

**Institut für Molekulare Zellbiologie
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf
Direktorin:
Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel**

**Suche nach Mutationen im PPAR- α -Gen
bei Patienten mit Hyperlipidämie und
mit Adipositas permagna**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Medizin
der Universität Hamburg

vorgelegt von:
Elisabete Maria Bras Marques
Hamburg 2003

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 23.04.2004

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg.

1. Prüfungsausschußvorsitzende : Prof. Dr. U. Beisiegel

2. Gutachter: Prof. Dr. F.U. Beil

3. Gutachter: Prof. Dr. D. Ameis

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung:

1.1. Der Lipidstoffwechsel	1
1.1.1. Der exogene Transportweg	2
1.1.2. Der endogene Transportweg	4
1.1.3. Der reverse Cholesterintransport	4
1.1.4. Die Lipoproteinlipase	5
1.2. Störungen im Lipidstoffwechsel triglyceridreicher Lipoproteine	6
1.2.1. Familiäre Hypertriglyceridämie	6
1.2.2. Familiäre kombinierte Hyperlipidämie	6
1.2.3. Primäres Chylomikronämiesyndrom	7
1.2.4. Dysbetalipoproteinämie	8
1.3. Adipositas permagna	9
1.4. Aufbau und Funktion von Transkriptionsfaktoren	11
1.4.1. Hormone Response Elements	13
1.5. Der Peroxisomen-Proliferation-Aktivierende-Rezeptor (PPAR)	13
1.5.1. Die PPAR-Familie	15
1.5.2. PPAR- β und PPAR- γ	15
1.5.3. PPAR- γ und seine Rolle bei der Adipozytendifferenzierung	16
1.6. PPAR- α	16
1.6.1. PPAR- α und seine Rolle im Lipidstoffwechsel	17
1.6.2. Extrazelluläre Kandidatengene	17
1.6.3. Intrazelluläre Kandidatengene	18
1.6.4. Fibrate und ihre Wirkung auf den Lipidstoffwechsel	21
1.6.5. Bekannte PPAR- α - Mutationen	22
1.7. Ziel der Arbeit	23

2. Material und Methoden

2.1. Material	
2.1.1. Chemikalien	24
2.1.2. Geräte	26
2.1.3. Patientengut	26
A) Kollektiv der HLP-Patienten	26
B) Kollektiv der Adipositas permagna-Patienten	28
2.2. Methoden	
2.2.1. Isolierung genomischer DNS	29
2.2.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	29
2.2.3. Aufreinigung des PCR-Produktes mit QIA-Quick PCR Purifikation Kit	32
2.2.4. DNS Konzentrationsmessung	33
2.2.5. Ethidiumbromidfärbung	33
2.2.6. SSCP-Analyse mit Polyacrylamidgelen	34
2.2.7. Silberfärbung	35
2.2.8. Sequenzreaktion	35
2.2.9. Aufreinigung des PCR-Produktes durch Ethanolfällung	37

3. Ergebnisse:

3.1. Charakterisierung der Patientenkollektive	38
3.2. Untersuchungsstrategie	39
3.2.1. Hyperlipidämie-Kollektiv	40
I. PCR-Amplifizierung	40
A) Amplifizierung des Exons 3	40
B) Amplifizierung des Exons 8	41
II. SSCP-Analyse	43
A) Analyse von Exon 3	44
1) Genabschnitt 3B	44
B) Analyse von Exon 8	47
1) Genabschnitt 8A	47
2) Genabschnitt 8B	49
3) Genabschnitt 8C	51
III. Sequenzierung	54
3.2.2. Adipositas permagna-Kollektiv	55
I. PCR-Amplifizierung	55
A) Amplifizierung des Exons 2	55
B) Amplifizierung des Exons 5	55
II. Analyse von Exon 2	56
1) SSCP-Analyse	56
2) Sequenzierung	58
3) Vergleich der Lipidparameter	59
III. Analyse von Exon 5	60
1) SSCP-Analyse	60
2) Sequenzierung	62
3) Vergleich der Lipidparameter	63
4. Diskussion	66
5. Zusammenfassung der Arbeit	75
6. Literaturverzeichnis	76
7. Abkürzungsverzeichnis	87
8. Abbildungsverzeichnis	89
9. Anhang	92

1. Einleitung

1.1. Der Lipidstoffwechsel

Lebewesen benötigen für den Aufbau und die Erhaltung ihrer zahlreichen physiologischen Funktionen Energie. Der Mensch kann verwertbare Energie in Form von Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden mit der Nahrung aufnehmen oder in der Leber synthetisieren. Die in bezug auf Struktur und Herkunft heterogene Gruppe der Lipide beinhaltet zum einen die Triglyceride (TG) und die Cholesterinester (CE), die als Neutrallipide zusammengefasst werden, zum anderen die polaren Lipide, die sich aus Phospholipiden, Cholesterin und freien Fettsäuren (FFS) zusammensetzen (Schwandt und Richter, 1995). Darüber hinaus werden die fettlöslichen Vitamine A, D, E, K den Lipiden als eigene Klasse zugeordnet.

Um ihre Aufgaben als Brennstoffe, Wärmeisolatoren, Hormonvorstufen und Membranbestandteile zu erfüllen, müssen die Lipide zu ihren Zielorganen transportiert werden. Im tierischen Organismus steht mit dem Blut ein wäßriges Milieu als Transportweg zur Verfügung. Da Lipide wasserunlöslich sind, müssen sie entweder an spezifische Transportproteine gebunden werden oder sie bilden Mizellare Komplexe mit Proteinen. Lipoproteine sind folgendermaßen angeordnet: Apolare Lipide wie TG und Cholesterinester bilden einen Kern (Alberts und Segrest et al., 1988). An diese legen sich von außen die polaren Lipide wie Phospholipide und Cholesterin an, wobei sie sich mit ihrer hydrophilen Seite nach außen zum Plasma und mit der hydrophoben Seite nach innen orientieren (Miller und Small, 1987). Der Proteinanteil der Lipoproteine, bestehend aus Apolipoproteinen (Apo), ist in die Lipidhülle eingelagert. Die Apolipoproteine geben den Lipidmizellen eine zusätzliche Stabilität und spielen eine entscheidende Rolle im Metabolismus der Lipoproteine. Sie besitzen Signale, die einen gerichteten Transport und eine selektive Aufnahme ermöglichen (Schwandt und Richter, 1995). Lipoproteine müssen als Momentaufnahme betrachtet werden, da durch Transfer sowohl einzelner Lipide als auch von Apolipoproteinen, sowie durch lipolytische Spaltung eine dynamische Verteilung erreicht wird.

Die Lipoproteine im humanen Blut können in 5 verschiedene Klassen eingeteilt werden, die sich in der Dichte, der Größe, der elektrischen Ladung sowie der Zusammenstellung der Lipide und Apolipoproteine unterscheiden (Gotto et al., 1986).

Tabelle 1.1. zeigt eine Übersicht der Einteilung und der Eigenschaften der Lipoproteine.

	Chylomikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte [g/ml]	<0,96	0,96-1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.063-1.210
Durchmesser [nm]	80-1200	30-80	25-35	18-25	5-12
Molekulargewicht [kD]	5-1000x10 ³	10-80x 10 ³	5-10 x10 ³	2-3x10 ³	65-386
Elektrophorese	Keine Wanderung	Pre-β	slow pre-β	β	α
Zusammensetzung [% der Masse]					
Triglyceride	86	55	23	6	4
Phospholipide	7	18	19	22	34
Cholesterol	5	19	38	50	18
Proteine	1-2	6-10	11	21	45-55
Apolipoproteine (Apo)	Apo A: I,II,IV Apo B: B ₄₈ Apo C: I,II,III ApoE	Apo A: - Apo B: B ₁₀₀ Apo C: I,II,III ApoE	Apo A: - Apo B: B ₁₀₀ Apo C: III ApoE	Apo A: - ApoB: B ₁₀₀ Apo C: -	Apo A: I,II Apo B: - Apo C: I,II,III ApoE

Tabelle 1.1.: Einteilung und Eigenschaften der Lipoproteine

Die Daten für die Zusammensetzung der Apolipoproteine und der physikalischen Eigenschaften von Chylomikronen, VLDL, IDL, LDL und HDL sind der Literatur entnommen (Gotto et al., 1986; Kane et al., 1996).

Im Metabolismus der Plasmalipoproteine werden ein exogenes, ein endogenes und ein reverses Cholesterintransportsystem unterschieden. Mit der Nahrung aufgenommene Lipide beschreiten den exogenen Weg, der endogene Weg wird von den Lipoproteinen hepatischen Ursprungs eingeschlagen und über den reverse Cholesterintransport gelangt Cholesterin aus der Peripherie in die Leber.

1.1.1. Der exogene Transportweg

Nahrungsfette, die zum größten Teil aus TG bestehen, werden im Dünndarm durch die Pankreaslipase zu Fettsäuren (FS) und β-Monoglyceriden abgebaut. Voraussetzung hierfür ist eine mechanische Emulgierung der Fette im Magen. Die Pankreasenzyme Phospholipase A und Cholesterinesterase spalten das Phospholipid Lecithin und die Cholesterinester. Unter Mithilfe von Gallensäuren bilden sich Mizellen, die die Aufnahme der lipophilen Fettsäureprodukte durch die Darmwand vermitteln (Silbernagl und Despopoulos, 1991). In der Mukosazelle erfolgt eine erneute Veresterung von langkettigen FS, Monoacylglyceriden und Cholesterin. Es kommt zur Bildung von Chylomikronen (CM), die Phospholipide, Cholesterin/-ester, sowie ApoB₄₈, ApoA-I und ApoA-IV enthalten. Diese werden in die mesenterialen Lymphbahnen abgegeben. Über den Ductus thoracicus gelangen sie ins Blut. Intravaskulär werden die Apolipoproteine C-I, C-II, C-III und E von zirkulierenden Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) auf die CM übertragen. Apo C-II dient als Kofaktor für

die endothelständige Lipoproteinlipase (LPL). Die LPL ist an Heparansulphat Proteoglykanen (HSPG) der Endothelzellen zahlreicher Gewebe gebunden. Das aktivierte Enzym hydrolysiert TG der Lipoproteine. Die dabei freiwerdenden FS werden entweder im Plasma an Albumin gebunden, zu den peripheren Geweben transportiert und der β -Oxidation in der Skelett- und Herzmuskulatur zugeführt oder im Fettgewebe gespeichert (Olivecrona et al., 1990). Im Verlauf der Hydrolyse werden Phospholipide, Apolipoproteine wie ApoA-I, ApoA-IV, und ApoC an HDL-Vorstufen abgegeben (Tall et al., 1978). Die durch diese Umwandlungen entstandenen Chylomikronen-Remnants (CR) exponieren auf ihrer Oberfläche ApoE, das von ApoE Rezeptoren der Leber erkannt werden kann (Willnow et al., 1994). Die LPL löst sich von den Proteoglykanen und verbleibt nach der Hydrolyse an den CR (Felts et al., 1978). Sie ist ebenfalls als Ligand in die rezeptorvermittelte Aufnahme der CM in die Leber beteiligt (Beisiegel et al., 1994). ApoE, sowie LPL und von Hepatozyten sezernierte Hepatische Lipase (HL) können an die stark negativ-geladenen HSPG binden (Eisenberg et al., 1987) und damit zu einer schnellen Anreicherung der CR im Disse-Raum an der Oberfläche der Hepatozyten führen (Herz et al., 1995). CR können aber auch durch direkte Bindung von ApoE und LPL an das LDL-Receptor Related Protein (LRP) (Beisiegel et al., 1989,91) über eine spezifische rezeptorvermittelte Endozytose in die Hepatozyten aufgenommen werden (Willnow et al., 1994). Das Membranprotein LRP ist ein multifunktionelles Rezeptorprotein und vermittelt die selektive Aufnahme ApoE-haltiger Lipoproteine in die Hepatozyten. Deshalb wird es als ApoE- oder CR-Rezeptor postuliert (Herz et al., 1995). Von Hepatozyten sezerniertes ApoE verstärkt diese Bindung. In vitro Experimente zeigten, daß ApoE sowie die LPL und die HL zuerst mit hoher Effizienz an Proteoglykane der Zelloberfläche binden (Herz et al., 1995) und erst anschließend mit LRP interagieren.

1.1.2. Der endogene Transportweg

Mit der Synthese von Lipoproteinen sehr geringer Dichte (VLDL) in den Hepatozyten startet der endogene Stoffwechselweg. Die Zusammensetzung dieser Apolipoproteine ähnelt denen der CM. Die VLDL besitzen jedoch einen geringeren TG-Anteil und enthalten als Strukturprotein ApoB₁₀₀ statt ApoB₄₈ (Ginsberg, 1995). Nach Abgabe aus der Leber nehmen sie ApoC und ApoE auf. Sie werden durch die LPL hydrolysiert (Griffin und Packard, 1994). Dabei werden sie zu Lipoproteinen mittlerer Dichte (IDL) umgewandelt. Die entstandenen VLDL-Remnants/IDL werden entweder –durch die HL katalysiert- weiter zu Lipoproteinen geringer Dichte (LDL) hydrolysiert (Griffin und Packard, 1994) oder über das ApoE an den LDL-Rezeptor/LRP auf den Hepatozyten aufgenommen (Beisiegel et al., 1995). Während der Hydrolyse werden mit Ausnahme des ApoB₁₀₀ fast alle Lipoproteine abgegeben. Bei der enzymatischen Katalyse durch das Cholesterin-Ester-Transfer-Protein (CETP) kommt es zu einer Aufnahme von Cholesterinestern aus zirkulierenden HDL (Kunitake et al., 1992). Die LDL werden in periphere Zellen oder in die Leber aufgenommen und abgebaut. Das dabei freiwerdende Cholesterin kann in die Zellmembran eingebaut werden oder dient als Vorstufe für Hormone (Kovanen et al., 1979). Das Cholesterin in der Leber kann in Form von Gallensäuren ausgeschieden werden, um den enterohepatischen Kreislauf zu sichern. Die Aufnahme der Lipoproteine erfolgt dadurch, daß der LDL-Rezeptor der Zellen das ApoB₁₀₀ auf der Oberfläche der LDL als Ligand erkennt (Goldstein und Brown, 1983). Um eine Überladung nichtheptischer Zellen mit Cholesterin zu verhindern, wird überschüssiges Cholesterin zur Leber transportiert.

1.1.3. Der reverse Cholesterintransport

Beim reversen Cholesterintransport findet über mehrere Stoffwechselschritte ein Transport von peripherem Cholesterin zur Leber statt. Dazu tragen die HDL entscheidend bei. Zu dieser heterogenen Klasse zählen die HDL₂, HDL₃ und die ApoE-reichen HDL-Partikel. Sie enthalten das ApoA-I als Hauptstrukturprotein. Im peripheren Gewebe wird freies Cholesterin in die HDL-Partikel aufgenommen. Es folgt eine Veresterung durch das Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT), wobei ApoA-I als Cofaktor fungiert. Die dabei entstehenden CE können auf andere Lipoproteine mittels CETP übertragen und zur Leber transportiert werden (Pieters et al., 1994) oder über die HDL selber zur Leber gelangen (Bakkeren et al., 1990). In der Leber werden aus Cholesterin Gallensäuren synthetisiert und diese über den enterohepatischen Kreislauf abgebaut.

1.1.4. Die Lipoproteinlipase

Die LPL nimmt im triglyceridreichen Lipoproteinstoffwechsel eine wichtige Position ein. Sie wird ebenso wie die hepatische und die pankreatische Lipase den neutralen Lipasen zugerechnet. Die LPL wird überwiegend im Fettgewebe und in der Muskulatur vorgefunden (Semenkovich et al., 1989), wo sie über ionische Wechselwirkungen mit den membranständigen HSPG auf der Oberfläche der kapillären Endothelzellen vorliegt (Saxena et al., 1991; Braun et al., 1992; Goldberg et al., 1996). Auch in den Parenchymzellen der Leber, Niere, Lunge und des Ovars wird sie exprimiert. Darüber hinaus wird sie in Monozyten, glatten Muskelzellen und Makrophagen synthetisiert, die sich in atherosklerotischen Läsionen befinden (Ylae-Herttuala et al., 1991). Insulin, Glukokortikoide und verschiedene Zytokine fördern die Transkription der LPL. Heparin bindet an den C-Terminus (Davis et al., 1992), aber auch der N-terminale Abschnitt trägt zur Heparinbindung bei (Dichek et al., 1993). Heparin kann an dieser HSPG-Bindung ansetzen, LPL in das Plasma freisetzen und die LPL-Aktivität im Blut erhöhen (Iverius et al., 1986). In zahlreichen Studien wurde die direkte Interaktion der LPL an LRP und die LPL vermittelte gesteigerte Aufnahme von Lipoproteinen unabhängig von der hydrolytischen Funktion beschrieben. Die verstärkte Interaktion zwischen den Lipoproteinen und den Rezeptoren kommt durch eine gleichzeitige Bindung der Lipoproteine und HSPG zustande. Diese Bindung kann nur von der dimeren Form vermittelt werden. Aufgaben sind neben der Hydrolyse von TG, die vermittelte Aufnahme von ApoE-reichen Proteinen durch das LRP (Beisiegel et al., 1991). Auch der ApoE Gehalt steigert die Bindung von Lipoproteinen an HSPG, durch ApoC wird sie hingegen gemindert (Van Barlingen et al., 1996).

Das LPL-Gen ist auf dem Chromosom 8 lokalisiert (Sparkes et al., 1987). Es besteht aus 10 Exons und 9 Introns (Deeb et al., 1989) und hat eine Länge von 30 kb, welches einer Länge von 475 Aminosäuren (AS) entspricht (Braun et al., 1992). Im Promotor des LPL-Gens wurden u.a. Bindungssequenzen für den Peroxisomen-Proliferation-Aktivierenden-Rezeptor (PPAR) nachgewiesen (Schoonjans et al., 1996). Mehrere funktionelle Domänen sind bekannt, ihre AS Sequenz konnte bestimmten DNS-Abschnitten zugeordnet werden (Ven Murthy et al., 1996).

1.2. Störungen im Stoffwechsel triglyceridreicher Lipoproteine

Generell besteht ein Gleichgewicht zwischen der Lipidproduktion in Leber und Darm und dem Lipidabbau in der Leber. Störungen der Enzyme und Rezeptoren dieses Systems führen zu veränderten Lipidkonstellationen im Plasma und können damit zum Auftreten bestimmter Erkrankungen beitragen. So ist die Entwicklung der Atherosklerose und ihrer häufigsten Komplikation, der koronaren Herzkrankheit (KHK), mit veränderten Konzentrationen der Lipoproteine vergesellschaftet (Auwerx et al., 1996). Da ein wichtiges triglyceridtragendes Lipoprotein im Plasma das VLDL ist, werden Störungen im Stoffwechsel der VLDL näher betrachtet. Man unterscheidet die Störungen bei denen eine verminderte Elimination der VLDL vorliegen, von den Störungen, die mit einer erhöhten Synthese abnormer oder normaler VLDL einhergehen.

1.2.1. Familiäre Hypertriglyceridämie (FHTG)

Patienten mit familiärer HTG sind durch TG-Werte im Plasma über 200 mg/dl und einem Gesamtcholesterinspiegel unter 200 mg/dl in aufeinanderfolgenden Generationen gekennzeichnet. Obwohl dieser Störung ein autosomal-dominanter Erbgang zugrunde liegt (Assmann und Brewer, 1991), manifestiert sich die Erkrankung erst im frühen Erwachsenenalter. Es können zusätzlich eine Fettleibigkeit, eine Glukoseintoleranz und eine Hyperurikämie vorliegen (Glueck et al., 1976). Bei der FHTG werden zwar normale Mengen VLDL-Partikel pro Zeiteinheit aus der Leber sezerniert, die meisten dieser Partikel enthalten jedoch mehr Triglyceride als normal (Brunzell et al., 1983). Als Ursache wird ein gestörter Kohlenhydratstoffwechsel in den Hepatozyten angenommen, der eine gesteigerte de-novo-Synthese von FS und damit von TG zur Folge hat (Cianflone et al., 1992). Eine verminderte Aufnahme von Fett mit der Nahrung senkt die Triglyceridspiegel nicht. Dagegen wirkt sich eine Einschränkung des Alkoholkonsums und der Aufnahme von Monosacchariden positiv aus. Bei dieser Störung besteht kein erhöhtes Risiko für eine Pankreatitis oder Arteriosklerose (Goff und Gotto, 1996), so daß eine pharmakologische Therapie nicht indiziert ist.

1.2.2. Familiäre kombinierte Hyperlipidämie (FKHL)

Kennzeichnend für diese auch als „Hyper-ApoB-Lipidämie“ bezeichnete Krankheit, ist eine hepatische Überproduktion von ApoB und folglich auch von VLDL (Sniderman und Cianflone, 1995). Die polygen vererbte FKHL geht mit einer erhöhten Anzahl, in ihrer Zusammensetzung normaler VLDL einher. Ursächlich wird ein vermehrtes Angebot von FS an die Leber angenommen. Das gesteigerte Angebot kann aus einer verminderten Aktivität

oder Expression der LPL oder aus einem Insulinmangel resultieren. Letzteres wird häufig bei insulinabhängigem Diabetes beobachtet. Ein weiterer Grund könnte in der verstärkten Produktion des Acylierung-Stimulierenden-Proteins (ASP) liegen. Dieses Plasmaprotein gilt als stärkstes Stimulans der TG-Synthese in Fettzellen (Cianflone et al., 1993). Durch die erhöhte VLDL-Fraktion kann es folglich durch den weiteren Abbau zu einer Erhöhung der LDL kommen, so daß neben einer HTG auch eine Hypercholesterinämie auftreten kann (Bradley und Gianturco, 1994).

In der Pubertät fallen erhöhte Cholesterin- und TG-Werte auf. Die Patienten leiden unter verfrühter Arteriosklerose. Die Inzidenzrate für Herzinfarkte bei Personen mittleren Alters ist erhöht. Die Frequenz von Übergewicht, Hyperurikämie und Glucoseintoleranz steigt ebenfalls an. Die Therapie beinhaltet allgemeine Maßnahmen wie Gewichtsreduktion, Restriktion von gesättigten FS und Cholesterin, Vermeiden von Alkohol und oralen Kontrazeptiva. HTG sprechen auf Nikotinsäure oder Gemfibrozil an. Ist die Cholesterinfraktion erhöht, helfen gallebindende Mittel oder Lovastatin.

1.2.3. Primäres Chylomikronämiesyndrom

Das primäre Chylomikronämiesyndrom ist durch das Auftreten von CM im Nüchternserum gekennzeichnet. Die Erkrankung beruht auf einem autosomal-rezessiv vererbten Mangel an LPL bzw. einer C-II-Defizienz. Dies führt zu einem stark verzögerten Abbau der CM. Ein solches Syndrom liegt vor, wenn die TG in den CM Werte von 2000 mg/dl oder 22 mmol/l überschreiten und mindestens eines der folgenden beschriebenen Symptome vorliegt (Brunzell et al., 1986). Klinisch fallen die meist jugendlichen Patienten durch eruptive Xanthome vorwiegend an Stamm und Gesäß, sowie Hepatosplenomegalie und anfallsartiger abdominelle Schmerzen aufgrund fulminanter Pankreatitiden auf. Es besteht kein wesentlich erhöhtes Arterioskleroserisiko, da die Cholesterinwerte nur mäßig erhöht sind (Goff und Gotto, 1996). Die VLDL-Spiegel sind in der Regel normal. Bei der LPL-Defizienz leiden die homozygoten Merkmalsträger an einem Strukturdefekt der LPL mit daraus resultierender Störung des CM-Abbaus. Physiologisches Korrelat bildet das Blut dieser Patienten, mit milchig-trübem Aussehen. Die Diagnose wird durch nicht ansteigende LPL-Spiegel nach Heparin-gabe bestätigt. Heterozygote Merkmalsträger weisen keine bis leicht erhöhte TG auf, trotz einer bis zu 50% reduzierten Aktivität der LPL. Allerdings kann ihre Stoffwechselsituation schnell entgleisen, wenn zusätzliche Risikofaktoren, wie z.B. unbehandelter Diabetes mellitus, Östrogeneinnahme oder Alkoholkonsum hinzukommen. Therapiert wird mit einer an Fett und Kohlenhydraten reduzierten Diät. Außerdem soll der

Patient verstärkt mittelkettige FS aufnehmen, die nicht in CM eingebaut werden, sondern direkt über die Blutbahn zur Leber gelangen. Die Ernährung sollte um fettlösliche Vitamine ergänzt werden. Auf Alkohol, Östrogene oder triglyceridsteigernde Medikamente sollte verzichtet werden. Eine Therapie mit Fibraten oder Nikotinsäure bringt meist nur geringen Erfolg.

Die ApoC-II-Defizienz ist auf das Fehlen von ApoC-II zurückzuführen (Beil et al., 1992). ApoC-II ist ein wesentlicher Cofaktor für die LPL. Die ApoC-II-Defizienz sorgt für einen funktionellen LPL-Mangel, der ein Syndrom ähnlich der vorausgehenden Erkrankung ausbildet. Anders als bei der LPL-Defizienz ist hierbei zusätzlich die VLDL-Fraktion erhöht. Diese Erkrankung tritt im Gegensatz zu der LPL-Defizienz erst im Erwachsenenalter und in einer weniger stark ausgeprägten Form auf. Die Therapiemöglichkeiten sind die gleichen. In akuten Situationen besteht die Möglichkeit einer Plasmaspende, um den ApoC-II Spiegel zu erhöhen und den TG-Abbau zu beschleunigen.

1.2.4. Dysbetalipoproteinämie

Bei der Dysbetalipoproteinämie ist die hepatische Elimination von CR und VLDL/IDL vermindert mit konsekutivem Anstieg der Plasmaspiegel von Cholesterin und TG. Ursache ist eine Abnormalität des ApoE, wodurch dessen Bindung an den Apolipoprotein-Rezeptor gestört ist.

Häufig wird eine Dysbetalipoproteinämie bei Personen mit einem homozygoten Auftreten des ApoE 2 Allels beobachtet. Klinisch relevant wird die Störung erst beim Zusammentreffen mit anderen Faktoren, wie z.B. Diabetes und Hypothyreose. Klinisch beobachtet man eine sich früh manifestierende Arteriosklerose sowohl der Herzkranzgefäße, wie auch der Gefäße der unteren Extremitäten. An den Handflächen sind Xanthome pathognomonisch für diese Erkrankung. Es werden Übergewicht, pathologische Glukosetoleranz, Fettleber, sowie Hyperurikämie beobachtet. Die Symptome treten überwiegend erst im Erwachsenenalter auf. Therapiert wird diätetisch, mit Fibraten und Nikotinsäure (Goff und Gotto, 1996).

Darüber hinaus sind Ursachen der sekundären HTG wie Medikamente, Diabetes mellitus Typ II und Alkohol bekannt. Als mögliche Ursache für eine HTG wäre auch aus seiner Rolle im Lipidstoffwechsel heraus, ein Defekt des PPAR denkbar (s.u.).

1.3. Adipositas permagna

Adipositas ist definiert als eine Erhöhung des Anteils des Körperfettes an der Körpermasse. Weißes Fettgewebe besteht aus Adipozyten. Diese Zellen spielen eine zentrale Rolle im Fett- und Energiehaushalt von Wirbeltieren. Sie speichern Energie in Form von TG in Zeiten guter Ernährungssituation und setzen sie in energieärmeren Zeiten wieder frei. Eine positive Energiebilanz führt zum Aufbau von Depotfett. Zur Berechnung des Übergewichtes und der Adipositas wird der Körpermaßindex (BMI) herangezogen, weil er am stärksten mit der menschlichen Körperfettmasse korreliert (Wechsler, 1995). Der BMI berechnet sich aus dem Quotienten Körpergewicht (kg) durch Körpergröße im Quadrat (m^2). Die Deutsche Adipositas-Gesellschaft (DAG) empfiehlt seit 1995 folgende international anerkannte Einteilung: Dem Normalgewicht wird ein BMI von 20 bis 24,9 kg/m^2 zugeordnet, dem Begriff Übergewicht oder Adipositas Grad I ein BMI im Bereich von 25 bis 29,9 kg/m^2 , bei Adipositas oder Adipositas Grad II liegt der BMI bei 30 bis 39,9 kg/m^2 . Extreme Adipositas oder Adipositas Grad III entspricht einem BMI über 40 kg/m^2 . Der Begriff Adipositas permagna beschreibt extrem adipöse Personen, die der letzten Gruppe zugeordnet werden. Die Folgen von massivem Übergewicht sind aus zahlreichen Studien bekannt (Wirth et al., 1997): Es kommt zu Erkrankungen des Kardiovaskulären Systems wie Hypertonie, KHK, Herzinsuffizienz und venöse Insuffizienz. Des Weiteren sind Erkrankungen im Rahmen des metabolischen Syndroms wie Diabetes mellitus Typ II, Dyslipidämie und die damit verbundenen Gefäßerkrankungen v.a. Arteriosklerose, Schlafapnoe, Dyspnoe in Ruhe und bei Belastung, Gelenkerkrankungen, Gallensteinleiden, Störungen der Blutgerinnung mit vermehrtem Auftreten von tiefen Beinvenenthrombosen und Lungenembolien sowie gehäuftes Auftreten von malignen Tumoren ebenfalls häufig mit Übergewicht assoziiert. Die Lebenserwartung eines adipösen Menschen ist deutlich vermindert. Die Annahme, daß Adipositas immer mit Fettstoffwechselstörungen einhergeht, konnte eingeschränkt werden (Beisiegel et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, daß Patienten mit einem BMI über 40 überwiegend einen normalen Fettstoffwechsel haben. Dyslipoproteinämien hingegen finden sich vermehrt in der Patientengruppe mit BMI 30-40.

Die durch Adipositas verursachten Kosten in Deutschland nehmen aufgrund der steigenden Prävalenz der Erkrankung stetig zu (Hamann et al., 1995).

In schweren Fällen führen konservative Methoden nur selten zu einer zufriedenstellenden Gewichtsreduktion. Erfolgsversprechender werden bei diesen Betroffenen Magenrestriktionsoperationen durchgeführt. Mit operativen Methoden konnten 55 % der Patienten ihr Übergewicht in durchschnittlich 7 Monaten halbieren (Wolf et al., 1998).

In Kenntnis der aus Adipositas permagna folgenden gesundheitlichen und finanziellen Belastungen, konzentriert sich die Forschung zunehmend auf die Ursachen dieser Erkrankung. Man geht davon aus, daß es sich um eine multifaktorielle Erkrankung handelt. Eine kalorienreiche Ernährung und mangelnde körperliche Aktivität führen aufgrund der positiven Energiebilanz zum Aufbau von Körperfett. Als Ursachen für die Fettleibigkeit werden neben falschem Essverhalten und mangelnder Bewegung eine genetische Disposition angenommen. Seit langem wird eine familiäre Häufung beschrieben. Erbliche Disposition wurde in Zwillingsstudien aufgezeigt (Hebebrand et al., 1995; Stunkard et al., 1986). Das Risiko adipös zu werden ist demnach für eine Person mit familiärer Adipositanamnese dreimal höher als in der Normalbevölkerung (Chagnon et al., 1997). Höchste Wahrscheinlichkeit (50-80 %) besteht bei eineiigen Zwillingen. Alter und Geschlecht haben, wie Ergebnisse von Zwillings-, Familien- und Adoptionsstudien zeigen, keinen wesentlichen Einfluß auf den Erblichkeitsgrad. Die Quebec-Familien-Studie zeigte einen genetischen Einfluß von 56% für das viszerale Fettdepot und 42% für das abdominale Subkutanfett (Buchard et al., 1996).

