

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin -  
Kernklinik des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Professor Dr. med. H. Greten

**Familienuntersuchung von Patienten mit  
Mutationen des Apo E- oder LPL-Gens**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Sandra Linder, aus Hamburg

Hamburg, 2000

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 06. Februar 2001

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Korreferent: Prof. Dr. H. Greten

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	Lipoproteinstoffwechsel .....	5
1.2	Exogener Weg .....	9
1.3	Endogener Weg .....	9
1.4	Cholesterin-Rücktransport.....	10
1.5	Apoprotein E.....	11
1.5.1	Genetik und Struktur.....	11
1.5.2	Funktion.....	13
1.5.3	Seltene Apo E Mutationen.....	15
1.5.3.1	Apo E1 (gly127asp).....	15
1.5.3.2	Apo E2 (lys146gln).....	15
1.5.3.3	Apo E2(ser136asp).....	16
1.5.4	Familiäre Dysbetalipoproteinämie (HLP Typ III nach Frederickson).....	16
1.6	Lipoproteinlipase.....	19
1.6.1	Genetik und Struktur.....	19
1.6.2	Synthese und Aktivität .....	20
1.6.3	LPL-Polymorphismen.....	21
1.6.4	LPL-Deletion.....	23
1.7	Chylomicronämie.....	23
1.7.1	Lipoproteinlipase-Defizienz.....	24
1.7.2	C-II-Defizienz.....	24
1.8	Hepatische Lipase.....	24
1.9	Exogene Faktoren.....	25
1.9.1	Diabetes Mellitus.....	25
1.9.2	Einfluß von Übergewicht.....	25
1.9.3	Einfluß von Schilddrüsenhormonen.....	26
1.9.4	Einfluß von Alkohol.....	27
1.9.5	Einfluß von Nikotin.....	28

1.10 Zielsetzung der Arbeit.....	29
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>30</b>
2.1 Chemikalien.....	30
2.1.1 Spezielle Reagenzien/Enzyme.....	30
2.1.2 Verwendete technische Hilfsmittel.....	33
2.2 Familienuntersuchung.....	34
2.3 Serum.....	36
2.3.1 Cholesterin- und Triglyceridbestimmung in den Lipoproteinfraktionen.....	37
2.4 Bearbeitung des Buffy Coats.....	38
2.4.1 DNS Extraktion.....	38
2.4.2 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	40
2.4.3 Restriktionsenzymverdau.....	42
2.4.4 Gelelektrophorese.....	43
2.4.4.1 SSCP-Gelelektrophorese (single strang conformation polymorphism).....	44
2.4.5 Färbung von Polyacrylamidgelen.....	46
2.4.5.1 Silberfärbung.....	46
2.4.5.2 Ethidiumbromidfärbung.....	46
2.4.6 Sequenzieren.....	47
2.4.7 Apo E Genotypisierung.....	50
2.4.8 Apo E Mutation Codon 127 (GGC—GAC).....	51
2.4.9 Apo E Mutation Codon 146 (TAC-GAC).....	51
2.4.10 Apo E Mutation 136 (CGC-TGC).....	51
2.4.11 LPL Deletion 560-564.....	52
2.4.12 HL-Promoter.....	52
2.4.13 LPL-Polymorphismen.....	53
2.4.14 LPL Exon 7.....	55
2.4.15 LPL Exon 8.....	55

3.	Ergebnisse	56
3.1	Familie A.....	56
3.2	Familie B.....	64
3.3	Familie C.....	71
3.4	Familie D.....	75
3.5	Familie E.....	79
4.	Diskussion	80
4.1	Familienuntersuchung.....	80
4.2	Familie A.....	81
4.3	Familie B.....	84
4.4	Familie C.....	86
4.5	Familie D.....	87
4.6	Familie E.....	88
5.	Zusammenfassung.....	89
6.	Anhang	91
6.1	Familie A Stammbäume und Tabelle.....	91
6.2	Familie B Tabelle.....	95
6.3	Familie C Tabelle.....	97
6.4	Familie D Tabelle.....	97
6.5	Abkürzungsverzeichnis.....	98
6.6	Abbildungen und Tabellen.....	99
6.7	Literaturverzeichnis.....	100
7.	Danksagung	109
8.	Lebenslauf	110
9.	Erklärung	111

## 1. Einleitung

Der atherosklerotisch bedingte Myokardinfarkt ist die häufigste Todesursache in den Industriestaaten der westlichen Welt. Ein wesentlicher Risikofaktor für koronare Herzkrankheiten stellen Störungen des Lipoproteinstoffwechsels dar, die sich in einer Hypercholesterinämie und/oder einer gemischten Hyperlipoproteinämie manifestieren. Dementsprechend ist die Diagnose und die Therapie der Hyperlipoproteinämie eine wichtige präventive Maßnahme gegen den Myokardinfarkt.

Pathologische Veränderungen im Lipoproteinstoffwechsel haben verschiedene Ursachen: sie können primär entstehen, d.h. durch Mutationen hervorgerufen werden, oder sie können aber auch sekundär bedingt sein, indem sie durch vorliegende Grundkrankheiten bzw. Lebensgewohnheiten induziert werden. Die Bedeutung der verschiedenen Faktoren und einiger Mutationen sind zum Teil schon sorgfältig untersucht worden. Über einige seltene Mutationen ist bisher jedoch nur wenig bekannt.

### 1.1 Lipoproteinstoffwechsel

Zellen der verschiedenen Gewebe im menschlichen Körper benötigen Triglyceride als Energieträger und auch Cholesterin, als Ausgangssubstanz für die Steroid- und Gallensäuresynthese, und als Strukturmolekül für die Zellmembran. Diese für die Zellen essentiellen Lipide können aufgrund ihres hydrophoben Charakters nicht im Blut gelöst zirkulieren. Für ihren Transport existieren Lipoproteine, die entweder die mit der Nahrung zugeführten Lipide im Organismus verteilen (Exogener Weg), oder die in der Leber synthetisierten Lipide in die extrahepatischen Gewebe transportieren (Endogener Weg) [10].

Alle Lipoproteine haben prinzipiell den gleichen Aufbau: Im lipophilen Kern sammeln sich die Triglyceride und die hydrophoben Cholesterinester. An der Oberfläche der Lipoproteine, der mit dem wässrigen Milieu in Kontakt kommt, befinden sich die hydrophilen Gruppen des Cholesterins und der Phosphoglyceride. Die amphiphilen Apoproteine, welche neben ihrer strukturgebenden Funktion auch bei spezifischen Reaktionen als Aktivatoren, Enzymen oder als Liganden von Zelloberflächenrezeptoren eine Rolle spielen, liegen z.T. im inneren aber auch an der Oberfläche.

Bisher wurden folgende Apoproteine isoliert und charakterisiert (Nomenklatur nach Alaupovic [2]):

A-I, A-II, A-IV, B-48, B-100, C-I, C-II, C-II und E.

Sie werden zum Teil in der Leber, aber auch in den Mucosazellen des Dünndarms gebildet. Aufgrund der unterschiedlichen Apoproteinanteile und deren unterschiedlichen Ladung können die Lipoproteine in der Elektrophorese aufgetrennt und charakterisiert werden. Ein weiteres Verfahren basiert auf der Tatsache, daß Lipoproteine sich zusätzlich in ihrer Größe und Dichte unterscheiden. Gofman et al. haben diese Eigenschaft zur Trennung der Lipoproteine mit Hilfe der Ultrazentrifugation ausgenutzt [23]

Entsprechend ihrer Dichte lassen sich die Lipoproteine wie folgt in ansteigender Form klassifizieren (siehe Bild 1):

- Chylomicronen
- Chylomicronenremnants (CR)
- very low density proteins (VLDL)
- intermediate density proteins (IDL)
- low density proteins (LDL)
- high density proteins (HDL)

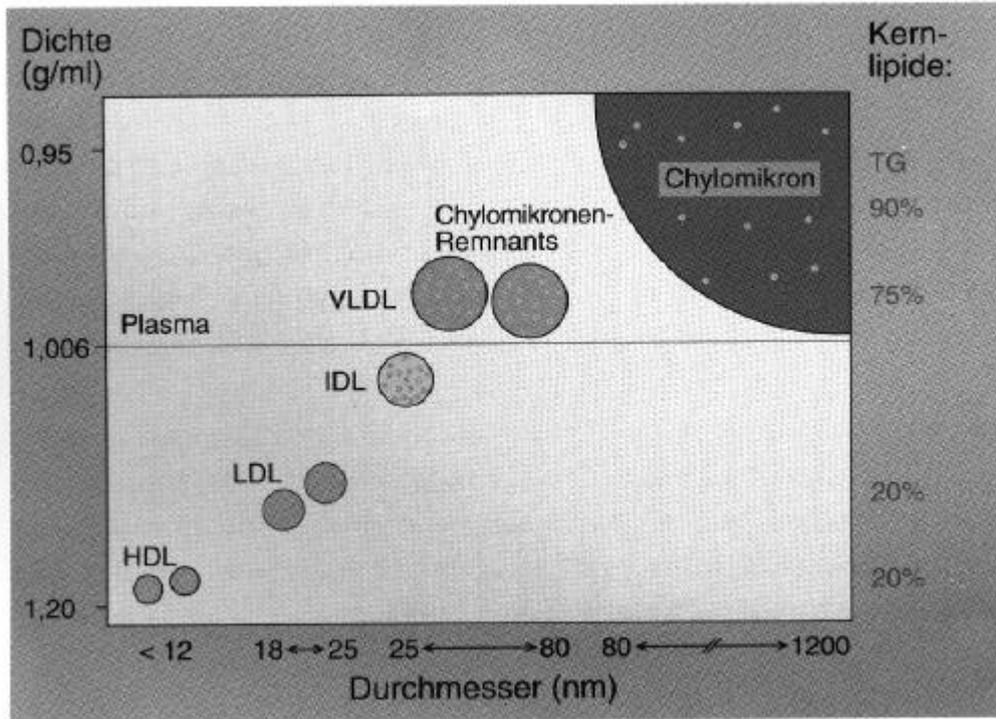


Abbildung 1 Größe der Lipoproteine und Dichteverteilung im Plasma.

Aus: Hellige G., Speickermann P.G., Ziegler A. (1995)  
Lipoproteine und Atherogenese, Herz-Kreislauf Forum, Arcis Verlag

<b>Klassifikation der Lipoproteine</b>				
	<b>Chylomikronen</b>	<b>Very Low Density Lipoproteine (VLDL)</b>	<b>Low Density Lipoproteine (LDL)</b>	<b>High Density Lipoproteine (HDL)</b>
<b>Dichte [g/ml]</b>	d<1,006	D<1,006	1,019<d<1,063	1,063<d<1,21
<b>Größe [nm]</b>	100-1000	30-70	15-25	7,5x10
<b>Syntheseort</b>	Darm	Leber	aus VLDL	Leber & Darm
<b>Zusammensetzung [%]</b> (Triglyzeride/Cholesterin)	90 / 3	65 / 15	10 / 45	5 / 20
<b>Anteil im Serum [%]</b> (Triglyzeride/Cholesterin)	nur postprandial	70 / 10	20 / 65	10 / 25
<b>Lipid/Protein-Verhältnis</b>	99 / 1	90 / 10	78 / 22	50 / 50
<b>Apolipoproteine</b>	AI, AIV, CI-CIII, E, B <sub>48</sub>	CI-CIII, E, B <sub>100</sub>	B <sub>100</sub> (C, E)	AI, AII, AIV, CI-CIII, E
<b>Lipidelektrophorese</b>	Auftragsstelle	Prä-β-Position	β-Position	α-Position

Tabelle 1:

## 1.2 Exogener Weg

Beim exogenen Transportweg gelangen die mit der Nahrung zugeführten Fette und fettlöslichen Vitamine zunächst in die Mucosazellen. Dort werden sie an die Apoproteine B-48, A-II und A-IV gebunden. Die so entstandenen Chylomicronen werden in die Lymphbahn sezerniert und gelangen über den Ductus thoracicus in die Blutbahn.

Bei dem dort stattfindenden Kontakt der Chylomicronen mit den HDL-Lipoproteinen geben letztere Apo C-II an die Chylomicronen ab. Das Apo C-II ist essentiell für die Hydrolyse der Chylomicronen, da es die endothelständige Lipoproteinlipase aktiviert [36], welche die Spaltung der Triglyceride zu Glycerin und Fettsäuren katalysiert, so daß dem peripheren Gewebe die Fettsäuren zugänglich gemacht werden [57].

Neben den Triglyceriden geben die Chylomicronen auch die Apoproteine A-I und A-IV ab; diese Apoproteine werden mittels der Lipid-Transfer-Proteine gegen Cholesterinester und Apo E der HDL<sub>3</sub> ausgetauscht, die Chylomicronen verlieren somit an Masse [29, 51]. Der zurückbleibende stark cholesterinhaltige Rest (Chylomicronen-Remnant) wird durch Bindung des Apoprotein E sowohl an spezifische Apo E-Rezeptoren als auch an den LDL-Rezeptor der Hepatozyten endozytiert (Beisiegel et al).

Die Chylomicronen-Remnants (CR) sind wesentlich kleiner und dichter als Chylomicronen. Während die Chylomicronen eine geringere Dichte als 0,094g/ml haben, liegt die Dichte der CR zwischen 0,094 und 1,006g/ml. Damit befinden sie sich bei der Dichtegradientenzentrifugation in der Fraktion der VLDL. Die Lebensdauer der Chylomicronen beträgt im Kreislauf ca. 30 Minuten, demnach sind sie physiologisch nur postprandial im Blut vorhanden. Bei einigen Dysbetalipoproteinämien lassen sie sich jedoch noch nach 12-stündiger Fastenzeit nachweisen.

## 1.3 Endogener Weg

Der endogene Lipidtransportweg ist gekennzeichnet durch die Sekretion von Lipoproteinen (VLDL), welche die in der Leber synthetisierten Lipide - vorwiegend Triglyceride- in den Blutkreislauf bringen.

Durch eine Wechselwirkung der VLDL mit HDL erfolgt eine Anreicherung der VLDL mit Cholesterin, Apo E und Apo C-II. Durch diese Reaktion entstehen

cholesterinreiche Reste, die VLDL-Remnants. Sie besitzen eine höhere Dichte als die VLDL und werden daher Intermediate Density-Lipoproteine (IDL) genannt.

Etwa die Hälfte dieser IDL werden über Apo E-Rezeptoren in die Hepatozyten endozytiert. Die Lebenszeit der VLDL/IDL-Partikel beträgt ca. 12 Stunden. Die andere Hälfte der IDL-Partikel geben auf noch nicht vollständig geklärte Weise die Apoproteine E und C-II ab, so daß sie schließlich nur noch das Apoprotein B-100 als Strukturprotein enthalten und als LDL bezeichnet werden.

Diese kleinen LDL-Partikel können die Endothelwand passieren und werden über Rezeptoren in die Zellen aufgenommen. Sie tragen so zur Versorgung der extrahepatischen Gewebe mit Cholesterin bei.

Die LDL-Partikel, die aufgrund ausreichender Versorgung nicht im extrahepatischen Gewebe aufgenommen werden, gelangen entweder in die Leber zurück und werden mittels LDL-Rezeptoren endozytiert [24], oder sie können sich in der Arterienwand ablagern und dort von Makrophagen phagozytiert werden. Die Makrophagen verändern sich dadurch zu Schaumzellen und tragen zur Arterioskleroseentwicklung bei.

## **1.4 Cholesterin-Rücktransport**

Die Leber ist das einzige Organ, das Cholesterin mit Hilfe von Gallensäuren ausscheiden kann. Das in der Peripherie überschüssige Cholesterin wird über Lipoproteine (HDL) in die Leber zurücktransportiert [53]. Die HDL werden sowohl von der Leber als auch vom Darm sezerniert. Bei den nascenten HDL handelt es sich um discoidale Lipoproteine, die das Apoprotein A (hepatisch: A-I und A-II; intestinal: A-I und A-IV), Phospholipide und wenige Cholesterinester enthalten. Durch die Aufnahme von Cholesterin aus den Membranen des extrahepatischen Gewebes wandeln sich die discoidalen Lipoproteine in ihre typische sphärische Form um. Die so entstandenen Lipoproteine werden HDL<sub>3</sub> genannt. Die Bindung des Cholesterins findet durch eine Veresterung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) statt. Dabei benutzt die LCAT das Apoprotein A-I als Cofaktor.

HDL<sub>3</sub> transferiert das Cholesterin an andere Lipoproteine, vorwiegend jedoch an IDL. Mit den IDL gelangt ein großer Teil des Cholesterins in die Leber zurück, dadurch dient das HDL selbst nicht als Transportmittel. Das HDL steht somit der weiteren Cholesterin-Aufnahme zur Verfügung.

Bei einem weiteren Weg dient das HDL direkt als Transportmittel. In diesem Fall nimmt das HDL<sub>3</sub> die von dem Abbau der VLDL und Chylomicronen verbleibenden Triglyceride, Phospholipide, Apo E und Apo C-II auf und wird somit zum weniger dichten HDL<sub>2</sub> (Dichte: 1,063g/ml-1,125g/ml). Die HDL<sub>2</sub>-Partikel gelangen zur Leber und werden dort entweder von den Apo E-Rezeptoren der Hepatozyten gebunden, endozytiert und abgebaut oder von der Hepatischen Triglyceridlipase hydrolysiert. Das führt zu einem Verlust der Triglyceride und Phospholipide und somit zu den kleineren und dichteren HDL<sub>3</sub> (Dichte: 1,125g/ml), die der erneuten Cholesterin- und Triglyceridaufnahme zur Verfügung stehen.

## 1.5 Apoprotein E

Apoprotein E (Apo E) ist in verschiedenen Lipoproteinen (außer LDL) vertreten und spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme der Lipoproteine in die Zellen.

Apo E wird hauptsächlich in der Leber und der Muskulatur, zum Teil aber auch von Makrophagen, dem Zentralen Nervensystem, der Niere und der Nebenniere gebildet [8].

Uterman et al. [71] zeigten, und Zannis und Breslow bestätigten [84], daß nicht nur eine Form des Apo E genetisch determiniert ist, sondern noch zwei weitere Isoformen existieren. Der Nachweis dieses Polymorphismus erfolgte mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung. Mahley et al. bewiesen diese Tatsache auf molekularbiologischer Ebene und zeigten, daß der Hintergrund der unterschiedlichen Ladung auf der Basis eines Aminosäureaustausches beruht [77]. 1982 einigte man sich auf die einheitliche Nomenklatur E2, E3 und E4. Dabei ist Apo E3/3 mit einer Frequenz von ca. 60% die am häufigsten auftretende Form. Es folgen mit 2% E4/4 und E2/2, das mit einer Frequenz von 1% auftritt, der restliche Teil besteht aus heterozygoten Allelen [47].

### 1.5.1 Genetik und Struktur

Das Apo E Gen ist 3,7 kb lang und enthält 4 Exons. Es ist auf dem Chromosom 19 in unmittelbarer Umgebung zum Apo C-I und Apo C-II lokalisiert. Anhand von genetischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die drei oben genannten Isoformen durch drei kodominante Allele determiniert werden [77]. Diese Allele unterscheiden sich durch Punktmutationen an den Positionen 112 und 158, wobei entsprechend der Tabelle 2, entweder Arginin oder Cystein an den jeweiligen Stellen

eingebaut wird. Aufgrund der so entstandenen relativen Ladungsdifferenz ist E4 am stärksten basisch und E2 am sauersten.

Isoform	Position 112	Position 158
E2	Cystein	Cystein
E3	Cystein	Arginin
E4	Arginin	Arginin

Tabelle 2: Apo E Isoformen

Durch diese Punktmutationen, die man molekularbiologisch einfach nachweisen kann, ist der Genotyp definiert.

Die Unterscheidung der einzelnen Phänotypen kann auch anhand der Ladungsdifferenz des Apoproteins im Serum zu E3 dargestellt werden. Diese Ladungsdifferenzen werden mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung ermittelt, denn sie führen zu unterschiedlichen isoelektrischen Punkten.

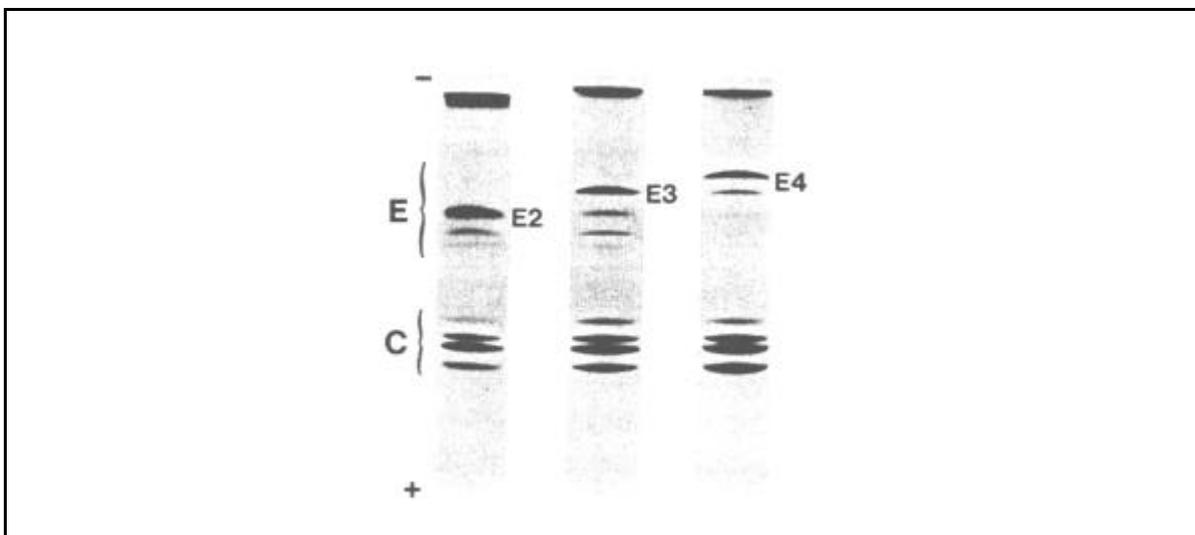


Abbildung 2: Apo E Phänotypen bei der isoelektrischen Fokussierung. Deutlich sind die unterschiedliche Laufgeschwindigkeit der einzelnen Isoformen zu unterscheiden.

Aus: Mahley R.W., Rall S.C.

The Role of Apolipoprotein E in Normal and Abnormal Lipoprotein Metabolism, 1195-1210

Nicht nur durch Punktmutationen an den Positionen 112 und 158 entstehen Ladungsdifferenzen, sondern auch durch andere Punktmutationen, welche die Ladung verändern. In diesem Fall entspricht der Phänotyp nicht mehr dem Genotyp. Somit ergibt sich z.B. trotz fehlenden Cysteins am Codon 158 der Phänotyp 2/3. Die Ursache hierfür bilden seltene Mutationen, auf die im Abschnitt 1.5.3 noch eingegangen wird.

Die Ladungsdifferenzen, die bei der isoelektrischen Fokussierung zu den verschiedenen Banden führen, können auch auf nicht molekularbiologischer Ebene vorhanden sein; das Apo E kann im Serum so glycosyliert werden, daß dabei posttranslationale Ladungsdifferenzen entstehen [84]. Auf diese Weise können Phänotypen erzeugt werden, die keine molekularbiologischen Abweichungen aufweisen. Dieses Phänomen zeigt sich insbesondere bei schlecht eingestellten Diabetikern, deren Glycosämie das Apo E glycosiliert.

### **Struktur:**

Das Apoprotein E besteht aus 299 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 34145 Dalton [47]. Es liegt im Serum als Glycoprotein vor. Der Kohlenhydratanteil beläuft sich dabei auf 2100 Dalton und die Serum Konzentration beträgt 3-5 mg/dl.

Chylomicronen und VLDL sind die Lipoproteine, in denen der größte Anteil (15%) des Apo Es gebunden ist. Da physiologisch VLDL gegenüber den Chylomicronen überwiegt, ist 90% des Gesamt-Apo E Gehalts an VLDL gebunden.

Die rezeptorbindende Domäne, die mit basischen Aminosäuren angereichert ist, ist in dem Abschnitt 140-160 des Apo E lokalisiert [1]. Die Codone von 171-183 haben bei der Stabilisation dieser Domäne eine entscheidende Bedeutung [44].

Mittels des carboxyterminalen Endes (As 225-229) werden die Lipide innerhalb der Lipoproteine gebunden [1].

### **1.5.2 Funktion**

Die wichtigste Funktion des Apo E stellt die Aufnahmevermittlung der Lipoproteine in die Zellen dar. Außerdem dient es den Lipoproteinen als Strukturprotein. Weiterhin ist Apo E an regenerativen Prozessen vor allem im peripheren Nervengewebe beteiligt.

Apo E ist Ligand für den LDL-Rezeptor und dem Lipoprotein Receptor Related Protein (LRP). Damit hat es bei der Endozytose der VLDL, HDL<sub>3</sub> und IDL die entscheidende Bedeutung.

Apo E stellt aber auch für die CR die Bindung an die LDL-Rezeptoren her. Dadurch werden die CR in die Leber aufgenommen und abgebaut. [80]. Auch bei dem von Herz et al. [32] untersuchten LRP bindet Apo E an den Rezeptor und vermittelt so die Aufnahme der CR. Aber nicht nur Apo E sondern auch die LPL spielt eine Rolle bei der Aufnahme der Chylomicronen. Beisiegel et al [4] haben nachgewiesen, daß an Chylomicronen gebundene LPL, die CR-Aufnahme um den Faktor 30 steigern kann. Desweiteren haben Mann et al. herausgefunden, daß ein intaktes LPL sogar die gestörte CR-Aufnahme durch ein mutiertes Apo E kompensieren kann [49].

Bei den VLDL-Rezeptoren im extrahepatischen Gewebe gilt ähnliches. Apo E dient auch hier als Ligand , wobei LPL die Affinität steigern kann.

Die drei Isoformen haben jedoch eine unterschiedliche Affinität zu den Rezeptoren und beeinflussen daher die Serumlipide. Sing und Davignon [15] zeigten in einer Studie den Einfluß des Apo E Polymorphismus:

	Apo E2	Apo E3	Apo E4
Triglyceride	↑	normal	↓
Cholesterin	↓	normal	↑

Tabelle 3: Einfluß der Apo E Isoformen auf die Serumlipide

Diese Unterschiede entstehen durch die unterschiedliche Affinität der einzelnen Apo E Isoformen zu den Rezeptoren. Im Vergleich zu Apo E 3 weist Apo E 4 eine höhere und Apo E 2 eine niedrigere Affinität auf. Somit können bei  $\epsilon$  4- Allel- Trägern die CR und VLDL schneller gebunden und aufgenommen werden. Durch deren Bindung an die Rezeptoren wird die Aufnahme der cholesterinreichen LDL kompetitiv gehemmt. Bei der E2 Isoform führt die Mutation, die in der Rezeptor-bindenden Domäne lokalisiert ist, hingegen zu einer verringerten Bindungsfähigkeit. Dadurch akkumulieren CR und IDL, so daß LDL aufgrund der fehlenden kompetitiven Hemmung vermehrt aufgenommen werden kann. Die Folge ist ein Absinken des Cholesterinspiegels und das Ansteigen der Triglyceridwerte.

### 1.5.3 Seltene Apo E Mutationen

#### 1.5.3.1 Apo E 1 (Gly127Asp,Arg158cys)

1984 beschrieben Weisgraber et al. [78] als erste die Apo E 1 Variante. Sie weist einen niedrigeren pH-Wert als E2 auf, und zeigt sich daher bei der isoelektrischen Fokussierung als eigene Bande unterhalb der E2-Bande. Die Differenz der Isoformen begründet sich auf einer Punktmutation im Codon 127, die zu dem Austausch der Aminosäure Glycin mit Asparagin führt. Diese Mutation wird ausschließlich bei Personen gefunden, die Träger des  $\epsilon$ 2-Alleles sind. Dementsprechend unterscheidet sich E1 um zwei Ladungen von E3.

Für den Nachweis dieser Mutation gibt es eine einfache Methode, die im Abschnitt Material und Methoden genauer beschrieben wird.

Die klinischen Auswirkungen des Basenaustausches sind umstritten, da die Träger nicht einheitlich hohe Lipidkonzentrationen aufweisen. Außerdem ist es möglich, daß nicht der Basenaustausch des Codons 127 für Änderungen im Lipidhaushalt verantwortlich ist, sondern die Tatsache, daß es sich formalgenetisch um ein  $\epsilon$ 2-Allel handelt (Basensubstitution an der Stelle Arg158Cys). Denn allein das  $\epsilon$ 2-Allel kann eine Dyslipoproteinämie verursachen.

Allerdings haben Mann et al. eine geringere Bindungskapazität der Apo E1 Variante gegenüber Apo E2 und Apo E3 in vitro nachgewiesen [50]. Das würde der These widersprechen, daß ausschließlich das  $\epsilon$ 2-Allel die Bindungsfähigkeit reduziert.

#### 1.5.3.2 Apo E2 (lys146gln)

Apo E2 ist prinzipiell durch die Mutation im Codon Arg158Cys definiert. Dadurch beinhaltet das Apoprotein E2 zwei Cysteine. 1983 untersuchten Rall et al jedoch einen Patienten mit dem Genotyp E2/3, dessen E2 Apolipoprotein nur ein Cystein statt zweien enthielt [64]. Bei der Sequenzierung zeigte sich, daß in diesem Fall nicht die Arg158Cys Mutation für die Ladungsänderung verantwortlich ist, sondern eine Mutation des Codon 146, die zum Austausch von Arginin gegen Glutamin führt. Die Untersuchung der in vitro-Bindungskapazität dieser Variante erwies sich um 40% vermindert im Vergleich zur E3 Isoform. Klinisch verursacht dies eine Hyperlipidämie Typ III (diese wird nachfolgend näher erläutert), die ansonsten ausschließlich bei homozygoten E2/2 Personen gefunden wurde. Diese Beobachtung wurde 1990 von Smit bestätigt [63]. Dabei wurden normolipämische Patienten und hyperlipämische

Patienten mit den Genotypen E2/2 und E2/3 untersucht. Bei den drei hyperlipämischen E2/3 Patienten wurde die lys146gln Mutation nachgewiesen, während bei den normolipämischen E2/3 und E2/2 diese Mutation nicht gefunden werden konnte. Daraus zogen auch Smit et al den Schluß, daß es sich bei dieser Mutation, um eine dominante Form handelt, die eine Hyperlipidämie Typ III auslöst.

#### **1.5.3.3 Apo E2 (Arg136Cys)**

Feussner et al [19] fanden 1995 bei einer hyperlipämischen Patientin mit dem Phänotyp 2/3 eine Punktmutation im Codon 136, die auf dem Austausch der Aminosäuren Arginin zu Cystein beruht. Bei der nachfolgenden Familienuntersuchung wurden ihre 18- und 25-jährigen Töchter und ihr 73 Jahre alter Vater ebenfalls als Träger dieser Mutation identifiziert. Während der Vater und die Patientin selbst an schwerer Hyperlipidämie Typ III litten, zeigten die beiden Töchter eine Dysbetalipoproteinämie, jedoch keine weiteren klinischen Symptome. Aus diesen Ergebnissen schlossen Feussner et al., daß es sich bei dieser Mutation um eine *late-onset* dominante Form handelt, die im späteren Lebensalter zu einer Hyperlipidämie Typ III führt.

#### **1.5.4 Familiäre Dysbetalipoproteinämie (Hyperlipidämie Typ III nach Frederickson)**

Von den 1% der Bevölkerung, die homozygot E2/2 sind, haben wiederum 2% eine gemischte Hyperlipidämie (HLP<sub>III</sub>). Die Bezeichnung HLP Typ III wurde 1967 von Fredrickson eingeführt [20]. Typisch für diese Form der HLP beschrieben sie das Auftreten von VLDL, die in der elektrophoretischen Auftrennung des Nativserums eine breite beta-Bande bilden („broad beta disease“) (siehe Abbildung 3).

