

vom Fachbereich für Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Gerhard Trommer

Gutachter: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz, PD Dr. Winfried März

Tag der Disputation:

02. November 2000

**STRUKTUR-FUNKTIONSBEZIEHUNGEN BEI APOLIPOPROTEINEN:
Genetische Varianten am Apolipoprotein B-Lokus als Ursache
atherogener Hypercholesterinämien**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main



von
Eva Fisher
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2000

A Zusammenfassung

Das Apolipoprotein (Apo) B-100 ist der wesentliche Proteinbestandteil der *Low Density Lipoproteine* (LDL). Es spielt als Ligand bei der rezeptorvermittelten Aufnahme der LDL aus dem zirkulierenden Blut in die Leber und andere periphere Gewebe eine wichtige Rolle. Erhöhte Plasmakonzentrationen der LDL gelten als unabhängiger Risikofaktor in der Genese der Koronaren Herzkrankheit (KHK). Eine gestörte Interaktion des LDL-Rezeptors mit seinem Liganden Apo B-100 vermindert die Endozytose der im Blut befindlichen LDL und kann damit eine primäre Hyperlipoproteinämie (HLP) des Typ IIa verursachen.

Die Rezeptorbindungsregion des Apo B-100, dessen Primärstruktur 4536 Aminosäuren umfasst, ist im carboxyterminalen Bereich des Moleküls lokalisiert. Im Gegensatz zu einer Vielzahl bekannter LDL-Rezeptormutationen wurden lediglich drei Mutationen am Apo B-100 bekannt, die als Auslöser der Typ IIa HLP in Frage kommen. Diese werden in der Literatur als Familiär Defektes Apo B-100 (FDB) beschrieben. Bei allen drei FDB-Varianten (FDB_{3500Q}, FDB_{3500W}, FDB_{3531C}) liegen Punktmutationen innerhalb des Exons 26 des Apo B-100 Gens vor.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde versucht, weitere, bisher unbekannte Punktmutationen am Apo B-100, die als Ursache bindungsdefekter LDL in Frage kommen, zu finden und zu charakterisieren. Die zunächst durchgeführte Sequenzierung der genomischen DNA einer Patientin mit bindungsdefekten LDL, die negativ für FDB war, zeigte keine Abweichungen von der Wildtyp-DNA-Sequenz im Bereich der Rezeptorbindungsregion. Es wurde daraufhin eine genetische *Screening*-Strategie für bindungsdefekte Apo B-100 entwickelt, die für die Analyse größerer Probenmengen geeignet erschien. Hierzu wurden zunächst parallel zwei Verfahren, der *single-strand conformation polymorphism* (SSCP) und die Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese (TGGE) getestet. Letztere erwies sich als geeignete Methode.

Ein Kollektiv von 297 Typ IIa HLP-Patienten, deren LDL-Cholesterin > 1,55 g/L und Triglyzerid-Konzentrationen < 2,0 g/l waren, wurde zusammengestellt. Die Blutproben stammten von nicht miteinander verwandten, im Rhein/Main-Gebiet ansässigen Personen kaukasischer Abstammung.

Ein DNA Bereich von 2,8 Kilobasenpaaren korrespondierend zu den Aminosäureresten 3131-3837 und 4269-4498 des Apo B-100 wurde in einzelnen Abschnitten amplifiziert und mit Heteroduplex-TGGE analysiert. Es wurden neun Substitutionen identifiziert. Diese waren: FDB_{3500Q}, FDB_{3500W}, L3350L, Q3405E, R3611Q, I4287V, N4311S, A4454T, und T4457M.

Bei 21 Personen (7,1%) wurde FDB_{3500Q} nachgewiesen. Dies entspricht nach Extrapolation auf die Gesamtbevölkerung einer Mutationshäufigkeit von 1,4% in unserer Region. Es konnte festgestellt werden, dass bei allen Merkmalsträgern die R3500Q Mutation mit einem einheitlichen Haplotypen kosegregiert, so dass eine stammesgeschichtliche Verwandtschaft der Mutationsträger belegt ist.

FDB_{3500W} wurde bei zwei HLP-Patienten diagnostiziert. Dies war insofern überraschend, da diese Mutation zuvor lediglich bei einer Person kaukasischer Abstammung in Großbritannien gefunden worden war. Beide R3500W Mutationen waren mit unterschiedlichen, bisher unbekanntem Haplotypen assoziiert. LDL der beiden heterozygoten Merkmalsträger für FDB_{3500W} zeigten in einem an normalen humanen Fibroblasten durchgeführten Bindungsassay eine deutlich verminderte Rezeptorbindungsaffinität, jedoch lag diese etwas höher als die der LDL einer FDB_{3500Q} heterozygoten Person. Es ist daher anzunehmen, dass der Austausch eines Arginins durch Tryptophan an Position 3500 einen geringeren Bindungsverlust der LDL bewirkt als der Austausch von Arginin zu Glutamin.

Zwei der in der TGGE identifizierten Punktmutationen stellten bekannte Apo B-100 Polymorphismen (*Msp*I₃₆₁₁ und N4311S) dar, eine weitere stille Mutation an Kodon L3350L wurde bei drei Personen festgestellt. Daneben fand sich ein Merkmalsträger mit einer Punktmutation an Kodon 4457 (T4457M). Zwei zuvor beschriebene Substitutionen, Q3405E und A4454T, traten mit einer Prävalenz von 1,3%, bzw. 6,4% im untersuchten Kollektiv auf. LDL eines heterozygoten Merkmalsträgers für Q3405E hatten normale Bindungsaffinität an LDL-Rezeptoren, zeigten jedoch eine signifikant erniedrigte Internalisation und Degradation im *in vitro*-Bindungstest. Schliesslich wurde eine bisher unbekannte Mutation des Apo B-100 am Aminosäurerest I4287V, die mit einer Allelfrequenz von 1% im untersuchten Kollektiv auftrat, funktionell überprüft. Dabei zeigte sich sowohl im Fibroblasten Bindungsassay als auch in einem zweiten *in vitro*-Testverfahren, dem U-937 Zellen Wachstumsassay keine Assoziation der I4287V Mutation mit bindungsdefekten LDL in der Familie einer heterozygoten Merkmalsträgerin. Eine funktionelle Relevanz dieses Aminosäureaustausches ist daher unwahrscheinlich.

An einem Tryptophanrest an Position 4369 des Apo B-100, der bei der Formation der dreidimensionalen Struktur des Proteins mit Arginin³⁵⁰⁰ interagiert, wurden Nukleotidveränderungen zunächst durch gezielte Mutagenese des Kodon 4369 erzeugt, um sicherzustellen, dass diese Mutationen durch TGGE nachweisbar sind. Nachfolgend wurde bei den Typ IIa HLP-Patienten nach Mutationen an dieser Position gesucht. Es konnte festgestellt werden, dass im untersuchten Kollektiv keine Punktmutationen am Aminosäurerest 4369 existierten.

Die Vermutung, dass weitere klinisch relevante Apo B-100 Mutationen mit einem dem FDB konformen Merkmalsbild bei Typ IIa HLP-Patienten vorhanden sind, konnte nicht bestätigt werden. Andererseits wurde eine überraschend hohe Prävalenz (1:72) des FDB_{3500Q} im Rhein/Main Gebiet festgestellt. Aufgrund der gemeinsamen Abstammung aller Merkmalsträger und der hohen Mutationsfrequenz in dieser Region ist es denkbar, dass sich die vermutlich vor ca. 6000 Jahren datierte *Founder*-Mutation in diesem Teil Deutschlands ereignete.

Da es offensichtlich auch, zwar seltener auftretende, Fälle des FDB_{3500W} in der hier untersuchten Region gibt, sind Analyse-Methoden, wie etwa die TGGE, die sich als ein hochsensibles Nachweisverfahren multipler Punktmutationen erwies, bei der differentialdiagnostischen Abklärung von Fettstoffwechselstörungen solchen Methoden vorzuziehen, die nur auf die Substitution FDB_{3500Q} testen.

B**Abkürzungen**

Apo	Apolipoprotein
APS	Ammoniumpersulfat
ARMS	<i>Amplification Refractory Mutation System</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cholesterin
cDNA	komplementäre DNA
Del	Deletion
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDB	Familiär defektes Apo B-100
FH	Familiäre Hypercholesterinämie
HDL	<i>High Density</i> Lipoprotein
IDL	<i>Intermediate Density</i> Lipoprotein
Ins	Insertion
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani
LDL	<i>Low Density</i> Lipoprotein
Lp	Lipoprotein
MOPS	3-N-(Morpholino)-Propan-Sulfonsäure
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel Elektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RPM	<i>Rapid Pure Minipreps</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Signalpeptid
TBE	Tris Borat EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin
TG	Triglyzeride
TGGE	Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
UZ	Ultrazentrifugation
VLDL	<i>Very Low Density</i> Lipoprotein
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside

Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Nukleotide

ATP	Adenosintriphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
TTP	Thymidintriphosphat

Aminosäure-Symbole

A	Alanin
C	Cystein
E	Glutaminsäure
I	Isoleucin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
Q	Glutamin
R	Arginin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan

Masseinheiten

μ	mikro (10^{-6})
A	Ampere
Da	Dalton
g	Gramm
k	Kilo
l	Liter
m	milli
M	Molar (mol/l)
Min	Minute
n	nanno (10^{-9})
p	piko (10^{-12})
rpm	<i>rounds per minute</i>
Sek	Sekunde
Std	Stunde
U	<i>Unit</i>
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumeneinheit
w/v	Gewicht pro Volumen

C Inhaltsverzeichnis

	Seite
A Zusammenfassung	I
B Abkürzungen	III
C Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 <u>Hypercholesterinämie - Risikofaktor für Atherosklerose</u>	1
1.1.1 Welche Rolle spielen Lipide bei der Atherogenese ?	2
1.1.2 Die Klassifikation der Hyperlipoproteinämien	4
1.1.3 Der Stoffwechsel der LDL	5
1.1.4 Das Apolipoprotein B	7
1.2 <u>Das Familiär Defekte Apo B-100 (FDB) - häufigste monogene Stoffwechselkrankheit in der westlichen Welt</u>	9
1.2.1 Klinische Manifestation der Erkrankung	10
1.2.2 Therapeutische Möglichkeiten	11
2 Problemstellung und Ziel der Arbeit	13
3 Material	14
3.1 <u>Chemikalien</u>	14
3.2 <u>Puffer und Medien</u>	15
3.3 <u>Enzyme und Kits</u>	17
3.4 <u>Spezielle Geräte und Software</u>	17
4 Methoden	18
4.1 <u>Auswahl der Patientenproben</u>	18
4.2 <u>Probenvorbereitung, Bestimmung der Lipidparameter und DNA-Extraktion</u>	18
4.3 <u>Oligonukleotid-Primer Sequenzen</u>	19
4.4 <u>Klonierung und Sequenzierung von Apo B-100 cDNA</u>	21
4.4.1 Klonierung	21
4.4.2 Plasmidpräparation	22
4.4.3 Didesoxy-Sequenzierung klonierter Apo B-100 cDNA	23

4.4.3.1	Denaturieren doppelsträngiger Plasmid-DNA	23
4.4.3.2	Superinfektion mit Helfer Phagen R408	24
4.4.3.3	Sequenzier Gele	24
4.4.3.4	Sequenzierreaktion	24
4.4.3.5	Elektrophorese und Autoradiografie	25
4.4.4	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)-Analyse	26
4.5	<u>Single-strand conformation polymorphism (SSCP)</u>	26
4.6	<u>Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese (TGGE)</u>	27
4.6.1	Erstellung von Schmelzkurven doppelsträngiger DNA	27
4.6.2	TGGE PCRs	27
4.6.3	TGGE-Apparatur und Polyacrylamidgele	28
4.6.4	Senkrechte TGGE	29
4.6.5	Parallele TGGE	29
4.6.6	Silbernitratfärbung der Gele	30
4.7	<u>DNA-Extraktion aus PAA-Gelen und Vorbereitung für die Sequenzanalyse</u>	31
4.8	<u>RFLP-Nachweis von Punktmutationen und Haplotypisierungen</u>	31
4.8.1	RFLP-Nachweis von Punktmutationen	31
4.8.2	Haplotypisierung	33
4.9	<u>Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese</u>	33
4.9.1	Analyse der durch Mutagenese erzeugten Punktmutationen in der TGGE	35
4.10	<u>In vitro Bindungs Assay von ¹²⁵I-markierten LDL</u>	35
4.11	<u>U-937 Zellen Wachstums Assay</u>	36
4.11.1	U-937 Lymphom Zellen	36
4.11.2	LDL-Isolation und Reinigung	36
4.11.3	<i>In vitro</i> Proliferations Assay	37
5	Ergebnisse	38
I. TEIL		
<u>MUTATIONSANALYSE DER APO B-100 DNA EINER PATIENTIN MIT PRIMÄRER</u>		
<u>TYP IIA HYPERLIPOPROTEINÄMIE IM BEREICH DER REZEPTORBINDENDEN DOMÄNE</u>		
<u>(KODON 3131-3638)</u>		
5.1	<u>Vorgeschichte</u>	38
5.2	<u>Klonierung und Sequenzierung</u>	39
5.3	<u>Auswertung und Beurteilung</u>	42

II. TEILMUTATIONS-SCREENING DER APO B-100 DNA (KODON 3131-3837 UND 4269-4498)
BEI 297 PERSONEN MIT TYP IIA HYPERLIPOPROTEINÄMIE

5.4	<u>Beschreibung des Typ Iia HLP-Patienten Kollektivs</u>	46
5.5	<u>Single-strand conformation polymorphism (SSCP)</u>	48
5.6	<u>Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese (TGGE)</u>	50
5.7	<u>Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese am AS Kodon Trp⁴³⁶⁹ des Apo B-100</u>	56
5.8	<u>Mutationen des Apo B-100 bei Typ Iia HLP-Patienten</u>	58
5.8.1	FDB _{3500Q} und FDB _{3500W}	59
5.8.1.1	Haplotypisierung des FDB _{3500Q} und FDB _{3500W}	60
5.8.1.2	Lipid Parameter und Familienanamnese der FDB _{3500W} Patienten	62
5.8.1.3	LDL-Rezeptor Bindung, Internalisation und Degradation der LDL zweier FDB _{3500W} heterozygoter Personen	63
5.8.2	Apo B L3350L	65
5.8.3	Apo B Q3405E	66
5.8.3.1	LDL-Rezeptor Bindung, Internalisation und Degradation der LDL eines heterozygoten Merkmalträgers für Apo B Q3405E	67
5.8.4	Apo B N4311S-Polymorphismus	69
5.8.5	Apo B A4454T	70
5.8.6	Apo B I4287V	73
5.8.6.1	Proliferation der mit LDL einer heterozygoten Merkmalsträgerin für Apo B I4287V stimulierten U-937 Zellen	74
6	Diskussion	78
	Literaturverzeichnis	93
	Anhang 1	
	Tabelle 6.1	106
	Anhang 2	
	Publikationen und Kongressbeiträge	107
	Anhang 3	
1	Lebenslauf	109
2	Dank	110
3	Ehrenwörtliche Erklärung	111

1

Einleitung

1.1 Hypercholesterinämie - Risikofaktor für Atherosklerose

In den westlichen Industrieländern sind Erkrankungen des atherosklerotischen Formenkreises häufigste Morbiditäts- und Mortalitätsursache. Seit Beginn der 80er Jahre wird die Hypothese diskutiert, dass Hyper- und Dyslipoproteinämien eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Koronarsklerose spielen. Indiz hierfür ist der hohe Anteil an Cholesterinablagerungen in atherosklerotischen Plaques der Gefäßwände. Welche Faktoren jedoch die Entstehung atherogener Plaques initiieren, ist gegenwärtig noch äusserst umstritten. Allein die Cholesterinkonzentration des Plasmas ist dafür keine ausreichende Erklärung. Dafür sprechen zahlreiche, klinisch dokumentierte Fälle von Personen mit normalen Cholesterinwerten, bei denen im frühen Lebensalter Myokard- oder Hirninfarkte auftraten.

Ein Beweis für die „Lipidhypothese“ der Atherogenese ist eine genetisch determinierte Stoffwechselerkrankung des Cholesterinmetabolismus, die sog. Familiäre Hypercholesterinämie (FH), die in ihrer homozygoten Form mit einem etwa 3-4fach erhöhtem Cholesteringehalt im Blut verbunden ist. Unbehandelt führt diese Erkrankung zu einer schweren koronaren Herzkrankheit im Kindesalter und meist schon vor dem 20. Lebensjahr zum ersten Infarkt. Inzwischen wurde auch an zahlreichen Tiermodellen der kausale Zusammenhang von hohem Cholesterin und der Genese atherosklerotischer Gefäßverengungen bestätigt (Bocan 1998). Durch Interventionsstudien zur Primärprävention der koronaren Herzkrankheit konnte festgestellt werden, dass eine Senkung des Cholesterins um 1% eine Verminderung der Inzidenz der koronaren Herzerkrankung um 2% bedingt (*The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial Results* 1984, Shepherd *et al.* 1995). Auch in der Sekundärprävention führten cholesterinsenkende Maßnahmen zur Senkung der kardiovaskulären Morbidität und zur Reduktion der Gesamtmortalität (*Scandinavian Simvastatin Survival Study* 1994, Plehn *et al.* 1999). Zahlreiche epidemiologische Studien bewiesen, dass mit der Erhöhung des Cholesterins auch eine Zunahme der Inzidenz von Myokardinfarkten einhergeht (Lamarche *et al.* 1995, Assmann *et al.* 1998). Dies betrifft Männer in etwas jüngerem Alter als Frauen. Während der prämenopausalen Lebensphase besteht bei Frauen ein durch die, auch auf Lipidstoffwechselmetabolite wirkenden, weiblichen Östrogene ausgehender Schutzfaktor (Bush und Barrett-Connor 1985). Daher verzögert sich der Beginn einer koronaren Herzkrankheit bei Frauen um durchschnittlich etwa 10 Jahre gegenüber Männern und bedingt eine niedrigere Sterblichkeit bei Frauen vor dem 70sten

bei Frauen vor dem 70sten Lebensjahr (Castelli 1984). Zahlen belegen jedoch, dass die Gesamtmortalität auf Grund eines Myokardinfarktes bei Frauen wesentlich höher ist als bei Männern. 1996 waren es in der Bundesrepublik 250.000 Frauen gegenüber 178.000 Männern (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden), die einen tödlichen Infarkt erlitten.

In einer inzwischen über einen Zeitraum von 50 Jahren laufenden Studie zu Risikofaktoren der KHK (*Framingham Heart Study*) waren 27% der Erkrankungen bei Männern und 34 % bei Frauen auf zu hohes Cholesterin ($\geq 2,0$ g/l) zurückzuführen (P.W. Wilson *et al.* 1998).

Eine Hypercholesterinämie kann zunächst einmal, und dies betrifft den überwiegenden Teil der moderaten Hypercholesterinämien, ernährungsbedingt sein. Daneben sind mangelnde körperliche Aktivität und Übergewicht zusätzliche Komponenten, die den Stoffwechselhaushalt insgesamt, und daher auch den normalen Lipidkatabolismus beeinträchtigen. Ein zu hoher Plasmacholesteringehalt kann auch sekundär durch Medikamente, eine Hypothyreose, einen Diabetes, eine Pankreatitis oder Lebererkrankungen verursacht werden. All diese Faktoren lassen sich durch entsprechende Änderung der Lebensgewohnheiten, bzw. die Therapie der Grundkrankheit beeinflussen.

Ein kleiner Prozentsatz von Hyper- und Dyslipoproteinämien, zu denen auch die bereits oben erwähnte FH gehört, haben ihre Ursprung in einem genetischen Defekt. Daneben sind eine Reihe von polygenen Faktoren bekannt, die mit erhöhten Cholesterinwerten, oder dem individuellen Risiko an einer KHK zu erkranken, assoziiert sind, deren genauen Wirkungsmechanismen man jedoch noch nicht kennt.

1.1.1 Welche Rolle spielen Lipide bei der Atherogenese ?

Nicht alle der im Blut transportierten Lipide sind atherogen. Die wichtigsten Lipide im Plasma sind Cholesterin, Cholesterinester, Triglyzeride, Phospholipide und freie Fettsäuren. Auf Grund ihrer Wasserunlöslichkeit werden diese (mit Ausnahme der freien Fettsäuren) in einer „Verpackung“ aus einem hydrophilem Phospholipid-Protein-Komplex im Blut transportiert. Diese Komplexe bezeichnet man als Lipoproteine.

Die Lipoproteine unterscheiden sich in ihren physikochemischen Eigenschaften wie Dichte, Partikelgröße, Ladung und Löslichkeit. Die gebräuchliche Einteilung der Lipoproteine erfolgt anhand der hydratisierten Dichte. Hauptklassen sind *Very Low Density* Lipoproteine (VLDL), *Intermediate Density* Lipoproteine (IDL), *Low Density* Lipoproteine (LDL) und *High Density* Lipoproteine (HDL); letztere zerfallen noch in die Subklassen HDL₂ und HDL₃ (Tabelle 1.1).

Das Lipoprotein (a) [Lp(a)] ist ein besonderes Lipoprotein. Vieles spricht heute dafür, dass es eigenständiger Risikofaktor für die Atherogenese ist. Strukturell ist es den LDL ähnlich. Sein Apo (a) weist ausgeprägte Homologien zum Plasminogen auf. Die Lp(a) Konzentration im menschlichen Blut ist interindividuell äusserst variabel und genetisch prädisponiert. Sie schwankt zwischen <0,2 g/l (bei 70% der Bevölkerung) und 0,3 bis zu 1,5 g/l (bei 30% der Bevölkerung). Die Mechanismen der Atherogenität von Lp(a) sind noch nicht klar. Hohe Konzentrationen (>0,3 g/l) des Lp(a) sollen besonders dann atherogen sein, wenn gleichzeitig das LDL-Cholesterin erhöht ist (Cremer *et al.* 1997).

Tab. 1.1 Lipoproteinklassen des menschlichen Plasmas.

	Dichte (kg/l)	Elektro- phoret. Beweglichkeit	Partikel- durch- messer (nm)	Zusammensetzung (% Masse)				
				TG	FC	CE	PL	Pr
Chylomikronen	< 0.95	-	>1000	90	1	2	5	2
VLDL	< 1.006	<i>pre-β</i>	55	54	7	13	16	10
IDL	1.006-1.019	<i>pre-β</i> bis <i>β</i>	25	20	9	34	20	17
LDL	1.019-1.063	<i>β</i>	20	4	11	41	21	23
Lp(a)	1.080-1.100	<i>pre-β</i>	24	3	9	36	18	34
HDL ₂	1.063-1.125	–	11	5	5	13	35	42
HDL ₃	1.125-1.210	–	9	3	3	15	23	56

TG = Triglyzeride, FC = freies (nicht verestertes) Cholesterin, CE = Cholesterinester, PL = Phospholipide, Pr = Protein

Den Proteinanteil der Lipoproteine bezeichnet man als Apolipoproteine. Viele Lipoproteinpartikel enthalten mehr als ein Apolipoprotein. Apolipoproteine stabilisieren die Struktur der Partikel, vermitteln über Rezeptoren deren zelluläre Aufnahme und beeinflussen die Aktivitäten von Enzymen.

Im Stoffwechsel der Plasmalipoproteine werden ein exogenes, ein endogenes und ein reverses Cholesterin-Transportsystem unterschieden. Der exogene Weg transportiert Lipide (in Form von Chylomikronen), die mit der Nahrung aufgenommen wurden. Der endogene Weg wird von den Lipoproteinen hepatischen Ursprungs beschriftet. Dazu gehören die VLDL, IDL und LDL. Der reverse Cholesterintransport dient dem Transport von Cholesterin aus der Periphe-

rie zur Leber, über die Cholesterin ausgeschieden wird. Dieser wird maßgeblich von den HDL beschriften, denen daher eine protektive Funktion für die Atherosklerose zukommt. Der Intermediärstoffwechsel der Lipoproteine stellt ein außerordentlich komplexes System dar, der zu einem hohen Anteil über Zelloberflächenrezeptoren bestimmt wird. Insbesondere die LDL-Rezeptoren haben eine zentrale Stellung in der Regulation des Lipoproteinstoffwechsels und des zellulären Cholesterinhaushalts. Das Cholesterin in Form des LDL-Cholesterins (LDL-C) ist wesentliche Komponente bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques und steht daher als Risikofaktor innerhalb der Lipide an erster Stelle.

1.1.2 Die Klassifikation der Hyperlipoproteinämien

Der Schwellenwert für ein atherogenes Risiko wurde 1988 von der *European Atherosclerosis Society* bei einer Konzentration des LDL-Cholesterins von 1,55 g/l festgelegt (Carmena *et al.* 1988). Diese LDL-Cholesterinkonzentration wird von nahezu 40% aller Deutschen im Alter zwischen 40 und 60 Jahren überschritten. Gleichzeitig erhöht sich das kardiovaskuläre Risiko bei HDL-Konzentrationen von unter 0,4 g/l. Ungefähr 7% der Bundesbürger haben ein stark erniedrigtes HDL-Cholesterin, so dass die Prävalenz von Dys- bzw. Hypercholesterinämien ca. 45% in der genannten Altersgruppe beträgt. Richtlinien amerikanischer Experten (*National Cholesterol Education Program* 1994) legen einen LDL-Cholesterin Wert von 1,3 g/l als obere Grenze der Normalkonzentration fest, Werte zwischen 1,3 und 1,6 g/l werden als „borderline“ bezeichnet und ab 1,6 g/l bei einem HDL-Cholesterin von <0,40 g/l geht man von einer „high risk“ Hyperlipoproteinämie (HLP) aus. Diese Einschätzungen gelten für gesunde Erwachsene. Bei Vorhandensein eines oder mehrerer zusätzlicher Risikofaktoren sollte das LDL-Cholesterin unter 1,3 g/l gehalten werden. Bei schon vorhandenen Symptomen einer KHK wird eine optimale LDL-Cholesterinkonzentration von < 1,0 g/l empfohlen. Triglyzeridkonzentrationen werden im Schwankungsbereich von 2,0 - 4,0 g/l als geringfügig erhöht angesehen und liegen bei $\leq 2,0$ g/l im Normalbereich.

Eine heute noch häufig verwendete Klassifizierung der Fettstoffwechselstörungen stammt aus dem Jahr 1967 (Fredrickson *et al.* 1967). Die nach dem Erstautor benannte Einteilung der Hyperlipoproteinämien richtet sich nach den im Plasma erhöhten Lipoproteinfraktionen und hat rein deskriptiven Charakter. Es werden sechs Typen unterschieden (Tabelle 1.2).

Tab. 1.2 Einteilung der Hyperlipoproteinämien nach Fredrickson (1967)

Typ nach FREDRICKSON	Erhöhte Plasmalipide	Erhöhte Lipoproteinfraktion
I	Triglyzeride	Chylomikronen
IIa	Cholesterin	LDL
IIb	Cholesterin u. Triglyzeride	LDL u. VLDL
III	Triglyzeride u. Cholesterin	Chylomikronen-Remnants u. IDL
IV	Triglyzeride	VLDL
V	Triglyzeride u. Cholesterin	VLDL u. Chylomikronen

1.1.3 Der Stoffwechsel der LDL

60-70% des Cholesterins im Plasma werden in den LDL transportiert (Scott 1989). Die Leber ist Dreh- und Angelpunkt des Cholesterinstoffwechsels (Abbildung 1.1). Durch sie wird sowohl Produktion als auch Abbau der LDL reguliert. Beim Stoffwechselgesunden werden etwa zwei Drittel der LDL über LDL-Rezeptoren in der Leber abgebaut (Brown und Goldstein 1986), der Rest wird in nicht-hepatischen (peripheren) Geweben verstoffwechselt. Diese verwenden Cholesterin als Membranbaustein und als Ausgangssubstanz für die Synthese von Steroidhormonen und des Vitamin D. Defekte des LDL-Rezeptors sind Ursache der familiären Hypercholesterinämie. Die Interaktion der LDL mit dem LDL-Rezeptor wird durch das Apolipoprotein (Apo) B-100 vermittelt (Goldstein *et al.* 1983, Scott 1989, Myant 1990). Jeder LDL-Partikel besitzt nur ein einziges Apo B-100 Molekül auf seiner Oberfläche.

LDL -Rezeptoren kommen in unterschiedlicher Zahl auf fast allen Zelltypen vor (glatte Muskelzellen, Endothelien, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Adipozyten, Hepatozyten, Zellen der Nebennierenrinde, der Ovarien und der Dünndarmmukosa). Fibroblasten besitzen zwischen 15 000 und 70 000 Rezeptoren pro Zelle. Die Expression des LDL-Rezeptors unterliegt einer *feed-back* Kontrolle durch den zellulären Cholesteringehalt (Brown und Goldstein 1986). Die Regulationsmechanismen der zellulären Cholesterinhomöostase sind im Folgenden kurz zusammengefasst:

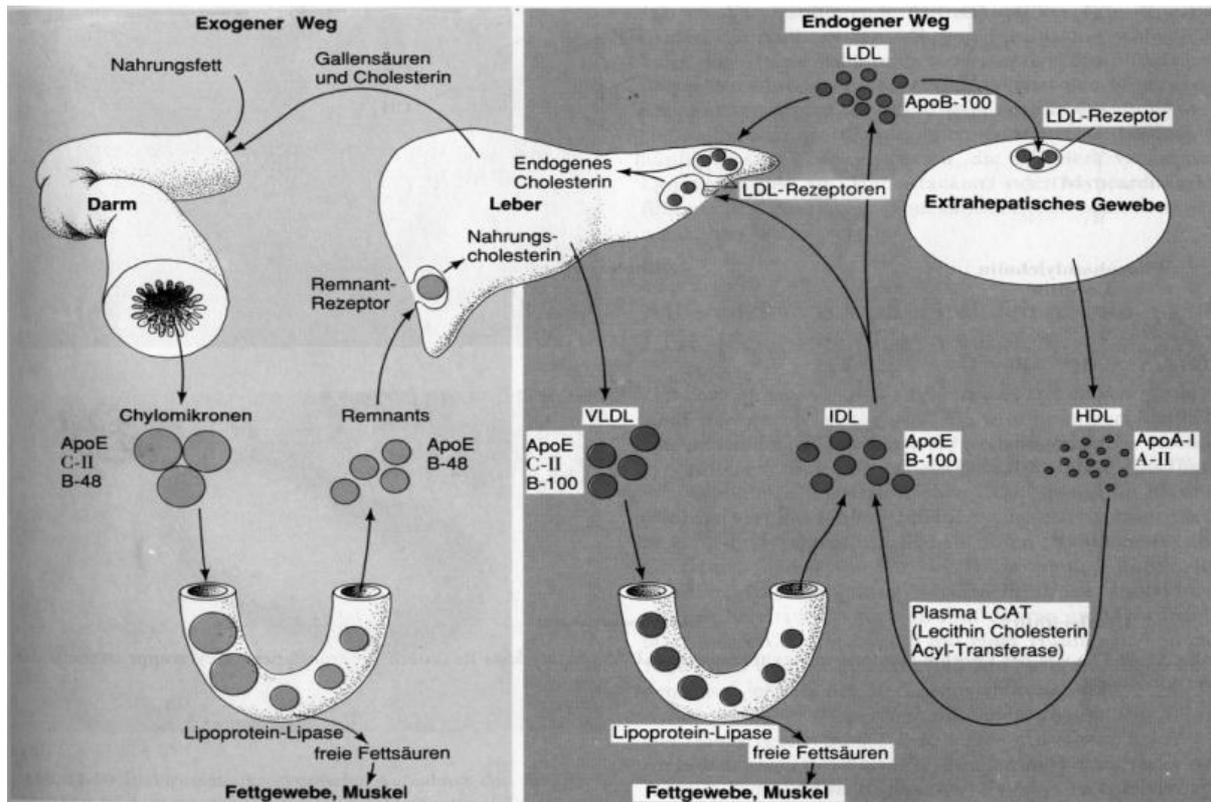


Abb. 1.1 Lipide aus der Nahrung werden in der Darmschleimhaut enzymatisch gespalten und gelangen in Form von Chylomikronen über den Blutkreislauf in die Leber. Dort vermischen sie sich mit den endogen aufgebauten Fetten und werden mit Apoproteinen zu Lipoproteinen (VLDL) zusammengebaut. Die Leber gibt diese triglyzeridreichen VLDL an das Blut ab. Sie werden dort rasch von Lipasen angegriffen, ihr Triglyzeridanteil wird gespalten, es entstehen die IDL. Diese werden entweder direkt von der Leber aufgenommen und abgebaut, oder nach weiterer Delipidierung in die cholesterinreichen LDL umgewandelt. VLDL haben eine Halbwertszeit von wenigen Stunden, während LDL drei bis fünf Tage im Blut zirkulieren können. (Abbildung aus: D.Voet, J.G. Voet „Biochemie“, Kap. 11-4: Lipoproteine, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, 1. Auflage 1992).

Die Regulation der zellulären Cholesterinhomöostase

Cholesterin und andere Isoprenoide sind essentielle Bestandteile der Zelle. Fast alle Gewebe tierischer Organismen können Cholesterin aus aktivierter Essigsäure (Acetyl-CoA) synthetisieren. Ein Erwachsener synthetisiert bei cholesterinreicher Ernährung etwa 1 g täglich. Das Schrittmacherezym des Synthesewegs ist die mikrosomale HMG-CoA-Reduktase.

Die HMG-CoA-Reduktase ist eines der am stärksten regulierten Enzyme der Zelle; ihre Aktivität kann um den Faktor 200 variieren (Brown *et al.* 1978, Nakanishi *et al.* 1988, Goldstein

und Brown 1990). Die Kontrolle erfolgt auf transkriptionaler, translationaler und posttranslationaler Ebene (Goldstein und Brown 1990) durch das Angebot des über den LDL-Rezeptor in die Zelle eingeschleusten Cholesterins. Ist genügend LDL in den Zellen vorhanden, wird durch das aus den Cholesterinestern der Partikel enzymatisch abgespaltene freie Cholesterin die mRNA-Synthese der HMG-CoA-Reduktase supprimiert. Auch die Expression des LDL-Rezeptors wird gedrosselt, um eine Überversorgung mit Cholesterin zu vermeiden. Versiegt das Angebot extrazellulären Cholesterins, wird die Synthese der Reduktase stimuliert und so die Cholesterineigensynthese hochreguliert. Die Cholesterinbiosynthese unterliegt einem circadianen Rhythmus. Sie ist mittags minimal und maximal um Mitternacht.

1.1.4 Das Apolipoprotein B

Das Apolipoprotein (Apo) B ist obligater Proteinbestandteil der Chylomikronen, VLDL, IDL und LDL. In den VLDL, IDL und LDL liegt es als Apo B-100, in den Chylomikronen als Apo B-48 vor. Apo B-48 entspricht dem amino(N)-terminalen Ende (48%) des Apo B-100. Die Primärstruktur des Apo B ist seit 1986 bekannt (Yang *et al.* 1986, Law SW *et al.* 1986, Knott *et al.* 1986, Chen *et al.* 1986, Cladaras *et al.* 1986). Das Apo B-Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2 (2p23-p24). Es ist 43 Kilobasenpaare lang und besteht aus 29 Exonen. Apo B-48 mRNA entsteht durch eine posttranskriptionale Modifikation aus Apo B-100 mRNA (Chen *et al.* 1987, Powell *et al.* 1987, Chan und Seeburg 1995, Chan *et al.* 1997). Im Gegensatz zur transkriptionellen Expressionskontrolle des LDL-Rezeptors wird das Gen für Apo B scheinbar konstitutiv exprimiert. Die Regulation der Apo B Sekretion findet auf translationaler und posttranslationaler Ebene statt; die Hälfte bis zu zwei Drittel der *de novo* synthetisierten Apo B Moleküle werden bei *in vitro* Versuchen humaner Hepatom Zellen intrazellulär degradiert (Jim-Yeung und Chan 1998).

Abbildung 1.2 zeigt die Struktur des Apo B-Gens. Für zahlreiche Positionen sind Sequenzunterschiede beschrieben. Einige dieser Polymorphismen, die zum Teil mit LDL-Konzentrationen oder der koronaren Herzkrankheit assoziiert sind (Berg 1986, Hegele *et al.* 1986, Law A *et al.* 1986, Talmud *et al.* 1987, Monsalve *et al.* 1988, Myant *et al.* 1989, Aalto-Setälä *et al.* 1991, Renges *et al.* 1991, Tybjaerg-Hansen *et al.* 1991, Saha *et al.* 1992, Bohn *et al.* 1993, Hansen *et al.* 1993, Visvikis *et al.* 1993, Bohn und Berg 1994, Turner *et al.* 1995), sind in Abbildung 1.2 bezeichnet.

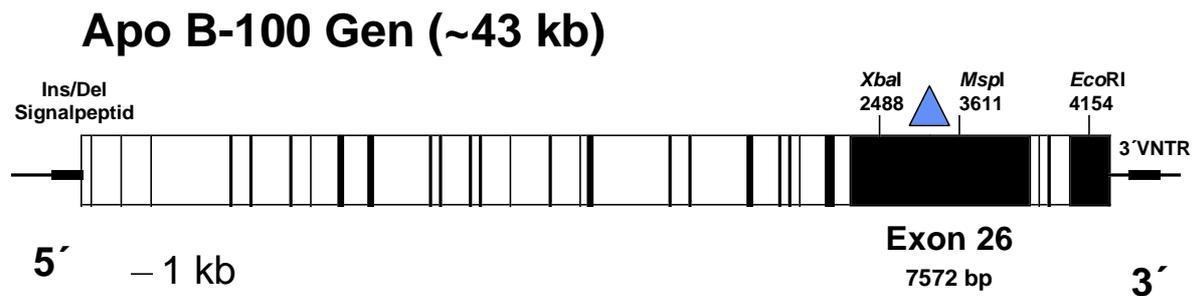


Abb. 1.2 Polymorphismen des Apolipoprotein-100 Gens (43 Kilobasenpaare). Am Signalpeptid des Apo B befindet sich eine 9 Basenpaar Deletion (Del), bzw Insertion (Ins). Der 3'VNTR (*variable number of tandem repeats*) Polymorphismus erzeugt bis zu 14 diskrete Allele einer repetitiven Sequenz. Alle übrigen Polymorphismen (*XbaI*, *MspI* und *EcoRI*) sind diallele Spaltstellenpolymorphismen. Unterhalb der Restriktionsenzymbezeichnung sind die Aminosäurepositionen (Kodon 2488, 3611 und 4154) der Sequenzänderung angegeben. Dunkel markierte Abschnitte stellen Exonbereiche dar, nicht ausgefüllte Genbereiche symbolisieren Introns. Δ : Bereich der für die LDL-Rezeptorbindung kodierenden Domäne.

An der Bindung von Apo B-100 an den LDL-Rezeptor sind Domänen im carboxyterminalen Bereich des Moleküls beteiligt (Aminosäuren 3000-3700) (Scott 1989). Diese Abschnitte fehlen im Apo B-48; es bindet daher nicht an den LDL-Rezeptor. Über die dreidimensionale Struktur der rezeptorbindenden Domäne des Apo B-100 ist wenig bekannt. Dies ist zum einen auf die enorme Größe des Proteins (4536 Aminosäuren) zurückzuführen und zum anderen darauf, dass es vollständig wasserunlöslich ist und aus diesem Grund in nicht-Lipid-assoziiertem Zustand aggregiert. Einige Erfolge in der strukturellen Aufklärung der Rezeptorbindungsdomäne des Apo B-100 wurden erst in den letzten Jahren gemacht. Zu Beginn der 90er Jahre ging man davon aus, dass basische Aminosäurereste die Wechselwirkung zwischen dem Apo B-100 auf der einen Seite und fünf negativ geladenen Cystein-reichen *repeats* des LDL-Rezeptors auf der anderen Seite vermitteln (Weisgraber *et al.* 1978, Russell *et al.* 1989). Mit Hilfe monoklonaler Antikörper (Milne *et al.* 1989, Pease *et al.* 1990) und auf der Basis von Homologien mit der Apo E Rezeptorbindungsregion (Knott *et al.* 1986) wurde ein Modell erstellt, in dem zwei kurze Abschnitte zwischen den Positionen 3147 und 3157 (A) und 3359 und 3367 (B) für die Rezeptorbindung der LDL verantwortlich sind. Beide Bindungsbereiche (A) und (B) sind über eine Disulfidbrücke zwischen Cystein 3167 und Cystein 3297 verknüpft und werden durch eine dazwischen liegende Prolin-reiche Sequenz im richtigen Abstand zueinander gehalten (Milne *et al.* 1989).

1.2 Das Familiär Defekte Apo B-100 (FDB) - häufigste monogene Stoffwechselkrankheit in der Westlichen Welt

„FDB is an experiment of nature that provides us with information about several aspects of the normal and abnormal physiology of human lipoproteins.“ (N.B. Myant)

Vor etwa 13 Jahren beschrieb Dr. Innerarity vom Cardiovascular Research Institute der University of California in San Francisco erstmalig menschliche LDL, deren Bindungsfähigkeit an die LDL-Rezeptoren intakter Fibroblasten um etwa 70% vermindert waren (Innerarity *et al.* 1987). Die von ihm untersuchten LDL stammten von einem Patienten mit primärer Hypercholesterinämie und reduziertem hepatischem LDL-Katabolismus, ohne dass bei diesem eine funktionelle Beeinträchtigung des Rezeptors nachgewiesen werden konnte. Die biochemischen Analysen und die daraufhin angestellten Familienuntersuchungen legten den Verdacht nahe, dass der auslösende Faktor eine genetische Veränderung am Apo B-100 ist. Innerarity nannte die von ihm beschriebene Apo B-100-Abnormalität „*familial defective apoB-100*“ (FDB). Zwei Jahre später erschien unter dem Titel „*Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100*“ (Soria *et al.* 1989) die Entschlüsselung der genetischen Veränderung der bindungsdefekten Apo B-100 Moleküle: als Ursache des Bindungsverlustes wurde eine Punktmutation am Aminosäurekodon 3500 in Exon 26 des Apo B-100 identifiziert, die zum Austausch eines Argininrests durch Glutamin führt. Sie wird als FDB Arg³⁵⁰⁰→Gln, oder auch FDB_{3500Q} bezeichnet. Neben der FDB_{3500Q} Mutation wurden 1995 (Pullinger *et al.* 1995, Gaffney *et al.* 1995) noch zwei weitere Apo B Substitutionen (FDB_{3500W} und FDB_{3531R}) entdeckt, die ebenfalls in bindungsdefekten LDL resultieren. Ihnen kommt unter klinischen Aspekten geringere Bedeutung zu, da sie bis dato wesentlich seltener vorgefunden wurden. Schätzungen Anfang der 90er Jahre zufolge tritt die FDB_{3500Q} Mutation mit einer Prävalenz von 1:500 bis 1:700 in Westeuropa und Nordamerika auf (Tybjaerg-Hansen und Humphries 1992, Rauh *et al.* 1992). In diesen Regionen stellt der familiäre Apo B-100 Bindungsdefekt die häufigste monogen verursachte Stoffwechselerkrankung dar. FDB wird in autosomal kodominanter Weise vererbt. In dem Klassifikationssystem nach Fredrickson ist die aus dem Bindungsdefekt resultierende Erhöhung des Plasma-Cholesterins einer Typ IIa Hyperlipoproteinämie zuzuordnen.

In der Differentialdiagnostik familiärer Hypercholesterinämien wurden eine Reihe unterschiedlicher molekulargenetischer Nachweisverfahren der FDB_{3500Q} Mutation entwickelt: ASO-Hybridisierung (Tybjaerg-Hansen *et al.* 1990, Eggertsen *et al.* 1994), RFLP-Analysen

PCR-generierter Restriktionsenzymspaltstellen (Hansen *et al.* 1991, Geisel *et al.* 1991, Mammotte und van Bockxmeer 1993), Allel-spezifische PCR (ASP od. ARMS) (Ruzicka *et al.* 1992, Schuster *et al.* 1992) und *Mutagenically Separated* (MS)-PCR (Rust *et al.* 1993), eine Verfeinerung der Allel-spezifischen PCR, die es erlaubt, die Analyse einer Probe in einem Reaktionsgefäß durchzuführen.

