Aus dem Institut für
Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Abteilung für Molekulare Zellbiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktorin Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

Diskrepanzen zwischen Phänotypisierung und Genotypisierung des Apolipoprotein E

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von Ina Beshir

aus Khartoum/Extension

Hamburg 2001

Angenommen von dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 11.10.02

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Dekan:
~~Sprecher:~~ Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Korreferent: _____

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... **IV**
ABBILDUNGSVERZEICHNIS ..... **VI**
TABELLENVERZEICHNIS ..... **VII**

GLIEDERUNG

1 EINLEITUNG 9

1.1 Fettstoffwechsel 9
1.1.1 Lipoproteine 9
1.1.1.1 Chylomikronen 11
1.1.1.2 Very Low Density Lipoproteins (VLDL) 12
1.1.1.3 Intermediate Density Lipoproteins (IDL) 12
1.1.1.4 Low Density Lipoproteins (LDL) 12
1.1.1.5 High Density Lipoproteins (HDL) 13
1.1.1.6 Lipoprotein (a) 13
1.1.2 Apolipoproteine 14
1.1.3 Stoffwechsel der Lipoproteine 15
1.1.3.1 Cholesterin 15
1.1.3.2 Exogener Weg 18
1.1.3.3 Endogener Weg 20
1.1.3.4 Cholesterinaufnahme über LDL-Rezeptor 21
1.1.3.5 Reverser Cholesterintransport 23

1.2 Apolipoprotein E und die Funktion im Fettstoffwechsel 23

1.3 Apolipoprotein E-Polymorphismus in Verbindung mit Stoffwechsel-erkrankungen 28
1.3.1 Apolipoprotein E-2 28
1.3.1.1 Typ-III-Hyperlipoproteinämie (Typ-III-HLP) und Atherio-sklerose 29
1.3.2 Apolipoprotein E-4 32
1.3.3 Apolipoprotein E-1 34
1.3.4 Genetische Varianten des Apolipoprotein E in der Übersicht 35

1.4 Nachweismethoden für Apolipoprotein E 36
1.4.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF) 36
1.4.2 Genotypisierung (Restriction Isotyping) 38
1.4.2.1 Diskrepanzen zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp (Problemstellung) 39
1.4.3 Ziele der Arbeit 40

2 MATERIAL UND METHODEN 41

2.1 Material 41

2.2 Methoden 44
2.2.1 Patientengut 44
2.2.2 DNA-Isolierung aus genomischer DNA (nach Miller SA., 1988) 44
2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) 45
2.2.4 Aufreinigung von PCR-Produkten durch QIAQuick PCR Purification kit 47
2.2.5 DNA-Konzentrationsmessung 49
2.2.6 Restriktionsverdau 49
2.2.7 Gelfärbemethoden 49
2.2.7.1 Ethidiumbromidfärbung 49
2.2.7.2 Silberfärbung (Bassamet al. 1991) 50
2.2.8 Sequenzierung (Perkin-Elmer Applied Biosystems) 51

3 BEFUNDE 53

3.1 Sequenzstrategie 53
3.1.1 Template-Vorbereitung / Amplifikation von Exon 3 und 4 55
3.1.1.1 Amplifikation von Exon 4 57
3.1.1.1.1 Optimierung der Temperatur 57
3.1.1.1.2 Optimale Primerkombination 58
3.1.1.1.3 Zusammenfassung 58
3.1.1.2 Amplifikation von Exon 3 58
3.1.1.2.1 $MgCl_2$-Optimierung 59
3.1.1.2.2 Zusammenfassung 61

3.2 Sequenzanalyse und Darstellung der Ergebnisse 61
3.2.1 Ergebnis von Patient 1 62
3.2.2 Ergebnis von Patient 2 63
3.2.3 Ergebnis von Patient 3 64
3.2.4 Ergebnis von Patient 4 65
3.2.5 Ergebnis von Patient 5 67
3.2.6 Ergebnis von Patient 6 68
3.2.7 Ergebnis von Patient 7 69
3.2.8 Ergebnis von Patient 8 70
3.2.9 Ergebnis von Patient 9 72
3.2.10 Ergebnis von Patient 10 73
3.2.11 Ergebnis von Patient 11 74

4 DISKUSSSION 75

5 ZUSAMMENFASSUNG 79

LITERATURVERZEICHNIS **80**

ANHANG **94**

DANKSAGUNG **116**

LEBENSLAUF **117**

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG **118**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyl-Transferase
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym-A
AD	Alzheimer disease
Ag	Silber
$AgNO_3$	Silbernitrat
Ala	Alanin
Apo	Apolipoprotein
Arg	Arginin
art.	arteriell
AS	Aminosäure
Asp	Asparagin
BMI	Body mass index
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Ca.	circa
CE	Cholesterinester
CETP	Cholesterinestertransferprotein
CO_2	Kohlendioxid
Cys	Cystein
d.h.	daß heißt
DNA	Desoxyribonucleid Acid
ds	double strang
Fa.	Firma
FC	freies Cholesterin
Gln	Glycin
Glu	Glutamin
H_2CO	Hydrogencarbonat
H_2O	Wasser
HDL	High Density Lipoproteins
HLP	Hyperlipoproteinämie
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
IDL	Intermediate Density Lipoproteins
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IP	Isoelektrischer Punkt
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
KHK	koronare Herzerkrankung
L	Lipid
LCAT	Lecitin Cholesterin Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoproteins
LDL-R	LDL-Rezeptor
Leu	Leucin
Lp (a)	Lipoprotein (a)
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL receptor-related protein
lsg.	Lösung

Lys	Lysin
m	männlich
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
Na_2CO_3	Natriumcarbonat
Na_2SO_3	Natriumsulfat
pAVK	periphere arterielle Verschlußkrankheit
PCR	Polymerasekettenreaktion
PL	Phospholipide
Pro	Prolin
RI	Restriction Isotyping
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
Ser	Serin
rpm	round per minute
sog.	sogenante
ss	singel-strang
TBE	Tris-borate
TG	Triglyceride
Thr	Threonin
Tris-HCI	Tris-
Tyr	Tyramin
UV	ultraviolett
V.a.	Verdacht auf
Val	Valin
VLDL	Very Low Density Lipoproteins
w	weiblich
ZB	Zusatzbanden
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensytem
Z.n.	Zustand nach

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1: Schema zum prinzipiellen Aufbau eines Lipoproteinpartikels (50) 10
Abbildung 1-2: exogener Weg (50) 18
Abbildung 1-3: endogener Weg (50) 20
Abbildung 1-4: Genstruktur des Apo E 24
Abbildung 1-5: Einfluß von Apo E-3/3 im Fettstoffwechsel (22) 25
Abbildung 1-6: Einfluß von Apo E-2/2 auf den Fettstoffwechsel (22) 29
Abbildung 1-7: Einfluß von Apo E-4/4 auf den Fettstoffwechsel (22) 33
Abbildung 1-8: Der sechs häufigsten Apo E Phänotypen durch IEF aufgetrennt auf einem Polyacrylamidgel (22) 34
Abbildung 2-1: Sequenzierungsmethoden 52
Abbildung 3-1: Vor- und Rückwärtsprimer für die Darstellung von Exon 3 54
Abbildung 3-2: Primerkombination für die komplette Darstellung von Exon 4 55
Abbildung 3-3: Darstellung eines reinen PCR-Produktes von Exon 4 von Patient 1 in 10% Polyacrylamidgel 56
Abbildung 3-4: Darstellung eines PCR-Produktes, bei dem die Primer verschiedene Teile der DNA amplifiziert haben, Exon 4, DNA des Patient 1, in 10% Polyacrylamidgel 56
Abbildung 3-5: Temperaturoptimierung bei 50°C und 60°C mit Test-DNA und DNA des Patienten 3 von Exon 4, in 10% Polyacrylamidgel 57
Abbildung 3-6: PCR-Produkt von Patient 1, 2, 3 und 4 von Exon 3 mit Notwendigkeit zur $MgCl_2$-Optimierung und/oder Temperaturoptimierung, in 10% Polyacrylamidgel 59
Abbildung 3-7: Temperatur- und $MgCl_2$-Optimierung von Exon 3 bei 50°C und 55°C mit steigender $MgCl_2$-Konzentration, Test-DNA, in 10% Polyacrylamidgel 60
Abbildung 3-8: Temperatur- und $MgCl_2$-Optimierung von Exon 3 bei 60°C mit steigender $MgCl_2$-Konz., Test-DNA, in 10% Polyacrylamidgel 61
Abbildung 3-9: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 1 63
Abbildung 3-10: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 1 63
Abbildung 3-11: Sequenzabschnitt aus dem Exon 4 von Patient 2 64
Abbildung 3-12: Sequenzabschnitt aus dem Exon 4 von Patient 2 64
Abbildung 3-13: Sequenzabschnitt aus dem Exon 4 von Patient 3 65
Abbildung 3-14: Sequenzabschnitt aus dem Exon 4 von Patient 3 65
Abbildung 3-15: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 4 66
Abbildung 3-16: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 4 66
Abbildung 3-17: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 4 66
Abbildung 3-18: Restriktionsverdau mit TaqI bei Patient 1, 3, 4, 5, 6 und 7 von Exon 4 in 10% Polyacrylamidgel 67
Abbildung 3-19: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 5 68
Abbildung 3-20: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 5 68
Abbildung 3-21: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 6 69
Abbildung 3-22: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 6 69
Abbildung 3-23: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 7 70
Abbildung 3-24: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 7 70
Abbildung 3-25: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 8 71

Abbildung 3-26: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 8 71
Abbildung 3-27: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 9 72
Abbildung 3-28: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 9 72
Abbildung 3-29: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 10 73
Abbildung 3-30: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 10 73
Abbildung 3-31: Sequenzabschnitt aus Exon 4 rückwärts gelesen dargestellt von Patient 11 74
Abbildung 3-32: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 11 74

Anhang:

Abbildung 1 : Exon 3 von Patient 1 mit Primer E1 und E11 94
Abbildung 2: Exon 4 von Patient 1 95
Abbildung 3: Exon 3 von Patient 2 mit Primer E1 96
Abbildung 4: Exon 4 von Patient 2 97
Abbildung 5: Exon 3 von Patient 3 mit Primer E1 und E11 98
Abbildung 6: Exon 4 von Patient 3 99
Abbildung 7: Exon 3 von Patient 4 mit Primer E1 und E11 100
Abbildung 8: Exon 4 von Patient 4 101
Abbildung 9: Exon 3 von Patient 5 mit Primer E1 und E11 102
Abbildung 10: Exon 4 von Patient 5 103
Abbildung 11: Exon 3 von Patient 6 mit Primer E1 und E11 104
Abbildung 12: Exon 4 von Patient 6 105
Abbildung 13: Exon 3 von Patient 7 mit Primer E11 106
Abbildung 14: Exon 4 von Patient 7 107
Abbildung 15: Exon 3 von Patient 8 mit Primer E1 und E11 108
Abbildung 16: Exon 4 von Patient 8 109
Abbildung 17: Exon 3 von Patient 9 mit Primer E1 und E11 110
Abbildung 18: Exon 4 von Patient 9 111
Abbildung 19: Exon 3 von Patient 10 mit Primer E1 und E11 112
Abbildung 20: Exon 4 von Patient 10 113
Abbildung 21: Exon 3 von Patient 11 mit Primer E1 und E11 114
Abbildung 22: Exon 4 von Patient 11 115

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1-1: Klassifikation der Lipoproteine in % der Lipoproteinmassen (63, 59) 11
Tabelle 1-2: Zuordnung der wichtigsten Apolipoproteine zu ihren Lipoproteinen und ihren spezifischen Funktionen (63) 15
Tabelle 1-3: strukturelle Unterschiede zwischen den drei häufigsten Apo E Allelen und deren Produkte (42) 26
Tabelle 1-4: Auftretungsverteilung der Apo E Phänotypen/Allele anhand zwei Populationsstudien aus den Jahren 1980 und 1983 (75) 27
Tabelle 1-5: Apolipoprotein E Varianten, die zur Typ-III-HLP führen können ... 30
Tabelle 1-6: genetische Varianten des Apo E (63) 35
Tabelle 1-7: Die drei homozygoten Phänotypen des Apo E Allelen und ihre relative Ladungen 36
Tabelle 1-8: Der sechs häufigsten Apo E Phänotypen durch IEF aufgetrennt auf einem Polyarcylamidgel (22) 37
Tabelle 1-9: Genotypisierung mit Angaben der Anzahl der Aminosäuren pro spezifische Bande 38
Tabelle 2-1: Patientengut (*[1] Angaben in mg/dl; *[2] Angaben in kg/m²) 41
Tabelle 2-2: angewandte Restriktionsenzyme mit Angaben des Herstellers zum experimentellen Einsatz (Fa. Boehringer, New England labs 43
Tabelle 2-3: Beschreibung der Primer für die PCR der Apo E Exons und Annealingtemperatur Angaben nach Hegele et.al 1992. Die Konzentrationen wurden nach Angaben der Hersteller berechnet 47
Tabelle 2-4: Durchführung der Silberfärbung für DNA-haltiges Polyacrylamid . 51
Tabelle 3-1: Ansatz für 50µl 58
Tabelle 3-2: Ansatz für 20µl 59
Tabelle 3-3: Ansatz für 60µl 61
Tabelle 3-4: Ergebnisse der Sequenzanalyse der Patienten 1-11 62
Tabelle 4-1: Verteilung der Isoformen des Apo E im Patientengut 77

1 Einleitung

In den westlichen Industrinationen stellen die Herz-Kreislauf-Erkrankungen die Haupttodesursache dar.

Auf dem Boden artheriosklerotisch veränderter Gefäßwände, die ohne Zweifel im Zusammenhang mit einem Ungleichgewicht im Lipidhaushalt einher gehen, erhöht sich das Risiko stark an koronarer Herzkrankheit (KHK), cerebrovaskulärer Insuffizienz, peripherer arterieller Verschlußkrankheit (pAVK) und Herzinfarkt zu erkranken.

Ursachen der Störung der Lipidhomöostase sind mannigfaltig. Im Rahmen intensiver Forschung konnte in den letzten zwei Jahrzehnte eine zentrale Rolle des Apolipoproteins E in hypo-, dys- und hyperlipidämischen Stoffwechsellage aufgezeigt werden. Es wurden verschiedene Isoformen für das Apo E nachgewiesen, die unterschiedliche Einflüsse auf den Lipidstoffwechsel haben.

1.1 Fettstoffwechsel

Lipide nehmen im Organismus eine zentrale Rolle ein. Sie besitzen vier bedeutende physiologische Aufgaben. Die Phospholipiden und Glykolipiden stellen sie einen wichtigen Bestandteil biologischer Membranen dar. Die Steroide sind Bausteine von Hormonen und zellulären Signalmolekülen. Durch kovalente Bindungen von Fettsäuren an viele Proteine können diese so an spezifische Membranregionen dirigiert werden. Als Brennstoffmoleküle (Triacylglyceride) stehen sie dem Körper als Energiereserve zur Verfügung (118).

1.1.1 Lipoproteine

Da Triglyceride und Cholesterinester stark hydrophob sind, müssen sie für ihren Transport in der wasserlöslichen Phase des Blutes in sogenannte Lipoproteinpartikel eingebunden sein.

Allen Lipoproteinen gemeinsam ist das Bauprinzip bestehend aus einem lipophilen Kern mit den Triglyceriden, apolaren Cholesterinestern und anderen fettlöslichen Substanzen (z.B. Vitamine) und aus einer hydrophilen Hülle. Diese setzt sich aus polaren Phosopholipiden, deren hydrophiler Kopf nach außen

gerichtet ist, und freiem Cholesterin zusammen. Die notwendige Hydrophilie der Oberfläche wird außerdem durch Apolipoproteine erreicht. Der Zusammenhalt zwischen Hülle und Kern wird durch nicht kovalente Bindungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kräfte aufrechterhalten. Dadurch ist ein leichter Austausch von Lipiden zwischen den Lipoproteinen möglich.

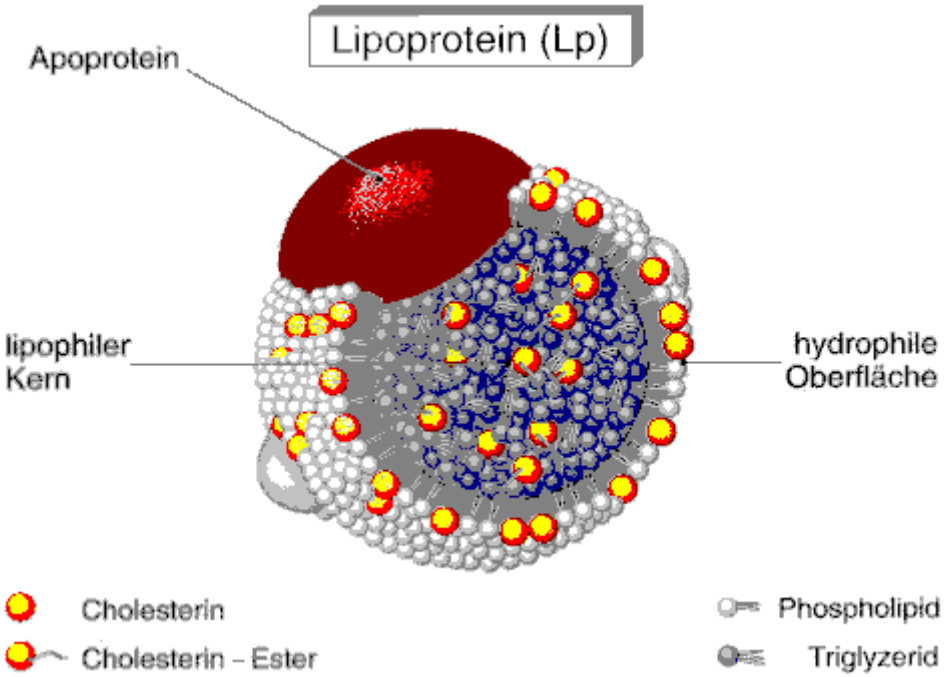


Abbildung 1-1: Schema zum prinzipiellen Aufbau eines Lipoproteinpartikels (50)

Das Spektrum der Lipoproteine setzt sich aus Partikeln zusammen, die sich in Dichte, Größe, Lipid- und Apolipoproteinzusammensetzung unterscheiden. Mit zunehmenden Protein- und abnehmenden Lipidgehalt steigt die Dichte der Lipoproteinpartikel. Entsprechend ihrer Dichte ordnen sich die Lipoproteine in sechs charakteristische Hauptfraktionen mit folgenden chemischen Zusammensetzungen (63) :

Lipoprotein	Protein	L	FC	CE	TG	PL
Chylomikronen	2	5	1	2	90	5
VLDL	10	16	7	13	54	16
IDL	17	20	9	34	20	20
LDL	23	21	11	41	4	21
Lp(a)	34	18	9	36	3	18
HDL	40-56	23-35	3-5	13-15	3-5	30

Tabelle 1-1: Klassifikation der Lipoproteine in % der Lipoproteinmassen (63, 59)

1.1.1.1 Chylomikronen

Bei der Verdauung werden im Jejunum und Ileum die aufgenommenen Fette zu Monoacylglycerin umd Fettsäuren gespalten, resorbiert und in der Mukosazelle neu zusammengesetzt (59, 47). Diese neusyntetisierten Partikel, Chylomikronen, besitzen als Hauptapolipoproteinkomponente Apo B-48, sind triglyceridreich und mit weniger als 2% haben sie einen sehr geringen Proteinanteil. Sie dienen also in der Resorbtionsphase dem Transport von v.a. Triglyceriden, Phospholipiden und Cholesterin. Ihr Durchmesser variiert abhängig von der transportierten Triglyceridmenge zwischen 80 und 500nm.

Nach der Chylomikronsynthese gelangen die beladenen Lipoproteine in die Lymphe und mit Umgehung der Leber über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf. Von den HDL nehmen die Chylomikronen Apolipoprotein C auf. Apo C-2 dient als Kofaktor des endothelständigen Enzyms Lipoproteinlipase (LPL) (63). Unter der Einwirkung der LPL werden die TG-Anteile im Kern hydrolisiert. Es entstehen dabei freie Fettsäuren, die ins Fettgewebe und in die Muskelzellen aufgenommen werden, um dort als Energieträger zur Verfügung zu stehen. Während dieser Lipolyse geht das Apolipoprotein E von HDL auf die Chylomikronen über, die deutlich an Größe im Verlauf der Lipolyse verlieren. Die LPL bleibt nach der Lipolyse an die Remnants gebunden. Diese Apo E-reichen aber TG-armen Partikel werden Chylomikronen-Remnants genannt. Über einen speziellen Rezeptor werden sie von der Leber aufgenommen. Im Gegensatz zum Apo B-48 besitzt das Apo E die rezeptorbindende Domäne und vermittelt

zusammen mit der LPL damit die Aufnahme der Remnants in die Hepatozyten durch den spezifischen Rezeptor, das sog. LRP („LDL receptor-related protein“) (8, 135,139).

1.1.1.2 Very Low Density Lipoproteins (VLDL)

VLDL sind ebenfalls Lipoproteine mit sehr geringer Dichte im Bereich von 0,94-1,006g/dl und einem hohen TG-Anteil. Sie werden in der Leber synthetisiert und in die Blutbahn abgegeben. Die integrale Proteinkomponente der VLDL ist das Apolipoprotein B-100. Neben Phospholipiden und freiem Cholesterin liegen in der Hülle außerdem auch Apolipoprotein C und E vor. In ihrer Funktion ähneln sie den Chylomikronen. Sie verteilen die von der Leber synthetisierten endogenen Triglyceride im Organismus (59). Während der Blutzirkulation nehmen die VLDL von den HDL weitere Apolipoproteine C und E auf. In der Peripherie wird die endothelständige LPL von dem Apo C-2 aktiviert und ca. 90% der Triglyceride der VLDL werden so hydrolisiert. Die durch die Lipolyse entstandenen kleineren, cholesterinreichen Partikel weisen eine höhere Dichte auf als die VLDL. Sie werden als „VLDL-Remnants“ oder synonym als „Intermediate Density Lipoproteins“ (IDL) bezeichnet.

1.1.1.3 Intermediate Density Lipoproteins (IDL)

Durch Lipolyse der VLDL entstehen cholesterinesterreiche Überreste mit einer Dichte von 1,006-1,019g/dl. Die eine Hälfte der IDL wird von der Leber mit Hilfe des Apo E über den LDL-Rezeptor oder den VLDL-Rezeptor aufgenommen (107). Die andere Hälfte wird unter Abspaltung des Apo E zu Lipoproteinen geringer Dichte (LDL) umgewandelt.

1.1.1.4 Low Density Lipoproteins (LDL)

LDL-Partikel entstehen beim intravasalen Abbau der VLDL/ IDL. Mit einer Dichte zwischen 1,006-1,063g/dl sind die LDL die wichtigsten Cholesterin-Carrier des Blutes. In ihrem Kern findet man bis zu 1500 veresterte Cholersterinmoleküle. Dieser stark hydrophobe Kern wird von einer Hülle aus Phospholipiden, freiem Cholesterin und einem einzigen Apolipoprotein B-100 umgeben, welches von den Zielzellen erkannt wird. Die Funktion der LDL besteht in dem Cholesterintransport zu den peripheren Geweben, wo diese von den Zellen

aufgenommen werden und für den Aufbau von Zellmembranen sowie zahlreichen Stoffwechselvorgängen verwendet wird. Außerdem spielen die LDL eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle der de novo-Cholesterinsynthese (118). Die Regulation der LDL-Aufnahme und die Verbindung zur Cholesterinsynthese wird im Kapitel 1.1.3.1 genauer erläutert.

1.1.1.5 High Density Lipoproteins (HDL)

Neu synthetisierte, sog. naszierende HDL, sind diskuidal und entstehen größtenteils in der Leber oder aber in der Darmmukosa. Aufgrund des hohen Protein- und des geringen Lipidanteils haben sie eine hohe Dichte von 1.063-1.21g/dl. Wie der Tabelle-1-1 zu entnehmen ist besteht der größte Anteil ihres Gewichtes aus Protein, hauptsächlich Apo A-1, Apo A-2 und Apo E. Die Funktion der HDL besteht im reversen Cholesterintransport von der Peripherie zur Leber zurück. Die diskoidalen HDL-Präkursoren absorbieren an den Membranen peripherer Zellen freies Cholesterin, das durch die Lecitin Cholesterin Acyltransferase (LCAT) verestert wird. Die entstehenden CE sind hydrophober als freies Cholesterin und werden im Kern der wachsenden Partikel angereichert. Auf diese Weise entstehen aus den diskoidalen schließlich größere, spärische HDL-Partikel.

1.1.1.6 Lipoprotein (a)

Lipoprotein (a) mit einer Dichte von 1,05-1,12g/dl gilt als eine Variante der LDL, dem es in Lipidzusammensetzung und Struktur ähnelt. Neben dem charakteristischen Apolipoprotein (a) findet man auch das Apolipoprotein B-100, das mit dem Lp(a) durch Disulfidbrücken verbunden ist. Aufgrund epidermiologischer Studien und biochemischen Untersuchungen konnte eine Assoziation zwischen erhöhtem Lp(a) und dem Auftreten von KHK gezeigt werden. Lp(a) gilt daher heute als unabhängiger Faktor für die Entstehung von Atheriosklerose (7). Lp(a) ist kein Stoffwechselprodukt der anderen Lipoproteine, sondern hat einen getrennten Stoffwechsel. Über weitere Stoffwechselvorgänge und physiologische Funktionen von Lipoprotein (a) ist bislang noch keine gesicherte Aussage möglich.

Eine Beteiligung bei der Wundheilung wurde von Goldstein und Brown vermutet, indem das Apo A eine Verbindung zwischen dem Fibringerinnsel und dem Lp(a)

herstellt und dessen Cholesterin zur Membranerneuerung beitragen könnte. Das der LDL-Rezeptor und das LRP eine bedeutsamere Rolle beim Abbau von Lp(a) im Gegensatz zur unspezifischen Aufnahme des Lipoprotein (a) in Zellen spielt, konnte von T. Reblin et al. nicht gezeigt werden (102).
Als Normwerte für Lp(a) werden 15-35mg/dl angegeben. Bei höheren Werten steigt das Risiko an KHK zu erkranken.

1.1.2 Apolipoproteine

Die verschiedenen Apolipoproteine befinden sich auf der Hülle der Lipoproteine. Dort erfüllen sie verschiedene Aufgaben. Unverzichtbar sind die Apolipoproteine bei der Stabilisierung von Lipidemulsionen und beim Transport von hydrophilen Lipiden im wässrigen Milieu. Außerdem bestimmen die verschiedenen Apolipoproteine den Stoffwechsel der jeweiligen Lipoproteine. Sie geben den Lipoproteinen eine antigene Struktur, so daß sie für die Zielzellen unterscheidbar werden. So kommt es zu einem gerichteten Transport der Lipide. Außerdem können Apolipoproteine als Kofaktoren von Enzymen, die den Lipidanteil der Lipoproteine umsetzen, deren Aktivität beeinflussen.
Die im Kapitel Lipoproteine bereits erwähnten Apolipoproteine werden anhand der folgenden Tabelle 1-2 zusammengefaßt vorgestellt (50, 63).

Apolipoprotein	Lipoproteinzuordnung	spezifischer Funktionsbereich
A-1	Chylomikronen	Aktivierung der LCAT;
A-2	HDL	HDL-Rezeptorbindung;
A-4		Triglyceridstoffwechsel
B-48	Chylomikronen	Chylomikronensynthese- und Sekretion
B-100	VLDL	Sekretion von Triglyceriden und
	IDL	Cholesterin aus Leber undDünndarm;
	LDL	LDL-Rezeptorbindung
C-1	Chylomikronen	Blockierung hepatischerRezeptoren;
	VLDL	LCAT-Aktivierung;
C-2	IDL	LPL-Aktivierung
C-3	HDL	Blockierung hepatischer Rezeptoren
E 2-4	Chylomikronen	Ligand für den B/E- sowie E-
	VLDL	Rezeptor;
	IDL	Ausschleusung von Cholesterin aus
	HDL	peripheren Zellen

Tabelle 1-2: Zuordnung der wichtigsten Apolipoproteine zu ihren Lipoproteinen und ihren spezifischen Funktionen (63)

1.1.3 Stoffwechsel der Lipoproteine

Der Stoffwechsel der Lipoproteine wird in einen exogenen und in einen endogenen Weg unterteilt. Diese Stoffwechselwege beeinflussen maßgeblich die Cholesterin-Homöostase im Organismus.

1.1.3.1 Cholesterin

Cholesterin ist ein Steroid, das im tierischen Organismus hauptsächlich als Bestandteil von Zellmembranen und Mitochondrien vorkommt. Dem Organismus steht neben dem mit der tierischen Nahrung aufgenommenen Cholesterin auch das körpereigene synthetisierte zur Verfügung. Fast alle Gewebe des tierischen

Organismus sind in der Lage, Cholesterin aus aktivierter Essigsäure herzustellen. Die körpereigene synthetisierte Cholesterinmenge liegt bei normaler Ernährungs- und Stoffwechsellage mit 500-1000g deutlich über der zugeführten Menge von etwa 200-500g, die nur 50% der insgesamt aufgenommenen Menge darstellt. Dem gegenüber steht ein Verbrauch der Körpergewebe von etwa 500-600g pro Tag, so daß die Ausscheidung von überschüssigem Cholesterin notwendig ist. Dies geschieht in Form von Gallensäure, die etwa 1% Cholesterin enthält. Das mit der Galle in den Darm gelangte Cholesterin ist an der Resorbtion der Lipide beteiligt und unterliegt dem enterohepatischen Kreislauf. Der größte Anteil des mit der Gallenflüssigkeit in den Darm aufgenommenen Cholesterins, ca. 1g pro Tag, wird durch Bakterien zu Koprosterin reduziert und mit der Faeces ausgeschiedenen. Über die Talgdrüsen der Haut wird ein geringer Anteil des Cholesterins ausgeschieden. Obwohl eigentlich kein physiologischer Bedarf an exogen zugeführten Cholesterin besteht, wird in den westlichen Industrinationen oft ein großer Anteil des Cholesterins mit der Nahrung aufgenommen. Dieses gilt als wichtige Störgröße für das Gleichgewicht des Cholesterinstoffwechsels.

Das körpereigene Cholesterin wird hauptsächlich in Leber und Darm aus ubiquitär vorhandenem Acetyl-CoA synthetisiert. Mit Hilfe einer Synthetase entsteht Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA), welches unter Einwirkung der HMG-CoA-Reduktase über viele weitere Teilschritte zur Cholesterinbildung genutzt wird. Die HMG-CoA-Reduktase ist das Schrittmacher-Enzym der Cholesterinsyntese. Um die beiden beschriebenen Cholesterinquellen dem Bedarf der Zellen anzupassen, sind Regelungen mit negativer Rückkopplung vorhanden. Bei einer hohen exogenen Cholesterinaufname wird die endogene Cholesterinproduktion inhibiert. Freies Cholestrien bindet an eine spezielle Promotorsequenz am Gen der HMG-CoA-Reduktase (6). Die Synthese der HMG-CoA-Reduktase in der Leber wird gehemmt. Gleichzeitig werden bereits synthetisierte Enzymmoleküle inaktiviert. Ein steigender Cholesterinspiegel hemmt außerdem die Genexpression für die Synthese der LDL-Rezeptormoleküle an den Ribosomen und so geht die Anzahl der Rezeptoren auf der Membran zurück. Es kann also weniger LDL-Cholesterin in die Zellen aufgenommen werden. Außerdem kann zur Einstellung eines normalen Spiegels für freies Cholesterin der Mechanismus zur reversiblen

Einspeicherung in Form der Ester über die Regulation der Acyl-CoA-Cholesterin-Acyl-Transferase (ACAT) genutzt werden (50).

Die beschriebenen Regulationsmechanismen gelten für den zellulären Stoffwechsel in der Peripherie. Sie sind für die Erhaltung der Cholesterinhomöostase von entscheidender Bedeutung (64). Für die Leber als zentralem Organ des Lipidstoffwechsels ist die Steuerung komplexer und mit dem Stoffwechsel der Lipoproteine verwoben.

1.1.3.2 Exogener Weg

Der exogene Weg läßt sich in zwei Teile aufteilen:

1. Resorbtion der Lipide durch die Darmmukosa
2. lipoproteinvermittlten Transport zur Leber.

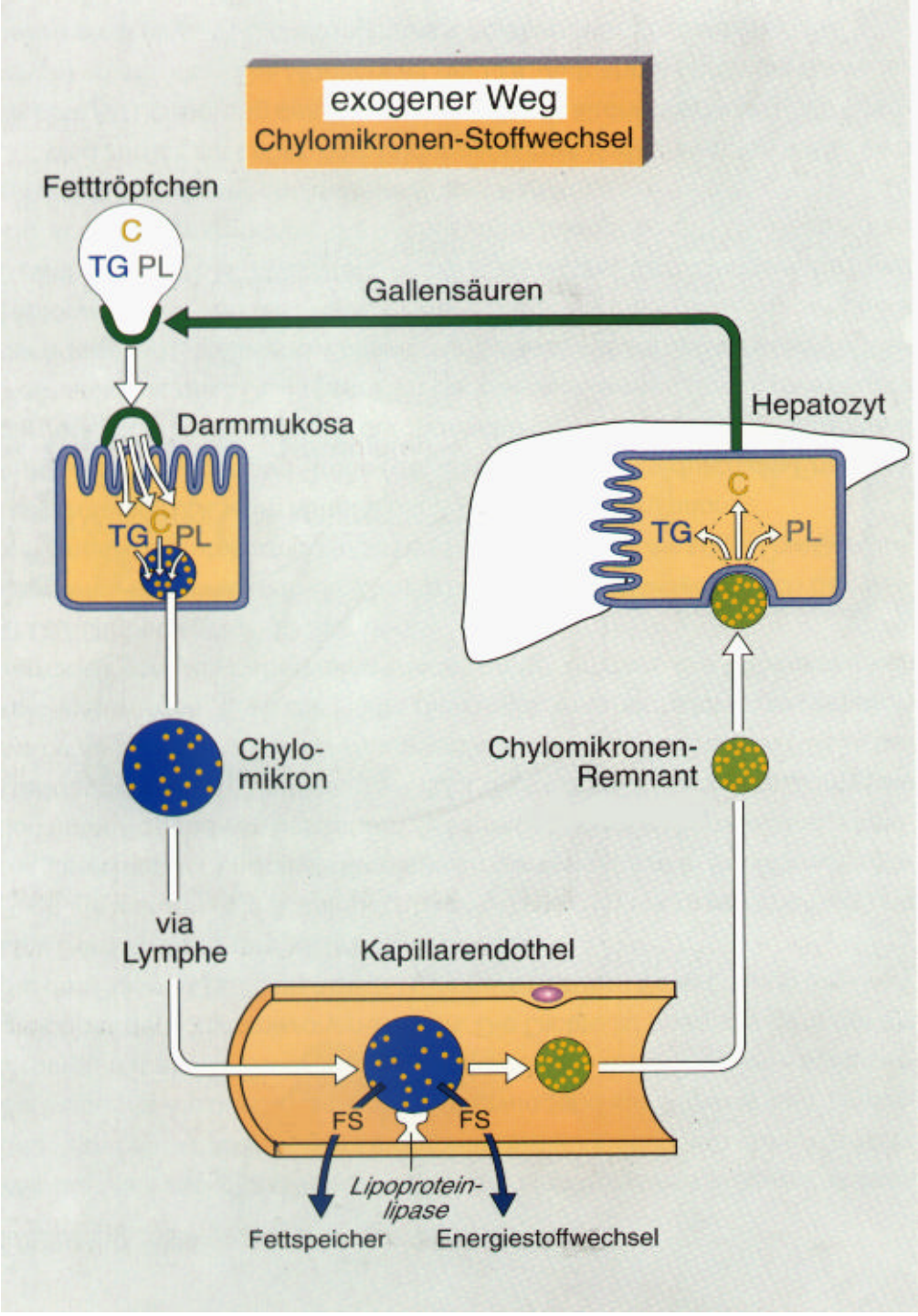


Abbildung 1-2: exogener Weg(50)

Die mit der Nahrung aufgenommenen Lipide bestehen hauptsächlich aus Triglyceriden und Cholesterin. Diese werden durch die Lipasen der Speicheldrüsen und des Pankreas in Di- und Monoglyceride sowie freie Fettsäuren zerlegt. Die Bildung von kleinsten gemischten Mizellen aus Cholesterin, Pospholipiden, Diglyceride und freien Fettsäuren entstehen unter Einwirkung der sezernierten Gallensäure. Nach Resorbtion werden sie dann wieder in der Mukosazelle resynthetisiert (reverestert) und mit einer Proteinhülle umgeben. Diese Partikel (Chylomikronen) werden aus der Zelle ausgeschleust und gelangen über die Darmlymphe und den Ductus thoracicus in das venöse Blut. Die Chylomikronen kommen so mit der endothelständigen Lipoproteinlipase (LPL), die sich auf der luminalen Seite von Kapillaren im Muskel- und Fettgewebe befindet, in Kontakt. Die LPL hydrolisiert einen Teil der Triglyceride im Kern der Chylomikronen zu Glycerin und freien Fettsäuren, die dann über Albumin dem peripheren Gewebe zur Verfügung stehen. So können Fett- und Muskelgewebe die freien Fettsäuren zur Energiegewinnung oder Energiespeicherung in ihre Zellen aufnehmen. Das Apolipoprotein C-2, das sich in der Hülle der Chylomikronen befindet, ist als Aktivator ein obligater Kofaktor der LPL. Ein funktioneller Defekt oder das Fehlen des Apo C-2 hat somit eine Chylomikronämie zur Folge.

