

# Genetische Faktoren der humanen Cholesterinbiosynthese

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Jan Baier  
Geburtsdatum / Geburtsort: geboren am 21. August 1982 in Jena / Thüringen  
angefertigt am / in: Institut für Laboratoriumsmedizin,  
Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik  
Betreuer: Prof. Dr. med. Daniel Teupser  
Prof. Dr. med. Joachim Thiery

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 16.10.2012

## Bibliografische Beschreibung

Baier, Jan

Genetische Faktoren der humanen Cholesterinbiosynthese

Universität Leipzig, Dissertation

Diese Arbeit umfasst 148 S.<sup>1</sup> und enthält 340 Lit.<sup>2</sup>, 36 Abb. sowie 23 Tab.

Referat:

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung genetischer Risikofaktoren der humanen endogenen Cholesterinbiosynthese. In einer dreistufigen genomweiten Assoziationsstudie (2 disjunkte KORA S3/F3- und CARLA-Kohorte) wurden 490.032 Genpolymorphismen bezüglich der Phänotypen Serumlanosterol und Serumcholesterin untersucht. Nach Validierung und Replikation signifikanter SNPs der Stufe 1 in 2 weiteren unabhängigen Kohorten zeigte ausschließlich der SNP rs7703051 im HMGCR-Locus für den Phänotyp Serumlanosterol eine reproduzierbare Assoziation ( $p = 1,4 \times 10^{-10}$ ). Eine darauffolgende kumulative Analyse untersuchter SNPs im HMGCR-Locus wies auch für den SNP rs17562686 eine signifikante Assoziation zu Serumlanosterol auf ( $p = 4,3 \times 10^{-6}$ ). Eine kombinierte Analyse der beiden SNPs bzgl. Assoziationen zu den untersuchten Phänotypen hob den SNP rs7703051 als Primär-SNP hervor, beobachtete Assoziationen des SNP rs17562686 waren zum Teil auf *Linkage Disequilibrium* (LD) zurückzuführen. Im Folgenden wurden in der CARLA-Kohorte mittels *fine mapping* mögliche funktionell bedeutsame SNPs bestimmt, welche mit einem der oben genannten SNPs in LD stehen. Der mit rs7703051 in starkem LD stehende SNP rs3846662, welcher im Intron 13 des HMGCR-Gens liegt, wies sowohl in der CARLA-Kohorte als auch in der LE-Heart Studie eine signifikante Assoziation zu Serumlanosterol auf. Funktionelle Genexpressionsuntersuchungen *in vivo* in 51 Leberproben als auch in peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) von 958 Probanden der LE-Heart Studie zeigten signifikante Assoziationen des SNPs rs3846662 zum prozentualen Ausmaß des alternativen *Splicings* des Exon 13 der HMGCR-mRNA ( $p < 0,01$  bzw.  $p = 2,1 \times 10^{-7}$ ), ohne Auswirkungen auf die Gesamtexpression des HMGCR-Gens zu haben. Weiterführende Untersuchungen der Enzymaktivität der HMG-CoA Reduktase in oben genannten humanen Zellen erbrachten keine signifikanten Ergebnisse. Diese Arbeit zeigt erstmalig genetische Assoziationen zu einem Phänotyp der Cholesterinhomeostase. Aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse kann behauptet werden, dass bereits bekannte Assoziationen des HMGCR-Locus zu LDL-Cholesterin und Gesamtcholesterin auf Varianzen in der Cholesterinbiosynthese zurückzuführen sind.

---

<sup>1</sup> Seitenzahl insgesamt

<sup>2</sup> Zahl der im Literaturverzeichnis ausgewiesenen Literaturangaben

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Bedeutung des Cholesterins	1
1.1.1. Die Cholesterinbiosynthese	1
1.1.2. Stoffwechsel, Abbau und Ausscheidung des Cholesterins	3
1.1.3. Regulation der Cholesterinhomöostase	5
1.2. Der Lipoproteinstoffwechsel	7
1.2.1. Aufbau der Lipoproteine	7
1.2.2. Metabolismus und Funktion der Lipoproteine	9
1.2.2.1. Metabolismus von Chylomikronen und VLDL	9
1.2.2.2. Metabolismus von LDL und HDL	11
1.3. Atherosklerose – eine multifaktorielle Erkrankung	13
1.3.1. Risikofaktoren der Atherosklerose	13
1.3.2. Einfluss des Cholesterins auf die Pathogenese der Atherosklerose	15
1.3.2.1. Endotheldysfunktion	15
1.3.2.2. Von der Endotheldysfunktion zur Schaumzellbildung	15
1.4. Strategien zur Untersuchung genetischer Risikofaktoren	19
1.4.1. Von Kandidatengenstudien zu genomweiten Assoziationsstudien	21
1.4.2. Konzeptionelle Grundlagen einer genomweiten Assoziationsstudie	23
1.4.3. Neue Erkenntnisse aus genomweiten Assoziationsstudie	25
1.5. Zielstellung	26
<b>2. Methoden und Materialien</b>	<b>27</b>
2.1. Genomweite Assoziationsstudie	27
2.1.1. Beschreibung des Studienmodells	27
2.1.2. Beschreibung der Studienpopulationen KORA-S3/F3	28

2.1.3. Beschreibung der Studienpopulationen CARLA	29
2.1.4. Beschreibung der Studienpopulationen LE-Heart	29
2.2. Probengewinnung von humanen Untersuchungsmaterialien	30
2.2.1. Gewinnung von Leberproben	30
2.2.2. Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen humanen Blutes	30
2.2.3. Gewinnung von Serum zur Sterolmessung	31
2.3. Molekularbiologische Methoden	31
2.3.1. Isolation von genomischer DNA aus Gewebe	31
2.3.2. Isolation von genomischer DNA aus humanem Blut	32
2.3.3. Isolation von RNA aus Gewebe	32
2.3.4. Isolation von RNA aus PBMCs	33
2.3.5. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA	33
2.3.6. Synthese von komplementärer DNA mittels reverser Transkription	34
2.3.7. Polymerase-Kettenreaktion	34
2.3.8. Agarose-Gelelektrophorese	35
2.3.9. DNA-Extraktion und -Aufreinigung	35
2.3.10. Subklonierung von PCR-Fragmenten in pCR II-TOPO	36
2.3.11. Präparation von Plasmid-DNA (Plasmid-Mini-Präparation)	37
2.3.12. DNA-Sequenzierung	38
2.3.13. Quantitative RT-PCR	39
2.3.14. Selektion von Primern und Sonden für die qRT-PCR	41
2.3.15. Reagenzien, Materialien und Reaktionsbedingungen für die qRT-PCR	43
2.3.16. Herstellung von cDNA für die qRT-PCR-Standardkurve	43
2.3.17. Präparation von Plasmid-DNA (Plasmid-Maxi-Präparation)	44
2.3.18. Linearisierung und Quantifizierung der Plasmid-DNA	45
2.3.19. Aufreinigung von isolierter RNA	46
2.3.20. Vorarbeiten für Expressionsstudien des HMGCR-Gens in der LE-Heart Kohorte	46
2.3.21. SNP-Genotypisierung mittels Schmelzkurvenanalyse	48
2.3.22. Reagenzien, Materialien, Reaktionsbedingungen für die Schmelzkurvenanalyse	50
2.3.23. SNP-Genotypisierung mittels Alleldiskrimination	52

2.3.24. Reagenzien, Materialien, Reaktionsbedingungen für die Alleldiskrimination	53
2.4. HMG-CoA-Reduktase Enzymaktivitätsassay	55
2.4.1. Probenaufbereitung von humanem Lebergewebe	55
2.4.2. Probenaufbereitung von peripheren mononukleären Zellen humanen Blutes	55
2.4.3. Proteinkonzentrationsbestimmung	56
2.4.4. Aktivitätsassay	57
2.4.5. Anionenaustausch-Säulenchromatographie	58
2.4.6. Bestimmung des Stoffumsatzes mittels Szintillationsmessung	59
2.5. Sterolmessung	61
2.5.1. Konzentrationsbestimmung von Sterolen mittels LC-MS/MS	61
2.5.2. Auswertung	63
2.6. Materialien, Reagenzien und Statistik	64
2.6.1. Laborchemikalien, Reagenzien	64
2.6.2. Laborgeräte	66
2.6.3. Verbrauchsmaterialien	67
2.6.4. Statistik	68
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>69</b>
3.1. Mehrstufige genomweite Assoziationsstudie der Cholesterinbiosynthese	70
3.1.1. Stufe 1 – GWA in der KORA-S3/F3 Kohorte	70
3.1.2. Stufe 2 – Validierung in der KORA-S3/F3 Kohorte	73
3.1.3. Stufe 3 – Replikation in der CARLA Kohorte	74
3.1.4. Ergebnis der mehrstufigen genomweiten Assoziationsstudie	74
3.2. Assoziationsuntersuchungen relevanter SNPs innerhalb des HMGCR-Locus	77
3.2.1. Untersuchung der Haplotyp-Struktur des HMGCR-Bereiches	77
3.2.2. Untersuchung der SNPs rs3846662 und rs5909 in CARLA und LE-Heart	79
3.2.3. Kumulative Analyse relevanter SNPs innerhalb des HMGCR-Locus	82
3.2.4. Kombinierte Analyse der <i>tagging</i> SNPs innerhalb des HMGCR-Locus	82

3.3. Untersuchung der HMGCR-Expression in humanen Zellen	83
3.3.1. Untersuchung in humanen Leberproben	83
3.3.2. Untersuchung in humanen PBMCs der LE-Heart Kohorte	85
3.4. Untersuchung der Promotorregion des HMGCR-Gens	89
3.4.1. Sequenzierung der DNA proximal des HMGCR-Gens	89
3.4.2. Assoziationsuntersuchung des SNP HMGCR 1 in CARLA und LE-Heart	91
3.5. Untersuchung der 3'-UTR-Stabilität des HMGCR-Gens	92
3.5.1. Untersuchung in humanen Leberproben	92
3.5.2. Untersuchung in humanen PBMCs der LE-Heart Kohorte	93
3.6. Aktivitätsuntersuchungen der HMG-CoA-Reduktase	94
3.6.1. Untersuchung in humanen Leberproben	94
3.6.2. Untersuchung in humanen PBMCs der LE-Heart Kohorte	96
<b>4. Diskussion</b>	<b>98</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>114</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>119</b>

**Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

**Lebenslauf**

**Veröffentlichungen**

**Danksagung**

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
AB0	Genlocus für Blutgruppenmerkmal des AB0-System nach Landsteiner
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
APO/apo	Apolipoprotein (Singular/Plural)
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bHLH-zip	<i>basic-helix-loop-helix-leucine zipper</i>
bp	Basenpaar
C	Kohlenstoff
C	Cytosin
CARLA	<i>CARDiovascular disease, Living and Ageing in Halle</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CE	Cholesterinester (Singular/Plural)
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
Ch	Cholesterin
Chr.	Chromosom
Cl	Chlor
CM	Chylomikron (Singular/Plural)
CNV /-s	<i>copy number variant</i> (Singular/Plural)
CoA	Coenzym A
cpm	<i>counts per minute</i>
CRP	C-reaktives Protein
C <sub>t</sub>	<i>cycle threshold</i>
Cu	Kupfer
Δ	delta
ΔEx13	HMGCR-Transkript ohne Exon 13
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat

dpm	<i>disintegrations per minute</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ER	endoplasmatisches Retikulum
FC	freies Cholesterin
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
FS	Fettsäuren (Singular/Plural)
fwd	<i>forward</i>
G	Guanin
GWA /-s	genomweite Assoziationsstudie (Singular/Plural)
H	Wasserstoff
HDL	<i>high density lipoprotein</i> (Singular/Plural)
HDL-C	HDL-Cholesterin
HL	hepatische Lipase
HMG-CoA	$\beta$ -Hydroxymethylglutaryl-CoA
HMGCR	$\beta$ -Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktase
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HWE	Hardy-Weinberg Gleichgewicht
IDL	<i>intermediate density lipoprotein</i> (Singular/Plural)
ILM	Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik
IMISE	Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie
Insig	<i>insulin induced gene</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
IZKF	Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung
K	Kalium
kbp	Kilobasenpaare
KHK	koronare Herzkrankheit
KORA	Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg
KRK	Kolorektalkarzinom
La	Lanosterol
LacZ	$\beta$ -Galactosidase
LB	Luria-Bertani

LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LC-MS/MS	mit Flüssigchromatographie gekoppelte Tandemmassenspektrometrie
LD	<i>Linkage Disequilibrium</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i> (Singular/Plural)
LDL-C	LDL-Cholesterin
LDLR	LDL Rezeptor (Singular/Plural)
LE-Heart	Leipzig Herz
LIPC	Gen, das die hepatische Lipase kodiert
LPA	Lipoprotein (a)
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	<i>LDL-receptor related protein</i>
maf	<i>minor allele frequency</i>
MAG	Monoacylglycerol (Singular/Plural)
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>
Mbp	Megabasenpaare
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
Mg	Magnesium
MGB	<i>minor groove binder</i>
mmLDL	<i>minimal oxidized LDL</i>
MONICA	<i>Monitoring of trends and determinants in cardiovascular diseases</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MSR	Scavenger Rezeptor der Makrophagen (Singular/Plural)
n	Anzahl
Na	Natrium
NAD(P)H	Nicotinamid-adenin-dinukleotid(-phosphat)
NO	Stickstoffmonoxid
NPC	Niemann-Pick Typ C
NPC1L1	Niemann-Pick C1 like 1
nS	nach Säule
O	Sauerstoff
OD	optische Dichte
oxLDL	oxidiertes LDL (Singular/Plural)
PBMC /-s	mononukleäre Zelle des peripheren Blutes (Singular/Plural)
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PP	Pyrophosphat
PCSK9	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RCT	reverser Cholesterintransport
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAsin	RNAse-Inhibitor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	reverse Transkription
S	Schwefel
Scap	<i>SREBP cleavage- activating protein</i>
sdLDL	<i>small dense</i> -LDL (Singular/Plural)
SNP /-s	<i>Single Nucleotid Polymorphism</i> (Singular/Plural)
SORT1	<i>Sortilin</i>
SR	<i>Scavenger</i> Rezeptor (Singular/Plural)
SRE	<i>sterol response element</i> (Singular/Plural)
SREBP	<i>sterol response element binding protein</i> (Singular/Plural)
T	Thymin
TAG	Triacylglycerin (Singular/Plural)
TAE	Tris-Acetat, EDTA
TC	Gesamtcholesterin
TE	Tris-HCl, EDTA
TEDK	Tris-HCl, EDTA, DTT, KCl
TICE	transintestinaler Cholesterinefflux
TRIB1	<i>tribbles homolog 1</i>
TRIzol	Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktionslösung
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i> (Singular/Plural)
VLDL-C	VLDL-Cholesterin
vS	vor Säule
WHO	<i>World Health Organization</i>
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-inolyl-[ $\beta$ ]-D-galactopyranoside

## 1. Einleitung

### 1.1. Bedeutung des Cholesterins

Lipide sind am Aufbau sämtlicher zellulärer Membranen beteiligt. Dadurch wird die Existenz von Zellen als in sich abgeschlossene Funktionseinheiten ermöglicht und deren Inneres gegen die Außenwelt abgeschirmt. Für diese Aufgabe sind amphiphile Lipide wie Phosphoglyceride und Sphingolipide besonders geeignet, da diese neben den für Lipide typischen hydrophoben Alkanketten auch über hydrophile, polare Gruppen verfügen und somit die typischen Doppelschichten ausbilden können. Cholesterin ist ebenso essentieller Bestandteil aller tierischen Membranen und dient vor allem dazu, die Doppelschichten zu verstärken, die Membranfluidität zu gewährleisten und somit weniger permeabel für kleine Moleküle zu machen (Levine & Wilkins 1971). Außerdem leiten sich sämtliche Steroidhormone aus Cholesterin ab, die mannigfaltig auf den gesamten Organismus wirken.