1.2.1 Klinische Manifestation der Erkrankung

Die Expressivität der FDB-Mutation konnte zunächst nur durch Untersuchungen an heterozygoten Merkmalsträgern ermittelt werden. Es stellte sich heraus, dass die phänotypische Ausprägung der FDB_{3500Q} Mutation sehr variabel ist. Tybjaerg-Hansen *et al.* (1990) beobachteten, dass die mittlere Cholesterinkonzentration bei zehn FDB-Heterozygoten mit 3,69 g/l etwa so hoch war wie bei FH-Heterozygoten. Einen ähnlich hohen Wert (3,5 g/l) fand Defesche *et al.* (1993) bei 18 niederländischen FDB-Heterozygoten. Schuster *et al.* (1990) ermittelte einen Durchschnittswert von 3,08 g/l bei 54 heterozygoten FDB-Patienten in Deutschland. In einer anderen Studie war die mittlere Cholesterinkonzentration der FDB-Heterozygoten hingegen 2,69 g/l, diejenige der FH-Heterozygoten aber 3,60 g/l (Innerarity *et al.* 1990). Die Unterschiede sind zum Teil auf unterschiedliche *Screening*-Strategien zurückzuführen. Tybjaerg-Hansen *et al.* (1990) und Schuster *et al.* (1990) haben Patienten untersucht, die klinisch zuvor als FH-Heterozygote klassifiziert worden waren, während andere Autoren auch Patienten mit niedrigeren Gesamtcholesterin-, bzw. LDL-Cholesterinkonzentrationen untersuchten. Eine variable Expression der FDB Mutation wurde auch von Friedl *et al.* (1991) und Myant *et al.* (1991) beobachtet, die heterozygote Merkmalsträger mit normalem LDL-Cholesterin beschreiben. Hansen *et al.* (1994) haben in ihrem Kollektiv von 45 dänischen FDB-Patienten ermittelt, dass ein Drittel der FDB-Heterozygoten Cholesterinkonzentrationen unter der 95sten Percentile der alters- und geschlechtsgleichen Normalbevölkerung hatten. Das genetische Merkmal FDB_{3500Q} zeigt somit 100%ige Penetranz, ist jedoch in seiner Expressivität variabel. Mittlerweile sind fünf Patienten mit homozygotem FDB_{3500Q} bekannt geworden (März *et al.* 1992, Funke *et al.* 1992, Gallagher und Myant 1995, Horinek *et al.* 1999). Bei diesen Patienten war die Hypercholesterinämie deutlich weniger ausgeprägt als bei homozygoten FH-Patienten (LDL-Cholesterin Konzentration FDB 2,9-4,6 g/l versus FH 5,0-10,0 g/l). Unter *steady state* Bedingungen sind etwa 75% der im Blut zirkulierenden LDL-Partikel bei heterozygoten FDB-Patienten bindungsdefekt, während nur 25% aus der Synthese des normalen

Apo B-Allels stammen (Arnold *et al.* 1994). Die Verweildauer der LDL im Blut ist bei FDB-Homozygoten im Vergleich zu normolipidämischen Personen um das 3,6 fache erhöht (8,3 Tage versus 2,3 Tage) (Schäfer *et al.* 1997).

Der milder ausgeprägte Phänotyp wird auf zwei kompensatorische Effekte zurückgeführt. Zum einen werden wahrscheinlich VLDL-Remnants verstärkt katabolisiert und somit die Produktion von LDL zurückgeschraubt (Maher *et al.* 1993), zum anderen scheinen einige LDL-Partikel auf Grund eines zusätzlich vorhandenen Apo E noch über LDL-Rezeptoren internalisiert werden zu können (März *et al.* 1993). Daneben könnten im Einzelfall auch andere regulatorische Mechanismen der Cholesterinhomöostase eine Rolle spielen.

Klinische Merkmale einer starken Hypercholesterinämie, etwa der klassischen FH, sind Xanthome (Lipidablagerungen in der Haut oder den Sehnen), Xanthelasmen (flache, gelbliche Lipideinlagerungen in der Orbita), Arcus lipoides corneae (weissliche, sichelförmige Lipideinlagerungen in der Hornhaut des Auges) und 'early onset' KHK. Insgesamt sind bei FDB-Heterozygoten als Konsequenz einer deutlich abgemilderteren Hypercholesterinämie diese Merkmale weniger häufig und ausgeprägt als bei heterozygoten FH Patienten. Bei drei der fünf FDB-Homozygoten (31, 54 und 69 Jahre) waren keine KHK und keine Sehnen-Xanthome feststellbar.

1.2.2 Therapeutische Möglichkeiten

Der familiäre Apo B-100 Defekt ist therapierbar. Meist reicht jedoch die Diät als konventionelle, cholesterinsenkende Maßnahme nicht aus. Bei konsequenter Durchführung der Ernährungsumstellung (Ersatz gesättigter Fettsäuren durch komplexe Kohlenhydrate, zusätzliche Zufuhr einfach und mehrfach gesättigter Fettsäuren, Reduktion der täglichen Cholesterinaufnahme) lässt sich das LDL-Cholesterin um maximal 15% senken. Für die Behandlung eines heterozygoten FDB-Patienten mit Cholesterinkonzentrationen von 2,5-3,5 g/l ist dies nicht ausreichend und daher wird meist ab dem frühen Erwachsenenalter medikamentös interveniert.

Die bisher erfolgreichsten Ansätze zur Senkung erhöhter Konzentrationen der LDL bestehen in der Steigerung der Expression von LDL-Rezeptoren durch Verminderung des regulatorischen Pools von Cholesterin in der Leberzelle. Hierzu gibt es drei Klassen von Wirkstoffen:

I.	Anionenaustauscherharze	vermindern die Reabsorption von Gallensalzen im Dünndarm und stimulieren damit die Konversion von Cholesterin zu Gallensäuren in den Leberzellen
II.	pflanzlichen Sterole (β -Sitosterin)	hemmen die Absorption von Cholesterin im Dünndarm
III.	CSE (Cholesterin-Synthese-Enzym) Hemmer	= HMG-CoA-Reduktasehemmer, vermindern die <i>de novo</i> Synthese von Cholesterin.

Die Hemmstoffe der HMG-CoA-Reduktase sind die wirksamsten Pharmaka zur Behandlung von Dyslipoproteinämien. Im Handel befinden sich derzeit Lovastatin, dessen semisynthetisches Derivat Simvastatin, Pravastatin, das durch mikrobielle Transformation aus Mevastatin gewonnen wird, sowie Fluvastatin, Atorvastatin und Cerivastatin, drei vollsynthetische Verbindungen. Diese Substanzen sind hochaffine, kompetitive Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase, des Schrittmacherenzyms der Cholesterin-Biosynthese. Durch die gedrosselte Eigenbiosynthese nimmt die Leberzelle vermehrt Cholesterin aus dem zirkulierenden Blut auf, indem sie verstärkt LDL-Rezeptoren produziert (*feed back* Regulation, s. Kap.1.1.3). Die Erhöhung der hepatischen Cholesterinaufnahme führt zur Senkung der LDL-Konzentration im Blut. Neben einem gesteigerten Abbau der LDL scheinen Hemmstoffe der HMG-CoA-Reduktase auch die Produktion der LDL zu hemmen, indem sie den Abbau ihrer Vorläufer, der VLDL, bewirken.

Die medikamentöse Verabreichung der CSE Hemmer (5-40 mg/Tag) hat einen cholesterinsenkenenden Effekt von etwa 30%. Atorvastatin erzielt sogar eine Reduktion des LDL-Cholesterins um bis zu 60% (Wolfenbittel *et al.* 1998).

2 Problemstellung und Ziel der Arbeit

Es ist sehr wahrscheinlich, dass von allen Proteinen, die an der Regulation des Lipoproteinstoffwechsels beteiligt sind, Strukturvarianten existieren. Bisher ist aber nur für wenige solcher Merkmale eine Auswirkung auf die Lipoproteinkonzentrationen des Plasmas gesichert. Trotz einer hohen Prävalenz der Hypercholesterinämie in der Normalbevölkerung - etwa jeder 4. Bundesbürger im Alter zwischen 40 und 65 hat nach Einschätzung des Instituts für Arterioskleroseforschung in Münster (Assmann *et al.* 1998) zu hohes LDL-Cholesterin - sind hereditäre Ursachen dieser Stoffwechselanomalie noch weitgehend ungeklärt. In dieser Arbeit sollte auf molekular-genetischer Ebene nach Strukturvarianten des humanen Apolipoprotein (Apo) B-100 gesucht werden, die für eine Hyperlipoproteinämie (HLP) des Typ IIa nach Fredrickson verantwortlich sind. Da die Ursache bindungsdefekter LDL in einem Sequenzunterschied der rezeptorbindenden Domäne des Liganden liegen müssen, sollte dieser Bereich durch gezielte Mutationsanalyse auf Punktmutationen hin untersucht werden. Mutationen des LDL-Rezeptors, die phänomenologisch ebenfalls in die Kategorie der Typ IIa HLP gehören, waren zum Zeitpunkt des Beginns dieser Untersuchung schon in nahezu 200 verschiedenen Varianten (Hobbs *et al.* 1992) nachgewiesen worden. Es war daher anzunehmen, auch auf Grund der hohen Frequenz des FDB_{3500Q}, dass andere Mutationen des Apo B Gens existieren, die die Rezeptorbindung der Apo B Moleküle an LDL-Rezeptoren unterbinden oder beeinträchtigen. In einem Fall einer jungen Frau mit bindungsdefekten LDL sollte zunächst durch Sequenzanalyse der Apo B-100 DNA ein möglicher genetischer Defekt nachgewiesen werden. Da die Sequenzierung in diesem Einzelfall jedoch keinen erkennbaren Unterschied der genomischen DNA ergab, wurde der Weg eines genetischen *Screenings* an einer größeren Anzahl von Patientenproben eingeschlagen. Hierfür sollte eine geeignete Methode des Mutations-*Screenings* etabliert werden. Als Untersuchungsmaterial diente ein Kollektiv von Typ IIa Patienten, die durch ein LDL-Cholesterin >1,55 g/l, einen Triglyzeridwert von < 2.0 g/l und einen HDL-Cholesterinwert von >0,35 g/l charakterisiert waren. Eine Überprüfung bindungsdefekter LDL, bzw. relevanter Aminosäure-Austauschmutationen, sollte durch *in vitro* Bindungsstudien mit humanen Fibroblasten-, bzw. an Hand eines Proliferationsassays mit U937-Zellen stattfinden.

3

Material

3.1

Chemikalien

[α - ³⁵ S]dATP (10 mCi/ml)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
100 bp DNA Längenstandard	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Acrylamid	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Agarose, Ultra Pure	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Ammoniumpersulfat	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Dimethyldichlorosilan Lösung	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
dNTPs	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Essigsäure, 100%	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung 1%	Carl Roth, Karlsruhe
Formaldehyd, 37%	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fötales Kälberserum	Linaris, Bettingen
Glycerol, Ultra Pure	ICN Biomedicals, Eschwege
Harnstoff	Applichem, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
N,N'-Methylenbisacrylamid	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Na ₂ EDTA•(2H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumborhydrid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat wasserfrei	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg
PBS, 1x	Life Technologies GmbH, Eggenstein
RPMI 1640 Medium	Life Technologies GmbH, Eggenstein
SDS	USBiochemicals, Cleveland, Ohio, USA
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Sucrose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TEMED	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Tris	USBiochemicals, Cleveland, Ohio, USA
Triton X-100	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Tween 20 (Monolaurate)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

3.2

Puffer und Medien

10x TBE-Puffer	0,9 M Tris-Borsäure 0,02 M EDTA 108 g Tris, 55 g Borsäure und 9,3 g Na ₂ EDTA•(2H ₂ O) auf 1 l ddH ₂ O auffüllen, pH 8.3
50x TAE-Puffer	2 M Tris-acetat 0,1 M EDTA 242 g Tris und 37,3 g Na ₂ EDTA•(2H ₂ O) in 900 ml ddH ₂ O lösen, 57,1 ml Essigsäure zugeben und auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen, pH 8.5 einstellen. Lagerung bei RT.
Diffusions-Puffer	0,5 M Natriumacetat 10 mM Magnesiumacetat 1 mM EDTA pH 8.0 0,1 % SDS 8,2 g Natriumacetat/100 ml (1 M), 2,45 g Magnesiumacetat/100 ml (10 mM) und 0,372 g EDTA/100 ml (10 mM) separat ansetzen und autoklavieren. 50 ml 1 M Natriumacetat, 10 ml 100 mM Magnesiumacetat, 10 ml 10 mM EDTA und 1 ml 10 % SDS (28,8 g/l) auf 100 ml ddH ₂ O auffüllen.
50x ME-Puffer	1 M MOPS 50 mM EDTA pH 8.0 52,3 g MOPS, 4,65 g Na ₂ EDTA•(2H ₂ O), 9 g NaOH auf 250 ml mit ddH ₂ O auffüllen, filtrieren.
Acrylamid Stock (30:0,5)	60 g Acrylamid und 1 g N,N'-Methylenbisacrylamid auf 200 ml mit ddH ₂ O auffüllen.
DR-Puffer	8 M Harnstoff 400 mM MOPS 20 mM EDTA pH 8.0 0,01 % Bromphenolblau 0,01 % Xylencyanol 4,8 g Harnstoff in 4 ml 50x ME-Puffer und 2 ml ddH ₂ O lösen, mit 1 ml 0,1% Farbstofflösung (und restlichem ddH ₂ O auf 10 ml auffüllen.
Farbmarker (6x)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 40% Sucrose (w/v) 4 g Sucrose, 2,5 mg Bromphenolblau und 2,5 mg Xylencyanol in 6 ml ddH ₂ O lösen und auf 10 ml mit ddH ₂ O auffüllen. Lagerung bei +4°C.

Formamid-Farbmarker	95 % (v/v) Formamid 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 0,05 % (w/v) Xylencyanol 20 mM EDTA Lagerung bei -20°C.
10x PCR-Puffer	500 mM KCl 100 mM Tris-HCl pH 8.3 3,73 g KCl, 1,21 g Tris in 100 ml ddH ₂ O lösen, pH 8.3 einstellen, autoklavieren. Lagerung bei +4°C.
25 mM MgCl₂	1,19 g MgCl ₂ in 500 ml ddH ₂ O lösen, autoklavieren. Lagerung bei +4°C.
Detergens-Puffer	50 mM KCl 2,5 mM MgCl ₂ 10 mM Tris-HCl pH 8.3 0,45 % Tween 20 0,45 % Nonidet P-40 3,73 g Kaliumchlorid, 0,24 g MgCl ₂ und 1,21 g Tris in 990 ml ddH ₂ O lösen, pH 8.3 einstellen, autoklavieren. 4,5 ml Tween 20 und 4,5 ml Nonidet P-40 zugeben. Lagerung bei +4°C.
10 % (w/v) APS	1 g Ammoniumpersulfat in 10 ml ddH ₂ O lösen. Alle 3 Tage frisch ansetzen.
40 % (v/v) Glycerol	40 ml Glycerol (99 %) in 60 ml ddH ₂ O lösen, autoklavieren.
0,1 % (v/v) Triton	100 µl Triton X-100 in 100 ml ddH ₂ O lösen.
LB Medium	10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt und 10 g NaCl in 950 ml ddH ₂ O lösen, mit 5 N NaOH auf pH 7.0 einstellen, mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen, autoklavieren.
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 ml 1M NaCl, 2,5 ml 1M KCl, pH 7.0, in 980 ml ddH ₂ O lösen, autoklavieren auf RT abkühlen lassen. 10 ml 2M Magnesium stock [1M MgCl ₂ /1M MgSO ₄] und 10 ml 2M Glukose-lösung zugeben. Zuletzt das Medium durch einen 2 µm Filter sterilfiltrieren. Bei RT in 50 ml Aliquots aufbewahren.
LB (Ampicillin/Tetracyclin) Agar	LB Medium herstellen, 15 g/l Agar zugeben, dann auf gewünschtes Endvolumen mit ddH ₂ O bringen, autoklavieren. Auf 55°C abkühlen lassen, 5 ml 10 mg/ml Ampicillin und 3ml 5 mg/ml Tetracyclin zugeben.
Ampicillin	10 mg/ml in ddH ₂ O, sterilfiltrieren.
Chloramphenicol	10 mg/ml in Ethanol (absolut).
10 mM IPTG	in sterilem H ₂ O. Lagerung bei -20°C.
2 % X-gal	20 mg/ml in Dimethylformamid. Lagerung bei -20°C, Licht-empfindlich!

3.3

Enzyme und Kits

GENECLEAN II Kit	Dianova, Hamburg
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
pT7Blue T-vector Kit	Novagen, Madison, WI, USA
QIAamp Blood Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick™ Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Beverly, USA Boehringer Mannheim, Mannheim Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ribonuklease I `A`	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
RPM® Kit	BIO 101, Vista, CA, USA
Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit	USBiochemicals, Cleveland, Ohio, USA
ssPHAGE™ DNA Spin Kit	BIO 101, Vista, CA, USA
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.4

Spezielle Geräte und Software

Ultrazentrifuge Typ L8-70	Beckman Coulter, Krefeld
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
PCR Cycler Polychain II	Polygen, Langen
Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese	QIAGEN GmbH, Hilden
Sequenzier Elektrophorese, Modell S3S	Hybaid, Mddx, UK
DNA Strider™ 1.0.1	Copyright by Christian Marck, Service de Bio- chimie - Departement de Biologie, Institut de Re- cherche Fondamentale, Commissariat a l'Energie Atomique - Frankreich
OLIGO Primer Analysis Software	Copyright 1992 Wojciech Rychlik, published by National Biosciences, Inc., Plymouth, MN, USA
POLAND	Copyright 1994 G.Steger

4 Methoden

4.1 Auswahl der Patientenproben

297 Personen mit LDL-Cholesterinkonzentrationen $>1,55$ g/l und Triglyzeridkonzentrationen $<2,0$ g/l (Typ IIa Hyperlipoproteinämie) wurden untersucht. Die Personen waren über einen definierten Zeitraum (1992-1997) aus dem Routine-analytischen Labor für Fettstoffwechselstörungen aus einem gesamten Probenaufkommen (>2000) ausselektiert worden. Die Auswahl wurde ausschließlich bezüglich der LDL-Cholesterin- und Triglyzerid-Werte getroffen. Alter, Geschlecht, HDL-Cholesterin und Lp(a) Werte, sowie die klinische Vorgeschichte der Probanden blieben unberücksichtigt. Das Kollektiv bestand aus 155 weiblichen und 142 männlichen Patienten mit einem Altersdurchschnitt von $41,4 \pm 19,1$ Jahren, im Alter zwischen 4 und 84 Jahren. Die Genehmigung zu einer DNA-Extraktion und Analyse von Punktmutationen am Apo B-100 Gen war von dem behandelndem Arzt bei den untersuchten Personen eingeholt worden. Die Untersuchung erfolgte in Übereinstimmung mit der *Helsinki Declaration* von 1975.

4.2 Probenvorbereitung, Bestimmung der Lipidparameter und DNA Extraktion

Die untersuchten Personen wurden morgens nüchtern zur Blutentnahme gebeten. 10 ml venöses Blut wurde in EDTA·K₂-Röhrchen (Endkonzentration: 1,5-2 g/l) entnommen und 30 Minuten bei 1500 g, 20°C zentrifugiert. Der Plasma-Überstand wurde zur Lipid- und Lipoproteinbestimmung verwendet, und genomische DNA wurde aus dem Buffy Coat präpariert. Die Cholesterinbestimmung erfolgte enzymatisch mit Reagenzien der Firma Boehringer Mannheim (Mannheim, D). Das HDL-Cholesterin wurde nach Präzipitation der Apo B-enthaltenden Lipoproteine gemessen (März und Groß 1986). Das LDL-Cholesterin wurde nach Friedewald (Friedewald *et al.* 1972) berechnet. Apo B- und Apo AI-Bestimmungen erfolgten in einem Protein-Array (Beckmann Instruments, CA, USA) mit handelsüblichen Reagenzien. Für die Lp(a)-Messung wurde ein RIA-Kit der Firma Pharmacia (Freiburg, D) verwendet. Die DNA-Isolierung aus 200 µl Buffy Coat erfolgte mit dem QIAamp Blood Kit der Firma Quiagen (Hilden, D). Die DNA wurde in 200 µl sterilem Wasser gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Für die Ausbeute an isolierter DNA gibt der Hersteller eine Menge von 75-125 ng/µl an (QIAamp Blood Kit Handbook). DNA-Sequenzanalysen, die Suche nach spezifischen Restriktionsendonuklease-Spaltstellen und das Oligonukleotid-Primer Design erfolgte mit Hilfe der Software DNA Strider™ 1.0.1, DNA and Protein Sequence Analysis Program, Copyright by Christian Marck.

4.3 Oligonukleotid-Primer Sequenzen

(1) Apo B-100 cDNA Klonierung und Sequenzierung

Bezeichn.	Primer Name	Primer Sequenz	AS-Kodon	Länge [bp]
Apo B Insert I	<i>K1</i>	5' TTGAAGGAATTCTTGAAAACGACAAAGCAA ^a	3131-3396	798
	<i>K2</i>	5' CACTTCCATATTTTTTCGTGGTAAGCTCAC ^a		
Apo B Insert II	<i>K3</i>	5' GAAGTTAGCCACAGCTCTGTCTCTGAGCAA ^a	3366-3638	816
	<i>K4</i>	5' AAGGATCCTGCAATGTCAAGGTGTGCCTTT ^a		
	<i>S1</i>	5' GTCAGCATGCCTAGTTTCTCCATCCTAG		
	<i>S2</i>	5' GAAGGACTGGCAGCTCTA		
	<i>S3</i>	5' CCTACTGTCTCTTCTCCATGGAA		
	<i>S4</i>	5' AGGGTTCGGTTCTTTCTCG		
	<i>S5</i>	5' GCCAAGGTCAGGGAAATCA		
	<i>HphI</i> RFLP	<i>R1</i>		

(2) TGGE-Fragmente

Bezeichn.	Primer Name	Primer Sequenz	AS-Kodon	Länge [bp]
Fragm. A	<i>A1 (=K1)</i>	5' TTGAAGGAATTCTTGAAAACGACAAAGCAA ^a	3131-3281	451
	<i>A2</i>	5' GAAGGACTGGCAGCTCTA		
Fragm. B	<i>B1*</i>	5' ccgcccgcgcccccgcCGTGTGCCTTCATACACATT	3264-3337	222
	<i>B2</i>	5' AGCAACAATATCTGACTGGT		
Fragm. C	<i>C1</i>	5' TTACCTATGATTTCTCCTTT	3310-3396	260
	<i>C2*</i>	5' ccccgcgcccccgcCGTGTGCCTTCATACACATT ^a		
Fragm. D	<i>D1*</i>	5' ccccgcgcccccgcGAAGTTAGCCACAGCTCTGT	3366-3453	261
	<i>D2</i>	5' TTGTGGTCAACTGCTCCTTTAGCGG		
Fragm. E	<i>E1</i>	5' CCTACTGTCTCTTCTCCATGGAA	3425-3534	329
	<i>E2</i>	5' GAATATATGCGTTGGAGTGTGGCTTCTCC		
Fragm. F	<i>F1</i>	5' CCAACACTTACTTGAATTCCAAGAGCAC	3490-3638	445
	<i>F2 (=K4)</i>	5' AAGGATCCTGCAATGTCAAGGTGTGCCTTT ^a		
Fragm. G	<i>G1*</i>	5' ccgcccgcgcccccgcGAGCTTCCAATGACCAAGA	3622-3726	314
	<i>G2</i>	5' AATGGGACATGGAACGTAGG		
Fragm. H	<i>H1</i>	5' AATTCAGTCTTGTGCATGCC	3714-3837	372
	<i>H2*</i>	5' ccgcccgcgcccccgcAATCTCAATGGTCTGCTCAG		
Fragm. I	<i>I1</i>	5' CTACGTAATCTTCAGGACCTTT	4269-4387	356
	<i>I2*</i>	5' cccgcgcccccgcAGGTTCTTGATCAGACTGACTA		
Fragm. J	<i>J1</i>	5' TACAGCAGATCCATCAATACATTA	4347-4498	455
	<i>J2</i>	5' AATGGACAGGTCAATCAATCTT		

(3) Apo B-100 Kodon 4369-Mutagenese

Bezeichn.	Primer Name	Primer Sequenz	AS-Kodon	Länge [bp]
apoBexon29	A	5'GATGTATAGGGAAGTGTGAAAGA	4240-Intron29	931
	D	5'TTGGAAGAAGAATAAATGAAGAT		
	C	5'GTATAGTTGGC <u>XXX</u> ACAGTGAAATA ^b		
	B	5'CATAATATTTCACTGT <u>XXX</u> GCCA ^b		

(4) RFLP-Nachweis von Punktmutationen und Haplotypisierungen**A. Haplotypisierung an Hand bekannter Apo B-100 Polymorphismen**

Bezeichn.	Primer Name	Primer Sequenz	AS-Kodon	Länge [bp]
<i>MspI</i> RFLP	5'	5'CAAAGCCACCCTGGAAGTCTCTCC	3558-3679	362
	3'	5'TTGAAACACGAAGATGCTGTCTCC		
<i>EcoRI</i> RFLP	5'	5'CACTGGGACCTACCAAGAGTGG	4110-4206	288
	3'	5'GAATATACCTGGGACAGTACCG		
<i>XbaI</i> RFLP	5'	5'GGAGACTATTCAGAAGCTAA ^c	2344-2581	710
	3'	5'GAAGAGCCTGAAGACTGACT ^c		
Ins/Del	5'	5'CAGCTGGCGATGGACCCGCCGA ^c	Signalpeptid	
	3'	5'ACCGGCCCTGGCGCCC GCCAGCA ^c		
3'VNTR	5'	5'ATGGAAACGGAGAAATTATG ^c	3'nichttranslatierte Region	
	3'	5'CCTTCTCACTTGGCAAATAC ^c		

B. RFLP-Analyse der Apo B-100 Punktmutationen

Bezeichn.	Primer Name	Primer Sequenz	AS-Kodon	Länge [bp]
<i>MspI</i> 3500Q	5'	5'CCAACACTTACTTGAATTCCAAGAGCACCC ^d	3490-3534	133
	3'	5'GAATATATGCGTTGGAGTGTGGCTTCTCC		
<i>TaqI</i> 3405	<i>D3</i>	5'CAGTGGCAACAACCAAAAAGTC ^e	3397-3453	169
	<i>D2</i>	5'TTGTGGTCAACTGCTCCTTTAGCGG		
<i>PstI</i> 4311	<i>I3</i>	5'AGATGAGATCAACACAATCTGC	4303-4387	272
	<i>I2</i>	5'cccgccgcccgcccccgccAGGTTCTTGATCAGACTGACTA		

^aRef.: Dunning *et al.* (1991), ^b variable Basentriplets (s. Tab. 5.4), ^c Ref.: Boerwinkle *et al.* (1990), ^d Ref.: Hansen *et al.* (1991), ^e Ref.: modifiziert nach Pullinger *et al.* (1996)

unterstrichene Basen bezeichnen *mismatch* Positionen zur Einführung einer Restriktionsenzym Spaltstelle

* Primer wurden mit GC-Überhang synthetisiert (Kleinbuchstaben). Der GC-Überhang erzeugt ein um 20 Basenpaare verlängertes Amplifikat.

4.4 Klonierung und Sequenzierung von Apo B-100 cDNA

4.4.1 Klonierung

Mit Hilfe des pT7Blue(R) T-Vektor Klonierungssystems der Firma Novagen (Madison, WI, USA) wurde die cDNA des ApoB-100 (Kodon 3131 bis 3638, cDNA Position 9.600-11.122) einer Patientin (S.K.) mit primärer Typ IIa Hyperlipoproteinämie (HLP) in BlueScript Vektoren kloniert. Die Klonierungsregion (*lacZ* α -Peptid 'cloning site') des Plasmids ist in Abbildung 4.1 gezeigt. Die Fragmente wurden aus Produkten von zwei PCR-Reaktionen gewonnen. Fragment I hatte eine Länge von 798 bp mit je einer *Hind*III und einer *Bam*HI Spaltstelle, Fragment II hatte eine Länge von 816 bp mit den Spaltstellen *Pst*I und *Eco*RI. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 4.3 (1) (Primer *K1-K4*) angegeben. 30 PCR-Zyklen wurden mit den Temperaturschritten 94°C 1 Min, 55°C 1 Min und 72°C 3 Min durchgeführt. In dem PCR Ansatz (Gesamtvolumen: 50 μ l) enthalten waren: 0.3-0.5 μ g genomische DNA der S.K., 60 pM Oligonukleotid Primer, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 2,0 mM MgCl₂, 25% Detergens Puffer (50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 0,45% Tween 20, 0,45% Nonidet P-40), 200 μ M je dNTP und 1,5 *Units Taq* DNA-Polymerase (Amersham Pharmacia, Freiburg, D). Die Amplifikationsprodukte wurden in einem 20 g/l Agarose Gel (1xTAE-Puffer, 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid) sichtbar gemacht, die Banden ausgeschnitten und mit den Reagenzien des GeneClean II Kits (Dianova, Hamburg) gereinigt. Nach der Reinigung wurden die PCR Produkte in 20 μ l sterilem Wasser eluiert.

Die Ligation der gereinigten PCR Fragmente wurde mit 50 ng pT7Blue T-Vektor, 1 μ l DNA (ca. 80 ng), 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,5 mM ATP und 2-3 Weiss¹ Einheiten T4 DNA Ligase in einem 10 μ l Reaktionsvolumen über 5 Stunden bei 16°C durchgeführt. Die Ligationseffizienz wurde mit einem Kontroll Insert (50 bp, 10 ng) in einem Parallelansatz getestet. Bei der anschließenden Transformation wurden kompetente Zellen (NovaBlue Competent Cells, 1 ml, CatNo. 69835-4) verwendet, die bei +4°C (auf Eis) langsam aufgetaut wurden. Ein Mix aus 30 μ l Bakterien und 5 μ l Ligationsmix wurde in zuvor auf Eis gekühlten, sterilen Polypropylenröhrchen (14 ml, Falcon 2059, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA) hergestellt und 30 Minuten auf Eis gestellt. Dann wurde die Transformation 40 Sekunden bei 42°C durchgeführt und die Zellen sofort nochmals für 2 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde 120 μ l SOC Medium zugegeben und 1 Stunde bei 37°C und 200-250 rpm geschüttelt. Agar Platten (15 g/l LB-Medium) mit 50 μ g/ml Ampicillin und 15 μ g/ml

¹ Weiss *et al.* 1968 J. Biol. Chem. 243:4543

Tetracyclin wurden 30 Minuten vor Gebrauch mit je 35 μ l 50 mg/ml X-gal und 20 μ l 100 mM IPTG bestrichen. Anschließend wurden je 50 μ l transformierte Zellen ausplattiert. Der Transformationserfolg wurde an Hand einer mit 0,2 ng Testplasmid (pT7Blue T-vector Kit) versetzten Bakteriensuspension getestet. Nach 30 Minuten Absorption durch den Agar wurden die Platten umgedreht und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Auf Grund der nicht mehr vorhandenen β -Galaktosidase Aktivität rekombinanter Zellen sind die transformierten Bakterien als weisse Kolonien zu erkennen. Mehrere Kolonien wurden in sterile Polypropylenröhrchen mit 5 ml LB-Medium (+ 100 μ g/ml Ampicillin) transferiert und über Nacht, oder evt. länger angezogen.

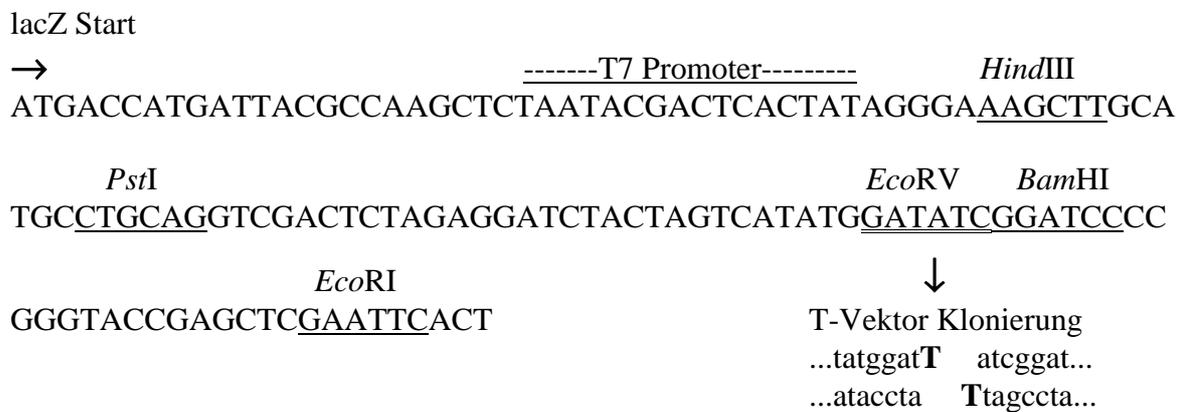


Abb. 4.1 Klonierungsregion des pT7Blue(R) Vektors (Novagen, Madison,USA). Für die Ligation eines PCR Produktes steht der an einer *EcoRV* Spaltstelle erzeugte T-Überhang zur Verfügung.

4.4.2 Plasmidpräparation

2 x 1,5 ml Bakteriensuspension wurden nach einer Methode von Stowers *et al.* (1992) in SDS-NaOH lysiert, und die Plasmid-DNA durch Binden an eine Silica-Matrix aus dem neutralisierten Lysat extrahiert. Reagenzien und Anwendungsprotokoll (RPM[®]-Kit) stammten von der Firma BIO101, Inc. USA. Die Plasmid-DNA wurde in 50 μ l sterilem Wasser eluiert. 5 μ l Plasmid DNA wurden mit 8-12 *Units* Restriktionsenzym (Amersham Pharmacia Biotech, D) und 0,04 *Kunitz Units* Ribonuklease I A (Amersham Pharmacia-Biotech, D) über Nacht bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Restriktionsfragmente wurden in einem 20 g/l Agarose Gel (Laufzeit 3 Stunden, 55 V) überprüft. Je nach Einbaurichtung (→: 5'-3'; ←: 3'-5') der Inserts kam es zu unterschiedlichen Restriktionsfragment-Längen:

Apo B Insert I:	5'-3'(\rightarrow)	<i>PstI</i>	\rightarrow 696 bp	<i>EcoRI</i>	\rightarrow 820 bp
	3'-5'(\leftarrow)		\leftarrow 178 bp		\leftarrow 36 bp
Apo B Insert II:	5'-3'(\rightarrow)	<i>HindIII</i>	\rightarrow 310 bp	<i>BamHI</i>	\rightarrow 11 bp
	3'-5'(\leftarrow)		\leftarrow 606 bp		\leftarrow 813 bp

Klone mit in 5'-3' Richtung eingebauten Apo B-100 PCR Inserts wurden sequenziert. Von den entsprechenden rekombinanten Bakterienstämmen wurden Glycerol-*stocks* (Sambrook, Fritsch, Maniatis 1989, Appendix 5) angelegt, die in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert wurden.

4.4.3 Dideoxy-Sequenzierung klonierter Apo B-100 DNA

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruch-Verfahren (Sanger *et al.* 1977) mit Hilfe eines Sequenzier Kits (Sequenase[®] Version 2.0) der Firma USB, Ohio, USA. Bei dem Enzym handelte es sich um eine aus Bakteriophagen T7 gewonnene und chemisch modifizierte DNA-Polymerase, deren 3'-5' Exonuklease Aktivität eliminiert worden war. Das Enzym verfügt neben einer hohen Prozessivität über die Fähigkeit, Nukleotid-Analoga (ddNTPs, α -thio dNTPs, dITP, 7-deaza-dGTP u.a.) bei der Polymerisierung einzubauen. Als radioaktives Isotop wurde [α -³⁵S] ATP bei der Sequenzierung verwendet.

4.4.3.1 Denaturieren doppelsträngiger Plasmid-DNA

Das Apo B-Insert I und II der rekombinanten Plasmide konnte direkt sequenziert werden, indem die Plasmide zuvor durch alkalische Denaturierung (Lim und Pene 1988) in Einzelstränge separiert wurden: 16 μ l gereinigte und RNase behandelte Plasmid DNA wurde mit 2 μ l frisch angesetztem 2 M NaOH und 2 μ l 2 mM EDTA gemischt und 30 Min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 1/10 Volumen 3 M Natrium Acetat pH 5.0 und 3 Volumen 95% Ethanol (eiskalt) zugefügt, durch vortexen gemischt und zur Präzipitation der DNA bei -20°C über Nacht inkubiert. Die DNA wurde am nächsten Tag durch 30-minütige Zentrifugation (12.000g, +4°C) pelletiert, der Überstand verworfen und anschließend mit 0,5 ml 70% Ethanol (eiskalt) gewaschen. Der Waschschrift wurde wiederholt und das DNA-Pellet schließlich bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Die DNA wurde in 7 μ l sterilem Wasser eluiert und gegebenenfalls bei -20°C gelagert.

4.4.3.2 Superinfektion mit Helfer Phagen R408

Als zweite Methode der Einzelstrang Präparation der Plasmid DNA wurde das Transferieren des Plasmid-Vektors in ein Phagen Genom durchgeführt: 5 µl rekombinante, in Glycerol-stocks gelagerte Bakterien wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium + Ampicillin (100 µg/ml) angezogen. 100 µl der Übernacht-Kultur wurden mit 4 ml LB-Medium für 4 Stunden inkubiert und anschließend mit 25 µl *Interference-Resistant* Helfer Phagen (R408) (Stratagene, Heidelberg, D) infiziert. Die Zellen wurden nochmals über Nacht kultiviert. Die Phagen-DNA wurde am folgenden Tag mit dem ssPHAGE™ DNA Spin Kit (BIO 101, USA) isoliert und in 50 µl sterilem Wasser eluiert.

4.4.3.3 Sequenziergele

Eine 8 %ige Polyacrylamidgellösung (100 ml) wurde in folgender Zusammensetzung hergestellt: 20 ml 400 g/l Acrylamid-bis (Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid 19:1), 48 g Harnstoff (8 M), 10 ml 10x TBE (90 mM Tris-Borsäure, 2 mM EDTA) und ddH₂O ad 100 ml. Zur besseren Lösung des Harnstoffs wurde das Becherglas auf einem beheizbaren (45°-50°C) Magnetrührer gestellt. Nachdem die Lösung wieder auf RT abgekühlt war, wurde sie filtriert, und 1 ml 10% APS und 30 µl TEMED wurden zugegeben. Die Gellösung wurde vorsichtig mit einer 60 ml Spritze zwischen die Glasplatten (35x40 cm) injiziert. Die Geldicke betrug 0,4 mm. Der Kamm wurde plaziert und die Glasplatten flach auf der Laborbank abgelegt. Nach 1-2 Stunden wurden die Klebebänder entfernt und das Gel in die Elektrophorese Apparatur eingebaut.

4.4.3.4 Sequenzierreaktion

Die einzelnen Schritte einer Sequenzierung nach Sanger sind:

- Primer Hybridisierung = 'Annealing'
- Markierung
- Termination

In den Annealing Mix der Sequenzierreaktion wurden 5 µl denaturierte Plasmid DNA, 0,5 pM Primer (Primersequenzen s. Kap.4.3 (1)), 2 µl 5x Sequenase® Puffer (200 mM Tris•HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl) und ddH₂O in einem Reaktionsvolumen von 10 µl gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Wasserbad 2 Min bei 65°C erhitzt und an-

schließlich langsam, innerhalb von ca. 15 Min bis auf 37°C abgekühlt. Im Anschluss daran wurde weitere 15 Min bei 37°C inkubiert. Während des Hybridisierungsvorganges des Primers an den Plasmid Einzelstrang wurden vier Terminations Reaktionsgefäße vorbereitet, in die jeweils 2,5 µl eines didesoxy G-, A-, C-, T-Terminations Mix (80 µM dATP, 80 µM dTTP, 80 µM dGTP, 80 µM dCTP, 50 mM NaCl und jeweils 8 µM des entsprechenden didesoxy Nukleotidtriphosphats) vorgelegt wurden. Diese Gefäße wurden zunächst auf Eis gestellt. Nach Beendigung des *Annealing* Schrittes wurde das Reaktionsgemisch ebenfalls auf Eis gestellt.

Für die radioaktive Markierung der DNA wurde in den *Annealing* Mix 2 µl eines dNTP-Gemisches (0,3 µM dGTP, 0,3 µM dCTP, 0,3 µM dTTP), 0,5 µl [α -³⁵S]dATP (5µCi) und 1 µl 0,1 M DTT Lösung gegeben. Das Enzym (Sequenase[®] T7 DNA-Polymerase) wurde im Verhältnis 1:8 mit entsprechendem Enzym Puffer (10 mM Tris•HCl pH 7.5, 5 mM DTT, 0,5 mg/ml BSA) verdünnt und 2 µl (3 *Units*) in die Markierungs-Reaktion eingestzt. Das Gemisch wurde 5 Min bei RT inkubiert, während zur selben Zeit die Eppendorfgefäße mit den Terminatoren auf 37°C vorgewärmt wurden. 3,5 µl des Sequenase Reaktionsgemisches wurde zu jedem Terminationsansatz pipettiert und bei 37°C inkubiert. Nach 5 Min wurde die Stopplösung (95% v/v Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% w/v Bromphenolblau, 0,05% w/v Xylencyanol FF) zugegeben und die Reaktionsgefäße auf Eis gestellt, oder gegebenenfalls bei -20°C (max. 7 Tage) aufbewahrt.

4.4.3.5

Elektrophorese und Autoradiografie

1xTBE Puffer wurde in obere und untere Pufferkammer der Elektrophoreseapparatur (Hybaid, UK) gefüllt. Ein 30minütiger Vorlauf bei 55 Watt (1200 Volt, 45 mA) wurde gestartet. Die Proben wurden 2 Min bei 80°C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt. Die Probentaschen wurden mit 1xTBE Puffer ausgespült, bevor je 3 µl einer Probe aufgetragen wurden. Die Laufzeit der DNA lag zwischen 2 und 4 Stunden bei konstanter Leistung (65 Watt) und ≥ 1600 Volt. Durch Wasserkühlung wurde eine konstante Temperatur von 45°C erzielt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele 30 Min in 15% Methanol, 5% Essigsäure fixiert und anschließend im Vakuum Trockner ca. 1 Stunde getrocknet. Mit einem Kodak X Omat AR-5 Röntgenfilm wurden die Gele über Nacht oder gegebenenfalls bis zu 2 Tage bei RT exponiert.

4.4.4 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) - Analyse

Die Apo B-100 cDNA Sequenz wurde mit den Autoradiografien der sequenzierten Klone verglichen. Die dabei vorgefundenen Basenaberrationen wurden durch Restriktionstypisierung (RFLP) der genomischen DNA-Amplifikate überprüft. Für die Restriktionen wurden die Enzyme *Hph*I, *Bsp*1286I und *Bst*UI (New England Biolabs, Beverly, USA) verwendet. Bei Mutationen, die zur Erzeugung einer Spaltstelle geführt hätten, wurden zur Kontrolle der Restriktion geeignete Amplifikationsprodukte anderer Genombereiche menschlicher DNA mitgespalten. Für die Reaktionsansätze der PCRs wurde die in 4.4.1 beschriebene Methode verwendet. Oligonukleotid-Primer waren: *K1* und *R1* (114 bp Amplifikationsprodukt, *Hph*I RFLP), *S1* und *K2* (438 bp Amplifikationsprodukt, *Bsp*1286I RFLP), *K3* und *D2* (263 bp Amplifikationsprodukt, *Bst*UI RFLP). Primersequenzen sind in Kapitel 4.3 (1) und 4.3 (2) angegeben. Primer *R1* hat an 2. Position des 3' Endes ein *mismatch*, das die Spaltstellensequenz im Wildtyp-Amplifikationsprodukt erzeugt. Das PCR-Protokoll des *Bsp*1286I-RFLP war 94°C 1 Min, 55°C 1 Min und 72°C 3 Min (30 Zyklen) und des *Bst*UI-RFPL 94°C 1 Min, 58°C 1 Min und 74°C 2 Min (30 Zyklen). Für den *Hph*I-RFLP wurde die DNA mit 30 Zyklen bei 94°C 1 Min, 58°C 1 Min und 74°C 4 Min amplifiziert.

4.5 Single-strand conformation polymorphism (SSCP)

Für den SSCP werden native Polyacrylamidgele verwendet. 50 ml Gellösung wurden aus 60 g/l Acrylamid mit einem Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid Verhältnis von 29:1 in 1xTBE Puffer hergestellt. Für die Polymerisation wurden 200 µl APS (10%) und 60 µl TEMED zugegeben. Die Gele waren nach einer Stunde polymerisiert. In einer Vertikalelektrophoresekommer (Protean II xi Elektrophoresekommer, Biorad, München) wurden Amplifikate des TGGE-Fragments F [Kap.4.3 (2)] mit vorhandener Punktmutation am Aminosäurekodon 3500 und Kontrollen ohne Mutation aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde unter variablen Bedingungen durchgeführt. Wesentliche Änderungen wurden bei der Temperatur (ungekühlt: RT, gekühlt: +10°C), der Glycerin Konzentration im Gel (0-10%) und der Fragmentgröße des untersuchten Amplifikats (≤ 445 bp) vorgenommen.

4.6 Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese

4.6.1 Erstellung von Schmelzkurven doppelsträngiger DNA

Für die Mutationsanalyse in Temperatur Gradienten Gelen eignen sich ausschließlich DNA Fragmente mit reversibler Schmelzeigenschaft. Inwieweit ein Stück doppelsträngiger DNA (oder RNA) beim Erhitzen reversibel denaturiert, ist abhängig von der Anzahl und Beschaffenheit partieller Schmelzdomänen des Fragments. Diese lassen sich an Hand der Basenzusammensetzung der Nukleinsäure theoretisch kalkulieren und in einem Schmelzdiagramm graphisch darstellen. Die Entwicklung einer hierfür geeigneten Software (POLAND) geht auf Gerhard Steger, Abteilung Biophysik der Universität Düsseldorf, zurück (Steger 1994). POLAND ist ein Anwendungsprogramm basierend auf den von D. Poland erstellten Algorithmen zur thermischen Denaturierung doppelsträngiger Nukleinsäuren (Poland 1974). Hiermit wurden optimierte DNA Fragmente konstruiert, deren Längen zwischen 200 und 500 bp lagen, und die über mindestens zwei separate Schmelzdomänen verfügten. Sequenzen, die per se keine deutliche Partiiellierung in mehrere Denaturierungsbereiche zeigten, wurden durch eine über PCR angefügte GC-reiche Nukleotidsequenz von 20 bp stabilisiert (s.a. Primersequenzen Kap.4.3 (2)). Der GC-Überhang an einem der beiden Enden des TGGE-Fragments stellt eine künstliche Domäne mit hoher Schmelztemperatur dar, die bewirkt, dass andere Bereiche zu einem früheren Zeitpunkt denaturieren. Der Doppelstrang wird währenddessen an dem GC-reichen 5' oder 3' Ende noch zusammengehalten; dadurch ist der Denaturierungsprozess reversibel. Das theoretisch kalkulierte Schmelzverhalten wurde an Hand einer senkrechten Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese anschließend experimentell überprüft.