Die genetische Erforschung der Adipositas wurde durch die Entdeckung des „Obese-Genes“ (OB-Genes) vorangetrieben (Friedmann, 1992). Das OB-Gen oder auch Adipositas-Gen trägt die Bauanleitung für das von Fettzellen erzeugte Hormon Leptin. Leptin wird überwiegend im weißen Fettgewebe gebildet und inhibiert über seinen OB-Rezeptor im Hypothalamus die Neuropeptidausschüttung. Dadurch wird ein Sättigungsgefühl ausgelöst, die Nahrungsaufnahme gesenkt (Pelleymounter et al., 1995) und die Energieverwertung gesteigert (Levin et al., 1996). Mehrere Studien zeigten, daß die Leptinkonzentration positiv mit der Fettmasse und dem BMI korrelieren (Considine et al., 1996; Ostlund et al., 1996; Frederich et al., 1995; Rosenbaum et al., 1996). Bei Übergewichtigen sind die Leptinspiegel entsprechend erhöht. Die folglich zu erwartende Reduktion der Nahrungsaufnahme bleibt jedoch bei adipösen Personen aus. Zur Erklärung wird eine Leptinresistenz herangezogen, wonach hohe Leptinspiegel eine Downregulation des OB-Rezeptors im Hypothalamus hervorrufen. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, daß eine Senkung des Leptinspiegels bei adipösen Tieren nur durch eine Gewichtsreduktion zu erreichen war (Maffei et al., 1995; Masuzaki et al., 1995).

Die Leptinproduktion unterliegt hormoneller Regulation. Unter Testosteroneinfluß nimmt die Leptinproduktion ab und unter Östrogenwirkung zu (Wabitsch et al., 1997; Elbers et al., 1997; Shimizu et al., 1997).

Weitere Ursachen für Adipositas sind genetische Syndrome wie das Prader-Willi-Syndrom oder das Bardet-Biedl-Syndrom u.a. und Adipositasformen wie sie sekundär bei neuroendokrinen Störungen beobachtet werden (Bray 1992). Beispielhaft seien hier nur Hypothyreose und M. Cushing genannt. Auch die iatrogene Adipositas, wie sie beispielsweise bei einer Cortisoltherapie vorkommt, soll der Vollständigkeit halber erwähnt werden (Bray, 1992).

Bei der Erforschung der Ursachen der Adipositas und der HLP konzentriert sich die Forschung zunehmend auf die genetische Ebene. Hierbei zeigte sich die zentrale Rolle von Transkriptionsfaktoren, wie PPAR, und ihre Auswirkungen im Lipidmetabolismus.

1.4. Aufbau und Funktion von Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung und Regulierung der Expression von Genen. Eine wichtige Gruppe von Transkriptionsfaktoren bilden die Kernrezeptoren. Diese lagern sich an spezielle DNA-Abschnitte an. So gebunden aktivieren sie die RNA-Polymerase, die an dieser Stelle mit der RNA-Replikation beginnt (Strachan und Read, 1996). Die Kernrezeptoren lassen sich aufgrund ihrer Lokalisation in zwei Gruppen einteilen (Schoonjans und Staels und Auwerx, 1996): Man unterscheidet die im Zytoplasma gelegenen Typ I-Rezeptoren, von den im Zellkern gelegenen Typ II-Rezeptoren. Die Typ I-Rezeptoren liegen im Zytoplasma inaktiviert an sogenannte Hitzeschock Proteine (HSP) gebunden vor. Erst durch Ligandenbindung wird der Rezeptor aktiviert und löst sich vom HSP ab. Der Rezeptor-Ligand-Komplex wandert in den Zellkern, lagert sich an bestimmte DNS-Abschnitte an und leitet die Transkription der Zielgene ein (O'Malley und Tsai, 1994). Nach diesem Prinzip wirken vor allem die Steroidrezeptoren. Die entsprechenden Liganden haben als hydrophobe Hormone die Fähigkeit die Zellmembran durch Diffusion zu überwinden.

Unabhängig von der Bindung eines Liganden können sich Typ II-Rezeptoren an bestimmte DNS-Abschnitte anlagern und die Transkription spezifischer DNS-Sequenzen anregen. Eine Ligandenbindung ist nicht zwingend erforderlich. Zu dieser Gruppe der Kernrezeptoren gehören u.a. der PPAR, der Thyroid-Hormon-Rezeptor (TR), der 9-cis-Retinsäure-Rezeptor (RXR) und der Vitamin-D-Rezeptor. Voraussetzung für eine effektive Transkription ist das Vorliegen der intrazellulären Rezeptoren als Homo- oder Heterodimere (Mangelsdorf et al., 1995). Sie alle weisen eine homologe Struktur auf (Evans et al., 1988).

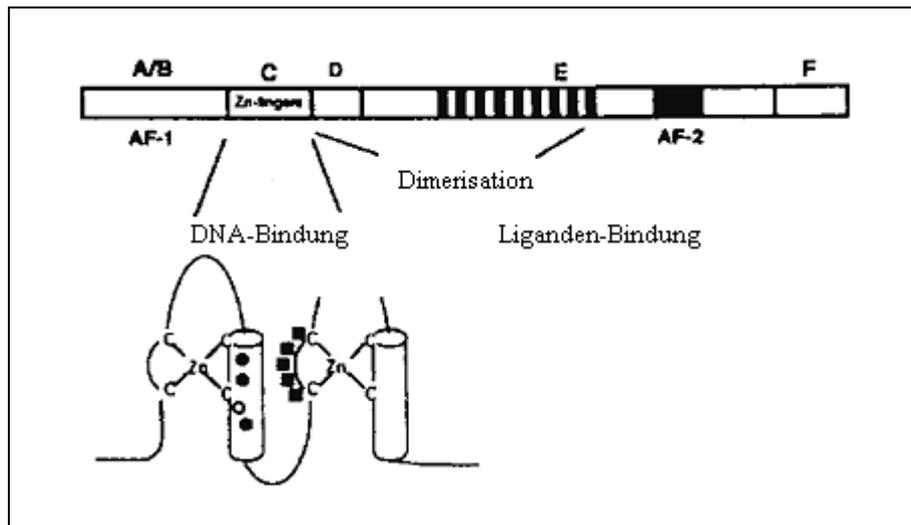


Abbildung 1.1.: Aufbau von Kernrezeptoren mit den funktionellen Domänen
 Aus: Schoonjans, Staels and Auwerx, Review (1996)

Intrazelluläre Rezeptoren weisen sechs funktionelle Domänen auf. Die A/B Domäne liegt am aminoterminalen Ende des Rezeptors. In Bezug auf AS-Sequenz und Länge variiert sie unter den verschiedenen Rezeptoren am stärksten. Sie enthält eine „Aktivationsfunktion“, die wahrscheinlich für die Regulierung der Transkription verantwortlich ist. Die DNS-Bindungsdomäne (DBD), auch als C-Domäne bezeichnet, bindet an den entsprechenden DNS Abschnitt. Sie ist besonders gut konserviert. Die C-Domäne wird durch zwei Zinkfinger ergänzt, um die jeweils eine charakteristische AS-Sequenz angeordnet ist. Sie werden als P-Box und D-Box bezeichnet. Die aus fünf AS bestehende P-Box bindet ein spezifisches DNS Stück, das Hormone Response Element (HRE) genannt wird. Drei der AS sind für die richtige Basenerkennung des entsprechenden HRE verantwortlich. Die aus fünf AS aufgebaute D-Box vermittelt Interaktionen mit Co-Aktivatoren und Repressoren. Die D-Domäne vermittelt die nach Ligandenbindung erfolgende Konformationsänderung. Die E Domäne ist die ligandenbindende Region. Außerdem ist sie auch an der Bildung von Dimeren beteiligt. Am carboxyterminalen Ende liegt die in ihrer Größe sehr variable F Domäne. Ihre Funktion ist bisher unklar.

1.4.1. Hormone Response Elements (HRE)

Intrazelluläre Rezeptoren binden mit ihrer P-Box an HRE (O'Malley und Tsai, 1994; Mangelsdorf et al., 1995). Diese liegen meist stromaufwärts in der regulatorischen Region bestimmter Zielgene (Taels und Auwerx, 1997). Ihre Basensequenz ist gut konserviert. Sie bestehen aus zwei hintereinander angeordneten Motiven. Jedes Motiv enthält eine Abfolge von je sechs Basen (Hexamer), die „half sites“ genannt werden. Jeder Rezeptor erkennt die für ihn charakteristische half site mit entsprechender Basensequenz. Interessant dabei ist, daß die Basenfolge der HRE für einen Rezeptor nicht immer identisch ist. Trotzdem werden sie von demselben Rezeptor erkannt. Ein Rezeptor kann folglich unterschiedliche HRE erkennen, die vor verschiedenen Genen liegen. Dadurch wird verständlich, daß für die richtige Rezeptor-HRE Paarung die Basenfolge allein nicht entscheidend sein kann. Die Anordnung der „half sites“, sowie die Art der Rezeptor Dimerisation sind hierbei weitere wichtige Faktoren. Auch der Abstand zwischen den beiden „half sites“ des HRE, in Basenpaaren ausgedrückt, spielt eine Rolle für die passende Rezeptorbindung (Schoonjans et al., 1996; Mangelsdorf et al., 1995; Leid et al., 1992). So binden Schilddrüsenhormon- und Vitamin D-Rezeptoren bevorzugt an HRE, die 3, 4 oder 5 DR (Direct Repeat spaced by five nucleotids) aufweisen.

1.5. Der Peroxisomen-Proliferation-Aktivierende-Rezeptor

Der PPAR gehört zu der Familie der intrazellulären Klasse II-Kernrezeptoren, die als aktivierte Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen regulieren und damit externe Signale zum Kern vermitteln (Taels and Auwerx, 1997, s. Abb. 1.2.). Seinen Namen verdankt der Rezeptor der Beobachtung, daß er nach Bindung eines Liganden Zielgene aktiviert, die in Nagetieren zu einer Peroxisomen-Proliferation führen (Schoonjans et al., 1996).

PPAR präsentiert die typische Struktur der Kernrezeptoren, bestehend aus sechs funktionellen Domänen A/B, C, D, und E/F (Abb. 1.1.). Bisher sind keine detaillierten Struktur-Funktions-Studien durchgeführt worden. Trotzdem werden aufgrund der Strukturhomologie zu anderen Rezeptoren, den Domänen bestimmte Funktionen zugesprochen. Die DNA Bindungsaktivität der PPARs wird durch die C-Domäne vermittelt. Die Domänen A und E beinhalten Transkriptionsfunktionen. Die D-Domäne erlaubt Konformationsänderungen des Proteins und Interaktion mit Co-Aktivatoren und Repressoren. Eine Dimerisation wird durch die Domänen C und E vermittelt. Die P-Box vom PPAR wird von der Sequenz cEGckG gebildet. Diese ist identisch mit der AS-Sequenz der P-Box von RXR -und TR. Im Gegensatz zu der D-Box anderer intrazellulärer Rezeptoren ist die von PPAR aus drei AS aufgebaut. PPAR bildet

bevorzugt heterodimere Komplexe mit dem RXR-Rezeptor (s. Abb. 1.2.) und bindet an solche HRE, bei denen die beiden „half sites“ aus zwei gleichen aufeinanderfolgenden Sequenzen bestehen (Schoonjans et al., 1996; Mangelsdorf et al., 1995; Leid et al., 1992). RXR bindet die in 3' Richtung liegende half site und PPAR die am 5' Ende gelegene half site. Der PPAR-RXR Komplex erkennt die „half site“ – Sequenz AGGTCA. Das PPAR-RXR Heterodimer bindet alle bekannten Enhancermotive des Typs DR-1.

Alle PPAR werden von einer breiten Palette von Liganden aktiviert. Darunter befinden sich die hypotriglyceridämisch wirkenden Fibrate und die antidiabetischen Thiazolidinedione.

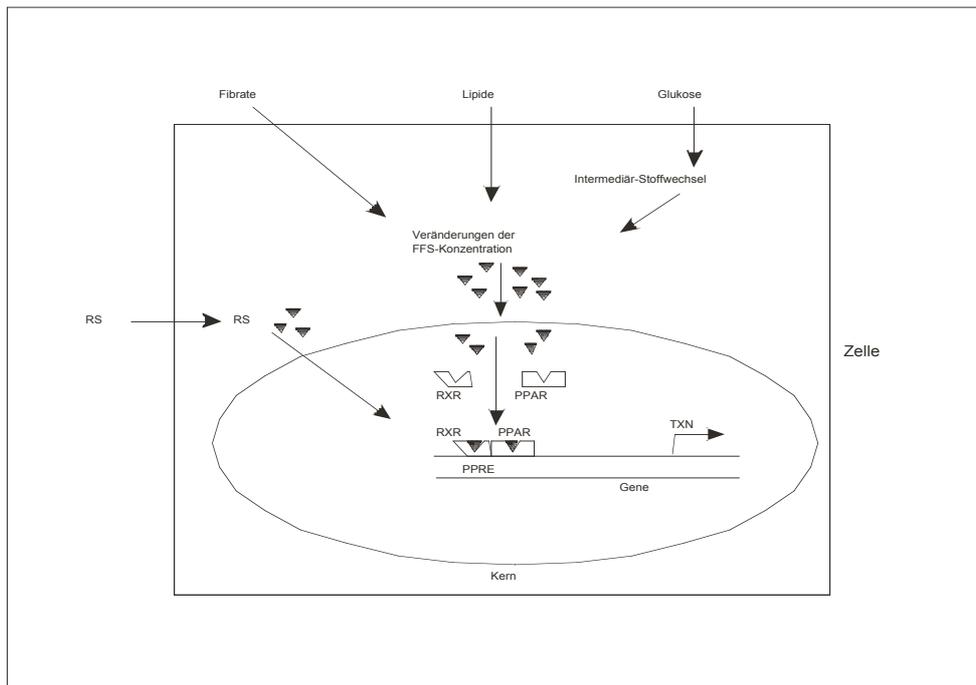


Abbildung 1.2.: Zentrale Rolle des PPAR.

In dimerisierter Form mit RXR bindet PPAR an spezielle Genabschnitte an und leitet damit die Transkription (TXN) verschiedener Gene ein. (Mit Veränderungen aus: K. Schoonjans, Staels und Auwerx. *Journal of Lipid Research*, Volume 37 (1996), S.912)

Wie die Transkription der PPAR genau gesteuert wird ist unklar. Sie scheint jedoch hormoneller Kontrolle zu unterliegen. So ist beobachtet worden, daß Dexamethason, insbesondere im Zusammenspiel mit FFS, die Expression von PPAR-messengerRNA (mRNA) steigert. Es sind zwar im Promotor von PPAR noch keine eindeutigen RE für Glucocorticoide entdeckt worden, es gibt jedoch Sequenzen, die diesen sehr ähnlich sind. Insulin dagegen übt einen hemmenden Effekt auf die Transkription der PPAR aus (Steiniger et al., 1994).

1.5.1. Die PPAR-Familie

Die Identifizierung der PPAR hat entscheidend zum Verständnis beigetragen, wie Ernährungsfaktoren und Pharmaka den Lipid- u. Lipoproteinmetabolismus steuern.

Bisher sind drei Mitglieder der PPAR Familie beim Menschen beschrieben worden: PPAR- α , PPAR- β und PPAR- γ (Schoonjans et al., 1997; Sher et al., 1993). Sie lassen sich aufgrund von Eigenschaften wie Gewebeverteilung, Liganden und Funktion, sowie anhand ihrer Genstruktur unterscheiden (Schoonjans et al., 1996).

Die verschiedenen PPAR Subtypen werden durch unterschiedliche Liganden aktiviert. So zeigten Schoonjans et al. an Hepatozyten, die mit Fibraten (PPAR- α -Liganden) behandelt wurden, eine verstärkte Transkription, der Gene, die in ihrem Promoterbereich PPRE beinhalten. Der PPAR- γ Ligand Thiazolidinedione BRL 49653 dagegen war nicht in der Lage, die Transkription in den Hepatozyten zu steigern (Schoonjans et al., 1996).

1.5.2. PPAR- β und γ

PPAR- β wird bereits während der Embryogenese exprimiert (Schoonjans et al., 1996) und ubiquitär in Körperzellen nachgewiesen. Seine Funktion ist unklar.

Bei PPAR- γ können durch alternatives Spleißen zwei Formen γ_1 und γ_2 entstehen. Die mRNA beider Spleißformen wird hauptsächlich in Adipozyten gefunden, aber auch zu kleineren Anteilen in der Skelettmuskulatur. PPAR γ_1 findet sich darüber hinaus in kleinen Mengen in Leber und Herz. PPAR γ wird eine Rolle bei der Differenzierung und Funktion von Adipozyten des weißen Fettgewebes zugeschrieben (Taels und Auwerx, 1997; Brun et al., 1997; Schoonjans et al., 1996). Bei Adipositas wurden erhöhte mRNA Spiegel an PPAR- γ_2 in Fettzellen nachgewiesen (Vidal-Puig et al., 1997).

Als natürlicher Ligand von PPAR- γ konnte bisher Prostaglandin J₂ identifiziert werden. Synthetische Liganden wie das antidiabetische Thiazolidinedion BRL 49653 sowie Indomethacin (Lehmann et al., 1996) wirken als PPAR- γ Aktivatoren (Schoonjans et al., 1996). Thiazolidinedione üben einen potenten hypotriglyceridämischen Effekt aus, indem sie die LPL -Expression im Fettgewebe induzieren. Der Steuerungsmechanismus zwischen PPAR-Aktivierung und Glukose-Metabolismus ist noch unklar.

1.5.3. PPAR- γ und seine Rolle bei der Adipozytendifferenzierung

Weißes Fettgewebe besteht aus Adipozyten, die eine zentrale Rolle in der Fetthomöostase und im Aufrechterhalten des Energiegleichgewichtes bei Wirbeltieren ausüben. Sie speichern Energie in Form von TG in Zeiten des Ernährungsüberflusses, und setzen sie in Form von FFS in Hungerzeiten wieder frei. Die Entwicklung des weißen Fettgewebes ist das Ergebnis lebenslanger Differenzierungsprozesse. Dabei differenzieren sich pluripotente Zellen zunehmend zu spezialisierten Zellen. Die Differenzierung der Adipoblasten wird durch zwei Gruppen von Transkriptionsfaktoren beeinflusst: Zum einen durch PPAR- γ , zum anderen durch Bindungsproteine wie CCAATT-enhancer-binding-protein (C/EBP). Die geläufige Hypothese ist, daß C/EBP die PPAR- γ Expression induziert und somit den initialen Trigger für das adipogenetische Programm darstellt. Damit vereinbar ist die Beobachtung, daß PPAR-Aktivatoren wie Fibrate und FS die Adipozytendifferenzierung induzieren. Ebenso interessant ist, daß Prostaglandine als natürliche PPAR-Liganden, potente Anreger der Adipozytendifferenzierung sind. Ob PPAR- γ als einziges Mitglied aus der PPAR Familie eine Rolle in der Adipozytendifferenzierung spielt, erfordert weitere Untersuchungen. Mehrere hochspezialisierte Proteine des Fettstoffwechsels, die während der Adipozytendifferenzierung induziert werden wie Adipozyten-Fettsäurebindendes Protein (aP2), Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK), Acyl-CoA-Synthetase (ACS) und LPL weisen PPARE auf, was auf eine Induktion durch PPAR hindeutet (Brun et al., 1997).

Weiterhin können freigesetzte FS PPAR- γ -Rezeptoren aktivieren, die zu einer Hemmung der Transkription des Leptin-Gens führen. Durch den verminderten Leptinspiegel wird im Hypothalamus das Neuropeptid Y ungehemmt produziert und dadurch ein Hungergefühl ausgelöst und die Nahrungsaufnahme gesteigert (Wechsler, 2002).

1.6. PPAR- α

Issman und Green gelang es 1990 erstmalig PPAR- α aus Maushepatozyten zu klonieren (Issemann und Green, 1990). Die Klonierung des humanen PPAR- α Gens erfolgte wenig später (Sher et al., 1993). Das PPAR- α Gen ist aus 8 Exons aufgebaut. Diese kodieren für insgesamt 468 AS (Mukherjee et al., 1994, Personal Communication Bart Steals, unpublished data). Die Funktion des ersten Exons ist nicht bekannt, da es nicht translatiert wird. In Exon 2 befindet sich die Startsequenz für die Transkription, das sogenannte ATG-Signal. Der für die P-Box kodierende Genabschnitt wird von den 15 letzten Basen des dritten sowie den 3 ersten Basen des vierten Exons gebildet. Die Sequenz lautet: cEGckG. Die für die D-Box codierende AS-Sequenz cDRSc befindet sich ebenfalls in Exon 4. Die Ligandenbindungsdomäne (oder E

Domäne) von PPAR- α konnte bisher keinem bestimmten Genabschnitt zugewiesen werden. Sicher befindet sie sich stromabwärts von Exon 4. In Exon 8 liegt das TGA Stoppsignal. Die genomische Struktur vom humanen PPAR- α (Personal Communication Bart Steals, unpublished data) ist im Anhang dieser Arbeit abgedruckt.

Messenger RNA von PPAR- α wird hauptsächlich in Geweben mit hoher Stoffwechselaktivität wie Leber, Niere, Herz und braunem Fettgewebe exprimiert (Schoonjans et al., 1996), was auf eine zentrale Rolle im Stoffwechsel hindeutet.

Natürliche Liganden des PPAR- α sind Eicosanoide, Peroxisomenproliferatoren und langkettige Fettsäuren (Kliwer et al., 1997). Zu den nicht natürlichen Liganden, die mit einer geringeren Affinität gebunden werden, zählen Fibrate und nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID) (Lehman et al., 1997).

Verschiedene Nagetierversuche zeigen, daß PPAR- α eine entscheidende Rolle im hepatischen Lipidmetabolismus spielt (Taels und Auwerx, 1997).

1.6.1. PPAR- α und seine Rolle im Lipidstoffwechsel

Der PPAR- α beeinflusst die Transkription von Genen, die für intra- und extrazelluläre Enzyme und Proteine des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels kodieren. Dadurch kommt PPAR- α eine Schlüsselrolle im intrazellulären Fettstoffwechsel, sowie eine wichtige Regulationsfunktion im extrazellulären Fettstoffwechsel zu.

1.6.2. Extrazelluläre Kandidatengene

PPAR- α vermittelt seine Wirkung durch Bindung an PPRE, die im Promotorbereich der Zielgene lokalisiert sind. Im Folgenden wird eine Übersicht der Enzyme und Proteine gegeben, in deren Genen PPRE gefunden wurden.

Das PPRE im Promoter der LPL führt zu einer Zunahme der Transkription dieses Enzyms (Taels und Auwerx, 1997). Im Plasma kommt es durch Aktivitätssteigerung der LPL nach PPAR- α Aktivierung zu einem gesteigerten Abbau triglyceridreicher Lipoproteine wie CM und VLDL. Dieser Effekt wird noch durch die Tatsache unterstützt, daß die Expression von ApoC-III durch PPAR- α reduziert wird. Somit fällt die hemmende Wirkung dieses Apoproteins auf die LPL-Aktivität und den Abbau der Plasma-TG aus. Dies hat eine verstärkte Hydrolyse von VLDL-Partikeln durch die LPL zur Folge. ApoC-III Spiegel sind, wie in zahlreichen Studien gezeigt, positiv mit der Plasma TG-Konzentration korreliert (Wang et al., 1985; Malmendier et al., 1989; Dammerman et al., 1993). Das legt den Verdacht nahe, daß ein Zusammenhang zwischen steigender ApoC-III Menge und

Hypertriglyceridämie (HTG) besteht (Ito et al., 1990; Maeda et al., 1994; de Silva et al., 1994).

Durch die verstärkte Hydrolyse der triglyceridreichen Lipoproteine kommt es folglich zu einer Vermehrung von FFS im Plasma. Die Aufnahme von FFS in die Leber ist durch die PPAR- α vermittelte Induktion von fettsäurebindenden Transportproteinen gesteigert (s. Abb. 1.3.). Gleichzeitig wird die Synthese und Freisetzung von triglyceridreichen-Partikeln wie VLDL aus der Leber gehemmt (Auwerx et al., 1992).

In den Promotersequenzen der Apolipoproteine ApoA-I- und ApoA-II-Gene sind PPRE gefunden worden. So geht die Aktivierung des PPAR- α beim Menschen mit der gesteigerten Transkription von ApoA-I und ApoA-II einher (Cardot et al., 1993). Bei Nagetieren dagegen erfolgt eine Repression dieser Gene (Staels und Auwerx, 1997). ApoA-I und A-II bilden den Hauptproteinanteil der HDL-Partikel, die ihrerseits eine wichtige Rolle im reverse Cholesterintransport spielen (s.o.). Steigende Produktion an ApoA-I und A-II geht folglich mit proportional höheren HDL-Partikel-Konzentrationen im Plasma einher. Klinisch ist dies von besonderer Relevanz, da eine steigende HDL-Konzentration mit einem abnehmenden Risiko für KHK einhergeht (Schoonjans et al., 1996).

1.6.3. Intrazelluläre Kandidatengene

Durch die Induktion extrazellulärer Enzyme kommt es wie oben beschrieben zu einer Steigerung der FFS im Plasma. PPAR- α führt zur Induktion von Proteinen, die die zelluläre Fettsäureaufnahme und den zellulären FS-Transport stimulieren, wie das aP2 und das Leber-Fettsäure-Bindende Protein (L-FABP). In Nagetieren steigt PPAR- α vermittelt die Fettsäureaufnahme in die Leber durch Aktivierung von Transportproteinen wie dem Fettsäure-Transporter (FAT) an.

Intrazellulär kommt es weiterhin zu einer Steigerung der ACS-Aktivität. Die ACS verestert die freien Fettsäuren zu Acyl-CoA-Verbindungen, womit sie deren Abbau einleitet. Die aktivierten FS werden nun bevorzugt für die β -Oxidation in Mitochondrien und Peroxisomen genutzt. Zusätzlich wird durch die Reduktion der Enzyme Acetyl-CoA-Carboxylase und Fettsäure-Synthetase eine Fettsäure-de-novo Synthese verhindert, wodurch weniger FS für die TG-Synthese zur Verfügung stehen. Als Konsequenz sinkt in der Leber die TG-Synthese und damit die Produktion und Sekretion von VLDL und ApoB.

Zu den peroxisomalen Enzymen mit PPRE zählen die Acyl-CoA Oxidase (ACO) und ein multifunktionelles Enzym, das den zweiten und dritten Schritt der langkettigen Fettsäure β -Oxidation katalysiert. ACO katalysiert die geschwindigkeitbestimmende Reaktion der

peroxisomalen β -Oxidation (Dreyer et al., 1992, Osumi et al., 1991). Bei der 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase konnte bisher kein RE identifiziert werden, obwohl die Transkription des Enzyms ebenfalls von PPAR induziert wird. In Mäusen, in denen das PPAR- α Gen durch homologe Rekombination inaktiviert wurde, bleiben diese Effekte nach Stimulierung mit PPAR-Liganden aus (Lee et al., 1995).

Daneben sind PPRE in Genen von mitochondrialen Enzymen wie denen der Mittelketten-Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) gefunden worden. MCAD ist eines von vier Enzymen, die den ersten Schritt der mitochondrialen β -Oxidation mittelkettiger FS katalysieren. Weiterhin stimuliert PPAR- α die mitochondriale HMG-CoA-Synthase, einem Schlüsselenzym der Ketogenese in der Leber.

Bei Nagetieren sind zwei Elemente X und Z als funktionelle PPRE im Promoter des CYP4A6 Gens identifiziert worden. Das Gen kodiert für die Mikrosomale-Cytochrom p450-Fettsäurew-Hydroxylase. Dieses Enzym bildet decarboxylierte Säuren aus einer Reihe von Substraten, wie FS und Prostaglandinen.

Zu den zytosolischen Proteinen mit PPRE zählen das cytosolic malic enzym (CME). Es liefert bei der Malat-Decarboxylierung NADPH für die Fettsäuresynthese. Weitere Proteine lassen sich PPAR vermittelt durch Peroxisomen-Proliferatoren induzieren, obwohl bisher kein RE identifiziert werden konnte. Zu diesen gehören Palmitoyl-CoA Hydrolase, das Fettsäure-Transport-Protein (FATP) und das Acyl-CoA-Bindende-Protein (ACBP). Zusätzlich sind zwei Elemente PCK1 und PCK2 in der regulatorischen Region des PEPCK-Gens beschrieben worden, die PPAR- α /RXR Komplexe binden. Hauptsächlich üben sie eine Funktion in der Gluco- und Glyceroneogenese aus (Schoonjans, Steals und Auwerx, Review 1996, Taels et al., 1997).

Abbildung 1.3 zeigt eine Übersicht der von PPAR- α beeinflussten Enzyme mit ihren Funktionen im Lipidstoffwechsel.

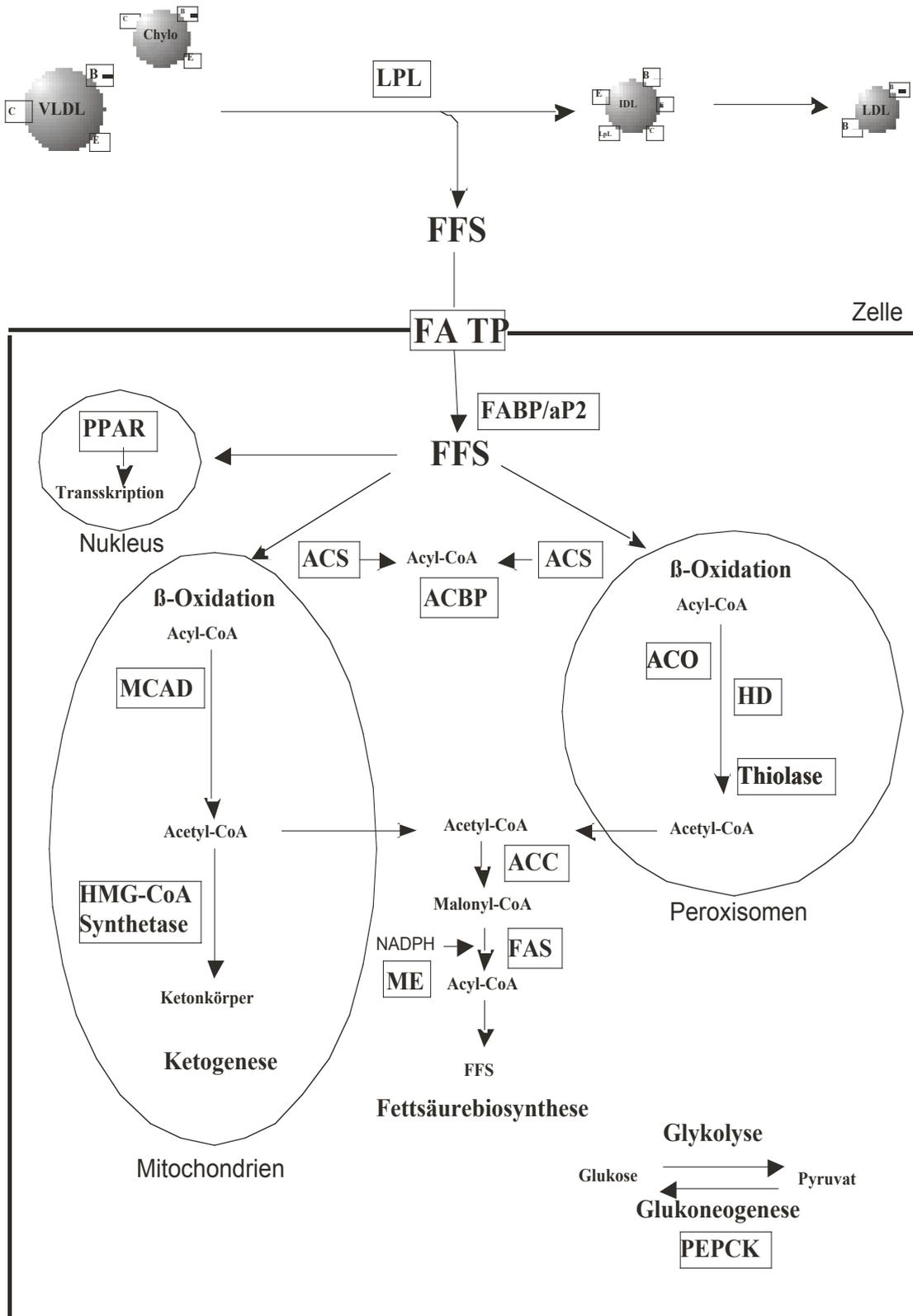


Abbildung 1.3.: Zusammenfassung der Gene, die durch PPAR reguliert werden und ihre Rolle im intra- und extrazellulären Lipidstoffwechsel. Abkürzungen werden im Text erklärt. Mit Veränderungen aus : K. Schoonjans et al. / Biochemica et Biophysica acta 1302 (1996, 93-109)

Der PPAR- α -vermittelte Einfluß auf verschiedene Gene im Lipidstoffwechsel läßt sich zusammenfassend beschreiben:

Es kommt zu einer gesteigerten Hydrolyse von TG, Stimulation der zellulären Fettsäureaufnahme, Umwandlung in Acyl-Derivate und Stimulation der β -Oxidation. Die Reduktion der FS-, TG- und VLDL-Produktion in der Leber führt folglich zu einer verringerten Plasma-TG-Konzentration.