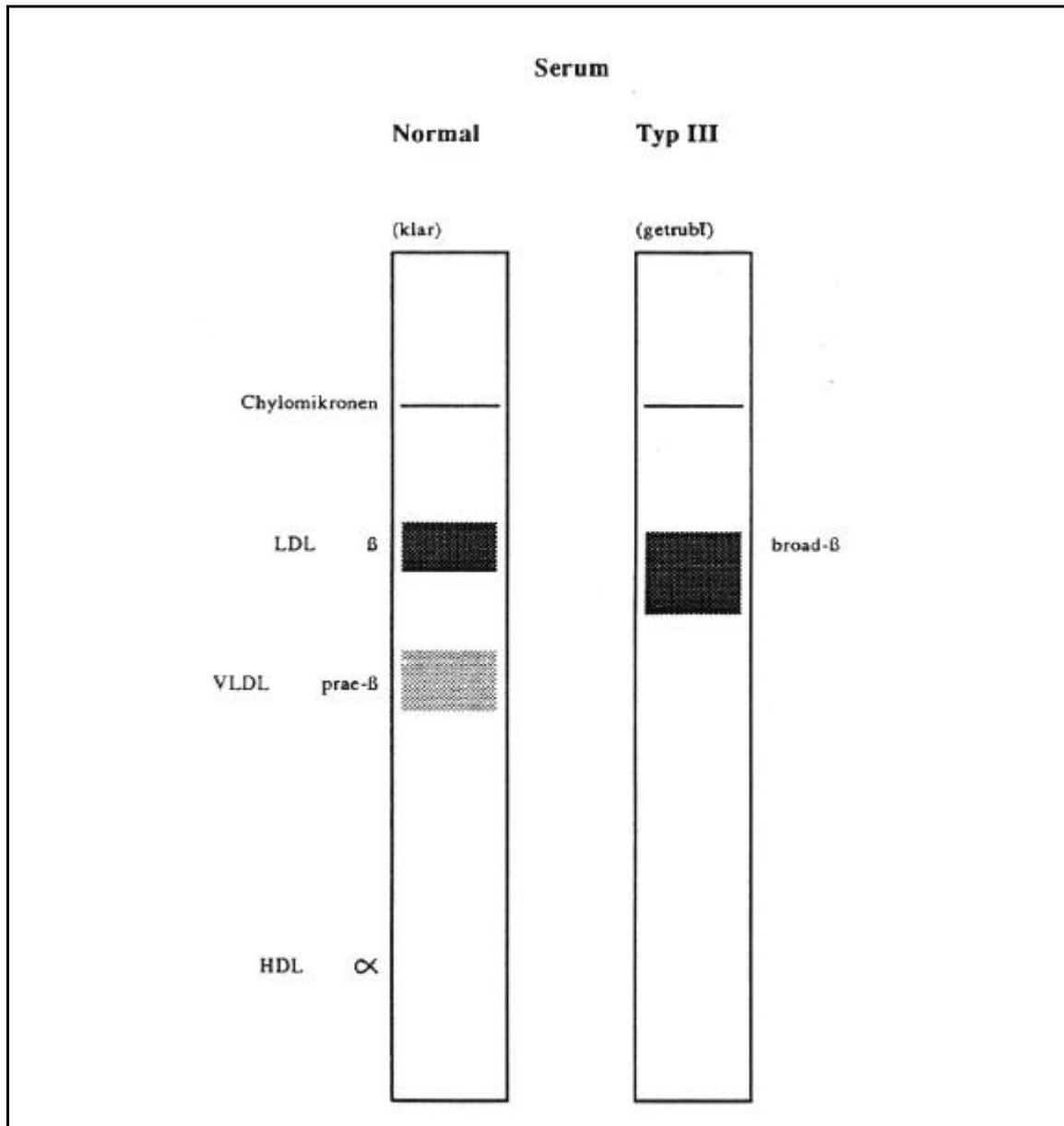


Abbildung 3: Broad- $\beta$ -Bande bei der Lipoproteinelektrophorese von Nativserum bei Hyperlipidämie Typ III.

Aus: Assmann G. und Lenzen H.J.

Apolipoprotein E-Polymorphismus, Hyperlipidämie und Herzinfarkttrisiko (1985), Internist: 692-700

Um genauere Aussagen über diese Lipoproteine zu treffen, werden sie zunächst mit Hilfe präparativer Ultrazentrifugation [21] isoliert. Anschließend werden sie mittels der Elektrophorese in  $\beta$ -Bande und prä- $\beta$ -Bande aufgetrennt. Die prä- $\beta$ -Bande ist gekennzeichnet durch die physiologischen triglyceridreichen VLDL. Dabei wird die  $\beta$ -Bande von den danach benannten  $\beta$ -VLDL gebildet, die aus pathologischen, cholesterinreichen Lipoproteinen bestehen [21]. Diese Partikel enthalten entweder Apo B-100 oder Apo B-48. Daraus wird geschlossen, daß es sich hierbei um VLDL

und CR handelt. Sie weisen eine geringere Menge an Apo C-II und einen fast verdoppelten Apo E-Gehalt auf [47].

Im Dichtegradienten ist diese Verschiebung dadurch erkennbar, daß die Fraktion mit einer Dichte unter 1,006g/ml, in der normalerweise die VLDL zu finden sind, eine stark erhöhte Konzentration an Triglyceriden und Cholesterinen beinhaltet. Der Cholesteringehalt in der IDL-Fraktion (Dichte:1,006-1,1019 g/ml) kann ebenfalls erhöht sein. Die LDL (Dichte: 1,025-1,063 g/ml) weisen dagegen erniedrigte Cholesterinwerte auf.

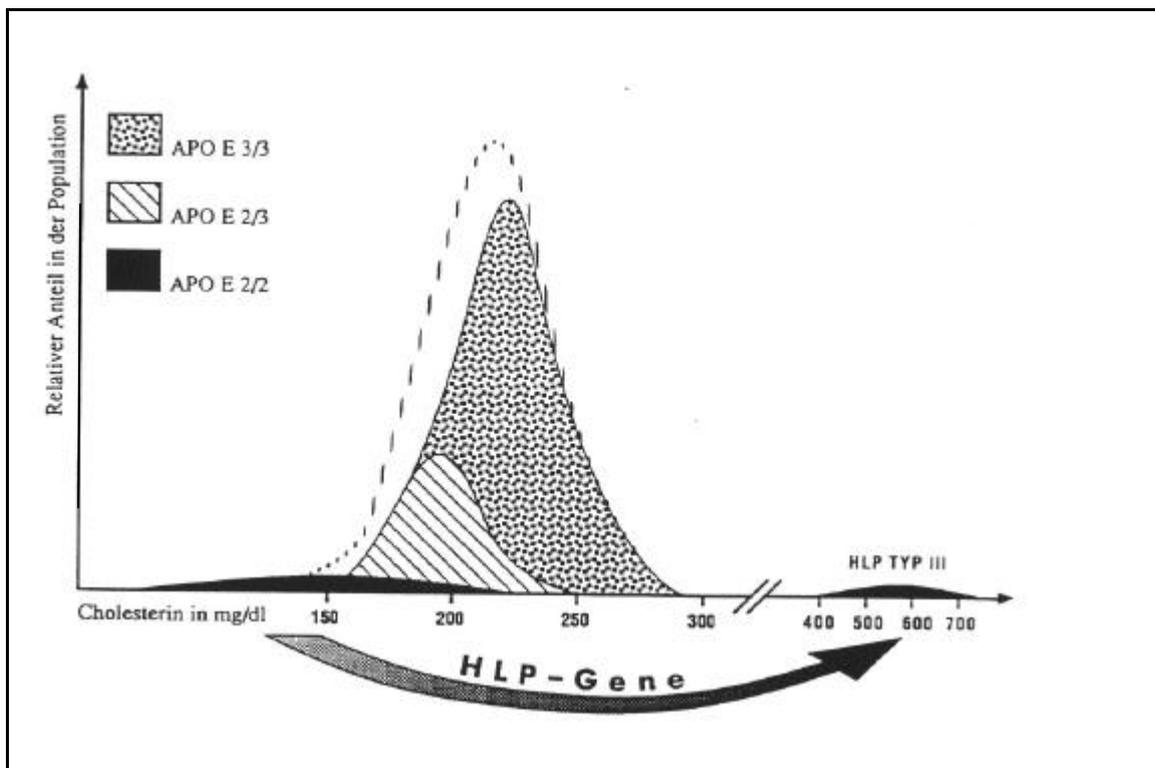


Abbildung 4: Auswirkung der E3 und E2 Isoformen auf den Cholesterinspiegel und das Zusammenwirken von „HLP-Genen“ mit dem  $\epsilon$ 2-Allel zur HLP Typ III.

Modifiziert nach : Utermann G. (1979) Polymorphismus des Apolipoprotein E  
Clin Genet. 15: 63-72

In diesem Fall wird der Hauptteil des Cholesterins in der  $\beta$ -VLDL-Fraktion transportiert. Diese Fraktion akkumuliert im Plasma. Dafür gibt es mehrere Ursachen: zum einen ist die Hydrolyse durch die LCAT, sowie durch die Hepatische (HL) und die Lipoproteinlipase (LPL) aufgrund des mutierten Apo E verlangsamt. Im Prinzip wird die LPL durch das Apo C-II aktiviert, jedoch inhibiert das veränderte Apo E die Reaktion [17]. Es entsteht kaum IDL. Zum anderen ist die Affinität des veränderten

Apo E zu den Apo E-bindenden Rezeptoren verringert, so daß die Lipoproteine nur langsam von den Hepatozyten aufgenommen werden können.

Die HLP Typ III fällt klinisch durch eine ebenso starke Erhöhung der Cholesterine wie auch der Triglyceride auf. Sie manifestiert sich jedoch meist erst im mittleren Lebensalter, bis dahin wird der Defekt durch körpereigene Regelmechanismen kompensiert. Männer sind davon in der Regel stärker betroffen als Frauen. Dieser Unterschied läßt sich auf unterschiedliche Expression der Rezeptoren zurückführen, die hormonell bedingt sind [40,81].

Patienten mit HLP Typ III leiden gehäuft unter Diabetes, Adipositas, Hyperuricämie und Hypothyreose. Außerdem finden sich bei den Patienten Risikofaktoren wie z.B. regelmäßiger Alkoholgenuß oder Rauchen. Das gemeinsame Auftreten der HLP Typ III und dieser zusätzlichen Faktoren sowie die Tatsache, daß nur 1% der Apo E2/2-Träger unter einer gemischten HLP leiden, verdeutlicht, daß es sich nicht um eine streng den Mendel'schen Gesetzen folgende Erkrankung handelt, sondern daß der Anstieg der Lipidwerte multifaktoriell beeinflusst wird.

Klinisch führen die hohen Lipidwerte oft zu peripherer Arteriosklerose und Koronarsklerose. Pathognomonisch für die gemischte HLP sind tuberoeruptive Xanthome an den Streckseiten der großen Gelenke sowie gelblich gefärbte Handlinien (Xanthoma striata palmarum).

## **1.6 Lipoproteinlipase**

Die Lipoproteinlipase (LPL) zeigt eine hohe Homologie zu der Hepatischen Lipase (HL), der Pankreas Lipase und der Zungen Lipase [33]. Alle diese Lipasen haben die Funktion, Triglyceride zu hydrolysieren. Wobei die LPL speziell Triglyceride der Chylomicronen und VLDL hydrolysiert.

### **1.6.1 Genetik und Struktur**

Der komplementäre DNS-Abschnitt der LPL wurde 1987 von Wilson et al kloniert und sequenziert [22]. Er befindet sich auf dem Chromosom 8 in der p22 Region. Das LPL Gen ist 30kb lang und besteht aus 10 Exons sowie 9 Introns [16]. Exon 4, 5 und 6 des Gens kodieren für das aktive Zentrum des Moleküls, während Exon 6 für die Endothelbindungsstelle (Heparin-sulfat-glycosaminoglycan-Bindung) verantwortlich ist. Die letzten Basen bilden das Carboxy-terminale Ende des Moleküls, hier werden

die Lipoproteine gebunden [46]. Eine weitere wichtige Struktur des Enzyms ist die Bindungsstelle für den Cofaktor Apo C-II, die durch Exon 4 codiert wird.

Die LPL ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 55000 Dalton auf einem SDS Page. Die aktive Form besteht aus einem nonkovalenten Homodimer, diese dimere Struktur wird von dem Heparansulfat unterstützt [73]. Zerfällt es in die monomere Form, hat es seine Funktion verloren und wird schnell von der Leber aufgenommen [74].

### 1.6.2 Synthese und Aktivität

Die mRNA ist in vielen Geweben gefunden worden, wie Niere, Herz, Fettgewebe, Intestinum, Myozyten, Brustdrüsengewebe, Makrophagen und Kupfferzellen. Die Hauptsyntheseorte sind Fettgewebe, Herz und Muskulatur. Syntheseort und Wirkungsort sind jedoch nicht identisch. Denn die Hauptlokalisierung der LPL befindet sich an der luminalen Seite der Gefäße. Auf eine bisher nicht ganz geklärte Weise gelangt das aktive nonkovalente Homodimer vom Syntheseort zu seinem Wirkort.

Untersuchungen haben einen Zusammenhang zwischen der Synthese der LPL und einiger Hormone gefunden. Bei intravenöser Gabe von Insulin und Glucose erhöht sich die LPL Synthese innerhalb der nächsten 3-6 Stunden [62, 83]. Der gleiche Zusammenhang wird für Thyroxin und Glucocorticoidhormone postuliert. [61] Beta-adrenerge Stimulation erniedrigt die LPL-Syntheserate im Fettgewebe, erhöht sie jedoch im Muskelgewebe.

Zur Hydrolyse der Triglyceride benötigt die LPL das Apoprotein C-II als Cofaktor. Physiologisch enthält das Plasma soviel C-II, daß 10% des vorhandenen Apoproteins genügen würden, um die LPL ausreichend zu stimulieren. Das aktivierte Enzym setzt aus den triglyceridreichen Lipoproteinen (VLDL, Chylomicronen) die Triglyceride frei. Diese werden entweder von dem umliegenden Gewebe aufgenommen, oder sie werden auf die HDL<sub>3</sub> transferiert, welche zum Austausch Cholesterinester an die Chylomicronen und VLDL übertragen. Die HDL<sub>3</sub> werden durch diese Reaktionen zu den weniger dichten HDL<sub>2</sub> und die Chylomicronen und VLDL verändern sich durch die gleichzeitige Abgabe der Apoproteine A-I, A-IV und C-II zu CR und IDL.

Eine weitere Funktion der LPL ist die Erhöhung der CR-Clearancerate [4,55]. Beisiegel et al haben gezeigt, daß die LPL an den CR gebunden bleiben und dadurch die Aufnahme der Lipoproteine in die Zelle steigern.

Um die LPL qualifizieren und quantifizieren zu können, wird diagnostisch die höhere Affinität des Heparins zur Heparinbindungsstelle gegenüber der Proteoglykane an der Gefäßwand ausgenutzt. Nach Injektion von Heparin bildet sich somit ein Heparin-LPL-Komplex, der frei im Blutkreislauf zirkuliert. Es wird angenommen, daß sich die gesamte LPL vom Endothel löst, so daß eine exakte Messung ermöglicht wird.

### **1.6.3 LPL-Polymorphismen**

Auf vier Polymorphismen des LPL-Gens mit unterschiedlichen Auswirkungen auf die Lipidwerte wird hier näher eingegangen.

#### LPL-Polymorphismus Promoter T-93G

Yang et al [82] beschrieben diesen Polymorphismus 1995 zum ersten Mal.

Hall et al [25] zeigten, daß der Polymorphismus D9N immer mit dem Polymorphismus T-93G vergesellschaftet ist, wohingegen nicht alle Träger des T-93G-Polymorphismus gleichzeitig den D9N Polymorphismus aufweisen. Eine Ausnahme stellt die Gruppe der Afro-Karribianern dar, dort können diese Polymorphismen auch getrennt voneinander auftreten. Bei einem Vergleich zwischen hyperlipämischen Patienten und einer Kontrollgruppe von normolipämischen Personen zeigte sich, daß die T-93GVarianten gehäuft in der hyperlipämischen Gruppe vertreten sind. Die Polymorphismenträger weisen erhöhte Cholesterin- und Triglyceridwerte, jedoch erniedrigte HDL-Werte auf.

#### LPL-Polymorphismus D9N

Die Punktmutation Asp9Asn (1991 zum ersten Mal von Lohse et al beschrieben [45]) ist mit einer Frequenz von ca.2% in der Bevölkerung vertreten, während bei hyperlipämischen Patienten die Frequenz mit 8-10% sehr viel höher liegt.

Maily et al [48] zeigten in einer Studie, daß diese Mutation zu erhöhten Plasmatriglyceridspiegeln führt. Sie haben einer gesunden Kontrollgruppe eine hyperlipämische Gruppe gegenübergestellt, wobei in beiden Gruppen Träger des LPL-Polymorphismus vertreten waren. Es stellte sich heraus, daß die Mutationsträger sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Patientengruppe höhere Triglyceridwerte im Nüchternplasma und eine geringere LPL-Aktivität im Postheparin Plasma aufwiesen als bei den Nichtmutationsträgern beider Gruppen. Die Tatsache, daß diese Variante auch bei normolipämischen Personen erhöhte Werte auslösen, daß sie jedoch keine Hypertriglyceridämie entwickeln, lassen Maily et al. zu dem

Schluß kommen, daß zusätzliche Faktoren den Organismus beeinflussen müssen, bis die Lipidwerte pathologisch werden. In Betracht kämen weitere Mutationen, die Einfluß auf den Lipidstoffwechsel nehmen, aber auch exogene Faktoren wie z.B. Rauchen, Alkoholkonsum, Adipositas etc.

#### LPL-Polymorphismus N291S

Anhand von Untersuchungen bei hyperlipämischen Patienten in den Niederlanden, zeigten Reymer et al. [59], daß Träger der Punktmutation Asn291Ser eine höhere Gesamtriglyceridkonzentration und eine niedrigere HDL-Konzentration haben. Auch gesunde Personen, die Träger des Polymorphismus sind, wiesen diese Dyslipämie auf, ohne jedoch pathologische Werte zu erreichen.

Eine andere Studie von Reymer et al. [58] zeigte eine zu 40% reduzierte Aktivität der LPL bei heterozygoten Mutationsträgern.

Diese Ergebnisse lassen Reymer et al. zu dem gleichen Schluß wie Mailly et al. bei der Asp9Asn Variante kommen, daß diese Mutation allein nicht zu einer Hyperlipidämie führt, sie jedoch im Zusammenhang mit anderen Faktoren eine Hyperlipidämie auslösen kann. Fisher et al [18] wiesen in einer Studie mit insgesamt 939 gesunden Probanden nach, daß bei den Personen, die heterozygot bezüglich der N291S Mutation sind und zusätzlich noch einen hohen BMI aufwiesen, die höchsten Triglyceridwerte gemessen wurden. Bei Personenn ohne hohen BMI aber mit der LPL-Mutation wurden nur geringe Triglyceriderhöhungen festgestellt.

#### LPL-Polymorphismus S447X

Hata et al [26] fanden 1990 durch Sequenzieren die Mutation im Exon 9, die ein Stop-Codon entstehen läßt. Das führt zum Fehlen der zwei terminalen Aminosäuren. Es fällt auf, daß diese Mutation in hypertriglyceridämischen Patienten seltener auftaucht. Beim Vergleich zwischen Trägern und Nichtträgern, den Stocks et al. anstellten [67], fällt kaum ein Unterschied bei den Lipidwerten auf, außer eine leichte Tendenz zu höheren HDL-Werten bei den Trägern. Kuivenhoven et al [43] zeigten sogar signifikante höhere HDL-Werte bei den Trägern dieser Mutation.

Weder bei den in vitro-Versuchen noch bei dem Post-Heparin-Plasma wurde eine verminderte LPL-Aktivität festgestellt. Die Häufigkeit dieses Polymorphismus ist niedriger als in der Normalbevölkerung, sie schützt demzufolge den Körper vor erhöhten Lipidwerten [67].

#### **1.6.4 LPL-Deletion 560-564**

Bei dieser Deletion handelt es sich um eine bisher noch nicht beschriebene Mutation. Sie wurde bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Patienten erstmals entdeckt. Es handelt sich um eine Deletion, die 4 Basenpaare an der Stelle 550 (Exon 3) entfernt. Die fehlenden Basenpaare führen zu einer Rasterverschiebung in der folgenden Sequenz, die zu der Erzeugung eines Stop-Codon im Anfangsbereich des Exon 4 führt. Demzufolge fehlt dem produzierten Protein das aktive Zentrum, die Endothelbindungsstelle, und auch die Lipoproteinbindungsstelle. Dieses Enzym kann keine Funktion mehr wahrnehmen. Handelt es sich bei dem Deletionsträger um einen heterozygoten Fall, ist es möglich, daß das gesunde Allel den Ausfall kompensieren kann. Im Detail bleibt der klinische Einfluß dieser Mutation noch zu klären, diese Arbeit soll einen Teil dazu beitragen.

### **1.7 Chylomicronämie**

Chylomicronämie ist durch die Anwesenheit von Chylomicronen nach 10-12 stündiger Nahrungskarenz definiert. Sie sind zunächst durch eine milchige Trübung des Serums erkennbar und schwimmen später als helle Schicht auf dem Serum. Die Triglyceridwerte im Serum solcher Patienten liegen zwischen 500-2000 mg/dl. Die Patienten leiden unter rezidivierenden Pankreatitiden, eruptiven Xanthomen und Dyspnoe. Bei chronischer Chylomicronämie findet man eine Hepatosplenomegalie. Isoliert hohe Triglyceridwerte zeigen jedoch eine geringere Korrelation zu einer Arteriosklerose wie hohe Cholesterinwerte.

Die Ursachen der Chylomicronämie sind in einer Lipoproteinlipase Defizienz [30] oder einer C-II-Defizienz [9] zu finden.

#### **1.7.1 Lipoproteinlipase Defizienz**

1960 zeigten Havel und Gordon [30] erstmals den Zusammenhang zwischen einer reduzierten LPL-Aktivität und der verminderten Verstoffwechslung der triglyceridreichen Lipoproteine. Bei Krauss et al. wurde deutlich, daß die HL dabei zwar intakt ist, jedoch die LPL-Defizienz nicht kompensieren kann [42].

Diese Form der Chylomicronämie ist sehr selten (1/1 Million). Sie wird autosomal rezessiv vererbt. Heterozygote haben eine leicht verringerte bis normale LPL-Aktivität. Dagegen werden Homozygote oft schon im Kindesalter symptomatisch. Bei Kindern fällt die isolierte Erhöhung der Chylomicronen bei einem völligen Fehlen von VLDL auf.

### **1.7.2 C-II-Defizienz**

1978 fanden Breckenridge et al [9] heraus, daß ein defektes C-II-Apoprotein ebenso wie die LPL-Defizienz zu einer Chylomicronämie führen kann. Denn die LPL kann aufgrund des fehlenden Kofaktors C-II die triglyceridreichen Lipoproteine nicht hydrolisieren, es kommt zu deren Akkumulation.

Diese Form der Krankheit wird jedoch erst im höheren Lebensalter symptomatisch und weist dann eine mildere Verlaufsform als die LPL-Defizienz auf [13].

## **1.8 Hepatische Lipase**

Die Hepatische Lipase (HL) ist ein Glykoprotein und ist ebenso wie die LPL durch Heparin Sulfat-Proteoglycane an die Zelloberfläche gebunden. Im Unterschied zur LPL wird die HL hauptsächlich in der Leber gebildet und exprimiert [6].

Ihre wesentliche Funktion ist die Hydrolyse der Triglyceride und Phospholipide aus IDL und HDL<sub>2</sub>, was die Konversion der HDL<sub>2</sub> zu HDL<sub>3</sub> zur Folge hat. Eine weitere wichtige Funktion der HL ist in der Aufnahmevermittlung der CR in die Hepatozyten zu finden [68]. Es zeigt sich, daß die HL die CR weiter prozessieren [66], und mittels ihrer hohen Affinität an die LRP [38] die Aufnahme der CR in die Hepatozyten steigern.

Untersuchungen an Mäusen, bei denen die HL durch Antikörper gezielt inaktiviert wurden [63], führten zu einem Anstieg des HDL Cholesterins und der CR.

Mutationen im Promotorbereich (Codon -480) führen zu Veränderungen der Enzymaktivität, die momentan diskutiert werden. Jenca et al. haben kürzlich gezeigt, daß das T-Allel bei normolipämischen und hypercholesterinämischen Personen zu erhöhten HDL-Konzentrationen führt, bei Patienten mit einer gem. Hyperlipidämie jedoch keinen solchen Effekt erzielt.

## **1.9 Exogene Faktoren**

### **1.9.1 Diabetes mellitus**

Grundsätzlich muß der Diabetes mellitus Typ-I (insulinpflichtiger Diabetes) vom Diabetes mellitus Typ-II (Insulinresistenz) in seiner Auswirkung auf den Lipoproteinstoffwechsel unterschieden werden.

Der gut eingestellte Typ-I-Diabetiker zeigt keine pathologischen Lipidwerte. Nur bei einer nicht optimal geführten Insulintherapie tendieren diese Patienten zu erhöhten Triglycerid- und zu erniedrigten HDL-Werten [27].

Die Typ-II-Diabetiker weisen eine solche Verschiebung häufiger und ausgeprägter auf [28]. Im folgenden wird daher nur auf den Einfluß des Typ-II-Diabetes auf den Lipoproteinstoffwechsel genauer eingegangen.

Bevor ein Diabetes Typ II manifest wird, liegt ein Hyperinsulinismus aufgrund der Insulinresistenz der Zellen vor. Eine meist gleichfalls vorhandene Adipositas beeinflusst dabei den Stoffwechsel zusätzlich. Aufgrund der Adipositas werden große Mengen an freien Fettsäuren aus den abdominellen Fettdepots freigesetzt. Diese Fettsäuren und die durch den Hyperinsulinismus vermehrt stimulierte Synthese des Apo B-100 [69] erhöhen die Synthese der triglyceridreichen VLDL-Partikel. Gleichzeitig sinkt die Abbaurate der VLDL aufgrund einer durch Insulin inhibierten Aktivität der LPL, sie akkumulieren im Plasma. Diese Erhöhung zeigt sich in erhöhten Plasmatriglyceridspiegeln.

Bei den HDL wird ein konträrer Einfluß beobachtet. So ist deren Synthese vermindert, während die Abbaurate aufgrund einer vorangegangenen Glykosylierung und der damit verbundenden schlechteren Bindungsfähigkeit zu den Rezeptoren erhöht ist [35,37]. Daraus folgt eine geringere HDL-Konzentration und ein verschlechterter Cholesterinrücktransport.

### **1.9.2 Einfluß von Übergewicht**

Es ist bekannt, daß Adipositas häufig assoziiert ist mit Hypertonie, Diabetes mellitus und Dyslipoproteinämien. Die Bogalusa-Heart-Study [75] zeigte bei 3311 Personen im Alter von 5-26 Jahren, daß je adipöser der Patient ist, das LDL- Cholesterin ansteigt, und das HDL-Cholesterin absinkt. Zusätzlich liegt bei vielen Personen ein Hyperinsulinismus vor [7]. Bei adipösen Patienten zirkulieren viele freie Fettsäuren im Blutkreislauf. Diese Fettsäuren hemmen zum einen die Insulinbindung an die

Hepatozyten und stimulieren zum anderen die hepatische Glucoseproduktion. Beide Mechanismen haben eine Insulinresistenz und damit einen Hyperinsulinismus zur Folge. Durch die oben beschriebenen Folgereaktionen kommt es zu einer Hypertriglyceridämie.

Der BMI ( Bodymass-Index= Körpergewicht [kg]/Größe<sup>2</sup>[m<sup>2</sup>]) wird in dieser Arbeit als Vergleichsgröße der Adipositas herangezogen. Er stellt eine einfache Möglichkeit dar, das Gewicht im Verhältnis zur Größe zu beurteilen. Ab einem BMI von 25 kg/m<sup>2</sup> wird von Übergewicht gesprochen.

### **1.9.3 Einfluß von Schilddrüsenhormonen**

Thyroxin bewirkt eine Abnahme des LDL-Cholesterins und damit des Gesamt-Cholesterins, während die Triglycerid- und HDL-Konzentration sich weniger ändern. Dieser Sachverhalt wurde bei athyreoten Patienten festgestellt, die mit Thyroxin substituiert wurden und dabei die Stadien der Hypothyreose, der Euthyreose, aber auch der Hyperthyreose durchliefen [38]. In Abbildung 5 sind zur Übersicht die Veränderungen des Lipoproteinstoffwechsels durch Thyroxin schematisch dargestellt.

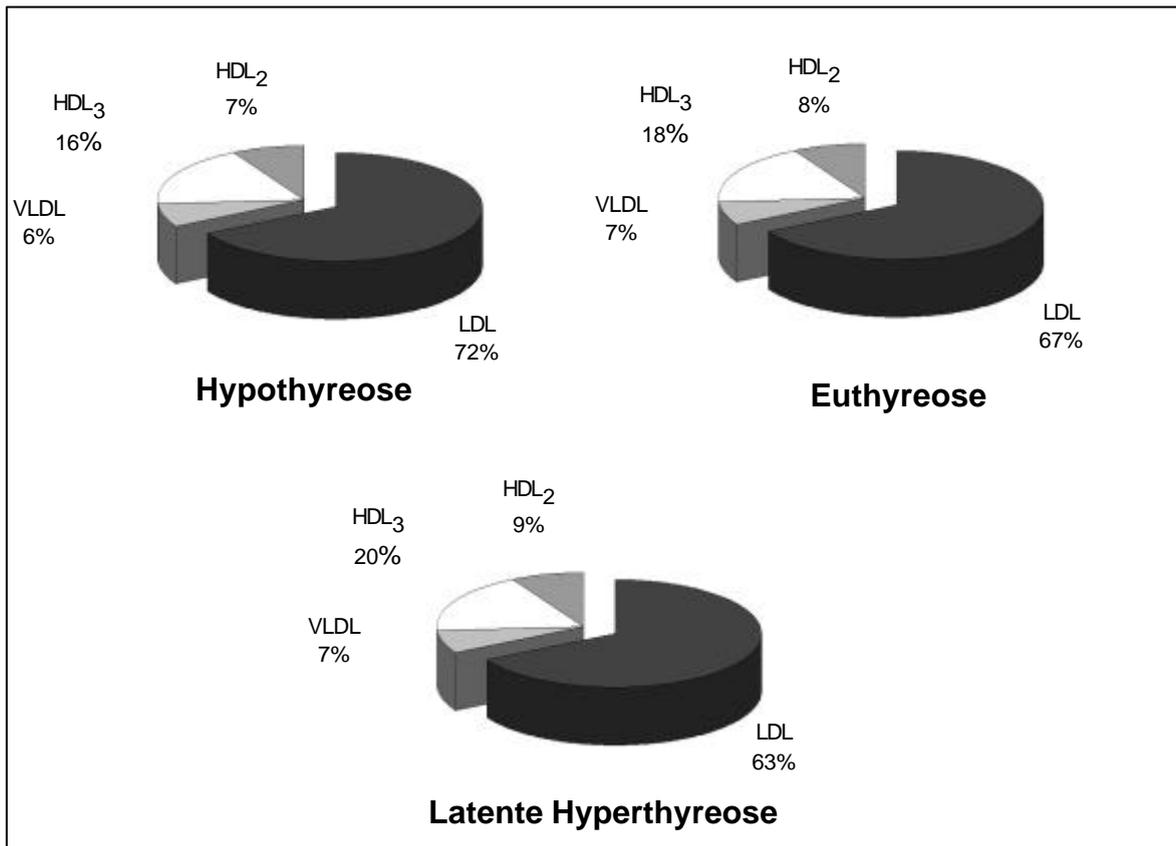


Abbildung 5: Einfluß von Thyroxin auf die relative Verteilung des Cholesterins im Serum.

Modifiziert nach: Wechsler J.G. (1995) Endokrinologische Erkrankungen und Dyslipoproteinämien Handbuch der Fettstoffwechselstörung.

Bei hypothyreoten Patienten wurden neben Hypercholesterinämien auch Hypertriglyceridämien mit Remnant-Akkumulation beobachtet [31]. Verantwortlich dafür ist eine verminderte Aktivität der LPL und somit eine gestörte Hydrolyse der VLDL und Chylomicronen [56]. Als weitere Ursache erweist sich die verringerte Bindungsfähigkeit der IDL und CR aufgrund der fehlenden affinitätssteigernden Wirkung an die Lipoproteine gebundener LPL. Zusätzlich wurde eine verminderte Aktivität des LDL-Rezeptors selbst beobachtet. Die Hyperthyreose hat im Gegensatz zur Hypothyreose einen cholesterinsenkenden Einfluß, der bei Einstellung auf eine euthyreote Stoffwechsellage wieder verschwindet [76].

#### 1.9.4 Einfluß von Alkohol

Alkohol hat einen nicht ausschließlich negativen Einfluß auf den Lipidstoffwechsel [22]. Bei gesunden Probanden führt mäßiger Alkohlgenuß zu einer Erhöhung der HDL-Konzentration, die kardioprotektiven Wert besitzt. Nur bei Personen mit schon vorhandener Hyperlipidämie oder bei Personen mit einer Disposition erhöht

übermäßiger Alkoholgenuß den Triglyceridspiegel [60]. Diese Erhöhung wird auf zwei Mechanismen zurückgeführt. Zum einen werden durch den Alkohol vermehrt freie Fettsäuren aus den Fettdepots freigesetzt. Dieses gesteigerte Angebot stimuliert die VLDL-Synthese, wodurch ein Chylomicronämiesyndrom entstehen kann [65]. Zum anderen hemmt Alkohol bei Personen mit entsprechender Disposition die Lipoproteinlipase [60], so daß dementsprechend Chylomicronen und VLDL verzögert umgebaut werden. Die verminderte Bindungsfähigkeit aufgrund der fehlenden bindungssteigernden Wirkung der LPL hat eine Akkumulation dieser Lipoproteine zur Folge, die Plasmatriglyceride steigen an.

### **1.9.5 Einfluß von Nikotin**

Der Vergleich zwischen Rauchern und Nichtrauchern zeigt deutlich, daß Nikotin zu höheren Lipidwerten bei niedrigeren HDL-Werten führen [14].

Eine Erklärung hierfür wird in einer vorliegenden Insulinresistenz vermutet, die durch die Nikotin-abhängige Adrenalinstimulation entstehen könnte [39]. Das Insulin bewirkt dabei eine Freisetzung der freien Fettsäuren, was wiederum die Neusynthese von VLDL und Cholesterin stimuliert. Auf noch nicht vollständig geklärtem Weg resultiert aus den so entstandenen hohen VLDL-Konzentration eine Verminderung der HDL:

Ungeklärt bleibt jedoch die Frage, in wieweit die teilweise unterschiedliche Ernährungsweise der Raucher den Lipoproteinstoffwechsel beeinflusst [11].

## **1.10 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der Arbeit ist die Auswirkung seltener Mutationen im LPL- oder Apo E- Gen auf den Lipidstoffwechsel zu klären. Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen, ist es nötig, mehrere Mutationsträger zu untersuchen. Aufgrund der Seltenheit der Mutationen bietet es sich an, die Familie eines bekannten Mutationsträger zu untersuchen. Im Vergleich zur Normalbevölkerung besteht bei der Familienuntersuchung eine höhere Wahrscheinlichkeit, weitere Träger zu finden.