#### 1.1.1. Die Cholesterinbiosynthese

Die Cholesterinbiosynthese findet mit Ausnahme der im Cytosol ablaufenden Reaktionen vom Acetyl-Coenzym A (CoA) bis zum  $\beta$ -Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) ausschließlich im endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Sämtliche Kohlenstoffatome des Cholesterins stammen von Acetyl-CoA ab (Bloch & Rittenberg 1942; Sonderhoff & Thomas 1937). Insgesamt sind 35 einzelne Reaktionsschritte notwendig, um aus 18 Molekülen Acetyl-CoA ein Molekül Cholesterin zu bilden. Die Synthese bedarf großer Mengen von Adenosintriphosphat (ATP) und wird somit stark vom Energiehaushalt der Zelle reguliert. Die einzelnen Reaktionsschritte lassen sich in vier Komplexe zusammenfassen (Tabelle 1). Die Abfolge der einzelnen Schritte (Abbildung 1) wurde insbesondere durch die Arbeitsgruppen von Konrad Bloch und Feodor Lynen aufgeklärt, welche für ihre Arbeiten auf diesem Gebiet 1964 den Nobelpreis für Medizin erhielten. Die entscheidenden Erkenntnisse waren hierbei, dass das aus fünf Kohlenstoff(C)-Atomen bestehende aktive Isopren Isopentenyl-Pyrophosphat (PP) der Grundkörper für die Biosynthese sowohl der Isoprenlipide als auch des Cholesterins ist (Lynen et al. 1958a). Dieses Isopren wird aus Acetyl-CoA über das Zwischenprodukt Mevalonat, welches aus sechs C-Atomen besteht, synthetisiert (Cresson et al. 1956; de Waard, Phillips & Bloch 1958).

# 1 Einleitung

**Tabelle 1:** Die Cholesterinbiosynthese.

Edukt → Produkt	Referenz
1. Acetyl-CoA → Mevalonat	Cresson et al. 1956; Durr & Rudney 1960; Lynen et al. 1958b
2. Mevalonat → Isopentenyl-PP	Clayton & Bloch 1956; Lynen et al. 1958a
3. Isopentenyl-PP → Squalen	Agranoff et al. 1960; Popjak et al. 1959
4. Squalen → Cholesterin	Clayton & Bloch 1956; Eschenmoser et al. 1955; Kandutsch & Russell 1960; Tchen & Bloch 1957

Aufreihung der Reaktionskomplexe der Cholesterinbiosynthese mit entsprechenden Referenzen, in denen die einzelnen Reaktionsschritte und deren Rolle in der Biosynthese im Detail beschrieben werden.

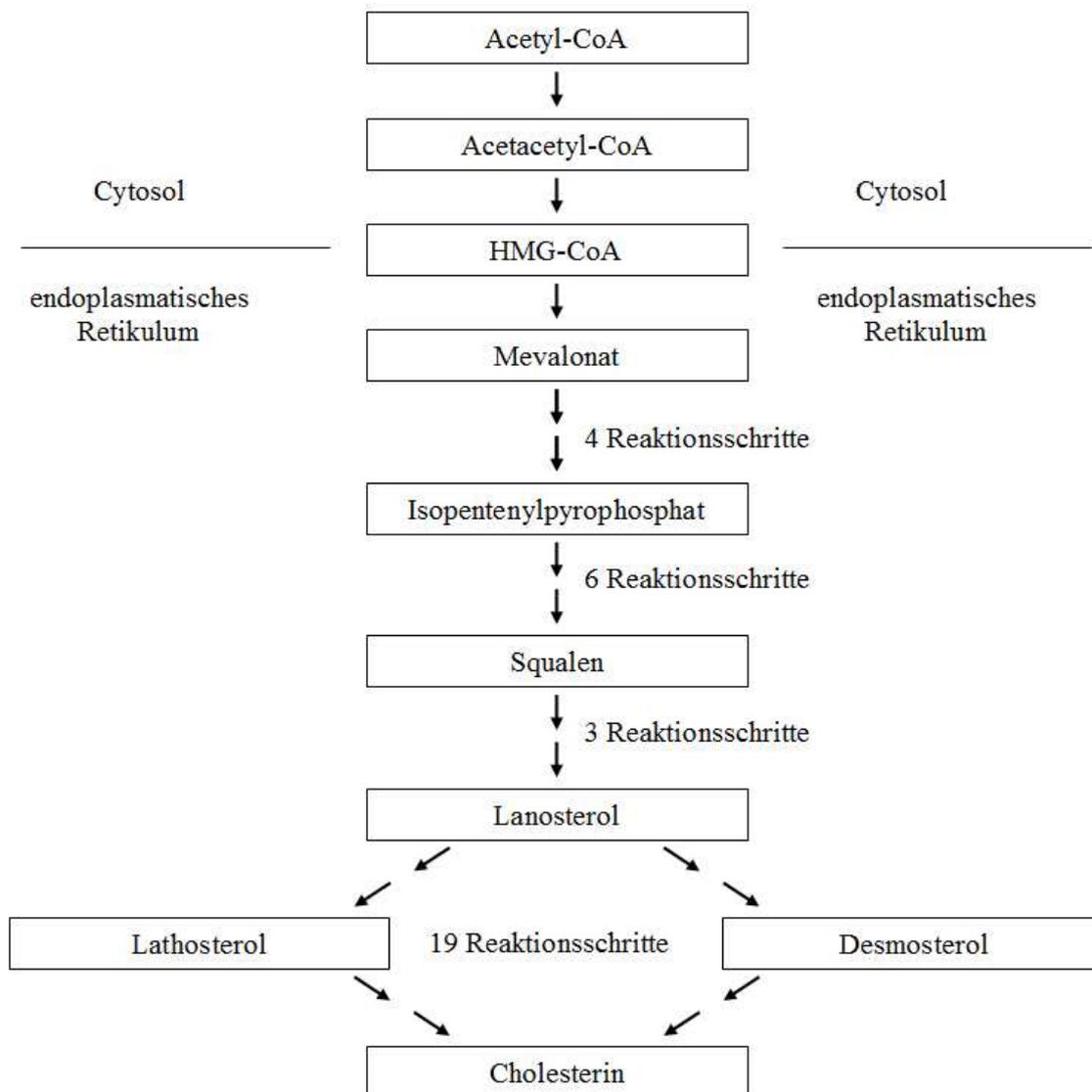


Abbildung 1: Reaktionsabfolge der Cholesterinbiosynthese mit den wichtigsten Zwischenprodukten. Die Syntheseabfolge über Lathosterol stellt den Kandutsch-Russell-Weg, die über Desmosterol den Bloch-Weg dar.

## 1 Einleitung

In diesem Zusammenhang wurden vor allem Vorarbeiten aufgegriffen, die postulierten, dass die Zyklisierung von Squalen – einem Polyisoprenoid – zu Cholesterin führt (Robinson 1934). Ein wichtiger Punkt ist hierbei, dass sich die Biosynthese des Cholesterins ab dem Metabolit Lanosterol (drei Reaktionsschritte vom Squalen) verzweigt und einerseits über den Bloch-Weg andererseits über den Kandutsch-Russell-Weg zu Cholesterin führt (Abbildung 1).

### 1.1.2. Stoffwechsel, Abbau und Ausscheidung des Cholesterins

Bei ausgeglichener Nahrung nimmt der menschliche Organismus ca. 300 mg Cholesterin pro Tag auf. Da jedoch täglich etwa 1 g Cholesterin in Form von Gallensäuren ausgeschieden werden, muss der größere Anteil durch Neusynthese nachgeliefert werden. Die Neusynthese findet überwiegend in extrahepatischen Geweben statt. Dem gegenüber kommt der Leber eine Schlüsselfunktion in der Aufrechterhaltung eines Fließgleichgewichtes zu (Dietschy & Turley 2002). Die intestinale Aufnahme von Nahrungscholesterin wird durch den Niemann-Pick C1 like 1 Transporter (NPC1L1) vermittelt (Altmann et al. 2004).

Die genauen Mechanismen des intrazellulären Cholesterintransportes sind noch nicht geklärt. Es gibt jedoch viele Hinweise darauf, dass Cholesterin neben dem bekannten Transport innerhalb von Doppelschichtvesikeln auch nicht-vesikulär durch die Bindung an Transportproteine an seinen Bestimmungsort befördert wird (Baumann et al. 2005). Hierbei handelt es sich vermutlich um die Proteinfamilie mit einer lipidbindenden START-Domäne (Alpy & Tomasetto 2005) und um die Proteinfamilie der Oxysterol bindenden Proteine (Olkkonen et al. 2006). Außerdem haben Untersuchungen an Patienten mit der Niemann-Pick Typ C Krankheit (NPC) gezeigt, dass extern aufgenommenes Cholesterin nach lysosomaler Verarbeitung auf zwei Transportproteine angewiesen ist - NPC1 und NPC2 - um nicht in Lysosomen zu akkumulieren (Infante et al. 2008; Xu et al. 2007).

Cholesterin ist in freier Form zytotoxisch (Warner et al. 1995). Daher wird es am ER durch die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) verestert und in Form von Lipidtröpfchen gespeichert, wenn es nicht für den unmittelbaren Aufbau von Zellmembranen benötigt wird. Cholesterinester (CE), welche in spezialisierten Zellen endokriner Organe, wie dem Ovar, den Testes oder den Nebennierenrinden hergestellt und gespeichert werden, bilden außerdem den Grundbaustein für die Synthese von Steroidhormonen.

Hingegen werden hepatisch synthetisierte CE in *very low density lipoprotein* (VLDL)- und *low density lipoprotein* (LDL)-Partikeln inkorporiert und zum extrahepatischen Gewebe transportiert (vgl. 1.2.2.1. und 1.2.2.2.), während der reverse Transport zur Leber als

## 1 Einleitung

Ausscheidungsorgan des Cholesterin vornehmlich durch *high density lipoprotein* (HDL)- aber auch durch LDL-Partikel vermittelt wird.

Cholesterin wird durch den menschlichen Körper hauptsächlich in Form von Gallensäuren ausgeschieden, welche in einen enterohepatischen Kreislauf eintreten und zu 90-95% reabsorbiert werden. Cholesterin selbst ist nicht wasserlöslich, Gallensäuren hingegen sind amphiphile Moleküle und können in Wasser kleine Aggregate – so genannte Mizellen – bilden (Monte et al. 2009). Die Synthese der Gallensäuren ist sehr komplex und ihre Teilreaktionen finden im Cytosol, dem ER, den Mitochondrien und Peroxisomen der Hepatozyten statt, die einer starken *feedback*-Inhibition unterliegen (Chiang 2004; Russell 2003). Die wichtigsten Endprodukte sind Cholsäure und Chenodesoxycholsäure. Diese werden als amidierter bzw. konjugierter Form über ABCB11, ABCC2 und ABCG2, Mitglieder der *ATP Binding Cassette* Transporter Familie, in die Gallenwege sezerniert (Akita et al. 2001; Gerloff et al. 1998). Neben ihrer Hauptfunktion Nahrungsfette und fettlösliche Vitamine im Jejunum zu emulgieren und somit absorptionsfähig zu machen, scheinen Gallensäuren auch endokrine und parakrine Eigenschaften zu besitzen, sowie eine Rolle in der Entzündungsantwort zu spielen (Geier et al. 2007; Houten, Watanabe & Auwerx 2006). Während der Darmpassage unterliegt ein Teil der Gallensäuren einer bakteriell induzierten Biotransformation, bevor sie im Ileum durch aktiven Transport apikal in die Enterozyten aufgenommen werden und diese basolateral ins Portalvenenblut verlassen (Craddock et al. 1998; Dawson et al. 2005). Dort gelangen sie albumingebunden zu den Lebersinusoiden zurück und werden natriumabhängig (Hagenbuch & Meier 1994) und -unabhängig (Kullak-Ublick et al. 2001) aufgenommen.

Zwei weitere Mechanismen der Cholesterinausscheidung sind bedeutsam. ABCG5/ABCG8-Heterodimere (Graf et al. 2003), welche eine Hauptrolle im Phytosterolstoffwechsel spielen und apikal in Enterozyten lokalisiert sind, können freies Cholesterin direkt nach ihrer Aufnahme wieder ins intestinale Lumen ausscheiden (Duan, Wang & Wang 2004). Durch denselben Mechanismus geben Hepatozyten freies Cholesterin in die Gallenwege ab (Yu et al. 2002). Auch gibt es Hinweise darauf, dass das Jejunum in der Lage ist, Cholesterin aktiv zu sezernieren. Dieser Weg der Cholesterinausscheidung wird auch transintestinaler Cholesterinefflux (TICE) genannt. Über dessen Relevanz im humanen Cholesterinstoffwechsel herrscht aber im Gegensatz zum murinen Modell noch Unklarheit (van der Velde, Brufau & Groen 2010).

### 1.1.3. Regulation der Cholesterinhomöostase

Da Cholesterin einerseits essentiell für die regelrechte Membranfluidität einer jeden tierischen Zelle, andererseits insbesondere die Bereitstellung von intrazellulärem Cholesterin mit einem hohen Energieaufwand verbunden ist, gehört die Cholesterinbiosynthese zu einem der am stärksten regulierten Prozesse in der Zellbiologie. Darüber hinaus ist Cholesterin nahezu unlöslich in wässrigen Medien, so dass endogene Cholesterinbiosynthese und exogene Cholesterinzufuhr genau aufeinander abgestimmt sein müssen. Bereits vor fast 80 Jahren zeigte Rudolf Schönheimer im Mausmodell, dass die Cholesterinbiosynthese einem Feedback-Mechanismus unterliegt (Schoenheimer & Breusch 1933). 40 Jahre später konnte gezeigt werden, dass die HMG-CoA-Reduktase das regulierende Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese ist (Goldstein & Brown 1973) und stark von der rezeptorvermittelten Endozytose von LDL-Partikeln mit konsekutiver Freisetzung von Cholesterin abhängt (Brown & Goldstein 1986).