Mit den weiter oben beschriebenen Veränderungen im HDL-Stoffwechsel führt dies zu einem hypolipidämischen Effekt und damit zu einem weniger atherogenen Lipoproteinprofil.

1.6.4. Fibrate und ihre Wirkung auf den Lipidstoffwechsel:

Aufgrund ihres TG senkenden Effektes werden Fibrate seit Jahrzehnten in der Therapie der HTG eingesetzt. Fibrate verändern das Lipoproteinmuster je nach Grunderkrankung unterschiedlich. Bei Patienten mit reiner HTG konnte eine Abnahme der TG zwischen 30% und 60 % erzielt werden, während das LDL-Cholesterin leicht und HDL zwischen 10% und 30 % anstieg (Simpson et al., 1990). Dieser TG senkende Effekt verringert aus pathophysiologischer Sicht das Risiko für eine Atherosklerose.

Die Wirkung der Fibrate wurde in vielen Studien beschrieben (Auwerx et al., 1996; Simpson et al., 1990; Chapman et al., 1996; Patch et al., 1994). Mit der Entdeckung von PPAR- α und seinen REs, erschloß sich den Forschern der molekulare Mechanismus mit dessen Hilfe man sich die oben beschriebenen PPAR- α -vermittelten Effekte der Fibrate erklären kann.

Durch Fibrate aktiviert lagert sich PPAR- α an PPRE im Promoter der LPL an, so daß dieses Enzym verstärkt transkribiert wird (Taels und Auwerx, 1997). Dadurch können im Plasma die triglyceridreichen Lipoproteine besser hydrolysiert werden. Dieser Effekt wird noch durch die Tatsache unterstützt, daß Fibrate über PPAR- α die Expression von ApoC-III herunter regulieren und somit der hemmende Einfluß dieses Apoproteins auf die Hydrolyse durch die LPL sowie auf die Remnantclearance wegfällt. Gleichzeitig wird die Plasma HDL-Fraktion erhöht.

Da sich auch im Gen von FABP und ACS ein PPRE befindet, kann die Zelle, die durch die gesteigerte Aktivität der LPL vermehrt angebotenen FS im Zytosol über FABP binden.

Die aufgenommenen FS werden durch ACS aktiviert und dann der β -Oxidation zugeführt.

Fibrate aktivieren nun die Gene der in die β -Oxidation involvierten peroxisomalen und mitochondrialen Enzyme. Folglich kommt es zu einem verstärkten Abbau der FS in der β -Oxidation. Dies sind die wichtigsten Mechanismen, über die Fibrate die TG senken.

1.6.5. Bekannte PPAR-_α Mutationen

Eine der bisher beschriebenen Mutationen des PPAR-_α ist der Polymorphismus L162V in Exon 5. Bei dem Polymorphismus L162V handelt es sich um eine Variante des PPAR-_α bei der ein Basenaustausch an Position 115 im Exonbereich 5 in 3' Richtung an gezählt vorliegt. Das beim Wildtypen vorliegende Cytosin-Nukleotid wird gegen ein Guanosin ausgetauscht. Der Basenaustausch findet an Position 1 eines Basentriplets statt, und führt deshalb zu einem Aminosäureaustausch in Codon 162. Die Aminosäure Leucin wird durch Valin ersetzt. Ob die Variante des PPAR-_α Veränderungen im Lipoprotein-Lipid-Profil bewirkt, zur Entwicklung eines Typ-II-Diabetes mellitus beisteuert oder mit der Adipositas assoziiert ist, wurde in mehreren Studien untersucht (Evans 2001, Vohl 2000 und Flavell 2000). Evans konnte 2001 einen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus L162V und reduzierten BMI bei Patienten mit nicht-Insulinpflichtigem Diabetes mellitus aufzeigen (Evans 2001). Vohl untersuchte die Assoziation zwischen dem Polymorphismus L162V und dem Auftreten einer Hyperapobetalipoproteinämie und eines Typ-II-Diabetes mellitus bei französischen Canadianern. Eine weitere beschriebene Punktmutation des PPAR-_α ist der Polymorphismus R131Q (Sapone 2000). Das beim Wildtypen vorliegende Guanosin-Nukleotid wird gegen ein Adenosin ausgetauscht. Der Basenaustausch findet an Position 2 eines Basentriplets statt, und führt deshalb zu einem Aminosäureaustausch in Codon 131. Die Aminosäure Arginin wird durch Glutamin ersetzt.

1.7. Ziel der Arbeit

Betrachtet man die zentrale Rolle des PPAR- α im Lipidstoffwechsel, so kann man erwarten, daß Mutationen im PPAR- α -Gen zu veränderter Struktur und Funktion des PPAR- α führen und dadurch die Lipidkonstellationen der Merkmalsträger beeinflussen. Weiterhin stellt sich die Frage, inwieweit strukturelle Veränderungen im PPAR- α zu einem verminderten Ansprechen auf PPAR- α Liganden, wie Fibrate (siehe Einleitung) führen könnten. Um dieser Frage nachzugehen sollen im ersten Teil der Arbeit Exon 3 und 8 des PPAR- α Gens auf Mutationen untersucht werden. Exon 2 und 5 waren bereits in einer Arbeit unseres Labors untersucht worden. Die zu analysierende DNS stammte von einem Patientenkollektiv, das aufgrund pathologisch erhöhter Lipidwerte zusammengestellt wurde. Das HLP-Kollektiv wurde mit Fibraten behandelt. Ziel dieser Untersuchungen war festzustellen, ob Veränderungen im Gen von PPAR- α dieser Patienten als mögliche Erklärung für ihre HTG dienen könnte, und inwiefern eine Mutation im PPAR- α Gen möglicherweise ein „Nicht-Ansprechen“ auf Fibrate einiger Patienten des Kollektivs erklären könnte.

Bei der Adipositas permagna handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung. Dem Erscheinungsbild der Adipositas permagna liegen, nach heutigem Wissenstand, komplexe genetische Ursachen zugrunde. Da Übergewicht in einem engen Zusammenhang mit der Adipozytendifferenzierung steht, werden Gene die hierbei eine Rolle spielen, mit besonderem Interesse betrachtet. Das PPAR-Gen ist ein solcher Kandidat, ebenso die Gene verschiedener spezialisierter Proteine, die durch PPAR- α induziert werden. Das Ziel im zweiten Teil der Arbeit war es Exon 5 des PPAR- α Gens eines Adipositas permagna-Kollektivs auf Mutationen zu untersuchen. Dabei sollte der Frage nachgegangen werden, ob der bekannte Polymorphismus L162V in Exon 5 mit der gleichen Häufigkeit in der Allelfrequenz im Adipositas permagna Kollektiv nachzuweisen ist, wie sie von einer Arbeitsgruppe unseres Labors für ein HTG- bzw. ein gesundes Vergleichskollektiv beschrieben wurde. Es sollte weiterhin geklärt werden, ob die Variante des PPAR- α mit Veränderungen im Lipoprotein-Lipid-Profil einhergeht und zur Entwicklung eines Typ II-Diabetes beisteuert. Zur Vervollständigung der Genuntersuchung wurde das Exon 2 des gleichen Kollektivs auf Mutationen untersucht.

2. Material & Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Alle Materialien wurden in p.A./a. Qualität verwendet.

A. Blutentnahme: S-Monovette KE (Sarstedt), Kanülen

B. DNS-Isolierung:

Stammlösungen:

- Tris HCL	1 M, pH 7,4	121 g Tris in 900 ml H ₂ O dest. aufgelöst, pH mit HCL einstellen, auf 1000 ml auffüllen.
- Tris HCL	1 M, pH 8,2	121 g Tris in 900 ml H ₂ O dest. aufgelöst, pH mit HCL einstellen, auf 1000 ml auffüllen.
- Na ₂ EDTA	0,5 M	18,6 g EDTA plus 90 ml H ₂ O dest. unter Erhitzen und Magnetrührer aufklaren lassen und auf 100 ml auffüllen.
- NaCl	5 M	293 g in 1l H ₂ O dest. auflösen.
- NaCl	6 M	349 g in 1l H ₂ O dest. auflösen.
-SDS 10%		10 g SDS in 100 ml H ₂ O dest. auflösen.

STE Waschpuffer:	Tris-HCL	1 M, pH 7,4	20 ml
	NaCl	5 M	1 ml
	EDTA	0,5 M	200µl
	H ₂ O dest.		ad 1l
Lyse Puffer:	Tris HCL	1 M, pH 8,2	1 ml
	NaCl	5 M	8 ml
	EDTA	0,5 M	400 µl
	H ₂ O dest.		ad 100 ml
TE Puffer:	Tris HCL	1 M, pH 7,4	1 ml
	EDTA	0,5 M	40 µl
	H ₂ O dest.		ad 100 ml

STE Waschpuffer, Lyse Puffer und TE Puffer werden filtriert und autoklaviert.

Proteinase K: 100 mg Proteinase K (Boehringer Mannheim)
 10 ml SDS 10% (Merck)
 20 ml EDTA 0,5 M (Sigma)
 70 ml H₂O dest

Proteinase K wird weder filtriert noch autoklaviert.

- NaCl 6 M (Merck)

C. PCR:

- 10 x Reaktionspuffer (1,0 ml Tris-HCl, 500 mM KCl) von Boehringer Mannheim- mit Magnesiumchlorid (1,5 mM) pH 8,3 bei 20 Grad Celsius.
- Taq DNS-Polymerase (Boehringer Mannheim, 1 Unit/ μ l)
- 10 mM dNTP (jeweils dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Mineralöl (Sigma)
- Primer (EUROGENTEC) Angaben siehe Tabelle 2.6
- Reaktionsgefäße 0,5 ml safe ware (Eppendorf)

D. PCR Aufreinigung:

- QIAquick, PCR Purifikation Kit (250) (Qiagene)
- Ethanol-fällung: 3 M Na-Acetat (Merck), pH 4,6, Ethanol (absolut) (Merck)

E. Elektrophorese

- Laufpuffer: 1 x Tris-borate (TBE)(Gibco) : 0,09 M Tris-borate (Merck):0,002 M EDTA
- Größenmarker: 1kb DNS Leiter (1 ug / μ l) (Gibco)
- Loading Buffer: 1 x TBE, 40% Glycerol (Merck), Bromophenol Blau (Merck)
- SSCP Gelelektrophorese:
 - 11% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) (Appligene)
 - 10% Glycerol
 - 1% Ammoniumpersulfat (Serva)
 - 0,4 TEMED (Serva)
 - 1 x TBE

Von dieser Grundzusammensetzung mußte bei der SSCP Analyse eines Genabschnitts abgewichen werden. Die entsprechenden Modifikationen sind im Ergebnisteil, Punkt 3.2.1. aufgelistet.

- SSCP Mix: 300 µl H₂O dest.
 - 100 µl 10 x TBE
 - 500 µl Harnstoff (Merck)
 - Bromophenol Blau (Merck)

F. Gelrocknung: Promega

G. Färbungen

- Silberfärbung: Essigsäure
 - AgNO₃ (Roth)
 - 37% Formaldehyd (Sigma)
 - Na₂CO₃ wasserfrei (Merck)
- Ethidiumbromidfärbung: 10 mg/ml Ethidiumbromid (Sigma)

2.1.2. Geräte

- Netzgeräte von Biorad, Biometra, LKB Bromma
- Zentrifugen: Hettich (DNS Isolierung), Heraeus Biofuge fresco (benutzt für die Eppendorf Reaktionsgefäße)
- PCR Gerät: Biometra Trio Thermoblock
- Sequenzierungsgerät: 310 Applied Biosystems

2.1.3. Patientengut

A. Kollektiv der HTG-Patienten

Die untersuchte DNS stammte von Patienten, die Teilnehmer einer Studie über Hypertriglyceridämie der Poliklinik für Innere Medizin des Universitäts-Krankenhauses Eppendorf in Hamburg waren. Es wurden sowohl weibliche als auch männliche Patienten in die Studie aufgenommen. Voraussetzung für die Teilnahme war das Vorliegen einer reinen HTG oder einer gemischten Hyperlipoproteinämie (HLP). In unserem Labor wurde eine HTG bzw. eine HLP wie folgt definiert:

HTG: Triglyceride (nüchtern):	> 150 mg/dl
Gesamtcholesterin:	< 200 mg/dl

HLP: Triglyceride (nüchtern): > 150 mg/dl

Gesamtcholesterin: > 200 mg/dl

Von der Studie ausgeschlossen waren Patienten mit einer bekannten endokrinen Störung, wie z.B. Funktionsstörungen der Schilddrüse, weiterhin Patienten mit chronischem Alkoholabusus und regelmäßiger Einnahme von Hormonpräparaten. Das Vorliegen eines Diabetes mellitus war kein Ausschlußkriterium.

Im Rahmen der Studie führten die Patienten einen OFTT (**o**raler **F**ett **T**oleranz**t**est) durch. Dabei mußten sie in nüchternem Zustand einen Fetttrunk zu sich nehmen. Der Fetttrunk bestand aus: 205g Schlagsahne, 48g Magermilchpulver und 24g Zucker entsprechend einer Menge von 65,5g Fett, 21,5g Eiweiß und 56,2 Kohlenhydraten. Es wurden im Nüchternzustand sowie eine und fünf Stunden nach der Fettbelastung im Blut folgende Parameter bestimmt:

Nüchtern	TG, Chol gesamt, HDL, Apo B, Apo AI, Apo CII und CIII, Lp(a), Apo E Masse, Glucose, HbA1 und HbA1c, C-Peptid, Fibrinogen
1. Stunde nach Belastung	TG, Chol gesamt, HDL, Insulin
5. Stunden nach Belastung	TG, Chol gesamt, HDL, Apo E Masse, LPL Aktivität

Tabelle 2.1.: Untersuchte Serumparameter der Studienteilnehmer

Der OFTT dient der Beurteilung der postprandialen Lipidwerte. Diese können bei einer eingeschränkten Lipidclearance erheblich erhöht sein, während der Nüchternwert hingegen keine Auffälligkeiten zeigt.

Nach Einhalten einer vierwöchigen fettarmen Diät wurden der OFTT sowie die Blutentnahmen bei diesen Patienten wie beschrieben wiederholt. Anschließend nahmen die Patienten für weitere vier Wochen jeweils abends Fenofibrat 200 mg ein. Nach dieser medikamentösen Behandlung wurde der OFTT mit Blutentnahmen ein drittes Mal durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 44 Patienten der Studie analysiert. Tabelle 3.1. zeigt die Lipidwerte dieser Patienten zum Zeitpunkt des Eintritts in die Studie.

B. Kollektiv der Adipositas permagna Patienten

Es wurde die DNS von 72 Patienten mit Adipositas permagna untersucht. Zur Gewichtsabnahme unterzogen sie sich einer Magenrestriktionsoperation im Evangelischen und Johanniter Klinikum Dinslaken (s. Einleitung).

In schweren Fällen führen konservative Methoden selten eine zufriedenstellende Gewichtsreduktion herbei. Erfolgsversprechender werden bei diesen Personen bauchchirurgische Operationen durchgeführt. Zur Zeit erzielen folgende Methoden die besten Ergebnisse:

1. Silastic Ring Vertical Gastroplasty nach Eckhout
2. Gastric Banding nach Kuzmak
3. Bilio-pankreatischer Bypass nach Scopinaro.

Bei der OP nach Eckhout (Eckhout et al., 1986/89) wird durch eine Klammernahtreihe vertikal an der kleinen Magenkurvatur mit einem Silikonring als untere Begrenzung eine Magensegmentation durchgeführt. Ähnlich verläuft die OP nach Kuzmak (Kuzmak et al., 1989/91). Hier wird im Gegensatz zur vorherigen OP ein horizontales Magenbanding am Mageneingang durchgeführt. In beiden Fällen entsteht ein kleiner Vormagen, Pouch genannt, der ein Volumen von 20 bis 30 ml haben sollte. Der Übergang vom Vormagen zum Magen beträgt 1,0 bis 1,2 cm. Bei der OP nach Scopinaro (Scopinaro et al., 1998) wird eine 2/3-Magensegmentation durchgeführt. Bei ca. 300cm oralwärts der Ileocaekalklappe wird der Dünndarm durchtrennt, der aborale Anteil des Dünndarms wird mit dem Magen anastomosiert. Der orale Anteil (Pankreassekret und Galle) wird 50 cm vor der Ileocaekalklappe anastomosiert. Bei diesem Verfahren gelangen die Verdauungsenzyme relativ spät zur Nahrung. So kommt es als Nebeneffekt zur Malabsorption. Es wird bei besonders ausgeprägter Adipositas permagna (BMI > 50) angewandt (55% der Pat. konnten mit dieser Methode ihr Übergewicht in durchschnittlich sieben Monaten halbieren (Wolf et al., 1998). Tabelle 3.1. stellt einige Blutwerte der Adipositas permagna Patienten zusammen.

2.2. Methoden

2.2.1. Isolierung genomischer DNS (nach Miller SA. 1988)

Das vom Patienten gewonnene Vollblut wird bei 4° C und 2500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Man trennt so das Serum von den Erythrozyten. Zwischen diesen beiden Phasen befindet sich eine dünne Schicht, die aus Thrombozyten und Leukozyten besteht. Sie wird Buffy Coat genannt. Aus den Leukozyten gewinnt man später die genomische DNS. Der Buffy Coat wird großzügig mit abpipettiert (ca. 1-2 ml). Er sollte bei minus 20° C für ≥ 1 Stunde eingefroren werden. Der aufgetaute Buffy Coat wird nun mit 14 ml STE Puffer vermengt und für 15 Minuten bei 4° C, 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand vorsichtig entfernt. Das Pellet, das sich am Boden des Röhrchens abgesetzt hat, wird nochmals mit 14 ml STE Puffer gewaschen, durch vorsichtiges Aneinanderschlagen der Röhrchen gelöst und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Danach wird der Überstand abpipettiert. Anschließend wird das Pellet zur Zerstörung des Leukozytenzellkerns und daraus resultierender DNS Freisetzung mit 3 ml Lyse Puffer, 1 ml Proteinase K Lösung und 200 μ l SDS 10% über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag werden 3,4 ml Lyse Puffer und 2,3 ml NaCl 6 M hinzugefügt, gut geschwenkt um die restlichen Proteine auszufällen und für 20 Minuten bei 4° C und 3000 rpm zentrifugiert. Danach wird der Überstand vorsichtig in 30 ml absolutem Ethanol gegossen. Nun wird das Reagenzglas geschwenkt. Es fällt die DNS als weiße, fädige Struktur aus. Diese kann durch sterile Pasteurpipetten aufgenommen, in 70% Ethanol gewaschen und in ca. 1000 μ l TE auf dem Rollschüttler bei 37°C für 48 Stunden gelöst werden. Anschließend kann die DNS bei 4° C gelagert werden. Vor Entnahme von DNS sollte das Gefäß kurz bewegt werden, da die DNS bei Lagerung mit der Zeit absinkt.

2.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR kann man definierte DNS Sequenzen in vitro vervielfältigen. Als Ausgangsmaterial kann sowohl die gesamte genomische DNS als auch eine cDNS dienen. Das Prinzip der PCR beruht darauf, daß man das zur Vervielfältigung ausgewählte DNS Stück (das „template“) durch zwei zu beiden Enden dieser Sequenz komplementären Oligonukleotidprimer eingrenzt und es anschließend durch eine hitzestabile DNS Polymerase in einer Kettenreaktion amplifiziert.

Als Voraussetzung für die Amplifikation muß die Basensequenz der template DNS bekannt sein. Dadurch kann man zwei 15-20 Basen lange Primer konstruieren, die jeweils dem 3‘

Ende des codogenen und nicht codogenen Strang komplementär sind und zwischen denen der zu vervielfältigende Genabschnitt liegt. Je komplexer die vorliegende DNS ist aus der ein bestimmter Abschnitt amplifiziert werden soll, desto länger müssen die Primer sein. Dadurch wird gewährleistet, daß der Primer mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nur an der vorgesehenen Sequenz bindet, da keine zweite Sequenz des Genoms ausreichend komplementär für eine Bindung ist. Damit die Primer sich an die DNS anlagern können, müssen die Stränge vorher denaturiert werden. Man erreicht dies durch Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 93-95°C. Während der folgenden Abkühlung lagern sich die Primer der DNS an. Diesen Vorgang nennt man „annealing“. Je geringer die annealing Temperatur ist, desto geringer ist die Spezifität der Primeranlagerung und desto höher ist folglich die Gefahr eines Primer/Template „mismatches“ und damit verbundener Amplifizierung eines falschen DNS Stücks (Watson et al., 1993). Nach der annealing Phase wird das Reaktionsgemisch für eine Minute auf 70-75°C erhitzt. In diesem Bereich besitzt die Taq Polymerase, die dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus* entstammt, ihr Aktivitätsoptimum. Nach Synthese der komplementären DNS Stücke samt Primersequenzen wird die Temperatur zur Denaturierung wieder angehoben und ein neuer Replikationszyklus beginnt. Läßt man diesen Vorgang 30 Zyklen durchlaufen, so erhält man am Ende ca. 10^5 Kopien der DNS Zielsequenz. Der Ablauf der Zyklen wird automatisch von einem elektronischen PCR Gerät gesteuert an dem man Temperatur, Dauer und Anzahl der Zyklen programmieren kann.

Ein Nachteil der PCR besteht darin, daß die Taq Polymerase keine 3'→5' Exonuclease Aktivität besitzt. Dadurch können fehlerhaft eingebaute Basen nicht durch komplementäre ersetzt werden. Die Fehlerrate beträgt in etwa 1 falsch eingebautes Nucleotid auf 2×10^4 synthetisierte Nucleotide. Tritt diese Mutation früh in der Amplifikationsphase ein, so wird sich der Fehler auf alle folgende Zyklen übertragen.

Durchführung:

Der PCR Ansatz wurde analog folgendem Schema in ein Reaktionsgefäß pipettiert.

Reagenz	Volumen in μl
autoklaviertes H ₂ O	12,2
DMSO	2
PCR Puffer, 10 x Konz.	2
10mM dNTP (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	1
Forward Primer 10 pmol / μl	0,8
Reverse Primer 10 pmol / μl	0,8
Taq DNS Polymerase 1U / μl	0,2
Genomische DNS	1
Endvolumen	20

Tabelle 2.2.: PCR-Ansatz

Anschließend wurde jede PCR Probe mit ca. 30-50 μl Mineralöl überschichtet, um Temperaturverzüge und Kondensation zu vermeiden. Es wurde mit jedem PCR Ansatz eine Negativkontrolle zur Erkennung von Verunreinigungen mitgeführt. In diese wurde statt 1 μl genomische DNS 1 μl autoklaviertes Wasser pipettiert. Das PCR Gerät wurde bezüglich der Zyklen wie folgt eingestellt:

1.Zyklus:	Denaturierung:	5 Minuten bei 95
	Annealing:	1 Minute bei 50°C
	Elongation:	1 Minute bei 72°C
33 Zyklen:	Denaturierung	1 Minute bei 95°C
	Annealing:	1 Minute bei 50°C
	Elongation:	1 Minute bei 72°C
1 Zyklus:	Denaturierung :	1 Minute bei 95°C
	Annealing:	1 Minute bei 50°C
	Elongation:	10 Minuten bei 72°C

Tabelle 2.3.: Zusammenfassung der PCR-Zyklen

Anschließend kühlt das PCR Produkt auf Raumtemperatur ab und kann für die weitere Analyse benutzt werden.

Es wurden in dieser Arbeit 4 Exons des PPAR-_α-Gens untersucht (siehe oben). Ihre Lage innerhalb des Gesamtgens ist in Abbildung 3.1. (s. Ergebnisteil) dargestellt. Tabelle 2.4. gibt Auskunft über die Sequenz der jeweiligen Forward und Reverse Primer mit denen die 6 Abschnitte amplifiziert wurden.

Primer	Primersequenz	Konzentration
Forward Primer 2	5'gtccattcaagctgctataa3'	10 pmol / <u> </u> l
Reverse Primer 2	5'-tagtgatccttcgagcact-3'	10 pmol / <u> </u> l
Forward Primer 3B	5'-TCGGCGGCACAACCAGCA -3'	10 pmol / <u> </u> l
Reverse Primer 3B	5'-GTCATCACGGgtaagtgtgccg -3'	10 pmol / <u> </u> l
Forward Primer 5	5'-tagatccactgtgtattacc-3'	10 pmol / <u> </u> l
Reverse Primer 5	5'-aggtggccctgcacatttc-3'	10 pmol / <u> </u> l
Forward Primer 8A	5'-nacctctctctcttttcg-3'	10 pmol / <u> </u> l
Reverse Primer 8A	5'-atcatcaagaagacggagt-3'	10 pmol / <u> </u> l
Forward Primer 8B	5'-CTGGTGACGGAGCATGCGCA-3	10 pmol / <u> </u> l
Reverse Primer 8B	5'-TTGGACAGTCTGAGCTGTAG-3	10 pmol / <u> </u> l
Forward Primer 8C	5'-CAGGAGTTCTGAAGCTGACA-3	10 pmol / <u> </u> l
Reverse Primer 8C	5'-CTAATCTCAGGACTGGGAAG- 3	10 pmol / <u> </u> l

Tabelle 2.4.: Primersequenzen mit Basenfolge und Konzentration

2.2.3. Aufreinigung des PCR Produktes durch QIA Quick PCR Purifikation

Kit zur Vorbereitung der Sequenzierung:

Die Aufreinigung beruht auf der Kombination der „Kikrosäulen Technologie“ mit der selektiven Bindungsmöglichkeit einer speziell entwickelten Silicagel-Membran. Durch die genau abgestimmten Puffer kann die Wiedergewinnung der DNS gewährleistet werden, während unerwünschte Substanzen wie Primer, Salze, Enzyme, Mineralöl oder Detergenzien durch Zentrifugation und Waschung entfernt werden. Die Adsorption der DNS an die Membran wird durch eine hohe Salzkonzentration gefördert und ist außerdem pH abhängig (pH sollte kleiner als 7,05 sein).

Die Elution der DNS ist ebenfalls stark von der Salzkonzentration und dem pH des Puffers abhängig. Im Gegensatz zur Adsorption ist die Elution bei einer niedrigen Salzkonzentration

am effektivsten. Die DNS wird durch 30-50µl 10mM Tris HCL, pH 8,5, TE (10mM Tris HCL, 1mM EDTA, pH 8,0) oder Wasser von der Membran abgelöst.

Durch diese Verfahren können PCR Produkte mit einer Länge zwischen 100 bp und 10 kb aufgereinigt werden. Diese Reinigung wurde vor jeder Sequenzierung durchgeführt um störenden Primerreste und nicht eingebaute d`NTPs zu entfernen.

Durchführung:

Zu dem PCR Produkt wird das 5 fache Volumen PB-Puffer zupipettiert, gevortext, auf die Säule gegeben und zentrifugiert (1 Minute, 13000rpm). Der PB Puffer erlaubt eine effektive Bindung von ss oder ds DNS von 100 bp- 10 Kb und eine Beseitigung der Primer (siehe oben). Der Unterstand wird verworfen, auf die Säule wird 750µl PE Puffer gegeben, der Ethanol enthält, und somit Salz auswaschen kann. Bei gleichen Bedingungen wird erneut zentrifugiert und anschließend der Unterstand verworfen. Das Reaktionsgefäß mit Säule wird nochmals kurz anzentrifugiert um Restpuffersubstanzen abzutrennen. Für die Elution wird die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Sie erfolgt mit 30-50 µl H₂O durch Zentrifugation.

2.2.4. DNS Konzentrationsmessung

Die Konzentrationsbestimmung der DNS erfolgt mittels photometrischer Messung, wobei die Absorption von DNS bei 260 nm am höchsten ist. Die Proben werden zur Messung um den Faktor 25 verdünnt. Die Berechnung der Konzentration setzt sich zusammen aus:

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

Dabei entspricht 50 dem Faktor der optischen Dichte bei 260 nm. Bei einer Wellenlänge von 280 nm ist die Absorption von unspezifischen Proteinen am höchsten. Durch die Bildung des Faktors der beiden Extinktionen kann die Reinheit der DNS errechnet werden. Der optimal Faktor liegt bei 1,8. Die Konzentrationsangabe der DNS wird bei PCR Produkten für die Sequenzierungsreaktion benötigt.

2.2.5. Ethidiumbromidfärbung

Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenanthrindiumbromid) ist ein fluoreszierender Farbstoff. Er gehört zu den sequenzunspezifischen DNS bindenden Substanzen, die während des elektrophoretischen Laufes zwischen den einzelnen Basenpaaren einer doppelsträngigen α -Helix Struktur des DNS Moleküls interkalieren. Mit Hilfe von Ethidiumbromid kann man DNS, die in einem Gel liegt, auf einer UV Platte sichtbar machen. Wir benutzten diese Färbung, um den Erfolg der PCR zu kontrollieren. Zur Färbung wurden die Gele nach der

Elektrophorese für 5 Minuten in ein Ethidiumbromid/TBE Bad niedriger Konzentration gelegt. Anschließend wurden sie auf einem UV Tisch bei 254-300 nm Wellenlänge bestrahlt.

2.2.6. SSCP Analyse auf Polyacrylamidgelen

Der Name SSCP steht für „single stranded conformation polymorphism“. Mit Hilfe dieser Methode kann man verschiedene Arten von Mutationen erkennen, zum Beispiel die Substitution einzelner Basen oder die Deletion von Gensequenzen (Sheffield et al., 1993). Das Prinzip der Analyse beruht auf der Tatsache, daß einzelstrangige DNS je nach Konformation und Ladung verschieden schnell auf Polyacrylamidgelen (PAA) im elektrophoretischen Feld läuft (Hayashi et al., 1991). Konformation und Ladung sind wiederum von der entsprechenden Basensequenz des Einzelstranges abhängig. Dadurch können Mutationen und Wildtypen verschiedene Bandenmuster auf den SSCP-Gelen erzeugen. Die Genauigkeit, mit der man mittels der SSCP Technik Genveränderungen erkennen kann, hängt von verschiedenen äußeren Einflüssen sowie von der Gelzusammensetzung und der Einstellung des Elektrophoresegerätes ab. Der Einfluß dieser Faktoren auf die Sensitivität der Methode wird in „Teil 4: Diskussion“ besprochen.