Durch diesen Prozeß sind die Chylomikronenreste (Remnants) deutlich kleiner geworden. Die Zusammensetzung der Proteinhülle ändert sich außerdem. Während der Lipolyse wird Apo E von den HDL übernommen und Apo A-1, Apo A-4 und Apo C an diese abgegeben (63). Das in den Chylomikronen transportierte Cholesterin verbleibt in den Remnants und wird mit diesen über den Chylomikronen-Rezeptor in die Leberzellen inkorporiert und dort zerlegt. Der Rezeptor kann die Remnants durch das Apo E und die gebundene LPL erkennen und binden (5). Dieser Rezeptor ist wie bereits erwähnt entweder der LDL-Rezeptor oder das LRP. Die durchschnittliche Lebensdauer der Chylomikronen wird mit etwa 30 Minuten beschrieben (50). Das aufgenommene Cholesterin kann von den Hepatozyten zu Gallensäure und ihren Salzen verstoffwechselt werden, die dann zusammen mit gekoppelten Cholesterin in den Gastro-Intestinaltrakt abgegeben werden.

Das Cholesterin kann aber auch in den endogenen Stoffwechselweg eingeschleust werden.

1.1.3.3 Endogener Weg

Zur Aufrechterhaltung der Energiegewinnung kann auch die Leber aus aufgenommenen oder synthetisierten Lipiden Lipoproteine bilden und ausschleusen, um periphere Gewebe mit Triglyceriden und Cholesterin zu versorgen.

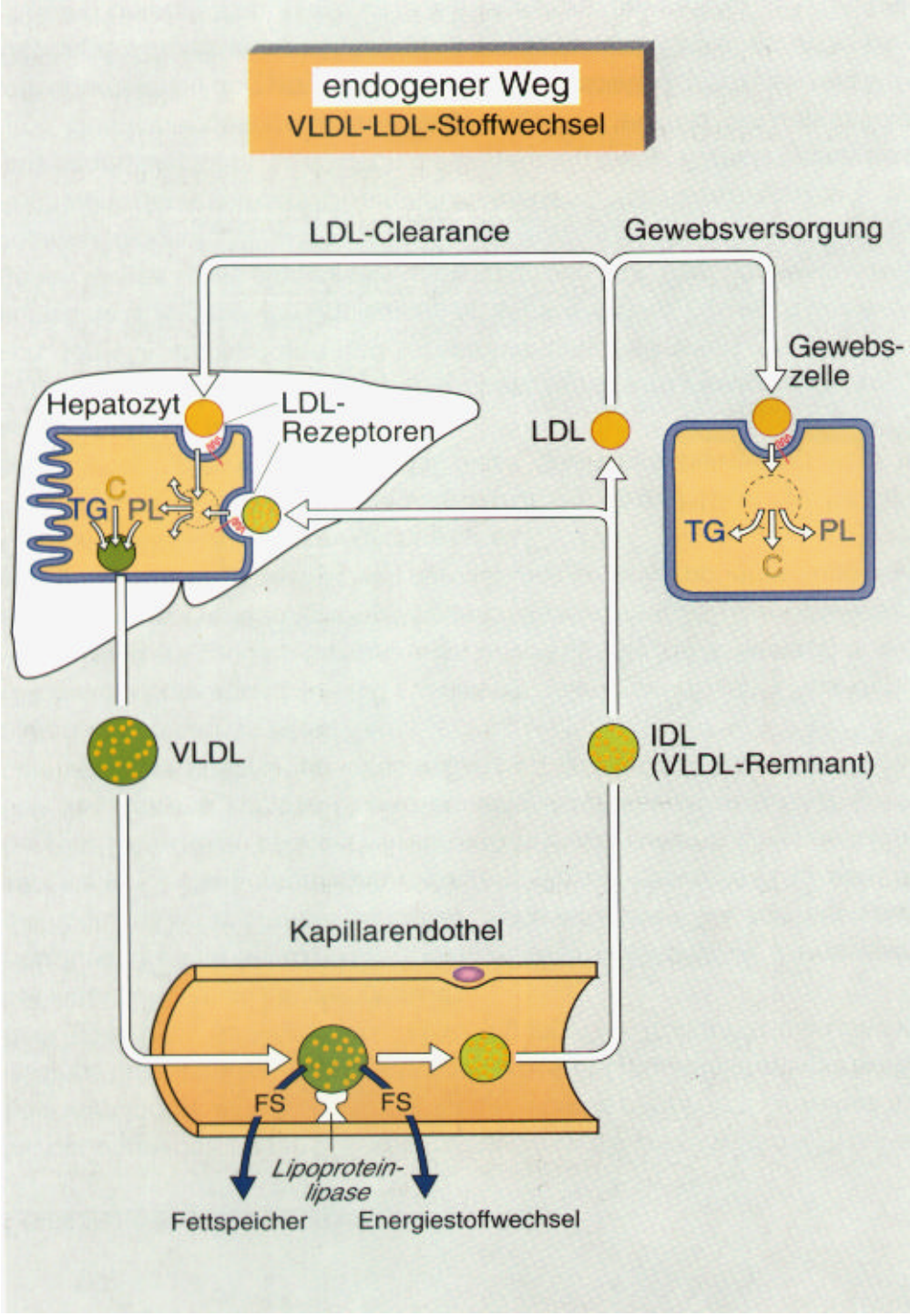


Abbildung 1-3: endogener Weg (50)

Diese werden als VLDL ins Plasma abgegeben, wo sie bis zu 12 Stunden zirkulieren (50). Die VLDL kommen während der Mikrozirkulation mit der LPL in Kontakt, die über Proteoglykane am Endothel gebunden ist. Diese wird durch das Apo C-II aktiviert (6). Die LPL katalysiert die Freisetzung von freien Fettsäuren aus dem Kern der VLDL. Etwa 90% der Triglyceride werden hydrolisiert (63). Die VLDL werden durch die Lipolyse zu Partikeln, die cholesterinesterreich sind und Apo E besitzen. Sie haben größeren Dichte und werden nun als Intermediate Density-Lipoproteins (IDL) bezeichnet.

Diese IDL oder auch „VLDL-Remnants“ können nun auf zwei Wegen weiter verstoffwechselt werden. Sie werden via LDL-Rezeptor in die Hepatozyten aufgenommen. Dafür wird das in der Hülle vorhandene Apo E und die gebundene LPL als Ligand benötigt. Nicht direkt aufgenommene IDL können in LDL umgewandelt werden. Die IDL verlieren dabei ihren Apo E-Anteil und nehmen von den HDL Cholesterinester mit Hilfe des Cholesterinestertransferproteins (CETP) auf. Bis zu 70% des im Blut transportierten Cholesterins befindet sich in den Kernen der LDL (50). Damit wird auch ihre Aufgabe deutlich, denn sie sichern den Gewebszellen die kontinuierliche Versorgung mit Cholesterin. Aufgrund ihrer geringen Größe werden die LDL durch die Endothelbarrieren filtriert und gelangen zu den Geweben, die LDL mittels dem LDL-Rezeptor aufnehmen können. Dazu gehören wie erwähnt die Hepatozyten, aber auch Myozyten, Nebenniere- und Gonadengewebe und das Monozyten/ Makrophagensystem.

1.1.3.4 Cholesterinaufnahme über LDL-Rezeptor

Der LDL-Rezeptor ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 115kD. Es besteht aus fünf Domänen. Die negativ geladene, erste, aminoterminale Domäne dient der Interaktion mit dem positiv geladenem Apo B-100, also der Bindung von LDL. Das corboxyterminale Ende, die fünfte Domäne, befindet sich auf der Cytosolseite der Plasmamembran. Hier kontrolliert es die Anreicherung von Rezeptoren in sog. coated pits (Stachelsaumgrübchen). Die übrigen Domänen verankern den Rezeptor in der Plasmamembran und unterstützen die Bindung zwischen LDL und dem Rezeptor.

Die durchgeführten Untersuchungen von Joseph Goldstein und Michael Brown verschafften einen Einblick in die Regulation des Cholesterinstoffwechsels über den LDL-Rezeptor in Nicht-Leberzellen (14). Diese Körperzellen verwenden Cholesterin aus dem Plasma. Als Transportmedium benutzt das Cholesterin wie bereits dargestellt die LDL.
Die Cholesterinaufnahme erfolgt in vier Schritten (118):

1. Die im LDL enthaltene Apolipoproteinkomponente B-100 bindet an das Rezeptorprotein auf der Membran der Zielzellen. Die Rezeptoren befinden sich in spezifischen Membranbereichen, die als Stachelsaumgrübchen (coated pits) bezeichnet werden.

2. Der Komplex aus Rezeptor und LDL wird per Endozytose aufgenommen. Die Plasmamembran in der Nähe des Komplexes stülpt sich ein und verschmilzt zu einem Endozytoseversikel.

3. Die Endozytoseversikel verschmelzen mit Lysosomen, die viele Verdauungsenzyme enthalten. Das Apolipoprotein B-100 wird zu freien Aminosäuren hydrolisiert und die Cholesterinester werden von einer Lipase in freies Cholesterin und Fettsäuren zerlegt. Der LDL-Rezeptor wandert unversehrt zur Plasmamembran zurück. Ein kompletter Rezeptorumlauf benötigt etwa 10 Minuten.

4. Das freie Cholesterin wird nun in der Zelle in verschiedenen Abläufen verstoffwechselt und ist eine wichtige regulatorische Größe im Cholesterinstoffwechsel (14). Es kann zur Membransynthese oder zur Synthese anderer Stoffe verwendet werden. Mit Hilfe der ACAT wird die Reaktion katalysiert, die freies Cholesterin in eine Speicherform bringt. Dabei wird die ACAT durch freies Cholesterin im Zytoplasma der Zelle aktiviert.

Alle LDL, die nicht vom peripheren Gewebe aufgenommen werden, müssen aus dem Blutstrom durch die Leber entfernt werden. Dieses wird als „LDL-Clearance“ bezeichnet.

1.1.3.5 Reverser Cholesterintransport

Die Leber ist das einzige Organ, das Cholesterin direkt oder als Bestandteil der Gallensäure ausscheiden kann. Deshalb muß das Cholesterin aus den peripheren Zellen zur Leber transportiert werden. Dieses wird als reverser Cholesterintransport bezeichnet (35). An diesem Transport sind die HDL maßgeblich beteiligt. Sie entstehen aus kleinen Vorläufern, die als „nascente HDL“ von Leber- und Darmzellen gebildet werden. Diese bestehen aus freiem Cholesterin, Phospholipiden und den Apolipoproteinen A-1, A-2, C und E. In der Peripherie nehmen diese HDL dann Cholesterin von den Gewebszellen auf. Das Enzym LCAT verestert das Cholesterin und es wird im Kern der HDL deponiert. Ein Teil der mit Cholesterin beladenen HDL überträgt ihr Cholesterin auf größere Lipoproteine mit Hilfe der LCAT bevorzugt auf die IDL. Der Cholesterinanteil der IDL werden wie erwähnt entweder von den Hepatozyten aufgenommen oder in den LDL transportiert und rezeptorvermittelt eliminiert. HDL kann auch rezeptorvermittelt durch den Mechanismus der selektiven Lipidaufnahme direkt von der Leber aufgenommen werden (64). Dabei bindet HDL an den HDL-Rezeptor (1), und nur einige Komponenten der HDL werden in die Zelle aufgenommen. Der delipidierte Rest dissoziiert vom Rezeptor und nimmt wieder an der Zirkulation teil. Der größte Anteil der selektiven Aufnahme wird in der Leber und in den steroidsynthetisierenden Organen beobachtet. Den HDL wird eine wichtige Funktion im Cholesterinstoffwechsel beigemessen. Durch ihre geringe Größe gelangen sie leicht ins Interstitium und übernehmen dort von Fibroblasten, Myozyten, Endothelzellen und Makrophagen Cholesterin zur Entsorgung des peripheren Gewebes (65). Ihnen kommt so eine endothelprotektive und damit antiatherogene Funktion zu, denn sie unterstützen die Makrophagen bei der Elimination von Cholesterin aus den Gefäßwänden und wirken so der Akkumulation von Cholesterin entgegen.

1.2 Apolipoprotein E und die Funktion im Fettstoffwechsel

Das Gen für das Apolipoprotein E ist auf dem Chromosomen 19 lokalisiert (21, 91). Es ist 3,7kb lang (92) und besteht aus vier Exons und drei Introns (85).

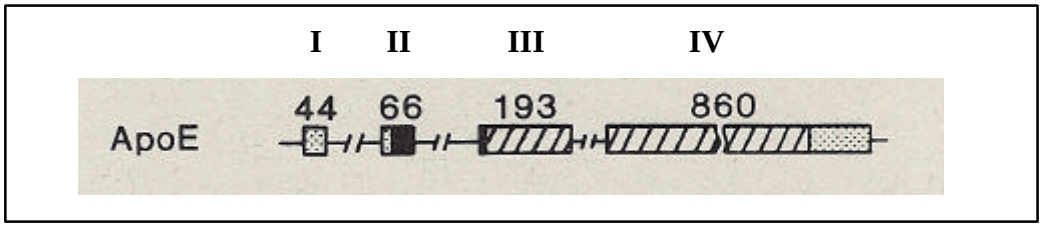


Abbildung 1-4: Genstruktur des Apo E
(gepunkteter Balken liegt nicht im 5'translatiertem Bereich;
schwarzer Balken zeigt die Signalsequenz;
offener Balkon entspricht dem Pro-Sequenz,
diagonaler Balken zeigt die Sequenz für das funktionstüchtige Protein) (97)

Die vier Exons kodieren zunächst ein 317-aminosäurelanges Proprotein. Die Signalsequenz aus 18 Amininosäuren wird abgespalten (84, 121).

Als Syntheseorte für Apo E konnten verschiedene Gewebe im Körper identifiziert werden.

Die größte Menge an mRNA für Apo E wurde in der Leber, dort allem in den Parenchymzellen gefunden. Die Leber ist der Hauptsyntheseort für Apo E (78).

Die zweitgrößte Synthesemenge befindet sich im Gehirn, vor allem sind die Astrozyten verantwortlich für die Apo E Synthese im ZNS (94).

Im geringerem Umfang sind auch glatte Muskelzellen an Apo E Synthese beteiligt (23, 81), z.B. im gastrointestinal Trakt.

Apo E der Proteinbestandteil von vielen Plasmalipoproteinen, wie bereits erwähnt von Chylomikronen, Chylomikronen-Remnants, VLDL, IDL und einer Subklasse von HDL, ist wesentlich an ihrem Transport zwischen verschiedenen Geweben und Zellen beteiligt (75).

Im Gehirn zum Beispiel hat das Apo E aufgrund der zentralen Funktion im Lipidtransport und Lipidmetabolismus eine wichtige Funktion.

Für die Entwicklung des ZNS, d.h. Neu- und Resynthese der Dendriten ist es essentiell, daß Menbranbestandteile reorganisiert und zur Verfügung gestellt werden (26, 61, 95).

Das im Wachstums- oder im Reparaturprozeß z.B. nach Verletzung befindliche neuronale Gewebe zeigt eine vermehrte Apo E Synthese sowohl im zentralen als auch im peripheren Gewebe (54, 96, 116).

Dem Apo E kommt eine wesentliche Rolle im Lipidstoffwechsel zu, da es die Interaktion zwischen Rezepter und Apo E beladenen Lipoproteinen vermittelt.

Bis heute sind fünf verschiedene Rezeptoren bekannt, an die Apo E bindet und die sich in Struktur und Funktion ähneln (4), megalin Igp 330 (4), apo e receptor 2 (apo er_2) (60), very low density LDL receptor (VLDL –R) (17), LDL –R (10, 16, 55) und LDL-receptor–related protein (LRP) (9).

Somit wird die zelluläre Aufnahme der Apo E reichen Lipoproteinen / Remnants ermöglicht und eine Akkumulation von triglyceridreichen Partikeln im Plasma verhindert (3).

Bei defekten Apo E kann es also nun zur Hyperlipidämie mit vielseitigen Folgen kommen.

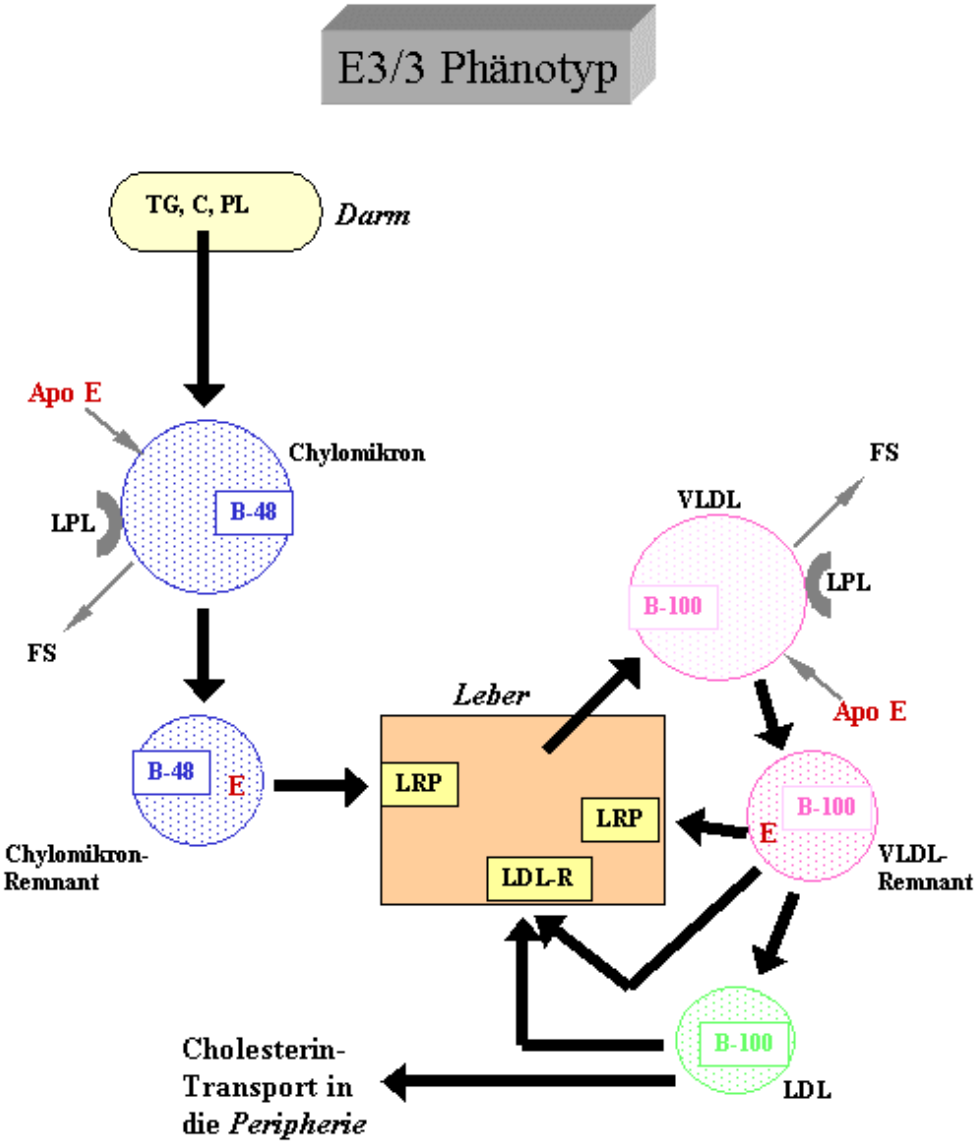


Abbildung 1-5: Einfluß von Apo E-3/3 im Fettstoffwechsel (22)

Um die minimalste Struktur im Apo E zu definieren, die für eine normale Rezeptorbindungsaktivität notwendig ist, wurden progressive Deletionsversuche am Carboxylende des Apo E durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die 171-183 Region auf dem Apo E eine wichtige Rolle für die Aktivität zu sein scheint. Einerseits könnte diese Region eine direkte Interaktion mit dem Rezeptor eingehen und deshalb für eine normale Aktivität notwendig sein. Andererseits ist es auch vorstellbar, das diese Region durch Stabilisierung einer anderen Region indirekt die Aktivität beeinflußt (66, 75).

Es existieren verschiedene Isoformen, die durch genetischen Polymorphismus und posttranslationelle Modifikation mit Neuraminsäure und Glykosylierung entstehen (136). Drei häufige und zahlreiche seltene Allele, deren Mutationen in die Rezeptorbindungsdomäne involviert sind (77), konnten identifiziert werden. Die drei Hauptisoformen Apo E-2, Apo E-3 und Apo E-4 werden durch die Allele ε2, ε3 und ε4 kodiert (100, 101, 134). Sie unterscheiden sich durch verschiedene Aminosäuren in der ersten Base der Codons 112 und 158.

Allel	**Aminosäureposition**		**relative Ladung**	**relative Verteilung der Apo E Allele (78)**
	112	**158**		
Allel ε2	TGC	TGC		Ca. 70-80% von Apo E Genpool
Aminosäure E2	Cys	Cys	0	
Allel ε3	TGC	CGC		Ca. 10-15% von Apo E Genpool
Aminosäure E3	Cys	Arg	+1	
Allel ε4	CGC	CGC		Ca. 5-10% von Apo E Genpool
Aminosäure E4	Arg	Arg	+2	

Tabelle 1-3: strukturelle Unterschiede zwischen den drei häufigsten Apo E Allelen und deren Produkte (42)

Phänotyp	Auftretungshäufigkeit in %	
	Utermann et al. (126, 128)	Menzel et al. (86)
E 4/4	3	2
E 3/3	60	63
E 2/2	1	1
E 4/3	23	20
E 4/2	2	3
E 3/2	12	11
Zahl der Untersuchten	1031	1000

Tabelle 1-4: Auftretungsverteilung der Apo E Phänotypen/Allele anhand zwei Populationsstudien aus den Jahren 1980 und 1983 (75)

Der Wildtyp Apo E-3, der sich bei ca. 60-70% der Bevölkerung nachweisen läßt und eine normolipämische Stoffwechsellage ermöglicht, trägt in Position 112 Cystein und in Position 158 Arginin. Apo E-2 hat in Position 158 Cystein, Apo E-4 hat in beiden Positionen Arginin. Mittels Isoelektrischer Fokussierung können drei homozygote (E2/2, E 3/3, E 4/4) und drei heterozygote (E 3/4, E 2/4 und E 2/3) Phänotypen unterschieden werden. Durch enzymatische Restriktionsanalyse lassen sich die verschiedenen Isoformen auch genotypisch darstellen.

Der genetische Polymorphismus vom Apolipoprotein E hat sowohl Auswirkungen auf den Abbau von den Remnants als auch auf die Konzentration von LDL/HDL-Cholesterin (63) und damit den endogenen und exogenen Cholesterinstoffwechsel. Verglichen mit der Isoform ε3 haben Träger von ε2 niedrigere Cholesterinspiegel, im Gegensatz dazu Träger mit den Isoform ε4 einen höheren Cholesterinspiegel (12).

Außerdem lassen sich bei den genetischen Variationen des Apo E auch verschiedene Apo E Plasmakonzentrationen nachweisen, ε2>ε3 >ε4 und auch die Plasma-Clearence zeigt Isoform spezifische Unterschiede (37, 40).

Populationsstudien beweisen, daß dieser genetische Polymorphismus damit Auswirkungen auf den LDL-Cholesterinspiegel (24) und das Risiko der KHK hat (121).

1.3 Apolipoprotein E-Polymorphismus in Verbindung mit Stoffwechsel-erkrankungen

Für das Apolipoprotein E liegt wie erwähnt ein Polymorphismus vor. Diese Heterogenität vom Apo E ist das Ergebnis von typischerweise drei verschiedenen Apo E Allelen an dem gleichen Genlocus, die sich durch Nukleotidsubstitution der kodierenden Proteinsequenz des Apo E unterscheiden (143). Die drei Ko-Dominanten Allele ε2, ε3 und ε4 sind für ca. 99% der genetischen Varianz verantwortlich (122). Alle übrigen Mutationen des Apolipoprotein E nehmen nur 1% einen sehr geringen Anteil der gentischen Varianz ein und sind sehr selten.

1.3.1 Apolipoprotein E-2

Apo E-2 unterscheidet sich vom Wildtyp durch einen Basenaustausch im Codon 112. Statt Arginin wird Cystein an dieser Stelle eingebaut. Diese Mutation ist mit einer sehr geringen Affinität für den LDL-Rezeptor und dem Chylomikronen-Remnant-Rezeptor verbunden (56, 57, 132). Daher findet man bei Individuen, die homozygot für das Allel ε2 sind, eine Akkumulation der Chylomikronen- und VLDL-Remnants und somit einen hohen Spiegel an Triglyceriden im Plasma (39). Die LDL-Konzentration ist dagegen bei diesen Individuen geringer als bei den Individuen mit den anderen Isoformen. Der verminderte Einstrom von Cholesterin in die Hepatozyten erhöht die Zahl der LDL-Rezeptoren in der Membran der Leberzellen. Dadurch sinkt die LDL-Cholesterin-Konzentration. Außerdem werden weniger Remnants in LDL umgewandelt. Aufgrund der geringeren LDL-Cholesterin-Konzentrationen wird Apolipoprotein E-2 ein kardioprotektiver Effekt zugeschrieben, wenn keine Hyperlipoproteinämie vorliegt (22).

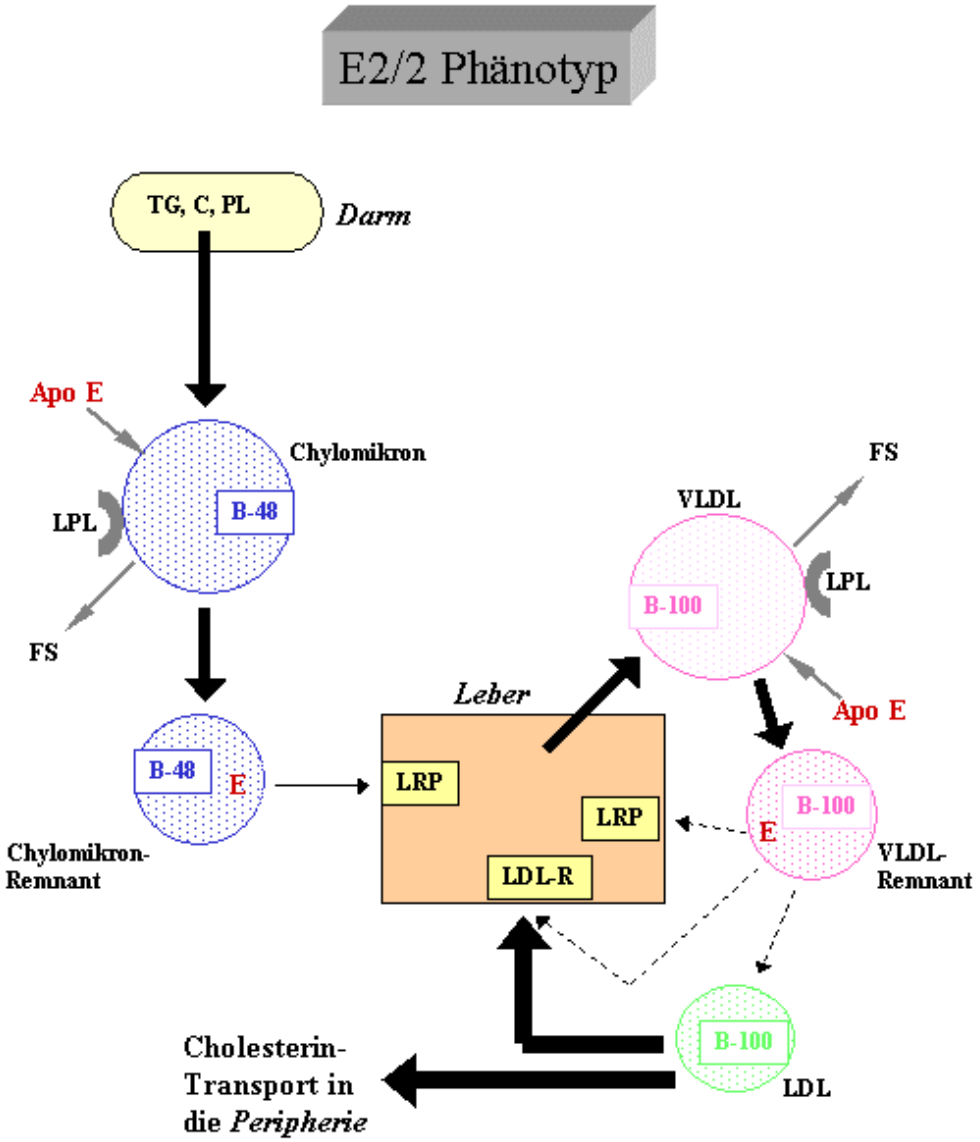


Abbildung 1-6: Einfluß von Apo E-2/2 auf den Fettstoffwechsel (22)

Allerdings entwickeln ca. 1-5% der homozygoten Träger für das Allel ε2 eine Typ-III-Hyperlipoproteinämie nach Frederickson et al. (32).

1.3.1.1 Typ-III-Hyperlipoproteinämie (Typ-III-HLP) und Atheriosklerose

Die familiäre Hyperlipoproteinämie Typ-III gehört pathophysiologisch zu den familiären (primären) Dysbetalipoproteinämien. Der Vererbungsmodus ist polygen.

Es findet eine verstärkte Aufnahme von Chylomikronen-Remmants und VLDL-Remmants in der Leber statt, die somit im Plasma akkumulieren (28, 58).

Das biochemische Charakteristikum dieser Erkrankung ist die bei Ultrazentrifugation und Lipoproteinelektrophorese darstellbare ß-VLDL Fraktion (33). Diese besteht aus Chylomikronen und VLDL-Remmants, die vermehrt Cholesterin und Apo E enthalten (48) und relativ triglyceridarm sind (15, 109).
Im Plasma des Patienten lassen sich erhöhte Werte sowohl für Cholesterin als auch Triglyceride nachweisen, die bis zu einer Konzentration bis 500 mg/dl ähnlich stark ansteigen. Jenseits der 500 mg/dl nimmt die Konzentration der Triglyceride rascher zu (140).
Der primäre molekulare Defekt bei den meisten Patienten mit Typ-III-HLP ist eine Punktmutation im Apo E-3-Gen im Codon 158 (Arg158 -> Cys). 90% aller Typ-III-HLP Patienten weisen einen E2/2 Phänotyp (123, 141) mit rezessiven Erbgang vor, einige seltene Formen von Typ-III-HLP scheinen einen dominanten Vererbungsgang zu haben (115).

Isoelektrische Fokussierung	**Aminosäureaustausch**	**LDL-Rezeptor-Bindungsaktivität in %**	**Referenzen**
E2	Arg^{158}→Cys	<2	25,101,132,
E2	Arg^{136}→Ser	45	131
E2	Lys^{146}→Gln	40	98, 115
E2	Arg^{142}→Leu	80	78, 103
E3	Arg^{142}→ Cys, Cys^{112}→Arg	20	49, 53, 99
E2	Arg^{145}→Cys	45	27, 67, 100
E1	Lys^{146}→Glu	<5	82, 90
E4	Glu^{13}→Lys,Arg^{145}→Cys	<4	67

Tabelle 1-5: Apolipoprotein E Varianten, die zur Typ-III-HLP führen können

Der normale Katabolismus der Remmants ist bei Typ-III-HLP Patienten gestört. Wie aufgeführt ist die Rezeptorbindungsaktivität deutlich reduziert (46, 112, 132), weshalb es dann zur Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie kommt.

Wesentlich ist aber, daß nur ca. 1-5% der Individuen mit einem E2/2 Phänotyp vom Typ-III-HLP betroffen sind (32, 124, 127). Es müssen also noch weitere

Faktoren zur Ausprägung des Krankheitsbildes erforderlich sein, wie z.B. andere HLP-Gene, hormonelle Störungen z.B. Östrogenmangel in der Menopause, Hypothyreose (89), Diabetes Mellitus und andere Umweltfaktoren wie Adipositas.
Als klinische Zeichen gelten die Xanthoma striata palmaris, gelbliche Lipidablagerung der Hand und Fingerlinien, als pathognomonisch (93, 41). Außerdem weisen einige Patienten gelblich tuberöse und tuberoeruptive Xanthome an Ellbogen, Knien und Achillessehne auf.
Die Patienten mit Typ-III-HLP haben ein stark erhöhtes Risiko an Artheriosklerose zu erkranken, die meist auch sehr frühzeitig beginnt und rasch progredient verläuft (13, 44, 87, 119, 130). Folgend steigt damit das Risiko an koronarer Herzkrankheit und auch an peripherer Artheriosklerose (89, 119) zu erkranken.
Im Gegensatz dazu erkranken die Patienten mit familärer Hypercholesterinämie meist nicht an peripherer Artheriosklerose und folgend nicht an der peripheren arteriellen Verschlußkrankheit (74, 79).
Ursächlich für die Artheriosklerose scheint das ß-VLDL zu sein, das sehr atherogen ist (71, 73, 74, 79). Aufgrund der Übersättigung des Plasmas mit den Lipiden kommt es zur Akkumulationen an Gefäßwänden.
Dort werden sie vom Monozyten- Makrophagen-System (36) via LDL-Rezeptor aufgenommen (62). Durch Anreicherungen von Lipiden in den Makrophagen werden diese zu Schaumzellen (105). Es kommt unter Mitwirkung von Adhäsions-Glykoproteinen zum Anheften von Monozyten bzw. Makrophagen und T-Lymphozyten, die in die Intima einwandern (88).
Die Schaumzellen bilden zusammen mit den T-Zellen und glatten Muskelzellen die artheriosklerotischen Frühlesionen, die sogenannten“fatty streaks“ innerhalb der Intima. Nachfolgend tritt eine weitere Zelleinwanderung ein, und es kommt zu einer Proliferation und Veränderung der glatten Muskelzellen unter Bildung einer fibrösen Matrix mit Kollagen und bestimmten Proteoglykanen. Es bildet sich ein fibrös-fettiger Plaque (Intermediärlesion). Die Schädigung des Endothels führt zu einer Regulationsschädigung der koronaren und peripheren Vasodilatation bzw. Konstriktion.
In einer normolipämischen Stoffwechsellage sorgt das HDL mit Apo E für einen Transport von Cholesterin von peripheren Zellen und Makrophagen zu

Zellsystemen, die Cholesterin benötigen oder zur Leber, wo Cholesterin in Form von Gallesalzen ausgeschieden werden kann (72).
Bei Patienten mit dem Typ-III-HLP ist aufgrund der großen Menge von ß-VLDL das Cholesterinrücktransportsystem nicht in der Lage ein Gleichgewicht auszurichten.

1.3.2 Apolipoprotein E-4

Das Apo E-3 Apo E-4 besitzt im Codon 158 in der ersten Position Arginin statt Cystein. Im Gegensatz zum Apo E-2 ist Apo E-4 mit einem hohen LDL-Cholesterin und niedrigen Plasmatriglyceridspiegel assoziiert (114). In vitro weisen Apo E-3 und Apo E-4 die gleiche Affinität zum LDL-Rezeptor auf (83). In vivo wird Apo E-4 viel schneller via Rezeptor aufgenommen als Apo E-3 (40, 83). Apo E-4 liegt ausschließlich als Monomer vor und steht damit vollständig der Interaktion mit Rezeptor zur Verfügung. Apo E-3 und Apo E-2 liegen im Plasma dagegen teilweise als durch Disulfidbrücken stabilisierte Multimere vor. Verglichen mit den Monomeren weisen die Multimere verringerte Rezeptoraffinität auf. Apo E-4 wird also schneller katabolisiert und der Einstrom von Cholesterin und Triglyceriden in die Leber ist erhöht (63).
Die katabolische Umsatzrate der verschiedenen Isoformen korreliert mit der Plasmakonzentration von Apo E: Individuen mit einem E2/2 Phänotyp haben die höchste, E3/3 Individuen mittlere und E4/4 Phänotypen haben die niedrigste Plasmakonzentration (22). Außerdem ist die Umsatzrate von VLDL-Remnants zu LDL höher als bei den anderen Isoformen, daraus resultiert eine höhere LDL-Produktion. Diese führt zur Drosselung der LDL-Rezeptorsynthese und somit zur Anhebung der LDL-Cholesterinkonzentration im Plasma.