Cholesterin vermittelt seine inhibitorische Wirkung auf die eigene Biosynthese auf verschiedene Arten. Ein Mechanismus ist die Regulation der Transkription des LDL-Rezeptorgens und von Genen, welche an der Cholesterinbiosynthese beteiligt sind. Diese Gene besitzen in ihrer Promotorregion mehrere Kopien eines aus acht Nukleotiden bestehenden sogenannten Sterolregulationselement (SRE-1) (Smith et al. 1990). Das SRE-1 ist ein *enhancer* und bindet Transkriptionsfaktoren, die als *sterol response element binding proteins* (SREBP) bezeichnet werden, die in drei Isoformen vorkommen. Für die Regulation durch Cholesterin ist vor allem das SREBP-2 zuständig (Horton et al. 1998; Sakakura et al. 2001). Der molekulare Mechanismus der Aktivierung vom SREBP-2 ist komplex (Abbildung 2). Bei hohen intrazellulären Cholesterinkonzentrationen liegt das SREBP-2 als transmembranärer Komplex im ER mit einem weiteren Protein vor, welches als SREBP *cleavage-activating protein* (Scap) bezeichnet wird. Hier bindet der Komplex an ein als Insig-Protein (*insulin induced gene*) bezeichnetes Membranprotein (Yang et al. 2002). Sinkt der Cholesterinspiegel, löst sich der Scap/SREBP-2-Komplex von Insig und wird vesikulär zum Golgi-Apparat transloziert (Nohturfft, Brown & Goldstein 1998). Scap dient hierbei als Sterol-sensitiver Transporter des Komplexes. Im Golgi-Apparat trifft dieser Komplex auf die aktive Protease S1P, welche SREBP-2 luminal spaltet und somit zur Trennung des Scap/SREBP-2-Komplexes führt (Duncan et al. 1997). Dies ermöglicht einer weiteren Protease, S2P, mit dem SREBP-2-Residuum zu interagieren, wodurch der N-terminale Teil mit seiner funktionellen *basic-helix-loop-helix-leucine-zipper*(bHLH-zip)-Domäne vom

## 1 Einleitung

SREBP-2 als eigentlicher Transkriptionsfaktor freigesetzt wird und im Zellkern Gene aktiviert, die die Cholesterinaufnahme und -synthese kontrollieren (Rawson et al. 1997).

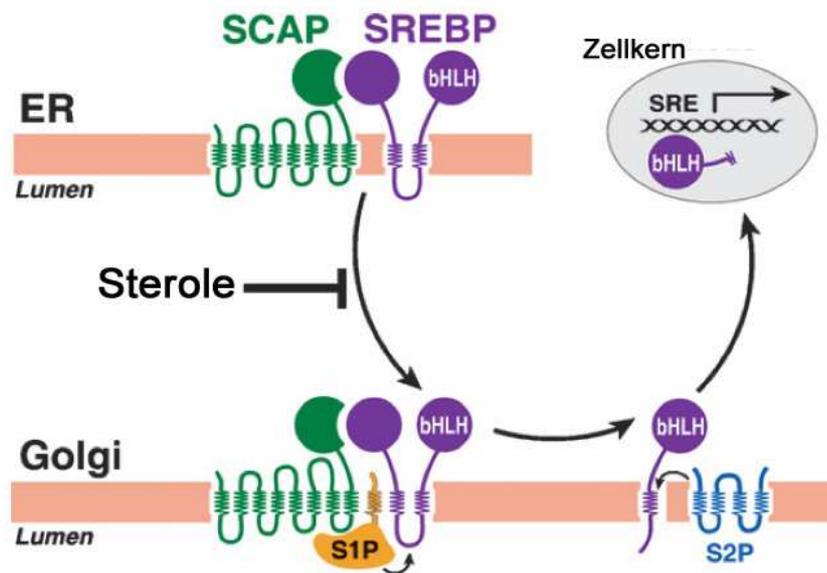


Abbildung 2: Schematische Darstellung des SREBP-Signalweges. Einzelheiten siehe Text (Brown & Goldstein 2009).

Weitere Untersuchungen der Gruppe um Goldstein und Brown haben in den vergangenen Jahren gezeigt, dass Oxysterole und Cholesterin auf verschiedenen Wegen mit dem Insig-Scap-SREBP-Komplex interagieren, jedoch zum gleichen Ergebnis führen (Radhakrishnan et al. 2004; Radhakrishnan et al. 2007). Bei hohen Sterolspiegeln verhindert eine Konformationsänderung innerhalb des Scap-Proteins, dass *coat protein complex II (CopII)-coated* Vesikel mit einer spezifischen Aminosäuresequenz (MELADL) des Scap-Proteins interagieren können und somit die Translokation vom ER in den Golgi-Apparat initiieren (Antonny & Schekman 2001; Espenshade, Li & Yabe 2002; Sun et al. 2007). Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass dieser Mechanismus in Abhängigkeit von der Cholesterinkonzentration des ER wie ein „An-Aus-Mechanismus“ funktioniert. Beträgt der Cholesteringehalt des ER weniger als 5% der Gesamtlipide des ER, so kommt es zur Translokation des Scap/SREBP-2-Komplexes in den Golgi-Apparat. Steigt die Konzentration auf über 5% an, kommt es zum plötzlichen Abbruch (Radhakrishnan et al. 2008). Des Weiteren führt eine Steroldepletion in der Zelle zur raschen Ubiquitylierung und Degradation von Insig-1, während eine Sterolakkumulation Insig-1 durch die Insig-Scap-Komplexierung stabilisiert (Gong et al. 2006). Ein weiterer Mechanismus der Cholesterinhomöostase ist die *feedback*-kontrollierte Proteindegradation des Schlüsselenzyms HMG-CoA-Reduktase. Hohe Sterolspiegel, insbesondere von Oxysterolen und Lanosterol,

## 1 Einleitung

führen zur Komplexierung der HMG-CoA-Reduktase und Insig. Dieser Schritt initiiert die Ubiquitylierung der HMG-CoA-Reduktase mit nachfolgender proteosomaler Degradation (Lange et al. 2008; Sever et al. 2003; Song, Sever & Bose-Boyd 2005).

### 1.2. Der Lipoproteinstoffwechsel

Da bei Lipiden die hydrophoben Eigenschaften überwiegen, ist ihr Transport im Blut in freier Form kaum möglich. Daher werden fast sämtliche Lipide durch spezifische Transportproteine – Lipoproteine – innerhalb des Blutplasmas befördert.

#### 1.2.1. Aufbau der Lipoproteine

Die im Plasma vorkommenden Lipoproteine können anhand verschiedener Kriterien eingeteilt werden. Die Namensgebung basiert entsprechend ihrer Dichte auf ihrem Verhalten in einer Ultrazentrifuge. Man unterscheidet dabei fünf Hauptklassen nach ansteigender Dichte: Chylomikronen (CM) mit  $< 0,95$  g/ml, VLDL mit  $< 1,006$  g/ml, *intermediate density lipoproteins* (IDL) mit  $< 1,019$  g/ml, LDL  $< 1,063$  g/ml und HDL mit einer Dichte bis 1,21 g/ml. Sie besitzen weiterhin sowohl einen unterschiedlichen Lipidgehalt als auch ein unterschiedliches Verhältnis von Lipiden zu Apolipoproteinen (APO). Letztere stellen Funktionsproteine der Lipoproteine dar, die der Interaktion mit verschiedenen Enzymen und Rezeptoren dienen. Während CM zu 98% aus Lipiden und nur ca. 2% APO bestehen, verändert sich das Verhältnis der Lipide gegenüber APO über VLDL und LDL sukzessive und weist bei den HDL-Partikeln nur noch einen Anteil von 55% Lipiden an der Gesamtmasse auf (Nelson & Cox 2006). Lipoproteine sind wie folgt aufgebaut (Abbildung 3): Im Inneren des Lipoproteins befinden sich apolare Lipide wie Triacylglycerine (TAG) und CE. Diese werden von einer Hülle amphiphiler Phospholipide umgeben, welche mit ihren nach außen gerichteten hydrophilen Gruppen den Transport im Plasma ermöglichen. In der äußeren Hülle befinden sich neben freien Cholesterinmolekülen auch APO. CM und VLDL sind relativ reich an TAG, während im Inneren der LDL und HDL CE überwiegen. Da APO einerseits der Stabilisierung eines Lipoproteins dienen, andererseits vielfältige Rezeptorfunktionen besitzen, kommt ihnen innerhalb des Lipoproteinstoffwechsels eine Schlüsselfunktion zu. Aus diesem Grund tragen die einzelnen Lipoproteinklassen spezifische APO-Muster, welche zu einem unterschiedlichen *targetting* und *sorting* der Lipoproteine

## 1 Einleitung

innerhalb des Stoffwechsels führen (vgl. 1.2.2). Einen Überblick der wichtigsten derzeit bekannten APO vermittelt Tabelle 2.

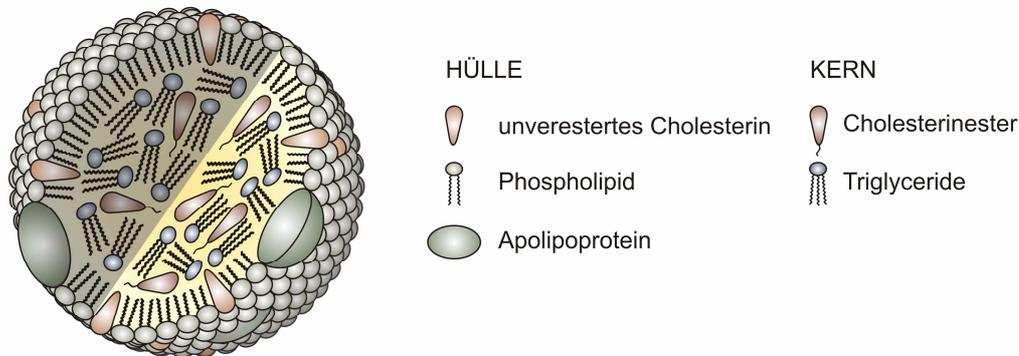


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung eines Lipoproteinpartikels (AntiSense 2010).

**Tabelle 2:** Klassifizierung und Funktion wichtiger APO im humanen Serum.

apo	Lipoprotein	Funktion	Referenz
A I	CM, HDL	Aktivator der LCAT Ligand von SR-BI	Fielding, Shore & Fielding 1972 Xu et al. 1997
A II	CM, HDL	Aktivator der hepatischen Lipase	Mowri et al. 1996
A IV	CM, HDL	TAG-Inkooperation in CM	Lu et al. 2006
B48	CM	strukturegebend	Kane, Hardman & Paulus 1980
B100	VLDL, LDL	Ligand des apoB100- Rezeptors	Attie, Pittman & Steinberg 1982
C I	CM, VLDL, HDL	Aktivator der LCAT Inhibitor des CETP	Albers, Lin & Roberts 1979 Sparks & Pritchard 1989
C II	CM, VLDL, HDL	Aktivator der LPL	Breckenridge et al. 1978
C III	CM, VLDL, HDL	Inhibitor der LPL	Wang et al. 1985
D	HDL	Modulator der LCAT strukturegebend	Steyrer & Kostner 1988 Blanco-Vaca et al. 1992
E	VLDL, HDL	Ligand des apoE- Rezeptors	Kowal et al. 1989

LCAT = Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase, SR-BI = Scavenger Rezeptor BI, CETP = Cholesterinester-Transferprotein, LPL = Lipoproteinlipase

### 1.2.2. Metabolismus und Funktion der Lipoproteine

#### 1.2.2.1. Metabolismus von Chylomikronen und VLDL

CM und VLDL gehören zu den triacylglycerinreichen Lipoproteinen. Während CM Nahrungslipide transportieren, sind VLDL vor allem für den Transport von endogen in der Leber synthetisierten TAG verantwortlich. Mit der Nahrung aufgenommene TAG werden durch die pankreatische Lipase hauptsächlich in Fettsäuren (FS) und Monoacylglycerole (MAG) gespalten, um absorbiert werden zu können. Diese Spaltprodukte wandern in den Enterozyten unmittelbar nach ihrer Aufnahme proteingebunden zum ER, da höhere Konzentrationen freier FS schnell zum Zelltod führen würden (Stralfors 1990). Im ER werden FS und MAG enzymatisch wieder zu TAG zusammengesetzt und in dort gebildete CM inkorporiert (Mansbach 1973; Yen & Farese, Jr. 2003). Wenn es zur intestinalen Aufnahme von hauptsächlich freien FS kommt, werden diese auch direkt über das Portalvenenblut zur Leber befördert und in dort synthetisierte VLDL-Partikel eingefügt (Mansbach et al. 1991). CM werden zunächst als PräCM in humanen Enterozyten in einem Zwei-Stufen-Prozess synthetisiert (Cartwright & Higgins 2001). An der Membran des ER wird ein primordiales CM hergestellt, welches hauptsächlich aus apoB48, Phospholipiden und Cholesterin besteht und von der Dichte mit einem HDL vergleichbar ist. Obligater Bestandteil ist das apoB48, dessen mRNA intestinal einem posttranskriptionalen mRNA *editing* des apoB-Gens unterliegt, wodurch ein vorzeitiges Stopp-Codon an Position 2153 eingefügt wird (Chen et al. 1987; Powell et al. 1987). Dieses primordiale CM liegt dann im ER-Lumen vor und wird daraufhin mit Partikeln, die reich an TAG und CE sind, durch das mikrosomale TAG-Transferprotein beladen (Wu et al. 1996). Danach erfolgt der Transport der PräCM zum Golgi-Apparat durch ein spezielles Transportvesikel (PCTV) (Siddiqi et al. 2003). Hier erfolgt die Implementation von apoAI (Siddiqi et al. 2006) und eine Veränderung des Glykosylierungsmusters von apoB48 (Berriot-Varoqueaux et al. 2001), bevor sie als finale CM per Exozytose die basolaterale Membran passieren (Sabesin, Clark & Holt 1977). Von hier gelangen sie über Lymphwege des Ductus thoracicus in das venöse Blut, wo sie sehr schnell ihre Konformation ändern und mit HDL-Partikeln apoC und apoE austauschen. Insbesondere die Translokation von apoCII führt dazu, dass die Lipoproteinlipase (LPL), welche im Endothel der Kapillaren und im extrahepatischen Gewebe lokalisiert ist, aktiviert wird und die Spaltung von TAG zu Glycerin und FS katalysiert (Redgrave 1970). Die FS werden anschließend vom umliegenden Gewebe aufgenommen und verstoffwechselt. Auf

## 1 Einleitung

diesem Weg werden bis 90% der TAG abgebaut. Gleichzeitig werden Cholesterin und apoAI auf HDL-Vorstufen übertragen. Infolge der Lipolyse entstehen die kleineren *CM-remnants*, welche in der Lage sind, durch das fenestrierte Endothel der Leber in den Disse-Raum zu gelangen (Fraser, Dobbs & Rogers 1995). Dort kommt es zur apoE-vermittelten Sequestrierung (Ji et al. 1993) und zur erneuten Lipolyse durch die hepatische Lipase (HL), bevor die Internalisierung durch den LDL-Rezeptor (LDLR) und das *LDL-receptor related protein* (LRP) erfolgt (Willnow 1997). *CM-remnants* werden zum Teil aber auch extrahepatisch aufgenommen. Man betrachtet sie unter anderem als einen möglichen Faktor in der Pathogenese der Atherosklerose, da sie ohne vorherige Modifikation von Makrophagen aufgenommen werden und zur Schaumzellbildung führen können (Batt et al. 2004; Fujioka, Cooper & Fong 1998; Napolitano et al. 2001).

