

Aus der Medizinischen Kernklinik und Poliklinik des  
Universitätskrankenhauses Eppendorf  
Universität Hamburg  
Direktor: Prof. Dr. H. Greten

**Mutationen auf Exon 7 und 9 der Hepatischen Lipase  
und ihre Auswirkungen auf den  
Fettstoffwechsel**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg  
vorgelegt von

Helge Homann  
aus Hamburg

Hamburg, 2000

**Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 18 Juli 2000**

**Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg**

**Sprecher : Prof. Dr. H.- P. Leichtweiß**

**Referent: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel**

**Koreferent: Prof. Dr. H. Greten**

## **Lebenslauf:**

- 1971 geboren in Hamburg
  - 1978 Einschulung in die Grundschule
  - 1982 - 1991 Besuch des Gymnasiums Lerchenfeld in Hamburg
  - 1988 - 1989 Aufenthalt in den USA, Washington, Indiana als Austauschschüler
  - 1991 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
  - 1991 - 1992 15 Monate Zivildienst im Rettungsdienst in Hamburg, dabei Ausbildung zum Rettungssanitäter
  - 1993 Beginn des Medizinstudiums
  - 1995 Physikum
  - 1995 Famulatur in der Pathologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf
  - 1996 1. Staatsexamen
  - 1997 Famulatur in der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Pinneberg
  - 1997 Famulatur in der Kinderklinik des Krankenhauses Heidberg in Hamburg
  - 1996-1997 Experimentelle Doktorarbeit im Lipid- Stoffwechsellabor bei Frau Professor Beisiegel am Universitätskrankenhaus Eppendorf
  - 1998 2-monatige Famulatur in Morant Bay, Jamaica
  - 1999 Praktisches Jahr in der Internistischen und Chirurgischen Klinik des Krankenhauses Reinbek, St. Adolph- Stift, als Wahlfach Kinderheilkunde im Klinikum Nord in Hamburg
  - 2000 Beginn als Arzt im Praktikum in der Kinderklinik des Klinikums Nord in Hamburg
- Sportliche Erfolge:*
- 1992 Deutscher Junioren- Vizemeister in der olympischen Zweimann- Jolle 470er
  - 1993 Deutscher Hochschulmeister in der 470er Klasse
  - 1995/ 96 1. Platz Kieler Woche in der J 24 Klasse
  - 1996 Deutscher Meister J 24
  - 1998 2. Platz Sardinia`s Cup Mumm 36
  - 1999 3. Platz Europameisterschaft Beneteau 25
  - 2000 2. Platz Kieler Woche Beneteau 25
  - 1998/ 2000 Teilnahme am Ironman Europe in Roth
- Seit 1997 Landestrainer des Hamburger Segler Verbandes

## **Danksagung:**

Bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. U. Beisiegel die mir dieses Thema zur eigenständigen Ausarbeitung überließ und die nötigen technischen und finanziellen Mittel bereitstellte.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. D. Evans für die freundliche und kritische Unterstützung während des experimentellen Teils der Arbeit und allen anderen Mitarbeitern des Labors, für die freundliche Aufnahme in ihr Team.

Bedanken muß ich mich auch bei May- Britt Boy und Mirja und May Giese für die hilfreiche Unterstützung bei der sprachlichen und gestalterischen Ausarbeitung dieser Arbeit.

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>6</b>
<u>1.1</u> ERLÄUTERUNG DER THEMATIK.....	6
<u>1.2</u> LIPOPROTEINE.....	7
<u>1.3</u> STRUKTUR UND FUNKTION DER HEPATISCHEN LIPASE .....	12
<u>1.4</u> MUTATIONEN DER HEPATISCHEN LIPASE.....	15
<u>1.5</u> METHODEN ZUM AUFFINDEN VON MUTATIONEN.....	19
<u>1.6</u> POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR): .....	22
<u>1.7</u> AUFGABENSTELLUNG.....	24
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>26</b>
<u>2.1</u> MATERIAL.....	26
<u>2.2</u> METHODEN:.....	28
2.2.1 Patientengut und DNA- Isolierung : .....	28
2.2.2 PCR (Polymerasekettenreaktion).....	29
2.2.3 Reinigung des PCR-Produkts: .....	30
2.2.4 SSCP-Gel: .....	30
2.2.5 Färbemethoden: .....	31
2.2.6 DNA- Konzentrationmessung.....	33
2.2.7 Sequenzierung:.....	33
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	<b>34</b>
<u>3.1</u> CHARAKTERISIERUNG DES PROBANDENKOLLEKTIVS .....	34
<u>3.2</u> AMPLIFIZIERUNG VON EXON 7 UND 9 .....	35
<u>3.3</u> ELEKTROPHORESE DER PCR- PRODUKTE .....	35
3.3.1 SSCP- Analyse von Exon 9 .....	36
3.3.2 Untersuchung verschiedener SSCP- Bedingungen .....	36
<u>3.4</u> SEQUENZIERUNG.....	40
<u>3.5</u> RESTRIKTIONSENZYMERDAU .....	41
<u>3.6</u> BESTIMMUNG DER ALLELFREQUENZ.....	43
<u>3.7</u> KORRELATION DER GENETISCHEN VERÄNDERUNG MIT DEM PHÄNOTYP.....	44
<u>3.8</u> ANALYSE VON EXON 7.....	45
3.8.1 Bestätigung der gefundenen Mutation .....	48
<b>4 DISKUSSION</b> .....	<b>49</b>
<u>4.1</u> GEFUNDENE VARIANTEN UND IHRE AUSWIRKUNGEN .....	49
<u>4.2</u> ASPEKTE DES SCREENINGVERFAHRENS .....	51
4.2.1 SSCP- Methode .....	52
4.2.2 Restriktionsenzym- Analyse.....	53
4.2.3 Direktes Sequenzieren.....	54
<u>4.3</u> POLYMERASEKETTENREAKTION.....	54
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>56</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>57</b>

## **1 Einleitung**

### **1.1 Erläuterung der Thematik**

Die *Hepatische Lipase* ist eines der lipolytischen Enzyme des menschlichen Organismus. Anders als zum Beispiel die mit der Hepatischen Lipase eng verwandte *Lipoprotein-Lipase*, die vornehmlich im Fettgewebe und in der Muskulatur vorkommt, oder die vom Pankreas in den Dünndarm sezernierte *Pankreas Lipase*, deren Aufgabe es ist, die Nahrungsfette in resorbierbare Teile zu spalten, weiß man über die *Hepatische Lipase*, die von den Hepatozyten synthetisiert und sezerniert wird, relativ wenig.

Das liegt vor allem daran, daß sich der Ausfall des Enzyms beim Menschen nicht dramatisch bemerkbar macht. Es gibt keine bei einem Fehlen der Hepatischen Lipase typischerweise veränderten Parameter, die eindeutig auf eine Defizienz der *Hepatischen Lipase (HL)* schließen lassen.

Die Funktion und Aufgaben der HL sind daher noch recht unbekannt.

Man weiß, daß die HL an der Umwandlung von Lipoproteinen durch die Hydrolyse der Triglyceride und Phospholipide beteiligt ist. So werden durch eine Abspaltung von Triglyceriden durch die HL Lipoproteine mittlerer Dichte (IDL) in Lipoproteine geringer Dichte (LDL) überführt (Julius 1999). Die HL ist zudem an der Umwandlung der HDL (Lipoproteine hoher Dichte) beteiligt (Azema et al.1990). Die dichtere Subfraktion des HDL, das HDL<sub>3</sub>, das durch die Aktivität des Enzyms entsteht, zeigt eine gesteigerte Aufnahmefähigkeit für zelluläres Cholesterin.

Dem HDL wird die Rückführung des von abgestorbenen Zellen und Membranen ins Plasma abgegebenen Cholesterins zur Leber zugeschrieben (Glomset et al. 1968). Die epidemiologisch gesicherte inverse Korrelation zwischen der HDL-Konzentration und dem Risiko an atherosklerotischen Veränderungen zu erkranken, ist hierzu das klinische Korrelat.

Es wird zwischen verschiedenen Subklassen des HDL unterscheiden. Die anti-atherogene Aktivität der gesamten HDL hängt vor allem von dem Verhältnis zwischen HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub> ab und von der Möglichkeit des Organismus, eine Subklasse in die andere zu überführen. Die Hepatische Lipase ist an der

Umwandlung der HDL<sub>2</sub>- Partikel in die dichteren HDL<sub>3</sub> - Partikel beteiligt. Ein Versagen der Hepatischen Lipase führt so zu einer Zunahme des gesamten HDL, dessen Zusammensetzung aus den einzelnen Subklassen jedoch verändert und der Rücktransport des Cholesterin durch HDL beeinträchtigt ist.

Obwohl es zu einer Zunahme des gesamten HDL kommt, kann ein Versagen der Hepatischen Lipase die Entstehung von atheromatösen Veränderungen begünstigen und an der Entstehung einer koronaren Herzerkrankung sowie einer atheriellen Verschlüßerkrankung beteiligt sein.

Es ist daher erforderlich, die Rolle der Hepatischen Lipase im Organismus genauer zu untersuchen.

### **1.2 Lipoproteine**

Lipide werden an Lipoproteine gebunden in Körperflüssigkeiten transportiert. Die Lipoproteine haben die Aufgabe, die stark hydrophoben Lipide zu solubilisieren. Sie enthalten Proteine, die den Transport spezifischer Lipide in bestimmte Zielzellen regulieren.

Die Lipoproteine werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte als *Chylomikronen*, *Chylomikronen-Remnants*, *Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL)*, *Lipoproteine mittlerer Dichte (IDL)*, *Lipoproteine geringer Dichte (LDL)* und *Lipoproteine hoher Dichte (HDL)* klassifiziert.

Lipoproteine unterscheiden sich weiterhin hinsichtlich ihrer Funktion, ihrer Zusammensetzung aus Apoproteinen und der Lipide, die sie im Kern transportieren.

<b>Lipoproteine</b>	<b>wichtigste Lipidklasse im Kern</b>	<b>Apoprotein</b>	<b>Mechanismus der Lipidabgabe</b>
Chylomikron	Nahrungstriglyceride	A-1; A-2	Hydrolyse durch Lipoprotein-Lipasen
Chylomikron-Remnants	Nahrungscholesterinester	A-4; B-48	rezeptorvermittelte Endozytose in die Leber
VLDL	endogen Triglyceride	B-100; C; E	Hydrolyse durch Lipoprotein-Lipasen
IDL	endogene Cholesterinester	B-100; E	rezeptorvermittelte Endozytose in die Leber und Umwandlung in LDL durch die HL
LDL	endogene Cholesterinester	B-100	rezeptorvermittelte Endozytose in Leber und andere Gewebe
HDL	endogene Cholesterinester	A-1; A-2	Transfer von Cholesterinestern auf IDL und LDL

**Tabelle 1:** Eigenschaften der Lipoproteine nach Brown, M.S.; Goldstein, J.L. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 7. Auflage (hrsg. von Gilman, A.G.; Goodman, L.S.; Rall, T.W.; Murad, F.) New York 1985. S. 825

Die Aufgabe der Lipoproteine besteht in dem Transport von Lipiden zu Zielzellen und von diesen zur Leber. Die Lipide werden von den Zellen als Bausteine benötigt oder dienen durch spezielle Enzyme hydrolysiert der Energiegewinnung.

Die Apoproteine fungieren als Signale für Enzyme und Rezeptoren und werden zwischen den Lipoproteinen ausgetauscht.

Triglyceride, Cholesterine und andere mit der Nahrung aufgenommene Lipide werden von den großen Chylomikronen vom Darm zur Leber und zu den Fettzellen transportiert.

Die Nahrungstriglyceride werden innerhalb von Minuten von der Lipoprotein-Lipase (LPL) hydrolysiert, die am Endothel der Kapillaren des Fettgewebes und anderer peripherer Gewebe lokalisiert ist. Dabei bleibt ein cholesterinreicher Rest übrig, das sogenannte Chylomikronen-Remnant, das von der Leber aufgenommen wird.

Anders als die Nahrungstriglyceride werden die endogen produzierten Triglyceride von *Lipoproteinen sehr geringer Dichte* (VLDL) transportiert. Diese werden hauptsächlich in der Leber produziert. Die Triglyceride werden von den gleichen Lipasen freigesetzt, die auch auf die Chylomikronen einwirken. Die verbleibenden Reste nennt man *Lipoproteine mittlerer Dichte* (IDL). IDL werden entweder in die Leber aufgenommen oder durch die HL unter Abspaltung von Triglyceriden in *Lipoproteine geringer Dichte* (LDL) umgewandelt (Julius 1999). LDL sind die wichtigsten Cholesterintransporter des Körpers. In ihrem Kern befinden sich etwa 1500 veresterte Cholesterinmoleküle. Die Funktion der LDL besteht darin, Cholesterin zu den peripheren Geweben zu transportieren und dort die *de-novo*-Synthese von Cholesterin zu kontrollieren.

Das Cholesterin aus peripheren Zellen, das nicht mehr benötigt wird, wird durch *Lipoproteine hoher Dichte* (HDL) aufgenommen und zur Leber zurücktransportiert (Reverser Cholesterin-Transport; Glomset et al 1968).

Die HDL-Lipoprotein-Subklassen haben eine Dichte von 1,063-1,21 g/ml. Es werden drei Subfraktionen, HDL<sub>1</sub>, HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub>, unterschieden.

Während HDL<sub>1</sub> und HDL<sub>3</sub> in ihren Konzentration wenig variieren, unterliegt die Konzentration der HDL<sub>2</sub>-Fraktion, in der das meiste des gesamten HDL-Cholesterin gebunden ist, größeren Schwankungen.

Die in epidemiologischen Studien nachgewiesene anti- atherogene Aktivität der HDL wird der oben beschriebenen Fähigkeit der HDL zum „reversen Cholesterin-Transport“ zugeschrieben.

Aufgenommen wird das Cholesterin von der HDL<sub>3</sub>-Fraktion. Durch die Fusion von Apolipoproteinen und Phospholipiden, die durch die LPL- vermittelte- Hydrolyse von VLDL-Partikeln freigesetzt werden, mit den HDL<sub>3</sub>- Partikeln entsteht HDL<sub>2</sub>. In deren Kern befindet sich das Cholesterin der peripheren Zellen, welches durch die Lecithin-Cholesterin- Acetyltransferase (LCAT) verestert wird.

Da die Aufnahme des Cholesterins zu einer Umwandlung von HDL<sub>3</sub> zu HDL<sub>2</sub> führt, reflektiert die HDL<sub>2</sub>- Konzentration in physiologischer Weise die anti- atherogene Aktivität der gesamten HDL.