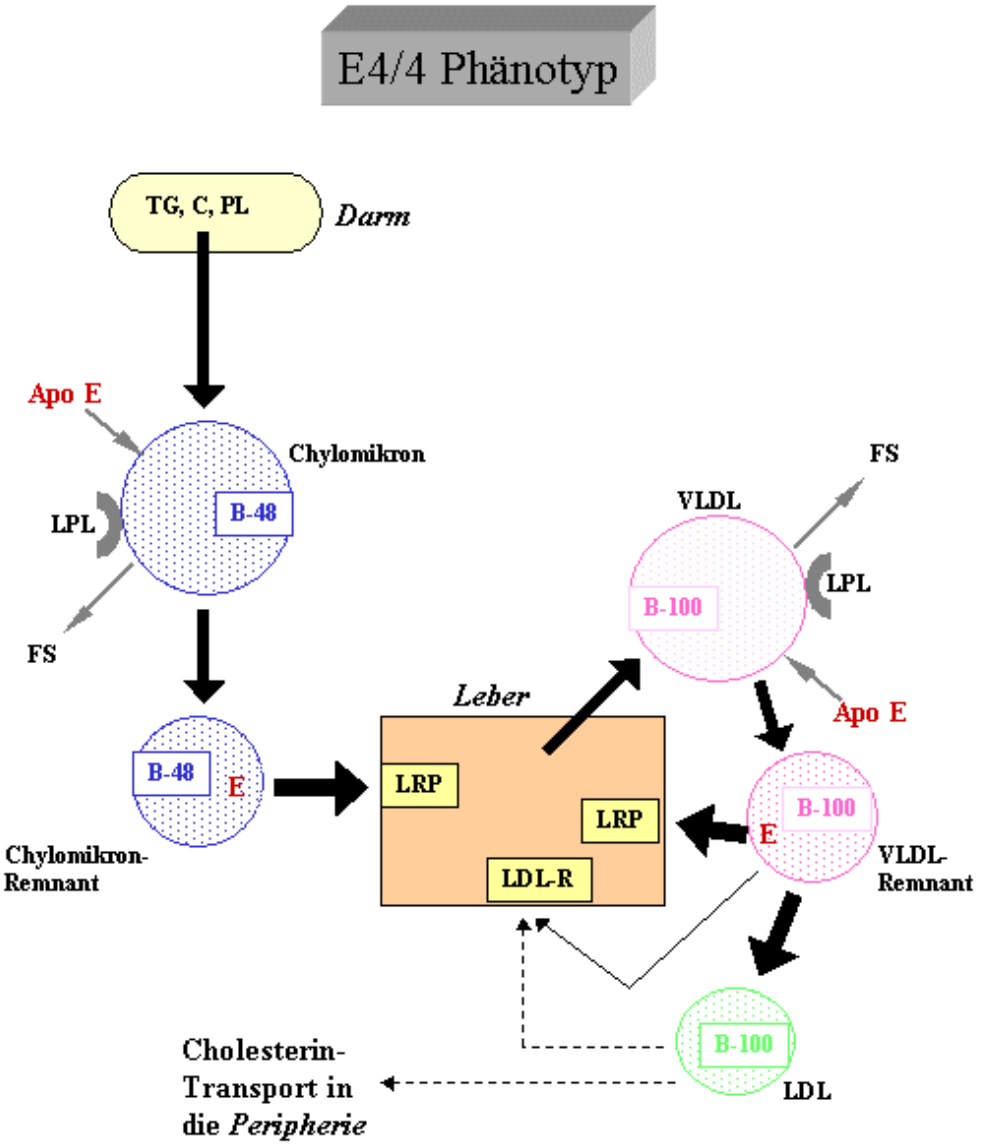


Abbildung 1-7: Einfluß von Apo E-4/4 auf den Fettstoffwechsel (22)

In Verbindung mit Stoffwechselerkrankungen wurde das Apo E-4 Philadelphia bei Patienten mit Typ-III-HLP gefunden (67).

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß das ε4 Allel ein wichtiger Risikofaktor für den Morbus Alzheimer ist. Der Morbus Alzheimer (Alzheimer's Disease, AD) ist eine irreversible progressiv demente Erkrankung, die sich in den späten Lebensdekaden manifestiert (113). Speziell die Neurons des Hippocampus und der Neurocortex werden durch einen unbekannten Machanismus zerstört

(133). Sie ist geprägt durch Verlust des Erinnerungsvermögens, zuerst des Kurzzeitgedächtnis und dann Verlust der kognitiven Funktionen.

Für die late-onselt familial and sporadic AD, die ein mittleres Manifestationsalter von 70 Jahren hat und 60-90% der Erkrankungen ausmacht, wurde die Apo E Mutation Apo E-4 als genetische Basis gefunden (104, 110, 111). Es wurde außerdem eine Verbindung zwischen Manifestationsalter und dem Apo E Gen-Defekt aufgezeigt.

In Familien mit late-onset AD steigt das Erkrankgungsrisiko von 20% auf 90% und das mittlere Manifestationsalter reduziert sich von 84 auf 68 Jahre, wenn sich die Zahl der Apo ε4 Allele von null auf eins oder zwei erhöht (19).

Wie bereits erwähnt ist Apo E Sekretion in der neuronalen Entwicklungsphase und bei Regeneration- und Reorganisationsprozessen stark erhöht (26, 54, 61, 95, 96, 116). Obwohl der neuronale Mediator des Apo E Effektes noch nicht definitiv geklärt ist, kann doch gezeigt werden, daß die Isoformen das Apo E das neuronale Wachstum und die Rekonvaleszenz unterschiedlich beeinflussen.

Träger von Apo ε4 Allelen und Morbus Alzheimer zeigen einen Verlust der Regenerationsfähigkeit (2, 52), weshalb es eventuell früher zum Auftreten des Morbus Alzheimers kommt.

1.3.3 Apolipoprotein E-1

Eine sehr seltene Variante des Apolipoprotein E ist das Apo E-1, davon findet man am häufigsten die Variante, die im Codon 127 in der ersten Position Glycin Asparagin ersetzt hat. Im Codon 112 und 158 befinden sich wie im Apo E-2 Cystein in der ersten Position. Weitere Apo E-1 Varianten sind bereits beschrieben worden: Apo E-1 ($Lys^{146}\rightarrow Glu$) (82), Apo $E\text{-}1_{Bethesda}$ und Apo $E\text{-}1_{Harriburg}$ (82). Apo E-1 ($Gly^{127}\rightarrow Asp$) und Apo $E\text{-}1_{Bethesda}$ werden mit der Hyperlipoproteinämie (38) und Hypertriglyceridämie (135) in Verbindung gebracht. Apo $E\text{-}1_{Harrisburg}$ führt im Gegensatz zu Apo E-2 dominant zur Ausprägung der Typ-III-HLP.

Im Vergleich mit dem Wildtyp E-3 ist die LDL-Rezeptorbindungsaktivität stark reduziert. Für die erwähnten Apo E-1 Varianten beträgt sie zwischen 1-4% im Vergleich mit der Bindungsaktivität des Apo E-3.

1.3.4 Genetische Varianten des Apolipoprotein E in der Übersicht

Variante	Mutation	R.-Bindung (%)	Pathobiochemie und Klinik	Referenz
Apo-E-Mangel	acceptor splice site mutation,Intron 3		Apo E im Plasma nicht nachweisbar,Typ-II-HLP. frameshift mutation.	18, 34
Apo-E-Mangel	$Gly^{31}\rightarrow Val$		Die Deletion eines G im Codon für Gly^{31} führt zum Auftreten eines Stopp-Codons nach 59 Aminosäuren. Das verkürzte Genprodukt wird im Plasma nicht nachgewiesen. Typ-III-HLP	30
E1	$Gly^{127}\rightarrow Asp, Arg^{158}\rightarrow Cys$	4	Typ-III-HLP,Artherosklerose	134
$E1_{Harrisburg}$	$Lys^{146}\rightarrow Glu$	1		82, 90
$E1_{Bethesda}$				
E2	$Arg^{158}\rightarrow Cys$	2	Typ-III-HLP,Artherosklerose	25, 101, 132
E2	$Arg^{145}\rightarrow Cys$	45	Typ-III-HLP,Artherosklerose	27, 67, 100
E2	$Lys^{146}\rightarrow Gln$	40	dominante Typ-III-HLP	98, 115
$E2_{Christchurch}$	$Arg^{136}\rightarrow Ser$	40	Typ-III-HLP	131
E2	$Val^{236}\rightarrow Glu$			129
E2	$Arg^{142}\rightarrow Leu$	80	Typ-III-HLP	78, 102
E3	Wildtyp	100	Wildtyp	134
E3	$Ala^{99}\rightarrow Thr, Ala^{152}\rightarrow Pro$	<20	Typ-III-HLP	84
E3	$Cys^{112}\rightarrow Arg, Arg^{142}\rightarrow Cys$	20	Typ-III-HLP	53
$E3_{Freiburg}$	$Thr^{42}\rightarrow Ala$		keine Dyslipoproteinämie	138
$E3_{Leiden}$	Dublikation AS 121-127		dominante Typ-III-HLP	45
E3	$Cys^{112}\rightarrow Arg, Arg^{274}\rightarrow His$	30		129
E3	$Arg^{142}\rightarrow Lys, Cys^{112}\rightarrow Arg$	20	Typ-III-HLP	49, 53, 99
E4	$Cys^{112}\rightarrow Arg$	100	beschleunigte Clearence von Remnants	21, 134
$E4_{Philadelphia}$	$Glu^{13}\rightarrow Lys, Arg^{145}\rightarrow Cys$		Typ-III-HLP	67
E4	$Ser^{296}\rightarrow Arg$			129
$E4_{Freiburg}$	$Leu^{28}\rightarrow Pro$		keine Dyslipoproteinämie	138
E5	$Glu^{3}\rightarrow Lys$	200	Hypercholesterinämie	120
E5	$Glu^{13}\rightarrow Lys$		Hypercholesterinämie?	80
E5	$Pro^{84}\rightarrow Arg, Cys^{112}\rightarrow Arg$	100	Hypercholesterinämie	120
$E5_{Frankfurt}$	$Gln^{81}\rightarrow Lys, Cys^{112}\rightarrow Arg$		Hypercholesterinämie?	106
$E5_{Heidelberg}$	?		Hypercholesterinämie, Amyloidose?	31
E7	$Glu^{224}\rightarrow Lys, Glu^{245}\rightarrow Lys$			70

Tabelle 1-6: genetische Varianten des Apo E (63)

1.4 Nachweismethoden für Apolipoprotein E

Um die verschiedenen Isoformen des Apo E-Polymorphismus zu bestimmen, kann man zwei verschiedene Methoden verwenden. Die erste Methode, die die Festlegung der Isoformen ermöglicht, ist die Isoelektrische Fokussierung (69).

1.4.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Wie schon ausführlich berichtet unterscheiden sich die drei häufigen Allele ε2, ε3 und ε4 durch Basenaustausch Mutationen in den Codons 112 und 158. Der Wildtyp Apo E-3 besitzt an der ersten Stelle der Position 112 Cystein und in Codon 158 Arginin. Arginin besitzt eine positive Ladung. Damit trägt Apo E-3 eine positive Nettoladung. Apo E-2 trägt im Codon 158 in erster Position statt Arginin Cystein. Damit entfällt die positive Ladung und als relative Nettoladung ergibt sich null. Apo E-4 besitzt sowohl im Codon 112 als auch 158 Arginin. Also ergibt sich eine zweifach positive Nettoladung für Apo E-4.

Allel	**relative Ladung**	**Aminosäure-position 112**	**Aminosäure-position 158**
ε2/2	0	Cys	Cys
ε3/3	+1	Cys	Arg
ε4/4	+2	Arg	Arg

Tabelle 1-7: Die drei homozygoten Phänotypen des Apo E Allelen und ihre relative Ladungen

Diese Ladungsunterschiede nutzt man aus, um die verschiedenen Phänotypen aufzutrennen. Das Prinzip dieses elektrophoretischen Verfahrens ist es, ein Protein oder Peptid im elektrischen Feld durch einen pH-Gradienten wandern zu lassen, bis es an seinem spezifischen Isoelektrischen Punkt (IP) angelangt ist. Dort ist seine Nettoladung und die Wanderungsgeschwindigkeit gleich null (68). Die Proteine E2-E4 finden also an unterschiedlichen Orten im elektrischen Feld ihren IP und lassen sich so auftrennen. Außerdem kann man sie so an einem Ort konzentrieren und der Diffusion entgegen wirken. Wenn ein Protein vom IP wegdiffundiert, erhält es sofort eine Ladung und wird vom elektrischen Feld zu seinem IP zurückgezogen.

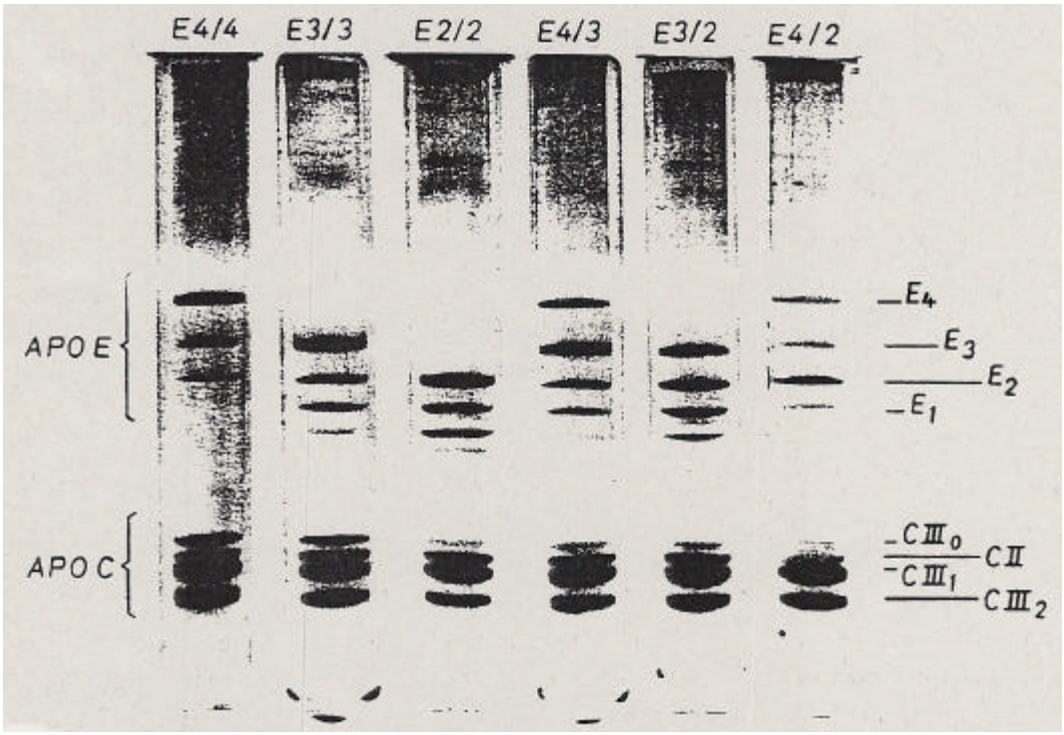


Abbildung 1-8: Der sechs häufigsten Apo E Phänotypen durch IEF aufgetrennt auf einem Polyacrylamidgel (22)

Obwohl die Methode eigentlich immer eindeutige Ergebnisse liefern sollte, kommt es doch in regelmäßigen Abständen zu Unsicherheiten bzw. Fehlinterpretationen des Ergebnisses. Bei der IEF werden nur die relativen Nettoladungen eines Proteins oder Peptids berücksichtigt, also die Summe aller positiven und negativen Ladungen an den Aminosäureseitengruppen. Durch Glykosylierungen und andere posttranslationelle Modifikationen an der Polypeptidkette des Apo E kann es zu Ladungsverschiebungen, d. h. zusätzlich negative Ladungen, kommen, die das Ergebnis verändern. Um dieser Problematik entgegen zu wirken, kann man die Proben vor der IEF mit Neuraminidase vorbehandeln und die Glykosylierungen rückgängig machen. Es lassen sich so aber nur die enzymatisch gebundenen Glykosylierungen lösen. Nicht enzymatisch gebundene Glykosylierungen, wie sie z.B. eventuell durch Diabetis Mellitus entstehen können (11, 20, 108), bleiben bei der Neuraminidasebehandlung unverändert gebunden (43). Vorstellbar sind auch Mißklassifikationen von Banden, die durch unterschiedliche Konzentrationen von Apo E im Plasma

hervorgerufen werden. Wie oben erwähnt sind Konzentrationen von Apo E-2 relativ zum Apo E-3 erhöht. Bei Apo E-4 verhält es sich konträr (37, 40).

1.4.2 Genotypisierung (Restriction Isotyping)

Eine neuere alternative Methode analysiert den Polymorphismus auf dem genetischen Level. Nach Hixon und Vernier (51) beruht die Methode auf der Existenz einer GCGC-Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym Endonuklease CfoI. Eine 244bp lange Aminosäuresequenz aus dem Exon 4 des Apo E, die die beiden polymorphen Positionen enthält, wird mittels PCR amplifiziert. Dieses Material wird dann mit der Restriktionsendonuklease inkubiert. Die Erkennungssequenz ist bei dem Apo E-4-Allel unter anderem in der Position 112 und 158 vorhanden. Im Apo E-3 fehlt eine Schnittstelle in der Position 112 und Im Apo E-2 sind insgesamt zwei Schnittstellen weniger vorhanden. In den Codons 112 und 158 ist durch Basenaustauschmutationen die Schneidesequenz GCGC verändert worden. Es entstehen je nach Apo E-Typ unterschiedlich lange Sequenzbruchstücke. Durch das Anlegen eines elektrischen Spannungsfeldes können diese in einem Polyacrylamidgel nach ihrer Größe aufgetrennt werden und durch verschiedene Färbungsmethoden sichtbar gemacht werden. An dem spezifischen Bandenmuster kann man den Apo E-Typ identifizieren:

E2/2	**E2/3**	**E3/3**	**E3/4**	**E4/4**	**E4/2**
91	91	91	91		91
80	80				80
			72	72	72
	48	48	48	48	48
39	39	39	39	39	39
	32	32	32	32	32
			19	19	19
18	18	18	18	18	18
16	16	16	16	16	16

Tabelle 1-9: Genotypisierung mit Angaben der Anzahl der Aminosäuren pro spezifische Bande

1.4.2.1 Diskrepanzen zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp (Problemstellung)

Eigentlich sollte man voraussetzen können, daß es immer übereinstimmende Ergebnisse bei diesen beiden Analyseverfahren gibt. Doch verschiedene Studien, bei denen die Ergebnisse der Phänotypisierung und Genotypisierung verglichen werden, wiesen in einem gewissen Prozentsatz Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen auf.

Bei Hansen et al. (1993) wurden 166 Menschen untersucht und in 2% traten Diskrepanzen auf (42), bei Snowden et al. 16% (117) und bei Wenham et al. 13% (136). Auch in der Ambulanz für Fettstoffwechselstörungen der Klinik für Innere Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf findet man diese Diskrepanzen bei Bestimmung des ApoE-Polymorphismus, die im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie durchgeführt werden. Bei 611 Patienten, die von Januar 1999 bis September 2001 untersucht wurden, zeigten sich in 41 Fällen keine Übereinstimmung zwischen Ergebnisse der Phänotypisierung und Genotypisierung. Dieses entspricht einem Prozentsatz von 6,71%.

Für dieses Phenomen sind verschiedene Lösungsansätze denkbar:

1. Durch das Vertauschen von Proben können natürlich keine Übereinstimmungen zwischen der Genotypisierung und der Phänotypisierung erzielt werden. Es ist aber nicht vorstellbar, daß dieser Fehler in einem so hohen Prozentsatz in verschiedenen Laboratorien vorkommt.

2. Wie bereits erwähnt kann es bei der Auswertung der Phänotypisierung durch Glykosylierungen und andere posttranslationelle Modifikationen zu zusätzlichen Banden und damit zu Fehlinterpretationen kommen (122, 142). Durch eine Vorbehandlung aller Proben mit Neuraminidase kann dieses Risiko minimiert werden. Nicht enzymatisch katalysierte Bindungen bleiben aber bestehen (43).

3. Da bei den verschiedenen Isoformen eine unterschiedliche Plasmakonzentration von Apo E vorliegt, ist eine Fehlklassifikation aufgrund der Konzentrationsunterschiede denkbar (37, 40).

4. Wenn in der Aminosäuresequenz des Apo E-Allels zusätzlich zu dem bekannten Polymorphismus Mutationen auftreten, könnte es zu Ladungsverschiebungen kommen. Wenn zum Beispiel eine ungeladene Aminosäure durch Basenaustausch durch eine geladene Aminosäure ersetzt wird, kommt es zur Änderung der relativen Nettoladung des Proteins und damit zu einer veränderten Mobilität. Es besteht dann keine Korrelation mehr zwischen der Nettoladung und dem Phänotyp. Die Phänotypisierung würde dann nicht den korrekten Phänotyp des analysierten Apo E angeben.

1.4.3 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird der unter Punkt vier genannte Lösungsansatz untersucht. Dafür wird bei elf durch Diskrepanzen auffällig gewordenen DNA-Proben eine Sequenzanalyse durchgeführt. Die Darstellung der Aminosäuresequenz ist die qualitativ beste Methode, Abweichungen vom Wildtyp zu regristrieren, die evtl. für die Diskrepanzen verantwortlich sind.
Außerdem kann der Genotyp dirkt von der erstellten Sequenz abgelesen werden.
Ziel dieser Arbeit ist zusätzliche Mutationen zu identifizieren oder diesen Lösungsansatz für diese Proben auszuschließen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Patientengut

Die elf Patienten, die für diese Analyse ausgewählt wurden, werden diagnostiziert und behandelt in der Lipidambulanz der Klinik für Innere Medizin des Universitätsklinikums Hamburg, Eppendorf.

Bei den elf Patienten sind bei vorhergehenden Routineuntersuchungen Diskrepanzen zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp aufgetreten.

Patient	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
Geschlecht	m	w	m	m	m	m	w	m	m	m	w
BMI*[2]	32	29	31	28	31	33	25	27	26	24	24
Phänotyp	2/4 +ZB	2/4 (1+3)	3/3 (2+1)	2/3	3/3	2/4	2/4	2/4	unklar	3/3	2/3
Genotyp	3/3	2/2	3/3	2/2	3/4	2/2	2/2	2/3	2/2	2/3	3/3
Cholesterin*[1]	388	962	287	409	222	312	467	322	350	145	221
TG*[1]	395	1170	809	657	178	382	706	1195	280	65	73
LDL*[1]	285	-	-	56	145	67	46	113	53	80	111
HDL*[1]	24	50	36	54	34	37	45	65	58	36	84
VLDL*[1]	79	-	-	155	9	21	213	68	138	4	3
Apo B*[1]	286	168	123	41	134	96	101	99	103	121	93
Apo A_1	111	144	162	111	129	127	123	111	131	126	207
Lp (a)*[1]	8	26	6	9	<2	5	32	<2	19	18	13
E-Masse	173	170	176	173	141	141	222	130	182	20	65

Tabelle 2-1: Patientengut (*[1] Angaben in mg/dl; *[2] Angaben in kg/m²)

Blutentnahme

- S-Monovette KE (Fa. Sarstedt)
- Kanülen (Fa. Braun)

DNA-Isolierung

- **STE-Waschpuffer:** 20mM Tris-HCI (Fa. Gigco BRL; Merck), pH=7,4; 10mM NaCL (Fa. Merck);1mM EDTA (Fa. Sigma), pH=8,0;
- **Lysis-Puffer:** 10mM Tris-HCI, pH=8,2; 400mM NaCl; 2mM EDTA
- **TE-Puffer:** 10mM Tris-HCI, pH=7,4; 0,2mM EDTA
- **Proteinase K:** Proteinase K 100mg (Fa. Boehringer Mannheim); 10ml 10% SDS; 20 ml EDTA 0,5M; Zugabe von 70ml H_20 dest.
- **NaCl** (6M)

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

PCR

- **Reaktionspuffer** (10x)**:** 1,0ml Tris-HCI; 500mM Kcl (Fa. Boehringer); ohne/mit Magnesiumchlorid (15mM) (Fa. Boehringer), pH=8,3 bei 20°C
- **Magnesiumchlorid** (25mM)
- **Taq DNA-Polymerase** (Fa. Boehringer Mannheim)
- **dNTP** (10mM)**:** je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Fa. Pharmazia)
- **Mineralöl** (Fa. Sigma)
- **DMSO** (Fa. Serva)
- **Primer** (Fa. PE Applied Biosystems)
- Reaktionsgefäß 0,5µl safe ware (Fa. Eppendorf)

PCR-Aufreinigung

- **QIAquick**
- **PCR Purification kit 250** (Fa. Qiagen)

Restriktionsverdaue

Name	Puffer	Unit	Inkubations-temperatur	Erkennung/ Spaltungssequenzen
Taq 1	L	24	65°C	T?CGA
CFO 1	B	10	65°C	GCG?C

Tabelle 2-2: angewandte Restriktionsenzyme mit Angaben des Herstellers zum experimentellen Einsatz (Fa. Boehringer, New England labs)

Färbungen

- **Silberfärbung:** Essigsäure; $AgNO_3$ (Fa. Roth); 37% Formaldehyd (Fa. Sigma); Na_2CO_3 wasserfrei; Na_2SO_3 in Wasser; Gycerol (Fa. Merck); Methanol (Fa. Merck)
- **Ethidiumbromidfärbung:** 10mg/ml Ethidiumbromid (Fa. Sigma); 1x Tris-borate (TBE) (Fa. Merck), Lösungmittel

Sequenzierung

- **Dye Terminator Cycle Sequenzing Ready Reaktion Mix**
- (Fa. Perkin-Elmer Applied Biosystem)

Elelektrophorese

- **Laufpuffer:** 1x0,09M TBE; 0,002M EDTA
- **Größenmarker:** 1kb DNA-Leiter, 1µl/µg (Fa. Gibco); 100bp DNA-Leiter, 1µl/µg (Fa. Gibco)
- **loading buffer** (6x)**:** 1xTBE; 40% Gycerol; Bromphenol Blau (Fa. Merck)
- **Polyacrylamidgel:** 10% Acrylamid/Bisacrylamid, 29:1 (Fa. Appligene); 1xTBE; 1% Ammoniumpersulfat (Fa. Serva); 0,4%TEMED (Fa. Serva)

Probenvorbereitung

- **für die Silberfärbung:** 2µl PCR-Produkt mit 1:5 verdünnten loading buffer (6x) vermengen; davon werden 2µl auf dem Gel aufgetragen; 1µl Größenmarker auf dem Gel auftragen

- **für die Ethidiumbromidfärbung:** 7-10µl PCR-Produkt mit 2-3µl loading buffer (6x) vermengen; davon werden 8µl auf dem Gel aufgetragen;

  2 µl Größenmarker auf dem Gel auftragen

Geltrocknung

- Gel Drying Film(Fa. Promega)

Geräte

- **Netzgeräte:** Biorad;
- **Zentrifugen:** Hettich; hearus Biofuge fresco
- **Biometra Trio-Thermoblock**
- **Abi Prism 310 Genetic Analyser**

2.2 Methoden

2.2.1 Patientengut

Eine Mindestmenge von 10ml Patientenblut wird in eine S-Monovette KE, mit EDTA als Antikoagulanz, abgenommen. Serum und Erythrozyten werden bei 4°C, 2500 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Die Phase zwischen Serum und Erythrozyten wird großzügig ca. 1-2ml abpipettiert und für die Isolierung der genomischen DNA eingesetzt. In dieser Interphase befinden sich die Leukozyten, der sogenannte „Buffycoat“ (DNA-haltige Blutzellen). Der Buffycoat wird bei -20°C gelagert, bis die Isolierung stattfindet (Mindestzeit 2 Stunden).

2.2.2 DNA-Isolierung aus genomischer DNA (nach Miller SA., 1988)

Durch das Einfrieren bei -20°C können DNA-haltige Blutzellen von den hämolysierten Erythrozyten durch eine osmotisch inaktive Waschlösung voneinander getrennt werden. Die DNA-haltigen Zellen werden durch den Proteinase Kund Lysis-Puffer aufgeschlossen, Proteine werden abgebaut, die genomische DNA bleibt intakt. Durch Salz und Ethanol wird die genomische DNA gefällt und somit von der proteinhaltigen Lösung abgetrennt.

Durchführung:

Der Buffycoat wird aufgetaut, mit 14ml STE vermengt und bei 4°C, 3000rpm, 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen und das Pellett erneut mit 15ml STE-Puffer gewaschen und wie oben angegeben zentrifugiert. Den Überstand gießt man wieder ab, lockert das Pellett und inkubiert es mit 3ml Lysis-Puffer, 1ml Proteinase-K-Lösung und 200µl SDS (10%) über Nacht schüttelnd bei 37°C.

Am folgenden Tag werden 3,4ml Lysis-Puffer und 2,3ml NaCl (6M) hinzugefügt, gut geschwenkt und zentrifugiert (4°C, 3000rpm, 20 Minuten). Der Überstand der Proben wird vorsichtig in 30ml absoluten Ethanol gegossen. Ethanol und genomische DNA werden nun umgeschwenkt; die genomische DNA fällt als weiße, fädenreiche Struktur aus. Diese kann durch sterile Pasteur-Pipetten an der Glasaußenseite aufgenommen, in 70% Ethanol gewaschen und in 500-1000µl TE gelöst werden (bei 37°C schüttelnd, 48 Stunden). Die DNA wird bei 4°C gelagert, bei jeder Entnahme genomischer DNA sollte das Gefäß vorher kurz bewegt werden, da die genomische DNA mit der Zeit absinkt. Für die PCR werden pro Ansatz 1µl oder 6µl entnommen.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit dieser Methode kann man eine große Anzahl von Kopien von einem spezifischen Teilstück der genomischen DNA als Template produzieren. Das Prinzip dieser Reaktion ähnelt der DNA-Replikation. Der doppelsträngige DNA-Strang (ds DNA) wird auf 94°C erhitzt, um einzelsträngige DNA (ssDNA) zu erhalten. Durch die Wahl der Primer (Oligonukleotide) werden die gewünschten Bereiche, die vervielfältigt werden sollen, innerhalb der genomischen DNA festgelegt. Die Primer binden nun an dem für sie spezifischen Teil der ss DNA. Dahinter beginnt dann die DNA-Polymerase mit der Synthese. Die neusynthetisierten Stücke enthalten nun auch die Primersequenz. Aus zwei ssDNA-Strängen sind jetzt zwei ds DNA-Stränge entstanden. Durch erneute Erhitzung, und damit Beginn eines neuen Zyklus, enstehen wieder ss DNA-Stränge, die von den Primern erkannt werden, und es wird eine erneute Synthese durchgeführt. Als Endergebnis von n-Zyklen erhält man ein theoretisches Maximun von 2^n ds DNA-Molekülen.

Die Fehlerrate der Taq in vitro beträgt bei etwa $2x10^4$ Nucleotiden ein falsches Nucleotid, da sie die Fähigkeit des „Korrekturlesens“ nicht mehr besitzt.

Durchführung:

Jede PCR-Reaktion, soweit nicht anders erwähnt, wird mit Mineralöl (ca. 30-50µl) überschichtet, um Temperaturverzüge und Kondensation zu vermeiden.

Die Sequenzen der Primer, die die Amplikons der PCR-Reaktion festlegen, sind in der Tabelle 5 dargestellt. Die Primer sind so gewählt, daß sie nicht direkt an den Exons des Apo E Gens liegen, sondern in den unmittelbaren Intronsequenzen vor und hinter den Exons, die insgesamt ca. 50bp des Amplikons ausmachen.

Entschlüsselung der Namengebung:

E2F = Primer des Exon 3, Apo E in 5’->3’ (forward) Richtung;

E2R= Primer des Exon 3, Apo E in 3’->5’ (reverse) Richtung;

E2-10= Primer des Exon 4, Apo E in 5`->3’ (forward) Richtung;

E12-18= Primer des Exon 4, Apo E in 3’->5’ (reverse) Richtung.

Die Zyklen der zu amplifizierenden Fragmente werden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1 Zyklus:	Denaturirung:	5 Minuten		95°C;
	Annealing:	1 Minute	z.B.	60°C;
	Elongation:	1 Minute		72°C;
33 Zyklen:	1 Minute 95°C;	1 Minute z.B. 60°C;		1 Minute 72°C;
1 Zyklus:	1 Minute 95°C;	1 Minute z.B. 60°C;		10 Minuten 72°C;

abkühlen auf Raumtemperatur.

Abweichungen dieses Protokolls können aus dem Ergebnisteil entnommen werden.

Titel	Primer	Exon	Gebr.-lösung in nmol	Annea-ling-temp.
E2	5'-CGC CCC ATC CCA GCC CTT CT-3'	4	20	60°C
E3	5'-CGC CTC CCC ACT GTG CGA CA-3'	4	20	60°C
E4	5'-ATG GAC GAG ACC ATG AAG GAG TTG A-3'	4	20	60°C
E5	5'-TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG AG-3'	4	20	60°C
E6	5'-CAG AGC ACC GAG GAG CTG CG-3'	4	20	60°C
E7	5'-C-GAT GAC CTG CAG AAG CGCC	4	20	60°C
E8	5'-GGG CGC CGA GCG CGG CCT CAG-3'	4	20	60°C
E9	5'-CGG ATG GAG GAG ATG GGC AG-3'	4	20	60°C
E10	5'-CTG CAG GCC GAG GCC TTC CA-3'	4	20	60°C
E12	5'-ACC TCG CCG CGG TAC TGC AC-3'	4	20	60°C
E13	5'-ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3'	4	20	60°C
E14	5'-CCG GCC AGG GAG CCC ACA GT-3'	4	20	60°C
E15	5'-TCT GCT GGG CCT GCT CCT CCA GCT T-3'	4	20	60°C
E16	5'-CCC GGC CCA CTG GCG CTG CAT-3'	4	20	60°C
E17	5'-AGT GAT TGT CGC TGG GCA CA-3'	4	20	60°C
E18	5'-GTC GCA TGG CTG CAG GCT TC-3'	4	20	60°C
E2F	5'-CCC ACC TTG AACTT GTTCC A	3	20	55°C
E2R	5'- AAG GGC CAG GAT GGG GAC AC-3'	3	20	55°C

Tabelle 2-3: Beschreibung der Primer für die PCR der Apo E Exons und Annealingtemperatur Angaben nach Hegele et.al 1992. Die Konzentrationen wurden nach Angaben der Hersteller berechnet.

2.2.4 Aufreinigung von PCR-Produkten durch QIAQuick PCR Purification kit

Dieses System basiert auf der Kombination der „microspin technology (Microsäulen Technologie)" mit der selektiven Bindungsmöglichkeit einer

speziell entwickelten Silicagel-Membran. Durch speziell abgestimmte Puffer kann die hohe Wiedergewinnung der DNA gewährleistet werden.

Die Reinigung verläuft in drei Teilschritten: Adsorbtion der DNA auf der QIAquick Membran, Waschen und Elution in Wasser.

Damit die Nukleinsäuren an der Sialicagelmembran adsorbieren können, muß eine hohe chaotropische Salzkonzentration vorliegen. Bis zu 10µl DNA können von einer QIAquick Säule gebunden werden. Außer der Salzkonzentration entscheidet auch der pH-Wert über eine effiziente DNA- Adsorbtion. Um eine Adsorbtion von ca. 95% zu erhalten sollte dieser < 7,5 betragen. Liegt der pH-Wert darüber sinkt die Adsorbtionsrate drastisch ab.

Durch das Waschen mit einem speziellen, ethanolhaltigem Puffer werden überflüssige Primer, Salze, Enzyme, nicht gebundene Nukleotide, Öl und andere nicht erwünschte Detergentien entfernt. Damit kein Puffer auf der Membran zurückbleibt, wird zweimal zentrifugiert.

Im Gegensatz zur Adsorbtion ist die Elution von einer niedrigen Salzkonzentration und einem basischen pH-Wert abhängig. Die DNA wird entweder mit 30µl einer 10mM Tris-HCL-Lösung, pH 8,5 oder Wasser eluiert.

