatur) benutzt, zum Teil aber auch wieder zu Triglyceriden aufgebaut (z. B. Leber) oder als Triglyceride im Fettgewebe gespeichert. Das Endprodukt des Chylomikronenstoffwechsels sind Chylomikronen-Remnants, die nur noch einen kleinen Lipidkern enthalten. Die Chylomikronen-Remnants werden über ApoE als hochaffinen Liganden über einen hepatischen Chylomikronen-Remnant-Rezeptor von der Leber aufgenommen. Die potentielle atherogene Bedeutung der Chylomikronen-Remnants selbst ist umstritten. Eine lang anhaltende fettreiche Fehlernährung mit hohem Cholesteringehalt und hohem Anteil an gesättigten Fetten führt jedoch auf Dauer zu einer Herunterregulation der LDL-Rezeptoraktivität in der Leber und hat somit indirekt Einfluss auf die Höhe der Plasmakonzentration der LDL. Eine Reduktion von Nahrungscholesterin und gesättigten Fettsäuren muss daher Ziel jeder

Therapie von Fettstoffwechselstörungen zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen sein. Dies ist durch eine konsequente und anhaltende Veränderungen des Ernährungsverhaltens, durch körperliche Aktivität und Gewichtsreduktion zu erreichen. Zusätzlich stehen heute unterstützend medikamentöse Resorptionsinhibitoren zur Verfügung, die selektiv die Aufnahme von Sterolen durch den Darm reduzieren.

1.2.4.2 Der endogene Weg

Endogene cholesterinreiche Lipoproteine (VLDL-Remnants, LDL, *small dense* LDL) und ihre Modifikation sind kausal für die Entstehung der Atherosklerose verantwortlich. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Prävention der koronaren Herzerkrankung. Der endogene Lipoproteinstoffwechsel beginnt mit der Synthese triglyceridreicher VLDL in der Leber. VLDL enthalten in ihrem Kern Triglyceride (60% der Gesamtmasse) und Cholesterinester (20% Gesamtmasse). Die reifen VLDL werden von der Leber in die Blutzirkulation abgegeben. Die VLDL-Hülle reifer VLDL enthält neben ApoB100 auch ApoCII, ApoCIII und ApoE. ApoCII wirkt als Kofaktor für die Lipoproteinlipase, während ApoCIII das Enzym inhibiert. ApoB100 und ApoE wirken als Liganden des LDL-Rezeptors (ApoB/-E-Rezeptor). In der Zirkulation wird der Triglyceridanteil der VLDL durch die endothelständige LPL hydrolysiert. Durch die Lipolyse wird der Kern der VLDL verkleinert. Es entstehen VLDL-Remnant-Partikel (sogenannte IDL). Der hierbei auftretende Membranüberschuss der VLDL-Remnants (Phospholipide, freies Cholesterin, ApoC und ApoE) wird auf HDL übertragen. Ein großer Teil der VLDL-Remnants wird durch den LDL-Rezeptor oder einen Remnant-Rezeptor direkt von der Leber aus der Zirkulation geklärt. Der verbleibende Teil der VLDL-Remnants wird durch die hepatische Lipase (HL) weiter zu LDL abgebaut.

Die LDL-Partikel bestehen in ihrem Kern zum überwiegenden Anteil aus Cholesterinester mit nur einem relativ geringen Anteil an Triglyceriden. Sie besitzen nur eine Apolipoprotein-Komponente, das ApoB100 und transportieren etwa 80% des gesamten Plasmacholesterins. LDL werden zu etwa 70% über den LDL-Rezeptor aus der Blutzirkulation entfernt, etwa 30% werden über einem vom LDL-Rezeptor unabhängigen Weg eliminiert. Das zentrale Organ der LDL-Rezeptor vermittelten Aufnahme ist die Leber. Sie ist daher ganz entscheidend für die Regulation der

Plasmacholesterinkonzentration verantwortlich. Die über den LDL-Rezeptor vermittelte Aufnahme von LDL in die Zelle unterliegt einer negativen Feedback-Kontrolle, die von dem Cholesterinbedarf der Zelle abhängig ist. So wird die LDL-Rezeptorproduktion in Zellen mit einer positiven intrazellulären Cholesterinbilanz herunterreguliert. Umgekehrt kommt es jedoch zu einer Stimulation der LDL-Rezeptor-Produktion, wenn im Falle einer Hemmung der HMG-CoA-Reduktase (z. B. Statine), dem Schlüsselenzym der intra-zellulären Cholesterinsynthese, die intrazelluläre Cholesterinkonzentration absinkt. Die erhöhte LDL-Rezeptor Aktivität führt zu einer gesteigerten hepatischen LDL-Aufnahme aus der Zirkulation und damit zu einem Abfall der Plasmacholesterinkonzentration. LDL-Partikel, die nicht über den LDL-Rezeptor geklärt werden, können durch einen nicht-regulierten Weg über Multiligandenrezeptoren (Scavenger-Rezeptor) aus der Zirkulation entfernt werden. Voraussetzung hierzu ist jedoch eine Modifikation der LDL-Partikel, die an extrazellulärer Matrix (Proteoglykane) in der Gefäßwand retinieren (z. B. Oxidation durch Sauerstoffradikale enzymatische Modifikation, Aggregation). Die Aufnahme von modifizierten LDL über diesen nicht-regulierten Weg kann in der Gefäßwand zu einer Akkumulation von Cholesterinestern in Makrophagen und zur Ausbildung von Schaumzellen führen. Dieser Prozess trägt entscheidend zur Entstehung und Progression atherosklerotischer Plaques bei. Freigesetzte oxidierte Phospholipide und Oxysterole wirken als inflammatorische Stimuli und führen durch weitere Zellaktivierung zu dem Bild einer chronisch-inflammatorischen Gefäßreaktion (Getz GS et al., 2005).

1.2.4.3 Der reverse Cholesterintransport

Der Mensch ist nicht in der Lage den Sterolring des Cholesterins abzubauen. Daher muss der Überschuss an Sterolen über die Galle und dem Darm aus dem Körper eliminiert werden. Dies ist nur durch eine Abgabe von Cholesterin durch die Zellen und durch Akzeptoren für überschüssiges Gewebecholesterin möglich. Dieser „reverse Cholesterintransport“ wird durch HDL vermittelt. An der Bildung der HDL sind mehrere Stoffwechselprozesse beteiligt. Von der Leber und dem Darm werden kleine, unreife HDL-Partikel („nascent HDL“) in die Zirkulation abgegeben, die aus Phospholipiden und Apolipoproteinen bestehen. Eine weitere Quelle der HDL sind Membrankomponenten, die nach Triglyceridhydrolyse der Chylomikronen und VLDL

im Überschuss auftreten. Die noch unreifen HDL-Partikel (HDL₃) sind der Lage freies Cholesterin aus dem Gewebe und von anderen Lipoprotein aufzunehmen. Der Transfer von intrazellulärem Cholesterin zur Zellmembran ist ein aktiver Vorgang, der unter anderem durch die ABCA1 Transfer Kasette reguliert wird. HDL-Cholesterin kann durch Transferproteine auf andere Lipoproteinklassen übertragen werden. Dieser Transferweg der VLDL ist für einen Austausch von Cholesterinester der HDL mit Triglyceriden der VLDL verantwortlich, wie dies charakteristischerweise bei einer diabetischen Stoffwechselstörungen mit Hypertriglyzeridämie und niedrigen HDL-Spiegeln beobachtet wird. Niedrige HDL-Cholesterinkonzentrationen sind daher Ausdruck eines gestörten Triglyceridstoffwechsels mit einem reduzierten Abtransport von Gewebecholesterin. Ziel in der Prävention der koronaren Herzerkrankung ist daher eine Verbesserung der Cholesterinabgabe des Gewebes, wie dies durch eine Erhöhung der HDL-Cholesterinkonzentration erreicht werden kann (Thery J, Teupser D et al., 2003; Chapman MJ, Assmann G et al., 2004; Brewer NB et al., 2004).

1.3 Störungen des Lipoproteinstoffwechsels

Die Hyperlipoproteinämie, Zigarettenrauchen, Arterielle Hypertonie, Adipositas und Diabetes mellitus stellen die etablierten Risikofaktoren der Atherosklerose und der koronaren Herzkrankheit dar. Es handelt sich um eine sehr heterogene Gruppe von Stoffwechselstörungen, sowohl was die Ätiologie als auch was die phänotypische Ausprägung betrifft. Anhand der phänotypischen Labormuster erstellte Fredrickson 1967 eine erste Klassifizierung der Hyperlipoproteinämien (Fredrickson DL et al., 1967). Diese Klassifikation berücksichtigt zwar noch nicht die heutigen, vor allem molekulargenetischen Erkenntnisse, hat aber weiterhin große klinische Bedeutung in Therapie und Praxis. Die Tabelle 7 stellt die Fredrickson-Klassifikation dar.

Klassifizierung der Lipidstoffwechselstörungen nach Fredrickson

Typ	Vermehrte Lipidklassen	Phänotyp
Typ I	Chylomikronen	Massive Triglyceriderhöhung durch Erhöhung der Chylomikronen
Typ II a	LDL	Isolierte Erhöhung des Cholesterins
Typ II b	VLDL und LDL	Triglyceride und Cholesterin erhöht
Typ III	β -VLDL (VLDL-Remnants)	Ratio: VLDL-Cholesterin/Triglyceride >0,3
Typ IV	VLDL	Isolierte Erhöhung der Triglyceride
Typ V	Chylomikronen und VLDL	Massiv Erhöhung der Triglyceride durch Erhöhung der Chylomikronen und VLDL

modifiziert nach Schäfer JR, 1998

Tab. 7: Klassifizierung der Lipidstoffwechselstörungen nach Fredrickson mittels Lipidelektrophorese.

1.3.1 Genetisch bedingte Störungen des Lipoproteinstoffwechsels

Bis jetzt konnte die Ätiologie einiger Fettstoffwechselstörungen aufgeklärt werden. So erhielten z.B. Brown und Goldstein den Nobelpreis für Medizin für ihre Entdeckung des LDL-Rezeptors auf den Zelloberflächen von Hautfibroblasten und konnten nachweisen, dass die Ursache der familiäre Hypercholesterinämie ein Defekt dieses Rezeptors ist.

Der familiäre Apolipoprotein B (ApoB)-100-Defekt (FDB) wird autosomal dominant vererbt und kommt in der Bevölkerung mit einer Häufigkeit von 1:700 vor. Ursache der FDB ist eine Punktmutation im Kodon 3500 des ApoB-Gens, die Base Guanin ist gegen Adenin ausgetauscht; im ApoB kommt es entsprechend zu einer Substitution der Aminosäure Arginin zu Glutamin. Dieser Aminosäureaustausch verändert die Ladung in der LDL-Rezeptor-bindenden Domäne, die Bindungsfähigkeit dieser Mutante ist erheblich eingeschränkt (Innerarity TL et al., 1987, 1990). Phänotypisch liegt eine Hyperlipoproteinämie IIa nach Fredrickson vor (Windler et al., 1994).

Die Typ-III-Hyperlipoproteinämie ist gekennzeichnet durch eine deutliche Erhöhung sowohl des Plasmacholesterins als auch der Triglyceride, das Vorhandensein

cholesterinreicher VLDL und hohe Spiegel von Apolipoprotein E. ApoE ist Bestandteil der LDL und vermittelt den Transport von Cholesterin aus der Leber ins Körpergewebe. Das menschliche ApoE-Gen liegt auf Chromosom 19 und kommt in drei häufigen Polymorphismen vor. Diese als $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$ bezeichneten allelischen Varianten kodieren für die ApoE-Isoformen E2, E3 und E4. Die am häufigsten isolierte Isoform ApoE3 hat einen Cystein-Rest an Position 112 und einen Arginin-Rest an Position 158. ApoE2 enthält 2 Cystein-Reste in diesen Positionen, ApoE4 zwei Arginin-Reste. Je nach Kombination sind insgesamt sechs verschiedene Genotypen bekannt. ApoE2 hat eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte Affinität zum LDL-Rezeptor. Dies führt zu einer Erhöhung der Cholesterin-Konzentration im Blut. In der Folge steigt das Risiko für KHK. So sind 94% aller Hyperlipoproteinämie Typ III- Patienten homozygot für das Allel ApoE2 (Utermann G et al., 1985).

Im Gen der Lipoproteinlipase sowie im Gen des Apolipoproteins C-II konnten inzwischen Defekte als eine genetisch determinierte Ursache der Hyperchylomikromämie nachgewiesen werden (Auwerx JH et al., 1989; Dichek H et al., 1992).

1.3.2 Familiäre Hypercholesterinämie

Die Familiäre Hypercholesterinämie kann auf dem Boden eines genetischen Defektes in den Genen des LDL-Rezeptors, des Apolipoprotein B als auch des ARH Locus entstehen. Patienten weisen im Falle eines homozygoten oder compound heterozygoten Defektes des LDL-Rezeptors LDL-Cholesterin-Serumkonzentrationen über 600 mg/dl auf. In der Regel kann eine klinische Progredienz der Atherosklerose mittels LDL-Apherese verhindert werden. Da ca. 70-80% aller LDL-Rezeptoren des Körpers in der Leber exprimiert sind, kann im Falle des Versagens der therapeutischen Möglichkeiten, eine Lebertransplantation (LTx) indiziert sein (Abb. 2). Nach einer (LTx) (normocholesterinämischer Spender mit intaktem LDL-Rezeptor) kann die LDL-Rezeptoraktivität zusätzlich durch die Gabe von Cholesterin-Synthese-Enzym Hemmer hochreguliert werden. Eine LTx sollte dann durchgeführt werden, wenn trotz herkömmlicher cholesterinsenkender Maßnahmen einschließlich der LDL-Apherese eine klinisch relevante Atheroskleroseprogredienz vorliegt. Die LTx sollte idealerweise zu einem Zeitpunkt gestellt werden bevor kardiale

Komplikationen auftreten. Infolge der ausgeprägten Atherosklerose auch der nicht-kardialen Gefäße kann der Erfolg einer symptomatischen HTx sehr begrenzt sein.

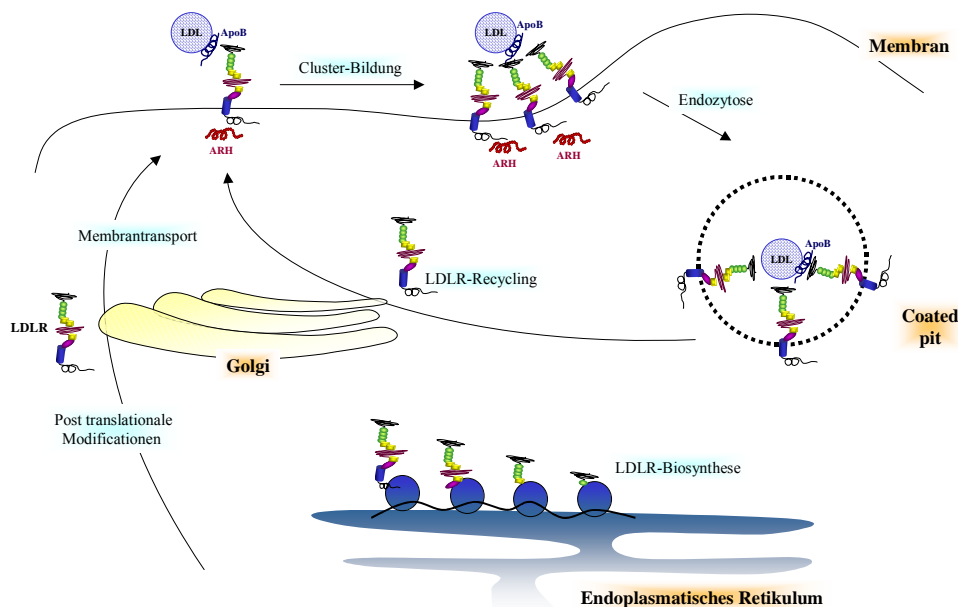


Abb. 2: LDL-Rezeptor Zyklus

1.4 LDL-Rezeptor

Goldstein und Brown gelang 1973 an kultivierten Hautfibroblasten homozygoter Patienten mit FHC der Nachweis, dass die Hypercholesterinämie, das führende klinische Symptom, durch Funktionsstörung eines spezifischen Rezeptors der Zelloberfläche, der die Aufnahme von LDL-Cholesterin in die Zelle vermittelt, zustandekommt und bezeichneten ihn als LDL-Rezeptor.

Das Gen des humanen LDL-Rezeptors ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 19 (19p13.2) lokalisiert und ist etwa 45,5 Kilobasen lang. Die für das intakte Protein kodierenden Bereiche sind auf 18 Exons verteilt.

Die wesentliche Funktion des LDL-Rezeptors besteht darin, dass überschüssiges LDL-Cholesterin in die Leberzellen aufgenommen und zu Gallensäuren metabolisiert wird. Gleichzeitig kommt es durch die Aufnahme von Lipoproteinen in die Leberzelle zu einer entsprechenden Blockade der endogenen Cholesterinsynthese. Liegt ein genetischer Defekt vor, der die Aufnahme von LDL-Cholesterin in die Leberzelle

verhindert, so kommt es zu einer erhöhten Produktion von cholesterinreichen Lipoproteinen, die in die Zirkulation abgegeben werden.

1.4.1 Struktur des LDL-Rezeptor

Das naszente monomere Protein besteht aus 839 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht (MG) von 93 000 Da, welches nach vollständiger Glykolisierung des Proteins auf 164 000 ansteigt. Der LDL-Rezeptor ist, bedingt durch einen sehr hohen Anteil an Cysteinresten, ein saures Protein (pI=4,6). Der LDL-Rezeptor besteht aus 5 funktionellen Domänen (Julius U et al., 2000):

- Das aminoternale Ende des maturen Rezeptorproteins ist die eigentliche Ligandenbindende Domäne. Diese ist sehr reich an Cysteinresten (15% der insgesamt 322 Aminosäurereste dieser Domäne) und besteht aus 7 homologen Abschnitten mit jeweils 40 Aminosäurereste (*cystein-rich repeated cassettes*), in denen v.a. die Positionen der Cysteinreste hochkonserviert sind. Alle Cysteinreste sind an der Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken beteiligt. Die Bindung ApoB-100 und ApoE an diese Repeats erfolgt über ein Cluster negativ geladener Aminosäurereste (Glutaminsäure und Asparaginsäure). Wenn in den Endozytosevesikeln (Endosomen) der pH-Wert absinkt, werden diese Reste protoniert, so dass der Ligand aus seiner Bindung freigesetzt wird. Missense-Mutationen in diesem Bereich führen fast immer zu Änderungen der Bindungseigenschaften des Rezeptors (Hobbs et al., 1986).
- Die 2. Domäne (350 Aminosäurereste) befindet sich wie die Ligandenbindende Domäne auf der extrazellulären Seite der Zellmembran und besitzt Homologie zum *epidermal growth factor precursor*. Sie enthält 3 cysteinreiche Repeats (*growth faktor repeats*). Die EGF-Präkursor-homologe Region ist an der pH-abhängigen Dissoziation von Rezeptor und Liganden beteiligt.
- Die 3. Domäne des LDL-Rezeptors enthält 18 Threonin- bzw. Serinreste, die O-glykosidisch gebundene Kohlenhydrate tragen. Diese Oligosaccharide wirken möglicherweise als Stützen, die den Rezeptor in der Membran aufrichten.
- Die eigentliche Transmembranregion des LDL-Rezeptors besteht aus 22 hydrophoben Aminosäuren. Sie verankern den Rezeptor in der Zellmembran.
- Das C-terminale Ende des Rezeptorproteins ragt ins Zytoplasma und ist für den intrazellulären Metabolismus des LDL-Rezeptors, so z.B. für das Clustering der Rezeptormoleküle in den *coated pits*, verantwortlich. Diese Domäne erlaubt die

Bildung von Dimeren und Multimeren des LDL-Rezeptors, die Bedeutung bei der Rezeptorinternalisierung erlangt.

Struktur des LDL-Rezeptors

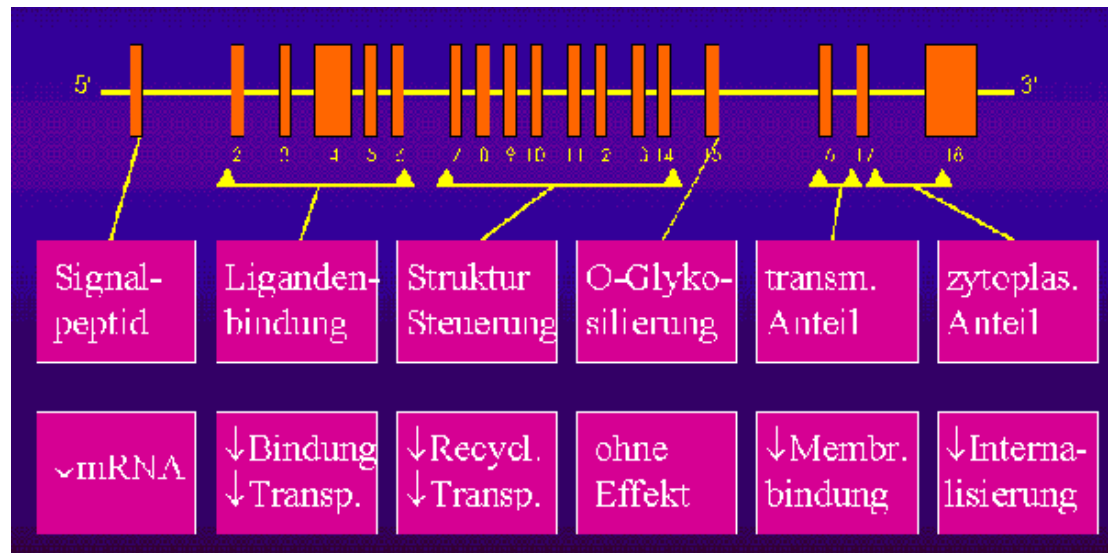


Abb. 3: Struktur des LDL-Rezeptors und Funktion der jeweiligen Domänen (modifiziert nach Ganten und Ruckpaul. Handbuch der Molekularen Medizin, 2000).

1.4.2 Mutationen des LDL-Rezeptors

Mittlerweile sind mehr als 900 Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen bekannt, die zu einer familiären Hypercholesterinämie führen können. Klinisch homozygote Patienten sind meist compound heterozygot für zwei verschiedene Defekte. Unterteilt man diese Mutationen nach Struktur und Funktion des LDL-Rezeptors, lassen sich fünf verschiedene Klassen der Mutationen unterscheiden. Bei Klasse 1 Mutationen produziert das Gen entweder keinen Rezeptor oder eine nur sehr geringe Menge intakten Proteins. Klasse 2 Mutationen stellen den häufigsten Mutationstyp dar. Hierbei ist der Transport der Proteine vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat gestört, der Rezeptor verbleibt auf der Stufe des Vorläufermoleküls und kann nicht als reifer Rezeptor extrazellulär exprimiert werden. Klasse 3 Mutationen weisen einen Rezeptor auf, der posttranslational normal prozessiert wird und die Zelloberfläche erreicht, jedoch unfähig ist, einen Liganden zu binden. Mutationen betreffen die cysteinreiche LDL-Bindungsdomäne oder die „Epidermal Growth Factor“ (EGF)-Präkursor homologe Domäne. Bei den Klasse 4 Mutationen erreichen LDL-Rezeptoren die Zellmembran, binden LDL, können sich aber nicht in den

coated pits sammeln. Dadurch kann ein beladener Rezeptor nicht internalisiert werden, da die Lokalisation in *coated pits* unbedingt erforderlich ist. Klasse 5 Mutationen sind Recycling-Defekte. Bezüglich Transport und Ligandenbindung verhält sich der Rezeptor normal, nach der Internalisierung kehrt er allerdings nicht an die Zelloberfläche zurück.