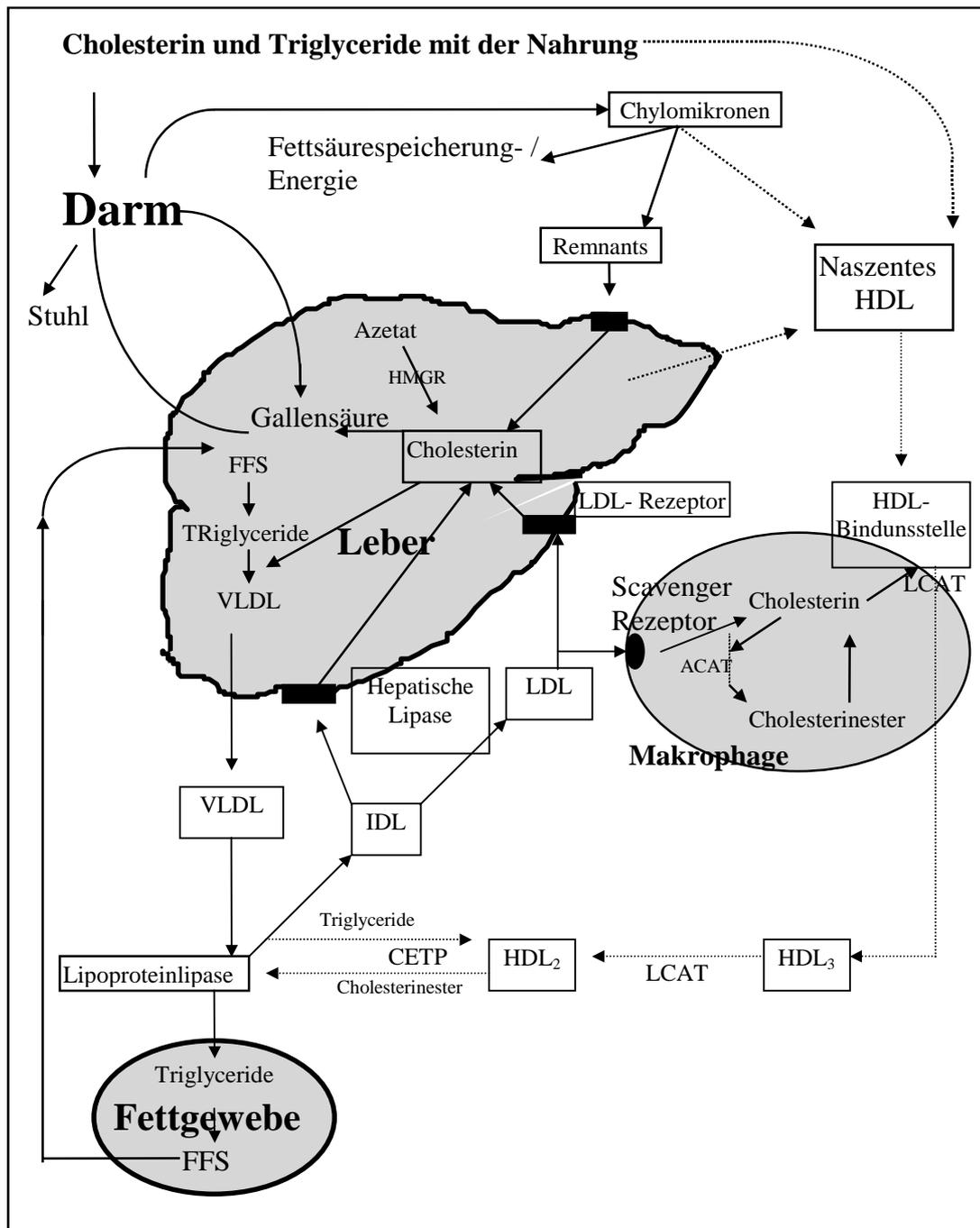
Die Bildung des HDL<sub>2</sub> hängt von der Aktivität der LPL ab und wird durch einen hohen VLDL- Umsatz begünstigt. Eine positive Korrelation von LPL- Aktivität und HDL<sub>2</sub>-Konzentration konnte in klinischen Studien belegt werden (Kuusie et al. 1982).

Der Abbau des HDL<sub>2</sub> wird durch die Wirkung der Hepatischen Lipase gesteigert. Das Enzym katalysiert die Hydrolyse der HDL<sub>2</sub>- Phospholipide und - Triglyceride und überführt so HDL<sub>2</sub> in die HDL<sub>3</sub>-Subklasse (Kuusie et al. 1980).

Das Cholesterin der HDL<sub>2</sub>-Partikel wird von den Zellen der Leber aufgenommen, wobei dieser Vorgang vermutlich von der an den Endothelzellen der Lebersinusoiden lokalisierten Hepatischen Lipase promotet wird (Jansen et al. 1985). Ein Funktionsausfall oder eine Verringerung der Aktivität der Hepatischen Lipase führt zu einem Anstieg des Serum- HDL<sub>2</sub>-Spiegels.

Die Lipoprotein- Lipase und die Hepatische Lipase regulieren so den HDL<sub>2</sub>- Serum- Spiegel in reziproker Weise. Während eine erhöhte LPL-Aktivität einen erhöhten Serum- HDL<sub>2</sub>- Spiegel fördert, führt eine Zunahme der Aktivität der HL zu einer Abnahme der Konzentration des HDL<sub>2</sub> im Serum.

Ein erhöhter HDL<sub>2</sub>-Serum- Spiegel ist folglich nicht immer Ausdruck gesteigerter Cholesterinaufnahme durch das HDL sein, sondern kann auch auf eine verminderte Aktivität der Hepatischen Lipase zurückzuführen sein und ist somit nicht zwangsläufig Zeichen eines Schutzes vor Atherosklerose.



**Abbildung 1:** Lipoproteinsynthese und -metabolismus. Nach *Fettstoffwechselstörungen*; M. Hanefeld 1999, noch nicht erwähnte Abkürzungen FFS: freie Fettsäuren; CETP: Cholesterolester-Transfer- Protein; HMGR: HMG- CoA- Reduktase

### **1.3 Struktur und Funktion der Hepatischen Lipase**

Die HL ist ein lipolytisches Enzym, das vornehmlich von Hepatozyten synthetisiert und sezerniert wird. Es ist an der Endotheloberfläche der hepatischen Sinusoide lokalisiert und besitzt sowohl Triglycerid- Hydrolase als auch Phospholipase A<sub>1</sub>-Aktivität. Auf dem Blutweg gelangt das Enzym zu den Erfolgsorganen. Es scheinen auch Nebennieren, Hoden und Ovarien eine wenn auch verkürzte Form der HL zu exprimieren (Verhoeven et al.1994).

Die Hepatische Lipase gehört zusammen mit der Lipoprotein- Lipase und der Pankreas- Lipase zu der Genfamilie der neutralen Lipasen. Die drei Enzyme haben sich in der Phylogenese aus einem Gen entwickelt. Sie weisen daher deutliche Homologien hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz und der Organisation ihrer Gene auf.

Das Gen der humanen HL wurde auf Chromosom 15 q 21 lokalisiert, es ist 35 kb lang (Hegele et al. 1990) und beinhaltet 9 Exon- und 8 Intronsequenzen (Cai et al.1989).

In Tabelle 2 sind die Exons in ihrer Größe und Funktion aufgeführt.

Das fertige Enzym besteht aus 477 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 60 000 Da (Datta et al.1988). Durch eine intravenöse Injektion von Heparin wird die Hepatische Lipase von der Endotheloberfläche der Lebersinusoiden in die Zirkulation freigesetzt. Die Aktivität des Enzyms kann dann im Plasma gemessen werden.

Die HL zeigt vier asparaginhaltige Glykosilierungsstellen bei Aminosäure 20, 56, 340 und 375. Diese asparaginhaltigen Glykosilierungsstellen scheinen wichtig für die Aktivität des Enzyms zu sein. Durch die Blockade dieser Glykosilierungsstellen durch Tunicamycin oder durch gezielte Mutagenese der betreffenden Genabschnitte wurde die Bedeutung dieser asparaginhaltigen Glykosilierungsstellen unterstrichen, wobei sich jedoch der Verlust einzelner Glykosilierungsstellen unterschiedlich stark auf die Funktionstüchtigkeit und die Aktivität des Enzym auswirkt (Ben-Zeev et al. 1994).

<b>Exon</b>	<b>Basen bp</b>	<b>Größe bp</b>	<b>Codon As</b>	<b>Funktion</b>
Exon 1		106	-22-8	Signal Peptidomäne
Exon 2		174	9-69	
Exon 3	282-463	181	70-130	
Exon 4	464-580	117	131-170	Bindung an das Lipoprotein Substrat und katalytisches Zentrum
Exon 5	581-815	233	171-247	hoch konserviert und katalytisches Zentrum
Exon 6	816-1058	242	248-329	Heparinbindungssequenz
Exon 7	1059- 1175	116	330-368	
Exon 8	1176- 1394	218	369-441	
Exon 9	1395- 1559	164	442-477	Kodiert eine Sequenz basischer Aminosäuren, die als Anker an der Endotheloberfläche dienen

**Tabelle 2:** Funktion und Größe der Exons der Hepatischen Lipase und der dazugehörigen Aminosäure Codons

Der Hepatischen Lipase kommen im Stoffwechsel der HDL- Proteine wichtige Steuerungsfunktionen zu. An den Lebersinusoiden lokalisiert erleichtert die HL die Aufnahme der Cholesterinester der HDL-Partikel in die Leberzellen. Für diesen Mechanismus spielt die Phospholipase A<sub>1</sub>-Aktivität der Hepatischen Lipase eine entscheidende Rolle (Marques-Vidal et al. 1994). Auf welche Art und Weise die Hepatische Lipase die Aufnahme der Cholesterinester in die Leberzelle fördert, ist noch unklar. Marques-Vidal et al. haben die Theorie aufgestellt, daß durch eine eingeschränkte Hydrolyse der Apo A<sub>1</sub>- Anteile der HDL-Partikel Domänen

freigelegt werden, die dann mit Rezeptoren an den Oberflächen der Leberzellen interagieren (Marques- Vidal et al. 1994).

Eine komplette oder partielle Inaktivität des Enzyms *in vivo* führt zu einer deutlichen Verschiebung des Lipoprotein-Profiles im Plasma. Eine Zunahme der HDL<sub>2b</sub> und HDL<sub>2a</sub> – Subfraktionen. Eine Abnahme der HDL<sub>3</sub>-Fraktion sowie eine Verschiebung im Profil der LDL-Fraktionen zu Gunsten von LDL<sub>1</sub> und LDL<sub>2</sub> konnte nachgewiesen werden (Kuusi et al. 1987). Dies stützt die These, daß die Hepatische Lipase mit hoher Affinität Triglyceride und Phospholipide als Bestandteile der HDL<sub>2</sub>- Subfraktionen hydrolysiert und so die Umwandlung von HDL<sub>2</sub> zu HDL<sub>3</sub> katalysiert.

Dies geschieht vor allem dann, wenn die HDL<sub>2</sub>-Partikel sich postprandial mit Triglyceriden anreichern. Diese erhalten sie von Chylomikronen im Austausch gegen Cholesterinester. Eine durch die HL katalysierte erhöhte Umwandlung dieser triglyceridreichen HDL<sub>2</sub>- Partikel in HDL<sub>3</sub> kann beobachtet werden.

Je größer die postprandiale Lipidämie ist, desto größer wird der Umsatz von HDL<sub>2</sub> in HDL<sub>3</sub>. Dies ist eine Erklärung für die großen Konzentrationsschwankungen der HDL<sub>2</sub>-Fraktion im Serum (Patsch et al. 1984).

Untersuchungen zur Hydrolyse von Triglyceriden auch anderer Lipoproteine weisen in unterschiedliche Richtungen. Connelly et al. 1990 konnten durch Untersuchungen an Probanden mit familiärer Mangelaktivität der Hepatischen Lipase eine hohe Korrelation zwischen der Aktivität des Enzyms und dem Gehalt der LDL- und HDL- Partikel an Triglyceriden feststellen. Der Cholesteringehalt der LDL- und HDL- Partikel war im Vergleich zu denen der Familienmitglieder mit normaler HL- Aktivität nahezu identisch.

Eine signifikante Korrelation zwischen dem VLDL-Cholesterin und der HL-Aktivität weiblicher Probanden einer Studie konnten Applebaum -Bowden, Haffner, Wahl et al. 1985 zeigen.

Bei den männlichen Probanden beider Untersuchungen wurde eine negative Korrelation zwischen dem Alter der Probanden und der HL-Aktivität festgestellt.

Bei Frauen wurde ein Zusammenhang zwischen der Hormonkonzentration und der HL- Aktivität gezeigt. Demnach hemmen Östrogene die HL-Aktivität, Androgene steigern sie

(Applebaum -Bowden, Haffner, Wahl et al. 1985; Connelly et al. 1990).

Die Hepatische Lipase scheint zudem den Aufnahme- und Verarbeitungsprozeß von Chylomikronen-Remnants durch Leberzellen zu unterstützen. Es konnte gezeigt werden, daß Leberzellen deutlich schneller solche Chylomikronen-Remnants aus der Zirkulation aufnehmen, die zuvor durch die HL hydrolysiert worden waren (Shafi, Brady, Bensadoun, Havel et al. 1994 und Krapp et al. 1996). Die Untersuchungen zeigten aber auch, daß die HL die Aufnahme von Chylomikronen- Remnants in die Leberzellen nur erleichtert, hierfür aber nicht essentiell notwendig ist. Ein familiäres Defizit der HL führt demnach phänotypisch nicht zu einer Akkumulation von Chylomikronen- Remnants im Blut (Shafi et al. 1994).

Weiterhin ist die HL an der Umwandlung von IDL in LDL durch die Abspaltung von Triglyceriden beteiligt (Julius et al 1999).

### **1.4 Mutationen der Hepatischen Lipase**

Die Funktion der HL im Organismus kann durch die Untersuchung der Auswirkungen von Mutationen im Gen der HL auf den Metabolismus der Lipoproteine analysiert werden. Am besten gelingt dies in Untersuchungen von Probanden mit einer familiären Defizienz der HL. Zu den klinischen Symptomen eines solchen HL- Mangels gehören das frühe Auftreten von Atherosklerose, eine Steigerung der Plasmacholesterin- Konzentration sowie der Triglyceride und der VLDL-, LDL- und der HDL- Subfraktionen.

Knudsen et al. konnten 1996 die genetische Grundlage der HL-Defizienz in einer finnischen Familie aufklären. Bei dieser Familie führte das gemeinsame heterozygote Auftreten von Mutationen auf Exon 8 Thr383Met und Exon 7 Leu334Phe zu einer mangelnden Aktivität des Enzyms.

Der Aminosäuretausch von Threonin in Methionin ist eine der am längsten bekannten Mutationen des HL-Gens. Sie kommt heterozygot vor und führt allein noch zu keinem vollständigem Verlust der Aktivität der Hepatischen Lipase.

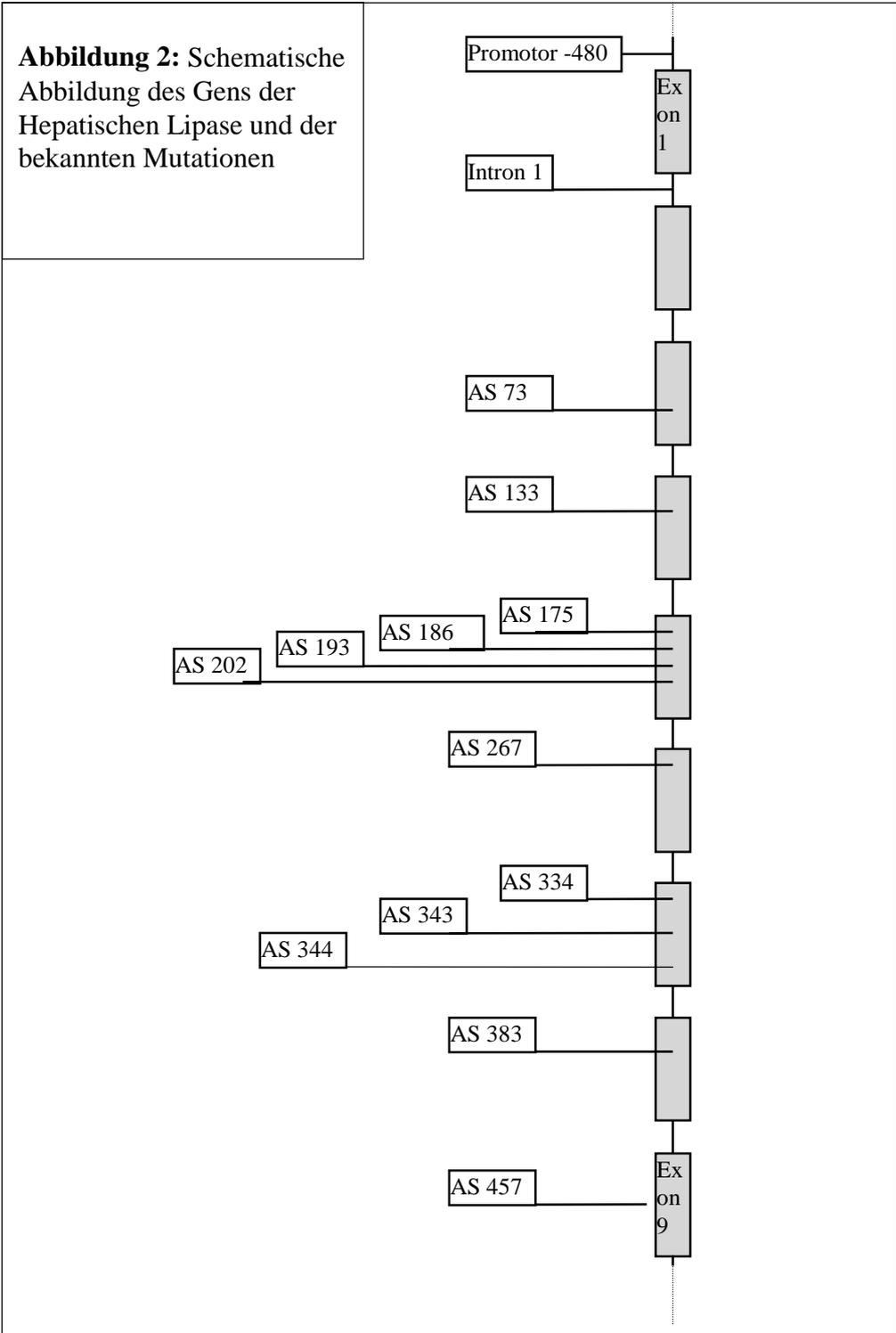
In Expressionsversuchen durch Transfektion von COS-Zellen mit der Thr383Met cDNA konnten im Medium der Zellen nur noch 6% der HL-Aktivität nachgewiesen werden. Der gleiche Versuch zeigte für die Leu334Phe- Mutation im Medium eine Aktivität von 30%. (Knudsen et al. 1996). Zusammen führen die Mutationen zu einem Aktivitätsverlust der HL. Phänotypisch zeigte sich vor allem ein Anstieg der HDL<sub>2</sub>-Subfraktion.