Durchführung:

A. Herstellung des PAA-Gels:

In den Spalt zwischen zwei zusammengepreßten Glasplatten, die an drei Seiten durch eine Gummidichtung verschlossen sind, werden folgende vorher in einem Kolben zusammenpipettierten Chemikalien gegossen:

Chemikalie	dest. H ₂ O	10 x TBE	Glycerol	PAA 40%	TEMED	AMP
Volumen	4,13 ml	0,75 ml	0,75 ml	1,88 ml	15 µl	100 µl

Nachdem die Stoffe nach ca. 10 Minuten durchpolymerisiert sind, werden die Glasplatten (ohne Gummidichtung) mit dem dazwischen liegenden 10%igen PAA-Gel (Acrylamid-/Bisacrylamid Lösung) in die Elektrophoresekammer gestellt. TBE Puffer wird entsprechend hinzugefügt.

Die für die Analyse vorgesehenen Proben werden mit einem SSCP Mix 1:10 verdünnt (2 µl PCR Produkt:18 µl SSCP Mix). Der SSCP Mix enthält Harnstoff (s.o.), der dazu dient, die DNS Stränge getrennt zu halten. Das Gemisch wird für 5 Minuten auf 96°C zur Denaturierung erhitzt und anschließend direkt in Eiswasser abgekühlt. Es wird nun je 4 µl pro

Probe auf das Gel aufgetragen. Jedes Gel mit Glycerol hat eine Laufzeit von sechs Stunden bei konstanten vier Watt. Das Gel ohne Glycerol hat eine Laufzeit von vier Stunden bei konstanten vier Watt.

2.2.7. Silberfärbung:

Nach der Elektrophorese wurden die Proben mit Hilfe einer Silberfärbung dargestellt. Polyacrylamid ist inert gegen diese Reaktion, so daß nur die DNS gefärbt wird. Die Reaktion kann mit einem 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. Das latente Bild wird durch die Reduktion der an den Nukleinsäuremolekülen komplexierten Silberionen hervorgerufen. Zeitlicher Ablauf dieser Reaktion sowie verwendete Chemikalien waren wie folgt:

Schritte	Dauer und Chemikalien
1. Fixierung	in 10% Essigsäurebad, 20 min.
2. Waschen	Eiswasser, 3 mal 2 min
3. Impregnate	in Lsg. aus: 100ml H ₂ O, 2ml AgNO ₃ , 150µl Formaldehyd
4. Waschen	Eiswasser, 1 mal 4 min.
5. Entwicklung (abgedunkelt)	in Lsg. aus: 140ml H ₂ O, 60ml Na ₂ CO ₃ , 60µl Na ₂ S ₂ O ₃ H ₂ O (5mg/l), 300µl Formaldehyd. Mit 1/3 der Lsg. Gel abspülen, restl. 2/3 zur Entwicklung verwenden.
6. Stop	10% Essigsäure bis sich keine Blasen mehr bilden
7. Fixierung	Methanol 10%, Glycerol 3%, bis zur Trocknung der Gele

Tabelle 2.5.: Darstellung der Schritte einer SSCP-Analyse

2.2.8. Sequenzreaktion:

Die PCR Proben wurden mit Hilfe des QIA Quick PCR Purification Kits aufgereinigt (s.o.) und anschließend mit Hilfe der Didesoxy-Methode nach Sanger sequenziert. Dabei handelt es sich um eine Direktsequenzierung der PCR-Produkte, die dazu dient, einzelne Basen in einem DNA-Abschnitt zu charakterisieren. Die DNA liegt als einzelsträngige Matrize vor. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase wird nach Bindung komplementärer Primer ein neuer DNA-Strang gebildet. Der Reaktionsansatz enthält zusätzlich zu den normalen Nukleotidbausteinen basenspezifische Didesoxynukleotide (ddNTPs), die sich durch das Fehlen der 3'-

Hydroxylgruppe von diesen unterscheiden. Dadurch bleibt eine Phosphordiesterbindung zu dem folgenden Nukleotid aus, wodurch ein Kettenabbruch erfolgt. Die Konzentration der ddNTPs-Analogons im Reaktionsansatz ist geringer als die der dNTPs, wodurch es statistisch verteilt an einer der vielen Positionen zu einem partiellen, zufälligen Abbruch der DNA-Synthese kommt, so dass für jede einzelsträngige DNA-Matrize eine Ansammlung von verschieden großen DNA-Fragmenten entsteht. Durch den Primer festgelegt, besitzen sie übereinstimmende 5'-Enden und variable 3'-Enden, durch das jeweilige ddNTP festgelegt. Die Längen der Fragmente können sich nur durch ein einziges Nucleotid unterscheiden. Diese lassen sich in einer hochauflösenden denaturierenden PAA-Matrix auftrennen. Die Nukleotidabfolge wird bestimmt indem durch eine Laserdiode des Sequenzierautomaten die fluoreszenzmarkierten ddNTPs abgelesen und mit der dazugehörigen Fragmentlänge in Beziehung gebracht werden.

Durchführung:

Es können für die Sequenzierung sowohl die gleichen Primer wie für die PCR, als auch Primer, die zwischen diesen Bindungssequenzen liegen, verwendet werden. Die Sequenzierung wird jeweils in eine „vorwärts“ (5' _ 3') –Richtung und in eine „rückwärts“ (3' _ 5') –Richtung durchgeführt. Nachdem die Aufreinigung des PCR-Produkts mit dem Quick Purifikation Kit erfolgt ist, wird die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt und ggf. auf eine Konzentration von etwa 30 ng/_l verdünnt. Der Sequenzierungsansatz und die Einstellungen der Reaktionszyklen werden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Reaktionsansatz zur Sequenzierung (20 _l):

PCR-Produkt (30 ng/ _l)	3,0 _l
Primer	0,5 _l
Ready reaction mix for Dye-Terminator	8,0 _l
H ₂ O	8,5 _l

Der Reaktionsansatz wird mit 30 _l Mineralöl überschichtet; Die Reaktionsgefäße werden abgedunkelt in den Thermocycler gestellt, um die fluoreszenzmarkierten Nukleotide vor UV-Licht zu schützen. Die Sequenzreaktion wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

25 Zyklen	Denaturierung:	30 sec 96°C
	Annealing:	15 sec 55°C
	Elongation:	4 min 60°C

Nach dem letzten Zyklus erfolgt eine Abkühlung auf 4°C. Anschließend wird die DNA mittels Ethanolfällung aufgereinigt und mit dem Template Suppressions Reagenz gelöst. Zur Denaturierung wird die DNA für zwei Minuten auf 95°C erhitzt und dann sofort auf Eis gestellt. Die Sequenzanalyse richtet sich nach den Angaben des Herstellers.

2.2.9. Aufreinigung von PCR-Produkten durch Ethanolfällung

Die Aufreinigung mittels Na-Acetat (3M; pH 4,6) und Ethanol dient dazu, Primer bzw. Oligonukleotide, die während der PCR entstanden oder nicht gebraucht wurden, zu entfernen da sie in folgenden Analysen stören könnten.

Durchführung:

Das PCR Produkt wird mit 3µl 3M Na-Acetat kurz abzentrifugiert, mit 300µl absolutem Ethanol vermennt und über Nacht bei -20°C aufbewahrt. Am folgenden Tag werden die Proben zwanzig Minuten zentrifugiert (4°C, 13000 rpm), der Überstand vorsichtig abgekippt, das Pellet in 300µl 70%igem Ethanol gewaschen, nochmals wie beschrieben zwanzig Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Den verbliebenen Ethanol läßt man abdampfen und resuspendiert dann das Pellet mit 10µl Wasser.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Patientenkollektive

In dieser Arbeit wurden zwei Patientenkollektive auf Mutationen im PPAR- α -Gen untersucht. Die DNS des ersten Kollektives stammte von Patienten, die Teilnehmer einer Studie über HLP der Poliklinik für Innere Medizin des Universitätskrankenhauses Eppendorf in Hamburg waren. Die Patienten wiesen unabhängig vom Cholesterin TG-Werte über 200 mg/dl auf. Das zweite Patientenkollektiv umfasste ausgewählte Patienten mit Adipositas permagna, die sich einer Magenrestriktionsoperation unterzogen haben (s. Material und Methoden). Die folgende Tabelle 3.1. gibt eine Charakterisierung des gesamten Patientengutes wieder:

	HLP-Patienten	Adipositas-Patienten
Anzahl	44	72
Alter (Jahre)	46 (26-65)	38 (21-59)
Diabetes mellitus	12	8
Glukose (mg/dl)	90 \pm 15	116 \pm 31
TC (mg/dl)	284,6 \pm 75,0	211,0 \pm 38,3
TG (mg/dl)	559,7 \pm 383,8	199,1 \pm 161,2
HDL (mg/dl)	29,0 \pm 6,9	39,9 \pm 11
LDL (mg/dl)	176,2 \pm 43,3	134,1 \pm 31,6
VLDL (mg/dl)	57,1 \pm 11,7	31,4 \pm 13,6
APO B	156,7 \pm 38,6	124,2 \pm 31,0
APO A 1	113,4 \pm 21,3	127,2 \pm 27,9
BMI (kg/m)	28,9 \pm 3,5	50,5 \pm 7,5
Leptin (ng/ml)	Nicht bestimmt	35,8 \pm 19,6
Größe (cm)	177 \pm 0,08	170 \pm 0,09
Gewicht (kg)	90,6 \pm 12,3	145,8 \pm 26,5

Tabelle 3.1: Charakterisierung der Patientenkollektive

3.2. Untersuchungsstrategie

Die zwei verschiedenen Patientenkollektive wurden auf Mutationen im PPAR- α -Gen untersucht. Die DNS der beiden Patientenkollektive wurde zunächst jeweils mittels PCR amplifiziert und anschließend einer SSCP-Analyse unterzogen. Bei Verdacht auf eine Mutation wurde der betreffende DNS-Abschnitt sequenziert, um eine eventuelle Veränderung der Basensequenz festzustellen.

Das PPAR- α -Gen besteht aus acht Exons. Ein Exon entspricht je einem Kästchen in der folgenden Abbildung. Die Länge der Exons, in Basenpaaren ausgedrückt, wurde in die jeweiligen Kästen eingetragen. Die Sequenz ist bekannt. Da die Länge der Introns nur unzureichend bekannt ist, wurde auf eine genaue Darstellung verzichtet, und die Intronbereiche gestrichelt dargestellt.

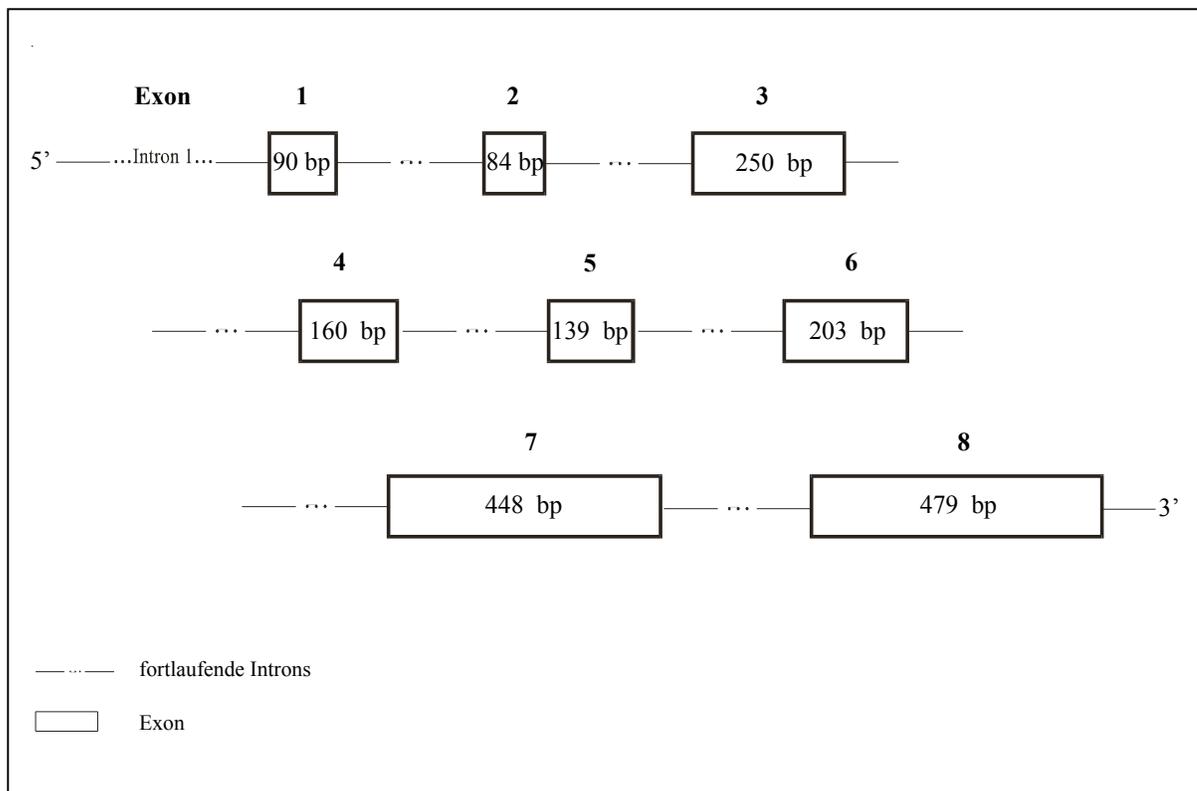


Abbildung 3.1.: Schematische Abbildung der acht Exons des PPAR- α -Gens. Ein Exon entspricht je einem Kästchen. Die Länge der Exons, in Basenpaaren ausgedrückt, wurde in die jeweiligen Kästen eingetragen. Da die Länge der Introns nur unzureichend bekannt ist, wurde auf eine genaue Darstellung verzichtet und die Intronbereiche gestrichelt dargestellt.

Die optimale Größe für die SSCP-Analyse liegt bei 200 Basenpaaren. Deshalb wurden die über 200 bp langen Exons in kleinere Genabschnitte unterteilt. In der vorliegenden Arbeit waren es Exon 3 und 8. Wie aus der Abbildung 3.2. bzw. 3.4. zu entnehmen ist, werden sie im folgenden

als Abschnitt 3 A + B und 8 A - C bezeichnet. Jeder Abschnitt wurde getrennt mit jeweils verschiedenen Primerpärchen amplifiziert. Die genauen Konzentrationsverhältnisse der einzelnen Reaktionspartner der PCR sind in Teil 2 „Material und Methoden“ aufgelistet. Abweichend von den Standardbedingungen wurden bei Abschnitt 3B und 8A dem PCR-Ansatz MgCl zugesetzt und Pufferlösung ohne Mg verwendet.

3.2.1. Hyperlipidämie-Kollektiv

In diesem Abschnitt wurden Exon 3 und 8 des PPAR- α -Gens von Patienten mit bekannter Hyperlipidämie auf Mutationen untersucht.

I. PCR-Amplifizierung

A) Amplifizierung des Exons 3

Die verwendeten Primer erkennen nahe der Exon-Intron-Grenze gelegene Intronsequenzen. Mit 250 bp ist dieses Exon zu lang für die SSCP-Analyse. Es werden deshalb zwei Primerpärchen benutzt, die überlappende Exonprodukte liefern. Dies wird in der folgenden Abbildung veranschaulicht.

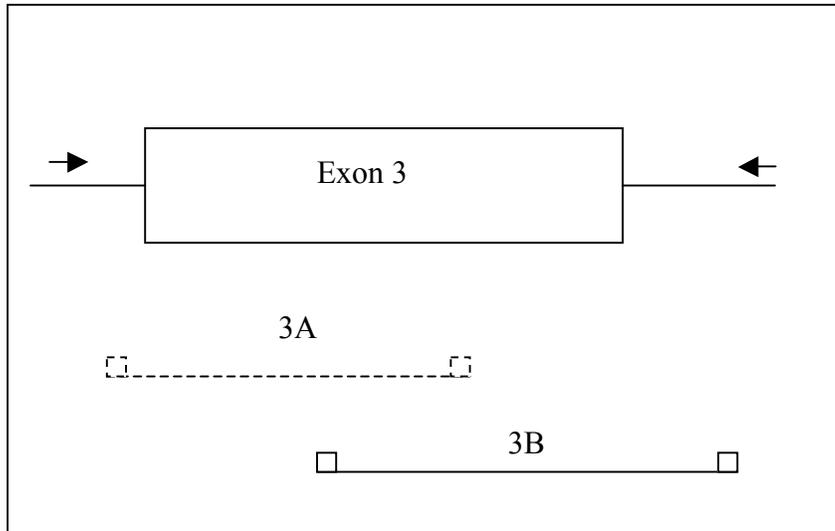


Abbildung 3.2.: Exon 3 des PPAR- α -Gens. Für die SSCP-Analyse wurde das Exon in zwei Abschnitte unterteilt. Genabschnitt 3A konnte nicht amplifiziert werden und ist deshalb in der Abbildung gestrichelt dargestellt.

Wegen technischer Schwierigkeiten konnte Abschnitt 3A nicht amplifiziert werden und ist deshalb in der Abbildung gestrichelt dargestellt.

Genabschnitt 3B konnte erfolgreich amplifiziert werden. Abb. 3.3. zeigt ein exemplarisches PAA-Gel, welches mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Lichtbestrahlung sichtbar gemacht und fotografiert werden konnte.

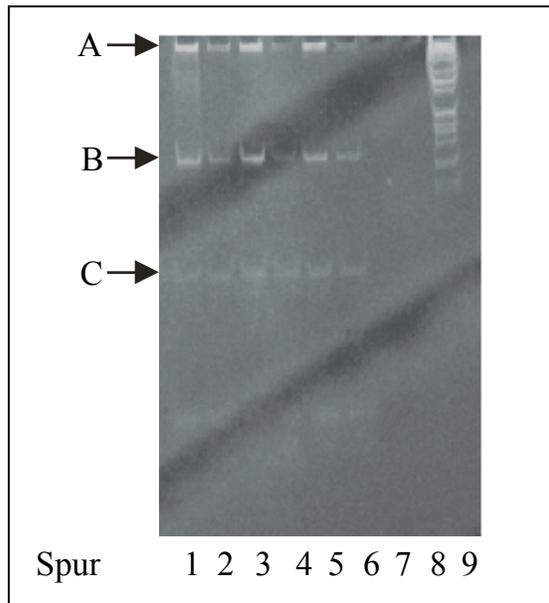


Abbildung 3.3.: PAA-Gel mit Darstellung der PCR-Amplifikation des Genabschnittes 3B des PPAR-_α-Gens. Spur 1-6 geben 6 verschiedene PCR-Proben wieder, Spur 7 und 8 sind leer, in Spur 9 stellt den 1kb-Leiter dar. A zeigt die Auftragungsstelle, B zeigt die Banden der erfolgreich amplifizierten PCR-Produkte, C stellt die Lauffront dar.

B) Amplifizierung des Exons 8

Mit 479 bp weist das Exon 8 ebenfalls keine optimale Größe für die SSCP-Analyse auf. Exon 8 wurde in drei Abschnitte 8 A-C geteilt und es wurden sechs Primer verwendet, d.h. pro Abschnitt ein anderes Primerpärchen, die überlappende PCR-Produkte liefern. Diese Aufteilung ist in Abbildung 3.4. schematisch dargestellt:

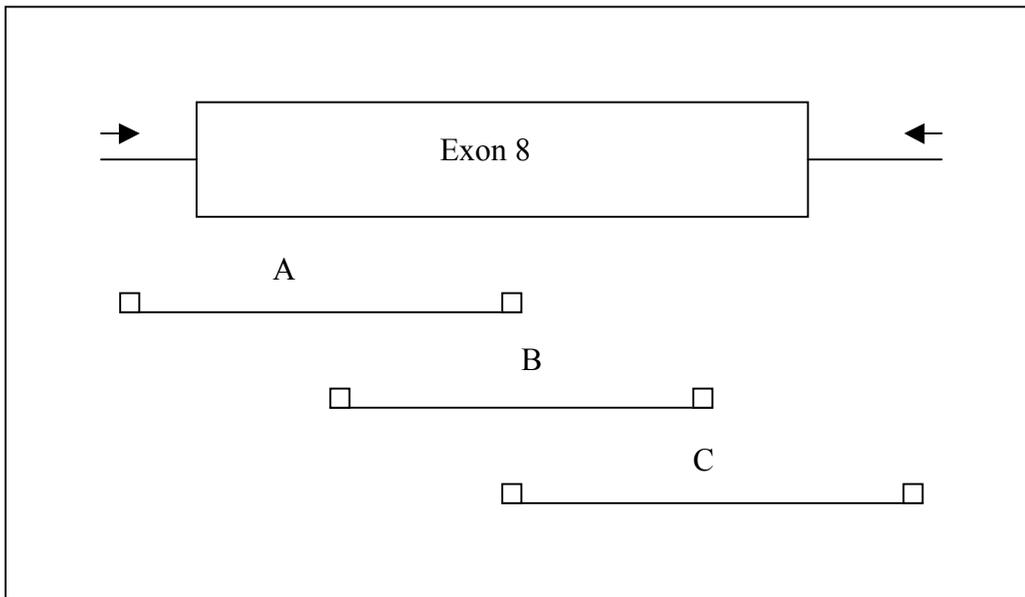


Abbildung 3.4.: Exon 8 des PPAR-_α-Gens. Für die SSCP-Analyse wurde das Exon in die Abschnitte A, B und C unterteilt.

Auch Exon 8 konnte erfolgreich amplifiziert werden. Abb. 3.5. zeigt ein exemplarisches PAA-Gel des Abschnitts 8A, welches mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Lichtbestrahlung sichtbar gemacht und fotografiert werden konnte. Auf die Darstellung der PAA-Gele der Abschnitte 8B und 8C wurde hier verzichtet.

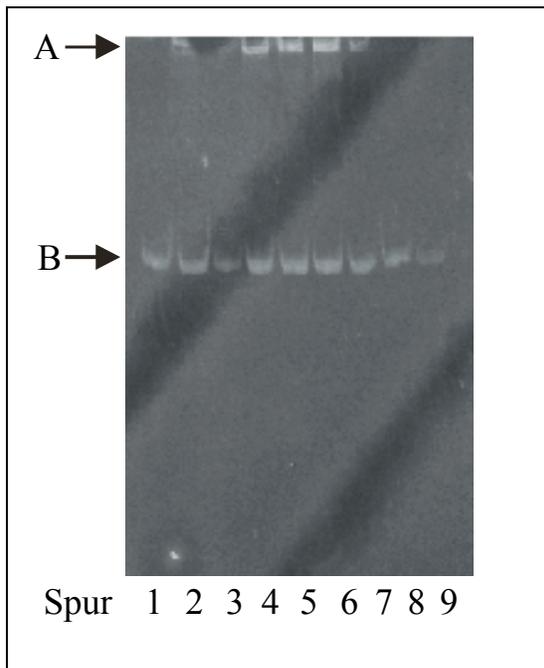


Abbildung 3.5.: PAA Gel mit Darstellung der PCR-Amplifikation des Genabschnittes 8A des PPAR-_α-Gens. Spur 1-6 geben 9 verschiedene PCR-Proben wieder. A zeigt die Auftragungsstelle, B zeigt die Banden der erfolgreich amplifizierten PCR-Produkte.

II. SSCP-Analyse

Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden auf Gele geladen. Die Sensitivität der SSCP-Analyse wird unter anderem von der Temperatur und der Glycerolkonzentration beeinflusst. Es ist deshalb wichtig und sinnvoll mehrere Gelbedingungen durchzuführen, um ein möglichst breites Spektrum an Mutationen aufzudecken. Exon 3 wurde bei Raumtemperatur unter Zugabe von Glycerol bzw. im Kühlraum bei 4° ohne Zugabe von Glycerol analysiert (s. Tabelle 3.2.). Exon 8 wurde bei Raumtemperatur mit Glycerol, im Kühlraum bei 4°C mit Glycerol und im Kühlraum ohne Zugabe von Glycerol untersucht. Tabelle 3.2. zeigt eine Zusammenfassung der Versuchsbedingungen.

	Raumtemperatur mit Glycerol	Kühlraum bei 4°C mit Glycerol	Kühlraum bei 4°C ohne Glycerol
Exon 3	X	–	X
Exon 8	X	X	X

Tabelle 3.2.: Zusammenfassung der Versuchsbedingungen für die SSCP-Analyse von Exon 3 und 8

Unter diesen Standardbedingungen enthielten alle Gele 11% PAA. Gele, die 10% Glycerol enthielten, wurden für 6 Stunden bei einer Spannung von 4 Watt in die Elektrophoresekammern gelegt. Gele ohne Glycerolgehalt hatten bei gleicher Spannung eine Laufzeit von nur 4 Stunden. Die Anzahl der pro Bedingung und Abschnitt untersuchten Proben variierte, da sich einige Proben auch nach wiederholten Versuchen nicht amplifizieren ließen.

A) Analyse von Exon 3

1) Genabschnitt 3B

Genabschnitt 3B wurde zunächst bei Raumtemperatur und unter Zugabe von Glycerol bei 37 Proben untersucht. Abbildung 3.6. zeigt exemplarisch das SSCP-Muster unter diesen Bedingungen:

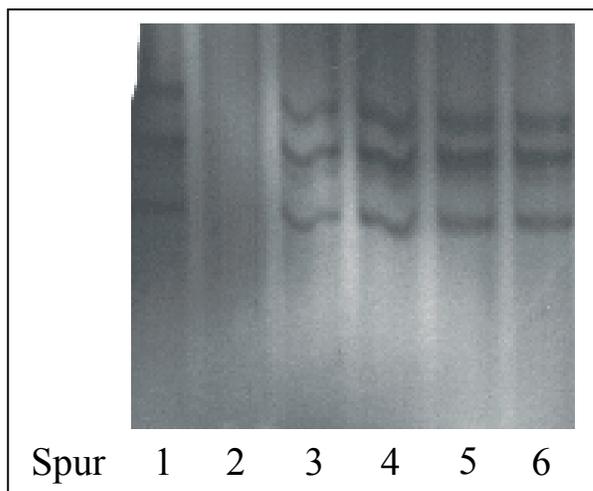


Abbildung 3.6.: SSCP-Analyse des Genabschnittes 3B bei Raumtemperatur unter Zugabe von Glycerol. Eine Spur entspricht einer Probe. Proben von Spur 1-6 fortlaufend, D 26, Leerprobe, D83, D106, D118, D124. Die Wellenformen der Banden in Spur 3 und 4 sind Artefakte.

Es fiel dabei eine Probe durch ein Bandenmuster auf, das sich von dem der restlichen unterschied. Die Spur 1 (Probe D26, s. Abb. 3.6.) zeigt ebenso wie die nicht auffälligen Proben der Wildtypen drei Banden, wobei der Abstand zwischen den beiden oberen Banden der auffälligen Probe jedoch deutlich größer ist als der bei den entsprechenden Banden der Wildtypen. Zusätzlich sind die Banden der auffälligen Probe weniger weit gelaufen, als die der benachbarten Proben. Diese Veränderung bei Probe D26 war im Kühlraum und ohne Glycerol nicht darstellbar. Unter dieser Bedingung wurden 44 Proben untersucht:

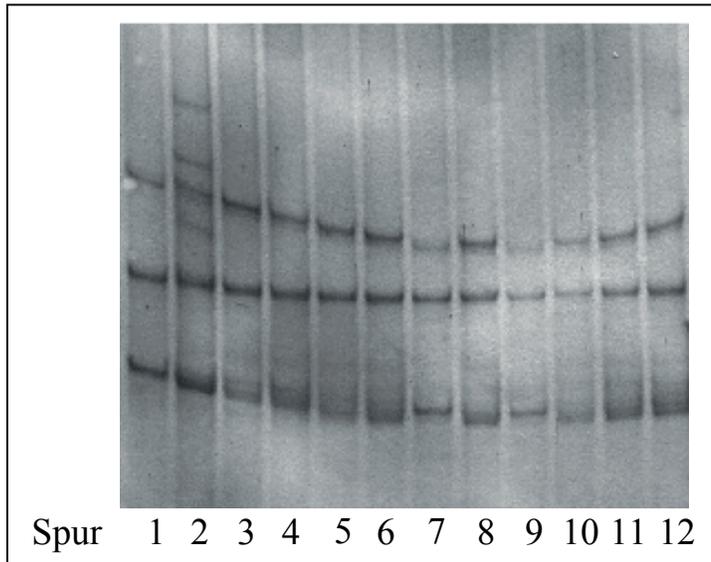


Abbildung 3.7.: SSCP-Analyse des Genabschnittes 3B im Kühlraum ohne Glycerol. Eine Spur entspricht einer Probe. Proben von Spur 1-12 fortlaufend, D224, D182, D178, D175, D174, D171, D170, D147, D128, D83, D118, D106

Hierbei fielen drei Proben durch ein Bandenmuster auf, das sich von den übrigen unterschied. Die Probe D128 (Spur 9) und Probe D170 (Spur 7) zeigen wie der Wildtyp drei Hauptbanden, wobei die obere und die untere Bande versetzt zu den entsprechenden Banden der benachbarten Proben liegen. Weiterhin imponieren die oberen Banden beider Proben deutlich heller als die Vergleichsproben. Es sind somit deutliche Unterschiede im Bandenmuster im Vergleich zum Wildtyp detektierbar. Die dritte auffällige Probe 182 (Spur 2) weist zusätzliche Banden im Vergleich zu den Wildtypen auf. Die Bandenmuster ließen sich jedoch nicht reproduzieren. Nicht sichtbar waren die Veränderungen bei Raumtemperatur unter Zugabe von Glycerol. Abbildung 3.8. zeigt zunächst einen Ausschnitt aus der Abbildung 3.7., auf dem die Probe D182 im Kühlraum ohne Glycerol wiedergegeben ist. In der Abbildung daneben ist im Vergleich dazu die Probe D182 auf einem Ausschnitt eines Gels dargestellt, dessen Bandenmuster bei Raumtemperatur und Zugabe von Glycerol entstanden ist. Sie zeigt das gleiche SSCP-Muster, wie die benachbarten Wildtypen.

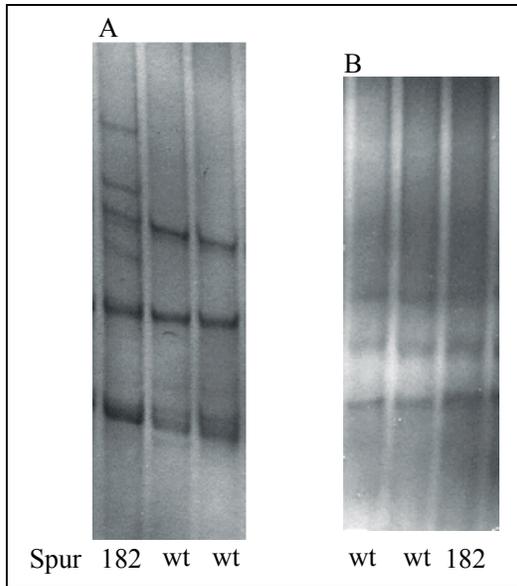


Abbildung 3.8.: Direkter Vergleich der Probe D182 unter zwei verschiedenen Bedingungen. A) Kühlraum ohne Glycerol B) Raumtemperatur mit Glycerol. Zu sehen ist die auffällige Probe D182 im Vergleich zu den Wildtypen (wt)

Die betreffenden Proben und ein Wildtyp wurden sequenziert, um diese Auffälligkeit ggf. als eine Mutation zu verifizieren. Das Ergebnis wird weiter unten besprochen.

