

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Innere Medizin, III. Medizinische Klinik und Poliklinik
Direktor: Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl

**Häufigkeit von seltenen Varianten im Lipoproteinlipase (LPL) Gen bei
Patienten mit moderater Hypertriglyzeridämie (HTG), ohne Diabetes
mellitus Typ2 (DM2)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Julian Arzer
aus Hamburg

Hamburg 2013

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 07.04.2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. F. U. Beil

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. M. Merkel

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. J. Aberle

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einführung.....	1
1.1. Genetik komplexer Krankheiten.....	1
1.2. Lipoproteinlipase (LPL).....	3
1.2.1. Struktur, Expression, Synthese.....	3
1.2.2. Funktion der LPL.....	5
1.2.3. LPL-Polymorphismen.....	5
1.2.3.1. T-93G (T-120G).....	6
1.2.3.2. D9N (D36N).....	7
1.2.3.3. N291S (N318S).....	7
1.2.3.4. G188E (G215E).....	7
1.2.3.5. S447X (S474X).....	8
1.2.4. LPL-Gensequenz.....	8
1.3. LPL-Defizienzen.....	10
2. Arbeitshypothese und Fragestellung.....	11
3. Material und Methoden.....	12
3.1. Material.....	12
3.1.1. Geräte und Arbeitsmittel.....	12
3.1.2. Chemikalien.....	13
3.1.3. Arbeitskits.....	13
3.1.4. Enzyme und Primer.....	13
3.1.5. Pufferlösung.....	14
3.2. Methoden.....	14
3.2.1. Klinische Parameter des Patientenkollektivs.....	14
3.2.2. DNA-Isolierung.....	15
3.2.3. PCR.....	16
3.2.3.1. Hot-Start PCR.....	16
3.2.3.2. Optimierung der Hybridisierungstemperatur.....	17
3.2.4. Gelelektrophorese.....	18
3.2.5. Reinigung der PCR-Produkt.....	19
3.2.6. DNA-Sequenzierung.....	19
3.2.7. Fällung der DNA.....	20
3.2.8. Bioinformatische Auswertung.....	20
4. Ergebnisse.....	22
4.1. Hotstart-PCR.....	22
4.2. Sequenzierungen.....	23
4.2.1. Exon 1.....	23
4.2.2. Exon 2.....	25
4.2.3. Exon 3.....	26
4.2.4. Exon 4.....	27
4.2.5. Exon 5.....	28
4.2.6. Exon 6.....	29
4.2.7. Exon 7.....	30
4.2.8. Exon 8.....	31
4.2.9. Exon 9.....	32
4.3. Varianten in dem codierenden Bereich des LPL-Gens.....	33

5. Diskussion.....	36
6. Abbildungs –und Tabellenverzeichnis.....	40
6.1. Abbildungen.....	40
6.2. Tabellen.....	40
7. Literaturverzeichnis.....	41
Danksagung.....	45
Eidesstattliche Versicherung.....	46

Abkürzungsverzeichnis

a	Jahre
ANGPTL4	Angiopoetin-like protein 4
ANGPTL3	Angiopoetin-like protein 3
Apo	Apolipoprotein
AS	Aminosäuren
Asp	Asparaginsäure
BMI	body mass index
bp	Basenpaare
CDCV-Hypothese	common disease common variant Hypothese
CDRV-Hypothese	common disease rare variant Hypothese
dd`NTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
dl	Deziliter
d`NTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus Typ 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
GPIHBP1	GPI-anchored HDL-binding protein
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien
HDL	high density lipoprotein
His	Histidin
HL	hepatische Lipase
HTG	Hypertriglyzeridämie
kb	Kilobasenpaare
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	low density lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mRNA	messenger RNA
nm	Nanometer
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
PL	Pankreaslipase
rpm	rounds per minute
Ser	Serin
SNP	single nucleotide polymorphism
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA
TG	Triacylglyceride
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultraviolett
V	Volt
VLDL	very low density lipoprotein

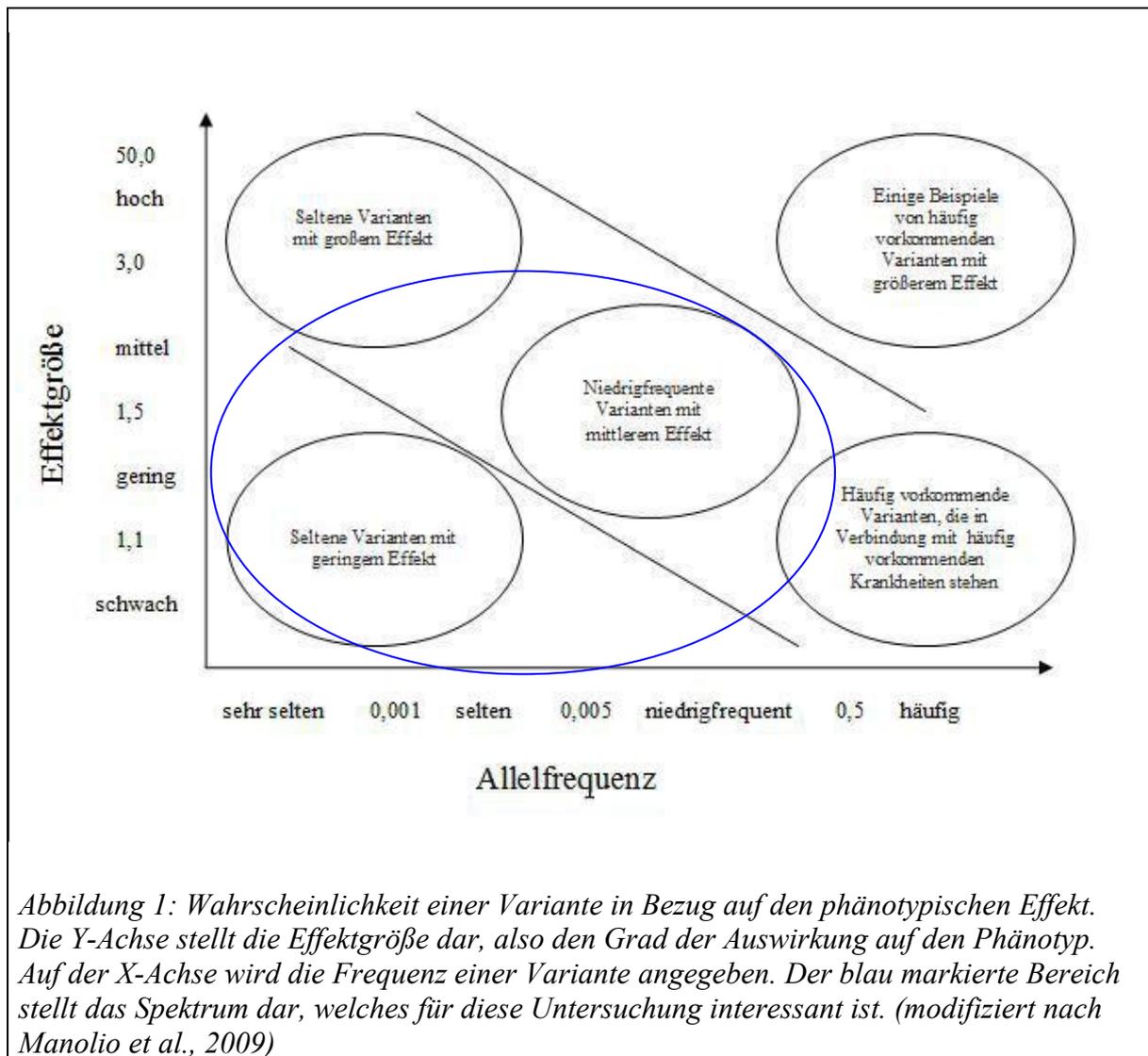
1. Einführung

1.1. Genetik komplexer Krankheiten

Seit langem versucht die Wissenschaft den genetischen Einfluss auf Krankheiten zu erforschen. Ist eine genetische Variante in einem bestimmten Gen überwiegend verantwortlich für den Ausbruch einer Krankheit, so spricht man von einer monogenetischen Krankheit. Hierbei lässt sich in der Regel ein typisches Vererbungsmuster erkennen. Dieses kann dominant oder rezessiv sein. Bei dem dominanten Erbgang genügt das Vorliegen eines Risikoallels, bei dem rezessiven Erbgang müssen zwei Risikoallele vorhanden sein, damit die Krankheit ausbricht. Ein Beispiel für den autosomal-dominanten Erbgang ist Chorea Huntington. Chorea Huntington hat eine vollständige Penetranz, d.h. dass diese Krankheit bei allen Merkmalsträgern ausbricht, egal ob der Patient homozygot oder heterozygot ist.

Komplexe Krankheiten hingegen entstehen durch das Zusammenspiel genetischer Einflüsse und Umweltfaktoren im weiteren Sinne. Es sind fast immer mehrere Gene daran beteiligt. So können sich verschiedene Varianten in den relevanten Genen modulierend auf den Phänotyp auswirken – sie können einander verstärken oder abschwächen. Hinzu kommt, dass Umwelteinflüsse einen beträchtlichen Anteil an der Ausprägung einer komplexen Erkrankung tragen. Dadurch, dass bei komplexen Krankheiten mehrere Gene beteiligt sind, ist die Penetranz, also der Einfluss einer einzelnen Variante eher gering, da diese allein nicht zwingend zum Ausbruch einer Erkrankung führt. Typische komplexe Krankheiten sind Diabetes mellitus (DM), Krebs und Herz-Kreislaufkrankungen, wie die koronare Herzkrankheit (KHK).

Abbildung 1 zeigt den Zusammenhang zwischen der Häufigkeit und der Effektgröße einer genetischen Variante. Häufig vorkommende Varianten, z.B. funktionell relevante single nucleotide polymorphisms (SNP), haben in der Regel nur einen geringen Einfluss auf den Phänotyp eines Individuums und kommen relativ häufig vor. Des Weiteren gibt es niedrigfrequente Varianten, die einen mittleren Effekt auf den Phänotyp haben und seltene Varianten mit einem hohen Effekt. Dennoch kann man aufgrund der Häufigkeit keine pauschalen Rückschlüsse auf die Effektgröße ziehen. So gibt es ebenso häufig vorkommende Varianten, die einen großen Einfluss auf den Phänotyp haben und seltene Varianten mit einem geringen Effekt.



In der Mehrzahl resultieren, z.B. erhöhte oder erniedrigte Cholesterin -und Triacylglyceride (TG) aus einem komplexen, multigenetischen Geschehen, welches durch äußere Gegebenheiten beeinflusst wird. Die „common disease common variant“ Hypothese (CDCV-Hypothese) geht davon aus, dass Krankheiten durch gewöhnliche Varianten hervorgerufen werden, die eine relativ hohe Frequenz in der Bevölkerung aufweisen. Die „common disease rare variant“ Hypothese (CDRV-Hypothese) geht hingegen davon aus, dass Krankheiten durch seltene Varianten hervorgerufen werden, die eine relativ geringe Frequenz in der Bevölkerung besitzen. Gleichzeitig haben diese aber einen stärkeren Einfluss auf den Phänotyp eines Individuums, als häufig vorkommende Varianten. Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) eignen sich gut, um neue Loci im Genom zu identifizieren, die mit komplexen Krankheiten assoziiert sind. Diese vorher noch nicht beschriebenen Loci können sowohl in codierenden, als auch in den nicht-codierenden Bereichen des Genoms liegen (Manolio et al., 2009). Sie sind allerdings nicht in der Lage die gesamte genetische Grundlage

einer komplexen Krankheit darzulegen, da sie nur relativ häufig vorkommende Varianten berücksichtigen. GWAS vermögen Assoziationen bestimmter Varianten mit einer Krankheit herzustellen, auch wenn diese nicht in den typischen Kandidatengenomen liegen. Allerdings erkennen sie nicht die seltenen Varianten, die mit komplexen Krankheiten assoziiert sind. GWAS vergleichen die Allele erkrankter Patienten mit denen einer gesunden Kontrollgruppe über das gesamte Genom hinweg. Die seltenen Varianten, die ebenfalls mit einer komplexen Krankheit assoziiert sein können, lassen sich unter anderem durch Resequenzierungsstudien einzelner Kandidatengene herausfinden.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss genetischer Varianten auf die Entwicklung einer HTG dargestellt. Die LPL eignet sich besonders für die Untersuchung des genetischen Einflusses gewöhnlicher und seltener Varianten auf den Fettstoffwechsel. Sie ist ein Schlüsselenzym im Fettstoffwechsel und wurde bereits in diversen Studien untersucht. Das LPL-Gen stellt also ein geeignetes Kandidatengen für die Untersuchung von Fettstoffwechselstörungen dar. So sind beispielsweise die funktionellen SNPs D9N und N291S eindeutig mit signifikant erhöhten TG assoziiert, wohingegen S447X mit signifikant verringerten TG einhergeht (Busca et al, 1995; Mailly et al., 1995; Sagoo et al., 2008). Die seltene Variante G188E in Exon 5 des LPL-Gens führt zu einem Funktionsverlust des Enzyms. Ziel dieser Untersuchung ist nun herauszufinden, ob seltene Varianten im LPL Gen bei Patienten mit moderat erhöhten TG vermehrt auftreten.

1.2. Lipoproteinlipase (LPL)

1.2.1. Struktur, Expression, Synthese

Das LPL-Gen umfasst zehn Exons und erstreckt sich über 30kb auf Chromosom 8p22. Das erwachsene Protein besteht aus 448 Aminosäuren (AS) und wird primär in Geweben mit einem hohen Fettsäuremetabolismus exprimiert, also im Fettgewebe, im Herzmuskel und in der

Größe:	448 Aminosäuren
Kofaktor:	ApoC2
Gen-Namen:	LPL; LIPD
IDs:	OMIM: 238600
	UniProt: P06858
	MGI: 96820
EC-Nummer:	3.1.1.34 Lipase
Reaktionsart:	Hydrolyse
Substrat:	Triacylglycerol + H ₂ O
Produkte:	Diacylglycerol + Fettsäure

Skelettmuskulatur. Außerdem wird LPL von den Inselzellen der Bauchspeicheldrüse und von Makrophagen gebildet (Wang & Eckel; 2009). Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) codiert ein 475 AS großes Peptid, von dem allerdings das 27 AS große, hydrophobe Signalpeptid vor

der Aktivierung abgespalten wird (Braun und Severson, 1992). Das Molekulargewicht liegt bei 50394 Dalton. Sie weist eine nahe Verwandtschaft zu der Pankreaslipase (PL) und zu der hepatischen Lipase (HL) auf, die alle zu der großen Genfamilie der neutralen Lipasen zählen. Diese Verwandtschaft lässt sich an der hohen Konservierung der LPL nachvollziehen. So ist die katalytischen Triade Ser-Asp-His der LPL sowohl in der HL, als auch in der PL zu finden (Hide et al., 1992; Rutledge et al., 1997). Alle drei Lipasen spalten TG durch Hydrolyse. Die funktionellen Areale des erwachsenen Proteins korrespondieren mit den Exons des LPL-Gens. Exon 1 codiert das Signalpeptid, Exon 2 ein N-terminales Glykosilierungsareal, Exon 4 die Grenzfläche der Lipid-bindenden Region, Exon 5 das aktive Zentrum mit der Aminosäure-Sequenz Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly (Xaa = alle Aminosäuren, außer Prolin), Exon 6 die Heparin-bindende Domäne, Exon 8 ein weiteres N-gekoppeltes Glykolisierungsareal und Exon 10 das nicht translatierte 3'-Ende (Braun et al., 1992).

Die LPL ist ein Homodimer, das mit ihrem katalytischen Zentrum in das Gefäßlumen der Kapillaren ragt (Santamarina-Fojo und Brewer, 1994). Sie besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die nicht-kovalent gebunden sind (Osborne et al., 1985). Synthetisiert wird die LPL allerdings nicht in den Endothelzellen, sondern in den Parenchymzellen des jeweiligen Gewebes (Camps et al., 1990; Braun und Severson, 1992). Nach der Transkription im Zellkern wird die messenger RNA (mRNA) im rauen Endoplasmatischen Retikulum translatiert und N-glykosyliert. Hier findet auch die Dimerisierung des Proteins statt, bevor die aktive LPL in das cis-Netzwerk des Golgi-Apperates transferiert wird, wo es weiter prozessiert wird, indem Oligosaccharidketten angefügt werden. Anschließend verlässt die LPL das trans-Golgi-Netzwerk und wird an Heparansulfat gebunden auf der Zelloberfläche der Parenchymzellen präsentiert. Zuletzt findet eine Translokation der LPL an die luminalen Seite der Endothelzellen statt, wo die Hydrolyse der TG stattfindet (Braun und Severson, 1992). Die LPL ist mit der Heparinbindungstelle an Proteoglykanen der Endothelzellen gebunden. Nach Heparinabgabe löst sich die LPL ab und es kommt zu einer erhöhten LPL-Aktivität im Plasma (post-Heparin-lipolytische-Aktivität). Dies beruht auf der höheren Affinität der LPL zu Heparin, als zu den endothelialen Proteoglykanen.

Angiopoetin-like protein 4 (ANGPTL4) konvertiert das LPL-Homodimer in zwei inaktive Monomere, die eine herabgesetzte Affinität zu Heparin besitzen. ANGPTL4 führt zu einem Abbau der aktiven LPL und dadurch zu einem Anstieg der TG im Blut (Sukonina et al., 2006). Ein Modell mit transgenen Mäusen zeigt den Einfluss von ANGPTL4 im Herzmuskel und verdeutlicht den Einfluss der LPL auf die Akkumulation von TG in den Kapillaren und dem daraus resultierenden Athereoskleroserisiko (Yu et al., 2005). Die Regulation der LPL

über die Ernährung findet hauptsächlich posttranslational statt. Eine Studie hat bestätigt, dass die LPL-Aktivität, die LPL-Masse und das Verhältnis zwischen dem Monomer und dem Homodimer im Fettgewebe durch die Ernährung gesteuert werden, wohingegen diese Parameter im Herzen nahezu konstant bleiben. Während die LPL-Aktivität im Fettgewebe nach nächtlichem Fasten um 70-80% reduziert war, wurde lediglich ein Rückgang der LPL-Masse von 20-30% verzeichnet. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Verhältnis zwischen dem Monomer und dem Dimer in Richtung des inaktiven LPL-Monomers verschoben ist (Bergö et al., 1996). Dies lässt sich auf ANGPTL3 -und 4 zurückführen, welche die LPL in ihrer Aktivität inhibieren. Dies hängt davon ab, ob sich der Organismus in dem Stadium der Nahrungsaufnahme oder der Nahrungskarenz befindet (Köster et al., 2005).