Dabei werden die Familien nicht nur auf die betreffenden Mutationen, sondern auch auf andere bereits bekannte Mutationen und Polymorphismen, die den Lipidstoffwechsel beeinflussen, untersucht. Zusätzlich werden andere Stoffwechselkrankheiten und exogene Risikofaktoren wie z.B. Adipositas und Rauchen berücksichtigt. Somit soll geklärt werden, ob die Mutation selbst oder im Zusammenhang mit anderen Faktoren eine Dyslipoproteinämie auslösen kann. Es ist ebenso denkbar, daß die betreffende Mutation bei der Manifestation einer Hyperlipidämie keine Rolle spielt, welches mit dem Vergleichen von Trägern und Nichtträgern innerhalb der Familie gezeigt werden kann.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

#### 2.1.2 Verwendete technische Hilfsmittel

<b>Blutentnahme:</b>	S-Monovette KE	(Sarstedt)
für Postheparinblut:	Heparin (Liquemin)	(Roche)
	Tetrahydrolipstatin (THL)	(Roche)
<b>Dichtegradient:</b>	Cholesterol Reagenz	(Boehringer Mannheim)
	Triglycerid Reagenz	(Boehringer Mannheim)
	Kaliumbromid	(Merck)
	Precinorm	(Boehringer Mannheim)
<b>DNS-Isolierung:</b>	Tris-HCL	(Gibco)
	Na <sub>2</sub> EDTA	(Serva)
	NaCl <sub>2</sub>	
	SDS	(Serva)
	Proteinkinase K	(Boehringer Mannheim)
<b>PCR:</b>		
-10x Reaktionspuffer +/- Magnesiumchlorid		(Boehringer Mannheim)
-Magnesiumchlorid (25mM)		(Boehringer Mannheim)
-Taq DNA-Polymerase		(Boehringer Mannheim)
-10mM dNTP (je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		(Pharmazia)
-Mineralöl		(Sigma)
-Reaktionsgefäße 0,5µl safe ware		(Eppendorf)

#### Primer:

Name	Sequenz	Hersteller
E5	5`-TAA-GCT-TGG-CAC-GGC-TGT-CCA-AGG-AG-3`	Eurogentec
E13	5`-ACA-GAA-TTC-GCC-CCG-GCC-TGG-TAC-AC-3`	Eurogentec
H PRO 1	5`-AGC-CAC-CGC-TCC-TGG-CCA-GA-3`	Eurogentec
HPRO 8	5`-CAT-TTC-TCC-GTT-TCA-CCC-GG-3`	Eurogentec
LPL 1F	5`-CCT-TGC-AGC-TCC-TCC-AGA-GGG-3`	Eurogentec
LPL 1R	5`-AGG-GGA-GTT-TGC-GCG-CAA-AA-3`	Eurogentec
LPL 2F	5`-CTC-ATA-TCC-AAT-TTT-TCC-TT-3`	Eurogentec

LPL 2R	5`-CTC-TTC-CCC-AAA-GAG-CCT-CC-3`	Éurogentec
LPL 3F	5`-AAG-CTT-GTG-TCA-TCA-TCT-TC-3`	Éurogentec
LPL 3R	5`-ATA-AGT-CTC-CTT-CTC-CCA-GT-3`	Éurogentec
LPL 4F	5`- TTT-TGG-CAG-AAC-TGT-AAG-CA-3`	Éurogentec
LPL 4R	5`-GAC-AGT-CTT-TTC-ACC-TCT-TA-3`	Éurogentec
LPL 5F	5`-TGT-TCC-TGC-TTT-TTT-CCC-TT-3`	Éurogentec
LPL 5R	5`-TAA-TTC-GCT-TCT-AAA-TAA-TA-3`	Éurogentec
LPL 6F	5`-GCA-TGA-TGA-AAT-AGG-ACT-CC-3`	Éurogentec
LPL 6R	5`-GCC-GAG-ATA-CAA-TCT-TGG-TG-3`	Éurogentec
LPL 7F	5`-CAT-GTT-CGA-ATT-TCC-TCC-CC-3`	Éurogentec
LPL 7R	5`-ATG-ACC-GCC-CCC-CTG-TGC-TA-3`	Éurogentec
LPL 8F	5`-CCA-AAT-TTA-TTG-CTT-TTT-TG-3`	Éurogentec
LPL 8R	5`-AAG-GAA-GAA-AAA-TAC-ATT-TA-3`	Éurogentec
LPL 9F	5`-TAT-TCA-CAT-CCA-TTT-TCT-TC-3`	Éurogentec
LPL 9R	5`-GTC-AGC-TTT-AGC-CCA-GAA-TG-3`	Éurogentec

### Elektrophorese:

Laufpuffer:	Tris-borate (TBE): 0,09M Tris-borate:0,002M EDTA	
Größenmarker:	1kb DNA (1µl/µg)	(Gibco)
	100bp DANN (1µg/µl)	(Gibco)
loading buffer:	1xTBE	
	Glycerin (40%)	(Merck)
	Bromphenol Blau	(Merck)
Acrylamidgel +/- Glycerol:		
	Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	(Appligene)
	1xTBE	
	Glycerin	(Merck)
	Ammoniumpersulfat	(Serva)
	TEMED	(Serva)

SSCP-Puffer: 10xTBE  
 Harnstoff 7M (Merck)  
 Bromphenolblau (Merck)  
 H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

### Färbungen:

Ethidiumbromidfärbung:

Ethidiumbromid (Sigma)

Silberfärbung:

Essigsäure (Merck)  
 Silbernitrat (AgNO<sub>3</sub>) (Roth)  
 Formaldehyd (37%) (Sigma)  
 Natriumcarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, wasserfrei) (Merck)  
 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>\*H<sub>2</sub>O (Merck)

### Geltrocknung:

System von Promega

### Restriktionsenzymverdau:

Name	Puffer	Inkubatio- -temp.	Spaltungs- sequenz	Hersteller
<i>apa</i> I	BSA	37°C	GGGCC↓C	Boehringer Mannheim
<i>bcl</i> I	NEB3	50°C	T↓GATCA	Biolab
<i>cfo</i> I	L	37°C	GCG↓C	Boehringer Mannheim
<i>mn</i> I	NEB2	37°C	CCTC(N) <sub>7</sub> ↓	Biolab
<i>rsa</i> I	L	37°C	GT↓AC	Boehringer Mannheim
<i>taq</i> I	B	65°C	T↓CGA	Boehringer Mannheim

### PCR-Aufreinigung:

Ethanol-fällung:

3M Na-Acetat (Merck)  
 Ethanol(absolut) (Merck)

Mikrosäulen Technology:

Qiaquick (Qiagene)

PCR-Purification Kit (250) (Qiagene)

**Sequenzierung:**

DNA Sequenzierung kit, Dye Terminator I (Perkin-Elmer Cetus)

**2.1.2 Verwendete technische Hilfsmittel**

Elektrophoreseapparaturen

Biometra

Netzgeräte

Biorad

Biometra

LBK Bromma

PCR-Geräte

Biometra/Appligene

Sequenzierautomat

Applied Biosystems

Zentrifugen

Hettich

Heraeus

Beckmann

Sorvall

SW 41 Rotor für die Beckmann Zentrifuge

TH 641 Rotor für die Sorvall Zentrifuge

## 2.2 Familienuntersuchung

In der Lipidambulanz der Universitätsklinik Eppendorf werden die Patienten routinemäßig auf ihren Apo E- Typ und LPL-Polymorphismen untersucht. Bei Unregelmäßigkeiten würde die DNS der Patienten genauer untersucht werden. Bei einigen dieser Indexpatienten wurde es aus oben genannten Gründen für notwendig erachtet, die Familienmitglieder ebenfalls einer Untersuchung zu unterziehen.

Es handelt sich um fünf Familien:

- Familie A 19 Personen
- Familie B 8 Personen
- Familie C 8 Personen
- Familie D 34 Personen
- Familie E 9 Personen

Von diesen Familien wurde in Zusammenarbeit mit dem Indexpatienten ein Stammbaum erstellt.

Die Blutproben der Angehörigen wurden entweder von deren zuständigen Hausarzt abgenommen, welcher zu diesem Zweck vorher EDTA-Röhrchen, Anamnesebögen, sowie Einverständniserklärungen für die Patienten zugeschickt bekommen hatte.

In einigen Fällen hat aber auch der zuständige Arzt der Lipidambulanz der Universitätsklinik Eppendorf im Hause des Indexpatienten das Blut abgenommen und die Anamnese durchgeführt. Anschließend wurde das Blut der Verwandten in unserem Labor serologisch und genetisch untersucht.

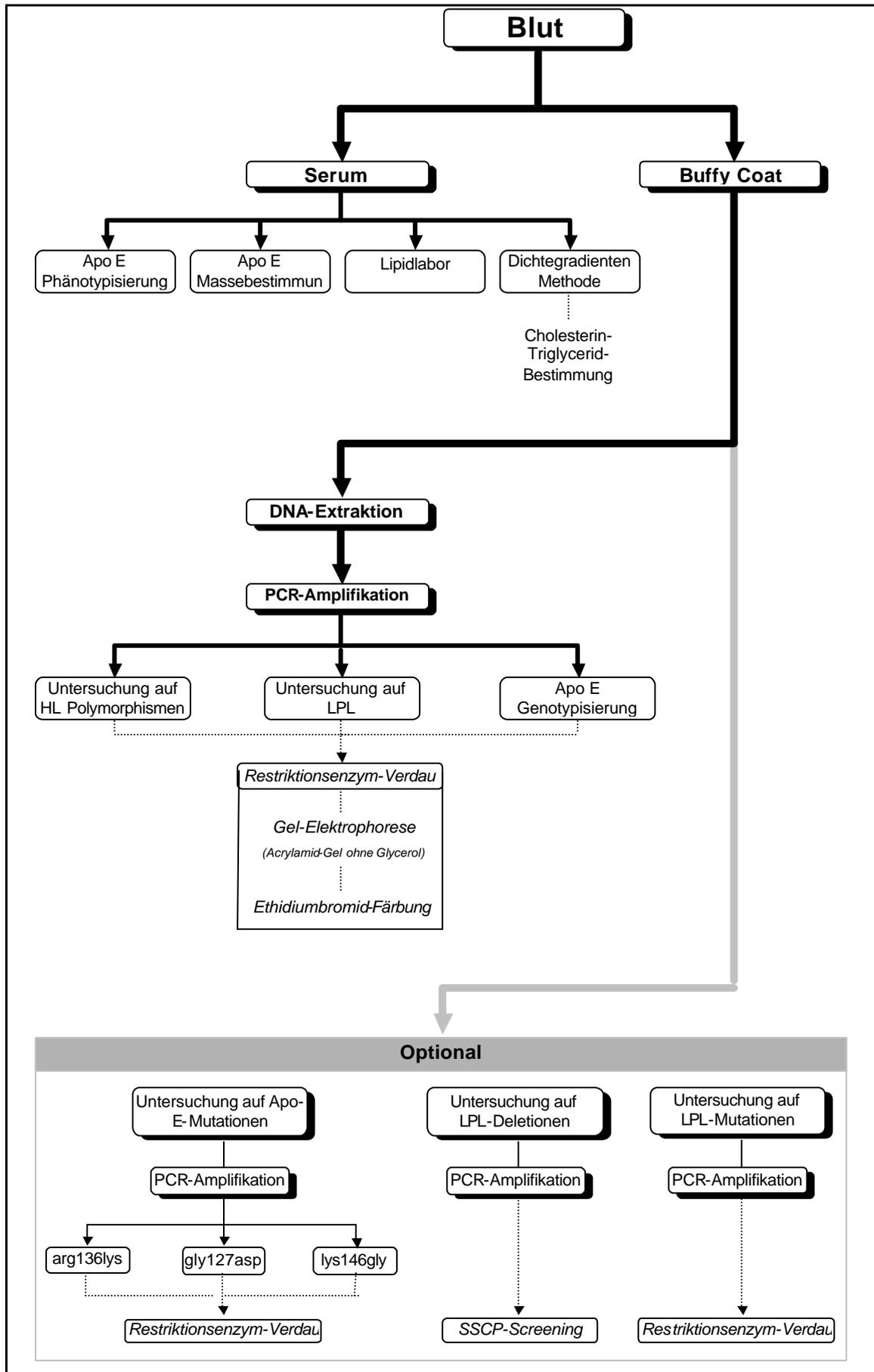


Abbildung 6: Verfahren mit dem Material

## 2.3 Serum

Das Blut wird aus der Cubitalvene in EDTA-Röhrchen abgenommen. Sobald es im Labor angekommen ist, wird es 10 Minuten bei 3000Upm und 4°C zentrifugiert und somit in zellfreies Serum und Erythrozyten getrennt. In der Interphase zwischen diesen beiden Medien befinden sich Leukozyten und Thrombozyten. Diese Schicht wird abpipettiert und bildet den Buffy Coat, aus dem DNS gewonnen werden kann.

Das abpipettierte Serum wird folgendermaßen verteilt:

- 1ml für das Lipidlabor zur Bestimmung von Gesamtcholesterin, Gesamttriglyceride, HDL-, LDL, VLDL-Cholesterin und die Konzentrationen von Lp(a), Apo A und Apo B
- 0,1 ml für die Apo E Phänotypisierung
- 0,1 ml für die Bestimmung der Apo E Masse
- 3 ml für die Erstellung des Dichtegradienten

Teilweise wurde den Personen Postheparin Plasma abgenommen, um die LPL zu beurteilen. Hierzu wurde dem Patienten 10 Minuten vor Blutentnahme intravenös 7000 Einheiten pro kg Körpergewicht Heparin injiziert. Unmittelbar nach Blutentnahme wurde dem Blut ein Proteaseinhibitor zugegeben, um die Aktivität der Lipoproteinlipase zu konservieren. Zusätzlich mußte darauf geachtet werden, dieses Material bei Temperaturen um 5°C zu halten, bei niedrigeren Temperaturen würde es eine Zellyse zur Folge haben, die das Material unbrauchbar machen würde.

Dieses Blut wurde ebenso wie das Präheparin-Plasma zentrifugiert. Das Serum und der Buffy Coat wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

Von dem Postheparin-Serum werden 0,1ml benötigt, um die LPL- und HL- Aktivität festzustellen.

### 2.3.1 Cholesterin- und Triglyceridbestimmung in den Lipoproteinfraktionen

#### Dichtegradientenzentrifugation

Mit diesem Verfahren werden die Lipoproteine gemäß ihrer Dichte aufgetrennt.

In einem 10ml Spezialröhrchen werden folgende Lösungen geschichtet:

- 2ml Aqua dest. ( $1,006\text{g/cm}^3$ )
- 3ml KBr-Lösung ( $1,019\text{g/cm}^3$ : 1,9 g KBr auf 100 ml 0,9% NaCl-Lösung)
- 3ml KBr-Lösung ( $1,063\text{g/cm}^3$ : 8,5g KBr auf 100ml 0,9% NaCl-Lösung)
- 3,5ml Plasma ( $1,21\text{ g/cm}^3$  eingestellt mit KBr)

Das Plasma erhält diese Dichte durch Gabe von 0,325g KBR pro ml Plasma. Das Plasma bildet dabei die unterste Schicht.

Die Zentrifugation wird bei 38000rpm und  $4^\circ\text{C}$  im Vakuum durchgeführt.

#### Photometrische Messung

Der Gradient wird mit Hilfe einer Fraktionsapparatur in 24 Röhrchen à 500ml aufgeteilt.

Die Lipidkonzentrationen werden mit einem standardisierten enzymatischen Farbtestverfahren der Firma Boehringer Mannheim GmbH im Photometer gemessen.

Jeweils 0,01ml der Röhrchen werden mit 0,1ml der standardisierten Lösung, in denen die Enzyme gelöst sind, gemischt. Nach 10 Minuten, in denen die Reaktionen stattfinden, werden die Triglyceride bei einer Wellenlänge von 104nm und die Cholesterine 853nm photometrisch ermittelt.

Bevor die Werte in einem Diagramm graphisch dargestellt werden, wird der Triglyceridwerte mit dem Faktor 10 multipliziert.

## 2.4 Bearbeitung des Buffy Coats

### 2.4.1 DNS Extraktion

Die DNS-Extraktion folgt der Methode nach Miller[49].

#### Stammlösungen:

- *Tris-HCl 1M, pH 7,4*                      *121g Tris in 900ml H<sub>2</sub>Odest lösen, pH mit HCl einstellen, Volumen auf 1000ml auffüllen*
- *Tris-HCl 1M, pH 8,2*                      *121g Tris in 900ml H<sub>2</sub>Odest auflösen, pH mit HCL einstellen, Volumen auf 1000ml auffüllen*
- *Na<sub>2</sub>ADTA, 0,5 M*                              *18,6g EDTA und 90ml H<sub>2</sub>Odest auf Magnetrührer erhitzen, bis Lösung klar wird, Volumen auf 1000ml auffüllen (die Lösung fällt beim Abkühlen wieder aus und muß für jede Benutzung neu erhitzt werden).*
- *NaCl 5M*                                      *293g in 900ml H<sub>2</sub>Odest auflösen, Volumen auf 1000ml auffüllen*
- *SAS 10%*                                      *10g SDS in 100ml H<sub>2</sub>Odest auflösen*

*Alle Stammlösungen werden autoklaviert.*

#### Arbeitslösungen:

##### *STE Waschpuffer:*

<i>Tris-HCl</i>	<i>1M, pH7,4</i>	<i>20ml</i>
<i>NaCl</i>	<i>5M</i>	<i>1ml</i>
<i>EDTA</i>	<i>0,5M</i>	<i>200µl</i>
<i>H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub></i>		<i>ad 1l</i>
<i>® filtrieren und autoklavieren</i>		

##### *Lyse-Puffer:*

<i>Tris-HCl</i>	<i>1M, pH8,2</i>	<i>1ml</i>
<i>NaCl</i>	<i>5M</i>	<i>8ml</i>
<i>EDTA</i>	<i>0,5M</i>	<i>400µl</i>
<i>H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub></i>		<i>100ml</i>
<i>® filtrieren und autoklavieren</i>		

*TE-Puffer:*

<i>Tris-HCl</i>	<i>1M,pH7,4</i>	<i>1ml</i>
<i>EDTA</i>	<i>0,5M</i>	<i>40µl</i>
<i>H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub></i>		<i>ad 100ml</i>

*® filtrieren und autoklavieren*

*Proteinkinase K:*

<i>Proteinkinase K</i>		<i>100mg</i>
<i>SDS</i>	<i>10%</i>	<i>10ml</i>
<i>EDTA</i>	<i>0,5M</i>	<i>20ml</i>
<i>H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub></i>		<i>70ml</i>

Nach der Trennung von Hämatokrit und Serum, werden die Erythrozyten von den kernhaltigen Leukozyten getrennt. Durch die niedrige Temperatur beim Einfrieren sind die Erythrozyten hämolysiert, mit Hilfe eines osmotisch inaktiven STE-Waschpuffers werden sie entfernt.

Das geschieht, indem der Buffy Coat zusammen mit 14ml Waschpuffer bei 3000rpm und 4°C 15 Minuten zentrifugiert wird. Nachdem der Überstand abgenommen worden ist, wird der Vorgang wiederholt. In dem Pellet befinden sich nun nur noch die Zellkerne; Zellmembranen und Zellflüssigkeit sind nicht mehr vorhanden. Zu dem Pellet werden 3ml Lysepuffer, 1ml Proteinkinase K Lösung und 200µl SDS 10% hinzugefügt. Diese Lösung wird über Nacht bei 37°C auf einem Rollenmischgerät inkubiert, um die Zellkerne zu lysieren und somit die DNS aus dem Zellkern freizusetzen.

Am folgenden Tag, werden 3,4ml Lyse-Puffer und 2,3ml 6 Molare NaCl hinzugefügt, um die DNS von Proteinen zu reinigen. Nach 20-minütiger Zentrifugation unter den ansonsten gleichen Parametern wie oben beschrieben, befindet sich die reine DNS im Überstand, während die Proteine sich am Boden abgesetzt haben. Die DNS-haltige Überstand wird in 30ml 100% Ethanol gegeben. In diesem Milieu fällt die DNS aus, sie wird als fadenförmige Struktur in eine Eppendorftube gefüllt. Durch Lösung mit 500µl TE-Puffer und inkubieren über 48 Std bei 37°C auf einem Rollenmischgerät, wird die DNS gelöst.

## 2.4.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, Abschnitte eines Chromosoms (50-25000 Basenpaare) zu amplifizieren. Das Prinzip ähnelt der DNS-Replikation.

Benötigt werden:

- Oligonukleotide                      Grundsubstanz für den neusynthetisierten Abschnitt
- Polymerase:                              Katalyse der Duplikation
- Primer                                      a.) Bereitstellung einer kurzen, doppelsträngigen DNA-Sequenz (3`-und 5`-Richtung), die von der Polymerase benötigt wird.  
b.) Markierung und Begrenzung des gewählten Abschnitts
- Puffer                                      optimales Milieu
- Magnesium                                a.)Cofaktor der Polymerase  
b.)Stabilisator der DNA

*Prinzip:*

Das Reaktionsgemisch wird in ein dünnwandiges Reaktionsgefäß gefüllt, welches Temperaturschwankungen schnell weiterleitet. Um Temperaturverzüge und Kondensation zu vermeiden, wird oberflächlich ca. 50µl Öl geträufelt.

Zunächst wird der Mix auf 94°C erhitzt, damit die doppelsträngige DNS aufgetrennt wird. (*Denaturation*) Dann wird die Temperatur auf 45-72°C abgekühlt, damit sich die beiden Primer der jeweils komplementären einsträngigen DNS anlegen können. Die Temperatur wird aus der Sequenz der Primer errechnet, sie trägt entscheidend zur Spezifität der Reaktion bei (*Annealing*). Bei einer Temperatur von 72°C entsteht mit Hilfe der Polymerase und der Oligonukleotide wieder eine doppelsträngige DNS (*Neusynthese*). Nachdem diese Zyklen 30-60mal wiederholt wurden, wird die Temperatur 5 Minuten bei 72°C gehalten, damit noch unvollständige Stränge vervollständigt werden können.

Bei der Aktivität der Polymerase fällt auf, daß das Enzym trotz der hohen Temperaturen die gleiche Aktivität beibehält. Die hier benutzte Taq-Polymerase stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, das im Wasser bei einer Temperatur von 75°C lebt. Daraus erklärt sich das Temperaturoptimum von 72°C und die Stabilität trotz der 94°C. Die Aktivität hängt von der

Magnesiumkonzentration, der Konzentrationsverteilung der vier Nukleotide und dem pH-Wert ab.

Im folgenden Bild wird gezeigt, daß bei der Neusynthese jeweils nur bei den von Primern markierten Startpunkten Nukleotide angelagert werden. Diese DNS wird solange neusynthetisiert, bis die Temperatur auf 95°C erhitzt wird. Dadurch entstehen undefiniert lange DNS-Fragmente. Im nächsten Zyklus legt sich der jeweilige andere Primer an die bereits vorhandenen DNS-Fragmente an. Die Neusynthese wird in diesem Fall nicht durch die Erhöhung der Temperatur unterbrochen, sondern ist durch die Länge des DNS-Fragmentes begrenzt. Bei den folgenden Zyklen wird nur noch der definierte Abschnitt amplifiziert. Dadurch wird eine hochspezifische Amplifikation des zu untersuchenden Abschnitts erreicht.

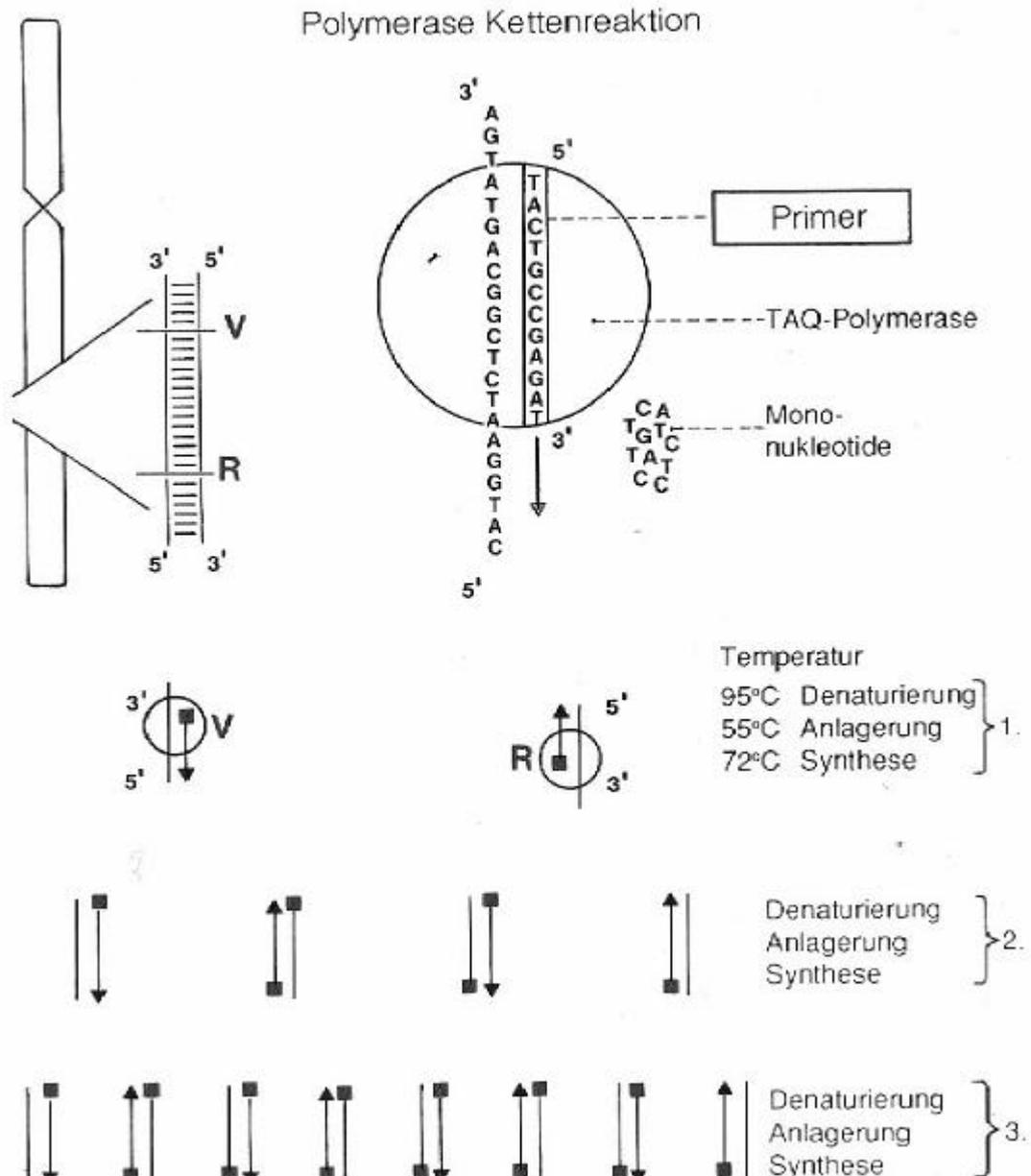


Abbildung 7: Prinzip der PCR-Amplifikation

### 2.4.3 Restriktionsenzymverdau

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die in der Lage sind, die Phosphodiesterbindungen doppelsträngiger DNS zu spalten.

Sie schneiden an - für das Enzym- spezifischen Spaltungsstellen, die in einer definierten Erkennungssequenz liegen. Diese sind oft palindromer Struktur, d.h. beide Stränge besitzen in 5'→3'-Richtung die gleiche Basenabfolge.

Durch die Spaltung entstehen unterschiedlich große Fragmente (Restriktion Fragment Längen Polymorphismus), die bei einer nachfolgenden Gelelektrophorese aufgetrennt werden. So kann der Restriktionsenzymverdau auf

zwei verschiedenen Wegen spezifisch und schnell Mutationen zeigen. Zum einen können durch Mutationen neue Spaltungsstellen entstehen, und zum anderen können bisher vorhandene Spaltungsstellen verschwinden. Es hängt von der zu erwartenden Erkennungssequenz ab, welches Restriktionsenzym eingesetzt wird. Die Bedingungen, wie Puffer, Inkubationsdauer und -temperatur sind abhängig von dem jeweiligen Enzym.

Die Enzymeinheit Unit ist als diejenige Menge definiert, die in der Lage ist, bei optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen alle spezifischen Spaltungstellen in 1µg DNS in einer Stunde in einem 20µl Ansatz vollständig zu spalten.

#### 2.4.4 Gelelektrophorese

Um das PCR-Produkt aufzutrennen, werden die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der DNS-Fragmente im elektrischen Feld genutzt. DNS ist bei neutralem pH negativ geladen und wird daher von der Anode angezogen. Bei der doppelsträngigen DNS variiert die Geschwindigkeit je nach Größe der Fragmente, aufgrund der geringeren Reibung sind die kleinen Fragmente die schnelleren. Bei DNS-Fragmenten bis zu 1000bp werden Polyacrylamidgele verwendet, da sie chemisch inert sind, und sie einfach herzustellen sind. Außerdem kann ihre Porengröße und somit die Wanderungsgeschwindigkeit der DNS variiert werden, indem die Konzentrationen von Acrylamid und Methylenbisacrylamid verändert wird.

Die Anwesenheit von freien Radikalen, die von Ammoniumpersulfat geliefert werden und durch TEMED (N,N',N',N'-tetramethylethylenediamine) stabilisiert werden, initiiert eine Kettenreaktion, in der die Acrylamidmonomere zu langen Ketten polymerisieren. Diese werden durch Methylenbisacrylamid so geformt, dass sich das Gel festigt.

Auf diese Polyacrylamidgel werden die Proben aufgetragen.

##### *10%-iges Acrylamid-Gel ohne Glycerol*

<i>Aqua dest</i>	<i>3,9 ml</i>
<i>10x TBE (Tris-borate-EDTA)</i>	<i>0,75</i>
<i>Polyacrylamid</i>	<i>1,88</i>
<i>Amp</i>	<i>100µl</i>
<i>Tetramethyldiamid</i>	<i>15µl</i>

### 10%-iges Acrylamid-Gel mit Glycerol

Aqua dest	4,1 ml
10x TBE (Tris-borate-EDTA)	0,75 ml
Glycerol	0,75 ml
Polyacrylamid	1,88 ml
Amp	100µl
Tetramethyldiamid	15µl

#### 2.4.4.1 SSCP-Gelelektrophorese

##### (single strang conformation polymorphism)

Die SSCP-Gelelektrophorese ist eine Methode, die nicht ausschließlich aufgrund der unterschiedlichen Fragmentlänge die DNS auftrennt, sondern zusätzlich nach der Konformation der Einzelstränge. Eine doppelsträngige DNS hat aufgetrennt zwei Stränge mit unterschiedlicher Konformation, die sich aufgrund intramolekularer Basenpaarung der Nukleotidsequenzen bilden. Demzufolge sind bei einem PCR-Produkt, daß aus einem homozygoten Allel entstanden ist, zwei Banden sichtbar, bei einem heterozygotem Allel vier Banden. Das wird in im folgenden Bild deutlich.

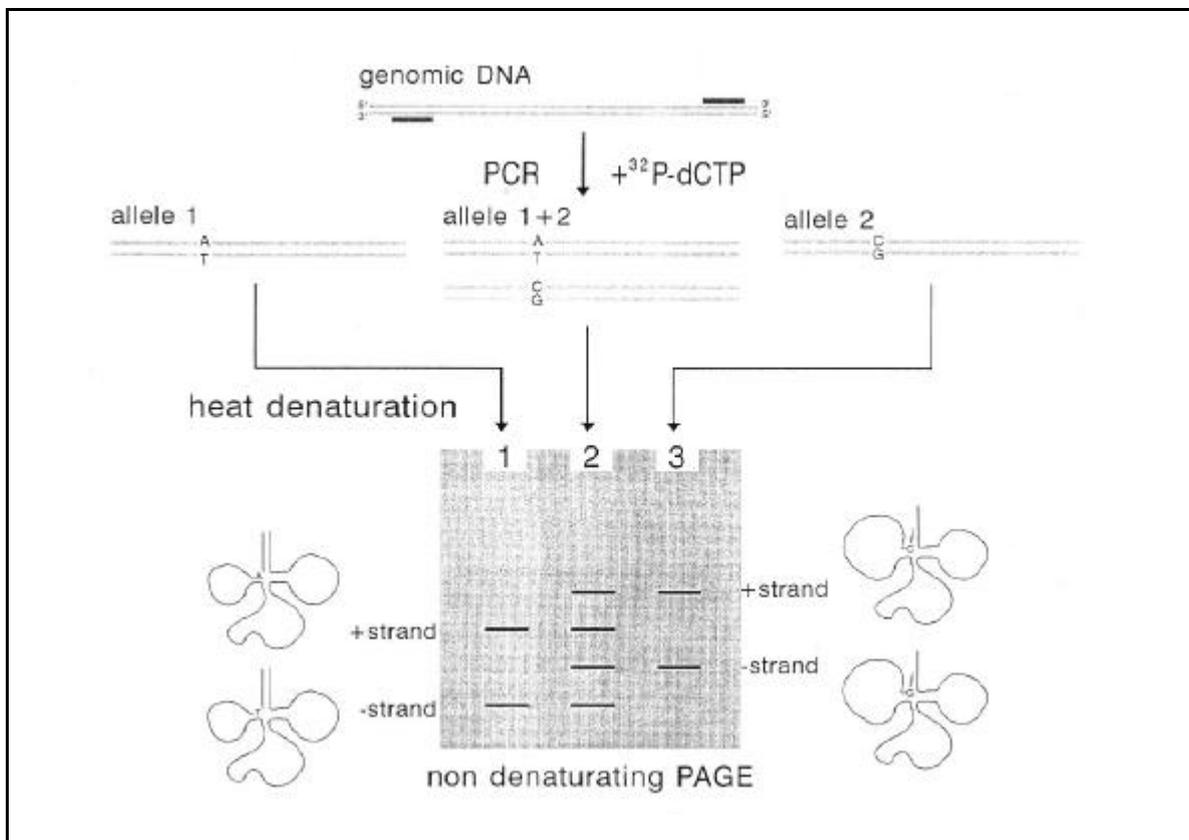


Abbildung 8: Prinzip der SSCP-Gelelektrophorese

Je nach Beschaffenheit des zu untersuchenden Abschnitts werden die Bedingungen wie Prozentigkeit des Gels, Dauer des Gellaufes, Ionenstärke des Elektrophoresepuffers und der Glycerolkonzentration gewählt.