Für den LDL Rezeptor sind inzwischen mehr als 900 Mutationen beschrieben, die mit einer Familiären Hypercholesterinämie assoziiert sind (Villéger et al., 2002; Heath et al., 2001). Auf Nukleinsäureniveau waren die meisten Mutationen (n=840) Punktmutationen und 610 von denen waren Substitutionen, 121 kleine Deletionen, 53 kleine Insertionen oder Duplikationen. Außerdem fanden sich 57 intronische Substitutionen, 37 von denen (65%) beeinflussen Consensus Splice Sequences (+1,+2,-1, und -2). Auf der Stufe der Proteine, wurden 507 Missense- Mutationen, 103 Nonsense- Mutationen, 139 Premature Stop Codons und 35 In- frame Aminosäureninsertionen oder -deletionen identifiziert. Größere Rearrangements (79) machen 10% aller Mutationen aus. Nur 9 Mutationen (1%) wurden auf dem Promoter gefunden (Dedoussis et al., 2003; Dedoussis et al., 2004). Große Deletionen machen ungefähr 7% aller Mutationen des LDLR- Gens aus. Ältere Studien zeigten, einen höheren Anteil der größeren Rearrangements in dem LDLR- Gen, 33% (Hobbs et al., 1990) und 25% (Varret et al., 1997). In den letzten 10 Jahren hat sich der Großteil der Screening Programme für LDLR- Mutationen nur mit Punktmutationen beschäftigt. Tatsächlich wurden Techniken wie SSCP, DGGE, DHPLC, und Sequenzierung kontinuierlich im Sinne der Effizienz und der Geschwindigkeit verbessert. Folglich es ist möglich, dass der aktuelle Anteil der größeren Rearrangements in dem LDLR- Gen unterschätzt wird.

1.4.3 LDL und Atherosklerose

Eine hohe Konzentration von LDL im Plasma führt durch aktiven endothelialen Transport zu einem vermehrten Einstrom von LDL in den subendothelialen Raum der Arterienwand, wobei das LDL modifiziert, z.T. oxidiert wird. Die Endothelzellen produzieren einen Adhäsionsfaktor für Leukozyten (*mononuclear endothelial leukocyte adhesion factor* = ELAM) (Cybulski et al., 1991; Sampietro et al., 1997). Gleichzeitig ändert sich die endotheliale Oberfläche und bewirkt eine Reaktion mit den vorbeiströmenden Monozyten und T-Lymphozyten, die an der Gefäßwand haften und in das Subendothelium eindringen. Orts-ständige Makrophagen und Monozyten

des Blutes werden durch Wachstumsfaktoren, vornehmlich PDGF (*platelet derived growth factor*) und TGF β (*transforming growth factor β*), die z.T. aus der Endothelzelle stammen, zu unregulierter Aufnahme von nativem und oxidiertem LDL durch Scavenger-Rezeptoren stimuliert und wandeln sich in Schaumzellen um, die die frühe atherosklerotische Läsion, die sog. *fatty streak*, bilden. Die Wachstumsfaktoren führen zu einer Einwanderung von glatten Muskelzellen aus Media und Adventitia in den subendothelialen Raum. Sie nehmen nicht nur LDL auf, sondern sezernieren hier auch extrazelluläre Matrix (*uncomplicated atheroma*). Gleichzeitig läuft eine Entzündungsreaktion ab, die durch das Vorhandensein von stimulierten T-Lymphozyten gekennzeichnet ist (Libby et al., 1995), die Metalloproteinasen aktivieren und zur Fragmentierung der Media führen, aber auch zur Ruptur der fibrösen Kappe, die das Atherom gegen den Blutstrom abschirmt.

Die Proliferation der glatten Muskelzellen und der Makrophagen sowie die fortgesetzte Sekretion von Wachstumsfaktoren führen zum Fortschreiten des Atheroms, aber auch zur Aktivierung von Thrombozyten, die aggregieren und wandständige Thromben bilden und selber Mitogene, PDGF und TGF β , sezernieren. Die fortgeschrittene atherosklerotische Läsion der Gefäßwand enthält intra- und extrazelluläre Lipide, Cholesterinkristalle, Schaumzellen, Makrophagen, T-Lymphozyten, proliferierende glatte Muskelzellen, Kollagenfasern und Kalziumpräzipitate. Bei Einriß der fibrösen Kappe entleert sich der Detritus in das Gefäßlumen und führt zur sekundenschnellen Thrombusbildung und zum Gefäßverschluß (Ross et al., 1988).

Zuerst zeigen sich atherosklerotische Veränderungen an den Gefäßaufzweigungen, an denen der laminäre in einen turbulenten Blutstrom übergeht. Warum bei der FH die thorakale Aorta und ihre großen Äste zuerst und am schwersten betroffen sind, ist ungeklärt.

1.5 Apolipoprotein B

Apolipoprotein B-100 hat eine Molmasse von ca. 550 kDa und liegt im Plasma in Konzentrationen zwischen 700 bis 900 mg/l vor. ApoB-100 wird in der Leber synthetisiert und ist Bestandteil von VLDL, IDL, LDL und Lp(a). Jedes LDL-Partikel enthält jeweils nur ein ApoB-100-Molekül. Neben seiner Funktion als maßgeblicher Ligand bei der zellulären Aufnahme von LDL über den LDL-Rezeptor (Goldstein et al., 1983), ist ApoB-100 für Synthese, Strukturstabilisierung und Sekretion der Lipoproteine notwendig. ApoB-100 und ApoB-48 sind Produkte eines einzigen Gens und ApoB-48 wird in der Dünndarmmukosa gebildet. Die 2152 Aminosäuren umfassende Sequenz des ApoB-48 entspricht dabei dem aminoterminalen Ende des ApoB-100. Es kommt nur in Chylomikronen und Chylomikronen-Remnants vor und dient damit dem Transport von exogenen Lipiden. Die Sekretion von Triglyceriden und Cholesterin aus der Leber und aus dem Dünndarm ins Plasma wird durch ApoB-100 vermittelt. Da sich die Rezeptorbindende Domäne des ApoB am carboxyterminalen Bereich des Moleküls befindet, ist nur ApoB-100 in der Lage, mit dem LDL-Rezeptor in Interaktion zu treten.

1.6 Hyperlipidämie

Die wichtigste Rolle spielt hierbei die Hypercholesterinämie. Eine Erhöhung der LDL (*low density lipoprotein*)- und VLDL (*very low density lipoprotein*)-Werte, ein Anstieg der Lipoprotein (a)-Werte und eine Erniedrigung der HDL (*high density lipoprotein*)-Werte gehen mit einem erhöhten Atheroskleroserisiko einher. HDL wirkt als protektiver Faktor. Es unterdrückt die zelluläre LDL-Aufnahme, hemmt die Cholesterinanhäufung in den Zellen der Arterienwand durch Überführung des Cholesterinüberschusses in die Gallensäuresynthese der Leber und verhindert somit die Entstehung einer Atherosklerose. Eine Erhöhung des HDL-Spiegels wird bei körperlicher Aktivität, aber auch bei mäßigem Alkoholkonsum beobachtet.

2 Aufgabenstellung

Grundlage dieser Arbeit ist die klinische und biochemische Charakterisierung des LDL-Rezeptor Gens von 100 deutschen und 100 griechischen Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie. Zu der klinischen Evaluation gehörte neben einer gründlichen körperlichen Untersuchung und einer ausführlichen Anamnese auch eine Blutentnahme zur Bestimmung der Parameter des Lipidstoffwechsels sowie EDTA-Blut für eine DNA-Extraktion. Jeder an dieser Untersuchung teilnehmende Patient willigte in die hier aufgeführten Untersuchungen ein. Ein entsprechendes Ethikvotum liegt dieser Studie zugrunde. (Votum der Ethikkommission der Charité vom 25.10.99). Alle Patienten haben für die Untersuchungen ihre Einverständniserklärung gegeben.

Die molekularbiologische Analyse erlaubt im Falle eines Mutationsnachweises eine eindeutige Identifizierung der Familiären Hypercholesterinämie, die ein hohes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bedingt.

Die von uns durchgeführte Analyse umfaßt die Untersuchung aller 18 Exons und des Promotors mittels PCR und Sequenzierung. Hiermit können die Mutationen des kodierenden Bereichs, der Exon-/Introngrenzen und des Promotors nachgewiesen werden.

Die Untersuchung des Patientenkollektivs wurde im Rahmen des vom DAAD unterstützten Kooperationsprojektes IKYDA durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es Mutationen im LDL-Rezeptor Gen zu identifizieren und einen Vergleich von Phänotyp und Genotyp bei den betroffenen Patienten durchzuführen. Die Patientenkollektive von deutschen und griechischen Patienten ermöglichte uns einen Vergleich zwischen zwei unterschiedlichen ethnischen Populationen.

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patienten

Die Patienten rekrutierten sich aus den Stoffwechselambulanzen der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, Campus Charité Mitte, der Lipidambulanz Campus Virchow, sowie aus den Stoffwechselzentren in Athen, Department of Science Dietetics-Nutrition, Harokopio University of Athen, Department of Cardiology und der Hyperlipidemic Clinic of Athen. Der Rekrutierungszeitraum für diese Arbeit bezog sich auf die Jahre 2001-2004. Ein Ethikvotum zur genetischen Untersuchung von Patienten mit Hypercholesterinämie lag vor. Alle Patienten haben für die Untersuchungen ihre Einverständniserklärung gegeben (Votum der Ethikkommission der Charité vom 25.10.1999).

3.1.2 Technisches Material und Chemikalien

Geräte

Sequenzanalyser:

- ABI Prism Genetik Analyzer Applied Biosystems,
Weiterstadt Deutschland

PCR – Thermocycler:

- T1 Thermoblock Biometra, Göttingen,
Deutschland

- T3 Thermoblock Biometra, Göttingen,
Deutschland

- T-Gradient Thermoblock Biometra, Göttingen,
Deutschland

Zentrifugen:

- Biofuge fresko Heraeus, Osterode, Deutschland
- Zentrifuge M-08656 Scientific Ind, NY, USA
- Zentrifuge 5416 C Eppendorf, Hamburg
- Mini Zentrifuge C-1200 Woodbridge, NJ, USA
- Varifuge 3. OR Heraeus, Osterode, Deutschland

Mixer:

- Vortex – Genie 2 Scientific Ind, NY, USA
- Vortex Reax 2000 Heidolph Göttingen, Deutschland
- Thermomixer 5436 Eppendorf, Hamburg
- Thermomixer comfort Eppendorf, Hamburg

Sonstiges Geräte:

- Magnetrührer MR 3001 Heidolph, Deutschland
- Analysenwaage BP210 D Sartorius Göttingen, Deutschland
- Mikrowelle Bosch, Deutschland
- Spannungsquelle P20 Power Pack Biometra, Göttingen, Deutschland
- Eppendorfpipetten Eppendorf, Hamburg
- Polaroidkammera Polaroid, UK
- Filmkassetten Polaroid, UK
- Schüttler WT 16 Biometra, Deutschland
- UV – Transilluminator Vilber Lourebat, Frankreich

Elektrophorese – Kammer:

- Elektrophoresekammer Pharmacia Biotech GNA 100, Sweden

Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

DNA – Isolierung:

- QIAmp DNA Blood Mini Kit Qiagen GmbH, Hilden

Gel:

- Agarose High Resolution Carl Roth GmbH, Karlsruhe

PCR – Aufreinigung:

- QIAquick PCR Purification Kit Qiagen GmbH, Hilden
- Dye Ex 2.0 Spin Kit Qiagen GmbH, Hilden

Enzyme:

- HotStar Taq, 5 units/ μ l Qiagen GmbH, Hilden
- Protease Qiagen GmbH, Hilden
- Restriktionsendonuklease *NsiI* Enzym New England, Biolabs
- Restriktionsendonuklease *MspI* Enzym New England, Biolabs
- Restriktionsendonuklease *HhaI* Enzym New England, Biolabs

Puffer und Lösungen

PCR – Puffer:

- PCR Puffer, 10 x Qiagen GmbH, Hilden

Ladepuffer für Elektrophorese:

- TBE Puffer, 10 x (1 x TBE Puffer als Gebrauchslösung) Ambion, England
- Proben Puffer , 1 x 5 Deutschland

Für ApoB Verdau Puffer:

- *NsiI* Puffer New England, Biolabs
- *MspI* Puffer New England, Biolabs

Für ApoE Verdau Puffer :

- <i>HhaI</i> Puffer	New England, Biolabs
<i>Desoxyribonukleotidlösung (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)</i>	
- dNTP Mix	Qbiogene, Heidelberg
<i>Sonstiges:</i>	
- Template Suppression Reagent	Applied Biosystems, Foster City
- Q – Solution, 5 x	Qiagen GmbH, Hilden
- Big Dye Terminator Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
- DNA Marker 50 – 1000 bp	Camprex, Rockland, USA
- SYBR Green	Serva, Mannheim

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung humaner DNA

Prinzipiell ist die menschliche DNA in allen kernhaltigen Zellen vorhanden und kann aus diesem Grund aus verschiedenartigen Geweben isoliert werden. Für die Isolierung humaner DNA wurde der „QIAamp Blood Kit“ der Firma Qiagen verwendet.

Vorbereitung: Für die Isolierung genomischer DNA wurden 10 ml EDTA-Vollblut verwendet.

1. EDTA-Blut Röhrchen auf Raumtemperatur bringen
2. Pro Blutprobe eine „Mini-Column“ und zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße bereitstellen
3. Thermomixer auf 56°C erwärmen
4. Zentrifugation des Blutes bei 2800 U/min, 10 min
5. Plasmaüberstand abnehmen
6. 250 µl Interphase abnehmen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettieren
7. Zugabe von 25 µl Protease
8. Zugabe von 250 µl Puffer AL, sofort vortexen
9. Inkubation bei 56°C, 10 min
10. Anzentrifugieren der Proben
11. Zugabe von 250 µl Ethanol (absolut 100%), vortexen
12. Anzentrifugieren der Proben
13. Überführen der Probe in die „Mini-Column“
14. Zentrifugation bei 8000 U/min, 1 min (ggf. Wiederholung des Vorganges bei höherer Umdrehungszahl, falls Probe sehr zähflüssig)
15. „Mini-Column“ in ein Collection-Tube überführen
16. Zugabe von 500 µl Puffer AW 1
17. Zentrifugation bei 8000 U/min, 1 min
18. „Mini-Column“ in ein Collection-Tube überführen
19. Zugabe von 500 µl Puffer AW 2
20. Zentrifugation bei 13000 U/min, 3 min
21. „Mini-Column“ in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
22. Zugabe von 200 µl Puffer AE (mindestens 1 min inkubieren)
23. Zentrifugation bei 8000 U/min, 1 min

3.2.2 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

Die denaturierende Gelelektrophorese (DGGE) ist in der Lage bei kleinen DNA-Fragmenten (200-700 bp) Unterschiede im Denaturierungsverhalten zu detektieren, hervorgerufen durch Veränderungen nur eines einzigen Basenpaars.

In der DGGE werden DNA-Fragmente anhand ihrer Denaturierungseigenschaften getrennt. Bringt man doppelsträngige DNA (dsDNA, *double strand DNA*) in eine zunehmend denaturierende Umgebung beginnt sie partiell zu schmelzen. Mit Ansteigen der denaturierenden Bedingungen dissoziieren die DNA-Fragmente schließlich vollständig.

Mit Eintreten der DNA-Fragmente in die denaturierende Umgebung dissoziieren zunächst nur bestimmte Bereiche des Fragments. Mit dem Übergang der dsDNA in Einzelstrang-DNA (ssDNA, *single strand DNA*) sinkt aufgrund der Konformationsänderung die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld drastisch. Ein dsDNA-Fragment bewegt sich erheblich schneller als ein denaturiertes ssDNA-Fragment. Während einer Elektrophorese in einem ansteigend denaturierenden Gradienten schmelzen dsDNA-Fragmente partiell, gehen dabei eine Konformationsänderung ein und ändern damit ihre elektrophoretische Mobilität. Das Schmelzverhalten und damit die Konformationsänderung und die elektrophoretische Mobilität der dsDNA-Fragmente ist abhängig von der Basenzusammensetzung der Fragmente. Bereits der Austausch einer einzigen Base führt zu einer detektierbaren Veränderung der Mobilität während der Elektrophorese.

Verwendete Lösungen für die DGGE

Stock Solutions	50x TAE	10% APS
40% Acrylamid 37,5 : 1 Acrylamid/Bisacrylamid (Bio Rad)	242,0 g Tris Base 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5M EDTA pH 8.0 Mit dH ₂ O auf 1000 ml auffüllen	0,1g Ammonium Persulfat Mit dH ₂ O auf 1 ml auffüllen

Tab. 8: Verwendete Lösungen für die DGGE

In den vorliegenden Experimenten wurden Gradienten zwischen 0-80% Denaturierung eingestellt (Nissen et al., 1995). Die Elektrophorese wurde bei 35 Volt für 20 Stunden durchgeführt.

0% Denaturierungsmischung	80% Denaturierungsmischung
75 ml 40% Acylamid	75 ml 40% Acrylamid
10 ml 50x TAE Stock	10 ml 50x TAE Stock
	160 ml Formamid
	170 g Harnstoff
dH ₂ O bis 500 ml	dH ₂ O bis 500 ml
100 ml	100 ml

Sequenzen der verwendeten Primer für jedes Exon des LDL-Rezeptors in der DGGE, PCR-Produkt Größe und eingestellter Gradient in der Elektrophorese.

Region Exon	Primer	Oligonukleotid (Sense & antisense 5' to 3')	Frag- ment- größe (bp)	Denaturie- rungs Gradient (%)
Prom	N1 N2	bAGG ACT GGA GTG GGA ATC AGA GC TGC TGT GTC CTA GCT GGA AAC CC	252	30-70
Exon 1	N3 N4	aTTG AAA TGC TGT AAA TGA CGT GG CTG GCG CCT GGA GCA AGC	256	40-80
Exon 2	N5 N6	bCGT GGT CAG TTT CTG ATT CTG GCG ATA AAT GCA TAT CAT GCC CAA AGG	253	30-70
Exon 3	N7 N8	bTCG GCC TCA GTG GGT CTT TC ACT CCC CAG GAC TCA GAT AGG C	268	30-70
Exon 4 (5'end)	N9 N10	bACT GCG GCA GCG TCC CCG GC GGA TGC AGG TGG AGC TGT TGC	297	40-80
Exon 4 (3'end)	N11 N12	ACC TGT GGT CCC GCC AGC bCCA GGG ACA GGT GAT AGG ACG	345	40-80
Exon 5	N13 N14	bGGC CCT GCT TGT TTT TCT CTGG AGC AGC AAG GCA CAG AGA ATG G	282	30-70
Exon 6	N15 N16	bACG AAA CTG AGG CTC AGA CAC ACC GCT CCC CAC AAA CTC TGC AAG C	262	30-70
Exon 7	N17 N18	bAGA GTG ACC AGT CTG CAT CCC TGG TTG GTT GCC ATG TCA GGA AGC	253	40-80
Exon 8	N19 N20	bTCC CCA CCA AGC CTC TTC TCT C CCA CCC GCC GCC TTC C	222	40-80
Exon 9	N21 N22	cCTG ACC TCG CTC CCC GGA CC GGC TGC AGG CAG GGG CGA CG	278	40-80

Exon 10	N23 N24	GCA GTG AGA TGA GGG CTC CTG G bCCT GCA GCC CTC AGC GTC G	349	30-70
Exon 11	N25 N26	bGGA TCC TCC CCC GCC CTC TGG CTG GGA CGG CTG TCC	239	30-70
Exon 12	N27 N28	GGC CCT CAG GCC CTC TGG bCCG AGT TTT CTG CGT TCA TCT T	336	30-70
Exon 13	N29 N30	aGTC ATC TTC CTT GCT GCC TG CAC AAG GAG GTT TCA AGG TTG G	264	30-70
Exon 14	N31 N32	aTCT CGT TCC TGC CCT GAC TCC GAC ACA GGA CGC AGA AAC AAG G	274	40-80
Exon 15	N33 N34	dGGC ACG TGG CAC TCA GAA GAC G GTG TGG TGG CGG GCC CAG TC	288	40-80
Exon 16	N35 N36	aCTC CAT TTC TTG GTG GCC TTC C CAT AGC GGG AGG CTG TGA CCT GG	239	40-80
Exon 17	N37 N38	aGGG CAG CTG TGT GAC AGA GCG CAT GGC TCT GGC TTT CTA GAG AGG	279	30-70
Exon 18	N39 N40	aCCT GAG TGC TGG ACT GAT AGT TTC C AAG GCC GGC GAG GTC TCA GG	190	40-80
APOB	N41 N42	bGGA GCA GTT GAC CAC AAG CTT AGC GGT GGC TTT GCT TGT ATG TTC TCC	382	20-60

modifiziert nach Hobbs, 1992; Nissen, 1996

Tab. 9: Sequenzen der verwendeten Primer für jedes Exon des LDL-Rezeptors in der DGGE, PCR-Produkt Größe und eingestellter Gradient in der Elektrophorese .

3.2.3 Sequenzieren des LDL Rezeptor Gens

Die Primer für die Sequenzierung der 18 Exone des LDL Rezeptor Gens wurden aus der Literatur entnommen.