Durch dieses System können PCR-Produkte in einer Länge von 100bp-10kb aufgereinigt werden. Die Zurückgewinnung der ds oder ss DNA beträgt 90-95%, die Wiedergewinnung von Oligomeren (17-40) ist gleich null.

Diese Aufreinigung wird vor jeder Sequenzreaktion durchgeführt, da die nicht eingebauten Primer und andere Detergentien diese Reaktion stören.

Durchführung:

Zu dem PCR-Produkt wird das 5-fache Volumen PB-Puffer hinzu pipettiert, gemischt, auf die Säule gegeben und zentrifugiert (bei 20°C, 60 Sekunden, 13000rpm). Der Unterstand wird verworfen, auf die Säule wird 750µl PE-Puffer gegeben, zentrifugiert (bei 20°C, 60 Sekunden, 1300rpm) und erneut der Unterstand verworfen. Das Reaktionsgefäß mit Säule wird nochmals kurz anzentrifugiert, um Restpuffersubstabzen abzutrennen. Für die Elution wird die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Sie erfolgt mit 50 µl dest. H_2O durch Zentrifugation 60 Sekunden, 13000rpm.

2.2.5 DNA-Konzentrationsmessung

Bei 260nm ist die Absorption von DNA am höchsten. Die Berechnung der Konzentration setzt sich aus: Extinktion x Verdünnungsfaktor x Faktor 50 = µl/ml zusammen.

Bei der Wellenlänge 280nm ist die Absorption von unspezifischen Proteinen am höchsten. Durch die Bildung des Faktors der Extinktion von 280/260 kann die Reinheit der DNA errechnet werden. Der optimale Faktor liegt bei 1,8.

Die DNA-Konzentrationsangabe wird bei PCR-Produkten für die Sequenzierung benötigt.

2.2.6 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme (= rekombinierte Enzyme), die bei DNA-Strängen innerhalb spezifischer Basensequenzen die Phosphordiester-Bindungen spalten. Die urspüngliche Funktion dieser Enzyme ist die Spaltung von eingedrungenen ds DNA-Molekülen in eine Bakterienzelle.

Die Restriktionsenyme erkennen spezifische Bindungsstellen, die als Erkennungssequenzen (recognition sequence) bezeichnet werden. Die Stelle, an der die Phosphordiester-Bindungen in der DNA durch die Enzyme gespalten wird, wird als Spaltungsstelle (cleavage site) bezeichnet.

Als Enzymeinheit (Unit) ist diejenige Menge eines Restriktionsenzyms definiert, die in der Lage ist, bei optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen 1µl DNA in einer Stunde vollständig zu spalten.

Durch eine Mutation kann es zum Wegfall oder zu einer neuen Schnittstelle für ein bestimmtes Restriktionsenzym kommen und damit zur Veränderungen im DNA-Fragmentmuster = RFLP. Dies kann für diagostische Zwecke eingesetzt werden, z.B. bei der Analyse des Apo E-Polymorphismus (Genotypisierung).

Die Durchführung der Restriktionsanalysen erfolgte nach Nagaben des Herstellers (siehe Tabelle 3-2-2). Auf Abweichungen wird hingewiesen.

2.2.7 Gelfärbemethoden

2.2.7.1 Ethidiumbromidfärbung

Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenanthridiumbromid) gehört zu den sequenzunspezifisch DNA-bindenden Substanzen, die zwischen einzelnen

Basenpaaren einer ds α-Helix-Struktur des DNA-Moleküls interkalieren. Diese nicht kovalente Bindung ist sehr fest. Ethidiumbromid reagiert begrenzt mit ssNukleinsäuren, jedoch wesentlich schwächer. Diese Färbung wird primär benutzt, um ds DNA innerhalb eines Gels sichtbar zu machen.

Duchführung:

Ethidiumbromid wird zum Färben von Polyacrylamidgelen eingesetzt. Dazu werden die Gele nach dem Lauf in eine wässrige Ethidiumbromid-Lösung von (so. 5µL/100ml) für ca. 10 Minuten gelegt, evtl. anschließend wieder etwas durch Wasser entfärbt.

Die Gele werden unter UV-Licht bei 254-300nm Wellenlänge bestrahlt. Die interkalierte ds DNA färbt sich rot/orange. Die Nachweisgrenze liegt bei 5ng Nukleinsäure pro Bande, bei ss Nukleinsäuren ist der Nachweis weniger sensitiv.Es muß mehr Marerial eingesetzt werden.

2.2.7.2 Silberfärbung (Bassamet al. 1991)

Diese Färbetechnik wird unteranderem für Polyacrylamidgele, die ds DNA geladen haben, verwendet . Polyacrylamid ist inert gegen diese Reaktion. Die Proben bilden „Lücken“ in dem Acrylamid, in dem die chemische Reaktion stattfinden kann. Das Prinzip kann mit dem photographischen Prozeß in lichtempfindlichen Silberhalogen-Schichten verglichen werden. Die Silberionen werden in der Gelmatrix bei pH-Werten über 10,5 durch Komplexbindung an die Makromoleküle gebunden.

Reaktion: $H_2CO + AG^+ + CO_3^{2-} \rightarrow HCOOH + Ag\downarrow + CO_2\uparrow$

Durchführung:

Das ursprüngliche, aus der Literatur entnommene Rezept wurde an die Labor spezifischen Bedingungen angepaßt und verändert (siehe Tabelle 2-4). Die abgebildeten Polyacrylamidgele sind mit der geänderten Silberfärbung angefärbt worden.

Schritte	nach Bassam	Status Quo
1. Fixierung	10% Essigsäure; 20’	10% Essigsäure; 20’
2. Waschen	H_2O; 2’ 3mal	eiskaltes H_2O; 2’ 3mal
3. Impregnate	$AgNO_3$ (1g/l), 1,5ml 37% HCOH/l; 30’	eiskaltes $AgNO_3$ (2g/l); 30’ +150µl Formaldehyd (37%)
4. Waschen	H_2O; 2’’, optimal	eiskaltes H_2O; ca. 2’
5. Entwicklung verdunkelt; abgedeckt	vorgekühlt: Na_2CO_3 (30g/l), 1,5ml 37% HCOH/l, $Na_2S_2O_3$ in H_2O (2mg/l); 2-5’	eiskühlt: Na_2CO_3 (30g/l), 1,5ml 37% HCOH/l, $Na_2S_2O_3$ in H_2O (5mg/l); 100ml waschen 100ml für Entwicklung; 1’-15’
6. Stop	10% Essigsäure; 5’	10% Essigsäure, bis keine Blasen mehr bilden, ca.20`
7. Fixierung	Trocknung	Methanol 10%; 3% Glycerol; bis zur Trocknung der Gele

Tabelle 2-4: Durchführung der Silberfärbung für DNA-haltiges Polyacrylamid

Diese Färbung ist sehr empfindlich gegenüber Chloridionen. Die Leitfähigkeit des demineralisierten Wassers wurde unter 2µM/ml gehalten. Ebenso ist die Entwicklungsphase licht- und wärmeempfindlich, daher wurden die Reaktionsgefäße verdunkelt und die Lösungen, vor allem die Natriumkarbonatlösung, vorgekühlt.

2.2.8 Sequenzierung (Perkin-Elmer Applied Biosystems)

Die Sequenzreaktion wird nach dem Prinzip der Didesoxy-Methode von Sanger durchgeführt, die auch als „Cycle-Sequenzing“ bezeichnet wird. Perkin-Elmer Applied Biosystems verwendet die hitzebeständige AmpliTag-DNA-Polymerase anstelle der ursprünglich verwendeten Klenow-Polymerase. Die DNA-Doppelstränge müssen für die Sequenzierung durch Hitzebehandlung denaturiert und so voneinander getrennt werden. Die Primer binden dann an dem für sie spezifischen DNA-Bereich. Die AmpliTaq-Polymerase beginnt nun mit der Synthese eines neuen Doppelstranges. Der Einbau von einem dNTP-Dye Terminator, das fluoreszenzmarkierte dNTP-Analogon, führt zu einem zufälligen Abbruch der Kettenverlängerung. Die Reaktion erfolgt mittels einer zyklischen

Sequenzierung, die eine lineare Vermehrung zur Folge hat. Es entstehen unterschiedlich lange DNA-Ketten, die mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und nach Länge sortiert werden (siehe Abbildung 2-1). Über eine Laserdiode werden die fluoreszierenden Terminatoren identifiziert und ausgedruckt (Gerätetyp 310 Genetic Analyser der Firma Applied Biosystems, unter Zuhilfenahme der 2.0-Softwareversion der Firma).

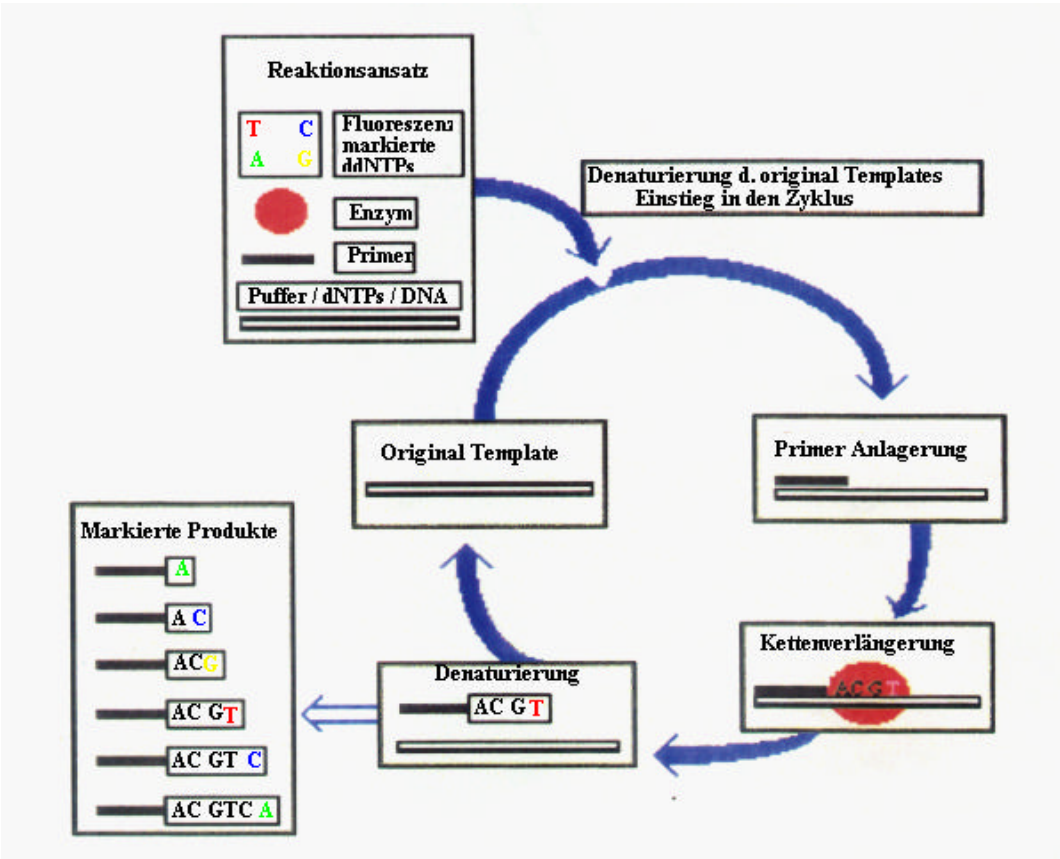


Abbildung 2-1: Sequenzierungsmethoden

Durchführung:

Das PCR-Produkt wird durch QIAQuick gereingt, die Konzentration gemessen und nach den Angaben von Perkin-Elmer Applied Biosystems eingesetzt. Einige Primer (siehe Tabelle 2-3) werden sowohl für die PCR, als auch für die Sequenzierung benutzt. Die Konzentration der DNA, des Primers und des Reaktionsmixes, sowie die Programmierung des Termocyclers, für die Reaktionsschritte der Denaturierung, Annealing und Elongation, wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3 Befunde

3.1 Sequenzstrategie

Die DNA der Patienten soll nun auf Mutationen im Exon 3 und Exon 4 des Apo E genau untersucht werden. Exon 1 und 2 werden nicht berücksichtigt. Exon 1 liegt nicht im 5`translatiertem Bereich. Da aber bei den Patienten eine Diskrepanz zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp aufgrund einer veränderten Mobilität besteht, muß es, wenn dieses eine genetische Ursache hat zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz gekommen sein. Die Informationen für die Aminosäuren liegen im 5`translatierten Bereich. Exon 2, das zwar translatiert wird, ist im Bezug auf die Gesamtgröße sehr klein. Damit ist die Wahrscheinlichkeit, daß sich dort eine Mutation befindet, gering. Außerdem liegen auf Exon 2 die Codons für das Signalpeptid von Apo E. Eine Mutation in diesem Bereich erhöht stark die Wahrscheinlichkeit, daß das mutierte Signalpeptid dieses Apo E seine Aufgabe nicht mehr erfüllen kann. Das Apo E könnte die Zelle nicht mehr verlassen und wäre im Serum nicht nachweisbar.

Als Nachweismethode wird die Sequenzanalyse angewendet, um eine genaue Auswertung zu erreichen.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten den bestimmten Sequenzabschnitt vervielfältigt herzustellen, um diesen in der Sequenzreaktion analysieren zu lassen. In dieser Arbeit wird das PCR-Produkt in die Sequenzanalyse eingesetzt. Bei Verwendung dieser Methode muß durch PCR-Optimierung und eine spezielle Reinigung sichergestellt werden, daß das PCR-Produkt nur aus dem amplifizierten Bereich besteht, der analysiert werden soll und keine Rückstände aus der PCR mehr vorhanden sind, die die Reaktion und damit die Auswertung stören können.

Begonnen wird mit der Extraktion der DNA aus den Leukozyten der Patienten.

Mittels PCR kann nun der Bereich der genomischen DNA amplifiziert werden, auf dem sich die Informationen für Exon 3 und 4 des Apo E befinden. Um nun ein für die Sequenzreaktion brauchbares PCR-Produkt zu erhalten, werden PCR - Optimierungen vor der Amplifikation durchgeführt. Das PCR-Produkt muß dann, bevor es in der Sequenzreaktion eingesetzt wird, durch eine Fällung und eine

spezielle Reinigung von nichtgebundenen PCR-Reaktionbestandteilen gesäubert werden, die die Sequenzreaktion stören.

Nun wird das gereinigte PCR-Produkt in die Sequenzreaktion eingesetzt.

Bei dem verwendeten Sequenzanalysegerät läßt sich eine Sequenz bis zu 400bp gut darstellen. Exon 3 mit 240bp läßt sich also in einer Reaktion mit einem Primer komplett darstellen. Dafür steht je ein Vorwärtsprimer (E2F) und ein Rückwärtsprimer (E2R) zur Verfügung, die beide für jede Exon 3-Probe verwendet werden.

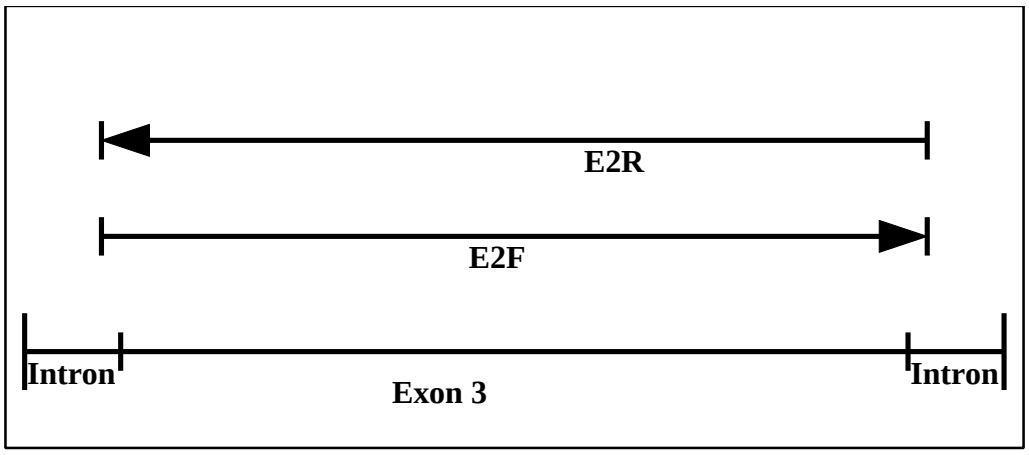


Abbildung 3-1: Vor- und Rückwärtsprimer für die Darstellung von Exon 3

Exon 4 hat eine Gesamtlänge von 798bp. Um die Sequenz vollständig darzustellen, benötigt man deshalb mehrere Primer. Für die Sequenzreaktion stehen als Vorwärtprimer E2- E10, als Rückwärtsprimer E12- E18 zur Verfügung. Ziel ist es durch mehere Sequenzreaktionen mit unterschiedlichen Primern, Exon 4 komplett darzustellen und möglichst große Überschneidungsbereiche zwischen den Primern zu erhalten.

Ansatz 1: Alle Vorwärts- und Rückwärtsprimer werden in Sequenzreaktionen eingesetzt. Das PCR-Produkt wird von Patient Nr. 1 verwendet.

Auswertung: Die Vorwärtsprimerliefern eine besser lesbare Sequenz als die Rückwärtsprimer.

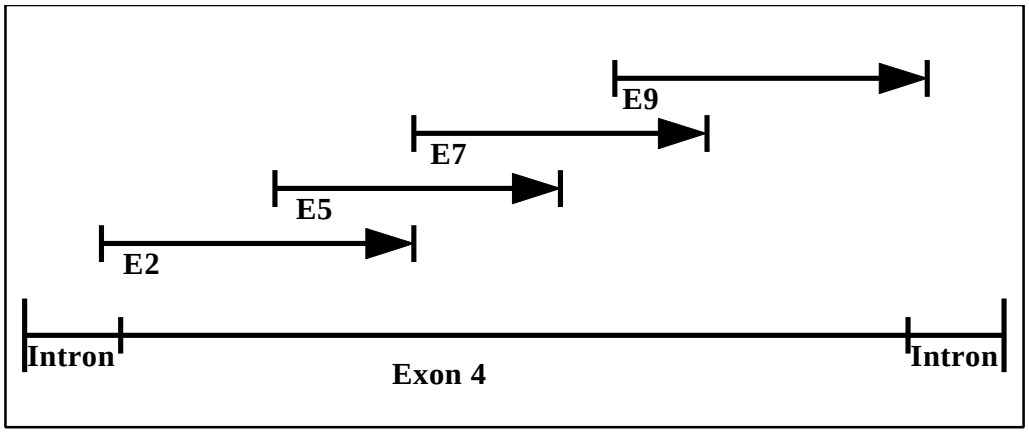


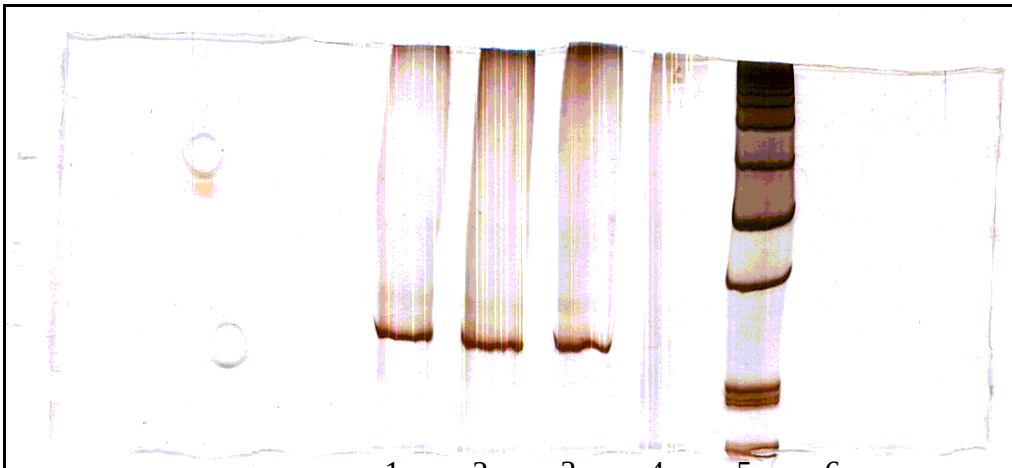
Abbildung 3-2: Primerkombination für die komplette Darstellung von Exon 4

Bei fraglichen Sequenzabschnitten werden entweder die Rückwärtsprimer und/ oder andere Vorwärtsprimer verwendet.

3.1.1 Template-Vorbereitung / Amplifikation von Exon 3 und 4

Um eine Sequenzanalyse am Apo E durchzuführen, müssen zuvor Exon 3 und 4 mittels PCR amplifiziert werden. Das PCR-Produkt muß, anders als bei diversen Screeningverfahren, absolut rein sein. Die Primer dürfen nur in dem für sie spezifischen Bereich an der DNA binden und somit nur diesen Teil amplifizieren. Um ein für die Sequenzreaktion geeignetes PCR-Produkt herzustellen, müssen zuvor die für die PCR wesentlichen Faktoren: Annealingtemperatur, $MgCl_2$-Konzentration und Primerwahl optimiert werden.

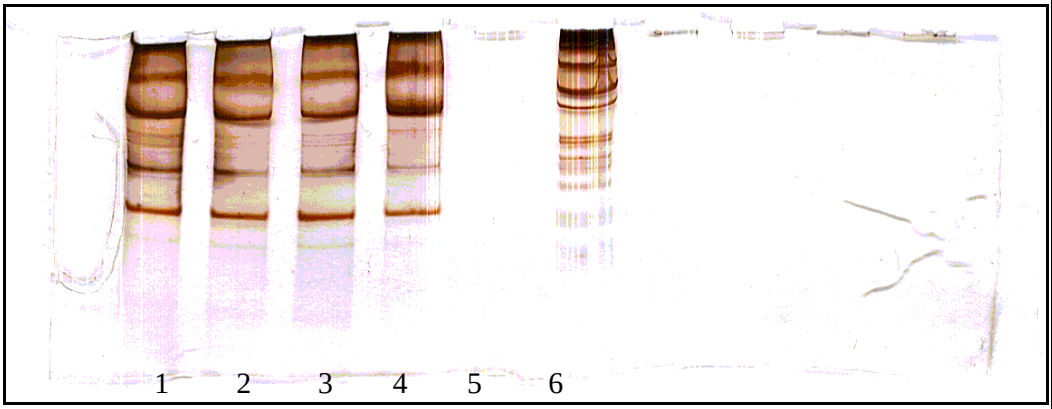
Anhand eines Kontrollgeles mittels Elektrophorese läßt sich dann das PCR-Produkt überprüfen. Bei einer Einelbande liegen also optimale Bedingungen für eine Sequenzreaktion vor (siehe Abbildung 3-3). Sind aber mehrere Banden in einer Laufspur sichtbar, so haben die Primer auch andere Teile der DNA amplifiziert (siehe Abbildung 3-4).



Laufspuren:

1 = DNA von Patient 1
2 = DNA von Patient 1 nach Fällung & Reinigung
3 = DNA von Patient 1 nach Fällung & Reinigung
4 = Leerprobe
5 = Marker

Abbildung 3-3: Darstellung eines reinen PCR-Produktes von Exon 4 von Patient 1 in 10% Polyacrylamidgel



Laufspuren:

1 = DNA von Patient 1
2 = DNA von Patient 2
3 = DNA von Patient 3
4 = DNA von Patient 4
5 =Leerprobe
6 = Marker

Abbildung 3-4: Darstellung eines PCR-Produktes, bei dem die Primer verschiedene Teile der DNA amplifiziert haben, Exon 4, DNA des Patient 1, in 10% Polyacrylamidgel

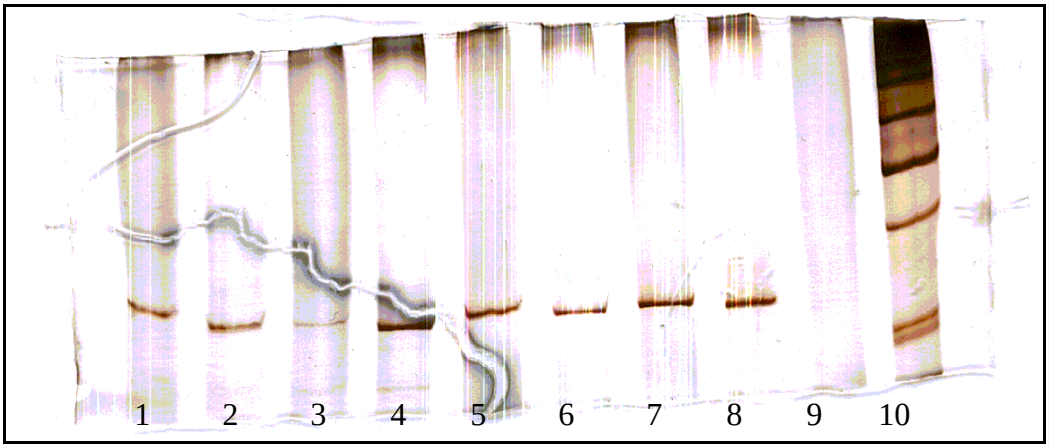
Würde man diese PCR-Produkt in eine Sequenzreaktion einsetzen, so entstünde entweder eine Sequenz, die durch viele Überlagerungen nicht auswertbar wäre, oder man würde ein falsches Ergebnis der Sequenz erhalten.

3.1.1.1 Amplifikation von Exon 4

Als Grundlage für den ersten Reaktionsansatz wird auf eine SSCP-Bediehnung für Exon 4 zurückgegriffen. Da die Reinheitsansprüche wie berichtet bei der Sequenzanalyse viel höher liegen, werden im Folgenden Optimierungen der PCR durchgeführt. Für die Exon 4 Amplifikation werden die Primer E2/ E3 als Vorwärtsprimer und E17/E18 als Rückwärtsprimer eingesetzt. Neben der Optimierung der Primerkombination wird gleichzeitig die Temperaturoptimierung mit durchgeführt.

3.1.1.1.1 Optimierung der Temperatur

Ansatz 1: Die PCR wird bei 50°C und 60°C durchgeführt. Als Primerkombinationen werden von links nach rechts 2/17, 2/18, 3/17, 3/18 verwendet (siehe Abbildung 3-5).



Laufspuren:

1 = DNA von Patient 3, Primer 2/18 bei 50 °C
2 = DNA von Patient 3, Primer 3/18 bei 50 °C
3 = Test DNA, Primer 2/18 bei 50 °C
4 = Test DNA, Primer 2/18 bei 50 °C
5 = DNA von Patient 3, Primer 3/18 bei 60 °C
6 = DNA von Patient 3, Primer 3/18 bei 60 °C
7 = Test DNA, Primer 2/18 bei 60 °C
8 = Test DNA, Primer 2/18 bei 60°C
9 = Leerprobe
10 = Marker

Abbildung 3-5: Temperaturoptimierung bei 50°C und 60°C mit Test-DNA und DNA des Patienten 3 von Exon 4, in 10% Polyacrylamidgel

Nach Wiederholung des Reaktionsansatzes wird 60°C als Annealingtemperatur festgelegt.

3.1.1.1.2 Optimale Primerkombination

Die Festlegung der optimalen Primerkombination läuft natürlich nicht völlig getrennt von der Temperaturoptimierung, da dort bereits die verschiedenen Kombinationmöglichkeiten von Vorwärts- und Rückwärtsprimern berücksichtigt wurden.

Im ersten Ansatz wurden E2 und E3 als Vorwärtsprimer und E17 und E18 als Rückwärtsprimer verwendet, da sie die Amplifikation des gesamten Exon 4 ermöglichen. Weil der Komplementärbereich von E2 und E18 weiter im Intron vor bzw. hinter Exon 4 liegt und somit das amplifizierte DNA-Stück größer ist (810bp) im Gegensatz zu E3 und E17 (759bp), bietet die Kombination E2/E18 eine größere Sicherheit später bei der Sequenzreaktion sowohl Anfang als auch Ende des Exon 4 als gutlesbare Sequenz darzustellen.

Das PCR-Produkt von E2/E18 zeigt sich auf dem Gel genauso rein wie das Produkt von E3/E17.

3.1.1.1.3 Zusammenfassung

H_2O	**10xPuffer**	**DMSO**	**dNTP**	**E2**	**E18**	**Taq**	**DNA**	**Annealing-temperatur**
26	5	5	2	5	5	1	1	60°C

alle Angaben in µl

Tabelle 3-1: Ansatz für 50µl

3.1.1.2 Amplifikation von Exon 3

Da für die Amplifikation von Exon 3 nur je ein Vorwärtsprimer und ein Rückwärtsprimer zur Verfügung stehen, müssen für die PCR nur die Annealingtemperatur und die $MgCl_2$-Konzentration optimiert werden.

Die beiden Parameter werden im Folgenden gemeinsam berücksichtigt.

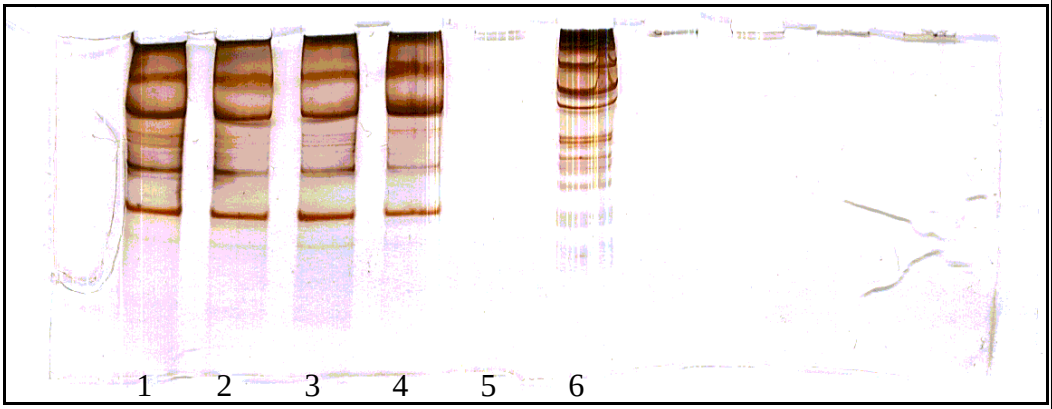
Der erste Reaktionsansatz erfolgt nach einem Ansatz für ein SSCP-Screning für Exon 3.

Ansatz 1:

H_2O	10xPuffer	dNTP	E2F	E2R	Taq	DNA	Annealing-temperatur
14,5	2	0,4	0,3	0,3	0,5	2	60°C

alle Angaben in µl

Tabelle 3-2: Ansatz für 20µl



Laufspuren:

1 = DNA von Patient 1
2 = DNA von Patient 2
3 = DNA von Patient 3
4 = DNA von Patient 4
5 = Leerprobe
6 = Marker

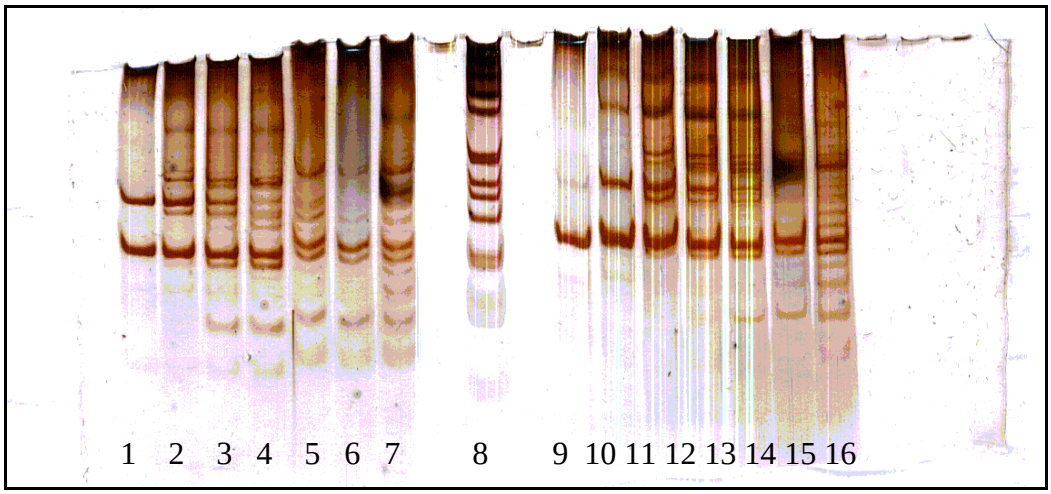
Abbildung 3-6: PCR-Produkt von Patient 1, 2, 3 und 4 von Exon 3 mit Notwendigkeit zur $MgCl_2$-Optimierung und/oder Temperatur-optimierung, in 10% Polyacrylamidgel

Auswertung: Das Muster der Banden auf dem Gel zeigt, das wahrscheinlich die $MgCl_2$ und/oder die Annealingtemperatur nicht im Optimum liegt.

3.1.1.2.1 $MgCl_2$-Optimierung

Um ein für die Sequenzreaktion auswertbares PCR-Produkt zu erhalten, müssen zusätzliche Bande vermieden werden. Dafür muß unter anderem eine optimale $MgCl_2$-Konzentration vorliegen.

Im Ansatz 1 liegt die eingesetzte $MgCl_2$-Konzentration bei 1,5 mM/µl. Das Ergebnis ist ein unreines PCR-Produkt mit vielen Banden auf dem Kontrollgel. Daher wird eine $MgCl_2$-Optimierung durchgeführt, wobei mit einer Konzentration von 1mM/µl beginnend diese Schrittweise erhöht wird. Die Optimierung wird mit 1mM/µl, 1,25mM/µl, 1,5mM/µl, 1,75mM/µl, 2mM/µl, 2,5mM/µl und 5mM/µl durchgeführt. Start- und Endpunkt erfolgt nach Angaben des Herstellers.
Gleichzeitig wird der Versuch bei 50°C, 55°C und 60°C durchgeführt, um auch das Optimum für die Annealingtemperatur festzulegen.



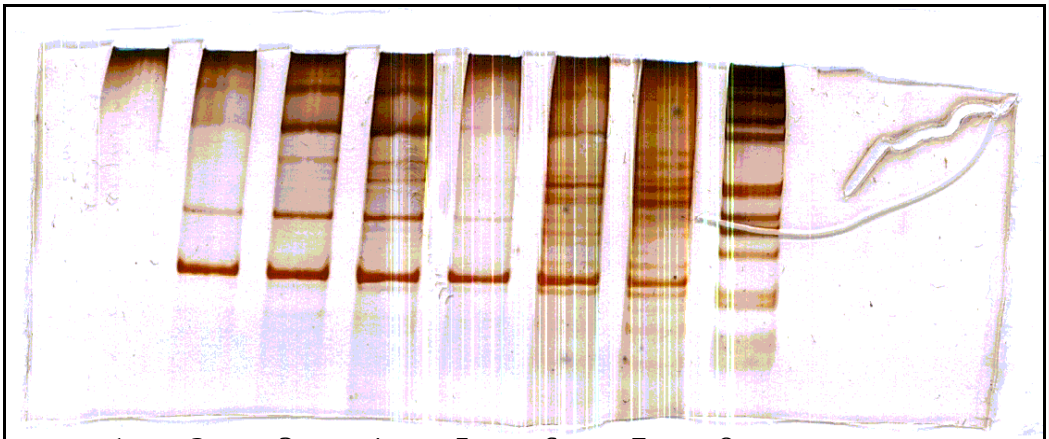
Laufspuren bei 50 °C:

1 = 1 mM $MgCl_2$
2 = 1,25 mM $MgCl_2$
3 = 1,5 mM $MgCl_2$
4 = 1,75 mM $MgCl_2$
5 = 2 mM $MgCl_2$
6 = 2,5 mM $MgCl_2$
7 = 5 mM $MgCl_2$
8 = Marker

Laufspuren bei 55 °C:

9 = 1 mM $MgCl_2$
10 = 1,25 mM $MgCl_2$
11 = 1,5 mM $MgCl_2$
12 = 1,75 mM $MgCl_2$
13 = 2 mM $MgCl_2$
14 = 2,5 mM $MgCl_2$
15 = 5 mM $MgCl_2$
16 = Leerprobe

Abbildung 3-7: Temperatur- und $MgCl_2$-Optimierung von Exon 3 bei 50°C und 55°C mit steigender $MgCl_2$-Konzentration, Test-DNA, in 10% Polyacrylamidgel



Laufspuren bei 60 °C:

1 = 1 mM $MgCl_2$	5 = 2 mM $MgCl_2$
2 = 1,25 mM $MgCl_2$	6 = 2,5 mM $MgCl_2$
3 = 1,5 mM $MgCl_2$	7 = 5 mM $MgCl_2$
4 = 1,75 mM $MgCl_2$	8 = Marker

Abbildung 3-8: Temperatur- und $MgCl_2$-Optimierung von Exon 3 bei 60°C mit steigender $MgCl_2$-Konz., Test-DNA, in 10% Polyacrylamidgel

Auswertung: Das Gel zeigt reinste PCR-Produkt bei einer Konzentration von 1mM/µl bei 55°C

.