*Durchführung:*

Um einen Einzelstrang zu erhalten, wird 1µl des PCR-Produktes zusammen mit dem SSCP-Mix zunächst 5 Minuten auf 95°C erhitzt und sofort danach mittels eines Eis-Wasser-Gemisches auf eine Temperatur von 0-4°C abgekühlt. Dann werden die Proben auf das Gel aufgetragen. Ein Marker und jeweils eine Probe, die homozygot für das eine Allel, homozygot für das andere Allel und eine Probe, die heterozygot bezüglich dieser Merkmale ist, laufen mit den zu untersuchenden Proben immer mit, der Marker hat die Funktion, die Länge der Basen zu markieren, die Kontrollproben werden für den Vergleich herangezogen.

## 2.4.5 Färbung von Polyacrylamidgelen

### 2.4.5.1 Silberfärbung

#### benötigte Lösungen:

<i>Sibernitratlösung:</i>	2g/l AgNO <sub>3</sub>
<i>Entwicklungslösung:</i>	30g/l Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	5mg/l Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
	1,5ml/l 37% HCOOH
<i>Fixierungslösung:</i>	30% Methanol
	3% Glycerin

Die Silberfärbung wird modifiziert nach der Methode von Bassam et al 1991 durchgeführt. Sie wird hauptsächlich bei SSCP-Polyacrylamidgelen angewandt, kann jedoch auch bei Gelen, die ds.DNS geladen haben genutzt werden.

Die Silberionen komplexieren mit der DNS, durch die Reduktion dieser Bindung mittels einer Entwicklungslösung können die Banden sichtbar gemacht werden.

#### *Durchführung:*

Zur Fixierung der Banden wird das Gel 20 Minuten lang in 10%-ige Essigsäure gelegt. Nach dreimaligem Waschen mit eiskaltem Wasser findet die 30-minütige Imprägnierung in Silbernitratlösung statt. Nach erneuten Spülungen mit eiskaltem Wasser wird es für ca. fünf Minuten in die Entwicklungslösung getaucht, welche die Banden sichtbar werden lässt. Danach wird das Gel für mehrere Tage in eine Fixierungslösung gelegt. Anschließend wird das Gel in Folien von Promega getrocknet.

### 2.4.5.2 Ethidiumbromidfärbung

Das Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenanthrindiumbromid) interkaliert zwischen Basenpaaren doppelsträngiger DNS und kann daher nicht für die Färbung von SSCP-Gelen herangezogen werden. Sie wird zur Färbung von PCR-Produkten genutzt, die mit Restriktionsenzymen inkubiert worden sind(s.u.). Es handelt sich bei der Interkalation um eine nicht kovalente Bindung, die sehr fest ist. Da es sich bei Ethidiumbromid um einen fluoreszierenden Farbstoff handelt, wird er mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

*Durchführung:*

Das Gel wird für ca. 10-15 Minuten in eine ethidiumbromidhaltiger Lösung (1-3µl/100ml) gelegt. Dann wird das Gel auf eine UV-Lichtquelle gelegt, welche die nun fluoreszierenden Banden zeigt. Indem die Gele in diesem Licht fotografiert werden, können sie für die Dokumentation erhalten werden.

**2.4.6 Sequenzieren**

Um eine Sequenz eines DNS-Fragmentes zu erhalten, sind folgende Reaktionsschritte nötig:

1. PCR-Amplifikation
2. Aufreinigung des Produktes
3. DNA-Konzentration-Bestimmung
4. Sequenzierreaktion
5. Ethanolfällung der DNA
6. Auswertung mittels Gel-Elektrophorese

***PCR-Amplifikation***

Die PCR-Amplifikation wird angewandt, um möglichst viele Kopien des zu untersuchenden Abschnittes zu erhalten, so daß ein aussagekräftiges Ergebnis möglich wird.

***Aufreinigung des Produktes***

Nicht gebundene Primere, Salze und Enzyme, stören die Sequenzierungsreaktion, daher werden sie mittels einer standardisierten Methode entfernt. Dafür wird das QIAQuick PCR Purifikation Kit verwendet, das auf dem Prinzip beruht, daß die DNS bei einem pH-Wert von unter 7,5 und hohen Salzkonzentrationen von einer Silicagelmembran der Mikrosäulen der microspin technology adsorbiert wird. Im Gegensatz zur Adsorption funktioniert die Elution nur bei niedrigen Salzkonzentrationen.

Es können 100bp-10kbp PCR-Produkt damit aufgefangen werden.

Die maximale Bindungskapazität der Membran beträgt 10µg, die Rückgewinnung der DNS 90%-95%, und die Oligomere werden vollständig ausgewaschen.

*Durchführung:*

Das 6-fach in PB-Puffer verdünnte PCR-Produkt wird auf eine Mikrosäule gegeben und eine Minute bei 13000rpm zentrifugiert. Der hohe Salzgehalt und der

niedrige pH-Wert ermöglicht eine optimale Bindung der DNS an die Membran und eine Beseitigung der Primer. Der Unterstand wird verworfen, und auf die Säule werden 750µl PE-Puffer gegeben. Dieser Puffer enthält Ethanol und reinigt somit die DNS von Salzen und Ölen. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen oben genannten Bedingungen wird der Unterstand verworfen, und ohne Hinzufügen einer neuen Lösung wird die Säule unter denselben Bedingungen ein weiteres Mal zentrifugiert, um Restpuffersubstanzen abzutrennen. Für die Elution der DNS werden 30-50µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf die Säule gegeben, das auffangende Reaktionsgefäß wird gegen ein neues vertauscht. Nach einem weiteren Zentrifugationsvorgang ist die PCR-Aufreinigung abgeschlossen, die gereinigte DNS befindet sich nun in dem Reaktionsgefäß

### ***DNS-Konzentrations-Bestimmung***

Für die Sequenzierungsreaktion ist eine definierte DNS-Konzentration von 30ng/µl nötig. Diese wird erreicht durch Messung der vorhandenen Konzentration und entsprechender Verdünnung.

#### *Durchführung:*

Die Probe wird 1:25 verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260nm (dem Adsorptionsmaximum der DNS) wird photometrisch die Extinktion gemessen. Die DNS-Konzentration läßt sich aus der Extinktion unter Berücksichtigung der vorherigen 25-fachen Verdünnung berechnen:

$$\text{Extinktion} \times 25(\text{Verdünnungsfaktor}) \times \text{Faktor } 50 = c \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

Um die benötigte Konzentration von 30ng/µl zu bekommen, wird die Probe mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> entsprechend verdünnt.

### ***Sequenzierreaktion***

Die Sequenzierung erfolgt nach der Didesoxymethode von Sanger, hierfür werden nach den Angaben von Perkin-Elmer Cetus folgendes benötigt:

Primer	0,5µl
PCR-Produkt	3,0µl
dNTP-Dye Terminator	8,0µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	8,5µl

Es werden die gleichen Primer wie bei der PCR angewendet. Dadurch, daß jedem Reaktionsansatz nur ein Primer hinzugefügt wurde, wird nach der Denaturierung

immer nur in eine Richtung neusynthetisiert. Demzufolge entstehen in dem einen Reaktionsgefäß Fragmente, deren 3´er Ende definiert ist, und in dem anderen ist das 5´er Ende definiert. Im Verlauf der Elongation mittels der AmpliTaqPolymerase bindet der dNTP-Dye Terminator an die DNS. Es handelt sich um ein mit Fluoreszenzfarbstoff markiertes dNTP-Analogon dessen 3´Hydroxylende fehlt, das zu einem Abbruch der Reaktion führt. Bei den folgenden Zyklen entstehen dadurch Kopien von Fragmenten unterschiedlicher Länge.

### ***Ethanol-fällung der DNS***

Nach der Sequenzierreaktion wird das PCR-Produkt mittels einer Ethanol-fällung von Primern gereinigt, um die nachfolgende Gelelektrophorese zu optimieren.

#### *Durchführung:*

Es werden jedem Reaktionsgefäß 2µl 3M Natrium Acetat (pH 4,6) und 50µl 95%-igem Ethanol hinzugefügt. Diese Mischung wird dann für ca. 30 Minuten bei -20°C eingefroren. Nach einer Zentrifugation für 20 Minuten bei 4°C mit 13000rpm wird der Überstand, ohne das Pellet abzulösen, herauspipettiert. In das Reaktionsgefäß werden 250µl 70%-igen Ethanols hinzugefügt. Nach erneutem Zentrifugieren bei den gleichen Bedingungen wird der Überstand abgekippt und das Pellet getrocknet. Dem Pellet werden zur Lösung 10µl Wasser hinzugefügt.

### ***Auswertung mittels Gelelektrophorese***

Die DNS-Fragmente beider Proben werden nun mittels zweier hochauflösender Polyacrylamidgele in die verschiedenen Längen aufgetrennt. (Ein Gel dient der Kontrolle des anderen.) Die Laserdiode des Sequenzierapparates erkennt die fluoescenzmarkierten Nukleotide und identifiziert sie. Dadurch wird die Sequenz eines Gen-Abschnittes sichtbar.

### 2.4.7 Apo E Genotypisierung

Für den Nachweis der Apo E Polymorphismen wird das Exon 4 mittels der PCR amplifiziert, und da beide Punktmutationen der Codons 112 (TGC-CGC) und 158 (CGC-TGC) von dem Restriktionsenzym *cfo1* geschnitten werden, wird ausschließlich dieses Enzym für den Nachweis genutzt. Nach der Gelelektrophorese wird die Ethidiumbromidfärbung angewandt.

#### *Durchführung:*

Dafür führt man eine PCR mit den Primern E5 und E13 durch, die diesen Abschnitt amplifiziert. Die Menge des Reaktionsgemisches beträgt 20µl (19µl Mix+1µl DNA), abhängig von der Anzahl der Reaktionsansätze wird der Mastermix angesetzt. Dadurch wird das Pipettieren für jede einzelne Probe erspart. Bei jeder PCR-Reaktion läuft eine DNS-freie Kontrolle mit, um eine eventuelle DNS-Kontamination aufzuzeigen.

#### Mastermix

<i>Aqua dest</i>	13,6µl
<i>10x Puffer mit Mg</i>	2,0µl
<i>DMSO (Dimethyl sulfoxid)</i>	2,0µl
<i>dNTP</i>	0,4µl
<i>Primer E5</i>	0,4µl
<i>Primer E13</i>	0,4µl
<i>Taq</i>	0,2µl

#### *PCR-Zyklen:*

<i>5 Minuten bei 95°C</i>	} 34 Zyklen
<i>1 Minute bei 50°C</i>	
<i>1 Minute bei 72°C</i>	

*Abschließend 5 Minuten bei 72°C*

Von diesem PCR-Produkt werden 5µl zu 1µl *cfo1* Enzym-Puffergemisch (0,5µl Enzym+0,5µl Puffer) pipettiert. Nach 3 Stunden bei 37°C werden die Proben auf ein zuvor vorbereitetes 10%-iges Acrylamid-Gel aufgetragen.

Die Proben laufen bei 30A ca. 20 Minuten und werden dann mittels der Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht.

#### **2.4.8 Apo E Mutation Codon 127 (GGC—GAC)**

Bei einem heterozygoten Träger dieser Mutation, entsteht beim Codon 127 eine neue Schnittstelle für das Restriktionsenzym *taq1*. Diese Mutation ist auf dem Exon 4 lokalisiert, dementsprechend wird die gleiche PCR-Reaktion wie bei der Apo E-Genotypisierung verwendet.

Es werden 5µl des PCR-Produktes und 1µl des Enzym-Puffer-Gemisches (0,5µl Enzym+0,5µl Puffer) in ein Gefäß pipettiert. Dann wird es bei 65°C über Nacht inkubiert. Ein 10%-iges Acrylamid-Gel, daß anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt wird, zeigt das Ergebnis. Ein heterozygoter Träger wird drei Banden, einer der die Mutation nicht trägt, eine einzelne Bande zeigen. Um zu kontrollieren, ob das Enzym verdaut hat, läuft eine Probe mit, welche die Mutation enthält (Positiv-Kontrolle).

Diese Mutation kann auch ohne Verdau mittels der SSCP-Elektrophorese ermittelt werden. Vor dem Auftragen läßt man das 10%-ige Acrylamid-Gel mit Glycerol fünf Minuten vorlaufen. Die eigentliche Laufzeit beträgt bei 30mA 90 Minuten. Mit Hilfe der Silbernitrat-Färbung wird das Ergebnis gezeigt. Auch bei dieser Methode muß eine Positiv-Kontrolle mitlaufen, damit die Laufgeschwindigkeit des mutierten Gens bekannt ist und ein Vergleich bzw. ein Erkennen eines Mutationsträgers möglich ist. Ein Träger wird vier verschiedene Banden, ein Nicht-Träger zwei verschiedene Banden aufweisen.

#### **2.4.9 Apo E2 Codon 146 (TAC-GAC)**

Aufgrund des Basenaustausches entsteht eine neue Schnittstelle für das Restriktionsenzym *cfo1*. Dieses wird bei der Gelelektrophorese (Acrylamidgel ohne Glycerol) mit nachfolgender Ethidiumbromidfärbung anhand des veränderten Bandenmusters deutlich.

#### **2.4.10 Apo E2 Codon 136 (CGC-TGC)**

Der Basenaustausch bewirkt neue Schnittstellen für das Restriktionsenzym *cfo1*. Es wird die gleiche Methode wie oben angewandt. Somit entsteht ein neues Bandenmuster.

### 2.4.11 LPL Deletion 560-564

Die Mutation liegt auf dem LPL-Gen Exon 3. Mit Hilfe der folgenden PCR-Amplifikation wird dieser Abschnitt erfaßt.

#### Mastermix

<i>Aqua dest.</i>	<i>17,8µl</i>
<i>Puffer mit Mg</i>	<i>2,4µl</i>
<i>dNTP</i>	<i>0,5µl</i>
<i>3 F</i>	<i>1µl</i>
<i>3R</i>	<i>1µl</i>
<i>Taq</i>	<i>0,5µl</i>

#### PCR-Zyklen:

<i>5 Minuten bei 95°C</i>	}	<i>33 Zyklen</i>
<i>1 Minute bei 60°C</i>		
<i>1 Minute bei 72°C</i>		

*Abschließend 10 Minuten bei 72°C*

Acrylamid-Gel mit Glycerol: Laufzeit 3Std bei 30mA, Silbernitratfärbung

### 2.4.12 HL-Promoter

Damit wird die Punktmutation im Codon -480 erfaßt.

#### Mastermix

<i>Aqua dest.</i>	<i>16,8µl</i>
<i>Puffer</i>	<i>2,5µl</i>
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	<i>2µl</i>
<i>dNTP</i>	<i>0,6µl</i>
<i>Primer 2</i>	<i>0,8µl</i>
<i>Primer 8</i>	<i>0,8µl</i>
<i>Taq</i>	<i>0,5µl</i>

#### PCR-Zyklen:

<i>5 Minuten bei 95°C</i>	}	<i>33 Zyklen</i>
<i>1 Minute bei 50°C</i>		
<i>1 Minute bei 72°C</i>		

*Abschließend 10 Minuten bei 72°C*

Nach dem Verdau werden die Proben auf ein 10% Acrylamid-Gel aufgetragen und nach ca. 20 minütiger Laufzeit bei 25mA mit Ethidiumbromid gefärbt.

Es ist empfehlenswert, drei Proben -eine Positiv-Kontrolle für TT, eine für CC und eine für CT- mitlaufen zu lassen, um die Proben mit den Kontrollen zu vergleichen.

### 2.4.13 LPL-Polymorphismen

Alle Polymorphismen werden mit Hilfe des 10%-igen Acrylamid-Gel und der nachfolgenden Ethidiumbromid-Färbung gezeigt. Bei jeder PCR läßt man eine Negativ-Kontrolle und die dazugehörige Positiv-Kontrolle mitlaufen.

Immer 9µl des PCR-Produktes werden mit dem jeweiligen Restriktionsenzym über Nacht inkubiert.

#### 2.4.13.1 LPL Promoter (T-93G)

##### Mastermix

<i>Aqua dest.</i>		14,8µl
<i>Puffer mit Mg</i>		2µl
<i>dNTP</i>		0,4µl
<i>Primer</i>	0,8µl	
<i>Primer</i>	0,8µl	
<i>Taq</i>		0,2µl

##### PCR-Zyklen:

<i>5 Minuten bei 95°C</i>	}	33 Zyklen
<i>1 Minute bei 64°C</i>		
<i>1 Minute bei 72°C</i>		
<i>Abschließend 10 Minuten bei 72°C</i>		

Restriktionsenzym: *apaI*

#### 2.4.13.2 D9N

##### Mastermix

<i>Aqua dest.</i>		13,8µl
<i>Puffer mit Mg</i>		2µl
<i>dNTP</i>		0,4µl
<i>Primer</i>	0,8µl	
<i>Primer</i>	0,8µl	
<i>Taq</i>		0,2µl

##### PCR-Zyklen:

<i>5 Minuten bei 95°C</i>	}	33 Zyklen
<i>1 Minute bei 50°C</i>		
<i>1 Minute bei 72°C</i>		
<i>Abschließend 10 Minuten bei 72°C</i>		

Restriktionsenzym: *bclI*

**2.4.13.3 N291S**Mastermix

<i>Aqua dest.</i>		14,8µl
<i>Puffer mit Mg</i>		2µl
<i>dNTP</i>		0,4µl
<i>Primer</i>	0,8µl	
<i>Primer</i>	0,8µl	
<i>Taq</i>		0,2µl

*PCR-Zyklen:*

<i>5 Minuten bei 95°C</i>	}	33 Zyklen
<i>1 Minute bei 50°C</i>		
<i>1 Minute bei 72°C</i>		
<i>Abschließend 10 Minuten bei 72°C</i>		

Restriktionsenzym: *rsal***2.4.13.4 S447X**Mastermix

<i>Aqua dest.</i>		14,8µl
<i>Puffer mit Mg</i>		2µl
<i>dNTP</i>		0,4µl
<i>Primer</i>	0,8µl	
<i>Primer</i>	0,8µl	
<i>Taq</i>		0,2µl

*PCR-Zyklen:*

<i>5 Minuten bei 95°C</i>	}	33 Zyklen
<i>1 Minute bei 50°C</i>		
<i>1 Minute bei 72°C</i>		
<i>Abschließend 10 Minuten bei 72°</i>		

Restriktionsenzym: *mnI1*

### 2.4.14 LPL Exon 7

#### Mastermix

<i>Aqua dest.</i>		14,8µl
<i>Puffer mit Mg</i>		2µl
<i>dNTP</i>		0,4µl
<i>Primer</i>	0,8µl	
<i>Primer</i>	0,8µl	
<i>Taq</i>		0,2µl

#### PCR-Zyklen:

<i>5 Minuten bei 95°C</i>	}	34 Zyklen
<i>1 Minute bei 60°C</i>		
<i>1 Minute bei 72°C</i>		

*Abschließend 10 Minuten bei 72°C*

Dieses PCR-Produkt wurde anschließend sequenziert.

### 2.4.15 LPL Exon 8

#### Mastermix

<i>Aqua dest.</i>		10,8µl
<i>Puffer</i>		2µl
<i>MgCl<sub>2</sub></i>		4,0µl
<i>dNTP</i>		0,4µl
<i>Primer</i>	0,8µl	
<i>Primer</i>	0,8µl	
<i>Taq</i>		0,2µl

#### PCR-Zyklen:

<i>5 Minuten bei 95°C</i>	}	33 Zyklen
<i>1 Minute bei 50°C</i>		
<i>1 Minute bei 72°C</i>		

*Abschließend 10 Minuten bei 72°C*

Dieses PCR-Produkt wurde danach sequenziert.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Familie A (LPL-Deletion 560-564)**

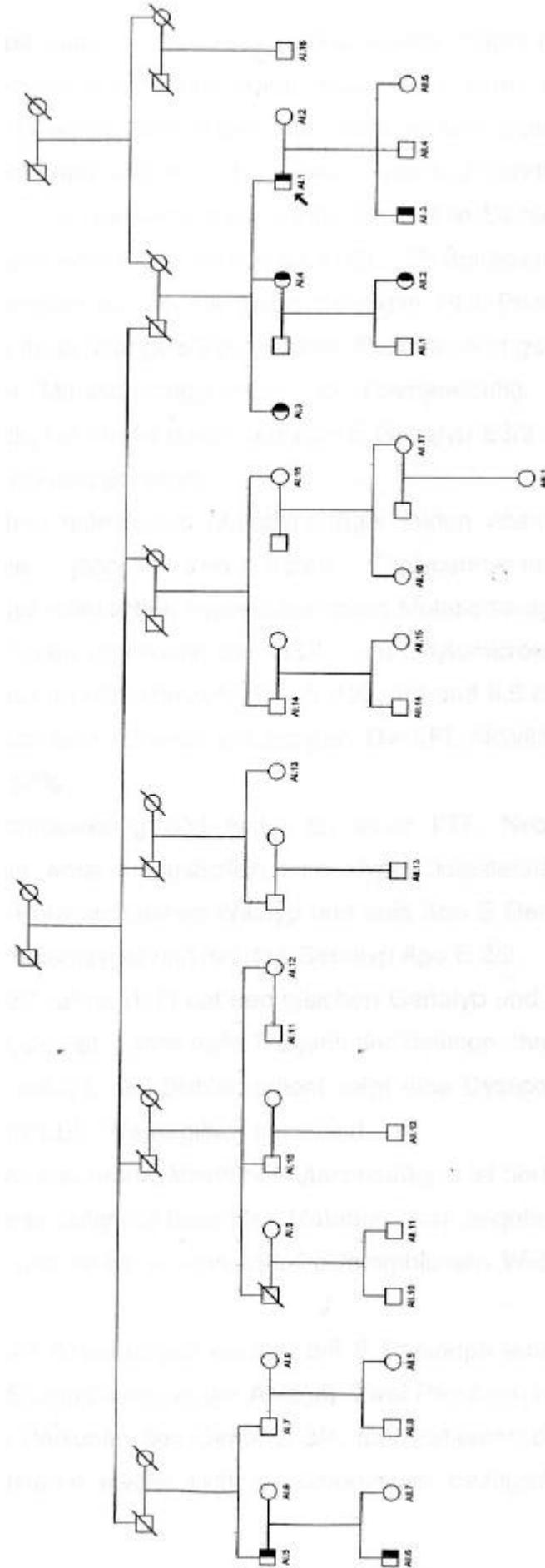
Der Indexpatient (I.1) fiel in der Lipidambulanz mit einem Gesamtcholesterin von 395 mg/dl und Gesamttriglyceride von 1170 mg/dl auf (ohne Diät und Lipidsenker). Der Patient hat Übergewicht, trinkt ca. 2x die Woche Alkohol und leidet an einer eingeschränkten Glucosetoleranz (IGT). Die klinischen Auswirkungen zeigen sich bei ihm in Form einer Koronaren Herzerkrankung, die im Alter von 64 Jahren zu einer Bypassoperation führte.

Unter Therapie (Diät und Lipidil) sanken die Cholesterinwerte auf 228 mg/dl ab.

Der Dichtegradient zeigt eine starke Akkumulation der VLDL- und Chylomicronenremnants. IDL ist ebenso stark vermehrt.

Die genetischen Untersuchungen zeigten eine Deletion auf dem Exon 3 Codon 560-564 des Chromosom 8, p22 Region. Weitere genetische Untersuchungen ergaben, daß der Patient einen Genotyp Apo E 3/3 und Wildtyp aller LPL-Polymorphismen aufweist.

Da die Generation des Vaters des Indexpatienten nicht mehr lebt, wurden die nachfolgenden Generationen untersucht. Von vier Geschwistern des Vaters konnten die Kinder und Enkel rekrutiert werden (siehe Stammbaum 1). Insgesamt ließen sich 33 Personen untersuchen.



Neben dem Indexpatienten wurden noch sechs weitere Träger der LPL-Deletion gefunden: seine beiden Schwestern, seine Nichte, sein Sohn, sein Cousin und dessen Sohn. Bis auf seinen Sohn haben alle Träger erhöhte Lipidwerte.

Die Mutationsträgerinnen leiden unter einer Hypertriglyceridämie, allerdings kommt bei I.3 noch eine Hypercholesterinämie hinzu. Die Dichtegradienten sind gekennzeichnet durch eine Akkumulation im VLDL-, Chylomicronenremnant- und IDL- Bereich, außerdem weisen sie einen niedrigen HDL-Peak auf. Die LPL-Aktivität konnte bei ihnen mangels Post-Heparin-Plasma nicht gemessen werden. Keine von diesen Mutationsträgerinnen ist übergewichtig. Die genetische Untersuchung ergab, bei allen Frauen den Apo E Genotyp E3/3 und LPL-Wildtyp bezüglich der LPL-Polymorphismen.

Die hyperlipämischen männlichen Mutationsträger leiden ebenfalls unter einer Hypertriglyceridämie, jedoch sind deren Triglyceridwerte höher. Die Dichtegradienten der männlichen hyperlipämischen Mutationsträger zeigen einen sehr hohen Peak in den Fraktionen der VLDL- und Chylomicronenremnants und einen niedrigen Peak im HDL-Bereich. Bei I.5 (Cousin) und II.6 (dessen Sohn) ist der LDL Peak jedoch sehr schwach ausgebildet. Die LPL-Aktivität von I.5 beträgt 107% und von II.6 52%.

I.5 (57 J.) ist übergewichtig und leidet an einer IGT. Neben der starken Hypertriglyceridämie weist er zusätzlich eine Hypercholesterinämie auf. Er ist bezüglich der LPL-Polymorphismen Wildtyp und sein Apo E Genotyp ist 2/3. II.6 (30 J.) ist LPL 291 heterozygot und hat den Genotyp Apo E 2/2.

Seine Schwester, 32 Jahre, (II.7) hat den gleichen Genotyp und die gleiche LPL-Variante wie ihr Bruder, ist jedoch nicht Trägerin der Deletion. Ihre Lipidwerte sind nicht pathologisch erhöht, der Dichtegradient zeigt eine Dyslipoproteinämie, bei der die HDL- und die LDL- Werte gleich hoch sind.

II.3, 36 Jahre, (Sohn des Indexpatienten, Mutationsträger) ist normolipämisch, der Dichtegradient konnte aufgrund fehlenden Materials nicht angefertigt werden. Der Genotyp ist E3/3, und er ist in allen LPL-Polymorphismen Wildtyp. Er ist nicht übergewichtig.

Von den übrigen 27 Angehörigen wurden bei 9 Personen eine Hyperlipidämie festgestellt (siehe Stammbäume in der Anlage). Zwei Personen haben den Apo E Genotyp 2/3, zwei Personen den Genotyp 3/4, fünf Patienten den Genotyp 3/3, einer von den letzteren erwies sich als heterozygot bezüglich des 291-LPL-

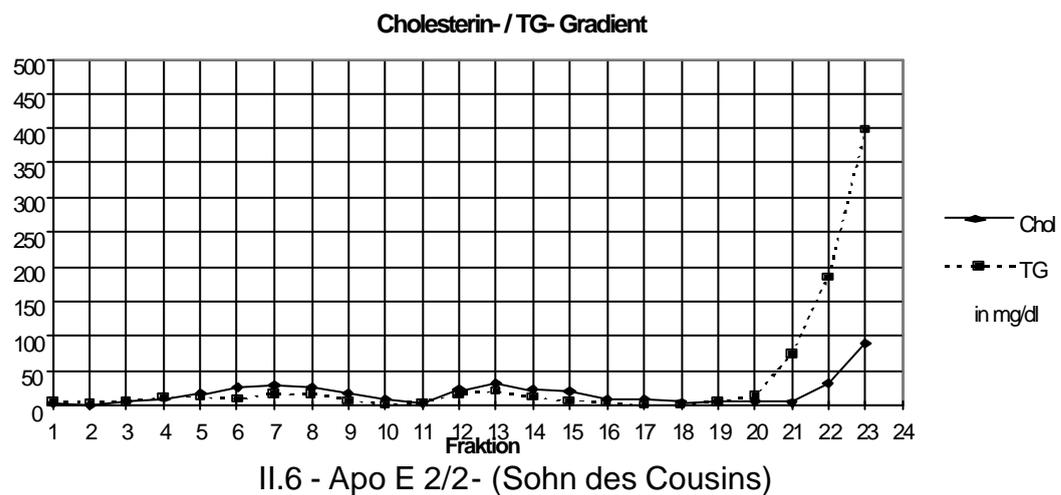
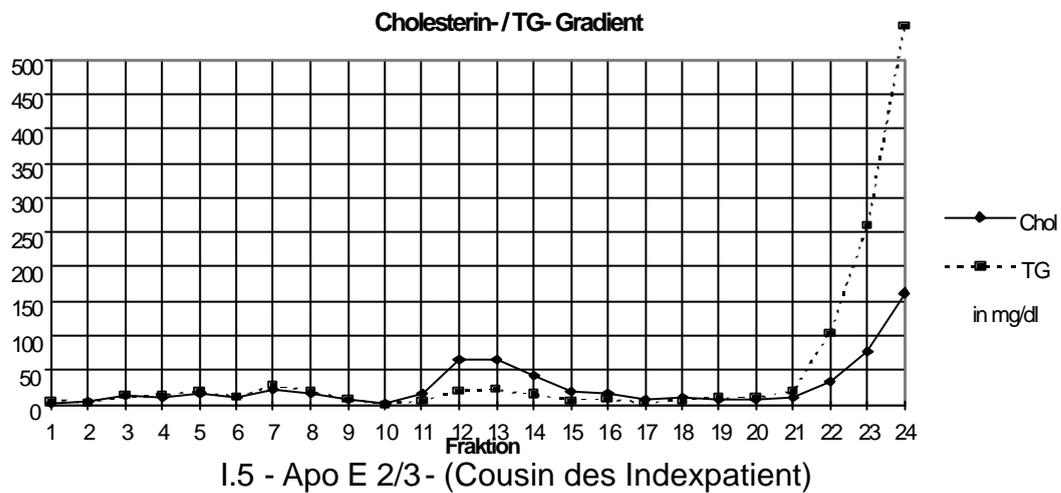
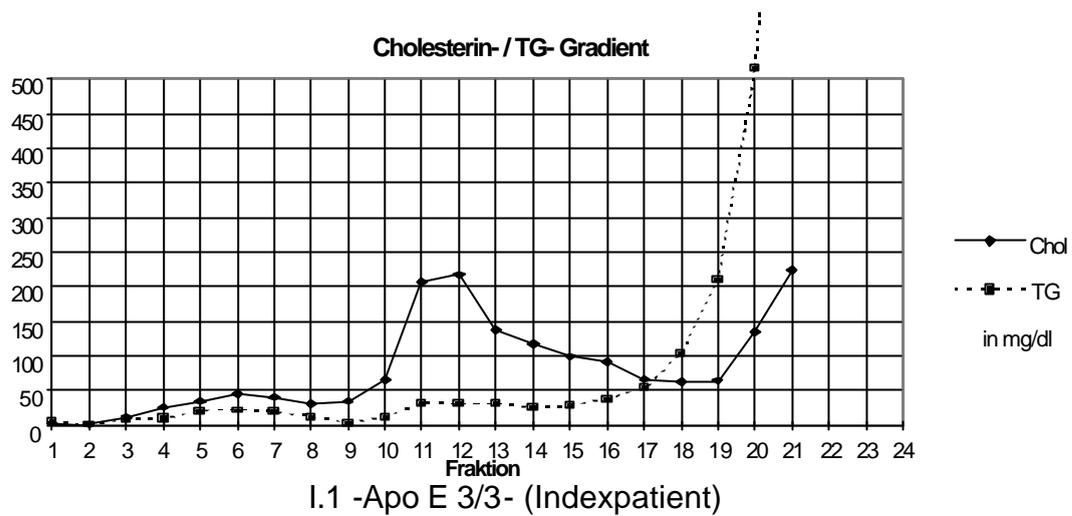
Polymorphismus. Fünf Personen leiden unter Übergewicht, zwei von diesen sind starke Raucher und trinken regelmäßig Alkohol. Ein Verwandter leidet an einem Diabetes Mellitus. Demzufolge wurden von diesen 9 Personen bei 7 Personen exogene Faktoren gefunden.

In der folgenden Tabelle sind einige Fakten in der Übersicht dargestellt, in der Anlage ist die vollständige Tabelle aufgelistet, außerdem sind dort die Stammbäume thematisch, zur graphischen Veranschaulichung der Zusammenhänge dargestellt.