Für einen weiteren Fall der HL-Defizienz in einer kanadischen Familie konnten Hegele et al. 1992 eine Kombination aus der oben erwähnten Thr383Met und Ser267Phe- Mutation, beide heterozygot, darstellen. Die Betroffenen fielen durch frühzeitige Atherosklerose und abnorme Lipidprofile auf. Zudem konnten abnorme Apoprotein B- Konzentrationen und die Anwesenheit von  $\beta$ -VLDL beobachtet werden.

Zu einem vollständigen Verlust der HL-Aktivität führt eine 1996 von Brand et al. beschriebene Mutation innerhalb des Introns 13 bp vor dem zweiten Exon. Durch diese Mutation entsteht eine alternative Spleißstelle, deren Folge ein funktionsloses Spleißprodukt ist.

Jansen et al. entdeckten 1996 eine Mutation innerhalb der Promotorsequenz des HL-Gens. Der Basentausch von Cytosin zu Thymin an Position -480 führt zu einem Aktivitätsverlust von -15% bei heterozygoten Trägern und -20% bei homozygoten Trägern. Der Aktivitätsverlust der HL bei den homozygoten Trägern ging mit einer Zunahme des HDL- Cholesterins einher.

Mutationen der Aminosäure 73 und 193 haben keinen nachweisbaren Einfluß auf die Aktivität des Enzyms. Sie bilden Isoenzyme der Hepatischen Lipase und sind zum Teil in der Bevölkerung recht weit verbreitet.



In der folgenden Tabelle 2 sind die beschriebenen Mutationen mit ihren Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz nochmals zusammengefaßt. Aktivitätsverändernde Mutationen, aktivitätsverändernde Polymorphismen und stumme Veränderungen sind voneinander getrennt

Exon	Nuc. Pos.	Nuc. Tausch	Codon	Wildtyp Aminos.	Mutanten Aminos.
------	-----------	-------------	-------	-----------------	------------------

**Aktivitätsbeeinflussende Mutationen:**

Promotor	-480	C>T			
Intron 1		A>G			
8	1221	C>T	383	Threonin	Methionin
6	873	C>T	267	Serin	Phenylalanin
5	630	G>A	186	Arginin	Histidin
7	1075	A>C	334	Leucin	Phenylalanin

**Polymorphismen:**

3	290	G>A	73	Valin	Methionin
5	651	A>G	193	Asparagin	Serin

**Stumme Mutationen:**

4	472	G>T	133	Valin	
5	598	G>G	175	Glycin	
5	679	C>A	202	Threonin	
7	1099	G>C	343	Glutamin	
7	1104	G>A	344	Threonin	
9	1444	C>T	457	Threonin	

**Tabelle 3:** Mutationen der Hepatischen Lipase. Im ersten Absatz sind die aktivitätsbeeinflussenden Mutationen aufgeführt, im zweiten die Polymorphismen, im dritten stumme Mutationen ohne Aminosäureveränderungen.

Die in der Tabelle vorgenommene Unterscheidung zwischen *aktivitätsbeeinflussenden Mutationen*, *Polymorphismen* und *stummen Mutationen* beruht auf Art, Häufigkeit und Auswirkungen der Veränderungen der Basensequenz.

Stumme Mutationen sind Veränderungen der DNA- Sequenz, die keinen Einfluß auf die Aminosäuresequenz haben. Dies sind zum Beispiel die sogenannten „third base wobbles“, Änderungen der dritten Base in einem für eine Aminosäure codierenden Basentriplett. Aufgrund der Tatsache, daß die meisten Aminosäuren durch mehrere Basentriplett codiert werden, die sich meist nur in der dritten Base unterscheiden, hat ein Austausch dieser Basen keine andere Aminosäure in der Sequenz des Proteins zur Folge, daher der Begriff „stumme Mutationen“.

Polymorphismen sind häufig auftretende Veränderungen der DNA eines Gens.

Aktivitätsbeeinflussende Mutationen sind Veränderungen, die deutlich seltener auftreten als Polymorphismen. Anders als die stummen Mutationen wirken sich diese Mutationen auf die Aminosäuresequenz der codierten Proteine aus.

### **1.5 Methoden zum Auffinden von Mutationen**

Sollen routinemäßig Genabschnitte nach Mutationen abgesucht werden, müssen die anzuwendenden Methoden, gewissen Anforderungen genügen. Sie müssen leicht zu handhaben sein und die Möglichkeit bieten, lange DNA- Abschnitte absuchen zu können, ohne daß das Testverfahren seine Sensitivität verliert.

Verfahren, mit denen Mutationen sowohl aufgespürt als auch beschrieben werden können, wie dies beim Sequenzieren durch die Didesoxy-Methode von Sanger möglich ist, sind zeit- und arbeitsaufwendig, zudem teuer, und fallen somit als Screeningmethoden aus.

Methoden, die sich auf den Nachweis von Veränderungen der Basen im Gen beschränken, haben sich als Suchmethoden in der Routine durchgesetzt. Verdächtige Abschnitte können dann entweder sequenziert werden oder mit Restriktionsendonukleasen verdaut und durch entstandene Restriktionslängen-Polymorphismen untersucht werden.

Die Denaturierende Gradienten- Gelelektrophorese (DGGE) von Meyers et al. 1988 nutzt die unterschiedlichen Schmelzeigenschaften von Doppelstrang-DNA-Abschnitten, die sich in Basenpaarungen unterscheiden. Dazu werden Elektrophorese- Gele benutzt, in denen die Doppelstrang-DNA entweder chemisch durch Harnstoff oder physikalisch durch Hitze zu Einzelstrang-DNA denaturiert wird. Der Übergang von Doppelstrang-DNA zu Einzelstrang-DNA auf dem Gradientengel kann aufgrund der schlechteren Laufeigenschaften von Einzelstrang-DNA auf Polyacrylamidgelen gut nachvollzogen werden (Meyers et al. 1988).

Eine weitere Methode nutzt den Single- Strand- Conformation- Polymorphism (SSCP) von Einzelstrang-DNA (Orita et al. 1989). Die Laufeigenschaften von DNA-Abschnitten auf einem Gel in einem elektrischen Feld sind abhängig von dessen Größe und Form. Die Form der Einzelstrang-DNA bestimmt ganz erheblich die Laufgeschwindigkeit in einem Gel. Bedingt wird sie durch die intramolekulare Basenanordnung und deren Interaktionen. Verändert sich eine Basenpaarung in der Nukleotidsequenz, verändert sich auch die Konformation des Einzelstranges und führt so zu einer veränderten Laufgeschwindigkeit gegenüber ansonsten identischen Genabschnitten. Durch diese Methode kann die Abweichung einer einzelnen Base in der Basensequenz eines Genabschnittes detektiert werden.

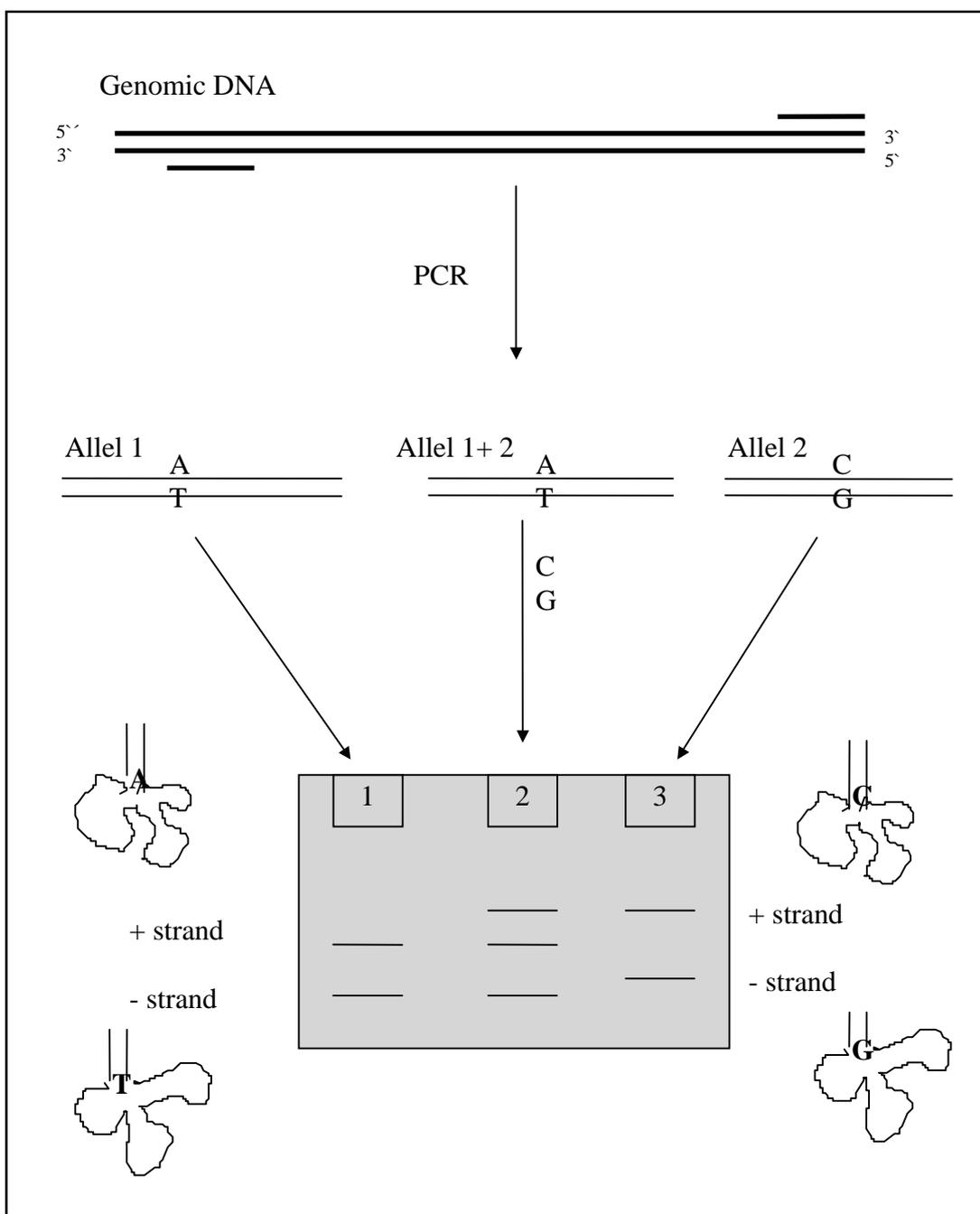
Durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) werden die zu untersuchenden Abschnitte eines Gens amplifiziert. Im Gegensatz zu der DDGE-Methode werden die so gewonnenen DNA-Fragmente nicht innerhalb des Gels denaturiert, sondern durch Erhitzen und sofortiges Abkühlen auf 0-4°C in Einzelstränge zerlegt und erst dann auf das Gel aufgetragen.

Auf die Sensitivität des Testverfahrens nehmen die Umgebungstemperatur, die Zusammensetzung des Gels und der Elektrophoresepuffer Einfluß.

Untersuchungen mit bekannten Mutationen lassen Schätzungen über die Empfindlichkeit der Methode von bis zu 90% je nach Größe des zu untersuchenden Genfragments zu. Je größer die zu untersuchenden Abschnitte sind, desto geringer ist die Empfindlichkeit. Die optimale Größe liegt zwischen 150 und 250 Basenpaaren.

Desweiteren ist die Empfindlichkeit der Methode stark abhängig von den Bedingungen der Elektrophorese, so daß kein Ausschluß von vorhandenen Mutationen garantiert werden kann.

In Screeningverfahren zum Detektieren von neuen Mutationen hat sich die SSCP-Methode jedoch wegen ihrer leichten Handhabung und der Möglichkeit, mit einer ausreichend hohen Sensibilität viele Proben auf einmal zu untersuchen, bewährt.



**Abbildung 3:** Methodische Repräsentation der SSCP-Methode. Die doppelsträngigen PCR-Produkte werden durch Hitze denaturiert und die so gewonnenen Einzelstränge auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt nach der intramolekularen Struktur des Einzelstranges. Veränderungen in der Konformation, verursacht durch Veränderungen der Basenfolge, zeigen sich durch unterschiedliche Positionen der Banden (nach *PCR: Clinical Diagnostics and Research*, Rolfs 1991).

### **1.6 Polymerasekettenreaktion (PCR):**

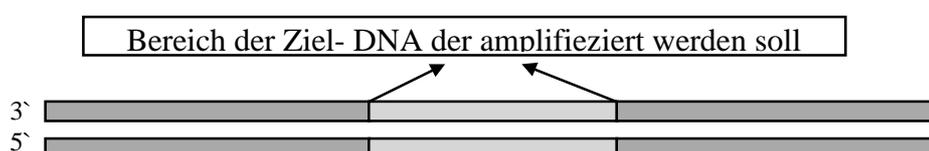
Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Vervielfachung eines bestimmten Abschnitts der genomischen DNA.