Abschließend zeigt Tabelle 3.3. eine Zusammenfassung der in Exon 3, Genabschnitt 3B gefundenen Veränderungen unter den beiden Versuchsbedingungen. Die Anzahl der jeweils erfolgreich amplifizierten Proben steht hinter dem Querstrich, die Proben mit auffälligem SSCP-Muster davor.

Genabschnitt	Raumtemperatur mit Glycerol	Kühlraum bei 4°C ohne Glycerol
3B	1 / 37	3 / 44

Tabelle 3.3.: Zusammenfassung der SSCP's in Genabschnitt 3B unter zwei verschiedenen Versuchsbedingungen.

B) Analyse von Exon 8

1) Genabschnitt 8A

Zunächst wurden 44 Proben bei Raumtemperatur unter Zugabe von Glycerol untersucht (s. Tabelle 3.2.). Abbildung 3.9. zeigt exemplarisch das SSCP-Gel-Muster für diesen Bereich.

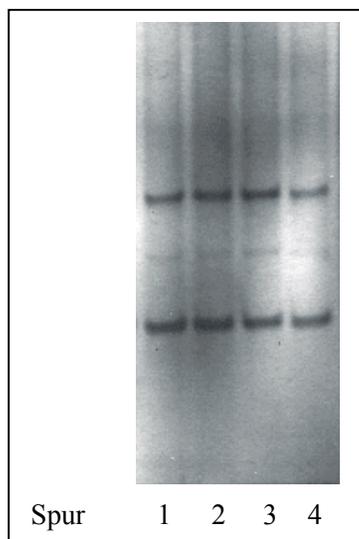


Abbildung 3.9.: Exemplarische Untersuchung auf Mutationen in Genabschnitt 8A bei Raumtemperatur und Zugabe von Glycerol. Eine Spur entspricht einer PCR-Probe.

Spur 1 = Probe D 226

Spur 2 = Probe D 231

Spur 3 = Probe D 244

Eine Spur gibt je eine Patientenprobe wieder. Es lassen sich pro Probe drei Banden erkennen. Die beiden äußeren Banden imponieren stärker, während die mittlere Bande sich dünner darstellt. Bei allen untersuchten Proben konnte unter diesen Bedingungen in diesem Bereich der DNS mit Hilfe der SSCP-Technik kein Anhalt für eine Mutation gefunden werden.

Im Kühlraum ohne Zugabe von Glycerol, ließen sich 44 Proben amplifizieren und darstellen. Ein repräsentativer Auszug ist in Abbildung 3.10 wiedergegeben.

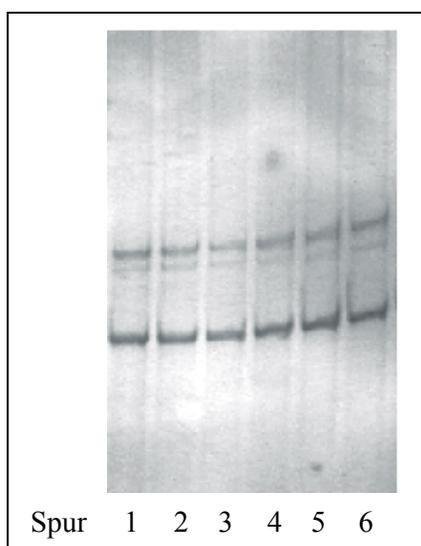


Abbildung 3.10.: Exemplarische Untersuchung auf Mutationen in Genabschnitt 8A im Kühlraum ohne Zugabe von Glycerol. Eine Spur entspricht einer PCR-Probe.

Spur 1 = Probe D 51

Spur 2 = Probe D 426

Spur 3 = Probe D 359

Spur 4 = Probe D 358

Spur 5 = Probe D 573

Spur 6 = Probe D 520

Es lassen sich ebenfalls drei Banden ausmachen, wobei die einzelnen Banden unterschiedlich stark zur Ausprägung kommen. Die erste und zweite Bande liegen nahe beieinander, die dritte Bande in etwas weiterem Abstand zu den beiden oberen Banden. In den beiden letzten Spuren zeigt sich ein beginnender Smiley-Effekt (s.u.). Unter diesen Bedingungen ließen sich in diesem Bereich mit der SSCP-Technik bei den untersuchten Proben keine Banden im Sinne einer Mutation detektieren. Interessant ist jedoch, daß sich unter den verschiedenen Bedingungen die Bandenmuster unterschiedlich darstellen.

Insgesamt 7 Proben ließen sich nicht darstellen. Dies gelang erst im Kühlraum unter Zugabe von Glycerol. Abbildung 3.11. zeigt drei repräsentative Proben, wobei eine Probe unter verschiedenen Konzentrationen aufgetragen wurde.

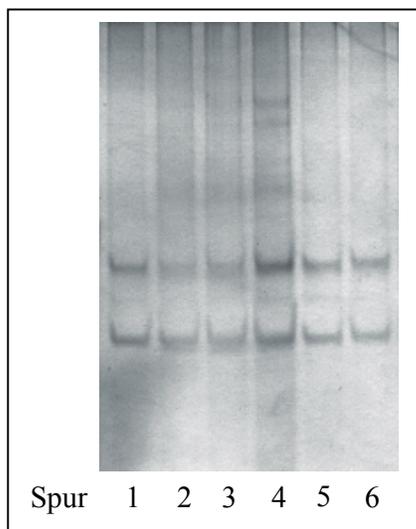


Abbildung 3.11.: Exemplarische Untersuchung auf Mutationen in Genabschnitt 8A im Kühlraum mit Zugabe von Glycerol. Eine Spur entspricht einer PCR-Probe.

Spur 1 = Probe D 513

Spur 2 = Probe D 575 (1:100)

Spur 3 = Probe D 575 (1:50)

Spur 4 = Probe D 575 (1:30)

Spur 5 = Probe D 526

Die Probe D 575 wurde zur besseren Darstellung in drei verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Die Verdünnungsreihe zeigt ein ähnliches Muster wie das Gel in Abbildung 3.9.

Die Banden weisen jedoch einen kleineren Abstand zueinander auf. Je höher die Konzentration desto deutlicher sind die Banden ausgeprägt.

Zusammenfassend ließen sich bei der SSCP-Analyse des Genabschnittes 8A des Exons 8 des PPAR_α-Gens unter den drei untersuchten Bedingungen kein Anhalt für eine Mutation finden.

2) Genabschnitt 8B

Analog zu Abschnitt 8B wurden 44 Proben bei Raumtemperatur unter Zugabe von Glycerol amplifiziert. Abbildung 3.12. gibt exemplarisch das Bandenmuster der SSCP-Analyse des Abschnittes 8B unter diesen Bedingungen wieder:

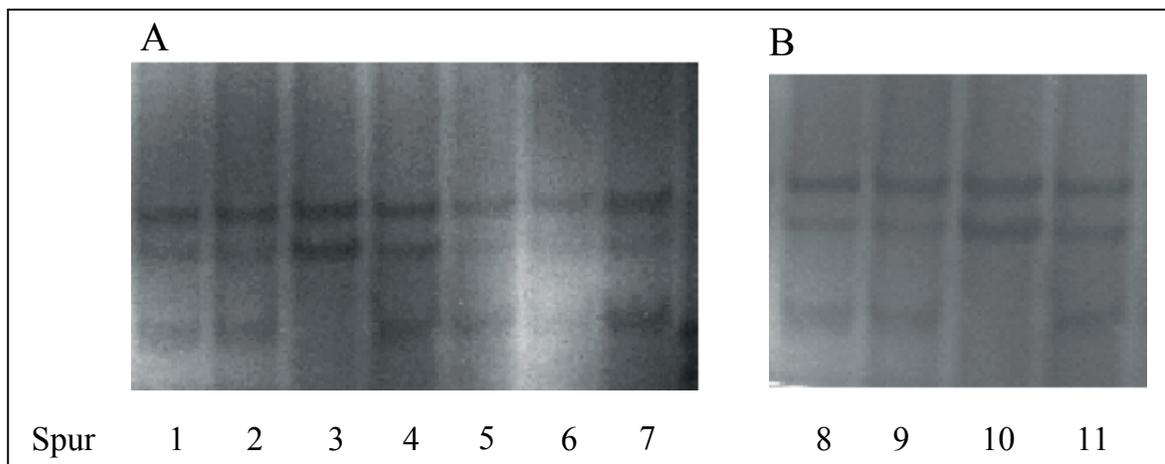


Abbildung 3.12.: Exemplarische Untersuchung auf Mutationen in Genabschnitt 8B bei Raumtemperatur unter Zugabe von Glycerol. Eine Spur entspricht einer PCR-Probe. Bild A und B zeigen zwei Gele unter den gleichen Versuchsbedingungen.

Spur 1 = Probe D 244 , Spur 2 = Probe D 246, Spur 3 = Probe D 308, Spur 4 = Probe D 353 ,
Spur 5 = Probe D 354 , Spur 6 = Probe D 358, Spur 7 = Probe D 359, Spur 8 = Probe D 519
Spur 9 = Probe D 520 , Spur 10 = Probe D 521, Spur 11 = Probe D 522

Bei dieser Untersuchung fielen zwei Proben durch ein Bandenmuster auf, das sich von dem der restlichen unterschied. Die Proben 308 (s. Abb. 3.12 A, Spur 3) und Probe 521 (s. Abb. 3.12. B, Spur 10) zeigten zwei sehr ausgeprägte Banden. Die beiden sichtbaren Banden waren dabei gleich stark. Beim Wildtyp hingegen ließen sich drei Banden darstellen. Die obere und untere Bande korrelierten in ihrer Intensität, während die mittlere Bande deutlich schmaler und schärfer ausfiel. Die beiden Proben und ein Wildtyp wurden sequenziert, um eine eventuelle Mutation in diesem Bereich zu verifizieren (s.u.).

Im Kühlraum unter Zugabe von Glycerol, ließen sich 44 Proben darstellen. Abbildung 3.13. gibt eine Auswahl der SSCP-Muster der Wildtypen wieder.

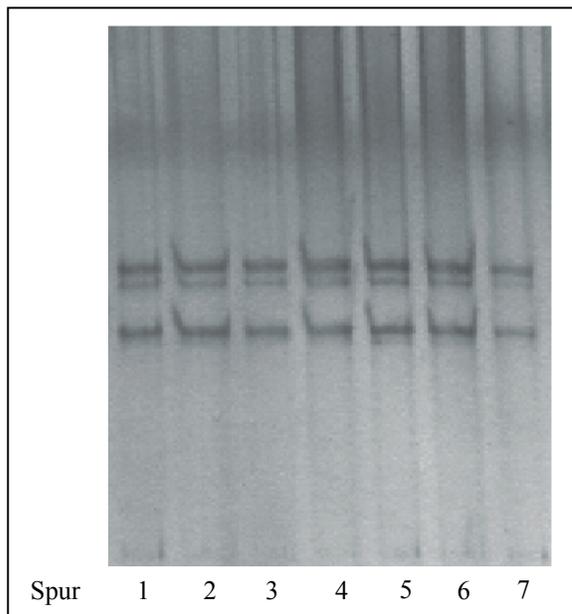


Abbildung 3.13.: Exemplarische Untersuchung auf Mutationen in Genabschnitt 8B im Kühlraum mit Zugabe von Glycerol. Eine Spur entspricht einer PCR-Probe.

Spur 1 = Probe D 170 Spur 2 = Probe D 171
 Spur 3 = Probe D 174 Spur 4 = Probe D 175
 Spur 5 = Probe D 178 Spur 6 = Probe D 182
 Spur 7 = Probe D 224

Es kommen drei Banden zur Darstellung, wobei sich die mittlere der drei Banden etwas schwächer abzeichnet. Interessanterweise stellte sich die in Abb. 3.12. auffällige Probe 521 unter diesen Bedingungen wie in Abb. 3.14. A dar:

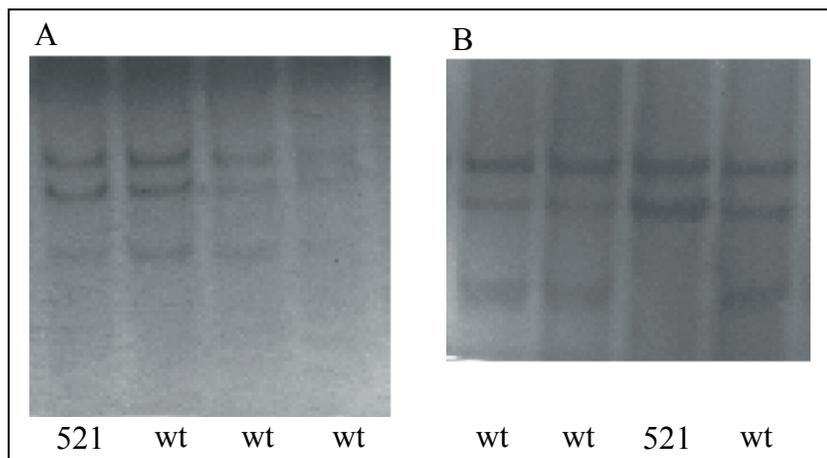


Abbildung 3.14.: Direkter Vergleich der Probe D521 unter zwei verschiedenen Bedingungen. A) Kühlraum mit Glycerol B) Raumtemperatur mit Glycerol.

Hier zeigt die Probe 521 eine zwar schwächere aber unverkennbare dritte untere Bande an. Somit zeigt sie keine Veränderung zu den Wildtypen. Hiermit wird deutlich, wie wichtig die SSCP-Analyse unter verschiedenen Bedingungen für die Detektion von Mutationen ist: Die Probe 521 zeigt im Kühlraum mit Glycerol keine Auffälligkeiten im Vergleich zu den Wildtypen (Abb. 3.14. A). Hingegen ist unter Raumtemperatur mit Glycerol eine deutliche Abweichung des Bandenmusters zu erkennen (Abb. 3.14. B).

Im Kühlraum ohne Zugabe von Glycerol wurden 48 Proben amplifiziert. Dabei waren keine Veränderungen sichtbar. Auf eine Darstellung der Wildtypen wurde hier verzichtet.

3) Genabschnitt 8C

Auch der letzte Abschnitt des Exons 8 wurde bei 44 Proben bei Raumtemperatur unter Zugabe von Glycerol untersucht. Abbildung 3.15 zeigt exemplarisch das SSCP-Gel-Muster für diesen Bereich.

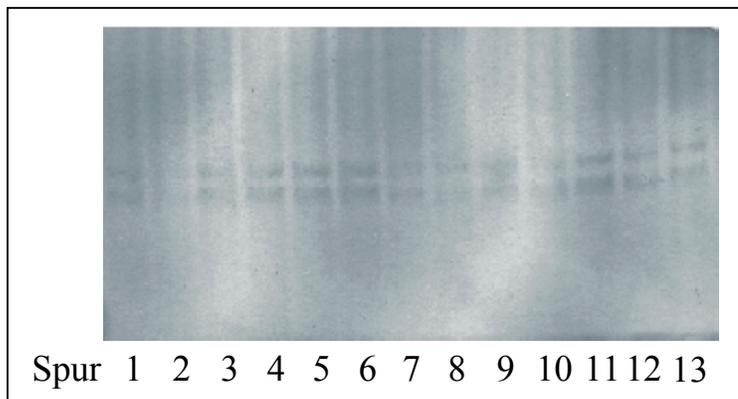


Abbildung 3.15.: SSCP-Analyse des Genabschnittes 8C bei Raumtemperatur mit Glycerol. Eine Spur entspricht einer Probe. Proben von Spur 1-13 fortlaufend: D174, D 175, D178, D182, D224, D226, D231, D244, D246, D308, D353, D354, D358.

Es lassen sich pro Probe zwei nahe beieinander laufende Banden erkennen. Die Banden imponieren gleich stark und homogen. In diesem Bereich der DNS konnte mit Hilfe der SSCP-Technik kein Anhalt für eine Mutation gefunden werden.

Bei einer im Kühlraum mit Zugabe von Glycerol durchgeführten Untersuchung ließen sich 48 Proben darstellen. Abbildung 3.16. gibt exemplarisch das SSCP-Gel-Muster für diesen Bereich wieder.

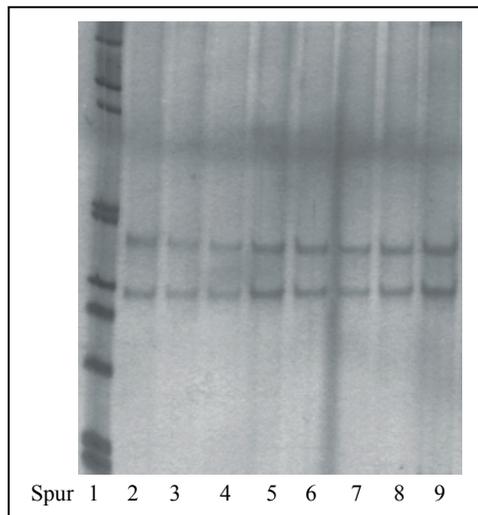


Abbildung 3.16.: SSCP-Analyse des Genabschnittes 8C im Kühlraum mit Glycerol. Eine Spur entspricht einer Probe.
 Proben von Spur 1-9 fortlaufend: 1kp-Leiter, D 515, D526, D513, D308, D512, D354, D246, D224

Es sind zwei gleich starke Banden abgebildet, die einen etwas größeren Abstand zueinander haben als die Banden in Abbildung 3.15. Auch hier gab es keinen Anhalt für eine veränderte Basensequenz.

Im Kühlraum ohne Zugabe von Glycerol ließen sich 44 Proben darstellen. Ein repräsentativer Auszug ist in Abbildung 3.17. wiedergegeben.

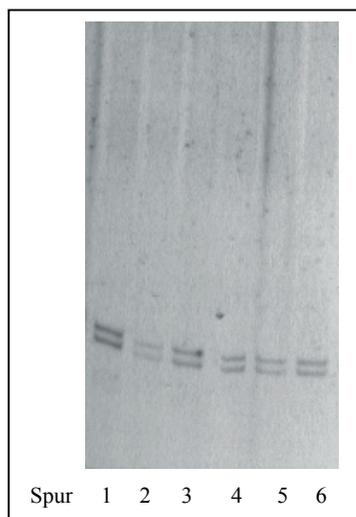


Abbildung 3.17.: SSCP-Analyse des Genabschnittes 8C im Kühlraum ohne Zugabe von Glycerol. Eine Spur entspricht einer Probe.
 Proben von Spur 1-6 fortlaufend, D 226, D352, D353, D358, D361, D365

Es lassen sich ebenfalls zwei Banden erkennen. Sie sind relativ scharf abgebildet und laufen nahe beieinander. In den beiden ersten Spuren deutet sich ein Smiley-Effekt an. Die Temperatur innerhalb des Gels ist in der Horizontalen nicht gleich. Durch die Temperaturunterschiede herrschen unterschiedliche elektrische Widerstände und Pufferbedingungen innerhalb des Gels. Diese Erscheinung macht sich durch eine Veränderung der Banden bemerkbar. Zu den Gelseiten hin verändern sich die Abstände zwischen den Banden, während sie sich in der Gelmitte verengen. Abgesehen von diesem Smiley-Effekt zeigten alle Proben das gleiche Bandenmuster. In diesem Abschnitt gab es ebenfalls keinen Anhalt für eine Mutation.

Tabelle 3.4. faßt die in Exon 8 gefundenen Veränderungen unter den drei Versuchsbedingungen zusammen. Die Anzahl der jeweils erfolgreich amplifizierte Proben steht hinter dem Querstrich, die Proben mit auffälligem SSCP-Muster davor.

Genabschnitt	Raumtemperatur mit Glycerol	Kühlraum bei 4°C mit Glycerol	Kühlraum bei 4°C ohne Glycerol
8A	0 / 44	0 / 44	0 / 6
8B	2 / 44	0 / 44	0 / 44
8C	0 / 44	0 / 44	0 / 44

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der SSCP in Exon 8 unter drei Versuchsbedingungen

Abschließend lässt sich sagen, daß im Abschnitt 8B zwei von 44 Proben ein auffälliges Muster zeigten. Die betreffenden Proben und ein Wildtyp wurden sequenziert.

III. Sequenzierung

Die SSCP-Analyse der Exons 3 und 8 des PPAR-_α-Gens gab einige Hinweise auf eventuell vorhandene Mutationen. Verifizieren lässt sich dieser Verdacht mit Hilfe der Sequenzierung. Die Sequenzierung ermöglicht die Charakterisierung der einzelnen Basen in einem DNA-Abschnitt, und gibt somit darüber Aufschluß, ob und wo eine genetische Veränderung lokalisiert ist.

Es wurden alle auffälligen Proben der Exons 3 und 8 sequenziert. Hier zeigten sich keine Veränderungen der genetischen Sequenz im Sinne einer Mutation. Der folgende Sequenzabschnitt zeigt repräsentativ die Basenfolge einer zunächst auffälligen Probe in 5'-Richtung abgelesen (s. Abb. 3.18.). Diese Basenfolge entspricht der bekannten Basenfolge des Wildtyps und damit der genomischen Struktur des PPAR-_α-Gens (s. Anhang).

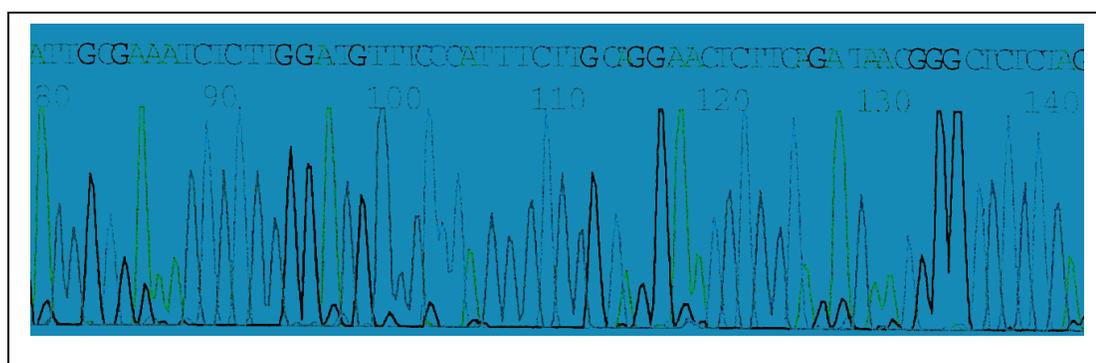


Abbildung 3.18.: Sequenzabschnitt des Genabschnittes 3B der auffälligen Probe D170. Die Basenfolge entspricht der bekannten Basenfolge des Wildtypes.

Zusammenfassend zeigte sich in diesem Abschnitt, daß nach einer erfolgreichen Amplifizierung des Exons 3 und 8 in der SSCP-Analyse einige auffällige Proben dargestellt werden konnten. Alle vom Wildtyp abweichenden Muster ließen sich jedoch unter gleichen Bedingungen nicht reproduzieren oder konnten nach einer erneuten PCR nicht mehr nachgewiesen werden. Eine ebenfalls durchgeführte Sequenzierung dieser auffälligen Proben zeigte keine genetische Veränderung der Basenabfolge.

3.2.2. Adipositas permagna-Kollektiv

Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit wurden Exon 2 und 5 des PPAR- α -Gens von Patienten mit Adipositas permagna auf Mutationen untersucht. Die Analyse wurde analog zum HLP-Kollektiv durchgeführt.

I PCR-Amplifizierung

A)/B) Amplifizierung der Exons 2 und 5

Die benutzten Primer erkennen nahe der Exon-Intron-Grenze gelegene Intronsequenzen. Der gesamte Exon- und Teile des Intronbereichs werden somit erfaßt. Es wurden exonspezifische PCR-Produkte gebildet.

Exon 2 und 5 konnten erfolgreich amplifiziert werden. Abb. 3.19. und Abb. 3.20. zeigen jeweils ein exemplarisches PAA-Gel, welches mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Lichtbestrahlung sichtbar gemacht und fotografiert werden konnte.

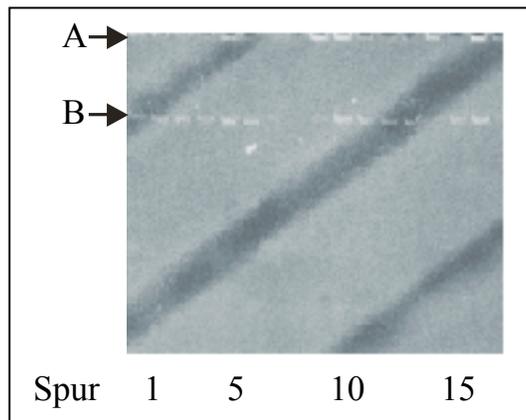


Abbildung 3.19: PAA-Gel mit Darstellung der PCR-Amplifikation des Exons 2 des PPAR-Gens. Spur 1-16 geben verschiedene PCR-Proben wieder, A zeigt die Auftragsstelle, B zeigt die Banden der erfolgreich amplifizierten PCR-Produkte.

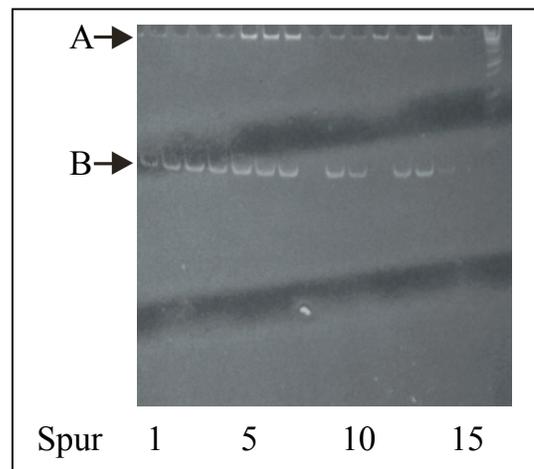


Abbildung 3.20.: PAA-Gel mit Darstellung der PCR-Amplifikation des Exons 5 des PPAR-Gens. Spur 1-15 geben verschiedene PCR-Proben wieder, A zeigt die Auftragsstelle, B zeigt die Banden der erfolgreich amplifizierten PCR-Produkte.

Exon 2 und Exon 5 wurden bei Raumtemperatur unter Zugabe von Glycerol bzw. im Kühlraum bei 4° ohne Zugabe von Glycerol analysiert (s. Tabelle 3.5.).

	Raumtemperatur mit Glycerol	Kühlraum bei 4°C ohne Glycerol
Exon 2	X	X
Exon 5	X	X

Tabelle 3.5.: Zusammenfassung der Versuchsbedingungen für die SSCP-Analyse von Exon 2 und 5.

II. Analyse des Exon 2

1) SSCP-Analyse

Im Kühlraum ohne Glycerol konnten 68 Proben dargestellt werden. Abbildung 3.21. gibt exemplarisch das SSCP-Gel-Muster für diesen Bereich wieder.

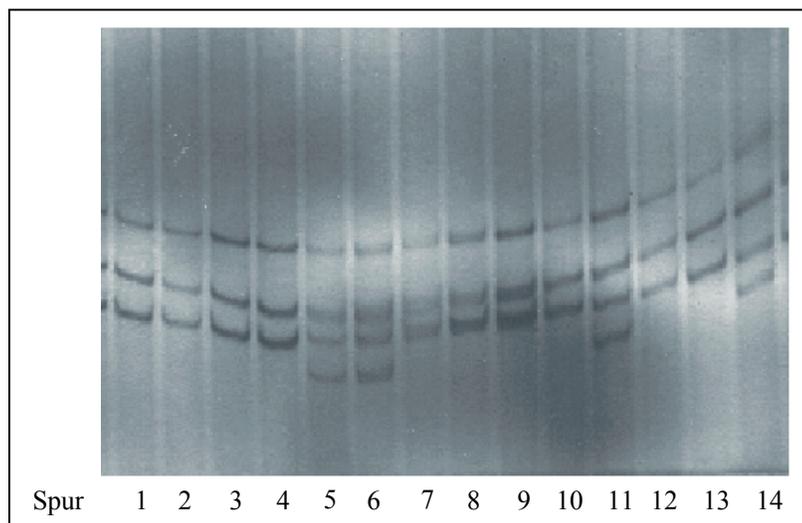


Abbildung 3.21.: SSCP-Analyse von Exon 2 im Kühlraum ohne Glycerol. Eine Spur entspricht einer Probe. Proben von Spur 1-14 fortlaufend, F5, F40, F49, F48, F47, F46, F45, F50, F42, F41, F52, F9, F4, F3

Unter dieser Bedingung fielen in der SSCP-Analyse insgesamt neun Proben durch ein deutlich differentes Bandenmuster auf. Abb. 3.21. zeigt vier der auffälligen Proben (F3, F46, F47, F52). Alle auffälligen Proben weisen zusätzlich zu den drei Banden des Wildtyps noch eine vierte Bande auf. Diese Bande lief im Gel wesentlich weiter als die übrigen.

Dieses Muster ließ sich reproduzieren. Nicht sichtbar waren die Veränderungen bei Raumtemperatur unter Zugabe von Glycerol. Unter dieser Bedingung wurden 72 Proben dargestellt. Sie zeigen drei gleichmäßige Banden, von denen die beiden unteren einen kleineren

Abstand zueinander aufweisen. Abbildung 3.22. gibt exemplarisch das beschriebene SSCP-Gel-Muster unter dieser Bedingung wieder.

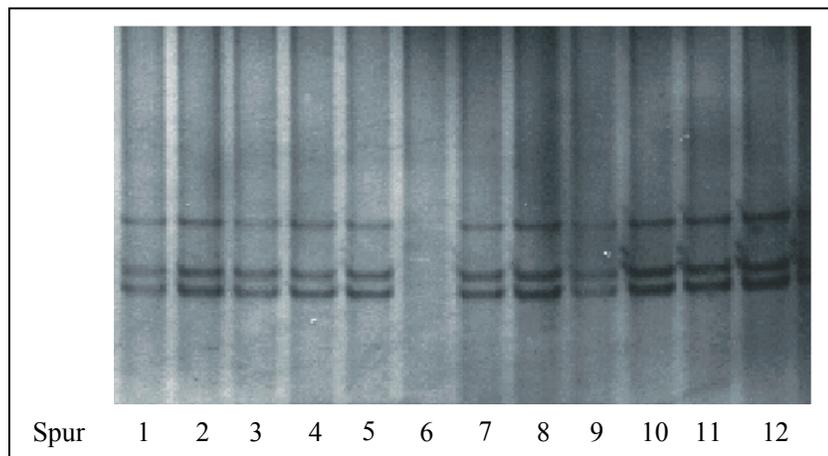


Abbildung 3.22.: SSCP-Analyse von Exon 2 bei Raumtemperatur mit Glycerol. Eine Spur entspricht einer Probe. Proben von Spur 1-12 fortlaufend, F11, F12, F13, F14, F15, leer, F16, F17, F18, F19, F21, F22

Die in Abb. 3.21. beobachteten Veränderungen ließen sich bei Raumtemperatur unter Zugabe von Glycerol nicht darstellen. Abbildung 3.23. zeigt das auffällige SSCP-Muster der Proben F62 und F67 im Kühlraum ohne Glycerol. Im Vergleich dazu gibt die Abbildung 3.24. die gleichen Proben unter Raumtemperatur mit Glycerol wieder.

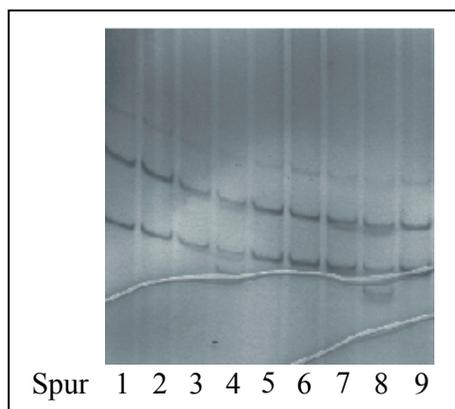


Abbildung 3.23.: SSCP-Gel des Exons 2 des PPAR-gens im Kühlraum ohne Zugabe von Glycerol. Spur 1-9 geben verschiedene Proben wieder, Spur 4 (F67) und 8 (F62) zeigen ein deutlich differentes Bandenmuster im Vergleich zu den Wildtypen.