3.1.1.2.2 Zusammenfassung

H_2O	Puffer Æ $MgCl_2$	$Mgcl_2$	dNTP	E2F	E2R	Taq	DNA	Annealing-Temperatur
41.1	6	2,4	1,2	0,9	0,9	1,5	6	55°C

alle Angaben in µl

Tabelle 3-3: Ansatz für 60µl

3.2 Sequenzanalyse und Darstellung der Ergebnisse

Bei elf Patienten wurde die Aminosäuresequenz der Exons 3 und 4 des Apolipoprotein E Gens durchgeführt und mit der Wildtypsequenz verglichen.

Aus der Sequenz wurde an Position 112 und 158 direkt der Genotyp abgelesen.

Patient	Mutation	Phänotyp	Genotyp						
			2/2	3/3	4/4	2/3	2/4	3/4	1/2
1	-	2/4+ZB		X					
2	-	2/4 (1+3)	X						
3	-	3/3 (2+1)		X					
4	G 127 D	2/3							X
5	-	3/3						X	
6	-	2/4	X						
7	-	2/4	X						
8	-	2/4				X			
9	-	unklar	X						
10	-	3/3				X			
11	-	2/3		X					

Tabelle 3-4: Ergebnisse der Sequenzanalyse der Patienten 1-11

3.2.1 Ergebnis von Patient 1

Patient 1 ist ein 51-jähriger, männlicher Patient. Seit 1994 ist eine Hyperlipoproteinämie bekannt. Unter lipidsenkender Therapie wurde ein Cholesterin von 388mg/dl, ein TG von 395mg/dl und ein LDL 285mg/dl gemessen.

Der Patient hat eine Adipositas per magna bei einem BMI von 32, art. Hypertonus, KHK mit Z.n. Herzinfarkt `94, positive Familienanamnese, Nikotinabusus bis 1996 bei 20-40 Zigaretten pro Tag. Es sind keine endokrinen Stoffwechselstörungen bekannt.

Der im Feststoffwechsellabor festgelegte Phänotyp ist 2/4+ZB, der Genotyp mittels ristriction isotyping ist 3/3. Der vorgegebene Genotyp läßt sich bestätigen. Auf Exon 3 und 4 des Apo E Gens wurden keine Mutationen gefunden.

Position 112, TGC = Cystein

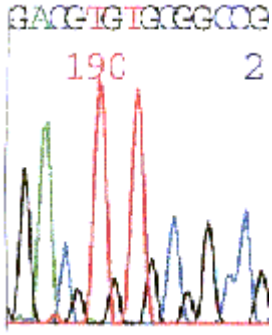


Abbildung 3-9: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 1

Position 158, CGC = Arginin

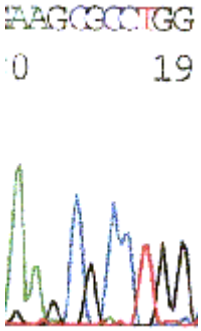


Abbildung 3-10: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 1

3.2.2 Ergebnis von Patient 2

Die Patientin 2 ist 59 Jahre alt und seit 1987 ist eine Hyperlipoproteinämie bekannt. Es fallen bei ihr Xanthoma striata palmaris und eruptive Xanthome an den Ellenbogen auf. Unter lipidsenkender Therapie wurde ein Cholesterin von 962mg/dl und TG von 11709mg/dl gemessen. Es besteht bei ihr eine ausgeprägte positive Familienanamnese für HLP und KHK. Sie selbst gibt keine Erkrankung des kardioraskulären Systems oder der endokrinen Stoffwechsels an. Es besteht eine Adipositas bei einem BMI von 29.

Der Apo E Phänotyp wird mit 2/4 (1+3) angegeben, der Genotyp 2/2. Es wurden keine Mutation auf den Exons 3 und 4 gefunden. Der vorgegebene Genotyp läßt sich mittels Sequenzanalyse bestätigen.

Position 112, TGC = Cystein

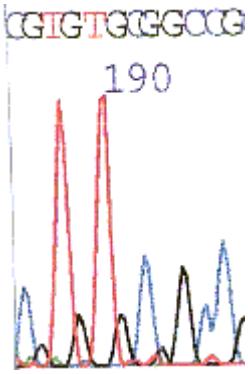


Abbildung 3-11: Sequenzabschnitt aus dem Exon 4 von Patient 2

Positio 158, TGC = Cystein

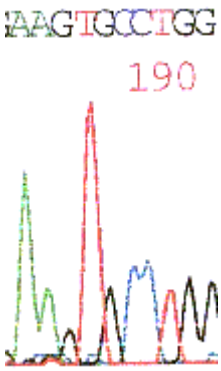


Abbildung 3-12: Sequenzabschnitt aus dem Exon 4 von Patient 2

3.2.3 Ergebnis von Patient 3

Bei dem dritten Patient, männlich, 33 Jahre alt, wurde 1996 eine eine Hyperlipoproteinämie diagnostiziert. Ohne lipidsenkende Therapie hat er ein Serumcholesterin von 287mg/dl und eine Hypertriglyceridämie von 809mg/dl. Es sind keine weiteren Erkrankungen außer einer Adipositas per magna mit bei einem BMI von 31 bekannt, die Familienanamnese ist positiv.

Der Phänotyp wird mit 3/3 (2+1) angegeben, der Genotyp 3/3. Nach einem Vergleich mit der Aminosäuresequenz läßt sich der Genotyp auf 3/3 festlegen.

Position 112, TGC = Cystein

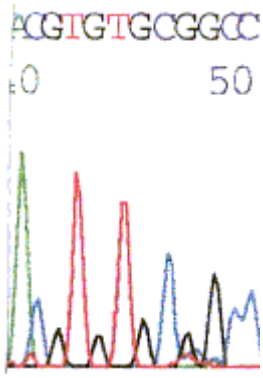


Abbildung 3-13: Sequenzabschnitt aus dem Exon 4 von Patient 3

Positio 158, CGC = Arginin

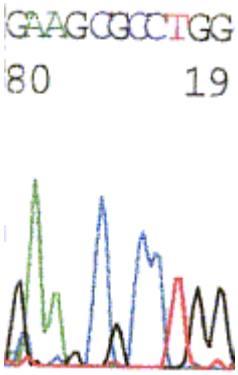


Abbildung 3-14: Sequenzabschnitt aus dem Exon 4 von Patient 3

3.2.4 Ergenis von Patient 4

Der Patient 4 ist 35 Jahre alt und seit ca. Seit neun Jahren ist eine Hyperlipoproteinämie bekannt. Unter lipidsenkender Therapie mißt man ein Cholesterin von 409mg/dl, TG von 657mg/dl, LDL 56mg/dl und HDL von 54mg/dl. Außer einer Adipositas bei einem BMI von 28 sind keine weiteren Erkrankungen bekannt. Die Familienanamnese ist fraglich positiv

Der Phänotyp ist 2/3 und der Genotyp ist 2/2. Bei der Sequenzauswertung zeigt sich im Codon 127 eine heterozygote Mutation (G 127 D). Ein Genotyp mit dieser Mutation wird als Apo E1 bezeichnet. Der vorgegebene Genotyp 2/3 wird auf 1/2 korrigiert.

Position 112, TGC = Cystein

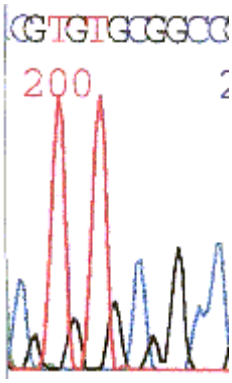


Abbildung 3-15: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 4

Position 127 heterozygot, CGC = Cystein, GAG = Asparagin

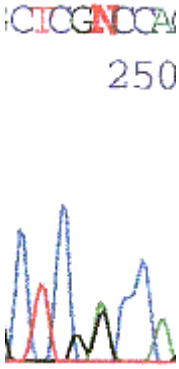


Abbildung 3-16: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 4

Position 158, TGC = Cystein

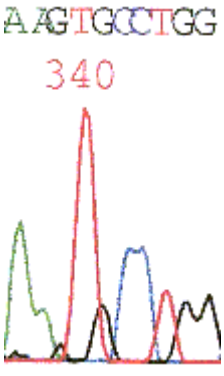
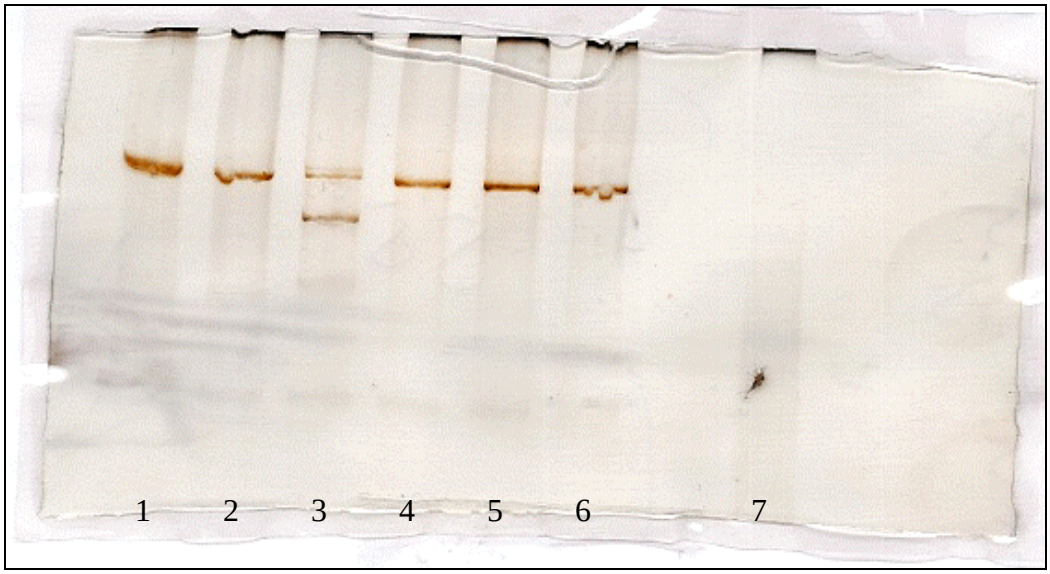


Abbildung 3-17: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 4

Um das Ergebnis der Sequenzanalyse zu unterstützen, wird ein Restriktionsverdau mit TaqI durchgeführt. Dieses Enzym mit der in Kapitel 2 angegebenen

Schneidesequenz findet bei einem mutiertem 127 Triplett eine weitere Schnittstelle vor. Dieses zeigt sich im Gel durch eine zusätzliche Bande (siehe Abbildung 3-18). Zur Kontrolle werden vier weitere Exon 4 Proben dem Verdau unterzogen.



Laufspuren:

1 = DNA von Patient1
2 = DNA von Patient 3
3 = DNA von Patient 4
4 = DNA von Patient 5
5 = DNA von Patient 6
6 = DNA von Patient 7
7 = Leerprobe

Abbildung 3-18: Restriktionsverdau mit TaqI bei Patient 1, 3, 4, 5, 6 und 7 von Exon 4 in 10% Polyacrylamidgel

Ergebnis: Die zu untersuchende Probe ist in Position 3 aufgetragen und zeigt ein eindeutiges Ergebnis.

3.2.5 Ergebnis von Patient 5

Der fünfte Patient ist 47 Jahre alt und 1992 wurde eine Hyperlipoproteinämie diagnostiziert. Er bekommt keine lipidsenkende Medikamente und unter Diät hat er ein Cholesterin von 222mg/dl, ein TG von 178mg/dl, ein LDL 145mg/dl und ein HDL von 34mg/dl. Der Patient hat eine Adipositas mit einem BMI von 31, ansonsten sind keine kardiovaskulären Erkrankungen und keine endokrinen Stoffwechselstörungen bekannt. Er raucht seit 12 Jahren 40 Zigaretten pro Tag. Die Familienanamnese ist nicht sicher erhebbar.

Im Feststoffwechsellabor wurde der Phänotyp auf 3/3 festgelegt, der Genotyp mittels ristriction isotyping mit 3/4 angegeben. Nach der Analyse der Sequenz kann ein Genotyp 3/4 bestätigt werden, es gibt in Exon 3 und 4 keine weiteren Abweichungen von der Wildtypsequenz.

Position 112 heterozygot, TGC = Cystein, CGC = Arginin

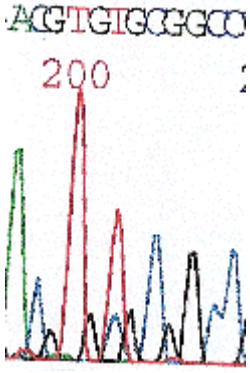


Abbildung 3-19: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 5

Position 158, CGC = Arginin

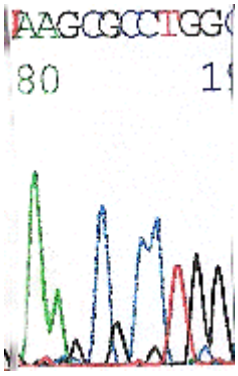


Abbildung 3-20: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 5

3.2.6 Ergebnis von Patient 6

Patient 6, männlich, 44 Jahre alt und hat eine 1993 diagnostizierte Hyperlipoproteinämie mit Cholesterinwerten von 312mg/dl, TG von 382mg/dl, LDL 67mg/dl und HDL von 37mg/dl. Die HLP ist bei dem Patienten im Kontext mit dem metabolischen Syndrom zu sehen, da ein Diabetes mellitus Typ II und

eine Adipositas per magna mit einem BMI von 33 bekannt ist. Art. Hypertonus und Hyperurikämie sind nicht vorbeschrieben, die Familienanamnese ist negativ.
Der Phänotyp ist bei ihm mit 2/4 bestimmt worden, der Genotyp mit 2/2. Der vorgegebene Genotyp 2/2 läßt sich nach Erstellen der Aminosäuresequenz bestätigen. Es wurden keine zusätzlichen Mutationen im Exon 3 und 4 des Apo E Gens gefunden.

Position 112, TGC = Cystein

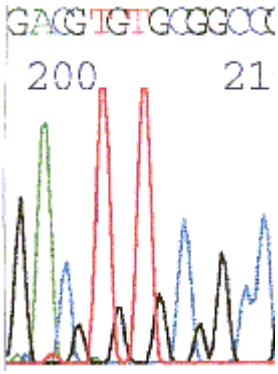


Abbildung 3-21: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 6

Position 158, TGC = Cystein

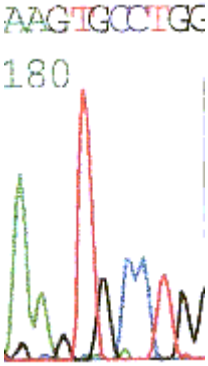


Abbildung 3-22: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 6

3.2.7 Ergebnis von Patient 7

Der siebte Patient, 64 Jahre alt, ist seit ca. 40 Jahren die Hyperlipoproteinämie bekannt, wahrscheinlich eine Typ-III-HLP. Sie weist Xanthoma striate palmaris auf. Unter Diät und lipidsenkende Mediaktion mißt man bei ihr im Plasma

Cholesterin von 467mg/dl, TG von 706mg/dl und LDL46 mg/dl. Als koronare Risikofaktoren läßt sich ein art. Hypertonus, Nikotinabusus mit 20-30 Zigaretten pro Tag und einer Familienanamnese, die positiv auf Diabetes mellitus und art. Hypertonus ist, erheben.

Der Apo E Phänotyp ist mit 2/4 angegeben, der Genotyp mit 2/2 bestimmt worden. Die Aminosäuresequenz des Exon 4 zeigt eindeutig einen Genotyp 2/2, weitere Mutationen im Exon 3 und 4 sind nicht vorhanden.

Position 112, TGC = Cystein

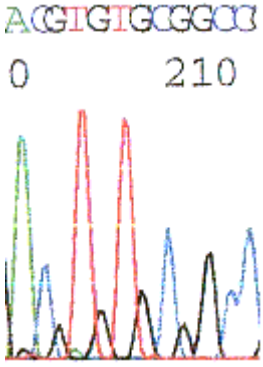


Abbildung 3-23: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 7

Position 158, TGC = Cystein

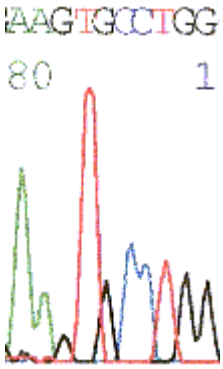


Abbildung 3-24: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 7

3.2.8 Ergebnis von Patient 8

Der achte Patient, 41 Jahre alt, weiß seit ca. 5 Jahren von der Hyperlipoproteinämie. Unter Diät liegt sein Cholesterin bei 322mg/dl, TG bei 1195mg/dl, LDL bei 113mg/dl und HDL bei 65mg/dl. Außer einem art.

Hypertonus sind keine kardiovaskulären Erkrenkungen bekannt. Bei einer bekannten Hyperurikämie, V.a. eine pathologische Glukosetoleranz und einer Adipositas mit einem BMI von 27 liegt auch bei diesem Patienten ein metabolisches Syndrom vor. In der Familienanamnese sind keine Fettstoffwechselstörungen bekannt.

Der Phänotyp ist mit 2/4 vorgegeben, der Genotyp mit 2/3. Nach der Sequenzanalyse läßt sich der Genotyp 2/3 bestätigen und für weitere Mutationen auf Exon 3 und 4 gibt es kein Hinweis.

Position 112, TGC = Cystein

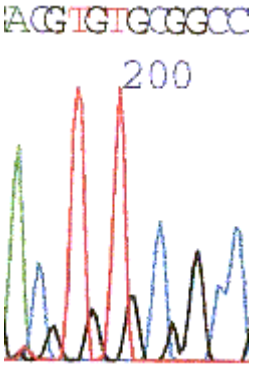


Abbildung 3-25: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 8

Position 158 heterozygot, TGC = Cystein, CGC = Arginin

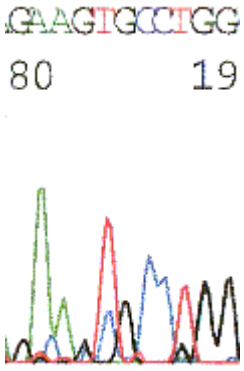


Abbildung 3-26: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 8

3.2.9 Ergebnis von Patient 9

Bei Patient 9, 60 Jahre alt, männlich, wurde vor mehr als 12 Jahren eine HLP diagnostiziert. Unter lipidsenkenden Medikation und Diät mißt man Serumcholesterinwerte von 350mg/dl, Serum-TG-Werte von 280mg/dl, Serum-LDL-Werte von 53mg/dl und HDL-Werte von 58mg/dl. Der Patient hat eine KHK mit Z.n. nach zweifach Art. mammania interna Bypässen und einem Aortokononarer-Venenbypaß (ACVB) 1988, außerdem ist eine Abgangstenose der Art. corotis interna links bekannt. Es besteht eine leichte Adipositas mit einem BMI von 26. Im endokrinen Stoffwechsel sind keine Erkrankungen bekannt, die Familienanamnese ist negativ.

Der Phänotyp ist bei diesem Patienten nicht auswertbar gewesen. Der Genotyp wurde als 2/2 bestimmt. Mit der Sequenzanalyse läßt sich der Genotyp 2/2 bestätigen und weitere Mutationen auf Exon 3 und 4 ausschließen.

Position 112, TGC = Cystein

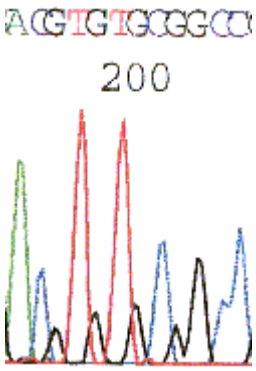


Abbildung 3-27: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 9

Position 158, TGC = Cystein

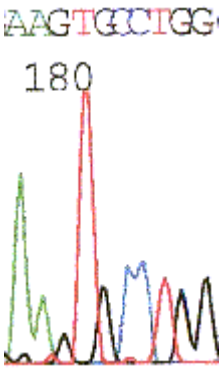


Abbildung 3-28: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 9

3.2.10 Ergebnis von Patient 10

Der 10. Patient, männlich, ist 64 Jahre alt. Seit mehr als 30 Jahren ist eine Hyperlipoproteinämie bei ihm bekannt. Er hält Diät und unter lipidsenkender Medikation mißt man ein Cholesterin von 145mg/dl, ein TG von 65mg/dl, ein LDL von 80mg/dl und ein HDL von 36mg/dl; damit hat er unter Therapie jetzt eine normolipamische Stoffwechsellage. Bei diesem Patienten ist eine KHK bekannt, ansonsten werden keine weiteren Erkrankungen angegeben. Der BMI liegt bei 24 und damit im oberen Normbereich. In der Familie sind erhöhte Cholesterinwerte bekannt.

Sein Phänotyp wurde mit 3/3 angegeben, der Genotyp mit 2/3. Nach Erstellung der Sequenz läßt sich der Genotyp auf 2/3 festlegen. Weitere Mutationen auf Exon 3 und 4 zur Erklärung der aufgetretenen Diskrepanz können ausgeschlossen werden.

Position 112, TGC = Cystein

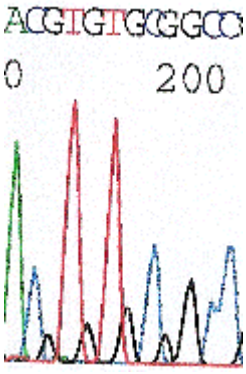


Abbildung 3-29: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 10

Position 158 heterozygot, TGC = Cystein, CGC = Arginin

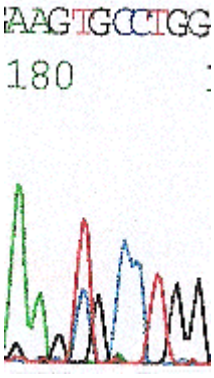


Abbildung 3-30: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 10

3.2.11 Ergebnis von Patient 11

Die elfte Patientin, 61 Jahre alt, hat unter leichter Diät eine fast normolipanische Stoffwechsellage mit leicht erhöhtem Serumcholesterin von 221mg/dl, TG von 73mg/dl, LDL von 111mg/dl und HDL von 84mg/dl befinden sich im Normbereich. Der BMI von 24 ist im Normbereich. Außer eines Herzklappenfehlers sind keine kardiovaskulären Erkrankungen bekannt. Die endokrine Stoffwechsellage ist im Normbereich, die Familienanamnese ist unauffällig.

Bei der Patientin ist eine Diskrepanz zwischen Phänotyp 2/3 und Genotyp 3/3 aufgefallen. Nach der Sequenzanalyse kann man den Genotyp 3/3 festlegen. Im Exon 3 und 4 zeigen sich im Vergleich mit der Wildtypsequenz keine Abweichungen.

Position 112, ACG entspricht TGC = Cystein

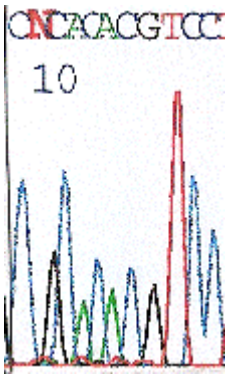


Abbildung 3-31: Sequenzabschnitt aus Exon 4 rückwärts gelesen dargestellt von Patient 11

Position 158, CGC = Arginin

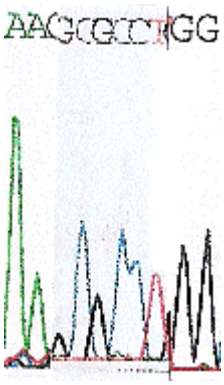


Abbildung 3-32: Sequenzabschnitt aus Exon 4 von Patient 11

4 Diskusssion

Die Analyse des Apo E-Polymorphismus mittels Phänotypisierung und Gentotypisierung ergibt regelmäßig Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen.
In der vorliegenden Arbeit wurde bei 11 Patienten der Fettstoffwechselambulanz der Klinik für Innere Medizin des Universitätsklinikums Hamburg, Eppendorf, die durch eine Diskrepanz zwischen Phänotyp und Genotyp aufgefallen sind, eine Sequenzanalyse des Exon 3 und 4 des Apo E Gens durchgeführt.
Es bestand die Fragestellung, ob Mutationen zusätzlich zu dem bekannten Polymorphismus aufgetreten sind und durch Aminosäuretausch zu Änderungen der relativen Nettoladung geführt haben. Das Ergebnis der Phänotypisierung wäre dann nicht mehr verwertbar.
Diese Fragestellung läßt sich am sichersten mit einer Darstellung der Aminosäuresequenz des Apo E Gens klären, da die erstellte Sequenz der Patienten direkt mit der Wildtypsequenz vergleichbar ist. Außerdem ergibt sich so die Möglichkeit die isoelektrische Fokusssierung und Genotypisierung mittels Restriktionsanalyse bei den 11 Patienten in Korrelation zu setzen, da durch ein drittes Verfahren, die Sequenzanalyse der Genotyp mit größter Sicherheit festgelegt werden kann. Dieser kann dann zur Überprüfung der Ergebnisse verwendet werden.
Es wurden die Aminosäurensequenzen von Exon 3 und 4 des Apo E erstellt. Exon 1 und 2 werden nicht berücksichtigt. Es besteht natürlich die Gefahr, dadurch eine Mutation in diesen Exons zu verpassen. Die Wahrscheinlichkeit, daß eine Mutation in diesem Bereich eine Diskrepanz zwischen Phänotyp und Genotyp verursacht, ist sehr gering. Exon 1 liegt nicht im 5'translatierten Bereich und damit enthält es keine Information für Aminosäuren. Somit könnte eine Mutation keine Änderung der relativen Nettoladung verursachen. Exon 2 wird zwar translatiert, ist aber im Bezug auf die Gesamtgröße des 5'translatierten Bereich sehr klein. Damit ist auch die Wahrscheinlichkeit, daß die Mutation in diesem Bereich liegt, sehr gering, aber natürlich nicht ganz ausgeschlossen.

Bei der Sequenzanalyse der 11 Patienten konnte in 10 Fällen der Genotyp, der zuvor mittel Restriktionsanalyse ermittelt wurde, bestätigt werden.
In einem Fall konnte sowohl der vorgegebenen Phänotyp 2/3 als auch des Genotyp 2/2 nicht bestätigt werden.
Aus der Aminosäuresequenz konnte der Genotyp auf 1/2 festgelegt werden. An Position 127 des Exons 4 kam es durch Mutation heterozygot zu einem Aminosäurewechsel von Cystein zu Arginin. Die relative Nettoladung des Apo E hat eine zusätzlich negative Ladung bekommen.
Durch später durchgeführte Analysen wie der TaqI-Verdau und eine wiederholte Phänotypisierung ließ sich das Ergebnis bestätigen. Unter diesen Umständen ist in diesem Fall davon auszugehen, daß im Rahmen der ersten Phänotypisierung und Genotypisierung eventuell zu einer Vertauschung der Proben gekommen ist und damit der von einer Vertauschung ausgehende Lösungsansatz zutrifft.

Bei den anderen 10 Patienten konnten auf Exon 3 und 4 keine Abweichungen von der Wildtypsequenz festgestellt werden. Damit ist trotz des nicht sequenzierten Exon 2 bei den 10 Patienten davon auszugehen, daß nicht zusätzliche Mutationen für die Diskrepanzen verantwortlich sind. Somit ist **erste Lösungsansatz** ist für dieses Patientengut nicht zutreffend.

Also muß es eine andere Erklärung der Diskrepanzen für die 10 Patienten geben. Es ist davon auszugehen, daß es zu Fehlinterpretation des Phänotyps gekommen ist, da durch die Sequenzanalyse die Genotypen bestätigt wurden. Damit ist die Genotypisierung mit einer Fehlerquote von *9,09%* im Vergleich mit der Phänotypisierung mit einer 100% Fehlerquote bei diesen Patientengut die eindeutig sensiblere Methode.
Der Lösungsansatz, der von Vertauschung ausgeht, kann für die 10 Proben vernachlässigt werden, da es sicher nicht zehnmal zur Probenvertauschung bei Phänotypisierung oder Genotypisierung gekommen ist.
Als **zweiter Lösungsansatz** wurden die die Phänotypisierung erschwerende Glykosylierung und posttranslationellen Modifikation (122 142) erwähnt. Es kommt so zu zusätzlichen Banden und somit zur Fehlinterpretation. Viele enzymatisch katalysierten Modifikationen können durch eine Vorbehandlung mit

Neuraminidase entfernt werden. Nicht-enzymatisch katalysierte Verbindungen bleiben bestehen (78, 101). Diese enstehen meistens durch Glykosylierungen.
Wenham et al. (136) stellte die Vermutung auf, daß bei Patienten mit Diabetes mellitus es vermehrt zu dieser Glykosylierungen und damit vermehrt zu Diskrepanzen kommen müßte. Es wurde eine Gruppe Patienten mit Diabetes mellitus und eine gleichgroße Kontrollgruppe phänotypisiert und genotypisiert. Die Diabetespatienten zeigten in 13% der Fälle Diskrepanzen, die Kontrollgruppe in 16% der Fälle. Damit ließ sich der Ansatz nicht belegen, daß Diabetes mellitus die Auswertung der Phänotypisierung verfälscht. In dem vorliegenden Patientengut sind 18,18% der Patienten (entspricht 2 Patienten) an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt. Für das vorliegende Patientengut ergeben sich damit keine Hinweise, daß es duch Vorliegen der Diabetes mellitus zur signifikanten Störung der Auswertung der Phänotypisierung kommt.
Das Modifikation des Apo E für Fehlinterpretationen der Pänotypisierung verantwortlich sind, bleibt weiter als möglicher Lösungsansatz bestehen, kann im Rahmen dieser Arbeit aber nicht eingehender geklärt werden.

Als **dritter Lösungsansatz** wurden die unterschiedlichen Plasmakonzantrationen von Apo E bei den verschiedenen Isoformen angegeben (37, 40), die aufgrund der Konzentraionsunterschiede zu Fehlinterpretationen führen können. In dem vorliegenden Patientengut liegt folgende Verteilung der Isoformen vor:

Genotypen	**2/2**	**3/3**	**4/4**	**2/3**	**2/4**	**3/4**
Anzahl im Patientengut	4	3	/	2	/	1

Tabelle 4-1: Verteilung der Isoformen des Apo E im Patientengut

Die Isoform 4/4 liegt nicht vor und 3/4 ist einmal vorhanden. Damit sind eventuelle Plasmakonzentrationsschwankungen, die zwischen ε2 homozygot und ε4 an Größten sind (12), in diesem Patientengut nicht ausgeprägt und verlieren als Lösungsansatz damit an Bedeutung.

Abschließend läßt sich zusammenfassen, daß für 90,9% des vorliegenden Patientengutes wahrscheinlich keine zusätzlichen Veränderungen der Aminosäuresequenz zu den Diskrepanzen geführt hat.

Am wahrscheinlichsten scheint beim Vergleich der Lösungsansätze der unter Punkt zwei aufgeführte Lösungsansatz, daß Glykosylierungen und posttranslationelle Veränderungen die Ergebnisse der Phänotypisierung verfälschen.

An diesem Punkt der Erklärungen der Diskrepanzen sind viele Studien, die diese Diskrepanzen klären wollten, gelangt.

Hansen et al. (1994) (42), Snowden et al. (1991) (117) und Wenham et al. (1991) (136) stellten in ihren Studien die Ergebnisse der Phänotypisierung und Genotypisierung gegenüber. Als Ergebnis der Studien konnten die Diskrepanzen in hohem Prozentsatz nicht geklärt werden, aber die Glykosylierungen und posttranslationellen Veränderungen und damit Verfälschung der Phänotypisieurng wurden als Lösungsansatz favorisiert.

Für das Patientengut dieser Studien konnten allerdings nie Mutationen als Verursacher der Diskrepanzen ausgeschlossen werden, da die Aminosäuresequenz nicht dargestellt wurde.

Aber nur die aufwendige Sequenzanalyse kann Mutationen mit größter Wahrscheinlichkeit ausschließen.

In der vorliegenden Arbeit konnte so für 90,9% der Diskrepanzen eine Mutation ausgeschlossen werden. In einer Studie über Vergleich zwischen Phänotypisieurng und Genotypisierung von Feussner et al. (29) wurden 5,6% Diskrepanzen gefunden. Diese wurden dann einer Sequenzanalyse unterzogen und es fand sich in einem Fall eine bisher nicht beschriebene Punktmutation in der dritten Position des Codon 20 (TGG -> TGA). Diese Studie zeigt, daß die Durchführung der aufwendigen Sequenzanalyse durchaus Berechtigung hat und zur Klärung der Diskrepanzen beiträgt.

Für die Zukunft empfiehlt sich im Umgang mit Diskrepanzen zunächst eine Probenvertauschung auszuschließen, eine Neuraminidasebehandlung durchzuführen und bei weiterbestehenden Diskrepanzen eine Sequenzanalyse anzuschließen.

5 Zusammenfassung

Bei den Routineuntersuchungen, die den Polymorphismus des Apolipoprotein E der Patienten in der Lipidambulanz des Universitätsklinikums Hamburg, Eppendorf, untersuchen, werden zwei Verfahren angewendet. Die Isoelektrische Fokussierung wird zur Bestimmung des Phänotypes angewendet und die Restriktionsanalyse zur Festlegung des Genotypes. Diese Verfahren werden in manchen Laboratorien zwecks Qualitätssicherung parallel angewendet. Bei Verwendung beider Verfahren zeigt sich in einem gewissen Prozentsatz Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Sequenzananlyseverfahren untersucht, ob zusätzliche Mutationen für die Diskrepanz verantwortlich sind. Diese Methode ist im Gegensatz zu anderen Screening-Verfahren wesentlich zeitaufwendiger, bietet aber den Vorteil, das die erstellte Sequenz des Patienten direkt mit der Wildtypsequenz abgleichbar ist. Um eine Mutation festzustellen, gibt es keine genaueres Verfahren. Diese Methode wurde bei 11 Patienten aus der Lipidambulanz durchgeführt, die wegen der Diskrepanz zwischen ihrem Phänotyp und Genotyp aufgefallen sind. Es wurden die Sequenz von Exon 3 und 4 des Apo E Gens von den 11 Patienten hergestellt. Die Exons 1 und 2 wurden bei der Analyse vernachlässigt.
Als Ergebnis der Sequenzanalyse zeigt sich, das in einem Fall der vorgegebene Phänotyp und der Genotyp korregiert werden konnte. Die anderen 10 Proben zeigten keine Abweichungen von der Wildtypsequenz in Exon 3 und 4.
Damit sind Mutationen bei diesen Proben als Ursache für Diskrepanzen mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen und es muß an andere Lösungsansätzen gearbeitet werden, wie zum Beispiel posttranslationelle Modifikationen.