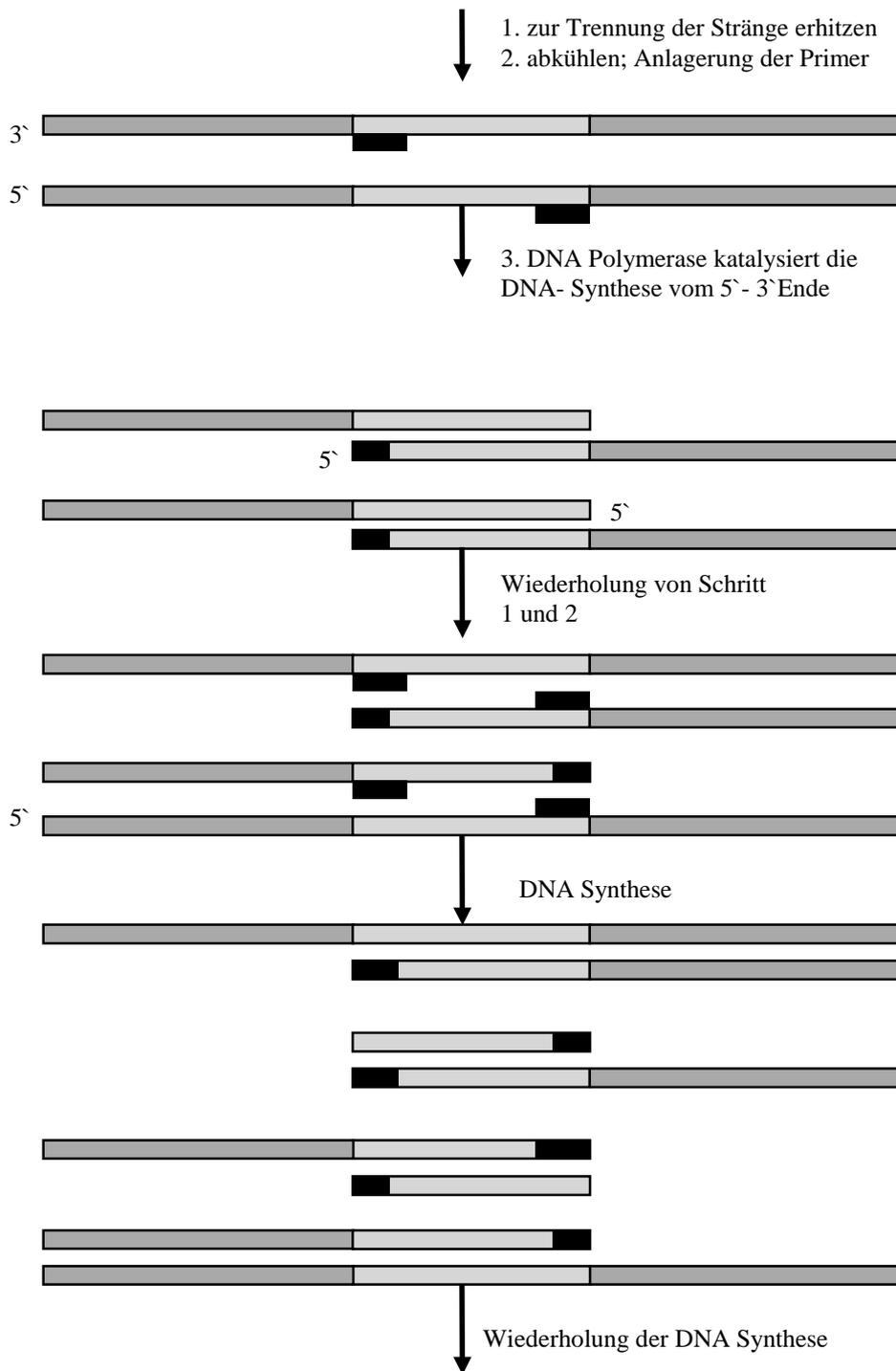
Ein Teil der aus dem Patientenblut gewonnenen Doppelstrang-DNA wird durch Erhitzen in Einzelstränge zerlegt, damit die DNA-Polymerase sich an den Einzelstrang binden und mit Hilfe der Primer den Aufbau des komplementären Basenstranges starten kann. Die DNA-Polymerase bindet sich an diesem kurzen Doppelstrang und synthetisiert von hier aus unter Anwesenheit einer ausreichenden Menge dNTP eine dem Einzelstrang genau komplementäre Sequenz.

Durch die Auswahl eines geeigneten Primers kann man den zu synthetisierenden Abschnitt genau bestimmen. Als Primersequenz wählt man einen Abschnitt vor dem eigentlichen Exon im Intronbereich. So kann man sichergehen, daß Mutationen im Bereich der Intron/Exon-Grenze nicht durch den Primer überdeckt werden. Die Veränderung einer Base würde das Bindungsverhalten des Primersegments, das aus 15-20 Basen besteht, kaum beeinflussen. Der Primer würde trotzdem binden und so die Mutation überdecken.

Im nächsten Syntheseschritt der PCR-Reaktion wird komplementär zu der eingebauten Primersequenz statt der veränderten Sequenz eine fehlerfreie Basensequenz synthetisiert. Systematisch verschwinden Mutationen im Intron/Exon-Bereich mit der Amplifizierung.

**Abbildung 4:** Darstellung der PCR-Reaktionsschritte





Die PCR ist in drei grundlegende Reaktionsschritte unterteilt, die zusammen einen Zyklus darstellen:

Während der **Denaturierung** wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 95° C in Einzelstränge zerlegt, durch das **Annealing** gehen die Primer bei 60° C eine Bindung mit den Einzelsträngen ein und bei der **Elongation** werden die Basen bei 72° C von den Primern ausgehend entlang der Einzelsträngen gebunden.

Durch die Wiederholung des zyklischen Erhitzens und Abkühlens des Reaktionsansatzes wird die Amplifizierung des betreffenden Fragmentes erreicht.

Am Ende eines jeden Zyklus gibt es jeweils zwei DNA-Stränge, die ab der Primer-Sequenz bis zum 3`- bzw. bis zum 5`- Ende doppelsträngig sind. Nach Trennung der Doppelstränge durch Erhitzen, erhält man vier Stränge, von denen jeweils zwei neu synthetisiert sind und Bindungsstellen für die Primer besitzen. Nach einem erneuten Synthesesyklus haben zwei Einzelstränge die gewünschte Sequenz.

Da bei jedem Zyklus an allen Einzelsträngen gleichzeitig neu synthetisiert wird, ist das Endergebnis von n Zyklen theoretisch  $2^n$  Moleküle Doppelstrang-DNA.

Da zur Trennung der Doppelstränge das Reaktionsgemisch auf 95° C erhitzt werden muß, verwendet man die DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus Aquaticus* (Taq) mit einem Wirkungsoptimum bei 75°C, um in der Elongationsphase das Gemisch nicht übermäßig abkühlen zu müssen.

### **1.7 Aufgabenstellung**

Durch die Analyse der Auswirkungen von Mutationen oder Polymorphismen im Gen der HL auf den Lipidstoffwechsel kann man Rückschlüsse auf die Funktion des Enzyms im Stoffwechsel ziehen. Es sind jedoch noch relativ wenige Mutationen bekannt, da Probanden mit einer HL-Defizienz in klinischen Routinekontrollen kaum auffallen.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, nach Mutationen auf Exon 7 und 9 der Hepatischen Lipase zu suchen und diese mit verschiedenen Parametern des Lipidstoffwechsels in Korrelation zu setzen.

Untersucht werden Patienten der Lipid-Ambulanz des Universitätskrankenhauses Eppendorf mit Fettstoffwechselstörungen und Personen einer Kontrollgruppe mit unauffälligen Blutfettwerten.

Um eventuell vorhandene Veränderungen der Basensequenzen der entsprechenden Genabschnitte auszumachen, sollte die DNA der Probanden mit Hilfe der SSCP-Methode untersucht werden. SSCP steht für Single-Strang-Conformation-Polymorphismen. Bei dieser Methode wird die Doppelstrang-DNA der Probanden in die Einzelstränge zerlegt. Diese werden elektrophoretisch in einem Acrylamidgel

aufgetrennt. Veränderungen in der Basensequenz führen zu einer veränderten Konformation der Einzelstränge. Dieser Konformationspolymorphismus kann sich in der Elektrophorese als eine Veränderung der Laufgeschwindigkeit der Einzelstränge im Acrylamidgel bemerkbar machen.

Um die Einzelstränge im Elektrophoresegel nachzuweisen, müssen die zu untersuchenden Genabschnitte zuvor amplifiziert werden.

Hierzu nutzt man die Polymerasekettenreaktion (PCR). Durch die Auswahl geeigneter Primer kann aus der gesamten DNA eines Probanden das zu untersuchende Exon amplifiziert werden.

Mutationen können durch die SSCP- Methode zwar prinzipiell erkannt, aber nicht charakterisiert werden. Zur Charakterisierung der Mutationen sollen die betroffenen Genabschnitte mittels der Didesoxy-Methode von Sanger sequenziert werden.

Für gefundene und charakterisierte Sequenzveränderungen sollen dann Restriktionsenzyme gesucht werden, die in der Lage sind die Sequenzveränderungen zu bestätigen.

Veränderungen in der Sequenz werden dann in ihrer Auswirkung auf den Fettstoffwechsel der Probanden durch Analyse von klinischen Laborparametern untersucht.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

Alle Materialien wurden in p.A.- Qualität verwendet.

#### **Blutentnahme:**

S -Monovetten KE (Sarstedt); Kanülen

#### **DNA- Isolierung:**

##### **Lösungen:**

**STE-Waschpuffer:** 20 mM Tris-HCL, pH=7,4; 10mM NaCl; 0,1mM EDTA (Sigma), pH=8,0

**Lysis- Puffer:** 10mM Tris HCl, pH=7,4; 0,2mM EDTA; 400mM NaCl

**TE- Puffer:** 10mM Tris HCl, pH=7,4; 0,2mM EDTA

STE- Puffer, Lysis- Puffer und TE- Puffer werden filtriert und autoklaviert.

**Proteinkinase K:** Proteinkinase K 100mg (Boehringer Mannheim), 10ml 10% SDS; 20ml EDTA 0,5M Zugabe von 70ml H<sub>2</sub>O dest.; nicht autoklaviert; nicht destiliert; 6M NaCl

#### **PCR:**

10xReaktionspuffer (1,0 mlTris-HCl, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>) pH=8,3 bei 20°C, Taq DNA Polymerase (Boehringer Mannheimer), 10mM dNTP (je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Pharmazia)), Primer (Eurogene), DMSO (Serva), Mineraloil (Sigma); Reaktionsgefäße: 0,5µl safe ware (Eppendorf)

#### **PCR-Aufreinigung:**

QIA- quick, PCR- Purifikation- Kit (Qiagene)

#### **Restriktionsverdau:**

*BsaI* 1 (New England Biolabs) 250 units, Erkennungssequenz: 5'-C-CNNGG-3', 3'-GGNNC-C-5'; Puffer: NEB 2, Inkubationstemperatur: 60°C

Färbungen:

**Silberfärbung:** Essigsäure; AgNO<sub>3</sub> (Roth); 37% Formaldehyd (Sigma); Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wasserfrei; Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O; Glycerol; Methanol

**Ethidiumbromidfärbung:** 10mg/ml Ethidiumbromid (Sigma)

Sequenzierung:

DNA Sequenzierungskit, DYE Terminator (Perkin- Elmer Cetus)

Elektrophorese:

**Laufpuffer:** 1x Tris-Borate (TBE): 0,09M Tris-Borate; 0,002M EDTA

**Größenmarker:** 1kb DNA-Leiter (1µl/µg) (Gibco); 100 bp DNA-Leiter (1µl/µg) (Gibco)

**Beladungspuffer:** 1x TBE, 40% Glycerol, Bromphenolblau

**Agerosegelelektrophorese:** 1% Agerosegel (Serva); Ethidiumbromid (10mg/ml); 10µl PCR Produkt zusammen mit 2-3µl Beladungspuffer; 1µl Marker

**Polyacrylamidgelelektrophorese:** 40% Acrylamid/Bisacrylamid (29/1)(Appligene); 10%

TBE; 10% Glycerol; 1% Ammoniumpersulfat (APS); 0,4% Tetraethylmethyldiamin(TEMED)

**SSCP-Gelelektrophorese:** 40% Acrylamid/Bisamid (29/1)(Appligene); 10% TBE; 10% Glycerol; 1% Amoniumpersulfat; 0,4% TEMED

**SSCP-Mix:** 300µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>; 100µl 10x TBE; 500µl Harnstoff; Bromphenolblau; 5µl PCR Produkt mit 45µl SSCP-Mix auf 95°C für 5 min erhitzt, danach sofort im Eis- Wasser- Gemisch gekühlt

Geltrocknung: (Promega)

**Netzgeräte:** Biorad, Biometra, LKB Bromma

**Zentrifugen:** Hettich (DNA-Isolierung), Heraeus Biofuge Fresco mit Eppendorf Reaktionsgefäßen

**PCR-Geräte:** Biometra Tri-Thermoblock, Appligene Crocodile III, Perkin & Elmer

## **2.2 Methoden:**

### **2.2.1 Patientengut und DNA- Isolierung :**

Zur DNA- Isolierung werden dem Patienten 10ml Blut in eine Sarstedt S-Monovette KE abgenommen und mit EDTA versetzt, um die Gerinnung zu verhindern. Zur Trennung von Serum und Erythrozyten wird das Blut bei 4°C und 2500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Aus der Zwischenphase von Serum und Erythrozyten, *Buffy Coat* genannt, werden 1-2ml abgenommen. Der *Buffy Coat* enthält die DNA- haltigen Blutzellen und wird zur DNA- Isolierung benutzt. Zur Isolierung der DNA- haltigen Blutzellen von den hämolysierten Erythrozyten wird der *Buffy Coat* für mindestens 2 Stunden bei -20°C eingefroren. Anschließend werden die Zellen durch eine osmotisch inaktive Wachlösung voneinander getrennt. Durch einen Proteinase K- haltigen Lysis- Puffer werden die DNA- haltigen Blutzellen aufgeschlossen und die Proteine abgebaut. Die genomische DNA wird mit einer Lösung aus Ethanol und Salz gefällt und so von den Proteinresten getrennt.

Der aufgetaute *Buffy Coat* wird mit 14ml STE versetzt und bei 4°C, 3000 rpm, 15 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird nochmals mit STE gewaschen und zentrifugiert. Nun wird das Pellet mit 3ml Lysis- Puffer, 1ml Protein K- Lösung und 200µl SDS 10% über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. 3,4ml Lysis- Puffer und 2,3ml 6M NaCl werden am folgenden Tag hinzugefügt, gemischt und bei 4°C, 3000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wird die Lösung nun behutsam in absoluten Ethanol gegossen. Die gefällte DNA kann nun als weiße, fädige Struktur an der Außenseite einer Pasteur- Pipette aufgenommen, in 70%igem Ethanol gewaschen und in 500-1000µl H<sub>2</sub>O bei 4°C aufbewahrt werden.

Zur Identifikation erhält jeder Patient eine Kennung.

## 2.2.2 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die PCR ist in drei Reaktionsschritte aufgeteilt:

1 Zyklus: Denaturierung: 5 Minuten bei 95°C

Anealing: 1 Minute bei z.B. 60°C

Elongation: 1 Minute bei 72°C

33 Zyklen: 1 Minute 95°C, 1 Minute z.B. 60°C, 1 Minute 72°C

1 Zyklus: 1 Minute 95°C, 1 Minute z.B. 60°C, 10 Minuten 72°C

Abkühlen auf Raumtemperatur

Dem Reaktionsansatz bestehend aus 38,5 µl H<sub>2</sub>O, 1µl dNTP, 5µl Pufferlösung, 4µl Primer (2µl Primer „forward“; 2µl Primer „reverse“) und 0,5 µl Taq (DNA-Polymerase) wird 1µl der DNA- Lösung zugegeben. Der Reaktionsansatz wird dann mit 50µl Mineralöl überschichtet, um Kondensation und Siedeverzüge zu vermeiden.

Die Primer der Reaktion sind entsprechend einer 20 nmolaren Konzentration in 100µl H<sub>2</sub>O gelöst und 1:10 verdünnt und stellen die Gebrauchslösungen dar.

Titel	Primer	Annealing-temperatur
HL 9 F	5`-TTC-AAT-AAG-CTC-CAC-CTA-AA-3`	60°C
HL 9 R	5`-TTT-TGG-CTT-CTA-AAT-AAG-GC-3`	
HL 7 F	5`-TAA-ATT-ATC-TCT-CTC-TTT-CT-3`	50°C
HL 7 R	5`-GAA-AAA-TAA-ATG-TCA-TCA-CC-3`	

**Tabelle 4:** Auflistung der benutzten Primer, mit der entsprechenden Annealingtemperatur. Zur Nomenklatur: HL steht für Hepatische Lipase, die Zahl gibt das Exon an, und F/R die jeweilige Ableserichtung (F:5`-3` „forward“; R:3`-5` „reverse“).

### **2.2.3** Reinigung des PCR-Produkts:

Das Prinzip der Reinigung des PCR-Produkt von unverbrauchtem dNTP, Mineralöl und Primerresten beruht auf der selektiven Bindungsmöglichkeit mancher Silicatgelmembranen. An diesen können DNA-Fragmente gebunden und so von anderen Bestandteilen getrennt werden. In einem zweiten Schritt werden die DNA-Fragmente mit H<sub>2</sub>O aus der Membran gelöst.

Die Bindung der DNA an der Membran ist abhängig von einem pH- Wert >7,5 und der Salzkonzentration. Mit diesem System können DNA- Fragmente einer Größe von 100bp - 1000bp aufgereinigt werden. Die Rückgewinnung beträgt 90-95%.