Die Synthese der VLDL in der Leber ist prinzipiell mit der Synthese von CM in Enterozyten vergleichbar. Unterschiede sind vor allem durch die Ausstattung der APO gekennzeichnet. Das apoB-Gen wird in der Leber komplett translatiert und bildet das apoB100. Dessen Assoziierung mit hepatisch synthetisierten TAG und CE erfolgt am rauhen ER und bildet das Prä-VLDL (Bostrom et al. 1988; Rustaeus et al. 1998). Danach erfolgt im Golgi-Apparat die Zusammensetzung mit apoCI-CIII und apoE zum VLDL. Bei niedrigem Lipidgehalt des Cytosols erfolgt die Sekretion von TAG-armen VLDL<sub>2</sub>. Ist der Lipidgehalt erhöht, so kommt es im Golgi-Apparat zu einer erneuten Beladung des Partikels mit Lipiden und zur Sekretion von TAG-reichen VLDL<sub>1</sub> (Gibbons, Islam & Pease 2000; Stillemark-Billton et al. 2005). Diese additive Lipidierung wird durch das Protein *ADP-ribosylation factor 1* reguliert (Asp et al. 2005). Neben der Regulierung der VLDL-Synthese durch die hepatische Bereitstellung von TAG konnte auch gezeigt werden, dass die endogene Cholesterinbiosynthese die VLDL-Synthese beeinflusst und Statine als Inhibitoren der Cholesterinbiosynthese zur verminderten VLDL-Synthese führen (Ginsberg et al. 1987; Khan, Wilcox & Heimberg 1989). Im Plasma kommt es dann infolge von Interaktionen mit HDL-Partikeln zur Anreicherung von apoCII und apoE. Ersteres bewirkt im extrahepatischen Gewebe die Aktivierung der LPL, wodurch es zum Abbau der VLDL zu IDL und VLDL-*remnants* kommt. Aus IDL werden dann LDL gebildet (vgl. 1.2.2.2.). VLDL-*remnants* hingegen werden ähnlich wie *CM-remnants* apoE-vermittelt in der Leber aufgenommen (Hussain et al. 1991).

### 1.2.2.2. Metabolismus von LDL und HDL

LDL werden in einer metabolischen Kaskade durch die Einwirkung der LPL und der HL aus VLDL über das Zwischenprodukt IDL gebildet. Die Umwandlung von IDL zu LDL ist apoE-vermittelt und führt zum Verlust der apoE-Partikel auf den entstehenden LDL (Ehnholm et al. 1984). Bei niedrigen Spiegeln an TAG können LDL auch direkt von der Leber synthetisiert werden (Gaw et al. 1995). LDL sind cholesterinreich, besitzen nur apoB100 und dienen dazu extrahepatisches Gewebe mit Cholesterin zu versorgen. Die Aufnahme geschieht rezeptorvermittelt über Endozytose. ApoB100 dient als Ligand für den LDLR, welcher in sogenannten *coated pits* akkumuliert, um ein LDL-Partikel aufzunehmen (Anderson, Brown & Goldstein 1977; Anderson, Goldstein & Brown 1976). Nach Internalisierung des LDL wird es dem Lysosom zugeführt und dort hydrolysiert, während die LDLR zügig recycelt und zur Zellmembran zurückgeführt werden (Brown, Anderson & Goldstein 1983; Goldstein, Brunschede & Brown 1975). Frei werdendes Cholesterin wirkt über den SREBP-Signalweg regulatorisch auf die intrazelluläre Cholesterinhomöostase. Die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase wird multimodal supprimiert, die Transkription des LDLR-Gens unterdrückt (vgl. 1.1.3.) und die ACAT aktiviert, um Cholesterin in seiner Esterform zu speichern (Brown, Dana & Goldstein 1975). Statine führen aufgrund dieser Mechanismen und ihrer Inhibition der vornehmlich hepatischen HMG-CoA-Reduktase zu einer verstärkten LDLR-Expression auf Membranen der Hepatozyten und konsekutiv zu niedrigeren LDL-Plasmaspiegeln (Brown & Goldstein 2004). Werden LDL-Partikel nicht endozytotisch aufgenommen, so können sie bei Störung der endothelialen Barrierefunktion in die Intima von Gefäßen einwandern und dort zu Atherosklerose führen (vgl. 1.3.2.2.). Wie VLDL sind auch LDL nicht homogen. Insbesondere eine höhere VLDL<sub>1</sub>-Konzentration (Packard & Shepherd 1997) führt über das Cholesterinester-Transferprotein (CETP) zur Bildung von TAG-reichen, CE-armen LDL (Eisenberg 1985), die ein präferiertes Substrat der HL darstellt. Die resultierende Lipolyse führt zu *small dense*-LDL (sdLDL), die aufgrund einer veränderten apoB100-Konformation einerseits eine geringere Affinität zum LDLR zeigen und somit länger im Blut zirkulieren können (Nigon et al. 1991), andererseits vermehrt mit Proteoglykanen in der Arterienwand interagieren (Anber et al. 1996). Da sie auch stärker als andere LDL-Partikel für Oxidierungsprozesse empfänglich sind, wird ihr atherogenes Potential als besonders hoch eingeschätzt (Tribble et al. 1992).

HDL bilden die vierte Gruppe der bekannten Lipoproteine. Diese sind reich an Cholesterin bzw. CE und werden als das zentrale Lipoprotein betrachtet, welches den reversen Transport

## 1 Einleitung

von überschüssigem Cholesterin (RCT) im peripheren Gewebe zur Leber vermittelt. Die Gruppe der HDL-Partikel ist sehr heterogen. HDL unterscheiden sich dabei insbesondere in ihrer Dichte und Größe, aber auch in ihren elektrophoretischen Eigenschaften und im Vorhandensein unterschiedlicher APO (Lund-Katz et al. 2003). Nach derzeitigem Stand der Forschung stellen lipidfreie, in der Leber synthetisierte apoA-I die Grundlage für HDL-Moleküle dar (Zannis et al. 1985). apoA-I interagiert mit ABCA1, einem Mitglied der *ATP Binding Cassette* Transporter Familie, welches auf Hepatozyten und peripheren Zellen einschließlich Makrophagen exprimiert wird. Dies führt in der Leber zu einer Beladung mit Phospholipiden und freiem Cholesterin (FC) und somit zur Bildung discoidaler HDL-Partikel (Timmins et al. 2005). Der ABCA1-vermittelte Cholesterinausstrom geschieht vermutlich zweistufig, wie Funktionsanalysen mit Mutationen innerhalb des ABCA1-Gens zeigten. Zunächst kommt es zur Bildung eines engen Komplexes zwischen ABCA1 und apoA-I, danach erfolgt der aktive ABCA1-vermittelte Transfer von Cholesterin (Chambenoit et al. 2001; Fitzgerald et al. 2002).

Weiterhin führt apoA-I zur Bindung und Aktivierung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), welche das FC der discoidalen HDL-Partikel zu CE umwandelt (Fielding, Shore & Fielding 1972). Diese wandern in das apolare Zentrum des HDL-Partikels. Wird genügend FC auf diesem Weg aufgenommen, so kommt es durch die Anreicherung von CE im Kern zur Konformationsänderung und Ausbildung reifer, sphärischer HDL-Partikel in der Peripherie, welche dann nicht mehr mit ABCA1 interagieren (Oram & Vaughan 2000; Wang et al. 2000). Makrophagen besitzen mit ABCG1 und dem Scavenger Rezeptor BI (SR-BI) noch weitere Möglichkeiten FC auf sphärische HDL zu übertragen. (vgl. auch Kapitel 1.3.2.2.) Im Blut kommt es nachfolgend zu vielen Wechselwirkungen mit anderen Lipoproteinen. Das benötigte Phosphatidylcholin für die Umwandlung von FC zu CE erhält die LCAT über das Phospholipid Transfer Protein aus VLDL (Tall et al. 1985). Andererseits werden CE über das CETP von HDL auf LDL und VLDL übertragen (Tall 1995). Inwiefern das CETP damit den RCT beeinflusst, ist noch ungeklärt und Fokus der aktuellen Forschung. HDL-Cholesterin (HDL-C) wird schließlich zweistufig über den Rezeptor SR-BI (vgl. Kapitel 1.3.2.2.) in die Hepatozyten aufgenommen und fließt dort in verschiedene Stoffwechselwege ein (Ueda et al. 1999). Große HDL-Partikel binden hierbei besser an SR-BI und geben mehr Cholesterin an die Hepatozyten ab (Thuahnai et al. 2004). Die Rolle von HDL innerhalb des Lipidstoffwechsels insbesondere bei der Entstehung von Krankheiten ist noch nicht abschließend geklärt. Zwar gibt es aus epidemiologischen Untersuchungen seit langem stichhaltige Nachweise, dass ein erhöhter Plasmaspiegel von HDL mit geringerem Risiko für

## 1 Einleitung

kardiovaskuläre Erkrankungen verbunden ist (Gordon et al. 1977), aber verschiedene experimentelle Modelle in Maus und Mensch, um den RCT quantitativ zu messen, zeigen bisher keinen sicheren Hinweis auf eine direkte Korrelation zwischen HDL-C-Plasmaspiegeln und dem RCT (Rader et al. 2009; Schwartz et al. 1978). Auch gibt es keinen zuverlässigen direkten Hinweis darauf, dass HDL zu einem messbaren Cholesterinefflux aus der Arterienwand führt (Vergeer et al. 2010). Vielmehr gibt es Anzeichen, dass das HDL eine direkte protektive Rolle in inflammatorischen und oxidativen Prozessen spielt und somit gefäßprotektiv wirkt (Ansell et al. 2003; Navab et al. 2001). Aber auch diese Untersuchungen fanden bisher fast ausschließlich *in vitro* statt und konnten *in vivo* noch nicht repliziert werden.

### 1.3. Atherosklerose – eine multifaktorielle Erkrankung

#### 1.3.1. Risikofaktoren der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung der großen und mittelgroßen Arterien. Sie verläuft über lange Zeit asymptomatisch und manifestiert sich zumeist erst klinisch in ihren Endpunkten akutes Koronarsyndrom, Schlaganfall, Aneurysmabildung und peripher arterielle Verschlusskrankheit. In Deutschland stellen Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems weiterhin mit 41,7% bzw. 356 462 Sterbefällen die häufigste Todesursache dar. Davon entfallen fast 74 000 Fälle auf die chronisch ischämische Herzkrankheit, ca. 53 000 auf den akuten Myokardinfarkt (Statistisches Bundesamt 2010a). Die direkten Kosten der Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems beliefen sich 2006 in Deutschland auf 16 879 Millionen Euro (Statistisches Bundesamt 2010b).

Das Lebenszeitrisko eines 50-jährigen Menschen einer westlichen Industrienation, der bis dahin keine klinische Manifestation einer Atherosklerose aufwies, an einer koronaren Herzkrankheit zu erkranken bzw. aufgrund eines Endpunktes der Atherosklerose zu versterben, wurde in der Framingham Herzstudie mit 51,7% für Männer bzw. 39,2% für Frauen berechnet (Lloyd-Jones et al. 2006). Anhand von vielen epidemiologischen Studien konnten bis zum heutigen Tag zahlreiche Risikofaktoren identifiziert werden. Von diesen sind in der Wissenschaft weitestgehend anerkannte Faktoren Bestandteil zahlreicher Behandlungsleitlinien (Tabelle 3).

## 1 Einleitung

**Tabelle 3:** Aufstellung von Risikofaktoren der Atherosklerose nach ATP III Leitlinien (NCEP ATP III 2002).

Risikofaktor	Referenz
Bluthochdruck	Kannel 1996
Diabetes mellitus	Kannel & McGee 1979
Exposition zu Tabakrauch	Law, Morris & Wald 1997
familiäre Disposition	Barrett-Connor & Khaw 1984
Alter	Wilson et al. 1998
LDL-Cholesterin (LDL-C)	Cremer et al. 1997
HDL-C	Gordon et al. 1989

Diese Risikofaktoren finden seit längerem Anwendung in der Berechnung verschiedener Risikoscores, wie z.B. dem Framingham Score (Wilson et al. 1998), dem European Systematic COronary Risk Evaluation (SCORE) algorithm (Conroy et al. 2003) oder dem PROCAM Score (Assmann, Cullen & Schulte 2002), welche der Risikostratifizierung und der damit verbundenen therapeutischen Interventionen dienen.

Weiterhin gibt es Hinweise, dass erhöhte Serumspiegel von Homocystein, Fibrinogen, Lipoprotein (a) und C-reaktivem Protein (CRP) als Riskofaktoren für Atherosklerose eine wichtige Rolle spielen könnten. Ein abschließender Konsens über deren Einfluss, welcher sich in Leitlinien niederschlägt, steht aber aus. Neben den genannten Faktoren sind derzeit außerdem verschiedene Zusammenstellungen multipler plasmatischer Biomarker im Fokus der wissenschaftlichen Diskussion, welche eine zusätzliche prognostische Aussage über klinische Endpunkte der Atherosklerose liefern könnten (Zethelius et al. 2008).

Unter allen Risikofaktoren spielt die Hypercholesterinämie als eigenständiger Kausalfaktor eine herausragende Rolle. Daher gibt es zahlreiche Empfehlungen, Patienten mit erhöhten LDL-C-Plasmaspiegeln oder erhöhtem Gesamtcholesterin frühzeitig Statine zu verabreichen, wenn das 10-Jahres-Risiko des Auftretens klinischer Endpunkte der Atherosklerose erhöht ist (Graham et al. 2007; Grundy et al. 2004). Grundlage für diese Empfehlungen bilden zahlreiche Interventionsstudien, welche zweifelsfrei eine Reduktion der Mortalität durch die Gabe von Statinen bei hypercholesterinämischen Patienten aufweisen (Cannon et al. 2004; Gould et al. 1998; Smith & Pekkanen 1994).