1. LITERATURVERZEICHNIS

2. Acton S, Rigotti A, Landschulz K, Hobbs HH, Krieger M (1996) Identification of scarenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. Science 271:518-20
3. Arendl T, Schinder CV, Bruckner MK, Eschnich K, Bige V, Zedlich D, Marcova L (1997) Plastic neuronal remodeling impaired in patients with Alzheimer`s disease carrying apolipoprotein epsilon 4 allele. J Neuroscience Jan15;17(2):516-529
4. Assmann G, von Eckardstein A, Funke H, Rust S, Sandkamp M (1991) Analysis of genetically determined structural polymorphisms in apolipoprotein E, B and (a). Curr Opp Lipidol 2:367-75
5. Beffert D, Danik M, Krzynkowski P, Ramassamy C, Berada F, Poirier J, (1998) The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer`s disease. Brain Res Rev 27:19-42
6. Beisiegel U (1995) Receptor for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. Curr Opin Lipidol 6(3):117-22
7. Beisiegel U (1998) Lipoprotein metabolism. Eur Heart J 19:20-23
8. Beisiegel U, Niendorf A, Wolf K, Rath M (1990) Lipoprotein (a) in the arterial wall. Eur Heart J 11 Suppl E:174-83
9. Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G (1991) Protein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. Proc Natl Acad Sci,USA 88:8342-6
10. Beisiegel U, Weber W, Ihrk G, Herz J, Stanley KK (1989) The LDL receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E binding protein. Nature 341:162-64
11. Bersot TP, Mahley RW, Brown MS, Goldstein JL (1976) Interaction of different lipoproteins with low density lipoprotein receptor in human fibroblast. J Biol Chem 251:2395
12. Black S, Brunt RV, Reckless JPD (1985) Apolipoprotein E isoforms in diabetes. Monogr Artheroscler 13:111-4

13. Boerwinkle E, Utermann G (1985) Simultaneous effects of apolipoprotein E polimorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B and cholesterol metabolism. Am Hum Genet 42:104-12
14. Borrie P (1969) Type III hyperlipoproteinemia. Br Med J 2:665
15. Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homostasis. Science 232:34-47
16. Chapell DA (1988) Pre ß-very low density lipoproteins as precursor of ß-very low density lipoproteins: A model for the pathogenesis of familial dysbetalipoproteinemia (type III hyperlipoproteinemia). J Clin Invest 82:628
17. Chapell DA, Fry GL, Waknitz MA, Muhanen LE, Pladet MW, (1993) Low density lipoprotein receptor bind and mediate cellulare catabolism of normal very low density lipoproteins in vitro. J Biol Chem 268:25487-92
18. Christie RH, Chung H, Rebeck GW,Srickland D, Hyman BT (1996) Expression of the very low-density lipoprotein receptor (VLDL-R), an apolipoprotein E receptor in the central nervous system and in Alzheimer`s disease. J Neuropathol Exp Neurol 55:491-98
19. Cladaras C, Hadzopoulou-Cladaras M, Felber BK, Pavlakis G, Zannis VI (1987) The molecular basis of a familoial apo E defiency. An acceptor splice site mutation in the third intron of the dificient apo E gene. J Biol Chem 262(5):2310-5
20. Corder EH, Saunders AM, Schrittmatter WJ, Schmeckel DE, Gaskell PC, Roses AD, Heines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer`s disease in late-onset families. Science 261:921-923
21. Curtiss LK, Witzum JL (1985) Plasma apolipoproteins AI, AII, B and E are glycosylated in hyglycaemic diabetic subjects. Diabetes 34:452-61
22. Das HK, Mc Pherson J, Bruns Gap, Karathanasis SK, Breslow JL (1985) Isolation, charcterization and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. J Biol Chem 266:6240
23. Davignon J Jean, et al. (1985) Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. Arteriosclerosis 8:1-21

24. Driscoll DM, Getz GS (1984) Extrahepatic synthesis of apolipoprotein E. J Lipid Res 25:1368
25. Ehnholm C, Lukka M, Kuusi T, Nikklä E, Uterman G (1986) Apolipoprotein E polymorphism in the Finish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentration. L Lipid Res 27:227-35
26. Ehnholm C, Mahley RW, Chapell DA, Weisgraber KH, Ludwig E, Witzum JL (1984) The role of apolipoprotein E in the lipolytic conversion of ß-very low density lipoproteins to low density lipoproteins in type III hyperlipoproteinemia. Proc Natl Acad Sci, USA 81:5566
27. Elshourbaggy NA, Laio WS, Mahley RW, Taylor JM (1985) Apolipoprotein E mRNA is aboundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. Proc Natl Acad Sci, USA 82:203-7
28. Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, White R, Lalouel J-M (1988) Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. Genomics 3:373
29. Fainaru M, Mahley RW, Hamilton RL, Innerarity TL (1982) Structural and metabolic heterogeneity of ß-very low density lipoproteins from cholesterol-fed dogs and from humans with type III hyperlipoproteinemia. J Lipid Res 23:702
30. Feussner G, Feussner V, Hoffmann MM, Lohrmann J, Wieland H, März W (1998) Molecular basis of type III hyperlipoproteinemia in Germany. Human Mutation 11(6):417-23
31. Feussner G, Funke H, Weng W, Assmann G, Lackner KJ, Ziegler R (1992) Severe type III hyperlipoproteinemia associated with unusal apolipoprotein E1 phenotype and epsilon 1/ null genotype. Eur J Clin Invest 22(9):599.
32. Feussner G, Scharnagl H, Scherbaum C, Acar J, Dobmeyer J, Lohrmann J, Wieland H, Marz W (1996) Apoliporotein E5 (Glu212→ Lys): increased binding to cell surface proteoglycanes but uptake and lysosomal degredation in cultured fibriblasts. J Lipid Res 37(8): 1632-45

33. Frederickson DS, Levy RS, Leers RS (1967) Fat transport in lipoproteins: An integrated approach to mechanisms and disorders. N Engl J Med 276:34, 94, 148, 215, 273
34. Frederickson DS, Levy RS, Lindgren FT (1975) The biochemical, clinical and genetic features of type III hyperlipoproteinemia. Ann Intern Med 82:158
35. Ghiselli G, Schaefer EJ, Gascon P, Brewer HB Jr (1981) Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E defiency. Science 214:1239-41
36. Glomset JA (1968). Lipoproteinmetabolism. J Lipid Res 9:155-67
37. Goldstein JL, Ho YK, Brown MS, Innearity TL, Mahley RW (1980) Cholesteryl ester accumulation in macrophages resulting from receptor-mediated uptake and degradation of hypercholesterolemic canine ß-very low density lipoproteins. J Bid Chem 255:1839
38. Gregg RE, Brewer HB jr. (1988) The role of apolipoprotein E and lipoprotein receptors in modulating the in vivo metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins in human. Clin Chem 34 Suppl:B28-B32
39. Gregg RE, Ghiselli G, Brewer HB Jr. (1983) Type III hyperlipoproteinemia. J Clin Endo Metab 57:969-74
40. Gregg RE, Zech LA, Schaefer EJ, Brewer HB Jr. (1981) Type III hyperlipoproteinemia: Defective metabolism of an abnormal apolipoprotein E. Science 211:584
41. Gregg RE, Zech LA, Schaefer EJ, Stark D, Wilson D, Brewer HB Jr. (1986) Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans. J Clin Invest 78:815-21
42. Haber C, Kwiterovich PO Jr. (1984) Dyslipoproteinemia and xanthomatosis. Pediatr. Dermatol 1:261
43. Hansen PS, Gerdes LU, Klausen IC, Gregersen N, Faergemann O (1994) Genotyping compared with protein phenotyping of the common apolipoprotein E polymorphism. Clin Chim Acta 224:131-137

44. Harris ELV, Angal S (Hrag.) (1990) Protein purification applications: a practical approach. Oxford, New York and Toyko: IRL Press at Oxford University Press (6.Auflage, S.53-54)
45. Harzzard WR (1977) Primary type III hyperlipoproteinemia. In Rifkind BM, Levi RI (Hrag.) Hxperlipidemia. Diagnosis and Therapie. New York, Grune&Stratton (S.137)
46. Havekes L, de Wit E, Leuven JG, Klasen E, Utermann G, Weber W, Beisiegel U (1986) Apolipoprotein E3-Leiden. A new variaqnt of human apolipoprotein E associated with familial type III hyperlipoproteinemia. Hum Genet 73(2): 157-63
47. Havel RJ, Chao YS, Windler EE, Kolote L, Guo LSS (1980) Isoprotein specifity in the hepatic uptake of apolipoprotein E and the pathogensis of familial dysbetalipoproteinemia. Proc Natl Acad Sci, USA 77:4349
48. Havel RJ, Goldstein JH, Brown MS (1980) Lipoproteins and lipid transport. In: Bondy PK, Rosenberg LE (Hrag.) Metabolic control and disease. Philadelphia Saunders (8. Auflage, S.423-27)
49. Havel RJ, Kane JP (1973) Primary dysbetalipoproteinemia: Predominance of a specific apoprotein species in tryglyceride- rich lipoproteins. Proc Natl Acad Sci, USA 70:2051
50. Havel RJ, Kotite L, Kane JP, Bersot T (1983) A typical familial dysbetalipoproteinemia associated with apolipoprotein phenotype E3/3. J Clin Invest 72:379
51. Hellige G, Spiekermann PG, Ziegler A (1995) Lipoprotein and artherogenese. Arcis-Verlag. Astra Promed
52. Hixson JE, Vernier DT (1990) Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. J Lipid Res 31:545-48
53. Holzmann DM, Pitas RE, Killeritge J, Nathan B, Mahley RW, Schwartz AL, Schwartz GU (1995) Low density Lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E dependent neurite outgroth in a central nervous system-derived neuronal cell line. Natl Acad Sci 92:9480-9484

54. Horie Y, Fazio S, Weisgraber KH, Rall SC Jr. (1992) The funktional characteristics of a human apolipoprotein E variant (cystein at residue 142) may explain it`s association with dominant expression of type III hyperlipoproteinemia. J Biochem Mol Biol 267(3):1962-68
55. Ignatus MJ, Gebicke-Haerter PJ, Skene JH, Schilling JW, Weisgraber KH, Mahley RW, Shooter EM (1986) Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regulation. Proc Natl Acad Sci, USA 83:1125-29
56. Innerarity TL, Mahley RW (1978) Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo E containing lipoproteins as compared with low density liporoteins. Biochemistry 17:1440
57. Innerarity TL, Weisgraber KH, Rall SC, Mahley RW (1987) Funktional domains on apolipoprotein E and apolipoprotein B. Med Scand 715: 51-9
58. Ji ZS, Fazio S, Mahley RW (1994) Variable heparan sulfate proteoglycan binding of apo E variants may modulate the expression of type III hyperlipoproteinemia. J Biol Chem 369:13421-28
59. Kane JP, Chen GC, Hamilton RL, Hardman DA, Mallory MJ, Havel RJ (1983) Remnants of lipoproteins of intestinal and hepatic origin in familial dysbetalipoproteinemia. Artheriosclerosis 3:47
60. Karlson P (1988)-7 Phospholipide, Glykolipide und Lipoproteine. In: Peter Karlson (Hrag.) Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (13. neubearbeitete Auflage; S. 294-295)
61. Kim DH, Iijima H, Gotok H, Sakai J, Ishii H, Kim HJ, Suzuki H, Kondo H, Saeki S, Yamamoto T (1996) Human apolipoprotein E receptor 2. J Biol Chem 71:8373-80
62. Kinoshita M, Arai H, Fukasawa K, Watanabe T, Tsukamoto K, Hashimoto Y, Inoue K, Kurokawa K, Teramoto T (1993) Apolipoprotein E enhances lipid exchanges between lipoproteins mediated by cholesteryl ester transfer protein. J lipid Res 34:261-68
63. Koo C, Wernette-Hammond MG, Innerarity TL (1986) Update of canine ß-very low density lipoproteins by mouse peniteneal macrophages is mediated by a low density lipoprotein receptor. J Biol Chem 261:1119

64. Kostner GM, März W (2001) Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lioproteine. In: Schwandt, Richter (Hrag.) Handbuch der Fettstoffwechslstörungen. Schattauer Verlag (2. neubearbeitete Auflage, S.4-51)
65. Krieger M (1998) The „best“ of cholesterol, the „worst“ of cholesterol: a tale of two receptors. Pri Natl Acad Sci, USA 95:4077-80
66. Lacko AG (1994) The metabolism of high density lipoproteins. Trends Cardiovasc Med 4:84-88
67. Lalazar A Avraham, et al. (1986) Human Apolipoprotein E. J Biol Chem 264(15):8447-8450
68. Lohse P, Mann A, Stein EA, Brewer HB Jr. (1991) Apoliprotein E-4 $_{\text{Philadelphia}}$ (Glu ^{13} →Lys, Arg^{145}→ Cys): Homozygosity for two rare point mutations in the apolipoprotein E gene combined with severe type III hyperlipoproteinemia. J Biol chem 266(16):10479-84
69. Lottspeich F, Zorbas H (1998)-3 Isoelektrische Fokussierung. In:Lottenspeich F, Zorbas H (Hrag.) Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin (1.Auflage, S.235-237)
70. Luley C, Prellwitz W, Oster O, Kloer HU (1987) Determination of apolipoprotein variants by isoelectric focusing in agarose. Anal Biochem 163:182
71. Maeda H, Nakamura H, Kobori S, Okada M, Mori H, Niki H, Ogura I, Higara S (1989) Identification of human apolipoprotein E variant gene: apolipoprotein E7 (Glu224, 245 to Lys 224, 245). J Biochem 105:51-54
72. Mahley RW (1979) Dietary fat, cholesterol and accelerated atherosklerosis. In Paoletti R, Gotto AM (Hrag.) Artherosklerosis Reviews, New York, Raven, (5.Auflage, S.1)
73. Mahley RW (1982) Atherogenic hyperlipoproteinemia. The celluar and molecular biology of plasma lipoproteins altered by dietary fat and cholesteroly. Med Clin North Am 66:375
74. Mahley RW (1983) Development of accelerated atherosklerosis. Concepts derived from cell biology and animal model studies. Arch Pathol Lab Med 107:393

75. Mahley RW (1985) Atherogenic lipoproteins and coronary artery disease: concepts derived from recent advancesin celluar and molucular biology. Circulation 72:943
76. Mahley RW (1988) Apoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. Science 240:622-30
77. Mahley RW, Hussain MM (1991) Chylomicron and chylomicron remnant catabolism. Curr Opin Lipidol 2:170
78. Mahley RW, Innertarity TL, Rall SC Jr., Weisgraber KH, Taylor JM (1990) Apolipoprotein E: Genetic variants provide insights into its structure and function. Curr Opin Lipidol 87:465
79. Mahley RW, Rall SC Jr. (1995) Type III Hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia): The Role of Apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS Valle DV (Hrag.) The metabolic and molecuar bases of inherited disease. Mc Graw-Hill (7. Auflage)
80. Mahley RW, Weisgraber KH, Innerarity TL, Rall SC Jr. (1991) Genetic defects in lipoprotein metabolism: Elevation of atherogenic lipoproteins caused by impaired catabolism. JAMA 265:78
81. Mailly F, Xu CF, Xhignesse M, Lussier-Cacan S, Talmund PJ, Davignon J, Humphries SE, Nestruck AC (1991) Characterization of a new apolipoprotein E5 variant detected in two French –Canadian subjects. J Lipid Res 32(4):613-20
82. Majak RA, Castle CK, Goodmann LV, Weisgraber KH, Mahley RW, Shooter EM, Gebicke-Haerter PJ (1988) Expression of apolipoprotein E by cultured vascular smooth muscle cells in controlled growth state. J Cell Biol 107:1207
83. Mann A, Gregg RE, Sprecher DL, Brewer HB Jr. (1989) Apolipoprotein E-1 Harrisburg: A new variant of apolipoprotein E dominantley associated with type III hyperlipoproteinemia. Biochem Biophhys Acta 1005:239-244
84. Marmate, Ayril DS, Sturm M, Foo JI, van Bockxmeer FM, Taylor RR (1999) Comparison of the LDL-receptor binding of apo E4 and apo E3 homozygotes. Am J Physsiol 276:553-557 (Endocinol Metab 39)

85. Mc Lean JW, Elshourbagy NA, Chang DJ, Mahley RW, Taylor JM (1984) Human apolipoprotein E mRNA cDNA cloning and nucleotide sequence of a new variant. J Biol Chem 259:6498-6504
86. Mc Pherson J, Burns GAP, Karatansis SK, Breslow JL (1985) Isolation, characterisation and mapping to chromosomen 19 of human apolipoprotein E gene. J Biol Chem 260:6240-7
87. Menzel HJ, Kladetzky RG, Assmann G (1983). Artheriosclerosis and type III hyperlipidemia. Artheriosclerosis 3:310
88. Miskel MA (1972) Type III hyperlipoproteinemia with xanthomatosis. In Peeters H (Hrag.) Protides of the biological fluids. Oxford, Pergamon (S.285)
89. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT (1994) Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implication for plaque rupture. Circulation 9(2):775-8
90. Morganroth J, Levy RI, Fredrickson DS (1975) The biochemical, clinical and genetic features of type III hyperlipoproteinemia. Ann Intern Med 82:158
91. Moriyama K, Sasaki J, Matsunaga A, Arakawa F, Takada Y, Araki K, Kaneko S, Arakawa K (1992) Apolipoprotein E1 Lys146→ Glu with type III hyperlipoproteinemia. Biochem Biophys Acta 1128:58
92. Olaisen B, Treisberg P, Gredde-Dahl T jr. (1982) The locus for apolipoprotein E (apoE) is linked to the complement component C3 locus on chromosome 19 in man. Hum Genet 62:233
93. Park YK, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW, Taylor JM (1985) Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. Proc Natl Acad Sci, USA 82:3445
94. Parker F (1985) Xanthomas and hyperlipidemies. J Am Acad Dermatol 13:1
95. Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW (1987) Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. Biochem Biophys Acta 917:148

96. Poirier J, Baccichet A, Dea D, Gauthier S (1993) Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodeling in.hyppocampus in adult rats. Neuroscience 55:81-90
97. Poirier J, Hess M, May PC, Frich CE (1991) Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hyppocampus after enterhinal cortex lesioning. Mol Brain Res 11:97-106
98. Pownall W., Gotto S. Jr. (1992) Structure and function of apolipoproteins. In: Maryvonne Rosseneu (Hrag.) Structure and function of apolipoproteins. CRC Press Inc. (1. Auflage, S. 14)
99. Rall SC Jr, Weisgraber KH, Innerarity TL, Bersot TP, Mahley RW, Blum CB (1983) Identification of a new structual variant of human apolipoprotein E, E2(Lys_{146}->Gln), in a type III hyperlipoproteinemic subject with E3/2 phenotype. J Clin Invest 72:1288
100. Rall SC Jr., Newhouse YM, Clarke HRG, Weisgraber KH, McCarthy BJ, Mahley RW, Bersot TP (1989) Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E phenotype E3/3: Structure and genetics of an apolipoprotein E3 variant. J Clin Invest 83:1095
101. Rall SC Jr., Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW (1982) Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. Proc Natl Acad Sci, USA 79:4696
102. Rall SC Jr., Weisgraber KH, Mahley RW (1982) Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. J Biol Chem 257:4171
103. Reblin T, Niemeier A, Meyer N et al. (1997) Cellular uptake of lipoprotein (a) by mouse embryonic fibroblasts via the LDL receptor and the LDL receptor-related protein. J Lipid Res 38 (10):2103-10
104. Richard P, de Zulueta MP, Beucler I, de Gennes JL, Cassaigne A, Iron A (1995) Identification of a new apolipoprotein E variant (E2 Arg^{142}→Leu) in type III hyperlipoproteinemia. Artherosclerosis 122:19-28
105. Rober J, Wong D, Buttini M, Orth M, Bellosta S, Pitas RE, Mahley RW (1998) Isoform-specific effects of human apolipoprotein E brain function revealed in apo E knockout mice increase susceptibility of femals. Proc Natl Acad Sci USA 95(18), 109:14-19

106. Ross R (1986) The pathogenesis of atherosklerosis-An update. N Enge J Med 314:488

107. Ruzicka V, Marz W, Russ A, Mondorf W, Gross W (1993) Characterization of the gene for apolipoprotein E5- Frankfurth (Gln 81→ Lys, Cys 112→ Arg) by polymerase chain reaktion, restriction isotyping and temperature gradient gel electrophoresis. Electrophoresis 14(10):1032-7

108. Sahai J, Hishimo A, Takahashi S, Miura Y, Ishii H, Suzuki H, KawarabayasiY, Yamamoto T (1994) Structure, chromosome location and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene. L Biol Chem 269:2173-81

109. Sana R, Abe R, Okawa SI, Fuji Y, Toyata T (1985) Apo E-2/E-3 of very low density lipoprotein in diabetis mellitus. Tohoky J Med 146:131-6

110. Sata T, Havel RJ, Jones AL (1972) Characterization of subfractions of triglyceride-rich lipoproteins separated by gel chromatography from blood plasma of normolipemic and hypolipemic humans. J Lipid Res 13:757

111. Saunders AM, Schmader K, Breitner JC, Benson MD, Brown WT et al. (1993) Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming disease. Lancet 342:710-711

112. Saunders AM, Schrittmatter WJ, Schneckel D, St. George-Hyslop PH, Pericak-Vance M et al. (1993) Association of apoliprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. Neurology 43:1347-1372

113. Schneider WJ, Kovanen PT, Brown MS, Goldstein JL, Utermann G, Weber W, Havel RJ, Kolite L, Kane JP, Innerarity TL, Mahley RW (1981) Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits ands cows. J Clin Invest 68:1075

114. Schrittmatter WJ, Roses AO (1996) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. Annu Rev Neurosci 19:53-77

115. Sing CF, Davignon J (1985) Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. Am J Hum Genet 37:268

116. Smit M, de Knijff P, van der Kooij-Meijs E, Groenendijk C, van der Maagdenberg AMJM, Gevers Leuven JA, Stalenhoef AFH, Stuyt PMJ, Frants RR, Havekes LM (1990) Genetic heterogeneity in familial dysbetalipoproteinemia. The E2(lys_{146}->gln) variant results in a dominant mode of inheritance. J Lipid Res 31:45

117. Snipes GJ, Mc Guire, Norder JJ, Freemann JA (1986) Nerve injurity stimulates the secretion of apolipoprotein E by nonneuronal cells. Proc Natl Acad Sci,USA 83:1130-34

118. Snowden C, Houlsten RS, Arif MH, Laker MF, Humphries SE, Alberti KGMM (1991) Discrepancy between apolipoprotein E phenotypes and genotypes (as determined by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Clin. Chim. Acta 196:49-57

119. Streyer Lubert (1996) Der Fettstoffwechsel. In Lubert Streyer (Hrag.) Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford (4. Auflage, S.635, 735-737)

120. Stuyt PMJ, van Laar A (1983) Clinical features of typ III hyperlipoproteinemia. Neth J Med 26:104

121. Tajima S, Yamamura T, Yamamoto A (1988) Analysis of apolipoprotein E5 gene from a patient with HLP. J Biochem 104:48-52

122. Tiret L, Knijff P, Menzel HJ, Ehnholm C, Nicaud V, Havekes LM (1994) Apo E polymorphism and prediposition to coronary heart disease in youth of different European population: the EARS: European Atherosclerosis Research Study. Artherioscl Thromb 14:1617-24

123. Uterman G, Hees M, Steinmetz A (1977) Polymorphism of apolipoprotein E and occurence of dysbetalipoproteinemia in man. Nature, London 341:162-63

124. Uterman G, Jaeschke M, Menzel J (1975) Familial hyperlipoproteinemia type III: defiency of a specific apolipoprotein in the very low density lipoproteins. FEBS lett 56: 352-55

125. Utermann G (1985) Genetic polymorphism of apolipoprotein E. Impact on plasma lipoprotein metabolism. In: Crepaldi G, Tiengo A, Baggio G (Hrag.) Diabetes, Obesity and Hyperlipidemias III. Amsterdam, Elsevier (S.1)

126. Utermann G (1994) Alzheimer disease. The apolipoproteine connection. Curr Biol 4(4):362-5

127. Utermann G, Langenbek U, Beisiegel U, Weber W (1980). Am J Hum Genet 32:339

128. Utermann G, Pruin N, Steinmetz A (1979) Polymorphism of apoprotein E III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man. Clin Genet 15:63

129. Utermann G, Steinmetz A, Weber W (1982). Hum Genet 60:344

130. van den Maagdenberg AM, Weng W, de Brfaijn IH, de Knijff P, Funke H, Smelt AH, Gevers Leuven JA, van`t Hooft FM, Assmann G, Hofker MH, et al. (1993) Characterization of five new mutants in the carboxyl-terminal domain of human apolipoprotein E, no cosegregation with severe hyperliproproteinemia. Am J Hum Genet 52(5):937-46

131. Vermeer BJ, van Gent CM, Goslings B, Polano MK (1979) Xanthomatosis and other clinical findings in patients with elevated levels of very low density lipoproteins. Br J Dermatol 100:657

132. Wardell Mr, Brennan SO, Janus ED, Fraser R, Carell RW (1987) Apolipoprotein E2- Christchurch (136Arg→ Ser). New variant of human apolipoprotein E in a patient with type III hyperlipoproteinemia. J Clin Invest 80:483-90

133. Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW (1982) Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. J Biol Chem 257:2518

134. Weisgraber KH, Mahley RW (1996) Human apolipoprotein E: the Alzheimer`s disease connection. FASEB J. 10:1485-1494

135. 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 Cem 256:9077-83
136. Weisgraber KH, Rall SC Jr., Innerarity TL, Mahley RW, Kuusi T, Ehnholm C (1984) A novel electrophoretic variant of human apolipoprotein E. Identification and characterization of apolipoprotein E1. J Clin Invest 73(4):1024-33
137. Wenham PR, Sedky A, Spooner R (1991) Apolipoprotein E phenotyping: a word of caution. Am Clin Biochem 28:599-605
138. Wernette-Hammond ME, Lauer SJ, Corsini A, Walker S, Taylor JM, Rall SC Jr. (1989) Glycosylation of human apolipoprotein E. The carbohydrate attachment site is threonine 194. J Biol Chem 264:9094
139. Wieland H, Funke H, Krieg J, Luley C (1991) Apo E3-Freiburg and apo E4-Freiburg are two variants which are caused by exchanges of uncharged amino cids and do not appear to be associated with lipid disorders or heart disease. Atheroclerosis 34:164-166
140. Willnow TE, Sheny Z, Ishibashi S, Herz J (1994) Inhibition of hepatic remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. Science 264:1471-4
141. Windler E, Greten H (1998) Fettstoffwechsel. In: Schettler G, Greten H (Hrag.) Innere Medizin. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (9. Aufl, S.686)
142. Zannis VI, Breslow JL (1980): Characterisation of a unique human apolipoprotein E variant associated with type III hyperlipoproteinemia. J Biol Chem 255:1759-62
143. Zannis VI, Breslow JL (1981) Human VLDL apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and post-translational modification. Biochemestry 20:1033-1041
144. Zannis VI, Just PW, Breslow JL (1981) Human apoliprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. Am J Hum Genet 33:11