Die Aufreinigung wird vor jeder Sequenzierung durchgeführt, da überschüssige Primer die Sequenzierung stören würden.

Die Puffer und die Membransäulen wurden als Fertigset aus dem QIA- quick-PCR- Purifikation- Kit genommen. Zum Trennen der DNA von den Primern wird das 5-fache Volumen PB- Puffer zugegeben, zentrifugiert (60 sek,13000rpm) und der Unterstand verworfen. Zum Waschen werden dann 750µl PE- Puffer auf die Membran gegeben, zentrifugiert (60 sek.13000rpm) und der Unterstand verworfen. Das Lösen des PCR- Produkts erfolgt durch 50µl H<sub>2</sub>O und 60 sek Zentrifugieren bei 13000 rpm.

Die Lösung enthält nun nur noch H<sub>2</sub>O und DNA- Fragmente, die größer als 100 bp sind.

### **2.2.4** SSCP-Gel:

Das Prinzip der SSCP- Gel- Analyse beruht auf unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten von DNA- Einzelsträngen, die sich in ihrer Basenpaarung unterscheiden.

Durch die Aneinanderlagerung von Basen eines DNA- Einzelstranges ergibt sich eine räumliche Struktur, die die Laufgeschwindigkeit in einem Acrylamidgel bestimmt.

Die Abweichungen von nur einer Base in der Sequenz eines Exons kann durch ein veränderte Laufgeschwindigkeit im Vergleich mit den SSCP- Mustern gleicher DNA Abschnitte von anderer Probanden auffallen. Pro Gel können 20 Probanden gleichzeitig untersucht werden.

1µl des PCR- Produktes eines Exons werden mit 45µl SSCP- Puffer auf 96°C für 5 Minuten erhitzt, um die Doppelstränge zu trennen. Anschließend werden diese im Eisbad gekühlt, um die erneute Bildung von Doppelsträngen zu verhindern.

Ein zuvor angefertigtes Acrylamidgel wird pro Geltasche mit 2µl des eiskalten SSCP- Mix beladen, insgesamt mit maximal 20 Proben.

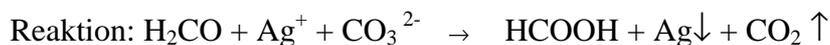
Das Ergebnis ist abhängig von der Laufzeit (im Verlaufe dieser Arbeit 2 Stunden), der Temperatur (hier für Exon 9: 4°C; für Exon 7: Raumtemperatur) und der angelegten Spannung (hier 25mA). Die Dicke des Gels beträgt 0,6 mm.

### **2.2.5** Färbemethoden:

Um die DNA-Fragmente in den Gelen einzufärben, wurden zwei Färbemethoden angewendet:

#### 1. Silberfärbung:

Die Silberfärbung wird zumeist zur Färbung von SSCP- Gelen verwendet. Silber-Ionen binden durch Komplexbindungen an die DNA-Moleküle, wenn der pH- Wert > 10,5 ist. Sichtbar werden die DNA-Banden, wenn die an die Nukleinsäure-Moleküle gebundenen Silber- Ionen reduziert werden:



Durchführung der Silberfärbung:

<b>Färbeschritte:</b>	<b>Reagenzien</b>
1. Fixierung	10% Essigsäure 20-30min
2. Waschen	eiskaltes H <sub>2</sub> O 2-3mal
3. Färbung	eiskaltes AgNO <sub>3</sub> 2g/l 30min
4. Waschen	eiskaltes H <sub>2</sub> O 4min
5. Entwicklung	eiskalt: Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 30g/l 1,5ml 37% HCOH/l, Na <sup>2</sup> -S <sub>2</sub> -O <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O 5mg/l; 50ml waschen, 150mg entwickeln: 5-10min
6. Reaktionsstop	10% Essigsäure
7. Fixierung	10% Methanol, 3% Glycerol; bis zur Trocknung

**Tabelle 5:** Silberfärbung von DNA-haltigen Polyacrylamidgelen

Die Leitfähigkeit des Wassers wird unter 2µS/ml gehalten. Da die Entwicklungsphase licht- und wärmeempfindlich ist, werden die Reaktionsgefäße verdunkelt und die Lösungen gekühlt.

## 2. Ethidiumbromidfärbung:

Ethidiumbromid ist ein Färbemittel speziell für Doppelstrang-DNA. Es interkaliert zwischen Basenpaaren einer doppelsträngigen  $\alpha$ -Helix-Struktur. Mit Einzelsträngen reagiert das Ethidiumbromid kaum und kann somit genutzt werden, um Doppelstrang-DNA zu markieren. UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254-300 nm läßt die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA sichtbar werden. Die DNA-haltigen Banden erscheinen rot-orange.

Angewendet wird die Ethidiumbromidfärbung auf Agerosegele, wobei das Ethidiumbromid in die gelöste Agerose eingebracht wird und während der Elektrophorese mit der DNA interkaliert. Die Nachweisgrenze der

Ethidiumbromidfärbung liegt bei 5ng Nukleinsäure pro Bande, für Einzelstrang-DNA ist sie um das Fünf- bis Zehnfache geringer.

### **2.2.6 DNA- Konzentrationmessung**

Für die Sequenzierung der PCR-Produkte ist eine Konzentrationsbestimmung notwendig. Die Konzentration wird errechnet aus:

Extinktion (bei 260nm) x Verdünnungsfaktor x Faktor 50

Sie wird in  $\mu\text{g/ml}$  angegeben. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260nm, das von Proteinen bei 280nm. Der Quotient aus dem Wert der Extinktion bei 280nm und dem Wert der Extinktion bei 260nm gibt Aufschluß über die Reinheit der DNA. Ein Quotient von 1,8 ist optimal.

### **2.2.7 Sequenzierung:**

Für die Sequenzierung wird ein Komplett-Kit von Perkin-Elmer Cetus verwendet, mit den in der PCR eingesetzten Primern nach dem Prinzip der Didesoxy-Methode von Sanger.

Hierzu wird die DNA denaturiert und so in Einzelstränge zerlegt. Ähnlich der PCR-Reaktion werden dann durch DNA- Polymerase Komplementärstränge aufgebaut, wobei zufällig dNTP- Terminatoren, fluoreszenzmarkierte didesoxy- Nukleotide, eingebaut werden, nach denen ein Kettenabbruch stattfindet. Durch die zyklische Sequenzierung entstehen unterschiedlich lange DNA-Ketten, die in einem hochauflösenden Polyacrylamidgel voneinander getrennt werden können. Mittels einer Laserdiode werden die Terminatoren identifiziert und registriert.

Reinigung und Konzentrationmessung des PCR-Produkts werden vor jeder Sequenzierung durchgeführt. Die Konzentrationen der Primer und des Reaktionsgemisches werden nach Herstellerangaben eingesetzt, ebenso wie die Programmierung des Thermocyclers für die einzelnen Reaktionsschritte.

### **3 Ergebnisse**

In dieser Arbeit wurden zwei der neun Exone der Hepatischen Lipase auf Mutationen und Polymorphismen untersucht.

Aus der DNA von insgesamt 209 Probanden wurden Exon 7 bzw. Exon 9 der Hepatischen Lipase mittels der Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Von jedem der beiden Exone wurden Elektrophoresen durchgeführt und Mutationen in Form von Einzelstrang- Konformation- Polymorphismen in der Elektrophorese detektiert.

Die DNA der Probanden war bereits isoliert.

#### **3.1 Charakterisierung des Probandenkollektivs**

Die Gruppe der Probanden wurde in drei Untergruppen unterteilt:

- Patientengruppe, eine Gruppe aus Patienten der Lipidambulanz,
- Kontrollgruppe mit klinisch unauffälligen Probanden
- Gruppe von zufällig ausgewählten Probanden

In der folgenden Tabelle sind die klinischen Daten der Probanden als Mittelwerte innerhalb der drei Gruppen dargestellt (Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite).

<b>Gruppe</b>	<b>C (n=4)</b>	<b>P (n=78)</b>	<b>F (n=9)</b>
Sex w/m	2/2	48/ 33	4/5
Alter	33	44	27
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	*	31,4	27,6
Diabetis mellitus (%)	*	5,6%	1%
gesamt Cholesterin (mg/ dl)	174	291	200
gesamt Triglyceride (mg/ dl)	109	597	219
LDL Cholesterin (mg/ dl)	99,5	162	136
HDL Cholesterin (mg/dl)	52,7	33,9	49,7

	<b>C(n=4)</b>	<b>P(n=78)</b>	<b>F(n=9)</b>
VLDL (mg/ dl)	21,0	44,2	*
Apo B (mg/ dl)	78	150	144
Apo A <sub>1</sub> (mg/ dl)	134	117	135
LpA (mg/ dl)	12	18,1	8,0

\* Die Daten waren nicht für alle Patienten zu ermitteln.

**Tabelle 6:** klinische Daten der Probanden (Fortsetzung von S. 30)

**C:** ist die Kontrollgruppe; **P:** ist die Patientengruppe; **F:** Zufallsgruppe

### **3.2 Amplifizierung von Exon 7 und 9**

Barbara Behrendt hat schon 1996 die optimalen PCR- Bedingungen für die Amplifizierung von Exon 7 und Exon 9 erarbeitet. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit übernommen.

Die PCR wurde nach den im Methodenteil aufgeführten Bedingungen für jede DNA mindestens einmal durchgeführt. Stellte sich in der Elektrophorese heraus, daß sich das Exon nicht amplifiziert hatte, wurde die PCR wiederholt.

Insgesamt wurde die Amplifizierung von Exon 9 mittels der PCR mit der DNA von 233 Probanden durchgeführt. In 66 Fällen gelang die Amplifizierung von Exon 9 aus der Probanden- DNA auch nach wiederholten Reaktionen nicht, bei 167 Proben konnte das PCR- Produkt in der Gel- Elektrophorese nachgewiesen werden.

Exon 7 wurde aus der DNA von 187 Probanden amplifiziert, in 181 Proben konnte in der Elektrophorese das PCR- Produkt nachgewiesen werden.

### **3.3 Elektrophorese der PCR- Produkte**

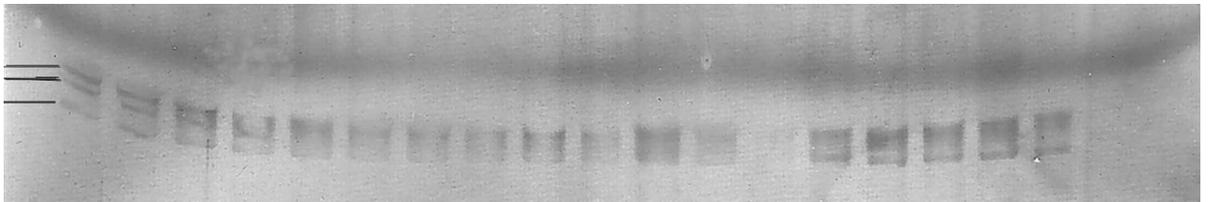
Polymorphismen und Mutationen lassen sich in der Elektrophorese auf einem Acrylamidgel als sogenannte „Single- Strang- Conformation- Polymorphism“, kurz SSCP genannt, darstellen. Diese Methode eignet sich aufgrund der einfachen Handhabung zum Aufspüren von Mutationen. Nichtsdestoweniger können Parameter wie Temperatur, angelegte Spannung und Zusammensetzung des Gels ganz erheblichen Einfluß auf die Sensitivität der Methode nehmen.

### 3.3.1 SSCP- Analyse von Exon 9

Alle Proben von Exon 9 wurden unter den oben genannten Bedingungen untersucht.

Auf dem abgebildeten Gel sieht man 18 exemplarische Proben von Exon 9. Unter diesen Bedingungen zeigte sich für alle Proben ein homogenes Bild.

Es sind deutlich zwei eng zusammen liegende Banden und eine weitere, unschärfere und schneller gelaufene Bande zu erkennen. Für keine der Proben konnte ein Polymorphismus unter den oben genannten Bedingungen nachgewiesen werden.



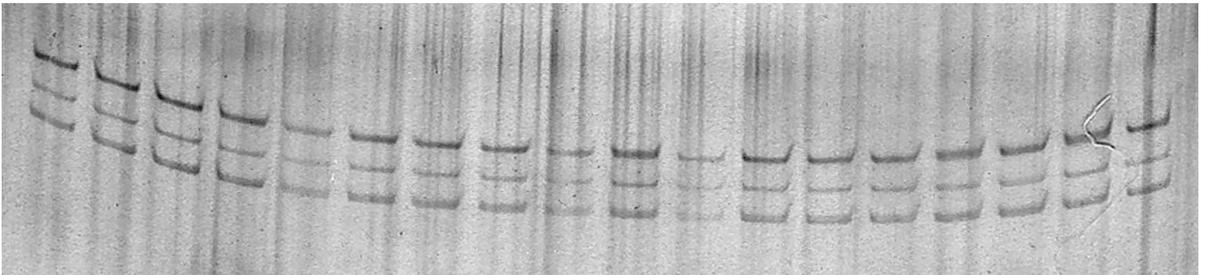
**Abbildung 5:** SSCP- Gel mit Proben von Exon 9

### 3.3.2 Untersuchung verschiedener SSCP- Bedingungen

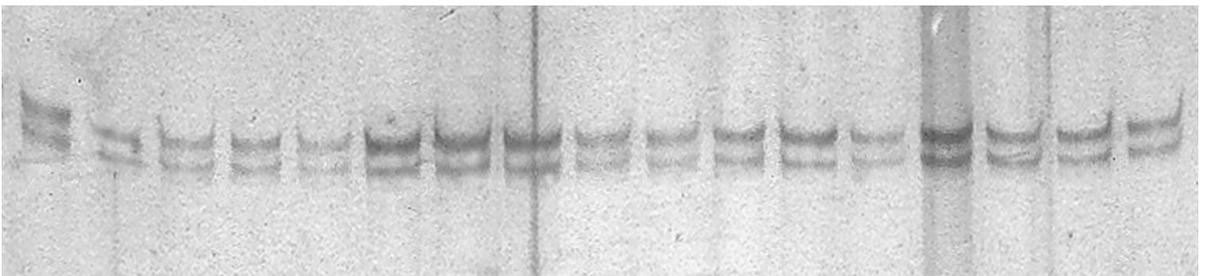
Die Laufeigenschaften der DNA- Einzelstränge im SSCP- Gel variieren stark mit den Bedingungen, unter denen die Analyse durchgeführt wird. Wie schon im Methodenteil erwähnt, haben Faktoren wie die Temperatur des Gels während der Elektrophorese, die Laufzeit oder die angelegte Spannung sowie die Zusammensetzung des Gels an sich einen nicht unerheblichen Einfluß auf das Ergebnis der Elektrophorese. Als Folge dieser Abhängigkeit können bei veränderten Bedingungen Banden entstehen, die bei den Ausgangsbedingungen nicht nachweisbar waren.

Um dieser Möglichkeit gerecht zu werden und um die unter den Anfangsbedingungen nur mäßige Auftrennung der Banden zu verbessern, wurden nacheinander einige Parameter der Elektrophorese verändert und in ihrer Auswirkung im Vergleich zu den Anfangsbedingungen untersucht.

Im ersten Schritt wurde der Einfluß des Glycerols untersucht. Jeweils die gleichen Proben wurden in Gelen mit und ohne Glycerol untersucht, wobei aufgrund der fast doppelt so hohen Laufgeschwindigkeit der Proben im glycerolfreien Gel der Lauf schon nach 60 min. abgebrochen wurde.