1.2.2. Funktion der LPL

Die LPL wird durch die C-terminale (1 bis 312 AS) -und die N-terminale (313 bis 448AS) Domäne organisiert. Die C-terminale Domäne ist wichtig für die katalytische Funktion der LPL, während die N-Terminale Domäne für die Interaktion mit den Proteoglykanen der Zellmembran zuständig ist.

Die C-Domäne übernimmt die katalytische Funktion der LPL, die in der Hydrolyse von TG aus Chylomikronen und „very low density lipoprotein“ (VLDL) besteht. Als Cofaktor fungiert hierbei das Apolipoprotein C2 (ApoC2). Die LPL nimmt durch ihre katalytische Funktion also direkten Einfluss auf die Menge an TG im Plasma. Aufgrund der gewebsspezifische Expression der LPL postulierten Greenwood et al. die Gatekeeper-Hypothese, nach welcher das Maß der Hydrolyse der TG von der, in den Geweben gebildeten LPL limitiert wird. Die Menge der gebildeten LPL nimmt also Einfluss auf die Entwicklung einer Adipositas (Greenwood, 1985). Eine Überexpression der LPL in Kardiomyozyten führt zu Myopathien des Herzmuskels und manifestiert sich in Arteriosklerose, die zu einem Herzinfarkt führen kann. Diese Überfunktion kann aber gleichzeitig eine Unterexpression der LPL in anderen Geweben kompensieren (Yagyu et al., 2003).

Mausmodelle haben gezeigt, dass die selektive Aufnahme von Cholesterinestern (CE) aus den Lipoproteinpartikeln in die Zellen durch LPL getriggert wird. Hierbei kann die LPL auch in ihrer katalytisch inaktiven Form vorliegen (Merkel et al., 2002). Dies weist auf die nicht-katalytische Funktion der LPL im Fettstoffwechsel hin.

1.2.3. LPL-Polymorphismen

Im Folgenden sind vier häufige Varianten und die seltene Variante G188E beschrieben. Der erste Buchstabe bezeichnet die AS des Wildtyp, die Zahl das Codon und der zweite Buchstabe

die AS für welche die Variante codiert. Die Aminosäuresequenz wird mit Hilfe des Ambiguity Code dargestellt. In dieser Arbeit wird die in der internationalen Literatur gängige Nomenklatur verwendet. In Klammern ist die neuere Nomenklatur angegeben, die bei der LPL das Signalpeptid des immaturren Proteins mitzählt.

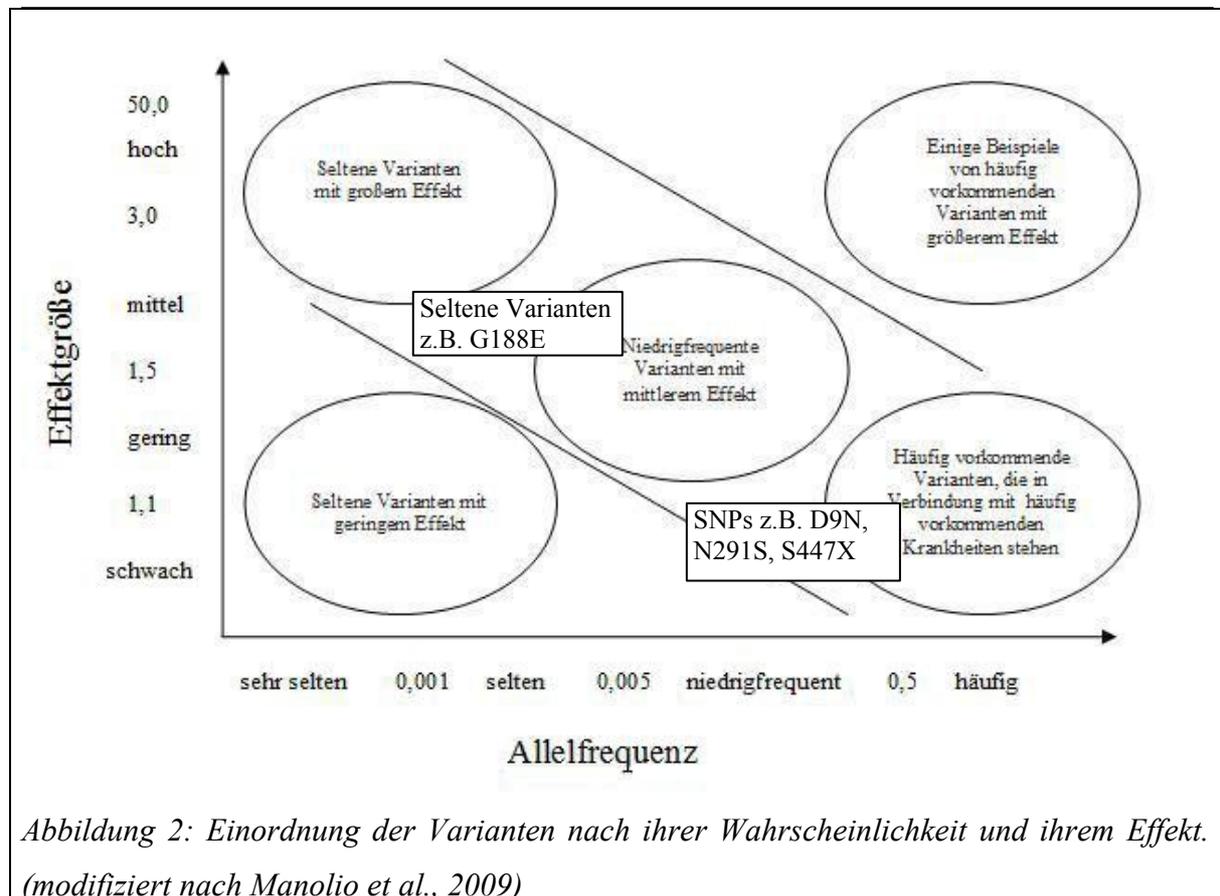


Abbildung 2: Einordnung der Varianten nach ihrer Wahrscheinlichkeit und ihrem Effekt. (modifiziert nach Manolio et al., 2009)

1.2.3.1. T-93G (T-120G)

Der T-93G Polymorphismus hat eine Frequenz von 1,6% (n=10395) (Sagoo et al., 2008). Hier wird in der Promotorregion des LPL-Gens Threonin durch Glycin ersetzt. Während der D9N Polymorphismus immer mit T-93G vergesellschaftet ist, müssen Träger des T-93G Allels nicht zwingend den D9N Polymorphismus aufweisen (Hall et al.). Es besteht ein starkes Kopplungsungleichgewicht zwischen D9N in Exon 2 und T-93G in der Promotorregion der LPL (Kastelein et al., 1998). Doppelt heterozygote Träger leiden an erhöhten TG im Plasma und einem erhöhten Risiko für KHK (Wittrup et al., 1999).

1.2.3.2. D9N (D36N)

D9N ist eine Punktmutation in Exon 2. Es wird Asparaginsäure durch Asparagin ersetzt. Dieser Polymorphismus hat eine Frequenz von 2,1% (n=10395) (Sagoo et al., 2008) und führt zu einem Anstieg der TG um 25% und einer herabgesetzten „high density lipoprotein“ (HDL)-Konzentration (Mailly et al., 1995; Fisher et al., 1997). D9N liegt in der N-Domäne nahe eines Glykolisierungsareals, das vermutlich Einfluss auf das aktive Zentrum nimmt (Wittrup et al., 1999). Dieser Polymorphismus ist immer mit T-93G in der Promoterregion vergesellschaftet (Hall et al., 1997).

1.2.3.3. N291S (N318S)

N291S ist eine Punktmutation in Exon 6. Dieser Polymorphismus hat eine Frequenz von 2,5% (n=24145) (Sagoo et al., 2008). Hier wird Asparagin durch Serin ersetzt und führt ähnlich, wie D9N zu einem Anstieg der TG und einem herabgesetzten HDL-Spiegel (Wittekoek et al., 1998). N291S liegt am N-terminalen Ende in der Heparinbindungsstelle und nimmt dadurch Einfluss auf die Interaktion zwischen der LPL und den Proteoglykanen der Zellmembran (Wittrup et al., 1999). Der Grad der Dyslipidämie hängt allerdings von weiteren Faktoren ab. So können diese Parameter bei Patienten ohne erhöhten BMI noch im Normbereich liegen, wohingegen N291S in Verbindung mit einem hohen BMI zu massiv erhöhten TG führt (Fisher et al., 1995).

1.2.3.4. G188E (G215E)

G188E kann auf Grund der geringen Häufigkeit von 0,03% (n=8595) nicht zu den gewöhnlichen Mutationen gezählt werden (Sagoo et al., 2008), sondern ist eine seltene Variante. G188E ist eine Punktmutation in Exon 5, bei der Glycin durch Glutaminsäure ausgetauscht wird, die zu einer Inaktivierung des Enzyms führt. Daraus resultiert eine HTG Typ I (Braun et al., 1992).

Diese Variante ist in dem lipidbindenden, aktiven Zentrum der LPL lokalisiert und verhindert die Bindung von TG an die LPL. Dies erklärt den erhöhten TG-Spiegel und das verringerte HDL-Chol im Plasma (Wittrup et al., 1999). Daraus resultiert ein erhöhtes Risiko für KHK.

Eine Studie hat gezeigt, dass ein homozygoter Träger dieser Mutation mit Chylomikronämie und einem Plasma-TG-Spiegel von >9mmol/l, aber ohne weiteren Risikofaktor für Atherosklerose, keine klinisch relevante Koronarsklerose hatte. Dies haben Untersuchungen der Koronararterien ergeben (Ebara et al., 2007).

1.2.3.5. S447X (S474X)

S447X ist eine Punktmutation in Exon 9, bei der das Codon 447 des LPL-Gens nicht mehr für Serin, sondern für ein Stopp-Codon codiert. Dies führt dazu, dass die zwei C-terminalen AS fehlen. Die S447X Mutation wirkt atheroprotektiv und schützt vor KHK, indem es die Dimerisierung der LPL fördert. (Wittrup et al., 2002; Wittrup et al., 1999). Diese atheroprotektive Wirkung beruht auf erhöhten HDL-Werten im Plasma (Kuivenhoven et al., 1997) und einem geringeren TG-Spiegel (Sagoo et al., 2008). Diese Mutation hat eine sehr hohe Frequenz von 9,9% (n=20233) (Sagoo et al., 2008).

1.2.4. LPL-Gensequenz

Im Folgenden ist die LPL-Gensequenz dargestellt. Die Zahlen beziffern das jeweilige Codon, das für eine spezifische AS codiert. Die **rot** markierten Buchstaben beschreiben häufig vorkommende, etablierte Varianten. Die in diesem Patientenkollektiv vorkommenden Varianten sind **gelb** unterlegt. G188E (G215E) in Exon 5 ist **grün** markiert. Diese Variante wird nicht zu den häufig vorkommenden Varianten gezählt und ist in der Gendatenbank Ensembl nicht als eine solche gelistet. Die Gensequenz wird mit dem Ambiguity Code dargestellt.

Exon 1

```
1  2  3  4  5  6  7  8  9  10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
ATG GAG AGC AAA GCC CTG CTC GTG CTG ACT CTG GCC GTG TGG CTC CAG AGT CTG ACC
20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
GCC TCC CGC GGA GGG GTG GCC GCC GYC GAC C
```

Exon 2 - D9N (D36N)

```
31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48
AA AGA AGA GAT TTT ATC RAC ATC GAA AGT AAA TTT GCC CTA AGG ACC CCT GAA GAC
49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67
ACA GCT GAG GAC ACT TGC CAC CTC ATT CCC GGA GTA GCA GAG TCC GTG GCT ACC TGT
68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83
CAT TTC AAT CAS AGC AGC AAA ACC TTC ATG GTG ATC CAT GGC TGG ACG
```

Exon 3

```
84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102
GTA ACA GGA ATG TAT GAG AGT TGG GTG CCA AAA CTT GTG GCC GCC CTG TAC AAG AGA
103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121
GAA CCA GAC TCC AAT GTC ATT GTG GTG GAC TGG CTG TCA CGG GCT CAG GAG CAT TAC
122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140
CCA GTG TCC GCG GGC TAC ACC AAA CTG GTG GGA CAG GAT GTR GCC CGG TTT ATC AAC
141 142 143
TGG ATG GAG
```

Exon 4

```
144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162
GAG GAR TTT AAC TAC CCT CTG GAC AAT GTC CAT CTC TTG GGA TAC AGC CTT GGA GCC
```

163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181
CAT GCT GCT GGC ATT GCA GGA AGT CTG ACC AAT AAG AAA GTC AAC AGA ATT ACT G

Exon 5 - G188E (G215E)

182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199
GC CTC GAT CCA GCT GGA CCT AAC TTT GAG TAT GCA GAA GCC CCG AGT CGT CTT TCT
200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218
CCT GAT GAT GCA GAT TTT GTA GAC GTC TTA CAC ACA TTC ACC AGA **GAG** TCC CCT GGT
219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237
CGA AGC ATT GGA ATC CAG AAA CCA GTT GGG CAY GTT GAC ATT TAC CCG AAT GGA GGT
238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256
ACT TTT CAG CCA GGA TGT AAC ATT GGA GAA GCT ATC CGC GTG ATT GCA GAG AGA GGA
257 258 259
CTT GGA G

Exon 6 - N291S (N318S)

260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277
AT GTG GAC CAG CTA GTG AAG TGC TCC CAC GAG CGC **WCC** ATT CAT CTC TTC ATC GAC
278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296
TCT **CKG** TTG AAT GAA GAA AAT CCA AGT AAG **RCC** TAC AGG TGC AGT TCC AAG GAA GCC
297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315
TTT GAG AAA GGG CTC TGC TTG AGT TGT AGA AAG AAC CGC TGC AAC AAT CTG GGC TAT
316 317 **318** 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334
GAG ATC **ART** AAA GTC AGA GCC AAA AGA AGC AGC AAA ATG TAC CTG AAG ACT CGT TCT
335 336 337 338 339 340
CAG ATG CCC TAC AAA G

Exon 7

341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358
TC TTC CAT TAC CAA GTA AAG ATT CAT TTT TCT GGG ACT GAG AGT GAA ACC CAT ACC
359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377
AAT CAG GCC TTT GAG ATT TCT CTG TAT GGC ACC **RTG** GCC GAG AGT GAG AAC **ATY** CCA
378 379 380
TTC **RCT** CT

Exon 8

381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398
G CCT GAA GTT TCC ACA AAT AAG **ACM** TAC TCC TTC CTA ATT TAC ACA GAG GTA GAT
399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417
ATT GGA GAA CTA CTC ATG TTG AAG CTC AAA TGG AAG AGT GAT TCA TAC TTT AGC TGG
418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436
TCA GAC TGG TGG AGC AGT CCC GGC TTC **RCC** ATT CAG AAG ATC AGA GTA AAA GCA GGA
437 438 439 440 441
GAG ACT CAG AAA AA

Exon 9 - S447X (S474X)

442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459
G GTG ATC TTC TGT TCT AGG GAG AAA GTG TCT CAT TTG CAG AAA GGA AAG GCA CCT
460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475
GCG GTA TTT GTG AAA TGC CAT GAC AAG TCT CTG AAT AAG AAG **TSA** GGC TG

1.3. LPL-Defizienzen

Es sind fast 100 Mutationen im LPL-Gen identifiziert, welche die Aktivität der LPL herabsetzen oder die Lipase gänzlich inaktivieren (Murthy et al., 1996). Die Heterozygotenfrequenz beträgt 3-7% (Merkel et al., 2003). Es werden hier seltene Varianten von SNPs unterschieden. Während sich seltene Varianten besonders stark auf die Enzymaktivität auswirken können, wird die Funktion der LPL durch SNPs in der Regel nur moderat verändert.

Die homozygote LPL-Defizienz hat eine Häufigkeit von $1:1 \times 10^6$ und manifestiert sich in dem klassischen Bild einer Hyperlipoproteinämie Typ I nach Frederickson. Diese sehr seltene Erbkrankheit wird autosomal-rezessiv vererbt und kann zum völligen Verlust der LPL-Aktivität führen. Die homozygote LPL-Defizienz tritt in der Regel bereits im Kindesalter auf und löst die typischen Symptome aus: Wachstumsstörungen, kolikartige Bauchschmerzen, eruptive Xanthome, Angina pectoris und rezidivierende Pankreatitiden. Auf Grund der hohen genetischen Vielfalt der LPL kommt es vor, dass compound heterozygote Träger, sich phänotypisch als homozygot erkrankte Patienten mit einer typischen Hyperlipidämie Typ I Symptomatik darstellen. Dies zeigte die Untersuchung eines niederländischen Patienten mit D250N und S251C in jeweils separaten Allelen von Exon 6 im LPL-Gen (Bijvoet et al., 1996).

Die LPL-Defizienz darf nicht mit der ApoC-II-Defizienz verwechselt werden, da diese Krankheit zu den gleichen Symptomen führt, wie die LPL-Defizienz. Allerdings wird die ApoC-II-Defizienz meist erst im Erwachsenenalter erkannt, da die LPL noch eine Restaktivität aufweist.

Heterozygote Mutationen haben eine Häufigkeit von 1:500 in der Bevölkerung. Dabei ist lediglich ein Allel betroffen, wodurch die LPL-Aktivität beeinflusst wird. Im französisch sprechenden Teil Kanadas rund um Quebec ist eine Mutationsrate von 17% aufgetreten (Minnich et al., 1995; Normand et al., 1992). Dies ist auf den sogenannten Gründereffekt zurückzuführen.