## Familie A

A	m/w	Alter	Chol	TG	Apo E	LPLdel	HL	BMI
I.1	m	63	395	1170	3/3	pos	CC	30
I.3	w	61	256	389	3/3	pos	CC	20
I.4	w	58	218	173	3/4	pos	CT	19
I.5	m	57	394	1236	2/3	pos	CC	32
II.2	w	30	214	213	3/3	pos	TT	22
II.3	m	36	216	113	3/3	pos	CC	26
II.6	m	30	207	580	2/2	pos	CC	21
I.2	w	59	249	328	3/3	neg	CC	31
I.6	w	53	185	89	2/2	neg	CC	31
I.7	m	55	212	248	2/3	neg	CC	24
I.8	w	51	312	98	3/4	neg	CC	17
I.9	w	62	186	91	3/3	neg	CC	26
I.10	m	56	256	343	3/3	neg	CT	28
I.11	m	68	202	169	2/3	neg	CT	26
I.12	w	61	201	103	3/3	neg	CC	27
I.13	w	70	258	108	3/3	neg	CT	23
I.14	m	52	220	220	3/3	neg	CC	25
I.15	w	66	208	99	2/3	neg		26
I.16	m	66	187	194	3/4	neg	TT	34
II.1	m	27	165	131	3/3	neg	CT	
II.4	m	28	201	101	3/3	neg	CC	23
II.5	w	32	203	133	3/3	neg	CC	21
II.7	w	32	147	111	2/2	neg	CC	31
II.8	m	33	221	78	2/3	neg	CC	17
II.9	w	31	171	109	2/3	neg	CC	22
II.10	m	40	232	81	3/3	neg	CC	30
II.11	m	38	199	124	3/3	neg	CC	25
II.12	m	31	211	70	3/3	neg	CC	23
II.13	m	38	212	112	3/4	neg	CC	25
II.14	m	22	186	137	3/4	neg	CT	22
II.15	w	25	182	128	3/3	neg	CC	20
II.16	w	46	185	158	2/3	neg	CC	27
II.17	w	38	158	83	2/2	neg	CC	26
III.1	w	8	140	56	2/3	neg	CT	17

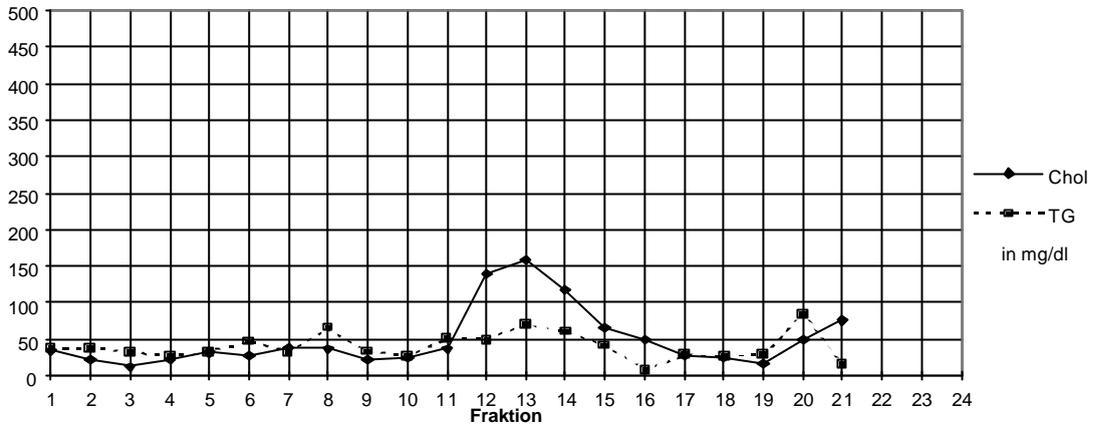
## Mutationsträger (männlich, Familie A)



Der Gradient des Indexpatienten zeichnet sich durch eine starke Akkumulation im IDL und VLDL, Chylomicronenremnantbereich aus. Der LDL Peak ist ausgeprägt, während sich die beiden anderen Gradienten durch einen schmalen HDL- und LDL-Peak kennzeichnen. Beide weisen die gleiche Akkumulation im Bereich der VLDL- und CR auf.

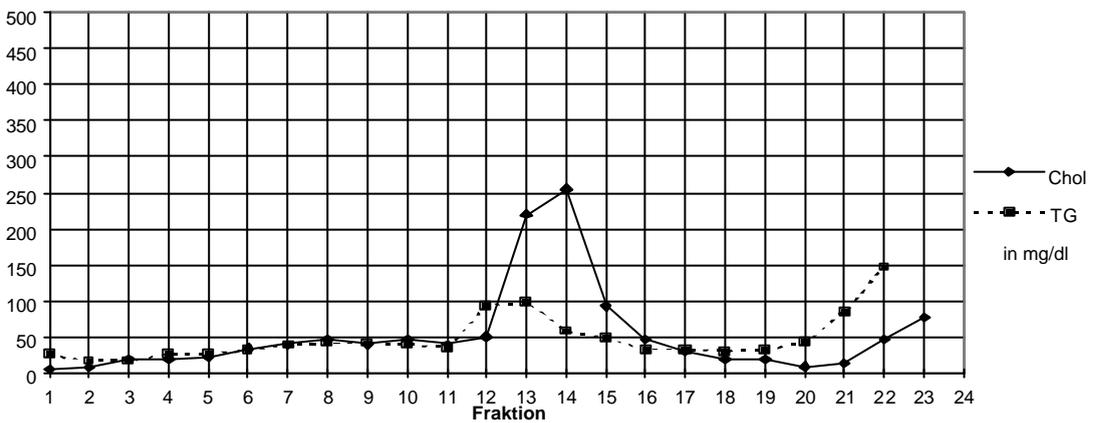
## Mutationsträger (weiblich, Familie A)

### Cholesterin- / TG- Gradient



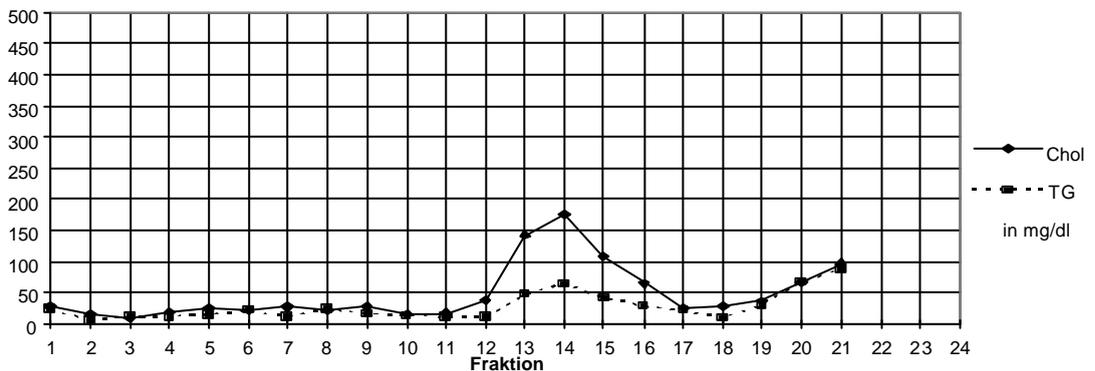
### I.3 - Apo E 3/3 - (Schwester)

### Cholesterin- / TG- Gradient



### I.4 - Apo E 3/4 - (Schwester)

### Cholesterin- / TG- Gradient

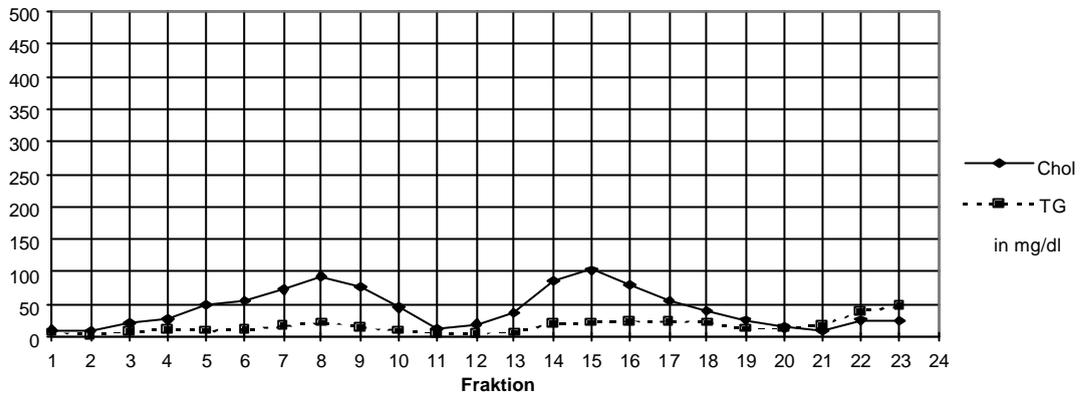


### II.2 - Apo E 3/3 - (Nichte)

Gemeinsamkeiten dieser Dichtegradienten bestehen in der Akkumulation im VLDL-CR-Bereich und in dem niedrigen HDL-Peak. Der LDL-Peak ist vorhanden, aber nicht stark ausgeprägt und abgerundet, es existiert viel IDL.

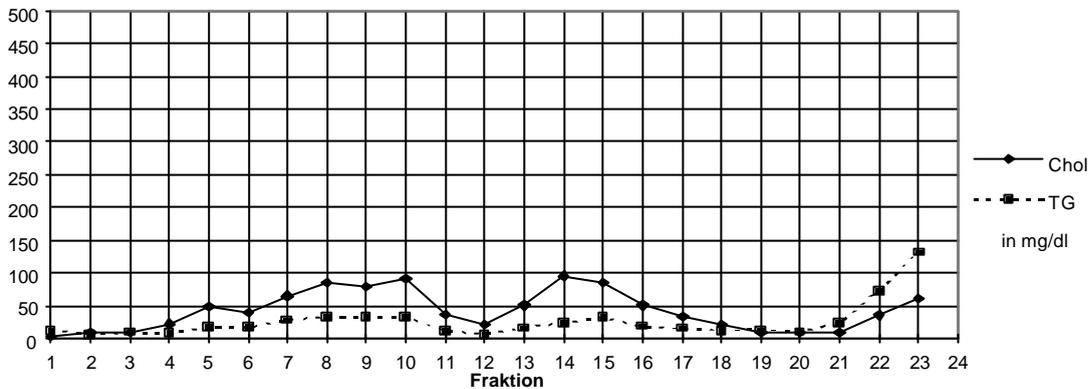
## Personen mit Apo E2/2

### Cholesterin- / TG- Gradient



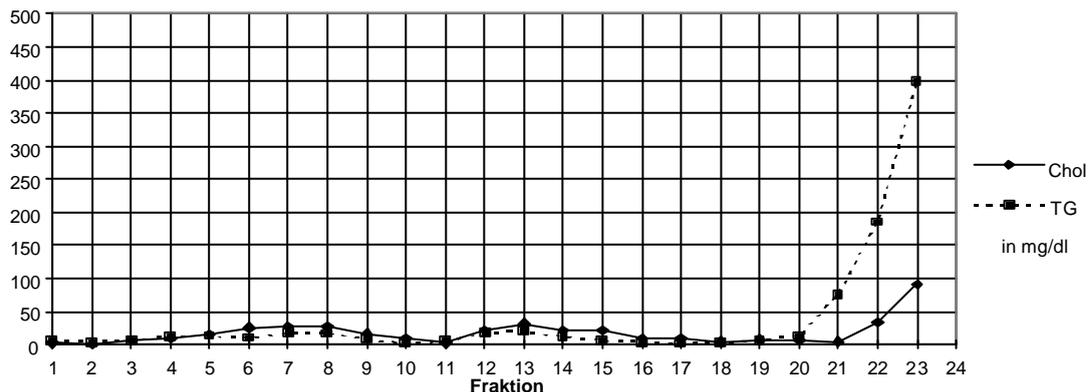
II.17 Apo E 2/2

### Cholesterin- / TG- Gradient



II.7 Apo E2/2, LPL 291 heterozygot

### Cholesterin- / TG- Gradient



II.6 Apo E2/2, LPL 291 heterozygot, LPL-Del560-564

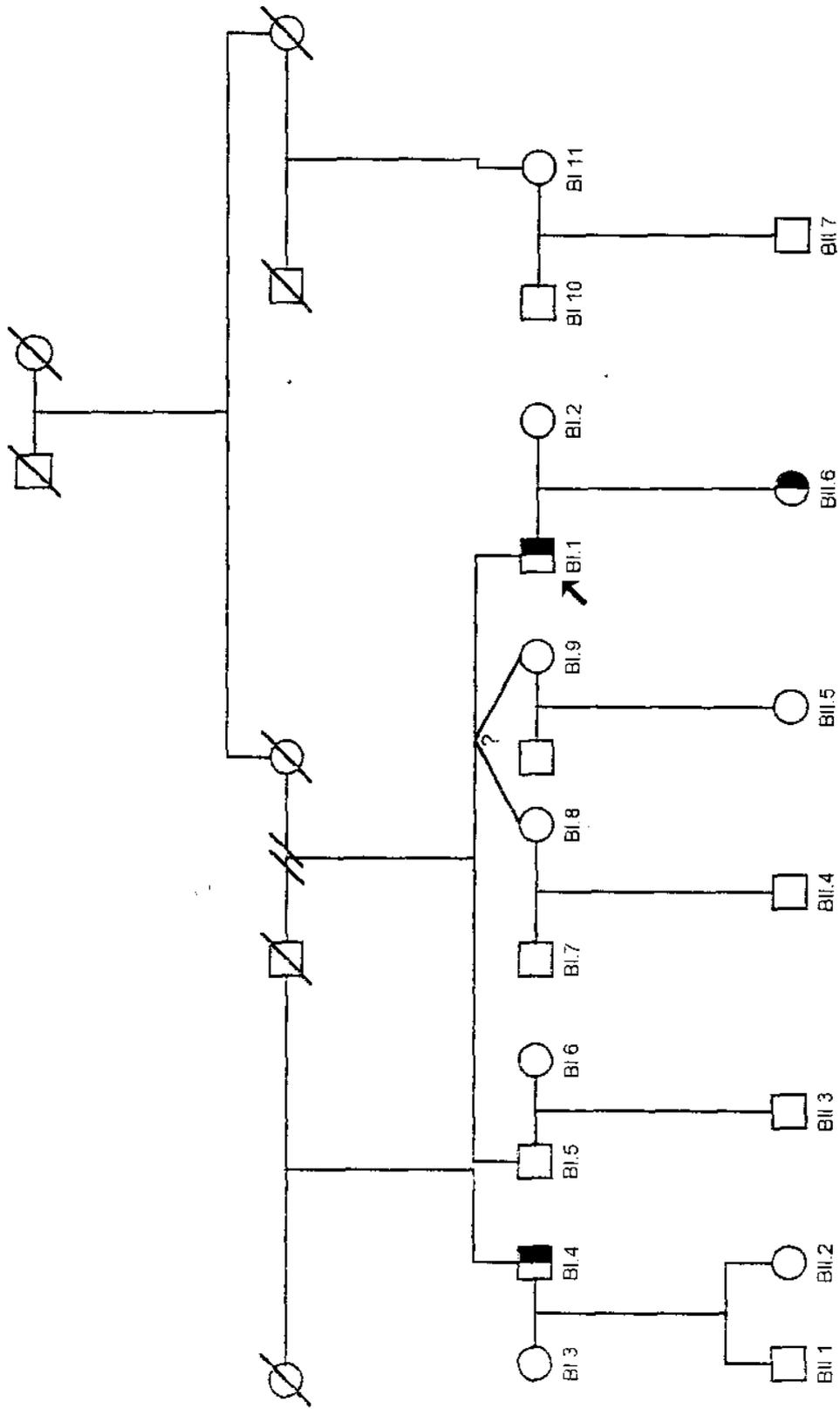
Gemeinsamkeit dieser Dichtegradienten liegt in den gleich hohen Peaks von HDL und LDL. Unterschiede bestehen darin, daß II.17 keine Remnant Akkumulation zeigt, während sie bei II.7 vorhanden ist und sich bei II.6 stark zeigt. Zusätzlich hat II.6 sehr niedrige HDL- und LDL-Peaks.

### 3.2 Familie B (Apo E gly127asp)

Der 57-jährige Indexpatient kam mit einer Hypertriglyceridämie in die Lipidambulanz des UKE. Die klinische Untersuchung ergab, daß der Patient Übergewicht hat und unter einer IGT leidet. Er raucht nicht und trinkt nur gelegentlich Alkohol. Der Patient hat schon zwei Herzinfarkte erlitten. Ohne Therapie lagen die Werte bei 261mg/dl Gesamtcholesterin und 239 mg/dl Gesamttriglyceride, unter Therapie mit Lipidil und Diät haben sich die Werte auf 168mg/dl Gesamtcholesterin und 125mg/dl Triglyceride gesenkt. Der Dichtegradient zeigt eine Akkumulation im IDL und VLDL/Chylomicronen-Remnant-Bereich. Die Apo E-Phänotypisierung ergab einen Apo E Typ 1/3, während die Apo E Genotypisierung 2/3 als Ergebnis hatte.

Aufgrund dieser Differenz wurde dieser Abschnitt sequenziert, und es zeigt sich ein Basenaustausch des Codon 127 (gly127asp). Die genetische Untersuchung der LPL-Polymorphismen zeigte in den vier Fällen nur Wildtypen.

Bei der darauffolgenden Familienuntersuchung wurden die Geschwister, der Halbbruder und die Cousine und deren Kinder rekrutiert.



Von den 17 untersuchten Angehörigen wurden zwei weitere Personen mit der Apo E 127-er Mutation gefunden: die Tochter (II.6) des Indexpatienten und sein Halbbruder (I.4). II.6 (36 J.) hat keine erhöhten Lipidwerte, und I.4 (61J.) hat leicht erhöhte Cholesterinwerte. Die Dichtegradienten sind gekennzeichnet durch normal hohe HDL-Werte und einer Akkumulation der IDL-Fraktionen und der VLDL- und Chylomicronenremnants-Fraktion, beide weisen eine Dyslipoproteinämie auf.

Weder II.6 noch I.4 leiden unter Übergewicht oder IGT, beide rauchen.

Von den übrigen 15 Personen leiden 9 unter erhöhten Lipidwerten.

Darunter sind die drei Geschwister des Indexpatienten, deren Hypercholesterinämie im Dichtegradienten als hoher LDL-Peak sichtbar wird. Es zeigt sich eine geringe Akkumulation im Bereich der VLDL- und Chylomicronenremnants. Der Dichtegradient des Bruders (I.5) hat eine geringere Höhe als der der Schwestern (I.8 und I.9). Diese sind übergewichtig (ohne IGT) und alle drei leiden unter einer KHK.

Unter den hyperlipämischen Personen sind drei Diabetiker, von ihnen hat I.3 einen Diabetes Typ I mit leicht erhöhten Triglyceridwerten. I.6 mit der Diagnose Diabetes Typ II ist ebenfalls hypertriglyceridämisch, während II.2 mit einer IGT hypercholesterinämisch ist. Sowohl I.6 als auch II.2 sind übergewichtig. Bei den Dichtegradienten dieser drei Personen werden eine geringe Akkumulation von Triglyceriden im VLDL-Chylomicronen-Remnant-Bereich festgestellt.

Es existiert keine Korrelation zwischen der Schilddrüsenerkrankung und den Lipidwerten. Siehe Stammbäume in der Anlage

Alle Angehörigen mit erhöhten Triglyceridwerten sind übergewichtig.

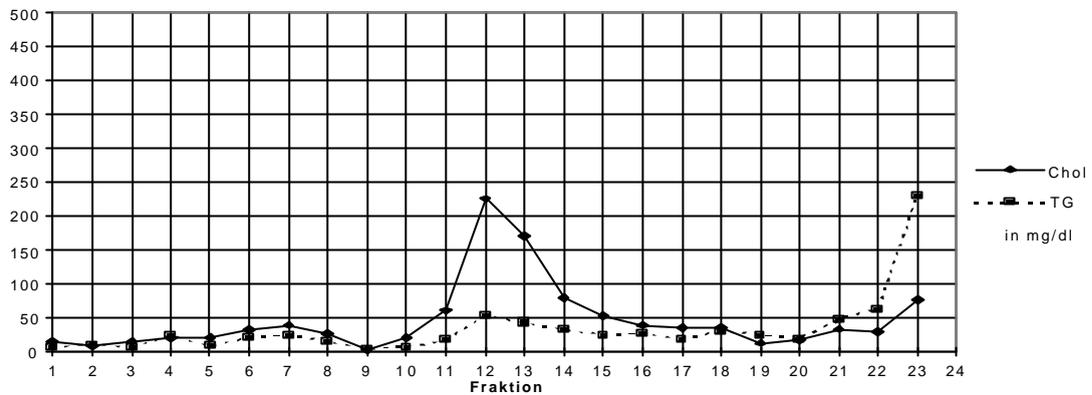
Bei der genetischen Untersuchung der Angehörigen wurden sieben Personen mit dem Apo E Genotypen 3/4 und acht Personen mit dem Apo E Genotypen 3/3 gefunden. Es ist kein Zusammenhang mit den Lipidwerten ersichtlich. Die Untersuchung der LPL- und HL-Polymorphismen erwies alle als Wildtypen bis auf I.7, der heterozygot bezüglich der LPL447-Variante ist, er hat keine erhöhten Lipidwerte, aber einen hohen HDL-Wert.

**Familie B**

<b>Fam. B</b>	<b>m/w</b>	<b>Alter</b>	<b>Chol</b>	<b>TG</b>	<b>E Ph.</b>	<b>E Gen.</b>	<b>BMI</b>
I.1	m	57	261	239	1/3	2/3	29
II.6	w	36	173	132	1/3	2/3	21
I.4	m	69	221	99	1/3	2/3	23
I.2	w	61	221	107	4/4	3/4	30
I.3	w	69	129	161	3/4	3/4	33
I.5	m	62	227	160	3/3	3/3	28
I.6	w	61	197	223	3/3	3/3	35
I.7	m	56	201	73	3/4	3/4	24
I.8	w	49	268	156	2/3	3/3	25
I.9	w	49	270	151	3/3	3/3	26
I.10	m	48	192	89	3/3	3/3	24
I.11	w	44	199	72	3/3(2)	3/3	23
II.1	m	46	221	138	3/4	3/4	27
II.2	w	43	242	130	3/4	3/4	/
II.3	m	21	215	196	3/3	3/3	27
II.4	m	31	137	98	3/4	3/4	25
II.5	w	30	234	48	3/4	3/4	20
II.7	m	15	125	49	3/3	3/3	22

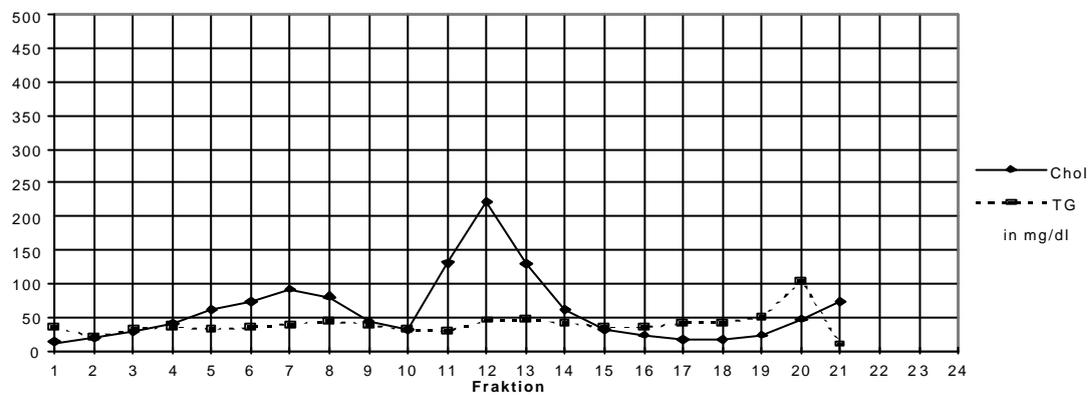
## Heterozygote Träger der Apo E gly127Asp Mutation der Familie B

Cholesterin- / TG- Gradient



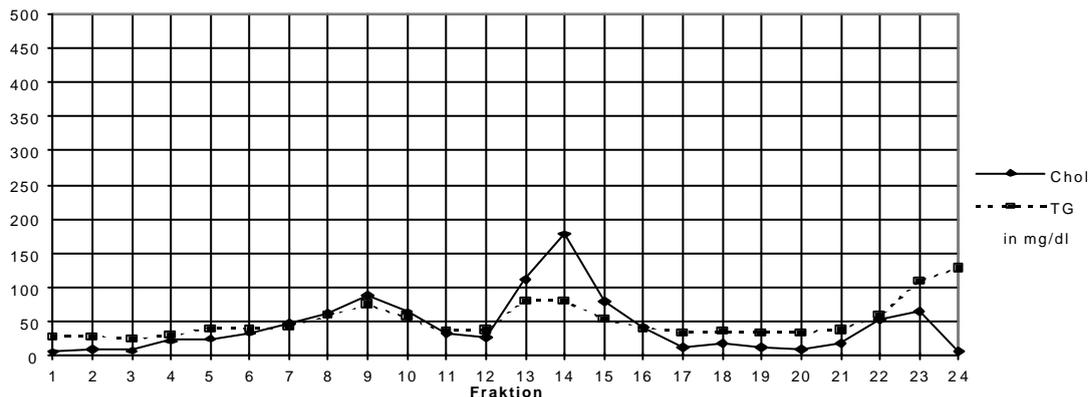
I.1 Apo E 2/3 (1/3)(Indexpatient)

Cholesterin- / TG- Gradient



I.4 Apo E 2/3 (1/3)(Halbbruder)

Cholesterin- / TG- Gradient

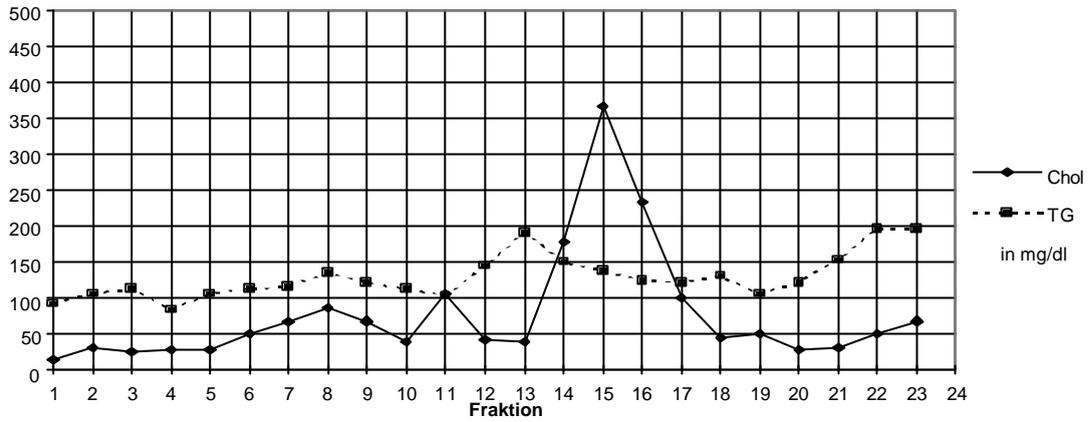


II.6 Apo E 2/3 (1/3)(Tochter)

Bei dem Indexpatienten wird ein niedriger HDL-Peak, ein erhöhter VLDL bzw. CR-Peak und eine Akkumulation der IDL gefunden. Der Dichtegradient von I.4 erscheint bis auf eine geringe Akkumulation in den Fraktionen mit geringer Dichte normal, ebenso wie der von II.1.

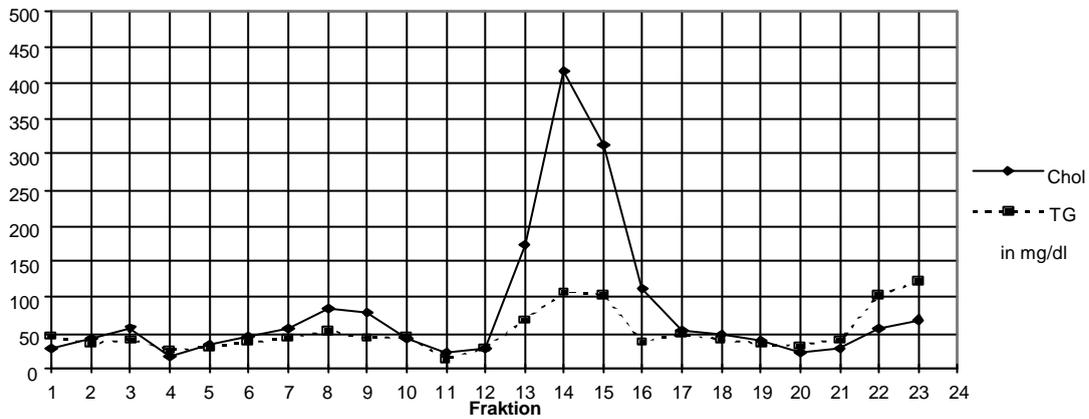
## Geschwister des Indexpatienten (Familie B)

### Cholesterin- / TG- Gradient



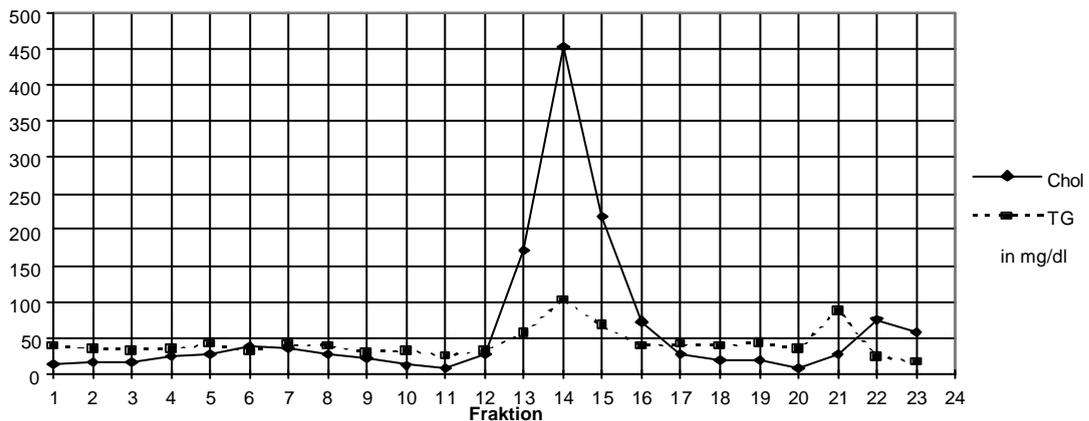
I.9 Apo E 3/3 (Schwester)

### Cholesterin- / TG- Gradient



I.8 Apo E 3/3 (Schwester)

### Cholesterin- / TG- Gradient

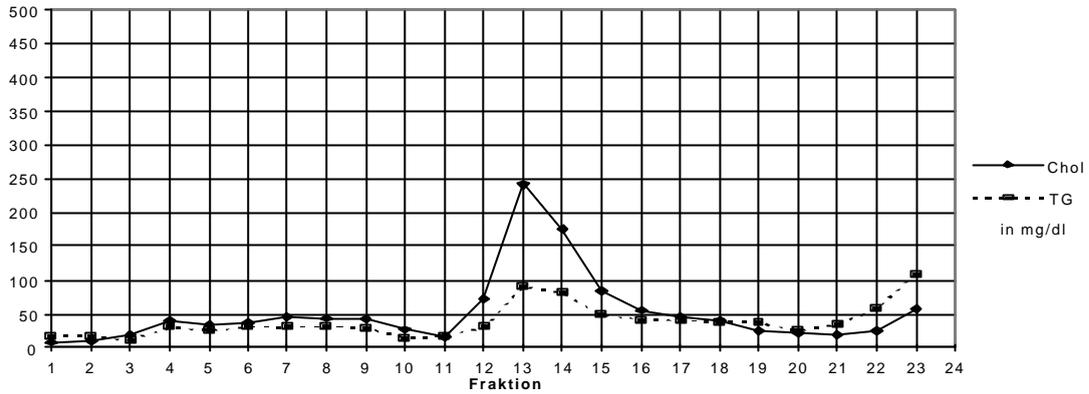


I.5 Apo E 3/3 (Bruder)

Alle Dichtegradienten weisen einen hohen LDL-Peak und eine geringe Akkumulation im VLDL- CR- Bereich auf. Die beiden Schwestern haben einen höheren HDL-Peak als der Bruder. I.9 zeigt erhöhte Werte, bei ihr mußte das Serum aufgrund der gering vorhandenen Menge stark verdünnt werden.