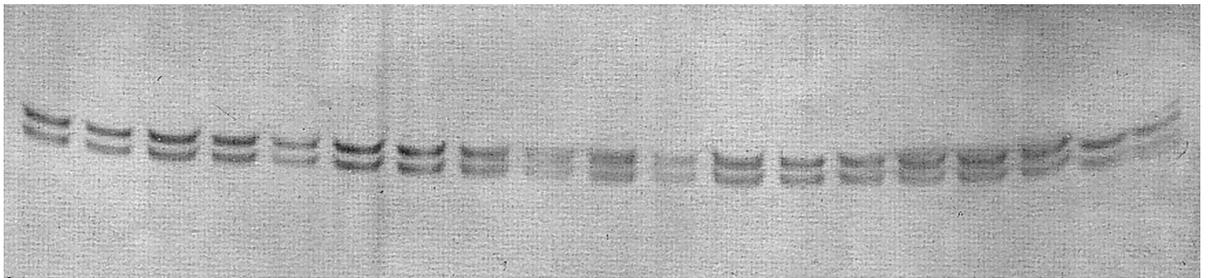
**Abbildung 6:** SSCP- Gel mit Glycerol



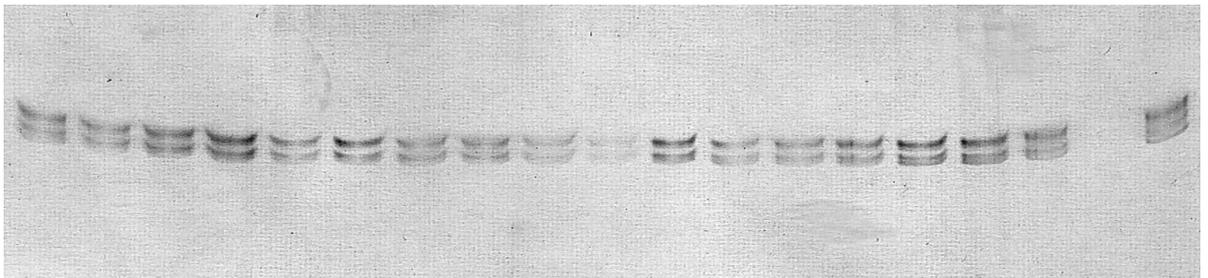
**Abbildung 7:** SSCP- Gel ohne Glycerol

Auf der Abbildung 6 sieht man das Gel mit Glycerol (25 mA/120 min) und in der Abbildung 7 ein Gel ohne Glycerol (25 mA/60 min) mit jeweils den gleichen Proben. Die Banden des glycerolhaltigen Gels erscheinen schärfer als die des glycerolfreien Gels.

In einem weiteren Schritt wurde das Verhältnis Acrylamid/ Bisacrylamid von 29/1 auf 37/1 geändert und somit die Matrix des Gels verändert. Auch hier wurden jeweils die gleichen Proben von Gelen mit Glycerol und ohne untersucht.



**Abbildung 8:** SSCP-Gel mit 37/1 Acrylamid/ Bisacrylamid, ohne Glycerol



**Abbildung 9:** SSCP-Gel mit 37/1 Acrylamid/Bisacrylamid mit Glycerol

Auf den Abbildungen 8 und 9 sind die Banden in den Gelen deutlich unschärfer als die in Abbildung 5, auch wenn die Unschärfe im glycerolhaltigen Gel nicht

ganz so ausgeprägt ist wie in dem glycerolfreien. Weder die Elektrophorese mit glycerolfreien Gelen, noch das Verändern des Acylamid/ Bisacrylamid-Verhältnisses bringt also einen Vorteil in Form einer deutlicheren Bandentrennung.

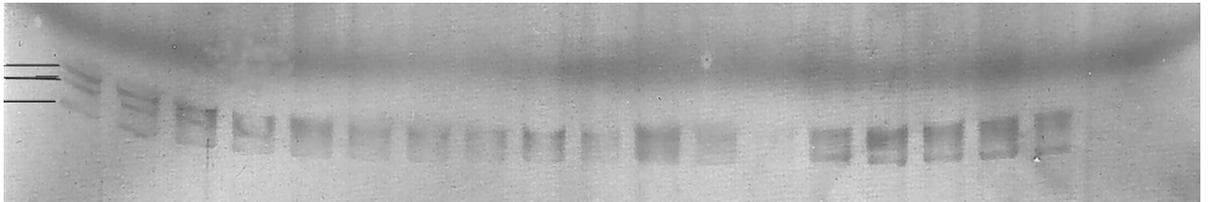
Im einem dritten Schritt wurde die Umgebungstemperatur verändert.

Während der Elektrophorese erhitzt sich das Gel in der Mitte stärker als am Rand, da die Wärme am Rand besser abgeleitet wird. Mit zunehmender Temperatur der Matrix erhöht sich auch die Laufgeschwindigkeit der DNA- Einzelstränge. Die Proben laufen in der Mitte schneller als außen. Ein Senken der Umgebungstemperatur würde das Erhitzen des Gels verzögern und so die Laufgeschwindigkeit verringern.

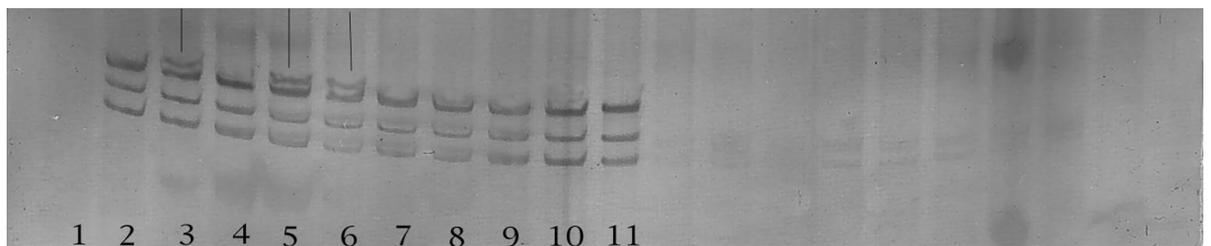
Schon nach Elektrophoresen bei Raumtemperatur konnte man am Rand eine bessere Bandentrennung erkennen (Abbildung 10).

Die Elektrophorese wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt (Verhältnis Acrylamid/ Bisacrylamid von 29/ 1; Glycerol von 4° C Umgebungstemperatur).

Auf Abbildung 11 erkennt man drei deutlich voneinander getrennte Banden.



**Abbildung 10:** Elektrophoresegel bei Raumtemperatur; der Pfeil zeigt die schärfer gezeichneten Banden in den Außenspuren



**Abbildung 11:** Elektrophoresegel bei +4° C Umgebungstemperatur; die Pfeile weisen auf Polymorphismen in Spur 3,6 und 7 hin

Alle Proben wurden nochmals einer Elektrophorese bei 4°C Umgebungstemperatur unterzogen und zeigten eine deutliche Aufspaltung in drei Banden.

Bei 19 dieser Proben konnte zudem eine zusätzliche Bande unmittelbar oberhalb der langsamsten Bande ausgemacht werden.

### **3.4 Sequenzierung**

Um herauszufinden, ob der zusätzlichen Bande eine Veränderung der Basensequenz zugrunde liegt, wurden zunächst die Basensequenzen von drei auffälligen Proben analysiert. Zum Vergleich wurde zusätzlich das Exon 9 einer unauffälligen Probe sequenziert.

Die Analyse der drei Basensequenzen der auffälligen Proben ergab an Position 1444 des Gens einen Unterschied im Vergleich zur Kontrollsequenz.

In der reversen Sequenzierung kommt zu dem schwarzen Signal an Position 1444 ein zusätzliches rotes Signal hinzu, das bei der Kontrollsequenz nicht vorhanden ist. In der Vorwärtssequenz ergibt sich ein zusätzliches grünes Signal für Adenin.

Das Nebeneinander zweier fast gleich starker Signale spricht für einen heterozygoten Austausch der Base Cytosin gegen Adenin.

Der Konformations- Polymorphismus der drei Proben in der Elektrophorese kann also dem heterozygoten Basenaustausch von Cytosin in Adenin an Position 1444 in der Basen- sequenz zugeordnet werden. In der Kontrollsequenz ist Cytosin1444

die dritte Base des Triplets ACC, in der veränderten Sequenz ist Adenin die dritte Base des Triplets ACA.

Auf die Aminosäuresequenz des Enzyms hat die gefundene Mutation keinen Einfluß. Die Sequenz ACC und die Sequenz ACA kodieren die Aminosäure Threonin. Es handelt sich um einen sogenannten „third base wobble“, eine stumme Mutation.

### **3.5 Restriktionsenzymverdau**

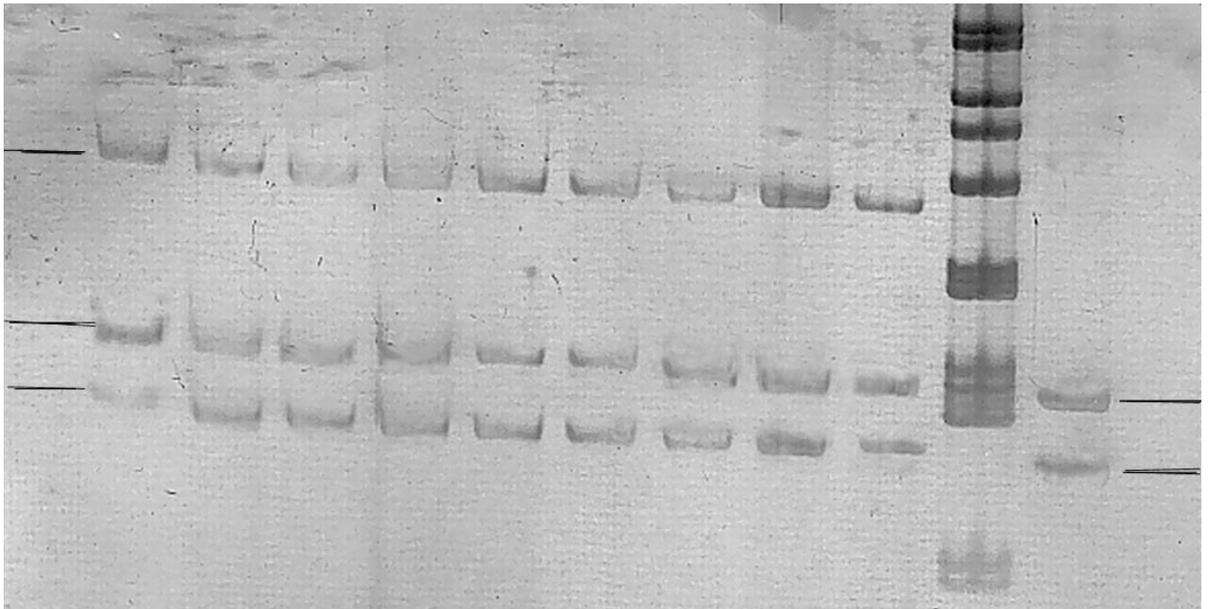
Durch den Verdau der DNA mit einem Restriktionsenzym an einer Schnittstellensequenz soll die Veränderung der Basensequenz bestätigt werden. Weiterhin soll geprüft werden, ob die 16 ebenfalls auffälligen Proben die gleiche Sequenzveränderung aufweisen.

Die Basensequenz CCNNGG ist eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BsaJ1: BsaJ1 kann also die gefundene Mutation 1444 C>A nachweisen. In jeder Probe, in der der Konformations- Polymorphismus durch die Mutation 1444 C>A verursacht wird, tritt ein Schnittstellenverlust ein. Kommt die Veränderung homozygot vor, geht die Schnittstelle komplett verloren. Bei heterozygoten Veränderungen wird eine Hälfte der Exone geschnitten, die andere Hälfte nicht.

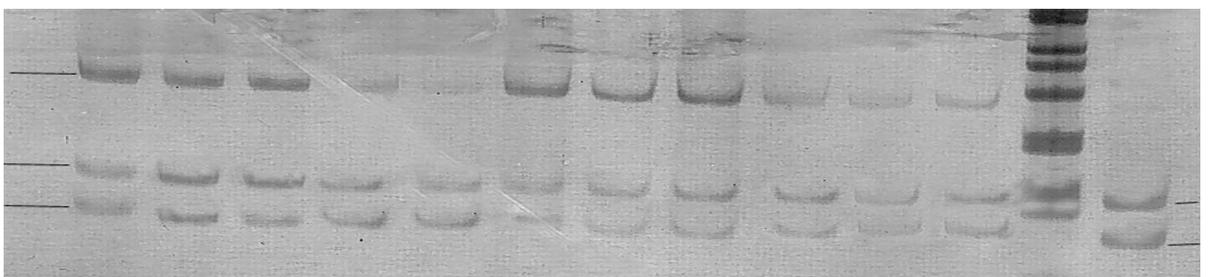
Von allen Exon 9- Proben mit Konformations- Polymorphismus wurden die PCR-Produkte mit dem QIA- Kit gereinigt und mit BsaJ1 für 20 h. bei 60°C inkubiert. Zusätzlich wurde eine Kontrollprobe verdaut.

Alle Proben wurden in einem Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Silbernitrat gefärbt.

Zur Größenbestimmung der Fragmente wurden die Elektrophoresegele mit einer 1000 bp- Leiter beladen. Die Proben wurden links, die Kontrolle rechts der 1000 bp- Leiter angeordnet.



**Abbildung 14:** Elektrophoresegel mit den Proben der Mutante in den ersten 11 Spuren (von links gesehen), in 12. Spur die 1000 bp- Leiter und eine Kontrollprobe der 13. Spur. Striche markieren die drei Banden der „positiven“ Proben, bzw. Die zwei der Kontrollprobe.



**Abbildung 15:** Von links gesehen die Proben der Mutanten, dann die 1000 bp-Leiter und in der 10. Spur die Kontrollprobe. Striche markieren die drei Banden der „positiven“ Proben bzw. die zwei der Kontrollprobe.

Die Kontrollprobe in der Spur rechts neben der 1000 bp- Leiter zeigt zwei relativ schnell gewanderte Banden, die von den Größenverhältnissen in etwa den durch BsaJ1 geschnittenen Fragmenten entsprechen. Von der Größe des eigentlichen Exon 9 (164bp) ist keine Bande vorhanden. Die Probe wurde also von dem Enzym geschnitten.

Die Positivproben zeigen eine Bande im Bereich der Größe des ursprünglichen Exons. Ein Teil der Exone der Proben wurden also von BsaJ1 nicht geschnitten. Die schwächeren Banden im Bereich der geschnittenen Fragmente der Kontrollprobe repräsentieren den Anteil der Exone, die auch dieses Mal geschnitten wurden.

Es läßt sich nachweisen, daß bei jeder der 19 Proben nur die Hälfte der Exone geschnitten werden. Im Vergleich dazu wird die Kontrollprobe komplett geschnitten.

Die Reaktion mit BsaJ1 erbringt den Nachweis, daß die zusätzliche Bande durch den Basentausch von Cytosin nach Adenin an Position 1444 des Gens der Hepatischen Lipase in der Elektrophorese verursacht wird.

### **3.6 Bestimmung der Allelfrequenz**

Im folgenden werden die Probanden, die Träger des Wildtyps sind und diejenigen, die Träger des Polymorphismus sind, zahlenmäßig gegenübergestellt. Die Frequenz des Allels wird bestimmt, um zu prüfen, ob die Frequenz in einer der Gruppen signifikant abweicht.

Tabelle 7 zeigt die Werte der Probanden insgesamt und nach den drei Gruppen getrennt. Dabei ist ersichtlich, daß die Allelfrequenzen der drei Gruppen sich nicht signifikant unterscheiden:

	CC	CA	A Allelfrequenz
Probanden insgesamt	113	16	0,06
Patientengruppe	79	14	0,07
Kontrollgruppe	27	1	0,02
Familiengruppe	7	1	0,06

**Tabelle 7:** Absolute Häufigkeit des Wildtyps und des Allels sowie Allelfrequenz, CC ist der Wildtyp, CA die Mutante

### **3.7 Korrelation der genetischen Veränderung mit dem Phänotyp**

Nachdem untersucht wurde, ob sich die Allelfrequenz zwischen den drei Ausgangsgruppen unterscheidet, soll nun geklärt werden, ob sich der Polymorphismus auf den Phänotyp auswirkt. Es wurden jeweils die klinischen Parameter der Probanden mit Polymorphismus und die der Wildtyp- Träger als Mittelwerte zusammen gefaßt.