2. Arbeitshypothese und Fragestellung

SNPs und seltene Mutationen im LPL-Gen sind mit erhöhten TG assoziiert. Homozygote Träger einer Mutation im LPL-Gen weisen massiv erhöhte TG auf, die sich in Form einer Chylomikronämie manifestieren. Heterozygote Träger von Mutationen im LPL-Gen weisen moderat erhöhte TG auf. Die Inzidenz für eine Homozygotie liegt bei $1:1 \times 10^6$, für eine Heterozygotie hingegen bei 1:500.

Ziel der Arbeit ist es, die Rolle von vereinzelt, seltenen Mutationen im LPL-Gen als genetische Ursache für HTG zu untersuchen. Studien von Wang et al. und Wright et al. haben gezeigt, dass bei Patienten mit extrem erhöhten TG $>875\text{mg/dl}$ im Blut seltene Varianten häufig vorkommen. Wir wollen mit dieser Studie die Häufigkeit von seltenen Varianten bei Patienten mit moderat erhöhten TG untersuchen.

Hierfür definieren wir ein Patientenkollektiv von 40 Patienten aus der Lipidambulanz des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) nach folgenden Kriterien:

- BMI $<25\text{ kg/m}^2$ (Patienten mit einem hohen BMI haben in der Regel erhöhte TG. Weisen die Patienten allerdings einen normalen BMI <25 , bei gleichzeitig erhöhten TG auf, so ist die Wahrscheinlichkeit für eine genetische Ursache höher.)
- TG >95 perzentil für Geschlecht und Alter, aber $<875\text{mg/dl}$

Ausschlusskriterien:

- Diabetes mellitus Typ 2 (wegen der Interaktion des Glucose und Fettstoffwechsels)
- ApoE2/2 (ist assoziiert mit Hyperlipoproteinämie Typ 3)

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte und Arbeitsmittel

Biometra, D-Göttingen:

- T3000 Thermocycler
- Trio-Thermoblock

Eppendorf, D-Hamburg:

- Pipetten diverse Größen
- Reaktionsgefäße diverse Größen

GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH), D-Burgwedel:

- Wärmebad

Gibco BRL, Life Technologies, D-Karlsruhe:

- Horizon Horizontal Gel Electrophoresis System

Greiner Bio-One International AG, A-Kremsmünster:

- Cellstar 50ml & 15ml

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, D-Schwabach:

- Vortexer Typ REAX1

Heraeus Instruments GmbH, D-Hanau:

- Biofuge pico
- Biofuge fresco

Sarstedt AG & Co., D-Nümbrecht:

- Biosphere Fil diverse Größen

Sartorius, D-Göttingen:

- Feinwaage U 4100 S

SoftGenetics, USA-State College

- Mutation Surveyor DNA Variant Analysis Software

Intas Science Imaging Instruments GmbH, D-Göttingen:

- Gel Jet Imager

Herolab GmbH Laborgeräte, D-Wiesloch:

- CleneCab

3.1.2. Chemikalien

Invitrogen, USA-Carlsbad:

- UltraPure Agarose

Mallinckrodt Baker B.V., NL-Deventer

- Ethanol

Merck, D-Darmstadt:

- Essigsäure
- Natriumacetat

Sigma, D-Deisenhofen:

- Mineralöl
- Ethidiumbromid (EtBr)

Qiagen, NL-Venlo:

- RNase-free Water
- GelPilot Loading Dye

Roche Deutschland Holding GmbH, D-Grenzach-Wyhlen:

- DNA Molecular Weight Marker VIII

3.1.3. Arbeitskits

Qiagen, NL-Venlo:

- QIAamp DNA Blood Mini Kit
- QIAquick PCR Purification Kit

3.1.4. Enzyme und Primer

Applied Biosystems, USA-Foster City:

- Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing

Eurofins MWG Operon, D-Ebersberg:

- LPLEXON1F: 5`-AGT GCC GAT CAA ATG TAA TTT A-3`
- LPLEXON1R: 5`-CTC ATC CTC AGT TCG GGT GGC-3`
- LPLEXON2F: 5`-AAC CCT CCA GTT AAC CTC ATA TCC-3`
- LPLEXON2R: 5`-CAC CAC CCC AAT CCA CTC TTC CCC-3`
- LPLEXON3F: 5`-GAA CAG CCG GTT TTC TGG CTC CAG TC-3`
- LPLEXON3R: 5`-GCT AGG TGG GTA TTT TAA GAA AGC TTG TG-3`
- LPLEXON4F: 5`-GAA TTA GTT TTC AGT ATT TCC TAT ATT TG-3`
- LPLEXON4R: 5`-CTC TCA GAA TGA CAG TCT TTT CAC C-3`
- LPLEXON5F: 5`-GCA GTG ACA TGC GAA TGT CAT ACG-3`

- LPLEXON5R: 5`-GGA CAT TGG GTC AAT AAG GGT TAA GG-3`
- LPLEXON6F: 5`-CCA CAT CTC ACC TAT TTT AGA CAT GC-3`
- LPLEXON6R: 5`-GCA GTG AGC ATG ATG AAA TAG GAC TCC-3`
- LPLEXON7F: 5`-GAG TTC CAT GTG TGT GCA CTT CCG G-3`
- LPLEXON7R: 5`-CAG GAG AGG GAC TGG TGC CAT GAT G-3`
- LPLEXON8F: 5`-AAG TGG GGG GCA GGG AGA GCT GAT C-3`
- LPLEXON8R: 5`-CAT CAG GTG GGG GTC TAA AGT GAA GG-3`
- LPLEXON9F: 5`-GAT TCT GAT GTG GCC TGA GTG TGA CAG-3`
- LPLEXON9R: 5`-GCT GGT GAT GGG GTG AAG AGG AAT GC-3`

Qiagen, NL-Venlo:

- HotStarTaq Master Mix

3.1.5. Pufferlösung

TBE-Puffer (1x):

10,8 g Tris Base

5,5 g Borsäure

4 ml 0,5 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA) pH 8,0

1000ml Aqua dest.

3.2. Methoden

3.2.1. Klinische Parameter des Patientenkollektivs

	N	Mittelwert	Minimum	Maximum	Standartabweichung
Alter a	42	38,8214	17,8000	70,4000	+/-14,3470
BMI kg/m ²	42	23,3690	20,8000	24,9000	+/-1,2729
TC mg/dl	42	264,8333	131,0000	400,0000	+/-68,2173
TG mg/dl	42	359,5000	157,0000	858,0000	+/-156,7864
HDL mg/dl	42	43,8810	20,0000	68,0000	+/-10,6798
LDL mg/dl	32	168,9688	38,0000	315,0000	+/-75,4293
ApoB1 mg/dl	42	128,2857	51,0000	218,0000	+/-39,3646
ApoA1 mg/dl	42	130,2381	80,0000	181,0000	+/-21,5642

Tabelle 1: Klinische Parameter des Patientenkollektivs

Das untersuchte Patientenkollektiv umfasst Patienten mit einer moderaten HTG (TG >95 perzentil für Alter und Geschlecht, aber <875mg/dl) mit einem BMI <25. Außerdem sind Patienten mit DM2 und Träger des ApoE2/2 Genotyps ausgeschlossen. DM2 wird ausgeschlossen, da eine Verbindung zwischen dem Glukose- und Lipidstoffwechsel besteht. Der ApoE2/2-Genotyp wirkt sich auf die TG aus, da er eine Rolle bei der Ausbildung eine

Typ-III-Hyperlipoproteinämie spielt. Daher sind diese Patienten ebenfalls ausgeschlossen. Das Patientenkollektiv wurde aus dem multiethnischen Probanden-Pool des UKE zusammengestellt.

3.2.2. DNA-Isolierung

Die Blutproben aus der Lipidambulanz des UKE befinden sich in EDTA-Röhrchen, wodurch verhindert wird, dass das Blut vor der Analyse gerinnt. EDTA ist ein anionischer Komplexbildner, der mit den im Blut befindlichen Kationen Chelatkomplexe eingeht und auf diesem Wege die Blutgerinnung hemmt. Zur DNA-Isolierung eignet sich besonders der Buffy Coat (=Leukozytenfilm), der die Grenzfläche zwischen dem Blutplasma und den Erythrozyten darstellt. Diesen erhält man durch Zentrifugation der Blutprobe.

Mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit von Qiagen lässt sich das gesamte menschliche Genom aus dem Buffy Coat isolieren. Alle Schritte werden bei einer Temperatur von 15-25°C durchgeführt. Zunächst werden 20µl Protease und 200µl des Buffy Coats in ein 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 200µl „AL Puffer“ und anschließendem vortexen wird der Reaktionsansatz für 10 Minuten, bei 56°C in einem Wasserbad inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Durch längere Inkubation würde keine höhere Ausbeute an DNA erzielt werden. Anschließend wird der Ansatz anzentrifugiert und nach Zugabe von 200µl reinem Ethanol ein weiteres Mal für 15 Sekunden gevortext. Nun wird noch einmal anzentrifugiert und der gesamte Ansatz auf eine QIAamp Säule pipettiert, die eine Minute lang bei 13000rpm zentrifugiert wird. Das Filtrat wird entfernt und die Säule in eine frische 2ml Auffangröhre gesteckt. Danach werden 500µl „AW1 Puffer“ auf die Säule gegeben und für eine Minute bei 13000rpm zentrifugiert. Nachdem man die Säule in eine neue 2ml Auffangröhre gegeben hat, werden 500µl „AW2 Puffer“ hinzugefügt und noch einmal für 3 Minuten bei 13000rpm zentrifugiert. Hinterher wird nach Entfernung des Filtrats für eine weitere Minute zentrifugiert, um ein Verbleiben von Pufferüberstand auf der Säule auszuschließen. Im letzten Schritt werden 200µl „AE Puffer“ auf die Säule gegeben, die zuvor in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben wurde. Nach einminütiger Ruhezeit, wird für eine Minute bei 8000rpm zentrifugiert, um die DNA aus der Silikamembran zu waschen und die genomische DNA zu isolieren.

3.2.3. PCR

3.2.3.1. Hot-Start PCR

Zur Amplifizierung der DNA-Abschnitte wird die Hotstart-PCR angewendet. Um die Zielsequenz zu vervielfältigen benötigt man das jeweilige Primerpaar, das an den flankierenden Sequenzen bindet, die vier verschiedenen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und eine hitzestabile Polymerase. Die Hotstart-PCR zeichnet sich dadurch aus, dass die Polymerisation erst startet, wenn die Polymerase aktiviert wird. Dadurch kommt es zu weniger Artefakten bei der anschließenden DNA-Sequenzierung. Das aktive Zentrum der Polymerase ist bei dieser Methode blockiert und wird erst in der Initialisierungsphase freigegeben. Hierbei wird der Reaktionsansatz für 15 Minuten auf 96°C erhitzt, bevor die PCR beginnen kann.

Die PCR verläuft in 33 Zyklen. Jeder Zyklus wiederum gliedert sich in drei Schritte. Zunächst wird der Reaktionsansatz für eine Minute auf 96°C erhitzt, damit sich der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge auftrennt, an denen die Primer binden können. Im Anschluss an die Denaturierung findet die Hybridisierung statt, bei der die Lösung schnell auf 60°C abgekühlt wird. Ein Primer bindet an das 3'-Ende der Zielsequenz und der Andere an das 3'-Ende des zu diesem komplementären Stranges. Im letzten Schritt findet die Elongation statt, bei der die DNA durch die DNA-Polymerase synthetisiert wird. Hierzu wird der Ansatz wieder auf 72°C erhitzt, damit die Synthese vom 5' zum 3'-Ende verlaufen kann. Beim letzten Zyklus wird die Elongationstemperatur für zehn Minuten bei 72°C gehalten. Abgebrochen wird die Reaktion mit dem Beginn des nächsten Zyklus. Daraus resultieren DNA-Sequenzen, die länger sind als die Zielsequenz. Im Idealfall verläuft die Amplifizierung exponentiell. Wenn man von einem einzigen DNA-Strang ausgeht erhält man nach 20 Zyklen eine Million, nach 30 Zyklen eine Milliarde Kopien der Zielsequenz.

Das Volumen des Reaktionsgemisches beträgt 20µl und setzt sich aus 7µl Wasser, 10µl Master Mix und je 1µl Forward und Reverse Primer zusammen. Der Master Mix setzt sich aus Taq-Polymerase, dNTPs und Pufferlösung zusammen. Um eine Kontamination mit Fremd-DNA zu verhindern wird der Reaktionsansatz unter einer PCR-Werkbank angesetzt.

Nach Beendigung der PCR wird die DNA bei 4°C gelagert.

3.2.3.2. Optimierung der Hybridisierungstemperatur

Um die optimale Hybridisierungstemperatur für das jeweilige Exon zu ermitteln werden identische PCR-Ansätze bei einer Hybridisierungstemperatur von jeweils 50°C, 55°C und 60°C angesetzt. Anschließend werden die Proben gelelektrophoretisch ausgewertet.

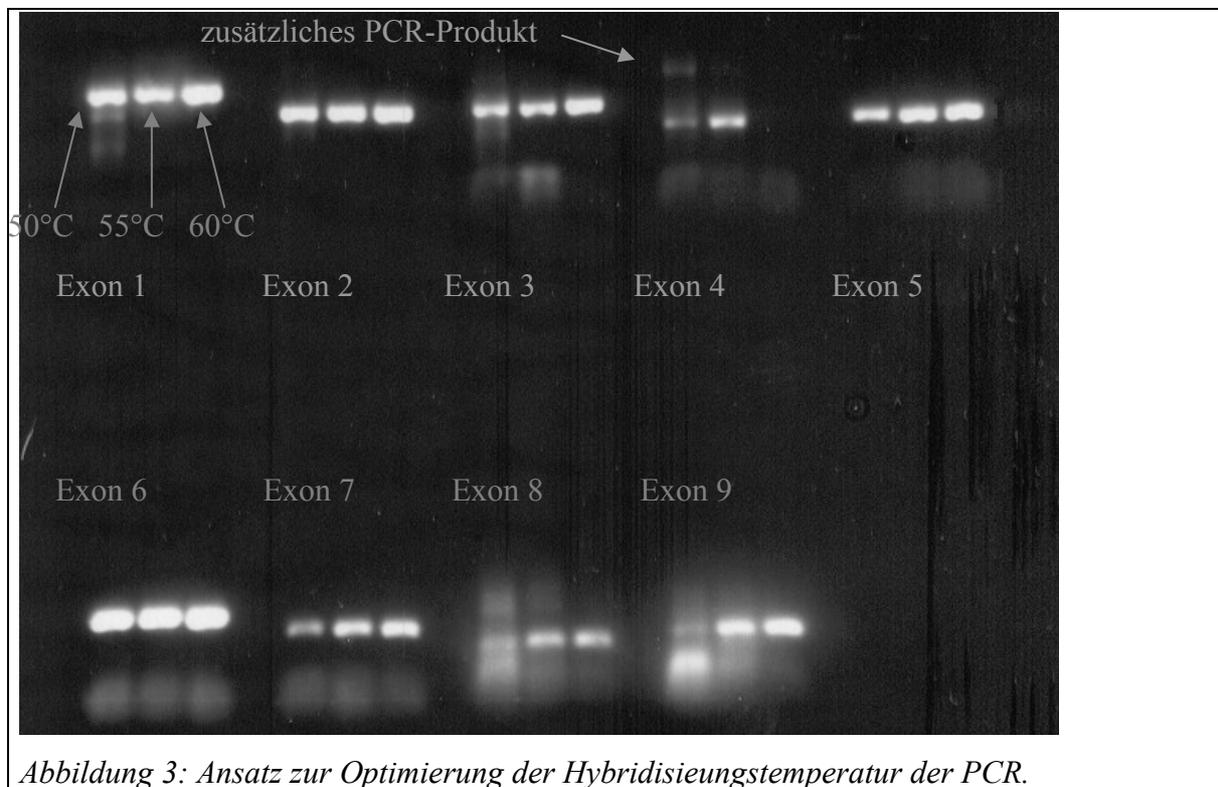


Abbildung 3: Ansatz zur Optimierung der Hybridisierungstemperatur der PCR.

Die Intensität einer Bande gibt Rückschlüsse auf die Menge der amplifizierten DNA. Man wählt jene Hybridisierungstemperatur, bei der eine starke Bande ohne Artefakte zu erkennen ist. Diese Verunreinigungen, welche als heller Schleier imponieren, sind zusätzliche PCR-Produkte und Primerüberschüsse.

Wichtiger als die Menge der DNA ist jedoch die Reinheit des Ansatzes. Je reiner die DNA ist, desto aussagekräftigere Sequenzen erhält man bei der Sequenzierung. In Exon 2 sind alle Banden gleich stark und bei keinem der drei Ansätze sind weitere Banden oder Artefakte zu erkennen. Man entscheidet sich hier für 60°C als Hybridisierungstemperatur, da bei 60°C ein spezifischeres Binden der Primer an der Template-DNA zu erwarten ist, als bei 50°C und 55°C. Dadurch werden Artefakte bei der Sequenzierung vermindert. Es zeigt sich, dass bei 50°C am häufigsten zusätzliche Banden in dem Gel auftreten. Aus diesem Grund wählt man lediglich 55°C und 60°C als Hybridisierungstemperatur aus.

In Exon 4 lässt sich deutlich erkennen, wie entscheidend die richtige Kalibrierung der PCR ist. Bei einer Hybridisierungstemperatur von 50°C wird eine zweite Bande sichtbar. Diese Bande besteht aus DNA-Fragmenten, die größer sind als jene, die man untersuchen will.