Region und Größe in Basenpaaren (bp)	AT	Sense-Primer	Antisense-Primer
LDLR-Promotor 252 bp	60°C	AGGACTGGAGTGGGA ATCAGAGC	TGCTGTGTCCTAGCT GGAAACCC
Exon 1 256 bp	62°C	TTGAAATGCTGTAAA TGACGTGG	CTGGCGCCTGGAGCA AGC
Exon 2 253 bp	62°C	CGTGGTCAGTTTCTG ATTCTGGCG	ATAAATGCATATCAT GCCCAAAGG
Exon 3 268 bp	62°C	TCGGCCTCAGTGGGT CTTTC	ACTCCCCAGGACTCA GATAGGC
Exon 4A 297 bp	62°C	ACTGCGGCAGCGTCC CCGGC	GGATGCAGGTGGAGC TGTTGC
Exon 4B 314 bp	67°C	ACCTGTGGTCCCCGC AGC	CCAGGGACAGGTGAT AGGACG
Exon 5 282 bp	62°C	GGCCCTGCTTGTTTT TCTCTGG	AGCAGCAAGGCACAG AGAATGG
Exon 6 262 bp	62°C	AGCAAAGTGAAGGCTC AGACACACC	GCTCCCCACAACTC TGCAAGC
Exon 7 253 bp	62°C	AGAGTGACCAGTCTG CATCCCTGG	TTGGTTGCCATGTCA GGAAGC
Exon 8 222 bp	62°C	TCCCCACCAAGCCTC TTTCTCTC	CCACCCGCCGCCTTC C
Exon 9 278 bp	62°C	CTGACCTCGCTCCCC GGACC	GGCTGCAGGCAGGGG CGACG
Exon 10 349 bp	62°C	GCAGTGAGATGAGGG CTCCTGG	CCTGCAGCCCTCAGC GTCG
Exon 11 239 bp	62°C	GGATCCTCCCCCGCC CTC	TGGCTGGGACGGCTG TCC
Exon 12 336 bp	62°C	GGCCCTCAGGCCCTC TGG	CCGAGTTTTCTGCGT TCATCTT

Exon 13	264 bp	62°C	GTCATCTTCCTTGCT GCCTG	CACAAGGAGGTTTCA AGGTTGG
Exon 14	274 bp	62°C	TTCGTTCTGCCCCT GACTCC	GACACAGGACGCAGA AACAAGG
Exon 15	288 bp	62°C	GGCACGTGGCACTCA GAAGACG	GTGTGGTGGCGGGCC CAGTC
Exon 16	239 bp	62°C	CTCCATTTCTTGGTG GCCTTCC	CATAGCGGGAGGCTG TGACCTGG
Exon 17	279 bp	62°C	GGCAGCTGTGTGAC AGAGCG	CATGGCTCTGGCTTT CTAGAGAGG
Exon 18	190 bp	62°C	CCTGAGTGCTGGACT GATAGTTTCC	AAGGCCGCGAGGTC TCAGG
ApoB	382 bp	55°C	GGAGCAGTTGACCAC AAGCTTAGC	GGTGGCTTTGCTTGT ATGTTCTCC

modifiziert nach Hobbs, 1992; Nissen, 1996

Tab. 10: Auflistung der in der PCR und bei der Sequenzierung verwendeten Primer. Genannt sind die sense und antisense Primer für die jeweiligen Exone, ihre Abkürzung, Fragmentlänge und die entsprechende Annealing-Temperatur (AT).

3.2.4 DNA- Sequenzierung nach Sanger

Grundlage für die angewandte DNA- Sequenzierungstechnik ist das 1977 erstmals von Sanger vorgeschlagene Dideoxynukleotid–Verfahren (Nobelpreis 1980), welches auf einer modifizierten DNA- Replikation mit Hilfe einer Polymerase beruht. Dabei führt man die Replikation mit Komplementärstrang, Primer, 3'-5'- Polymerase und den Nukleotiden (dNTP) in vier parallelen Ansätzen aus. Als entscheidenden Faktor gibt man nun zu jedem Ansatz eine geringe Menge eines jeweils anderen Dideoxynukleotids (ddNTP), die von der Polymerase in statistischer Weise eingebaut werden. Da nach dem Einbau jedoch die 3'-OH-Gruppe für die Phosphatesterbindung fehlt, bricht die DNA- Replikation an dieser Stelle ab und man erhält als Endprodukt ein Gemisch aller möglichen Kettenbruchstücke, die innerhalb eines Ansatzes die Eigenschaft haben, alle an demselben Nukleotid zu enden. Dieses macht man sich zu Nutze, indem man die Gemische der vier Ansätze nebeneinander auf einem Trägergel

laufen läßt und über Elektrophorese trennt. Liegt die DNA dabei denaturiert vor, was man durch spezielle Gele erreichen kann, ist die Wanderungsgeschwindigkeit eine monotone Funktion der Kettenlänge. Wird das Resultat auf Film entwickelt, so kann man die Basensequenz als Aufeinanderfolge der geschwärzten Striche von oben nach unten bei der jeweiligen Base (bzw. dem ddNTP im aufgetragenen Ansatz) ablesen.

3.2.5 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde Mitte der 80-iger Jahre von Karl Mullis (Nobelpreis für Chemie 1993) konzipiert und zur Anwendung gebracht. Diese Technik hat innerhalb kürzester Zeit die molekulare Genetik und deren Anwendung im Medizinischen Bereich revolutioniert. Auf Grund der hohen Sensitivität des Nachweises erlaubt die PCR eine Diagnose von Infektionen (Viren, Bakterien) aus wenigen Tropfen Blut oder anderen Körperflüssigkeiten, oder eine Erkennung von Erbkrankheiten aus wenigen Zellen des Probanden.

Die PCR erlaubt einen bestimmten Abschnitt der DNA (Amplikon) zu vervielfältigen. Sie ist ein zyklisches Verfahren, wobei sich im Idealfall in jeder Runde die Anzahl der DNA-Kopien verdoppelt. Dadurch kommt es zu einem exponentiellen Anstieg von DNA-Kopien. Zunächst werden die beiden Stränge der DNA durch Erhitzen auf 95°C getrennt. Dann wird die Temperatur in dem PCR-Gerät (Thermocycler) auf eine Temperatur heruntergefahren, bei der sich die vorher ausgewählten Primer spezifisch an die Enden des zu vervielfältigen DNA-Segments anlagern (Annealing). Die Taq- (DNA-) Polymerase katalysiert die Verlängerung der Primer, wobei die in einem geeigneten Puffer gelösten Nukleotide (dNTP) als Bausteine dienen. Für die PCR sind folgende Substanzen im Reaktionsansatz nötig:

1. Doppelsträngige DNA, die die Sequenz enthält, die amplifiziert werden soll; im Normalfall sollten weniger als 1 Microgramm (μg) an genomischer DNA ausreichen, um genügend Kopien der gewünschten Sequenz für eine Analyse zu erhalten.
2. Zwei Primer mit definierter Sequenz, um die Reaktion zu starten und das gewünschte Produkt zu definieren.
3. Hitzestabile DNA Polymerase

Die klassische Polymerase für PCR ist die Taq-DNA-Polymerase, isoliert aus

Thermus aquaticus, einem hitzestabilen Bakterienstamm, der in 70°C heißen Quellen wächst. Die Taq-Polymerase hat ihr Aktivitätsmaximum bei 74°C und einem pH von über 8 und besitzt neben der 5'-3'-DNA Polymeraseaktivität auch eine 5'-3'-Exonucleaseaktivität, aber keine 3'-5'-Exonucleaseaktivität.

4. Eine Mischung aus allen vier Desoxynukleotiden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) als Bausteine der neu zu bildenden DNA.
5. PCR-Puffer. Die Pufferbedingungen sind je nach verwendeter Polymerase einzustellen, bei den zumeist mitgelieferten Puffern sollte insbesondere auf die Ionenkonzentration geachtet werden, da diese die Spezifität und den Prozeß der Gesamtreaktion stark beeinflusst.

PCR-Bedingungen:

Zyklus	Schritt	Temperatur	Zeit (min)
	Vor Denaturierung	95°C	10,0
30	Denaturierung	95°C	1,0
	Annealing	Abhängig vom Primerpaar	1,0
	Elongation	72°C	1,5
	Finalelongation	72°C	2,0

Tab. 11: PCR – Programm

Master Mix für PCR:

Master Mix mit Qiagen HotStarTaq DNA Polymerase	
	Einfachansatz (μl)
Wasser	17,9
Puffer MgCl_2 (10x)	3,0
5 x Q – Solution	6,0
MgCl_2 25 mM	
dNTP	0,6
Primer (100 μmol)	0,6
Primer (100 μmol)	0,6
Taq	0,3
Template	1,0
Summe	30,0

Tab. 12: PCR – Ansatz

Die Reaktionsfolge wird je nach Fragestellung und Menge an eingesetzter DNA 20 - 40 mal wiederholt. Das Reaktionsgemisch kann nach Beendigung der Reaktion auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert werden.

3.2.6 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode, um verschiedene Arten von Molekülen zu trennen. Dabei wird eine Mischung aus zu trennenden Molekülen durch elektrische Spannung (Elektrophorese) durch ein Gel getrennt, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt. Je nach Größe und Ladung der Moleküle wandern diese unterschiedlich schnell durch das Gel. Dabei wandern kleine, negativ geladene Moleküle am schnellsten in Richtung der positiv geladenen Anode.

Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um Desoxynucleinsäure (DNA)-Stränge nach ihrer Größe zu trennen und um ihre Größe durch Vergleich mit Strängen bekannter Größe zu bestimmen.

Man löst Agarose in Elektrophoresepuffer durch Erhitzen, gießt daraus mit Hilfe eines Kammes ein Gel mit Taschen, das man nach Erkalten in eine Elektrophoresekammer gibt, die DNA-Lösung in die Taschen pipettiert und Spannung anlegt. Ist die DNA ausreichend weit gelaufen, färbt man das Gel mit einem Farbstoff und betrachtet es unter UV-Licht.

Vorbereitung:

1. 2% -iges Gel

2 g Agarose in 100 ml 1 x TBE Puffer vorsichtig mischen, Agarose einige Minuten quellen lassen und in der Mikrowelle ca. 3 x aufkochen, bis das Gel klar ist

Gelgießtemperatur ca. 60°C

2. Kammer muss waagrecht stehen, d.h. evtl ausrichten

3. Schlitten und Kamm einsetzen

4. Gel vorsichtig in den Schlitten gießen – evtl. Luftblasen entfernen

5. Gel mindestens 45 min auspolymerisieren lassen

6. Schlitten mit dem Gel in die richtige Laufposition bringen

7. 1 x TBE Puffer in die Kammer geben (Gel vollständig mit Puffer bedecken)

8. Vorsichtig den Kamm ziehen

Probenauftrag:

1. 1 µl Probenpuffer 5 µl PCR Produkt zusammenpipetieren (abhängig von der Größe der Taschen und der Kammer) und gut mischen

2. Proben auftragen

3. Marker auftragen

4. Kammer schließen und an das Stromnetz anschließen. Laufrichtung beachten von minus nach plus

5. Nach Beendigung des Laufs Strom ausschalten, Gel vorsichtig aus der Kammer nehmen. Das Gel in eine bereitgestellte Färbelösung legen und 15 min schüttelnd inkubieren. Das Gel anschließend unter UV-Licht analysieren, photographieren.

3.2.7 Aufreinigung des PCR Produktes QIAquick™ PCR Purification Kit (Entfernung von Primer-, Polymerase-, dNTP- Resten)

Da für folgende Reaktionen ausschließlich reines DNA-Produkt verwendet werden konnte, war es im Anschluß an die PCR zunächst nötig, das gewonnene amplifizierte PCR-Produkt einem Reinigungsschritt zu unterziehen, um unerwünschte PCR-Reagenzien wie überschüssige dNTPs oder Primer zu entfernen.

Diese Aufreinigung wurde mit Hilfe des QIAquick™ PCR Purification Kit der Firma Qiagen durchgeführt.

Vorbereitung: Zum Wasch-Puffer PE Ethanol absolut zugeben.

1. Qiaquick Mini Columns mit Proben-Nummer beschriften
2. 1,5 ml Tubes mit Proben-Nummer beschriften
3. PCR Produkt mit 5 x Volumen Puffer PB mischen:
Verhältnis 1 : 5
4. PCR Produkt auf die Qiaquick Mini Columns (Säulen) pipettieren
5. Säulen 1 min zentrifugieren bei 10.000 U/min
6. Abfall (Zentrifugat) aus dem Collection Tube (der Säule) entfernen: Säule in ein neues Collection Tube überführen
7. 750 µl Waschpuffer PE auf die Säule pipettieren
8. Säulen 1 min zentrifugieren bei 13000 U/min
9. Waschpuffer entfernen und nochmal zentrifugieren 13000 U/m 1 min
10. Säule (Qiaquick Column) in das 1,5 ml Tube überführen
11. 5x µl Elutionspuffer (z.B bei Ausgangsvolumen 30 µl PCR Produkt und 150 µl Elutionspuffer) auf die Säule pipettieren
12. Zentrifugieren 1 min bei 13000 U/min

3.2.8 Cycle Sequenzierung

Das Prinzip der Cycle-Sequencing-Methode ist ähnlich dem der PCR: Anhand von DNA – Matrizen (hier PCR – Produkte) werden in einer zyklischen, enzymatischen Reaktion *in vitro* DNA Fragmente erzeugt.

Cycle Sequenzieren Bedingungen:

Zyklus	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
	Vor Denaturierung	95°C	0,5
30	Denaturierung	95°C	0,5
	Annealing	Abhängig vom Primer	0,5
	Elongation	55°C	4,0

Tab. 13: Cycle Sequenzier Programm

Master Mix für Cycle Sequenzierung:

	Einfachansatz (µl)
HPLC-H ₂ O	5,8
Terminator Ready Reaktion Mix	2,0
Primer 1 (100 µmol)	0,2
PCR Produkt	2,0
Summe	10,0

Tab. 14: Ansatz für Cycle Sequenzierung

In der heutigen, automatisierten DNA-Sequenzierung benutzt man ein modifiziertes Sanger-Verfahren, in dem zu einem Replikationsansatz geringe Mengen aller vier ddNTPs gegeben wird. Um spezifische Information über die jeweiligen Basen zu erhalten, sind die ddNTPs dabei mit nukleotidspezifischen Farbstoffen markiert, die im selben Frequenzbereich absorbieren, jedoch bei verschiedener Wellenlänge emittieren. Das erhaltene Gemisch wird über Elektrophorese getrennt, im oberen Drittel des Trenngels wird ein Laserstrahl mit der Anregungsfrequenz eingestrahlt. Die unterschiedlichen Kettenfragmente wandern also nach Kettenlänge geordnet durch den Strahl und emittieren Fluoreszenz des jeweiligen ddNTPs – Farbstoffs. Das Fluoreszenzsignal wird über einen optischen Aufbau ausgekoppelt und das

Spektrum in die Farbstoffanteile zerlegt. Die Intensitätsverläufe der vier Spektrallinien werden gegen die Laufzeit übereinander aufgetragen. Die Sequenz kann durch den Verlauf der jeweiligen Maxima bei den Emissionswellenlängen bestimmt werden.

3.2.9 Prinzip des benutzten Sequenziergerätes

Die Sequenzierung der amplifizierten DNA wurden mit Hilfe des ABI Prism 310 Genetik Analyzer durchgeführt. Dieses Gerät kann gleichzeitig über eine Kamera Fluoreszenz bei vier verschiedenen Wellenlängen erfassen, die den Emissionswellenlängen der verwendeten Farbterminatoren entsprechen. Die Reaktionsansätze laufen nur auf einer Spur. Das Gel wird mit einem Argonlaser beleuchtet. Passiert ein Fragment den Detektor, wird der spezifische Farbstoff durch den Laser angeregt und emittiert ein für ihn spezifisches Licht. Aus der jeweiligen Farbe kann auf die betreffende Base geschlossen werden. Verarbeitet werden die entstehenden Signale durch eine Computer-Software zu einem sogenannten Elektropherogramm.

3.2.10 Aufreinigung (Entfernung von Primer-, Terminator Ready Reaktion Mix-Resten) mit DyeEx™ Spin Kit Qiagen:

Wie auch im Anschluß an die PCR war es nun zunächst nötig, nicht eingebaute Nukleotide und andere überschüssige Reagentien zu entfernen.

Diese Aufreinigung wurde mit Hilfe des DyeEx™ Spin Kit der Firma Qiagen durchgeführt.

Aufreinigung:

1. Beschriftung von 1,5 ml Tubes
2. Collection Tubes in die Zentrifuge einstellen
3. Deckel und Endverschluß der DyeEx Spin Column entfernen
4. Spin Column in das Collection Tube stellen, dann 3 Minuten bei 3000-4000 U/min zentrifugieren. Vorbereitung zum Sequenzieren
5. Spin Column in 1,5 ml Tube überführen

6. Probe (10 µl Cycle-Sequenzierung-Produkt) im Zentrum der Spin Column ohne das Säulenmaterial zu beschädigen, auftragen
7. Zentrifugieren 3 Minuten bei 3000-4000 U/min

3.2.11 Vorbereitung zum Sequenzieren

1. 0,5 ml Sample Tube beschriften
2. 20 µl TSR (Template Supression Reagent) in das 0,5 ml Sample Tube pipettieren
3. 4 µl Template (aufgereinigtes Cycle-Sequencing-Produkt) dazu pipettieren (dabei Template und TSR gut mischen)
4. 0,5 ml Sample-Tube mit Deckel verschließen
5. Tube für 2 Minuten bei 90°C erhitzen (dabei kurz bei 700 U/m schütteln)
6. Die Proben in den ABI Prism 310 Genetic Analyzer stellen

3.3 Etablierung eines Bestätigungsassays für neue Mutationen

Neu identifizierte Mutationen werden mit Hilfe eines zweiten Assays, der Analyse von Restriktionsfragmenten-Ploymorphismen (RFLP) oder einer allelspezifischen PCR bestätigt.

3.3.1 Analyse von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP)

Die Ende der sechziger Jahre von Werner Arber, Hamilton Smith und Daniel Nathans entdeckten Restriktionsenzyme oder Restriktionsendonukleasen sind Enzyme aus Prokaryonten, die spezifische Basensequenzen, meist in Form eines Pallindroms, in einer DNA-Doppelhelix erkennen und beide Stränge an einer bestimmten Stelle schneiden. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme kann man DNA-Moleküle in spezifische Fragmente spalten. Die Länge der entstandenen Fragmente, angegeben in Kilobasen (kb), werden getrennt durch Gel-Elektrophorese. Sie kann z.B. durch mutationsbedingte neu entstandene oder auch weggefallene Restriktionsstellen

variieren (Längenpolymorphismus) und macht demzufolge Aussagen über das Vorliegen heterozygoter oder homozygoter Polymorphismen oder Mutationen.

Restriktionsenzym MspI

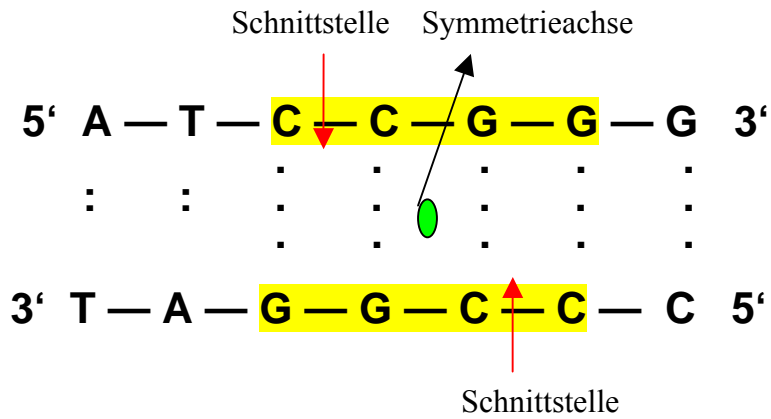


Abb. 5. a) Darstellung der von dem Restriktionsenzym MspI erkannten Basenpaarsequenz. Für die gelb unterlegte Sequenz spaltet MspI an der markierten Stelle spezifisch. Dargestellt ist weiterhin die erwähnte Symmetrieachse in Form eines Pallindroms (grün) (modifiziert nach Stryer, 1996).

Restriktionsenzym Tsp509I

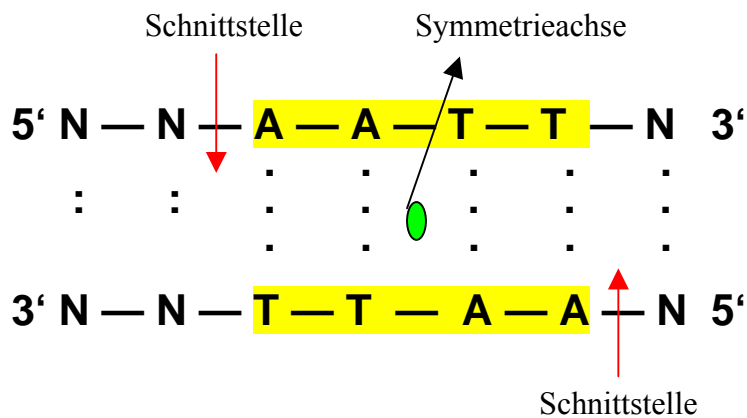


Abb. 5. b) Darstellung der von dem Restriktionsenzym Tsp509I erkannten Basenpaarsequenz. Für die gelb unterlegte Sequenz spaltet Tsp509I an der markierten Stelle spezifisch. Dargestellt ist weiterhin die erwähnte Symmetrieachse in Form eines Pallindroms (grün) (modifiziert nach Stryer, 1996).

3.3.2 Allelspezifische PCR

Die allelspezifische PCR ist dadurch charakterisiert, daß man eine durch Mutation veränderte Nukleotidsequenz als Primer für die nachfolgende PCR nutzt, welche nur das Allel amplifiziert, welches die Mutation aufweist, das gesunde Allel jedoch nicht. In einem zweiten Reaktionsansatz verwendet man ein Primerpaar, welches die normale Nukleotidsequenz, also die Sequenz des Wildtyps, aufweist und welche nur das Allel amplifiziert, welches die Mutation nicht trägt.

Daraus ergaben sich zwei Reaktionsansätze mit dem Primerpaar der Mutation auf der einen, des Wildtyps auf der anderen Seite. Jeder der beiden Reaktionsansätze wurde nun in getrennten Ansätzen mit der DNA des Wildtypes und der DNA des von der Mutation betroffenen Patienten vermischt und die PCR wurde unter den gleichen Bedingungen wie schon beschrieben im Thermocycler durchgeführt. Anschließend wurde das PCR-Produkt in dem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Mutation	Primer Wildtyp	Größe PCR-Produkt	Primer Mutation	Größe PCR-Produkt	Annealing-Temperatur
C195Y	Forward: cactccagctggccgctgt Reverse: tcatggtggccataggatc	304 Bp	Forward: ccactccagctggcgctat Reverse: tccaataagctaacagcaacca	343 Bp	63°

Tab. 16: Neu identifizierte Mutation, die durch allelspezifische PCR bestätigt wurde. Angegeben sind die Mutationen mit den jeweiligen Sequenzen für die forward- und reverse-Primer des Wildtyps und der Mutationen, die jeweilige Größe des resultierenden PCR-Produkts und die Annealingtemperatur für die betroffene Mutation.

Master Mix Allelspezifische PCR:

Master Mix mit Qiagen HotStarTaq DNA Polymerase	
	Einfachansatz (µl)
Wasser	17,9
Puffer MgCl ₂ (10x)	3,0
5 x Q – Solution	6,0
MgCl ₂ 25mM	
dNTP	0,6
Primer (100 µmol)	0,6
Primer (100 µmol)	0,6
Taq	0,3
Template	1,0
Summe	30,0

Tab. 17: PCR – Ansatz

3.3.2 Restriktionsenzymanalyse (ApoB-3500) und (ApoB-3531)

Die Mutationsdetektion des Aminosäureaustausches von Arginin 3500 durch Glutamin bei FDB-Patienten erfolgte durch den entstehenden bekannten Polymorphismus, der nach Verdau mit *MspI* nachweisbar ist.