4.6.2 TGGE PCRs

Die Apo B-100 cDNA wurde im Bereich des Exon 26 (Aminosäurekodon 3131 bis 3837) und des Exon 29 (Aminosäurekodon 4269 bis 4498) in zehn Einzelreaktionen unter Verwendung überlappender Primerpaare amplifiziert. Die Primersequenzen und deren Positionen sind in 4.3 (2) angegeben. Primer *A1* und *F2*, sowie Primer *C2*, dessen 3' Sequenz jedoch durch einen GC-Überhang ersetzt wurde, wurden in ihrer Originalsequenz aus einer bekannten Arbeit übernommen (Dunning *et al.* 1991). Das Design aller übrigen Primer erfolgte mit Hilfe einer Software (OLIGO Primer Analysis Software, Copyright 1992 Wojciech Rychlik, published by National Biosciences, Inc. Plymouth, MN, USA). Die Oligonukleotide wurden von der Firma

MWG-Biotech (Ebersberg, D) synthetisiert, über HPLC gereinigt und in lyophilisierter Form bezogen. Vor der Erstverwendung wurden sie in einer Stammkonzentration von 100 pmol/ μ l in sterilem Wasser gelöst und bei -20°C gelagert. Die PCR-Reaktionen hatten ein Gesamtvolumen von 50 μ l, darin enthalten waren: 0.3-0.5 μ g genomische DNA, 60 pM Oligonukleotid Primer, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1,5 mM MgCl_2 , 25 % Detergens-Puffer (50 mM KCl, 2,5 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 0,45% Tween 20, 0,45% Nonidet P-40), 200 μ M je dNTP und 1,5 Units *Taq* DNA-Polymerase (Amersham Pharmacia, Freiburg, D). Die PCR-Bedingungen variierten je nach Temperatur-Optimum des betreffenden Primerpaares. Folgende Temperatur-Zyklen wurden verwendet:

	I	II	III
PCR Fragment	A, B, C, D, G, H, I, J	F	E
Denaturieren	94°C , 1 Min	94°C , 1 Min	94°C , 1 Min
Primer-Hybridisierung	55°C , 1 Min	58°C , 1 Min	58°C , 1 Min
Extension	72°C , 3 Min	72°C , 3 Min	74°C , 2 Min
Anzahl der Zyklen	30	30	30

Alle PCR Reaktionen wurden durch *Hot Start* (95°C , 3 Minuten) initiiert und anschließend wurde bei 80°C die *Taq* DNA-Polymerase zugegeben. Der letzte Extensionsschritt jeder PCR wurde um 10 Minuten verlängert. Generell wurde eine Negativ-Kontrolle als Kontaminations-test bei den Amplifikationen mitgeführt.

4.6.3 TGGE-Apparatur und Polyacrylamidgele

Für die Temperatur Gradienten Gele wurde die Apparatur der Firma Quiagen (Hilden, D) benutzt. Es handelt sich dabei um eine Flachbett-Elektrophoresekammer mit zwei angeschlossenen unabhängigen Wasserheizbädern. Die Gele wurden auf Trägerfolien gegossen (210x213 mm Gelbond PAG Film, FMC Corporation, USA), die über eine dünne Schicht von 0,1% Triton mit der Heizplatte in Kontakt waren. Die Überbrückung zu den Pufferkammern mit 1x ME-Puffer (20 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 8.0) fand mit einer Doppellage Filzstoff statt. Die Gele wurden zusätzlich mit einer Lage Saran-Verpackungsfolie gegen Evaporation geschützt.

45 ml einer 8 %igen Polyacrylamidgellösung (8 M Harnstoff) wurden in folgender Zusammensetzung hergestellt: 80 g/l Acrylamid mit einem Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid

Verhältnis von 30:0,5, 480 g/l Harnstoff, 20 mM MOPS pH 8.0, 1 mM EDTA, und 20 g/l Glycerol. Als Polymerisationsstarter wurden 136 µl APS (10%) und 75 µl TEMED verwendet. Die Polymerisationszeit betrug 1 Stunde.

4.6.4 Senkrechte TGGE

Der Temperaturgradient von 20°C bis 60°C verlief senkrecht zur Laufrichtung der DNA. 40 µl PCR-Produkt wurde mit 20 µl 10x Puffer (200 mmol/L MOPS, pH 8.0, 10 mmol/L EDTA, 0,5 g/l Bromphenolblau, 0,5 g/l Xylen Cyanol FF) gemischt und mit Wasser auf ein Volumen von 200 µl gebracht. Über die gesamte Gelbreite wurde eine Probe aufgetragen. Im Vorlauf der Elektrophorese wurde die Heizplatte zunächst auf 10°C gekühlt. Nachdem die Probe eine kurze Strecke (etwa 30 Minuten, 17 V/cm, \cong 1 cm) in das Gel gelaufen war, wurde der Strom abgeschaltet und die Platte mit dem oben genannten Temperaturgradienten senkrecht zur Laufrichtung beheizt. Nach Erreichen der entsprechenden Temperaturen wurde die Elektrophorese ein zweites Mal gestartet und für ca. 1 1/2 Stunden (15 V/cm, < 30 mA) fortgesetzt. Die Gele wurden anschließend mit Silbernitrat gefärbt (s. Kap.4.5.6).

4.6.5 Parallele TGGE

Zur gleichzeitigen Analyse von bis zu 24 PCR Proben wurde der Temperaturgradient parallel zur Laufrichtung ausgerichtet. 4 µl des PCR Produkts wurden mit 4 µl eines denaturierenden Puffers (DR-Puffer) (8 mmol/L Harnstoff, 400 mmol/L MOPS, pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, 0,1 g/l Bromphenolblau, 0,1 g/l Xylen Xyanol FF) gemischt. Das Gemisch wurde 5 Minuten bei 95°C erhitzt (Denaturieren der DNA) und anschließend 15 Minuten bei 50°C (Renaturieren der DNA) inkubiert. Dann erst wurden 6 µl der Probe auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei eingestelltem Temperaturgradienten nach Auftrag der Proben sofort gestartet. Der Temperaturgradient reichte von 30°C, bzw. 35°C bis 50°C, bzw. 55°C, abhängig von dem jeweilig zu untersuchenden DNA Fragment. Die Laufzeiten variierten in Abhängigkeit von den Längen der untersuchten Fragmente zwischen 3 und 4 1/2 Stunden. Eine Silbernitratfärbung (Kap. 4.6.6) der Gele wurde durchgeführt.

4.6.6 Silbernitratfärbung der Gele

Tab. 4.1 Silberfärbung nach QIAGEN, TGGE Handbook

Schritt	Lösung	Zeit
1. Waschen	10% Ethanol, absolut 0,5 % Essigsäure	15 Min
2. Färben	1 g/l AgNO ₃	10 Min
3. Waschen	ddH ₂ O	3 x 20 Sek
4. Entwickeln	15 g/l NaOH 4 ml/l 37% Formaldehyd* 0,1 g/l NaBH ₄ *	10-20 Min
5. Fixieren	7,5 g/l NaCO ₃	15 Min

Tab. 4.2 Silberfärbung nach Blum *et al.* 1987

Schritt	Lösung	Zeit
1. Fixieren	50 % Methanol 12 % Essigsäure 0,5 ml/L 37% Formaldehyd	≥ 1 Std
2. Waschen	50% Ethanol, absolut	3 x 20 Min
3. Vorbehandlung	0,2 g/l Na ₂ S ₂ O ₃ •5H ₂ O	1 Min
4. Spülen	ddH ₂ O	3 x 20 Sek
5. Färben	2 g/l AgNO ₃ 0,75 ml/l 37% Formaldehyd	20 Min
6. Spülen	ddH ₂ O	
7. Entwickeln	60 g/l NaCO ₂ 0,5 ml/l 37% Formaldehyd* 4 mg/l Na ₂ S ₂ O ₃ •5H ₂ O	10 Min
8. Waschen	ddH ₂ O	2 x 2 Min
9. Stop	50 % Methanol 12% Essigsäure	10 Min
10. Waschen	50% Methanol	≥ 20 Min

* wurde erst unmittelbar vor Gebrauch zur Entwickler-Lösung gegeben

Alle Lösungen wurden mit ddH₂O angesetzt und mit Ausnahme der Färbelösung nur einmalig verwendet. Die Silbernitratlösung wurde bis zu 10 mal wiederverwendet.

4.7 DNA-Extraktion aus PAA-Gelen und Vorbereitung für die Sequenzanalyse

Homoduplexbanden der mutationstragenden DNA Fragmente wurden aus den gefärbten Gelen, die in diesem Fall nicht fixiert worden waren, ausgeschnitten, abgewogen und in 2 Volumen Diffusionspuffer (0.5 mol/L Ammonium Acetat, 10 mmol/L Magnesium Acetat, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0, 1 g/l SDS) 20 Minuten bei 60°C und nachfolgend 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA nach Anleitung (QIAEX II Polyacrylamidgel Extraction Kit, Qiagen, Hilden) gereinigt. Die gereinigte DNA wurde in 20 µl sterilem Wasser eluiert und ein Aliquot von 10 µl in eine anschließende Reamplifizierungsreaktion mit 2,5 Units *Pfu* DNA-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) eingesetzt. Die PCR Zyklen der zuvor angewandten PCR-Regime für das jeweilige Apo B-100 DNA Fragment wurden beibehalten. Für die PCR Reaktion wurde der 10x Reaktionspuffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 60 mM (NH₄)₂ SO₄, 1% Triton X-100, 100 mg/ml Nuklease-freies BSA] des Enzym-Herstellers verwendet, je 30 pmol Oligonukleotid-Primer und eine Nukleotidkonzentration von 200 µM pro dNTP. Die erhaltenen Amplifikate wurden erneut über eine Gelelektrophorese (20 g/l Agarose in 1x TAE-Puffer) gereinigt (QIAEX II Agarose Gel Extraction) und anschließend in 1/10 Volumen 3M Natriumacetat + 2,5 Volumen Ethanol (absolut) gefällt. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kits der Firma Amersham Life Science (Braunschweig, D) unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer. Die Reaktionsprodukte wurden in einem ALF DNA Sequencer (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) analysiert.

4.8 RFLP-Nachweis von Punktmutationen und Haplotypisierungen

4.8.1 RFLP-Nachweis von Punktmutationen

Die in der TGGE identifizierten und anschließend sequenzierten Mutationen wurden durch Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)-Detektion verifiziert. RFLP-Methoden für die FDB_{3500Q} und FDB_{3500W} Mutation wurden beschrieben (Ruzicka *et al.* 1992, Talmud *et al.* 1996) und in dieser Form übernommen.

Die G→A Transition an Kodon 3350 (L3350L) bedingt den Wegfall einer *PstI*-Spaltstelle in Fragment C. Die *PstI*-Restriktion erfolgte mit 1x Inkubationspuffer H (Boehringer Mannheim, D), 8 µl PCR-Produkt und 10 Units *PstI* Enzym (Boehringer Mannheim, D) über 4 Std bei

37°C. Die Restriktionsprodukte der Wildtyp-DNA hatten eine Länge von 124 bp und 156 bp. Die Analyse der Restriktion erfolgte in einem 20 g/l Agarosegel (5,5 V/cm, 1½ Std).

Q3405E (G→C Austausch an Kodon 3405) wurde durch Amplifikation eines 169 bp Fragmentes unter Verwendung der Primer *D3* und *D2* [Kap.4.3 (4)] und anschließende Restriktion bei 65°C über 2 Std mit *TaqI* (NewEngland Biolabs, UK) nachgewiesen. Primer *D3* enthält ein *mismatch* an 2. Position des 3' Endes, das eine *TaqI*-Spaltstelle im mutationstragenden Allel erzeugt. Für die Restriktion wurden 2 µl 10x NEBuffer *TaqI* (1 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, pH 8.4), 2 µl 10x BSA, 15 µl PCR-Produkt und 20 *Units TaqI* Enzym (NewEngland Biolabs, UK) verwendet. Zur Auftrennung der Restriktionsprodukte eigneten sich 12,5% PAA-Gele. Bei einer Spannung von 10 V/cm betrug die Elektrophoresezeit 2 ½ Std. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml H₂O) gefärbt.

Der A→G Austausch an Kodon 4311 (N4311S) wurde durch RFLP einer PCR-generierten *PstI*-Spaltstelle nachgewiesen. Das Amplifikat wurde mit den Primern *I3* und *I1* [Kap. 4.3 (4)] erzeugt. Die Restriktion wurde wie oben beschrieben (Q3405E RFLP) durchgeführt. Die A→G Transition bedingt die enzymatische Spaltung des Amplifikats (272 bp) in zwei Fragmente (249 bp, 23 bp). Wildtyp-DNA wird nicht gespalten. Die Analyse der Restriktionsprodukte erfolgte in 8% PAA-Gelen. Die Elektrophorese wurde 1 ½ Std bei 10 V/cm ausgeführt, und die Gele mit Ethidiumbromid gefärbt.

Die Mutation G→A an Kodon 4454 (A4454T) bedingt den Wegfall einer *HaeIII*-Spaltstelle im Amplifikat des TGGE-Fragments J. Die Restriktion wurde mit 1x NEBuffer2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.9), 10 *Units HaeIII* Enzym (NewEngland Biolabs, UK) und 8 µl PCR-Produkt bei 37°C über Nacht durchgeführt. Amplifizierte Wildtyp-DNA wird an zwei Positionen gespalten; die resultierenden Restriktionsprodukte waren 294, 136 und 25 bp lang. Der Verlust einer *HaeIII*-Spaltstelle bei Vorhandensein der Mutation an Kodon 4454 erzeugte zwei, 430 und 25 bp, Restriktionsfragmente im Amplifikat. Für die Auftrennung der Spaltprodukte wurden 20 g/l Agarosegele verwendet.

Die A→G Substitution an Kodon 4287 (I4287V) konnte durch *MaeII* Restriktion des TGGE-Fragments I detektiert werden. 9 µl PCR-Produkt wurden mit 10 µl 2x Enzympuffer (100 mM Tris-HCl, 440 mM NaCl, 12 mM MgCl₂, 14 mM 2-Mercaptoethanol, 200 µg/ml BSA, pH 8.8) und 1 µl (2 *Units*) *MaeII* Enzym (Boehringer Mannheim, Mannheim) über Nacht bei 50°C inkubiert. Die Mutation erzeugt eine zweite Spaltstelle im Amplifikat. Die Restriktionsprodukte (Mutation: 324, 50 und 2 bp, Wildtyp: 374 und 2 bp) wurden in einem 20 g/l Agarosegel (5,5 V/cm, 2 Std) aufgetrennt.

4.8.2 Haplotypisierung

Fünf Apo B-100 Genpolymorphismen - (Signalpeptid (SP): Insertion (Ins) oder Deletion (Del), *XbaI* (ACT→ACC, Thr²⁴⁸⁸→Thr) RFLP, *MspI* (CGG→CAG, Arg³⁶¹¹→Gln) RFLP, *EcoRI* (AAA→GAA, Lys⁴¹⁵⁴→Glu) RFLP und die 3' hypervariable Region (3'VNTR) - wurden analysiert. Der Signalpeptid-Polymorphismus (Boerwinkle und Chan 1989) und der *XbaI*-RFLP (Priestley *et al.* 1985) wurden nach Bedingungen von Boerwinkle *et al.* (1990) bestimmt. Zur Genotypisierung des *EcoRI*- und *MspI*-Polymorphismus (Priestley *et al.* 1985) wurde wie folgt vorgegangen: Primersequenzen sind in Kapitel 4.3 (4) angegeben. Die Reaktionsvolumen (20 µl) enthielten 20 pmol/l Primermix, 80 µmol/l der einzelnen dNTPs, 20-40 ng genomische DNA und 0.5 Units *Taq*-DNA-Polymerase. Reaktionsbedingungen waren: 35 Zyklen, Denaturierung: 95°C, 30 Sekunden, *Annealing*: 60°C, 1 Minute und *Elongation*: 72°C, 15 Sekunden. Die PCR-Produkte wurden bei 37°C für 3 Stunden mit 10 Units des entsprechenden Restriktionsenzym und 10x Enzym-Puffer inkubiert und anschließend in einem 20 g/l Agarosegel aufgetrennt. Die Bestimmung der Anzahl repetitiver Sequenzen des 3'VNTR-Polymorphismus erfolgte wie in März *et al.* (1993) beschrieben.

4.9 Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese

Am Aminosäurekodon 4369 (Tryptophan) im Exon 29 des Apo B-100 wurden durch Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese sieben unterschiedliche Punktmutationen eingefügt. Hierbei wurden alle Varianten einer Substitution mit Ausnahme der für Transkriptions-Stop kodierenden zwei Triplets (TAG und TGA) erzeugt. Das Prinzip der von Ho *et al.* (1989) beschriebenen Methode ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Es beruht auf der Durchführung zweier aufeinanderfolgender PCR-Reaktionen. In einer ersten PCR wurde das 3' Ende von Exon 29 (Apo B-100 cDNA: 12929-13817(+43)) in zwei überlappenden Fragmenten (AB und CD) mit *Pfu* DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) amplifiziert. 0,3-0,5 µg genomische DNA wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl in die PCR eingesetzt (Amplifikationsprotokoll A, Tabelle 4.3). In der Überschneidungssequenz wurden durch entsprechend modifizierte Primer die gewünschte Substitution in beide Amplifikate eingebaut. Primersequenzen (A,B,C,D) s. Kap.4.3. (3). Die Amplifikationsprodukte wurden über eine Agarosegel-Elektrophorese (20 g/l in 1xTBE) gereinigt (QIAquickTM Kit, Qiagen, Hilden), in 30 µl ddH₂O gelöst und anschließend durch einen erneuten PCR-Zyklus miteinander fusioniert, wobei die komplementären Sequenzen von Fragment AB und CD als Primer dienen. Durch Zugabe der externen Pri-

mer A und D im zweiten PCR-Zyklus wurde das Fusionsprodukt, Fragment AD mit der Punktmutation generiert (Amplifikationsprotokoll B, Tabelle 4.3). Die PCR-Produkte wurden anschließend über eine QIAquickTM Agarosegel-Extraktion (20 g/l Agarose in 1x TBE) gereinigt und in 30 µl sterilem H₂O gelöst. Diese dienten in einer 1:10 Verdünnung als Vorlage für die Mutationsanalyse in der TGGE.

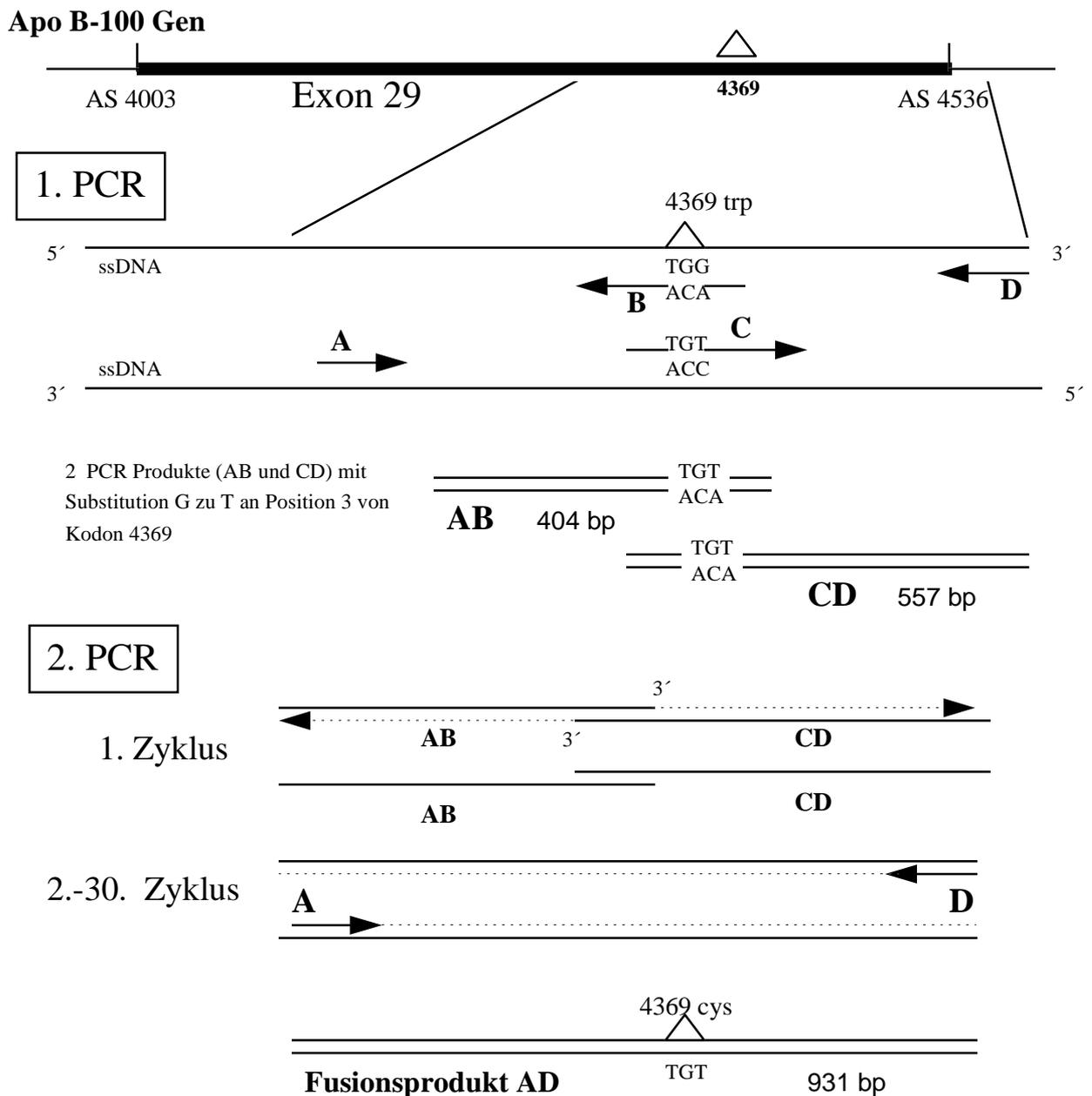


Abb. 4.2 Einfügen einer Punktmutation G→T an Kodon 4369 des Apo B-100 Gens (Exon 29) durch Oligonukleotid gesteuerte Mutagenese (Ho *et al.* 1989). Beschreibung s.Kap. 4.9. Durch die Transversion kodiert das Basentriplett an Position 4369 der Aminosäuresequenz des Apo B-100 für Cystein an Stelle von Tryptophan. Durch entsprechende Modifikation der Primer B und C konnten alle gewünschten Substitutionen in das Fusionsprodukt eingefügt werden.

Tab. 4.3 PCR-Protokolle für die Amplifikation mit *Pfu* DNA-Polymerase

	A (1.PCR)	B (2. PCR)
Komponente	Konzentration	Konzentration
10x PCR-Puffer	1x	1x
MgCl ₂	2,0 mmol/l	2,0 mmol/l
Detergens-Puffer	25 %	25 %
dNTPs	0,8 mmol/l	0,8 mmol/l
Primer	60 pmol/l (A und B, bzw. C und D)	60 pmol/l (A und D)
Templat DNA	genom. DNA (~500 ng)	0,5 µl PCR Produkt
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	2,5 U	2,5 U
Reaktionsvolumen	50 µl	50 µl
Anzahl der PCR-Zyklen	30	30
	Denaturieren:	94°C 1 Min
	Primer-Hybridisierung:	54°C 1 Min
	Extension:	72°C 3 Min
	abschließende Extension:	72°C 10 Min

4.9.1 Analyse der durch Mutagenese erzeugten Punktmutationen in der TGGE

Je 1 µl Wildtyp AD-PCR Produkt und 1 µl Fusionsprodukt AD wurden als Vorlage in die Reaktion der TGGE-PCR J eingesetzt, um das Vorhandensein einer heterozygoten Mutation zu simulieren. PCR-Protokoll s. Kap.4.6.2. Das entstandene PCR-Fragment hatte eine Länge von 455 bp und umfasste den Bereich von Kodon 4347-4498 des Apo B-100. 3 µl einer 1:10 Verdünnung der *nested*-PCR wurden in 3 µl DR-Auftragpuffer gelöst, zunächst de- und renaturiert (95°C 3 Min, 50°C 15 Min) und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die TGGE wurde bei 15 V/cm (<30 mA) und einem Temperaturgradienten von 30°C - 55°C über 3 1/2 Stunden durchgeführt. Drei der sieben Mutationen (CGG, TCG und TGT) konnten zusätzlich durch RFLP-Analyse verifiziert werden. Die Transition TGG→CGG (Trp⁴³⁶⁹→Arg) erzeugt fünf Restriktionsstellen: *Msp*I, *Hpa*II, *Hae*III, *Gdi*II und *Eae*I. Von diesen wurde die *Msp*I Restriktion durchgeführt. Die Substitution TGG→TCG (Trp⁴³⁶⁹→Ser) erzeugt eine *Taq*I-Spaltstelle, und TGG→TGT (Trp⁴³⁶⁹→Cys) war durch *Rsa*I RFLP nachweisbar.

4.10 In vitro Bindungs Assay von ¹²⁵I-markierten LDL

LDL (1,019 < d > 1,063 g/ml) wurden aus frischem EDTA Plasma durch Ultrazentrifugation (Kap. 4.11.2) isoliert und nach der Jod-Monochlorid Methode (Goldstein und Brown 1974) mit ¹²⁵I markiert. Humane Fibroblasten Zellen wurden von Haut-Biopsien normolipidämi-

scher Personen kultiviert. Die Zellen wurden in 24-Loch Polystyrenplatten angezogen und 40 Stunden vor Beginn der Bindungsexperimente in 10% (v/v) humanem lipoproteindefizientem Medium kultiviert, um die LDL-Rezeptor-Synthese zu stimulieren. Bindung, Aufnahme und Degradation der ^{125}I -markierten LDL wurde nach der Methode von Goldstein *et al.* (1983) unter geringfügigen Abänderungen (März *et al.* 1993) gemessen.

4.11 U-937 Zellen Wachstums Assay

4.11.1 U-937 Lymphom Zellen

Die humanen Lymphom Zellen wurden 1976 charakterisiert (Sundstrom und Nilson 1976). Als bindegewebsspezifische Makrophagen (Histozyten) geben sie ein weites Spektrum physiologischer Spezifikationen, so unter anderen auch den Verlust der zelleigenen Cholesterinbiosynthese (Bilheimer *et al.* 1987). U-937 Zellen wachsen konfluent und benötigen fötales Kälber Serum (FCS) (enthält durchschnittlich 31 mg/dl Cholesterin) zum Wachstum. Ihre Verdopplungszeit beträgt 48 Stunden. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage in frisches Medium (90% RPMI 1640 Medium, 2 g/l Glucose, 10 mM HEPES, 1 mM Natrium Pyruvat, 10% hitzeinaktiviertes FCS und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin) transferiert und bei einer Zelldichte von maximal 2×10^5 Zellen/ml in 185 cm² Flaschen (Nunc, Wiesbaden) kultiviert. Ein Vitalitäts-Test der Zellen wurde durch Trypanblau Färbung vorgenommen (0,5 ml 0,4% Trypanblau Lösung + 0,3 ml Hanks' Balanced Salts + 0,2 ml Zellsuspension). Zellzahl und Farbstoffanreicherung der Zellen wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

4.11.2 LDL-Isolation und Reinigung

Die LDL wurden aus frisch abgenommenem EDTA-Plasma durch Ultrazentrifugation (UZ) isoliert. Zunächst mussten die VLDL/IDL Fraktionen ($d < 1.019$ g/ml) bei einer DichteEinstellung von 1.0189 g/ml und einer 20 Std UZ bei 44000 Min^{-1} , 15°C abgetrennt werden.. Die in der oberen Schicht flottierten VLDL/IDL wurden mit einer Kanüle abgesaugt und der Unterstand sorgfältig homogenisiert. Nach Zugabe einer neuen Dichtelösung (11,42 g/l NaCl, 0,1 g/l EDTA•Na₂, 282,27 g/l NaBr) wurde die Dichte auf 1.065 g/ml angehoben. Die LDL wurden nach einer 22 Std UZ bei 44000 Min^{-1} , 15°C als flottierte Fraktion abgenommen.

Ein Teil der LDL wurde in 20% Glycerin bei -20°C eingefroren und 1 ml LDL wurde in Dialyse Schläuchen (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) über Nacht in einer Lösung von 0,15 M NaCl₂, 0,3 mM Na₂EDTA•(2H₂O), 20 mM Tris pH 7.4 bei +4°C dialysiert. Anschließend wurde eine

Cholesterinmessung durchgeführt. Die dialysierten LDL wurden schließlich sterilfiltriert (0,2 µm Minisart Sterilfilter, Satorius, Göttingen) und in einer Stammlösung von 100 µg/ml LDL-Cholesterin mit Zellmedium ohne FCS verdünnt.

4.11.3

In vitro Proliferations Assay

Die U-937 Zellen wurden 24 Stunden vor Beginn des Assays in FCS-freies Medium transferriert, um eine Entleerung der intrazellulären Cholesterinspeicher zu erreichen. Am nächsten Tag wurden die Zellen 2x mit sterilem PBS gewaschen und mit einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml in frischem FCS-freiem Medium aufgenommen. In einer 96-Loch Platte (0,65µm sterile Durapore Filter Platte, Millipore) wurden 100 µl FCS-freies Medium mit fünf verschiedenen LDL-Cholesterin Konzentrationen (5, 10, 15, 20 und 25 µg/ml) in jeweils vierfach Parallelansätzen vorgelegt. Je 100 µl Zellsuspension wurde anschließend zugegeben. Vier Kontrollen mit Zellen ohne LDL Zusätze wurde mitgeführt. Die Zellen wurden 48 Stunden bei 37°C inkubiert.

6-8 Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit wurden 25 µl (0,5 µCi) ^3H Thymidin pro Loch zugegeben. Bei der Zellteilung wird in der DNA-Synthesephase das radioaktiv markierte Thymidin in die DNA eingebaut und nach Abtrennung des im Medium verbleibenden ^3H Thymidins wird eine Messung des in den Zellen befindlichen Tritiums (^3H) durchgeführt. Die Zellen wurden hierzu auf speziellen 96-Loch Platten mit intergriertem Filter (0,65µm sterile Durapore Filter Platte, Millipore, Eschborn) angezogen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Zellmedium über eine Vakuum Apparatur abgesaugt. Die auf dem Filter zurückgehaltenen Zellen wurden zweimal mit 0,2 ml PBS gewaschen. Durch anschließende Zugabe von 0,2 ml Ethanol und Inkubation der Zellen für 10 Min wurden die Zellwände permeabilisiert und die DNA konnte präzipitieren. Die Zellen wurden anschließend noch dreimal kurz mit 0,2 ml Ethanol (abs.) gewaschen. Nachdem die Filter nach etwa einer halben Stunde bei RT getrocknet waren, wurden sie aus den Platten entfernt und einzeln in 7 ml Szintillationsgefäße mit 0,5 ml Natriumhypochlorid (0,4%) gegeben. Die Gefäße wurden verschlossen und 30 Min geschüttelt. Durch das Natriumhypochlorid wird die Freisetzung der radioaktiven Nukleinsäuren aus den Filtermembranen unterstützt (Millipore Corporation 1991). Die Messung erfolgte nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Beckmann Szintillator (Typenbezeichnung: LS 6000 IC).

5 Ergebnisse

I. TEIL

Mutationsanalyse der Apo B-100 DNA einer Patientin mit primärer Typ IIa Hyperlipoproteinämie im Bereich der rezeptorbindenden Domäne (Kodon 3131-3638)

5.1 Vorgeschichte

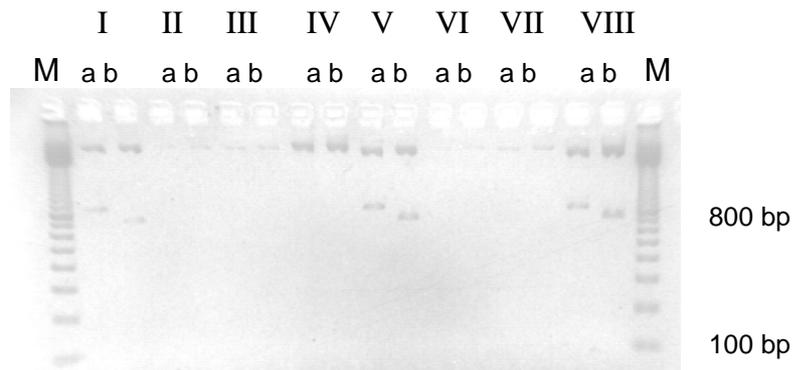
Im Dezember 1994 wurde dem Labor für angewandte Biochemie die Blutprobe einer jungen Frau (S.K., 25 Jahre) zugesandt, deren LDL eine deutlich verminderte Bindungsaffinität an LDL-Rezeptoren in Fibroblasten-Zellkulturen aufwies. Die gegen gepoolte LDL-Kompetitoren normolipidämischer Personen gemessene Bindungsfähigkeit ihrer LDL war in etwa der von FDB_{3500Q} heterozygoten LDL vergleichbar. Das bei ihr gemessene Gesamtcholesterin lag bei 3,27 g/l, das LDL-Cholesterin (LDL-C) bei 2,33 g/l und ihr Apo B Wert war ebenfalls deutlich erhöht mit 2,33 g/l. Triglyzeride (1,26 g/l) und HDL-Cholesterin (HDL-C) (0,68 g/l) Konzentrationen lagen im Normalbereich. S.K. ist negativ für die FDB_{3500Q} Mutation. Sie war normalgewichtig (160 cm, 51 kg, BMI \cong 20 kg/m²) und zeigte keine äußerlichen Symptome (Arcus lipoides, Xanthelasmen, Xanthome) einer Hypercholesterinämie. Alle übrigen Laborbefunde der S.K. (Leberfunktionsproben, harnpflichtige Substanzen, Blutzucker, Schilddrüsenhormone) lagen im Normbereich. Auch fanden sich normale Konzentrationen der Cholesterinpräkursoren Cholestanol, Campesterin und Sitosterin im Blut. Die Familienmitglieder der S.K. wurden ebenfalls zu einer Blutentnahme gebeten. Der 54-jährige Vater zeigte eine TypIIb Hyperlipoproteinämie (HLP) mit erhöhten Cholesterin- (3,36 g/l) und Triglyzerid- (2,81 g/l) Werten. An beiden Augenlidern wurden Xanthelasmen diagnostiziert. Sein Vater (Großvater der S.K.) war im Alter von 68 Jahren einem Myokard Infarkt (MI) erlegen. Die 49-jährige Mutter der Patientin hatte einen altersentsprechenden Normalbefund mit auffallend gutem HDL-C Wert. Der Bruder der S.K. (31 Jahre) hatte ein LDL-C von 1,42 g/l (Gesamtcholesterin 2,24 g/l), das im oberen Bereich normaler Werte liegt. Die Patientin S.K. erhielt nach den zunächst empfohlenen diätischen Behandlungsmaßnahmen, die jedoch erfolglos waren, eine medikamentöse Therapie. Unter der Behandlung mit Pravastatin (20 mg/Tag) über einen Zeitraum von 4 Wochen fiel die LDL-C Konzentration bei S.K um 21% auf 1,85 g/l, der Apo B Wert sogar um 29% auf 1,65 g/l. Das HDL-C stieg leicht (um 4%) und die Triglyzeride

wurde um 14% gesenkt. Da aus dem vorhandenen Bindungsdefekt der LDL von S.K. auf eine Mutation am Apo B-100 geschlossen werden konnte, wurde der zu diesem Zeitpunkt vermutete LDL-Rezeptorbindungsbereich der Apo B-100 DNA der Patientin kloniert und anschließend sequenziert.

5.2 Klonierung und Sequenzierung

Für die Sequenzanalyse wurde die cDNA des Apo B-100 im Bereich der Nukleotidpositionen 9.600-11.122 (Aminosäurekodon 3131-3638) amplifiziert. Dieser Bereich umfasst die für die Rezeptorbindung kodierende Region des Apo B-100 (A) Kodon 3147-3157 und (B) Kodon 3359-3369 weitläufig und schliesst den carboxyterminal davon befindlichen Aminosäurerest 3500 ein, dessen Mutation beim FDB_{3500Q} zur verminderten Rezeptoraffinität führt. Für die PCR wurden zwei Primerpaare aus einer bekannten Arbeit übernommen (Dunning *et al.* 1991), mit denen zwei überlappende PCR-Fragmente generiert wurden (Längen: 798 und 816 Basenpaare). Beide PCR-Fragmente (hier als Insert I und Insert II bezeichnet) wurden durch dT-Klonierung in Bluescript Vektoren eingebaut und nach der Transformation in *E.coli* vervielfältigt. Die durch alkalische Denaturierung der Plasmid DNA erhaltenen DNA Einzelstränge wurden nach dem von Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Didesoxynukleotid-Verfahren sequenziert. Insgesamt wurden 19 rekombinante Plasmide nach der Transformation erhalten: 10 Klone (Nr. I-X) des Inserts I (798 Basenpaare) und 9 Klone (Nr. 1-9) des Inserts II (816 Basenpaare). Abbildung 5.1 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der nach Plasmidpräparation und anschließender Restriktion erhaltenen Klon-Fragmente: Klon I, V, VIII, IX und X hatten in 5'-3'Richtung eingebaute Insert I-DNA und in ebenfalls 5 Klonen (Nr. 4, 5, 6, 7, 8) hatte Insert II die korrekte Einbaurichtung. Die Sequenzier-Primer wurden so gewählt, dass eine Strecke von maximal 200 Basenpaaren pro Sequenzierreaktion ausgewertet werden musste. Einige Abschnitte lagen indes wesentlich darunter, so dass in sehr engem Bereich und mit kurzen Elektrophoreselaufzeiten (2-3¹/₂ Stunden) sequenziert werden konnte. Pro Fragment wurden vier Klone sequenziert, um statistisch die Möglichkeit der Entdeckung eines heterozygoten Gendefektes zu ermöglichen. Dabei konnten an drei Basentriplets Sequenzunterschiede festgestellt werden: ein A → T Austausch am Aminosäurekodon 3160 für Threonin, ein G → A Austausch an Position 3356 (Glycin) und eine Transition (A → G) bei 3391 (Threonin) des Apo B-100. In Abbildung 5.2 sind die entsprechenden Ausschnitte der Sequenziergele gezeigt. Alle drei Punktmutationen traten nur in jeweils einem der vier sequenzierten Klone auf.

Insert I Plasmide



Insert II Plasmide

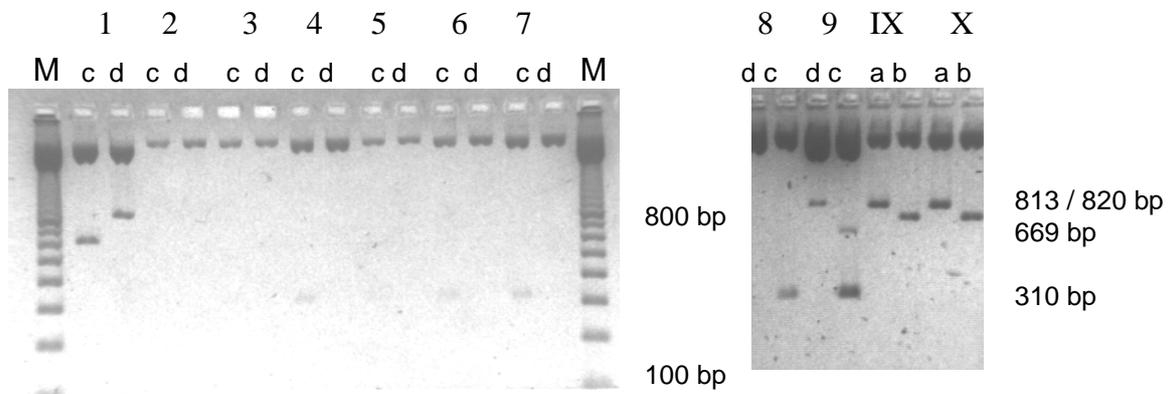


Abb. 5.1 Restriktionsanalyse der rekombinanten Plasmidvektoren. Die Plasmide wurden mit *PstI/EcoRI* (Apo B Insert I) und *HindIII/BamHI* (Apo B Insert II) gespalten und die Restriktionsprodukte in einem 20 g/l Agarosegel (5,5 V/cm) überprüft. M = 100 bp DNA Leiter, a = *EcoRI*-, b = *PstI*-, c = *HindIII*-, d = *BamHI*-Restriktion, ↑ = rekombinante Plasmide mit in 5'-3' Richtung eingebauter Apo B-100 DNA.

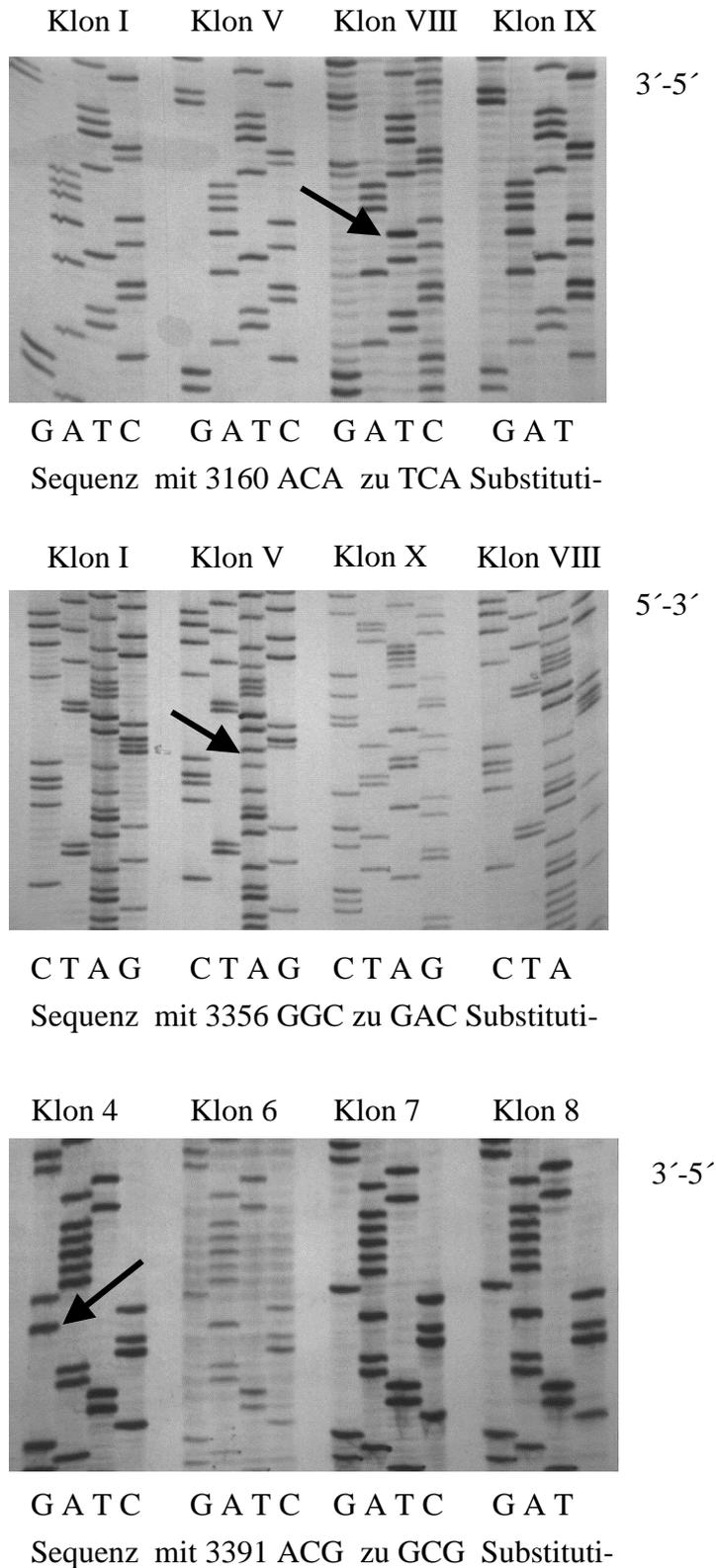


Abb. 5.2 Autoradiografien der Sequenzierungen klonierter Apo B-100 cDNA der Patientin S.K.. Die in 95% Formamid-Puffer gelöste [α - 35 S]dATP markierte ssDNA wurde in 80 g/l PAA Gelen (8 M Harnstoff) bei 65 Watt (≥ 1600 V) und einer konstanten Temperatur von 45°C elektrophoretisch getrennt. An den markierten Nukleotiden befinden sich die Substitutionen Apo B 3160_{ACA}→TCA, Apo B 3354_{GGC}→GAC und Apo B 3391_{ACG}→GCG.