Aufgrund ihrer Größe wandert sie langsamer im Agarose-Gel und zeichnet sich daher relativ scharf hinter dem PCR-Produkt ab. Würde man diesen Ansatz sequenzieren, würde diese zusätzlichen PCR-Produkte Artefakte hervorrufen, welche die Qualität der Sequenz herabsetzen. Diese zusätzlichen PCR-Produkte würden bei der Reinigung nicht eliminiert werden, da diese zu groß für die Silicagelmembran des QIAquick PCR Purification Kits sind. Bei einer Hybridisierungstemperatur von 60°C wiederum erhält man bei der PCR von Exon 4 kein brauchbares PCR-Produkt, das man für eine Sequenzierung verwenden könnte. Daher wählt man hier 55°C als Hybridisierungstemperatur aus.

Es ergeben sich folgende Hybridisierungstemperaturen (Annealing-Temperature) für die PCR:

Exon 1: 60°C	Exon 4: 55°C	Exon 7: 60°C
Exon 2: 60°C	Exon 5: 60°C	Exon 8: 60°C
Exon 3: 60°C	Exon 6: 60°C	Exon 9: 60°C

3.2.4. Gelelektrophorese

Um die DNA quantitativ zu untersuchen, wird eine Gelelektrophorese durchgeführt, anhand derer man überprüfen kann, ob die PCR erfolgreich war. Die Gelelektrophorese ist ein analytisches Verfahren, bei welchem die DNA-Fragmente der Länge nach aufgeteilt werden. Dabei wandern die Fragmente im elektrischen Feld gemäß ihrer elektrischen Ladung. Negativ geladene Teilchen wandern zur Anode, während sich positiv geladene Teilchen zur Kathode bewegen. Da die DNA bei einem neutralen pH negative Partialladungen aufweist, wandert sie in Richtung der Anode, wobei die Geschwindigkeit von der Größe der Fragmente abhängig ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit verhält sich etwa umgekehrt proportional zum Molekulargewicht und der Fragmentgröße. Es wird ein einprozentiges Agarose-Gel verwendet, da sich dieses auf Grund seiner relativ großen Poren von etwa 150nm sehr gut zur Trennung von hochmolekularen Verbindungen, wie der DNA im Bereich von 200 bis 500 bp eignet. Um die DNA unter der UV-Lampe sichtbar zu machen, wird sie mit Ethidiumbromid (EtBr) angefärbt. EtBr interkaliert in Nukleinsäuren und verändert dadurch sein Absorptionsspektrum. Seine Fluoreszenz-Emission steigert sich dadurch um den Faktor 50-100. Die mit EtBr markierten DNA-Fragmente absorbieren das UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366nm.

Zur Herstellung des Agarose-Gels wird 1g Agarose in 100ml 1xTRIS-Borat-EDTA (TBE)-Puffer gelöst und aufgekocht. Anschließend werden unter ständigem Rühren 4µl EtBr in das abgekühlte Agarose-Gel gegeben, das nun in einem Gelträger erstarrt. Nach dem Abkühlen

werden die Kämme, die zum Formen der Taschen angebracht wurden, entfernt und das Gel in die Gelkammer gelegt. Nun werden die Taschen mit den Proben beschickt, die aus 2µl PCR-Produkt und 2µl Loading-Puffer zusammengesetzt sind. Die Powersupply wird auf 120V und 86mA eingestellt und das Gel mindestens 30 Minuten laufen gelassen. Nun wird das Gel unter der UV-Lampe fotografiert und anschließend ausgewertet.

3.2.5. Reinigung der PCR-Produkt

Das Hauptziel dieses Schrittes ist die Entfernung von nicht inkorporierten Primern. Bei der Sequenzierung von Exon 1 werden beispielsweise Vorwärts-Primer verwendet. Würden sich in dem Sequenzierungsansatz noch Rückwärts-Primer befinden, würde man sich überlagernde Sequenzen erhalten. Aus diesem Grund ist die Reinigung der PCR essentiell für die spätere Sequenzierung.

Für die Reinigung des PCR-Produktes wird das QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen verwendet, mit dem man DNA-Fragmente von 100bp bis 10kp reinigen kann. Dabei werden überschüssige Primer, dNTPs und Taq-Polymerase abzentrifugiert, um reine DNA zu erhalten.

Hierzu werden 100µl PBI-Puffer zu den 20µl PCR-Produkt in das 0,5ml Reaktionsgefäß gegeben, gut durchmischt und auf die Microsäule pipettiert. Bei einem pH von unter 7,5 und einer hohen Salzkonzentration wird die DNA von einer Silicagelmembran gebunden. Nun wird eine Minute bei 13000rpm zentrifugiert und das Filtrat entfernt. Nachdem man anschließend 750µl PE-Puffer appliziert und ein weiteres mal eine Minute zentrifugiert hat, wird das Filtrat entfernt und noch einmal zentrifugiert. Zuletzt werden 50µl Wasser auf die Membran in der Säule gegeben und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gesteckt. Nun wird eine Minute zentrifugiert. Bevor man die DNA nun sequenziert, wird eine weitere Gelelektrophorese des gereinigten PCR-Produktes durchgeführt.

3.2.6. DNA-Sequenzierung

Zur DNA-Sequenzierung wird die modifizierte Didesoxymethode nach Sanger angewendet, bei der durch kontrollierte Beendigung der enzymatischen DNA-Replikation in-vitro verschieden lange Fragmente entstehen. Grundlage dieser Methode sind die verschiedenfarbig, radioaktiv markierten und fluoreszierenden 2',3'-Didesoxyanaloga, die zum Abbruch der DNA-Replikation führen. Wird ein Didesoxyribonukleosidtriphosphat (ddNTP) von der Taq-Polymerase in den Strang eingebaut, kann dieser nicht verlängert werden. Es wird daher auch von einer Kettenabbruch-Synthese gesprochen. Die entstandenen Kettenabbruchprodukte werden nach der Alkohol-Fällung mittels einer

Kapillarelektrophorese der Länge nach getrennt und die dd`NTPs durch einen Laser zum Fluoreszieren gebracht. Nun lässt sich die DNA-Sequenz ablesen und auswerten. In dem Reaktionsansatz befinden sich neben 13µl Wasser, 4µl Pre-Mix (Taq-Polymerase, d`NTPs, dd`NTPs) und 2µl PCR-Produkt entweder 1µl Vorwärts- oder 1µl Rückwärts-Primer. Um hier eine Kontamination mit Fremd-DNA zu verhindern wird der Reaktionsansatz ebenfalls unter einer sterilen Werkbank angesetzt. Die Sequenzierungsreaktion wird im PCR-Thermoblock durchgeführt und verläuft in 35 Zyklen. Zunächst wird der Reaktionsansatz für 30 Sekunden auf 96°C erhitzt, damit die DNA-Stränge denaturieren. Anschließend wird der Ansatz für zwei Minuten auf 60°C abgekühlt.

Die Qualität der Sequenzierung ist von Exon zu Exon unterschiedlich und hängt unter anderem von dem eingesetzten Primer ab. Daher wird die Sequenzierung von Exons 8 mit dem Rückwärts-Primer durchgeführt. Die Übrigen werden mit Vorwärts-Primer durchgeführt.

Exon 1: Vorwärts

Exon 4: Vorwärts

Exon 7: Vorwärts

Exon 2: Vorwärts

Exon 5: Vorwärts

Exon 8: Rückwärts

Exon 3: Vorwärts

Exon 6: Vorwärts

Exon 9: Vorwärts

3.2.7. Fällung der DNA

Bevor die Kapillarelektrophorese durchgeführt werden kann, müssen störende Primer, Enzyme, Pufferlösungen und Salze entfernt werden. Hierzu wird die DNA mittels Ethanol-Fällung gereinigt. Das Ethanol und das Natriumacetat führen zu einem Abbau der Hydrathülle, welche die DNA umgibt. In Folge dieses Vorganges wird diese unlöslich in Wasser und präzipitiert. Hierzu werden 180µl Wasser und 20µl DNA in einem 1,5ml Reaktionsgefäß gemischt. Nach Zugabe von 20µl Natriumacetat und weiterem Mischen, werden 440µl 100% Ethanol hinzugegeben. Nun wird 30 bis 60 Minuten bei 13000rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Nachdem man 700µl 80% Ethanol hinzugegeben hat, mischt man ein weiteres mal, um dann 10 Minuten zu zentrifugieren. Abschließend wird der Überstand entfernt und nach 30 sekündigem Zentrifugieren die letzten Tropfen abpipettiert. Die palletierte DNA wird nun 15 Minuten an der Luft getrocknet, bevor man sie bei -20°C lagert.

3.2.8. Bioinformatische Auswertung

Die DNA Sequenz wird mit der Analysesoftware Mutation Surveyor V3.23 untersucht. Mit dieser Software ist man in der Lage die Sequenzen schnell und effizient auszuwerten. Man definiert eine Referenzsequenz, die dem Wildtyp entspricht. Nun vergleicht das Programm

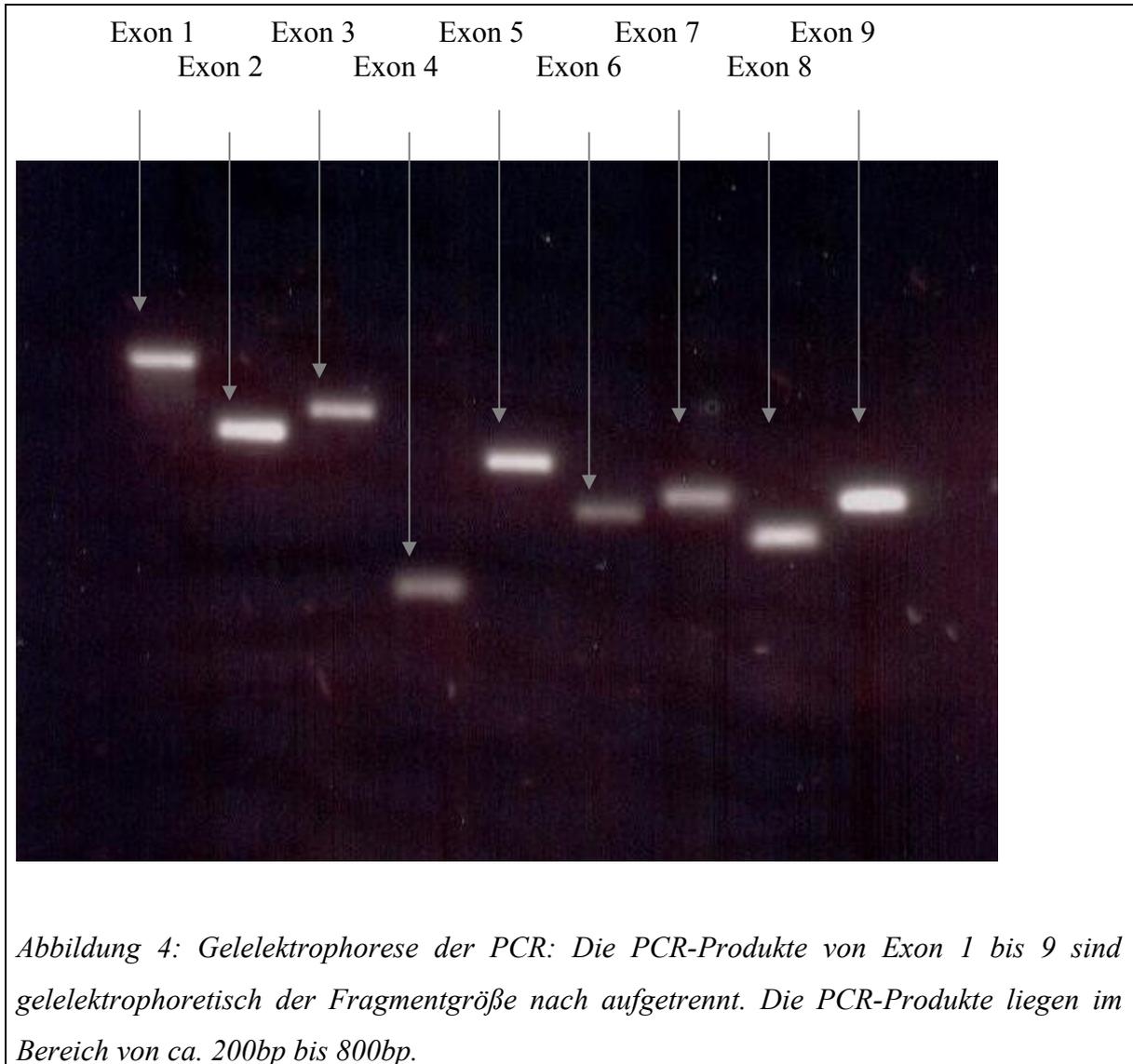
alle weiteren Sequenzen mit dieser Referenzsequenz und gibt sämtliche Abweichungen an. Abschließend kann man die Abweichungen auswerten und anhand bestehender Gendatenbanken, wie der Ensembl-Datenbank einordnen. In dieser Gendatenbank sind diverse SNPs und Varianten gelistet.

Anschließend wird der Effekt von aufgetretenen Varianten auf die Enzymaktivität mit dem Tool PolyPhen (=Polymorphism Phenotyping) der Harvard Universität analysiert. PolyPhen ist eine „in-silico Analysesoftware“ mit der sich mögliche Auswirkungen eines SNPs auf den Phänotyp untersuchen lassen. Die Software ist spezialisiert darauf, die Auswirkung von nicht-synonymen SNPs (nsSNP) vorherzusagen. PolyPhen gleicht die Variante mit verschiedenen Datenbanken ab und erstellt für den SNP eine Beurteilung, die zusammen mit einem Abgleich der dreidimensionalen Struktur des Proteins eine Prognose über die möglichen Auswirkungen auf den Phänotyp zulässt. Es werden beispielsweise elektrostatische Interaktionen innerhalb des Proteins, Veränderungen des aktiven Zentrums und andere Manipulationen vorhergesagt.

PolyPhen klassifiziert eine Variante als „gutartig“, „eventuell schädlich“ oder „wahrscheinlich schädlich“. Ist eine Beurteilung auf Grund zu weniger Daten nicht möglich, wird die Variante als „unbekannt“ ein.

4. Ergebnisse

4.1. Hotstart-PCR



Anhand der Banden lässt sich eine Aussage über die Menge der amplifizierten DNA machen. Je stärker eine Bande ist, umso mehr DNA ist amplifiziert worden. Diese Erkenntnis ist für die Abstimmung des Sequenzierungsansatzes essentiell, da man so die Menge der Template-DNA anpassen kann. Je mehr PCR-Produkt vorhanden ist, desto weniger muss man davon dem Sequenzierungsansatz begeben.

4.2. Sequenzierungen

4.2.1. Exon 1

Der T-93G Polymorphismus kommt in diesem Patientenkollektiv zweimal vor. Durch diese Punktmutation wird in der Promotorregion des Gens Threonin durch Glycin ersetzt. Der codierende Bereich beginnt mit den Codons ATG GAG und endet in Exon 1 mit GAC C. Dieser ist am Ende des sequenzierten Bereichs markiert. Der Bereich davor codiert das Signalpeptid des juvenilen Proteins, das vor der Aktivierung der LPL abgespalten wird.

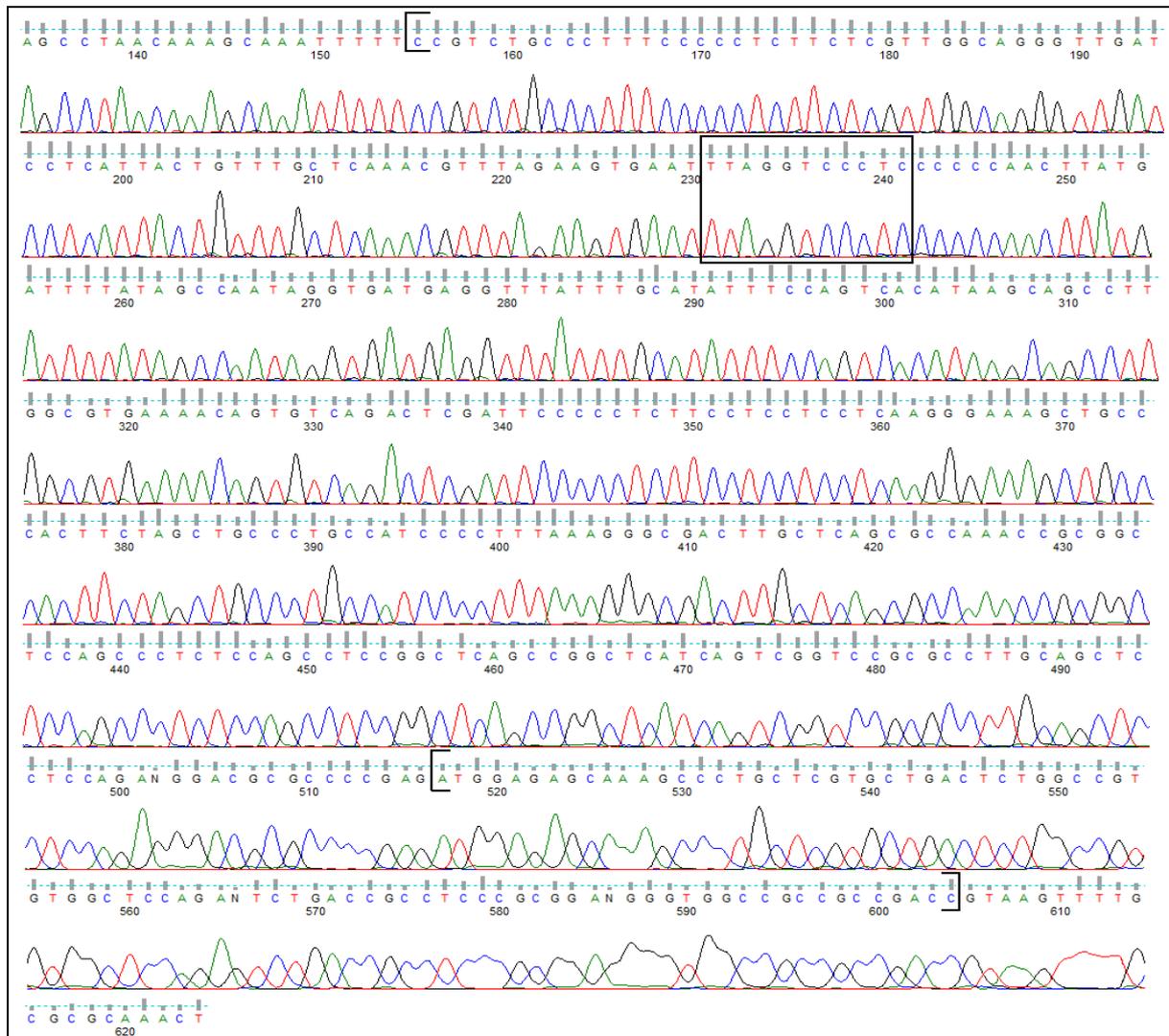


Abbildung 5: Exon 1 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron. Die erste Klammer markiert den Anfang der Promotorregion, während die zweite, sowie die dritte Klammer den Anfang und das Ende des codierenden Bereiches anzeigen. In der Box befindet sich der T-93G Polymorphismus, der in Abbildung 5 vergrößert dargestellt ist.