Im einzelnen erfolgte die Analyse durch eine primer-induzierte Spaltstelle. Dazu wurde für die PCR mit der genomischen DNA ein Primer verwendet, der kurz vor der Mutation bindet, zu Template DNA allerdings nicht exakt komplementär ist. Es werden somit von der ursprünglichen DNA abweichende Kopien generiert, deren Sequenz aber in Verbindung mit der Mutation entweder eine neue Spaltstelle ergibt oder eine vorhandene wegfällen läßt. In diesem Fall wird beim Fehlen einer Mutation eine Spaltstelle für die Restriktionsendonuklease *MspI* erzeugt. Es entsteht ein 120 Bp großes Spaltfragment. Besitzt der Patient die Mutation, so entsteht die Spaltstelle nicht, und auf dem Gel erscheint das unveränderte, 149 bp große Produkt.

Die Mutationsdetektion des Aminosäureaustausches von Arginin durch Cystein an Position 3531 bei FDB-Patienten erfolgte ebenfalls mittels Verdau des PCR-Produktes mit einer Restriktionsendonuklease, mit *NsiI*. Die Größe des PCR-Produktes betrug 1371 Bp. Beim Vorhandensein einer Mutation entstand eine

Spaltstelle für die Restriktionsendonuklease *Nsi*I, und das PCR-Produkt wurde in 2 Fragmente gespalten, deren Größen 1030 Bp und 341 Bp betragen.

Basenpaar	AT	Sense-Primer	Antisense-Primer
ApoB 382 bp	55°C	GGAGCAGTTGACCAC AAGCTTAGC	GGTGGCTTTGCTTGT ATGTTCTCC

Tab. 18: ApoB-Primersequenzen und Annealingtemperaturen

PCR-Bedingungen:

Zyklus	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
	Vor Denaturierung	95°C	10,0
30	Denaturierung	94°C	1,0
	Annealing	55°C	1,0
	Elongation	72°C	1,5
	Finalelongation	72°C	2,0

Tab. 19: ApoB PCR Programm

Die PCR-Bedingungen und Ansätze für ApoB gleichen denen des LDL-Rezeptors. Der Master Mix für die PCR von ApoB entspricht den für die LDLR Sequenzierung verwendeten PCR-Bedingungen.

Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben. Ein U entspricht der Menge an Restriktionsenzym, die benötigt wird, um 1 µg Lambda-DNA in einer Stunde zu spalten. Um sicherzustellen, daß der Verdau quantitativ abläuft, wurde die Enzymmenge und die Inkubationszeit verdoppelt.

Master Mix für Restriktionsverdau *MspI* (ApoB 3500):

<i>MspI</i> (ApoB 3500)	
	Einfachansatz (µl)
Wasser	16,75
Puffer (10x)	2,5
Enzym	0,75
PCR Produkt	5,0
Summe	25,0

Tab. 20: *ApoB 3500 Verdau Ansatz*

Master Mix für Restriktionsverdau *NsiI* (ApoB 3531):

<i>NsiI</i> (ApoB 3531)	
	Einfachansatz (µl)
Wasser	16,00
Puffer (10x)	2,5
Enzym	1,5
PCR Produkt	5,0
Summe	25,0

Tab. 21: *ApoB 3531 Verdau Ansatz*

Verdau dauert 16 Stunden bei 37°, danach wurde die Fragmente im 2%-igen Agarose-Gel analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Patienten

Patienten mit einer Hyperlipidämie wurden für eine detaillierte Charakterisierung und eine intensive Therapie an die Lipid-Kliniken in Berlin oder Athen verwiesen. Der Rekrutierungszeitraum für diese Arbeit bezog sich auf die Jahre 2001-2004. Die Patienten waren untereinander nicht verwandt. Die biochemischen Kriterien für die genetische Charakterisierung waren erhöhtes Gesamtcholesterin (>290 mg/dl), erhöhtes LDL Cholesterin (>200 mg/dl) sowie normale Trygliceridwerte (<175 mg/dl). Klinisches Einschlußkriterium war eine schwere Hypercholesterinämie bei Verwandten ersten Grades. Die meisten Krankheitsgeschichten beinhalteten eine KHK. Sehnenxanthome traten in einigen Familien auf. Sehnenxanthome und kardiovaskuläre Vorfälle lagen jedoch nicht bei allen FH-Patienten vor. Daher haben wir sie nicht als Einschlußkriterien verwendet. Sekundäre Ursachen für Hypercholesterinämie wie z.B. Hypothyroidismus, Diabetes und Nieren- oder Leberkrankheiten waren ebenfalls nicht vorhanden.

4.2 Klinische Parameter

Um möglichst alle LDL-Rezeptor Mutationen zu identifizieren wurden alle Exone und Exon/Intronübergänge des LDLR Gens mittels DGGE untersucht und auffällige Bandenmuster mittels direkter Sequenzierung analysiert. Die biochemischen und klinischen Parameter der untersuchten Patientengruppen sind in Tabelle 23 dargestellt.

Biochemische und klinische Parameter der untersuchten FH Patienten

(Mittelwert \pm SD)

	Deutsche Patienten	Griechische Patienten
N (total)	100	100
Altersdurchschnitt	18-69	18-65
Geschlecht, männlich/weiblich	32/68	54/46
Bluthochdruck	21	12
Koronare Herzerkrankungen	25	18
Diabetes mellitus Typ II	-	3
Xanthome	10	12
Raucher (früher)	17	9
Raucher (aktuell)	14	23
BMI (kg/m ²)	26,3 \pm 5,2	25 \pm 4,4
Total Cholesterin, mg/dL	334,5 \pm 92,5	353,5 \pm 86,5
LDL Cholesterin, mg/dL	261,7 \pm 89,5	280,7 \pm 83,1
HDL Cholesterin, mg/dL	44,2 \pm 13,4	45,4 \pm 11,4
Triglyzeride, mg/dL	144,7 \pm 68,7	125,4 \pm 61,3
ApoA-I, mg/dL	Nicht verfügbar	144,4 \pm 23,6
ApoB, mg/dL	198,5 \pm 49,4	206,2 \pm 54,7
Lp(a)	58,6 \pm 54,2	Nicht verfügbar

Tab. 22: Biochemische und klinische Parameter der untersuchten FH Patienten

4.3 Mutationsscreening in der deutschen Patientengruppe

Nach dem Screening von 100 Patienten mit klinischer Diagnose einer FH konnten wir bei 37 Patienten Mutationen identifizieren. Zwei Patienten waren heterozygot für die ApoB-3500 Mutation, alle weiteren Mutationen betrafen das LDLR Gen (Tabelle 23 Übersicht alle Mutationen, Abbildung PCR ApoB positiv).

Insgesamt identifizierten wir eine homozygote Mutation in der Promotorregion, 25 Missense Mutationen (p.C95S [C74S], p.C109R [C88R], p.C143Y [C122Y], p.C155G [C134G], p.C216Y [C195Y], p.Q254P [Q233P], p.D266N [D245N], p.C329Y [C308Y], p.A391T [A370T], p.E408K [E387K], p.R416W [R395W], p.V429M [V408M], p.V523M [V502M], p.G549D [G528D], p.G592E [G571E], p.A606S [A585S], p.V653F [V632F], p.P685L [P664L], p.C711S [C690S]), 3 Nonsense Mutationen (p.C167X [C146X], p.W305X [W284X], p.E317X [E296X]), 3 Deletionen bzw. Insertionen (c.661_662insCCCCG, c.680_681delAC,

c.680_681insGGACAAATCTGA) und 3 Splice Site Mutationen (c.313+1G>A, c.313+1G>C, c.313+2T>C).

Der überwiegende Anteil der gefundenen Mutationen ist in der Literatur bereits bekannt (Ebhardt et al., 1999; Nauck et al., 2001 Genschel et al., 2001; Dedoussis et al., 2001, 2004). Drei der gefundenen Mutationen sind jedoch noch nicht in der Literatur beschrieben.

Eine Übersicht über alle gefundenen Mutationen in der deutschen Patientengruppe ist in Tabelle 23 zusammengefasst.

Übersicht über die Mutationen im LDL-Rezeptor und im Apolipoprotein B-100 Gen in der deutschen Patientengruppe

Exon	Nukleotid- austausch	Aminosäure- austausch	Aminosäure- austausch ⁺	Restriktions- enzym	Referenz	Anzahl der Patienten
Missense Mutationen						
Promotor	c.1-156 C>T (-63 C>T) homozygot			<i>Tsp509I</i>	Neu	1
3	c.283 T>C	p.C95S	[C74S]		Deutschland	1
4	c.325 T>C	p.C109R	[C88R]		Deutschland	2
4	c.428 G>A	p.C143Y	[C122Y]	<i>Aci I+</i>	Deutschland	1
4	c.463 T>G	p. C155G	[C134G]		Dänemark	1
4	c.647 G>A	p.C216Y	[C195Y]	<i>Nein</i>	Neu	1
5	c.761 A>C	p.Q254P	[Q233P]		Italien	1
5	c.796 G>A	p.D266N	[D245N]		Dänemark	1
8	c.1171 G>A	p.A391T	[A370T]		Afrika	4
7	c.986 G>A	p.C329Y	[C308Y]		Süd Afrika	2
9	c.1222 G>A	p.E408K	[E387K]		Amerika, Frankreich, Algerien	1
9	c.1246 C>T	p.R416W	[R395W]		Norwegen	1
9	c.1285 G>A	p.V429M	[V408M]	<i>Nla III+</i>	Griechenland	1
10	c.1567 G>A	p.V523M	[V502M]		Dänemark	1
11	c.1646 G>A	p.G549D	[G528D]		Griechenland	1
12	c.1775 G>A	p.G592E	[G571E]		Italien	1
12	c.1816 G>S	p.A606S	[A585S]		England	1
13	c.1957 G>T	p.V653F	[V632F]	<i>Nein</i>	Neu	1
14	c.2054 C>T	p.V685L	[P664L]		England	2
14	c.2131 T>A	p.C711S	[C690S]	<i>Nein</i>		1

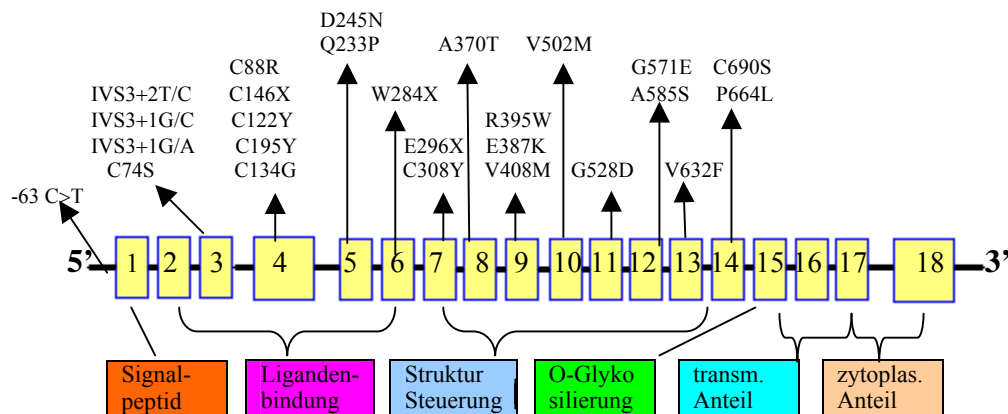
Nonsense Mutationen

4	c.501 C>A	p.C167X	[C146X]		Österreich, England	1
6	c.915 G>A	p.W305X	[W284X]		Finnland	1
7	c.949 G>A	p.E317X	[E296X]	<i>BsmI</i> -	Deutschland	1
Apo B Gen						
26	c.10499 G>A	p.R3500Q		<i>NotI</i>	Amerika	2
Splice Site Mutationen						
IVS3	c.313+1G>C				Holland, Spanien	1
IVS3	c.313+1 G>A			<i>Msl I</i> +	Norwegen	2
IVS3	c.313+2 T>C			<i>MwoI</i> +	Dänemark	1
Frameshift Mutationen						
4	c.661_662 ins CCCC	Vorzeitiges Stopkodon			Deutschland	1
4	c.680_681 del AC	Vorzeitiges Stopkodon			England	1
4	c.680_681ins GGACAAA TCTGA	Vorzeitiges Stopkodon			Deutschland	1

[†]ältere Mutationsnomenklatur nach Yamamoto entsprechend UMD-LDLR Database (www.umd.necker.fr.). Neue Mutationen sind in Fettdruck dargestellt.

Tab. 23: Übersicht über die Mutationen im LDL-Rezeptor und im Apolipoprotein B-100 Gen in der deutschen Patientengruppe.

Lokalisation der Mutationen (Deutschland)



ältere Mutationsnomenklatur nach Yamamoto entsprechend UMD-LDLR Database (www.umd.necker.fr).

Abb. 5: Darstellung der identifizierten Mutationen aus der Deutschen Patientengruppe und ihre Lokalisation bezüglich funktionellen Domänen des LDL-Rezeptor Gens.

4.4 Genetische und klinische Charakterisierung der neu identifizierten Mutationen aus der deutschen Patientengruppe

1999 stellte sich eine 44 Jahre alte Frau, die zwar in Deutschland geboren, jedoch jordanischer Abstammung war, mit schwerer KHK in der Abteilung vor. Anamnestisch ergab sich, dass sie sich 1984, im Alter von 26 Jahren, einer Bypass-Operation unterziehen musste. Die Familienanamnese für KHK war positiv und ihre Lipidwerte waren erhöht, obwohl sie bereits mit Atorvastatin 60 mg pro Tag behandelt wurde. Ihr Vater starb im Alter von 48 Jahren an einem Myokardinfarkt und ihre Mutter mit 40 Jahren am plötzlichen Herztod. Beide waren blutsverwandter Herkunft. Aufgrund des Krankheitsverlaufes der Patientin und ihren Lipidwerten in Kombination mit Xanthomen an den Achillessehnen und periorbitalen Xanthelasmen, wurde zunächst die Diagnose einer Familiären Hypercholesterinämie gestellt, die später durch die Entdeckung einer neuen homozygoten LDLR Basensubstitution genetisch bestätigt wurde (homozygote c.1-156C>T Mutation im Promotor des LDL-Rezeptors). Im Frühjahr 2002 verstarb die Patientin im Alter von 46 Jahren am plötzlichen Herztod. Die Patientin, bei der diese Mutation gefunden wurde, hatte

einen Gesamt-Cholesterinwert von 439 mg/dl, Triglyceride mit 99 mg/dl im Normbereich, LDL-Cholesterin mit 377 mg/dl deutlich erhöht, HDL-Cholesterin mit 43 mg/dl erniedrigt. Ihr ApoB-Wert (245 mg/dl) lag um mehr als das Doppelte über dem Normbereich (40-115 mg/dl) und der Lipoprotein-(a)-Wert (31 mg/dl) lag knapp über dem Normbereich (<30 mg/dl). Als Genotyp hatte die Patientin ApoE 3/3.

Die Patientin hatte 8 Geschwister, von denen 7 ebenfalls klinisch an einer Familiären Hypercholesterinämie leiden. Wir konnten Blutproben von 2 der Geschwister erhalten, wovon der eine ein 34-jähriger, gesunder Bruder mit normolipämischen Werten war (negativ getestet für die c.1-156C>T Mutation). Bei dem anderen handelte es sich um einen 38-jährigen Bruder mit klinisch heterozygoter Familiärer Hypercholesterinämie und frühzeitiger atherosklerotischer Veränderung der Karotiden, der jedoch keine Anzeichen für Xanthome oder einen Arcus lipoides hatte und sich als heterozygot für die c.1-156C>T (-63C>T) Mutation herausstellte.

Diese erste der drei neuen Mutationen ist eine homozygote Basensubstitution (c.1-156C>T) im Repeat 2 in der Promotorregion des LDL-Rezeptor Gens. Die Mutation wurde zunächst per DGGE detektiert, per Sequenzierung identifiziert und mittels Restriktionsverdau mit Tsp509I bestätigt (Abbildung 6. a, b, c).

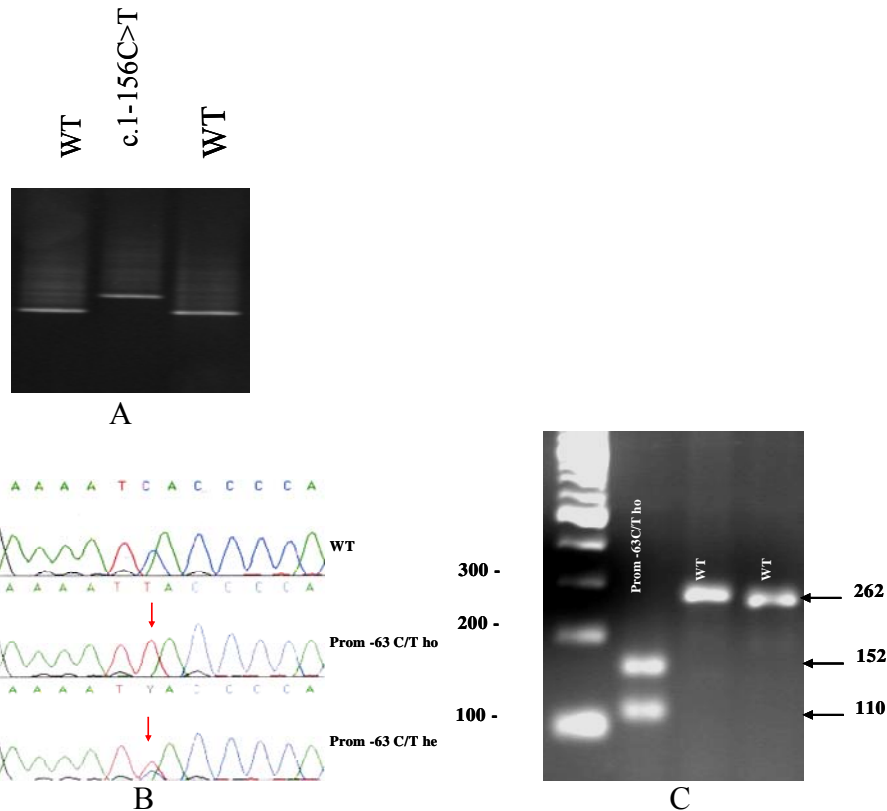


Abb. 6:

a) DGGE Elektrophorese der Promotorregion des LDL-Rezeptors. Bahn 1 und 3 zeigen PCR Produkte von normalen Proben, Bahn 2 zeigt das PCR Produkt eines Patienten mit der c.1-156 C>T (-63C>T) Mutation.

b) Sequenzdarstellung der c.1-156 C>T (-63C>T) Mutation, die obere Reihe zeigt eine Wildtyp-Sequenz, darunter ist eine Sequenz mit einer homozygoten c.1-156 C>T (-63C>T) Mutation dargestellt und darunter eine heterozygote Variante.

c) Die c.1-156 C>T (-63C>T) Mutation innerhalb Region 2 des LDLR-Promotors wurde durch einen Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym Tsp509I bestätigt. Die Mutation führt zu einer zusätzlichen Schnittstelle für das Enzym Tsp509I, so dass das ursprüngliche 262 bp PCR Produkt bei Anwesenheit der Mutation in zwei Fragmente (152 bp und 110 bp) gespalten wird.

Eine andere neue Mutation c.647G>A (p.C216Y [C195Y],) wurde bei einem 53 Jahre alten männlichen Patienten identifiziert, der sich mit klinisch heterozygoter FH und schwerer KHK vorstellte. Xanthome wurden nicht gefunden. Im Alter von 52 Jahren erhielt auch dieser Patient eine Bypass-Operation. Unter der Behandlung mit Statinen, erfolgte eine effektive Senkung der Serumkonzentration von LDL-Cholesterin, ohne jedoch den Zielwert zu erreichen (<100 mg/dl). Dieser Patient, bei der diese Mutation gefunden wurde, hatte einen Gesamt-Cholesterinwert von 430 mg/dl, der mehr als das Doppelte vom Normwert (200 mg/dl) betrug. Sein Triglyceridwert (128 mg/dl) war

unterhalb des Normbereichs (>200 mg/dl), der LDL-Cholesterinwert (360 mg/dl) lag um mehr als Doppelte über der Normgrenze (<135 mg/dl), der HDL-Cholesterinwert lag mit (39 mg/dl) unterhalb des Normbereiches (>55 mg/dl), der Lipoprotein (a)-Wert (23 mg/dl) lag unterhalb der Normgrenze (<30 mg/dl) und ApoE Genotyp war E 3/3.

Eine seiner 2 Schwestern (geboren 1954) stellte sich mit schwerer Hypercholesterinämie und klinischen Symptomen einer KHK vor, doch es gelang nicht, eine Blutprobe für die weitere Analyse von ihr zu erhalten. Die Lipidprofile der Eltern konnten ebenfalls nicht in Erfahrung gebracht werden. Überraschenderweise hatte jedoch keines der Elternteile klinische Zeichen einer koronaren Herzkrankheit. Der Patient hat zwei Kinder, von denen eines an schwerer Hypercholesterinämie leidet, ohne jedoch Xanthome, einen Arcus lipoides oder koronare Herzkrankheit aufzuweisen. Die Tochter wurde heterozygot für die p.C216Y [C195Y] Mutation diagnostiziert, wohingegen ihr Bruder seine Zustimmung zur Durchführung weiterer genetischer Analysen verweigerte.

Bei dieser zweiten, neu identifizierten Mutation handelt es sich um eine c.647G>A Basensubstitution, die mittels allelspezifischer PCR verifiziert wurde (Abb. 7). Der Nukleotidaustausch resultiert in der Aminosäuresequenz in einer Substitution der Aminosäure Cystein durch Tyrosin im Kodon 216 (p.C216Y [C195Y]) in der liganden-bindenden Domäne des LDL-Rezeptors.

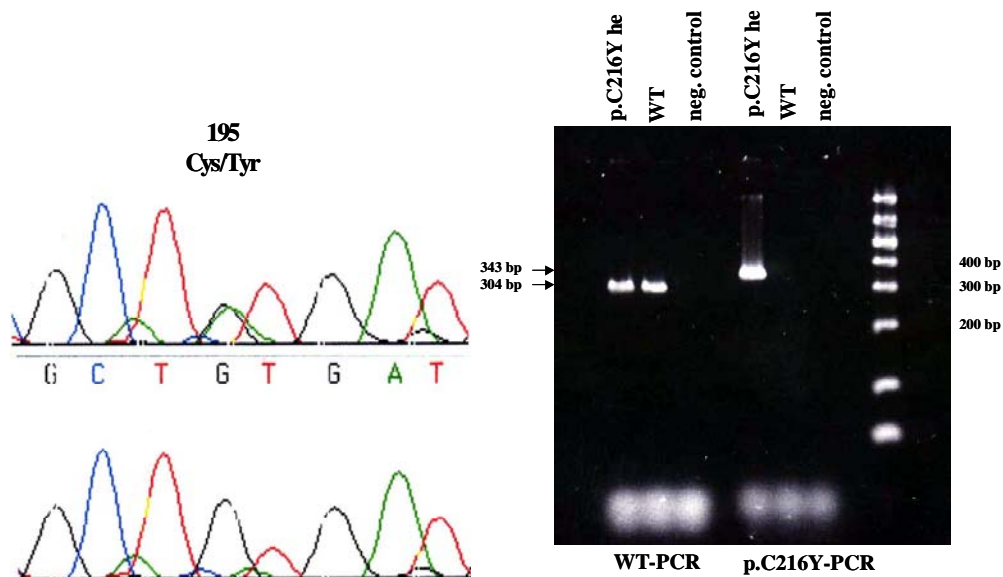


Abb. 7:

Die heterozygote Missense Mutation *c.647G>A* resultiert in einem Austausch im Kodon 216 [195] (Cys (TGT) zu Tyr (TAT)). Zur Bestätigung dieser neuen Mutation wurde eine allelspezifische PCR etabliert. Die Amplifikation wurde mit dem Wildtyp-spezifischen forward Primer 5'-CACTCCAGCTGGCGCTGT-3' und dem reverse Primer 5'-TCATGGTGGCCATATGGATG-3' bzw. mit dem Mutations-spezifischen forward Primer 5'-CCACTCCAGCTGGCGCTAT-3' und dem reversed Primer 5'-TCCCAATAAGCTAACAGCAACCA-3, bei einer Annealingtemperatur von 63°C durchgeführt.