5.3

Auswertung und Beurteilung

Zur Überprüfung der gefundenen Sequenzaberrationen wurde die genomische DNA der Patientin in den Bereichen der Basenveränderungen amplifiziert und anschließend mit einem für die Mutationsstelle spezifischen Restriktionsenzym (Tabelle 5.1) gespalten. Abbildung 5.3 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der drei RFLPs. Für die PCR des *HphI*-RFLP wurden der 5'Primer *K1* und der 3'Primer *R1* mit einem *mismatch* an Position 2 des 3'Endes [Sequenzen s. Kapitel 4.3 (1)] verwendet. Bei Vorhandensein des A→T Basenaustausches am Aminosäurekodon 3160 entfällt die über PCR generierte *HphI*-Spaltstelle im Amplifikationsprodukt. Die Restriktionsfragmentlängen der Wildtyp-DNA sind 85 und 29 Basenpaare (Tabelle 5.1). Der *Bsp1286I*-RFLP wurde mit dem Primerpaar *S1* und *K2* und der *BstUI*-RFLP mit dem 5'Primer *K3* und dem 3'Primer *D2* [Kapitel 4.3 (2)] durchgeführt. Die PCR-Bedingungen waren wie in Kapitel 4.4.4 beschrieben. Die Transition an Position 3356 führt zum Verlust der *Bsp1286I*-Spaltstelle. Die Restriktion mit *BstUI* sollte bei Vorhandensein der Mutation ermöglicht werden. Wildtyp-DNA verfügt über keine Spaltstelle. Die *BstUI*-Restriktion wurde daher an Hand eines Amplifikats (244 Basenpaare, Abb. 5.3 C, Bahn 7) mit bekannten *BstUI*-Spaltstellen kontrolliert. Das 244 Basenpaar-Fragment hat vier Enzymspaltstellen, die zu Restriktionsprodukten der Längen 93, 59, 52, 21 und 19 Basenpaare führen. Im Elektropherogramm (Abb. 5.3 C, Bahn 8) sind die drei längeren Spaltprodukte deutlich zu erkennen, die kürzeren, 19 und 21 Basenpaar Fragmente migrieren mit den Oligonukleotid-Primern. Die RFLP-Analysen wurden auch bei den Familienmitgliedern der S.K. durchgeführt.

Tab. 5.1 Sequenzaberrationen im sequenzierten DNA Bereich der S.K. und der durch RFLP fuhrbare Nachweis der betreffenden Substitutionen.

Apo B-100 AS Kodon	Sequenz WT→Mutation	Länge des Amplifikats (bp)	Restriktions- endonuklease	Enzymspalt- stelle geht verloren (-) entsteht (+)	Restriktions- fragmentlängen (bp)	
					WT	Mutation
3160	ACA→ <u>T</u> CA	114	<i>HphI</i>	-	85 / 29	114
3356	GGC→ <u>G</u> AC	438	<i>Bsp1286I</i>	-	314 / 124	438
3391	ACG→ <u>G</u> CG	261	<i>BstUI</i>	+	263	187 / 74

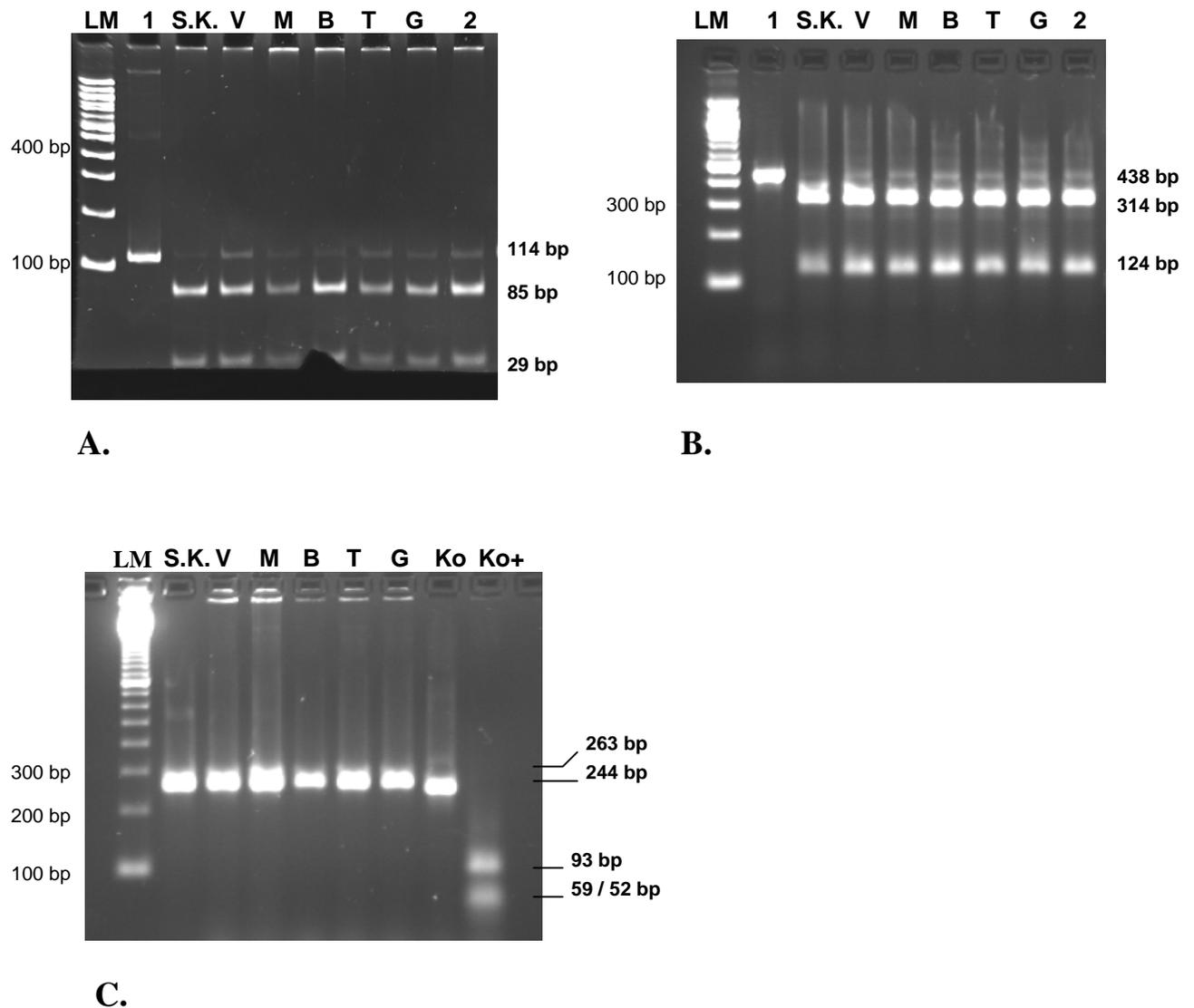


Abb. 5.3 RFLP-Analyse genomischer DNA bei S.K. und Familienmitgliedern.

A. *H_{ph}I*-Restriktion am Basentriplett 3160 des Apo B-100. Zur Auftrennung der Restriktionsprodukte wurde eine 12,5% PAGE verwendet. 1 = nicht-restringiertes Amplifikat; 2 = restringiertes Amplifikat eines Nicht-Familienmitgliedes; LM = Längenmarker (100 Basenpaar DNA Leiter); V = Vater; M = Mutter; B = Bruder; T = Tante; G = Großmutter.

B. *B_{sp}1286I*-Restriktion am Basentriplett 3356 des Apo B-100. Die Auftrennung der Restriktionsprodukte erfolgte in einem 20 g/l Agarosegel (5,5 V/cm). Die Reihenfolge des Probenauftrags war wie in A. angegeben.

C. *B_{st}UI*-Restriktion am Basentriplett 3391 des Apo B-100. Die Elektrophorese wurde in einem 20 g/l Agarosegel (5,5 V/cm) durchgeführt. LM = Längenmarker (100 Basenpaar DNA Leiter); V = Vater; M = Mutter; B = Bruder; T = Tante; G = Großmutter; Ko = nicht-gespaltenes Kontrollamplifikat (244 bp); Ko+ = *B_{st}UI*-Restriktion des Kontrollamplifikats.

Die genomische DNA der S.K. wies bei der Überprüfung durch Restriktionen mit spezifischen Endonukleasen keine der drei sequenzierten Punktmutationen an den Positionen Apo B 3160_{ACA→TCA}, Apo B 3354_{GGC→GAC} und Apo B 3391_{ACG→GCG} auf. Bei allen Familienmitgliedern zeigten sich identische Restriktionsfragmente der drei untersuchten RFLPs mit den der Wildtyp-DNA entsprechenden Fragmentlängen. Dem Auftreten derartiger Sequenzierartefakte liegen zumeist Amplifikationsfehler der *Taq* DNA-Polymerase zugrunde. Lediglich einer der vier sequenzierten Klone hatte den betreffenden Sequenzunterschied in der Autoradiografie der Sequenzierung gezeigt. Auch dies konnte als Indiz für Polymerasefehler bei der Herstellung der Insert-DNA gewertet werden, da, bei Vorhandensein einer heterozygoten Mutation im Genom statistisch einer von zwei rekombinanten Plasmidvektoren die entsprechende Substitution hätte aufweisen müssen.

Zunächst erschien es plausibel, Sequenzartefakte auf zwei Sequenziergelen zu beobachten. Die Sequenzaberrationen traten jedoch nicht bei den Gegenstrangsequenzierungen auf. Die Tatsache, dass die denaturierte DNA lediglich in angrenzende Bereiche aus 5' bzw. 3'Richtung „hinein“-sequenziert wurde, bzw. auf den Autoradiografien abgelesen werden konnte, kann hierfür eine Erklärung liefern. Alle drei beschriebenen Basenveränderungen traten im angrenzenden Bereich zu den Positionen der Sequenzierprimer auf (Abbildung 5.4). Bei der Gegenstrangsequenzierung wurde dieser Bereich meist gelelektrophoretisch nicht mehr exakt getrennt. Demzufolge waren die Mutationen nur in Autoradiografien einer Sequenzierreaktion erkennbar.

Bei der Patientin S.K. konnte keine genetische Veränderung in der Rezeptorbindungsdomäne des Apo B-100 festgestellt werden.

Das Ergebnis wurde als Hinweis auf eine möglicherweise sehr hochkonservierte Struktur des untersuchten DNA-Bereiches gewertet. Zweifelsfrei war dies jedoch bei der Anamnese einer einzigen Patienten-DNA nicht festzustellen. Es wurde daraufhin eine neue Strategie zur Mutationsanalytik für das Apo B-100 entworfen. Die konzeptionelle Änderung ging von der Mutmaßung aus, dass bei einer zu untersuchenden größeren Probenanzahl doch Veränderungen an der genetischen Information für Bindungsepitope des Apo B-100 gefunden werden könnten. Auch sollte der Überlegung nachgegangen werden, dass möglicherweise in anderen Bereichen lokalisierte Sequenzvarianten des Apo B-100 ebenfalls die Bindung von Apo B-100 an LDL-Rezeptoren beeinflussen.

5 Primer K1

1 ttgaaggaattccttgaaaacgacaaagcaatcatttgatttaagtgtaaaagctcagtataagaaaaaca
AS 3131

aca→tca (Thr₃₁₆₀→Ser) **3 Primer R1**

71 aacacaggcattccatcacaaatcctttggctgtgctttgtgagttatcagtcagagcatcaaatcctt
141 tgacaggcattttgaaaaaacagaaacaatgcatttagattttgtcaccaaatcctataatgaaacaaaa
211 attaagtttgataagtacaaagctgaaaaatctcacgacgagctccccaggacctttcaaattcctggat
281 aactgttccagttgtcaatgttgaagtgtctccattcaccatagagatgtcggcattcggctatgtggt

5 Primer S1

351 cccaaaagcagtcagcatgcctagtttctccatcataggttctgacgtccgtgtgcttcatacacatta

3 Primer S2

421 atcctgccatcattagagctgccagtccttcatgtccctagaaatctcaagctttctctccagatttca
491 aggaattgtgtaccataagccatattttttattcctgccatgggcaatattacctatgattttctcctttaa
561 atcaagtgtcatcactgaataccaatgctgaactttttaaccagtcagatattggtgctcatctcctt

ggc→gac (Gly₃₃₅₆→Asp)

631 tcttcatcttcatctgtcattgatgcactgcagtacaaattagaggggccaccacaagattgacaagaaaa

5 Primer K3

701 ggggattgaagttagccacagctctgtctctgagcaacaaatgtgtggagggtagtcataacagtactgt

3 Primer K2 acg→gcg (Thr₃₃₉₁→Ala)

771 gagcttaaccacgaaaaatatggaagtgtcagtggaacaaaccacaaaccggaaattccaattttgaga

5 Primer S3

841 atgaatttcaagcaagaacttaatggaaataccaagtcaaaacctactgtctcttctccatggaattta

3 Primer (BstUI Restriktion)

911 agtatgatttcaattcttcaatgctgtactctacccgctaaaggagcagttgaccacaagcttagcttggaa

5 Primer S4

981 aagcctcactcttacttttccattgagtcactaccaaaggagatgtcaagggttcggttctttctcgg
1051 gaatattcaggaactattgctagtgaggccaacacttacttgaattccaagagcacacggctctcagtgga
1121 agctgcagggcacttccaaaattgatgatctggaaccttgaagtaaaagaaaattttgctggagaagc
1191 cacactccaacgcatatattcctctgggagcacagtacgaaaaaccacttacagctagagggcctcttt
1261 ttcaccaacggagaacatacaagcaaagccacctggaactctctccatggcaaatgtcagctcttggtc

3 Primer S5

1331 aggtccatgcaagtcagcccagttccttccatgatttcctgaccttggccaggaagtggccctgaatgc
1401 taacactaagaaccagaagatcagatggaaaaatgaagtccggattcattctgggtctttccagagccag

3 Primer K4

1471 gtcgagctttccaatgaccaagaaaaggcacaccttgacattgcaggatcctta - 3'
AS 3638

Abb. 5.4 Nukleotidsequenz klonierten Apo B-100 cDNA (Kodon 3131-3638) der S.K.. Die Primer-Sequenzen sind fett gedruckt und unterstrichen. *K* = Klonierung, *S* = Sequenzierung, *R* = Restriktionsanalyse. Die bei der Sequenzierung des Klon VIII, Klon V und Klon 4 beobachteten Substitutionen sind kursiv/unterstrichen gekennzeichnet.

II. TEIL

Mutations-Screening der Apo B-100 DNA (Kodon 3131-3837 und 4269-4498) von 297 Personen mit Typ IIa Hyperlipoproteinämie

Die molekulargenetische Analyse der für die Rezeptorbindung kodierenden Domäne des Apo B-100 sowie angrenzender Bereiche sollte bei weiteren Personen mit Typ IIa Hyperlipoproteinämie (HLP) unbekannter Genese durchgeführt werden, in der Annahme, hier Sequenzunterschiede nachweisen zu können, die als Ursache bindungsdefekter LDL in Frage kämen.

5.4 Beschreibung des Typ IIa HLP-Patienten Kollektivs

Dem für Differentialdiagnostik von Fettstoffwechselstörungen zuständigen Labor für angewandte Biochemie der Universitätsklinik Frankfurt werden regulär Blutproben von niedergelassenen Ärzten aus dem Frankfurter Raum, der Kinder-Poliklinik in Erlangen/Bayern, dem Markus-Krankenhaus in Frankfurt und aus den Abteilungen Kardiologie, Endokrinologie und Kinderheilkunde der Uniklinik Frankfurt zugesandt. Aus dem Gesamtprobenaufkommen von 5 Jahren (1992-1997) wurden diejenigen Patientenproben ausgesucht, deren LDL-Cholesterin $> 1,55$ g/l - bei normaler Triglyzeridkonzentration ($< 2,0$ g/l) - und HDL-Cholesterin $> 0,35$ g/l war. Alter, Geschlecht und Begleiterkrankungen wurden dabei nicht berücksichtigt. Die mittleren Cholesterin-, Triglyzerid- und Apo B-Konzentrationen der Typ IIa HLP-Patienten sind in Tabelle 5.2 angegeben. Anhand der Familiennamen wurde eine Doppel- oder Mehrfachanalyse von Familienmitgliedern ausgeschlossen.

In der Gruppe der nach diesen Kriterien selektierten 297 Typ IIa HLP-Patienten waren 135 (45,5%) Personen mit moderater Hypercholesterinämie (LDL-C $1,55 > 2,0$ g/l). Bei 162 (54,5%) Patienten lag der LDL-C Wert über 2,0 g/l (bis zu einem Maximal-Wert von 6,4 g/l). Bei extrem erhöhten Cholesterin Konzentrationen ist der Verdacht auf das Vorliegen einer LDL-Rezeptormutation naheliegend. Dem klinischen Phänotyp einer Familiären Hypercholesterinämie (FH) entsprechen bei heterozygoter Manifestation meist LDL-C Konzentrationen von 3,5 - 4,5 g/l. Personen mit LDL-C Werten $> 3,5$ g/l (18% der Typ IIa HLP-Patienten) wurden dennoch mit in das Patienten Kollektiv aufgenommen, da ein doppelt vorhandener Defekt, sowohl am Apo B-100 als auch dessen Rezeptor, nicht ausgeschlossen werden konnte. Einige dieser Fälle sind in der Literatur beschrieben worden (Rubinsztein *et al.* 1993, Benlian *et al.* 1996).

Den Familiennamen zu Folge war der überwiegende Teil (96%) der Patienten deutscher Abstammung. Unter dem Anteil ausländischer Personen waren mehr als 90% kaukasisch-europäischer Herkunft (Italiener, Griechen, Türken etc.). Lediglich eine Person war asiatischer Abstammung, so dass von einem weitgehend ethnisch homogenem Kollektiv ausgegangen werden konnte.

Bei 94,5% der Patienten war mit hoher Wahrscheinlichkeit eine primäre Hyperlipoproteinämie des Typ IIa vorhanden. Bei 5,5% der Personen kam auf Grund einer Schilddrüsenunterfunktion eine sekundär bedingte HLP in Frage.

11% der Typ IIa HLP-Patienten waren zusätzlich Diabetiker, davon hatten dreiviertel einen TypII- und einviertel einen TypI-Diabetes mellitus. Vier männliche und eine weibliche Person unter 40 Jahren hatten Symptome einer KHK. Bei den >40-Jährigen waren 11 Männer (5,6%) und 18 Frauen (9,1%) an KHK erkrankt. Eine 43jährige männliche Person hatte einen Schlaganfall erlitten und drei weitere Personen wiesen Symptome einer arteriellen Verschlusskrankheit (AVK) auf.

62 von 198 Personen (31%) nahmen zum Zeitpunkt der Blutabnahme lipidsenkende Medikamente ein. In acht Fällen war vom behandelnden Arzt eine cholesterinarme Diät empfohlen worden.

Tab. 5.2 Lipid-, Lipoprotein- und Apolipoprotein-Konzentrationen der Typ IIa HLP-Patienten

	Ges. Chol [mg/dl]	LDL-C [mg/dl]	Triglyzeride [mg/dl]	HDL-C [mg/dl]	Apo B [mg/dl]
Mittelwert	298,7	223,4	107,6	53,7	173,1
Standardabw.	66,0	65,4	34,9	13,9	47,0
Maximum	737,1	643,3	193,8	106,3	466,0
Minimum	209,3	155,0	23,6	38,1	101,0

5.5 Single-strand conformation polymorphism (SSCP)

Der SSCP hat neben der denaturierenden Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) und der TGGE als Detektionsmethode für Punktmutationen der DNA einen hohen Stellenwert.

Die durch eine Basensubstitution hervorgerufene Konformationsänderung der DNA-Einzelstänge sollte im SSCP-Gel anhand unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität der Moleküle erkennbar sein. Generell werden bei dem SSCP native PAA-Gele in Sequenziergelgröße ($\geq 40 \times 30$ cm) verwendet, mit entsprechend langen Laufzeiten und der Notwendigkeit des Einsatzes radioaktiver Markierungssubstanzen. Die Handhabung der relativ dünnen Sequenziergele und die 6- bis 20-stündigen Elektrophoreselaufzeiten waren von vornherein kritisches Anwendungskriterium für den SSCP bei den hier erwarteten, hohen Probenzahlen.

Aus Gründen der technischen Vereinfachung wurde eine SSCP-Analyse der Apo B-100 DNA in 6% PAA-Gelen mit den Maßen $20 \times 18 \times 0,2$ cm durchgeführt. Die DNA wurde anschließend mit Silbernitrat gefärbt. Es wurden zunächst Amplifikate des TGGE-Fragmentes F (Apo B cDNA : 10.678-11.122) mit heterozygoter, bzw. homozygoter FDB_{3500Q} Mutation untersucht. Fragment F hatte eine Länge von 445 Basenpaaren. Bei einer maximalen Laufzeit von 5 Stunden bei Raumtemperatur (RT) blieb die Auftrennung von mutationstragendem Amplifikat und Wildtypamplifikat indifferent. Daraufhin wurde das 445 Basenpaar Fragment mit der Restriktionsendonuklease *Hph* I gespalten, und die entstehenden Restriktionsprodukte (262 und 183 Basenpaare) mit der Mutationsstelle im kürzeren Restriktionsfragment in einem 8% SSCP-Gel aufgetrennt. Auch hier zeigte sich kein Laufunterschied bei den Amplifikaten der DNA eines FDB_{3500Q} Homozygoten, bzw. Heterozygoten und der Wildtyp-DNA. Es wurde in einem letzten Testansatz die Glycerin Konzentration (0%, 5%, 10%), sowie die Elektrophoresetemperatur (RT, 10°C) variiert. Keine der vorgenommenen Modifikationen der Elektrophoresebedingungen konnte jedoch eine Unterscheidung der Restriktionsprodukte mit und ohne Punktmutation ermöglichen. Abbildung 5.5 zeigt das Elektropherogramm des letzten Modifizierungsversuchs eines SSCP von 5 Stunden Laufzeit bei 10°C und einer Glycerinkonzentration von 10%. Ein Migrationsunterschied von mutationstragendem und Wildtyp-Allel war nicht festzustellen.

Der SSCP kam daher nicht als geeignete Methode für ein Mutations-*Screening* am Apo B-100 in Frage, und eine Etablierung der TGGE-Analytik wurde diesem vorgezogen.

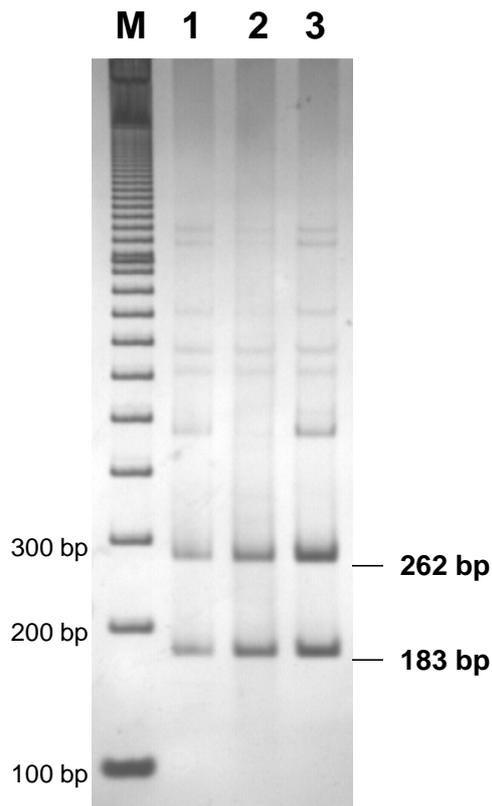


Abb. 5.5 80 g/l SSCP Gel (10% Glycerol). Bandenmuster der mit *Hph* I gespaltenen Amplifikationsprodukte genomischer DNA mit und ohne FDB_{3500Q} Mutation im Bereich der Apo B cDNA 10.678-11.122. Längen der Restriktionsfragmente: 262 und 183 Basenpaare. Die Elektrophorese wurde bei 7 V/cm, +10°C über 5 Stunden in einer vertikalen Elektrophoreseapparatur (Gelgröße 18x20 cm) durchgeführt. Die Banden wurden nach Beendigung der Elektrophorese mit Silbernitrat gefärbt. M: Längenmarker (100 Basenpaar DNA Leiter). **Bahn 1:** FDB_{3500Q} heterozygote DNA **Bahn 2:** FDB_{3500Q} homozygote DNA **Bahn 3:** DNA ohne FDB_{3500Q} Mutation.

5.6 Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese (TGGE)

Die TGGE nutzt Unterschiede in den Schmelzpunkten doppelsträngiger DNA zu deren Auftrennung (Gotoh und Tagashira 1981, Riesner *et al.* 1991). Auf Grund partieller Denaturierung einzelner Sequenzabschnitte von Amplifikaten in einem Temperatur Gradienten Gel ist es möglich, einzelne Basenunterschiede in DNA-Fragmenten von einer Größe bis maximal 500 Basenpaare sichtbar zu machen. Insgesamt wurde die Apo B-100 DNA in 10 Teilbereichen (Fragment A bis J) amplifiziert (Abbildung 5.6). Fragment A bis H sind PCR-Fragmente des Exons 26 des Apo B-100 (cDNA 9.600-11.720), Fragment I und J sind Amplifikate des Exons 29 des Apo B-100 (cDNA 13.014-13.703). Alle TGGE-Fragmente wurden als überlappende PCR-Fragmente konstruiert. Die Größe der einzelnen Fragmente lag zwischen 222 und 455 Basenpaaren.

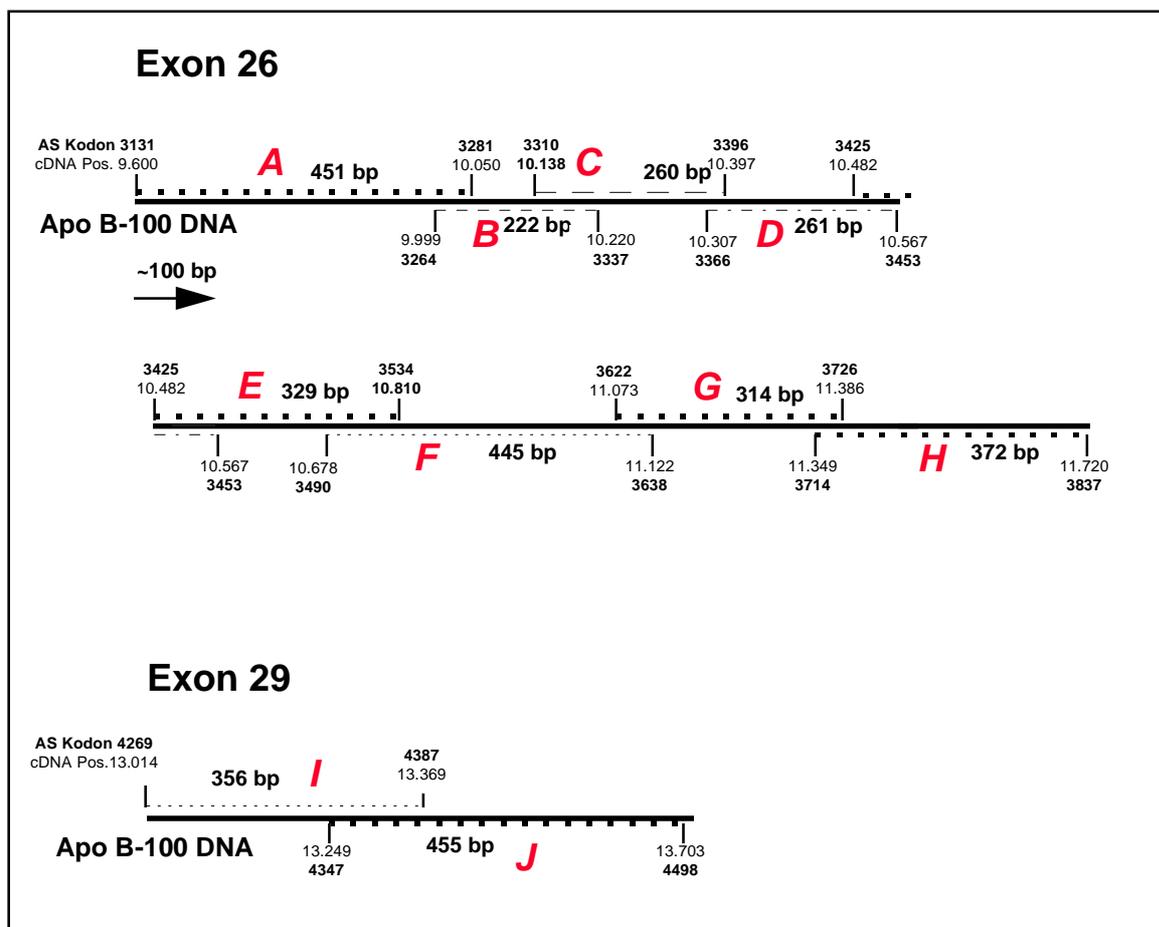


Abb. 5.6 Amplifizierte Region der Apo B-100 DNA. A - J: die als überlappende PCR-Fragmente amplifizierten Teilbereiche.

Das theoretisch erwartete Denaturierungsverhalten der einzelnen Fragmente wurden mit Hilfe einer PC-Software berechnet. Die von Gerhard Steger entwickelte POLAND-Software simuliert die Konformationsänderung doppelsträngiger Nukleinsäuren in einem linearen Temperaturgradienten. In Abbildung 5.7 ist eine Denaturierungskurve am Beispiel des Fragment F dargestellt. Das Temperaturprofil dieses Fragments weist fünf diskrete Schmelzdomänen auf (I-V). Optimale TGGE-Fragmente sollten über mindestens drei Schmelzdomänen verfügen, um eine, auch als 'kontinuierlich' bezeichnete, Denaturierung zu ermöglichen. Diese Form der Hitzedenaturierung ist reversibel (Sheffield *et al.* 1989). Reversibilität der Denaturierung ist Voraussetzung für die erfolgreiche TGGE-Analytik eines Amplifikats. Bei Fragment B, C, G, H und I wurde durch einen GC-reichen Überhang (20 Basenpaar GC-Sequenz) am 5' Ende eines Primers eine Schmelzdomäne mit hoher Stabilität zusätzlich eingeführt. Gleichzeitig erhöht der GC-Überhang die Sensitivität der Mutationsdetektion, da im Sequenzbereich, der die höchste Thermostabilität aufweist, die Möglichkeit der Erkennung einer Substitution nur gering ist. Durch Harnstoffzugabe im Gel wurde die Schmelztemperatur (T_M) der dsDNA vermindert (1 M Harnstoff $\cong -2^\circ\text{C}$).

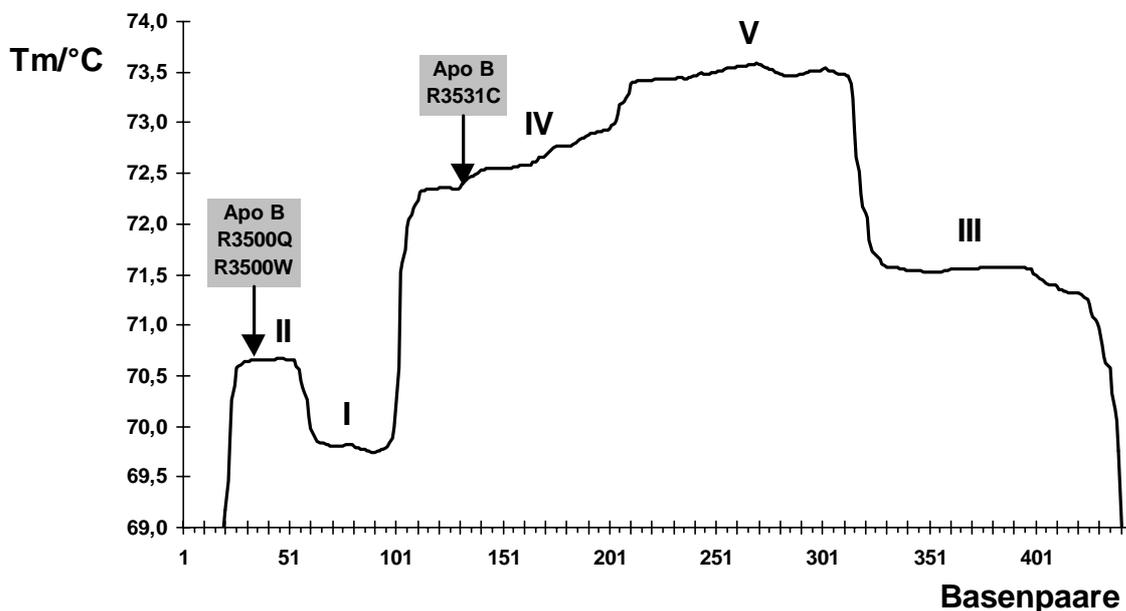


Abb. 5.7 Denaturierungsprofil des TGGE-Fragments F (445 Basenpaare). Die Schmelzkurve zeigt fünf diskrete Domänen (I-V) im Bereich der amplifizierten Apo B cDNA 10.678-11.122 (Aminosäuren 3490-3638). Die Positionen der Apo B Mutationen des FDB (R3500Q, R3500W, R3531C) sind eingezeichnet. Die Berechnung des Schmelzprofils erfolgte ohne Berücksichtigung der Harnstoff Konzentration (8M) des Gels.

An Hand einer senkrechten TGGE konnte das Denaturierungsverhalten jedes Fragmentes überprüft werden. Ließ sich kein reversibles Schmelzverhalten der DNA feststellen, wurde die PCR neu konstruiert. In den meisten Fällen jedoch konnte durch den Einbau eines GC-Überhanges am 3'- oder 5'-Ende des PCR-Fragmentes eine reversible Denaturierung der DNA erreicht werden. Abbildung 5.8 a. zeigt die senkrechte Auftrennung von Fragment B ohne GC-Überhang in einem Temperaturgradienten von 20°C bis 60°C. Der Übergang von doppelsträngiger (ds) in einzelsträngige (ss) DNA ist diskontinuierlich und weist auf ein irreversibles Schmelzverhalten dieses Fragments hin. Darunter (Abbildung 5.8 b.) wurde das gleiche Fragment mit GC-Überhang in der senkrechten TGGE analysiert. Der typische S-förmigen Verlauf der ds/ssDNA (Abbildung 5.8 b) ist kennzeichnend für eine reversible Denaturierung der dsDNA.

In der senkrechten TGGE lässt sich die Transition von dsDNA in ssDNA visuell über das gesamte Spektrum der intramolekularen Konformationsänderungen verfolgen: Die dsDNA hat die höchste elektrophoretische Beweglichkeit. Sobald die erste Domäne des Moleküls denaturiert, wird die Wanderung im Gel verzögert. Die dsDNA tritt in die Phase partiell fortschreitender Denaturierung. Je weiter die Aufspaltung des Doppelstranges erfolgt, desto schlechter durchläuft das Molekül die Gelmatrix: die Transitionskurve nimmt eine sigmoide Form an. Ist die DNA schließlich komplett denaturiert, bricht die Transitionskurve ab, und die denaturierten DNA Einzelstränge wandern kontinuierlich linear.

Die Berechnung der Schmelzkurve und die Überprüfung der reversiblen Denaturierung in einer senkrechten TGGE waren Voraussetzung für eine erfolgreiche Mutationsanalyse aller TGGE-Fragmente.

Die Identifizierung heterozygoter Mutationsträger wird durch die Kombination der temperaturabhängigen Denaturierung in der TGGE mit konformationsabhängigen Laufveränderungen im Gel durch Heteroduplexanalyse erleichtert. Bei heterozygotem Genotyp können sich bei der Renaturierung der zuvor erhitzten (denaturierten) dsDNA sowohl komplementäre als auch mutationstragende und wildtypsequenzspezifische ssDNA wieder zusammenlagern. Diese Heteroduplex-Moleküle werden auf Grund der vorhandenen Fehlpaarung (*mismatch*) in der Gelmatrix zurückgehalten und erscheinen daher deutlich abgetrennt von den Homoduplex-Banden.

Die Laufeigenschaft einer DNA Probe (TGGE-Fragment F) mit heterozygoter FDB_{3500Q} Mutation ist in Abbildung 5.9 abgebildet. Es lassen sich vier Transitionskurven unterscheiden, die den Homo- und Heteroduplex-Molekülen der DNA entsprechen.

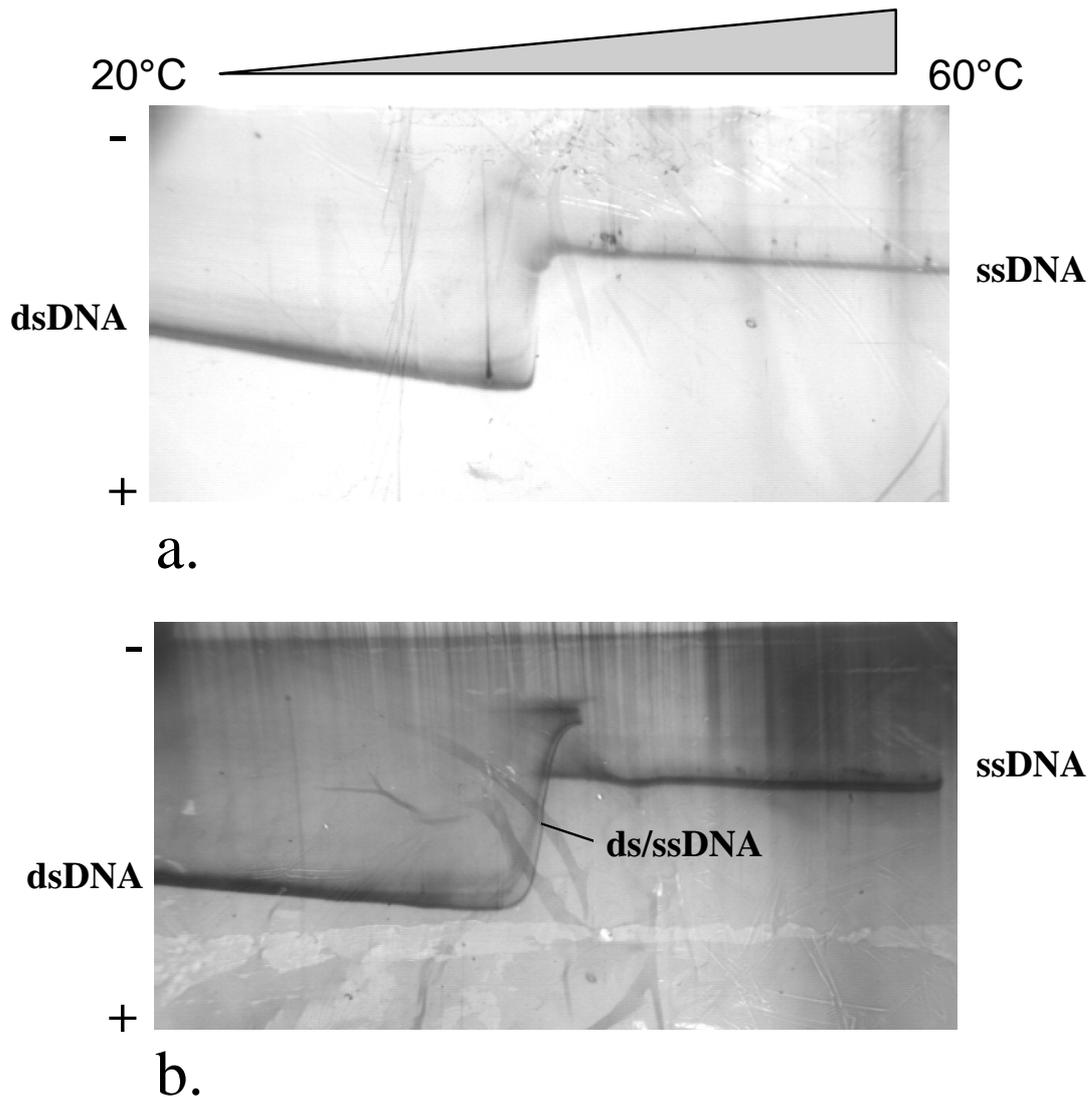


Abb. 5.8 Senkrechte Temperatur Gradienten Gel Elektrophoresen. In 80 g/l Polyacrylamidgelen (8 M Harnstoff) wurden 40 μ l eines PCR Produkts 1 $\frac{1}{2}$ Stunden bei 15 V/cm über einen Temperaturgradienten von 20°C bis 60°C aufgetrennt. Die Gele wurden mit Silbernitrat nach der in Kapitel 6.6, Tabelle 4.1 beschriebenen Methode gefärbt. ds = doppelsträngig, ss = einzelsträngig.

a. *diskontinuierliche* Elektrophorese des Fragment B *ohne* GC-Überhang.

b. *kontinuierliche* Elektrophorese des Fragment B *mit* GC-Überhang.

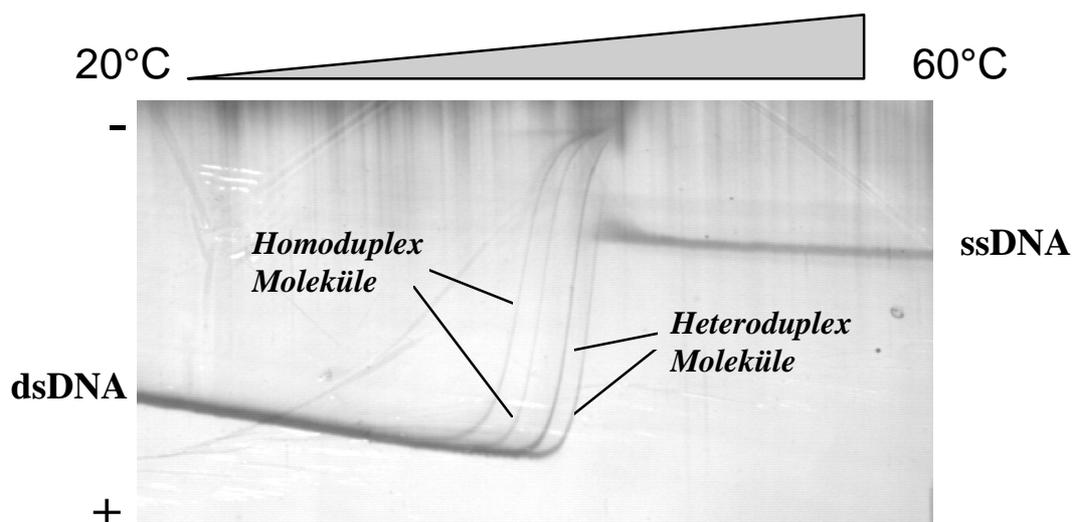


Abb. 5.9 Senkrechte Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese des Fragment F einer Person mit heterozygoter FDB_{3500Q} Mutation. In einem 80 g/l Polyacrylamid Gel (8 M Harnstoff) wurden 40 µl PCR Produkt 1¹/₂ Stunden bei 15 V/cm über einen Temperaturgradienten von 20°C bis 60°C aufgetrennt. Die amplifizierte DNA wurde vor der gelelektrophoretischen Auftrennung 5 Min bei 95°C denaturiert und anschließend 15 Min bei 50°C renaturiert. Eine Silberfärbung des Geles erfolgte nach der in Kapitel 6.6, Tabelle 4.1 beschriebenen Methode.

Anschließend wurde das Proben-Screening in waagrechten (parallelen) TGGE-Gelen vorgenommen. Im Gegensatz zur senkrechten TGGE verläuft hier der Temperaturgradient parallel zur Laufrichtung der DNA. In parallelen Gelen können bis zu 24 Proben gleichzeitig analysiert werden. Der Temperaturgradient wurde über den Temperaturbereich von beginnender Denaturierung bis hin zum vollständigen Übergang in einzelsträngige DNA des untersuchten Fragmentes festgelegt. Dieser Temperaturbereich variierte zwischen 30°C, bzw. 35°C und 50°C, bzw. 55°C. An Hand bekannter Mutationen des Apo B-100 wurde die Empfindlichkeit der TGGE überprüft. Fragment F umfasst die Genregion des Apo B-100, in der die drei FDB-Mutationen FDB_{3500Q}, FDB_{3500W} und FDB_{3531C} lokalisiert sind. Genomische DNA eines/er heterozygoten FDB_{3500W} Patienten/tin wurde von Evelyn Koay der National University of Singapore zur Verfügung gestellt. Die DNA einer Person mit heterozygoter FDB_{3531C} Mutation wurde von Clive Pullinger vom Cardiovascular Research Institute der University of California in San Francisco erhalten. Die häufigste FDB-Variante, die FDB_{3500Q} Mutation, konnte eigenem Probenmaterial entnommen werden.

Die Identifizierung der drei Punktmutationen des FDB gelang durch Analyse in der TGGE (Abbildung 5.10). Die T_M Differenz von FDB_{3500Q} und FDB_{3500W} betrug lediglich 0,2°C am Basentriplett 3500 der Apo B-100 cDNA. In der gelelektrophoretischen Auftrennung zeigte

sich entsprechend ein leichter Wanderungsunterschied der Heteroduplex-Banden beider Substitutionen (Bahn 3 und 4, Abbildung 5.10). Bei der anschließenden Analyse der Typ IIa Patienten-Proben konnte zusätzlich ein weiterer, häufiger Polymorphismus des Aminosäurerest 3611 (R3611Q) des Apo B-100 in der TGGE des Fragment F detektiert werden (Bahn 6, Abbildung 5.10), so dass innerhalb dieses einen DNA-Abschnittes insgesamt 4 unterschiedliche Punktmutationen nachgewiesen werden konnten.