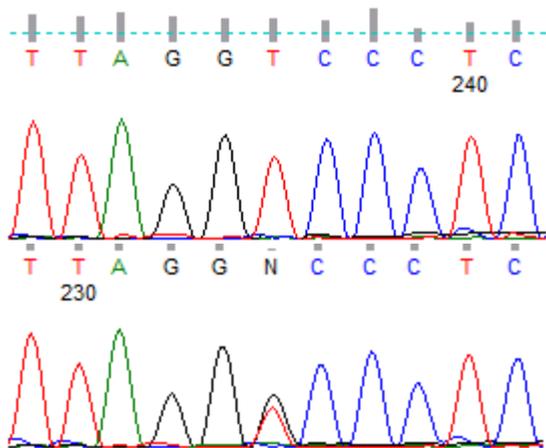


Abbildung 6: Wildtyp und T-93G Polymorphismus. Die obere Sequenz zeigt den Wildtyp von Exon 1. Im unteren Bild ist der T-93G Polymorphismus zu erkennen.

4.2.2. Exon 2

Der D9N Polymorphismus kommt in diesem Patientenkollektiv zweimal vor. Durch diese Punktmutation wird Asparaginsäure durch Asparagin ersetzt.

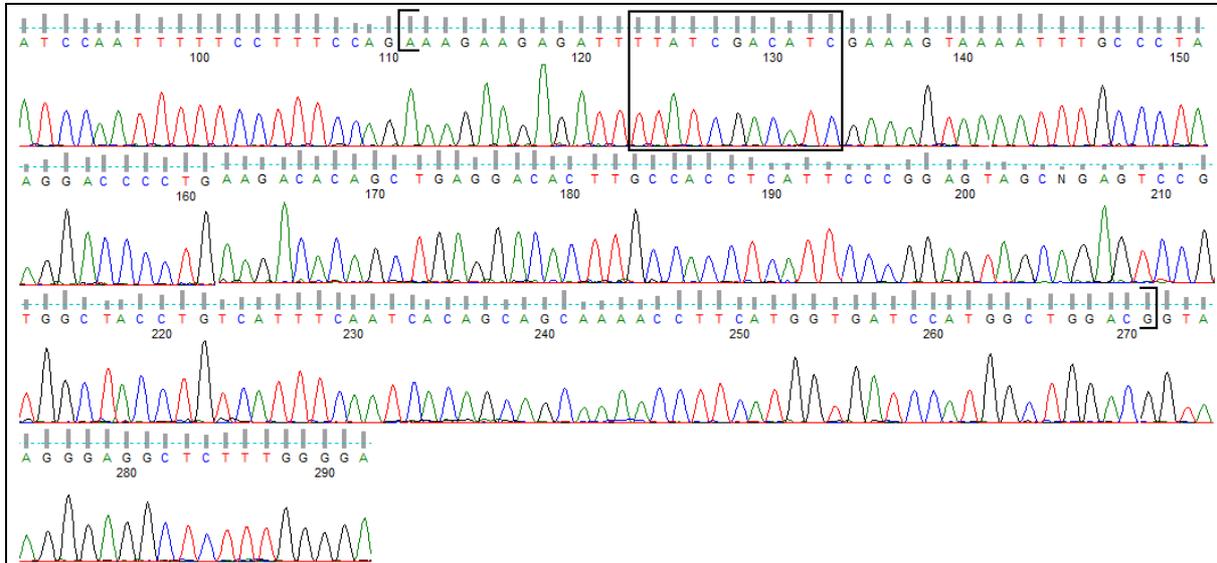


Abbildung 7: Exon 2 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron. Der codierende Bereich wird durch die Klammern am Anfang und am Ende der Sequenz markiert. In der Box befindet sich der D9N Polymorphismus, der in Abbildung 7 vergrößert dargestellt ist.

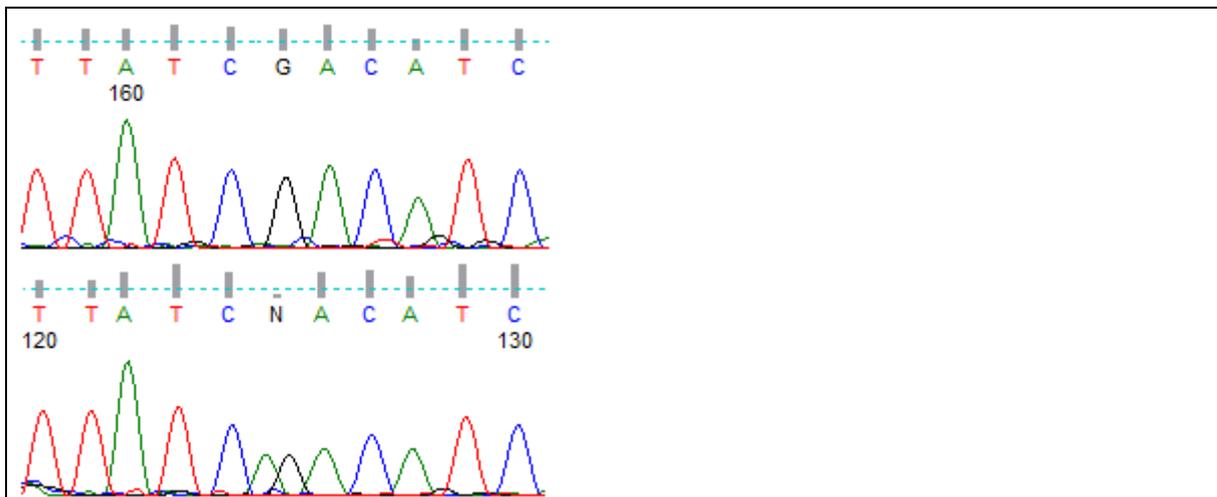


Abbildung 8: Wildtyp und D9N Polymorphismus. Die obere Sequenz zeigt den Wildtyp von Exon 2. Im unteren Bild ist der D9N Polymorphismus zu erkennen.

4.2.3. Exon 3

Der V109V Polymorphismus kommt in diesem Patientenkollektiv einmal vor. Diese Punktmutation verläuft stumm, indem die Codons GTG und GTA beide die Aminosäure Valin codieren.

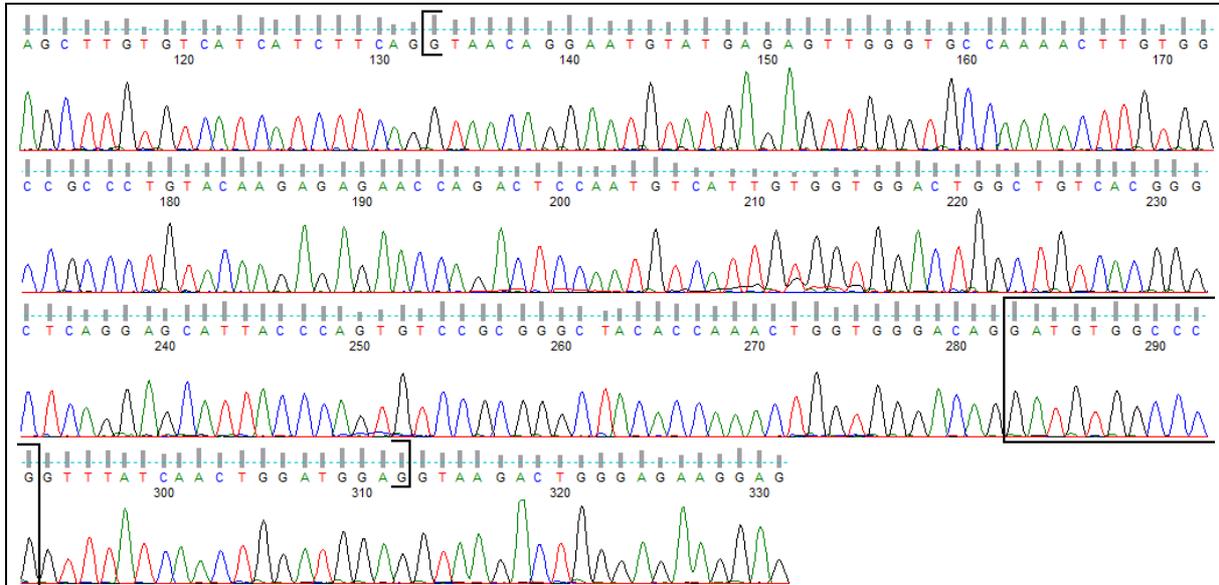


Abbildung 9: Exon 3 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron. Der codierende Bereich wird durch die Klammern am Anfang und am Ende der Sequenz markiert. In der Box befindet sich der V109V Polymorphismus, der in Abbildung 9 vergrößert dargestellt ist.

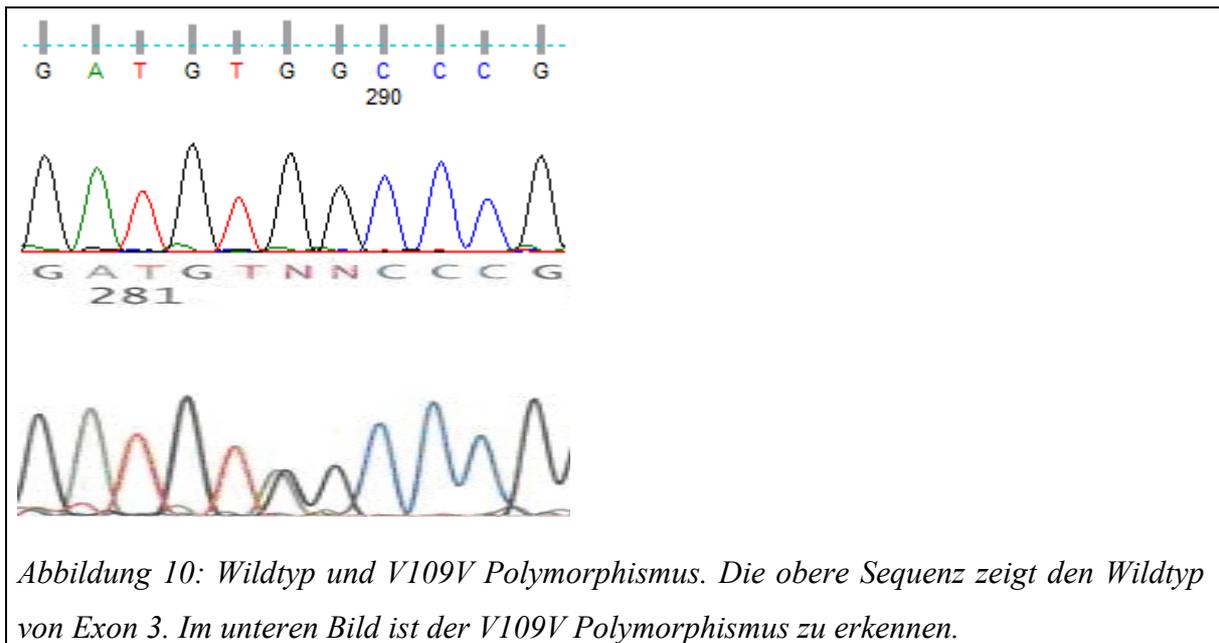


Abbildung 10: Wildtyp und V109V Polymorphismus. Die obere Sequenz zeigt den Wildtyp von Exon 3. Im unteren Bild ist der V109V Polymorphismus zu erkennen.

4.2.4. Exon 4

Der E118E Polymorphismus kommt in diesem Patientenkollektiv dreimal vor. Diese Punktmutation verläuft stumm, indem die Codons GAG und GAA beide die Aminosäure Glutaminsäure codieren.

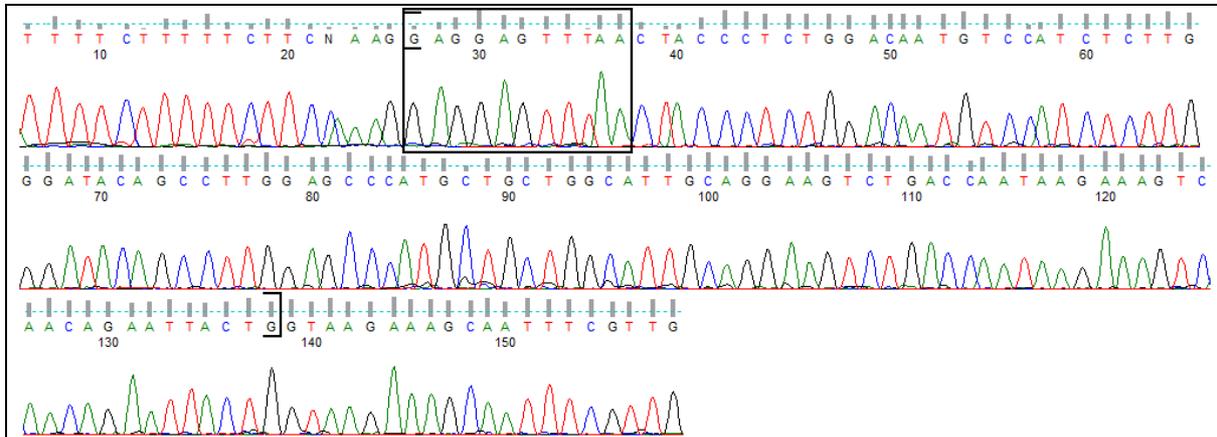


Abbildung 11: Exon 4 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron. Der codierende Bereich wird durch die Klammern am Anfang und am Ende der Sequenz markiert. In der Box befindet sich der E118E Polymorphismus, der in Abbildung 11 vergrößert dargestellt ist.

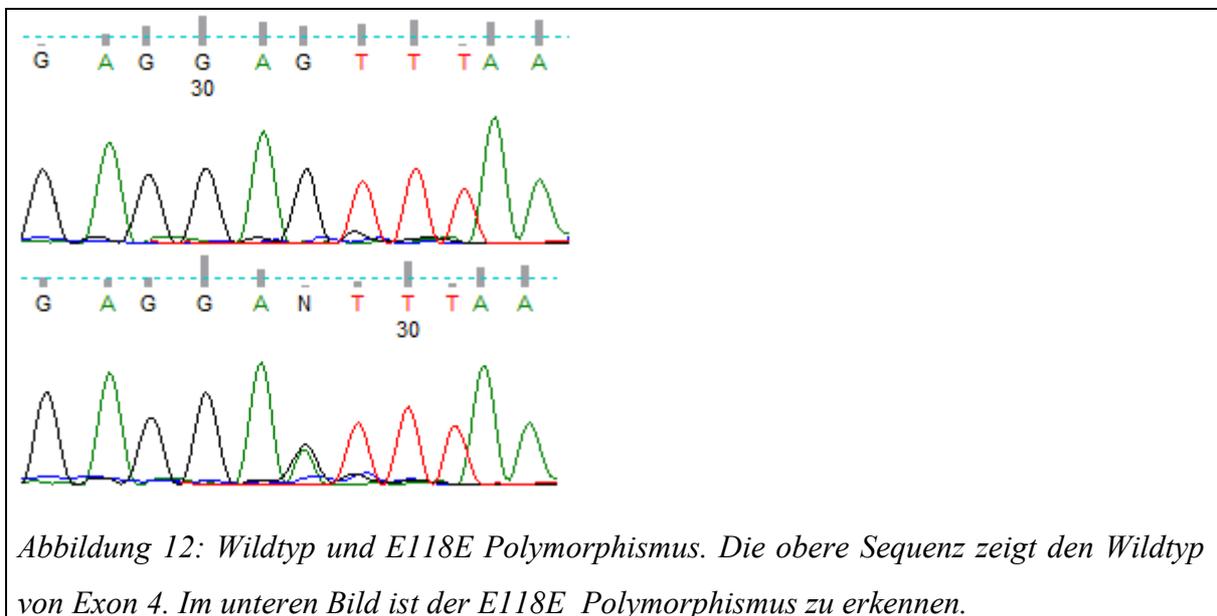


Abbildung 12: Wildtyp und E118E Polymorphismus. Die obere Sequenz zeigt den Wildtyp von Exon 4. Im unteren Bild ist der E118E Polymorphismus zu erkennen.

4.2.5. Exon 5

Die seltene Variante G188E kommt in diesem Patientenkollektiv einmal vor. Durch diese Punktmutation wird Glycin durch Glutaminsäure ersetzt.