Eine dritte neue Mutation *c.1957G>T* (p.V653F [V632F]) wurde bei einer 53-jährigen adipösen (BMI: 34,8) Patientin gefunden. Die Patientin war zusätzlich compound heterozygot für die p.A391T [A370T] Mutation. Sie stellte sich mit tuberösen Xanthomen, KHK und stark erhöhten Lipidwerten vor. Daraufhin wurde eine Therapie mit hohen Dosen Atorvastatin (80 mg/Tag) begonnen, was zu einer Reduktion der LDL-Cholesterinwerte auf 145 mg/dL führte. Die Patientin, bei der diese Mutation gefunden wurde, hatte einen Gesamt-Cholesterinwert von 432 mg/dl, der mehr als das Doppelte vom Normwert (200 mg/dl) betrug. Ihr Triglyceridwert (59 mg/dl) war unterhalb des Normbereiches (>200 mg/dl), der LDL-Cholesterinwert (349 mg/dl) lag um mehr als das Doppelte über der Normgrenze (<135 mg/dl), der HDL-Cholesterinwert lag mit (71 mg/dl) im Normbereich (>65 mg/dl bei Frauen). Der ApoE Genotyp war 3/2.

Die Familienanamnese ergab mehrere Fälle einer frühzeitigen KHK, zerebrovaskuläre Erkrankungen und schwere Hypercholesterinämie. Ihr Vater starb mit 52 und ihr

Bruder mit 49 Jahren, beide an einem Myokardinfarkt. Außerdem hatte ihr Bruder mehrere Schlaganfälle erlitten. Eine Schwester und eine Tochter wurde ebenfalls mit FH diagnostiziert. Ihre 67-jährige Schwester stellte sich mit Plaques in den Karotiden vor und unter Therapie mit 20 mg Atorvastatin erhielten wir folgende Lipoproteinparameter (in mg/dl): TC 201, TG 113, LDL-Chol 117, HDL-Chol 61, Lp (a) 126. Ihr ApoE Genotyp war 3/3. Interessanterweise war sie negativ für die p.V653F [V632F] Mutation, aber heterozygot für die p.A391T [A370T] Mutation. Die 32 Jahre alte Tochter der Indexpatientin war zwar klinisch noch nicht auffällig geworden, hatte jedoch eine Hypercholesterinämie. Die genetische Analyse zeigte, dass sie heterozygot für p.V653F [V632F] aber negativ für p.A391T [A370T] war. Somit wird deutlich, dass die p.V653F [V632F] Mutation ursächlich für eine Hypercholesterinämie ist, die Rolle der p.A391T [A370T] Mutation jedoch noch weiter geklärt werden muss. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine genetische Variation in der kaukasischen Bevölkerung (Gudnason et al., 1995). Keiner der drei Patienten wies für eine kardiovaskuläre Erkrankung zusätzliche Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Diabetes oder Nikotinabusus auf. Bei dieser dritten neuen Mutation handelt es sich um einen Basenaustausch (c.1957G>T), der in der Aminosäuresequenz im Kodon 653 zu einem Austausch der Aminosäuren Valin gegen Phenylalanin führt (p.V653F [V632F]). Das Kodon 653 befindet sich im Bereich der EGF Präkursor homologen Region des LDL-Rezeptors.

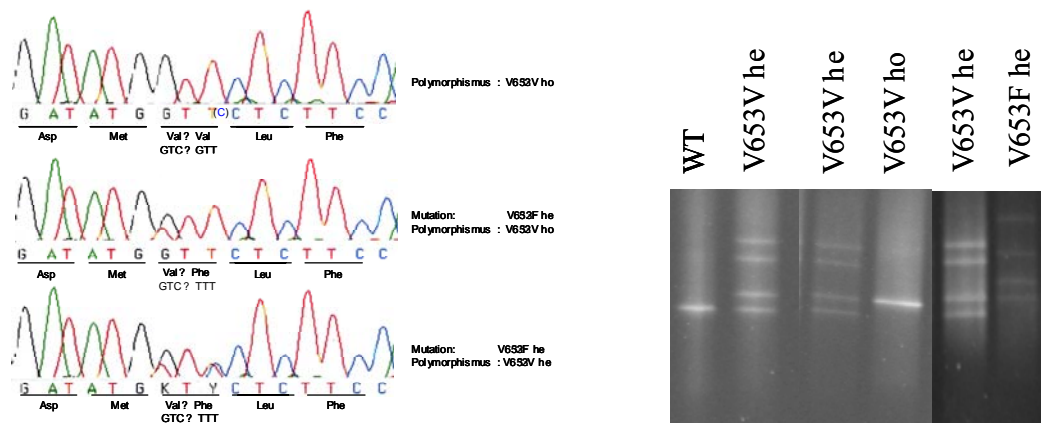


Abb. 8:

Die heterozygote Missense Mutation *c.1957 G>T* (*p.V653F [V632F]*) resultiert im Austausch der Aminosäure Valin gegen Phenylalanin. Im selben Kodon findet sich auch ein recht häufig vorkommender Polymorphismus (*c.1959C>T*, *GTC→GTT*), der mit der Mutation cosegregiert.

In der DGGE sind die Banden für den Wildtyp, den heterozygoten und homozygoten (*p.V653V [V632V]*) Polymorphismus und die heterozygote (*p.V653F [V632F]*) Mutation dargestellt.

4.5 Mutationsscreening in der griechischen Patientengruppe

Analog zum Vorgehen in der deutschen Patientengruppe wurden ebenfalls 100 griechische Patienten mit der klinischen Diagnose einer FH untersucht. Dabei konnten in 47 Patienten Mutationen identifiziert werden. In dieser Gruppe wurden insgesamt 10 Missense Mutationen; 2 Nonsense Mutationen und 3 Splice Site Mutationen gefunden. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 24 dargestellt. Vier der identifizierten Missense Mutationen (*p.Q254P [Q233P]*, *p.Q384P [Q363P]*, *p.D386E [D365E]* und *p.R744Q [R723Q]*) und die beiden Nonsense Mutationen (*p.Q384X [Q363X]* und *p.C681X [C660X]*) wurden hier erstmals für eine griechische Population beschrieben.

Die Splice Site Mutation *c.1060+10C>G* wurde bislang noch nicht in der Literatur beschrieben.

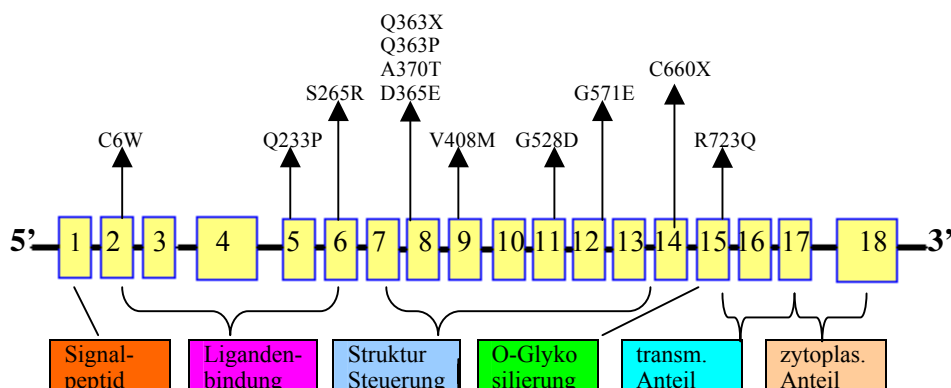
Übersicht über die Mutationen im LDL-Rezeptor und im Apolipoprotein B-100 Gen in der griechischen Patientengruppe

Exon	Nukleotid- austausch	Aminosäure- austausch	Aminosäure- austausch ⁺	Restriktions- enzym	Referenz	Anzahl der Patiente n
Missense Mutationen						
2	c.81 T>G	p.C27W	[C6W]		Amerika	6
5	c.761 A>C	p.Q254P	[Q233P]		Italien	1
6	c.858 C>A	p.S286R	[S265R]		Griechenland	4
8	c.1151 A>G	p.Q384P	[Q363P]		Dänemark	1
8	c.1158 C>G	p.D386E	[D365E]		Zypern	2
8	c.1171 G>A	p.A391T	[A370T]		Afrika	4
9	c.1285 G>A	p.V429M	[V408M]	<i>NlaIII+</i>	Afrika	15
11	c.1646 G>A	p.G549D	[G528D]		Italien	2
12	c.1775 G>A	p.G592E	[G571E]		Italien	2
15	c.2231 G>A	p.R744Q	[R723Q]		England	1
Nonsense Mutationen						
8	c.1150 C>T	p.Q384X	[Q363X]		Zypern	2
14	c.2043 T>A	p.C681X	[C660X]	<i>HinfI+</i>	Libanon	1
Splice Site Mutationen						
IVS7	c.1060+10 C>G				Neu	1
IVS11	c.1587-10 G>A				Spanien	1
IVS14	c.2140+5 G>A				England	4

⁺ältere Mutationsnomenklatur nach Yamamoto entsprechend UMD-LDLR Database (www.umd.necker.fr.). Neue Mutationen sind in Fettdruck dargestellt.

Tab. 24: Übersicht über die Mutationen im LDL-Rezeptor und im Apolipoprotein B-100 Gen in der griechischen Patientengruppe.

Lokalisation der Mutationen (Griechenland)



ältere Mutationsnomenklatur nach Yamamoto entsprechend UMD-LDLR Database (www.umd.necker.fr).

Abb. 9: Darstellung der identifizierten Mutationen aus der griechischen Patientengruppe und ihre Lokalisation bezüglich funktioneller Domänen des LDL-Rezeptor Gens.

4.6 Fallbericht von einem Patienten aus Griechenland mit einer neuen LDLR Splice Site Mutation

Eine mögliche neue Splice Mutation c.1060+10C>G wurde bei einem 69 Jahre alten griechischen Patienten von der Insel Aegina gefunden. Der Patient war zusätzlich heterozygot für die Doppelmutationen p.Q384X [Q363X] und p.D386E [D365E], die auch schon bei griechischen Patienten von Zypern gefunden wurden (Xenophon et al., 2000). Stammbaumanalysen zeigten, dass die Splice Mutation in-trans mit der Missense und der Nonsense Mutation vererbt wurde. Der Patient stellte sich mit schwerer Hypercholesterinämie ohne KHK vor. Xanthome wurden nicht festgestellt. Mit Atorvastatin 40 mg/Tag wurde er mit einer hohen Dosis eines Statins behandelt, was die LDL-Cholesterinwerte auf 175 mg/dL reduzierte. Der Patient starb im Frühjahr 2003 im Alter von 71 Jahren am plötzlichen Herztod. Dieser Patient hatte einen Gesamt-Cholesterinwert von 350 mg/dl, der das 1,5-fache vom Normwert (200 mg/dl) darstellt. Sein Triglyceridwert war mit 147 mg/dl im Normbereich (<200 mg/dl), der LDL-Cholesterinwert (274 mg/dl) lag 2-fach über dem Normbereich

(<135 mg/dl) und der HDL-Cholesterinwert lag mit (47 mg/dl) unterhalb der Normgrenze.

Bei seiner Tochter wurde ebenfalls die p.Q384X [Q363X], p.D386E [D365E] Doppelmutation gefunden, sie ist jedoch nicht Trägerin der Splice Mutation. Ihr Lipidprofil war im Vergleich zu dem ihres Vaters weniger stark verändert. Xanthome wurden auch bei ihr nicht gefunden. Der Bruder des Patienten war ebenfalls heterozygot für die Doppelmutation und auch er hatte keine Xanthome.

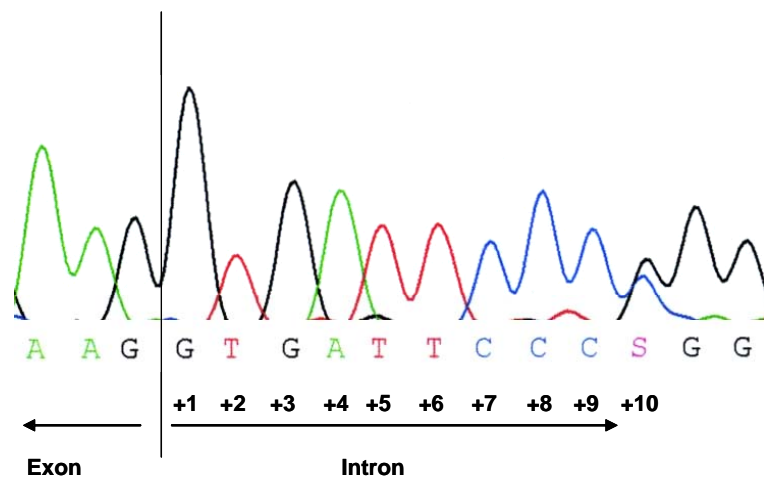
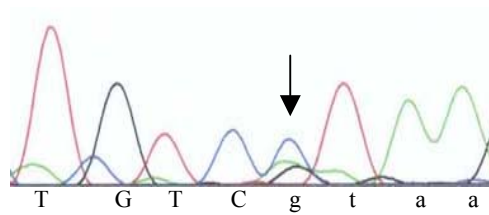


Abb. 10: Sequenzdarstellung der heterozygoten *IVS7+10G>C* (*c.1069G>C*) Mutation. Die Mutation befindet sich 10 Basen nach der 3'Splice Stelle des Exon 7 und hat möglicherweise ein verändertes Spliceverhalten zur Folge.

4.7 LDL-Rezeptor Mutationen in Deutschland und Griechenland

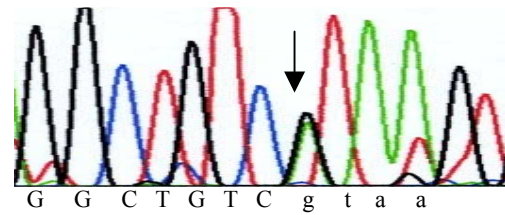
Eine Anzahl von Studien (Schuster et al., 1995; Thiart et al., 1998; Ebhardt et al., 1999; Bochmann et al., 2001; Genschel et al., 2001; Dedoussis et al., 2004) beschrieben unterschiedliche LDLR Mutationen in der deutschen FH-Population. Bis jetzt sind ca. 80 Mutationen entdeckt worden. Von diesen sind 51 Missense-Mutationen, 7 sind Nonsense-Mutationen, 17 sind kleine Deletion bzw. Insertionen, 5 sind in-frame-Mutationen und 4 sind Splice-Site-Mutationen. In Deutschland sind die am meisten vorkommenden Mutationen c.798T>A p.D266E [D266E] in Exon 5 (3,7%), c.682G>T p.E228X [E207X] in Exon 4 (3,1%) und c.313+1 G>A, c.313+1 G>C in Intron 3 (3,1%).

IVS3+1G/C



A.

IVS 3 +1 G/A



B.

Abb. 11:

a) Elektropherogramm der Splice-Site-Mutation IVS3+1 G/C am Übergang Exon 3 – Intron 1. Der Pfeil markiert die Nukleotidposition 313+ 1 G>C und den heterozygoten Nukleotidaustausch Guanin (schwarz) > Adenin (grün).

b) Elektropherogramm der Splice-Site-Mutation IVS3+1 G/A am Übergang Exon 3 – Intron 1. Der Pfeil markiert die Nukleotidposition 313+ 1 G>A und den heterozygoten Nukleotidaustausch Guanin (schwarz) > Adenin (grün).

In der griechischen Population wurden insgesamt 15 unterschiedliche LDLR-Mutationen identifiziert; elf von diesen sind Missense-Mutationen, 2 sind Nonsense-Mutationen und 2 sind Splice-Site-Mutationen.

Die c.1646 G>A p.G549D [G528D] Mutation ist die am meisten gefundene unter den griechischen FH Patienten mit einem Anteil von 16,4% (Traeger-Synodinos et al., 1998, Miltiadous et al., 2001, Dedoussis et al., 2004). Die zweithäufigste Mutation ist c.1285 G>A p.V429M [V408M] im Exon 9 (14,9%) und die dritte Mutation ist c.858 C>A p.S286R [S265R] im Exon 6 (9,9%).

G549D [G528D]

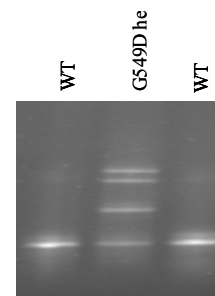
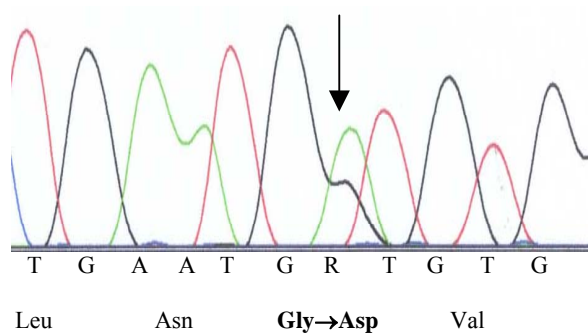


Abb. 12. a) Gly 549 [528] Asp Mutation (c.1646 G>A). In der DGGE sind die Banden für den Wildtyp und für die G549D [G528D] Mutation dargestellt.

V429M [V408M]

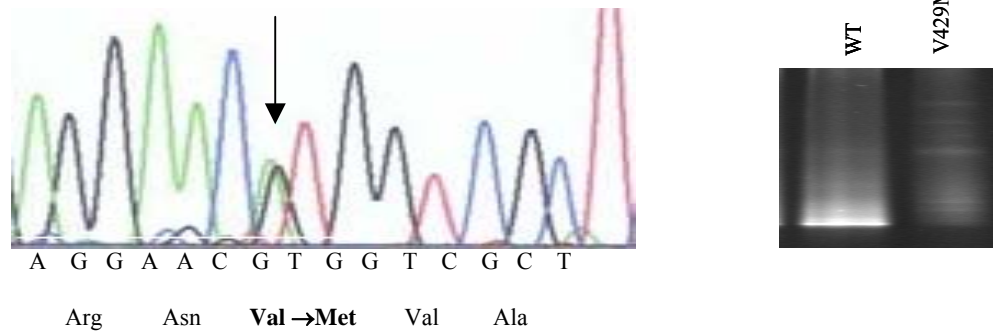


Abb. 12. b) Val 429 [408]Met Mutation (c.1285 G>A). In der DGGE sind die Banden für den Wildtyp und für die V429M [V408M] Mutation dargestellt.

S286R [S265R]

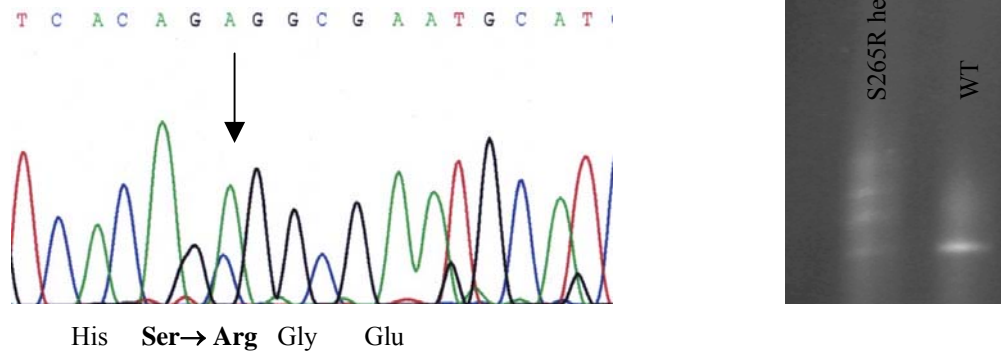


Abb. 12. c) Die Missense Mutation 286 [265] (c.858 C>A) resultiert im Austausch der Aminosäure Ser gegen Arg. In der DGGE sind die Banden für den Wildtyp und für die S286R [S265R] Mutation dargestellt.

In den 100 untersuchten Patienten wurde 26 verschiedene auffällige DGGE Banden gefunden, diese Proben wurden anschließend durch direkte Sequenzierung analysiert. Unter diesen wurden 6 relevante Mutationen mittels direkt Sequenzierung gefunden, die restlichen Aberrationen erwiesen sich als synonyme Polymorphismen.

4.8 Apo B Mutation

Die Mutationsdetektion des Aminosäureaustausches von Arginin 3500 durch Glutamin bei FDB-Patienten erfolgte durch den entstehenden bekannten Polymorphismus, der nach Verdau mit *MspI* nachweisbar ist.

Die Mutationsdetektion des Aminosäureaustausches von Arginin durch Cystein an Position 3531 bei FDB-Patienten erfolgte ebenfalls mittels Verdau des PCR-Produktes mit der Restriktionsendonuklease *NsiI*.

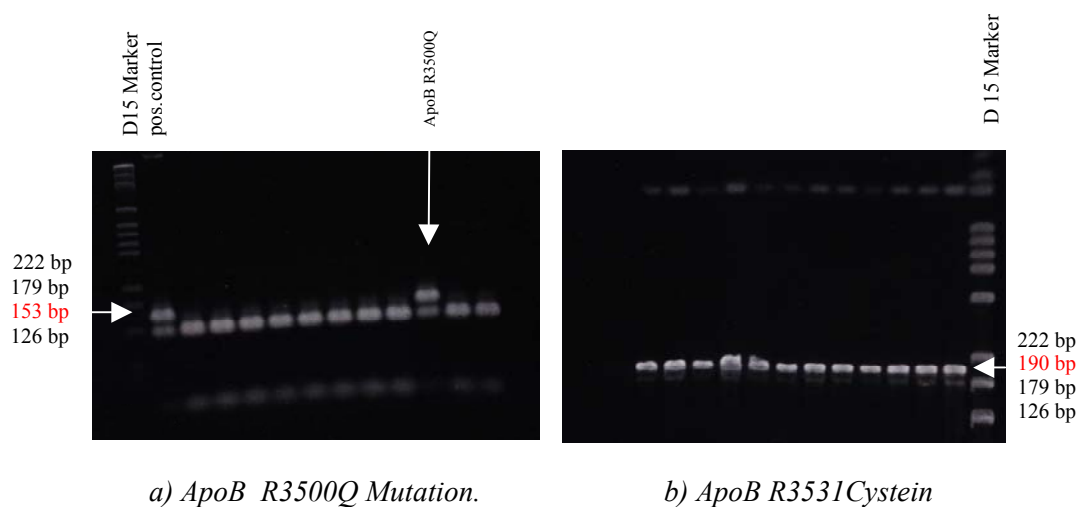


Abb. 13: a) ApoB R3500Q Mutation, b) ApoB R3531Cysteine dargestellt.