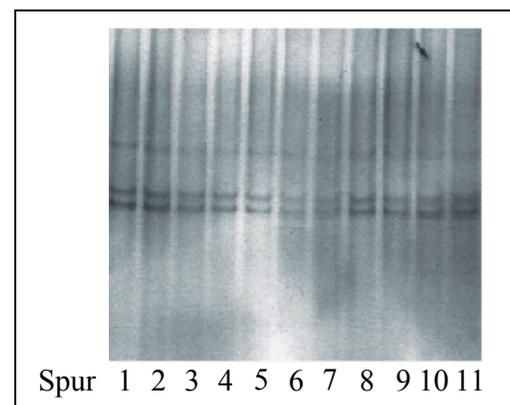


Abbildung 3.24.: SSCP-Gel des Exons 2 des PPAR-gens bei Raumtemperatur mit Zugabe von Glycerol. Spur 1-11 geben verschiedene Proben wieder, Spur 6 (F67) und Spur 1 (F62) zeigen im Vergleich zu den Wildtypen unter dieser Bedingung keine Veränderungen

Abb. 3.23. zeigt im Kühlraum ohne Glycerol in Spur 4 und 8 ein deutlich differentes Bandenmuster im Vergleich zu den aufgetragenen Wildtypen im Sinne einer SSCP. Analysiert man nun die gleichen Proben bei Raumtemperatur mit Zugabe von Glycerol (Abb. 3.24.), so zeigen diese Proben keine Veränderungen.

Zusammenfassend gibt Tabelle 3.6. eine Übersicht der unter den Versuchsbedingungen detektierten Mutationen.

	Raumtemperatur mit Glycerol	Kühlraum bei 4°C ohne Glycerol
Exon 2	0 / 72	9 / 68

Tabelle 3.6.: Zusammenfassung der SSCP in Exon 2 unter zwei Versuchsbedingungen

Alle abweichenden Muster konnten reproduziert werden, so daß wir aufgrund der SSCP-Analyse den Verdacht auf eine Mutation hatten. Entsprechende Proben wurden sequenziert.

2) Sequenzierung von Exon 2

Bei der SSCP-Analyse von Exon 2 des PPAR_α-Gens zeigten neun Proben im Vergleich zum Wildtypen ein auffälliges Bandenmuster. In der durchgeführten Sequenzierung konnte ein Basenaustausch in Intron 2 detektiert werden, der in Abb. 3.25. wiedergegeben ist:

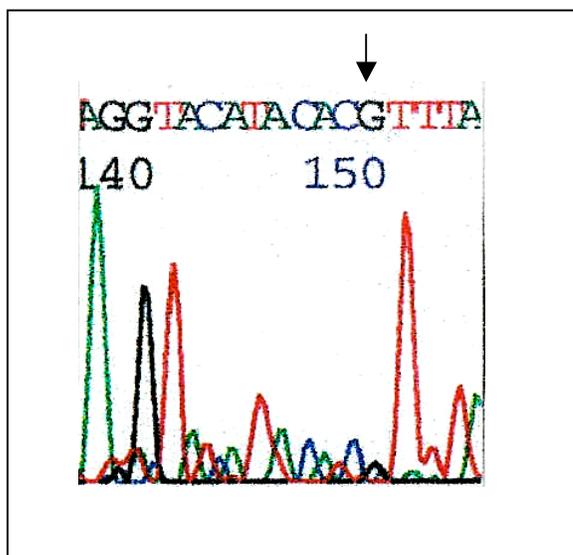


Abbildung 3.25.:

Sequenzausschnitt des Exons 2 der auffälligen Probe F62 vom Exon/Intron-Übergang in 3'-Richtung gelesen. An Position 11 zeigt sich ein Guanosen-Nukleotid (Pfeil). Der Wildtyp besitzt an dieser Stelle ein Adenosin-Nukleotid.

Die Sequenzierung des auffälligen Genabschnitts der Probe F62 (s. Abb. 3.25.) zeigte ein Guanosen-Nukleotid an Position 11 vom Exon/Intron Übergang in 3'Richtung gezählt. Der Wildtyp besitzt an dieser Stelle ein Adenosin-Nukleotid (s. Genomstruktur im Anhang dieser Arbeit). Entsprechend der internationalen Nomenklatur wurde diese Veränderung a11g genannt. In diesem Genabschnitt zeigten neun von insgesamt 68 Proben ein so verändertes Bandenmuster. Dies entspricht einer Häufigkeit von 13,2 %.

3) Vergleich von Lipidparametern

In diesem Zusammenhang interessant zu betrachten sind die Lipidwerte dieser Merkmalsträger im Vergleich zu den Werten der Wildtypen. Tabelle 3.7. zeigt die wichtigsten Laborwerte der Wildtypen und der Merkmalsträger.

	Wildtypen		Merkmalsträger a11g		Signifikanz p
	Gült. N	Mittelwert mit Standartabweichung	Gült. N	Mittelwert mit Standartabweichung	
AGE	63	37,2 ± 9,2	9	44,0 ± 10,3	0,04
TC	62	213,1 ± 40,1	9	196,7 ± 16,9	0,23
TG	62	203,8 ± 169,8	9	166,1 ± 79,2	0,51
HDL	62	39,6 ± 11,4	9	42,3 ± 7,7	0,48
LDL	56	136,1 ± 33,1	9	121,3 ± 16,8	0,19
VLDL	56	31,2 ± 13,4	9	33,0 ± 15,8	0,71
APO_B	62	126,1 ± 31,9	9	110,9 ± 21,1	0,17
APO_A1	62	128,3 ± 29,1	9	119,4 ± 16,5	0,37
GLUCOSE	23	118,3 ± 30,8	3	99,7 ± 27,5	0,32
DM	63	100,1 ± 0,3	9	100,0 ± 0	0,26
BMI	63	50,6 ± 7,8	9	49,8 ± 5,5	0,75
LEPTIN	13	35,8 ± 19,6	0	-	-

Tabelle 3.7.: Metabolismus der Wildtypen und der Merkmalsträger des Exons 2 des PPAR_α-Gens.

Eine statistische Analyse zwischen der Gruppe der Merkmalsträger und der Gruppe der Wildtypen mit Hilfe der Statistika-Software ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer Lipidwerte. Abbildung 3.26. gibt graphisch die Triglycerid- und Cholesterinwerte der Wildtypen und der Merkmalsträger im Vergleich wieder.

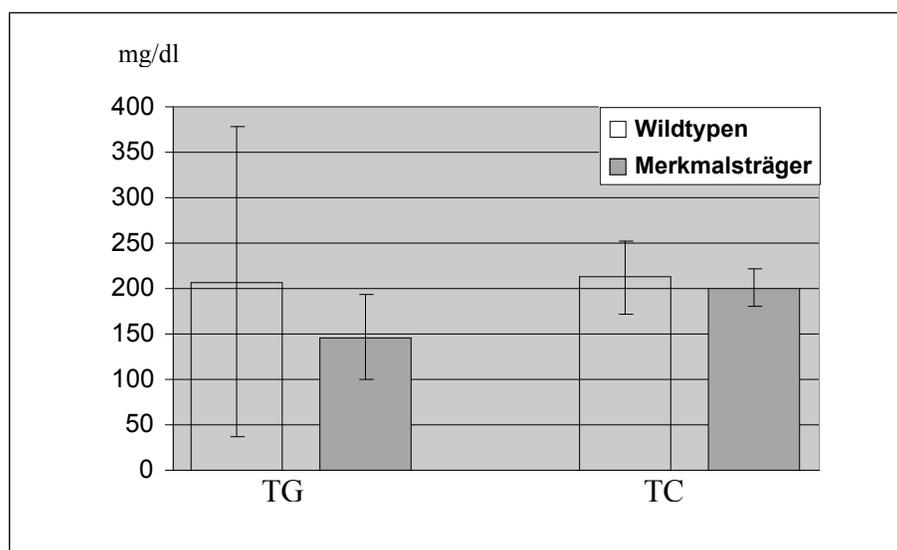


Abb. 3.26.: Graphischer Vergleich der Triglycerid- (TG) und Cholesterinmittelwerte (TC) der Wildtypen und der Merkmalsträger des Exon 2 mit Standardabweichungen.

III. Analyse von Exon 5

1) SSCP-Analyse

Bei Raumtemperatur unter Zugabe von Glycerol wurden 66 Proben analysiert. Abbildung 3.27. gibt repräsentativ das Gelmuster unter dieser Bedingung wieder:

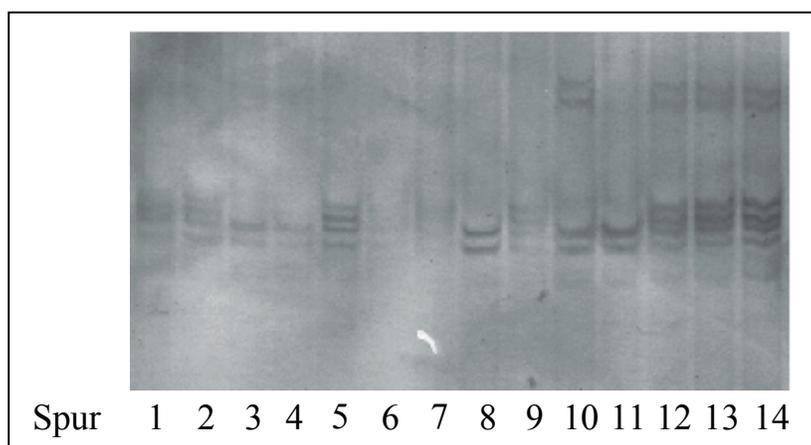


Abbildung 3.27.: SSCP-Gel des Exons 5 des PPAR-_α-Gens bei Raumtemperatur mit Zugabe von Glycerol. Spur 1-14 geben verschiedene Proben wieder. Spur. 1-14 fortlaufend: F26, F68, F29, F67, F54, F56, F43, F63, F33, F37, F66, F47, F1, F2.

Dabei fielen neun Proben durch ein differentes Bandenmuster auf. Diese zeigen im Vergleich zum Wildtyp zwei zusätzliche Banden am oberen Rand. Die auffälligen Spuren entsprechen den Proben: F1, F2, F26, F33, F43, F47, F54, F56 und F68. Die Spuren 10, 12, 13 und 14 zeigen zwei weitere Banden am oberen Bildrand, die im Gel nicht so weit gelaufen sind. Diese ließen sich im Gegensatz zu den erst beschriebenen Veränderungen nicht reproduzieren, so daß man von einem Artefakt ausgehen kann.

Im Kühlraum ohne Zugabe von Glycerol zeigten sich ebenfalls Veränderungen bei den Proben-Nr. F1, F2, F9, F13, F26, F33, F52, F54, F56 und F68. Abbildung 3.28. gibt repräsentativ die SSCP-Muster zweier auffälliger Proben bzw. zweier Wildtypen wieder. Zu den aufgetrennten vier Banden der Wildtypen zeigen sich bei Spur 1 und 3 zwei zusätzliche Banden, die sich reproduzieren ließen.

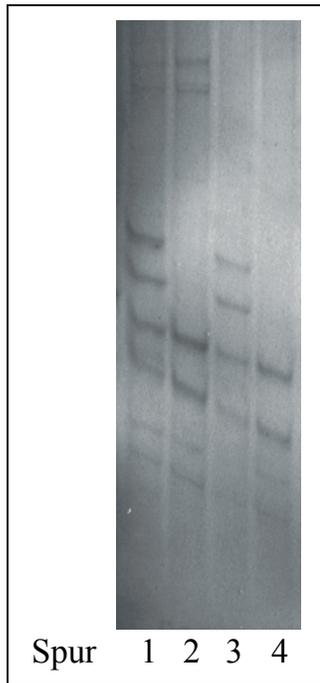


Abbildung 3.28.: SSCP-Gel des Exons 5 des PPAR-_α-Gens im Kühlraum ohne Zugabe von Glycerol. Spur 1-4 geben verschiedene Proben wieder.

Spur 1 = Probe F1
 Spur 2 = Probe F37
 Spur 3 = Probe F33
 Spur 4 = Probe F38

In Spur 1 und 2 sind zwei weitere Banden am oberen Bildrand zu erkennen, die im Gel nicht so weit gelaufen sind. Diese ließen sich im Gegensatz zu den differenteren Banden nicht reproduzieren, so dass auch hier von einem Artefakt ausgegangen werden kann.

Interessant ist, daß sich die Proben F1, F2, F54, F56 und F68 unter den beiden Bedingungen darstellen ließen. Dagegen gab es Proben, die sich nur unter der einen oder der anderen Bedingung zeigten. Bei Raumtemperatur mit Glycerol betrifft das die Proben F26, F33, F43 und F47, im Kühlraum ohne Glycerol waren die Proben F9, F13, F26, F33 und F52 auffällig.

Alle abweichenden Muster konnten reproduziert werden, so daß wir aufgrund der SSCP-Analyse den Verdacht auf eine Mutation hatten. Zusammenfassend gibt Tabelle 3.8. eine Übersicht der unter den Versuchsbedingungen detektierten Mutationen.

	Raumtemperatur mit Glycerol	Kühlraum bei 4°C ohne Glycerol
Exon 5	9 / 66	10 / 64

Tabelle 3.8.: Zusammenfassung der SSCP in Exon 5 unter zwei Versuchsbedingungen.

2) Sequenzierung des Exons 5

Die Sequenzierung der bei der Analyse von Exon 5 auffälligen Proben ergab ebenfalls einen Basenaustausch. Dieser liegt, im Gegensatz zu der vorher beschriebenen Veränderung, an Position 115 im Exonbereich in 3'-Richtung gezählt. Das beim Wildtypen vorliegende Cytosin-Nukleotid (s. Abb. 3.29., Bild A) wurde gegen ein Guanosin-Nukleotid ausgetauscht (s. Abb. 3.29., Bild B, s. Genomstruktur im Anhang dieser Arbeit). Da der Basenaustausch an Position 1 eines Basentriplets stattfindet, kommt es zu einem Aminosäureaustausch. Die Aminosäure Leucin wird an Position 162 durch Valin ersetzt, so dass dieser Polymorphismus auch als L162V bezeichnet wird.

Abbildung 3.29. zeigt repräsentativ die Probe F56 mit dem beschriebenen Polymorphismus in diesem Genabschnitt.

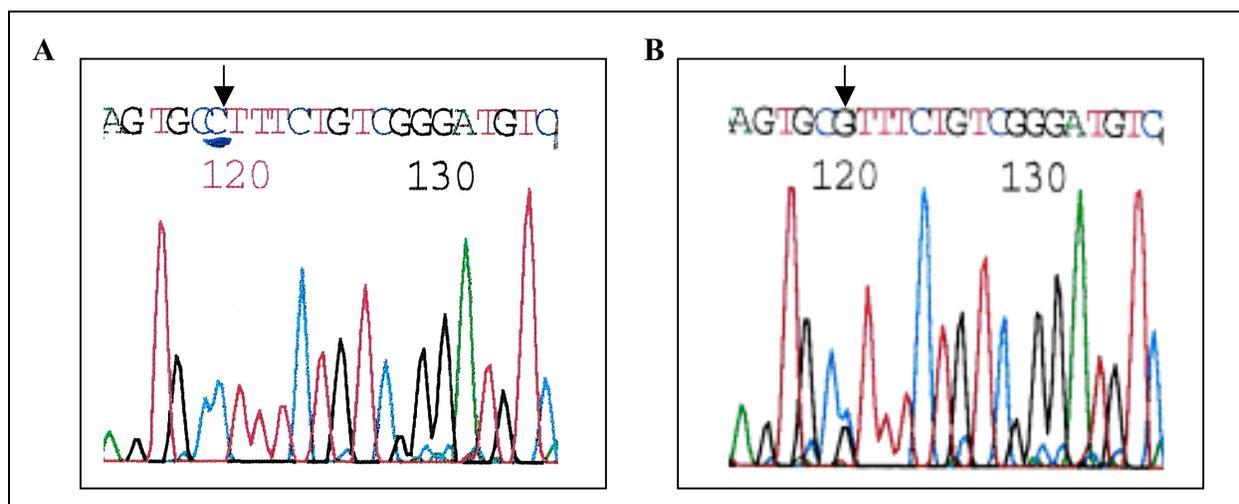


Abbildung 3.29.: Bild A zeigt einen Sequenzausschnitt des Exons 5 der Probe F59 mit bekannter Basenfolge des Wildtypes. Im Bild B ist der gleiche Sequenzausschnitt der auffälligen Probe F56 dargestellt. Das beim Wildtypen vorliegende Cytosin-Nukleotid (blauer Peak, s. Pfeil Bild A) wurde gegen ein Guanosin-Nukleotid ausgetauscht (schwarzer Peak, s. Pfeil Bild B).

In diesem Genabschnitt zeigen neun von insgesamt 66 Proben, entsprechend 13,6 %, bei Raumtemperatur unter Gabe von Glycerol bzw. zehn von 64 Proben im Kühlraum ohne Glycerol ein verändertes Bandenmuster. Dies entspricht 15,6 %. Es gab sieben Patienten, dessen SSCP Muster sowohl unter der einen als auch unter der anderen Bedingung auffällig waren.

3. Vergleich von Lipidparametern

In diesem Zusammenhang sind die Lipidwerte dieser Patienten im Vergleich zu den Werten der nicht auffälligen Patienten interessant zu betrachten. Tabelle 3.9. zeigt die wichtigsten Laborwerte der Merkmalsträger im Vergleich zu den Wildtypen.

	Wildtypen		Merkmalsträger L162V		Signifikanz p
	Gült. N	Mittelwert mit Standartabweichung	Gült. N	Mittelwert mit Standartabweichung	
AGE	60	38,3 ± 9,7	12	36,7 ± 9,1	0,59
TC	60	210,9 ± 38,1	11	211,9 ± 41,2	0,93
TG	60	207,0 ± 171,4	11	155,6 ± 78,6	0,33
HDL	60	39,0 ± 10,6	11	45,0 ± 12,2	0,09
LDL	54	133,7 ± 31,0	11	135,8 ± 36,3	0,84
VLDL	54	31,5 ± 13,3	11	31,1 ± 15,7	0,93
APO_B	60	125,1 ± 31,8	11	119,2 ± 27,1	0,56
APO_A1	60	124,7 ± 26,3	11	140,8 ± 33,5	0,08
GLUCOSE	20	114,2 ± 31,9	6	122,8 ± 27,0	0,55
BMI	60	50,9 ± 7,9	12	48,5 ± 5,4	0,31
LEPTIN	10	37,4 ± 21,7	3	30,7 ± 11,2	0,62

Tabelle 3.9.: Metabolismus der Wildtypen und der Merkmalsträger L162V des Exons 5 des PPAR α -Gens.

Eine statistische Analyse zwischen der Gruppe der Merkmalsträger und der Gruppe der Wildtypen ergab keine signifikanten Unterschiede in bezug auf die Laborparameter. Abbildung 3.30. gibt exemplarisch die Triglycerid- und Cholesterinwerte der Wildtypen und der Merkmalsträger graphisch wieder.

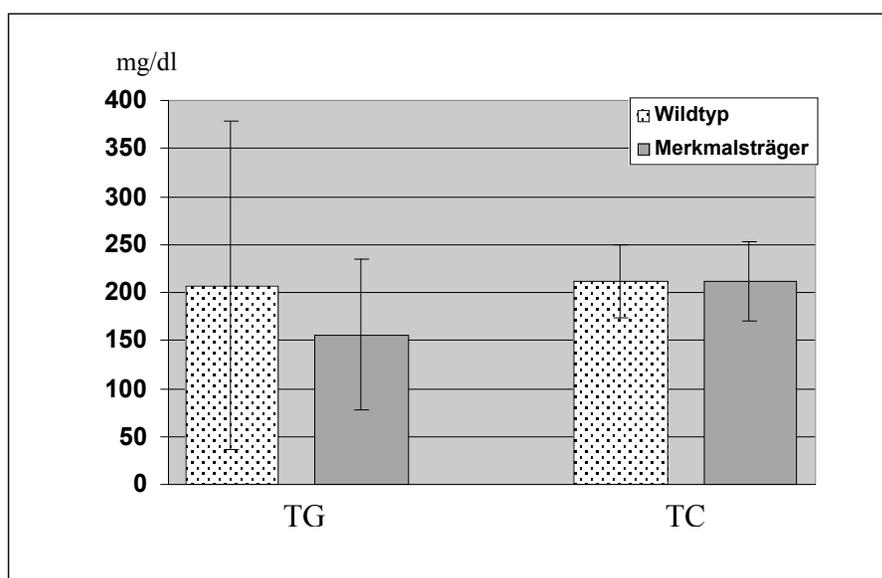


Abb. 3.30.: Graphischer Vergleich der Triglycerid- (TG) und Cholesterinmittelwerte (TC) der Wildtypen und der Merkmalsträger des Exon 5 mit Standardabweichungen.

Interessant zu betrachten ist in diesem Zusammenhang die kleine Gruppe von acht Diabetikern innerhalb des Gesamtkollektives. Die folgenden Tabellen geben die Laborwerte dieser Diabetiker wieder und stellen die Laborwerte der Merkmalsträger denen der Wildtypen gegenüber.

DM	Wildtypen		Merkmalsträger		Signifikanz p
	Gült. N	Mittelwert mit Standartabweichung	Gült. N	Mittelwert mit Standartabweichung	
AGE	5	48,2 ± 6,8	3	37,0 ± 9,5	0,09
TC	5	220,4 ± 50,6	3	206,7 ± 30,1	0,68
TG	5	163,8 ± 85,3	3	228 ± 135,5	0,43
HDL	5	31,0 ± 7,3	3	44,3 ± 11	0,08
LDL	5	158,6 ± 51,1	3	116,7 ± 35,2	0,26
VLDL	5	32,6 ± 17,1	3	45,7 ± 26,9	0,42
APO_B	5	125,4 ± 32,4	3	116,7 ± 32,8	0,72
APO_A1	5	102,8 ± 22,6	3	146,3 ± 45,1	0,11
GLUCOSE	3	174,3 ± 45,2	1	166 ± 0	0,88
BMI	5	47,6 ± 4,9	3	48,3 ± 3,2	0,82
LEPTIN	2	15,0 ± 2,8	1	43,0 ± 0	0,07

Tabelle 3.10.: Laborwerte der Patienten mit Diabetes mellitus (DM).Vergleich der Wildtypen mit den Merkmalsträgern L162V des Exon 5 des PPAR-_α-Gens.

In dieser Gruppe wiesen drei Personen den L162V Polymorphismus auf. Die Merkmalsträger sind im Mittel zehn Jahre jünger als die homozygoten Wildtypen. Die diabetischen Merkmalsträgern zeigten im Vergleich zu den diabetischen Probanden ohne Polymorphismus einen deutlich erhöhten Leptin-Mittelwert (s. Tab. 3.10). Nicht diabetische Merkmalsträger wiesen im Gegensatz zu den Wildtypen einen deutlich geringeren Leptinspiegel auf (s. Tab. 3.11). Betrachtet man nun die TC-, HDL- und LDL-Konzentrationen der diabetischen Merkmalsträger (Tab. 3.10.) so konnte eine leichte Senkung der TC-Werte und eine deutliche Verminderung der LDL-Werte detektiert werden. Die HDL-Konzentration stieg hingegen an. Interessanterweise zeigten die Merkmalsträger ohne DM II im Vergleich zu den Wildtypen keine so deutlichen Unterschiede der Lipidwerte (s. Tab.3.11).

Eine Ausnahme macht die TG-Konzentration, die bei den Merkmalsträgern mit DM II höher ist als bei den Wildtypen.

Nicht DM	Wildtypen		Merkmalsträger		Signifikanz p
	Gült. N	Mittelwert mit Standartabweichung	Gült. N	Mittelwert mit Standartabweichung	
AGE	54	37,4 ± 9,5	10	36,9 ± 9,1	0,88
TC	54	210,8 ± 37,1	9	208,3 ± 46,4	0,85
TG	54	212,5 ± 178,4	9	228,3 ± 20,8	0,16
HDL	54	39,9 ± 10,6	9	43,4 ± 13,6	0,37
LDL	48	131,6 ± 27,9	9	139,3 ± 35,6	0,46
VLDL	48	31,5 ± 13,2	9	25,6 ± 4,2	0,18
APO_B	54	125,8 ± 31,9	9	116,6 ± 27,6	0,41
APO_A1	54	127,2 ± 25,8	9	134,1 ± 32,8	0,47
GLUCOSE	17	103,6 ± 12,5	5	114,2 ± 18,7	0,15
BMI	54	51 ± 7,9	10	50 ± 7,3	0,7
LEPTIN	8	43 ± 20,6	2	24,5 ± 4,9	0,26

Tabelle 3.11.: Laborwerte der Nicht-Diabetiker. Vergleich der Wildtypen mit den Merkmalsträgern L162V des Exons 5 des PPAR-_α-Gens.

Auf die Ergebnisse wird im einzelnen im Abschnitt Diskussion eingegangen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden verschiedene Exons des PPAR-_α-Gens auf Mutationen untersucht. Die zu untersuchende DNA wurde mittels der PCR vervielfältigt und anschließend der Analyse mit SSCP-Gelen unterzogen. Gerade in diesen beiden Bereichen können viele verschiedene Faktoren zu Verfälschungen oder Vortäuschungen von Mutationen führen. Folglich ist für eine Beurteilung der erzielten Ergebnisse eine genaue Diskussion des experimentellen Systems notwendig:

Die PCR dient der Vervielfältigung spezifischer DNS-Abschnitte. Sie ist einfach in der Durchführung und findet deshalb zunehmend breite Anwendung in Forschung und Diagnostik. Das Prinzip beruht darauf, daß das hitzebeständige Enzym Taq-Polymerase sich der Einzelstrang-DNS als Vorlage für die Synthese eines neuen, komplementären Stranges bedient. Dazu benötigt es ein kurzes Stück Doppelstrang DNS, um die Synthese zu beginnen. Durch Zugabe eines Primers legt man den Startpunkt der DNS-Synthese fest und kann damit die taq Polymerase gezielt für die Synthese eines speziellen DNS-Bereichs einsetzen (s. Material und Methoden). Beim Anfügen von Nukleotiden an die wachsende DNS Kette, können der taq Polymerase Fehler unterlaufen. Während die Taq in vitro etwa alle 2×10^4 gebildete Nukleotide ein falsches Nukleotid einbaut, beträgt die Fehlerrate in einer lebenden Zelle ein Falsches auf 1×10^9 gebildete Nukleotide (Watson et al., 1993). Die Zelle verfügt über Korrekturmöglichkeiten, die falsch eingebaute Base zu entfernen. Die Taq-Polymerase dagegen besitzt keine korrigierende 3'-5'-Exonuklease Aktivität, so daß eine im Laufe der Replikation falsch eingebaute Base ebenfalls mit abgelesen und vervielfältigt wird. Wird nun das PCR-Produkt mit den fehlerhaft synthetisierten Strängen z.B. auf SSCP-Gele aufgetragen, so können diese auffällige Muster zeigen, die auf eine falsch eingebaute Base und nicht auf eine Mutation zurückzuführen sind. Um dies voneinander zu unterscheiden, müssen die betreffenden DNS Proben erneut amplifiziert werden. Es ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß bei der erneuten Amplifizierung die Taq nicht wieder an derselben Stelle eine falsche Base einbaut. Bei dieser Arbeit könnten sich Fehler der Taq ausgewirkt haben. Die zunächst in der SSCP auffälligen Proben konnten teilweise nach einer erneuten Amplifizierung nicht bestätigt werden. Ihr SSCP Muster zeigte nach Wiederholung ein dem Wildtypen entsprechendes Muster (Abb.3.7.).

Eine weitere Fehlerquelle der PCR liegt in der Kontamination des PCR-Ansatzes. Gerät unbemerkt Fremd-DNS in den Ansatz, so wird diese ebenfalls amplifiziert und verfälscht folglich die Ergebnisse. Aus diesem Grunde wird bei jedem PCR-Ansatz eine sogenannte Negativkontrolle durchgeführt. Dabei handelt es sich um den gleichen Ansatz ohne Gabe von DNS. Läßt sich nach der PCR eine Amplifikation nachweisen, so kann von einer Kontamination ausgegangen werden.

Mit der SSCP Technik lassen sich in kurzer Zeit eine große Anzahl DNS Proben auf Mutationen untersuchen. Es handelt sich dabei um ein einfaches und relativ empfindliches Verfahren, bei dem man sich die Beweglichkeit einzelsträngiger DNS (single strang DNS) in der Elektrophorese zunutze macht. Die elektrophoretische Beweglichkeit hängt nicht nur von der Länge der Molekülkette ab, sondern auch von der Konformation, die durch die Basensequenz des amplifizierten Stückes bestimmt wird (Orita & Sekiye, 1988). Veränderungen in der Basenabfolge führen demnach zu einer anderen Sekundärstruktur der ssDNS mit veränderter Beweglichkeit auf dem aufgetragenen nicht denaturierenden Gel. Durch spezifische Färbungen findet diese als Bandenmuster ihren sichtbaren Ausdruck. Das genaue Bandenmuster hängt stark von den Versuchsbedingungen ab. Die Sensitivität der SSCP Analyse ist von verschiedenen Faktoren abhängig, die im Folgenden beschrieben werden:

1. Größe der analysierten Sequenz: Die optimale Länge der DNS-Abschnitte sollte zwischen ca. 155 und 210 Basenpaaren betragen (Sheffield et al., 1993). Dazu wurden DNS Abschnitte unterschiedlicher Länge auf Mutationen untersucht. Es konnten in dem empfohlenen Längenbereich die meisten, entsprechend 97% Mutationen detektiert werden. In darüberliegenden Längenbereichen sank die Detektionsrate. Entsprechend der Empfehlung wurde in dieser Arbeit die Länge der zu amplifizierenden Fragmente gewählt. Exons mit einer darüber hinausgehenden Länge wurden von uns in kleinere Abschnitte unterteilt.

2. Art der benutzten Primer: Sheffield et al. zeigten, daß die benutzten Primer ebenfalls Einfluß auf die Sensitivität der Methode haben. Dazu benutzten sie DNS-Fragmente gleicher Länge und variierten nur die Primer. Die Primer setzen an Sequenzen an, die zu beiden Seiten der zu untersuchenden Bereiche liegen. Je nach Primer werden unterschiedliche Basenfolgen abgelesen. Um einen DNS Abschnitt vollständig zu erfassen, empfehlen Sheffield et al., deshalb den zu untersuchenden Abschnitt mit verschiedenen Primern überlappend zu amplifizieren. Diese Empfehlung wurde von uns bei über 200 bp langen Exons befolgt.

3. Zusammensetzung des Polyacrylamidgels: Hayashi et al. konnten den Einfluß aufzeigen, den das Ausmaß der Vernetzung von Acrylamidmonomeren auf die Sensitivität der Methode ausübt (Hayashi et al., 1991). Dazu bestimmten sie das Verhältnis von Methylenebisacrylamid zu Acrylamid-Monomeren in den Gelen. Ist die Methylenebisacrylamid-Konzentration hoch, so folgt daraus eine starke Vernetzung, das Gel wird fester und die Sensitivität der Mutationserkennung sinkt und umgekehrt.

Die Gesamtkonzentration des Polyacrylamids im Gel hat dagegen Auswirkungen auf die Bandentrennung. Je niedriger die Polyacrylamidkonzentration, desto besser lassen sich die Banden trennen. Bei einer zu geringen PAA-Konzentration dagegen, verlieren die Gele an Stabilität und reißen z.B. beim Färben leichter ein. Es wurde von uns eine 11% Konzentration benutzt.