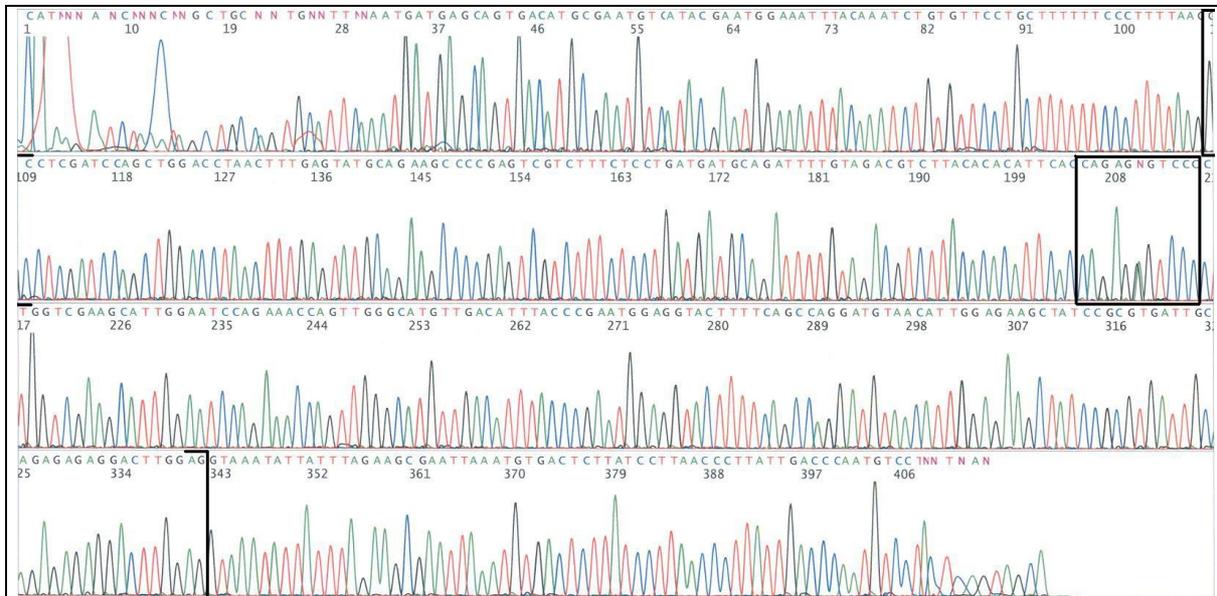


Abbildung 13: Exon 5 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron. Der codierende Bereich wird durch die Klammern am Anfang und am Ende der Sequenz markiert. In der Box befindet sich die seltene Variante G188E, die in Abbildung 13 vergrößert dargestellt ist.

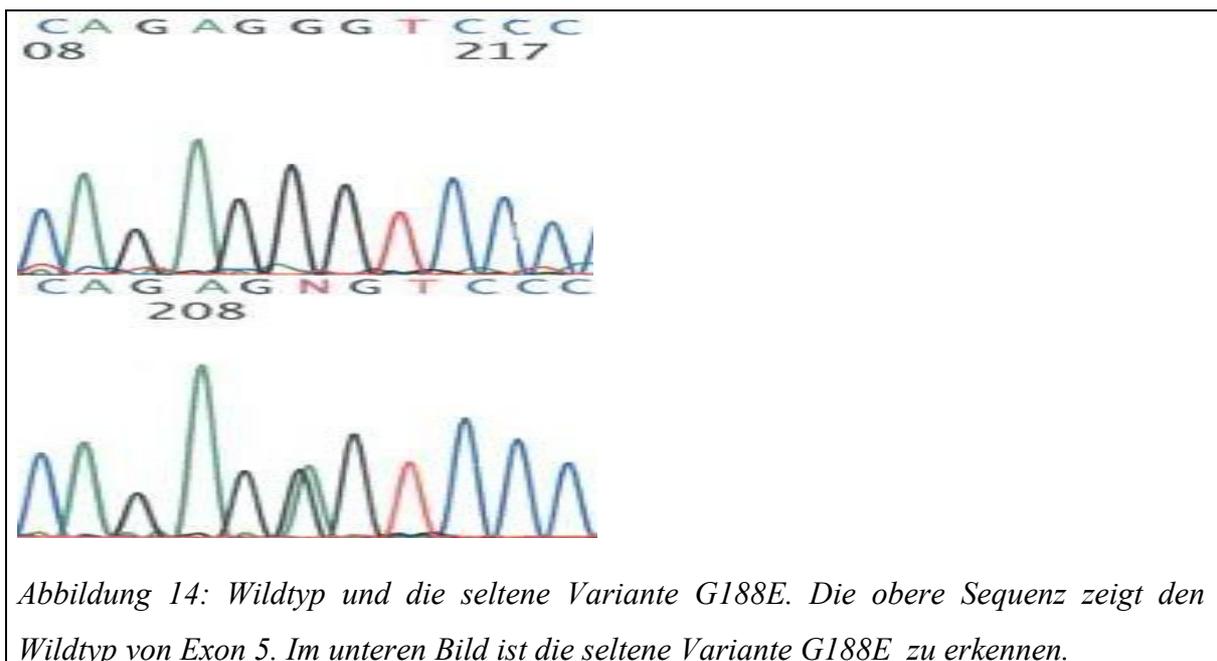


Abbildung 14: Wildtyp und die seltene Variante G188E. Die obere Sequenz zeigt den Wildtyp von Exon 5. Im unteren Bild ist die seltene Variante G188E zu erkennen.

4.2.6. Exon 6

Der N291S Polymorphismus kommt in diesem Patientenkollektiv dreimal vor. Durch diese Punktmutation wird Asparagin durch Serin ersetzt.

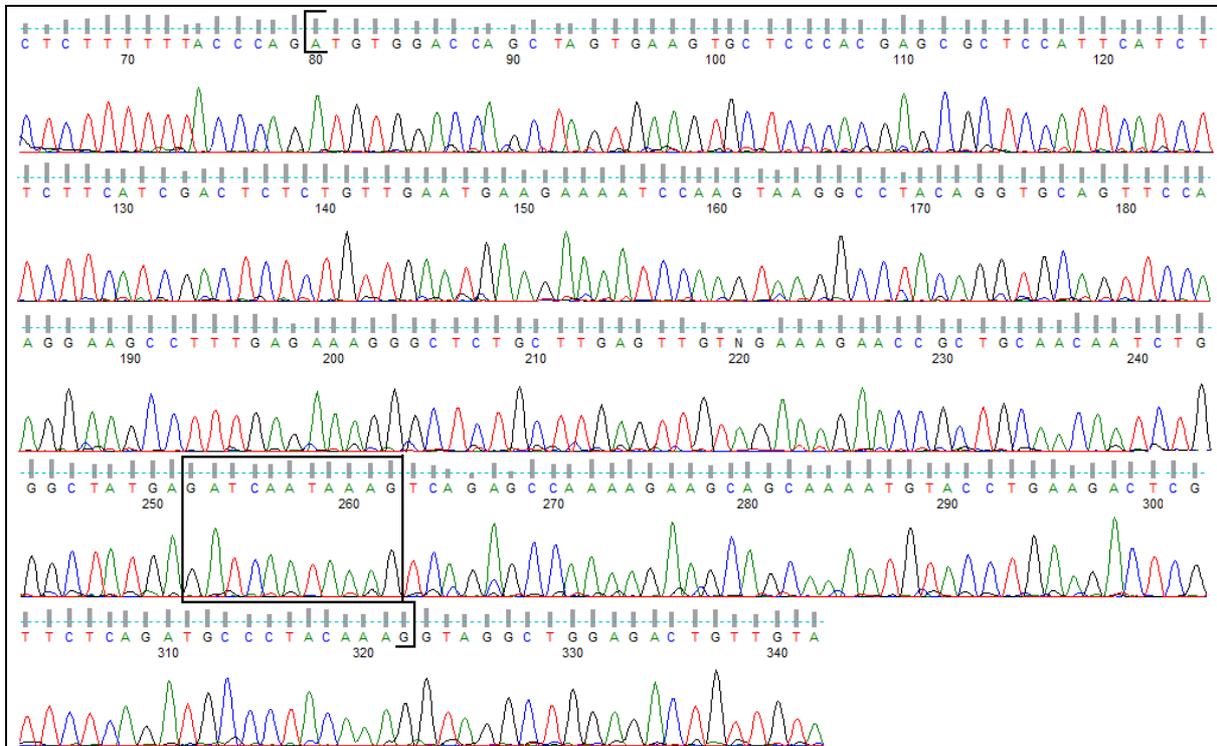


Abbildung 15: Exon 6 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron. Der codierende Bereich wird durch die Klammern am Anfang und am Ende der Sequenz markiert. In der Box befindet sich der N291S Polymorphismus, der in Abbildung 15 vergrößert dargestellt ist.

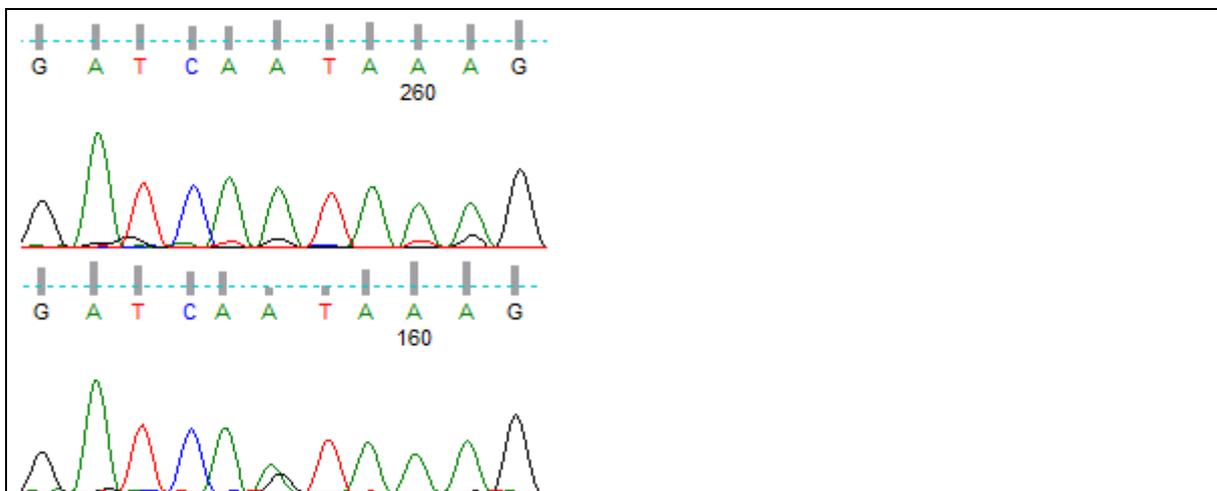
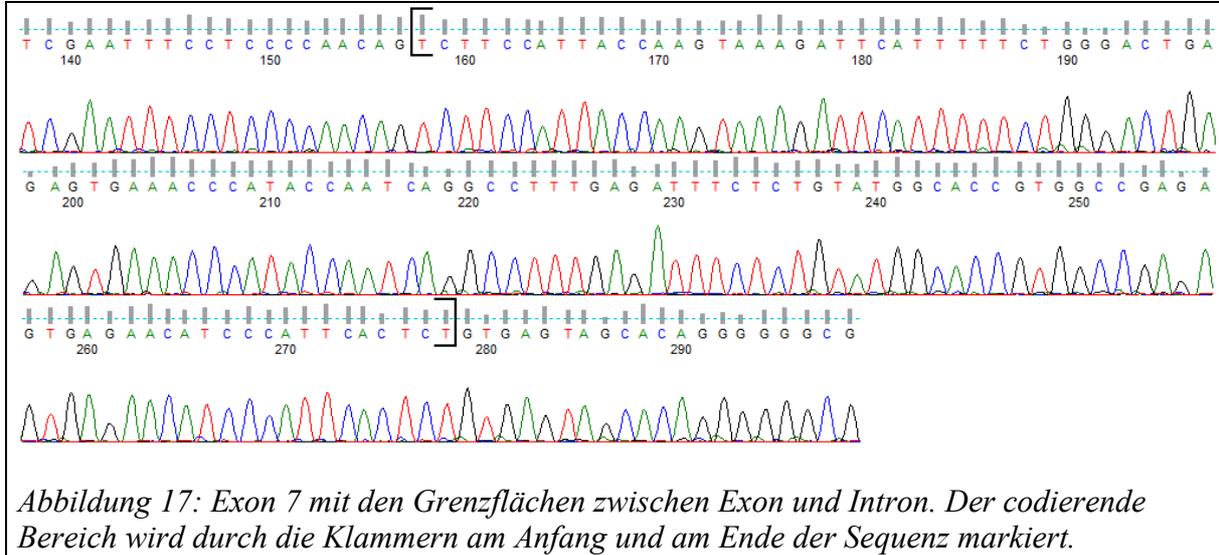


Abbildung 16: Wildtyp und N291S Polymorphismus. Die obere Sequenz zeigt den Wildtyp von Exon 5. Im unteren Bild ist der N291S Polymorphismus zu erkennen.

4.2.7. Exon 7

In Exon 7 sind keine Varianten aufgetreten.



4.2.8. Exon 8

Der T361T Polymorphismus kommt in dem untersuchten Patientenkollektiv zehnmal vor. Diese Punktmutation verläuft stumm, indem die Codons ACC und ACA beide die Aminosäure Threonin codieren. Es ist zu bemerken, dass die hier dargestellte Abbildung die rückwärts sequenzierte Nukleinsäuresequenz zeigt, da diese im Vergleich zu der vorwärts Sequenzierung bessere Ergebnisse geliefert hat.

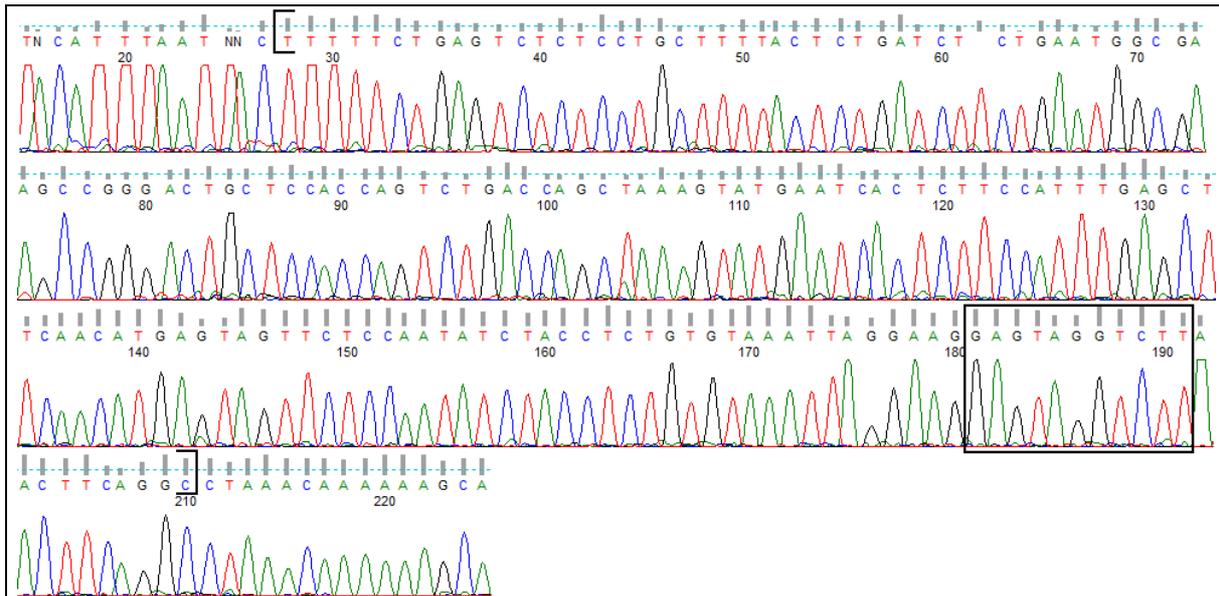


Abbildung 18: Exon 8 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron. Der codierende Bereich wird durch die Klammern am Anfang und am Ende der Sequenz markiert. In der Box befindet sich der T361T Polymorphismus, der in Abbildung 18 vergrößert dargestellt ist.

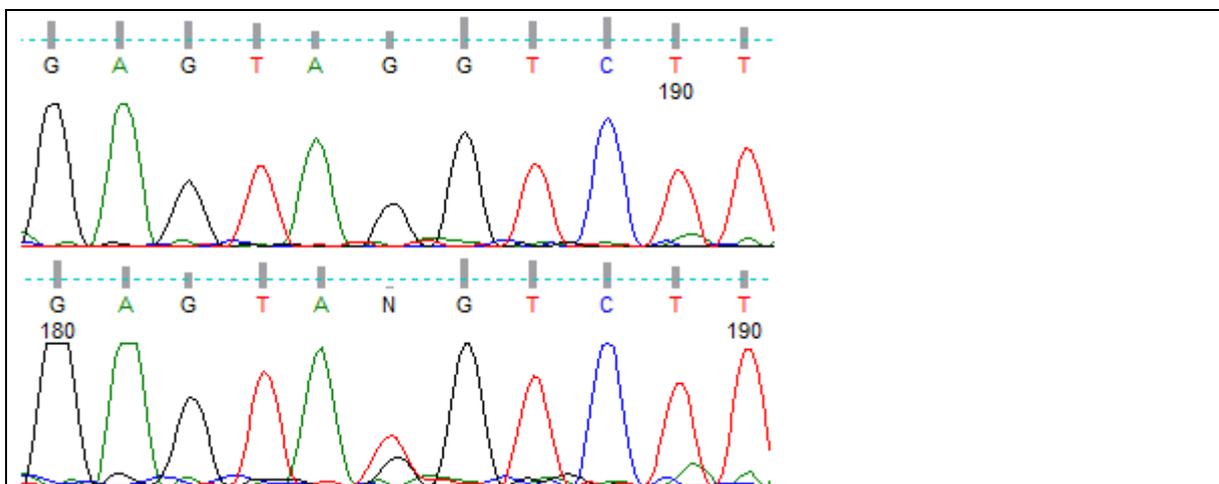


Abbildung 19: Wildtyp und T361T Polymorphismus. Die obere Sequenz zeigt den Wildtyp von Exon 8. Im unteren Bild ist der T361T Polymorphismus zu erkennen.

4.2.9. Exon 9

Der S447X Polymorphismus kommt in diesem Patientenkollektiv zweimal vor. Durch diese Punktmutation wird das für Serin codierende Codon TCA durch das Stopp-Codon TGA ersetzt, wodurch es zum Abbruch in der Aminosäuresequenz kommt.