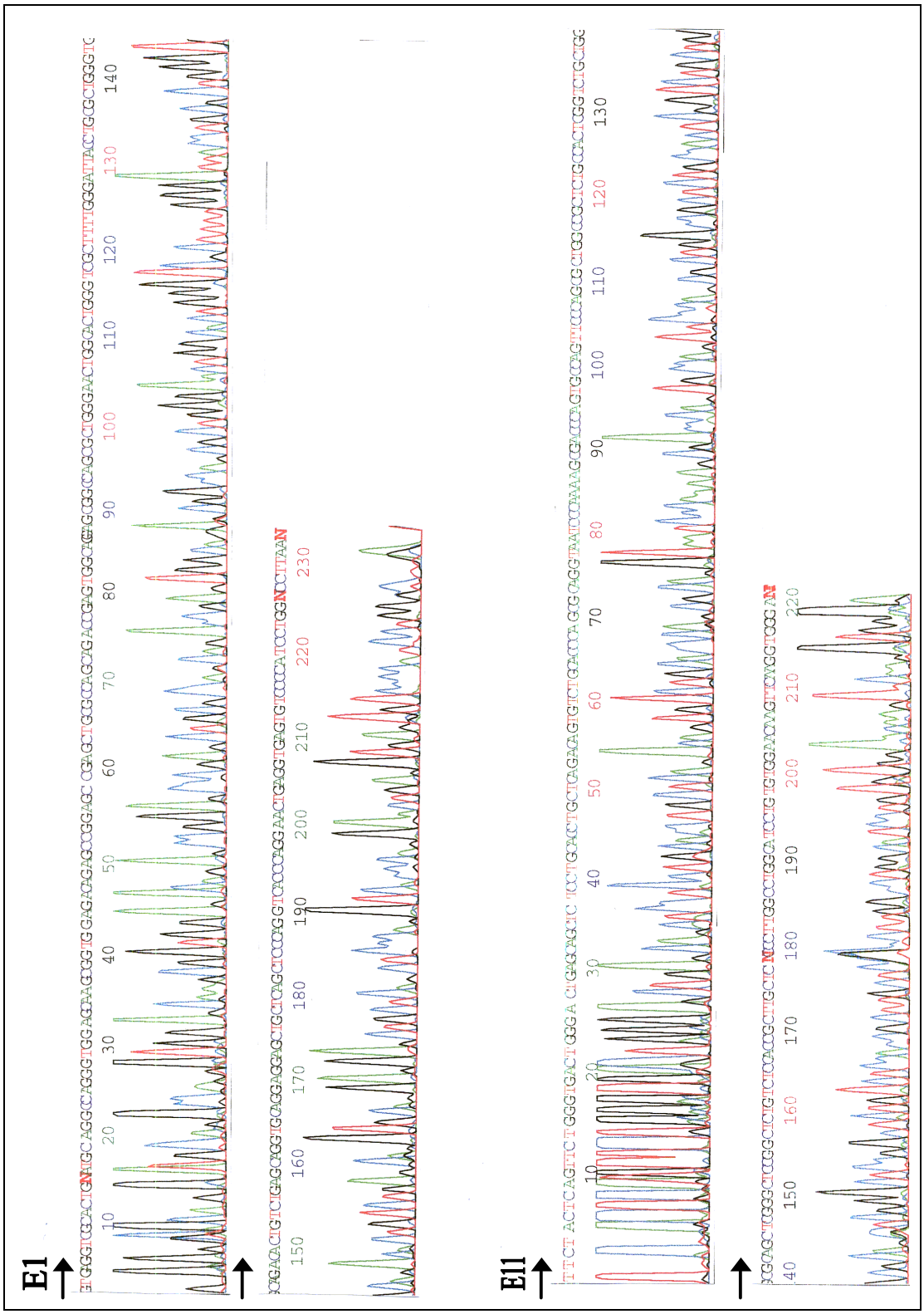


Abbildung 1 : Exon 3 von Patient 1 mit Primer E1 und E11

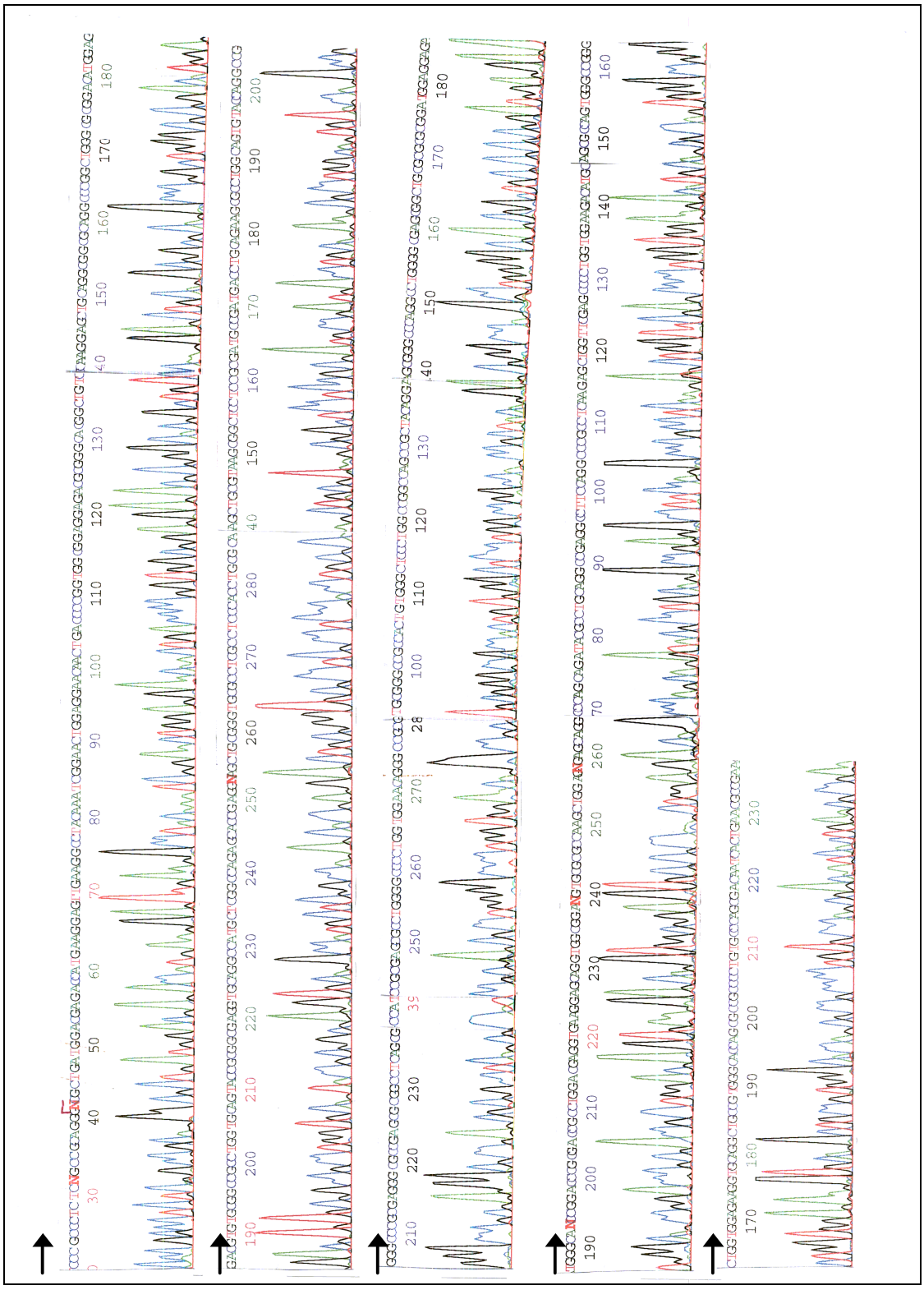


Abbildung 2: Exon 4 von Patient 1

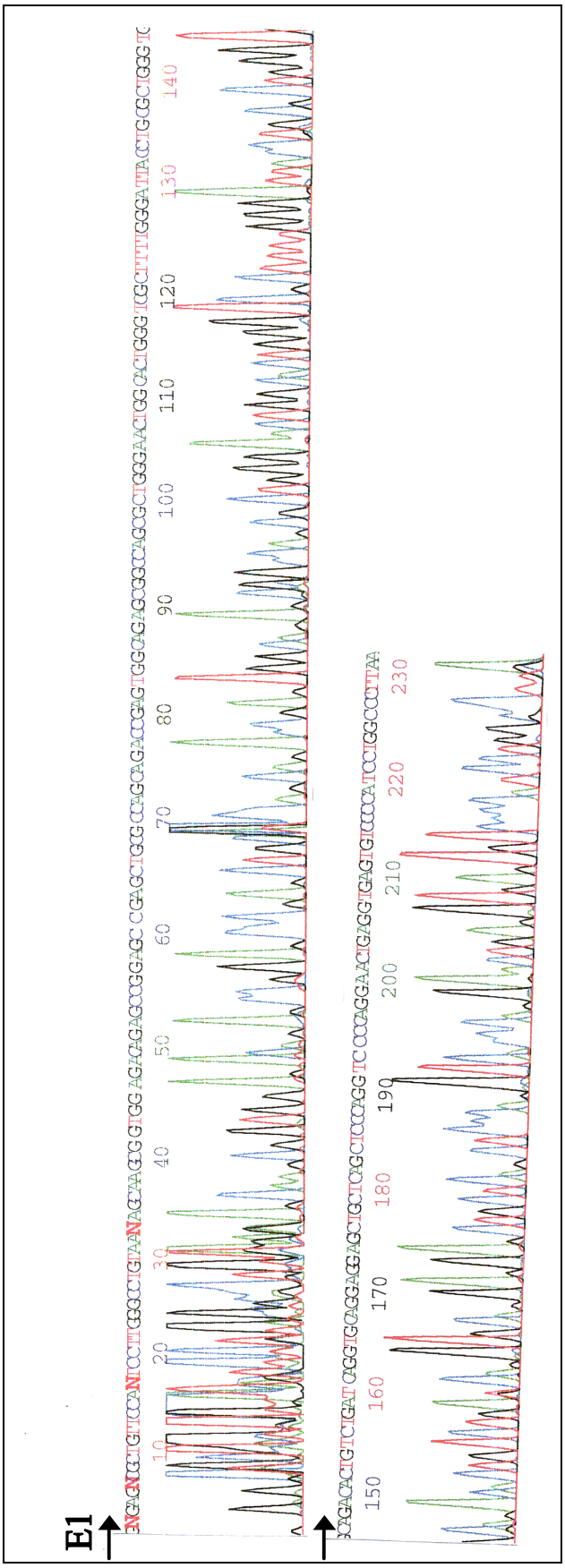


Abbildung 3: Exon 3 von Patient 2 mit Primer E1

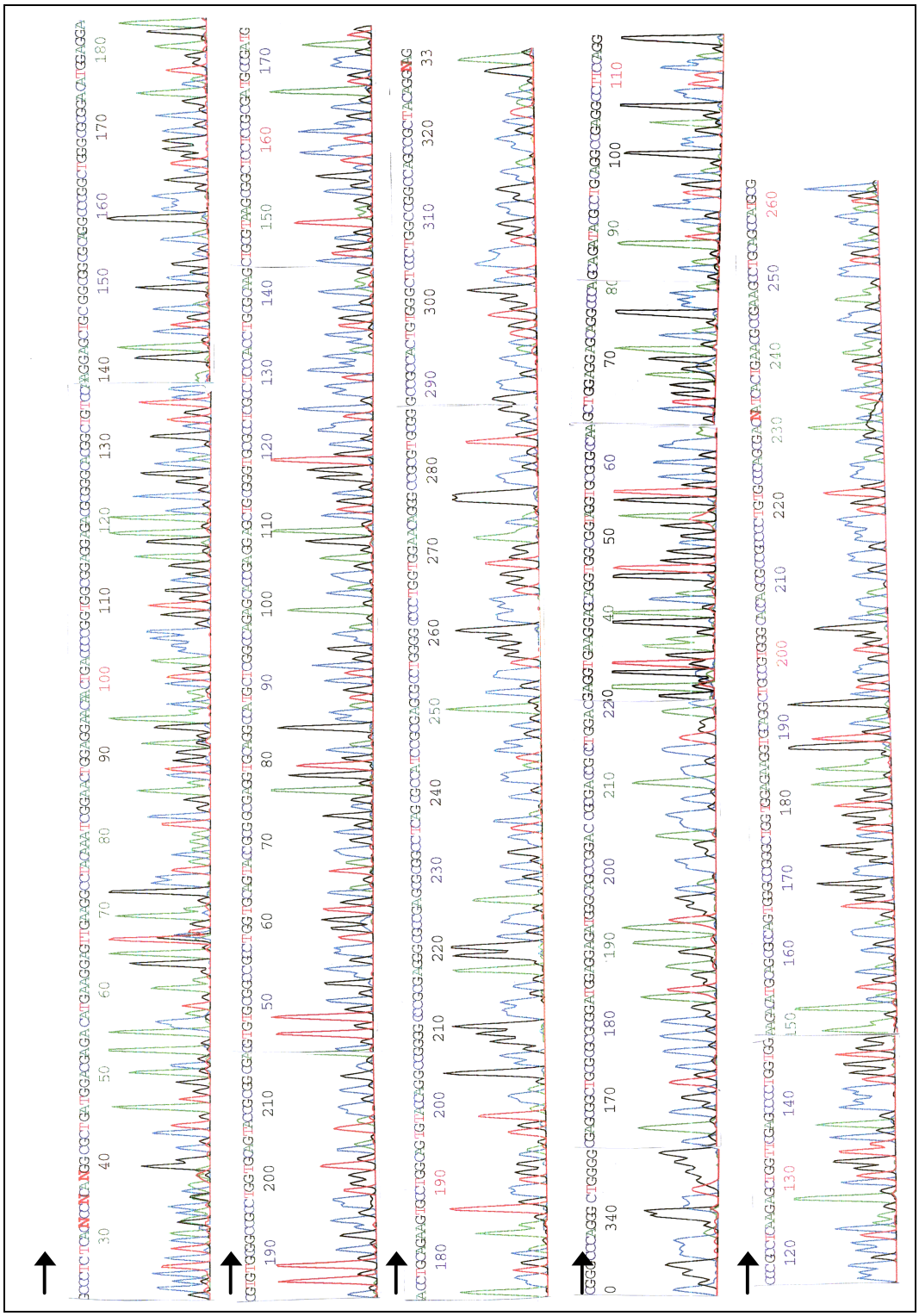


Abbildung 4: Exon 4 von Patient 2

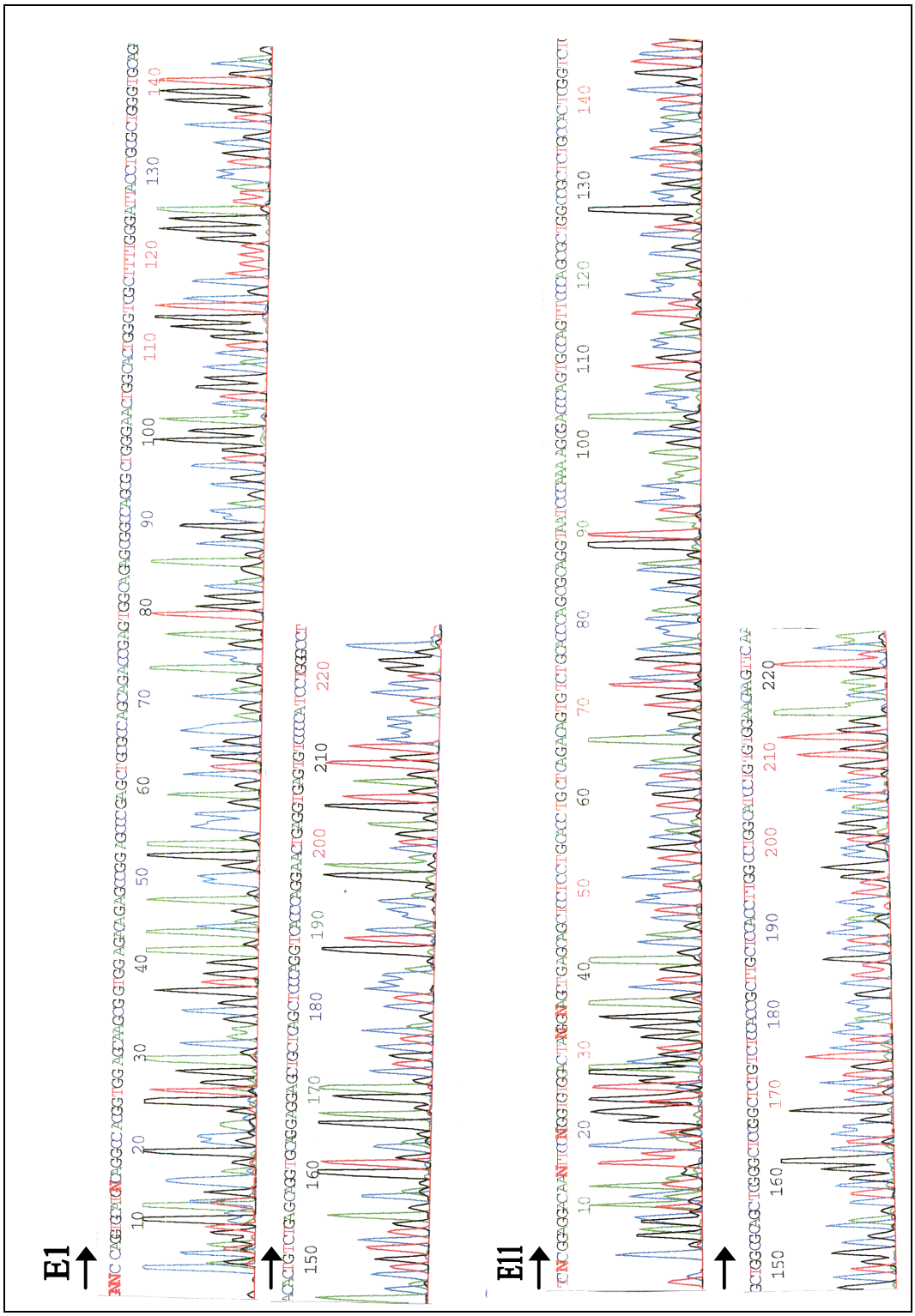


Abbildung 5: Exon 3 von Patient 3 mit Primer E1 und E11

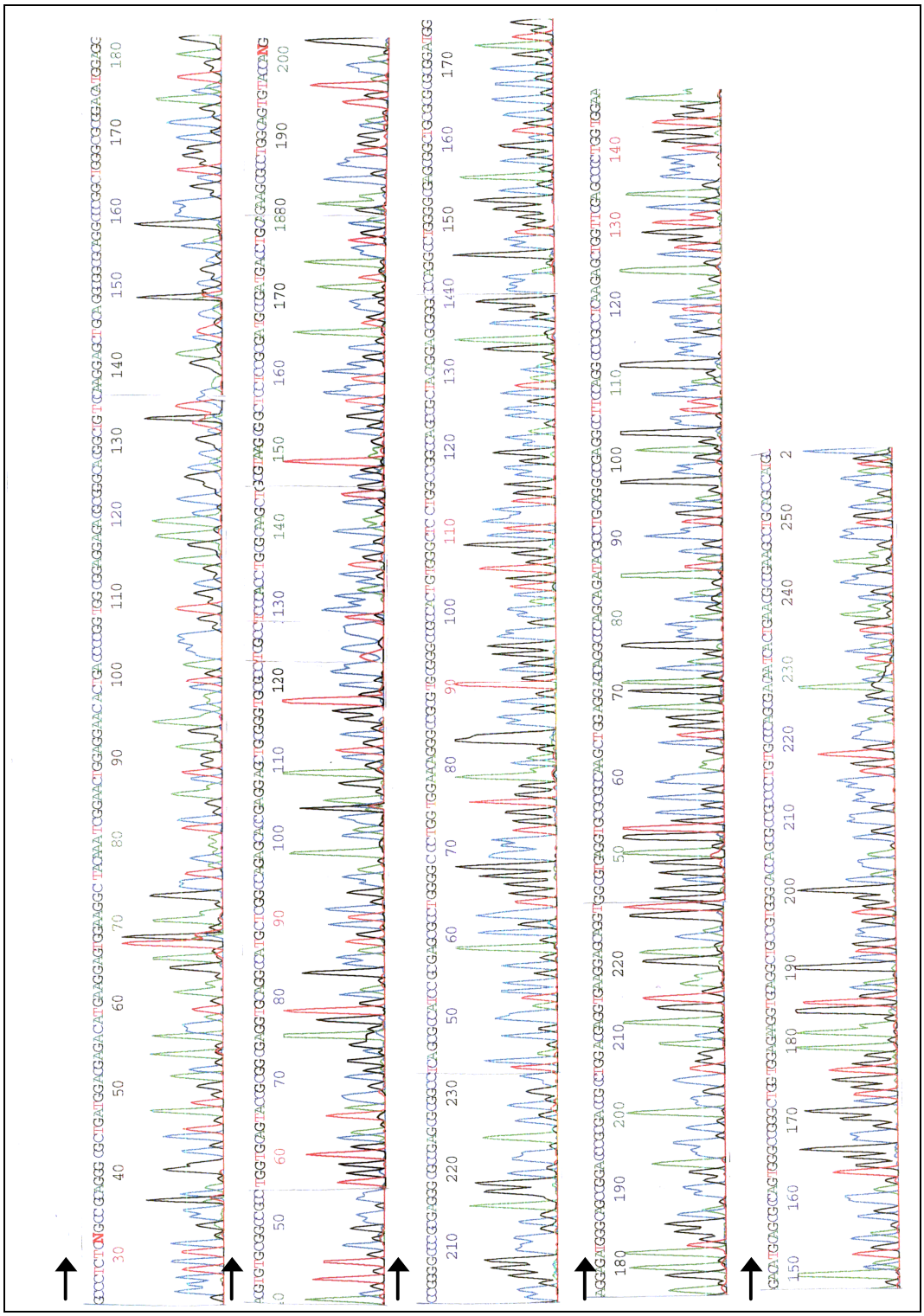


Abbildung 6: Exon 4 von Patient 3

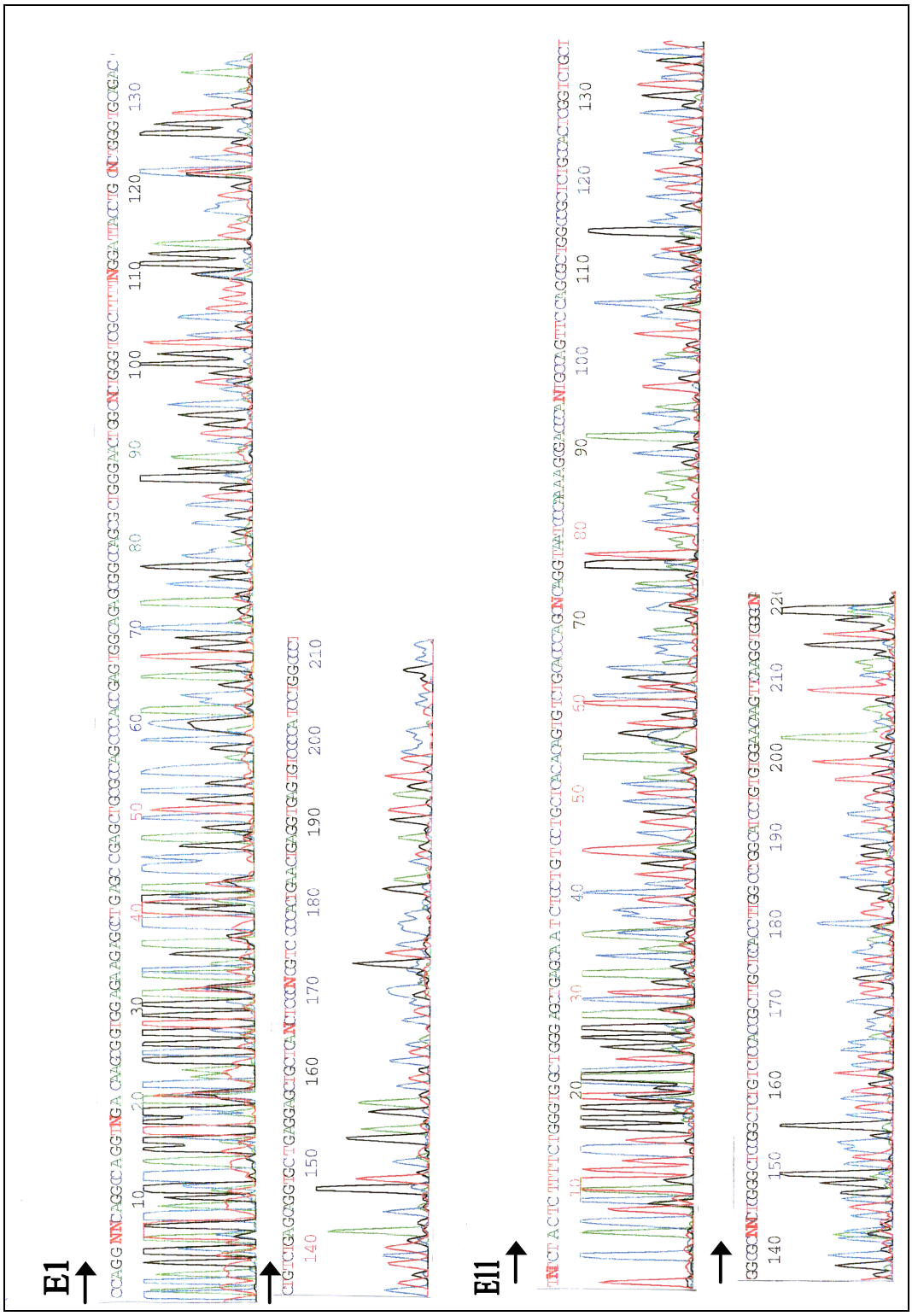


Abbildung 7: Exon 3 von Patient 4 mit Primer E1 und E11

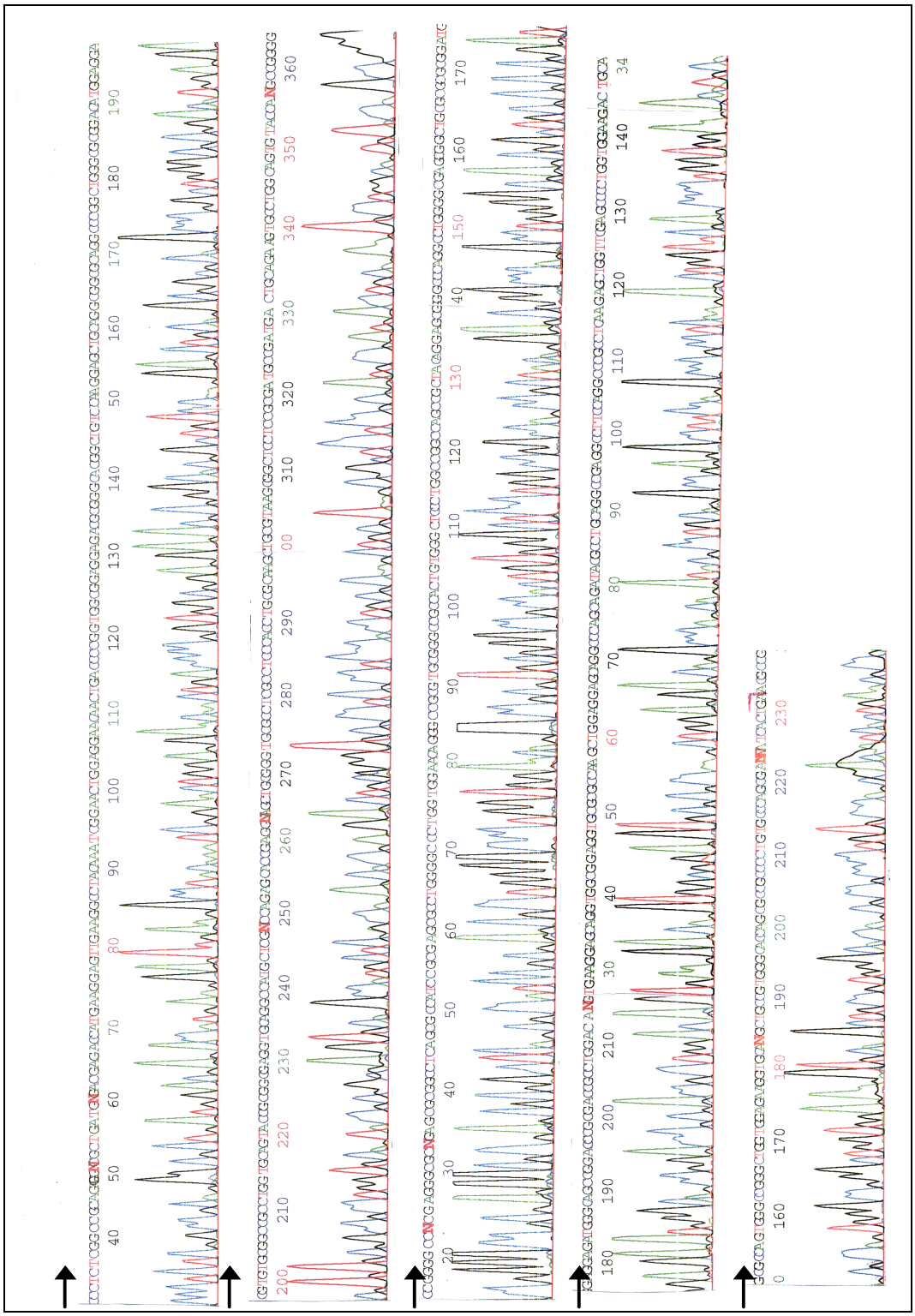


Abbildung 8: Exon 4 von Patient 4

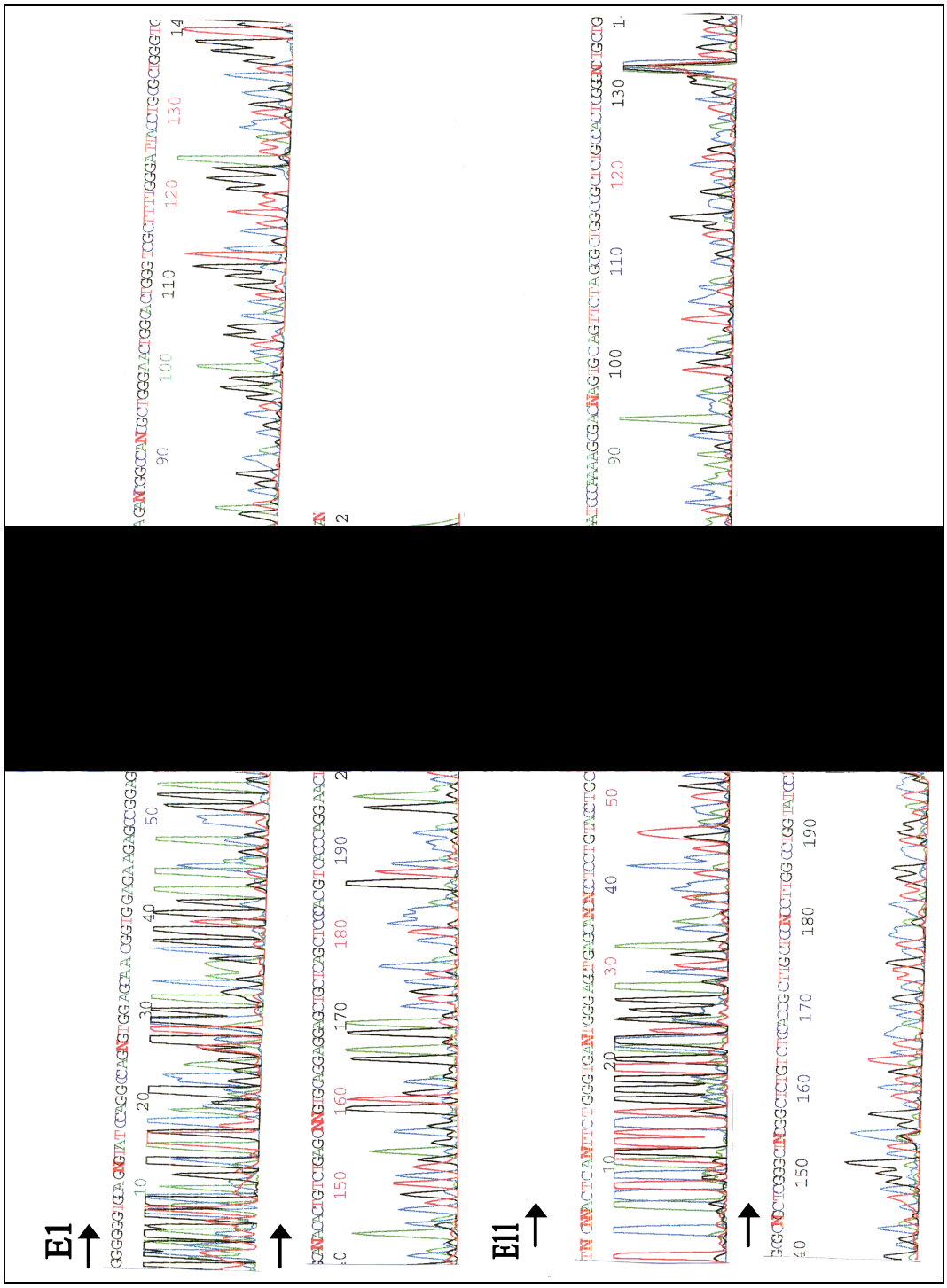


Abbildung 9: Exon 3 von Patient 5 mit Primer E1 und E11

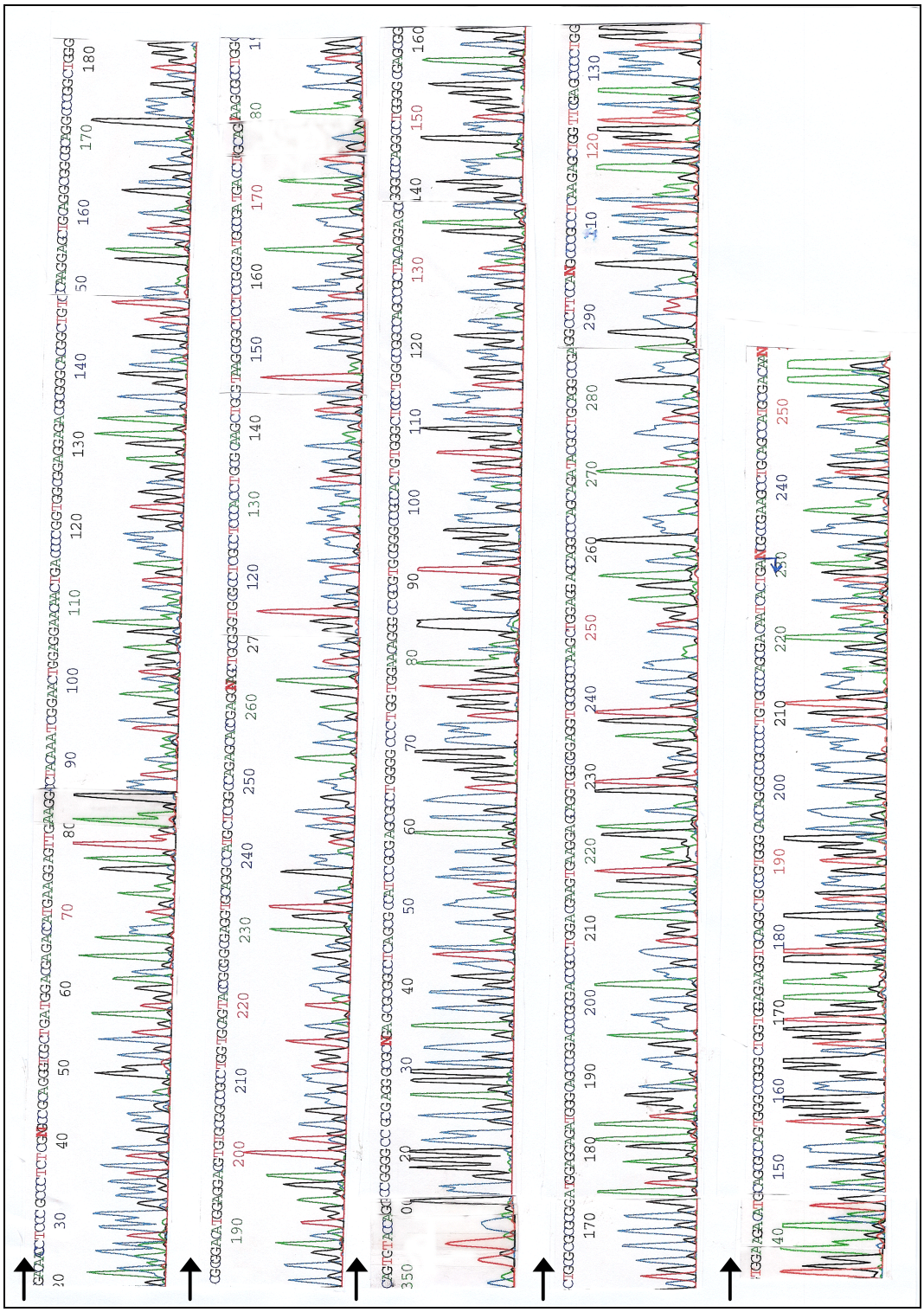


Abbildung 10: Exon 4 von Patient 5

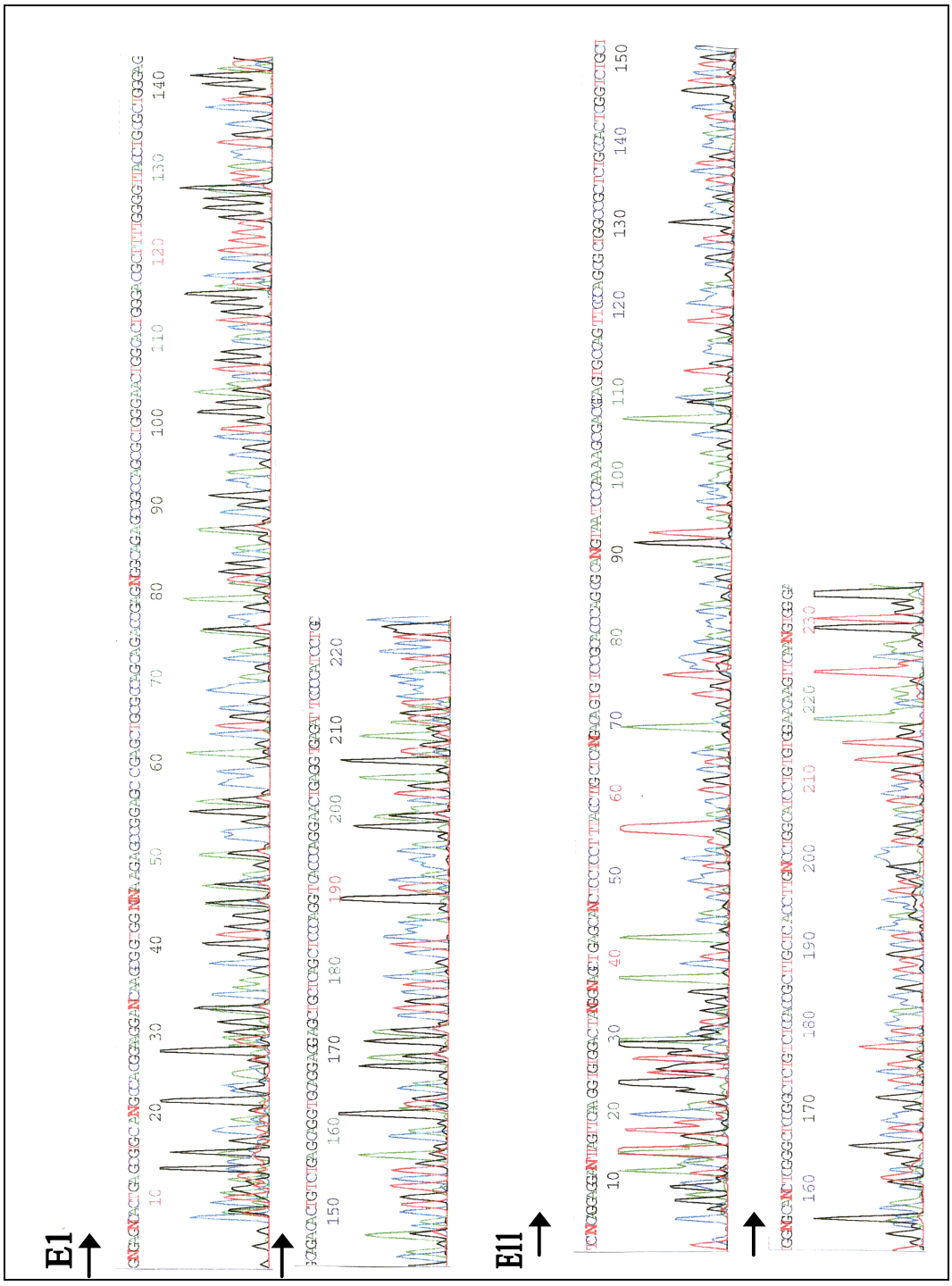


Abbildung 11: Exon 3 von Patient 6 mit Primer E1 und E11

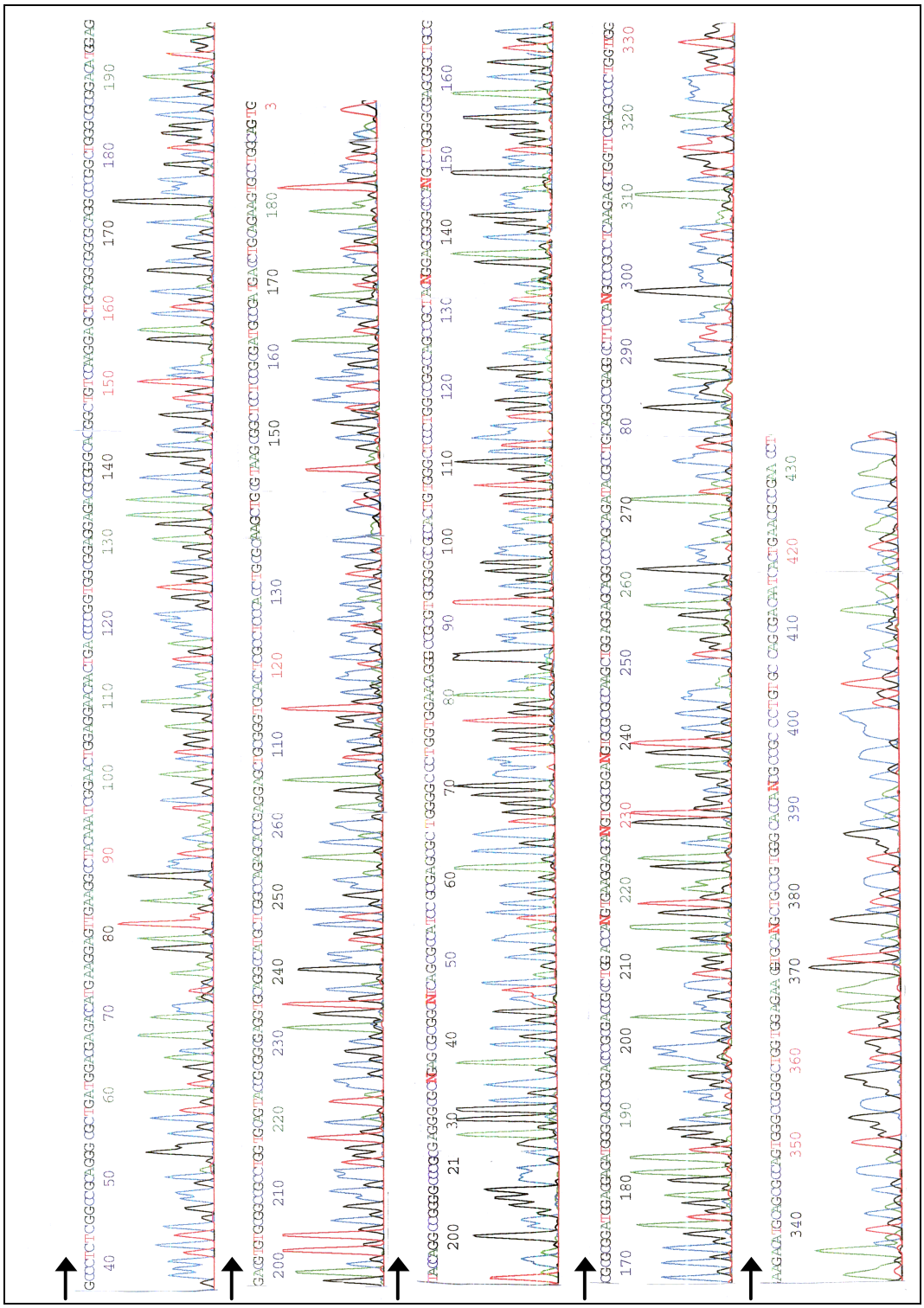


Abbildung 12: Exon 4 von Patient 6

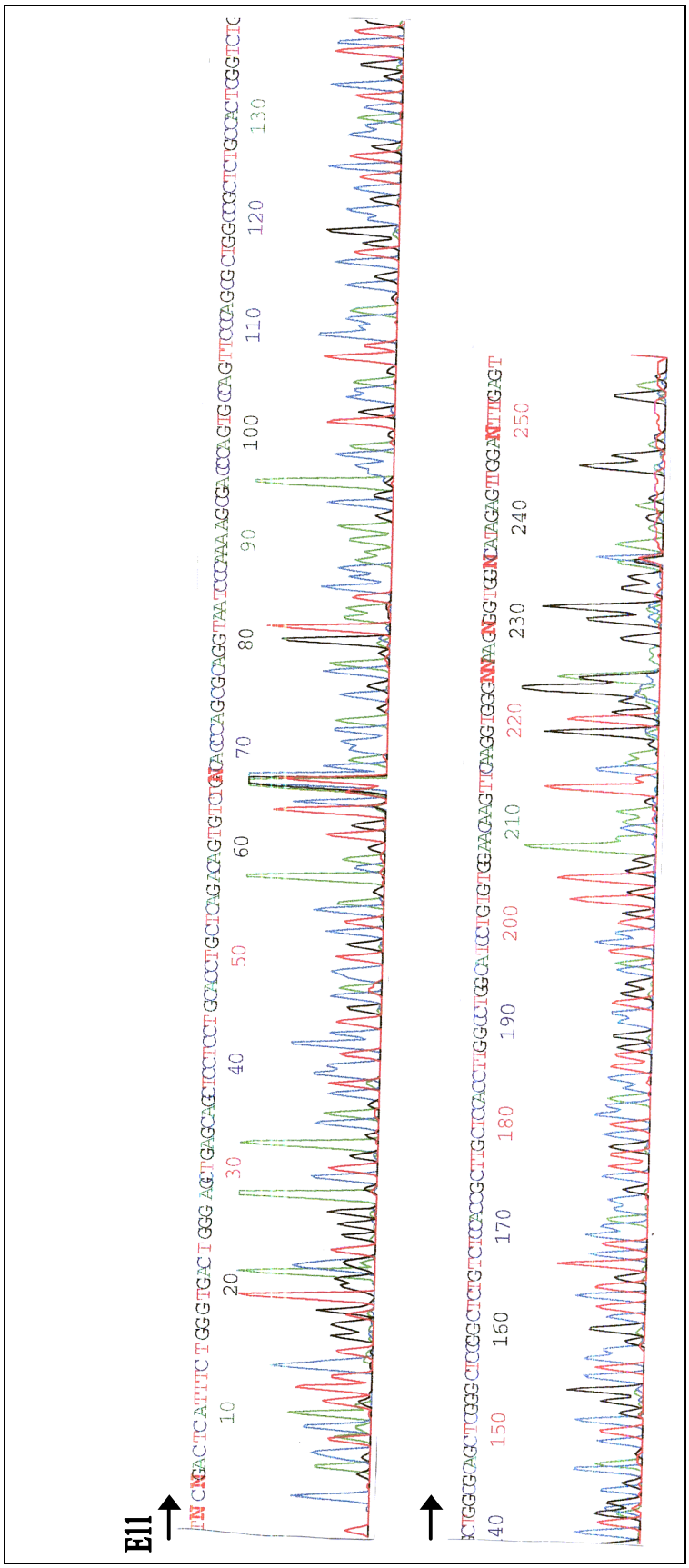


Abbildung 13: Exon 3 von Patient 7 mit Primer E11

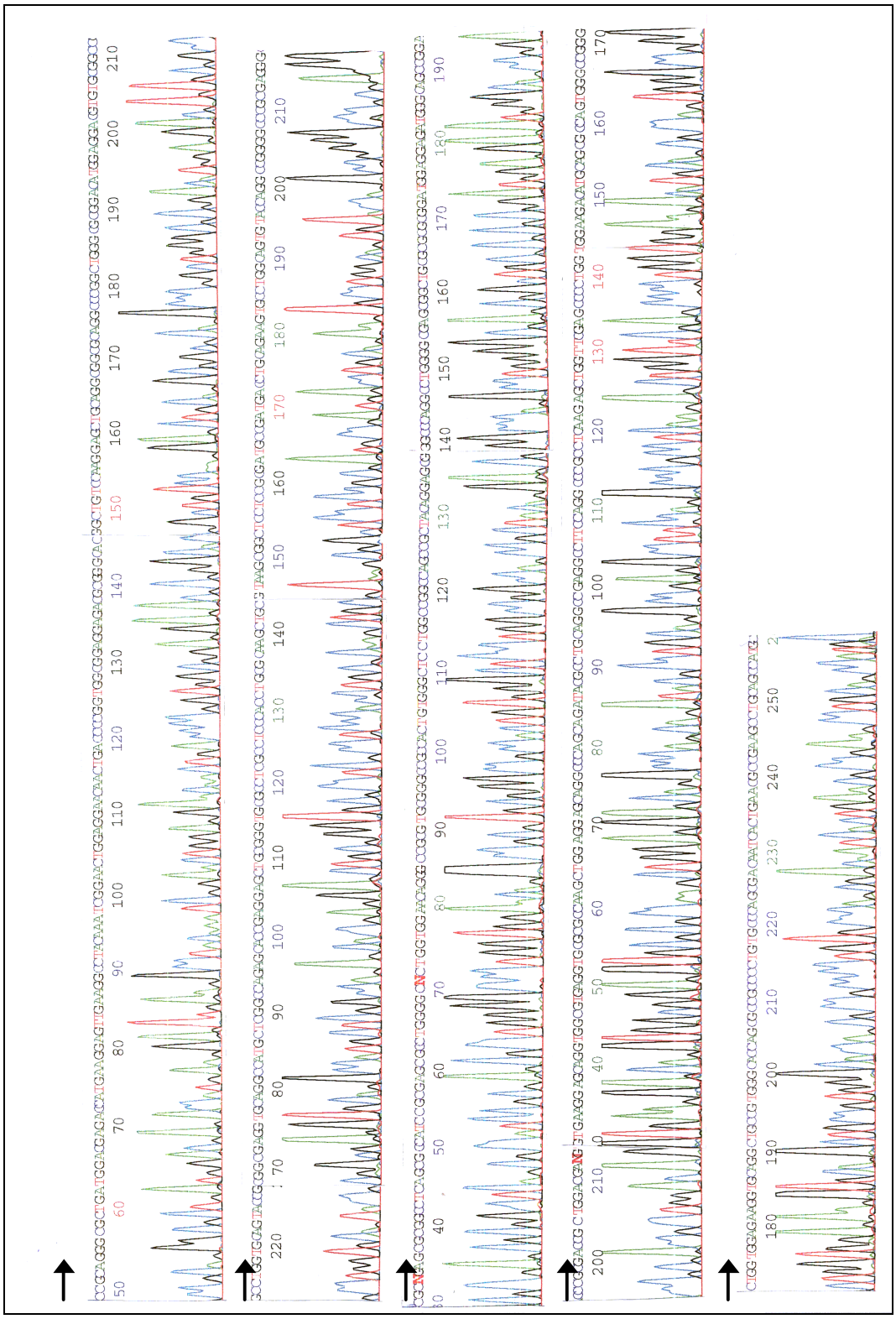


Abbildung 14: Exon 4 von Patient 7

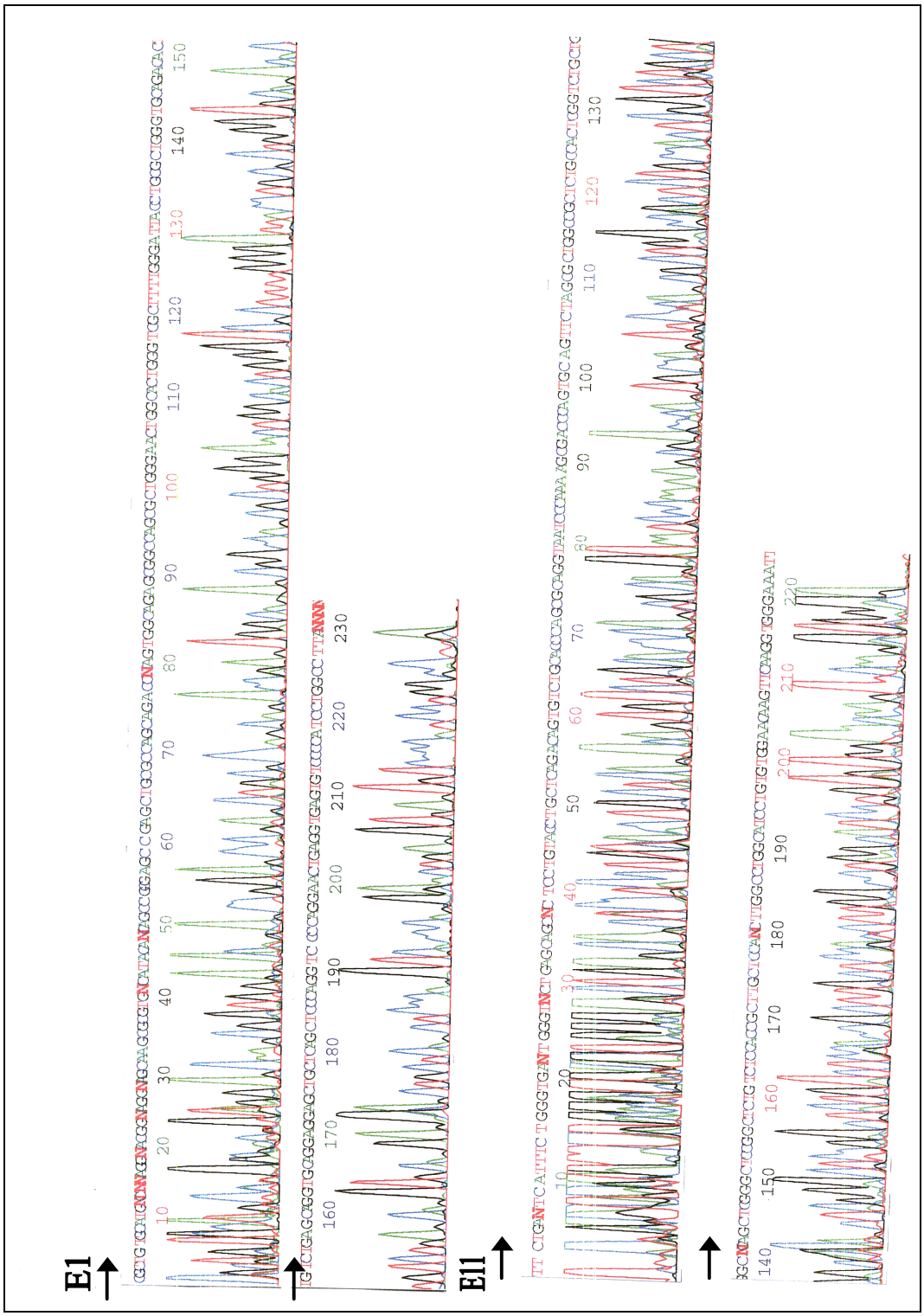


Abbildung 15: Exon 3 von Patient 8 mit Primer E1 und E11

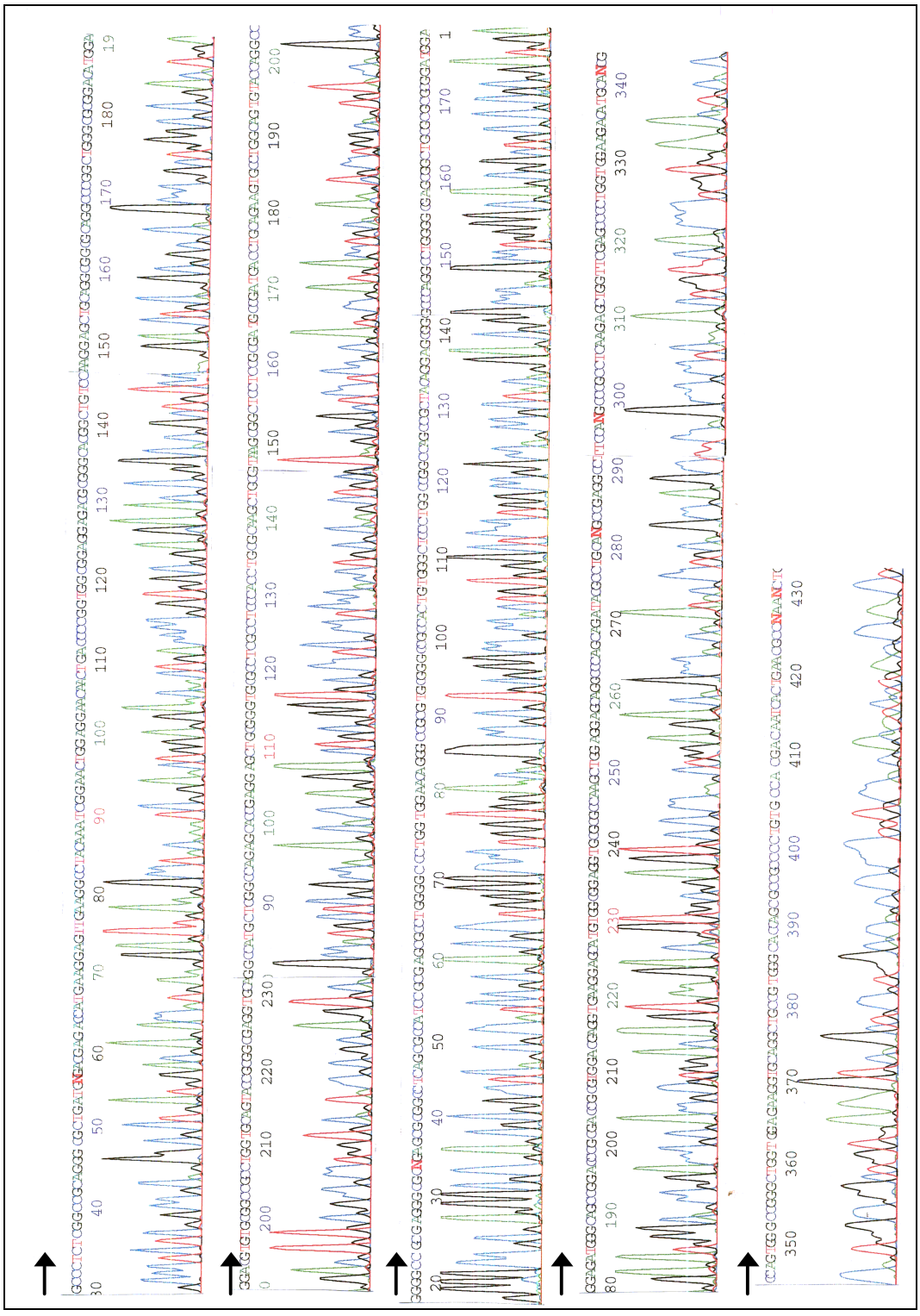


Abbildung 16: Exon 4 von Patient 8

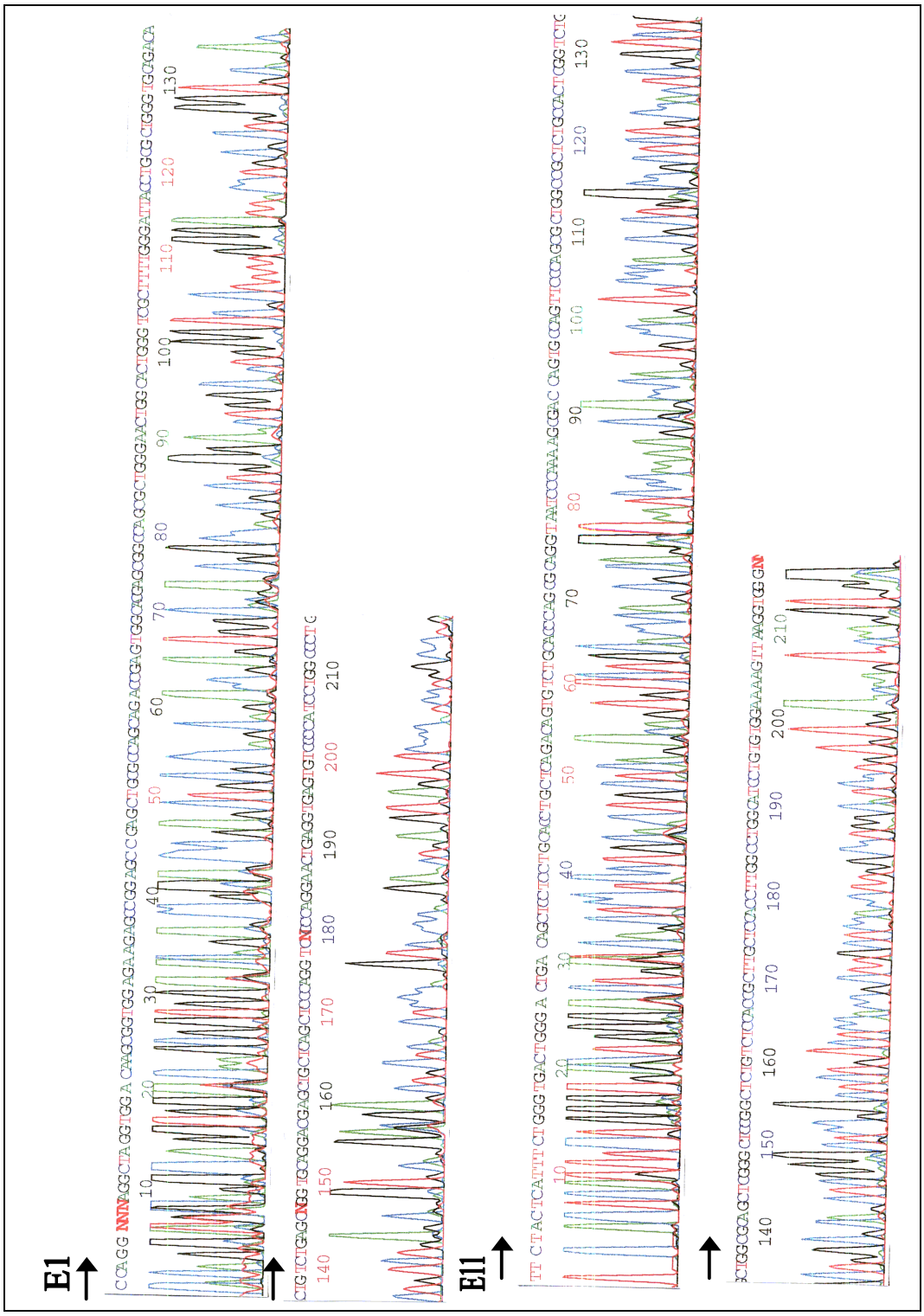


Abbildung 17: Exon 3 von Patient 9 mit Primer E1 und E11

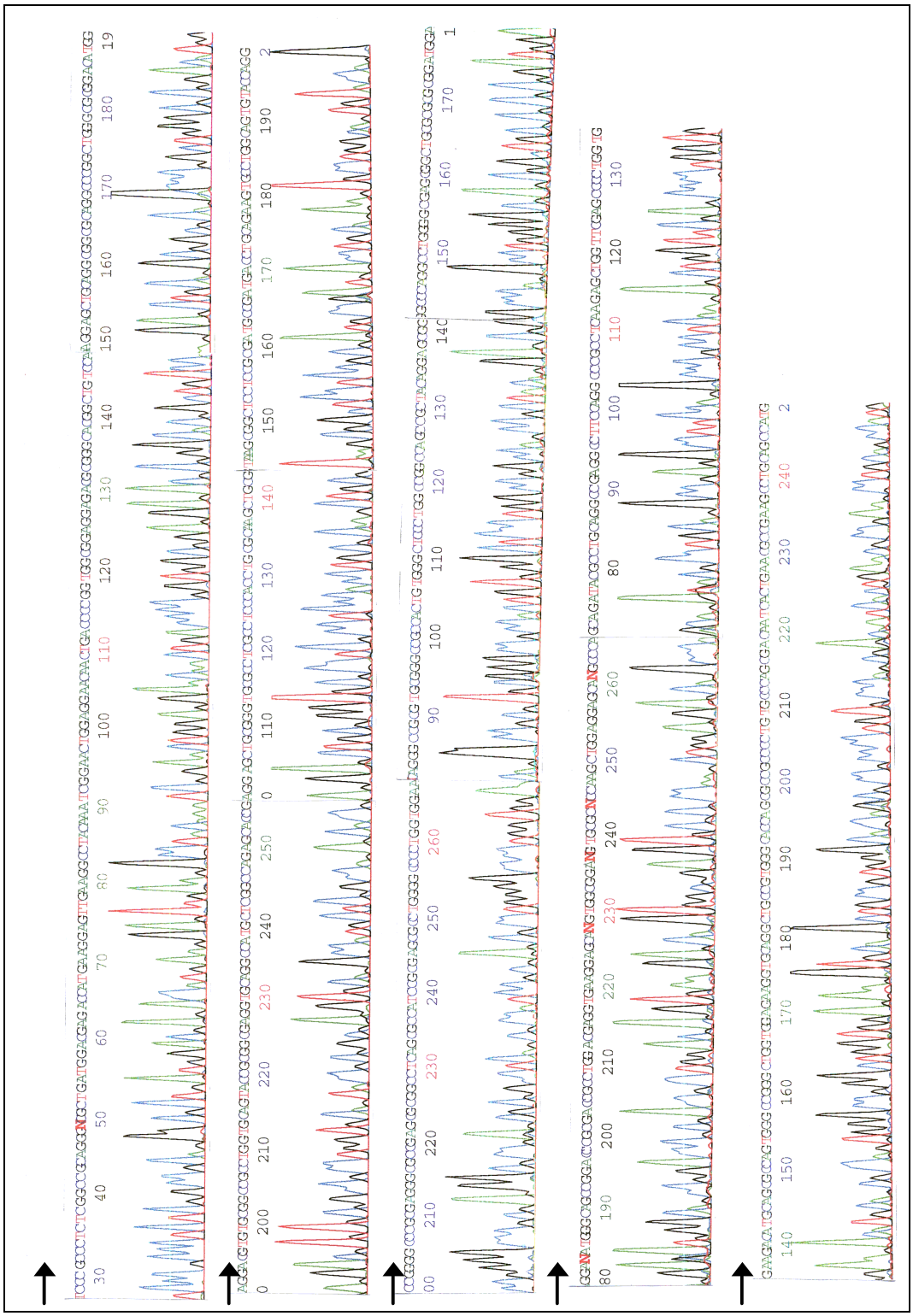


Abbildung 18: Exon 4 von Patient 9

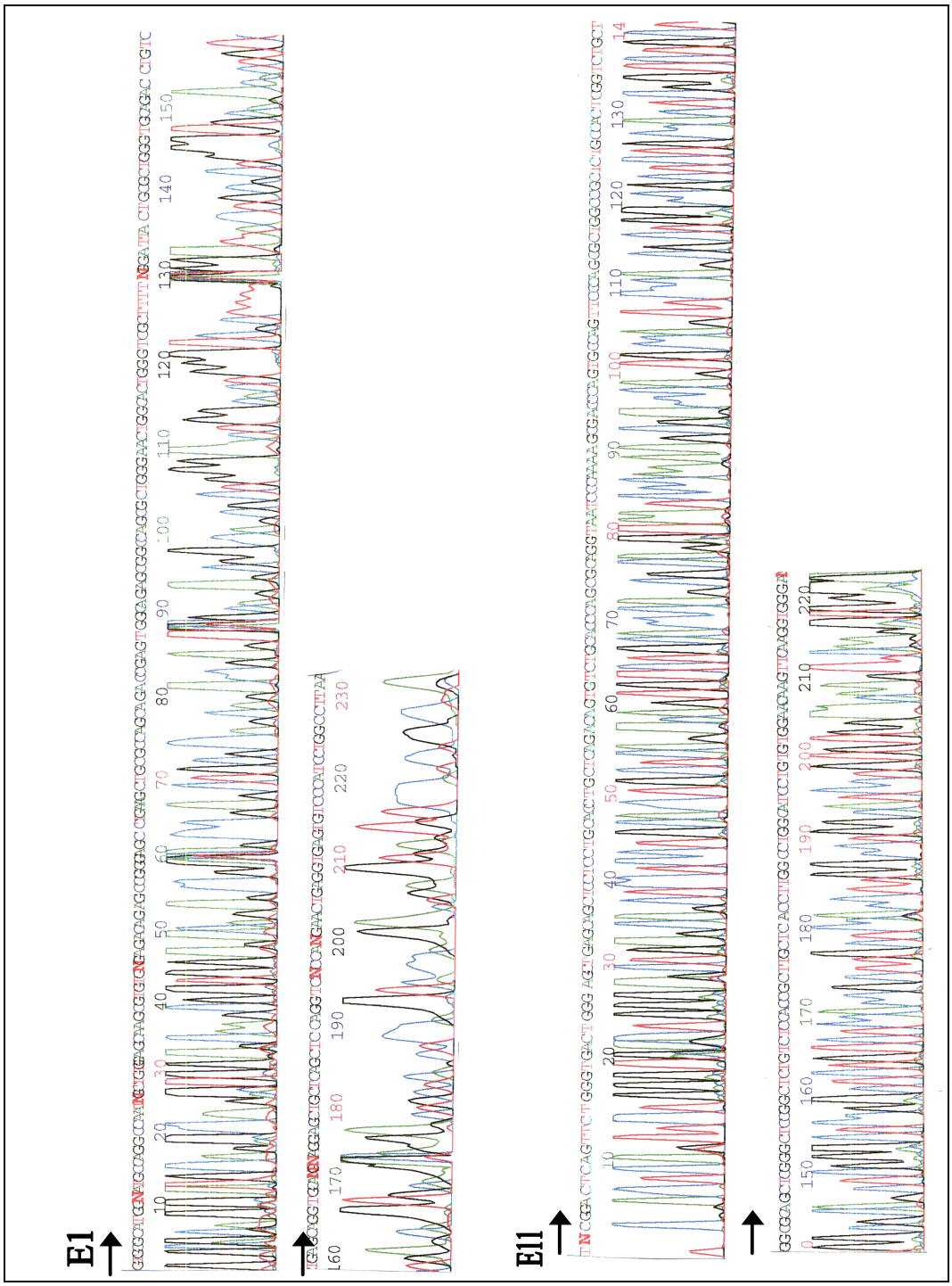


Abbildung 19: Exon 3 von Patient 10 mit Primer E1 und E11

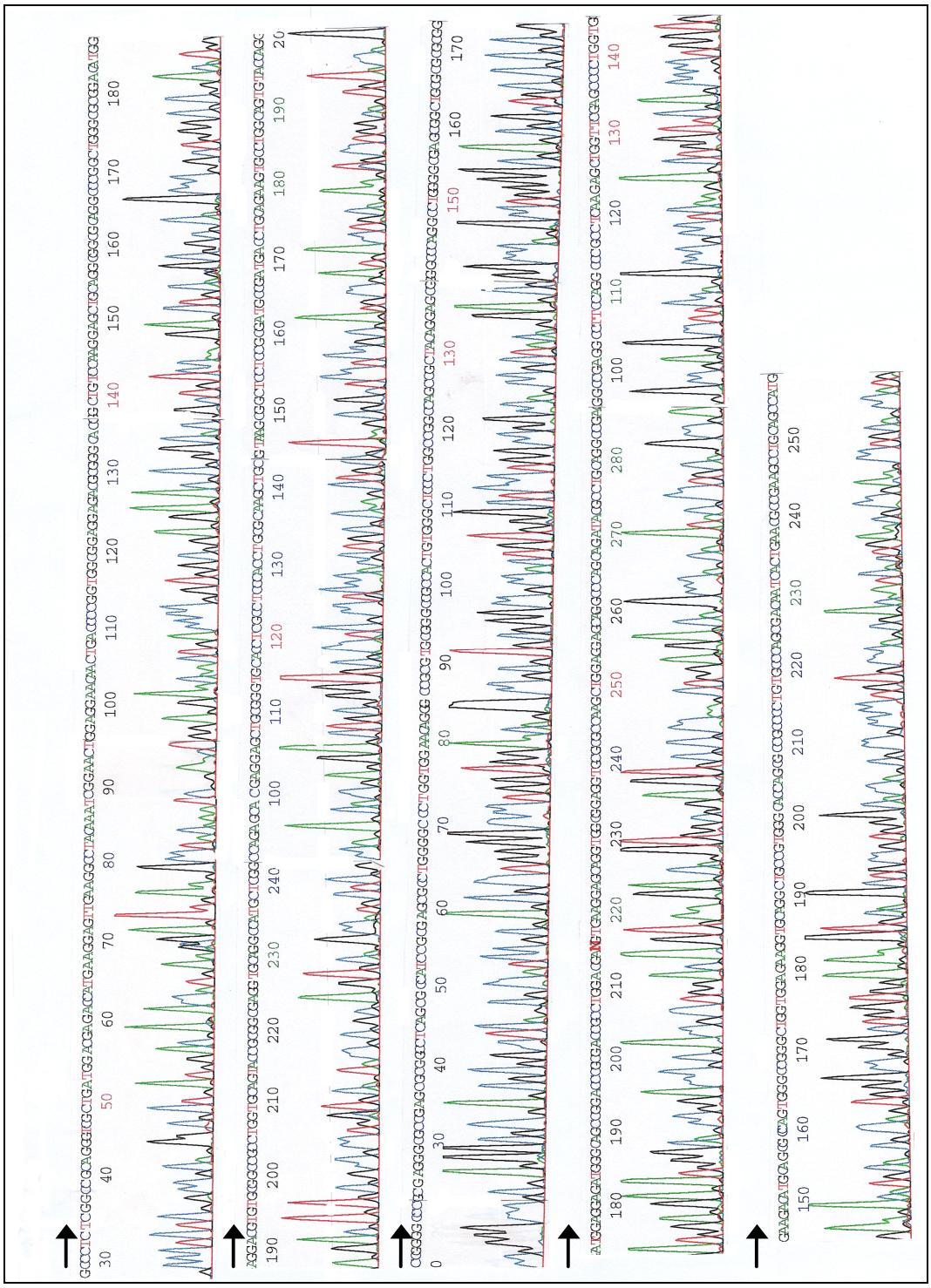


Abbildung 20: Exon 4 von Patient 10

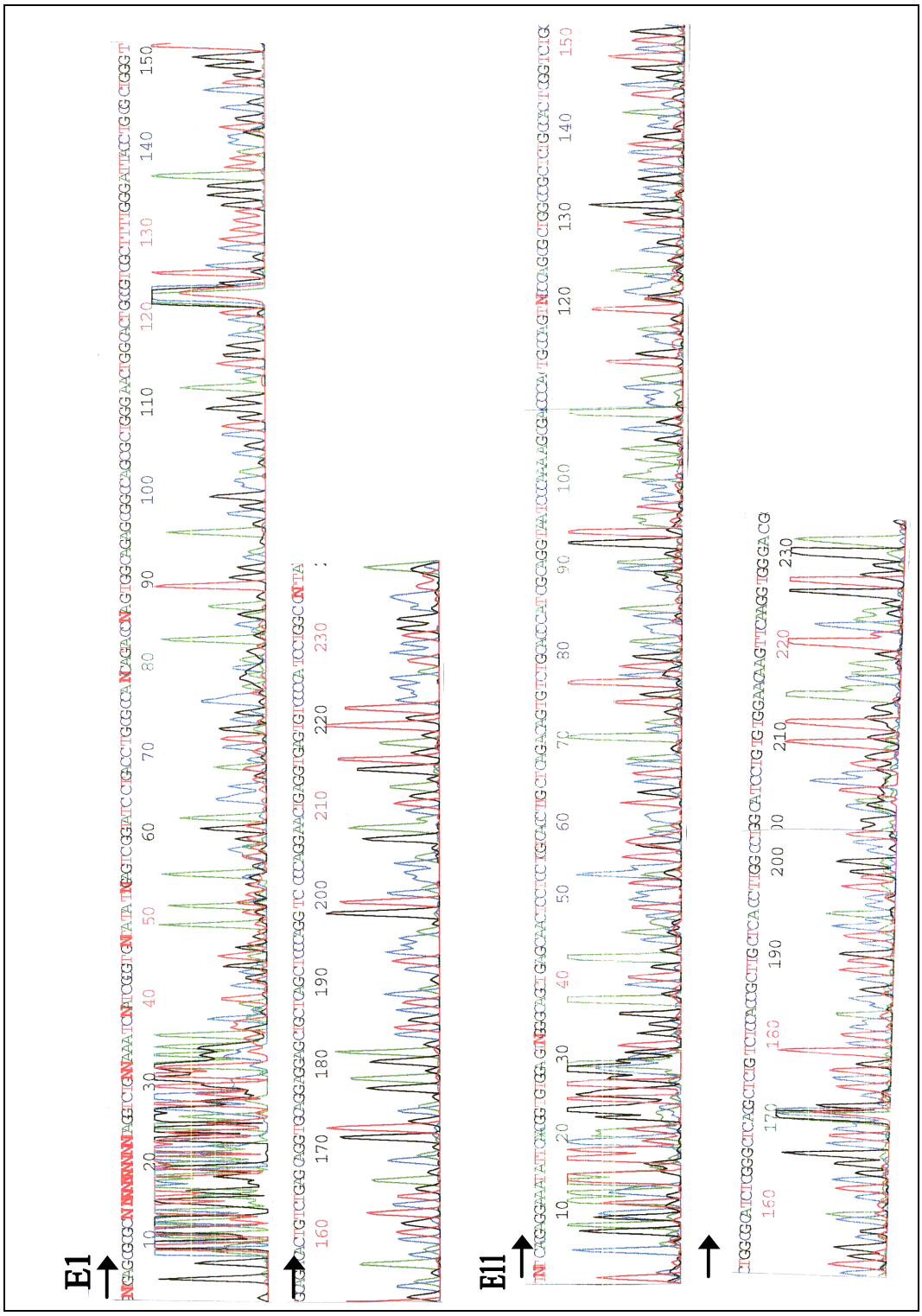


Abbildung 21: Exon 3 von Patient 11 mit Primer E1 und E11

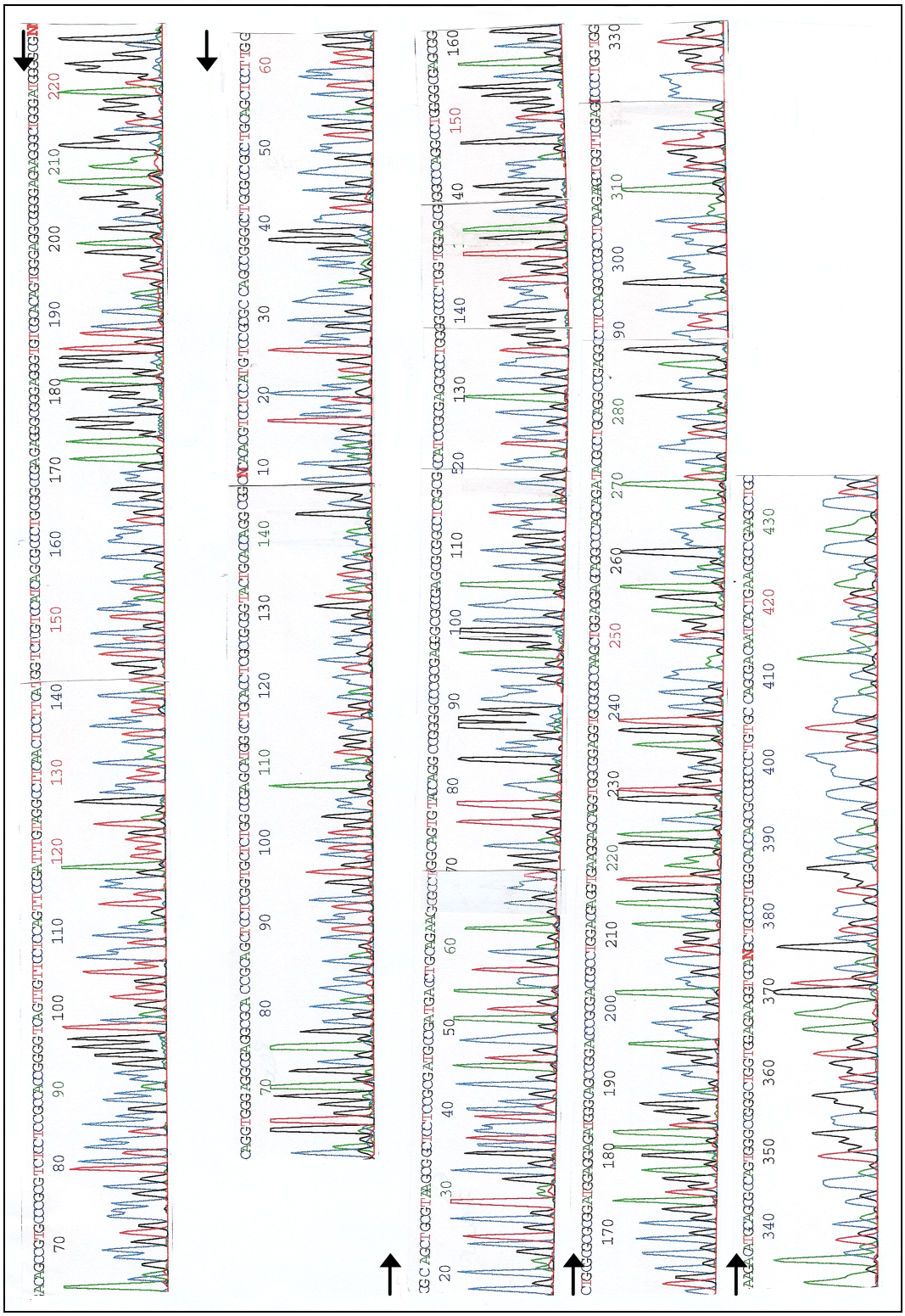


Abbildung 22: Exon 4 von Patient 11

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde in dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Abteilung für Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf angefertigt.