### 1.3.2. Einfluss des Cholesterins auf die Pathogenese der Atherosklerose

#### 1.3.2.1. Endotheldysfunktion

Es ist heutzutage weitestgehend anerkannt, dass eine Fettstoffwechselstörung die Grundlage für die Entstehung der Atherosklerose bildet. In den letzten Jahren haben sich allerdings viele Hinweise ergeben, dass die darauf folgende lokalisierte Inflammationsreaktion einen entscheidenden Modulator für die weitere Ausbildung einer atherosklerotischen Läsion darstellt (Ross 1999). Bereits Rudolf Virchow beschrieb die Atherosklerose als eine proliferative Reaktion, welche durch eine Schädigung der Intima der Arterienwand initiiert wird (Virchow 1858). Auch heute hat diese Grundlage weiterhin Bestand, wenn gleich sie aber mittlerweile durch die „*response to injury*“ Hypothese weiter präzisiert wurde (Ross 1986; Ross 1993; Ross, Glomset & Harker 1977). Diese betont vielmehr die endotheliale Dysfunktion als Auslöser der Atherosklerose, deren Ursache erhöhte LDL-C-Plasmaspiegel und modifizierte LDL-Partikel, aber auch freie Radikale infolge von Zigarettenrauch, Bluthochdruck und Diabetes mellitus sein können. Als weitere mögliche auslösende Faktoren werden erhöhte Homocysteinspiegel im Plasma (Dudman et al. 1991) als auch infektiöse Mikroorganismen wie Herpesviren (Hajjar et al. 1987) und Chlamydia pneumoniae (Muhlestein et al. 1996) betrachtet. Auch ein generelles Ungleichgewicht von Vasodilatoren und Vasokonstriktoren kann zur Endotheldysfunktion führen (Lerman & Burnett 1992). Vor allem die Verminderung der Stickstoffmonoxid(NO)-Synthese führt zur weiteren Progression der Dysfunktion zur Atherosklerose (Oemar et al. 1998). Oxidativer Stress, insbesondere durch oxidierte LDL-Partikel und freie Radikale durch Zigarettenrauchen, führt zu einer abnormalen Vasomotorik, Einschränkung der Barrierefunktion und vor allem zur vermehrten Bildung von Endothelin und Adhäsionsmolekülen (Davi et al. 1998; Lerman et al. 1993).

#### 1.3.2.2. Von der Endotheldysfunktion zur Schaumzellbildung

Infolge der Störung der Barrierefunktion des Endothels kommt es zu einer verstärkten Einwanderung von Lipidpartikeln in den subendothelialen Raum. Circa 90% wandern dabei durch Transzytose ein, welche auf Partikelgrößen von < 70 nm Durchmesser beschränkt ist (Simionescu & Simionescu 1993). Gemäß der „*response to retention*“ Hypothese (Williams & Tabas 1995) führt die Einwanderung von LDL-Partikeln zu einer lokalen Synthese APO B bindender Moleküle, welche zu einer progredienten Akkumulation von LDL führen. Daneben

## 1 Einleitung

bewirkt die lokale Aktivität von Sphingomyelinasen die Bildung von LDL-Mikroaggregaten (Xu & Tabas 1991), welche einerseits aufgrund ihrer Größe das Endothel nicht passieren können, andererseits durch glatte Muskelzellen und Makrophagen – insbesondere durch das LRP – aufgenommen werden und die Schaumzellbildung unterstützen (Vijayagopal et al. 1992).

Ein entscheidender Pathomechanismus stellt in diesem Zusammenhang die Oxidation von LDL im subendothelialen Raum dar (Steinberg et al. 1989), welche nachfolgend über eine Vielzahl von SR in Makrophagen aufgenommen werden (Goldstein et al. 1979). Während im Plasma zahlreiche Antioxidantien vorhanden sind (Frei, Stocker & Ames 1988), können im subendothelialen Raum Oxidantien auf die LDL-Partikel einwirken und funktionell unterschiedliche Modifikationen bewirken. Da die meisten Oxidantien sehr reaktionsfreudig sind und daher nur kurz existieren, ist der Nachweis schwierig. Es gibt Hinweise darauf, dass die lokale Aktivität der NAD(P)H-Oxidase und deren Produktion von  $O_2^-$  eine wichtige Rolle spielt (Guzik et al. 2000). Ebenso könnten die Myeloperoxidase (Malle et al. 2000) und Lipoxygenasen (Yla-Herttuala et al. 1990) die Oxidation von LDL zu *minimal oxidized* LDL (mmLDL) fördern, welches dann zu oxidiertem LDL (oxLDL) umgewandelt wird. Schließlich könnte auch eine „Entkopplung“ der endothelialen NO-Synthase z.B. im Rahmen der Hypercholesterinämie zu oxidativem Stress in der Gefäßwand führen (Pritchard, Jr. et al. 1995), indem statt der üblichen Oxidation von L-Arginin molekularer Sauerstoff reduziert wird und somit reaktive Sauerstoff-Spezies entstehen (Vasquez-Vivar et al. 1998).

Ein zweiter Mechanismus der Pathogenese der frühen Atherosklerose stellt die Akkumulation von Leukozyten dar, welche bereits wenige Wochen nach Beginn einer Hypercholesterinämie in die Intima einwandern (Gimbrone, Jr. 1995). Akkumuliertes oxLDL aktiviert die Expression von Molekülen wie z.B. P- und E-Selektin in den Endothelzellen, welche die Adhäsion und nachfolgende Transmigration der Leukozyten initiieren (Cybulsky & Gimbrone, Jr. 1991; Varki 1994). Letztere wird vor allem durch Chemokine gesteuert, welche am Ort der Endotheldysfunktion vermehrt vom Endothel synthetisiert werden und modifizierte LDL z.B. für MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) als Stimulus fungieren (Cushing et al. 1990; Han et al. 1999; Yla-Herttuala et al. 1991).

Nachdem Monozyten in die Intima migriert sind, differenzieren diese unter dem Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren – insbesondere dem mitogenen *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) – zu Makrophagen. Makrophagen spielen in der frühen atherosklerotischen Läsion eine entscheidende Funktion, da sie über die Aufnahme von oxLDL einen großen Einfluss auf die lokale Cholesterinhomöostase ausüben und diese zu

## 1 Einleitung

Schaumzellen transformieren, welche die weitere Progression von der frühen Läsion zum Plaque triggern. Die Aufnahme des oxLDL wird durch SR vermittelt (Goldstein et al. 1979). Molekulares Klonen und biochemische Analysen haben gezeigt, dass es sich hierbei um eine sehr große Gruppe von Rezeptoren handelt mit z.T. großen unterschiedlichen Eigenschaften in der Ligandenbindung (Krieger & Herz 1994). Allen gemeinsam ist aber die hohe Affinität zu chemisch veränderten LDL-Partikeln (Horkko et al. 2000). Da sie im Gegensatz zum LDLR keiner *feedback*-Inhibition unterliegen, führen sie zur unkontrollierten endozytotischen Aufnahme von oxLDL in Makrophagen und letztendlich zur Schaumzellbildung.

SR der Makrophagen (MSR) lassen sich in Klassen A bis F einteilen. Rezeptoren der Klasse A (MSR-A) sind bisher am besten untersucht. Im Mausmodell führt M-CSF zur selektiven Hochregulierung von MSR-A und verstärkter Aufnahme von oxLDL (de Villiers et al. 1994). Weiterhin konnte im Mausmodell nachgewiesen werden, dass MSR-A für mehr als die Hälfte der Aufnahme modifizierter LDL-Partikel in Makrophagen sorgt und MSR-A Knockout-Mäuse im apoE <sup>-/-</sup> und LDLR <sup>-/-</sup> Mausmodell signifikant geringere atherosklerotische Läsionen aufweisen (Babaev et al. 2000; Suzuki et al. 1997). Andererseits führt die geringere Verweildauer von oxLDL zu einer verminderten Aktivierung des Endothels, weswegen den MSR-A auch anti-atherogene Eigenschaften zugesprochen werden (Teupser et al. 1999; Whitman et al. 2002). Eine weitere Gruppe stellen SR der Klasse B dar, zu denen insbesondere CD36 und SR-BI gehören. Es hat sich herausgestellt, dass CD36 multiple Liganden – unter ihnen modifizierte LDL-Partikel – bindet (Febbraio, Hajjar & Silverstein 2001). In einem Doppel-Knockout-Mausmodell mit apoE <sup>-/-</sup> und CD36 <sup>-/-</sup> konnte eine Reduktion der Größe atherosklerotischer Läsionen von 70% nachgewiesen werden (Febbraio et al. 2000). In transgenen Mäusen, deren Makrophagen weder MSR-A noch CD36 exprimierten, konnte gezeigt werden, dass diese beiden Rezeptorklassen für ca. 90% der Aufnahme modifizierter LDL-Partikel stehen und deren Fehlen nicht durch andere MSR kompensiert werden kann (Kunjathoor et al. 2002). SR-BI hingegen bindet nicht nur typische MSR-Liganden sondern auch native HDL-Partikel und erleichtert den RCT von Makrophagen über HDL zur Leber (Acton et al. 1996; Trigatti, Krieger & Rigotti 2003). Die Bedeutung dieser Funktion im Vergleich zu den anderen MSR wird durch Mausstudien verdeutlicht in denen z.B. eine hepatische Überexpression von SR-BI in LDLR <sup>-/-</sup> Mäusen zu einer Reduktion der Plaquegröße unter milder Hypercholesterinämie um 80% führte (Arai et al. 1999).

Um eine Schaumzellbildung zu verhindern, spielen Cholesterineffluxmechanismen eine wichtige Rolle. Unter anderem wird apoE für diesen Zweck von Makrophagen vor allem in

## 1 Einleitung

frühatherosklerotischen Läsionen synthetisiert (Rosenfeld et al. 1993) und vermittelt den reversen Transport von Cholesterol auf HDL. Die anti-atherosklerotische Wirkung von apoE v.a. auf die Plaquegröße ist hierbei größtenteils unabhängig von seinen Effekten auf Plasmalipidspiegel (Boisvert & Curtiss 1999; Fazio et al. 1997). Erwähnenswert ist hierbei, dass der apoE-Genotyp einen wichtigen Einfluss auf die Effizienz des Cholesterinefflux besitzt. apoE4/4 Makrophagen zeigen im Vergleich zu E2/2 und E3/3 eine signifikante Verringerung des Effluxes (Cullen et al. 1998). Neben apoE wird der Cholesterinefflux aus Makrophagen durch ABCA1 und ABCG1 vermittelt. Lipidfreie apoA-I-Moleküle stellen den Ursprung für die HDL-Bildung dar und werden von Makrophagen sequentiell zunächst von ABCA1 (vgl. 1.2.2.2.) später auch von ABCG1 mit Cholesterin beladen (Gelissen et al. 2006; Vaughan & Oram 2006). Die Zunahme von atherosklerotischen Plaques konnte im Mausmodell mittels Knochenmarktransplantation von ABCA1- bzw. ABCG1-defizienten Makrophagen gezeigt werden (Aiello et al. 2002; Out et al. 2006). Die Bedeutung des ABCA1-Transporters schlägt sich auch in der Tangier-Erkrankung nieder. Die Patienten besitzen einen ABCA1-Funktionsdefekt aufgrund einer Genmutation (Rust et al. 1999) und entwickeln häufig frühzeitig eine diffuse Atherosklerose.

Die weitere Progression der frühatherosklerotischen Läsion zum manifesten Plaque wird durch die Ausschüttung verschiedener Mediatoren seitens der Schaumzellen in der Intima getriggert. Insbesondere der *platelet derived growth factor* (PDGF) führt zu einer Einwanderung von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima, welche im folgenden extrazelluläre Matrixproteine bilden und somit die Plaque-Bildung fördern. Auch die Migration von T-Lymphozyten aus dem Gefäßlumen, welche eine komplexe Entzündungsreaktion in der Arterienwand bewirken, wird durch Schaumzellen gefördert.

## 1 Einleitung

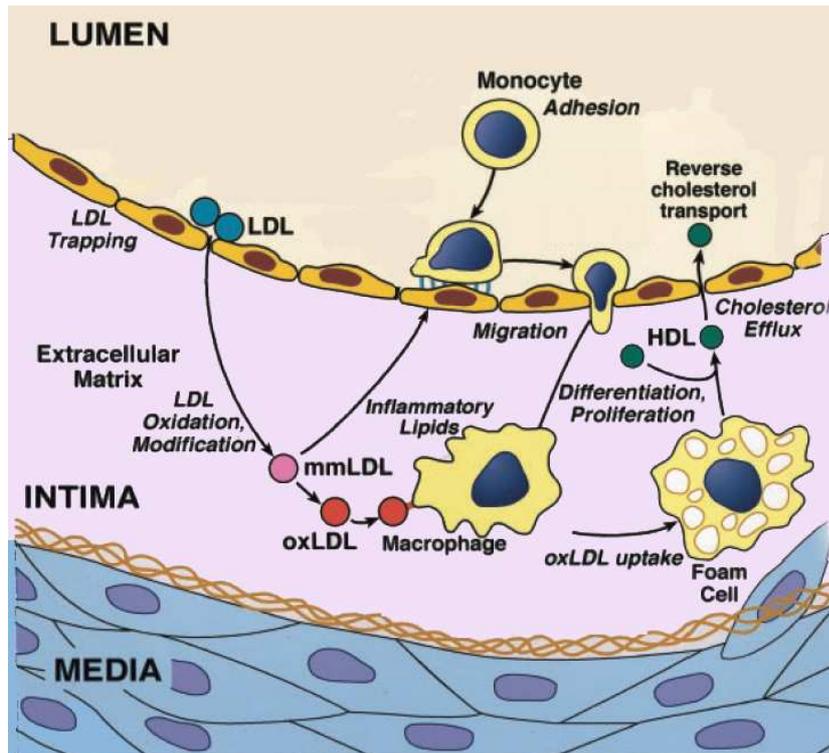


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Schaumzellbildung, Abkürzungen siehe Text, modifiziert nach (Lusis, Fogelman & Fonarow 2004).

### 1.4. Strategien zur Untersuchung genetischer Risikofaktoren

Unterschiede in einem bestimmten Phänotyp zwischen zwei Individuen können aufgrund von genetischen und umweltbedingten Faktoren entstehen. Heritabilität ist der Anteil einer phänotypischen Variation, der aufgrund genetischer Faktoren erklärt werden kann. Um diesen Anteil für einen Phänotyp zu messen, kann man unterschiedliche Ansätze wählen. Diese Untersuchungen nennt man Heritabilitätsstudien. Anfangs wurden in der Regel Zwillingsstudien für die Untersuchung eines Phänotyps verwendet, da hier der Grad der genetischen Gemeinsamkeit als bekannt vorausgesetzt werden kann. Ähneln sich monozygote Zwillinge in einem bestimmten Phänotyp stärker als dizygote (Konkordanzrate), so ist dies ein Hinweis für eine starke genetische Beeinflussung des zu untersuchenden Merkmals. In mehreren Ländern konnte auf diese Art eine erbliche Disposition für die Entwicklung von Atherosklerose gezeigt werden. Eine Auswertung des dänischen (Hauge et al. 1968) als auch des schwedischen (de Faire 1974) und norwegischen (Berg 1981) Zwillingsregister erbrachte stets eine signifikant höhere Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen für die Atherosklerose.