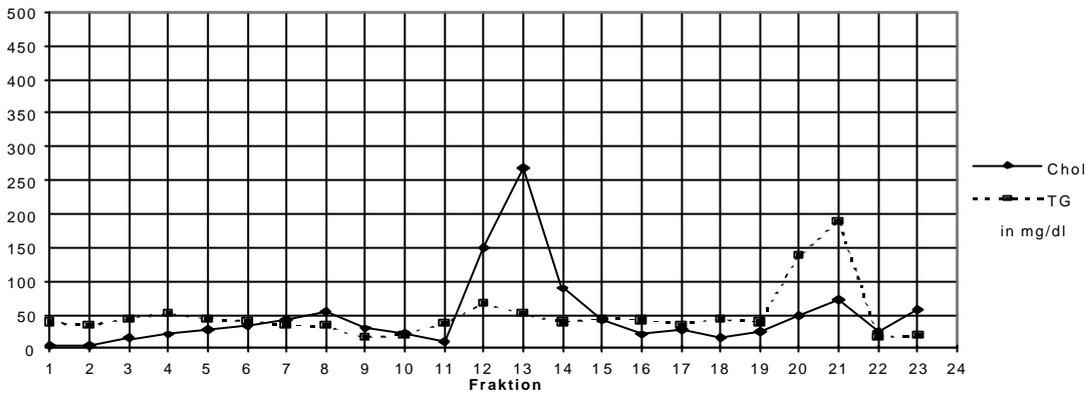
## Diabetiker der Familie B

### Cholesterin- / TG- Gradient



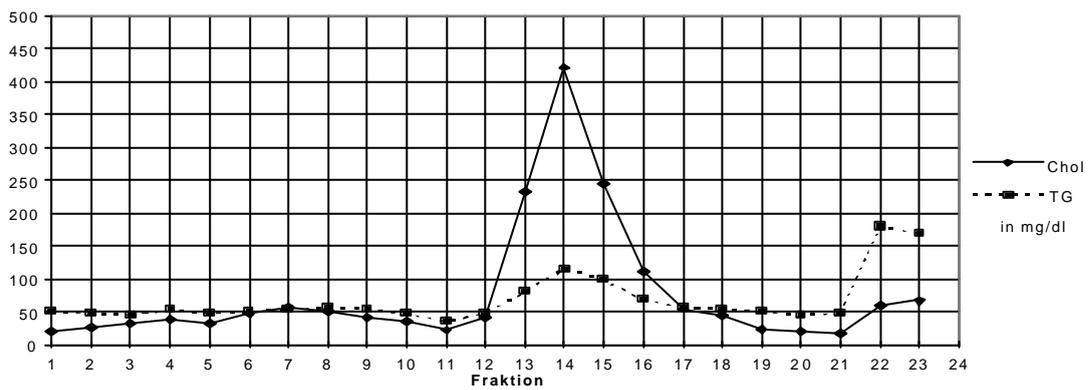
I.3 Apo E 3/4 (Ehefrau des Halbbruders, Typ I)

### Cholesterin- / TG- Gradient



I.6 Apo E 3/3 (Ehefrau des Bruders, Typ II)

### Cholesterin- / TG- Gradient



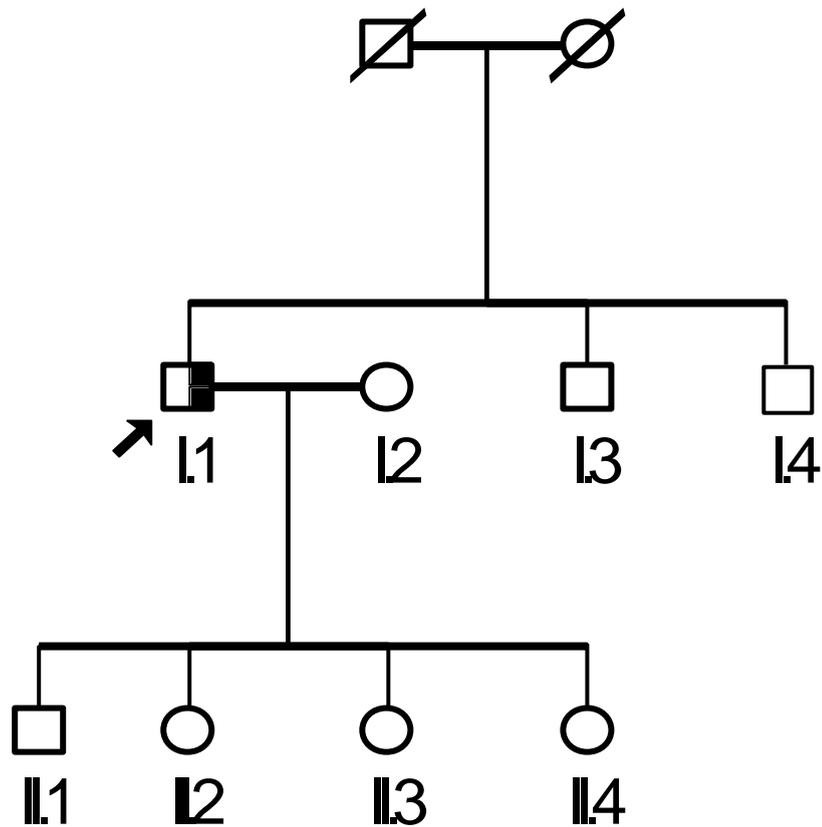
II.2 Apo E 3/4 (Sohn des Halbbruders, IGT)

I.3 weist niedriges HDL, erhöhtes IDL und eine geringe Akkumulation im VLDL-Chylomicronen-Bereich auf. I.6 zeigt niedriges HDL, normales LDL und einen nicht erklärbaren Peak vor dem VLDL-Chylomicronen-Bereich. II.2 hat hohes LDL und einen Peak im VLDL-Chylomicronenremnant-Bereich.

### **3.3 Familie C (Apo E Mutation Lys 146 Glu)**

Die ersten in der Lipidambulanz gemessenen Werte des 62-jährigen Indexpatienten betragen 305 mg/dl Gesamttriglyceride und 365 mg/dl Gesamtcholesterin. Er leidet unter einer IGT, bei einem BMI von 27, er hat aber bisher keine symptomatischen Gefäßveränderungen. Er rauchte früher 20 Zigaretten am Tag, und er trinkt gelegentlich Alkohol. Er weist den Apo E-Phänotyp 2/3 und den Genotyp 3/3 auf. Eine genauere genetische Untersuchung ergab, daß der Indexpatient die Apo E Mutation Lys146Glu trägt. Der Dichtegradient zeigt vermehrt IDL und eine Akkumulation im Bereich der Lipoproteine mit geringer Dichte (Chylomicronen und VLDL). Als Therapie wurde lange Zeit Diät allein eingesetzt, seit kurzer Zeit nimmt er Lipidil.

Von dieser Familie wurden die beiden Geschwister und die vier Kinder des Indexpatienten rekrutiert. Bis auf den Bruder wurden alle Verwandten sowohl serologisch als auch genetisch untersucht. Bei dem Bruder war nur Serum vorhanden, der Buffy Coat fehlte.



Es fanden sich neben dem Indexpatienten keine weiteren Mutationsträger. Nur der Apo E Phänotyp des Bruders ist mit dem des Indexpatienten gleich (2/3)., Aufgrund des fehlenden Buffycoats konnte jedoch der Genotyp nicht überprüft werden. Weitere verfügbare Daten über den Bruder sind die erhöhten Lipidwerte, sowohl das Gesamtcholesterin (402mg/dl) als auch die Gesamttriglyceride (287mg/dl). Er hat im Gegensatz zum Indexpatienten kein Übergewicht und keine IGT.

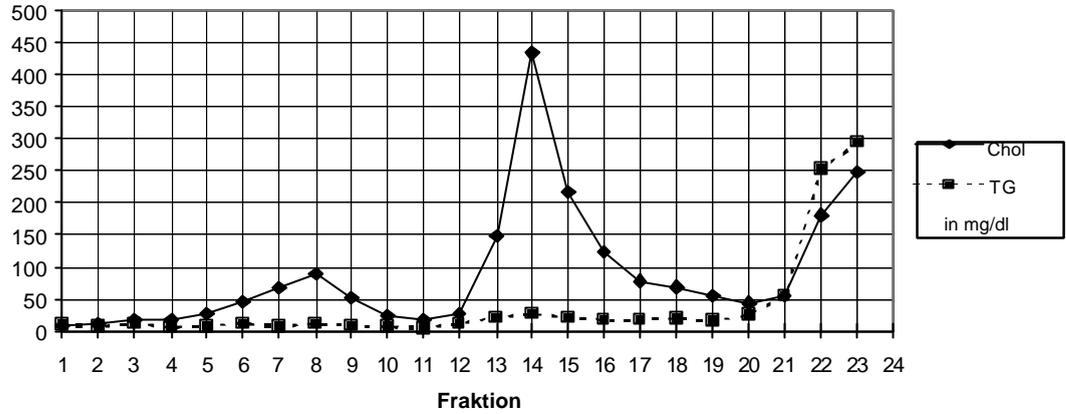
Die genetische Untersuchung der anderen Angehörigen zeigte, daß alle Personen in dieser Familie Wildtyp bezüglich der vier LPL-Polymorphismen sind. Die serologische Untersuchung ergibt, daß die Ehefrau und drei seiner Kinder unter einer Hypercholesterinämie leiden. Der Dichtegradient der Ehefrau und der Tochter (I.2, II.3) sind abgebildet, sie zeigen beide erhöhtes LDL mit IDL. Beide Frauen sind übergewichtig, II.3 raucht 12 Zigaretten am Tag. II.2 hat erhöhtes Cholesterin, kein Übergewicht und raucht nicht. Die jüngste Tochter, die übergewichtig ist und 15 Zigaretten am Tag raucht (II.4, 24 J.), hat keine erhöhten Werte.

**Familie C**

<b>Fam C</b>	<b>m/w</b>	<b>Alter</b>	<b>Chol</b>	<b>TG</b>	<b>E Ph</b>	<b>E Gen</b>	<b>145</b>	<b>BMI</b>
I.1	M	62	365	305	2/3(1)	3/3	pos.	27
I.2	W	62	297	161	$\frac{3}{4}$	3/4	neg.	31
I.3	M	56	402	287	2/3	?	neg.	23
I.4	W	60	211	125	3/3	3/3	neg.	20
II.1	M	33	257	203	$\frac{3}{4}$	3/4	neg.	n.b.
II.2	W	36	277	146	3/3	3/3	neg.	21
II.3	W	28	251	156	$\frac{3}{4}$	3/4	neg.	29
II.4	W	24	211	142	3/3	3/3	neg.	27

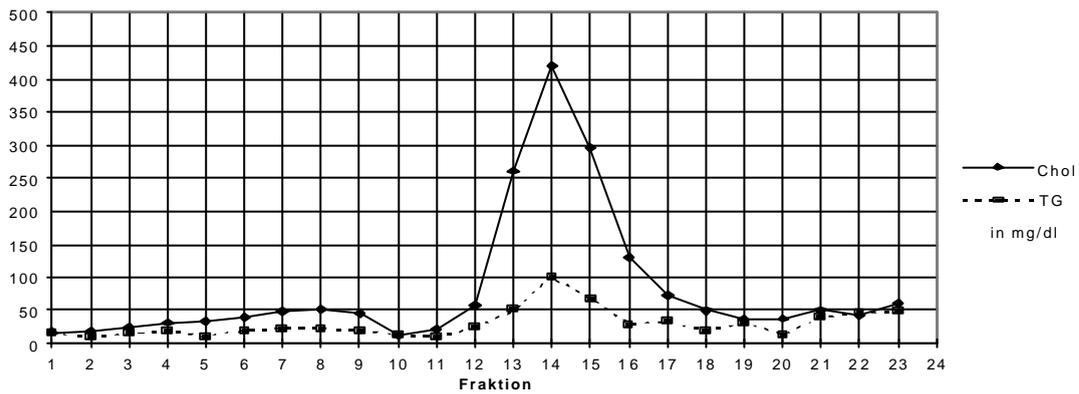
## Familie C

### Cholesterin- / TG- Gradient



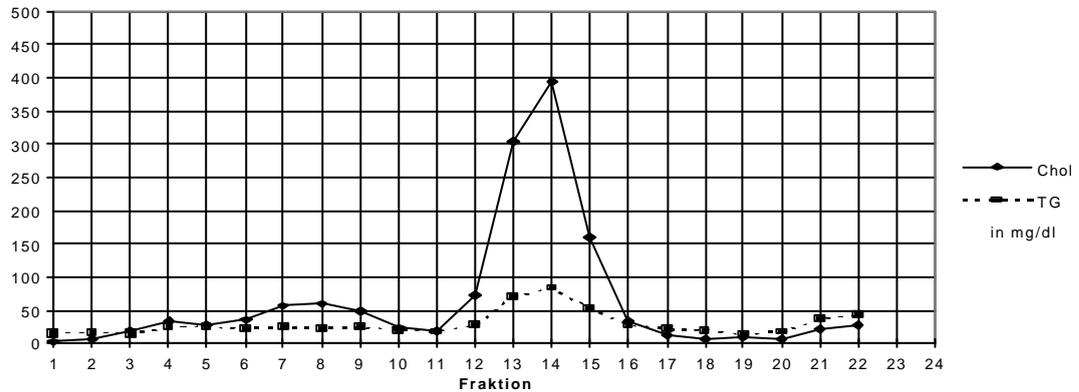
### I.1 Apo E 3/3 (2/3)(Indexpatient)

#### Cholesterin- / TG- Gradient



### I.2 Apo E 3/4 (Ehefrau)

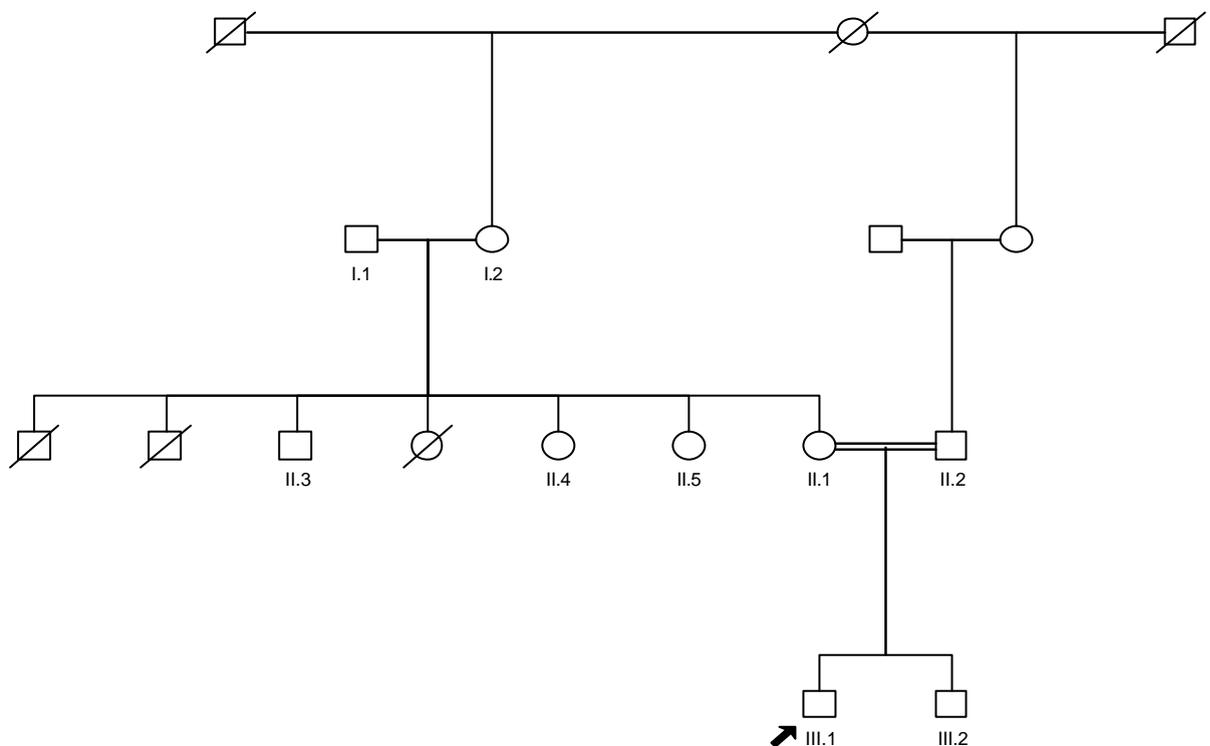
#### Cholesterin- / TG- Gradient



### II.3 Apo E 3/4 (Tochter)

### 3.4 Familie D (unbekannte Mutation)

Der 11-jährige Indexpatient weist eine massive Hypertriglyceridämie auf. Ihm wurde eine Hyperlipidämie Typ I nach Frederickson diagnostiziert, die nur schwer mit Diät und Lipidsenkern therapierbar ist. Seine LPL-Aktivität ist stark erniedrigt, das LPL-Gen wurde sequenziert, es wurden jedoch keine Mutationen gefunden. Die Apo E Masse ist stark erhöht. Dabei ist jedoch das Apo B bis unter die Nachweisgrenze erniedrigt. Der Dichtegradient zeigt niedriges HDL und LDL, aber eine Akkumulation im Bereich der Chylomicronen/VLDL-Remnants. Er hat schon mehrere Pankreatitiden hinter sich.



Die Eltern des Patienten haben das Verhältnis Cousin/Cousine. Die Großmutter mütterlicherseits hat sieben Kinder geboren, davon sind jedoch drei Kinder im Säuglingsalter gestorben.

In der Familie sind neben dem Indexpatienten noch vier weitere Personen hyperlipämisch. Der Bruder und der Vater des Indexpatienten hingegen sind gesund. Von den Großeltern und der Mutter wurden die Werte unter Lipidsenkern erstellt. Der Dichtegradient der Mutter zeigt niedriges HDL und LDL, aber sehr hohe Cholesterin- und Triglyceridwerte in den Fraktionen der VLDL- und Chylomicronenremnants. Die Großeltern haben ebenfalls einen niedrigen HDL-

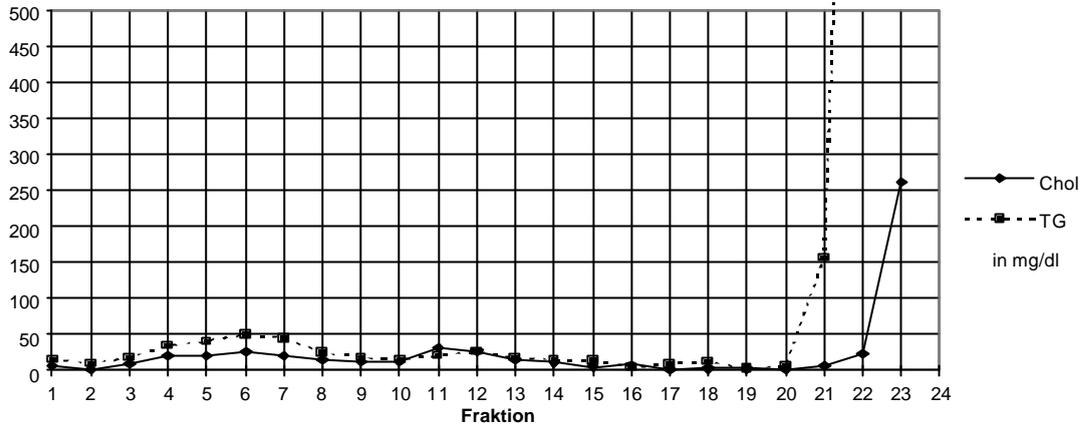
Peak, der LDL-Peak ist jedoch ausgeprägter. Die Apo E Genotypen 3/3 und 3/4 sind in der Familie vertreten, es ist keine Korrelation zwischen den Werten und dem Genotyp erkennbar. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der PCR der LPL-Polymorphismen konnten nicht alle bestimmt werden. Bisher wurden nur Wildtypen gefunden (siehe Tabelle). In Bezug auf die exogenen Risikofaktoren wird Übergewicht bei den Großeltern und der Mutter gefunden. Der Großvater und die Eltern des Indexpatienten sind starke Raucher.

### Familie D

Fam D	m/w	Alter	Chol	TG	Apo E	Apo B	LPL	BMI
III.1	m	11	118	673	3/3	<35	32%	
I.1	m	58	152	83	3/3	85	94%	29
I.2	w	54	172	266	3/4	94	53%	31
II.1	w	35	185	237	3/3	102	106%	31
II.2	m	35	197	89	3/3	91	41%	21
II.3	m	20	151	125	3/3	74	/	n.b.
II.4	w	22	200	119	3/4	91	/	n.b.
II.5	w	31	245	142	3/4	130	/	n.b.
III.2	m	9	154	94	3/3	70	56%	n.b.

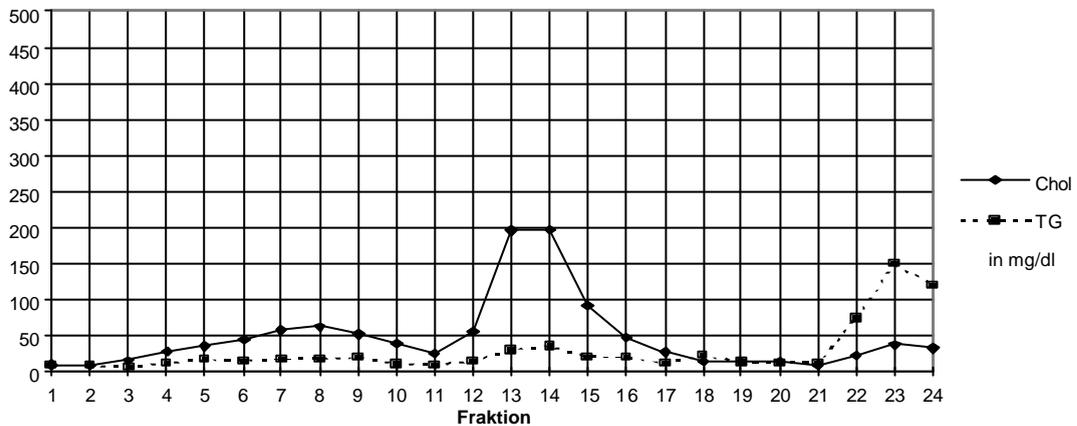
## Familie D

### Cholesterin- / TG- Gradient



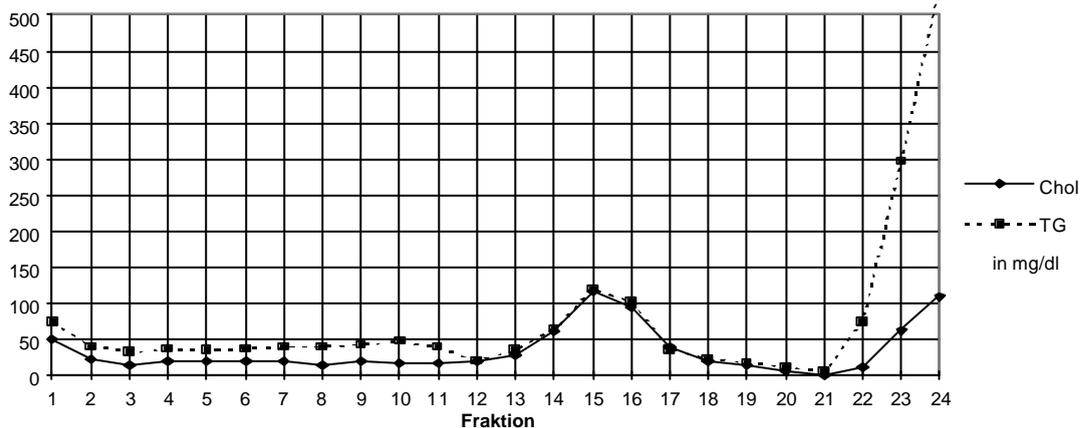
### III.1 Apo E 3/3 (Indexpatient)

### Cholesterin- / TG- Gradient



### III.2 Apo E 3/3 (Bruder)

### Cholesterin- / TG- Gradient

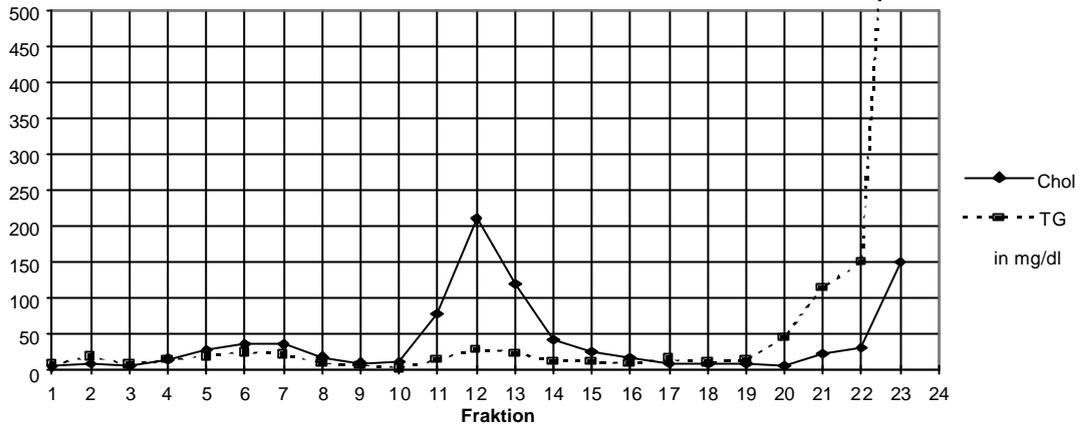


### II.1 Apo E 3/3 (Mutter)

Der Indexpatient hat einen niedrigen HDL-Peak, keinen LDL-Peak und einen sehr hohen Remnant-Peak, während der Bruder bis auf eine Akkumulation im Remnant-Bereich einen normalen Dichtegradienten aufweist. Die Mutter hat kaum HDL, nur einen geringen LDL-Peak und einen ähnlich stark erhöhten Peak im VLDL-CR-Bereich.

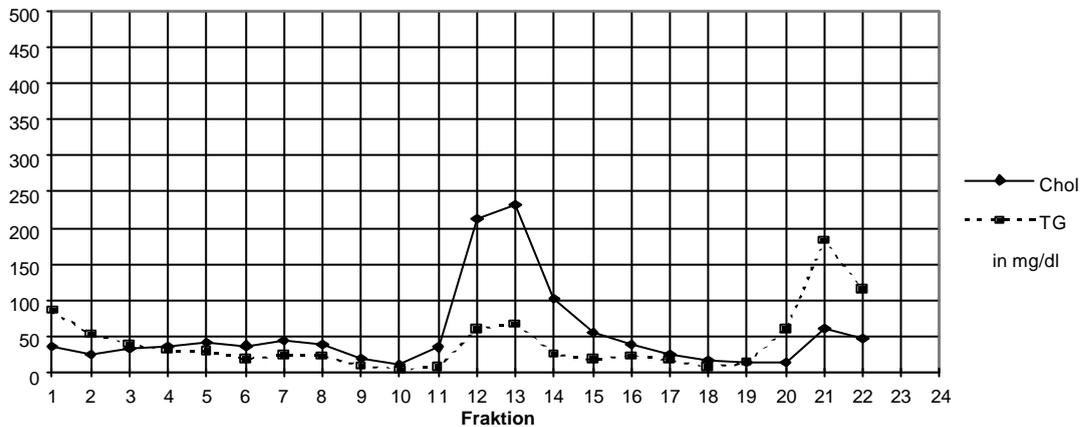
## Familie D

### Cholesterin- / TG- Gradient



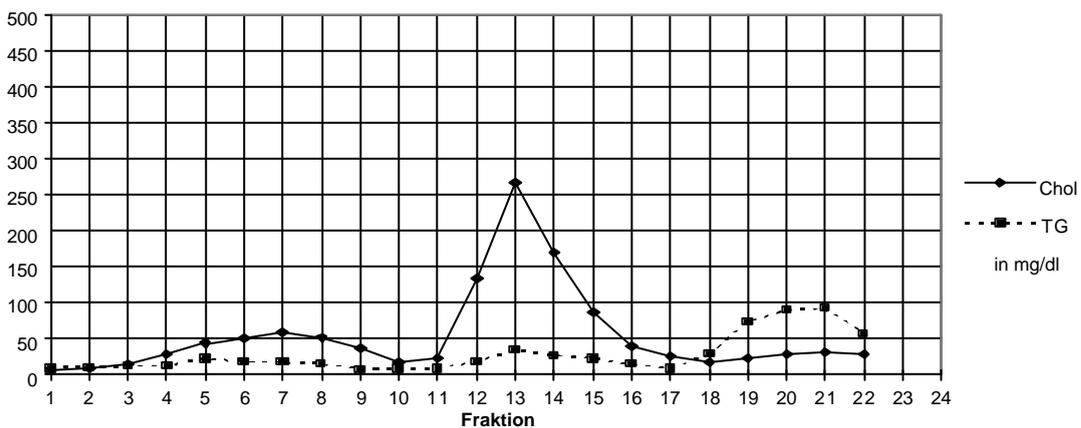
I.2 Apo E 3/3 (Großmutter)

### Cholesterin- / TG- Gradient



I.1 Apo E 3/4 (Großvater)

### Cholesterin- / TG- Gradient

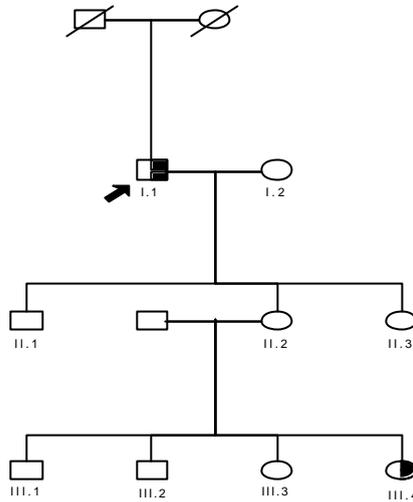


II.2 Apo E 3/3 (Vater)

Der Dichtegradient von I.2 hat einen normalen HDL- und LDL Peak, jedoch einen stark erhöhten Peak im VLDL- und CR- Remnant-Bereich. I.1 hat in dem gleichen Bereich eine mäßige Erhöhung, er weist zusätzlich eine Akkumulation an IDL auf. II.2 hat bis auf eine Triglyceriderhöhung im Bereich der niedrigen Dichten einen normalen Dichtegradienten.

### 3.5 Familie E (Apo E Arg136Cys)

Der Indexpatient ist Träger der Apo E Mutation Arg136Cys. Er fiel in der Lipidambulanz mit den Cholesterinwerten von 298mg/dl und den Triglyceridwerten von 336mg/dl auf. Die Familie wurde untersucht.



Leider kann die Familienuntersuchung nicht ausgewertet werden, da Blut oder DNS vertauscht worden sein müssen. Denn die genetische Untersuchung, die wiederholt und überprüft worden ist, ergibt, daß der Indexpatient und seine Enkelin die einzigen Mutationsträger der Familie sein sollen. Aber damit die Mutation bis in die 3. Generation weiter vererbt werden konnte, hätte die Mutter (2. Generation) die Mutation auch haben müssen. Daher muß eine Vertauschung vorliegen. Jedoch kann der Nachweis, auf welcher Ebene die Vertauschung stattgefunden hat, nicht mehr erbracht werden. Daher ist es unklar, ob das Blut oder erst die DNS vertauscht worden ist. Außerdem ist es nicht bekannt, ob es sich um eine direkte Vertauschung von Mutter und Tochter handelt oder ob noch mehr Angehörige daran beteiligt sind. Daher können die Ergebnisse nicht ausgewertet werden, obwohl alle Untersuchungen durchgeführt worden sind.

## 4. Diskussion

### 4.1 Familienuntersuchung

Die in dieser Arbeit angewandte Form der Familienuntersuchung hat zum Ziel, Träger der Mutationen, die den Lipidstoffwechsel beeinflussen, zu finden und zu vergleichen. Die Vorteile, die man sich durch diese Methode verspricht, aber auch die dabei entstehenden Nachteile seien im folgenden kurz genannt.

Ein Vorteil liegt in der hohen Wahrscheinlichkeit, mehr Mutationsträger zu erfassen, als es bei einem allgemeinem Screening der Lipidpatienten der Fall wäre. Zusätzlich bieten verwandte Mutationsträger optimierte Vergleichsbedingungen, da ihr Genmaterial zwar nicht identisch, jedoch ähnlich ist. Das bietet die Möglichkeit für einen relativ direkten Vergleich.

Nachteile dieser Methode können schon im Vorfeld der Untersuchung entstehen. Wenn ein Patient nur eine kleine Anzahl an Verwandten hat, sinkt die Wahrscheinlichkeit, weitere Mutationsträger zu finden. Wird kein weiterer Träger gefunden, wie es bei der Familie C der Fall war, so ist kein direkter Vergleich möglich. In so einem Fall wird dann untersucht, ob andere Familienmitglieder auch ohne die zu untersuchende Mutation erhöhte Werte aufweisen. Das würde darauf hinweisen, daß nicht nur die Mutation, sondern andere Faktoren zur Manifestation der Hyperlipidämie geführt haben könne. Ein solches Ergebnis müßte durch weitere Untersuchungen an weiteren Mutationsträgern erhärtet werden.

Ein weiteres Problem kann die Rekrutierung der Angehörigen darstellen. Zum einen ist die Motivation der Verwandten entscheidend, vor allem wie viele von ihnen sich untersuchen lassen. Bei mangelnder Kooperationsbereitschaft können nur wenige der betroffenen Personen untersucht werden, dementsprechend sinkt die Wahrscheinlichkeit, Mutationsträger zu finden. Zum anderen kann die Entfernung das Untersuchen der Angehörigen erschweren. So lebt beispielsweise ein Teil der Familie D in der Türkei; was selbst das Schicken von Blutproben fast unmöglich macht.

Nach der recht aufwendigen Rekrutierung der Verwandten können Fehler des Untersuchers, wie das Mißlingen einer DNS-Extraktion oder das Verunreinigen von DNS-Material; sowie das Vertauschen von einzelnen Proben, wie es bei der Familie E geschehen ist, ein großes Problem darstellen, da in der Regel eine

zweite Blutentnahme nicht möglich ist. Bei der Anamnese der Familien ist es wichtig, möglichst viele Details zu erfassen, damit viele Parameter beim Vergleich herangezogen werden können. Dadurch wird ein besserer Vergleich ermöglicht.

## 4.2 Familie A

Die Untersuchung zeigt die Auswirkung der LPL-Deletion auf den Lipidmetabolismus der Familie A. Von 34 untersuchten Personen haben 15 Personen eine Hyperlipidämie, sechs der sieben LPL-Deletionsträger sind darunter. Von den neun hyperlipämischen Familienmitgliedern, die nicht Träger der Deletion sind, weisen sieben Personen exogene Risikofaktoren auf. Von den sechs Mutationsträgern weisen drei Personen weitere Risikofaktoren auf, und diese drei haben auch die höchsten Lipidkonzentrationen im Blut.