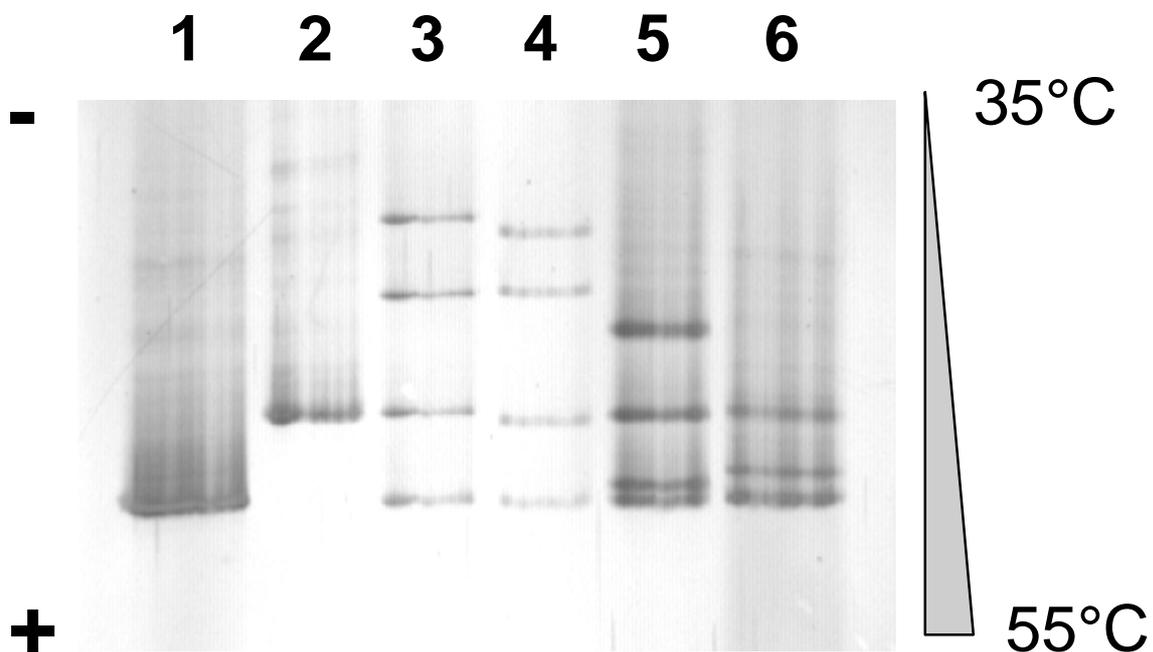


Abb. 5.10 Parallele Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese. 3 μ l PCR Produkt des Fragment F wurden nach vorangegangener De- und Renaturierung in einem 80 g/l Polyacrylamidgel (8 M Harnstoff) 4^{1/2} Stunden bei 15 V/cm (< 30 mA) aufgetrennt. Der Temperaturgradient reichte von 35°C (Kathode) bis 50°C (Anode). Die Silbernitratfärbung wurde nach der in Kapitel 6.6, Tabelle 6.1 beschriebenen Methode durchgeführt.

Bahn 1: Wildtyp-DNA

Bahn 2: homozygote FDB_{3500Q} DNA

Bahn 3: heterozygote FDB_{3500Q} DNA

Bahn 4: heterozygote FDB_{3500W} DNA

Bahn 5: heterozygote FDB_{3531C} DNA

Bahn 6: heterozygote R3611Q DNA (*Msp*I₃₆₁₁ Polymorphismus).

5.7 Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese am AS Kodon Trp⁴³⁶⁹ des Apo B-100

Für den gezielten Nachweis einer mutagenen Veränderung am Aminosäurerest 4369 (Tryptophan) des Apo B-100 wurden zunächst innerhalb eines Sequenzabschnitts der Apo B-100 DNA einer normolipidämischen Person Punktmutationen an diesem Basentriplett künstlich erzeugt. Nach einer von Ho *et al.* (1989) beschriebenen Methode wird aus zwei überlappenden PCR-Fragmenten ein Fusionsprodukt mit der gewünschten Mutation hergestellt (s. Kap. 4.9, Abb.4.2). Auf eine Verwendung von Plasmidvektoren konnte auf Grund der ausschließlich analytischen Zwecke der mutagenisierten Fragmente verzichtet werden. Bei der Mutagenese wurde berücksichtigt, dass das Fusionsprodukt als Vorlage für die Amplifizierung eines optimierten TGGE-Fragmentes geeignet sein sollte. An einem Basentriplett kommen 9 verschiedene Austauschmutationen in Frage. Im Fall des Aminosäurekodon 4369 kodieren zwei der möglichen Triplett-Varianten für ein Stop-Kodon. Die Mutationen für ein Stop-Kodon wurden nicht berücksichtigt, da ein entsprechendes Translationsprodukt ein um 3,7% verkürztes Apo B (Apo B-96) Protein generieren würde, dessen Bindung an LDL-Rezeptoren eher besser als schlechter sein sollte¹. In Tabelle 5.3 sind die möglichen Substitutionen mit Aminosäurecode und den Eigenschaften der entsprechenden Aminosäuren aufgelistet. Das TGGE-Amplifikat (Fragment J) hatte eine Länge von 455 Basenpaaren. Die Veränderung der Schmelztemperatur an Kodon 4369 auf Grund der eingeführten Substitutionen kann Tabelle 5.4 entnommen werden. Der T_M Wert der Base Thymin am Basentriplett 4369 der Wildtyp-DNA ist 66,96°C. Zwei Substitutionen, TGG→CGG und TGG→AGG, führen zum Austausch von Tryptophan zu Arginin. Das Amplifikat mit der Mutation TGG→CGG (Arg⁴³⁶⁹) hat einen T_M Wert von 67,49°C (T_M-Differenz zum Wildtyp-Triplett: +0,53°C). Die Transversion TGG→AGG (Arg⁴³⁶⁹) verändert dagegen das Schmelzprofil von Fragment J nicht. Die durch die Renaturierung von Wildtyp-DNA und der mutationstragenden DNA erzeugten Heteroduplex-Moleküle waren jedoch in der TGGE eindeutig nachweisbar (Abbildung 11, Bahn 6). Die TGGE-Analyse der PCR-Produkte mit den am Basentriplett 4369 eingefügten Punktmutationen war hochsensitiv. In Anbetracht dessen konnte eine Überprüfung natürlich vorkommender Mutationen an dieser Position mit 100% Erkennungswahrscheinlichkeit stattfinden.

Tab. 5.3 Mögliche Aminosäure-Veränderungen an Position 4369 des Apo B-100.

¹Andere Autoren (Parhofer *et al.* 1990, Krul *et al.* 1992, Kim *et al.* 1998) konnten einen beschleunigten hepatischen Abbau von LDL, deren Apo B eine bis zu 25% verkürzte Aminosäuresequenz am carboxyterminalen Ende aufwies, feststellen.

	AS	Eigenschaften	Triplett	Basen- austausch	Enzym- Spaltstelle	Schmelz T _M [°C] (Diff.:WT-Mu)
WT	Trp	unpolar, hydrophob	TGG	Wildtyp	-	T : 66,961 G : 66,964 G : 66,966
1	Arg	basisch	CGG	T→C	<i>MspI</i>	67,488 (+ 0,53)
2	Gly	unpolar, hydrophob	GGG	T→G	-	67,488 (+ 0,53)
3	Cys	neutral, bildet S-S Brücken aus	TGC	G→C	-	67,253 (+ 0,29)
4	Ser	neutral, hydrophil	TCG	G→C	<i>TaqI</i>	67,249 (+ 0,29)
5	Leu	unpolar, hydrophob	TTG	G→T	-	66,562 (- 0,40)
6	Arg		AGG	T→A	-	66,961 (0)
7	Cys		TGT	G→T	<i>RsaI</i>	66,505 (- 0,46)
	Stop		TAG	G→A*		
			TGA	G→A*		

* bedingen ein Apo B-96 Synthese- Produkt

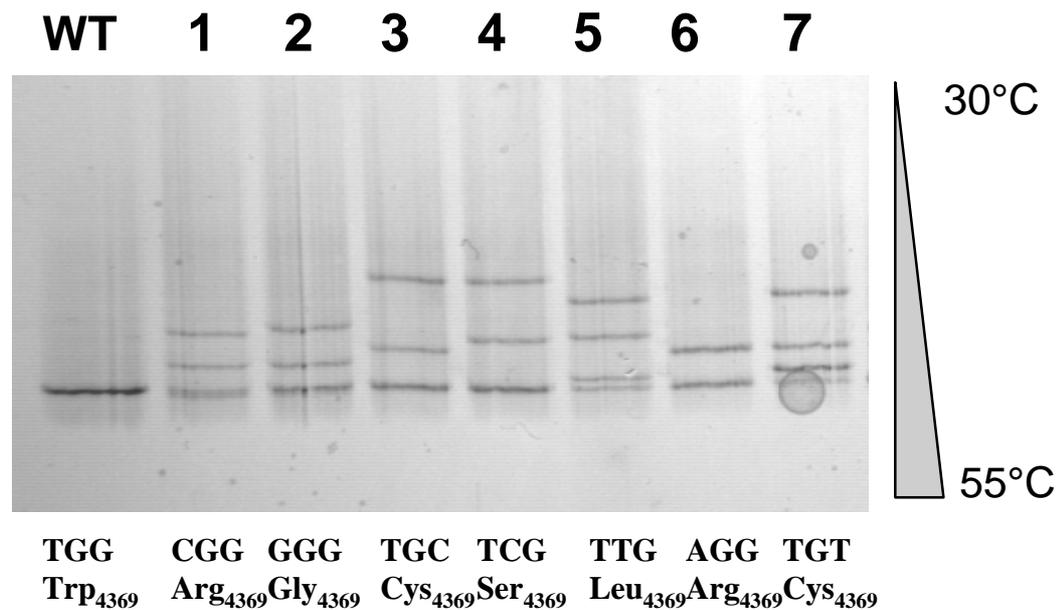


Abb. 5.11 Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese des Fragment J (Apo B-100 Exon 29 cDNA: 13.249-13.703) mit Punktmutationen am Aminosäurekodon 4369. Fusionsprodukte (931 Basenpaare) mit Punktmutation wurden mit dem 931 Basenpaar Amplifikat einer Wildtyp-DNA gemischt (1:1) und in der Fragment J-PCR reamplifiziert. Die entstehenden Amplifikate wurden 1:10 in dd H₂O verdünnt und anschließend de- und renaturiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 80 g/l Polyacrylamidgel (8 M Harnstoff) bei 15 V/cm (<30 mA) über 4¹/₂ Stunden. Das Gel wurde nach der von Blum *et al.* (1987) beschriebenen Methode (Tabelle 4.2, Kapitel 4.6.6) gefärbt.

Bei dem anschließenden Proben-Screening von 297 Personen mit Typ IIa HLP wurde jedoch keine natürliche Mutation am Aminosäurerest 4369 des Apo B-100 festgestellt.

5.8 Mutationen des Apo B-100 bei Typ IIa HLP-Patienten

Es wurden neun verschiedene Substitutionen bei den DNA-Analysen von 297 Typ IIa HLP-Patienten festgestellt. Bezogen auf den untersuchten cDNA Bereich von 2,8 Kilobasenpaaren (20% der Apo B-100 cDNA, 6,5% des Apo B-Gens) entspricht dies einer Variabilität von 0,3%. Unter den vorgefundenen neun Basenaustauschmutationen fanden sich neben der FDB_{3500Q} und FDB_{3500W} Mutation zwei bekannte häufige Polymorphismen des Apo B-100 Gens (*MspI* RFLP₃₆₁₁ und N4311S Polymorphismus), drei schon beschriebene Mutationen (L3350L, E3405Q und A4454T), eine bisher unbekannte Mutation des Apo B-100 am Aminosäurerest 4287 (I4287V), und eine Mutation bei einer einzelnen DNA-Probe (T4457M) (Tabelle 5.4). Die Lipid-Phänotypen der entsprechenden Mutationsträger sind in Tabelle 5.5 angegeben.

Tab. 5.4 Mutationen des Apo B-100 in Exon 26 (Aminosäurekodon 3131-3837) und Exon 29 (Aminosäurekodon 4269-4498) bei 297 Typ IIa HLP-Patienten

Bezeichn.	Kodon	Basen- austausch	Aminosäure- austausch	Heterozygote n (Häufigkeit)	Homozygote n (Häufigkeit)	Ref.
EXON 26						
L 3350 L	3350	CTG→CTA	Leu→Leu	3 (0,01)	n.v.	(1)
Q 3405 E	3405	GAA→CAA	Gln→Glu	4 (0,013)	n.v.	(2)
FDB_{3500Q}	3500	CGG→CAG	Arg→Gln	21 (0,071)	*	(3)
FDB_{3500W}	3500	CGG→TGG	Arg→Trp	2 (0,007)	n.v.	(4)
<i>MspI</i>₃₆₁₁⁺	3611	CGG→CAG	Arg→Gln	n.b.	n.b.	(5)
EXON 29						
I 4287 V	4287	ATT→GTT	Ile →Val	6 (0,02)	n.v.	-
N 4311 S	4311	AAT→AGT	Asn→Ser	103 (0,347)	11 (0,037)	(6)
A 4454 T	4454	GCC→ACC	Ala→Thr	19 (0,064)	n.v.	(7)
T 4457 M	4457	ACG→ATG	Thr→Met	1 (0,003)	n.v.	-

n.v.: nicht vorhanden, n.b.: nicht bestimmt,* Ein Fall wurde bei nachfolgend angestellten Familienuntersuchungen festgestellt,⁺ Apo B-100 Haplotypen Marker

(1) Ludwig *et al.* 1997; (2) Ludwig *et al.* 1987; (3) Soria *et al.* 1989; (4) Gaffney *et al.* 1995; (5) Huang *et al.* 1988; (6) Navajas *et al.* 1990; (7) Ilmonen *et al.* 1997.

Tab. 5.5 Mittlere Lipid-, Lipoprotein und Apolipoprotein B-Konzentrationen bei Typ IIa HLP-Patienten (LDL-C > 1,55 g/l, TG < 2,0 g/l) mit heterozygoter* Punktmutation des Apo B-100.

	n	Ges. Chol. [g/l] $\bar{x} \pm s$	LDL-C [g/l] $\bar{x} \pm s$	Triglyzeride [g/l] $\bar{x} \pm s$	HDL-C [g/l] $\bar{x} \pm s$	Apo B [g/l] $\bar{x} \pm s$
FDB_{3500Q}	21	2,71 ± 0,41	2,03 ± 0,43	1,0 ± 0,55	0,48 ± 0,11	1,62 ± 0,39
FDB_{3500W}	2	2,59 ± 0,59	1,9 ± 0,57	1,0 ± 0,3	0,49 ± 0,07	1,4 ± 0,49
E 3405 Q	4	2,64 ± 0,55	1,81 ± 0,42	1,32 ± 0,42	0,56 ± 0,18	1,63 ± 0,15
L 3350 L	3	2,73 ± 0,17	1,85 ± 0,16	1,14 ± 0,4	0,65 ± 0,08	1,46 ± 0,2
I 4287 V	6	2,79 ± 0,36	2,05 ± 0,34	1,13 ± 0,25	0,51 ± 0,15	1,7 ± 0,35
N 4311 S (+/-)	103	3,01 ± 0,78	2,24 ± 0,78	1,04 ± 0,33	0,56 ± 0,15	1,77 ± 0,58
N 4311 S (+/+)	11	2,87 ± 0,59	2,1 ± 0,52	1,2 ± 0,36	0,53 ± 0,15	1,64 ± 0,38
A 4454 T	19	3,16 ± 1,12	2,37 ± 1,08	1,03 ± 0,32	0,58 ± 0,14	1,85 ± 0,68
T 4457 M	1	2,35	1,78	1,09	0,36	1,58

n: Anzahl der Merkmalsträger, LDL-C: LDL-Cholesterin, HDL-C: HDL-Cholesterin, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung

* Ausnahme: N4311S Homozygote (+/+)

Die Identifizierung der Mutationen gelang an Hand der unterschiedlichen Migration der entsprechenden PCR-Amplifikate genomischer DNA in Temperatur Gradienten Gelen. Die Homoduplex-Banden mit den Mutationen wurden aus dem TGGE-Gel ausgeschnitten und gereinigt, mit *Pfu* DNA-Polymerase reamplifiziert, ein weiteres Mal über eine Elektrophorese gereinigt und anschließend im Labor für DNA-Analytik, Freiburg, sequenziert. In der genomischen DNA wurden die Substitutionen durch sequenzspezifische Restriktionen mit entsprechenden Endonukleasen überprüft. Bedeutung und Eigenschaften der gefundenen Mutationen werden im Folgenden getrennt beschrieben.

5.8.1 **FDB_{3500Q} und FDB_{3500W}**

Bindungsdefekte Apo B-100 sind Ursachen von primären Hypercholesterinämien. Bisher wurden drei Mutationen (R3500Q, R3500W und R3531C) am Apo B-100 beschrieben, die nachweislich einen Rezeptorbindungsdefekt der LDL-Partikel verursachen (Soria *et al.* 1989, Pullinger *et al.* 1995, Gaffney *et al.* 1995). Alle drei Mutationen sind im Exon 26 des Apo B-100 lokalisiert. In dem randomisierten Kollektiv von 297 Typ IIa HLP-Patienten aus dem Rhein/Main Gebiet wurden 21 Personen mit dem FDB_{3500Q} Defekt und 2 Personen mit

FDB_{3500W} entdeckt. Dies entspricht einer Prävalenz von 7,1% heterozygoter FDB_{3500Q} und 0,7% heterozygoter FDB_{3500W} Merkmalsträger. Die FDB_{3531C} Mutation war nicht vorhanden.

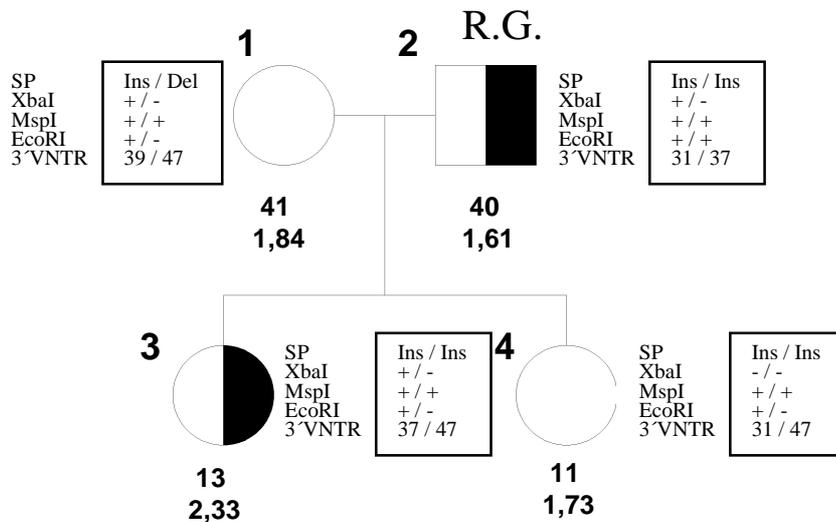
An Hand der Untersuchung von Familienmitgliedern der gefundenen FDB-Patienten konnten insgesamt 40 Personen mit FDB_{3500Q} (19 Angehörige aus 9 FDB_{3500Q} Familien) und 6 Personen mit FDB_{3500W} diagnostiziert werden. Unter den 40 Personen mit FDB_{3500Q} befand sich eine Person mit homozygoter R3500Q Mutation. In der Familie dieses Patienten fanden sich fünf weitere heterozygote Merkmalsträger. Eine detaillierte Beschreibung des homozygoten FDB_{3500Q} Patienten und dessen Familienmitglieder wurde früher publiziert (März *et al.* 1992).

5.8.1.1 Haplotypisierung des FDB_{3500Q} und FDB_{3500W}

Eine Haplotypisierung der FDB_{3500Q} und der FDB_{3500W} Mutation wurde bei allen Merkmalsträgern durchgeführt. Anhand von fünf polymorphen Markergenorten des Apo B-100 [Signal Peptid (SP) Insertion (Ins) oder Deletion (Del), *Xba*I (ACT→ACC, Thr²⁴⁸⁸→Thr) RFLP, *Msp*I (CGG→CAG, Arg³⁶¹¹→Gln) RFLP, *Eco*RI (AAA→GAA, Lys⁴¹⁵⁴→Glu) RFLP und der 3' hypervariablen Region (3'VNTR)] kann die Assoziation der Mutation mit einem bestimmten Alleltyp nachgewiesen werden. Der nach der binären Nomenklatur von Ludwig und McCarthy (1990) bezeichnete Haplotyp 194 (*Xba*I-, *Msp*I+, *Eco*RI-, 3'VNTR-49) wurde ausnahmslos bei allen 40 FDB_{3500Q} Patienten festgestellt.

Im Fall des FDB_{3500W} waren die beiden Mutationen mit unterschiedlichen Haplotypen assoziiert (Abbildung 5.12), Haplotyp: SP-Ins, *Xba*I+, *Msp*I+, *Eco*RI+, 3'VNTR-37 (Familie des R.G.) und Haplotyp: SP-Del, *Xba*I+, *Msp*I+, *Eco*RI+, 3'VNTR-37 (Familie des M.B.).

R.G. Familie



M.B. Familie

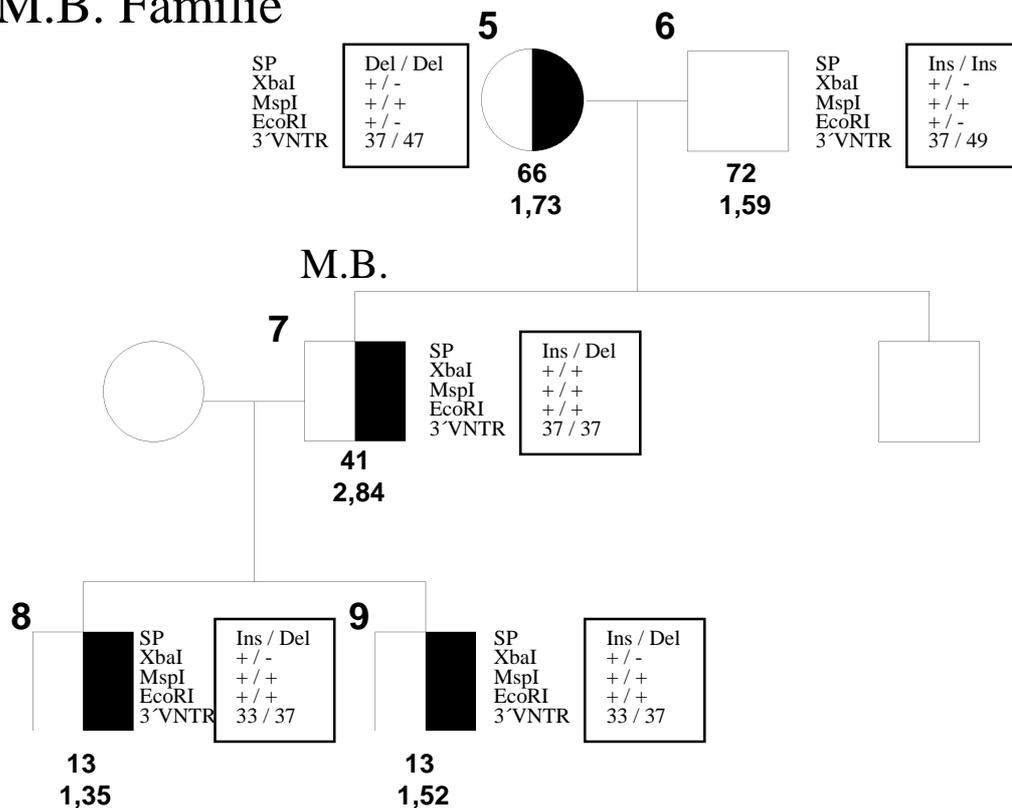


Abb. 5.12 Familienstammbäume der FDB_{3500W} heterozygoten Patienten R.G. und M.B.: männliche Personen; O: weibliche Personen. Heterozygote FDB_{3500W} Familienmitglieder sind durch halb gefüllte Symbole gekennzeichnet. Unterhalb der Symbole sind Alter (Jahre) der Person und die LDL-Cholesterinkonzentration (g/l) angegeben. Apo B-100 Haplotypen finden sich in den Kästchen neben den Symbolen; +: Enzym-Schnittstelle vorhanden. SP: Signal Peptid; Ins: Insertion; Del: Deletion; 3'VNTR: 3'hypervariable Region (Zahlenangabe bezieht sich auf die Anzahl der repetitiven Sequenz eines Allels).

5.8.1.2 Lipid Parameter und Familienanamnese der FDB_{3500W} Patienten

Die beiden Patienten mit Apo B R3500W Mutation sind kaukasischer (deutscher) Abstammung und nach Befragung nicht miteinander verwandt. Beide Patienten, R.G. (40 Jahre) und M.B. (41 Jahre), zeigten keine klinischen Symptome einer KHK, oder kutane Anzeichen einer Hypercholesterinämie (Xanthome und/oder Arcus lipoides). In Tabelle 5.6 sind Lipid-, Lipoprotein- und Apolipoprotein- Werte der beiden FDB_{3500W} Patienten und ihrer Familienmitglieder angegeben.

In der Familie des M.B. segregiert die R3500W Mutation mütterlicherseits (Abbildung 5.12). Die 66jährige Mutter des M.B. wird seit 10 Jahren mit Fenofibrat behandelt. Ein vor 5 Jahren bei ihr diagnostizierter Diabetes wird ebenfalls medikamentös behandelt. Ihr Vater starb im Alter von 62 Jahren an Herzinfarkt. Bei M.B. wurde eine Hyperlipoproteinämie Typ IIa erstmals 1987 festgestellt. Im März 1996 hatte er ein LDL-Cholesterin von 2,84 g/l. Seitdem erfolgte eine Behandlung mit einem HMG CoA-Reduktase-Hemmer (10 mg/Tag Simvastatin). Sein LDL-Cholesterin konnte dadurch um etwa 40% auf 1,74 g/l gesenkt werden. Als zusätzlicher Atherosklerose-Risikofaktor kommt bei M.B. ein sehr hoher Lp(a) Wert (>100 mg/dl) hinzu, der durch CSE-Hemmer nicht verringert werden kann. Beide Söhne des M.B. (dizygote Zwillinge) haben den FDB-Defekt von ihrem Vater geerbt. Ihr Plasma-Cholesterin lag 32% über dem Altersdurchschnitt.

In der Familie des R.G. sind offensichtlich zwei verschiedene hereditäre Veranlagungen für einen zu hohen Plasma-Cholesterin Wert vorhanden. Während sich dieser beim Vater eindeutig auf die Apo B R3500W Mutation zurückführen lässt, konnte bei der Mutter keine genetische Veränderung am Apo B-100 in dem untersuchten DNA Bereich festgestellt werden. Ein möglicherweise vorliegender LDL-Rezeptor Defekt wurde bisher noch nicht nachgewiesen. Die Hypercholesterinämie des R.G wird schon seit längerer Zeit medikamentös behandelt. Zur Zeit der Blutabnahme nahm er eine tägliche Dosis von 20 mg Pravastatin (CSE Hemmer) ein. Durch eine Trennung der beiden Eltern war eine Untersuchung der Großeltern oder eine genauere Befragung über deren Krankengeschichte nicht möglich. Die 13jährige Tochter des R.G., die ebenfalls heterozygot für FDB_{3500W} ist, hat überdurchschnittlich hohes Cholesterin für ihr Alter (Gesamtcholesterin liegt 98% über dem Altersdurchschnitt), das sich vermutlich durch eine gleichzeitig von der Mutter vererbte Disposition erklären lässt. Dies scheint sich dadurch zu bestätigen, dass auch bei der jüngeren Tochter (11 Jahre) des R.G., die negativ für FDB_{3500W} ist, ein zu hohes LDL-Cholesterin festgestellt wurde. Die Kinder des R.G. waren

normalgewichtig ($\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$) und hatten keine Erkrankungen, die die Ausprägung einer HLP begünstigen (Diabetes, Hypothyreose, Erkrankungen der Leber oder Niere).

Tab. 5.6 Lipide, Lipoproteine und Apolipoproteine bei $\text{FDB}_{3500\text{W}}$ heterozygoten Patienten und deren Familienangehörigen.

Fam.Stamm.		Alter		Ges.C	LDL-C	TG	HDL-C	Apo B	Lp(a)	ApoE		
Pos.	Sex	$\text{FDB}_{3500\text{W}}$	[Jahre]	BMI	[g/l]	[g/l]	[g/l]	[g/l]	[g/l]	Phänotyp		
R.G. Familie												
1	I	w	Wt	41	17,4	2,8	1,84	0,57	0,85	1,46	1,52	33
2*	I	m	Mu	40	28,9	2,29	1,61	1,02	0,47	1,4	0,13	33
3	II	w	Mu	13	20,2	3,11	2,33	1,38	0,5	1,88	1,15	33
4	II	w	Wt	11	17,8	2,45	1,73	1,17	0,48	1,34	1,01	33
M.B. Familie												
5	I	w	Mu	66	15,5	2,46	1,73	0,57	0,62	1,11	0,67	33
6	I	m	Wt	72	22,5	2,29	1,59	1,3	0,45	1,06	0,68	42
7*	II	m	Mu	41	20,8	3,52	2,84	1,29	0,42	2,10	1,55	43
8	III	m	Mu	13	n.b.	2,03	1,35	0,97	0,48	0,89	0,86	43
9	III	m	Mu	13	n.b.	2,14	1,52	0,78	0,46	1,01	0,96	43

* Index Patient

Mu: heterozygot für $\text{FDB}_{3500\text{W}}$, Wt: Wildtyp

5.8.1.3 LDL-Rezeptor Bindung, Internalisation und Degradation der LDL zweier $\text{FDB}_{3500\text{W}}$ heterozygoter Personen

Für die Untersuchung der Rezeptorbindung heterozygoter Apo B R3500W LDL wurde beiden Indexpatienten M.B. und R.G. je 40 ml Blut entnommen und aus dem Plasma-Überstand durch Ultrazentrifugation die LDL abgetrennt. Die frisch isolierten LDL wurden mit ^{125}I markiert und in Zellkultur mit Hilfe normaler humaner Fibroblasten die Bindung, Aufnahme (Internalisation) und Degradation der markierten LDL gemessen (Abbildung 5.13 a.). In einem zusätzlichen Test wurde die Kompetition der $\text{FDB}_{3500\text{W}}$ LDL mit ^{125}I markierten Pool-LDL normolipidämischer Probanden untersucht (Abbildung 5.13 b.). Als Referenz wurde zusätzlich LDL eines heterozygoten $\text{FDB}_{3500\text{Q}}$ Patienten getestet. Bindung, Internalisation und Degradation der $\text{FDB}_{3500\text{W}}$ LDL betrug 58% der normalen LDL, war jedoch etwas höher als die der $\text{FDB}_{3500\text{Q}}$ LDL (44% Bindungskapazität der normaler LDL).

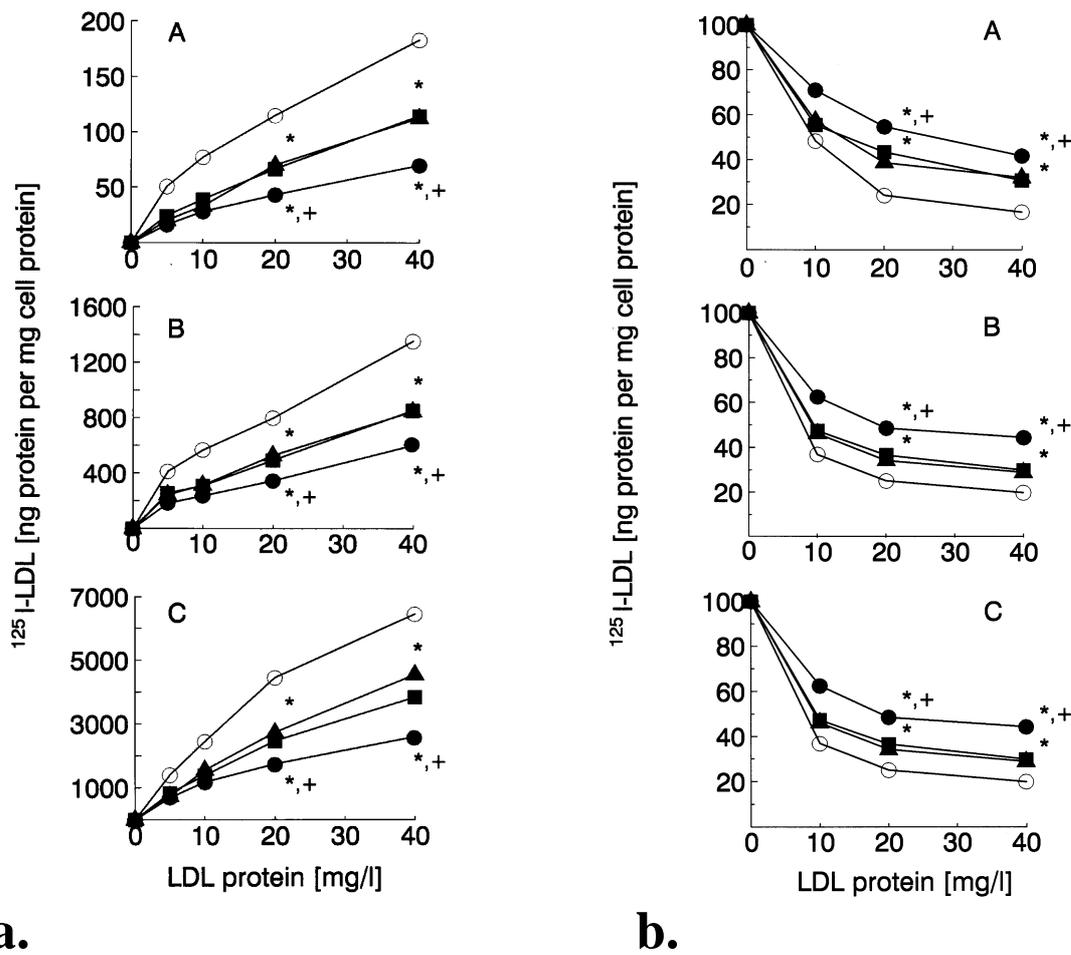


Abb. 5.13 **a.** Interaktion und **b.** Konkurrenz der LDL zweier heterozygoter Merkmalsträger (\square , \blacktriangle) für FDB_{3500W} im Vergleich zu gepoolten LDL normolipidämischer Personen (\circ) und LDL einer FDB_{3500Q} heterozygoten Person (\bullet) mit humanen Fibroblasten im *in vitro*-Test (Methodenbeschreibung Kapitel 4.10). A. Bindung, B. Internalisation, C. Degradation. Messwerte stellen den Durchschnitt aus drei Experimenten mit jeweils dreifachem Parallelansatz dar. * $P < 0.05$ versus Kontrollen.

5.8.2

Apo B L3350L

Bei drei DNA-Proben konnte eine ungewöhnliche Migration des TGGE-Fragments C beobachtet werden. Die Sequenzierung der Homoduplex-DNA mit vorhandener Mutation einer der Proben ergab den Nachweis eines Basenaustausches CTG→CTA an Kodon 3350 für Leucin (L) des Apo B-100. Wurde die nochmals aus genomischer DNA der drei Merkmalsträger/Innen amplifizierte DNA (Fragment C) mit dem Restriktionsenzym *PstI* fragmentiert, konnte durch den Verlust der Spaltstelle im 3350^{CTA} Allel die Mutation bestätigt werden. Die beiden 54 und 66 Jahre alten weiblichen Personen hatten zur Zeit der Blutabnahme weder atherosklerotische Veränderungen, die auf eine KHK hindeuteten, noch zeigten sie Hautzeichen einer Hyperlipoproteinämie. Von der dritten männlichen Person (59 Jahre) war keine Behandlungsakte mehr zugänglich. LDL-Cholesterin und weitere Lipid-Parameter der drei L3350L heterozygoten Personen sind in Tabelle 5.7 angegeben. Da es sich um einen 'stummen' Polymorphismus handelt, wurden lediglich die mit dem 3350^{CTA}-Allel assoziierten Apo B-100 Haplotypen bestimmt. Das Apo B 3350^{CTA} Allel war mit dem Haplotyp SP-Ins, *XbaI*-, *MspI*+, *EcoRI*+, 3'-VNTR-35 assoziiert (Tabelle 5.8).

Tab. 5.7 Alter, Geschlecht und Lipoproteine der drei heterozygoten L3350L Merkmalsträger/Innen.

Patient/In mit L3350L	Geschlecht	Alter (Jahre)	Chol g/l	LDL-C g/l	TG g/l	HDL-C g/l	Apo B g/l	Lp(a) g/l
1	w	66	2,53	1,74	0,73	0,64	1,32	0,17
2	w	54	2,81	1,77	1,52	0,73	n.b.	0,15
3	m	59	2,84	2,04	1,18	0,57	1,60	0,07

Tab. 5.8 Haplotypisierung der L3350L Mutation des Apo B-100

Patient/In mit L3350L	Geschlecht	Alter (Jahre)	SP Ins/Del	<i>XbaI</i>	<i>MspI</i>	<i>EcoRI</i>	3'VNTR ^a
1	w	66	Ins/Del	+/-	+/+	+/-	35/49
2	w	54	Ins/Del	+/-	+/+	+/+	35/37
3	m	59	Ins/Ins	-/-	+/+	+/+	35/35

^a Nomenklatur nach Boerwinkle *et al.* (1989)

5.8.3

Apo B Q3405E

Die Transition an Aminosäurekodon 3405 (CAA→GAA) konnte in der TGGE des Fragments D nachgewiesen werden. Sie verursacht einen Aminosäureaustausch von Glutamin (Q) zu Glutaminsäure (E). Apo B Q3405E wurde erstmalig bei Sequenzierungen des Apo B-100 Gens entdeckt (Ludwig *et al.* 1987). Diese und zwei weitere Basenveränderungen innerhalb der für die Rezeptorbindung kodierenden Region des Apo B-100 (Kodon 3130-3630) wurden ursprünglich als *bona fide* Sequenzaberrationen betrachtet (Yang *et al.* 1989). In dem hier untersuchten Kollektiv wurden jedoch 4 heterozygote Träger für Apo B Q3405E gefunden. Dies entspricht einer Allelfrequenz von 0,7%. Andere Autoren berichten von ähnlichen Allelfrequenzen: Pullinger *et al.* (1996): 0,9%; Ludwig *et al.* (1997): 1,0% und Gaffney *et al.* (1998): 0,8%. Damit handelt es sich beim Apo B Q3405E um einen echten Polymorphismus. Die Sequenzierung der aus dem Gel ausgeschnittenen Homoduplex-Bande für Apo B 3405^{GAA} zeigte eindeutig den C→G Austausch. Die DNA der Personen mit heterozygoter Q3405E Mutation wurde nochmals mit einem neuen Primerpaar [Kapitel 4.3 (4)] amplifiziert, wobei der *sense* Primer durch ein *mismatch* an zweiter Position des 3' Endes zur Erzeugung einer *TaqI* Restriktionsstelle beiträgt, die bei Vorhandensein der Mutation entsteht. Durch den *TaqI* RFLP wurde die Punktmutation an Kodon 3405 bei den betroffenen Individuen bestätigt. Lipid-, Lipoprotein- und Apolipoproteinkonzentrationen der vier Q3405E heterozygoten Merkmalsträger sind in Tabelle 5.9 angegeben.

Tab. 5.9 Alter, Geschlecht und Lipoproteine bei heterozygoten Apo B Q3405E Typ IIa HLP-Patienten.

Patient/In mit Q3405E	Geschlecht	Alter (Jahre)	Chol g/l	LDL-C g/l	TG g/l	HDL-C g/l	Apo B g/l	Lp(a) g/l
1	m	64	2,37	1,69	1,22	0,44	1,61	0,08
2	m	59	2,34	1,56	1,91	0,40	1,70	0,01
3	m	52	2,38	1,57	0,92	0,63	1,43	0,07
4	w	57	3,46	2,43	1,23	0,78	1,79	1,46

Tab. 5.10 Haplotypisierung der Q3405E Mutation des Apo B-100.

Patient/In mit Q3405E	Geschlecht	Alter (Jahre)	Ins/Del	SP <i>XbaI</i>	<i>MspI</i>	<i>EcoRI</i>	3'VNTR
1	m	64	Ins/Del	+/-	+/-	+/+	35/37
2	m	59	Ins/Del	+/-	+/+	+/-	37/49
3	m	52	Del/Del	+/+	+/+	+/+	33/37
4	w	57	Del/Del	+/+	+/+	+/+	35/37

Bei allen Merkmalsträgern ließ sich ein gemeinsamer Haplotyp der Q3405E Mutation feststellen (Tabelle 5.10). Die Apo B 3405E Allel segregiert mit dem Haplotyp SP-Del, *Xba*I+, *Msp*I+, *Eco*RI+ und 3'VNTR-37.

5.8.3.1 LDL-Rezeptorbindung, Internalisation und Degradation der LDL eines heterozygoten Merkmalträgers für Apo B Q3405E

Der Glutamin zu Glutaminsäure Austausch an Position 3405 des Apo B-100, der eine zusätzliche negative Ladung im Bereich der Rezeptorbindungsdomäne einfügt, könnte Konsequenzen auf die Bindungskapazität der LDL haben. Die Messung der rezeptorvermittelten Aufnahme der LDL wurde in Zellkultur nach dem in Kapitel 4.10 beschriebenen Verfahren an humanen Fibroblasten durchgeführt.

Einem der vier heterozygoten Merkmalsträger, einem 52-jährigen Mann, wurde Blut für eine LDL-Isolation entnommen. Die LDL wurden mit ¹²⁵I markiert und in dem Bindungsassay eingesetzt. In Übereinstimmung mit drei zuvor publizierten Arbeiten (Pullinger *et al.* 1996, Ludwig *et al.* 1997 und Gaffney *et al.* 1998) fand sich keine Abnormalität der Rezeptorbindung von heterozygoten Apo B Q3405E LDL (Abbildung 5.14 A). Dagegen waren Internalisation und Degradation der LDL niedriger als die normaler LDL (Abbildung 5.14 B und C). Die Werte betragen 85% bzw. 87,5% der Pool LDL und erreichten statistische Signifikanz ($P < 0,05$) bei der höchsten Ligandenkonzentration (40 mg/l LDL).

Offensichtlich ist das Apo B-100 mit der selteneren 3405E Variante in seiner Bindungskapazität an den LDL-Rezeptor nicht beeinträchtigt. Dies wurde auch in anderen Arbeiten festgestellt (Pullinger *et al.* 1996, Ludwig *et al.* 1997). Möglicherweise aber ist 3405Q an der Konformationsänderung des LDL-Rezeptor-Komplexes zu Beginn und im Verlauf des Internalisierungsprozesses beteiligt, wodurch die *in vitro* beobachtete verminderte Internalisation und Degradation der LDL des heterozygoten Q3405E HLP-Patienten zu erklären sein könnte. Gaffney *et al.* (1998) untersuchten LDL sieben heterozygoter und eines homozygoten Merkmalsträgers des Apo B Q3405E Polymorphismus in einem U-937 Zellen Wachstumsassay. Die Autoren berichten, dass die mit LDL Q3405E Heterozygoter inkubierten U-937 Zellen eine geringere Vermehrungsrate (77%) zeigten. Ergebnisse deren Untersuchungen und die hier beschriebenen decken sich in der Annahme, dass die Rezeptorbindungsdomäne des Apo B-100 und die bei der intrazellulären Aufnahme der LDL-Partikel beteiligten Proteinbereiche nicht komplett identisch sind.

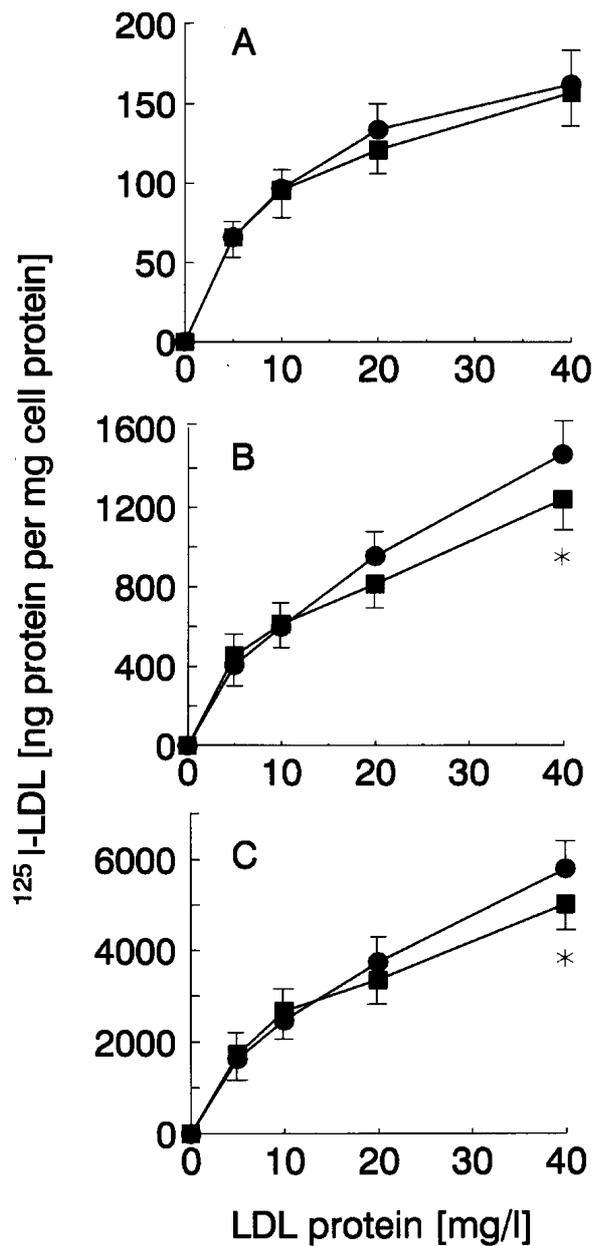


Abb. 5.14 Interaktion der LDL eines heterozygoten Merkmalträgers für Apo B Q3405E (■) im Vergleich zu gepoolten LDL normolipidämischer Personen (●) mit humanen Fibroblasten im *in vitro*-Test. **A.** Bindung, **B.** Internalisation, **C.** Degradation. Messwerte stellen Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit je dreifachen Parallelansätzen dar. * $P < 0.05$ versus Kontrollen.