4. Temperatur und Glycerolkonzentration: Die Glycerolkonzentration hat ebenfalls Einfluß auf die Sensitivität der Methode. So gibt es Mutationen, die sich in Gelen mit einer 10% Glycerol Konzentration darstellen lassen (s. Abb. 3.23), läßt man das Glycerol jedoch weg, so lassen sich die Mutationen nicht mehr nachweisen (Gele nicht gezeigt). Leider ist es nicht möglich, Vorhersagen darüber zu treffen, welche Mutation bei welcher Glycerolkonzentration darstellbar ist. Hinzu kommt, daß man im Voraus nicht weiß, nach was für Arten von Mutationen man sucht. Aus den genannten Gründen werden die zu untersuchenden Proben unter verschiedenen Gelbedingungen untersucht, um ein möglichst breites Spektrum an Mutationen zu erkennen. Neben der genannten Glycerolkonzentration wirkt sich auch die umgebende Temperatur auf die Sensitivität der Gele aus. Ähnlich wie mit der Glycerolkonzentration läßt sich auch hier keine optimale Temperatur vorhersagen. Deshalb ist es wichtig, die Proben unter verschiedenen Temperaturen zu untersuchen. Zu beachten ist, daß eine zu hohe Temperatur zu einer Denaturierung der ssDNS führt, wodurch sie für eine weitere Analyse unbrauchbar wird.

All diese Einflußgrößen wurden versucht zu optimieren, indem in dieser Arbeit die Analysen unter verschiedenen Gelbedingungen durchgeführt wurden. Trotzdem ist anzunehmen, daß bei einer Routineuntersuchung eines Kollektivs mit einer unbekanntem Anzahl von Mutationen, wie es in dieser Arbeit der Fall war, die Sensitivität der Methode geringer ausfällt als bei der Untersuchung eines Kollektivs mit bekannter Mutationsstruktur. Es besteht die Möglichkeit, daß vorhandene Genveränderungen nicht festgestellt wurden.

Je höher der Prozentsatz der aufgedeckten Mutationen, also die Sensitivität, desto besser ist die verwendete Methode. Allerdings nimmt die Aussagefähigkeit der Methode ab, wenn das untersuchte Patientenkollektiv zu klein ist. Deshalb ist auch die Anzahl der untersuchten Personen eine wichtige Größe, die berücksichtigt werden muß. Die Sensitivität der Methode wird auch davon beeinflusst, ob den Untersuchern die Art und Anzahl der zu detektierenden Mutationen bekannt sind, weil ihnen dies ein gezielteres suchen ermöglicht. Ist es, wie in dieser Arbeit nicht der Fall, so ist von einer geringeren Sensitivität auszugehen.

Anhand des SSCP Musters läßt sich keine Aussage über die Art der Mutation treffen. Um eventuelle Mutationen beurteilen zu können, müssen die entsprechenden Proben sequenziert werden.

Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollte man einen Gedanken nicht außer acht lassen: Konkrete Angaben über die Sensitivität und Spezifität unserer Ergebnisse lassen sich nur eingeschränkt machen, denn es wurden nur die positiven Proben, sowie nur eine negative Probe als Kontrolle sequenziert. Da die restlichen negativen Proben nicht sequenziert wurden, ist nicht geklärt, wie viele negative bzw. falsch negative Proben vorhanden waren.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Genabschnitt 3B des Exons 3 und Exon 8 des PPAR-_α-Gens eines HLP-Kollektives auf Mutationen untersucht. Es sollte geklärt werden, in welchem Ausmaß Mutationen, die erwartungsgemäß mit veränderter Struktur und Funktion des PPAR einhergehen, die Lipidkonstellationen der Merkmalsträger beeinflussen. Weiterhin sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit Strukturveränderungen zu einem verminderten Ansprechen auf Fibrate führen.

Die zu untersuchenden Genabschnitte konnten mit der PCR erfolgreich vervielfältigt werden (s. Abb. 3.3. und Abb. 3.4.) Bei der SSCP-Analyse des Exons 3 konnte im Kühlraum ohne Zugabe von Glycerol im Genabschnitt 3B eine Veränderungen in den Proben D128, D170 und D182 dargestellt werden (s. Abb. 3.7.). Nicht sichtbar waren diese Veränderungen bei Raumtemperaturen mit Glycerol (s. Abb. 3.8.). Um eine Mutation zu verifizieren, wurden die betreffenden Proben sequenziert. Bei dieser Analyse konnte keine Veränderung der molekularen Basensequenz detektiert werden (s. Abb. 3.18.). Da die Sequenzierung eine sensitive Analyse für Genabschnitte darstellt, kann man davon ausgehen, dass die in

Abbildung 3.7. gefundenen Veränderungen Artefakte oder Verunreinigungen (s.o.) darstellen und keine Mutation in diesem Genabschnitt zeigen. Entsprechend konnten die gezeigten Veränderungen nicht reproduziert werden.

Auch in Exon 8 konnten durch die SSCP-Analyse Variationen der DNA-Banden im Genabschnitt 8B dargestellt werden (s. Abb. 3.12.). Es zeigten sich bei Raumtemperatur unter Zugabe von Glycerol bei den Proben D308 und D521 nur zwei stark ausgeprägte Banden. Beim weiteren Screening im Kühlraum zeigten sich diese Veränderungen nicht mehr (s. Abb. 3.14.). Da diese Tatsache eine Mutation in diesem Genabschnitt nicht ausschließt, konnte wiederum nur eine Sequenzierung eine tatsächliche genetische Veränderung verifizieren. In der Sequenzierung (s. Abb. 3.18.) konnten bei den beiden auffälligen Proben keine Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden. Es ist deshalb davon auszugehen, daß die beschriebenen Veränderungen am ehesten als Artefakte anzusehen sind. Eine Reproduktion der Veränderungen war nicht möglich.

Abschließend lässt sich sagen, daß sich keine Mutation in diesen untersuchten Genabschnitten des PPAR-_α-Gens finden ließ. Folglich kann eine Mutation in diesen Bereichen nicht als Erklärung für veränderte Lipidwerte gegenüber den Wildtypen oder für ein Versagen der Fibrattherapie bei diesen Patienten herangezogen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Exon 2 und 5 des PPAR-_α-Gens auf Mutationen untersucht. Dabei war zu klären, ob der in Exon 5 vorbeschriebene Polymorphismus L162V mit der gleichen Häufigkeit in der Allelfrequenz in unserem Adipositas permagna Kollektiv nachzuweisen ist, wie sie für ein HTG- bzw. ein gesundes Vergleichskollektiv von einer Arbeitsgruppe unseres Labors beschrieben wurde. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Variante des PPAR-_α mit Veränderungen des Lipoprotein-Lipid-Profiles einhergeht und zu der Entwicklung eines Typ II Diabetes beisteuert. Aus Abbildung 3.19. geht hervor, daß Exon 2 des PPAR-_α-Gens zunächst erfolgreich amplifiziert werden konnte. Bei der folgenden Analyse von Exon 2 ließ sich im Kühlraum ohne Glycerol bei neun Proben eine zusätzliche Bande im Vergleich zu den Wildtypen nachweisen (s. Abb. 3.21). Interessanterweise konnte diese Veränderung bei den betreffenden Proben bei Raumtemperatur mit Glycerol nicht lokalisiert werden (s. Abb 3.22). Die anschließende Sequenzierung stellte einen Basenaustausch in Intron

2 dar. Abbildung 3.25. zeigt ein Guanosin-Nukleotid an Position 11 vom Exon/Intron Übergang an in 3' Richtung gezählt. Der Wildtyp besitzt an dieser Stelle ein Adenosin-Nukleotid (siehe auch Genomstruktur im Anhang dieser Arbeit). Die Mutation tritt in einer Häufigkeit von 13,2 % auf. Dies entspricht der in der Literatur angegebenen Häufigkeit bei einem HTG-Patientenkollektiv und einer gesunden Kontrollgruppe (veröffentlichte Daten einer Arbeitsgruppe des Labors Beisiegel). Interessanterweise wirken sich die Mutationen in diesem Bereich nicht auf das Lipidprofil der betreffenden Patienten aus (s. Tabelle 3.7. und Abb. 3.26.). Mögliche Erklärungen für diesen Effekt könnten sein: 1) Für das alternative Spleißen gibt es in den meisten Genen eine Konsensus Sequenz, welche die beiden letzten Exonbasen und die ersten beiden Intronbasen umfasst. Da unsere Veränderung zu weit von dem Exon/Intron Übergang entfernt liegt, ist keine Konsequenz für das regelrechte Spleißen der mRNA und damit auch nicht für die Funktion des Proteins zu erwarten. 2) Weiterhin ist bekannt, daß die Patienten für dieses Merkmal heterozygot sind, so daß sich diese bestehende Mutation nicht auswirkt. Dieses würde bedeuten, dass die Mutation an sich zu einer Veränderung des Lipidstatus führen könnte. Aufgrund der Heterozygotie würde jedoch dieser Effekt nicht zum Vorschein kommen. Interessant wäre zu beobachten, ob ein auf dieses Merkmal homozygoter Patient eventuell Lipidveränderungen aufweisen würde. Dies liefert eine mögliche Erklärung, warum Merkmalsträger und Wildtypen keine signifikanten Unterschiede im Lipidprofil aufweisen.

Aus Abbildung 3.20. geht hervor, dass Exon 5 erfolgreich amplifiziert werden konnte. Bei der folgenden Analyse von Exon 5 des PPAR_α-Gens ließ sich im Kühlraum ohne Glycerol bei zehn Proben eine zusätzliche Bande im Vergleich zu den Wildtypen nachweisen (s. Abb. 3.28). Interessanterweise konnte diese Veränderung bei neun Proben auch bei Raumtemperatur mit Glycerol lokalisiert werden (s. Abb 3.27). Die Sequenzierung der bei der Analyse von Exon 5 auffälligen Proben ergab ebenfalls einen Basenaustausch. Dieser liegt an Position 115 im Exonbereich in 3'Richtung gezählt. Das beim Wildtypen vorliegende Cytosin-Nukleotid wurde gegen ein Guanosin ausgetauscht (s. Abb. 3.29., s. Genomstruktur im Anhang). Der Basenaustausch findet an Position 1 eines Basentriplets statt, und führt deshalb zu einem Aminosäureaustausch. Die Aminosäure Leucin wird durch Valin ersetzt. Dies entspricht dem bekannten Polymorphismus L162V (Evans et al., 2001). Aus dieser Mutation könnten sich mögliche strukturelle und damit auch funktionelle Veränderungen für den PPAR ergeben. Somit

könnte diese PPAR-₂-Variante einen direkten Einfluß auf den Lipidmetabolismus der Merkmalsträger haben (s. Einleitung).

Um dieser Frage nachzugehen wurden die Lipidwerte der 72 untersuchten Patienten mit Adipositas permagna genauer betrachtet. Auf den ersten Blick ergab die Untersuchung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtypen und den Merkmalsträgern bezüglich ihrer Lipidwerte. (s. Tabelle 3.9.). Geringe Unterschiede konnten bei den TG- und HDL-Werten detektiert werden. Die Merkmalsträger zeigten hier geringere TG-Werte und leicht erhöhte HDL-Konzentrationen. Betrachtet man jedoch die Signifikanz *p* dieser Werte (s. Tabelle 3.9.), so ergibt sich kein maßgeblicher Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und diesen Lipidwerten. Diese Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen von Evans et al, der ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Serum-Lipidwerten und den L162V-Polymorphismus entdecken konnte (Evans et al., 2001).

Interessant zu betrachten ist in diesem Zusammenhang eine kleine Gruppe von acht Diabetikern innerhalb der untersuchten Gesamtgruppe. In dieser Gruppe wiesen drei Personen den L162V Polymorphismus auf. Dabei fiel zunächst auf, daß die Merkmalsträger im Mittel zehn Jahre jünger waren als die homozygoten Wildtypen. Bei genauerer Betrachtung der Blutparameter fiel ein Wert heraus: Die diabetischen Merkmalsträgern zeigten im Vergleich zu den diabetischen Probanden ohne Polymorphismus einen deutlich erhöhten Leptin-Mittelwert (s. Tab. 3.10). Die Mögliche Assoziation von diabetischen Merkmalsträgern mit Leptin ließ sich dadurch untermauern, dass nicht diabetische Merkmalsträger im Gegensatz zu ihren Wildtypen einen deutlich geringeren Leptinspiegel aufwiesen (s. Tab. 3.11). Der Polymorphismus L162V schien nur bei Diabetikern einen Einfluß auf den Leptinwert zu haben.

Diese mögliche Erkenntnis ist daher sehr interessant, da Leptin über einen komplexen Regelkreis zu einer Reduzierung der Nahrungsaufnahme und zu einer Verminderung des Übergewichtes führt. Folglich müsste Leptin einen positiven Einfluß auf den Lipidstatus der diabetischen Merkmalsträger haben. Betrachtet man nun die TC-, HDL- und LDL-Konzentrationen der diabetischen Merkmalsträger (Tab. 3.10.) so konnte eine leichte Senkung der TC-Werte und eine deutliche Verminderung der LDL-Werte detektiert werden. Die HDL-Konzentration stieg hingegen an, so daß ein positiver Einfluß bestätigt und so diese Hypothese

unterstützen könnte. Interessanterweise zeigten die Merkmalsträger ohne DM II im Vergleich zu den Wildtypen keine so deutlichen Unterschiede der Lipidwerte (s. Tab.3.11).

Eine Ausnahme macht die TG-Konzentration, die bei den Merkmalsträgern mit DM II höher war als bei den Wildtypen.

Obwohl bei den Diabetikern mit dem Polymorphismus ein deutlicher lipidsenkender Einfluß dargestellt werden konnte, waren die aufgezeigten Unterschiede zwischen Merkmalsträgern und Wildtypen nicht signifikant (s. Tab. 3.10 und 3.11.).

Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen von Vohl et al. Er beschrieb die L162V-Mutation im Exon 5 des PPAR α -Gens von Diabetikern und Nicht-Diabetikern. Dabei konnte er keinen Zusammenhang zwischen dem L162V-Polymorphismus, TC, HDL, Cholesterin, ApoA1 und dem BMI feststellen (Vohl et al., 2000). Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen, bei denen die Merkmalsträger, unabhängig von DM, durchweg niedrigere ApoB- Spiegel aufwiesen als die Wildtypen, beschrieb Vohl bei den Merkmalsträgern - unabhängig von DM - höhere Plasma ApoB-Spiegel (Vohl et al., 2000). Er konnte so einen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und einer Hyperapobetalipoproteinämie aufweisen, sowohl bei Gesunden als auch bei DM Typ II Personen. Diese Tendenz konnte er auch für das LDL- Cholesterin nachweisen.

Flavell et al. untersuchte ebenfalls den Zusammenhang zwischen Polymorphismus und Serum-Lipid-Spiegel (Flavell et al., 2000). Die Untersuchung wurde an 124 Patienten mit DM Typ II durchgeführt. Er fand im Gegensatz zu Vohl einen signifikanten Zusammenhang zwischen Polymorphismus und TC, HDL, LDL-Cholesterin und ApoA1 (Flavell et al., 2000) und leicht erhöhte Werte des Apo B. Dagegen konnte er in einer Gruppe von 2508 Gesunden keinen Zusammenhang zwischen Polymorphismus und Serum-Lipiden herstellen. Dies würde bedeuten, dass sich der L162V Polymorphismus nur bei Diabetikern auswirken würde, was wiederum unseren Beobachtungen entsprechen würde (s.o.).

Evans et al. führte Untersuchungen mit 464 DM Typ II und 248 Nicht-DM Typ II Patienten durch. Er entdeckte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Polymorphismus und TC, HDL, Cholesterin und ApoA1 bei DM Typ II. Hingegen konnte er in einer kleinen Gruppe von übergewichtigen Merkmalsträgern mit hyperglykämischen Serumwerten einen signifikant erhöhten ApoB Spiegel aufweisen. Weiterhin beobachtete er bei dieser Gruppe, daß die Träger des Polymorphismus L162V-Allels einen signifikant niedrigeren BMI als die Nicht-Träger

aufwiesen. Dagegen wurde kein direkter Effekt des Polymorphismus bei Nicht-Diabetikern beobachtet (Evans et al., 2001). Er folgerte daraus, dass nur bei Anwesenheit von Diabetes mellitus II die Träger des L162V einen BMI senkenden Effekt haben könnten.

Analysiert man daraufhin die BMI Werte der untersuchten Diabetiker und Nicht-Diabetiker, so konnte der beschriebene Effekt in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (s. Tabelle 3.10/3.11).

Diese Arbeit konnte weiterhin zeigen, dass der L162V-Polymorphismus in Exon 5 des PPARGens bei Adipositas permagna mit der gleichen Häufigkeit auftrat, wie in der Literatur beschrieben (Flavell et al., 2000; Vohl et al., 2000; Evans et al., 2001). Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Frequenz zwischen Merkmalsträgern und Wildtypen.

Versucht man nun die verschiedenen Beobachtungen zusammenzubringen, so könnte man folgende Hypothese aufstellen: Der Polymorphismus L162V scheint keinen Einfluß auf den Lipidkatabolismus der Patienten zu haben, da keine signifikanten Unterschiede der Lipidparameter entdeckt werden konnten. Jedoch scheint sich der Polymorphismus unter metabolischen Streß, wie ihn der DM II für den Organismus darstellt, auf die Lipidwerte auszuwirken. Einerseits scheint es hier durch den Polymorphismus zu einer Beeinflussung der TC-, LDL- und HDL-Werte zu kommen, was in dieser Arbeit nur latent gezeigt werden, jedoch von Flavell et al. untermauert werden konnte.

Andererseits beobachtete Evans einen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und einer Verringerung des BMI bei einigen diabetischen Merkmalsträgern. In diesem Zusammenhang könnte auch der erhöhte Leptinspiegel bei diabetischen Merkmalsträgern eine wichtige Rolle spielen.

Bisher konnte nicht eindeutig festgestellt werden, in welcher Form sich der Polymorphismus im PPAR-Gen unter metabolischen Streß auswirkt. Dazu gibt die Literatur (Flavell et al., 2000) verschiedene Beobachtungen wieder, die bis heute noch nicht in einem kausalen Zusammenhang dargestellt werden konnten. Dieses zu erforschen und eine Erklärung der beschriebenen Veränderungen auf den Lipidstoffwechsels zu liefern, bedarf es weiterer Untersuchungen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Patientenkollektive auf Mutationen im PPAR- α -Gens untersucht. Die DNS von 44 Patienten mit Hyperlipidämie bzw. 72 Patienten mit Adipositas permagna wurde jeweils mittels der PCR amplifiziert und anschließend einer SSCP-Analyse unterzogen. Bei Verdacht auf eine Mutation wurde der betreffende DNS-Abschnitt sequenziert. Exon 2, 3, 5 und 8 wurden bei Raumtemperatur unter Zugabe von Glycerol bzw. im Kühlraum bei 4° ohne Zugabe von Glycerol analysiert. Zusätzlich wurde Exon 8 im Kühlraum bei 4°C mit Glycerol untersucht.

Für die Exons 3 und 8 konnten unter den durchgeführten Standardbedingungen einige Veränderungen innerhalb des spezifischen Bandenmusters erkannt werden. Die Sequenzierung zeigte keine Veränderung der molekularen Basensequenz, so daß die gefundenen Veränderungen Artefakte oder Verunreinigungen darstellen und folglich nicht als Mutation zu werten sind. Demzufolge kann eine Mutation nicht als Erklärung für veränderte Lipidwerte gegenüber den Wildtypen oder für ein Versagen einer Fibrattherapie herangezogen werden.

Bei der Analyse von Exon 2 ließ sich bei neun Proben eine zusätzliche Bande im Vergleich zu den Wildtypen nachweisen. Die anschließende Sequenzierung stellte einen Basenaustausch an Position 11 im Exon-Intron-Übergangsbereich dar, bei dem es zu einem Austausch eines Adenosin-Nukleotids in ein Guanosin-Nukleotid kam. Dieser Polymorphismus zeigte sich mit einer Häufigkeit von 13,2 %, was den in der Literatur beschriebenen Werten entspricht. Da die Veränderung in einer Intronsequenz liegt, hat sie folglich keinen Einfluß den Lipidstoffwechsel der Merkmalsträger.

Bei der Analyse von Exon 5 des PPAR α -Gens ließ sich bei zehn Proben (15,6 %) eine zusätzliche Bande im Vergleich zu dem Bandenmuster der Wildtypen nachweisen. Die Sequenzierung der bei der Analyse auffälligen Proben ergab einen Basenaustausch. Der Basenaustausch findet an Position 1 eines Basentriplets statt, und führt zu einem Aminosäureaustausch von Leucin zu Valin. Es konnte gezeigt werden, dass dieser bekannte Polymorphismus L162V in Exon 5 des PPAR- α Gens bei Patienten mit Adipositas permagna mit der gleichen Häufigkeit auftritt wie bei Patienten mit HTG und einem gesunden Vergleichskollektiv früher von einer Arbeitsgruppe unseres Labors beschrieben. Die Untersuchung ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtypen und Merkmalsträgern bezüglich ihrer Lipidwerte. Der Polymorphismus L162V scheint sich jedoch unter metabolischem Streß, wie ihn der Diabetes mellitus für den Körper darstellt, auf die Lipidwerte auszuwirken.

5. Literaturverzeichnis

1. **Assmann G., Brewer HB. Jr.:** "Genetic (primary) forms of hypertriglyceridemia. AmJ. Cardiol. **1991**;68:13A-16A.
2. **Austin MA.:** "Plasma Triglyceride and Coronary Heart Disease", **1991**, Arteriosclerosis and Thrombosis, Vol. 11, No.1, pp.2
3. **Auwerx J., Schoonjans K., Fruchart F-C., Staels B.:** "Transcriptional control of triglyceride metabolism: fibrates and fatty acids change the expression of the LPL and apo C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR", Atherosclerosis, 124 Suppl. **1996**, pp. 29-37
4. **Auwerx J, Leroy P, Schooljans K :** "LPL: recent contributions from molecular biology. Crit Rev Clin Lab Sci 29: 243-268, **1992**
5. **Beisiegel U., Weber W., Ihrke G., Herz J. and Stanley K.:** "The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein" Nature, **1989**, Vol. 341, pp. 162
6. **Beisiegel U., Weber W., Bengtsson-Olivecrona G.:** "Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein", Proc.Natl.Acad.Sci.USA, **1991**, Vol. 88, pp. 8342
7. **Beisiegel et al.:** "Hypertriglyzeridämie und Arteriosklerose", Der Internist, **1995**, Vol.36, pp. 357
8. **Beisiegel, U.:** Receptors for triglycerid-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. Curr.Opin.Lipidol. 6, 117-122 ,**1995**
9. **Borensztajn J. et al.:** "The apoprotein B-independent hepatic uptake of chylomicron remnants", Biochemical Journal, **1982**, Vol. 204, pp. 609
10. **Bradley WA., Gianturco SH.:** "Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerosis: pathophysiological considerations", Journal of Internal Medicine, **1994**, 236 (Suppl. 736), pp. 33-39
11. **Braun EA., Severson DL:** "Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase", Biochemical Journal, **1992**, Vol. 287, pp. 337
12. **Brown ML., Tall AR.:** "Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins", Nature, **1989**, Vol. 342, pp. 448
13. **Bruckert E. et al.:** "Interrelationship of plasma triglyceride and coagulant factor VII levels in normotriglyceridemic hypercholesterolemia", **1988**, Atherosclerosis, Vol. 75, pp. 129

14. **Brun RP. et al.**: "PPAR_α and the control of adipogenesis", *Current Opinion in Lipidology* 8, 1997, pp.212-218
15. **Brunzell JD.**: "Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome" in CR.Scriver et al.: "The Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease", 7th ed., chap. 59, 1989
16. **Brunzell JD., Albers JJ., Chait A., Grundy SM, Gorszek E., Mc Donald GB.**: "Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia on monogenic familial hypertriglyceridemia. *J. Lipid Res.*24, 1983, pp.147-155
17. **Buchard C, Rice T, Lemieux S, Despres JP, Perusse L, Rao CD.**: Major gene for abdominal visceral fat area in the Quebec Family Study. *Int J Obesity* ,1996, 20: 420-427
18. **Burniat W.M.**: "The Genetics of Childhood Obesity", In: P.L.Giorgi et al, „The obese Child“, *Pediatric Adolescence Med. Basel, Karger*, 1992, Vol 2, pp. 21-31
19. **Cardot P, Chambaz J, Kardassis D, Cladaras C Zannis VI.**: Factors participating in the liver-specific expression of the human apolipoprotein A II gene and their significance for transcription, 1993, *Biochemistry* 32, 9080-9093.
20. **Chagnon Y.C. et al.**: "Familial aggregation of obesity, candidate genes and quantitative trait loci", *Current opinion in Lipidology* 8, 1997, pp. 205-211
21. **Chapman MJ., Bruckert E.**: "The atherogenic role of triglycerides and small, dense low density lipoproteins: impact of ciprofibrate therapy", *Atherosclerosis*, 1996, Suppl. 124, pp. 21-28
22. **Cianflone K., Sniderman AD. et al.**: "Impaired Response of Fibroblasts from Patients with Hyperapobetalipoproteinemia to Acylation-stimulating Protein", 1990, *Journal of Clinical Investigation*, Volume 85, pp. 722-730
23. **Cianflone K., Sniderman AD.**: "Pathogenesis of Carbohydrate-Induced Hypertriglyceridemia Using HepG2 Cells as a Model System", *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 1992, Vol. 12, pp. 271
24. **Cianflone K. et al.**: "The adipin-acylation stimulating protein system and regulation of intracellular triglyceride synthesis", 1993, *Journal of Clinical Investigation*, Volume 92(3), pp. 1543-1547
25. **Cianflone K., Sniderman AD.**: "Role of the neutral lipid accessible pool in the regulation of secretion of apo B-100 lipoprotein particles by HepG2 cells", *Journal of Lipid Research*, 1995, 36(12):2513-28
26. **Cianflone K., Sniderman AD.**, in Schwandt, Richter: "Handbuch der Fettstoffwechselstörungen", Schattauer Verlag, 1995, S.182ff

27. **Criqui MH. et al.:** "Plasma Triglyceride Level and Mortality From Coronary Heart Diseases", **1993**, New England Journal of Medicine, 328:1220-5
28. **Considine RV, Sinha MK, Heiman MI, Krianchiunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF:** Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl. J Med.*, 334, 1996, 292-295.
29. **Dammerman M, Sandkuijl NA, Halaas JL, Chung W, Breslow JL:** An apolipoprotein CIII haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3' untranslated region polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1993, 4562-4566.
30. **Davignon J., Cohn JS:** "Triglycerides: a risk factor for coronary heart disease", **1996**, *Atherosclerosis*, 124 Suppl., pp.57
31. **De Silva HV, Lauer SJ, Wand J, Simonet WS, Weisgraber KH, Mahley RW, Talyor JM :** Overexpression of human apolipoprotein C III in transgenic mice results in an accumulation of apolipoprotein B48 remnants that is corrected by excess apolipoprotein E. *J Biol Chem* 269, 1994, 2324-2335.
32. **Diehm C, Schettler G. (Hrsg.), Dietze G.:** „Das Metabolische Syndrom“, Medion-Verlag München, **1995**
33. **Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W:** Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68, **1992**, 879-887.
34. **Ducimetiere P. et al.:** "The pattern of subcutaneous fat distribution in middle aged men and the risk of coronary heart disease: The Paris Prospektive Study", *Int J Obes* , **1986**, No.10, S 229-240
35. **Eckhout GV.:** "Silastic Ring Vertical Gastroplasty", *Am J Surg*, **1986**, No.152, S. 7113-716
36. **Eisenberg S.:** "Lipoprotein abnormalities in Hypertiglyceridemia: Significance in atherosclerosis", **1987**, *American Heart Journal*, Vol. 113, Number 2 Part 2, pp. 557
37. **Elbers JMH, Asscheman H, Seidell JC, Frolich M, Meinders AE, Gooren LJG:** reversal of the sex difference in serum leptin levels upon cross-sex hormone administration in transsexuals. *J Clin Endocrinol Metab* 82, **1997**, 3267-3270.
38. **Evans D. et al.:** "A polymorphism, L162V, in the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) gene is associated with lower body mass index in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus", *J Mol Med*, **May 2001**, 79(4):198-204

39. **Evans D. et al.**: "Association between polymorphisms in candidate genes and morbid obesity", *Int J Obes Relat Metab Disord*, **May 2001**, 25 Suppl 1:S19-21
40. **Evans D. et al.**: "Association between the P12A and c1431t polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) gene and type 2 diabetes", *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **2001**, 109(3):151-4
41. **Evans RM.**: "The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily", *Science*, **1988**, Vol. 240, pp. 889
42. **Felts JM., Itakura, H., and Crane, RT.**: "The mechanism of assimilation of constituents of chylomicrons, very low density lipoproteins and remnants-a new theory. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*", (**1975**), 66,1467-1475.
43. **Flavell DM, Torra JP et al.**: "Variation in the PPAR α gene is associated with altered function in vitro and plasma lipid concentrations in type II diabetic subjects", 2000, *Diabetologia* 2000 (in press)
44. **Flegal KM. et al.**: "Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends 1960-1994, *Int J Obesity*, **1998**, No.22, S. 39-47
45. **Frederich RC, Harman A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS**: Leptin level reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Mol* 1, **1995**, 1311-1314.
46. **Friedman J.M., Leibel RL., Bahary N.**: "Molecular mapping of obesity genes", *Mammalian Genome* 1, **1991**, S. 130-144
47. **Gabrielli O., Coppa GV, Giorgi PL.**: „Syndromic Obesity“, In: Giorgi PL et al *The obese Child. Pediatric Adolesc Med. Basel, Karger*, **1992**, Vol 2, S. 32-43
48. **Gearing KL. et al.**: "Structure of the Mouse Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha Gene", **1994**, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 199, No.1, pp. 255
49. **Ginsberg HN.**, "Synthesis and secretion of apolipoprotein B from cultured liver cells", **1995**, *Curr.Opin.Lipidol.* 6,p.275-280.
50. **Glueck CJ., MJ. Mellies, L. Srivastava et al.**: "Insulin, obesity and triglyceride interrelationships in sixteen children with familial hypertriglyceridemia. *Pediatr.Res* 11, **1976**, pp. 13-18
51. **Goff DC., Gotto AM.**: "Störungen des Lipoproteinstoffwechsels und ihre Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System" in P. **Schwandt, WO. Richter**(eds) *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*, Schattauer, Stuttgart **1996** S.104

52. **Goldberg** IJ.: "Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis" *Journal of Lipid Research*, **1996**, Volume 37, pp. 693
53. **Goldstein** JI., **Brown** MS., **Basu** SK: „Receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein in cultured cells“, **1983**, *Method.Enzymol.*98, pp. 241-260.
54. **Gotto** AMJ., **Pownall** H.J., and **Havel** R.J.: "Introduction to the plasma lipoproteins".*Method.Enzymol.* (**1986**) 128, 3-41.
55. **Greiling** H., **Gressner** A.M.: "Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie", Schattauer Verlag, **1994**
56. **Griffin**, B.A. and **Packard**, C.J.: Metabolism of VLDL and LDL subclasses. *Curr.Opin.Lipidol.* 5, **1994**, 200-206.
57. **Hamann** A, **Matthaei** S, **Greten** H: "Durch Dick und Dünn: Neue Erkenntnisse der Adipositasforschung", *Dtsch. Med. Wschr.* 120, **1995**, S. 971-975
58. **Harrison's**: "Principles of Internal Medicine", Thirteenth Edition **1994**, LCAT Deficiency pp. 2069
59. **Hashimoto** T: Individual peroxisomal β -oxidation enzymes. *Ann NY Acad Sci* 386, **1991**, 5-12.
60. **Havel**, R.J., **Eder**, H.A., and **Bragdon**, J.H. () The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J.Clin.Invest.* ,**1955**, 1345
61. **Hayashi** K.: "PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA", 1991, *PCR Methods and Applications, Review*, 1:34-38
62. **Hebebrand** J., **Remschmidt** H.: „Das Körpergewicht unter genetischen Aspekten“, *Medizinische Klinik*, 7/**1995**, S.403-410
63. **Hebebrand** J., **Remschmidt** H.: „Genetische Aspekte der Adipositas“, 9/**1995**, S. 20-24
64. **Herz** J.et al.: "Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor", *EMBO*, Vol. 7, No. 13, pp. 4119, **1995**
65. **Issemann** I., **Green** S.: "Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators", *Nature*, **1990**, Vol. 347, pp. 645
66. **Ito** Y, **Azrolan** N, **O'Connell** A, **Walsh** A, **Breslow** JN: Hypertriglyceridemia as result of human apo C III gene expression in transgenic mice. *Science* 249, **1990**, 790-793.
67. **Johnson** WJ. et al.: "Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins", *Biochemica et Biophysica Acta*, **1991**, 1085, pp. 273
68. **Karlson** P.: "Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler" Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York, **1994**

69. **Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisley GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM:** Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with PPAR-alpha and -gamma. *Proc Natl Acad. Sci USA* 94 , **1997**, 4318-4323.
70. **Klinke R., Silbernagel S.:** "Lehrbuch der Physiologie" Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York, **1994**
71. **Koizumi J. et al.:** "Deficiency of Serum Cholesteryl-Ester Transfer Activity in Patients with Familial Hyperalphalipoproteinaemia", **1985**, *Atherosclerosis*, 58, pp. 175
72. **Kovanen PT., Faust JA., Brown MS., Goldstein JL:** "Low density lipoprotein receptors in bovine adrenal cortex. 1. Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured adrenocortical cells". *Endocrinology* 104, **1979**, pp. 599-609
73. **Kowal RC., Herz J., Goldstein JL., Brown MS et al.:** "Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins", *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **1989**. Vol. 86, pp. 5810
74. **Kowal RC, Herz J., Goldstein JL.:** "Opposing effects of apolipoprotein E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein", *Journal of Biological Chemistry*, **1990**, Vol. 265, pp.10771
75. **Krapp A., Beisiegel U. et al.:** "Structural features in lipoprotein lipase necessary for the mediation of lipoprotein uptake into cells", *Journal of Lipid Research*, **1995**, Vol. 36, pp.2362
76. **Kuzmak LI:** "Stoma Adjustable Silicone Gastric Banding", *Surgical Rounds*, January, **1991**, S. 19-28
77. **Lee SS. et al.:** "Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators", *Molecular Cell Biology*, **1995**, 15(6): 3012-22
78. **Lehmann JM. et al.:** "Peroxisome Proliferator-activated Receptors α and γ are activated by Indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs", *Journal of Biological Chemistry*, **1997**, Vol. 272, No. 6, pp. 3406
79. **Leid M. et al.:** "Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways", *TIBS* 17, October **1992**
80. **Lemberger T, Steals B, Saladin R., Desvergne B, Auwerx J., Wahli W.:** Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene by glucocorticoids, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269: 24527-24530.