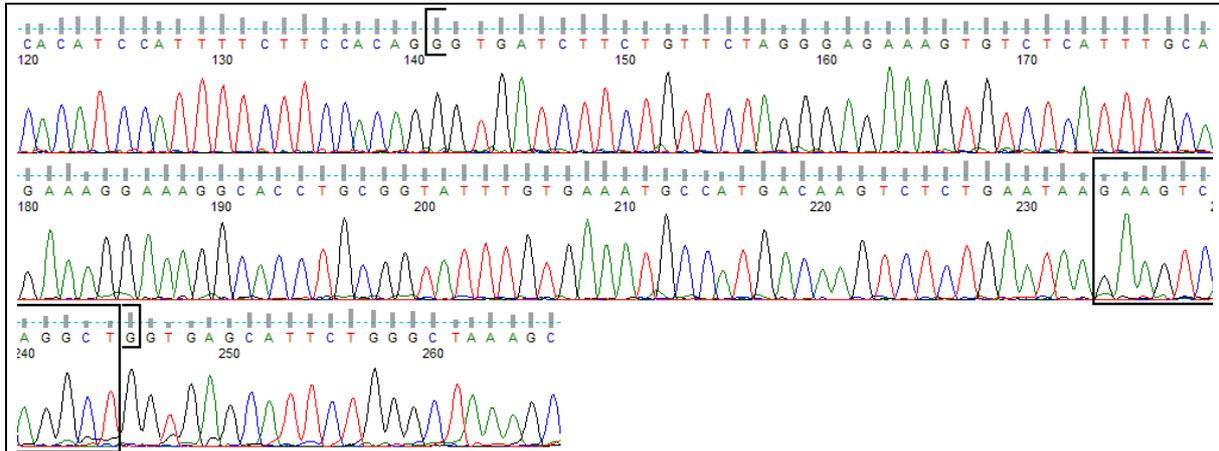


Abbildung 20: Exon 9 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron. Der codierende Bereich wird durch die Klammern am Anfang und am Ende der Sequenz markiert. In der Box befindet sich der S447X Polymorphismus, der in Abbildung 20 vergrößert dargestellt ist.

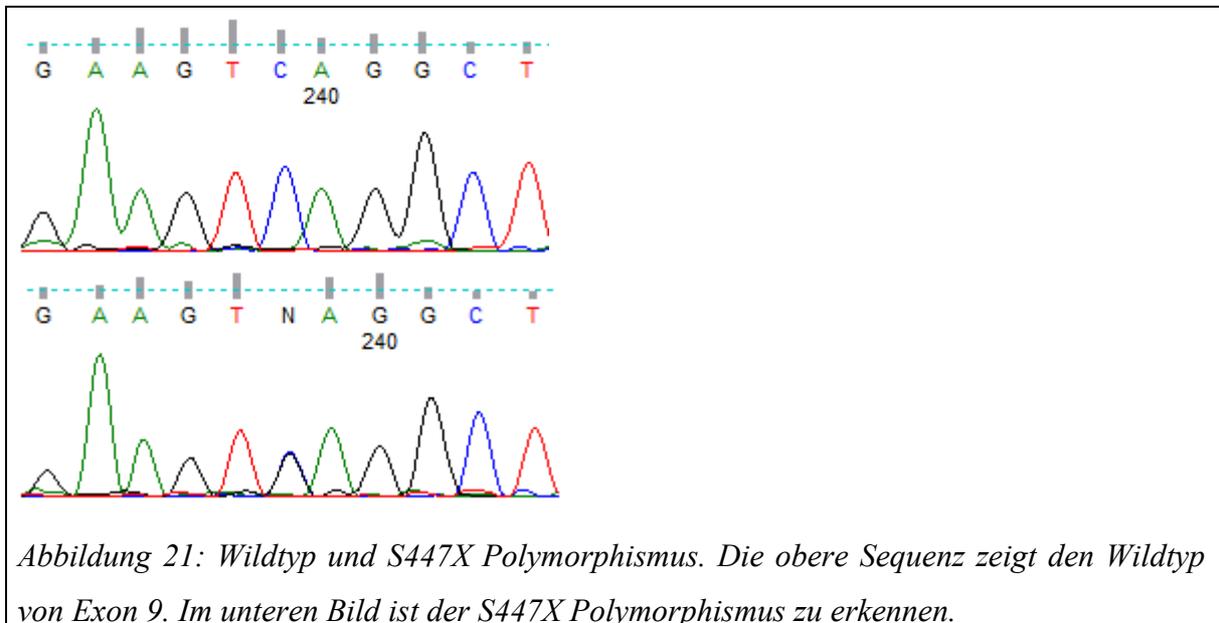


Abbildung 21: Wildtyp und S447X Polymorphismus. Die obere Sequenz zeigt den Wildtyp von Exon 9. Im unteren Bild ist der S447X Polymorphismus zu erkennen.

4.3. Varianten in dem codierenden Bereich des LPL-Gens

Nukleotid	Exon	Codon (neu)	Codon (alt)	AA→AA	Ambiguity Code	Status	SNP-ID	In vitro Funktion	Patientenkollektiv	PolyPhen	Häufigkeit (Sagoo et al.)
T>G	1	-93	-120	S→A	K	SNP	rs1800590		2	-	1,6%
-/CC	1					Insert	rs34513350		-	-	
-/CC	1					Insert	rs36100146		-	-	
c83C>T	1	28	1	A→V	Y	SNP	rs11570895		-	-	
c106G>A	2	36	9	D→N	R	SNP	rs1801177	normale Funktion; gestörte Sekretion	2	gutartig	2,1%
c213C>G	2	71	44	H→Q	S	SNP	rs11542065		-	-	
c405G>A	3	135	108	V→V	R	SNP	rs1121923	synonym	2	-	
c435G>A	4	145	118	E→E	R	SNP	rs248	synonym	3	-	
c644G>A	5	215	188	G→E	R	bekannt		inaktiv	1	gutartig	0,03%
c687T>C	5	229	202	H→H	Y	SNP	rs45607438		-	-	
c811T>A	6	271	244	S→I	W	SNP	rs28934893		-	-	
c836T>G	6	279	252	L→R	K	SNP	rs35414700		-	-	
c862G>A	6	288	261	A→T	R	SNP	rs1800011		-	-	
c953A>G	6	318	291	N→S	R	SNP	rs268	43% Aktivität	3	gutartig	2,5%
c1108G>A	7	370	343	V→M	R	SNP	rs298		-	-	
c1128C>T	7	376	349	I→I	Y	SNP	rs299		-	-	
c1135A>G	7	379	352	T→A	R	SNP	rs300		-	-	
c1164C>A	8	388	361	T→T	M	SNP	rs316	synonym	10	-	
c1279G>A	8	427	400	A→T	R	SNP	rs5934		-	-	
c1421C>G	9	474	447	S→X	S	SNP	rs328	130% Wildtyp-Masse	2	-	9,9%

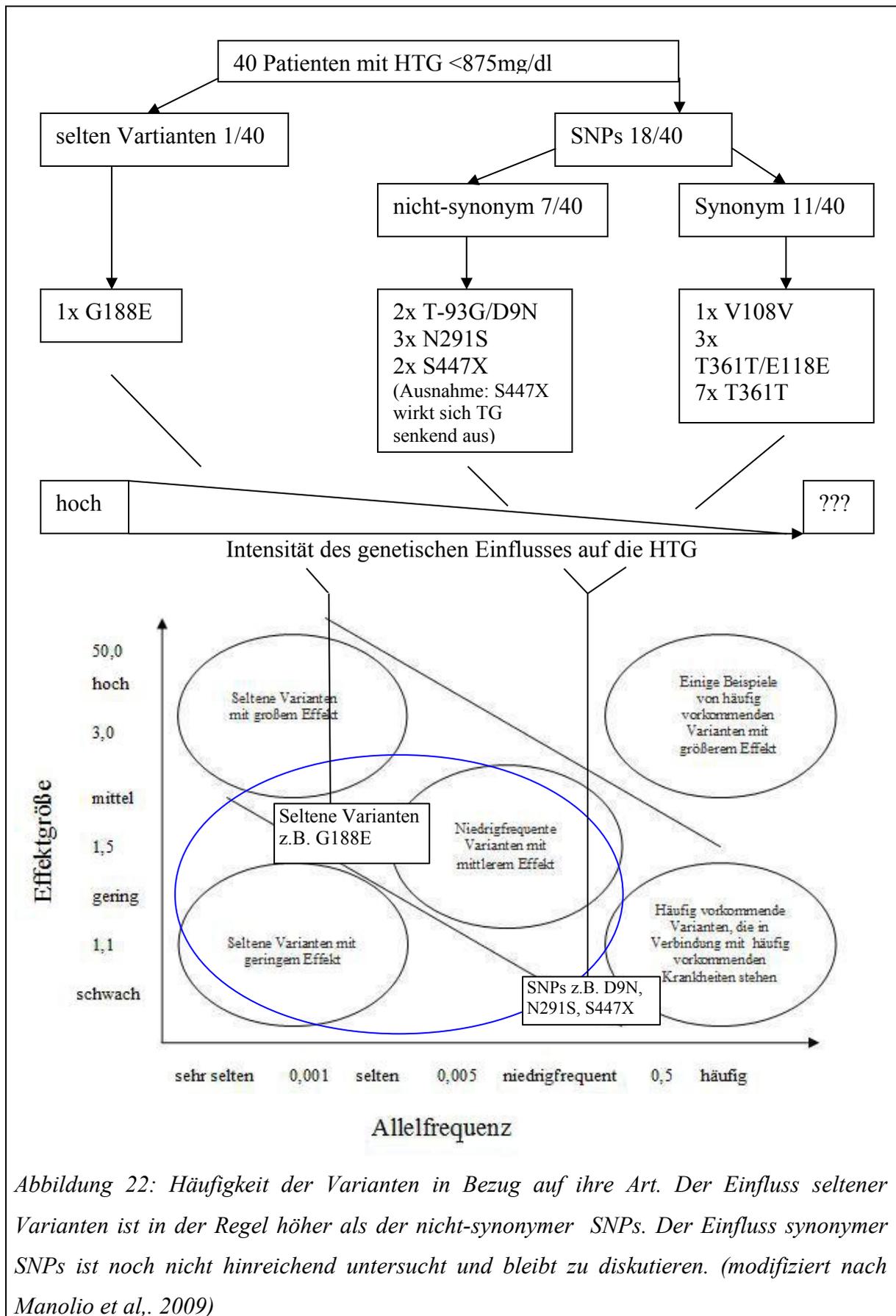
Tabelle 2: Untersuchte Varianten in den codierenden Bereichen der LPL. Die seltene Variante G188E in Exon 5 kann einmal im Patientenkollektiv vor. Des Weiteren wurden die funktionellen SNPs T-93G, D9N, N291S und S447X gefunden. Die synonymen SNPs V108V, E118E und T361T verändern die Aminosäuresequenz der LPL nicht.

In diesem Patientenkollektiv kommt lediglich einmal die seltene Variante G188E vor. Es weist also nur 1/40 Patienten eine seltene Variante in dem Patientenkollektiv mit einer moderaten HTG <875mg/dl auf.

Des Weiteren treten insgesamt neun nicht-synonyme SNPs auf. Zwei Patienten haben die T-93G/D9N SNPs in Exon 1 und 2. Drei Patienten weisen den N291S SNP in Exon 6 auf. Bei zwei weiteren Patienten wurde S447X identifiziert. Nicht-synonyme SNPs kommen also bei 7/40 Patienten vor.

Synonyme SNPs treten insgesamt 14-mal auf. Der synonyme SNP V108V kommt bei einem Patient vor. Der synonyme SNP E118E tritt dreimal in diesem Kollektiv auf und ist hier immer mit T361T vergesellschaftet. Drei Patienten weisen also gleichzeitig die beiden synonymen SNPs E118E und T361T. Außerdem kommt T361T bei sieben weiteren Patienten einzeln vor. Bei 11/40 Patienten wurde also ein synonyme SNP identifiziert. Abbildung 22 zeigt wo die vorkommenden Varianten einzuordnen sind.

Auf Grund der geringen Zahl an sequenzierten Patienten ist eine statistische Auswertung der Ergebnisse nicht sinnvoll. Dennoch lässt sich sagen, dass bei Patienten mit einer moderaten HTG, aber ohne die Risikofaktoren DM2, BMI >25 und ApoE2/2-Genotyp seltene Varianten vorkommen. Ebenfalls sind auch nicht-synonyme und synonyme SNP vorhanden.



5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, herauszuarbeiten, ob seltene Varianten im LPL Gen bei Patienten mit einer moderaten HTG vorkommen und wie hoch deren Frequenz ist. Es wurden bereits Studien an Patienten mit stark erhöhten Lipidwerten (TG >875mg/dl; Normbereich \leq 150mg/dl) durchgeführt (Wang et al., 2007 & Johansen et al., 2010). Diese Studien zeigen, dass seltene Varianten im LPL-Gen an der Entwicklung einer Dyslipidämie beteiligt sind. Diese Arbeit ist nun die erste Resequenzierungsstudie, die seltene Varianten bei Patienten mit moderat erhöhten TG (TG <875mg/dl) untersucht.

Unsere Hypothese ist, dass durch den Ausschluss von DM2, dem ApoE 2/2-Genotyp und Übergewicht die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass die HTG bei diesen Patienten durch genetische Faktoren hervorgerufen wird. Die Ergebnisse zeigen, dass seltene Varianten bei Patienten mit einer moderaten HTG vorkommen. G188E kommt in diesem Patientenkollektiv einmal vor. Weitere unbekannt Varianten sind nicht identifiziert worden.

Wie zu erwarten war, kommen in diesem Patientenkollektiv die bekannten SNPs D9N, N291S und S447X vor. In normolipidämischen Patienten ist die Frequenz von D9N 2,1%, N291S 2,5% und S447X 9,9% (Sagoo et al., 2008). Sagoo et al. bestätigen in ihrer Metaanalyse den Zusammenhang von gewöhnlichen, funktionellen SNPs und HTG. D9N und N291S sind bei HTG-Patienten signifikant erhöht (Mailly et al., 1995; Busca et al., 1995; Sagoo et al., 2008), wohingegen der lipidsenkende SNP S447X signifikant verringert ist (Sagoo et al., 2008). Diese Erkenntnisse werden durch unsere Ergebnisse unterstützt. D9N und N291S kommen in einer erhöhten Frequenz vor, während S447X seltener vorkommt, als in normolipidämischen Kontrollgruppen. D9N, N291S und S447X stellen folglich genetische Co-Faktoren für die Ausbildung einer HTG dar.

Bis auf G188E in Exon 5 konnte keine seltene Variante identifiziert werden. Es stellt sich die Frage, ob es sich dabei lediglich um eine selten vorkommende neutrale Variante handelt oder ob sie mit HTG assoziiert ist. Johansen et al. haben in einer Kohorte von 438 HTG Patienten zehnmal G188E identifiziert. In der normolipidämischen Kontrollgruppe aus 327 Probanden, kam G188E nicht vor (Johansen et al., 2010). Diese Ergebnisse zeigen, dass G188E mit HTG assoziiert ist. Des Weiteren wurde G188E bereits bei Patienten aus Australien, Dänemark, Großbritannien, Griechenland, Indien, Japan, den Niederlanden und Portugal identifiziert und

hat somit eine weite geographische Verbreitung (Wittrup et al., 1999, Brunzell et al., 2001, Merkel et al., 2002).

Unterstützt wird dies durch die erweiterte Studie von Evans et al., die zeigt, dass die Prävalenz seltener Varianten bei Patienten mit extrem erhöhten TG bei 9,3% (10/107 Patienten) und bei Patienten mit moderat erhöhten TG bei 4,4% (9/206 Patienten) liegt (Evans et al., 2010). Dies zeigt, dass seltene Varianten bei HTG-Patienten vorkommen. Um Assoziationen von selten vorkommenden Varianten zur HTG sicher benennen zu können sind jedoch größere Patientenkollektive nötig.

Das Ziel der genetischen Untersuchungen von komplexen Krankheiten ist es, einen Benefit für die Diagnostik und die Therapie einer Krankheit zu bekommen und nicht zuletzt ein besseres Verständnis für die Physiologie und Pathophysiologie zu erlangen. In den letzten Jahren wurden GWAS –und Resequenzierungsstudien durchgeführt, um den genetischen Hintergrund für HTG zu erörtern.

Die „common disease common variant“-Hypothese (CDCV) geht davon aus, dass gewöhnliche Krankheiten durch eine Akkumulation gewöhnlicher Varianten mit einer geringen Effektgröße hervorgerufen werden, die eine hohe Frequenz in der Bevölkerung aufweisen. Die „common disease rare variant“-Hypothese (CDRV) geht hingegen davon aus, dass seltene Varianten mit einer großen Effektgröße und einer geringen Frequenz in der Bevölkerung gewöhnliche Krankheiten hervorrufen. Weder die eine, noch die andere Hypothese ist allein in der Lage den genetischen Hintergrund einer HTG zu erklären. In der Bevölkerung lassen sich sowohl seltene, als auch gewöhnliche Varianten finden, die jeweils einen unterschiedlichen Effekt auf die Ausbildung einer Krankheit haben.