5.8.4

Apo B N4311S Polymorphismus

Der Polymorphismus am Apo B-100 Aminosäurekodon 4311, der zum Austausch der Aminosäure Asparagin (N) mit Serin (S) führt, war in der TGGE des Fragment I identifizierbar. Durch Amplifikation mit einem modifizierten Primerpaar [Kap. 4.3 (4)] und Restriktion mit der Endonuklease *Pst*I wurde eine zweite Möglichkeit zur Detektion evaluiert. Serin₄₃₁₁ war bei 21% der untersuchten 594 Chromosomen vorhanden: 103 Personen waren heterozygot und 11 Personen waren homozygot für die 4311S Variante. Der N4311S Polymorphismus wurde 1990 erstmals beschrieben (Navajas *et al.* 1990). Die Autoren fanden die seltenere Serin₄₃₁₁ Variante in 24% der von ihnen untersuchten 162 Chromosomen. Weitere Allelfrequenzen bei anderen Populationen finden sich in Tabelle 5.11. Ein deutlicher populationsgenetischer Unterschied der Alleldistribution zwischen Asiaten und Europäern ist feststellbar. Das Serin₄₃₁₁ Allel ist prozentual bei Indern/Pakistanis und Chinesen zwei- bis dreifach höher repräsentiert als in der westeuropäischen Bevölkerung.

Der N4311S Polymorphismus ist mit einem immunologischen Polymorphismus der LDL, den Antigen Epitopen Ag(x) und Ag(y) des Apo B-100 assoziiert (Dunning *et al.* 1992). Die Antigen Gruppe x/y (Ag x/y) ist zugleich in *Linkage disequilibrium* mit einem in Exon 26 des Apo B-100 Gens befindlichen Polymorphismus (Prolin₂₇₁₂→Leucin) (Wu *et al.* 1991, Dunning *et al.* 1992). Ag(x) ist mit dem Serin₄₃₁₁/Leucin₂₇₁₂ Allel assoziiert und das Ag(y) Epitop wird durch das Allel Asparagin₄₃₁₁/Prolin₂₇₁₂ repräsentiert.

Der N4311S Polymorphismus wurde in dieser Arbeit ausschließlich bei Patienten mit Typ IIa HLP detektiert. Da keine Erhebung in einer normolipidämischen Kontrollgruppe stattfand, kann keine Aussage über die Assoziation beider Allelvarianten mit hohen, bzw. niedrigen Lipidwerten gemacht werden. Dunning *et al.* (1992) konnte bei einer Untersuchung normolipidämischer Personen eine, wenn auch geringe, Assoziation (1,1% prozentuale Varianz $R^2 \times 100$) des Serin₄₃₁₁/Leucin₂₇₁₂ Allels mit niedrigerem LDL-Cholesterin und dafür eine signifikante ($P < 0,05$) Assoziation (9% prozentuale Varianz $R^2 \times 100$) mit erhöhtem HDL-Cholesterin feststellen. Da die Frequenz des Serin₄₃₁₁ Allels (0.21) in dem hier untersuchten Kollektiv von HLP-Patienten 3-5% unter den in anderen europäischen Populationen mit Ausnahme Schwedens (s. Tabelle 5.11) errechneten Allelfrequenzen lag, spräche dies ebenfalls für eine mögliche Assoziation mit erniedrigten LDL-, bzw. erhöhten HDL-Cholesterin Werten. In einer Gruppe hyperlipidämischer Patienten aus England war zwar die Häufigkeit (0.26) der Apo B N4311S Heterozygoten etwas höher als in Deutschland, es ist jedoch zu bedenken,

dass der Stichprobenumfang (n=35) in dieser Untersuchung sehr klein ist, und ebenfalls ein Vergleich zu einer Kontrollgruppe fehlt.

Tab. 5.11 Relative Häufigkeit des Serin₄₃₁₁ Allels in verschiedenen Populationen

Population	Gruppe	Anzahl der Individuen	Frequenz des Ser ₄₃₁₁ Allels
Franzosen ^a	(1)	81	0.24
Finnen ^b	(2)	118	0.26
Engländer ^b	(3)	37	0.26
Schweden ^b	(2)	186	0.9
Asiaten ^b	(1)	152	0.48
Chinesen ^b	(2)	82	0.71
Afro-Karibische ^b	(1)	47	0.11
Deutsche ^c	(3)	297	0.21

^a Ref. (Navajas *et al.* 1990), ^b Ref. (Dunning *et al.* 1992), ^c hier

(1) Lipid-, bzw. KHK Status nicht angegeben; (2) normolipidämisch; (3) hyperlipidämisch

5.8.5

Apo B A4454T

Der von Ilmonen *et al.* (1997) beschriebene Apo B Polymorphismus des Kodon 4454, der zum Austausch der Aminosäure Alanin (A) mit Threonin (T) führt, wurde in der TGGE des Fragment J detektiert. Eine Sequenzierung belegte den Guanin → Adenin Austausch, der eine *HaeIII* Restriktionsenzym-Spaltstelle entstehen lässt. Dadurch konnte Apo B A4454T bei den Mutationsträgern verifiziert werden. Threonin ist ein hydroxyliertes Valin, es ist daher sehr viel hydrophiler und reaktiver als Alanin. Die Mutation wurde bei 19 der 297 Typ IIa Patienten nachgewiesen (Allelfrequenz = 0,032). Die Segregation des 4454T Allels konnte in der Familie der S.K., deren Apo B-100 DNA im ersten Teil dieser Arbeit sequenziert worden war, bestimmt werden, da S.K. heterozygot für Apo B A4454T ist (Abbildung 5.15). Sowohl die Mutter, als auch Tante und Großmutter der Indexpatientin sind heterozygote Merkmalsträgerinnen. Das Threonin-Allel segregiert mit dem Haplotyp: SP-Ins, *XbaI*-, *MspI*+, *EcoRI*+, 3'VNTR-35 und Apo B 4311S (Tabelle 5.12). Die Lipid-, Lipoprotein- und Apolipoprotein-Konzentrationen der S.K. und ihrer Familienmitglieder sind in Tabelle 5.13 angegeben. Die mittleren Cholesterinwerte der 19 Apo B A4454T heterozygoten Typ IIa HLP-Patienten lagen etwas höher (~17%) als die der FDB_{3500Q} Patienten (Gesamtcholesterin: 3,16 versus 2,71 g/l, LDL-Cholesterin: 2,37 versus 2,03 g/l) (Tabelle 5.6). In der Familie der S.K. sind dennoch zwei Apo B A4454T Heterozygote mit pathologisch nicht erhöhten Cholesterinspiegeln vorhanden. Ilmonen *et al.* (1997) fanden keinen Unterschied in der Allelfrequenz von normo- und

hyperlipoproteinämischen Personen in Finnland. Sie lag in beiden untersuchten Kollektiven bei 0,02. Auch konnten sie keine klare Kosegregation mit dem Lipid-Phänotyp feststellen. In der Familie der S.K. ist die Assoziation der A4454T Mutation mit dem Lipid-Phänotyp ebenfalls nicht nachweisbar, da sich mütterlicherseits bei allen Merkmalsträgerinnen altersentsprechende Normalbefunde der Lipide zeigten. Auffällig sind bei allen Merkmalsträgerinnen das hohe HDL-Cholesterin (im Mittel 0,78 g/l). Auf Grund der vorliegenden, bisherigen Ergebnisse der Familienuntersuchung ist ein Verdacht auf einen ursächlichen Zusammenhang zwischen dem nachgewiesenen Apo B-100 Bindungsdefekt der S.K. mit der Substitution A zu C an Position 4454 des Apo B-100 auszuschließen. In einer anderen Arbeit wurde bei einer heterozygoten Person mit A4454T Mutation eine funktionelle Überprüfung ihrer LDL vorgenommen, die keinen Anhaltspunkt auf einen vorliegenden Bindungsdefekt gab (Meng *et al.* 1996). Die Vermutung, das S.K. durch ihren Vater erblich mit einem Apo B-Defekt belastet ist, kann dem Erbgang zufolge durch das gemeinsame (vom Vater stammende) 3'VNTR-51 Allel der S.K. und des ihres Bruders (normolipidämisch) nicht bestätigt werden.

Tab. 5.12 Apo B-100 Haplotypisierung der A4454T Mutation in der Familie der S.K.

Fam.Stamm.				SP					
Position		A4454T	N4311S	Ins/Del	<i>XbaI</i>	<i>MspI</i>	<i>EcoRI</i>	3'VNTR	
1	Großm.	A/T	N/S	Ins/Ins	+/-	+/+	+/+	35/37	
2	Vater	A/A	N/S	Ins/Ins	-/-	+/+	+/+	35/51	
3	Mutter	A/T	N/S	Ins/Ins	+/-	+/+	+/+	35/37	
4	Tante	A/T	N/S	Ins/Ins	-/-	+/+	+/+	35/39	
5	Bruder	A/A	N/N	Ins/Ins	+/-	+/+	+/+	37/51	
6*	S.K.	A/T	N/S	Ins/Ins	-/-	+/+	+/+	35/51	

Tab. 5.13 Lipid-, Lipoprotein und Apolipoprotein Konzentrationen der S.K. und ihrer Familienmitglieder

Position	Apo 4454 Genotyp	Alter [Jahre]	Ges.C [g/l]	LDL-C [g/l]	TG [g/l]	HDL-C [g/l]	Apo B [g/l]	Lp(a) [g/l]	ApoE Phänotyp	
1	Großm.	A/T	78	2,79	1,64	1,1	0,93	1,3	0,04	33
2	Vater	A/A	53	3,36	2,47	2,8	0,32	2,4	0,54	43
3	Mutter	A/T	48	2,43	1,41	0,57	0,91	0,92	0,13	33
4	Tante	A/T	54	2,11	1,27	1,38	0,57	0,97	0,56	33
5	Bruder	AA	30	2,24	1,42	1,47	0,53	1,25	0,12	43
6*	S.K.	A/T	24	3,26	2,33	1,26	0,68	2,33	0,13	33

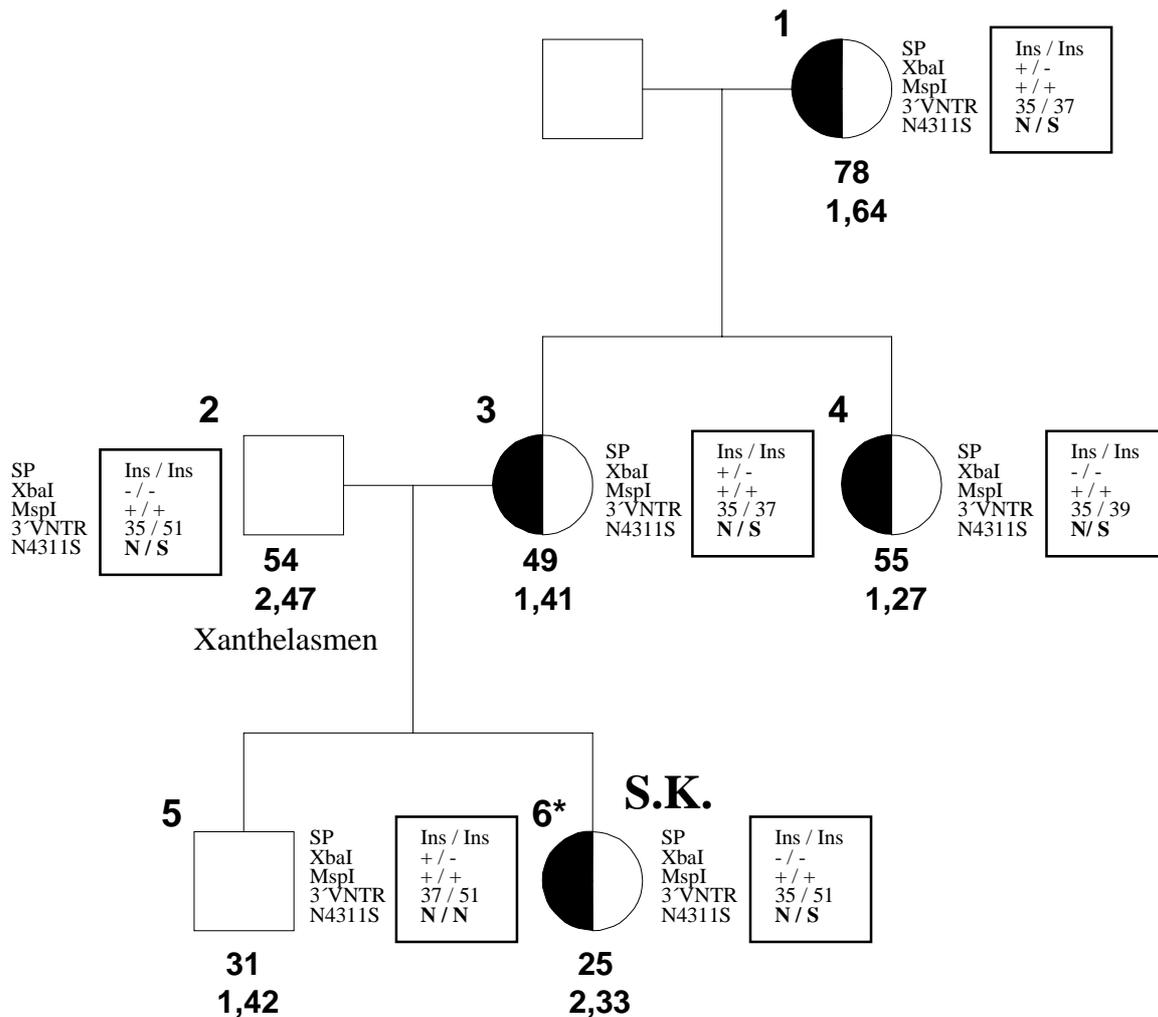


Abb. 5.15 Segregation der A4454T Mutation in der Familie der S.K.. Unterhalb der Symbole sind Alter (Jahre) und LDL-Cholesterin (g/l) angegeben. Halb gefüllte Symbole = heterozygot für Apo B A4454T. Allelvarianten fünf polymorpher Apo B-100 Gene sind in Kästchen umrahmt angegeben. Als Haplotypenmarker wurden bestimmt: die Signal Peptid (SP) Insertion (Ins) oder Deletion (Del), der *XbaI* (ACT→ACC, Thr²⁴⁸⁸→Thr) RFLP, der *MspI* (CGG→CAG, Arg³⁶¹¹→Gln) RFLP, der N4311S (AAT→AGT, Asn⁴³¹¹→Ser) Polymorphismus und die 3' hypervariable Region (3'VNTR).
+ = Enzymspaltstelle vorhanden.

5.8.6

Apo B I4287V

Neben dem N4311S Polymorphismus (Kap. 5.8.4) konnte in der TGGE des Fragment I eine weitere Punktmutation des Apo B-100 identifiziert werden (Abbildung 5.16 A). Der Basenaustausch von ATT nach GTT an Kodon 4287 des Apo B-100 ersetzt ein Isoleucin (I) durch Valin (V). Die Apo B I4287V Mutation wurde in 6 DNA-Proben festgestellt (Allelfrequenz = 0,01). Lipide, Lipoproteine und Apolipoproteine der sechs heterozygoten Merkmalsträger(Innen) sind in Tabelle 5.14 angegeben. Bisher wurde dieser Polymorphismus in der Literatur noch nicht beschrieben. Die Genotypisierung anderer Apo B Polymorphismen bei Apo B I4287V Heterozygoten wies auf einen gemeinsamen Haplotyp (SP-Del, *Xba*I +, *Msp*I +, *Eco*RI +, 3'VNTR-37) der Mutation hin (Tabelle 5.15). Anhand der Restriktion des TGGE-Fragments I (376 Basenpaare) mit der Endonuklease *Mae*II konnte die Mutation von der Wildtyp-DNA, bei der die Spaltstelle an Position 4287 nicht vorhanden ist, unterschieden werden (Abbildung 5.16 B.).

Tab. 5.14 Lipid-, Lipoprotein- und Apolipoprotein Konzentrationen bei Apo B I4287V heterozygoten Typ IIa HLP-Patienten.

		Alter		Ges.C	LDL-C	TG	HDL-C	Apo B	Lp(a)	ApoE
Geschlecht	[Jahre]	BMI	[g/l]	Phänotyp						
1	w	64	25,6	2,8	1,9	1,06	0,7	1,81	0,15	33
2	m	48	26,3	3,4	2,66	1,54	0,44	2,22	0,79	43
3	m	42	n.b.	2,6	2,0	1,09	0,38	1,68	1,03	33
4	m	37	21,7	2,33	1,69	1,14	0,41	1,45	0,72	43
5*	w	26	19,0	2,89	2,26	1,19	0,40	1,65	0,27	33
6	w	8	15,9	2,7	1,85	0,78	0,69	1,33	0,15	33

* Index-Patientin

Tab. 5.15 Haplotypisierung heterozygoter I4287V Merkmalsträger.

		Alter	SP				
Geschlecht	(Jahre)	Ins/Del	<i>Xba</i> I	<i>Msp</i> I	<i>Eco</i> RI	3'VNTR	
1	w	64	Ins/Del	+/+	+/+	+/+	37/37
2	m	48	Ins/Del	-/+	+/+	+/-	37/49
3	m	42	Ins/Del	-/+	+/+	+/+	n.b.
4	m	37	Ins/Del	+/+	+/+	+/+	37/37
5*	w	26	Del/Del	+/+	+/+	+/+	37/37
6	w	8	Ins/Del	-/+	+/+	+/-	37/51

* Index-Patientin

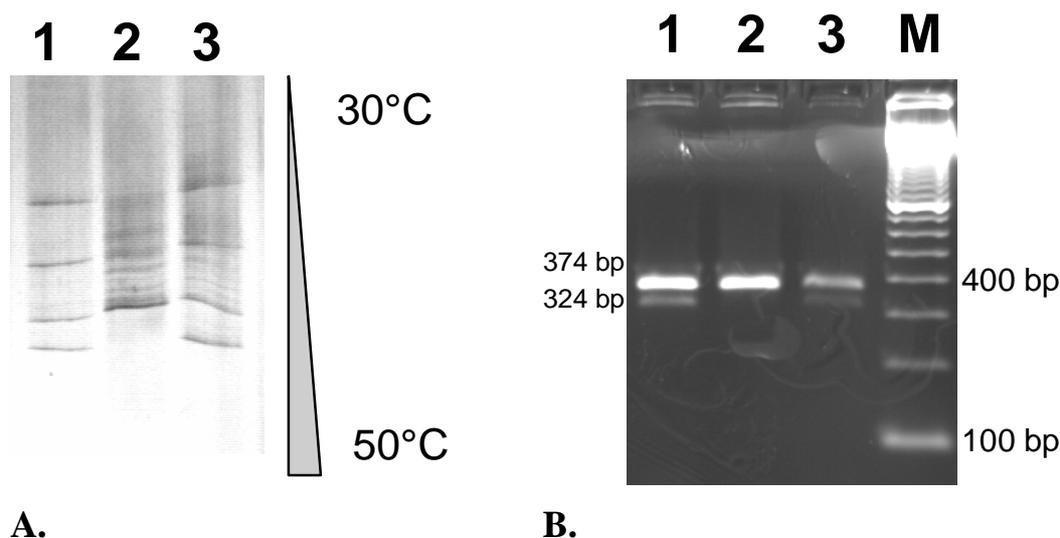


Abb. 5.16 Nachweis der Apo B I4287V Mutation in der Familie einer heterozygoten Merkmalsträgerin (5*). **1** = Vater, **2** = Mutter, **3** = Indexpatientin (5*) **A.** Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese des Fragment I (376 bp). 3 μ l PCR-Produkt wurden in einem 80 g/l Polyacrylamidgel (8M Harnstoff) bei 15 V/cm (<30 mA) aufgetrennt. Der Temperaturgradient reichte von 30°C (Kathode) bis 50°C (Anode). **B.** *Mae*II Restriktion des Fragment I. 9 μ l PCR-Produkt wurden mit 10 μ l 2x Enzypuffer und 1 μ l Restriktionsenzym (2 *Units*) bei 50°C über Nacht inkubiert und anschließend in einem 20 g/l Agarosegel (1xTBE Puffer) bei 5,5 V/cm aufgetrennt. Restriktionsprodukte der I4287V heterozygoten DNA-Amplifikate haben die Längen: 374, 324, 50 und 2 Basenpaare. WT-DNA wird lediglich einmal gespalten (Länge der Spaltprodukte: 374 und 2 Basenpaare).

5.8.6.1 Proliferation der mit LDL heterozygoter Merkmalsträger für Apo B I4287V stimulierten U-937 Zellen

Die LDL einer 26-jährigen Merkmalsträgerin und die ihrer Eltern wurden frisch isoliert und in einem Wachstums-Assay an einer Zelllinie (U-937) humaner Histozyten untersucht. U-937 Zellen verfügen über keine eigene Cholesterinsynthese und sind daher auf extrazelluläre Supplementation des Cholesterins angewiesen. Die Zellen wurden 24 Stunden vor Beginn des Experimentes auf serumfreien Medium kultiviert und anschließend auf 96-Loch Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen (5-25 μ g/ml) LDL-Cholesterins weitere 48 Stunden inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde an Hand der Einbaurrate radioaktiv markierten Thymidins (3 H-Thymidin) in die Zellen gemessen. Über die Wachstumsrate der Zellen konnte darauf geschlossen werden, inwieweit die rezeptorvermittelte Aufnahme von LDL in die Zellen beeinträchtigt war.

Aus der Genotypisierung der I4287V Mutation (Abbildung 5.16) ging hervor, dass der 59jährige Vater der Patientin ebenfalls heterozygoter Merkmalsträger ist. Er zeigte einen auf-

fallend niedrigen Plasma-Cholesterinwert von 1,42 g/l. Alle anderen gemessenen Lipidparameter lagen ebenfalls im Normalbereich. Er war zum Zeitpunkt der Blutabnahme gesund.

U-937 Zellen, die mit LDL der Patientin inkubiert worden waren (Abbildung 5.17 a.), zeigten im Vergleich zu den mit gepoolten LDL normolipidämischer Personen inkubierten Zellen ein 18%iges Wachstumsdefizit. Zellen, die mit LDL eines heterozygoten FDB_{3500Q} Patienten stimuliert worden waren, wiesen eine um 31% verminderte Wachstumsrate auf. Die mit LDL der Mutter der Patientin (I4287V negativ) inkubierten Zellen proliferierten ebenfalls schlechter (Abbildung 5.17 b.). Das Wachstum der mit LDL des normolipidämischen (LDL-Cholesterin: 0,72 g/l, Triglyzeride: 1,04 g/l, HDL-Cholesterin: 0,49 g/l) Vaters stimulierten U-937 Zellen war dagegen normal (Abbildung 5.17 b und c.). Daher ist ein funktioneller Zusammenhang der I4287V Mutation mit der *in vitro* beobachteten gestörten Aufnahme der LDL der Indexpatientin auszuschließen. Die Ergebnisse des an der U-937 Zelllinie durchgeführten Proliferations-Assays wurden unabhängig davon durch Bindungsversuche an humanen Fibroblasten Zellkulturen bestätigt (Abbildung 5.18). Bindung, Internalisation und Degradation der mit ¹²⁵Jod markierten LDL der Indexpatientin und der ihrer Mutter waren im Vergleich zu denen des Vaters deutlich vermindert. In dieser Bindungsstudie sind die als Kontrolle eingesetzten Pool-LDL normolipidämischer Personen durch eine zu lange Lagerung modifiziert worden, so dass sie keine exakten Referenzwerte erzeugten.

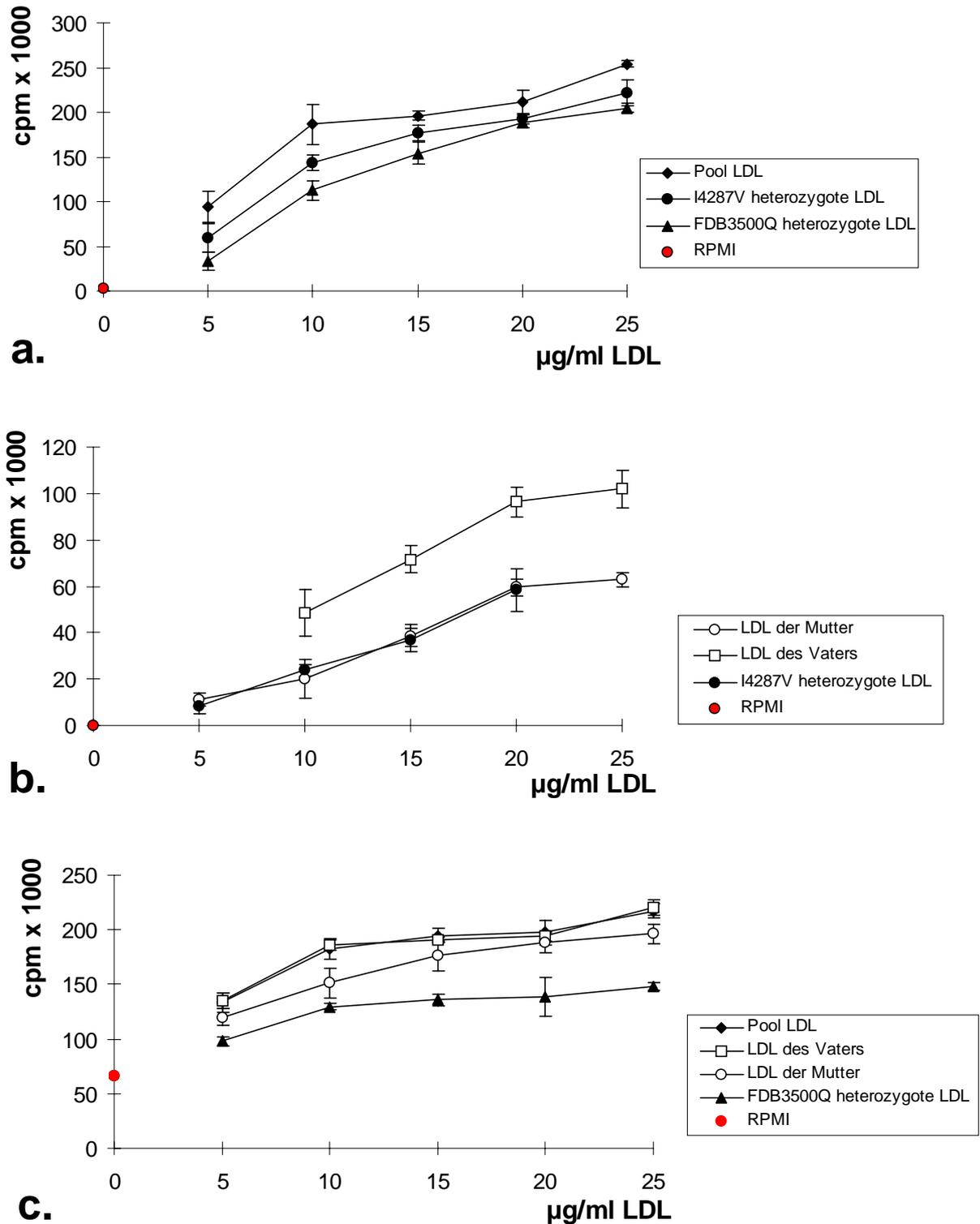


Abb. 5.17 ^3H -Thymidin-Aufnahme der mit LDL der heterozygoten Apo B I4287V Person (●), deren Eltern (Mutter: ○, Vater: □), Kontroll-LDL (◆) und LDL eines FDB_{3500Q} Heterozygoten (▲) inkubierten U-937 Zellen. 2×10^4 Zellen wurden mit unterschiedlichen LDL-Konzentrationen (5-25 µg/ml) 48 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. 8 Stunden vor Beendigung der Inkubationszeit wurden 0,5 µCi ^3H -Thymidin zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend vom Medium getrennt und die Menge an zellulär aufgenommenen ^3H -Thymidin im Szintillator gemessen. Die cpm bezeichnet den aus einem quadruplikatem Ansatz ermittelten Durchschnittswert (\pm Standardabweichung). ● RPMI ist die in RPMI Medium ohne Serumzusatz erhaltene Zellproliferationsrate.

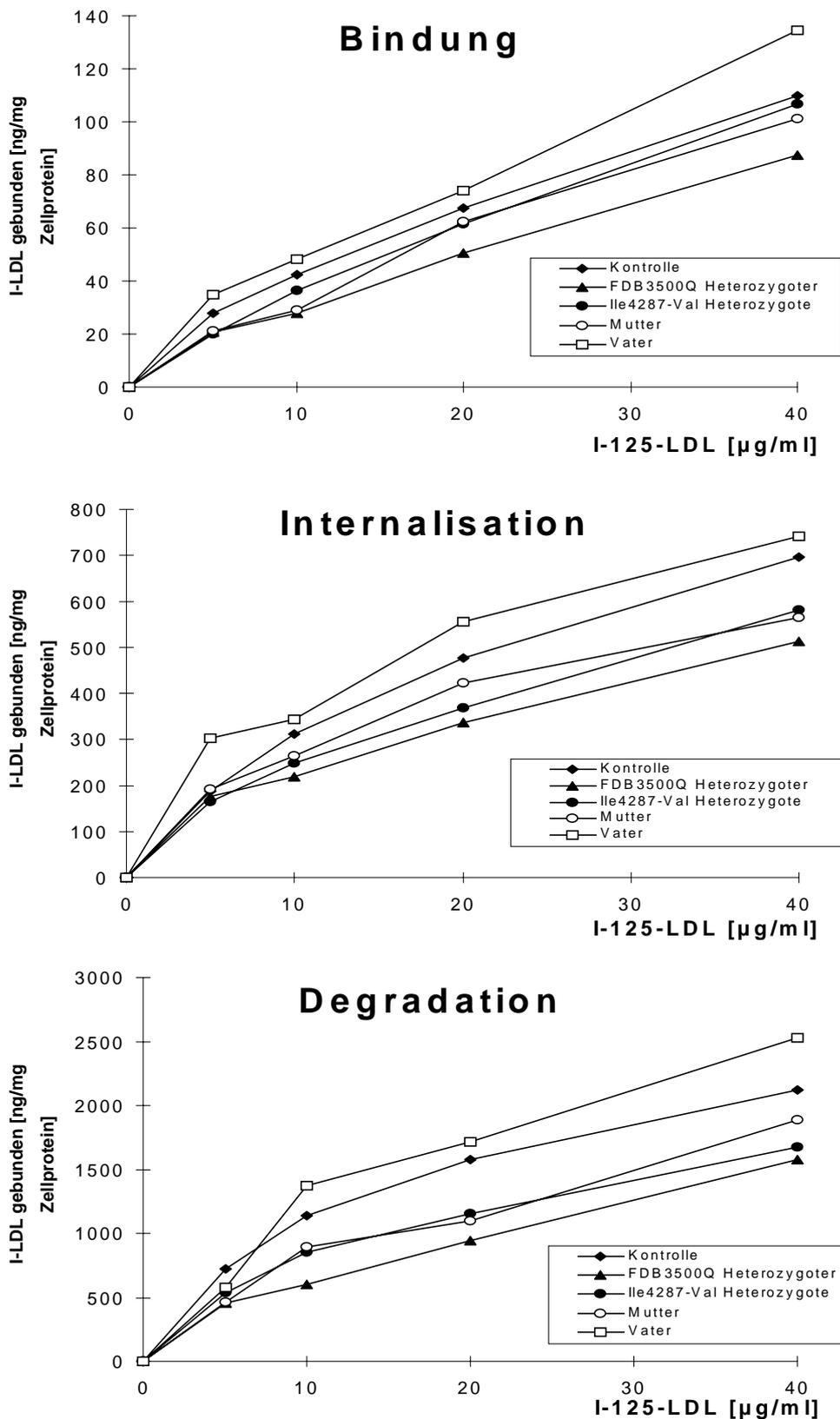


Abb. 5.18 Interaktion der LDL der heterozygoten Merkmalsträgerin (●) für Apo B I4287V und der LDL ihrer Eltern (□,○) im Vergleich zu gepoolten LDL normolipidämischer Personen (◆) und LDL einer FDB_{3500Q} heterozygoten Person (▲) mit humanen Fibroblasten im *in vitro*-Test.

6

Diskussion

Genetische Varianten des Apo E, des Lp(a) und des Apo B spielen neben anderen regulatorischen Proteinen eine bedeutsame Rolle in der Genese familiär veranlagter Hypercholesterinämien. An Hand allelspezifischer Distributionen vermuteten Gavish *et al.* (1989) und Hasstedt *et al.* (1987), dass 14-20% der Varianz in LDL- und Apo B-Plasmaspiegeln auf das Apo B Gen zurückzuführen sind.

De facto war 1994 nur eine einzige strukturelle Variante des Apo-100 - FDB_{3500Q}- mit funktionell verminderter Rezeptorbindung bekannt, die damit als Auslöser einer primären Hypercholesterinämie klinisch relevant ist. FDB_{3500Q} beruht auf einer Punktmutation am Aminosäurekodon 3500 (CGG→CAG, Arginin→Glutamin). Die Vermutung, dass weitere mutagene Veränderungen am Apo-100 existieren, die sich phänotypisch wie das FDB_{3500Q} auswirken, war Grundlage der hier vorliegenden Arbeit. Die Diversität der LDL-Rezeptormutationen, von denen bis heute mehr als 400 (Wilson DJ *et al.* 1998) beschrieben wurden, musste die Annahme verstärken, dass auch das Apo B-100 als einziger Ligand der LDL genetisch instabil ist. Auf der Grundlage eines noch wenig präzisen Wissens über die Lokalisation des rezeptorbindenden Bereiches des Apo B-100 hatte sich mit dem Fall der jungen Frau (S.K.) mit bindungsdefekten LDL-Partikeln, aber nicht vorhandener FDB_{3500Q} Mutation, ein klinischer Fall eröffnet, der für eine DNA-Sequenzierung des Apo B-100 geeignet erschien. Es wurde ein dem damals vermuteten Rezeptorbindungsbereich entsprechender Sequenzabschnitt des Exon 26 sequenziert. Die DNA der S.K. zeigte jedoch keine genetische Veränderung in dem untersuchten Bereich, so dass davon ausgegangen werden musste, dass hier eine strukturelle Veränderung des Apo B-100 vorliegt, die sich ausserhalb der vermuteten Rezeptorbindungsregion befindet und einen indirekten Einfluss auf die Rezeptor-Liganden Interaktion ausübt. Es wurde daraufhin eine neue Strategie entwickelt, die das gezielte Mutations-Screening bei einer großen Zahl Patienten mit bisher ursächlich nicht geklärten Typ IIa HLP-Erkrankungen zum Ziel hatte. Für die Messung der Bindungsaffinität humaner LDL in einem *in vitro* Test stand kein geeignetes Verfahren für den Umsatz größerer Probenmengen zur Verfügung. Folglich wurde einem genetischen *Screening* der Vorzug gegeben.

In der Molekulargenetik stehen im Wesentlichen vier verschiedene Verfahren zur Detektion unbekannter Punktmutationen doppelsträngiger DNA zur Verfügung: der SSCP, die DGGE, die Heteroduplexanalyse und die TGGE. Die drei ersteren wurden für Mutationsanalysen am

Apo B-100 in anderen Arbeiten bereits eingesetzt (Ilmonen *et al.* 1994, Kotze *et al.* 1994, Nissen *et al.* 1995).

Mutations Detektion mit SSCP und Heteroduplex-TGGE

Es gab bisher wenige erfolgreiche Versuche, den SSCP in kleineren Gelen ohne Verwendung radioaktiver Markierungssubstanzen zu etablieren (Nollau und Wagener 1997, Ailenberg und Silverman 1997). Generell wird in der Literatur die Verwendung großer Sequenziergel-Elektrophorese-Apparaturen beschrieben. Der Versuch, die R3500Q Mutation des Apo B-100 in DNA Fragmenten <200 Basenpaare (*Hph*I-Restriktionsprodukt eines 445 Basenpaar Fragments) in kleineren SSCP-Gelen (18x20 cm) nachzuweisen, zeitigte keinen Erfolg. Dagegen gelang die Identifizierung der R3500Q Mutation in einem >400 bp Fragment in TGGE-Gelen eindeutig. Im Folgenden konnten in diesem Fragment drei weitere Punktmutationen (R3500W, R3531C und R3611Q) diskriminiert werden.

Unter optimierten Bedingungen können in der TGGE Punktmutationen mit nahezu 100% Erkennungswahrscheinlichkeit detektiert werden (Scholz *et al.* 1993). Beim SSCP liegt die Wahrscheinlichkeit eines Mutationsnachweises mit 80-90% deutlich niedriger (Sheffield *et al.* 1993). Optimale DNA-Fragmente in der TGGE-Analytik variieren zwischen 100 und 500 Basenpaaren; in dem SSCP können dagegen nur Fragmente <200 Basenpaare (Hayashi und Yan-dell 1993) analysiert werden. Die hier beschriebene Erfahrung in der Anwendung von SSCP und TGGE sprechen für diese Hypothese.

Henderson *et al.* (1997) haben drei Methoden beim FDB Mutations-Screening verglichen. Während sie mit denaturierender Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) und Heteroduplexanalyse 11 heterozygote Mutationsträger für FDB_{3500Q} in einer Gruppe von 432 Personen identifizieren konnten, waren vier der heterozygoten Merkmalsträger in dem SSCP nicht nachweisbar. Die Autoren haben dafür keine Erklärung. Beim SSCP können demnach trotz evaluiertem Anwendungsprotokoll Inkonsistenzen bei der Probenanalyse auftreten. Henderson *et al.* beklagen neben der geringeren Erfolgsrate von 64% gefundenen Mutationen die im Vergleich zu beiden anderen Methoden wesentlich arbeitsaufwendigere Durchführung des SSCP.

DGGE und TGGE erzielen ähnliche, aber nicht unbedingt identische Resultate (Wartell *et al.* 1998). In der DGGE werden chemisch-denaturierende Gradienten in senkrechten PAA-Gelen bei konstanter Elektrophorese-Temperatur (60°C) verwendet. Die Herstellung des denaturie-

renden Gradienten Geles ist indes technisch etwas schwieriger als die eines homogenen TGGE Geles.

Durch die Kombination einer denaturierenden Elektrophorese im Temperaturgradienten mit der Heteroduplex-Formation der DNA-Moleküle können Punktmutationen auch bei geringen thermischen Konformationsveränderungen heterologer Allele (WT-Allel und Allel mit Substitution) nachgewiesen werden. Hierfür konnte eine Reihe von Beispielen in der TGGE verschiedener Apo B-100 Mutationen beobachtet werden. So etwa war der *MspI*₃₆₁₁-Polymorphismus am Aminosäurekodon R3611 des Apo B-100 erst durch Heteroduplexanalyse detektierbar: beide Homoduplex-Moleküle (3611 R/R, 3611 Q/Q) zeigten keinen optisch erkennbaren Wanderungsunterschied im Temperatur Gradienten Gel. Durch die Heteroduplex-Formation nach vorangegangener De- und Renaturierung der untersuchten Proben-DNA wurde bei heterozygotem Genotyp (3611 R/Q) eine zusätzliche Bande im TGGE-Gel sichtbar. Bei homozygoten Genotypen ist jedoch auch die Heteroduplex-Formation ineffektiv. Daher konnte im Fall des *MspI*₃₆₁₁-Polymorphismus die Allelverteilung in dem untersuchten Kollektiv nicht festgestellt werden. Dieses Problem kann durch Mischen einer Kontroll-PCR (mit WT-Sequenz) mit dem Amplifikationsprodukt der Proben-DNA umgangen werden. Eine Veranlassung hierfür gab es jedoch nicht, da die Dokumentation der Allelhäufigkeiten dieses polymorphen Locus nicht erforderlich erschien: der *MspI*₃₆₁₁-Polymorphismus des Apo B-100 ist ein ausführlich charakterisierter Genort ohne pathobiochemische Relevanz. Bei einem weiteren Genpolymorphismus des Apo B-100 (Apo B Q3405E) mit ähnlich indifferenter Migration der Homoduplex-Banden konnte die Allelverteilung auf Grund der geringen Heterozygotenfrequenz (1,3%) bei den untersuchten Personen bestimmt werden, da angenommen wurde, dass die Mutation kaum homozygot vorkommt. Insgesamt erzielte die Heteroduplex-TGGE präzise und reproduzierbare Ergebnisse, die zu einer verlässlichen Analytik der Punktmutationen beitrug.

Mutationen des Apo B-100

Etwa zum Zeitpunkt der ersten Etablierungsversuche des Mutationsnachweises am Apo B-100 Gen mit Hilfe der TGGE wurde die Rezeptorbindungsdomäne des Apo B-100 neu und genauer definiert (Chatterton *et al.* 1995, Boren *et al.* 1998).

Da es sich beim Apo B-100 um ein sphärisch in den LDL-Partikel integriertes Protein handelt, das isoliert nicht analysiert werden kann, wurden insbesondere über die Herstellung rekombi-

nanter LDL Erkenntnisse zu strukturellen Bindungseigenschaften des Apo B-100 an seinen Rezeptor gewonnen. Daneben gelang es Chatterton *et al.* durch den Einsatz einer Vielzahl monoklonaler Antikörper Konformationseigenschaften des LDL-assoziierten Apo B-100 im Elektronenmikroskop darzustellen (Chatterton *et al.* 1995).

Die Herstellung rekombinanter Apo B-LDL bereitete zunächst größere Schwierigkeiten. Zum einen waren Apo B-Minigenetranskripte in Zellkulturen nicht exprimierbar, zum anderen gelang deren Expression in transgenen Mäusen nur in sehr geringen Mengen (Chiesa *et al.* 1993). Erst mit Hilfe des P1 Bakteriophagen (p158) Klons, der das gesamte Apo B Gen (43 Kilobasen) einschließlich 19 Kilobasen der 5' flankierenden und 17,5 Kilobasen der 3' flankierenden Region umspannte, gelang die Expression humaner LDL in Mäusen (Linton *et al.* 1993, Callow *et al.* 1994). Transgene Tiere mit > 10 Kopien des Phagengenoms zeigten humane Apo B Konzentrationen im Plasma (60-80 mg/dl), die denen normolipidämischer Menschen entsprach (Linton *et al.* 1993). Über gezielte Mutagenese des p158 Klons wurde die Expression verschiedener Apo B Gentranskripte in den transgenen Tieren erzielt. Zunächst jedoch konnten nur größere Deletionen über Transposons in die p158 DNA eingebracht werden und damit verschiedene Spezies verkürzter Apo B Proteine generiert werden (McCormick *et al.* 1994, Young *et al.* 1994). Wenig später waren geeignete Methoden gefunden, mit denen auch Punktmutationen in den p158 Klon eingeführt werden konnten (McCormick *et al.* 1995, Boren *et al.* 1996). Dadurch gelang es zum Beispiel die Bereiche des Apo B zu identifizieren, die mit apo (a) interagieren. Apo B bindet über eine Disulfidbrücke am Cysteinrest 4326 an das apo (a) (Callow *et al.* 1994, McCormick *et al.* 1995 und 1996). Daneben sind weitere Aminosäuren am carboxyterminalen (C-terminalen) Teil (4331-4397) des Apo B-100 kritisch für die Wechselwirkung mit apo (a) und die Formation des Lp(a) Partikels (McCormick *et al.* 1997). Interessante Ergebnisse aber lieferte das Maus-Modell auch für die Neudefinition der Rezeptorbindungsdomäne des Apo B-100: Parhofer *et al.* (1992), Chatterton *et al.* (1995) und schließlich Boren *et al.* (1998) entwickelten kontinuierlich ein präziseres Bild der dreidimensionalen Struktur des LDL-assoziierten Apo B-100 Moleküls und dessen Interaktion mit dem LDL-Rezeptor. Mit Hilfe eines von Boren *et al.* übernommenen Strukturmodells wird dieses Konzept in Abbildung 6.1 veranschaulicht. Vieles spricht heute dafür, dass die primäre Rezeptorbindungsdomäne des Apo B-100 im Proteinbereich der basischen (Arginin- und Lysinreichen) Aminosäurereste 3359-3369 liegt (Law und Scott 1990, Boren *et al.* 1998). Das ursprüngliche Modell einer bimodalen Bindungsregion mit einem Bereich 3147-3157 (A) und 3359-3367 (B) (Knott *et al.* 1986) wurde daher teilweise revidiert.