81. **Levin BE, Routh VH**: Role of the brain in energy balance and obesity. *Am J physiol.* , **1996**, R 491-R 500.
82. **Liu MS, Jirik F, LeBoeuf RC, Henderson H, Castellani LW, Lusic AJ, Ma Y, Forsythe IJ, Kirk E, Brunzell JD, Hayden MR**: Alteration of lipid profiles in plasma transgenic mice expressing human lipoprotein lipase. *J Biol. Chem* 269, 1994, 11417-11424.
83. **Luoma J, Moestrup SK.**: “Expression of alpha₂-Macroglobulin Receptor/Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein and Scavenger Receptor in Human Atherosclerotic Lesions”, *Journal of Clinical Investigation*, **1994**, Vol.93, pp. 2014
84. **Lupu F., Kruithof K.O.**: “Expression of LDL Receptor-Related Protein/alpha₂-Macroglobulin Receptor in Human Normal and Atherosclerotic Arteries”, *Arteriosclerosis and Thrombosis*, **1994**, 14:1438-1444
85. **Maeda N, Li H, Lee D, Oliver P, Quarfordt SH, Osada J**: Targetted disruption of the apolipoprotein C III gene in mice results in hypertriglyceridemia and protection postprandial hypertriglyceridemia. *J Biol Chem* 269, **1994**, 2324-2335.
86. **Maffei M, Fei H, Lee GH, Dani C, Leroy P, Zhang Y, Proenca R, Negrel R, Ailhaud G, Friedman JM**: Increased expression in adipocytes of ob mRNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, **1995**, 6957-6950.
87. **Mahley RW.**: “Type III hyperlipoproteinemia: The role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism” in: CR.Scriver et al.: “The Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease”, 7th ed., chap. 61
88. **Mahmood M., Mahley R.W.**: “Clearance of Chylomicron remnants by the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein/alpha₂-Macroglobulin Receptor”, *Journal of Biological Chemistry*, **1991**, Vol. 266, No. 21, pp. 13936
89. **Malmendier CL, Lontie JF, Delcroix C, Dubois DY, Magot T, DeRoy L**: Apolipoproteins C II and CIII metabolism in hypertriglyceridemia patients. Effect of a drastic triglyceride reduction by combined diet restriction and fenofibrate administration, *Atherosclerosis* 77, **1989**, 139-149.
90. **Mangelsdorf DJ. et al**: “The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade”, *Cell*, **1995**, Vol. 83, pp. 835
91. **Mangelsdorf DJ., Evans RM.**: “The RXR Heterodimers and Orphan Receptors”, *Cell*, **1995**, Vol. 83, pp. 841

92. **Masuzaki, H, Ogawa Y, Isse N, Satoh N, Okazaki T, Shigemoto M, Morik K, Tamura N, Hosoda K, Yoshimasa Y:** Human obese gene expression. Adipocyte specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 44, **1995**, 855.
93. **Miesenböck G., Patsch JR.:** "relationship of Triglyceride and High-Density Lipoprotein Metabolism", **1990**, *Atherosclerosis Reviews*, Vol. 21, pp. 119
94. **Miller KW and Small D.M:** Structure of triglyceride-rich lipoproteins: An analysis of core and surface phases. In: *Plasma Lipoproteins: New Comprehensive Biochemistry*, 1987, Edited by Gotto, A.M.J., Amsterdam, Elsevier Scienc.
95. **Moestrup SK:** "Distribution of the alpha₂-macroglobulin/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues", *Cell Tissue Res.*, **1992**, Vol.269, pp. 375
96. **Mukherjee R. et al.:** "Human and Rat Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs) Demonstrate Similar Tissue Distribution but Different Responsiveness to PPAR Activators", *Journal of Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **1994**, Vol. 51, No.3/4, pp. 157
97. **Niemeier A., Beisiegel U. et al.:** "VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro", *Journal of Lipid Research* ,**1996**, Vol. 37, pp. 1733
98. **Olivecrona T., Bengtsson-Olivecrona G.** Lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Curr.Opin.Lipidol*, **1993**, 196
99. **O'Malley BW. and Tsai M-J.:** "Molecular Mechanisms of action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members". *Annu.Rev.Biochem.*, **1994**, Vol.63, pp. 451
100. **Orita M., Sekiya T.:** "Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms", **1988**, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, Vol. 86, pp. 2766-2770, Genetics
101. **Ostlund RE, Yang JW, Klein S, Gingerich R.:** Relation between plasma leptin concentration in body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab* 81, **1996**, 3909-3913.
102. **Patch JR.et al.:** "Fenofibrate improves postprandial chylomicron clearance in II B hyperlipoproteinemia", *Clinical Investigator*, **1994**, 72:294-301
103. **Pelleymounter MA.et al.:** „Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice“, *Science*, **1995**, Vol 269, pp. 540-543
104. **Pudel V, Ellrott T.:** "Adipositas therapie: Aktuelle Perspektiven", Georg Thieme Verlag, Stuttgart,**1998**
105. **Rosenbaum M.et al:** „Obesity“, *N Engl J Med*, **1997**, Vol. 337, No. 6, S.396-405
106. **Ross R.:** "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s", **1993**, *Nature*, Vol. 362, pp. 801

107. **Sapone A. et al:** "The human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene: identification und functional characterization of two natural allelic variants, Pharmacogenetics, Jun 2000, 10(4):321-33
108. **Schoonjan K., Staels B. and Auwerx J.:** "Role of the peroxisome proliferator-activated receptor PPAR in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression", Journal of Lipid Research, Volume 37, **1996**, pp. 907
109. **Schoonjans K., Staels B., Auwerx J.:** "The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation", Biochemica et Biophysica Acta, **1996**, 1302, pp. 93
110. **Schoonjans K. et al.:** "PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene", EMBO, **1996**, Vol. 15, pp. 5335-5348
111. **Schwandt P., Richter WO. (eds.):**"Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine". Von GM **Kostner:** In:: Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. S.4-44. Schattauer, Stuttgart 1996
112. **Senftleben U., Felbinger T. und Suchner U.,** "Pathophysiologie der Substratverwertung im Streßstoffwechsel: Bedeutung einer vollständigen hypoenergetischen Ernährungstherapie", Akt. Ernähr.-Med, **1998**, Nr.23, S. 207-223
113. **Shalev A, Meier CA. et al.:** "The Peroxisome ProliferatorActivated Receptor α is a Phosphoprotein: Regulation by Insulin", Endocrinology, **1996**, Vol. 137, No. 10, pp. 4499
114. **Sheffield C. et al.:** "The sensitivity of single strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions", Genomics, **1993**, 16:325-332
115. **Sher T, Yi, HF, Mc Bride OW, Gonzalez FJ:** cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferators-activated receptor. Biochemistry 32 (21), **1993**, 5598-5604.
116. **Shimano H., Namba Y. et al.:** "Secretion-Recapture Process of Apolipoprotein E in Hepatic Uptake of Chylomicron Remnants in Transgenic Mice", Journal of Clinical Investigation, **1994**, Vol. 93, pp. 2215
117. **Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatari T, Ohtanika K, Sato N, Mori M.:** Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. J Endocrinol 154, 1997, 285-292.
118. **Silbernagl S., Despopoulos A.,** "Taschenatlas der Physiologie", 1991, pp.218
119. **Simpson HCR.:** "Hypertriglyceridaemia and Hypercoagulability", April **1983**, The Lancet, pp. 786

120. **Simpson HS., Shepherd J.et al.:** "Postprandial lipemia, fenofibrate and coronary artery disease", *Atherosclerosis*, **1990**, Vol. 85, pp. 193
121. **Skartlien AH.et al.:** "Effect of Alteration in Triglyceride Levels on Factor VII-Phospholipid Complexes in Plasma", **1989**, *Arteriosclerosis*, 9:798-801
122. Personal Communication Bart **Steals**, unpublished data
123. **Steineger HH. et al.:** "Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells", *EJB*, **1994**, 94 0754/1, pp. 967
124. **Stokes J., Garison R., Kannel W.:** „The independent contribution of various indices of obesity to the 22-year incidence of coronary heart disease: The Framingham Study“, In: Vague J. (Ed.)*Metabolic complications of human obesity*, **1985**, Elsevier, Amsterdam, S 49-57
125. **Strachan T., Read A.P.:** *Molekulare Humangenetik*, Spektrum Akademischer Verlag, **1996**, S.14 f
126. **Strickland D.K. et al.:** "Sequence identity between the alpha₂-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this is a multifunctional receptor", *Journal of Biological Chemistry*, **1990**, Vol. 265, pp. 17401
127. **Stunkard A.J. et al.:** "A Twin Study of Human Obesity", *JAMA*, **1986**, Vol. 256, No. 1, S. 51-54
128. **Stunkard A.J. et al.:** "An Adoption Study of Human Obesity“, *New England Journal of Medicine*, **1986**, Vol 314, No. 4, pp. 193-197
129. **Stunkard A.J et al.:** "The Body-Mass Index of Twins who have been reared apart", *N Engl J Med*, **1990**, Vol. 322, No. 21, S. 1483-1487
130. **Snidermann AD., Cianflone K. t al.:** "The acylation-stimulating protein pathway and regulation of postprandial metabolism", **1997**, *Proc.Nutr.Soc.*, Volume 56(2), pp. 703-12
131. **Taels B., Auwerx J.:** "Role of PPAR in the Pharmacological Regulation of Lipoprotein Metabolism by Fibrates and Thiazolidinediones", *Current Pharmaceutical Design*, **1997**, Vol. 3, No. 1,
132. **Takahashi S, Kawarabayasi et al.:** "Rabbit very low density lipoprotein receptor: A low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, Vol. 89, pp.9252
133. **Tsutsumi K, Inoue Y, Shim A, Iwasaki K, Kawamura M, Murase T:** The novel compound NO-1886 increases lipoprotein lipase activity with resulting elevation of high density lipoprotein cholesterol, and in long-term administration inhibits atherogenesis in

- coronary arteries of rats with experimental atherosclerosis. *J Clin Invest* 92, **1993**, 411-417.
134. **Van Barlingen, de Bruin et al.**: "Lipoprotein lipase-enhanced binding of human triglyceride-rich lipoproteins to heparan sulfate: modulation by apolipoprotein E and apolipoprotein C", *Journal of lipid Research*, **1996**, Vol. 37, pp. 754
135. **Ven Murthy et al.**: "Molecular Pathobiology of the Human Lipoprotein Lipase Gene", *Pharmacological Therapy*, **1996**, Vol. 70, No. 2, pp. 101
136. **Vidal-Puig AJ. et al.**: Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gene Expression in Human Tissues", *Journal of Clinical Investigation*, **1997**, 99:2416-2422
137. **Vohl MC et al.**: "Molecular scanning of the human PPAR α gene: association of the L162V mutation with hyperapobetalipoproteinemia, *J Lipid Res*, Jun 2000, 41(6):945-52
138. **Wabitsch M, Blum WF, Muehle R, Braun M, Hube F, Rascher W, Heinze E, Teller W, Hauner A**: Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Invest* 100, **1997**, 808-813.
139. **Wang C.S., McConathy W.J., Kloer H.U., Alaupovic P.**: Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apoC-III. *J.Clin.Invest.* 75, **1985**, 384-390..
140. **Watson JD., Gilman M., Witkowski J., Zoller M.**: "Rekombinierte DNS", Spektrum Akademischer Verlag, 2.Auflage, **1993**
141. **Wayt W., Gibbs**: „Übergewicht: ein Zivilisationsproblem?“, *Spektrum der Wissenschaft*, 11/1996, S. 54-63
142. **Wechsler J.G.**: "Diätetische Therapie der Adipositas", *Deutsches Ärzteblatt*, **1994**, Heft 36, S.1830-1836
143. **Wechsler J.G.**, "Adipositas- Ursachen und Therapie", Blackwell-Verlag, **2002**.
144. **Willnow TE., Herz J.et al.**: "Inhibition of Hepatic Chylomicron Remnant Uptake by Gene Transfer of a Receptor Antagonist", *Science*, **1994**, Vol. 264, pp. 1471
145. **Wirth A**: "Adipositas : Epidemiologie, Ätiologie, Folgekrankheiten, Therapie", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1997**
146. **Wolf A.M und Colditz G.A.**: „The Cost of Obesity“, *Pharmacoeconomics* 5, 1 Suppl. **1994**, pp.34-37

6. Abkürzungsverzeichnis

ACBP	Acyl-CoA Binding Protein
ACO	Acyl-CoA Oxidase
ACS	Acyl-CoA Synthetase
aP2	Adipozyten-Fettsäurebindendes Protein
Apo	Apolipoprotein
AS	Aminosäuren
ASP	Acylierungs-Stimulierendes-Protein
BMI	Körpermaßindex
bp	Basenpaare
cAMP	cycloAdenosinmonophosphat
CE	Cholesterinester
C/EBP	CCAATT/ enhancer binding protein
CETP	Cholesterin Ester Transfer Protein
Chol	Cholesterin
CM	Chylomikronen
CR	Chylomikronen Remnants
CME	cytosolic malic enzym
DBD	DNS-Bindungsdomäne
DM	Diabetes mellitus
dsDNS	doppelsträngige DNS
FABP	Fettsäurebindendes Protein
FAT	Fettsäure Transporter
FATP	Fettsäure-Transport-Protein
FFS	Freie Fettsäuren
FHC	Familiäre Hypercholesterinämie
FHTG	familiäre Hypertriglyzeridämie
FKHL	familiäre kombinierte Hyperlipidämie
FS	Fettsäuren
HDL	High Density Lipoprotein
HL	Hepatische Lipase
HLP	Hyperlipidämie
HRE	Hormone Response Element
HSP	Hitzeschock-Proteine
HSPG	Heparansulfatproteoglycan
HTG	Hypertriglyceridämie

IDDM	Insulin Dependent Diabetes Melitus
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
kb	Kilo Basenpaare
KHK	Koronare Herzkrankheit
LCAT	Lecithin Cholesterin Acyl Transferase
LDL	Low Density Lipoprotein
L-FABP	Leber-Fettsäurebindendes Protein
LP	Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL-receptor-related protein
MCAD	Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NSAID	Nicht-Steroidale Antiphlogistika
OB	Obese-Gen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
RER	Rauhes Endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RXR	9-cis Retinoinsäure-Rezeptor
SSCP	Single Stranded Conformation Polymorphism
ssDNS	single stranded DNS
TG	Triglyceride
TR	Thyroid-Hormon-Rezeptor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
Wt	Wildtyp

Alle hier nicht aufgeführten Abkürzungen wurden im Text nur selten verwendet und sind dann an den entsprechenden Stellen erläutert.

7. Abbildungsverzeichnis	Seite:
Tabelle 1.1.: Einteilung und Eigenschaften der Lipoproteine	2
Abbildung 1.1.: Der Aufbau von Kernrezeptoren und ihre funktionellen Domänen	12
Abbildung 1.2.: Zentrale Rolle des PPAR.	14
Abbildung 1.3.: Zusammenfassung der Gene, die durch PPAR reguliert werden und ihre Rolle im intra- und extrazellulären Lipidstoffwechsel.	20
Tabelle 2.1.: Untersuchte Serumparameter der Studienteilnehmer	27
Tabelle 2.2.: PCR-Ansatz	31
Tabelle 2.3.: Zusammenfassung der PCR-Zyklen	31
Tabelle 2.4.: Primersequenzen mit Basenfolge und Konzentration	32
Tabelle 2.5.: Darstellung der Schritte einer SSCP-Analyse	35
Tabelle 3.1.: Charakterisierung der Patientenkollektive	38
Abbildung 3.1.: Schematische Abbildung der acht Exons des PPAR _α -Gens	39
Abbildung 3.2.: Exon 3 des PPAR _α -Gens. Für die SSCP-Analyse wurde das Exon in zwei Abschnitte unterteilt. Genabschnitt 3A konnte nicht amplifiziert werden.	40
Abbildung 3.3.: PAA Gel mit Darstellung der PCR-Amplifikation des Genabschnittes 3B des PPAR _α -Gens.	41
Abbildung 3.4.: Exon 8 des PPAR _α -Gens. Für die SSCP-Analyse wurde das Exon in die Abschnitte A, B und C unterteilt.	42
Abbildung 3.5.: PAA Gel mit Darstellung der PCR-Amplifikation des Genabschnittes 8A des PPAR _α -Gens.	42
Tabelle 3.2.: Zusammenfassung der Versuchsbedingungen für die SSCP-Analyse von Exon 3 und 8.	43
Abbildung 3.6.: SSCP-Analyse des Genabschnittes 3B bei Raumtemperatur unter Zugabe von Glycerol.	44
Abbildung 3.7.: SSCP-Analyse des Genabschnittes 3B im Kühlraum ohne Glycerol.	45
Abbildung 3.8.: Direkter Vergleich der Probe D182 unter zwei verschiedenen Bedingungen. A) Kühlraum ohne Glycerol B) Raumtemperatur mit Glycerol.	46
Tabelle 3.3.: Zusammenfassung der SSCPs in Genabschnitt 3B unter zwei verschiedenen Versuchsbedingungen.	46

Abbildung 3.9.: Exemplarische Untersuchung auf Mutationen in Genabschnitt 8A bei Raumtemperatur und Zugabe von Glycerol.	47
Abbildung 3.10.: Exemplarische Untersuchung auf Mutationen in Genabschnitt 8A im Kühlraum ohne Zugabe von Glycerol.	47
Abbildung 3.11.: Exemplarische Untersuchung auf Mutationen in Genabschnitt 8A im Kühlraum mit Zugabe von Glycerol.	48
Abbildung 3.12: Exemplarische Untersuchung auf Mutationen in Genabschnitt 8B bei Raumtemperatur unter Zugabe von Glycerol.	49
Abbildung 3.13.: Exemplarische Untersuchung auf Mutationen in Genabschnitt 8B im Kühlraum mit Zugabe von Glycerol.	50
Abbildung 3.14.: Direkter Vergleich der Probe D521 unter zwei verschiedenen Bedingungen. A) Kühlraum mit Glycerol B) Raumtemperatur mit Glycerol.	50
Abbildung 3.15.: SSCP-Analyse des Genabschnittes 8C bei Raumtemperatur mit Glycerol.	51
Abbildung 3.16.: SSCP-Analyse des Genabschnittes 8C im Kühlraum mit Glycerol.	52
Abbildung 3.17.: SSCP-Analyse des Genabschnittes 8C im Kühlraum ohne Zugabe von Glycerol.	52
Tabelle 3.4.: Zusammenfassung der SSCP's in Exon 8 unter drei Versuchsbedingungen	53
Abbildung 3.18.: Sequenzausschnitt des Genabschnittes 3B der auffälligen Probe D170. Die Basenfolge entspricht der bekannten Basenfolge des Wildtypes.	54
Abbildung 3.19.: PAA Gel mit Darstellung der PCR-Amplifikation des Exon 2 des PPAR _α -Gens.	55
Abbildung 3.20.: PAA Gel mit Darstellung der PCR-Amplifikation des Exon 5 des PPAR _α -Gens.	55
Tabelle 3.5.: Zusammenfassung der Versuchsbedingungen für die SSCP-Analyse von Exon 2 und 5.	56
Abbildung 3.21. : SSCP-Analyse von Exon 2 im Kühlraum ohne Glycerol.	56
Abbildung 3.22. : SSCP-Analyse von Exon 2 bei Raumtemperatur mit Glycerol.	57
Abbildung 3.23.: SSCP-Gel des Exon 2 des PPAR-Gens im Kühlraum ohne Zugabe von Glycerol.	57
Abbildung 3.24. SSCP-Gel des Exon 2 des PPAR-Gens bei Raumtemperatur mit Zugabe von Glycerol.	57

Tabelle 3.6.: Zusammenfassung der SSCP in Exon 2 unter zwei Versuchsbedingungen.	58
Abbildung 3.25.: Sequenzausschnitt des Exon 2 der auffälligen Probe F62 vom Exon/Intron-Übergang in 3'-Richtung gelesen. An Position 11 zeigt sich ein Guanosin-Nukleotid. Der Wildtyp besitzt an dieser Stelle ein Adenosin-Nukleotid.	58
Tabelle 3.7.: Metabolismus der Wildtypen und der Merkmalsträger des Exons 2 des PPAR _α -Gens.	59
Abbildung 3.26.: Graphischer Vergleich der Triglycerid- (TG) und Cholesterinmittelwerte (TC) der Wildtypen und der Merkmalsträger des Exon 2 mit Standardabweichungen .	60
Abbildung 3.27.: SSCP-Gel des Exon 5 des PPAR _α -Gens bei Raumtemperatur mit Zugabe von Glycerol.	60
Abbildung 3.28.: SSCP-Gel des Exon 5 des PPAR _α -Gens im Kühlraum ohne Zugabe von Glycerol.	61
Tabelle 3.8.: Zusammenfassung der SSCP in Exon 5 unter zwei Versuchsbedingungen.	62
Abbildung 3.29.: Bild A zeigt einen Sequenzausschnitt des Exon 5 der Probe F59 mit bekannter Basenfolge des Wildtypes. Im Bild B ist der gleiche Sequenzausschnitt der auffälligen Probe F56 dargestellt.	62
Tabelle 3.9.: Metabolismus der Wildtypen und der Merkmalsträger L162V des Exons 5 des PPAR _α -Gens.	63
Abbildung 3.30.: Graphischer Vergleich der Triglycerid- (TG) und Cholesterinmittelwerte (TC) der Wildtypen und der Merkmalsträger des Exon 5 mit Standardabweichungen .	64
Tabelle 3.10.: Laborwerte der Patienten mit Diabetes mellitus (DM). Vergleich der Wildtypen mit den Merkmalsträgern L162V des Exons 5 des PPAR _α -Gens.	64
Tabelle 3.11.: Laborwerte der Nicht-Diabetiker. Vergleich der Wildtypen mit den Merkmalsträgern L162V des Exons 5 des PPAR _α -Gens.	65

Struktur des humanen PPAR- α Gens

 GGCCCAGGCTGAAGCTCAGGGCCCTGTCTGCTCTGTGGACTCAACAGTTTGT
 GGCAAGACAAGCTCAGAAGCTGAGAAGCTGTCACCCACAGgtaaatagaatgttaattfactgt
 tccagatgaaatatttaagtgtttcagtgttacttctgttgactacagaccatcaatctgggggttattntttgtat-----
 -----intron 1-----
 tgttaatggtcaagacatggtctgtctaggtgaatgttccatgggcttttagggaaaaagtatatctagtggtggaatggtgtctta
gtccatfcaagctgtctata¹caaaataaccgtaaactgggtgattataacaacagaatttntctctcacagTTCTGGAGGC
 TGGGAAGTTCAAGATCAAAGTGCCAGCAGATTCAGTGTCATGTGAGGACGTG
 CTTCTGCTTCATAGATAAGAGgtacatacacatfaggagcatcgtgtcttctggtggatgaattctgtatcat
taggtgatccttcgagcact²tmaaaaaataatctgttgccgggagcagtgcttccccctgttatcccaggacttt-----
 -----intron 2-----
 gagccccatgactccagccagggcaacagaatgagactctgtctcngaaaaagaaaaaagaataaataaataaataaaaa
 taaanacaacaagtgaacgttgaatacgtcagcttacc³aatggttcttcttctccagTAG¹CTTGGAGCTCGG
 CGG²CACAACCAGCACCATCTGGTCGCGATGGTGGACACGGAAAGCCCACTC
 TGCCCCCTCTCC³CCACTCGAGGCCGGCGATCTAGAGAGCCCGTTATCT⁵GAA
 GAGTTCCTGCAAGAAATGGGAAACATCCAAGAGATTTTCGCAATCCATCGGCG⁴
AGGATAGTTCTGGAAG⁵CTTTGGCTTTACGGAATACCAGTATTTAGGAAGCTGT
 CCTGGCTCAGATGGCTCGGTCATCACGG⁶gtaagtgtgccgnntcctagaaggtttattt⁶gaaatgttcc
ttctccaag⁶gaaaactgt-----intron 3-----
 gtagcgaatcacatmttcatagaccgggtcagacacgggatagtgatgctggaatattcatccgtcttcttcttccccagAC
 AC⁴GCTTTCACCAGCTTCGAGCCCCCTCCTCGGTGACTTATCCTGTGGTCCCCG
 GCAGCGTGGACGAGTCTCCCAGTGGAGCATTGAACATCGAATGTAGAATCTG
 CGGGGACAAGGCCCTCAGGCTATCATTACGGAGTCCACGCGTGTGAAGGCTG
 CAA⁵Ggtataggg⁸agctggaacagggcctggtgcccgccaccatcaactacttatggtcactttcatagcaaatggcagcttt
 actgagagattgcagaaagtcccggataagaactgacttcaggccagggcgggnatctcctgcctat-----
 -----intron 4-----
 aacaataagtgagcaacaaaaaggtgagtaagcaagtgcgctggttctcagtgcccagggttt⁷agatccactgtgtattaccct
 ncacagGGCTTCTTTTCGGCGAACGATTGACTCAAGCTGGTGTATGACAAGTGC
 GACCGCAGCTGCAAGATCCAGAAAAAGAACAGAAACAAATGCCAGTATTGTC
 GATTTACAAGTGCG⁶TTTCTGTCTGGGATGTACACAACGGtaggtah⁶gggtggccctgcaca
 10 tttccannnnnctcagtagcccttcttctccaagggaacagatcaagctatggatgaatgtgcttcaacat-----
 -----intron 5-----
 gcan¹¹gtgttccccctccaacccttagCGAFTTCGTTTTGGACGAATGCCAAGATCTGAGAAAG
 CAAAAGTCAAAGCAGAAATTCTTACCTGTGAACATGACATAGAAGATTCTGAA
 ACTGCAGATCTCAAATCTCTGGCCAAGAGAATCTACGAGGCCTACTTGAAGA

Persönliche Daten:

Name: Bras Marques
Vorname: Elisabete Maria
Geburtsdatum/-ort: 26.03.1970 in Fundao / Portugal
Anschrift: Friedastraße 8
22043 Hamburg
Familienstand: ledig
Nationalität: portugiesisch

Schulbildung:

1977 - 1981 Grundsule Maretstraße in Harburg
1981 - 1990 Gesamtschule Harburg
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung:

1990 – 1992 Ausbildung zur Speditionskauffrau bei der Firma Kühne & Nagel im Rahmen des „Hamburger Modells“
02/1997 Aufnahme des Kurses für Traditionelle Chinesische Medizin bei der Deutschen Gesellschaft für TCM, Heidelberg

Hochschulausbildung:

10/1992 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg
08/1995 Ärztliche Vorprüfung
08/1996 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
03/1999 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2000 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

08/1999 - 12/1999 Chirurgie im Universitäts-Krankenhaus Rio Grande do Norte in Natal / Brasilien
12/1999 – 03/2000 Innere Medizin im Israelitischen Krankenhaus in Hamburg
03/2000 – 07/2000 Gynäkologie und Geburtshilfe im Albertinen-Krankenhaus in Hamburg

Berufspraxis:

01/2001 – 07/2002 Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe im Allgemeinen Krankenhaus Wandsbek

Lebenslauf

08/2002– 04/2003 Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und
Geburtshilfe im Allgemeinen Krankenhaus Wandsbek

05/2003- Assistenzärztin in der Weiterbildung im Bethesda-
Krankenhaus Bergedorf

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe, Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Danksagung

Danken möchte ich allen, die mich beim Zustandekommen der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Zunächst geht mein besonderer Dank an Frau Prof. Dr. Dr. h.c. U. Beisiegel, die mir das Thema dieser Arbeit zur Bearbeitung überließ, mir in Ihrer Abteilung alle notwendigen Mittel zur Verfügung stellte um diese Doktorarbeit durchzuführen, und mir jederzeit weiterbringende konstruktive Anregungen gab.

Mein weiterer Dank geht an Herrn Dr. Evans, der mich während der praktischen Tätigkeit betreut hat und bei den statistischen Analysen eine große Hilfe war. Besonders herzlich möchte ich mich bei Dorte Wendt bedanken, die mir zu jeder Zeit mit qualifiziertem Rat und Tat zur Seite stand und bei Christine Runge, bei der ich zu jeder Zeit ein offenes Ohr fand.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und mich während der praktischen Zeit im Labor und während der Fertigstellung dieser Arbeit in jeder Hinsicht unterstützt haben und meinem Freund Malte für seine liebevolle Geduld in dieser Zeit.