4.9 Polymorphismen p.L575L [L554L], p.N591N [N570N]

In allen untersuchten Patienten konnten die bereits bekannten Polymorphismen p.L575L [L554L] und p.N591N [N570N] im Exon 12 bestätigt werden. Es handelt sich um einen Basenaustausch an Positionen c.1725 der DNA von Cytosin zu Thymin und c.1773 der DNA Thymin zu Cytosin. Das Kodon (c.1725 p.L575L [L554L]) CTC sowie das veränderte Codon CTT codieren für die Aminosäure Leucin und das Kodon (c.1773 p.N591N [N570N]) AAT sowie das veränderte Kodon AAC codieren für die Aminosäure Asparagin, so daß sich für die Proteinstruktur des LDL-Rezeptorgens jeweils keine Veränderung ergibt.

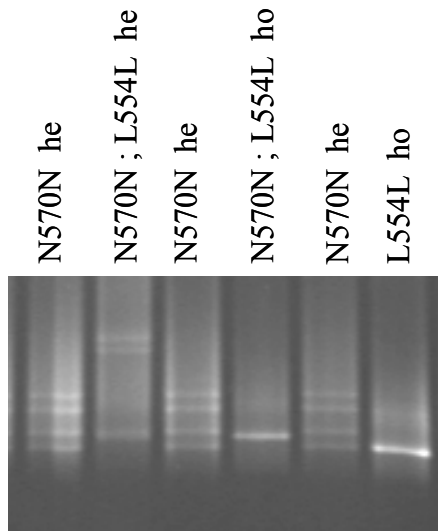


Abb. 14: Homozygote und heterozygoten Polymorphismen p.L575L [L554L] und p.N591N [N570N]. In der DGGE sind die Banden für den Wildtyp, den heterozygoten und homozygoten p.L575L [L554L], p.N591N [N570N] dargestellt.

5 Diskussion

Die Familiäre Hypercholesterinämie ist eine erbliche Stoffwechselerkrankung des Fettstoffwechsels, die durch erhöhte Cholesterinwerte im Blut gekennzeichnet ist und mit einem erhöhten Risiko für Arteriosklerose einhergeht. Die Familiäre Hypercholesterinämie wird im Wesentlichen bedingt durch die Defekte des LDL-Rezeptor Gens sowie des Apolipoprotein B-100 Gens. Das mutierte ApoB-100 wird als familiär defektes ApoB-100 (FDB) bezeichnet. Sekundär kann eine Hypercholesterinämie auch z.B. durch eine Hypothyreose, ein nephrotisches Syndrom, eine Cholestase oder eine chronische Lebererkrankung bedingt sein.

Der LDL- Rezeptor ist von zentraler Bedeutung für die Regulation des Lipoproteinstoffwechsels und des Cholesterinspiegels. Er bindet neben ApoB-100, dem Hauptlipoprotein der LDL-Partikel, auch ApoE und wird deshalb auch als ApoB- und ApoE-Rezeptor bezeichnet. Die normale Funktion des LDL-Rezeptors ist die Bindung der LDL-Partikel über ihren ApoB-100 Anteil und ihre anschließende Aufnahme über eine Rezeptor vermittelte Endocytose. Etwa zwei Drittel der LDL-Partikel, die ca. 75% des gesamten Cholesterins im Plasma darstellen, werden über den LDL-Rezeptor abgebaut. Ein Defekt oder ein Mangel an LDL-Rezeptoren führt zu einer Herabsetzung bzw. einem vollständigen Verlust des LDL-Abbaus über den LDL-Rezeptor. Heterozygote FH-Patienten weisen eine etwa 50%-ige Reduktion der funktionsfähigen LDL-Rezeptoren auf ihren Zellen auf. Abhängig von der Art des Defektes können bei homozygot Betroffenen die LDL-Rezeptoren völlig fehlen bis hin zu einer Restaktivität von bis zu 20% vorliegen.

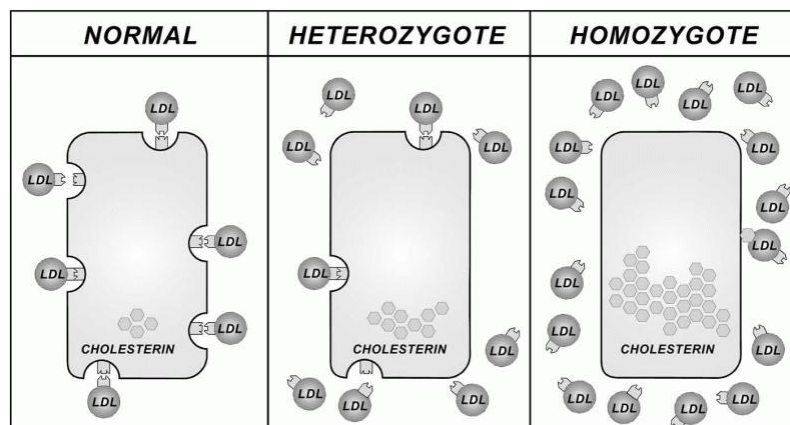


Abb. 15: Schematische Darstellung der LDL-Rezeptoren und der endogenen Cholesterinsynthese bei Stoffwechselgesunden sowie heterozygoter bzw. homozygoter Hypercholesterinämie (modifiziert nach Derfler. Journal für Kardiologie, 2002).

Die LDL-Konzentrationen im Serum steigen der Schwere des Defektes entsprechend unterschiedlich an (siehe Abb. 15). Bei erwachsenen Heterozygoten liegt die mittlere Serumkonzentration für das Gesamtcholesterin bei ca. 350 mg/dl. Er kann allerdings bei den einzelnen Patienten, selbst innerhalb einer Familie, sehr unterschiedlich erhöht sein. Bei Homozygoten liegt die Cholesterin-Serumkonzentration in der Regel zwischen 600 und 1200 mg/dl. Als Folge der Anhebung der zirkulierenden Anzahl von LDL-Partikeln kommt es zu Cholesterinablagerungen im Bereich der Augenlider (Xanthelasmen), in der Haut und in den Sehnen der Hände und Füße (kutane bzw. tendinöse Xanthome) und im Auge (Arcus lipoides corneae). Des Weiteren kommt es zu einer fortschreitenden Koronarsklerose. Etwa jeder 20. Infarktpatient unter 60 Jahren leidet an einer heterozygoten Familiären Hypercholesterinämie, dies entspricht einem ca. 25fach erhöhten Risiko. Homozygot Betroffene sterben unbehandelt häufig bereits im Kindes- und Jugendalter an den Folgen der Koronarsklerose.

Die Familiäre Hypercholesterinämie wird autosomal dominant vererbt. Bei der homozygoten Form (Häufigkeit 1 : 1 000 000) liegen *de facto* keine funktionsfähigen LDL-Rezeptoren vor, bei der heterozygoten Form (Häufigkeit 1: 500) ist die Aktivität der LDL-Rezeptoren um etwa 50% vermindert.

Das Gen des humanen LDL-Rezeptors ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 19 (19p13.2) lokalisiert und ist etwa 45,5 Kilobasen lang. Die für das intakte Protein kodierenden Bereiche sind auf 18 Exone verteilt. Bislang sind über 900 verschiedene Mutationen beschrieben worden, die sich über das gesamte Gen verteilen (Datenbanken unter <http://www.ucl.ac.uk/fh> und <http://www.umd.necker.fr:2004>). Der weitaus größte Teil der Mutationen sind Punktmutationen. Der Anteil von großen Genveränderungen (z.B. Deletion) beträgt etwa 2-17%. Auf Basis ihrer phänotypischen Expression können die Mutationen in fünf Klassen eingeteilt werden (siehe Einleitung).

Die molekularbiologische Analyse erlaubt im Falle eines Mutationsnachweises eine eindeutige Identifizierung einer Familiären Hypercholesterinämie, die ein hohes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bedingt.

Die von uns durchgeführte Analyse umfaßt die Untersuchung aller 18 Exons mittels PCR und Sequenzierung. Hiermit können die Mutationen des kodierenden Bereichs, der Exon-/Introngrenzen und des Promotors nachgewiesen werden.

Bei der Beurteilung des Ausmaßes der Änderung der Proteinstruktur aufgrund einer Mutation unterscheidet man zunächst zwischen konservativen und nicht-konservativen Mutationen. Bei den konservativen Mutationen wird die ursprüngliche

Aminosäure durch eine Aminosäure mit ähnlichen chemischen Eigenschaften ausgetauscht. Die nicht-konservative Mutation ist gekennzeichnet durch den Austausch einer Aminosäure mit einer anderen Seitenkette und damit anderen chemischen Eigenschaften als die ursprüngliche Aminosäure. Während die Auswirkungen auf die Funktionstüchtigkeit bei konservativen Mutationen häufig gering sind, ist bei nicht-konservativen Mutationen eine Störung der Funktion des Proteins eher wahrscheinlich.

Neben der Unterscheidung zwischen konservativer und nicht-konservativer Substitution spielt bei der Prädiktion des Grades einer möglichen Funktionseinschränkung des cholesterintransportierenden Proteins die Lokalisation der Schädigung im LDL-Rezeptor Gen eine zentrale Rolle. Untersuchungen haben ergeben, dass die verschiedenen Arten von Mutationen bevorzugte Regionen (Promotor Region, Liganden-bindenden Region, EGF Präkursor homologen Region) des LDL-Rezeptor Gens betreffen. Während Nonsense-, Frameshift- (d.h. Mutation, die eine Veränderung des Leserasters bedingen) und Splice-Site-Mutationen über das gesamte LDL-Rezeptor Gen verteilt vorkommen, finden sich Missense-Mutationen häufig in speziellen Regionen des Gens. Missense-Mutationen sind nicht-synonyme Mutationen, sie verändern die Sequenz eines Polypeptids, indem sie ein Nukleotidtriplett (Codon) so abwandeln, dass es für eine andere Aminosäure codiert. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden bei den 100 untersuchten deutschen Patienten insgesamt in 37 Fällen Mutationen nachgewiesen. Diese verteilten sich auf 29 verschiedene Mutationen, von denen 26 bekannt waren und 3 neu identifiziert wurden. Bei den 100 griechischen Patienten wurden in 47 Probanden Mutationen nachgewiesen: 15 verschiedene, von denen 14 bekannt waren und eine neu gefunden wurde (Tabelle 25).

Gruppe	Anzahl untersuchte Patienten	Gefundene Mutationen insg.	Verschiedene Mutationen	Bekannte Mutationen	Neue Mutationen
Deutschland	100	37	29	26	3
Griechenland	100	47	15	14	1

Tab. 25: Übersicht über die Anzahl gefundener Mutationen in den untersuchten Patientengruppen.

Insgesamt wurde in 84 Fällen eine Mutation gefunden und 44 verschiedene Mutationen wurden identifiziert. Fünf Mutationen wurden in beiden Gruppen gefunden: insgesamt in 32 Probanden. Bei der deutschen Gruppe 1x p.Q254P [Q233P], 4 x p.A391T [A370T], 1x p.V429M [V408M], 1x p.G549D [G528D] und 1x p.G592E [G571E]; bei der griechischen Gruppe 1x p.Q254P [Q233P], 4x p.A391T [A370T], 15x p.V429M [V408M], 2x p.G549D [G528D] und 2x p.G592E [G571E]. Zwei Patienten waren heterozygot für die ApoB 3500 Mutation. Die 3 neuen Mutationen in der deutschen Gruppe unterteilen sich in eine homozygote Mutation in der Promotorregion und 2 Missense-Mutationen. Die neue griechische Mutation ist eine Splice-Site-Mutation.

Das Spektrum der LDL Rezeptor Mutation variiert innerhalb Europa erheblich. So gehen zum Beispiel in Island alle FH Mutationen auf ein und denselben genetischen Defekt im LDLR Gen zurück (Gudnason et al., 1997), wohingegen in den Niederlanden die größte genetische Heterogenität zu finden ist und mittlerweile 148 verschiedene Mutationen mit einem FH Phänotyp assoziiert sind (Fouchier et al., 2001).

In den von uns untersuchten Patientengruppen unterscheiden sich die Mutationsspektren ebenfalls. Während in der deutschen Gruppe eine leichte Häufung der Mutationen in den Exonen 3, 4 und 7 zu finden ist, erscheinen in der griechischen die meisten Mutationen in den Exonen 2, 8 und 9. Die Mutation p.V429M [V408M] im Exon 9 ist mit einer Frequenz von 15 betroffenen Patienten vergleichsweise oft anzutreffen (Abbildung 16).

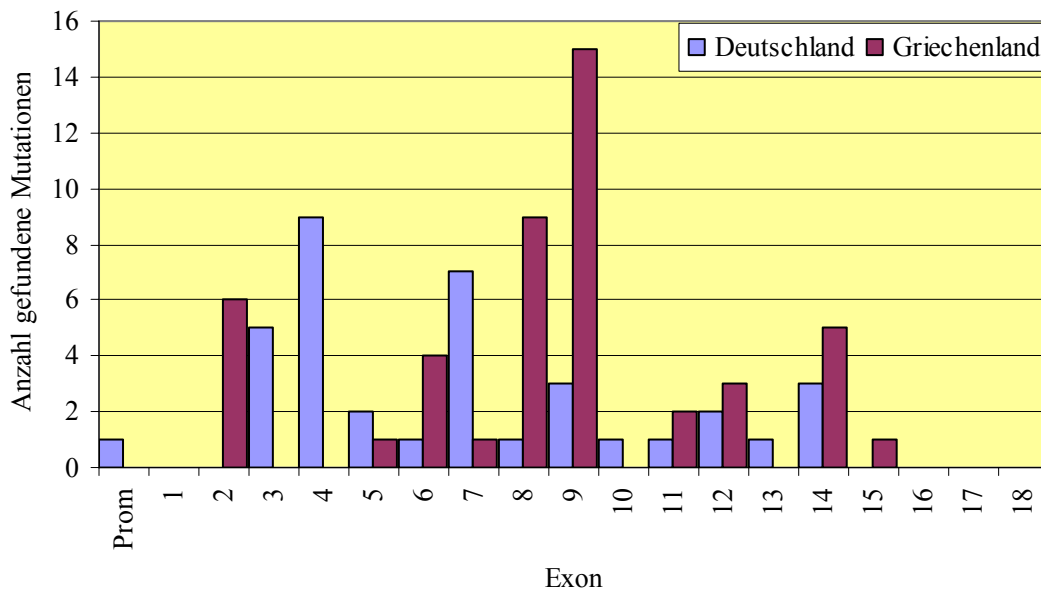


Abb. 16: Vergleich der Anzahl verschiedener Mutationen in den einzelnen Exonen in den beiden untersuchten Patientengruppen.

Für die griechische Population sind bislang insgesamt nur 15 verschiedene Mutationen in der Literatur beschrieben. Davon sind 11 Missense-Mutationen, zwei Nonsense-Mutationen und zwei Splice-Site Mutationen (Traeger-Synodinos et al., 1998; Miltiadous et al., 2001; Dedoussis et al., 2004). Insgesamt stehen hier aber nur relativ wenige Informationen zur Verfügung. Die häufigste in der Literatur beschriebene Mutation ist die p.G549D [G582G] mit einer Häufigkeit von 16,4 % in der untersuchten Population, gefolgt von der p.V429M [V408M] Mutation mit einer Häufigkeit von 14,9 % (Dedoussis et al., 2004). In unserer untersuchten Patientengruppe wurde diese Mutation sogar mit einer Häufigkeit von 32% gefunden.

In der deutschen Patientengruppe stellte sich das Mutationsspektrum deutlich heterogener dar. Diese hohe Heterogenität wird ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben. In einer Reihe von Studien zu diesem Thema (Schuster et al., 1995; Thiart et al., 1998; Ebhardt et al., 1999; Bochmann et al., 2001; Weiss et al., 2000; Nauck et al., 2001; Genschel et al., 2001; Dedoussis et al., 2004) werden für die deutsche Population ca. 80 verschiedene Mutationen beschrieben. Diese unterteilen sich in 51 Missense-Mutationen, 7 Nonsense-Mutationen, 22 Insertionen oder Deletionen und 4 Splice-Site Mutationen. Drei Mutationen werden mit einer leicht erhöhten Häufigkeit gefunden p.D266E [D245E] (3.7%), p.E228X [E207X] (3.1%)

und c.313+1G>A oder c.313+1G>C (3.1%) (Dedoussis et al., 2004). Die beiden Mutationen p.D266E [D245E] und c.313+1G>A/C wurden in unserer Gruppe mit einer Häufigkeit von 2,7 bzw. 8,1% gefunden.

Lokalisation der neuen Mutationen

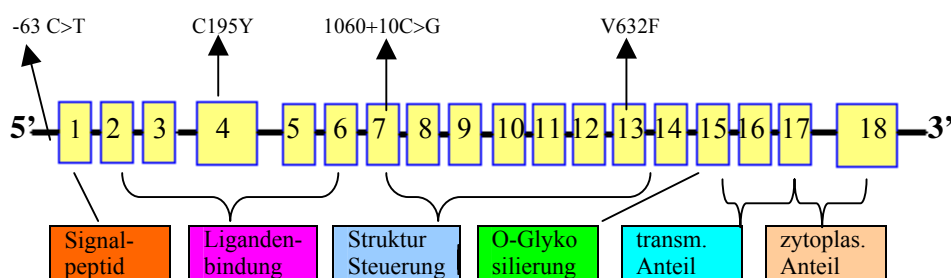


Abb. 17: Darstellung der neu identifizierten Mutationen und ihre Lokalisation bezüglich funktionellen Domänen des LDL-Rezeptor Gens.

Tabelle 25 zeigt eine Zusammenfassung der Lipoproteinparameter von FH Patienten, bei denen neue Mutationen identifiziert wurden.

Mutation	TC	TG	LDL-c	HDL-c	Apo B	Lp (a)	ApoE
c.1-156C>T	439	99	377	43	245	31	3/3
p.C216Y	430	128	360	39	NA	23	3/3
p.V653F	432	59	349	71	NA	NA	3/2
c.1060+10C>G	350	147	274	47	NA	NA	NA

Alle Lipidparameter sind in mg/dL angegeben. NA: Nicht verfügbar.

Tab. 26: Lipoproteinparameter von FH Patienten mit neu identifizierten Mutationen.

Diese erste der vier neuen Mutationen ist eine homozygote Basensubstitution (c.1-156C>T) im Repeat 2 in der Promotorregion des LDL-Rezeptor Gens. Die Mutation wurde zunächst per DGGE detektiert, per Sequenzierung identifiziert und mittels Restriktionsverdau mit Tsp509I bestätigt. Dies ist die erste uns bekannte homozygote Mutation in einer essentiellen regulatorischen Region des LDLR Promotors. Die Hauptsequenz, die die Transkription des LDLR-Gens reguliert, liegt ungefähr 250 bp oberhalb des Initialcodons (AUG). Für die Promotoraktivität sind zwei AT-reiche Sequenzen (TATA-Boxen) und drei sterol-abhängige regulatorische Repeats verantwortlich (Südhof et al., 1987). Zehn LDLR Promotor lokalisierte Mutationen

sind in der Literatur bereits beschrieben: (c.1-135C>G [-42], c.1-137C>T [-44] Hobbs HH, Brown MS et al., 1992), (c.1-136C>T [-43], Koivisto UM, Palvimo JJ et al., 1994), (c.1-138 T>C [-45], Sun XM, Neuwirth C, Wade DP et al., 1995; Dedoussis et al., 2003), (c.1-142C>T [-49], Mozas P, Galetto R, Allbayar M et al., 2002), (c.1-153 C>T [-60], c.1-119 [-27], Francova H, Trbusek M et al., 2003), (c.1-152 C>T [-60], Scholtz CL, Peeters AV et al., 1999) und eine andere Mutation c.1-206 C>T [C-113T] wurde bei einem schwedischen Patienten identifiziert.

Unsere identifizierte Mutation befindet sich in der hochkonservierten Region des LDLR-Promotors, der entscheidend für die Transkription ist: zwischen den Nucleotiden -65 und -56 (Scholtz et al., 1999). Diese homozygote Mutation in einer essentiellen regulatorischen Region des LDLR Promotors bedingt wahrscheinlich eine Änderung der Transkription.

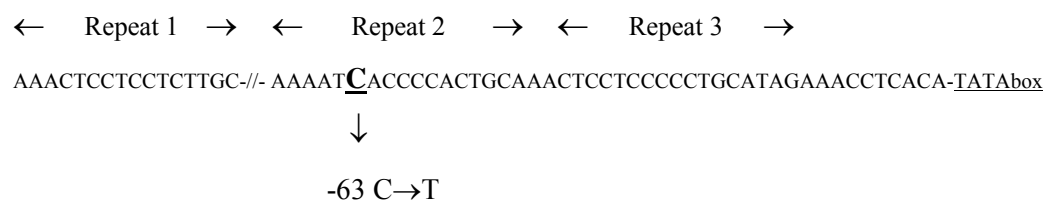


Abb. 17: Die Hauptsequenz, die die Transkription des LDLR-Gens reguliert. Die unterstrichenen Nucleotide stellen Mutationen dar. Ihre Nummer -63 ist vom Anfang der Transkription berechnet (in Übereinstimmung mit dem LDLR-Locus, Gen-Karte: <http://www.ucl.ac.uk/fh>).

Die Patientin, bei der diese Mutation gefunden wurde, hatte einen Gesamt-Cholesterinwert von 439 mg/dl, Triglyceride mit 99 mg/dl im Normbereich, LDL-Cholesterin mit 377 mg/dl deutlich erhöht, HDL-Cholesterin mit 43 mg/dl erniedrigt. Ihr ApoB-Wert (245 mg/dl) lag um mehr als das Doppelte über dem Normbereich (40-115 mg/dl) und der Lipoprotein-(a)-Wert (31 mg/dl) lag knapp über dem Normbereich (<30 mg/dl). Als Genotyp hatte die Patientin ApoE 3/3. Klinisch wies diese Patientin bereits im Alter von 26 Jahren eine symptomatische koronare Herzerkrankung auf und erhielt eine Bypass-Operation. Familienanamnestisch verstarb sowohl ihr Vater im Alter von 48 Jahren als auch die Mutter im Alter von 40 Jahren am akuten Herztod. Hiermit besteht klinisch als auch genetisch das Bild einer homozygoten Form einer Familiären Hypercholesterinämie. Dieser Phänotyp

unterstreicht die Relevanz der Domäne im Promotor, die bei dieser Patientin betroffen ist.

Bei der zweiten neu identifizierten Mutation handelt es sich um eine c.647G>A (p.C216Y) Basensubstitution, die mittels allelspezifischer PCR verifiziert wurde. Der Nukleotidaustausch resultiert in der Aminosäuresequenz in einer Substitution der Aminosäure Cystein durch Tyrosin im Kodon 216 (p.C216Y) in der ligandenbindenden Domäne des LDL-Rezeptors. Cystein besitzt eine Sulfhydrylgruppe als Seitenkette. Es handelt sich dabei um eine hydrophobe, sehr reaktive Seitenkette, die leicht Disulfidbrücken ausbildet. Tyrosin neigt eher dazu (mit einer aromatischen Seitenkette) sich zusammenzulagern und die dreidimensionale Struktur des Proteins zu stabilisieren. Die in der ligandenbindenden Domäne lokalisierte Mutation gehört zur Mutations-Klasse der Bindungsstörungen.