Frau Prof. Dr. Ulrike Beisiegel danke ich für die interessante Aufgabenstellung und die stetige Betreuung.

Dr. Dave Evans möchte ich für die gute Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Für die unermüdliche Hilfe und Unterstützung im Labor danke ich Dorte Wendt ganz herzlich.

Ich bedanke mich bei Philipp W. Kay für Geduld, Motivation und kontinuierliche Hilfsbereitschaft, die sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Für den Beistand in einer schweren Stunde danke ich Birgitta Tillig.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Schwestern für die Unterstützung und den aufbauenden Beistand während des Studiums und des gesamten Zeitraums der Erstellung der Dissertation.

LEBENSLAUF

1 Persönliche Daten

Ina Beshir
Geboren am 18.12.1974
Ledig

2 Schulbildung

1985 - 1994	Immanuel-Kant Gymnasium / Hamburg
1981 – 1985	Grundschule Marmstorf / Hamburg

3 Famulaturen

1998	einmonatige Famulatur in einer endokrinologischen Praxis in Hamburg
1999	einmonatige Famulatur in der Traumatologie im Krankenhaus Mariahilf, Hamburg
2000	3-monatiges Praktikum im Donau Spital, Wien Onkologie, Kinderchirurgie

4 Berufliche Aus- und Weiterbildung

1995 - 2001	Medizinstudium an der Universität Hamburg
1997	Physikum
1998	1. Staatsexamen
1998 – 2001	Forschung und Ausarbeitung der Dissertation im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Abteilung für Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Frau Prof. Dr. U. Beisiegel
2000	2. Staatsexamen
2000 – 2001	Praktisches Jahr:
	Erstes Tertial in der Abteilung für Kinderchirurgie Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
	Zweites Tertial in der Klinik für Kinderheilkunde der Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
	Drittes Tertial in der Klinik für Innere Medizin der Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
	Voraussichtlich 3. Staatsexamen (November 2001)

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe vefaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Aussage (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter zur Promotion beworben habe.

Ort; Datum

Ina Beshir