## 1 Einleitung

Da unterschiedlich hohe Cholesterinspiegel im Blut einen wichtigen Risikofaktor in der Entstehung der Atherosklerose darstellen, war auch dieser Phänotyp früh von Interesse und es konnte gezeigt werden, dass der Cholesterinspiegel im Blut wesentlich stärker genetisch als sozio-ökonomisch vermittelt wird. So wurde z.B. in einer schwedischen Untersuchung verheirateter Zwillinge und deren Kernfamilien der Anteil der Heritabilität für Gesamtcholesterin mit 50% ermittelt, der sozio-ökonomische Einfluss machte hingegen nur 4% aus (Dahlen et al. 1983). Die Relevanz der genetischen Komponente für Gesamtcholesterin – aber auch dessen Teilkomponenten – wurde in den folgenden Jahren durch weitere Zwillings- und Familienuntersuchungen bestätigt (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Auswahl von Zwillings- oder Familienuntersuchungen zur Bestimmung der Heritabilität des Plasmacholesterinspiegels.

Ethnische Herkunft	Cholesterin	Heritabilität	Referenz
japanisch	Gesamt	60%	Mimura 1975
unterschiedlich	Gesamt	30 – 54%	Friedlander et al. 1982
europäisch und japanisch		55 – 63%	Rao et al. 1983
unterschiedlich	LDL	88%	Austin et al. 1987
	HDL	66 %	
europäisch	Gesamt	42 – 65%	Hunt et al. 1989
	HDL	45 – 51%	

Die Aufklärung biochemischer Prozesse und neue genetische Untersuchungsmethoden eröffneten die Möglichkeit der Untersuchung von Kandidatengenen. Allerdings konnte hiermit nur ein kleiner Teil der beobachteten Variationen von Cholesterinspiegeln demonstriert werden (erklärte Varianz). Während diese Methoden in der Aufdeckung von monogenetisch vererbten Krankheiten, welche Mendel'schen Regeln folgen, sehr erfolgreich waren (Jimenez-Sanchez, Childs & Valle 2001), haben sie in der Aufklärung der Dyslipidämie nur wenig Erkenntnisse liefern können. Dies liegt insbesondere daran, dass die Dyslipidämie zu den komplexen genetischen Erkrankungen gehört und nur in Ausnahmefällen durch einen monogenetischen Defekt mit hoher Penetranz verursacht wird. Ein seit langem bekanntes Beispiel hierfür ist der LDLR-Defekt, welcher bereits in der Kindheit zu sehr hohen LDL-C-Konzentrationen im Serum führt (Hobbs, Brown & Goldstein 1992). In der Regel beeinflusst jedoch eine Vielzahl genetischer Varianten mit geringen Einzeleffekten innerhalb unterschiedlicher, teils noch unbekannter biologischer Stoffwechsel- oder Signalwege die

## 1 Einleitung

Ausprägung des Phänotyps gemäß der *common variant – common disease* Hypothese. Des Weiteren ist das Spektrum des Manifestationsalters und des Ausmaßes der Symptome wesentlich größer. Diese Eigenschaften erforderten neue Untersuchungsansätze. Daher wurde das Konzept der genomweiten Assoziationsstudie (GWA) in die Praxis eingeführt, um hereditäre Faktoren komplex vererbter Krankheiten aufzudecken (Lander & Schork 1994; Risch & Merikangas 1996).

### 1.4.1. Von Kandidatengenstudien zu genomweiten Assoziationsstudien

Kandidatengenstudien sind hypothesenbasierte Untersuchungen (Tabelle 5), deren Grundlage der zum jeweiligen Zeitpunkt aktuelle Wissensstand über die Pathophysiologie einer Krankheit ist. Allerdings können durch diese auch im Fall einer breitgefassten Arbeitshypothese (z.B. Untersuchung eines gesamten Signalweges) nur ein Bruchteil möglicher Risikofaktoren multifaktoriell bedingter Krankheiten identifiziert werden (Hirschhorn & Daly 2005).

**Tabelle 5:** Konzeptionelle Gegenüberstellung von hypothesenbasierten und hypothesenfreien Untersuchungen zur Aufklärung hereditärer Ursachen eines Phänotyps.

Untersuchungsansatz	hypothesenbasiert	hypothesenfrei
vorausgehend benötigte Information	physiologische Funktion des Gens	keine
mögliche Erkenntnis	Klärung der Ausgangshypothese	Potentielle Informationen über bekannte und neue pathophysiologische Zusammenhänge
Testbreite	auf das Zielgen beschränkt	gesamtes Genom
Kosten	eher gering	hoch

Untersuchungen zur Dyslipidämie konnten beispielsweise nur solche Gene als Risikofaktoren identifizieren, wenn Mutationen innerhalb dieser Gene zu seltenen – phänotypisch stark ausgeprägten – monogenetischen Krankheitsbildern führten (Tabelle 6). Des Weiteren wurden diese Studien oft als Fall-Kontroll-Studien konzipiert. Ungleiche Verteilungen der Studienprobanden bezüglich ihrer ethnischen Herkunft zwischen Fall- und Kontroll-Kohorten haben womöglich dazu geführt, dass sich die Allelverteilung nicht aufgrund einer Assoziation zur Krankheit unterschied. Dies führte schließlich zu falsch positiven Assoziationen in einer

## 1 Einleitung

Studie, welche in einer zweiten davon unabhängigen Studie nur selten repliziert werden konnten. Ein Beispiel hierfür ist die vermeintliche Assoziation zwischen Alkoholismus und Variationen innerhalb des D2-Dopaminrezeptor-Locus (Gelernter, Goldman & Risch 1993). Ein weiteres Problem der frühen Kandidatengenstudien bestand in der unzureichenden Abdeckung der untersuchten Polymorphismen innerhalb eines Gens und deren unterschiedliches *Linkage Disequilibrium* (LD; deutsch: Kopplungsungleichgewicht) zueinander. Dies führte zum einen dazu, dass oft nicht der kausale Genpolymorphismus untersucht wurde. Zum anderen kam es vor, dass das LD des signifikanten Polymorphismus zum kausalen Allel in der einen Studie ein anderes war als in einer weiteren Studie, wodurch eine Replikation des Ergebnisses nicht gelang (Hirschhorn et al. 2002).

**Tabelle 6:** Aufstellung genetischer Risikofaktoren, die den Lipoproteinstoffwechsel beeinflussen und bereits vor Einführung von GWAs bekannt waren.

Gen	Phänotyp	Referenz
ABCA1	Tangier-Erkrankung	Brooks-Wilson et al. 1999
ABCG5/8	Sitosterolämie	Berge et al. 2000
APOA5	Hypertriglyceridämie	Pennacchio & Rubin 2003
APOB	Hyperlipoproteinämie II	Soria et al. 1989
APOE	Hyperlipoproteinämie III	Rall, Jr. et al. 1982
CETP	Hyperalphalipoproteinämie	Akita et al. 1994
LCAT	Fischaugenkrankheit	Funke et al. 1991
LDLR	Hyperlipoproteinämie II	Brown & Goldstein 1974
LIPC	hepatischer Lipasemangel	Hegele et al. 1991
LPL	Hyperlipoproteinämie I	Havel & Gordon 1960
PCSK9	Familiäre Hypercholesterolämie	Abifadel et al. 2003

Einteilung der Hyperlipoproteinämie gemäß der Klassifikation nach Fredericksson

Technologische Fortschritte eröffneten schließlich die Möglichkeit zur Durchführung von GWAs. Hierbei werden mittels Genchips eine große Anzahl genetischer Polymorphismen, welche das gesamte Genom erfassen, gleichzeitig in einem Individuum untersucht. Aus diesem Grund werden einzelne Regionen des Genoms wesentlich besser abgedeckt, als es bisher möglich war. Da primär keine Vermutungen über kausale Genpolymorphismen aufgestellt werden, handelt es sich hierbei um einen hypothesenfreien Ansatz (Tabelle 5) (Hirschhorn & Daly 2005).

### 1.4.2. Konzeptionelle Grundlagen einer genomweiten Assoziationsstudie

Sind Veränderungen eines definierten Phänotyps signifikant mit einem Genpolymorphismus gekoppelt – z.B. Variante A geht mit höheren LDL-C-Spiegeln im Serum einher als Variante B – so spricht man von einer genetischen Assoziation. Mittels Genchips können aktuell über eine Million *Single Nucleotid Polymorphisms* (SNPs) gleichzeitig in einem Individuum gemessen werden. Es ist zwar bekannt, dass die Anzahl der Polymorphismen im humanen Genom mindestens mehr als das Zehnfache dessen beträgt, aber aufgrund der Tatsache, dass viele Genomvarianten miteinander gekoppelt sind, kann man mittels Auswahl von sogenannten *tagging* SNPs eine nahezu genomweite Untersuchung von Varianten mit einer Allelfrequenz  $> 5\%$  erreichen (Balding 2006).

Bereits Risch und Merikangas (1996) wiesen in diesem Zusammenhang auf das Problem des multiplen Testens mit einhergehender Alphafehler-Kumulierung hin. Daher ist eine Adjustierung des globalen Signifikanzniveaus notwendig, um so die Anzahl der falsch positiven Ergebnisse gering zu halten. Wird eine solche Adjustierung sehr konservativ mittels Bonferroni-Korrektur durchgeführt, so ergibt sich bei der gleichzeitigen Messung von 1.000.000 SNPs in einem Individuum ein globaler Signifikanzwert von  $p < 5 \times 10^{-8}$ . Aus diesem Grund sind sehr große Probandenzahlen notwendig, um die erwarteten moderaten Effekte kausaler Genvarianten mit einer *odds ratio* von weniger als 1,5 entdecken zu können (Abbildung 5) (Hirschhorn & Daly 2005).

Um die Effizienz einer GWA zu erhöhen und somit die Probandenanzahl möglichst niedrig zu halten, ist ein exaktes und detailliertes Studiendesign unumgänglich. Dazu gehören zum einen hochstandardisierte Arbeitsabläufe in der Studienambulanz und im Labor, zum anderen eine genaue Beschreibung der Ein- und Ausschlusskriterien von Probanden (Amos 2007). Weiterhin ist die Vermeidung systematischer Fehler eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg einer solchen Studie. Wie auch bei Kandidatengenstudien kann eine ungleiche Verteilung ethnischer Untergruppen in der Gesamtkohorte (*population stratification*) zu falsch positiven Resultaten führen. Mittels unabhängiger genetischer Marker und spezieller Software sollte jede Untersuchungskohorte darauf geprüft werden (Price et al. 2006; Pritchard & Rosenberg 1999).

GWAs können einstufig oder mehrstufig ablaufen. Während die statistische Wahrscheinlichkeit größer ist, dass kausale SNPs in einer großen Kohorte einer einstufigen GWA globale Signifikanz erreichen, haben mehrstufige GWAs verschiedene andere Vorteile.

# 1 Einleitung

Sie sparen bei entsprechendem Design Kosten (Lowe et al. 2004; Thomas, Haile & Duggan 2005) und es ist ebenfalls möglich, falsch positive SNPs der ersten Stufe zu eliminieren und Regionen im Bereich signifikanter SNPs der ersten Stufe nachfolgend mittels weiterer SNPs in einem *fine mapping* zu untersuchen, um nicht nur gelinkte, sondern auch kausale SNPs aufzudecken (Wang et al. 2006). Ein großes Problem von mehrstufigen Modellen ist allerdings die erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass relevante SNPs in einer ersten kleineren Kohorte keine Signifikanz erreichen und somit nicht weiter geprüft werden (Elston, Lin & Zheng 2007).

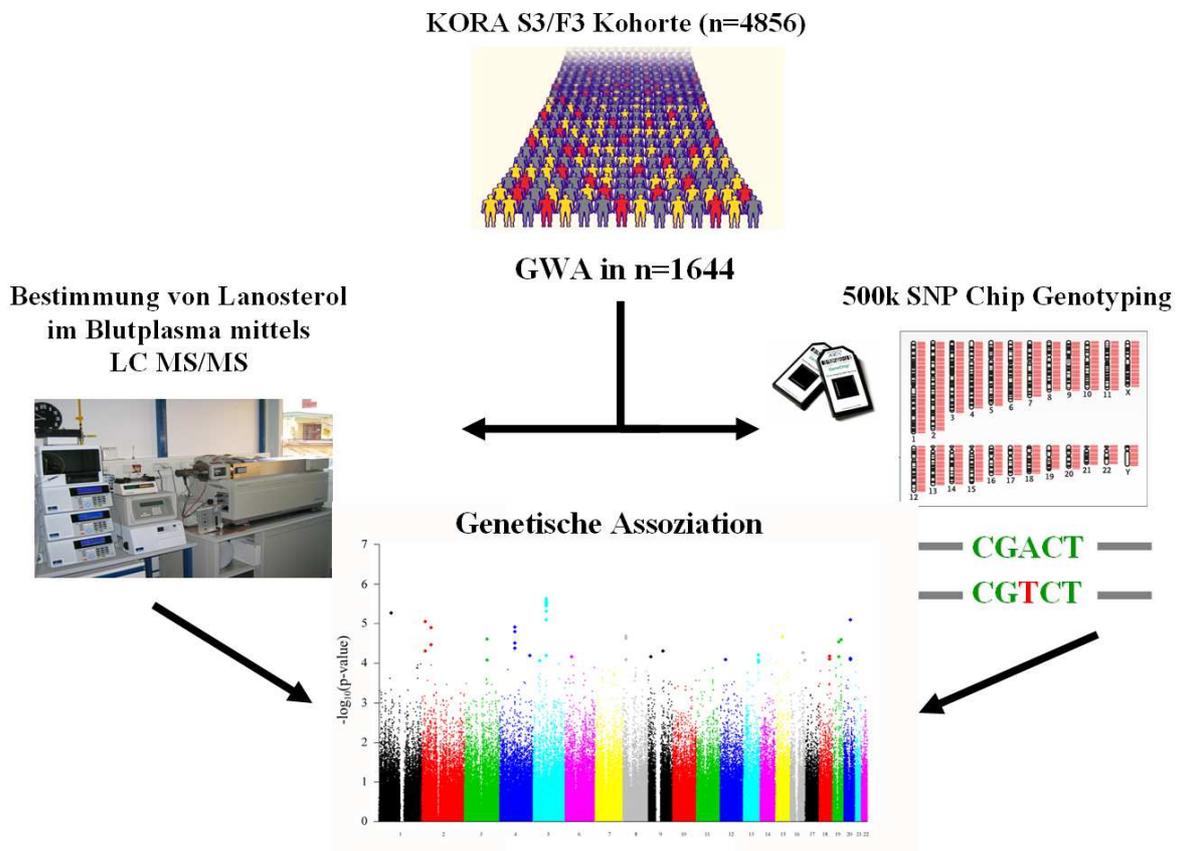


Abbildung 5: Vereinfachtes Konzept einer GWA: Aus einer Population wird eine Kohorte ausgewählt, deren Individuen auf einen definierten Phänotyp (in der vorliegenden Arbeit: Serumlanosterol und -cholesterin) untersucht werden. Parallel dazu wird das Genom eines jeden Individuums mittels SNP-Chip auf Genpolymorphismen untersucht. Schließlich werden die Signifikanzwerte der Assoziationen eines jeden SNPs zum untersuchten Phänotyp auf einen Manhattan-Plot aufgetragen. Polymorphismen mit den niedrigsten p-Werten, welche sich im Diagramm von der Punktwolke nach oben absetzen, sind als mögliche Kandidaten-SNPs für weitere Untersuchungen anzusehen. Adaptiert nach (Hunter, Altshuler & Rader 2008).