Einzelnen haben gewöhnliche Varianten einen geringen Einfluss auf den Phänotyp. Es ist bekannt, dass T-93G, D9N und N291S mit erhöhten TG assoziiert sind, wohingegen S447X TG senkend wirkt (Merkel et al., 2002; Mailly et al., 1995; Busca et al., 1995; Sagoo et al., 2008). Generell kommen neben der LPL alle Gene für eine Resequenzierungsstudie in Frage, die eine Rolle im Lipidmetabolismus spielen. Hierzu zählen sämtliche Gene, die mit monogenetischer HTG assoziiert sind oder durch GWAS identifiziert wurden. Durch GWAS wurden in den vergangenen Jahren diverse neue Loci identifiziert, die mit erhöhten TG assoziiert sind. Die Studie von Teslovich et al. zeigt 95 Loci, die mit Lipidstoffwechselstörungen assoziiert sind. Davon werden 59 Loci zum ersten Mal damit in Verbindung gebracht (Teslovich et al., 2010). Nichtsdestotrotz erklären diese Loci lediglich

etwa 10% der genetischen Varianz. Seltene Varianten bleiben unberücksichtigt. GWAS liefern korrelative Resultate, die eine Assoziation eines Genlocus mit einer Krankheit herstellen. Es bleibt aber zu klären, wie sich Veränderungen eines assoziierten Gens auf eine Krankheit auswirken. Verschiedene Studien zeigen, dass eine Reihe von Genen, wie ANGPTL4, APOA5, APOC2 und GPIHBP1, auf den TG-Spiegel Einfluss nehmen (Romeo S et al., 2007; Calandra S et al., 2006; Talmund P, 2007; Brunzell JD et al., 2001; Beigneux et al., 2009; Wang et al., 2009). Daher liegt es auf der Hand, dass Varianten im LPL-Gen nur einen Teil der genetischen Basis der HTG erklären. Es kommt also die Frage auf, wie sich Kombinationen der einzelnen Risikoallele auf das individuelle Risiko für die Ausbildung einer HTG auswirken. Humphries et al. sagen, dass Genscores in Zukunft in die Risikoeinschätzung mit einfließen könnten (Humphries et al., 2008). Solche Tests sind sinnvoll, wenn sie eine zuverlässige Aussage über die Prädisposition für eine Krankheit zulassen. Dabei sollte deren Aussagekraft mit der von konventionellen Risikofaktoren, wie Alter, Geschlecht, TG, Blutdruck, Glukosetoleranz, Adipositas und Rauchen vergleichbar sein. Dies könnte der Prävention und einer individuellen Therapie zu Gute kommen und letzten Endes Einsparungen im Gesundheitssystem bringen. Genscores sind bei Patienten zweckmäßig, wo keine suffiziente Familienanamnese, aufgrund von Adoptionen, nicht hinreichend geklärten Vaterschaftsverhältnissen oder fehlerhaften Aussagen erhoben werden kann. Bei Patienten an der Grenze zur HTG (z.B.: 200mg/dl) könnte man durch die Erhebung eines Genscores das Arterioskleroserisiko besser bestimmen, da KHK und Arteriosklerose einen chronisch progredienten Verlauf nimmt. So lässt sich bestimmen, ob die erhöhten TG durch z.B. Übergewicht und mangelnde Bewegung erworben wurden oder ob dies durch genetische Varianten geschehen ist. In diesem Falle hätte der Patient mit der genetischen Disposition ein höheres Arterioskleroserisiko, da die erhöhten TG bereits lebenslang vorliegen.

Durch die Resequenzierung assoziierter Gene lassen sich nun gewöhnliche und seltene Varianten identifizieren. Zurzeit sind Sequenzierungen teuer und zeitaufwändig. Mit fortschreitender Entwicklung der Gentechnologie wird dies in naher Zukunft nicht weiter ein Problem darstellen, da Hochdurchsatzsequenzierungsverfahren der nächsten Generation zum Einsatz kommen, mit denen ein ganzes Genom oder große Mengen an DNA schnell und kostengünstig sequenziert werden können. Zudem ist man durch das „full-genome-sequencing“ in der Lage Varianten in Intronsequenzen und nicht-codierenden Bereichen zu identifizieren und Assoziationen zu knüpfen. Veränderungen der Intronsequenzen können sich beispielsweise auf das Spleißen auswirken und somit funktionell sein. Mit der steigenden

Fallzahl ist man dann auch in der Lage die Frequenz seltener Varianten zu bestimmen. Um eine seltene Variante eindeutig einer bestimmten Krankheit zuzuordnen, darf diese nicht in normolipidämischen Kontrollgruppen vorkommen.

Eines der Hauptprobleme ist die Beurteilung einer Variante. Es stellt sich die Frage, ob sich eine Variante funktionell auswirkt oder ob sie keinen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel hat. Kryukov et al. schätzen, dass 20% der neu identifizierten Mutationen schädlich sind. Weitere 53% haben einen mittelstarken Einfluss, vergleichbar mit bekannten, gewöhnlichen Varianten und die übrigen 27% verhalten sich neutral (Kryukov et al., 2007). Eine Möglichkeit bietet die in-silico-Analyse mit der Polyphen-Software der Harvard Universität, die Varianten als gutartig, möglicherweise schädlich oder wahrscheinlich schädlich einstuft. Diese Analyse ist schnell, preisgünstig und bewährt. Allerdings widerspricht die Polyphen-Auswertung in einigen Fällen den Ergebnissen anderer Methoden. Zum Beispiel wird G188E durch Familien- und in-vitro-Studien mit HTG in Verbindung gebracht, von Polyphen aber als gutartig eingestuft. Um die in-silico-Ergebnisse zu verifizieren, sind teure und zeitaufwändige in-vitro-Asseys notwendig.

Des Weiteren sind es nicht nur genetische Faktoren, die sich auf HTG auswirken. Ebenso spielen Umweltfaktoren eine Rolle. Diese können den Effekt einer Variante modulieren.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass seltene Varianten bei Patienten mit einer moderaten, klinisch signifikanten HTG vorkommen. Der genetische Hintergrund dieser komplexen Krankheit beruht auf einer Kumulation verschiedener Varianten, deren Zusammenwirken zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig zu klären ist. Hinzu kommt der noch nicht hinreichend geklärte Einfluss nicht-genetischer Faktoren und der Gen-Umwelt-Interaktionen. In der Zukunft müssen neben einzelnen Varianten auch strukturelle Variationen, wie Insertion, Deletionen und Kopienzahlvariationen berücksichtigt werden, wie es in dem „1000-Genoms-Projekt“ gemacht wird. Dies können Resequenzierungsstudien allein nicht leisten. Um die dabei entstehenden Datenmengen auszuwerten, müssen neue, leistungsfähige Analysemethoden entwickelt werden (Metzker, 2010). Hinzu kommen epigenetische Veränderungen, die sich nicht durch eine Veränderung der DNA-Sequenz, sondern in einer Modulierung der Chromosomen zeigen. Diese Einflüsse sind noch nicht hinreichend untersucht.

6. Abbildungs –und Tabellenverzeichnis

6.1. Abbildungen

Abbildung 1: Wahrscheinlichkeit einer Variante in Bezug auf den phänotypischen Effekt.

Abbildung 2: Einordnung der Varianten nach ihrer Wahrscheinlichkeit und ihrem Effekt.

Abbildung 3: Ansatz zur Optimierung der Hybridisierungstemperatur der PCR.

Abbildung 4: Gelelektrophorese der PCR.

Abbildung 5: Exon 1 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron.

Abbildung 6: Wildtyp und T-93G Polymorphismus.

Abbildung 7: Exon 2 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron.

Abbildung 8: Wildtyp und D9N Polymorphismus.

Abbildung 9: Exon 3 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron.

Abbildung 10: Wildtyp und V109V Polymorphismus.

Abbildung 11: Exon 4 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron.

Abbildung 12: Wildtyp und E118E Polymorphismus.

Abbildung 13: Exon 5 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron.

Abbildung 14: Wildtyp und die seltene Variante G188E.

Abbildung 15: Exon 6 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron.

Abbildung 16: Wildtyp und N291S Polymorphismus.

Abbildung 17: Exon 7 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron.

Abbildung 18: Exon 8 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron.

Abbildung 19: Wildtyp und T361T Polymorphismus.

Abbildung 20: Exon 9 mit den Grenzflächen zwischen Exon und Intron.

Abbildung 21: Wildtyp und S447X Polymorphismus.

Abbildung 22: Häufigkeit der Varianten in Bezug auf ihre Art.

6.2. Tabellen

Tabelle 1: Klinische Parameter des Patientenkollektivs

Tabelle 2: Untersuchte Varianten in den codierenden Bereichen der LPL

7. Literaturverzeichnis

- Baker M. Functional genomics: The changes that count. *Nature*. 2012 Feb 8;482(7384):257, 259-62. doi: 10.1038/482257a.
- Bansal V, Libiger O, Torkamanl A, Schork NJ. Statistical analysis strategies for association studies involving rare variants. *Nature Reviews Genetics* 2010;11:773-785
- Beigneux AP, Franssen R, Bensadoun A, Gin P, Melford K, Peter J, Walzem RL, Weinstein MM, Davies BS, Kuivenhoven JA, Kastelein JJ, Fong LG, Dallinga-Thie GM, Young SG. Chylomicronemia with a mutant GPIHBP1 (Q115P) that cannot bind lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:956-962
- Bergö M, Olivecrona G, Olivecrona T. Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. *Biochem J*. 1996 Feb 1;313 (Pt 3):893-8.
- Braun J, Severson D. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J*. 1992 Oct 15;287 (Pt 2):337-47.
- Brunzell JD. Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. In: Scriver C, Beaudet AI, Sly WS, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 6th ed. New York, NY: McGraw-Hill Book Co; 1989:1165-1180.
- Brunzell JD, Deeb SS. Familial lipoprotein lipase deficiency, ApoC-II deficiency, and hepatic lipase deficiency. In: Scriver, et al., editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw Hill; 2001. p. 2789–816.
- Busca R, Peinado J, Vilella E, et al. The mutant Asn291Ser human lipoprotein lipase is associated with reduced catalytic activity and does not influence binding to heparin. *FEBS Lett* 1995;367:257262
- Calandra S, Oliva CP, Tarugi P, Bertolini S. APOA5 and triglycerides metabolism, lesson from human APOA5 deficiency. *Curr Opin Lipdol* 2006. 17:122-127
- Camps L, Reina M, Llobera M, Vilaro S, Olivecrona T. Lipoprotein lipase: cellular origin and functional distribution. *Am J Physiol* 258: C673-81.
- Ebara T, Endo Y, Yoshiike S, Tsuji M, Taguchi S, Murase T, Okubo M. A 60-y-old chylomicronemia patient homozygous for missense mutation (G188E) in the lipoprotein lipase gene showed no accelerated atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2007 Nov-Dec;386(1-2):100-4. Epub 2007 Sep 1.
- Evans D, Arzer J, Aberle J, Beil FU. Rare variants in the lipoprotein lipase (LPL) gene are common in hypertriglyceridemia but rare in Type III hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2011 Feb;214(2):386-90. Epub 2010 Nov 26.

Evans D, Aberle J, Beil FU. The relative importance of common and rare genetic variants in the development of hypertriglyceridemia. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2011;9:637-644

Fisher RM, Maily F, Peacock RE, Hamsten A, Seed M, Yudkin JS, Beisiegel U, Feussner G, Miller G, Humphries SE, Talmud PJ. Interaction of the lipoprotein lipase Asp 291 Ser mutation with body mass index determines elevated plasma triacylglycerol concentrations: a study in hyperlipidemic subjects, myocardial infarction survivors, and healthy adults. *J Lipid Res.* 1995 Oct;36(10):2104-12.

Fisher RM, Humphries SE, Talmud PJ. Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1997 Dec;135(2):145-59.

Gilbert B, Rouis M, Griglio S, de Lumley L, Laplante P-M. Lipoprotein lipase (LPL) deficiency: A new Patient homozygote for the preponderant mutation Gly188Glu in the human LPL gene and review of reported mutations: 75% are clustered in exon 5 and 6. *Ann Genet* 2001;44:25-32.

Hall S, Grace C, Miller G, Cruickshank K, Cooper JA, Humphries SE, Talmud PJ. A common Mutation in the Lipoprotein Lipase Gene Promoter, -93T/G, is associated with lower Plasma Triglyceride Levels and Increased Promoter activity in vitro, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vasc. Biology, 1997, 17:10, 1969-1976.

Hide WA, Chan L, Li WH. Structure and evolution of the lipase superfamily. *J Lipid Res* 33: 167-78. 1992.

Johansen CT, Wang J, Lanktree MB, et al. Excess of rare variants in genes identified by genome-wide association study of hypertriglyceridemia. *Nat Genet* 2010;42:684-7

Johansen CT, Kathiresan S, Hegele RA. Genetics of Human Lipid Diseases: Genetic determinants of plasma triglycerides *J Lipid Res.* 2011 February; 52(2): 189–206.

Kastelein JJ, Groenemeyer BE, Hallman DM, Henderson H, Reymer PW, Gagné SE, Jansen H, Seidell JC, Kromhout D, Jukema JW, Bruschke AV, Boerwinkle E, Hayden MR. The Asp9 variant of lipoprotein lipase is associated with the -93G promoter mutation and an increased risk of coronary artery disease. *Clin Genet.* 1998 Jan;53(1):27-33.

Kathiresan S, Willer CJ, Peloso G, et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet* 2009;56-65.

Köster A, Chao YB, Mosior M, Ford A, Gonzalez-DeWhitt PA, Hale JE, Li D, Qiu Y, Fraser CC, Yang DD, Heuer JG, Jaskunas SR, Eacho P. Transgenic angiotensin-like (angptl4) overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism. *Endocrinology.* 2005 Nov;146(11):4943-50. Epub 2005 Aug 4.

- Kryukov GV, Pennacchio LA, Sunyaev SR. Most rare missense alleles are deleterious in humans: implications for complex disease and association studies. *Am J Hum Genet.* 2007. 80:727-39
- Kuivenhoven JA, Groenemeyer BE, Boer JM, Reymer PW, Berghuis R, Bruin T, Jansen H, Seidell JC, Kastelein JJ. Ser447stop mutation in lipoprotein lipase is associated with elevated HDL cholesterol levels in normolipidemic males. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Mar;17(3):595-9.
- Maily F, Tugrul Y, Reymer PWA, Bruin T, Seed M, Groenemeyer BF, Asplund-Carlson A, Vallance D, Windler AF, Miller GJ, Kastelein JJP, Hamsten A, Olivecrona G, Humphries SE, Talmud PJ. A common variant in the gene for lipoprotein lipase (Asp9Asn): functional implications and prevalence in normal and hyperlipidemic subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 1995;15:468-478.
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, Cho JH, Guttmacher AE, Kong A, Kruglyak L, Mardis E, Rotimi CN, Slatkin M, Valle D, Whittemore AS, Boehnke M, Clark AG, Eichler EE, Gibson G, Haines JL, Mackay TF, McCarroll SA, Visscher PM. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009 Oct 8;461(7265):747-53.
- Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake and regulation. *J Lipid Res* 2002. 43:1997-2006
- Metzker ML. Sequencing technologies – the next generation. *Nature Reviews Genetics* 2010.11, 31-46
- Osborne JC Jr, Bengtsson-Olivecrona G, Lee NS, Olivecrona T. Studies on inactivation of lipoprotein lipase: role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry.* 1985 Sep 24;24(20):5606-11.
- Ranganathan G, Unal R, Pokrovskaya ID, Tripathi P, Rotter JI, Goodarzi MO, Kern PA. The lipoprotein lipase (LPL) S447X gain of function variant involves increased mRNA translation. *Atherosclerosis.* 2012 Mar;221(1):143-7. Epub 2011 Dec 27.
- Romeo S, Pennacchio LA, Fu Y, Boerwinkle E, Tybjaerg-Hansen A, Hobbs HH, Cohen JC. Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides and increase HDL. *Nat Genet* 2007;39:513-516
- Sagoo GS, Tatt I, Salanto G, et al. Seven lipoprotein lipase gene polymorphisms, lipid fractions, and coronary disease: a HuGE association review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008;168:1233-46.
- Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr. Lipoprotein lipase: structure, function and mechanism of action. *Int J Clin Lab Res.* 1994;24(3):143-7.

- Spence JD, Ban MR, Hegele RA. Lipoprotein Lipase (LPL) Gene Variation and Progression of Carotid Artery Plaque. *Stroke*. 2003 May;34(5):1176-80. Epub 2003 Apr 10.
- Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, Olivecrona G. Angiotensin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 14;103(46):17450-5. Epub 2006 Nov 6.
- Talmund P. Rare APOA5 mutations-clinical consequences, metabolic and functional effects. *Atherosclerosis* 2007; 194:287-292.
- Tselovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 2010 Aug 5;466(7307):707-13.
- Wang J, Cao H, Ban MR, et al.. Resequencing genomic DNA of patients with severe hypertriglyceridemia (MIM 144650). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2450-5
- Wang H, Eckel RH., Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Aug;297(2):E271-88. Epub 2009 Mar 24.
- Wittrup HH, Nordestgaard BG, Steffensen R, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A. Effect of gender on phenotypic expression of the S447X mutation in LPL: the Copenhagen City Heart Study. *Atherosclerosis*. 2002 Nov;165(1):119-26.
- Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis. *Circulation*. 1999 Jun 8;99(22):2901-7.
- Wittekoek ME, Moll E, Primstone SN, et al. A frequent mutation in Lipoprotein lipase gene (D9N) deteriorates the biochemical and clinical phenotype of familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Nov;19(11):2708-13.
- Wittekoek ME, Primstone SN, Reymar PWA, et al. A common mutation in lipoprotein lipase gene (N291S) alters the lipoprotein phenotype and risk for cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998 Mar 3;97(8):729-35.
- Wright WT, Young IS, Nicholls DP, et al. Genetic screening of the LPL gene in hypertriglyceridaemic patients. *Atherosclerosis*. 2008 Jul;199(1):187-92. Epub 2008 Feb 20.
- Yu X, Burgess SC, Ge H, Wong KK, Nasseem RH, Garry DJ, Sherry AD, Malloy CR, Berger JP, Li C. Inhibition of cardiac lipoprotein utilization by transgenic overexpression of Angptl4 in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 1;102(5):1767-72. Epub 2005 Jan 19.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, ohne die das Verfassen dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Beil als Leiter des Lipidlabors III. Medizinische Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die Bereitstellung des Themas und der Laboratorien danken.

Ganz besonders will ich Dr. David Evans für die stets freundliche und kompetente wissenschaftliche Unterstützung bei dieser Arbeit danken. Die wertvollen praktischen und fachlichen Hilfestellungen haben das Arbeiten im Labor nicht nur effizienter, sondern auch angenehmer gemacht. Auch das Arbeitsklima im Labor war ausgezeichnet, wodurch ich stets mit Freude gearbeitet habe.

Bedanken will ich mich auch bei dem gesamten Laborteam, das mich bei technischen Fragen immer sehr gut beraten hat.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Freundin Silja, die mich während meines Studiums jederzeit unterstützt haben.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

Julian Arzer