	CC	CA	Signifikanz+/-
Alter	47,5 (+/-11)	39,5 (+/-13)	<b>0,047</b>
BMI	31,6 (+/-19)	29,5 (+/-4)	0,074
gesamtCholesterin mg/dl	292,5 (+/-163)	284,4 (+/100)	0,81
gesamt Triglyceride mg/dl	628,5 (+/-1176)	408,2 (+/-251)	0,67
LDL Cholesterin mg/dl	163,8 (+/-62)	149,6 (+/-41)	0,43

HDL Cholesterin mg/dl	33,7 (+/-15)	35,7 (+/-17)	0,56
VLDL mg/dl	44,7 (+/-22)	41,2 (+/-21)	0,65
Apo B mg/dl	150,3 (+/-51)	149,0 (+/-33)	0,88
Apo A <sub>1</sub> mg/dl	116,2 (+/-33)	127,1 (+/-36)	0,66
Lp A mg/dl	19,2(+/-24)	11,0 (+/-14)	0,38

**Tabelle 8:** klinische Werte der Wildtypträger im Vergleich mit den Werten der Probanden mit dem Polymorphismus, in die Klammern die Standardabweichung. Mittels des Mann-Whitney U Test wurden die Werte auf signifikante Unterschiede geprüft.

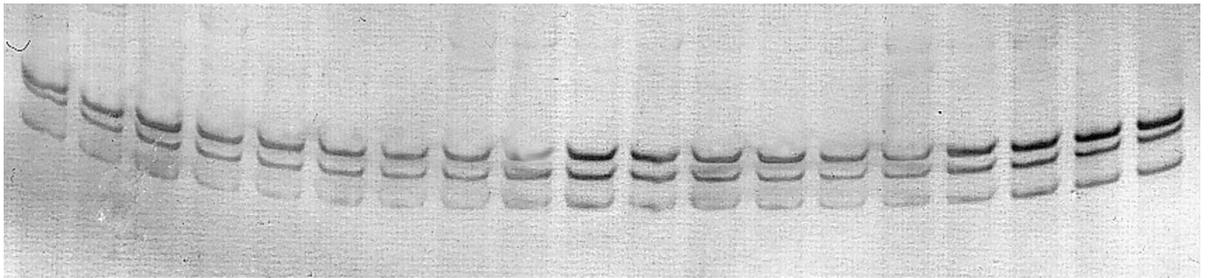
Man kann ersehen, daß sich die beiden Gruppen signifikant im Alter unterscheiden (der p-Wert liegt deutlich unter 0,05). Die Träger des Polymorphismus sind im Durchschnitt 8 Jahre jünger als die Probanden mit dem Wildtyp. Die anderen untersuchten klinischen Werte sind dagegen bei beiden Gruppen annähernd gleich.

Der zwischen den Gruppen deutlich differierende BMI (Body Mass Index) kann mit der Tatsache erklärt werden, daß dieser Wert unter anderem vom Alter abhängt, berücksichtigt man den Altersunterschied der beiden Gruppen, relativiert sich der Unterschied.

### **3.8 Analyse von Exon 7**

Nach der Elektrophorese von Exon 9 wurde auch für Exon 7 die Elektrophorese mit der scheinbar optimalen Umgebungstemperatur von 4°C durchgeführt.

Die Banden konnten klar voneinander getrennt werden. Abbildung 15 zeigt die typische Auftrennung der Banden bei Proben ohne erkennbaren Konformationspolymorphismus.

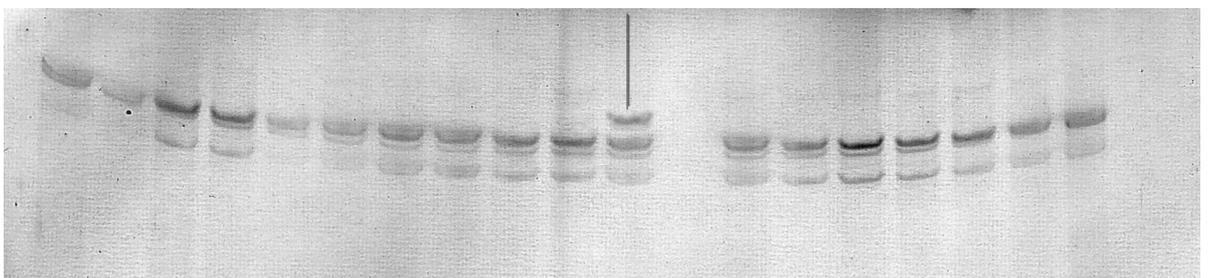


**Abbildung 16:** Auftrennung der Einzelstränge von Exon 7 der HL per Elektrophorese, aufgetragen sind Proben D 88-D 106

Man erkennt in jeder Spur drei etwa durch die Hälfte des Gels gewanderte Banden. Die Banden im oberen Bereich sind durch Interaktionen der Primer mit den Einzelsträngen und den unverbrauchten Nukleotiden verursachte Artefakte.

Vergleicht man die Banden in den einzelnen Spuren, erkennt man, daß sie jeweils gleich schnell gewandert sind. Keine der Spuren zeigt Extrabanden oder Unterschiede in der Laufgeschwindigkeit.

Von den 187 untersuchten Proben zeigte jedoch eine Probe in der Elektrophorese eine zusätzliche Bande. Abbildung 15 zeigt die entsprechende Probe im Vergleich zu Proben ohne zusätzliche Banden.

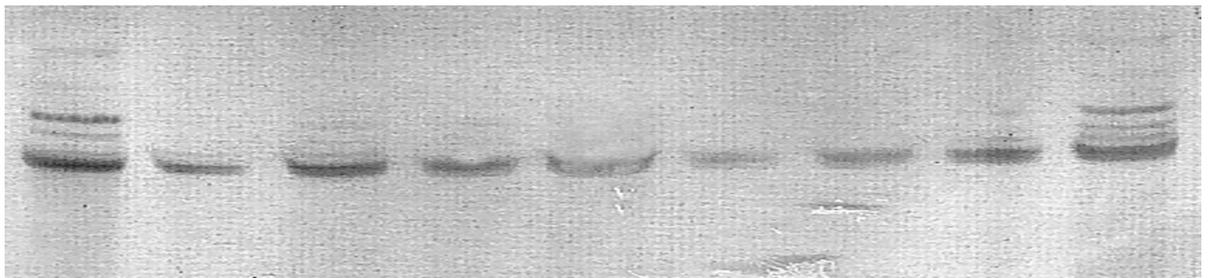


**Abbildung 17:** Elektrophoresegel der Pfeil markiert eine Probe mit einer Variante in Form einer zusätzlichen Bande.

In der durch den Pfeil markierten Spur erkennt man eine zusätzliche Bande oberhalb der beiden bei allen Proben vorhandenen Banden. Diese zusätzliche Bande kann als Hinweis auf eine Mutation im Exon 7 der HL der Probe D 50

gewertet werden. Keine der anderen 187 untersuchten Proben wies solch eine zusätzliche Bande auf. Weiter konnte auch bei allen anderen Proben keine weitere Variante in der Elektrophorese nachgewiesen werden.

Durch Reinigung des PCR- Produktes mittels des QIA- quick- Kit und anschließende erneute Elektrophorese wurde ausgeschlossen, daß es sich bei der beobachteten Variante um ein Artefakt handelt. Die jeweils vierte Spur in Abbildung 18 zeigt die gereinigte Probe D50, in PCR- Puffer aufgelöst, im Vergleich zu drei Kontrollproben (Pfeil). Es ist deutlich zu erkennen, daß die Variante nach wie vor nachzuweisen ist. Es handelt sich also um kein nachweisbares Artefakt.



**Abbildung 18:** Probe D50 gereinigt, zum Vergleich drei gereinigte Kontrollproben; der Pfeil weist auf die Variante.

Um auszuschließen, daß sich bei anderen Bedingungen weitere Banden zeigen, wurden die Proben D50-D87 und D166-D184 exemplarisch bei Raumtemperatur aufgetrennt. Das Ergebnis ist auf Abbildung 19 dargestellt. Die Banden sind hier verschwommener und weniger klar getrennt, zeigen aber das gleiche Muster. Die Elektrophorese bei Raumtemperatur bringt also keinen Vorteil.

In der Untersuchung von 187 Proben von Exon 7 der Hepatischen Lipase konnte in einem Fall in der Elektrophorese eine zusätzliche Bande nachgewiesen werden.

### **3.8.1 Bestätigung der gefundenen Mutation**

Durch eine Sequenzierung soll die gefundene Mutation bestätigt und charakterisiert werden.

Insgesamt wurde die Probe D50 viermal sequenziert. Als Vergleich wurden Sequenzen von vier Proben angefertigt, die in der Elektrophorese keine Polymorphismen gezeigt hatten und von denen man daher annehmen konnte, daß sie den Wildtyp von Exon 7 darstellen würden.

In Abbildung 19 sind die Sequenzen von Probe D50 und Kontrollen dargestellt. An keiner Stelle der Sequenz der Probe D50 ergeben sich eindeutige Hinweise für eine Veränderung der Basensequenz.

Da weitere Sequenzierungen noch ausstehen und die bisherigen Sequenzen noch nicht genug Hinweise erbracht haben, um den Versuch zu unternehmen, eventuelle Veränderungen der Basensequenz durch Restriktionsenzyme zu verifizieren, steht die Klärung des Konformations- Polymorphismus der Probe D50, Exon 7 HL, noch aus.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Gefundene Varianten und ihre Auswirkungen**

Für das Exon 9 der Hepatischen Lipase konnte in dieser Arbeit in 19 Proben eine Veränderung der Basensequenz nachgewiesen werden. Bei allen 19 Proben handelt es sich um die gleiche Variante, einen sogenannten „third base whooble“, also einen Basentausch in der dritten Position eines Basentriplets. Das Triplet, bestehend aus den Basen Adenin, Cytosin und Cytosin, codiert die Aminosäure Threonin. In der mutierten Variante ist das an dritter Position stehende Cytosin gegen Adenin ausgetauscht. Durch diesen Basentausch wird die Aminosäuresequenz jedoch nicht verändert, da Threonin sowohl durch das Triplet ACC wie auch durch das Triplet ACA codiert wird. Es handelt sich also um eine sogenannte „stumme Mutation“.

Es konnte gezeigt werden, daß alle 19 Probanden nur heterozygote Träger der veränderten Basensequenz sind.

Man kann also davon ausgehen, daß diese Veränderung in Exon 9 keine Auswirkungen auf den Phänotyp hat, da die Aminosäuresequenz nicht verändert wurde. Eine Veränderung der Genaktivität oder eine veränderte Sekretion des Enzyms und daraus folgende Veränderungen im Lipidprofil der Probanden sind also unwahrscheinlich.

Dennoch zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Alter der Probanden, wenn man die Gruppe der Träger des Allels mit der Gruppe der Träger des Wildtyp vergleicht. Im Mittelwert sind die Allelträger 8 Jahre jünger als die Wildtypträger. Die Lipidwerte unterscheiden sich dagegen kaum.

Geht man davon aus, daß sich das Lipidprofil mit zunehmendem Alter verschlechtert, ist der geringe Unterschied zwischen den beiden Gruppen, die eine Altersdifferenz von nur 8 Jahren aufweisen, recht auffällig.

Dennoch ist unwahrscheinlich, daß dieser Effekt durch den Polymorphismus verursacht worden ist. Diese „stumme Mutation“ hat keine Veränderung der Aminosäuresequenz zur Folge und sollte somit eigentlich keinen Effekt auf das Enzym haben.

Der gleiche Polymorphismus wurde 1997 von Murtoimäki et al. dargestellt. Auch hier wurde untersucht, wie und ob sich die klinischen Daten der Träger des Polymorphismus T 457 T

im Vergleich mit denen einer Vergleichsgruppe mit dem Wildtyp verhalten würden. Zudem wurde untersucht, ob dieser Polymorphismus mit anderen Veränderungen auf dem Gen der HL verbunden ist. Hier konnte eine Assoziation zwischen dem Polymorphismus T457T und zwei anderen Polymorphismen T202T und L334F festgestellt werden. Mit dem Polymorphismus L334F konnte eine verminderte Aktivität der HL assoziiert werden (Knudsen et al. 1993). Eine denkbare Erklärung durch die Altersunterschiede zwischen den beiden Gruppen und das damit zusammenhängende relativ gesehen schlechtere Lipidprofil der Gruppe mit dem T457T- Polymorphismus könnte das Vorkommen des T457T- Polymorphismus in Verbindung mit dem aktivitätsbeeinflussenden Polymorphismus L334F sein.

Eine weitere Ursache kann eine aufgrund der geringen Fallzahl verfälschte Statistik sein. Für diese Vermutung spricht die Tatsache, daß sich in der Untersuchung von Murtoimäki et al. kein Anhaltspunkt für einen signifikanten Einfluß der drei oben genannten Polymorphismen auf die Lipidwerte der Probanden der Studie finden läßt. Allerdings wird in der Untersuchung von Murtoimäki et al. das Alter der Probanden nicht berücksichtigt.

Welche und ob eine der diskutierten Möglichkeiten Ursache der Auffälligkeiten der statistischen Auswertungen ist, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

Über die Auswirkungen der vermuteten und mit der SSCP- Methode dargestellten Veränderungen im Exon 7 der Probe D 50 läßt sich noch keine Aussage machen, da es bis jetzt nicht gelungen ist, diese so zu sequenzieren, daß eine Aussage darüber gemacht werden kann, ob eine Veränderung der Basensequenz vorliegt und welcher Art diese Veränderung ist.

Insgesamt wurden 187 Proben von Exon 7 und 233 Proben von Exon 9 untersucht. Veränderungen der Basensequenz konnten in einer Probe von Exon 7 und in 19 Proben von Exon 9 nachgewiesen werden. Dies sind deutlich weniger

Veränderungen als erwartet. Im Gen der LPL beispielsweise finden sich deutlich häufiger Mutationen.

Das Ergebnis deckt sich mit Untersuchungen von Jansen et al. 1997, die in einer Studie alle Exone der HL von 18 Probanden untersuchten. Alle Probanden fielen durch eine niedrige Aktivität der HL auf. Bei keiner der Versuchspersonen konnte in den codierenden Abschnitten des Gens eine Mutation festgestellt werden. Dagegen ließ sich häufig eine Mutation im Promoterbereich des Gens zeigen (C-T - 480).

Auch hier fiel das seltene Auftreten von Mutationen im Gen der HL auf. Eine Erklärung für diese Phänomen steht indes noch aus.

### **4.2 Aspekte des Screeningverfahrens**

Es gibt kein einheitliches klinisches Bild der HL- Defizienz. Es gibt aber viele Störungen im Fettstoffwechsel mit zum Teil gravierenden Auswirkungen auf den Organismus, deren Ursachen selten vollständig geklärt sind.

Für eine Hypercholesterinämie oder Hypertriglycerideämie eines Patienten gibt es nicht selten nur unbefriedigende Erklärungen, da zu viele Faktoren eine Rolle spielen. So führen viele Gendefekte von Proteinen zu nicht erkennbaren Ausfällen, da die Funktionseinbußen noch kompensiert werden können. Vor allem bei heterozygoten Defekten, bei denen ein Teil der Proteine fehlerfrei produziert wird, ist der Organismus in der Lage, einen normalen Status quo aufrecht zu erhalten, solange er nicht zusätzlichem Streß ausgesetzt ist.

Hier bringen erst schädliche Faktoren wie falsche Ernährung, Rauchen, Übergewicht oder Bewegungsmangel das System aus dem Gleichgewicht und führen so zu einem Krankheitsausbruch.

Solche Patienten fallen in Routinekontrollen nicht auf, da der Organismus noch im Gleichgewicht ist. Eine frühe Erkennung möglicher Funktions- oder Enzymverluste wäre jedoch von großem Nutzen für die Betroffenen, um eine rechtzeitige medikamentöse Therapie zu ermöglichen und zusätzliche schädliche Noxen zu vermeiden.

Speziellere Untersuchungen, die direkt etwas über die Funktionstüchtigkeit eines Enzyms aussagen, wie zum Beispiel die Messung der Enzymaktivität im Plasma, sind zur Zeit noch aufwendig und teuer und bieten sich daher für Routineuntersuchungen nicht an.

Die Untersuchung der DNA auf eine genetische Disposition kann hingegen mit Methoden wie der SSCP- Analyse oder dem Restriktionsenzymverdau bei einer großen Anzahl von Patienten mit wenig Aufwand betrieben werden.