Hier wird die Tendenz deutlich, daß bei Angehörigen, die nicht die Deletion tragen, exogene Risikofaktoren die Entstehung einer Hyperlipidämie verursachen, während bei den Mutationsträgern diese Risikofaktoren die Hyperlipidämie nicht mit auslösen, sondern sie lediglich verstärken. Aufgrund der Tatsache, daß der Sohn (II.3) des Indexpatienten, der ebenfalls Mutationsträger ist, keine erhöhten Werte aufweist, müssen Gründe vorhanden sein, die eine Normolipidämie aufrecht erhalten.

Die Auswirkungen der LPL-Deletion auf den Lipidstoffwechsel werden bei einer detaillierten Untersuchung deutlich. Es fällt auf, daß die Dichtegradienten aller männlichen Mutationsträger ein typisches Muster einer Aktivitätsminderung der LPL zeigen: es existiert nahezu kein HDL-Peak, und nur ein geringer LDL-Peak. Dagegen zeigt sich ein starker Anstieg in der VLDL/Chylomicronenfraktion. Dieser Dichtegradient veranschaulicht die reduzierte Aktivität der LPL, bei der die triglyceridreichen Partikel nicht mehr hydrolysiert werden, diese Partikel werden im Blut angereichert. Im Gegensatz dazu kann HDL<sub>3</sub> aufgrund der verminderten LPL-Aktivität nur in geringer Menge entstehen. Das LDL wird wegen der fehlenden kompetitiven Hemmung schneller von den LDL-Rezeptoren der Hepatozyten endozytiert. Demzufolge sinkt das LDL-Cholesterin, und es zeigt sich nur ein geringer LDL-Peak.

Hervorzuheben ist, daß sich die Dichtegradienten der weiblichen Mutationsträger von denen der männlichen Mutationsträger unterscheiden. Die Gradienten der Frauen haben nur leicht erniedrigte HDL-Werte und nur leicht erhöhte Werte im

VLDL/Chylomicronenbereich, jedoch einen normalen LDL-Peak. Das ist erstaunlich, denn zum einen spricht die LPL-Mutation gegen eine solches Lipoproteinverhältnis, und zum anderen beeinflussen auch Östrogene die Lipoproteine auf konträre Weise.(LDL-Cholesterin niedrig, HDL höher, VLDL-Triglyceride höher). In diesem Bereich wären weitere Untersuchungen mit weiteren Probanden wünschenswert, die diesen Sachverhalt klären könnten.

In dem einen Teil der Familie A sind der Indexpatient, sein Sohn, seine beiden Schwestern und seine Nichte heterozygot bezüglich der LPL-Deletion. Mit Ausnahme des Sohnes haben diese vier pathologisch erhöhte Triglyceridwerte. Der Indexpatient und seine ältere Schwester haben zusätzlich noch erhöhte Cholesterinwerte. In diesem Teil der Familie ist die Ehefrau des Indexpatienten die einzige, die als Nicht-Trägerin der LPL-Deletion ebenfalls erhöhte Cholesterin und Triglyceridkonzentrationen aufweist. Als Risikofaktor findet man bei ihr nur das Übergewicht. Der Indexpatient hat neben dem Übergewicht noch eine eingeschränkte Glucosetoleranz. Da ohne Therapie der IGT die Lipidwerte stark erhöht sind, kann man einen verstärkenden Effekt der Hyperlipidämie aufgrund des Hyperinsulinismus vermuten. Erhärtet wird diese Vermutung dadurch, daß sein Cousin (I.5) die gleichen Risikofaktoren (IGT, Übergewicht) trägt und ebenfalls sehr stark erhöhte Lipidwerte aufweist. Bei ihm und in diesem Teil der Familie kommen weitere genetische Besonderheiten hinzu, auf die hier gesondert eingegangen wird: sein Genotyp wurde als E2/3 definiert, demzufolge ist nicht nur seine LPL insuffizient, sondern er hat zusätzlich noch eine verschlechterte Clearance der Apo E-haltigen Lipoproteine aufgrund der geringeren Affinität der Apo E-Rezeptoren zum defekten Apo E-Protein. Der Dichtegradient veranschaulicht dabei das Ausmaß der LPL-Defizienz und die hohe Apo E Masse (129mg/dl) zeigt die Auswirkung des mutierten Apo E.

Bei seinem Sohn (II.6, Sohn des Cousins) addieren sich noch weitere genetische Änderungen: er trägt auf dem einen Allel die LPL-Deletion, und auf dem anderen die 291-Variante, die Untersuchung des Genotyp ergibt ein E2/2. Daraus erklärt sich die stark erniedrigte LPL-Aktivität und die erhöhte Apo E Masse (170mg/dl). Diese Summation der genetischen Faktoren haben bei ihm trotz fehlender exogener Faktoren und trotz des jungen Alters (30 Jahre) zu einer starken Hypertriglyceridämie geführt.

Im Vergleich mit Verwandten, die ähnliche genetische Voraussetzung haben, wird die Bedeutung der LPL-Deletion deutlich. Die Schwester (II.7) des letztgenannten (II.6) hat den gleichen Apo E Genotyp sowie den heterozygoten 291-er Polymorphismus. Die Untersuchung ergab jedoch keine Hyperlipidämie sondern nur eine für den Genotyp typische Dysbetalipoproteinämie, bei der die HDL- und LDL-Fraktion ähnlich hoch sind. Es gibt noch eine Frau (II.17), die homozygot E2/2 ist, ihr Dichtegradient zeigt das oben erläuterte typische Muster. Beide haben stark erhöhten Apo E-Gehalt ( 89 mg/dl und 195 mg/dl). Diese beiden Fälle zeigen, daß nicht das defekte Apo E-Protein allein hier eine Hyperlipidämie auslöst, sondern daß primär die LPL-Deletion die Ursache ist, und die weiteren genetischen Veränderungen (LPL-Polymorphismus, Apo E2/2, Übergewicht etc.) einen verstärkenden Einfluß ausüben.

Der Bruder (I.7) von I.5 hat den gleichen Genotypen E2/3, ist jedoch nicht Träger der LPL-Deletion. Die Apo E Masse ist bei ihm leicht erhöht, und er leidet ebenfalls an einer Hypertriglyceridämie. Die hohen Werte kann man in diesem Fall auch von seinem regelmäßigen Alkoholgenuß (mindestens 2 Biere täglich) und dem starken Rauchen (40 Zigaretten pro Tag) abhängig machen, beides beeinflußt den Lipidstoffwechsel negativ. Bei ihm addieren sich demzufolge mehrere exogene Faktoren.

Wohingegen bei dem Sohn, II.3, des Indexpatienten das Fehlen weiterer Risikofaktoren, sowohl genetische, als auch exogene ursächlich sein kann für das Aufrechterhalten einer Normolipidämie. Der Sohn, II.3 ist 36 Jahre alt, er ist Wildtyp bezüglich der vier untersuchten LPL-Polymorphismen, Apo E 3/3, hat keine eingeschränkte Glukosetoleranz, einen nur gering erhöhten BMI (26), und er raucht nicht. Demzufolge bewirkt die LPL-Deletion allein bei einer jungen Person keine Hyperlipidämie.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß die LPL-Deletion, durch die das aktive Zentrum der LPL fehlt, einen starken Einfluß auf den Lipoproteinstoffwechsel hat. Obwohl die betroffenen Personen heterozyot sind, kann das gesunde Allel, welches funktionierendes LPL codiert, den Ausfall durch das mutierte Allel schlecht kompensieren. In dieser Familie ist von sieben Mutationsträgern einer

normolipämisch. Von Interesse wäre daher, ob dieser Unterschied allein durch das Alter und das Fehlen weiterer Risikofaktoren zustande kommt, oder ob noch eine weitere Mutation existiert, die die anderen hyperlipämischen Mutationsträger tragen, die noch nicht entdeckt wurde.

Ebenfalls interessant wäre eine genauere Untersuchung der unterschiedlichen Auswirkung der Deletion auf die weiblichen Träger.

Die Vermutung, daß der Hyperinsulinismus die Hypertriglyceridämie triggert, liegt nahe, jedoch aufgrund der Tatsache, daß bei den beiden betroffenen Personen (Indexpatient und Cousin I.5) noch andere Faktoren, wie Alter, Geschlecht und Übergewicht übereinstimmen, ist eine eindeutige Aussage nicht möglich. Zu bedenken ist auch, daß der Hyperinsulinismus sekundär durch die Hypertriglyceridämie entstanden sein kann und ihn nicht primär verstärkt.

Bei dieser Familie kommen viele verschiedenen Faktoren zusammen, die aufgrund der geringen Anzahl von untersuchten Personen nicht absolut bewerten werden können. Es wäre erstrebenswert, weitere Deletionsträger zu finden und zu untersuchen. Außerdem wäre es interessant, die Untersuchung nicht nur auf klinischer und genetischer Ebene weiterzuführen, sondern auf die Bindungskapazität und die Morphologie des Enzyms *in vitro* auszuweiten.

### **4.3 Familie B**

Von den 19 untersuchten Familienmitgliedern haben neben dem Indexpatienten acht weitere Personen pathologisch erhöhte Werte. Auffällig dabei ist, daß weder der Halbbruder noch die Tochter, die beide die Apo E Mutation (gly127Asp) tragen, hyperlipämisch sind. Auch die Dichtegradienten dieser beiden zeigen keine normolipämische Dysbetalipoproteinämie. Demnach liegt die Vermutung nahe, daß die Mutation nicht der Auslöser der pathologischen Werte sein kann.

Aufgrund des Vorkommens der Mutation nicht nur in der älteren (Indexpatient und Halbbruder) sondern auch in der Nachfolgeneration (Tochter) kann man den exogenen Faktor des Alters als einen alleinigen Zusatzfaktor ausgrenzen, denn sowohl in der jüngeren Generation als auch in der gleichen Generation entsteht keine Hyperlipidämie mit der Mutation zusammen. Bei keinem der drei Mutationsträger wurde eine weitere bekannte Mutation im Apo E- oder LPL-Gen gefunden. Es gibt jedoch einige Parameter, die den Indexpatienten von den beiden anderen Mutationsträger unterscheiden: der Patient hat Übergewicht und

eine eingeschränkte Glucosetoleranz (IGT). Um zu prüfen, ob diese Parameter allein eine Hyperlipidämie auslösen, müßten Personen untersucht werden, die die gleichen Parameter nicht aber die Mutation aufweisen. I.6 wäre eine solche Vergleichsperson, sie ist im gleichen Alter, hat Diabetes Typ II, und leidet an Übergewicht. Sie ist aber nicht blutsverwandt mit dem Patienten und hat dementsprechend eine andere genetische Disposition, insbesondere ist sie nicht Trägerin der Apo E Mutation. Sie leidet jedoch im Gegensatz zum Patienten unter einer isolierten Hypertriglyceridämie und nicht unter einer gemischten HLP. Außerdem sind ihre Triglyceridkonzentrationen nicht so stark erhöht wie die des Indexpatienten. Demzufolge spielen der Diabetes Typ II und das Übergewicht allein auch nicht die entscheidenden Rollen zur Entstehung der gem. HLP.

Bei der Beurteilung des Einflusses exogener Faktoren auf den Lipidstoffwechsel, wie dem Rauchen und der Hypothyreose, konnte man keinen deutlichen Zusammenhang erfassen. In der Familie sind vier weibliche Angehörige hypothyreat, die jedoch mit Jod bzw. mit Thyroxin substituiert wird. Und da zwei dieser Frauen hohe Werte und zwei physiologische Werte aufweisen, zeigt sich, daß der kontrollierte Hypothyreodismus keine deutliche Korrelation mit den Lipidwerten bildet. Auch dem Rauchen kann man in dieser Familie keinen deutlichen Einfluß nachweisen; z.B. II.1 ist mit 40 Zigaretten am Tag der stärkste Raucher, es werden bei ihm jedoch nur schwach erhöhte Cholesterinwerte und leicht erniedrigte HDL-Konzentrationen gemessen.

Es fällt auf, daß (bis auf den Halbbruder) alle Geschwister des Patienten an erhöhten Cholesterin und Triglyceridkonzentrationen leiden. Dies legt die Folgerung nahe, daß in der Familie noch eine weitere, bisher nicht erkannte Mutation vorhanden ist, die der Indexpatient zusätzlich trägt. Aufgrund dieser Tatsachen kann geschlossen werden, daß die Mutation nur dann Einfluß auf den Lipidstoffwechsel hat, wenn zusätzlich metabolische und/oder genetische Vorbedingungen existieren. Dies entspricht auch der Auffassung von David Miller et al. [52], die behaupten, daß Apo E1 (Gly127Asp) autosomal dominant mit unterschiedlicher Penetranz vererbt wird, wobei sie von anderen Faktoren (exogenen und endogenen) beeinflusst wird. Sie haben u.a. gezeigt, daß der Anteil des mutierten Apo E bei diabetischer Ketoazidose und Chylomicronämie ansteigt.

Das bedeutet, daß bei Personen mit eingeschränkter Glucosetoleranz vermehrt defektes Apo E in den Lipoproteinen vorhanden ist. Daraus folgt eine schlechtere Bindungsfähigkeit [50] und somit eine geringere Clearance der Lipoproteine.

Diese Annahme wird zusätzlich durch den Befund von Steinmetz et al [66] bestätigt. Sie präsentieren eine Familie, in der zwei Geschwister homozygot für die Apo E1-Variante sind, während die Eltern und ein weiteres Geschwisterkind heterozygot E1/3 sind. Der Patient (E1/1) hat im Alter von 25 Jahren eine ausgeprägte Hyperlipidämie Typ III entwickelt. Im Gegensatz dazu zeigt seine Schwester (ebenfalls E1/1) eine normolipämische Dyslipoproteinämie, die der homozygoten für E2/2 sehr ähnelt. Der Unterschied zwischen dem Patienten und seiner Schwester besteht darin, daß er unter einer eingeschränkten Glucosetoleranz ohne Übergewicht leidet, die Schwester jedoch nicht.

Doch aus diesem Zusammenhang ist es nicht zulässig, daraus eindeutigen Schlüsse zu ziehen, denn der Hyperinsulinismus muß nicht der zusätzliche Faktor (primäre Insulinresistenz→Verstärkung einer latenten primären Lipoproteinstoffwechselstörung) gewesen sein. Er kann auch Folge der Hyperlipidämie sein (primäre Lipoproteinstoffwechselstörung, sekundäre Insulinresistenz). Die Insulinresistenz würde demnach beim Einstellen auf physiologische Lipidwerte wieder verschwinden [12]. Um diese Möglichkeit auszuschließen, müßte man den weiteren Verlauf der Krankheitsgeschichte des Indexpatienten beobachten. Dabei wäre abzuwarten, ob sich die eingeschränkte Glucosetoleranz einstellt, sobald der Lipidstoffwechsel auf physiologische Werte therapiert ist. In diesem Fall erscheint es jedoch sinnvoller, nach anderen beeinflussenden Mutationen zu suchen.

#### **4.4 Familie C**

Bei der Familie C hat neben dem Indexpatienten niemand die Mutation geerbt, daher können leider keine Mutationsträger miteinander verglichen werden. In diesem Fall gäbe es nur die Möglichkeit, das Lipoproteinverhältnis der anderen Verwandten nach Ähnlichkeiten zu untersuchen, um zu zeigen, daß nicht die Mutation die Dyslipoproteinämie verursacht. Die Ehefrau und zwei der Töchter leiden zwar unter zu hohen Cholesterinwerten, jedoch nicht unter erhöhten Triglyceriden. Aufgrund der unterschiedlichen Expression der Hyperlipidämie wird vermutet, daß es sich hierbei um eine weitere genetische Hyperlipidämie handelt,

die unabhängig von der des Indexpatienten ist. Es wäre zu untersuchen, ob es sich hierbei um einen Rezeptordefekt oder anderes handelt.

Jedoch könnte man aufgrund des gleichen Phänotyps des Indexpatienten und seines Bruders sowie ähnlichem Verteilungsmuster der Lipide (hohe Cholesterinkonzentration mit gleichzeitig erhöhten Triglyceriden) vermuten, daß der Bruder ebenfalls Mutationsträger ist. Seine DNS müßte noch untersucht werden.

Smit et al [63] zeigten in ihrer Studie, daß die 146 Mutation eine *late-onset* Dominanz für eine gemischte Hyperlipidämie auslösen kann. Dieser Sachverhalt konnte durch die hier gewonnenen Untersuchungsergebnisse leider nicht bestätigt werden, da zu wenig Material vorhanden ist, um eine Aussage treffen zu können. Hierfür wären daher noch weitere Untersuchungen an Familien mit dieser Mutation notwendig.

#### **4.5 Familie D**

Bei dieser Familie konnte trotz weitgefächerter Untersuchungen keine Ursache für die Hypertriglyceridämie des jungen Indexpatienten gefunden werden. Aufgrund der Schwere der Krankheit, ihres frühen Auftretens und des Verwandtschaftsverhältnisses der Eltern, liegt die Vermutung nahe, daß der Indexpatient homozygot in Bezug auf eine unentdeckte Mutation ist. So haben in der Familie mehrere Personen (die Mutter, II.1, beide Tanten, II.4 und II.5 und die Großeltern, I.1 und I.2) pathologisch erhöhte Werte. Niemand hat jedoch die gleiche Ausprägung wie der Indexpatient. Vermutlich ist die Großmutter heterozygote Trägerin der Mutation, denn sie hat trotz medikamentöser Therapie eine Hypertriglyceridämie. Desweiteren hat sie drei Kinder im Säuglingsalter verloren, was für genetische Abnormitäten spricht. Drei ihrer Töchter sind hyperlipämisch, jedoch hat nur die Mutter des Patienten isoliert erhöhte Triglyceride. Das legt die Vermutung nahe, daß die Mutation von der Großmutter über die Mutter auf den Jungen vererbt wurde. Da die Großmütter des Indexpatienten Schwestern sind, ist es möglich, daß die Großmutter väterlicherseits ebenfalls Mutationsträgerin ist, und die Mutation über den Vater an das Kind vererbt wurde, und der Junge somit homozygot ist.

Auch wenn der Dichtegradient mit seinem hohen Peak im VLDL/Chylomicronenbereich und dem nahezu vollständigem Fehlen von HDL und LDL auf eine LPL-

Defizienz hinweist, hat die komplette Sequenz des LPL-Gens keine Abnormitäten gezeigt. Es war damit nicht möglich, die Ursache der Hypertriglyceridämie zu ermitteln. Jedoch hat die Messung der LPL-Aktivität unter Zugabe von C-II einen stark erniedrigten Wert ergeben, und die Masse der LPL war sogar unter der Nachweisgrenze. Demzufolge muß in diesem Bereich ein Defekt vorhanden sein. Der niedrige Apo B-Gehalt im Blut des Indexpatienten zeigt, daß hier sowohl LDL als auch VLDL einen sehr geringen Anteil ausmachen. Das wurde schon in anderen Fällen als ein typisches Zeichen eines Chylomicronämie-Syndrom bei Kindern festgestellt.

Im Serum ist C-II vorhanden, damit kann der mangelnde Cofaktor für die LPL auch nicht Ursache des Chylomicronämie-Syndroms sein. Der Apo E Genotyp ist E3/3. Bisher konnte in diesem Bereich noch keine Mutation festgestellt werden. Es wäre jedoch ungewöhnlich, wenn eine solche Veränderung die Triglyceride so stark beeinflussen würde. Gleiches gilt für exogene Faktoren, wie Diätfehler oder Rauchen.

Bei dieser Familie müßte weiter nach genetischen Ursachen geforscht werden. Obwohl alles auf einen LPL-Defekt hinweist, wäre noch ein weiteres Ausschlußkriterium, die Sequenz des C-II zu untersuchen. Andernfalls müßte die Sequenz der LPL noch ein weiteres Mal überprüft werden.

#### **4.6 Familie E**

Bei der Familie E sollte der Einfluß der Apo E Mutation Arg136Cys auf den Lipidstoffwechsel untersucht werden. Aufgrund einer Vertauschung läßt sich jedoch keinerlei Aussage darüber treffen.

## 5. Zusammenfassung

Die Familienuntersuchung hat sich sowohl als adäquate Methode zum Finden von weiteren Trägern seltener Mutationen herausgestellt als auch zum Vergleichen der klinischen Auswirkungen.

Bei der Familie A wurden noch weitere Mutationsträger entdeckt. Da von diesen Mutationsträgern drei Personen das gleiche pathologische Lipidprofil zeigen, jedoch zwei weitere ein anderes pathologisches Muster zeigen und ein weiterer nicht hyperlipämisch ist, zeigt sich, daß diese LPL-Deletion per se nicht einheitliche klinische Auswirkungen hat. Die Cofaktoren wie Hyperinsulinismus und Adipositas, die selbst ebenfalls zu hohen Triglyceridwerten führen können, triggern den Organismus so, daß eine Hypertriglyceridämie entsteht. Aber auch der Apo E Polymorphismus Apo E2/2, der LPL-Polymorphismus 291 und das fortgeschrittene Alter führen im Zusammenhang mit der Deletion zu massiven Hypertriglyceridämien. Ohne die Deletion haben beide Polymorphismen keine klinischen Auswirkungen.

Da es aber einen gesunden Mutationsträger und zwei weibliche Mutationsträger mit einem anderen Lipidprofil gibt, müssen Kompensationsmechanismen existieren, die im einzelnen noch zu untersuchen wären.

Bei der Familie E gilt ähnliches: der Indexpatienten mit der Apo E-Mutation gly127asp weist eine Hyperlipidämie auf, während bei den beiden anderen Mutationsträgern jedoch nur eine Dyslipoproteinämie gefunden wurde. Ursächlich dafür kann entweder eine weitere bisher nicht gefundene und untersuchte Mutation sein, die der Indexpatient zusätzlich hat oder die Adipositas und der Hyperinsulinismus, an denen der Indexpatient leidet, sind die alleinigen Cofaktoren für die Auslösung der Hyperlipidämie. Das Ergebnis dieser Familienuntersuchung widerspricht den Theorien, daß diese Mutation allein zu einer Hyperlipidämie führt.

Bei der Familie C wurde kein weiterer Mutationsträger gefunden, aber bei einem Verwandten, bei dem keine DNS vorhanden war, zeigte sich das gleiche Lipidprofil, was zu der Annahme veranlaßt, daß er ebenfalls diese Mutation trägt. Außerdem zeigte die Familienuntersuchung, daß neben dem Indexpatienten noch weitere Angehörige hyperlipämisch sind. Das führt zu der Folgerung, daß in dieser

Familie noch eine zusätzliche genetische Disposition zur Hyperlipidämie besteht. Da diese aber noch nicht gefunden wurde, kann die Hypothese, dass eine zusätzliche Mutation im Zusammenhang mit der Apo E Mutation zu einer Hyperlipidämie führt, nicht erhärtet werden.

Bei der Familie D, bei der noch Unklarheit herrscht, um was für eine Mutation es sich handelt, lässt sich nur feststellen, ein unbekannter Mechanismus die LPL insuffizient werden lässt. Da in der Familie sonst niemand unter solch hohen Werten leidet, und bei dem jungen Patienten so stark erhöhte Werte in jungem Alter aufgetreten sind, wird davon ausgegangen, dass entweder der Indexpatient diese Mutationen homozygot trägt, oder dass es sich um zwei verschiedene Mutationen handelt, die bei dem Patienten aufeinandertreffen.

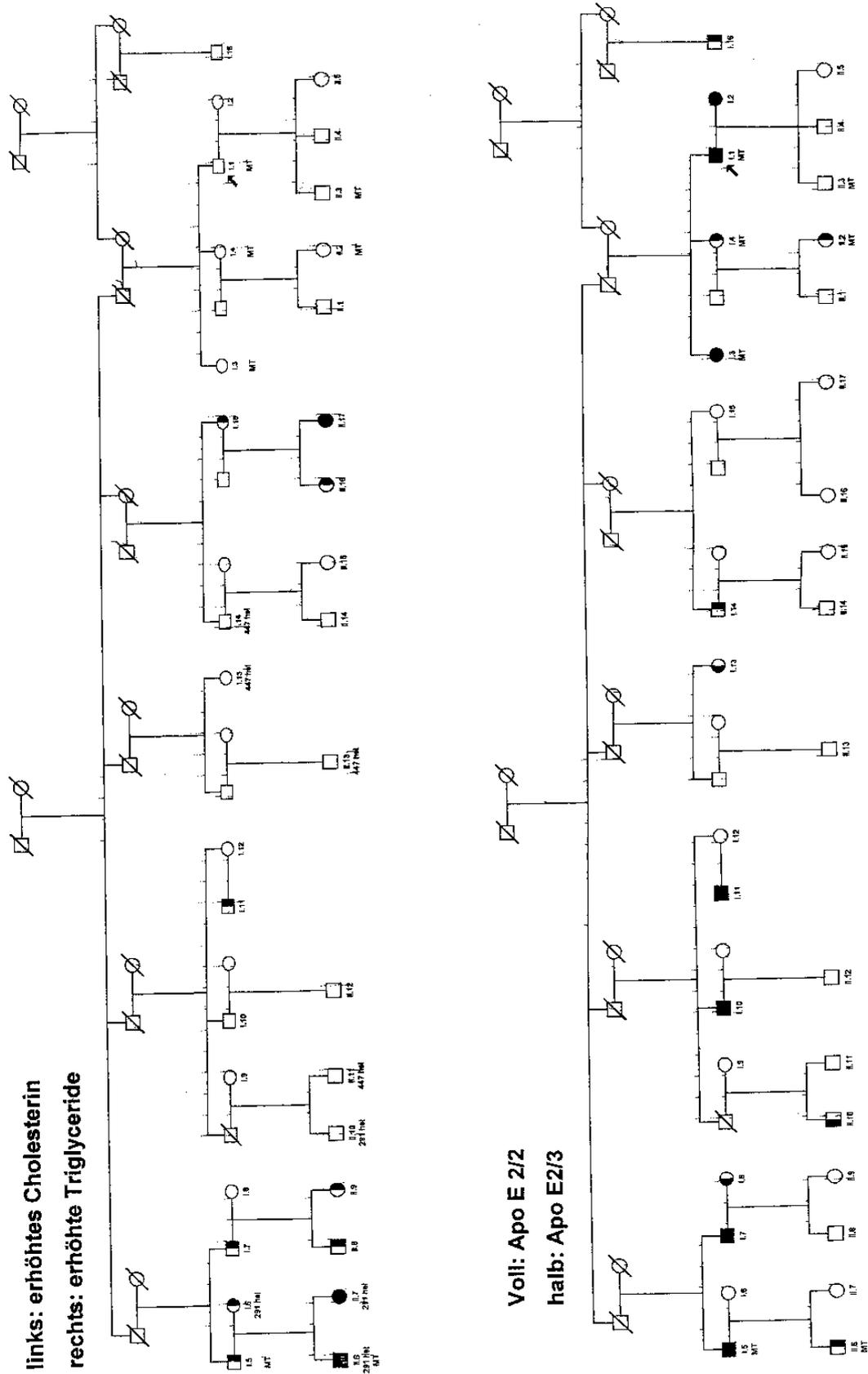
Die Ergebnisse der Familie E konnten aufgrund einer Vertauschung nicht ausgewertet werden.

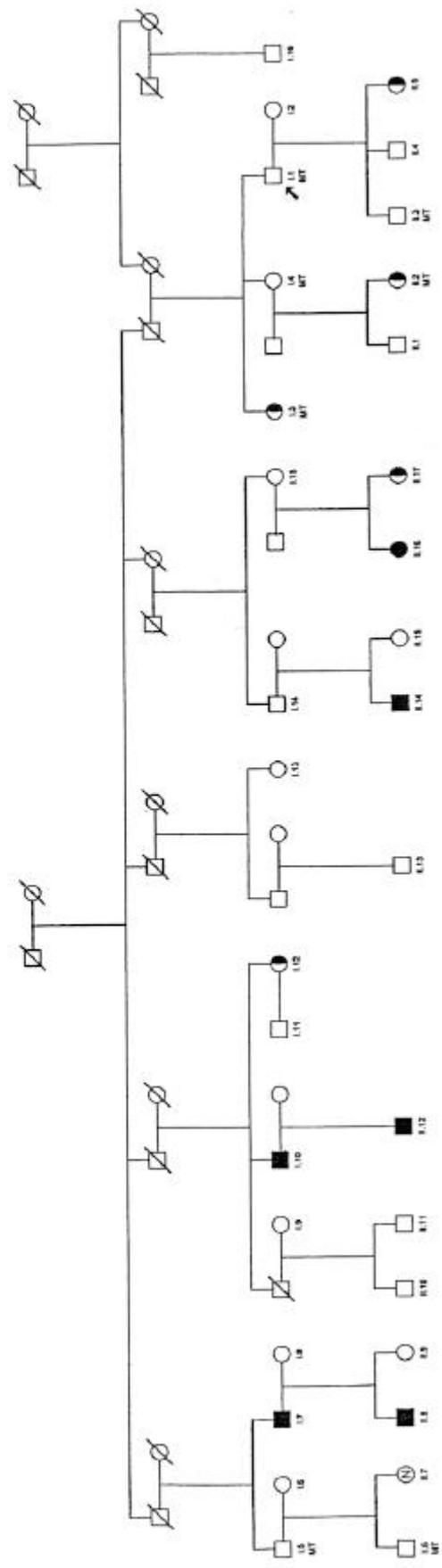
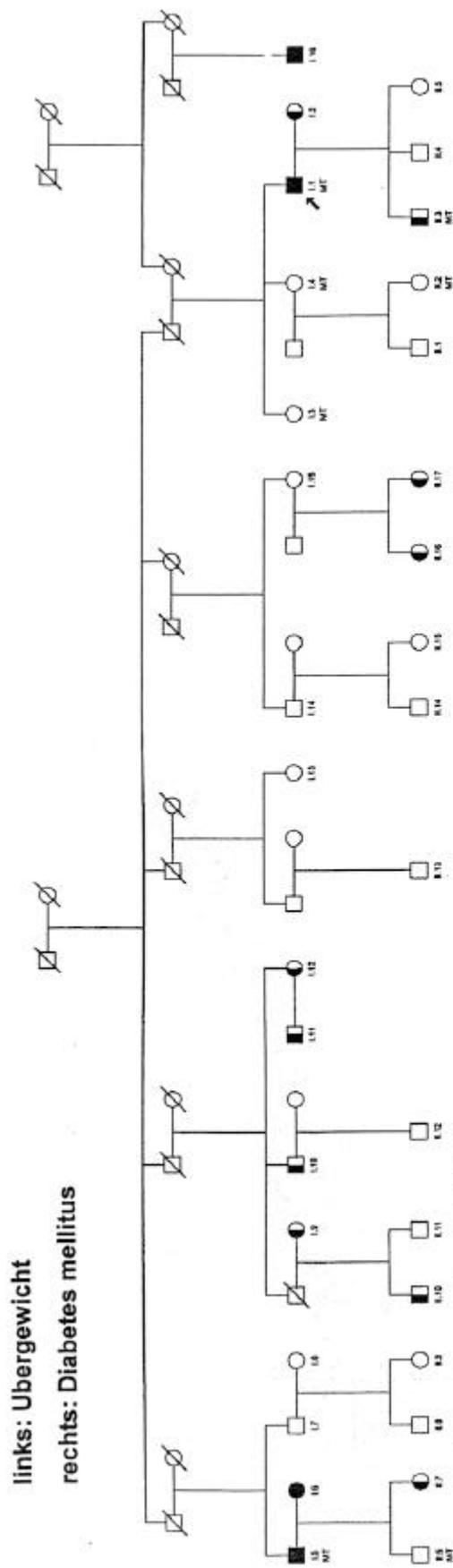
Familienuntersuchung im allgemeinen ist die Methode der Wahl um vergleichende Untersuchungen anzustellen, jedoch wäre es wünschenswert, viele und zahlreiche Familien zu untersuchen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Da es notwendig ist, sehr viele Parameter zu untersuchen, um möglichst alle Faktoren zu erfassen, die in den Lipidhaushalt mit hineinspielen, hilft eine große Anzahl an Probanden.

In den einzelnen Familien ließen sich Hinweise auf mögliche Ursachen der Dyslipoproteinämie finden, die jedoch alle noch mit Untersuchungen an weiteren Familien erhärtet werden müssten, damit eine allgemeingültige Aussage getroffen werden kann.