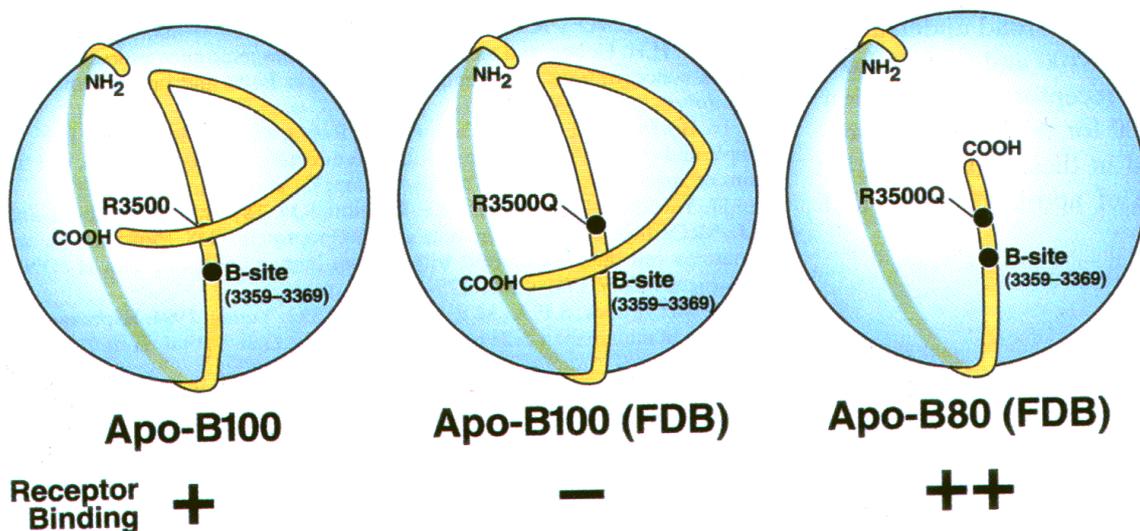


Abb. 6.1 Modell der Apo B-100 Quartärstruktur nach Boren *et al.* (1998)

89% des Apo B-100 schließen sich ringförmig um den LDL-Partikel. Etwa am Aminosäurerest 4050 ist der Ringschluss nahezu möglich und die verbleibenden 11% des Proteins beginnen sich in einer Schlaufe zu legen, die den Ring im Bereich der Aminosäure 3500-Arginin (77%) kreuzt. Die dabei mit dem Argininrest 3500 in Kontakt tretende Aminosäure liegt in den C-terminalen 8% der Aminosäuresequenz (Aminosäurerest 4174-4536) des Proteins. Der Überkreuzungsbe- reich verläuft etwas C-terminal verschoben zur Rezeptorbindungsdomäne 3359-3369 (B) des Apo B-100. LDL mit verkürzten Apo B-100 (Apo B-80), die an Position 3500 die FDB-Mutation haben, binden mit erhöhter Kapazität an den Re- zeptor (Boren *et al.*, 1998). Das C-terminale Ende des Apo B-100 wirkt somit als Modulator der LDL-Rezeptorbindung. Durch die FDB-Mutationen am Amino- säurerest 3500 werden die C-terminalen 8% des Moleküls über das Arginin- und Lysin-reiche *Cluster* (B) des Rezeptorbindungsbereiches verschoben und verhin- dern dessen Interaktion mit dem LDL-Rezeptor.

Boren *et al.* konnten zudem beweisen, dass nicht der Verlust einer basischen Aminosäure an Position 3500 (im Falle der beiden FDB₃₅₀₀ Mutationen) die Rezeptorbindung beeinträchtigt, sondern die spezifische Wechselwirkung des Argininrests mit einer Aminosäure der letzten 8% des C-terminalen Bereiches die strukturelle Integrität des Bindungsepitopes des Apo B-100 bedingt. In ihrem transgenen Tiermodell tauschten sie Argin durch Lysin am Aminosäurerest 3500 aus und stellten fest, dass rekombinante Apo B-3500_{Lysin} LDL ebenfalls bindungsdefekt waren.

Im Kontext dieser neuen Entwicklungen zur strukturellen Aufklärung der LDL-Rezeptorbin- dung des Apo B-100 wurde die Suche nach genetischen Varianten mit Hilfe der TGGE schrittweise ausgedehnt. Zunächst wurden Nukleotidveränderungen im Bereich der Amino- säuren 3131-3837 (Exon 26) untersucht, die die Lysin und Arginin-reichen *Cluster* A (3147-

3157) und B (3359-3369) der Rezeptorbindungsdomäne nach dem Modell von Knott *et al.* (1986) umfassten, sowie weitläufig das R3500. Später wurden angrenzende Aminosäuren (4269-4387) der apo (a) Bindungsstelle Cystein-4326 (Exon 29) des Apo B-100 in das *Screening* eingeschlossen. Schließlich wurde ein weiteres Mal im Bereich des C-terminalen Endes (4347-4498) des Apo B-100 (Exon 29) nach Punktmutationen gesucht. Diese Region musste die mit dem Aminosäurerest R3500 in Wechselwirkung tretende Überschneidungssequenz des C-terminalen Apo B-100 enthalten. Im Juni 1998 erklärte hierzu Dr. Innerarity auf einem Treffen führender Lipidologen in Florenz (Innerarity 1998), dass seine Arbeitsgruppe die partizipierende Aminosäure des Schleifenkreuzes am C-terminalen Ende des Apo B-100 an Kodon 4369 (Tryptophan) identifiziert hat. Analog zur R3500Q Mutation würde eine Aminosäureveränderung des Tryptophanrests 4369 ebenfalls die modulierende Funktion der Schlaufe ändern und möglicherweise zum Bindungsverlust der LDL an die Rezeptoren führen. In der TGGE konnten die durch Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese erzeugten Basenaustauschmutationen an Kodon 4369 von der Wildtyp-Sequenz unterschieden werden. Es wurden 297 Personen mit Typ IIa HLP auf spezifische Substitutionen in diesem Basenbereich hin untersucht. Die Suche nach natürlich vorkommenden Nukleotidveränderungen an diesem Triplet blieb jedoch ergebnislos. Bisher wurden drei weitere Arbeiten publiziert, in denen ein genetisches *Screening* am 3' Ende des Apo B Genes im Exon 29 durchgeführt worden war (Navajas *et al.* 1990, Dunning *et al.* 1992, Ilmonen *et al.* 1997). Eine Veränderung des Aminosäurerests 4369 wurde in keiner dieser Arbeiten beobachtet. Dafür wurden eine Reihe anderer Substitutionen beschrieben, die jedoch nicht mit Lipidphänotypen korrelierten.

In dem untersuchten DNA Bereich des Exon 26 (AS 3131-3837) ließen sich fünf Punktmutationen nachweisen. Zwei der bekannten FDB-Mutationen, FDB_{3500Q} und FDB_{3500W}, gehörten dazu. Daneben fand sich eine stille Mutation (L3350L), ein Polymorphismus (*MspI*₃₆₁₁) und eine weitere, zuvor beschriebene Substitution (Q3405E). Die detaillierte funktionelle Untersuchung dieser strukturellen Apo B Variante mit einem Glutamin zu Glutamat Austausch am Aminosäurerest 3405 an Hand von Bindungsstudien ergab eine signifikante Beeinträchtigung der Internalisation, bzw. Degradation der LDL-Partikel. Auf Grund des sauren Aminosäurerests Glutamat an Position 3405 kann es zu einer polaren Verschiebung in diesem Proteinbereich kommen, die möglicherweise zu intramembranen Molekümlagerungen des Apo B-100 während des Internalisierungsprozesses führt. Dadurch könnte eine verzögerte Aufnahme der LDL in die Zellen erklärt werden. Folglich wären Apo B-100 Proteindomänen, die bei der Bindung in Wechselwirkung mit dem LDL-Rezeptor treten und jene, die während der Rezep-

tor-Liganden-Komplex Bildung beim Internalisierungsprozess in die Zelle und der nachfolgenden Freisetzung der komplexierten LDL eine Rolle spielen, nicht komplett identisch. Leider ließ sich eine Untersuchung an weiteren Personen mit der Q3405E Mutation nicht durchführen, da lediglich vier der 297 partizipierenden Personen heterozygote Träger dieser Substitution waren. Mit drei der betroffenen Personen konnte kein Kontakt zwecks einer zweiten Blutabnahme hergestellt werden. Einen gesicherten Hinweis auf die vermutete Assoziation des Glutamin zu Glutamat Austausches mit Internalisations- bzw Degradations-Defiziten der LDL hätte sicherlich eine Überprüfung bei allen Mutationsträgern erbracht. Die oben beschriebene Hypothese ist daher nur mit Vorbehalt aufgestellt.

Im untersuchten DNA Bereich des Exon 29 wurden vier Punktmutationen identifiziert. Auch hier fand sich ein gängiger Polymorphismus (N4311S), der als Apo B Antigen-Epitop (Ag x/y) assoziierter DNA-Polymorphismus in der Literatur bekannt war (Dunning *et al.* 1992). Auch zeigte sich der seltenere Fall einer Einzelmutation (T4457M) bei einem männlichen Patienten, der jedoch für eine weitere Analyse nicht zur Verfügung stand. Im dritten Fall konnte die Segregation eines Arginin zu Threonin Austausches (A4454T) in der Familie der Patientin S.K., deren DNA zu Anfang sequenziert worden war, analysiert werden. Diese wies jedoch nicht auf eine Assoziation mit erhöhtem LDL-Cholesterin hin. Schließlich wurde eine bisher nicht beschriebene Mutation am Aminosäurerest 4287, die den Austausch eines Isoleucins mit einem Valinrest verursacht, gefunden. Die I4287V Mutation war mit einer Heterozygotenfrequenz von 2% bei sechs der untersuchten Typ IIa HLP-Patienten vorhanden. LDL einer 26jährigen heterozygoten Mutationsträgerin und die ihrer Eltern wurden in einem direkten *in vitro* Bindungsassay an humanen Fibroblasten und einem indirekten *in vitro* Wachstumsassay mit der U-937-Zelllinie auf ihre Rezeptorbindungseigenschaften hin untersucht. Beide Assays erzielten übereinstimmende Ergebnisse. Es konnte festgestellt werden, dass die I4287V Mutation, die bei Vater und Tochter vorhanden war, nicht mit einem Bindungsdefekt der LDL assoziiert ist. Gleichwohl gab es Anhaltspunkte für eine erblich bedingte Verminderung der Rezeptorbindung der LDL in dieser Familie, die jedoch mütterlicherseits segregierte. Hier trat im Verlauf der Arbeit zum zweiten Mal eine Familie mit offensichtlich erblichem Bindungsdefekt der LDL zu Tage, dessen Ursache nicht in einer Veränderung der Primärstruktur des rezeptorbindenden Bereiches des Apo B-100 lag. Sowohl die LDL der Patientin S.K., als auch die der jungen Frau mit der I4287V Mutation zeigten Bindungsdefizite, deren möglicher kausaler Zusammenhang mit Konformationsveränderungen des Apo B jedoch nicht geklärt werden konnte.

Nach den hier vorliegenden Ergebnissen muss davon ausgegangen werden, dass genetische Ursachen einer primären Hypercholesterinämie des Typs IIa nach Fredrickson nur sehr selten im Bereich der Rezeptorbindungsdomäne des Apo B-100 liegen. Neben den bisher beschriebenen phänomenologisch relevanten Apo B-100 Mutationen, FDB_{3500Q} und FDB_{3500W}, konnten keine Mutationen im rezeptorbindenden Bereich festgestellt werden, die klinisch als Stoffwechselanomalie bedeutsam wären. Die genetische Stabilität des Apo B-100 weist auf einen sensiblen Faktor dieses Liganden im Lipidstoffwechsel des Menschen hin. Möglicherweise sind mutagene Veränderungen der Apo B DNA in der frühen Reifungsphase menschlicher Embryonen von hoher Auswirkung. Nicht anders lässt sich das offensichtlich hochkonservierte Arrangement der mit dem LDL-Rezeptor interagierenden Aminosäurereste des Apo B-100 erklären.

Nach wie vor ist die FDB_{3500Q} Mutation häufigste Ursache bindungsdefekter LDL. Vor allem im Mitteleuropäischen Raum, insbesondere in der Region um Frankfurt, gibt es eine sehr starke Verbreitung. Merkmalstypisch sind die deutlich erhöhten Plasma-Cholesterinkonzentrationen, die, nach individueller Risikoabwägung, meist eine medikamentöse LDL-Cholesterinsenkung ab dem mittleren Lebensalter bei den Betroffenen erfordern (Amsterdam und Deedwania 1998).

Erstmaliger Nachweis des FDB_{3500W} in Deutschland

Die Routineanalyse des FDB_{3500Q} war seit 1992 in der diagnostischen Beurteilung von Fettstoffwechselstörungen der Frankfurter Uniklinik etabliert. Nach Bekanntwerden von zwei weiteren FDB-Mutationen im Jahr 1995 am Aminosäurekodon R3500 (FDB_{3500W}) und R3531 (FDB_{3531C}) wurden die bis dahin auf FDB_{3500Q} hin untersuchten Patientenproben, die diesen Defekt nicht aufwiesen, ein weiteres Mal in der TGGE analysiert. Dabei wurden zwei heterozygote Merkmalsträger für FDB_{3500W} identifiziert. Dies entspricht einer Häufigkeit von 0,7% innerhalb der Gruppe der Typ IIa HLP-Patienten aller Altersgruppen (n=297). In der Altersgruppe der 40-60jährigen (n=135) ist die Mutationsfrequenz ebenfalls 0,7%. Bei einem Mindestanteil von 25% Typ IIa HLP-Patienten in der Gesamtbevölkerung innerhalb dieser Altersgruppe deutet dies auf eine Erwartungswahrscheinlichkeit von 1:600 FDB_{3500W} heterozygoter Mutationen im Frankfurter Raum hin.

In der Erstbeschreibung der R3500W Mutation (Gaffney *et al.* 1995) wurde in dem damals durchgeführten U-937 Wachstumsassay kein Unterschied in der Rezeptorbindung der LDL

heterozygoter FDB_{3500Q} und FDB_{3500W} Patienten festgestellt. Die LDL der beiden Frankfurter FDB_{3500W} Patienten zeigten jedoch in dem klassischen, direkten Bindungsassay eine deutlich bessere Rezeptorbindung (58% verbleibende Bindungsaktivität) als die einer FDB_{3500Q} heterozygoten Person (44%). Der hier beobachtete Unterschied ist wahrscheinlich auf methodische Differenzen beider Assays zurückzuführen. Das U-937 Wachstumsassay ermöglicht lediglich eine indirekte Messung der Rezeptorbindungsaffinität auf der Basis einer Cholesterinsynthese-defizienten Zelllinie. Die Zellvermehrungsrate der Zellen verhält sich proportional zur angebotenen Menge an LDL. Dagegen ist die an humanen Fibroblasten gemessene ¹²⁵Jod-markierte LDL-Aufnahme eine direkte Methode zur Messung der Bindungsaffinität. Bei kompetitiven Bindungsexperimenten mit ¹²⁵Jod-markierten Kontroll-LDL wird zudem die Wirksamkeit nicht markierter (d.h. unmanipulierter) Proben-LDL als Kompetitor gemessen.

Die Auswirkung des Arginin- zu Tryptophan-Austausches am Aminosäurerest 3500 des Apo B-100 hat offensichtlich einen geringeren Effekt auf funktionelle Bindungseigenschaften der LDL als der Arginin- zu Glutamin-Austausch. Diese Beobachtung lässt sich sehr gut in das Modell von Boren *et al.* (1998), bzw. Innerarity und Boren (1998) einfügen, da eine Interaktion des R3500 mit dem Tryptophanrest 4369 des C-terminalen Proteinbereiches durch den Austausch mit Glutamin stärker beeinträchtigt wird als durch den Austausch eines Tryptophanrests. Beide Tryptophanreste lassen auf Grund ihrer Molekülstruktur die gegenseitige Bindung ihrer aromatischen Seitenketten zu.

FDB_{3500W} konnte auf molekulargenetischer Ebene mit zwei unterschiedlichen Haplotypen assoziiert werden (Ins, *Xba*I+, *Msp*I+, *Eco*RI+, 3'VNTR-37 und Del, *Xba*I+, *Msp*I+, *Eco*RI+, 3'VNTR-37). Beide Haplotypen variieren lediglich im Signalpeptid-Polymorphismus. Das Del-Allel (= 9 Basenpaar Deletion am Signalpeptid des Apo B-100) ist mit einer Populationsfrequenz von 0,33 in Mitteleuropa die seltenere Variante dieses polymorphen Locus. Die R3500W Mutation der Familie des M.B., bei der das Del-Allel als genetischer Marker festgestellt wurde, mag daher phylogenetisch neueren Ursprungs sein.

In der kaukasischen Bevölkerung wurde diese Mutation bisher extrem selten nachgewiesen. Abgesehen von den beiden hier beschriebenen Fällen wurde sie lediglich bei einer Person schottischer Abstammung bekannt (Gaffney *et al.* 1995). Beide Haplotypen der R3500W Mutation in Deutschland unterscheiden sich von dem beschriebenen Haplotyp der R3500W Mutation in Schottland, so dass sich hier im Vergleich zu der R3500Q Mutation keine gemeinsame Abstammung rekonstruieren lässt.

FDB_{3500W} ist jedoch wesentlich häufiger bei Asiaten. Erstmals wurde eine Person mit heterozygotem FDB_{3500W} asiatischer Herkunft in Schottland identifiziert (Gaffney *et al.* 1995), anschließend entdeckten Choong *et al.* (1997) beim Mutations-Screening in einem malaysischen und einem chinesischen Patientenkollektiv mit Typ IIa, bzw. Typ IIb HLP vier heterozygote R3500W Merkmalsträger (4,2%, bzw. 0,8%). Tai *et al.* (1998) fanden bei 373 hyperlipidämischen Patienten 9 Merkmalsträger (2,4%). Die Haplotypenanalyse der „asiatischen“ R3500W Mutation deutete daraufhin, dass hier möglicherweise ein *Founder*-Effekt vorliegt. Bei allen bisher beschriebenen Fällen fand sich ein identisches Haplotypenmuster, das nominiert ist mit *Ins*, *XbaI*-, *MspI*+, *EcoRI*+, VNTR-35. Dieses variiert an zwei polymorphen Genorten (*XbaI* und 3'VNTR-Polymorphismus) von denen in den zwei deutschen Familien nachgewiesenen Haplotypen und kann daher als stammesgeschichtlich nicht mit diesen verwandt betrachtet werden. Die Tatsache, dass die R3500W-Mutation erneut in der europäischen weißen Bevölkerung nachgewiesen werden konnte, war daher eine überraschende Entdeckung.

Geographische Verbreitung der FDB Mutationen

Zu Beginn der 90er Jahre konnte man davon ausgehen, dass die Verbreitung des familiär Defekten Apo B-100 (FDB_{3500Q}) wahrscheinlich in der Größenordnung zwischen 1:700 (Schuster *et al.* 1990) und 1:500 (Innerarity *et al.* 1990) in Mitteleuropa und Nordamerika rangiert. FDB_{3500Q} ist die bis dato häufigste monogene Stoffwechselkrankheit bei Europäern und deren amerikanischen Deszendenten. Zwei weitere Mutationen (FDB_{3500W} und FDB_{3531R}), die Bindungsdefekte LDL zur Folge haben, wurden 1995 erstmalig beschrieben. FDB_{3500Q} blieb jedoch weiterhin prädominante Ursache des familiär Defekten Apo B-100.

In den vergangenen 10 Jahren wurde diese Mutation in verschiedenen Teilen der Welt studiert (Tabelle 6.1, Anhang 1). Als Konsequenz zahlreicher demographischer Untersuchungen können nunmehr genauere Aussagen über die Verbreitung des FDB_{3500Q} innerhalb unterschiedlicher ethnischer Gruppen der Weltbevölkerung gemacht werden.

In den USA (Ludwig *et al.* 1997), Kanada (Innerarity *et al.* 1990), Südafrika (Rubinsztein *et al.* 1995) und in Australien (Hosking *et al.* 1991, Mamotte und van Bockxmeer 1993) fanden sich FDB_{3500Q} Heterozygote lediglich in Familien europäischer Abstammung, nicht aber innerhalb der jeweiligen Urbevölkerung. Israel (Friedlander *et al.* 1993), Japan (Nohara *et al.* 1995) und China (Myant *et al.* 1997, Choong *et al.* 1997, Tai *et al.* 1998) sind Länder, in denen keine Merkmalsträger gefunden werden konnten. Schwartz *et al.* (1991) fanden in einer

Gruppe von 120 Herzinfarkt Patienten und 130 Kontrollen aus der Stadt St. Petersburg ebenfalls kein FDB_{3500Q}.

Die geographische Distribution des FDB_{3500Q} in Europa zeigt deutliche regionale Unterschiede (Abbildung 6.2). Vor allem in Mitteleuropa (Belgien, Deutschland und der Schweiz) ist die Mutation bei Typ IIa HLP-Patienten sehr häufig. Die hier erfassten Patienten hatten einen prozentualen Anteil FDB Heterozygoter von 4,9% (Schweiz) bis 8,1% (Belgien) (Miserez *et al.* 1994, Kotze *et al.* 1994). Dazwischen liegt die in Frankfurt festgestellte Heterozygotenfrequenz von 7,1%. In München waren dagegen nur 11 von 415 Typ IIa HLP-Patienten (2,7%) positiv für FDB_{3500Q} (Rauh *et al.* 1992). Das in Belgien untersuchte Kollektiv war mit 62 Personen wesentlich kleiner als die in Frankfurt untersuchte Gruppe. Zudem wurden belgische Typ IIa HLP-Patienten nach einem LDL-C >1,8 g/l selektiert (in Frankfurt: >1,55 g/l). Dadurch könnte die höhere Frequenz FDB_{3500Q}-Heterozygoter in Belgien erklärt werden.

In England, Skandinavien und Südeuropa (Italien) ist FDB_{3500Q} wesentlich seltener als in Belgien, Deutschland und in der Schweiz. Offensichtlich stellen die Pyrenäen und das Alpengebiet Expansionsgrenzen für den Defekt dar. In Finnland (Hamalainen *et al.* 1990), Island (Gudnason *et al.* 1990) und in Spanien (Myant *et al.* 1997) konnte FDB_{3500Q} nicht nachgewiesen werden. Das auch die Türkei ein Gebiet ohne Mutationsvorkommen darstellt (Mahley *et al.* 1995), ist anthropogenetisch für den Mutationsursprung von Bedeutung.

Aus der in Tabelle 6.1 in Anhang 1 erstellten Auflistung demographischer Untersuchungen des FDB-Defektes geht hervor, dass sich Prävalenzen zumeist nicht auf die Normalbevölkerung beziehen. Insofern sie aus ähnlichem Probenmaterial eruiert wurden - in den meisten Fällen beziehen sie sich auf Patienten mit Hypercholesterinämie, Typ IIa HLP oder klinisch definierter FH - wurden sie in Abbildung 6.2 als Anhaltspunkt für Prävalenzen innerhalb der europäischen Bevölkerung aufgenommen.

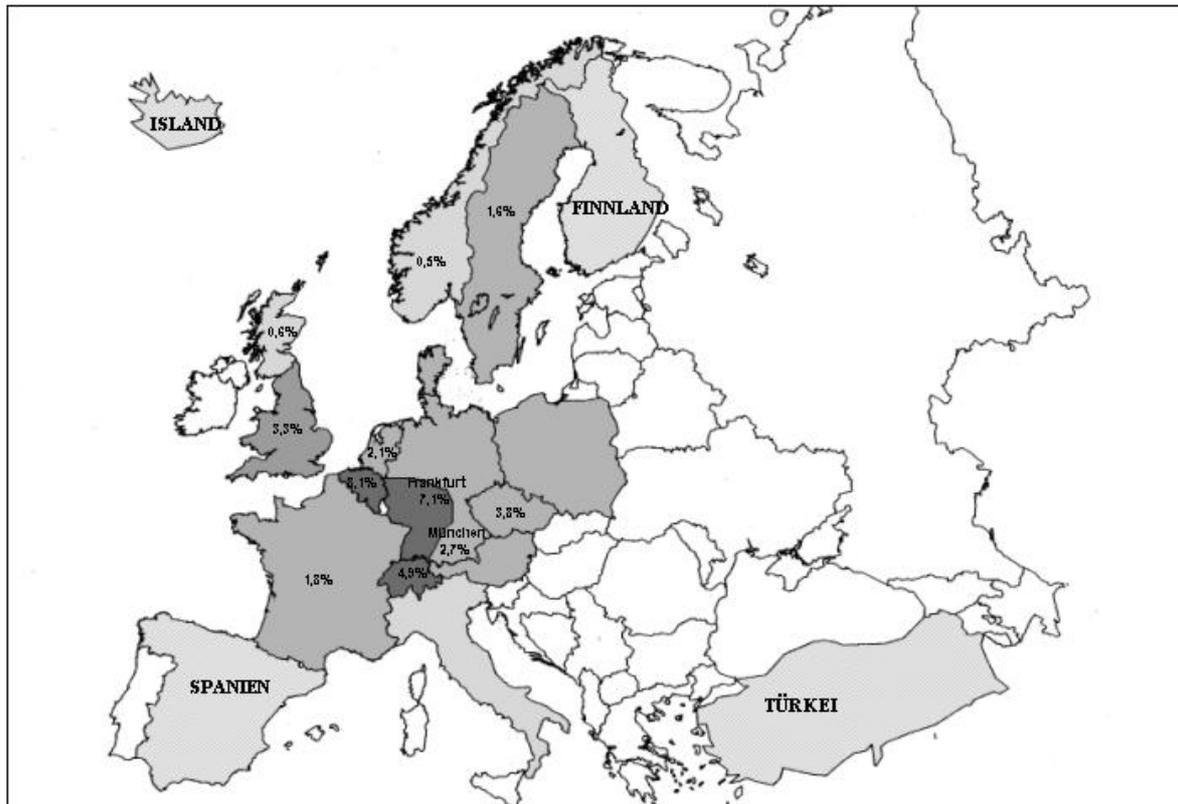


Abb. 6.2 Geographische Verbreitung des FDB_{3500Q} in Europa. In den dunkel markierten Ländern wurde FDB_{3500Q} nachgewiesen. Die Intensität der Färbung richtet sich nach der Höhe der vorgefundenen Prävalenzen. Prozentuale Angaben beziehen sich auf das Vorkommen der Mutation in Typ IIa HLP-, bzw. klinisch diagnostizierten FH-Patienten. Länder, in denen die R3500Q Mutation nicht gefunden werden konnte sind schraffiert und mit Namen gekennzeichnet. Ungefüllte Länder: hier sind keine Angaben zur Mutationshäufigkeit vorhanden.

Das Ergebnis dieser Arbeit ist insofern interessant, als dass es eine in Deutschland bislang unerwartet hohe Heterozygotenfrequenz der R3500Q Mutation nachwies. Innerhalb der 297 Typ IIa HLP-Patienten aus dem Rhein-Main Gebiet wurden 21 heterozygote Träger der FDB_{3500Q} Mutation identifiziert. Dies entspricht einer Heterozygotenfrequenz von 7,1%. In der Altersgruppe der 40 bis 65jährigen Personen waren 5,5% heterozygot für FDB_{3500Q}. Überträgt man dies auf einen Anteil von ca. 25% Typ IIa HLP-Patienten in dieser Altersgruppe in der Gesamtbevölkerung, so ist die Prävalenz des FDB_{3500Q} in der Rhein-Main Region mit etwa 1,4% (1:72) um mehr als das Doppelte höher als in der Schweizer Bevölkerung (1:209).

Da sich die Häufigkeit der Fälle auf Mitteleuropa konzentriert, kann man von einem „*Founder*“-Effekt der Mutation irgendwo im Mitteleuropäischen Raum ausgehen. Die Theorie einer gemeinsamen Abstammung des FDB_{3500Q} ist formal dadurch gesichert, dass diese bisher beinahe ausnahmslos mit einer bestimmten Allelform des Apo B-100 assoziiert vorgefunden wurde. Der nach Ludwig und McCarthy (1990) bezeichnete seltene Haplotyp 194 der FDB_{3500Q} Mutation setzt sich aus bis zu acht variablen Genorten des Apo B-100 zusammen. Für die hier erstellte Haplotypisierung der FDB - und anderer Apo B-100 - Mutationen wurden fünf dieser polymorphen Stellen ausgewählt und bestimmt. Bei alle 40 FDB_{3500Q} Patienten stimmten diese mit dem Haplotyp 194 überein. Innerhalb der weltweit bisher erfassten mehr als 200 Merkmalsträger dieser Mutation wurden lediglich drei Ausnahmen der Haplotypenhomologie des Apo B-100 beschrieben. Die bei einem Nordamerikaner asiatischer Herkunft, dem einzigen Nicht-Kaukasier mit FDB_{3500Q}, und zwei weiteren Personen europäischer Abstammung beschriebenen Abweichungen vom Haplotyp 194 des FDB (Bersot *et al.* 1993, Rauh *et al.* 1993, Rabes *et al.* 1997) könnten durch Rekombinationsereignisse aus diesem hervorgegangen sein.

Auf Grund der ethnischen Distribution der Mutation ist die Datierung der *Founder*-Mutation möglicherweise zu präzisieren: In Asien und Afrika (negride Bevölkerung) ist FDB_{3500Q} unbekannt. Demnach ist der Zeitpunkt der *Founder*-Mutation nach der ethnischen bzw. geographischen Differenzierung des Homo sapiens sapiens anzunehmen. Vorläufer des rezenten Menschen erreichten vor ca 40.000 Jahren auf ihrer „Route“ vom afrikanischen Kontinent über den arabischen Raum Europa („Out of Africa“ Theorie) und verdrängten hier den Homo neanderthalensis vor 35.000 Jahren. Zeugnisse des anatomisch modernen Menschen konnten auf allen Kontinenten der Erde datiert auf ein Alter von 32.000 bis 30.000 Jahren gefunden werden. Zu einer Rassendifferenzierung kam es erst 10.000 bis 12.000 Jahre später als Konsequenz aus der Anpassung an unterschiedliche Lebensräume. Gleichwohl Asiaten, Kaukasier, Afrikaner (Negride), Khoisanide und die Ureinwohner Amerikas (Indianide) und Australiens (Australoide) sich erst vor 20-18tausend Jahren in ihrer Physiognomie zu unterscheiden begannen, haben sie zuvor etwa über den gleichen Zeitraum hinweg geographisch voneinander separiert existiert. Daher könnte die FDB_{3500Q} Mutation schon vor 30.000-40.000 Jahren bei einem Vertreter des Homo sapiens sapiens in Mitteleuropa aufgetreten sein. Demnach müsste sie jedoch innerhalb aller europäischen Bevölkerungsgruppen nachzuweisen sein. Da jedoch in einigen europäischen Staaten keine Merkmalsträger gefunden werden konnten (Abbildung 6.2), ist sie mit hoher Wahrscheinlichkeit jüngeren Datums.

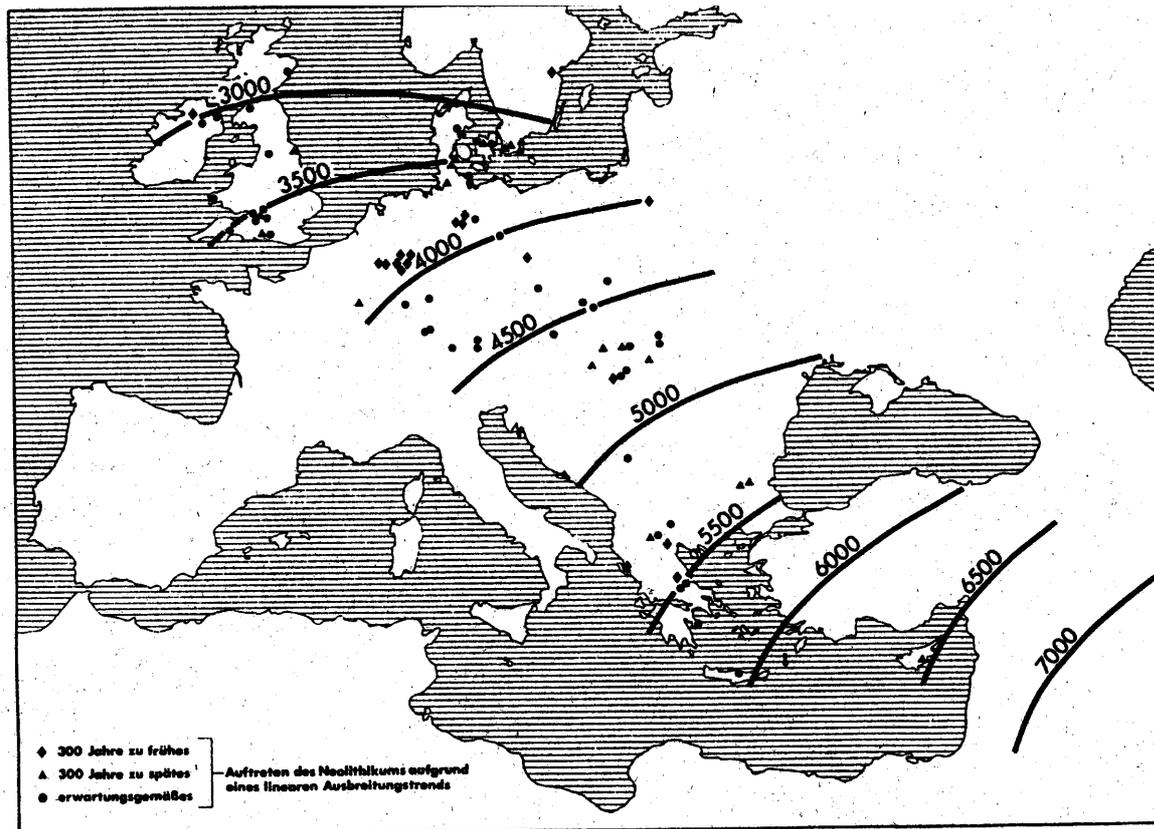


Abb 6.3 Die Ausbreitung des Neolithikums vom Vorderen Orient bis Nordeuropa. Zeitangaben nach C^{14} -Jahren. (Abbildung aus: P.Breunig „ ^{14}C -Chronologie des vorderasiatischen, südost- und mitteleuropäischen Neolithikums“ 1987 Fundamenta A, 13; 86). Ob sich die Agrikultur durch Völkerbewegungen, oder lediglich durch die über Siedlungsgrenzen hin stattfindende Weitergabe von Kulturgütern in Europa ausbreitete, ist unter Historikern/Ethnologen heute noch umstritten.

Archäologische Zeugnisse weisen auf eine große und sich langsam über einen Zeitraum von ca. 4000 Jahren fortsetzende Ausbreitung des neolithischen Bauerntums (10.000-6000 a.D.) aus dem mittleren Orient nach Europa hin (Abbildung 6.3). Aufgrund des damals einsetzenden massiven Bevölkerungswachstums ist eine Auswanderung einzelner Gruppen aus Südosteuropa nach Norden hin anzunehmen (Cavalli-Sforza *et al.* 1994). Wäre die FDB-Mutation vor 6000 Jahren schon in dieser Population präsent gewesen, müssten sich wenigstens Spuren davon in der heutigen türkischen Bevölkerung, insbesondere den Einwohnern Anatoliens, finden lassen, da der asiatische Teil der Türkei auf der Wanderungsrouten dieser Völker lag. In der Türkei gibt es den FDB_{3500Q} Defekt jedoch nicht (Mahley *et al.* 1995). Daher kann angenommen werden, dass diese Mutation 1. europäischen Ursprungs ist und 2. sie wahrscheinlich nicht älter als 6000 Jahre ist. In Finnland, dessen Bevölkerung eine genetisch und ethnologisch einzigartige Gruppe Europas darstellt, existiert FDB_{3500Q} nicht (Hämäläinen *et al.* 1990). Finnen haben ihren genetischen Ursprung zum einen in einer aus Zentralasien

Finnen haben ihren genetischen Ursprung zum einen in einer aus Zentralasien (Mongolei) vor ca. 4000 nach Westen emigrierten Volksgruppe und einer ca. 2000 Jahre später folgenden zweiten Einwanderungsgruppe aus Skandinavien, wahrscheinlich aus Südschweden (Kittles *et al.* 1998). Vor etwa 300 Jahren lebten in Finnland vermutlich lediglich 250.000 Menschen. Diese Population war zuvor über 2000 Jahre isoliert und hat daher bis heute einen relativ homogenen Genpool. Folglich war in dem vor ca. 2000 Jahren eingewanderten Skandinavischen Gruppe die FDB_{3500Q} Mutation noch nicht vorhanden.

Auf der kleinen Insel Island, die vor etwa 1000 Jahren von einer norwegischen Population (10.000-20.000 Menschen) besiedelt wurde (Cavalli-Sforza *et al.* 1994, Kapitel 5), ist FDB_{3500Q} ebenfalls nicht vorhanden (Gudnason *et al.* 1990). In Norwegen selbst wurde die Mutation jedoch nachgewiesen (Leren *et al.* 1995). Daher muss angenommen werden, dass zum Zeitpunkt der Emigration der Norweger im 9. Jahrhundert n.Chr. FDB_{3500Q} Norwegen noch nicht erreicht hatte. Nach Nordamerika, Australien und Südafrika mag der Defekt im Verlauf der letzten 200 bis 300 Jahre durch Imigranten aus Europa "importiert" worden sein. Leider fehlen bisher noch Erkenntnisse über die Präsenz dieser Mutation in Osteuropa, Nord- und Zentralafrika und Südamerika, sowie dem Mittleren Osten und weiten Teilen Asiens. Myant *et al.* (1997) hat den genetischen Drift der FDB_{3500Q} Mutation und deren *Founder* Zeitpunkt an Hand der Rekombinationsrate zwischen dem Apo B 3500 Locus und drei ≤ 240 kb entfernten Mikrosatelliten im Chromosom 2 des Menschen berechnet. Tatsächlich kommt er dabei auf eine Datierung des Mutationsursprungs, die 267 Generationen (bei einem durchschnittlichen Generationszyklus von 25 Jahren entspricht dies 6675 Jahren) zurückliegen muss. Folgerichtig gleichen sich geographisch/historische und genetische Rückdatierung der Ursprungsmutation nahezu an. Eine Korrektur der Hypothese ist jedoch nicht auszuschließen: Rekombinations- und *Linkage*-Analysen sind immer Wahrscheinlichkeitsberechnungen und vielleicht wird die Theorie des gemeinsamen Ursprungs vor 6000-7000 Jahren in Mitteleuropa eines Tages durch das Auffinden der FDB_{3500Q} Mutation in anderen Ländern der Welt revidiert.

Literaturverzeichnis

1. Aalto-Setälä K, Viikari J, Akerblom HK, Kuusela V, Kontula K. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B and A-I/C-III genes are associated with variations of serum low density lipoprotein cholesterol level in childhood. *J. Lip. Res.* **1991**; 32: 1477-1487.
2. Ailenberg M und Silverman M. Separation of DNA strands facilitates detection of point mutations by PCR-SSCP. *BioTechniques* **1997**; 22: 604-606.
3. Amsterdam EA und Deedwania PC. A perspective on hyperlipidemia: concepts of management in the prevention of coronary artery disease. *Am J Med* **1998**; 105(1A): 69S-74S.
4. Arnold KS, Balestra ME, Krauss RM, Curtiss LK, Young SG, Innerarity TL. Isolation of allele-specific, receptor-binding-defective low density lipoproteins from familial defective apolipoprotein B-100 subjects. *J Lipid Res* **1994**; 35: 1469-1476.
5. Assmann G, Cullen P, Schulte H. The Münster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. *Eur Heart J* **1998**; 19Suppl.A: A2-11.
6. Avoustin P, Mostachi H, Perret B, Cambou JP, Cambien F, de Preval C. A very conservative region of ApoB-100 in the putative binding region to the LDL receptor in the Toulouse population. *Hum Genet* **1992**; 90: 460-463.
7. Benlian P, de Gennes JL, Dairou F, Hermelin B, Ginon I, Villain E, Lagarde JP, Federspiel MC, Bertrand V, Bernard C, Bereziat G. Phenotypic expression in double heterozygotes for familial hypercholesterolemia and familial defective apolipoprotein B-100. *Hum. Mut.* **1996**; 7: 340-345.
8. Berg K. DNA polymorphism at the apolipoprotein B locus is associated with lipoprotein level. *Clin. Genet.* **1986**; 30: 515-520.
9. Bersot TP, Russell SJ, Thatcher SR, Pomernacki NK, Mahley RW, Weisgraber KH, Innerarity TL, Fox CS. A unique haplotype of the apolipoprotein B-100 allele associated with familial defective apolipoprotein B-100 in a Chinese man discovered during a study of the prevalence of this disorder. *J Lipid Res* **1993**; 34: 1149-1154.
10. Bilheimer JT, Chamoun D, Esfahani M. Defective 3-ketosteroid reductase activity in a human monocyte-like cell line, *J Lipid Res* **1987**; 28: 704-709.
11. Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **1987**; 8: 93-99.
12. Bocan TM. Animal models of atherosclerosis and interpretation of drug intervention studies [Review]. *Curr Pharm Des* **1998**; 4(1): 37-52.
13. Boerwinkle E und Chan L. A three codon insertion/deletion polymorphism in the signal peptide region of the human apolipoprotein B (APOB) gene directly typed by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **1989**; 17(10): 4003.
14. Boerwinkle E, Xiong W, Fourest E, Chan L. Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: Application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. *Proc Natl Acad Sci USA* **1989**; 86: 212-216.

15. Boerwinkle E, Lee SS, Butler R, Schumaker VN, Chan L. Rapid typing of apolipoprotein B DNA polymorphisms by DNA amplification. Association between Ag epitopes of human apolipoprotein B-100, a signal peptide insertion/deletion polymorphism, and a 3' flanking DNA variable number of tandem repeats polymorphism of the apolipoprotein B gene. *Atherosclerosis* **1990**; 81: 225-232.
16. Bohn M, Bakken A, Erikssen J, Berg K. Xba I polymorphism in DNA at the apolipoprotein B locus is associated with myocardial infarction (MI). *Clin. Genet.* **1993**; 44: 241-248.
17. Bohn M und Berg K. The Xba I polymorphism at the apolipoprotein B locus and risk of atherosclerotic disease. *Clin. Genet.* **1994**; 46: 77-79.
18. Boren J, Lee I, Callow MJ, Rubin EM, Innerarity TL. A simple and efficient method for making site-directed mutants, deletions, and fusions of large DNA such as P1 and BAC clones. *Genome Res* **1996**; 6: 1123-1130.
19. Boren J, Lee I, Zhu W, Arnold K, Taylor S, Innerarity TL. Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *J Clin Invest* **1998**; 101(5): 1084-1093.
20. Brousseau T, Arveiler D, Cambou J-P, Evans AE, Luc G, Fruchart J-C, Cambien F, Amouyel P. Familial defective apolipoprotein B-100 and myocardial infarction: The ECTIM study. *Atherosclerosis* **1995**; 116: 269-271.
21. Brown MS, Faust JR, Goldstein JL, Kaneko I, Endo A. Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase. *J Biol Chem* **1978**; 253(4): 1121-1128.
22. Brown MS und Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **1986**; 232: 34-47.
23. Bush TL und Barrett-Connor E. Non-contraceptive estrogen use and cardiovascular disease. *Epidemiol Rev* **1985**; 7: 80.
24. Callow MJ, Stoltzfus LJ, Lawn RM, Rubin EM. Expression of human apolipoprotein B and assembly of lipoprotein[a] in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**; 91: 2130-2134.
25. Carmena R, Crepaldi G, De Backer G, de Gennes JL, Eisenberg S, Galton D, Gotto AM, Goodwin JF, Greten H, Hanefeld M, Huttunen JK, Jacotot B, Katan MB, Mann JL, Miettinen TA, Norum KR, Oganov RG, Olsson AG, Paoletti R, Pometta D, Pyorala K, Schettler G, Shepherd J, Schwandt P, Tikkanen MJ. The recognition and management of hyperlipidaemia in adults: policy statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* **1988**; 9: 571-600.
26. Castelli WP. Epidemiology of coronary heart disease in the Framingham study. *Am J Med* **1984**; 76: 4-13.
27. Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. *The History and Geography of Human Genes.* 1994 Princeton University Press, Princeton, New Jersey USA.
28. Chan L und Seeburg PH. RNA editing. *Sci Am Sci Med* **1995**; 2: 68-77.
29. Chan L, Chang BH-J, Nakamuta M, Li W-H, Smith LC. Apobec-1 and apolipoprotein B mRNA editing. *Biochim Biophys Acta* **1997**; 1345: 11-26.