### 1.4.3. Neue Erkenntnisse aus genomweiten Assoziationsstudien

GWAs haben in den letzten fünf Jahren eine Vielzahl von Ergebnissen hervorgebracht und damit das Verständnis über multifaktoriell bedingte Erkrankungen erweitert. Im Jahr 2010 waren 95 Genloci bekannt, welche mit Variationen von Lipidspiegeln im Blut assoziiert sind. 36 Genloci konnten davon bereits in voneinander unabhängigen Kohorten mit der Dyslipidämie assoziiert werden (Chasman et al. 2009; Kathiresan et al. 2009; Teslovich et al. 2010). Allerdings ist die funktionelle Überprüfung einer bestätigten Assoziation in der GWA sehr komplex. Daher ist der physiologische Mechanismus von nur wenigen Loci bisher aufgeklärt, doch zeigen diese bereits bedeutende neue Einblicke in die Pathophysiologie der Dyslipidämie. Als Beispiel sei hier der SNP rs646776 im 1p13-Locus erwähnt, welcher mit Veränderungen des LDL-C assoziiert wurde und dessen Auswirkung auf die Genexpression des *Sortilin*-Gens (SORT1) gezeigt werden konnte (Kathiresan et al. 2008). Die Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus erfolgte erst im Jahr 2010. Ursache hierfür ist, dass ein signifikanter SNP in einer GWA nur selten auch dem funktionell bedeutsamen SNP entspricht, weswegen in der Regel ein nachfolgendes *fine mapping* - wenn nicht sogar eine Resequenzierung des Genabschnittes - notwendig ist (Manolio et al. 2009). Im Falle von SORT1 bewirkt der SNP rs12740374 eine Veränderung der Bindungsstelle eines Transkriptionsfaktors und moduliert somit die Genexpression von SORT1 (Musunuru et al. 2010). Dessen Genprodukt wurde mittlerweile als intrazellulärer hepatischer Rezeptor verifiziert, der eine wichtige Rolle in der VLDL-Sekretion spielt (Kjolby et al. 2010). Weiterhin sei hier das *tribbles homolog 1* – Protein (TRIB1) angeführt, welches im Rahmen eines Mausmodells einen bisher unbekanntem regulatorischen Einfluss auf die hepatische VLDL-Synthese aufweist, indem es vermutlich die Genexpression der Lipogenese supprimiert (Burkhardt et al. 2010).

Ebenso konnten GWAs In der Erforschung der Atherosklerose wertvolle Beiträge liefern (Lotta 2010; Malarstig & Hamsten 2010). Besondere Bedeutung erhält hierbei die Entdeckung einer genetisch komplexen Region im Chromosom 9, welche statt einem Protein nicht-codierende RNA erzeugt, und in vielen Studien mit vermehrter Atherosklerose assoziiert ist (Holdt et al. 2010). Die Erforschung der dahinter liegenden Mechanismen wird neue Einblicke auch in andere komplex bedingte Erkrankungen ermöglichen.

Es stellt sich allerdings mittlerweile heraus, dass GWAs bisher einen geringeren Teil genetischer Risikofaktoren aufgeklärt haben, als zunächst erhofft wurde (Manolio et al. 2009). Die Ursachen hierfür sind vielfältig. Ein wichtiger Punkt ist die Komplexität der LD-Struktur

## 1 Einleitung

innerhalb des humanen Genoms. Zwar hat das HapMap-Projekt (Gibbs 2003) wichtige Erkenntnisse dazu geliefert, doch zeigt eine detaillierte Analyse der LD-Struktur, dass weit mehr SNPs notwendig sind, um das gesamte Genom abzudecken (Taylor et al. 2006). Daher ist es möglich, dass auch SNP-Chips mit 1.000.000 SNPs nicht alle Risikofaktoren im Genom abdecken, sei es durch direktes Testen des SNPs oder indirektes Testen mittels bekannter LD-Muster. Des Weiteren decken die derzeitigen SNP-Chips nur unzureichend seltene Polymorphismen mit einer Allelfrequenz der Mutante von unter 5% ab (McCarthy & Hirschhorn 2008). Da in GWAs gezeigt werden konnte, dass etliche Gene, welche durch seltene Mutationen zu monogenetischen Krankheitsbildern führen, auch häufig vorkommende SNPs tragen, die mit bestimmten Phänotypen assoziiert sind, könnten noch unbekannt seltene Varianten einen wesentlichen Anteil zur Krankheitsdisposition beitragen (Manolio et al. 2009). Fortschritte im Bereich der Gensequenzierung könnten hier einen wertvollen Beitrag leisten. Außerdem könnten auch zahlreiche strukturelle Variationen innerhalb des Genoms eine wesentliche Bedeutung haben. So genannte *copy number variants* (CNVs) sind in bisherigen GWAs nur unzureichend betrachtet. Verbesserungen in der Detektionsmethodik und deren Implementation auf Genchips könnten - wie beim M. Crohn und der Adipositas schon gezeigt (McCarroll et al. 2008; Willer et al. 2009) - neue Erkenntnisse auch in anderen Krankheitsbildern liefern.

Schließlich kann auch, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen, die Untersuchung subtilerer Phänotypen weitere Hinweise über genetische Risikofaktoren multifaktorieller Erkrankungen ergeben.

### 1.5. Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, genetische Faktoren der Regulation des Fettstoffwechsels im Menschen zu identifizieren. Hierzu wurde eine GWA für die humanen Phänotypen „Serumlanosterol“ und „Serumcholesterin“ durchgeführt. Signifikante Assoziationen wurden anschließend funktionell auf der Genexpressions- und Proteinfunktionsebene überprüft. Des Weiteren wurde geprüft, ob diese Genpolymorphismen eine Assoziation mit dem Ausmaß der Koronaren Herzkrankheit haben.

## 2. Methoden und Materialien

### 2.1. Genomweite Assoziationsstudie

#### 2.1.1. Beschreibung des Studienmodelles

Zur Prüfung genetischer Assoziationen der endogenen Cholesterinbiosynthese wurde ein mehrstufiger Untersuchungsansatz gewählt. Die Stufen 1 und 2 der vorliegenden Studie wurden in disjunkten Individuen der S3/F3-Kohorte der „Kooperativen Gesundheitsforschung in der Region Augsburg“ (KORA) durchgeführt. Genpolymorphismen der Stufe 1, die signifikante Assoziationen (additives bzw. rezessives Modell) bezüglich der Phänotypen Lanosterol, Cholesterin und Lanosterol normalisiert auf Cholesterin aufwiesen, wurden zur Validierung erneut in der Stufe 2 überprüft. Genpolymorphismen, die sich in der Stufe 2 bestätigten, wurden daraufhin zur Replikation in der dritten Stufe in der „CARDiovascular disease, Living and Ageing in Halle“ (CARLA)-Kohorte erneut auf Assoziationen zu den oben genannten Phänotypen überprüft (Abbildung 6).

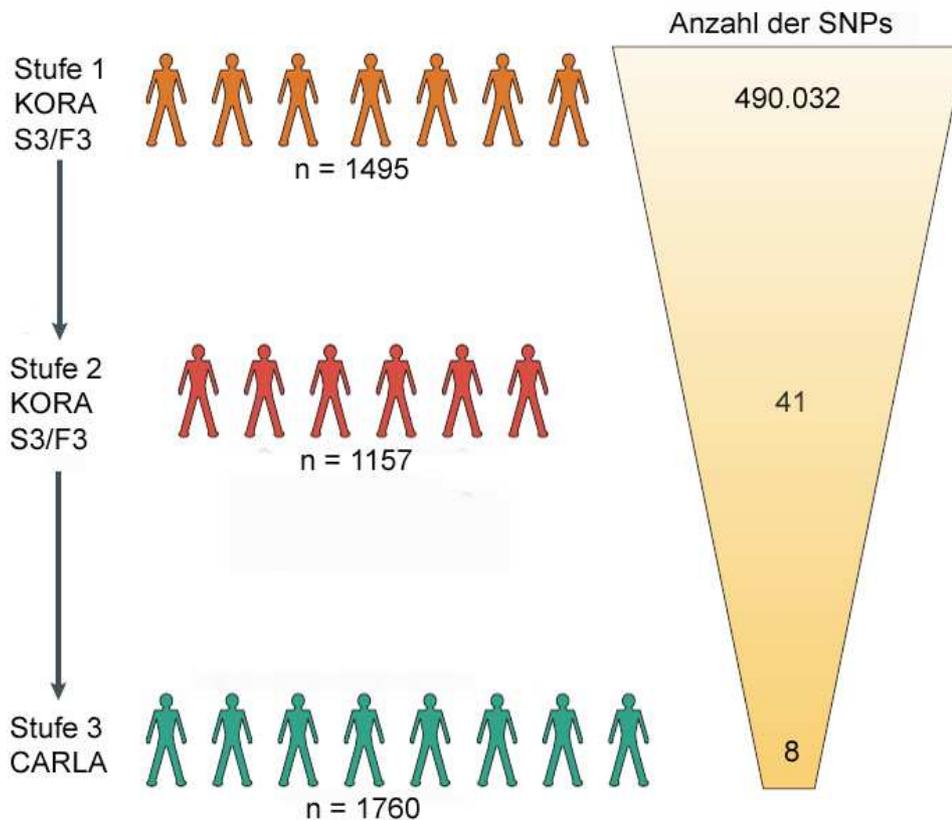


Abbildung 6: Schema der mehrstufigen genomweiten Assoziationsstudie dieser Arbeit. SNPs, welche in der ersten Stufe ein bestimmtes nominell festgelegtes Signifikanzniveau erreichen, werden in den darauffolgenden Stufen zur Validierung bzw. Replikation erneut untersucht. Abbildung modif. nach (Hirschhorn & Daly 2005).

## 2 Methoden und Materialien

Die Durchführung der ersten beiden Stufen erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Helmholtzzentrum, München. In der ersten Stufe wurde ein GeneChip Mapping 500K Array Set (Affymetrix) verwendet, um das humane Genom innerhalb einer Studienpopulation auf genetische Assoziationen zu prüfen. Die dafür notwendige DNA wurde aus dem Blut einer EDTA-Monovette mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (Gentra, Minneapolis, USA) gemäß den Vorgaben des Herstellers extrahiert. Die nachfolgende Hybridisierung der genomischen DNA auf dem GeneChip erfolgte gemäß Protokoll. Die Genotypen wurden mit dem *Bayesian Robust Linear Model with Mahalanobis distance classifier* (BRLMM) *Clustering* Algorithmus ermittelt (Doring et al. 2008). Von 490.032 untersuchten SNPs erfüllten 374.370 autosomale und 15.760 gonosomale SNPs die Qualitätskriterien (*call rate* > 95%, Frequenz des mutierten Allels > 1%, Überprüfung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts  $p > 10^{-6}$ ) und wurden für die weiteren Analysen verwendet.

Das formale genomweite Signifikanzniveau der ersten Stufe betrug bei 490.032 zu untersuchenden SNPs  $p < 1,02 \times 10^{-7}$  (Risch & Merikangas 1996). Da in der vorliegenden Arbeit kein SNP dieses erfüllte, wurde in der ersten Stufe ein liberalerer p-Wert angesetzt, um keine falsch negativen Assoziationen zu übersehen.

Genpolymorphismen, welche in mindestens einem Assoziationsmodell ein Signifikanzniveau von  $p < 3,16 \times 10^{-5}$  ( $-\log(p) = 4,5$ ) überschritten, wurden in der zweiten Stufe in einer weiteren Studienkohorte validiert. Als Signifikanzniveau für die Stufe 2 der GWA (Validation) wurde hier ein nominelles Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt. Die Genotypisierung der einzelnen signifikanten SNPs der Stufe 1 wurde am Helmholtzzentrum, München, mittels *iPlex single base primer extension* und *matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight* (MALDI-TOF) durchgeführt (Vollmert et al. 2006).

### 2.1.2. Beschreibung der Studienpopulationen KORA-S3/F3

Die KORA (Lowel et al. 2005) ist Teil des *World Health Organization-Monitoring of trends and determinants in cardiovascular diseases* (WHO-MONICA)-Konzeptes. Im Rahmen des KORA-Projektes wurde die Biobank KORA-gen erstellt, welche mittlerweile aus vier Querschnittsstudien des KORA-Projektes Daten und Proben von mehr als 18000 Individuen enthält (Wichmann, Gieger & Illig 2005). Aus der dritten Erhebung einschließlich *follow-up* stammen 4856 Studienteilnehmer (KORA-S3/F3) der KORA-gen (Abbildung 6), aus denen für die erste Stufe der GWA 1495 Probanden ausgewählt wurden. Vollständige Genotypinformationen für die Bestimmung der SNP-Qualitätskriterien lagen von 1644

## 2 Methoden und Materialien

Probanden vor. Für die zweite Stufe wurden weitere 1157 zur ersten Stufe disjunkte Probanden aus dieser Kohorte ausgewählt. Vom Helmholtzzentrum, München, wurden neben den Daten, welche bei den Genotypisierungen in Stufe 1 und 2 erhoben wurden, umfangreiche Informationen aus Einzelinterviews, medizinischen und laborchemischen Untersuchungen (Wichmann, Gieger & Illig 2005) zur Verfügung gestellt, die für die Adjustierung der Assoziationsanalysen mit den in Leipzig erhobenen Steroldaten notwendig waren.

### **2.1.3. Beschreibung der Studienpopulation CARLA**

Im Rahmen der CARLA-Studie, welche in einem populationsbasierten Ansatz die Verteilung von kardiovaskulären Erkrankungen, Herzfrequenzvariabilität, kardiovaskulären Risikofaktoren und deren Assoziationen in 1776 Personen der Stadt Halle untersuchte, wurden umfassende anamnestische, klinische und laborchemische Daten erhoben (Greiser et al. 2005). Diese Informationen wurden in der dritten Stufe (Replikation) der GWA verwendet, in welcher 1760 Individuen auf Assoziationen hinsichtlich signifikanter Genpolymorphismen der ersten beiden Stufen untersucht wurden. Die Parameter, welche für die Adjustierung der Assoziationen zwischen Genotyp und Phänotyp – in Leipzig ermittelte Steroldaten – notwendig waren, entsprachen denen aus der KORA-S3/F3-Kohorte.