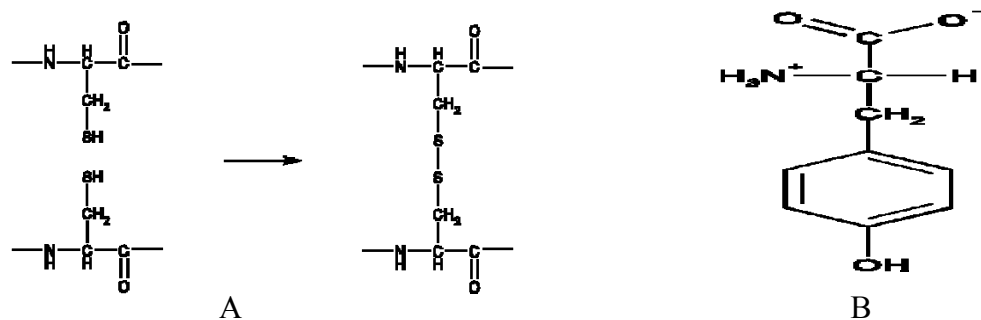


Abb. 18: a) Knüpfen einer Disulfidbindung, b) Tyrosin

Dieser zum Zeitpunkt der Diagnostik 53-jährige Patient, bei dem diese Mutation gefunden wurde, hatte einen Gesamt-Cholesterinwert von 430 mg/dl, der mehr als das Doppelte vom Normwert (200 mg/dl) betrug. Sein Triglyceridwert (128 mg/dl) war unterhalb des Normbereichs (>200 mg/dl), der LDL-Cholesterinwert (360 mg/dl) lag um mehr als das Doppelte über der Normgrenze (<135 mg/dl), der HDL-Cholesterinwert lag mit (39 mg/dl) unterhalb des Normbereiches (>55 mg/dl), der Lipoprotein (a)-Wert (23 mg/dl) lag unterhalb der Normgrenze (<30 mg/dl) und ApoE Genotyp war E 3/3. Klinisch als auch genetisch liegt hiermit eine heterozygote Form der autosomal dominanten Familiären Hypercholesterinämie vor. Die Familienanamnese war positiv bezüglich einer Hypercholesterinämie. Passend zur Heterozygotie sprach der Patient gut auf eine Therapie mit Statinen an.

Eine dritte neue Mutation c.1957G>T (p.V653F) wurde bei einer 53-jährigen adipösen (BMI: 34.8) Patientin gefunden. Bei dieser dritten neuen Mutation handelt es sich um einen Basenaustausch (c.1957G>T), der in der Aminosäuresequenz im Kodon 653, der zu einem Austausch der Aminosäuren Valin gegen Phenylalanin führt (p.V653F). Das Kodon 653 befindet sich im Bereich der EGF-Präkursor homologen Region des LDL-Rezeptors. Die Patientin war ebenfalls *compound* heterozygot für die bereits bekannte p.A391T Mutation. Diese Mutation V653F ist gekennzeichnet durch einen Austausch der aliphatisch, unpolaren, hydrophoben Aminosäure Valin gegen die größere, aromatische, stark hydrophobe Aminosäure Phenylalanin. Durch die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der beiden Aminosäuren ist eine Veränderung in der EGF-Präkursor homologen Struktur des Proteins wahrscheinlich. Diese im Bereich der EGF-Präkursor homologen Region lokalisierte Mutation gehört auch zur Mutations-Klasse der Bindungsstörungen.

Die Patientin, bei der diese Mutation gefunden wurde, hatte einen Gesamt-Cholesterinwert von 432 mg/dl, der mehr als das Doppelte vom Normwert (200 mg/dl) betrug. Ihr Triglyceridwert (59 mg/dl) war unterhalb des Normbereiches (>200 mg/dl), der LDL-Cholesterinwert (349 mg/dl) lag um mehr als das Doppelte über der Normgrenze (<135 mg/dl), der HDL-Cholesterinwert lag mit (71 mg/dl) im Normbereich (>65 mg/dl bei Frauen). Der ApoE Genotyp war 3/2. Das klinische Bild zusammen mit der Response auf Statintherapie spricht eher für das Vorliegen einer heterozygoten Form einer Familiären Hypercholesterinämie. Dieses lässt vermuten, dass die p.A391T Variante eher einen Polymorphismus darstellt bzw. keine wesentliche Beeinflussung des LDL-Rezeptors bedingt. Auch wenn dieses nur durch weitere funktionelle Untersuchungen zu klären ist, wird vermutlich im Vordergrund der bestehenden Hypercholesterinämie die c.1957G>T Mutation sein neben der bestehenden Adipositas und dem zusätzlich vorliegenden ApoE 2/3 Genotyp.

Bei der im Rahmen der Dissertation neu gefundenen *Splice-Site-Mutation* handelt es sich um c.1060+10C>G. Wie schon erwähnt sind *Splice-Site-Mutationen* am Übergang von Exon zu Intron lokalisiert und liegen auf intronischer Seite. Der Vorgang des Spleißens ist ein aufwendiger Prozeß, bei dem die transkribierten Exons in der prä-mRNA von den nicht-kodierenden Introns getrennt werden und als mRNA zusammengefügt für die Translation zur Verfügung stehen. Diese hoch konservierten Bereiche sind wichtig für einen geordneten Spleißprozeß. Mutationen in diesen Bereichen können zu einer Störung des Spleißvorgangs führen und über die Bildung

einer neuen Spleißstelle eine Konformationsänderung des Proteins oder bei Vorhandensein eines Stopcodon eine vorzeitige Beendigung der Translation hervorrufen. Die Mutation befindet sich 10 Basen nach der 3' Spleißstelle des Exon 7 und hat möglicherweise ein verändertes Spleißverhalten zur Folge. Aufgrund der Lokalisation ist davon auszugehen, dass die ursprüngliche Splice-Site durch eine veränderte Anfangs-Intron-Sequenz nicht erkannt wird und die intronische Sequenz bei dem Transkriptionsprodukt verbleibt. Die *Splice-Site-Mutation* c.1060+10C>G wurde bislang noch nicht in der Literatur beschrieben. Bei dieser identifizierten Mutation befindet sich die betroffene Sequenz zu Beginn eines neuen Introns innerhalb der ersten 10 Nukleotide. Betrachtet man die Mutation IVS7+10 G>C könnte es auch hier zu einer Verkürzung des resultierenden Proteins kommen, je nachdem wie das Spliceverhalten beeinflusst wird.

Dieser Patient hatte einen Gesamt-Cholesterinwert von 350 mg/dl, der das 1,5-fache vom Normwert (200 mg/dl) darstellt. Sein Triglyceridwert war mit 147 mg/dl im Normbereich (<200 mg/dl), der LDL-Cholesterinwert (274 mg/dl) lag 2-fach über dem Normbereich (<135 mg/dl) und der HDL-Cholesterinwert lag mit (47 mg/dl) unterhalb der Normgrenze. Klinisch lag eine eher heterozygote Familiäre Hypercholesterinämie vor, so dass am ehesten die identifizierte koseggregierende p.Q384X/p.D386E Mutationen relevant erscheinen und vermutlich die im Intron identifizierte Variante keine wesentliche klinische Rolle spielt.

In der griechischen Population wurden insgesamt weniger verschiedene Mutationen gefunden, als in der deutschen Population. Innerhalb der identifizierten Mutationen wurden zwei Mutationen mit einer relativ hohen Frequenz in der griechischen Population detektiert: p.C27W (6 von 47 Mutationen) und p.V429M (15 von 47 Mutationen). Diese höhere Homogenität in der griechischen Population wird auch in der Literatur beschrieben (Miltiados et al., 2001).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Direkt-Sequenzierung bei der Mutationsanalyse einer genetischen Erkrankung ein genaues und wichtiges molekulargenetisches Werkzeug ist. In der Zwischenzeit wurden auf dem LDL-Rezeptor Gen mehr als 900 verschiedene Mutationen identifiziert, die mit einer familiären Hypercholesterinämie assoziiert sind. Dabei sind alle 18 Exone des Gens betroffen, Mutations Hotspots konnten bislang noch nicht identifiziert werden, auch

zeichnete sich bislang kein Exon in allen Populationen durch eine besondere Mutationshäufigkeit aus.

In dieser Arbeit wurde methodisch ein Verfahren angewendet, bei dem zunächst alle Patientenproben einem Screening per DGGE unterzogen wurden um auffällige Elektrophoresebanden in einzelnen Exonen zu identifizieren. In einem nächsten Schritt wurden diese auffälligen Exone mittels Sequenzierung genauer analysiert. Das Verfahren sollte das Screening nach Mutationen im LDL-Rezeptor Gen vereinfachen und den Arbeitsaufwand reduzieren. Bei der Untersuchung von Populationen, deren Mutationsspektrum schon einigermaßen bekannt ist und wo sich einige Exone als besonders prädestiniert für Variationen gezeigt haben, erweist sich dieses Verfahren als recht hilfreich. Im Falle von Populationen deren Spektrum noch unbekannt oder sehr heterogen ist, erweist sich das Verfahren als recht aufwändig. Die einzelnen Reaktionsbedingungen in der DGGE müssen für jedes Exon recht genau eingestellt werden. Zusätzlich erhält man per DGGE auch für jeden Polymorphismus ein verändertes Bandenmuster, sodass unter Umständen recht viele Exone per Sequenzierung nachanalysiert werden müssen.

So scheint ein Vergleich der DGGE mit dem Direkt-Sequenzieren bei dem heutigen Möglichkeiten des Probenumsatzes beim Direkt-Sequenzieren ein Vorscreening z.B. mittels DGGE entbehrlich zu machen.

Mit Hilfe der Sequenzierung ist es möglich den Ort der Mutation im Gen genau zu lokalisieren und die Art der Mutation zu bestimmen, woraus wichtige Vorhersagen über die Funktionsfähigkeit des resultierenden Proteins gemacht werden können.

Die Molekulargenetik ist zur Zeit die spezifischste Methode für die Diagnose der Familiären Hypercholesterinämie. Ein fehlender Mutationsnachweis schließt jedoch eine Familiäre Hypercholesterinämie nicht aus. Unsere gemeinschaftliche Studie zeigt, dass die FH-verursachenden Mutationen bei deutschen Patienten eine hohe Heterogenität, bei griechischen Patienten hingegen eine geringere Heterogenität aufweisen. Es werden aktuell weitere Studien durchgeführt, um bei Patienten mit denselben Mutationen das Auftreten unterschiedlicher Phänotypen, die möglicherweise durch unterschiedliche Lebensweisen und potentielle *Modifier*-Gene bedingt sind, zu evaluieren.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschäftigte sich mit der molekulargenetischen Charakterisierung von Patienten, welche an der Familiären Hypercholesterinämie erkrankt sind und der Mutationsanalytik des LDL-Rezeptorgens unter besonderer Beachtung neu determinierter Mutationen.

Die Familiäre Hypercholesterinämie ist klinisch durch ein erhöhtes Gesamt- und LDL-Cholesterin, eine Xanthomatose der Sehnen und der Haut sowie eine früh einsetzende Koronarsklerose charakterisiert. Genetisch liegen zumeist Mutationen im LDL-Rezeptor Gen vor. Das Gen des humanen LDL-Rezeptors ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 19 (19p13.2) lokalisiert und ist etwa 45,5 Kilobasen lang. Die für das intakte Protein kodierenden Bereiche sind auf 18 Exons verteilt. Mittlerweile sind bis über 900 verschiedene Mutationen, meist Punktmutationen im LDL-Rezeptor Gen identifiziert worden.

Durch die Untersuchung von 100 deutschen Patienten konnten 29 verschiedene Mutationen gefunden werden, darunter 3 neue, vorher noch nicht beschriebene Mutationen. Dabei handelt es sich im Einzelnen um c.1.156C>T [-63 C>T], c.647G>A [p.C216Y] und c.1957G>T [p.V653F]. Bei den 100 griechischen Patienten wurden 15 verschiedene Mutationen nachgewiesen, von denen eine neue Splice-Site-Mutation gefunden wurde (c.1060+10C>G). Die Untersuchungen bestätigen auch die große Heterogenität der krankheitsverursachenden Mutationen im LDL-Rezeptor Gen. Die Erkrankung resultiert aus einer großen Zahl von seltenen Mutationen. Hier liegt die Problematik des routinemäßigen Einsatzes der genetischen Diagnostik bei der Familiären Hypercholesterinämie. Die große Vielfalt der Mutationen macht auch Aussagen über Genotyp-Phänotyp-Korrelationen schwierig.

Die Mutationsdiagnostik bei der Familiären Hypercholesterinämie ist zum Verständnis der Genotyp-Phänotyp-Relation erforderlich, die wiederum bedeutend für die Entwicklung neuer Strategien für Diagnostik, Disease-Management-Programme und Therapie ist.

7 Literaturverzeichnis

Alaupovic P: Apolipoproteins and lipoproteins Atherosclerosis 1971; 13:141-146.

Alaupovic P, Lee DM, McConathy WJ: Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. Biochim Biophys Acta 1972; 260:689-707.

Assmann G, Cullen P, Schulte H: The Munster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. Eur Heart J 1998; 19 Suppl A:A2-A11.

Assmann G, Schulte H: The Prospective Cardiovasculare Munster (PROCAM) Study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease. Am Heart J 1988; 116:1713-1724.

Assmann G, Schulte H, Cullen P: New and classical risk factors-the Munster heart study (PROCAM): Eur J Med Res 1997; 2:237-242.

Aufenanger J, Haux P, Weber U, Kattermann R: A specific method for the direct determination of lipoprotein cholesterol in electrophoretic patterns. Clin Chem Acta 1988; 177:197-207.

Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM: Low density lipoprotein subclass pattern and risk of myocardial infarction. J Am Med Assoc 1988; 260:1917-1921.

Auwerx JH, Babirak SP, Fujimoto WY, Iverius PH, Brunzell JD: Defective enzyme protein in lipoprotein lipase deficiency. Eur J Clin Invest 1989; 19:433-437.

Barrett PHR, Baker N, Nestel PJ: Model development to describe the heterogeneous kinetics of apolipoprotein B and triglyceride in hypertriglyceridemic subjects. J Lipid Res 1991; 32:743-762.

Barrett PHR, Foster D. Design and analysis of lipid tracer kinetic studies. Cur Op Lipidol 1996; 7:143-148.

Beisiegel U, Ameis D, Will h, Greten H: Hypertriglyceridemia and arteriosclerosis. Physiology and pathophysiology of chylomicron catabolism. *Internist (Ber)* 1989; 60: 455-461.

Beltz WF, Kesäniemi YA, Howard BV, Grundy SM: Development of an integrated model for analysis of the kinetics of apolipoprotein B in plasma very low density lipoproteins, intermediate density lipoproteins and low density lipoproteins. *J Clin Invest* 1985; 76:575-585.

Bochmann H, Geisel J, Herrmann W, Purcz T, Reuter W, Julius U, Metzler W, Bergmann S, Jaross W, Gehirsch S: Eighth novel LDL receptor gene mutations among patients under LDL apheresis in Dresden and Leipzig. *Hum Mut* 2001; 17:76-77.

Brehme U, Einsiedler K, Schwahl FW: Das Risikofaktorenkonzept für Herz-Kreislauf-Erkrankungen in der Arbeitsmedizin. *J Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 2003; 38:68-75.

Brewer HB: Focus on high-density lipoprotein in reducing cardiovascular risk. *Am Heart J* 2004; 148:14-18.

Brown MS, Goldstein JL: The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane bound transcription factor. *Cell* 1997; 89:331-340.

Brown MS, Goldstein JL: A receptor-mediated pathway for cholesterol homostasis. *Science* 1986; 232:34-47.

Bujo H, Takahashi K, Saito Y, Maruyama T, Yamashita S, Matsuzawa Y, Ishibashi S, Shionoiri F, Yamada N, Kita T: Clinical features of familial hypercholesterolemia in Japan in a database from 1996-1998 by the research committee of the ministry of health, labour and welfare of Japan. *J Atheroscler Thromb* 2004; 11:146-151.

Calabresi L, Franceschini G: High density lipoprotein and coronary heart disease: insights from mutations leading to low high density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8:219-224.

Cantafora A, Blotta I, Pino E, Pisciotta L, Calandra S, Bertolini S: Quantitative polymerase chain reaction and microchip electrophoresis to detect major rearrangements of the low-density lipoprotein receptor gene causing familial hypercholesterolemia. *Electrophoresis* 2004; 25:3882-3889.

Cefalu AB, Barraco G, Noto D, Valenti V, Barbagallo CM, Elisir GD, Cuniberti LA, Werba JP, Libra M, Costa S, Gianguzza F, Notarbartolo A, Travali S, Averna MR: Six novel mutations of the LDL receptor gene in FH kindred of Sicilian and Paraguayan descent. *J Mol Med* 2006; 17:539-546.

Calero M, Tokuda T, Rostagno A, Kumar A, Zlokovic B, Frangione B, Ghiso J: Funktional and structural properties of lipid-associated apolipoprotein (clusterin). *Biochem J* 1999; 344 Pt:375-383.

Cartwright IJ, Plonne D, Higgins JA: Intracellular events in the assembly of chylomicrons in rabbit enterocytes. *J Lipid Res* 2000; 41:1728-1739.

Castelli WP, Anderson K: A population at risk. Prevalence of high cholesterol levels in hypertensive patients in the Framingham Study. *Am J Med* 1986; 80:23-32.

Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB: Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA*. 1986; 256:2835-2838.

Chang JH, Pan JP, Tai DY, Huang AC, Li PH, Ho HL, Hsieh HL, Chou SC, Lin WL, Lo E, Chang CY, Tseng J, Su MT, Lee-Chen GJ: Identification and characterization of LDL receptor gene mutations in hyperlipidemic Chinese. *J Lipid Res* 2003; 44:1850-1858.

Chapman MJ, Assmann G, Fruchart JC, Shepherd J, Sirtori C: European Consensus Panel on HDL-C Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid-a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C. *Current Medical Research Opinion*. 2004; 20:1253-1268.

Chiu CY, Wu YC, Jeng SF, Jap TS: Mutations in low-density lipoprotein receptor gene as a cause of hypercholesterolemia in Taiwan. *Metabolism* 2005; 54:1082-1086.

Chi-Pui Pang, Ying-Tat Mak, Brian Tomlinson, Jun Zwang, Yuen-Shan Chan, Tony Mak WL, John Masarei RL: Mutations in the Low-Density Lipoprotein Receptor Gene in Chinese Familial Hypercholesterolemia Patients. *Thromb Vas Biol* 1998; 18:1600-1605.

Cooper AD: Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res* 1997; 38: 2173-2192

Cybulski MI, Gimbrone MA: Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251:788-791.

Dahlen GH, Guyton JR, Atter M, Farmer JA, Kautz JA, Gotto AM: Association of levels of lipoprotein Lp (a), plasma lipids and other lipoproteins with coronary artery disease documented by angiography. *Circulation* 1986; 74: 758-765.

Damgaard D, Nissen PN, Jensen LG, Nielsen GG, Stenderup A, Larsen ML, Faergeman O: Detection of large deletions in the LDL receptor gene with quantitative PCR methods. *BMC Medical Genetics* 2005; 6:15.

Dedoussis GVZ, Genschel J, Schmidt H: LDL-Receptor Mutations in Europe. *Hum Mut* 2004b; 24: 443-459.

Dedoussis GVZ, Pitsavos C, Kelberman D, Skoumas J, Pressa ME, Choumerianou DM, Stefanadis C, Humphries SE, Toutouzas P: FH-Pyrgos: a novel mutation in the promoter (-45delT) low-density lipoprotein receptor gene associated with familial hypercholesterolemia. *Clin Genet* 2003; 64:414-419.

Dedoussis GVZ, Skoumas J, Pitsavos C, Choumerianou DM, Genschel J, Schmidt H: FH clinical phenotype in Greek patients with LDL-R defective vs. negative mutations. *European Journal of Clinical Investigation* 2004; 34:402-409.

Dedoussis GVZ, Genschel J, Bochow B, Pitsavos C, Skoumas J, Prassa M, Lkhagvasuren S, Toutouzas P, Vogt A, Kassner U, Thomas HP, Schmidt H: Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in German and Greek patients. *Hum Mut* 2004a; 23:285-286.

De Faria E, Fong LG, Komaromy M, Cooper AD: Relative role of the LDL receptor, the LDL receptor-like protein and hepatic lipase in chylomicron remnant removal by the liver. *J Lipid Res* 1996; 37:197-209.

Demant T, Shepherd J, Packard CJ: Very low density lipoprotein, apolipoprotein B metabolism in humans. *Klin Wochenschr* 1988; 66:703-712.

Derfler K: Familiäre Hypercholesterinämie *J für Kardiol* 2002; 9:304-306.

Dichek H, Fojo SS, Beg O, Brewer HB: The molecular defects in lipoprotein lipase deficient patients. *Eur J Epidemiol* 1992; 8 Suppl 1:75-77.

Dos Santos JE, Zago MA: Familial hypercholesterolemia in Brazil. *Atheroscler Suppl* 2003; 4:1-2.

El Messal M, Ait Chihab K, Chater R, Vallve JC, Bennis F, Hafidi A, Ribalti J, Varret M, Loutfi M, Rabes JP, Kettani A, Boileau C, Masana L, Adlouni A: Familial hypercholesterolemia in Morocco: first report of mutations in the LDL receptor gene. *J Hum Genet* 2003; 48:199-203.

Fouchier SW, Defesche JC, Umans-Eckenhausen MW, Kastelein JP: The molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands. *Hum Genet* 2001; 109:602-615.

Franceschini G: Apolipoprotein function in health and disease: insights from natural mutations. *Eur J Clin Invest* 1996; 26:733-746.

Francova H, Trbusek M, Zapletalova P, Kuhrova V: New promoter mutations in the low-density lipoprotein receptor gene which induce familial hypercholesterolemia phenotype: Molecular and functional analysis. *J Inherit Metab Dis* 2004; 27:523-528.

Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS: Fat transport in lipoproteins. An integrated approach to mechanism and disorders. *New Engl J Med* 1967; 276:32-44.

Friedewald WT, Levy RT, Fredrickson DS: Estimation of the concentration of Low Density Lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.

Genschel J, Thomas HP, Kassner U, Lochs H, Steinhagen-Thiessen E, Schmidt HH: Two novel LDL receptor mutations in familial hypercholesterolemia: C122Y and E296X. *Hum Mutat* 2001; 17:354.

Getz GS: Immune function in atherogenesis. *J of Lipid Research* 2005; 46:1-10.

Gofman JW, Lindgren FT, Elliot H: Ultracentrifugal studies of lipoprotein of human serum. *J Bio Chem* 1949; 179:973-978.

Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Dawber TR: Lipoproteins, Cardiovascular Disease and Death. The Framingham Study. *Arch Intern. Med* 1981; 141:1128-1131.

Greten H, Windler E: Physiology and pathophysiology of lipoprotein metabolism--relation to hyperlipemias and arteriosclerosis. *Internist (Berl)* 1985; 26:399-404

Gudnason V, Patel D, Sun XM, Humphries S, Soutar AK, Knigth BL: Effect of the Stul polymorphism in the LDL receptor gene (Ala 370 to Thr) on lipid levels in healthy individuals. *Clin Genet* 1995; 47:309-316.