### 4.2.1 SSCP- Methode

Die SSCP- Methode ist eine relativ einfache und sensitive Methode, um Mutationen zu erkennen. Der Vorteil der Methode liegt darin, daß viele DNA- Proben auf einmal untersucht werden können.

Der Nachteil besteht darin, daß sich kaum abschätzen läßt, wie viele Mutationen tatsächlich durch die Methode nicht aufgespürt werden. Empirisch gewonnene Daten zeigen zwar eine genügend hohe Sensitivität, ein sicherer Ausschluß von Mutationen ist jedoch nicht möglich.

Weiterhin kann eine Veränderung einer oder mehrerer Parameter die Sensitivität der Analyse stark beeinflussen.

In dieser Arbeit konnte der große Einfluß der Temperatur des Gelsystems auf das Ergebnis der Elektrophorese gezeigt werden. Bei Raumtemperatur waren die im Exon 9 gefundenen Polymorphismen nicht aufzuspüren, da die Banden nicht weit genug voneinander getrennt werden konnten. Eine verbesserte Auftrennung der Banden konnte durch Senken der Temperatur des Gelsystems erreicht werden.

Andere Parameter des Gelsystems wurden in dieser Arbeit ebenfalls verändert. Es zeigte sich jedoch, daß sowohl das Fehlen des Glycerols als auch die Veränderung des Verhältnisses von Acrylamid zu Bisacrylamid von zuerst 37:1 auf 29:1 auf die Analyse des Exon 9 keinen Einfluß hatten.

Ein weiterer Einflußfaktor bei der Analyse ist die Reinheit des PCR- Produkts. Wird das PCR- Produkt vor der Elektrophorese gereinigt, zeigt sich eine andere Verteilung der Banden als ohne Reinigung. Die Reinigung bedeutet jedoch nicht zwangsläufig eine Steigerung der Sensitivität. Interaktionen zwischen den Einzelsträngen und den übriggebliebenen Primern, die durch die Reinigung entfernt

werden, werden zwar unterbunden, es ist jedoch vorstellbar, daß sich auch diese Interaktionen zwischen Primern und Einzelsträngen bei veränderter Basensequenz verändern. Unter Umständen sind diese veränderten Interaktionen und das damit veränderte Laufverhalten die einzigen Hinweise auf eine Mutation.

Die Reinigung der Proben ist zudem mit einem erheblichen Mehr an Arbeits- und Kostenaufwand verbunden. Es bietet sich daher an, die ungereinigten Proben für das Routinescreening zu verwenden und nur im Einzelfall eine Reinigung durchzuführen.

Infolge der relativ hohen Variabilität der Untersuchungsbedingungen ist man darauf angewiesen, die Proben untereinander zu vergleichen und durch die Unterschiede der Banden der einzelnen Proben auf Veränderungen der Basensequenz zu schließen.

### **4.2.2 Restriktionsenzym- Analyse**

Die Restriktionsenzym- Analyse ist eine elegante Methode, eine Veränderung der Basensequenz darzustellen. Dennoch ist der Einsatz begrenzt, da es im Verhältnis zu möglichen Schnittstellen nur wenige Restriktionsenzyme gibt.

Die Polymorphismen, die in dieser Arbeit in Exon 9 entdeckt worden sind, wurden durch einen Restriktionsenzymverdau bestätigt.

Der Einsatz von Restriktionsenzymen eignet sich gut für Familienreihenuntersuchungen, um gezielt nach schon beschriebenen Mutationen zu suchen.

Die Methode hat den Vorteil, daß sie nach Etablierung der Reaktionsbedingungen leicht zu handhaben ist und viele Proben auf einmal untersucht werden können. Leider läßt sich nicht zu jeder möglichen Mutation ein Restriktionsenzym finden.

Sollen Mutationen durch den Verlust von Schnittstellen nachgewiesen werden, muß sichergestellt sein, daß das Ergebnis nicht durch ein inaktives Enzym verfälscht wurde. Ergibt sich durch die Mutation eine neue oder zusätzliche Schnittstelle, ist das Ergebnis meist eindeutiger. Dieser Fall ist jedoch selten.

In dieser Arbeit konnten alle Proben, die verdächtig für Mutationen waren, auch als solche bestätigt werden.

### **4.2.3** Direktes Sequenzieren

Die Sequenzierung eines PCR- Produktes ist eine sichere Methode, um Mutationen aufzu- spüren.

Die Sequenzierung ist zwar aufwendig und dauert bedingt durch die vielen Arbeitsschritte recht lange, liefert aber eindeutige Ergebnisse.

Aufgrund des hohen Aufwands ist die Sequenzierung nur sinnvoll, um die durch andere Verfahren wie SSCP oder Restriktionsenzymverdau gefundenen Varianten zu charakterisieren, wie dies in dieser Arbeit für die in Exon 9 gefundene Variante durchgeführt wurde.

### **4.3 Polymerasekettenreaktion**

Die PCR ist eine geeignete Methode, um spezielle Abschnitte der DNA zu amplifizieren.

Mit hoher Spezifität können ausgewählte Stücke aus der gesamten DNA heraus vermehrt werden, um sie dann mit anderen Methoden analysieren zu können.

Empfindlich ist die PC-Reaktion gegenüber Verunreinigungen mit „fremder“ DNA. Die Kontamination mit „fremder“ DNA führt zu verfälschten Ergebnissen in anschließenden Analysen, da diese auch amplifiziert wird.

Eine Fehlerquelle liegt in der Methode selbst: Die in der Reaktion eingesetzte rekombinierte Taq- Polymerase besitzt keine Möglichkeit des Korrekturlesens. Alle  $2 \times 10^4$  Nukleotide kommt es statistisch zu einem fehlerhaften Einbau eines Nukleotids.

Geschieht dies am Anfang einer Kettenreaktion, wird das Ergebnis der anschließenden Analysen verfälscht. Je später der fehlerhafte Einbau geschieht, desto weniger verfälscht er das Ergebnis.

Trotz der theoretisch hohen Fehlerrate der Polymerase hat es sich gezeigt, daß dies in der Praxis kaum eine Rolle spielt. So wurden in dieser Arbeit über 400 PCR-

Produkte auf Varianten hin untersucht. Dabei konnten nur zwei verschiedene Mutationen nachgewiesen werden.

Ein Fehler der Polymerase kann als Ursache einer Variante nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wird in allen Positivfällen eine zweite PCR durchgeführt.

## **5 Zusammenfassung**

In dieser Arbeit wurde die DNA von rund 211 Probanden nach Mutationen in den Exonen 7 und 9 der Hepatischen Lipase untersucht.

Aus den Proben wurden zunächst die Genabschnitte der beiden Exone durch die Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Die Reaktionsbedingungen der Kettenreaktion wurden bereits in einer vorangegangenen Arbeit etabliert.

Die fertigen PCR-Produkte wurden dann, als Einzelstränge aufgetrennt, in einer Elektrophorese nach Konformations- Polymorphismen untersucht.

Die Bedingungen der Elektrophorese mußten für Exon 9 optimiert werden.

Um die Aussage der SSCP- Methode zu steigern, wurden die Bedingungen der Elektrophorese in drei Schritten verändert. Nur die Senkung der Temperatur brachte deutlich verbesserte Ergebnisse.

Unter optimierten Bedingungen wurde dann das Exon 9 von 233 Probanden untersucht. Bei 19 der untersuchten Proben fand sich ein Konformations- Polymorphismus.

Bei drei dieser Proben konnte in der Sequenzierung ein Austausch der Base Cytosin gegen die Base Adenin an Position 1444 des Gens nachgewiesen werden.

Durch das Restriktionsenzym BsaJ1 wurde dieser Polymorphismus bei allen 19 Proben bestätigt. Es handelt sich um ein sogenannten „third base wobble“, daß keinen Einfluß auf die Aminosäuresequenz des Enzyms hat.

Unter den gleichen Elektrophoresebedingungen wurden 187 Proben von Exon 7 untersucht, die zuvor durch die PCR- Methode hergestellt worden waren.

Bei einer der 187 Proben konnte in der Elektrophorese ein Konformations- Polymorphismus nachgewiesen werden.

Jeweils vier Proben desselben Probanden wurden im Vergleich zu zwei Kontrollen sequenziert. In keiner der Sequenzen konnte ein eindeutiger Hinweis für eine Veränderung der Basensequenz gefunden werden, obwohl sich die Variante auch in weiteren Elektrophoresen bestätigen ließ.

Die Klärung der Ursache des gefundenen Konformations- Polymorphismus in der Elektrophorese von Exon 7 konnte in dieser Arbeit nicht erbracht werden.

## **6 Literaturverzeichnis**

Auwerx J.H., Marzetta C.A., Hokanson J.E., Brunzell J.D. 1989 Large buoyant LDL-like particles in Hepatic Lipase deficiency Arteriosclerosis 9: 319- 325

Applebaum- Bowden D. Lipase and lecithin: cholesterol acetyltransferase in the control of lipoprotein metabolism. Curr. Opin. Lipidol. 1995; 6: 130- 135

Bansadoun A, Berryman DE. 1996 Genetics and molekular biology of hepatic lipase, Curr. Opin Lipidol 7:77- 81

Ben- Zeev O., Stahnke G., Liu G., Davis R.C., Doolittle M.H. 1994 Lipoprotein Lipase and Hepatic Lipase: the role of asparagine- linked glycosylation in the expression of a functional enzym Journal of Lipd Research Vol. 35

Behrendt, B. 1996; Untersuchungen der humanen Hepatischen Lipase auf Mutationen in den funktionellen Domänen. Diplomarbeit, Universität Hamburg

Blades B., Vega G. L., Grundy S. M. 1993 Activities of Lipoprotein Lipase and Hepatic Triglycerid Lipase in postheparin plasma of patients with low concentrations of HDL cholesterol, Ateriosklerosis and Thrombosis Vol. 13, No. 8

Breckenridge W.C., Little J.A., Alauovic P., Wang C.S., Kuksis A., Kakis G., Lindgren F., Gardiner G. 1982 Lipoprotein abnormalities associated with a familial deficiency of Hepatic Lipase, Atherosclerosis, 45 161- 179

Connelly P. W., Maguire G.F., Lee M., Little J.A., 1990 Plasma lipoproteins in familial Hepatic Lipase deficiency Arteriosclerosis Vol. 10, No. 1

Carlson L.A., Holmquist L., Nilsson- Ehle P. 1986 Deficiency of Hepatic Lipase Activity in post- heparin plasma in familial Hyper-  $\alpha$ - Triglyceridemia Acta Med. Scand.; 219: 435-47

Dargel R. 1991 Biochemie und Pathobiochemie der Lipoproteine Akademie Verlag

Demant T., Carlson L.A., Holmquist L., Karpe F., Nilsson-Ehle P., Packard C.J., Shepard J. 1988 Lipoprotein metabolism in Hepatic Lipase deficiency: studies on

the turnover of apolipoprotein B and on the effect of Hepatic Lipase on High Density Lipoprotein, Journal of Lipid Research, Vol. 29

Guerra R., Wang J., Grundy S.M., Cohen J. C., A hepatic lipase allele associated with high plasma concentration of high density lipoprotein cholesterol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997 Vol 94, p.p. 4532- 4537

Hegele RA, Tu L, Connelly PW. Human hepatic lipase mutations and polymorphism. Human Mutat. 1992; 1: 320- 324

Hegele RA, Little JA., Vezina C., Maguire G., Tu L., Wolever T., Jenkins DJA., Connelly PW. 1993 Hepatic Lipase Deficiency : clinical, biochemical, and molekular genetic characteristics, Arteriosklerosis, Thrombosis; 13: 720- 728

Julius U. Grundlagen des Lipoproteinmetabolismus in: Hahnefeld M. (Hrsg) Fettstoffwechselstörungen Bedeutung, Erkennung und Behandlung Gustav Fischer Verlag Jena 1999

Katzel L.I., Coon P.J., Busby M.J., Gottlieb S.O., Krauss R.M., Goldberg A.P. 1992 Reduced HDL<sub>2</sub> Cholesterol Subspecies and elevated postheprin Hepatic Lipase activity in older men with abdominal obesity and asymptomatic myocardial ischemia, Arteriosclerosis and Thrombosis; 12: 814- 823

Knudsen P., Antikainen M., Ehnholm S., Uusi- Oukari M., Tenkanen H., Lahdenperä S., Kahri J., Tilly- Kiesi M., Bensadoun A., Taskinen M-R., Ehnholm C. 1996

A compound heterozygote for Hepatic Lipase gene mutation Leu334-Phe and Thr383- Met: correlation between Hepatic Lipase activity and phenotypic expression, Journal of Lipid Research Vol. 37

Krapp A, Ahle S, Kersting S, Hua Y, Kneser K, Nielsen M, Gliemann J, Beisiegel U. 1996 Hepatic lipase mediates the uptake of chylomicrons and beta-VLDL into cells via the LDL receptor related protein (LRP). Journal of lipid research; 37: 926- 936

Kuusi T., Saarinen P., Nikkilä E.A. 1980 Evidence for the role of Hepatic Lipase in the metabolism of plasma High Density Lipoprotein<sub>2</sub> in man, *Atherosclerosis*, 36 589-593

Kuusi T., Ehnholm C., Viikari J., Härkönen R., Vartiainen E., Puska P., Taskinen M-R. 1989 Postheparin plasma lipoprotein and hepatic lipase are determinants of hypo- and hyperalphalipoproteinemia, *Journal of Lipid Research* Vol. 30

Lanstra J.A. The application of the polymerase chain reaction in the life sciences. *Cell. Mol. Biol. Noisy le grand* 1995; 41(5): 603-14

Lehninger, Nelson, Cox; *Prinzipien der Biochemie*  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 1994

Marques-Vidal P., Azema C., Collet X., Vieu C., Chap H., Perret B. 1994 Hepatic Lipase promotes the uptake of HDL esterified cholesterol by the perfused rat liver: a study using reconstituted HDL particles of defined phospholipid composition, *Journal of Lipid Research* Vol. 35

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. 1988 Simple salting out procedure for extracting out DNA from human nucleated cells, *Nucleid Acids Research* Vol. 16 No. 3

Murtomäki, S., Tahvanainen, E., Antikainen, M., Tirt, L., Nicaud, V., Jansen, H., Ehnholm, C., 1997 Hepatic Lipase gene polymorphisms influence plasma HDL-levels,  
*Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* Vol. 17 No. 10

Nicoll A., Lewis B. 1980 Evaluation of the role of Lipoprotein Lipase and Hepatic Lipase in lipoprotein metabolism: in vivo and in vitro studies in man  
*European Journal of Clinical Investigation* 10; 487- 495

Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. 1988 Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, Vol. 86, pp 2766-2770

Patsch J.A., Gotto A.M., Olivecrona T., Eisenberg S. 1978 Formation of High Density Lipoprotein<sub>2</sub>- like particles lipolysis of Very Low Density Lipoproteins in vitro, Proc. Natl. Acad. Sci USA 75, 4519- 4523

Patsch J.R. Prasad S., Gotto A.M., Bengtsson- Olivecrona 1984 Postprandial Lipemia, a key for the conversion of High Density Lipoprotein<sub>2</sub> into High Density Lipoprotein<sub>3</sub> by Hepatic Lipase, Journal of Clinical Investigation Vol. 74, 2017-2023

Rolfs A., Schuller I., Finck U., Weber- Rolfs I. 1991 PCR: Clinical Diagnostics and Research, Springer Labortory

Sanger F., A.R. Coulson, B. G. Barrel, A. H. J. Smith, B.A. Roe 1980, Cloning in single- strang bacteriophage as an and to rapid DNA sequencing

Shafi S., Brady S. E., Bensadoun A., Havel R.J. 1994 Role of Hepatic Lipase in the uptake and processing of chylomicron remnants in the rat liver, Journal of Lipid Research Vol. 35

Styer L.; Biochemie; vierte Aufl., Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford 1994

Verhoeven A.J.M., Jansen H. 1994 Hepatic Lipase mRNA is expressed in rat and human steroidogenic organs Biochimica et Biophysica Acta 1211 pp. 121- 124

Weidner J., Eigel A., Horst J., Kohnlein W.. Nonisotopic detection of mutations using a modified single- strand conformation polymorphism analysis. Hum. Mutat. 1994; 4(1): 55- 6