## 6. Anhang

### 6.1 Familie A Stammbäume und Tabelle





## Familie A

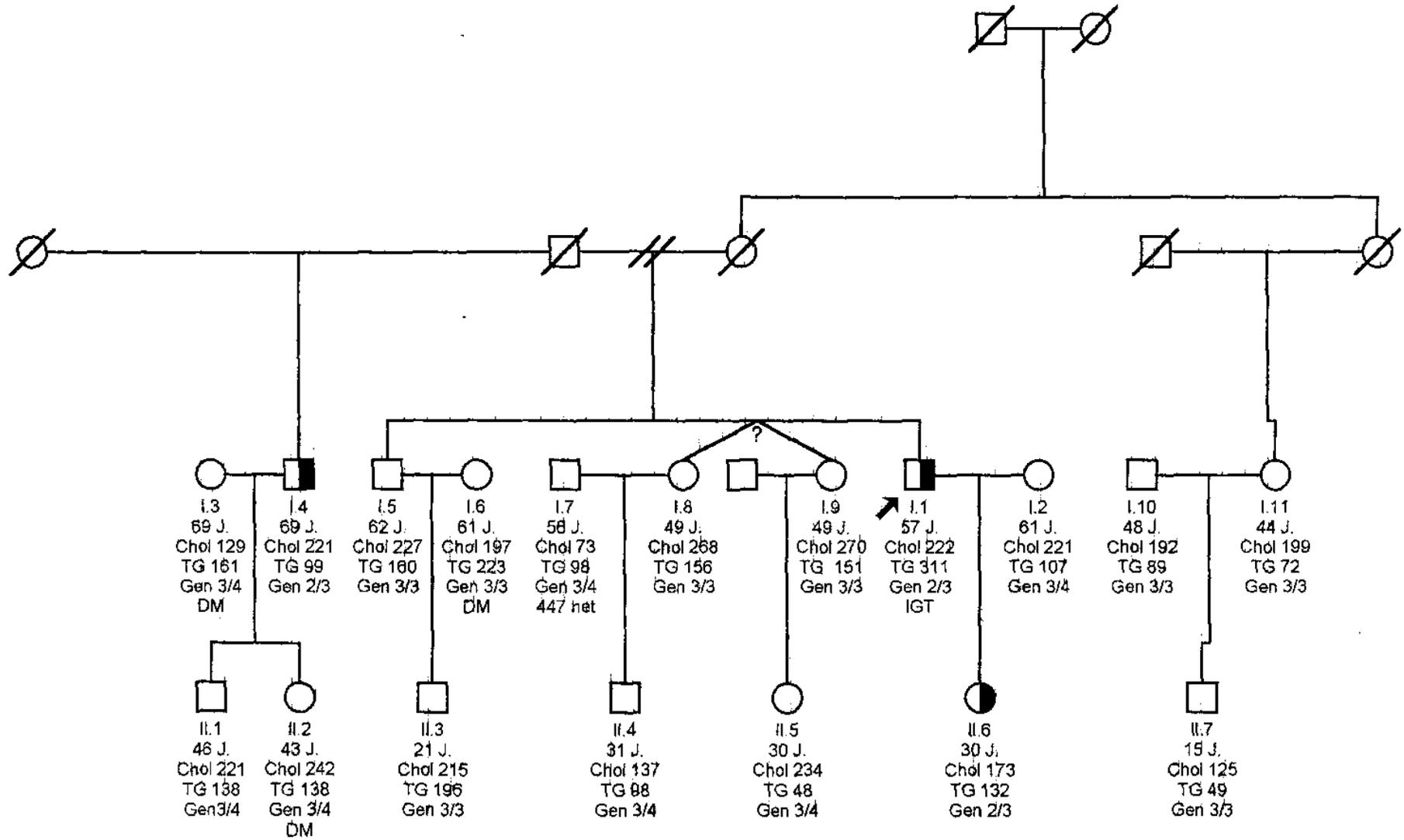
A	Alter	Chol	TG	VLDL	LDL	HDL	Apo E	LPLdel	-93	9	291	447	Lp(a)	HL	E Ms	LPLAkt	HLAkt	Alkohol	Zigaretten	BMI	DM	KHK
I.1	63	395	1170	/	149	26	3/3	pos.	wt	wt	wt	wt	31	CC	36	/	/	2x/wk	/	30	IGT	Hypert
I.3	61	256	389	78	124	54	3/3	pos.	wt	wt		wt	<5	CC	22	/	/	n.b.	8/d	20	/	Hypert
I.4	58	218	173	35	131	52	3/4	pos.	wt	wt	wt	wt	32	CT	74	/	/	n.b.	/	19	/	Hypert
I.5	57	394	1236	/	/	22	2/3	pos	wt	wt	wt	wt	<2	CC	129	107%	153	gelegtl.	/	32	IGT	Hypert
II.2	30	214	213	43	138	33	3/3	pos	wt	wt	wt	wt	35	TT	67	/	/	n.b.	10/d	22	/	/
II.3	36	216	113	23	150	43	3/3	pos	wt	wt		wt	148	CC	10	/	/	n.b.	/	26	/	/
II.6	30	207	580	/	/	23	2/2	pos	wt	wt	het	wt	<2	CC	170	52%	86	gelegtl.	/	21	/	/
I.2	59	249	328	66	138	45	3/3	neg	wt		wt	wt	45	CC	97	/	/	n.b.	/	31	/	Hypert.
I.6	53	185	89	18	116	51	2/2	neg		wt	het	wt	<2	CC	88	/	/	gelegtl.	/	31	DM	Hypert.
I.7	55	212	248	50	107	55	2/3	neg	wt	wt	wt	wt	6	CC	52	66%	138	2 Bier/d	40/d	24	/	Hypert.
I.8	51	312	98	20	222	70	3/4	neg			wt	wt	21	CC	494	124%	97	/	/	17	/	/
I.9	62	186	91	18	118	50	3/3	neg		wt			5	CC	48	/	/	selten	/	26	/	/
I.10	56	256	343	69	148	39	3/3	neg	wt	wt	wt	wt	2	CT	50	/	/	gelegtl.	40/d	28	/	/
I.11	68	202	169	34	117	51	2/3	neg		wt	wt		62	CT		/	/	Rotwein	/	26	/	KHK
I.12	61	201	103	21	197	73	3/3	neg			wt	wt	9	CC	43	53%	60	gelegtl.	20/d	27	/	/
I.13	70	258	108	22	183	53	3/3	neg	wt	wt	wt	het	6	CT	42	/	/	gelegtl.	/	23	/	/
I.14	52	220	220	44	125	51	3/3	neg	wt	wt	wt	het	2	CC	64	/	/	gelegtl.	/	25	/	/
I.15	66	208	99	20	125	63	2/3	neg					10		30	/	/	nie	/	26	/	/
I.16	66	187	194	39	117	31	3/4	neg	wt	wt		wt	4	TT	36	/	/	wenig	/	34	IGT	Herzin.
II.1	27	165	131	26	87	52	3/3	neg	wt	wt	wt	wt	35	CT	67	/	/	n.b.	n.b.		/	
II.4	28	201	101	20	136	45	3/3	neg	wt	wt	wt	wt	118	CC	29	/	/	n.b.	/	23	/	/
II.5	32	203	133	27	129	47	3/3	neg	wt	wt	wt	wt	7	CC	77	/	/	n.b.	15/d	21	/	/
II.7	32	147	111	22	54	71	2/2	neg	wt	wt	het	wt	<2	CC	89	/	/	selten	20/d	31	/	/

## Fortsetzung Familie A:

A	Alter	Chol	TG	VLDL	LDL	HDL	Apo E	LPLdel	-93	9	291	447	Lp(a)	HL	E Ms	LPLAkt	HLAkt	Alkohol	Zigarette.	BMI	DM	KHK
II.8	33	221	78	16	144	61	2/3	neg		wt		wt	7	CC	28	/	/	öfters	20/d	17	/	/
II.9	31	171	109	22	100	49	2/3	neg		wt	wt	wt	5	CC	68	70%	75	/	/	22	/	/
II.10	40	232	81	16	173	43	3/3	neg	wt		het	wt	4	CC	37	/	/	gelegtl.	/	30	/	Hypert.
II.11	38	199	124	25	111	63	3/3	neg		wt		het	2	CC	45	174%	230	gelegtl.	/	25	/	/
II.12	31	211	70	14	143	54	3/3	neg	wt	wt	wt	wt	2	CC	34	/	/	2 Bier/d	20/d	23	/	/
II.13	38	212	112	22	149	41	3/4	neg		wt	wt	het	10	CC	205	/	/	gelegtl.	/	25	/	Linksbl
II.14	22	186	137	27	128	31	3/4	neg	wt	wt	wt	wt	5	CT	26	/	/	15/d	22/d	22	/	/
II.15	25	182	128	26	95	61	3/3	neg	wt	wt	wt	wt	<2	CC	75	/	/	gelegtl.	/	20	/	/
II.16	46	185	158	32	110	43	2/3	neg		wt	wt	wt	5	CC	71	/	/	gelegtl.	20/d	27	/	/
II.17	38	158	83	17	79	62	2/2	neg		wt	wt	wt	<2	CC	195	/	/	gelegtl.	5/d	26	/	/
III.1	8	140	56	11	93	36	2/3	neg		wt	wt	wt	3	CT	147	/	/	/	/	17	/	/

## 6.2 Familie B

Fam. B	Alter	Chol	TG	VLDL	LDL	HDL	Lp(a)	E Ph.	E Gen.	-93	9	291	447	E Ms.	VLDL	Taq 1	Rauchen	BMI	DM	KHK	Schilddr.
I.1	57	261	239	58	112	37	9	1/3	2/3	/	wt	wt	wt	68	1,6	pos.	/	29	IGT	2 Inf.	/
II.6	36	173	132	26	86	61	23	1/3	2/3		wt	wt	wt	67	1,8	pos.	10/d	21	/	/	hypoth.
I.4	69	221	99	20	122	79	6	1/3	2/3		wt	wt	wt	95	1,8	pos.	15/d	23	/	Hypert.	/
I.2	61	221	107	21	144	56	35	4/4	3/4		wt	wt	wt	56	1,75	neg.	/	30	/	/	/
I.3	69	129	161	32	52	45	<2	3/4	3/4		wt	wt	wt	24	6,4	neg.	/	33	seit 24J.	Hypert.	/
I.5	62	227	160	32	159	36	5	3/3	3/3		wt	wt	wt	76	3,85	neg.	4/d	<u>28</u>	/	1 Infarkt	/
I.6	61	197	223	45	113	39	<2	3/3	3/3		wt	wt	wt	123	10,9	neg.	/	<u>35</u>	seit 3 J.	Hypert.	hypoth.
I.7	56	201	73	15	128	58	3	3/4	3/4	wt	wt	wt	het	46	2,1	neg.	/	24	/	/	/
I.8	49	268	156	31	181	56	9	2/3	3/3	wt	wt	wt	wt	98	3,5	neg.	/	<u>25</u>	/	KHK+Hy	hypoth.
I.9	49	270	151	30	181	59	16	3/3	3/3	wt	wt	wt	wt	32	1,75	neg.	/	<u>26</u>	/	Hypert.	/
I.10	48	192	89	18	130	44	72	3/3	3/3	wt	wt	wt	wt	/	0,7	neg.	15/d	24	/	/	/
I.11	44	199	72	14	130	55	11	3/3(2)	3/3	wt	wt	wt	wt	67	/	neg.	/	23	/	/	hypoth.
II.1	46	221	138	28	148	45	5	3/4	3/4		wt	wt	wt	58	0,7	neg.	40/d	27	/	/	/
II.2	43	242	130	26	173	43	15	3/4	3/4	wt	wt	wt	wt	n.b.	n.b.	neg.	10/d	/	<u>IGT</u>	/	/
II.3	21	215	196	39	139	37	<2	3/3	3/3		wt	wt	wt	107	3,8	neg.	/	<u>27</u>	/	/	/
II.4	31	137	98	20	83	34	18	3/4	3/4	wt	wt	wt	wt	47	4,5	neg.	/	25	/	KHK	/
II.5	30	234	48	10	169	55	10	3/4	3/4	wt	wt	wt	wt	68	0,4	neg.	5/d	20	/	/	/
II.7	15	125	49	10	74	41	19	3/3	3/3	wt	wt	wt	wt	48	/	neg.	/	22	/	/	/



## 6.3 Familie C

C	Alter	m/w	Chol	TG	LDL	HDL	VLDL	Lp(a)	E Ph	E Gen	9	291	447	145	E Ms	VLDL	Alkohol	Raucher	BMI	DM	KHK	Schilddr.	AVK/CVI
I.1	62	m	365	305	145	53	34	4	2/3(1)	3/3				pos.	91	/	in Maßen	20/d früher	27	IGT	/	/	/
I.2	62	w	297	161	208	57	24	5	3/4	3/4	/	wt	wt	neg.	18	2,6	n.b.	/	31	/	/	/	/
I.3	56	m	402	287	279	66	57	3	2/3		wt	wt	wt	neg.	165	/	n.b.	Pfeife	23	/	/	/	/
I.4	60	w	211	125	111	75	25	24	3/3	3/3					65	2,7	n.b.	/	20	/	/	/	/
II.1	33	m	257	203	176	40	41	<2	3/4	3/4	wt	wt	wt	neg.	27	/	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
II.2	36	w	277	146	171	77	35	<5	3/3	3/3	wt	wt	wt	neg.	106	0,7	n.b.	/	21	/	/	/	/
II.3	28	w	251	156	176	60	31	<2	3/4	3/4	wt	wt	wt	neg.	25	0,4	n.b.	12/d	29	/	/	/	/
II.4	24	w	211	142	124	59	44	5	3/3	3/3	wt	wt	wt	neg.	29	1,3	n.b.	15/d	27	/	/	/	/

## 6.4 Familie D

D	m/w	Alter	Chol	TG	LDL	HDL	VLDL	Apo A	Apo B	Lp(a)	E Ph	E Gen	-93	9	291	447	LPL	E Ms	VLDL	Alkohol	Raucher	BMI
III.1	m	11	118	673		20		109	<35	<2	3/3	3/3				wt	32%	279	13	/	/	
I.1	m	58	152	83	106	29	17	91	85	9	3/3	3/3			wt		94%	39	1,4	selten	50/d	29
I.2	w	54	172	266	86	33	53	116	94	<2	3/4				wt		53%	111	20	selten	/	31
II.1	w	35	185	237	97	41	47	143	102	4	3/3	3/3			wt	wt	106%	81	8,1	selten	40/d	31
II.2	m	35	197	89	132	47	18	149	91	11	3/3	3/3			wt		41%	66	11,4	selten	40/d	21
II.3	m	20	151	125	81	45	25	128	74	<2	3/4	3/4		wt	wt	wt	n.b.	61	2,3	n.b.	n.b.	
II.4	w	22	200	119	118	58	24	170	91	4	3/4	3/4		wt	wt	wt	n.b.	65	3,5	n.b.	n.b.	
II.5	w	31	245	142	169	48	28	144	130	10	3/4	3/4			wt	wt	n.b.	95	15	n.b.	n.b.	
III.2	m	9	154	94	90	45	19	131	70	14	3/3	3/3			wt	wt	56%	46	9,1	/	/	

## 6.5 Abkürzungsverzeichnis

BMI	Body Mass Index
Chol	Cholesterin
CR	Chylomicronenremnants
DM	Diabetes Mellitus
HDL	High Density Lipoprotein
HL	Hepatische Lipase
HLP	Hyperlipidämie
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
n.b.	nicht bekannt
TG	Triglyceride
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

## 6.6 Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Größe der Lipoproteine und Dichteverteilung im Plasma

Abbildung 2: Apo E Phänotypen bei der isoelektrischen Fokussierung

Abbildung 3: Broad- $\beta$ -Bande bei der Lipoproteinelektrophorese von Nativserum der Hyperlipoproteinämie Typ III

Abbildung 4: Auswirkungen der E2 und E3 Isoformen auf den Cholesterinspiegel und das Zusammenwirken von „HLP-Genen“ mit dem  $\epsilon 2$ -Allel zur HLP Typ III

Abbildung 5: Einfluß von Thyroxin auf die relative Verteilung des Cholesterins im Serum

Abbildung 6: Verfahren mit dem Material

Abbildung 7: Prinzip der PCR-Amplifikation

Abbildung 8: Prinzip der SSCP-Gelelektrophorese

Tabelle 1: Klassifikation der Lipoproteine

Tabelle 2: Apo E Isoformen

Tabelle 3: Einfluß der Apo E Isoformen auf die Serumlipide

## 6.7 Literaturverzeichnis

1. Aggerbeck LP, Wetterau JR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA (1988) Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Studies on the Amino-terminal (Receptor-binding) Domain of Human Apolipoprotein E from Serum Very Low Density Lipoproteins. *J Mol Biol* 202: 179-181
2. Alaupovic P, Lee DM, McConarthy (1972) Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 260:689-707
3. Assmann G, Lenzen HJ (1985) Apolipoprotein E-Polymorphism, Hyperlipidämie und Herzinfarkttrisiko. *Der Internist* 26:692-700
4. Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G (1991) Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8342-8346
5. Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK (1989) The LDL-receptor related protein, LRP, is an apolipoprotein E binding protein. *Nature* 341:162-164
6. Bensadoun A, Berryman DE (1996) Genetics and molecular biology of hepatic lipase *Curr. Opin. In Lipidology* 7:77-81
7. Björntorp P (1990) „portal“ adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes *Arteriosclerosis* 10: 493-496
8. Blue ML, Williams DL, Zucker S, Khan SA, Blum CB (1983) Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland, and liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:283-287
9. Breckenridge WC, Little JA, Steiner G, Chow, Poabst M (1978) Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II. *N Engl J Med* 298: 1265-1273
10. Brown MS, Goldstein JL. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47
11. Bruckert E, Jakob N, Lamaire L, Truffert J, Percheron F, de Gennes JL (1992) Relationship between smoking status and serum lipids in a hyperlipidemic population and analysis of possible confounding factors *Clin Chem* 38: 1698-1705

12. Bruns W, Rjasanowski I, Michael R (1973) Zur Differentialtherapie der Kohlenhydrattoleranzstörung bei Patienten mit Hyperlipoproteinämien. In: Symposium über Stoffwechselkrankheiten 286-296 Berlin
13. Brunzell JD (1989) Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome In : The metabolic basis of the inherited disease 6<sup>th</sup> ed. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds. McGraw-Hill, New York 1989 1165-1180
14. Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE (1989) Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations : an analysis of published data Brit. Med. J. 298:784-788
15. Davignon J., Gregg R.-E., Sing C.F. (1988) Apolipoprotein E Polymorphism and Atherosclerosis. Arteriosclerosis 8:1-21
16. Deep SS, Peng R. Structure of the human lipoprotein lipase gene. Biochemistry 1989; 28: 4131-4134
17. Ehnholm C, Mahley RW, Chappell DA, Weisgraber KH, Ludwig E, Witztum JL (1984) Role of apolipoprotein E in the lipolytic conversion of  $\beta$ - very low density lipoproteins to low density lipoproteins in type III hyperlipoproteinemia. Proc Natl Acad Sci USA 81: 5566-5570
18. 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 Journal of lipid research, 36 1995
19. Feussner G, Albanese M, Mann wa, Valencia A, Schuster H, (1996) Apolipoprotein E2 (Arg 136→Cys), a variant of apolipoprotein E associated with late-onset dominance of type III hyperlipoproteinemia Europ J Clin Invest 26:13-23
20. Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS (1967) Fat transport in lipoproteins- an integrated approach to mechanism and disorders N Engl J Med 276: 34, 94, 148, 215,
21. Fredrickson DS, Levy RI, Lindgren FT (1969) A comparison of heritable abnormal lipoprotein patterns as defined by two different techniques. J. Clin Invest 47:2446-2457

22. Friedmann LA, Kimball AW (1986) Coronary heart disease mortality and alcohol consumption in Framingham Am J Epidemiol 124: 481-489
23. Gofman JW, DeLalla O, Glazier F, Freeman NK, Lindgren FT, Nichols AV, Strisower B, Tamplin AR (1954) The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary heart disease. Plasma (Milano) 2:413-428
24. Goldstein JL, Brown MS, (1985) Arteriosklerose und Cholesterin: die Rolle der LDL-Rezeptoren, Spektrum der Wissenschaft, Januar 1985
25. 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, 17:10, 1969-1976
26. Hata A, Robertson M, Emi M, Lalouel J. Direct detection and automated sequencing of individual alleles after electrophoretic strand separation: identification of a common nonsense mutation in exon 9 of the human lipoprotein lipase. Nucleic Acids Res. 1990; 18:5407-5411
27. Hanefeld M, Hofmann D, Reichelt M (1978) Zur Epidemiologie koronarer Risikofaktoren in einer geschlossenen insulinspritzenden Diabetikerpopulation Dtsch. Gesundheitswesen 33:1552-1556
28. Hanefeld M, Schmechel U, Julius et al. (1991) Five year incidence of coronary heart disease related to major risk factors and metabolic control in newly diagnosed non-insulin dependent diabetes The diabetes Intervention study (DIS) Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 1:135-140
29. Havel RJ, Kane, JP, Kashyap ML (1978) Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man. J Clin Invest 52: 32-38
30. Havel R, Gordon Rs jr (1960) Idiopathic hyperlipidemia: Metabolic studies in an affected family. J Clin Invest 39: 1777-1782
31. Hazzard WR, Biermann EL (1972) Aggravation of broad beta disease (type III hyperlipoproteinemia) by hypothyroidism Arch. Intern. Med. 130: 822-828

32. Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500kD liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J* 7: 4119-4127
33. Hide WA, Chan L, Wen-Hsiung L. (1992) Structure and evolution of the lipase superfamily. *J Lipid Res* 33:167-178
34. Homanics GE, de Silva HV, Osada J, Zhang SH, Wong H, Borensztajn J, Maeda N (1995) Mild dyslipidaemia in mice following targeted inactivation of the hepatic lipase gene. *J Biol Chem* 270:2974-2980
35. Howard BV, Abbott WF, Beltz (1987) Integrated study of low density lipoprotein metabolism and very low density lipoprotein metabolism in non-insulin-dependent diabetes *Metabolism* 36:870-877
36. Huff MW, Evans, AJ, Wolfe BM, Conelly PW, Maguire GF, Strong WL (1990) Identification and metabolic Characteristics of an Apolipoprotein C-II Variant isolated from a Hypertriglyceridemic subject. *J Lipid Res* 30: 1349-1355
37. Jiao S, Kameda Y, Matsuzawa (1986) Influence of endogenous hyperinsulinemia on high density lipoprotein level in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Atherosclerosis* 60:279-286
38. Keck FS, Wolf CF, Wechsler JG (1991) Thyroxin reduziert KHK-Risiko. *Der Kassenarzt* 15:42-44
39. Kershbaum A, Khorsandian R, Caplan RF, Bellet S, Feinberg LJ (1963) The role of catecholamines in the fatty acid response to cigarette smoking *Circulation* 28:52-57
40. Knopp RH (1991) Estrogen replacement therapy for reduction of cardio-vascular risk in women. *Current opinion in Lipidology* 2:240-244.
41. Kounnas MZ, Chappell DA, Wong H, Argraves WS, Strickland DK (1995) The cellular internalization and degradation of hepatic lipase is mediated by low density lipoprotein receptor-related protein and requires cell surface proteoglycans *J Biol Chem* 270:9307-9312

42. Krauss RM, Levy RI, Fredrickson DS (1967): Selective measurement of two lipase activities in postheparin plasma from normal subjects and patients with hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest* 46:239-244
43. Kuivenhoven J.A., Groenemeyer B.E., Boer J., Reymers P.W.A., Berghuis R., Bruin T., Jansen H., Seidell J., Kastelein J.P. Ser447stop Mutation in Lipoprotein Lipase is associated with elevated HDL Cholesterol Levels in Normolipidemic Males; *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* ;17, 3 1997
44. Lalazar A, Mahley RW, Ignatius Ou SH (1989) Human Apolipoprotein E The journal of Biological Chemistry Vol. 264, No. 15:8447-8450
45. Lohse P, Beg O, Brunzell JD, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr. Familial chylomicronemia: identification of a unique patient homozygous for two separate mutations in the LPL- Gene. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:1415a Abstract
46. Lookene A, Bengtsson-Olivecrona G (1993) Chymotryptic cleavage sites and functional studies of the truncated molecule. *Eur J Biochem* 213:185-194
47. Mahley RW, Rall SC Jr. (1989) Type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): The role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In: *The metabolic basis of the inherited disease*. 6<sup>th</sup> ed. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds. McGraw-Hill, New York 1195-1213
48. Mailly F, Tugrul Y, Reymers P, Bruin T, Seed M, Groenemeyer B, Asplund-Carlson A, Vallance D, Windler A, Miller G, Kastelein J, Hamsten A, Olivecrona G (1995) A common variant in the gene for lipoprotein lipase (Asp9Asn) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:468-478
49. Mann AW, Meyer N, Berg D, Greten H and Beisiegel U (mmm) Coordinate effect of Apoprotein E and Lipoprotein Lipase in vitro: Lipoprotein Lipase compensates for the defective function of Apo E variants in lipoprotein binding to cells
50. Mann AW, Meyer N, Weber W, Meyer S, Greten H, Beisiegel U (1995) Apolipoprotein E isoforms and rare mutations: parallel reduction in binding to cells and to heparin reflects severity of associated type III hyperlipoproteinemia. *J Lip Res* 36:517-525
51. Miesenböck G, Patsch JR (1990) Relationship of Triglyceride and High-Density Lipoprotein Metabolism. *Atherosclerosis* 21:119-127

52. Miller DB, Hegele RA, Wolfe BM, and Huffs MW (1995) Identification, Molecular Characterization, and Cellular Studies of an Apolipoprotein E Mutant (E1) in three unrelated families with hyperlipidemia *J Clin Endocrinol Metab* 89:807-813
53. Miller ENC, Sambert N, Freedman RB (1985) Direct evidence that cholesterol transport is mediated by high density lipoproteins in rabbits. *Nature* 314: 109-111
54. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215
55. Niemeier A, Grafswels M, Heeren J, Meyer N, Angelin B, Beisiegel U (1996) The VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. *J Lipid Res* 37:1733-1742
56. Pykalisto O, Goldberhg A, Brunzell JD (1976) Reversal of decreased human adipose tissue lipoprotein lipase and hypertriglyceridemia after treatment of hypothyroidism *J Clin Endocrinol Metab* 43: 591-600
57. Olivecrona T, Bengtsson G (1984) Lipoproteinlipase, the model enzyme. In: *Lipases*. Borstom B and Brockmann HL eds. Elsevier, Amsterdam 205-261
58. Reymer P, Gagne E, Groenemeyer B, Zhang H, Forsyth I, Jansen H, Seidell J, Kromhout D, Lie K, Kastelein J, Hayden M (1995) A lipoprotein lipase mutation (Asn 291 Ser) is associated with reduced HDL Cholesterol levels in premature atherosclerosis *Nature Genetics* 10: 28-34
59. Reymer P, Groenemeyer B, Gagne E, Miao Li, Appelman E.G., Seidel J., Kromhout D, Bijvoet S, Oever K, Bruin T, Hayden M, Kastelein J (1995) A frequently occurring mutation in the lipoprotein lipase gene (Asn291Ser) contributes to the expression of familial combined Hyperlipidemia. *Human Molecular Genetics*. Vol.4 No.9 1543-1549
60. Ritter MM, Richter WO, Schwandt P (1995) Einfluß von Alkohol auf den Fettstoffwechsel *Handbuch der Fettstoffwechselstörung* Schattauer Verlag 336-339
61. Robinson DS, Parkin SM, Speake BK, Little JA (1983) Hormonal control of rat adipose tissue lipoprotein lipase activity, in Angel A, Hollenberg CH, RoncariDAK(eds): *The Adipocyte and Obesity: Cellular and Molecular Mechanism*. New York, Raven, p 127-136

- 62.Sadur CN, Eckel RH (1982) Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase: Use of the euglycemic clamp technique. *J Clin Invest* 69: 1119-1125
- 63.Smit M, de Knijff P, van der Kooij-Meijjs E, Groenendijk C, van den Maagdenberg AMJM, Gevers Leuven JA, H.Stalenhouf AF, Stuyt PMJ, Frants RR, and Havekes LM (1990) Genetic heterogeneity in familial dysbetalipoproteinemia. The E2(Iy146gln)variant results in a dominant mode of inheritance, *Journal Lip Res* 31:45-53
- 64.Stanley C,Rall Jr, Weisgraber KH, Innerarity L, Bersot TP, and Mahley RW (1983) Identification of a new Structural Variant of Human Apolipoprotein E, E2(Lys146Gln), in a Type III Hyperlipoproteinemic Subject with the E3/2 Phenotype. *J.Clin.Invest.* 72:1288-1297
- 65.Steinberg D, moderator, Pearson TA, Kuller LH discussants. Davis conferences (1991) Alcohol and atherosclerosis *Ann. Intern. Med.* 114: 967-976
- 66.Steinmetz A, Assefbarkhi N, Eltze C, Ehlenz K, Funke H, Pies A, Assmann G, Kaffarnik H (1990) Normolipemic dysbetalipoproteinemia type III in subjects homozygous for a rare genetic apolipoprotein E variant (Apo E1) *J. Lip Res.* 31:1005-1013
- 67.Stocks J, Thorn JA, Galton D (1992) Lipoprotein lipase genotypes for a common termination codon mutation detected by PCR-mediated site-directed mutagenesis and restriction digestion. *J Lipid Res* 33: 853-857
- 68.Sultan F, Lagrange D, Janssen H, Grigolio S. (1990) Inhibition of hepatic lipase activity impairs chylomicron remnant-removal in rats. *Biochem Biophys Acta* 1042:150-152
- 69.Taskinen MR, Beltz WF, Harper I (1986) The effects of non-insulin-dependent diabetes mellitus on VLDL triglycerides and VLDL Apo B metabolism: studies before and after sulfonylurea therapy *Dibetes* 35:1268-1277
- 70.Taskinen MR, Nikkila EA (1981) Lipoprotein lipase of adipose tissue and skeletal muscle in human obesity: Response to glucose and to semistarvation. *Metabolism* 30:810-817
- 71.Thuren T, Wilcox RW, Sisson P, Waite M (1991) Hepatic lipase hydrolysis of lipid monolayers. Regulation by apoproteins *J Biol Chem* 266:4853-4861

72. Uterman G, Hees M, and Steinmetz A (1977) Polymorphism of Apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinemia in man. *Nature* 269:604-607
73. van Tilbeurgh H, Roussel A, Lalouel J-M, Cambillau C. (1994) Lipoprotein lipase-molecular model based on the pancreatic lipase x-ray structure- consequences for heparin binding site and catalysis. *J. Biol Chem* 269: 4626-4633.
74. Wallinder L, Peterson J, Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G (1984) Hepatic and extrahepatic uptake of intravenously injected lipoproteinlipase. *Biochim Biophys Acta* 795:513-524
75. Wattigney WA, Harsha DW, Srinivasan SR, Webber LS, Berenson GS (1991) Increasing impact of obesity on serum lipids and lipoproteins in young adults. *Arch Intern. Med.* 151:2017-2022
76. Wechsler JG (1995) Endokrinologische Erkrankungen und Dyslipoproteinämien Handbuch der Fettstoffwechselstörung Schattauer 273-284
77. Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW (1981) Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo E isoforms. *J Biol Chem* 256: 9077-9083
78. Weisgraber KH, Rall SC Innerarity T.L., Mahley R.W. (1984) A novel Electrophoretic Variant of Human Apolipoprotein E. *J Clin Invest* 73:1024-1033
79. Wilson KL, Kirchgessner TG, Lusis AI, Schotz MC, Lawn RM (1987) Human lipoproteinlipase complementary DNA sequence. *Science* 235:1638-1641
80. Windler E, Greeve J, Daerr WH, Greten H. (1988) Binding of rat chylomicrons and their remnants to the hepatic low- density lipoprotein receptor and its role in remnant removal. *Biochemistry J.* 252: 553-561
81. Windler EE, Kovanen PT, Chao YS, Brown MS, Havel RJ., Goldstein JL (1980) The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat-liver: A binding site that mediates the uptake of rat lipoprotein containing apoproteins B and E. *J. Biol. Chem.* 255: 10464-10469
82. Yang WS, Nevin DN, Peng R, Brunzell JD, Deeb SS. A mutation in the promotor of the lipoproteinlipase gene in a patient with familial combined hyperlipidemia and low LPL- activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4462-4466.

83. Yki-Jarvinen H, Taskinen M-R, Koivisto VA, Nikkila EA (1984) Response of adipose tissue lipoprotein lipase activity and serum lipoproteins to acute hyperinsulinemia in man. *Diabetologia* 27:364-369
84. Zannis VI, Breslow JI (1981) Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. *Biochemistry* 20:1033-1041

## 7. Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Dr. U. Beisiegel für die Ermöglichung dieses neuen Projektes, für ihre Geduld und ihr Verständnis nicht nur für wissenschaftliche Fragen bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. D. Evans, der immer den Überblick behielt und mir mit neuen Ideen half, die Arbeit voranzubringen.

Dank gebührt auch Dr. Ch. Altenburg und Dr. K. Peek, die mir bei dem klinischen Teil der Arbeit unter die Arme griffen.

Mein Dank geht an H. Reschke, E. George, D. Berg und Susanne Ahle für die Durchführung von Experimenten, die weitere Aspekte bei der Familienuntersuchung zeigten.

Außerdem gilt mein Dank S. Plöhn und Ch. Runge, die mir in organisatorischen Belangen zur Seite standen.

Mein besonderer Dank geht an D. Wendt für die gute Einarbeitung in die molekularbiologischen Techniken, und die geduldige Beantwortung jener Fragen, die schon dutzende von anderen Doktoranden vor mir gefragt hatten. Hierfür möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern bedanken.

Ferner möchte ich mich bei J. Hashagen bedanken, der durch seine technische Hilfe mich und den Computer so manches Mal vor Verzweiflungstaten gerettet hat.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Sandra Linder
Geburtsdatum / Ort	30.03.1974 in Hamburg
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

### Schulbildung

1980-1984	Grundschule Halstenbek
1984-1993	Wofgang-Borchert-Gymnasium Halstenbek mit Abiturabschluß

### Studium

1993-2000	Medizinstudium an der Universität Hamburg
1997-2000	Akupunkturausbildung mit Diplomabschluß

### Dissertation

Familienuntersuchung von Patienten mit Mutationen des Apo E oder LPL-Gens bei Frau Professor Dr. Dr. U. Beisiegel, Stoffwechsellabor der Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Hamburg, den 4. September 2000

*S. Linder*  
Sandra Linder

## 9. Erklärung

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 entommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 4. September 2000



Sandra Linder