Gudnason V, Sigurdsson G, Nissen H, Humphries SE: Common founder mutation in the LDL Receptor gene causing familial hypercholesterolemia in the Icelandic Population. *Hum Mut* 1997; 10:36-44.

Hansen PS, Rudiger N, Tybjaerg-Hansen A, Faergeman O, Gregerson N: Detection of the apoB-3500 mutation (glutamine for arginine) by gene amplification and cleavage with *Msp I*. *J Lipid Res* 1991; 32:1229-1233.

Hattori H, Hirayama T, Nobe Y, Nagano M, Kujiraoka T, Egashiri T, Ishii J, Tsuji M, Emi M: Eight novel mutations and functional impairments of the LDL receptor in familial hypercholesterolemia in the north of Japan. *J Hum Genet* 2002; 47:80-87.

Heath KE, Gahan M, Whittall RA, Humphries S: Low-density lipoprotein receptor gene (LDLR) world-wide website in familial hypercholesterolaemia: update, new features and mutation analysis. *Atherosclerosis* 2001; 154:243-246.

Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL: The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet* 1990; 24:133-170.

Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL: Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolaemia. *Hum Mutat* 1992; 1:445-446.

Holla OL, Teie C, Berga KE, Leren TP: Identification of deletions and duplications in the low density lipoprotein receptor gene by MLPA. *Clin Chim Acta* 2005; 356:164-71.

Horsthemke B, Dunning A, Humphries S: Identification of deletion in the human low density lipoprotein receptor gene. *J Med Genet* 1987; 21:144-147.

Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, Bersot TP: familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 1990; 31:1337-1349.

Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnolds KS, Mahley RW, Krauss RM, Vega GL, Grundy SM: Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:6919-6923.

Jansen AC, van Aalst-Gohen ES, de Jongh S, de Sauvage Nolting PR, Kastelein JJ: Clinical, diagnostic, and therapeutic aspects of familial hypercholesterolemia. *Semin Vasc Med* 2004; 4:31-41.

Julius U, Pietzsch J, Hanefeld M: Störungen des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels, in Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg): Handbuch der Molekularen Medizin, Band 6 Monogen bedingte Erbkrankheiten. Springer-Verlag. Berlin -Heidelberg -New York 2000; 334-362.

Just H, Hort W, Zeiher AM: Arteriosclerosis. New insights into Pathogenetic mechanisms and prevention.(Hrsg) Darmstadt, Steinkopff Verlag, New York-Springer Verlag 1994: 1-32, 41-128.

Keller C, Zöllner N: Familiäre Hypercholesterinämien, in Schwand P, Richter WO, Parhofer KG: Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. Schattauer Verlag. Stuttgart – New York 2001; 72-88.

Kim JH, Choi HK, Lee H, Park HY, Kim JH, Kim JW, Kim HJ, Lee ST: Novel and recurrent mutations of the LDL receptor gene in Korean patients with familial hypercholesterolemia. Mol Cells 2004; 18:63-70.

Kong WJ, Lui J, Jiang JD: Human low-density lipoprotein receptor gene and its regulation. J Mol Med 2006; 84:29-36.

Koren E, Corder C, Mueller G, Centrurion H, Hallum G, Fesmire J, McConathy WD, Alaupovic P: Triglyceride enriched lipoprotein particles correlate with the severity of coronary artery disease. Atherosclerosis 1996; 122:105-115.

Kostner GM, Laggner P: Chemical and physical properties of lipoproteins, in Fruchart JC, Sheperd J (eds): Human Plasma Lipoproteins. Walter de Gruyter: Berlin – New York 1989; 23-54.

Kostner GM, März W: Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine, in Schwandt P, Richter WO (eds): Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. 11th ed. Schattauer Verlag. Stuttgart – New York 1995; 250-258.

Kostner G, März W: Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine. In Schwand P, Richter WO, Parhofer KG: Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. Schattauer Verlag. Stuttgart – New York 2001; 1-57.

Krauss RM, Burke DJ: Identification of Multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res* 1982; 23:97-104.

Krauss RM: Heterogeneity of plasma low density lipoproteins and atherosclerosis risk. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5:339-349.

Kühnel W: Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie 9. Auflage. George Thieme Verlag. Stuttgart-New York 1995.

Laurie AD, Scott RS, George PM: Genetic screening of patients with familial hypercholesterolaemia (FH): a New Zealand perspective. *Atheroscler Suppl* 2004; 5:13-15.

Leonhard H. Kreislauforgane In: (Hrsg). *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. 8 Auflage. George Thieme Verlag. Stuttgart-New York 1990.

Levy D, Kannel WB: Cardiovascular risk: New insight from Framingham. *Am Heart J* 1988; 116:266-272.

Loggen U, Boden A, Baron H, Schuster H: Apolipoprotein B-100 gene Mutations and cholesterol control in German patients. *Atherosclerosis* 2003; 166:411-412.

Lombardi MP, Redeker EJW, Defesche JC, Kamerling SWA, Trip MD: Molecular genetic testing for familial hypercholesterolemia: spectrum of LDL receptor gene mutations in the Netherlands. *Clin Genet* 2000; 57:116-124

Lombardi MP, Eric JC Sijbrands, Karin van de Giessen, Augustinus HM Smelt, John JP Kastelein, Rune R Frants: Mutations in the low density lipoprotein receptor gene of familial hypercholesterolemic patients detected by DGGE and direct sequencing. *J of Lipid Research* 1995; 36:860-867

MacMahon S, White HD, Anderson NE, Hankey GJ, Watson JD, Hunt D, Colquhoun DM, Glasziou P, Kirby AC, West MJ, Tonkin AM: Pravastatin therapy and the risk of stroke. *N Eng J Med* 2000; 343:317-326.

Maher V, Sinfuego J, Chao P, Parekh J: Primary prevention of coronary heart disease. What has WOSCOPS told us and what questions remain? West of Scotland Coronary Prevention Study. *Drugs* 1997; 54:1-8.

Marais AD, Firth JC, Blom DJ: Homozygous familial hypercholesterolemia and its management. *Semin Vasc Med.* 2004; 4:43-50.

Mathes P, Thiery J: The role of lipid metabolism in the prevention of coronary heart disease. *Zeitschrift für Kardiologie* 2005; 94 Suppl 3:III/43-55.

Miserez AR: Familiäre Hypercholesterinämie: Zweite WHO-Konferenz und Internationales MED-PED-Programm *Schweiz Med Forum* 2001; 29/30.

Miserez AR: Die molekulare Basis der intra- und extrazellulären Cholesterin-Homöostase *Schweiz Med Forum* 2001; 12.

Miltiados G, Elisaf M, Bairaktari H, Xenophontos SL, Manoli P, Cariolou MA: Characterization and geographic distribution of the low density lipoprotein receptor (LDLR) gene mutations in northwestern Greece. *Hum Mutat* 2001; 17:432-433.

Moll KJ, Moll M: Allgemeine Anatomie und Histologie. In: Moll KJ, Moll M (Hrsg) *Anatomie*, 14. Auflage. Jungjohann Verlagsgesellschaft. Neckersulm-Lübeck-Ulm 1995.

Mooser V, Darioli R: Forschung über polygene Erkrankungen. *Genetik der Hyper- und Dyslipidemien.* *Schweiz Med Forum* 2001; 48.

Mozas P, Galetto R, Albajar M, Ros E, Pocovi M, Rodriguez-Rey JC: A Mutation (-49C>T) in the promotor of the low density lipoprotein receptor gene associated with familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2002; 43:13-18.

Mozas P, Castillo S, Tejedor D, Reyes G, Alonso R, Franco M, Saenz P, Fuentes F, Almagro F, Mata P, Pocovi M: Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain: identification of 39 novel and 77 recurrent mutations in LDLR. *Hum Mutat.* 2004; 24:187.

Naomova RP, Neuwirth C, Pottinger B, Whittall R, Humphries SE, Souter AK: Genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia: a mutation and a rare non-pathogenic amino acid variant in the same family. *Atherosclerosis*. 2004; 174:67-71.

Nauck MS, Koster W, Dörfer K, Eckes J, Scharnagel H, Gierens H, Nissen H, Nauck MA, Wieland H, März W: Identifikation of the recurrent and novel mutations in the LDL receptor gene in German patients with familial hypercholesterolaemia. *Hum Mutat* 2001; 18:165-166.

Neubeck W, Wieland H, Habenicht A, Mueller P, Baggiok G, Seidel D: Improved assessments of lipoprotein patterns. III. Direct measurement of lipoproteins after gel-electrophoresis. *Clin Chem* 1977; 23:1296-1300.

Nissen H, Guldberg P, Hansen AB, Peterson NE, Norder M: Clinically applicable mutation screening in familial hypercholesterolaemia. *Hum Mutat* 1996; 8:168-177.

Ouguerram K, Chetiveaux M, Zair Y, Costet P, Abifadel M, Varret M, Boileau C, Magot T, Krempf M: Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1448-1453.

Pauciullo P, Giannino A, De Michele M, Gentile M, Liguori R, Argiriou A, Carlotto A, Faccenda F, Mancini M, Bond MG, De Simone V, Rubba P: Increased carotid artery intima-media thickness is associated with a novel mutation of low-density lipoprotein receptor independently of major cardiovascular risk factors. *Metabolism* 2003; 52:1433-1438.

Pedersen TR: Coronary artery disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study experience. *Am. J. Cardio* 1988; 82:53T-56T.

Pedersen TR, Ollson AG, Faergeman O, Kjekshus J, Wedel H, Berg K, Wilhelmsen L, Haghfelt T, Thorgeirsson G, Pyorala K, Miettinen T, Christophersen B, Tobert JA, Musliner TA, Cook TJ: Lipoprotein changes and reduction in the incidence of major coronary heart disease events in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Circulation* 1998; 97: 1453-1460.

Pedersen TR, Wilhelmsen L, Feargeman O, Strandberg TE, Thorgeirsson G, Troedsson L, Kristianson J, Berg K, Cook TJ, Haghfelt J, Miettinen T, Ollson AG, Pyorala K, Wedel H: Follow-up study of patients randomized in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Am J Cardiol* 2000; 86:257-262.

Pongrapeeporn KU, Nuinoon M, Thepsuriyanont P, Kasemsuk B, Charoensuk P, Chantawee R, Wongmanee U, Nuchpramool W: Detection of a known mutation M412T in the LDL receptor in a Chinese Thai FH family. *Clin Chim Acta* 2006; 365:211-6.

Punzalan FE, Sy RG, Santos RS, Cutiongco EM, Gosiengfiao S, Fadriguilan E, George P, Laurie A: Low density lipoprotein--receptor (LDL-R) gene mutations among Filipinos with familial hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb* 2005; 12:276-283.

Rader DJ: Gene therapy for familial hypercholesterolemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001;11 Suppl 5:40-44.

Real JT, Chaves FJ, Ejarque I, Garcia-Garcia AB, Valldecabres C, Ascaso JF, Armengod ME, Carmena R: Influence of LDL receptor gene mutations and the R3500Q mutation of the apoB gene on lipoprotein phenotype of familial hypercholesterolemic patients from a South European population. *Eur J Hum Genet* 2003; 11:959-965.

Riede UN, Schaefer HE: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 4 Auflage. George Thieme Verlag. Stuttgart-New York 1995.

Ross R: Endothelial injury and atherosclerosis. In *Endothelial Cell Biology in Health and Disease*. Simionescu N, New York: 1988; 371:84.

Sacks FM, Moye LA, Davis BR, Cole TG, Rouleau JL, Nash DT, Pfeffer MA, Braunwald E: Relationship between plasma LDL concentrations during treatment with pravastatin and recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events trial. *Circulation* 1998; 97:1446-1452.

Sampietro T, Tuoni M, Ferdeghini M, Ciardi A: Plasma cholesterol regulates soluble cell adhesion molecule expression in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1997; 96:1381-1385.

Sanchez HB, Yieh L, Osborne TF: Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp I in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 1995; 270:1161-1169.

Schaefer JR: Präventive Kardiologie. Prophylaxe der koronaren Herzkrankheit, Schattauer Verlag: Stuttgart-New York, 1998.

Schaefer JR, Herzum M, Maisch B: Prevention of coronary heart disease-„evidence-based medicine“ of antilipemic therapy. *Herz* 1999; 24-3-12.

Schmidt HH-J, Dugi K, Hill S, Makariou EV, Feuerstein IM, Hoeg JM: Relation of Cholesterol-year score to severity of calcific atherosclerosis tissue deposition in homozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 1996; 77:575-580.

Schmidt HH-J, Gutierrez B, Schneider A, Jobs J, Korte A, Manns MP, Stuhmann M: Homozygous familial Hypercholesterolemia: a novel point mutation (W556) in a turkish patient. *Hum Mut* 2000; 16:374.

Schmidt HH-J, Manns MP: Ophthalmologische Aspekte bei Patienten mit Dyslipidämien. *Deutsches Ärzteblatt* 1995; 92:2389-2393.

Schmidt HH-J, Tietge UJ, Cichon G, Genschel J, Heeren J, Gielow P, Grewe N, Dogar M, Baisiegel U, Manns MP, Lochs H, Burchert W: A sensitive noninvasive method for monitoring successful liver-directed gene transfer of the low-density lipoprotein receptor in Watanabe hyperlipidemic rabbits in vivo. *Gene Ther* 2004; 11:574-580.

Schmidt HH-J, Ebhard M, Doerk T, Tietge U, Haas R, Manns MP, Schmidtke J, Stuhmann M: Mutation analysis in 46 German families with familial hypercholesterolemia: Identifikation of 8 new mutations. *Hum Mutation* 1999; 13:257.

Scholtz CL, Peeters AV, Hoogendijk CF, Thiarth R, Villiers JNP, Hillermann R, Lui J, Marais AD, Kotze MJ: Mutation -59c→t repeat 2 of the LDL receptor promotor: reduction in transcriptional activity and possible allelic interaction in a South african family with familial hypercholesterolemia. *J Hum Mol Gen* 1999; 8:2025-2030.

Schuster H: Genetische Ursachen der Hypercholesterinämie und ihre Verknüpfung mit Gefäßerkrankungen, in Ganton D, Ruckpaul K (Hrsg): *Handbuch der Molekularen Medizin, Band 3 Herz-Kreislauf Erkrankungen*. Springer-Verlag. Berlin -Heidelberg -New York 1998; 325-342.

Schuster H, Keller C, Wolfram G, Zöllner N: Ten LDL receptor mutants explain one third of familial hypercholesterolemia in a German sample. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:2176-2180.

Slimane MN, Lestavel S, Clavey Y, Maatouk F, Ben Fahrath MH, Fruchart JC, Hammami M, Benlian P: CYS127S (FH-Kairouan) and D245N (FH-Tozeur) mutations in the LDL receptor gene in Tunisian families with familial hypercholesterolaemia. *J Med Genet* 2002; 39:e74.

Soufi M, Sattler AM, Maerz W, Starke A, Herzum M, Maisch B, Schaefer JR: A new but frequent mutation of apoB-100-apoB His3543Tyr. *Atherosclerosis* 2004; 174:11-16.

Sozen MM, Whittall R, Oner C, Tokatli A, Kalkanoglu HS, Dursun A, Coskun T, Oner R, Humphries SE: The molecular basis of familial hypercholesterolaemia in Turkish patients. *Atherosclerosis*. 2005; 180:63-71.

Stamler J, Wenworth D, Neaton JD: Is relationship between serum cholesterol and risk premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356, 222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 1986; 256:2823-2928.

Stary, HC: Evolution and progression of the atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 1989; 9:119-32.

Sary, HC: Macrophages, macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis* 1987; 64:91-108.

Sary, HC: The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J* 1990; 11 Suppl E:3-19.

Sary HC: Pathologie der Atherosclerose, in Schwandt P, Richter WO (eds): *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. 11th ed. Schattauer:Stuttgart-New York. 1995; 48-64.

Steinberg D: Underlying mechanisms in atherosclerosis. *J Pathol* 1981; 133:75-87.

Steinberg D: Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy: part I. *J Lipid Res* 2004; 45:1583-1593.

Steinberg D. Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation* 1987; 76:508-514.

Steinberg D: Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis. *J Intern Med* 1993; 233:227-232.

Stryer L: Die Erforschung der Gene. *Biochemie Spektrum* 1996; Vol. 4:123-151.

Stryer L: Struktur und Funktion der Proteine. *Biochemie Spektrum* 1996; Vol 4. 4:17-41.

Sun X-M, Webb JC, Gudnadson V, Humphries S, Seed M, Thompson GR, Knight BL, Soutar AK: Characterization of deletions in the LDL receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia in the UK. *Arterioscler Thromb* 1992; 12:762-770.

Thejedor D, Castello S, Mozas P, Jimenez E, Lopez M, Tejedor MT, Artieda M, Alonso R, Mata P, Simon L, Martinez A, Pocovi M: Spanish FH Group: Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 2005; 51:1137-1144.

Thiart R, Loubser O, de Villiers JNP, Marx MP, Zaire R, Raal FJ, Kotze M: Two novel and two known low-density lipoprotein receptor gene mutations in German patients with familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat Supp* 1998; 1:232-233.

Thiery J, Teupser D, Fiedler GM: Lipide und Störungen des Lipoproteinstoffwechsels. 2003. In: Renz H (Hrsg) *Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin*. 1. Aufl. Walter de Gruyter Verlag, Berlin.

Traeger-Synodinos J, Mavroidis N, Kanavakis E, Drogari E, Humphries SE, Day INM, Kattamis C, Matsaniotis N: Analysis of low density lipoprotein receptor gene mutations and microsatellite haplotypes in Greek Fh heterozygous children: six independent ancestors account for 60% of probands. *Hum Genet* 1998; 102:343-347.

Twisk J, Gillian-Daniel DL, Tebon A, Wang L, Barrett PHR, Attie AD: The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *J Clin Invest* 2000; 105:521-532.

Umas-Eckenhausen MA, Sijbrands EJ, Kastelein JJ, Defesche JC: Low-density lipoprotein receptor gene mutations and cardiovascular risk in a large genetic cascade screening population. *Circulation* 2002; 106:3031-3036.

Utermann G: Apolipoprotein E mutants, hyperlipidemia and arteriosclerosis. *Adv Exp Med Biol* 1985; 183:173-188.

Varret M, Rabes JP, Collod-Beroud G, Junien C, Boileau C, Beroud C: Software and database for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:172-180.

Villegier L, Abifadel M, Allard D, Rabes JP, Thiart R, Kotze MJ, Berould C, Junien C, Boileau C, Varret M: The UMD-LDLR database: additions to the software and 490 new entries to the database. *Hum Mutat* 2002; 20:81-87.

West of Scotland Coronary Prevention Study Group: Influence of Pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 1998; 97:1440-1445.

Weiss N, Binder G, Keller C: Mutations in the low-density lipoprotein receptor gene in German patients with familial hypercholesterolemia. *J Inherit Metab Dis* 2000; 23:778-790.

Whittall RA, Matheus S, Granston T, Miller GJ, Humphries SE: The intron 14 2140+5G>A variant in the low density lipoprotein receptor gene has no effect on plasma cholesterol levels. *J Med Genet* 2002; 39:e57.

Widhalm K, Heinrich K, Reithofer E: Therapie der Familären Hypercholesterinämie mit einfach ungesättigten Fettsäuren. *J Ernährungsmed* 2001; 3:7-10.

WHO (2003). WebSite: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr72/en/> und <http://who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/cvd/en/>

Windler E: Hypercholesterolemia. *Deutsch Med Wochenschr.* 1994; 119(48):1677.

Xenophontes SL, Pierides A, Demetriou K, Avraamides P, Manoli P, Ayrton N, Scordis N, Anastasiadou V, Militiadous G, Cariolou MA: Geographical clustering of the low density lipoprotein receptor gene mutations (C292X, Q363X, D365E&C660X) in Cyprus. *Hum Mutat* 2000; 15:380-384.

Yu W, Nohara A, Higashikata T, Lu H, Inazu A, Mabuchi H: Molecular genetic analysis of familial hypercholesterolemia: spectrum and regional difference of LDL receptor gene mutations in Japanese population. *Atherosclerosis* 2002; 165:335-342.

Zakharova FM, Damgaard D, Mandelshtam MY, Golubkow VI, Nissen GG, Stenderup A, Lipovetsky BM, Konstantinov VO, Denisenko AD, Vasilyev VB, Faergeman O: Familial hypercholesterolemia in St-Petersburg: the known and novel mutations found in the low density lipoprotein receptor gene in Russia. *BMC Med Genet* 2005; 8:6:6.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Apo	Apolipoprotein
Apo B48	Apolipoprotein B48
Aqua bidest	Zweifach destilliertes Wasser
CARE-Studie	„Cholesterol And Recurrent Events“- Studie
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
CK	Kreatininkinase
CM	Chylomikronen
DNA	Desoxynucleinsäure
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EL	Endotheliale Lipase
ELAM	Endothelial leukocyte adhesion factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCR	Fraktionelle Katabole Rate
FDB	Familiär defektes Apolipoprotein B
HCl	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDL	High density Lipoprotein Lipoproteine hoher Dichte
IDL	Intermediate density lipoprotein Lipoproteine intermediärer Dichte
HTGL	Hepatische Triglycerid-Lipase
KHK	Koronare Herzerkrankung
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase
Lp (a)	Lipoprotein (a)
LDL	Low Density Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
LDL-R	Low Density Lipoprotein Rezeptor
LRP	LDL-Rezeptor Related Protein
LTx	Lebertransplantation
MAG	Monoacylglyceride

MG	Molekulargewicht
MRFIT	Multiple Risk Factor Intervention Trial
MTP	Microsomal Transfer Protein
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PDGE	Platelet derived growth factor
PROCAM- Studie	Prospektive Cardiovaskulare Münster-Studie
RFLP	Restriktionensfragmentlängen-Polymorphismen
TG	Triglyceride
TGF- β	Transforming growth factor β
VLDL	Very Low Density Lipoprotein Lipoproteine sehr niedriger Dichte
WHO	World Health Organisation
WOSCOPS	West of Scotland Coronary Prevention Study
4S-Studie	Scandinavian Simvastatin Survival Studie
γ -GT	Gamma-Glutamyl-Transferase

9 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die das Entstehen dieser Dissertation möglich gemacht haben.

Herrn Prof. Dr. med. H. Lochs danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Dissertation in seiner Abteilung.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Hartmut H-J Schmidt möchte ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung der Arbeit herzlichen danken, ohne die die Erstellung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Meinen großer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Janine Büttner für ihre wertvollen Anregungen und ihre Bereitschaft Fragestellungen zu diskutieren und zu kommentieren.

Frau Bettina Bochow und Renita Weltrich möchte ich meinen besonderen Dank ausdrücken, für die unermüdliche Unterstützung und die geduldige Anleitung bei den Experimenten.

Anschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, meinen Schwiegereltern, meiner Familie und meinen Freunden für ihr Verständnis, ihre Motivation und ihre Unterstützung bedanken.

DANKE!

10 Erklärung

„Ich, Sodnomtsogt Lkhagvasuren, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Molekularbiologische Charakterisierung des LDL-Rezeptor Gens bei Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Sodnomtsogt Lkhagvasuren

15.02.2007

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der Elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.