30. Chatterton JE, Phillips ML, Cutiss LK, Milne R, Fruchart J-C, Schumaker VN. Immunoelectron microscopy of low density lipoproteins yields a ribbon and bow model for the conformation of apolipoprotein B on the lipoprotein surface. *J Lipid Res* **1995**; 36: 2027-2037.
31. Chen S-H, Yang C-Y, Chen P-F, Setzer D, Tanimura M, Li W-H, Gotto AM, Chan L. The complete cDNA and amino acid sequence of human apolipoprotein B-100. *J Biol Chem* **1986**; 261(28): 12918-12921.
32. Chen S-H, Habib G, Yang C-Y, Gu Z-W, Lee BR, Weng S-A, Silberman SR, Cai S-J, Deslypere JP, Rosseneu M, Gotto AM Jr, Li W-H, Chan L. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific inframe stop codon. *Science* **1987**; 238: 363-366.
33. Chiesa G, Johnson DF, Yao Z, Innerarity TL, Mahley RW, Young SG, Hammer RH, Hobbs HH. Expression of human apolipoprotein B100 in transgenic mice. Editing of human apolipoprotein B100 mRNA. *J Biol Chem* **1993**; 268: 23747-23750.
34. Choong M-L, Koay ESC, Khoo K-L, Khaw M-C, Sethi SK. Denaturing gradient-gel electrophoresis Screening of familial defective apolipoprotein B-100 in a mixed Asian cohort: two cases of arginine₃₅₀₀→tryptophan mutation associated with a unique haplotype. *Clin Chem* **1997**; 43: 916-923.
35. Cladaras C, Hadzopoulou-Cladaras M, Nolte RT, Atkinson D, Zannis VI. The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms. *EMBO J* **1986**; 5(13): 3495-3507.
36. Corsini A, Fantappie S, Granata A, Bernini F, Catapano AL, Fumagalli R, Romano L, Romano C. Binding-defective low-density lipoproteins in a family with hypercholesterolaemia. *Lancet* **1989**; I: 623.
37. Cremer P, Nagel D, Mann H, Labrot B, Muller-Berninger R, Elster H, Seidel D. Ten-year follow-up results from the Goettingen Risk, Incidence and Prevalence Study (GRIPS). I. Risk factors for myocardial infarction in a cohort of 5790 men. *Atherosclerosis* **1997**; 129(2): 221-230.
38. Defesche JC, Pricker CL, Hayden MR, van der Ende BE, Kastelein JJP. Familial defective apolipoprotein B-100 is clinically indistinguishable from familial hypercholesterolemia. *Arch Intern Med* **1993**; 153: 2349-2356.
39. Dunning AM, Houlsten R, Frostegard J, Revill J, Nilsson J, Hamsten A, Talmud P, Humphries S. Genetic evidence that the putative receptor binding domain of apolipoprotein B (residues 3130 to 3630) is not the only region of the protein involved in the interaction with the low density lipoprotein receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* **1991**; 1096: 231-237.
40. Dunning AM, Renges H-H, Xu C-F, Peacock R, Brasseur R, Laxer G, Tikkanen MJ, Bütler R, Saha N, Hamsten A, Rosseneu M, Talmud P, Humphries SE. Two amino acid substitutions in apolipoprotein B are in complete allelic association with the antigen group (x/y) polymorphism: Evidence for little recombination in the 3' end of the human gene. *Am J Hum Genet* **1992**; 50: 208-221.
41. Eggertsen G, Eriksson M, Wiklund O, Iitiä A, Olofsson S-O, Angelin B, Berglund L. Time-resolved fluorometry in the genetic diagnosis of familial defective apolipoprotein B-100. *J Lipid Res* **1994**; 35: 1505-1508.

42. Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. Fat transport in lipoproteins - an integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med* **1967**; 276: 34-44, 94-103, 148-156, 215-225, 273-281.
43. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of Low-Density Lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* **1972**; 18: 499-502.
44. Friedl W, Ludwig EH, Balestra ME, Arnold KS, Paulweber B, Sandhofer F, McCarthy BJ, Innerarity TL. Apolipoprotein B gene mutations in Austrian subjects with heart disease and their kindred. *Arteriosclerosis* **1991**; 11: 371-378.
45. Friedlander Y, Dann EJ, Leitersdorf E. Absence of familial defective apolipoprotein B-100 in Israeli patients with dominantly inherited hypercholesterolemia and in an offspring with parental history of myocardial infarction. *Hum Genet* **1993**; 91: 299-300.
46. Funke H, Rust S, Seedorf J, Brennhäuser B, Chirazi A, Motti C, Assmann G. Homozygosity for familial defective apolipoprotein B-100 (FDB) is associated with lower plasma cholesterol concentrations than homozygosity for familial hypercholesterolemia (FH). *Circulation* **1992**; 86:Suppl.I: I-691.
47. Gaffney D, Reid JM, Cameron LM, Vass K, Caslake MJ, Shepherd J, Packard CJ. Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb* **1995**; 15: 1025.
48. Gaffney D, Hoffs MS, Cameron IM, Stewart G, O'Reilly DSJ, Packard CJ. Influence of polymorphism Q3405E and mutation A3371V in the apolipoprotein B gene on LDL receptor binding. *Atherosclerosis* **1998**; 137: 167-174.
49. Gallagher JJ und Myant NB. The affinity of low-density lipoproteins and of very-low-density lipoprotein remnants for the low-density lipoprotein receptor in homozygous familial defective apolipoprotein B-100. *Atherosclerosis* **1995**; 115: 263-272.
50. Gavish D, Brinton EA, Breslow JL. Heritable allele-specific differences in amounts of apoB and low-density lipoproteins in plasma. *Science* **1989**; 244: 72-76.
51. Geisel J, Schleifenbaum T, Weibhaar B, Oette K. Rapid diagnosis of familial defective apolipoprotein B-100. *Eur J Clin Chem* **1991**; 29: 395-399.
52. Goldstein JL und Brown MS. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* **1974**; 249: 5153-5162.
53. Goldstein JL, Basu SK, Brown MS. Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol* **1983**; 98: 241-260.
54. Goldstein JL und Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway [Review]. *Nature* **1990**; 343: 425-430.
55. Gorski B, Kubalska J, Naruszewicz M, Lubinski J. LDL-R and Apo-B-100 gene mutations in Polish familial hypercholesterolemias. *Hum Genet* **1998**; 102: 562-565.
56. Gotoh O und Tagashira Y. Locations of frequently opening regions on natural DNAs and their relation to functional loci. *Biopolymers* **1981**; 20: 1043-1058.

57. Gudnason V, Sigurdsson G, Humphries SE. Use of the polymerase chain reaction to search for a mutation in the apolipoprotein B gene in the Icelandic population. *Icelandic Med J* **1990**; 76: 431-436.
58. Hämäläinen T, Palotie A, Aalto-Setälä K, Kontula K, Tikkanen MJ. Absence of familial defective apolipoprotein B-100 in Finnish patients with elevated serum cholesterol. *Atherosclerosis* **1990**; 82: 177-183.
59. Hansen PS, Rüdiger N, Tybjaerg-Hansen A, Faergeman O, Gregersen N. Detection of the apoB-3500 mutation (glutamine for arginine) by gene amplification and cleavage with MspI. *J Lipid Res* **1991**; 32: 1229-1233.
60. Hansen PS, Gerdes LU, Klausen IC, Gregersen N, Faergeman O. Polymorphisms in the apolipoprotein B-100 gene contributes to a normal variation in plasma lipids in 464 Danish men born in 1948. *Human Genetics* **1993**; 91(1): 45-50.
61. Hansen PS, Meinertz H, Jensen HK, Fruergaard P, Launbjerg J, Klausen IC, Lemming L, Gerdes U, Gregersen N, Faergeman O. Characteristics of 46 heterozygous carriers and 57 unaffected relatives in 5 Danish families with familial defective apolipoprotein B-100. *Arterioscler Thromb* **1994**; 14: 207-213.
62. Hasstedt SJ, Wu L, Williams RR. Major locus inheritance of apolipoprotein B in Utah pedigrees. *Genet Epidemiol* **1987**; 4: 67-76.
63. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* **1955**; 34: 1345-1353.
64. Hayashi K und Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* **1993**; 2: 338-346.
65. Hegele RA, Huang L-S, Herbert PN, Blum CB, Buring JE, Hennekens CH, Breslow JL. Apolipoprotein B-gene DNA polymorphisms associated with myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **1986**; 315: 1509-1515.
66. Henderson BG, Wenham PR, Ashby JP, Blundell G. Detecting familial defective apolipoprotein B-100: three molecular scanning methods compared. *Clin Chem* **1997**; 43: 1630-1634.
67. Hennessy LK und Pullinger CR. Nonradioactive PCR-SSCP assay to detect apoB arg₃₅₀₀ to gln mutation using a minigel format. *BioTechniques* **1997**; 22: 446-447.
68. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **1989**; 77: 51-59.
69. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* **1992**; 1: 445-466.
70. Horinek A, Slezka V, Sobra J, Ceska R. DNA analysis in heterozygotes in familial hypercholesterolemia. *Cas Lek Cesk* **1995**; 134: 234-239.
71. Horinek A, Ceska R, Sobra J, Vrablik M. Familial defective apolipoprotein B-100 homozygote with premature coronary atherosclerosis. A case report. *J Intern Med* **1999**; 246: 235-236.
72. Hosking JL, Bais R, Roach PD, Thomas DW. Hypercholesterolemia due to familial defective apolipoprotein B-100 in two Australian families. *Med J Aust* **1991**; 155: 572-573.

73. Huang LH, Graaf J, Breslow JL. Apo B gene *MspI* RFLP in exon 26 changes amino acid 3611 from Arg to Glu. *J Lipid Res* **1988**; 239: 63-67.
74. Ilmonen M, Heliö T, Ebeling T, Pyörälä K, Uusitupa M, Palotie A, Tikkanen MJ. Screening for mutations in the exon 26 of the apolipoprotein B gene in hypercholesterolemic Finnish families by the single-strand conformation polymorphism method. *Hum Mut* **1994**; 4: 217-223.
75. Ilmonen M, Ebeling T, Viikari J, Ojala J-P, Tikkanen MJ. Screening of the 3' two-thirds of the coding area of the apo B gene in Finnish hypercholesterolemic patients. Report of six new genetic variants. *Atherosclerosis* **1997**; 128: 191-199.
76. Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Mahley RW, Krauss RM, Vega GL, Grundy SM. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA* **1987**; 84: 6919-6923.
77. Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, Bersot TP, Krauss RM, Vega GL, Grundy SM, Friedl W, Davignon J, McCarthy BJ. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia [Review]. *J Lipid Res* **1990**; 31: 1337-1349.
78. Innerarity TL und Borén J. The receptor- and proteoglycan-binding sites of LDL: engineering a nonatherogenic LDL. 13th International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism. Florence, May 30 - June 3, **1998**, Abstract Book, 7.
79. Jim Yeung S-C und Chan L. Hepatic apolipoprotein B biogenesis: an update. *TCM* **1998**; 8(1): 8-14, Elsevier Science Inc., 1050-1738/98/.
80. Kim E, Cham CM, Veniant MM, Ambroziak P, Young SG. Dual mechanisms for the low plasma levels of truncated apolipoprotein B proteins in familial hypobetalipoproteinemia. *J Clin Invest* **1998**; 101(6): 1468-1477.
81. Kittles RA, Perola M, Peltonen L, Bergen AW, Aragon RA, Virkkunen M, Linnoila M, Goldman D, Long JC. Dual origins of Finns revealed by Y chromosome haplotype variation. *Am J Hum Genet* **1998**; 62: 1171-1179.
82. Knott TJ, Pease RJ, Powell LM, Wallis SC, Rall SC, Innerarity TL, Blackhart B, Taylor WH, Marcel Y, Milne R, Johnson D, Fuller M, Lusic AJ, McCarthy BJ, Mahley RW, Levy-Wilson B, Scott J. Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature* **1986**; 323: 734-738.
83. Koch M, Pfohl M, Enderle M, Schnauder G, Seif FJ. Detection of the apolipoprotein B-100_{arg(3500)→glu} mutation in familial defective apoB-100 by temperature-gradient gel electrophoresis. *Z Gastroenterol* **1996**; 34 (Suppl 3): 16-18.
84. Kotze MJ, Langenhoven E, Peeters AV, Theart L, Oosthuizen CJJ. Detection of two point mutations causing familial defective apolipoprotein B-100 by heteroduplex analysis. *Mol Cell Prob* **1994**; 8: 513-518.
85. Kotze MJ, Peeters AV, Langenhoven E, Wauters JG, van Gaal LF. Phenotypic expression and frequency of familial defective apolipoprotein B-100 in Belgian hypercholesterolemics. *Atherosclerosis* **1994**; 111: 217-225.
86. Krul ES, Parhofer KG, Barrett PH, Wagner RD, Schonfeld G. ApoB-75, a truncation of apolipoprotein B associated with familial hypobetalipoproteinemia: genetic and kinetic studies. *J Lipid Res* **1992**; 33(7): 1037-1050.

87. Lamarche B, Despres JP, Moorjani M, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ. Prevalence of dyslipidemic phenotypes in ischemic heart disease (prospective results from the Quebec Cardiovascular Study). *Am J Cardiol* **1995**; 75: 1189-1195.
88. Law SW, Grant SM, Higuchi K, Hospattankar A, Lackner K, Lee N, Brewer HB Jr. Human liver apolipoprotein B100 cDNA: Complete nucleic acid and derived amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* **1986**; 83: 8142-8146.
89. Law A, Wallis SC, Powell LM, Pease RJ, Brunt H, Priestley LM, Knott TJ, Scott J, Altmann DG, Miller GJ, Rajput J, Miller NE. Common DNA polymorphism within coding sequence of apolipoprotein B gene associated with altered lipid levels. *Lancet* **1986**; I: 1301-1303.
90. Law A und Scott J. A cross-species comparison of the apolipoprotein B domain that binds to the LDL receptor. *J Lipid Res* **1990**; 31: 1109-1120.
91. Leren TP, Rodningen OK, Tonstad S, Rosby O, Urdal P, Ose L. Identification of the apo B-3500 mutation in the Norwegian population. *Scandinavian J Clin & Lab Invest* **1995**; 55(3): 217-221.
92. Lim HM und Pene JJ. Optimal conditions for supercoil DNA sequencing with the *Escherichia coli* DNA polymerase I large fragment. *Gene Anal Techniques* **1988**; 5(2): 32-39.
93. Linton MF, Farese RV Jr, Chiesa G, Grass DS, Chin P, Hammer RE, Hobbs HH, Young SG. Transgenic mice expressing high plasma concentrations of human apolipoprotein B100 and lipoprotein[a]. *J Clin Invest* **1993**; 92: 3029-3037.
94. Ludwig EH, Blackhart BD, Pierotti VR, Caiati L, Fortier C, Knott T, Scott J, Mahley RW, Levy-Wilson B, McCarthy BJ. DNA sequence of the human apolipoprotein B gene. *DNA* **1987**; 6: 363-372.
95. Ludwig EH und McCarthy BJ. Haplotype analysis of the human apolipoprotein B mutation associated with familial defective apolipoprotein B100. *Am J Hum Genet* **1990**; 47: 712-720.
96. Ludwig EH, Hopkins PN, Allen A, Wu LL, Williams RR, Anderson JL, Ward RH, Lalouel J-M, Innerarity TL. Association of genetic variations in apolipoprotein B with hypercholesterolemia, coronary artery disease, and receptor binding of low density lipoproteins. *J Lipid Res* **1997**; 38: 1361-1373.
97. Maher VMG, Gallagher JJ, Myant NB. The binding of very-low-density lipoprotein remnants to the low-density lipoprotein receptor in familial defective apolipoprotein B-100. *Atherosclerosis* **1993**; 102: 51-61.
98. Mahley RW, Palaoglu KE, Atak Z, Dawson-Pepin J, Langlois A-M, Cheung V, Onat H, Fulks P, Mahley LL, Vakar F, Özbayrkcı S, Gökdemir O, Winkler W. Turkish heart study: Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. *J Lipid Res* **1995**; 36: 839-859.
99. Mamotte CDS und van Bockxmeer FM. A robust strategy for screening and confirmation of familial defective apolipoprotein B-100. *Clin Chem* **1993**; 39: 118-121.
100. März W und Groß W. Analysis of plasma lipoproteins by ultracentrifugation in a new fixed angle rotor: evaluation of a phosphotungstic acid/MgCl₂ precipitation and a quantitative lipoprotein electrophoresis assay. *Clin Chim Acta* **1986**; 160: 1-18.

101. März W, Ruzicka V, Pohl T, Usadel KH, Groß W. Familial defective apo B-100: Mild hypercholesterolemia without evidence of atherosclerosis in a homozygous patient. *Lancet* **1992**; 340: 1362.
102. März W, Baumstark MW, Scharnagel H, Ruzicka V, Buxbaum S, Herwig J, Pohl T, Russ A, Schaaf L, Berg A, Böhles H-J, Usadel KH, Groß W. Accumulation of „small dense“ low density lipoproteins (LDL) in a homozygous patient with familial defective apolipoprotein B-100 results from heterogeneous interaction of LDL-subfractions with the LDL-receptor. *J Clin Invest* **1993**; 92: 2922-2933.
103. März W, Ruzicka V, Fisher E, Russ AP, Schneider W, Groß W. Typing of the 3' hyper-variable region of the apolipoprotein B gene: Approaches, pitfalls, and applications. *Electrophoresis* **1993**; 14: 169-173.
104. McCormick SPA, Linton MF, Hobbs HH, Taylor S, Curtiss LK, Young SG. Expression of human apolipoprotein B90 in transgenic mice. Demonstration that apolipoprotein B90 lacks the structural requirements to form lipoprotein(a). *J Biol Chem* **1994**; 269: 24284-24289.
105. McCormick SPA, Linton MF, Young SG. Expression of P1 DNA in mammalian cells and transgenic mice. *Genet Anal Tech Appl* **1994**; 11: 158-164.
106. McCormick SPA, Ng JK, Taylor S, Flynn LM, Hammer RE, Young SG. Mutagenesis of the human apolipoprotein B gene in a yeast artificial chromosome reveals the site of attachment for apolipoprotein(a). *Proc Natl Acad Sci USA* **1995**; 92: 10147-10151.
107. McCormick SPA, Peterson KR, Hammer RE, Clegg CH, Young SG. Generation of transgenic mice from yeast artificial chromosome DNA that has been modified by gene targeting . *Trends Cardiovasc Med* **1996**; 6: 16-24.
108. McCormick SPA, Ng JK, Cham CM, Taylor S, Marcovina SM, Segrest JP, Hammer RE, Young SG. Transgenic mice expressing human apoB95 and apoB97. Evidence that sequences within the carboxylterminal portion of human apoB100 are important for the assembly of lipoprotein(a). *J Biol Chem* **1997**; 272: 23616-23622.
109. Meng Q-H, Pajukanta P, Ilmonen M, Schuster H, Schewe CK, Andersson LC, Tikkanen MJ. Analysis of novel apolipoprotein B mutations using a modified U937 cell line LDL binding assay. *Clin Chim Acta* **1996**; 256: 27-36.
110. Millipore Corporation. 1991. The MultiScreen Assay System for Cell Proliferation Assays Using Thymidine Uptake. Millipore Technical Brief #TB038.
111. Milne RW, Theolis R, Maurice R, Pease RJ, Weech PK, Rassart E, Fruchart J-C, Scott J, Marcel YL. The use of monoclonal antibodies to localize the the low-density lipoprotein receptor-binding domain of apolipoprotein B. *J Biol Chem* **1989**; 264: 19754-19760.
112. Miserez AR, Laager R, Chiodetti N, Keller U. High prevalence of familial defective apolipoprotein B-100 in Switzerland. *J Lipid Res* **1994**; 35: 574-583.
113. Monsalve MV, Young R, Jobsis J, Wiseman SA, Dhamu S, Powell JT, Greenhalgh RM, Humphries SE. DNA polymorphisms of the gene for apolipoprotein B in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* **1988**; 70(1-2): 123-129.
114. Myant NB, Callagher J, Barbir M, Thompson GR, Wile D, Humphries SE. Restriction fragment length polymorphisms in the apo B gene in relation to coronary artery disease. *Atherosclerosis* **1989**; 77: 193-201.

115. Myant NB. Cholesterol metabolism, LDL, and the LDL receptor. San Diego: Academic Press Inc., **1990**; Chapter 10.
116. Myant NB, Gallagher JJ, Knight BL, McCarthy SN, Frostegard J, Nilsson J, Hamsten A, Talmud P, Humphries SE. Clinical signs of familial hypercholesterolemia in patients with familial defective apolipoprotein B-100 and normal low density lipoprotein receptor function. *Arterioscler Thromb* **1991**; 11: 691-703.
117. Myant NB, Forbes SA, Day INM, Gallagher J. Estimation of the age of the ancestral arginine₃₅₀₀→glutamine mutation in human apoB-100. *Genomics* **1997**; 45: 78-87.
118. Nakanishi M, Goldstein JL, Brown MS. Multivalent control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Mevalonate-derived product inhibits translation of mRNA and accelerates degradation of enzyme. *J Biol Chem* **1988**; 263(18): 8929-8937.
119. National Cholesterol Education Program. Detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel II). *Circulation* **1994**; 89: 1330-1445.
120. Navajas M, Laurent A-M, Moreel J-F, Ragab A, Cambou J-P, Cuny G, Cambien F, Rozes G. Detection by denaturing gradient gel electrophoresis of a new polymorphism in the apolipoprotein B gene. *Hum Genet* **1990**; 86: 91-93.
121. Nikonova AL, Pogoda TV, Metelskaya VA, Olferyev AM, Usievich VM, Limborksa SA, Oganov RG, Perova NV. Hereditary defect of apoB as a cause of hypercholesterolemia in a patient with coronary heart disease. *Kardiologiya* **1994**; N2: 98-103.
122. Nissen H, Hansen PS, Faergeman O, Horder M. Mutation Screening of the codon 3500 region of the apolipoprotein B gene by denaturing gradient-gel electrophoresis. *Clin Chem* **1995**; 41: 419-423.
123. Nohara A, Yagi K, Inazu A, Kajinami K, Koizumi J, Mabuchi H. Absence of familial defective apolipoprotein B-100 in Japanese patients with familial hypercholesterolemia [letter]. *Lancet* **1995**; 345: 1438.
124. Nollau P und Wagener C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment [Review]. *Clin Chem* **1997**; 43(7): 1114-1128.
125. Parhofer KG, Barrett HR, Bier DM, Schonfeld G. Lipoproteins containing the truncated apolipoprotein, apoB-89, are cleared from human plasma more rapidly than apoB-100-containing lipoproteins in vivo. *J Clin Invest* **1992**; 89: 1931-1937.
126. Pease RJ, Milne RW, Jessup WK, Law A, Provost P, Fruchart J-C, Dean RT, Marcel YL, Scott J. Use of bacterial expression cloning to localize the epitopes for a series of monoclonal antibodies against apolipoprotein B 100. *J Biol Chem* **1990**; 265: 553-568.
127. Plehn JF, Davis BR, Sacks FM, Rouleau JL, Pfeffer MA, Bernstein V, Cuddy TE, Moye LA, Piller LB, Rutherford J, Simpson LM, Braunwald E. Reduction of stroke incidence after myocardial infarction with pravastatin: the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) study. The care Investigators. *Circulation* **1999**; 99(2): 216-223 [Comment 185-188].
128. Poland D. Recursion relation generation of probability profiles for specific sequence macromolecules with long range correlations. *Biopolymers* **1974**; 13: 1859-1871.

129. Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein B-48 in intestine. *Cell* **1987**; 50: 831-840.
130. Priestley L, Knott T, Wallis S, Powell L, Pease R, Brunt H, Scott J. RFLP for the human apolipoprotein B gene: II; EcoRI. *Nucleic Acids Res.* **1985**; 13: 6790.
131. Priestley L, Knott T, Wallis S, Powell L, Pease R, Scott J. RFLP for the human apolipoprotein B gene: IV; MspI. *Nucleic Acids Res.* **1985**; 13: 6792.
132. Priestley L, Knott T, Wallis S, Powell L, Pease R, Brunt H, Scott J. RFLP for the human apolipoprotein B gene: V; XbaI. *Nucleic Acids Res.* **1985**; 13: 6793.
133. Pullinger CR, Hennessy LK, Chatterton JE, Liu W, Love JA, Mendel CM, Frost PH, Malloy MJ, Schumaker VN, Kane JP. Familial ligand-defective apolipoprotein B: identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. *J Clin Invest* **1995**; 95: 1225-1234.
134. Pullinger CR, Love JA, Liu W, Hennessy LK, Ghassemzadeh M, Newcomb KC, Illingworth DR, Kane JP. The apolipoprotein B Q3405E polymorphism has no effect on its low-density-lipoprotein receptor binding affinity. *Hum Genet* **1996**; 98: 678-680.
135. Rabes JP, Varret M, Saint-Jore B, Erlich D, Jondeau G, Krempf M, Giraudet P, Junien C, Boileau C. Familial ligand-defective apolipoprotein B-100: simultaneous detection of the Arg₃₅₀₀→Gln and Arg₃₅₃₁→Cys mutations in a French population. *Hum Mut* **1997**; 10: 160-163.
136. Rauh G, Keller C, Schuster H, Wolfram G, Zöllner N. Familial defective apolipoprotein B-100: a common cause of primary hypercholesterolemia [Review]. *Clin Invest* **1992**; 70: 77-84.
137. Rauh G, Schuster H, Schewe CK, Stratmann G, Keller C, Wolfram G, Zöllner N. Independent mutation of arginine₍₃₅₀₀₎→glutamine associated with familial defective apolipoprotein B-100. *J Lipid Res* **1993**; 34: 799-804.
138. Renges H-H, Wile DB, McKeigue PM, Marmot MG, Humphries SE. Apolipoprotein B gene polymorphisms are associated with lipid levels in men of South Asian descent. *Atherosclerosis* **1991**; 91: 267-275.
139. Riesner D, Henco K, Steger G. Temperature-gradient gel electrophoresis. A method for the analysis of conformational transitions and mutations in nucleic acids and proteins. Chrambach A, Dunn MJ, Radola BJ, ed. *Advances in Electrophoresis*. Vol. 4. Weinheim, FRG: VCH Verlagsgesellschaft, **1991**: 169-250.
140. Rubinsztein DC, Raal FJ, Seftel HC, Pilcher G, Coetzee GA, van der Westhuyzen DR. Characterization of six patients who are double heterozygotes for familial hypercholesterolemia and familial defective apo B-100. *Arteriosclerosis Thromb.* **1993**; 13: 1076-1081.
141. Rubinsztein DC, Coetzee GA, van der Westhuyzen DR, Langenhoven E, Kotze MJ. Familial defective apolipoprotein-B is rare in hypercholesterolaemic South African Afrikaners, coloureds and Indians. *South African Medical Journal.* **1995**; 85: 355-357.
142. Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. *J Biol Chem* **1989**; 264: 21682-21688.

143. Rust S, Funke H, Assmann G. Mutagenically separated PCR (MS-PCR): a highly specific one step procedure for easy mutation detection. *Nucleic Acids Res* **1993**; 21: 3623-3629.
144. Ruzicka V, März W, Russ A, Groß W. Apolipoprotein B (arg³⁵⁰⁰→gln) allele specific polymerase chain reaction: large-scale Screening of pooled blood samples. *J Lipid Res* **1992**; 33: 1563-1567.
145. Saha N, Tong MC, Tay J-S, Jeyaseelan K, Humphries SE. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene in Chinese coronary artery disease patients. *Clin. Genet.* **1992**; 42(4): 164-170.
146. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* **1989** Second Edition Cold Spring Harbor Press, New York.
147. Sanger F, Miklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**; 74(12): 5463-5467.
148. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* **1994**; 344: 1383-1389.
149. Schäfer JR, Scharnagl H, Baumstark MW, Schweer H, Zech LA, Seyberth H, Winkler K, Steinmetz A, März W. Homozygous familial defective apolipoprotein B-100: Enhanced removal of apolipoprotein E-containing VLDLs and decreased production of LDLs. *Arterioscler, Thromb Vasc Biol* **1997**; 17: 348-353.
150. Scholz RB, Milde Langosch K, Jung R, Schlechte H, Kabisch H, Wagener C, Loning T. Rapid screening for *Tp53* mutations by temperature gradient gel electrophoresis: a comparison with SSCP analysis. *Hum Mol Genet* **1993**; 2: 2155-2158.
151. Schuster H, Rauh G, Kormann B, Hepp T, Humphries SE, Keller C, Wolfram G, Zöllner N. Familial defective apolipoprotein B-100: comparison with familial hypercholesterolemia in 18 cases detected in Munich. *Arteriosclerosis* **1990**; 10: 577-581.
152. Schuster H, Rauh G, Müller S, Keller C, Wolfram G, Zöllner N. Allele-specific and asymmetric polymerase chain reaction amplification in combination: a one step polymerase chain reaction protocol for rapid diagnosis of familial defective apolipoprotein B-100. *Anal Biochem* **1992**; 204: 22-25.
153. Schwartz EI, Shevtsov SP; Kuchinski AP, Kovalev YuP, Plutalov OV, Berlin YuA. Approach to identification of a point mutation in apoB 100 gene by means of a PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res* **1991**; 19: 3752.
154. Scott J. The molecular and cell biology of apolipoprotein-B. *Mol. Biol. Med.* **1989**; 6: 65-80.
155. Sheffield VC, Cox DR, Lerman LR, Myers RM. Attachment of a 40-base-pair G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA* **1989**; 86: 232-236.
156. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* **1993**; 16: 325-332.

157. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ, West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* **1995**; 333: 1301-1307.
158. Soria LF, Ludwig EH, Clarke HRG, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B100. *Proc Natl Acad Sci USA* **1989**; 86: 587-591.
159. Steger G. Thermal denaturation of double-strand nucleic acids: prediction of temperatures critical for gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **1994**; 14: 3773-3790.
160. Stowers L, Herrnstadt C, Grothe A, Pease E, Osterlund M, Cable P, Brolaski M, Gautsch J. Rapid isolation of plasmid DNA. *Amer. Biotech. Lab.* **1992**; 10(10): 48.
161. Sundstrom C und Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* **1976**; 17: 565-577.
162. Tai D-Y, Pan J-P, Lee-Chen G-J. Identification and haplotype analysis of apolipoprotein B-100 Arg₃₅₀₀→Trp mutation in hyperlipidemic Chinese. *Clin Chem* **1998**; 44: 1659-1665.
163. Talmud PJ, Barni N, Kessling AM, Carlsson P, Darnfors C, Bjursell G, Galton D, Wynn V, Kirk H, Hayden MR, Humphries SE. Apolipoprotein B gene variants are involved in the determination of serum cholesterol levels: a study in normo- and hyperlipidemic individuals. *Atherosclerosis* **1987**; 67: 81-89.
164. Talmud PJ, Tamplin OJ, Heath K, Gaffney D, Day INM, Humphries SE. Rapid testing for three mutations causing familial defective apolipoprotein B100 in 562 patients with familial hypercholesterolaemia [Letter]. *Atherosclerosis* **1996**; 125: 135-137.
165. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial Results. *JAMA* **1984**; 251(3): 351-374.
166. Turner PR, Talmud PJ, Visvikis S, Ehnholm C, Tiret L. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene are associated with altered plasma lipoprotein concentrations but not with the perceived risk of cardiovascular disease: European Atherosclerosis Research Study. *Atherosclerosis* **1995**; 116(2): 221-234.
167. Tybjaerg-Hansen A, Gallagher J, Vincent J, Houlston R, Talmud P, Dunning AM, Seed M, Hamsten A, Humphries SE, Myant NB. Familial defective apolipoprotein B-100: detection in the United Kingdom and Scandinavia, and clinical characteristics of ten cases. *Atherosclerosis* **1990**; 80: 235-242.
168. Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG, Gerdes LU, Humphries SE. Variation of apolipoprotein B gene is associated with myocardial infarction and lipoprotein levels in Danes. *Atherosclerosis* **1991**; 89: 69-81.
169. Tybjaerg-Hansen A und Humphries SE. Familial defective apolipoprotein B-100: a single mutation that causes hypercholesterolemia and premature coronary artery disease [Review]. *Atherosclerosis* **1992**; 96: 91-107.
170. Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Meinertz H, Schnohr P, Nordestgaard BG. Association of mutations in the apolipoprotein B gene with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease. *New England J. Medicine* **1998**; 338(22): 1577-1584.

171. Visvikis S, Cambou JP, Arveiler D, Evans AE, Parra HJ, Aguilon D, Fruchart JC, Siest G, Cambien F. Apolipoprotein B signal peptide polymorphism in patients with myocardial infarction and controls. *Hum Genet* **1993**; 90: 561-565.
172. Wartell RM, Hosseini S, Powell S, Zhu J. Detecting single base substitutions, mismatches and bulges in DNA by temperature gradient gel electrophoresis and related methods. *J Chromatography A* **1998**; 806: 169-185.
173. Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Role of the lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts. *J Biol Chem* **1978**; 253: 9053-9062.
174. Weiss B, Jacquemin-Sablon A, Live TR, Fareed GC, Richardson CC. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia Coli* infected with bacteriophage T4. *J Biol Chem* **1968**; 243: 4543.
175. Wenham PR, Henderson BG, Penney MD, Ashby JP, Rae PWH, Walker SW. Familial ligand-defective apolipoprotein B-100: detection, biochemical features and haplotype analysis of the R3531C mutation in the UK. *Atherosclerosis* **1997**; 129: 185-192.
176. Wilson DJ, Gahan M, Haddad L, Heath K, Whittall RA, Williams RR, Humphries SE, Day INM. A world wide web site for low-density lipoprotein receptor gene mutations in familial hypercholesterolemia: sequence-based, tabular, and direct submission data handling. *Am J Cardiol* **1998**; 81(12): 1509-1511.
177. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* **1998**; 97(18): 1837-1847.
178. Wolffenbuttel BH, Mahla G, Muller D, Pentrup A, Black DM. Efficacy and safety of a new cholesterol synthesis inhibitor, atorvastatin, in comparison with simvastatin and pravastatin, in subjects with hypercholesterolemia. *Netherlands J Med* **1998**; 52(4): 131-137.
179. Wu M-J, Butler E, Butler R, Schumaker VN. Identification of the base substitution responsible for the Ag(x/y) polymorphism of apolipoprotein B-100. *Arteriosclerosis Thromb* **1991**; 11: 379-384.
180. Yang C-Y, Chen S-H, Gianturco SH, Bradley WA, Sparrow JT, Tanimura M, Li W-H, Sparrow DA, DeLoof H, Rosseneu M, Lee F-S, Gu Z-W, Gotto AM Jr, Chan L. Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100. *Nature* **1986**; 323: 738-742.
181. Yang C-Y, Gu Z-W, Weng S-A, Kim TW, Chen S-H, Pownall HJ, Sharp PM, Liu S-W, Li W-H, Gotto AM Jr, Chan L. Structure of apolipoprotein B-100 human low density lipoproteins. *Arteriosclerosis* **1989**; 9: 96-108.
182. Young SG, Farese RV Jr, Pierotti VR, Taylor S, Grass DS, Linton MF. Transgenic mice expressing human apoB100 and apoB48. *Curr Opin Lipidol* **1994**; 5: 94-101.

Tab. 6.1 Prävalenz der R3500Q Mutation**FDB_{3500Q} vorhanden**

Land	Mutationsträger : Anzahl unter- suchter Personen	Charakteristika des untersuchten Kollektivs	Prävalenz (%) des FDB _{3500Q}	Referenz
USA	3 : 2859	Normaldurchschnitt	0,1	Bersot <i>et al.</i> 1993
	12 : 1368	HLP	0,9	Pullinger <i>et al.</i> 1995
	5 : 309	Hypercholesterinämie	1,6	Ludwig <i>et al.</i> 1997
	4 : 411	KHK	1,0	Ludwig <i>et al.</i> 1997
Kanada	1 : 343	Hypercholesterinämie	0,3	Innerarity <i>et al.</i> 1990
Europa				
England	6 : 173	FH	3,5	Tybjaerg-Hansen <i>et al.</i> 1990
	3 : 91	Typ IIa HLP	3,3	Tybjaerg-Hansen <i>et al.</i> 1990
	17 : 562	FH	3,0	Talmud <i>et al.</i> 1996
Schottland/Glasgow	5 : 907	Hypercholesterinämie	0,6	Gaffney <i>et al.</i> 1995
Schottland/Wales	9 : 412	Hypercholesterinämie	2,2	Wenham <i>et al.</i> 1997
Niederlande	18 : 840	FH	2,1	Defesche <i>et al.</i> 1993
Belgien	5 : 62	Typ IIa HLP	8,1	Kotze <i>et al.</i> 1994
Deutschland				
München	11 : 415	Typ IIa HLP	2,7	Rauh <i>et al.</i> 1992
Tübingen	4 : 43	Typ IIa und TypIIb HLP	9,3	Koch <i>et al.</i> 1996
Frankfurt	21 : 297	Typ IIa HLP	7,1	Fisher <i>et al.</i> 1999
Italien	1:1			Corsini <i>et al.</i> 1989
Dänemark	1 : 80	KHK	1,3	Tybjaerg-Hansen <i>et al.</i> 1990
	7 : 9255	Normaldurchschnitt	0,08	Tybjaerg-Hansen <i>et al.</i> 1998
Norwegen	1 : 208	FH	0,5	Leren <i>et al.</i> 1995
Schweden	2 : 127	FH	1,6	Eggertsen <i>et al.</i> 1994
	0 : 113	MI		Tybjaerg-Hansen <i>et al.</i> 1990
	1 : 56	Typ IIa HLP	1,8	Avoustin <i>et al.</i> 1992
Frankreich	2 : 622	MI	0,3	Brousseau <i>et al.</i> 1995
	1 : 639	Kontrollen	0,16	Brousseau <i>et al.</i> 1995
	2 : 49	FH	4,1	Rabes <i>et al.</i> 1997
	3 : 991	KHK-verdächtig	0,3	Rabes <i>et al.</i> 1997
Schweiz	3 : 728	Kontrollen	0,4	Miserez <i>et al.</i> 1994
	7 : 142	Typ IIa HLP	4,9	Miserez <i>et al.</i> 1994
Österreich	2 : 236	110 KHK+130 Kontrollen	0,8	Innerarity <i>et al.</i> 1990
Tschechien	2 : 52	FH	3,8	Horinek <i>et al.</i> 1995
Polen	5 : 30	FH	16,7	Gorski <i>et al.</i> 1998
Australien	2 : 37	FH	5,4	Hosking <i>et al.</i> 1991
Südafrika				Rubinsztein <i>et al.</i> 1995
Russland (Moskau)				Nikonova <i>et al.</i> 1994

FDB_{3500Q} nicht vorhanden

Land	Referenz	Land	Referenz
Finnland	Hämäläinen <i>et al.</i> 1990	Island	Gudnason <i>et al.</i> 1990
Japan	Nohara <i>et al.</i> 1995	Russland (St. Petersburg)	Schwartz <i>et al.</i> 1991
Israel	Friedlander <i>et al.</i> 1993	Türkei	Mahley <i>et al.</i> 1995

FH = Familiäre Hypercholesterinämie, HLP = Hyperlipoproteinämie, MI = Myokardinfarkt

Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

- März, W., V. Ruzicka, E. Fisher, A.P. Russ, W. Schneider, W. Groß. 1993. Typing of the 3' hypervariable region of the apolipoprotein B gene: Approaches, pitfalls, and applications. *Electrophoresis* 14: 169-173.
- Ruzicka, V., W. März, A. Russ, E. Fisher, W. Mondorf, W. Groß. 1993. Characterization of the gene for apolipoprotein E5-Frankfurt (Gln⁸¹→Lys, Cys¹¹²→Arg) by polymerase chain reaction, restriction isotyping, and temperature gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis* 14: 1032-1037.
- März, W., M.M. Hoffmann, H. Scharnagl, E. Fisher, M. Chen, M.S. Nauck, G. Feussner, H. Wieland. 1998. Apolipoprotein E2 (Arg¹³⁶→Cys) mutation in the receptor binding domain of apo E is not associated with dominant type III hyperlipoproteinemia. *J. Lipid. Res.* 39: 658-669.
- Edling, C., E. Fisher, C.R. Noe, W. Groß. 1998. Separation of INS/DEL Polymorphism in the Signal Peptide Sequence of Apolipoprotein B Gene by Capillary Gel Electrophoresis. *Die Pharmazie* (Suppl.1) 53(3) Abstract 28, S.13.
- Fisher, E., H. Scharnagl, M. Hoffmann, K. Kusterer, D. Wittmann, H. Wieland, W. Groß, W. März. 1999. Detection of apo B-100 (arg³⁵⁰⁰→trp) associated with two new haplotypes and evidence that apo B-100 (glu³⁴⁰⁵→gln) diminishes receptor-mediated uptake of LDL. *Clin. Chem.* 45(7): 1026-1038.

Buchbeitrag

- März, W., M.S. Nauck, E. Fisher, M.M. Hoffmann, H. Wieland. The molecular mechanisms of inherited hypercholesterolemia. In: Zehender, M., Geibel, A., Just, H. (Hrsg.) From molecule to man - molecular basis of congenital cardiovascular disorders. Steinkopff Verlag, im Druck.

Kongressbeiträge

- Fisher, E., V. Ruzicka, A. Russ, W. März, W. Groß. Typing of the 3' hypervariable region of the apolipoprotein B gene: approaches, pitfalls, and applications. Electrophoresis forum '92, München, Oktober 1992.
- März, W., E. Fisher, U. Stein, M. Chen, W. Groß, H. Wieland. Apolipoprotein E2 (Arg¹³⁶→Cys): detection of a new frequent apo E mutation in a German population. 64th Congress of the European Atherosclerosis Society, Utrecht, 10. - 13. Juni 1995; Atherosclerosis 115 (Suppl.) S5, 1995.
- Fisher, E., W. März, H. Wieland, and W. Groß. Ligand defective apolipoprotein B-100: mutation screening of the codon 3500 region of the apolipoprotein B gene by temperature gradient gel electrophoresis. 9th International Dresden Symposium on Lipoproteins and Atherosclerosis. 27. – 29. Juni 1997, Dresden.
- Fisher, E. Mutations-Screening am ApoB-100 im Bereich der Rezeptorbindungsregion (AS 3131-3837) mit Heteroduplex-TGGE: Erstmaliger Nachweis der FDB_{3500W} Mutation in Deutschland, hohe Prävalenz des FDB_{3500Q} und Hinweis auf eine verminderte Internalisation und Degradation von Gln³⁴⁰⁵→Glu LDL. 29. Jahrestagung des Arbeitskreises „Klinischer Lipidstoffwechsel“, 25. - 27. November 1999, Maikammer (Pfalz).

1 Lebenslauf

Name		Eva Fisher, geb. Banczyk
geboren am		26.01.1965
in		Frankfurt am Main
Familienstand		verheiratet
Kinder		2 Kinder, geb. 1987 und 1993
Staatsangehörigkeit		deutsch
Schulabschluss	1984	Abitur an der Marienschule der Ursulinen in Offenbach am Main
Studium	1985-1991	Diplom-Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Diplomarbeit	1991-1992	im Zentrum für Biologische Chemie der Universitätsklinik Frankfurt am Main, Abteilung für Angewandte Biochemie, kommissarische Leitung: Prof. Dr. Lothar Träger. Titel der Arbeit: „Die Typisierung genetischer Polymorphismen der Apolipoproteine B und E mittels Polymerase Chain Reaction: Methoden und Anwendungen“
Promotion	1994-2000	Promotionsarbeit im Zentrum für Biologische Chemie, Abteilung für Angewandte Biochemie, Leitung: Prof. Dr. Werner Groß unter Betreuung von PD Dr. Winfried März, Freiburg und Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz, Frankfurt Titel der Arbeit: „Struktur-Funktionsbeziehungen bei Apolipoproteinen: Genetische Varianten am Apolipoprotein B-Lokus als Ursache atherogener Hypercholesterinämien“
Stipendium	1995-1997	Kontaktstipendium des Hessischen Ministeriums für Wissenschaft und Kunst

2

Dank

Den Ansporn für meine Dissertation verdanke ich vor allem der Unterstützung und Förderung durch meinen Doktorvater Herrn Privat Dozent Doktor Winfried März, der nie gezögert hat, mir wissenschaftlichen Rat und materielle oder ideelle Unterstützung dort zukommen zu lassen, wo ich diese(n) benötigte.

Durch ein Kontaktstipendium des Hessischen Ministeriums für Wissenschaft und Kunst wurde mir der Einstieg in die Promotionstätigkeit ermöglicht, die im Folgenden durch ein festes Arbeitsverhältnis im Labor für Angewandte Biochemie weiter finanziert werden konnte. Diese so wichtige Voraussetzung verdanke ich Herrn Professor Werner Groß, in dessen Arbeitsgruppe ich die Arbeit durchführen durfte, der mir „vor Ort“ alle materiellen Voraussetzungen dafür zur Verfügung stellte und sich wohlwollend für den Verlauf der Promotion einsetzte.

Frau Professor Anna Starzinski-Powitz hat sich für die stipendierte Unterstützung eingesetzt, wofür ich ihr von Herzen dankbar bin.

Im Verlauf meiner mehrjährigen Tätigkeit an der Uniklinik Frankfurt habe ich Hilfe von vielen Personen erfahren, die im einzelnen aufzuzählen ich mich nicht wage, um die Dankesworte nicht zu lang werden zu lassen. Erwähnen möchte ich jedoch meine gute Freundin Ulrike Stein, mit der gemeinsame Arbeit immer ein Vergnügen war, Angela Eser und Daniela Wittmann, die, obwohl beide noch sehr jung und gerade fertig ausgebildete MTAs, hochqualifiziert bei Experimenten mitgeholfen haben. Hubert Scharnagel aus Freiburg war ein sehr wichtiger Mitbereiter der hier vorliegenden experimentellen Ergebnisse, da unter seiner Anleitung die Fibroblasten-Zellkulturexperimente durchgeführt wurden. Doktor Michael Hofmann aus Freiburg hat zwei genetische Haplotypenmarker für mich bestimmt und sich zudem mit dem Korrekturlesen dieser Arbeit beschäftigt. Aus der Arbeitsgruppe von Frau Professor Starzinski-Powitz war Heike Handrow-Metzmacher die zweite Person, welche die Arbeit kritisch gelesen hat, und mir hier und da Ratschläge erteilte. Schließlich bin ich dankbar dafür, dass sich so viele Menschen bereitwillig Fragen und mehrmaligen Blutabnahmen aussetzten, um der Forschung und damit hier auch mir persönlich einen Gefallen zu tun. Ohne Kooperation von Seiten der von einer Lipiderhöhung betroffenen Personen wäre diese Arbeit nicht ausführbar gewesen.

3 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Struktur-Funktionsbeziehungen bei Apolipoproteinen: Genetische Varianten am Apolipoprotein B-Lokus als Ursache atherogener Hypercholesterinämien“

selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen und den Betreuern bekannten verwendet habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät, bzw. keinem anderen Fachbereich der Biologie ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, 13. April 2000