### **2.1.4. Beschreibung der Studienpopulation LE-Heart**

Die Leipzig Herz Studie (LE-Heart Study) beinhaltet die Untersuchung von Patienten, welche aufgrund des Verdachtes auf eine koronare Herzkrankheit (KHK) in das Herzzentrum Leipzig überwiesen wurden. Ziel ist der Aufbau einer Kohorte von 4000 Probanden, welche exzellent bezüglich der KHK phänotypisiert sind, um genetische Risikofaktoren zu identifizieren, die zu einer erhöhten Suszeptibilität der KHK führen (Teupser et al. 2007). Zum Zeitpunkt der genetischen Untersuchungen, welche in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden, lagen Daten der Anamnese, der körperlichen und laborchemischen Untersuchung, der Echokardiographie mit Fokus auf die Quantifizierung der Atherosklerose in beiden Aa. carotidae, des Belastungs-EKGs und der Herzkatheteruntersuchung von 1895 Probanden vor. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Leipzig genehmigt (Registrierungsnummer: 276-2005) und ist unter ClinicalTrials.gov (NCT00497887) registriert.

### **2.2. Probengewinnung von humanen Untersuchungsmaterialien**

#### **2.2.1. Gewinnung von Leberproben**

Insgesamt 98 humane Leberproben wurden in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Universität Leipzig gewonnen. Hierbei wurden Patienten im Rahmen einer Leberteilektomie Gewebeprobe aus gesunden Teilen des Resektats zur weiteren Untersuchung entnommen. Nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Leipzig (Registrierungsnummer: 23-2006) wurden seitens Herrn Prof. Dr. Huster kryokonservierte Leberproben im Umfang von 100 - 200 mg aus den Jahren 2003 bis 2006 der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Teupser zur Verfügung gestellt.

#### **2.2.2. Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen humanen Blutes**

Im Rahmen der LE-Heart-Studie wurden allen Studienprobanden nach schriftlicher Einwilligung unter anderem Blut für zwei Vacutainer CPT (je 8ml) entnommen. Aus diesen wurden wie folgt mononukleäre Zellen – im folgenden PBMCs genannt – für Genexpressionsstudien gewonnen:

1. Zentrifugation bei 1650 g für mindestens 20 min im Ausschwingrotor bei Raumtemperatur innerhalb von 2 h nach Blutentnahme
2. zügige Weiterbearbeitung, senkrechte Lagerung bei 4°C für maximal 24 h an dieser Stelle möglich
3. mehrfaches Überkopfschwenken der Vacutainer, danach Überführung des Überstandes in ein steriles 50 ml-Polystyrolröhrchen (Sarstedt) und Auffüllen auf 50 ml Gesamtvolumen mit steriler kalziumfreier PBS-Dulbecco-Lösung
4. Zentrifugation bei 400 g für 15 min bei Raumtemperatur
5. Abgießen des Überstandes und Resuspendierung des Zellpellets in 50 ml steriler kalziumfreier PBS-Dulbecco-Lösung
6. Zentrifugation bei 300 g für 15 min bei Raumtemperatur
7. Abgießen des Überstandes
8. Resuspendierung des Pellets in 1ml RPMI 1640-Lösung incl. 20% fetales Kälberserum und 1 ml RPMI 1640-Lösung incl. 20% DMSO

## 2 Methoden und Materialien

### 9. Aliquotierung in 2 x 1 ml PBMC-Suspension in zwei Kryoröhrchen (Fa. Nalgene) und Lagerung in flüssigem Stickstoff

Für die Untersuchung der HMG-CoA-Reduktase Enzymaktivität wurden von 55 Studienprobanden – mit Fokussierung auf nicht-nüchterne Probanden ohne Statinmedikation (Harwood, Jr., Schneider & Stacpoole 1984) – vier Vacutainer CPT Vollblut verwendet und wie vorab beschrieben verarbeitet. Die Resuspendierung des gewaschenen Zellpellets erfolgte jedoch in 1 ml TEDK-Puffer (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 5 mM DTT, 70mM KCl) zur direkten Weiterverarbeitung (vgl. 2.4.2.).

### 2.2.3. Gewinnung von Serum zur Sterolmessung

Jedem Studienteilnehmer der KORA-S3/F3-, CARLA- und LE-Heart-Kohorte wurde im Rahmen der laborchemischen Phänotypisierung unter anderem Vollblut für eine S-Monovette Serum-Gel (Sarstedt) abgenommen. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 2500 g wurde das Serum als Überstand gewonnen und aus diesem ein 200 µl-Aliquot für die Sterolmessung bei -80°C eingelagert.

## 2.3. Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1. Isolation von genomischer DNA aus Gewebe

Wenige Milligramm von kryokonserviertem Lebergewebe wurden in 500 µl Lysepuffer (8 M Harnstoff, 0,2 M Tris-HCl, 0,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 1% Sarcosyl) und 50 µl Proteinase K-Lösung (100 mg Proteinase K auf 10 ml Aqua tridest) bei 55°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgte eine Zentrifugation mit nachfolgender Ethanol-fällung des Überstandes. Mittels Glaskapillaren wurde der sich bildende DNA-Faden dann in 200 µl 0,1 x TE-Puffer (10 mM Tris-HCl [pH = 8,0], 1mM EDTA) überführt und über Nacht gelöst mit anschließender Lagerung bei -20°C.

### 2.3.2. Isolation von genomischer DNA aus humanem Blut

Für die Isolierung von genomischer DNA aus humanem Blut von Probanden der LE-Heart-Kohorte wurde das gesamte Material aus einer EDTA- und Citratmonovette zusammen in ein steriles 50 ml-Polystyrolröhrchen (Sarstedt) überführt und mit dem Invisorb Spin Blood Maxi Kit (Invitex) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Das finale DNA-Eluat betrug 1050 µl und wurde folgendermaßen verteilt: 2 Eppendorf-SafeLock-Tubes mit je 800 µl und 200 µl Volumen zur Lagerung bei -80°C. Das restliche Volumen wurde für die Messung der optischen Dichte (OD; siehe 2.3.5.) und ApoE-Genotyp-Bestimmung verwendet. Die Isolierung genomischer DNA von Probanden der CARLA-Kohorte erfolgte aus EDTA-Blut unter Verwendung des Qiagen Blood Kit (Qiagen).

### 2.3.3. Isolation von RNA aus Gewebe

Enzymatische Einflüsse führen schnell zur Degradierung von RNA. Hauptgrund dafür sind RNAsen. Dies sind Enzyme, welche die RNA spezifisch abbauen. Daher wurden für die Herstellung der Arbeits- und Stammlösungen 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H<sub>2</sub>O verwendet, welches eine Inaktivierung der RNAsen durch kovalente Bindung des DEPC an primäre und sekundäre Amine zur Folge hat (Mülhardt 2003). Außerdem wurden zur Minimierung der RNA-Degradation RNase-freie Einwegartikel verwendet bzw. die Arbeitsgeräte mit 0,1 M NaOH behandelt und anschließend mit RNase-freiem Wasser gespült.

Die Isolation von RNA erfolgte mit einer monophasischen Phenol- und Guanidiniumthiocyanatlösung (TRIzol, Gibco) nach Angaben des Herstellers. Durch das Phenol wurden Proteine entfernt, während das Guanidiniumthiocyanat zur Zellyse und Inaktivierung der RNAsen führte (Chomczynski & Sacchi 1987). Für die RNA-Isolation wurden zunächst ca. 50 mg humane Leber mit einem Mörser in flüssigem Stickstoff zerkleinert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,5 ml TRIzol und die Homogenisierung des Gemisches mittels Homogenisator (Polytron PT 1300 D). Zu einem späteren Zeitpunkt der laborchemischen Arbeiten erfolgte diese Gewebszerkleinerung und Homogenisierung mit einem anderen Homogenisator (Precellys24, bertin technologies) in einem einzigen Schritt. Nach Zugabe des TRIzol wurde das noch gefrorene Gewebe bei 5000 U/min für 20 s mittels 1,4 mm großer Keramikkügelchen homogenisiert. Die weitere Aufarbeitung umfasste folgende Arbeitsschritte:

## 2 Methoden und Materialien

1. Zentrifugation bei 12000 g und 4°C für 10 min
2. Abnahme des Überstandes und dessen Vermischung mit 300 µl Chloroform
3. 2 min Inkubation bei Raumtemperatur
4. Zentrifugation bei 12000 g und 4°C für 20 min; Stabilisierung der Phasengrenzen zwischen wässriger und organischer Phase durch Chloroform
5. Überführung der wässrigen Phase in ein neues Tube und Vermischung mit 750 µl Isopropanol, 10 min Inkubation bei Raumtemperatur
6. Zentrifugation bei 12000 g und 4°C für 10 min; Pelletierung der RNA.
7. Reduktion des hohen Salzgehaltes der RNA durch anschließenden Waschschrift mit 75%-igem Ethanol
8. Trocknen für 5-10 min, Lösung des Pellets in DEPC-Wasser mit nachfolgender Lagerung bei -80°C bis zur Weiterverwendung

### 2.3.4. Isolation von RNA aus PBMCs

Ein isoliertes PBMC-Aliquot (vgl. 2.2.2.) wurde komplett aufgetaut und mittels Zentrifugation bei 7000 g und 4°C für 5 min pelletiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden 1,5 ml TRIzol hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform. Die weitere Isolation geschah analog der Gewebe-RNA-Isolation unter Verwendung von 500 µl statt 750 µl Isopropanol.

### 2.3.5. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA

Zur Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren wurde die Extinktion bei 260 nm mit dem NanoDrop-System (NanoDrop-Technologies) gemessen. Die Berechnung der Konzentration ergab sich wie folgt:

E260: 1,0 = 50 µg/ml doppelsträngige DNA

E260: 1,0 = 40 µg/ml einzelsträngige RNA

E260 entspricht der Extinktion von DNA bzw. RNA und E280 der von Proteinen. Mit Hilfe des Quotienten E260/E280 ließ sich somit die Reinheit der Probe bestimmen. Dieser Quotient sollte in 1 x TE-Puffer für DNA ca. 1,8 und für RNA ca. 2,0 betragen (Sambrook 2001).

### 2.3.6. Synthese von komplementärer DNA mittels reverser Transkription

Für die Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde RNA durch reverse Transkription (RT) in stabile komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Zunächst wurden 2 µg RNA in 10 µl H<sub>2</sub>O-DEPC mit 1 µl *Random Hexamer Primer* (500 µg/ml, Roche) für 10 min bei 68°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 9 µl Mastermix (Tabelle 7) und die Inkubation des Ansatzes für 60 min bei 42°C. Es schloss sich die 1:15 Verdünnung der cDNA mit 1 x TE an. Bis zur Weiterverwendung wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

**Tabelle 7:** Zusammensetzung des Mastermix für die Reverse Transkriptase.

Zusammensetzung des RT Mastermix	
4 µl	5 x First Strand Buffer (250 mM Tris-HCL [pH 8,3], 375 mM KCL, 15 mM MgCl <sub>2</sub> ; Invitrogen)
2 µl	0,1 M DTT (Dithiothreitol; Sigma)
1 µl	dNTP, je 10 mM (Promega)
1 µl	RNAse-Inhibitor (RNAsin, Promega)
1 µl	Reverse Transkriptase (200 U, Super Script II, Life Technologies)

### 2.3.7. Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR diente der exponentiellen Vermehrung spezifischer DNA- bzw. cDNA-Sequenzen (Saiki et al. 1988). Spezifische Primer für die Amplifikation wurden mit der Software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) erstellt. Die Synthese der verwendeten Primer erfolgte bei MWG Biotech (Ebersberg). In der vorliegenden Arbeit wurden - falls nicht anders erwähnt - die folgenden Standardbedingungen für die PCR-Amplifikation verwendet:

- 2,5 µl DNA- bzw. cDNA-*Template*
- 2,5 µl 10 x PCR-Puffer (Reaction Buffer B, 0,8 M Tris-HCl, 0,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2% w/v Tween-20, Solis Biodyne)
- 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM, Solis Biodyne)
- 2,5 µl dNTPs (1250 µM)
- 0,5 µl *Forward*- bzw. *Reverse*-Primer (20 pmol/µl)
- 0,25 µl DNA-Polymerase (5 U/µl FIREPol DNA Polymerase I, Solis Biodyne)
- 13,75 µl H<sub>2</sub>O

## 2 Methoden und Materialien

Die Reaktionsbedingungen betragen dabei in einem Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700:

- 95°C 3 min
- 40 Zyklen zu 95°C 15 s, 58 - 63°C 20 s, 72°C 1 min
- 72°C 10 min

Anschließendes Auftragen von 10 µl PCR-Produkt + 2 µl Ladepuffer auf ein Agarosegel ermöglichte die Kontrolle der Reaktion. Das hier beschriebene Protokoll wurde für die Prüfung der DNA-Produkte aller neu hergestellten Primerpaare verwendet. Des Weiteren wurden die seitens des Herstellers angegebenen *Annealing*-Temperaturen für alle Primer geprüft und ggf. optimiert. Auch diente dieses Protokoll der Synthese von PCR-Produkten für nachfolgende DNA-Sequenzierungen, welche im Rahmen der Standardkurvenherstellung für die verschiedenen *quantitative real time*-PCR-Assay (qRT-PCR) angewendet wurden, um Subklonierungen zu prüfen und Mutationen auszuschließen (vgl. 2.3.10, 2.3.12. und 2.3.16.).

### 2.3.8. Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuregemische sind aufgrund ihrer negativen Ladung durch Gelelektrophorese trennbar. RNA und DNA wurden deshalb elektrophoretisch auf TAE-Agarosegelen analysiert. Auf diesem Weg waren Trennung bzw. Reinigung sowie in eingeschränktem Maß auch Konzentrationsbestimmungen möglich. Abhängig von der jeweiligen Fragmentgröße erfolgte die Verwendung von 0,8 – 3 %-igen Gelen. Je Analyse wurden 10 µl RNA bzw. DNA mit 2 µl Ladepuffer versetzt (50 % Glycerin; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylen-Cyanol) und in Geltaschen aufgetragen. Als Längenstandard diente der Molecular Weight Marker X (Roche Diagnostics). Der TAE-Kammerpuffer bestand aus 2 M Tris-Acetat und 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, (pH 8,0). Nach einer Laufzeit von 30-90 min bei 85 bzw. 110 Volt (kleine/große Gelkammer) wurde das Gel für 5 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 ng/ml) gefärbt, daraufhin für 5 min bei 85/110 Volt entfärbt und anschließend unter UV-Licht (Geldokumentationssystem, MWG Biotech) ausgewertet.

### 2.3.9. DNA-Extraktion und -Aufreinigung

Falls der Analyse eine DNA-Extraktion aus dem Gel folgen sollte, so musste zwingend auf kurze Expositionszeiten geachtet werden, um das Risiko einer möglichen Schädigung der DNA durch UV-Licht zu minimieren (Cariello et al. 1988).

## 2 Methoden und Materialien

Eine solche DNA-Extraktion war in der vorliegenden Arbeit insbesondere dann notwendig, wenn im Rahmen der Sequenzierung des 5-kbp-Blockes proximal des HMGCR-Gens Primerpaare sowohl nach wiederholter Erstellung mittels Software als auch nach verschiedenen Adjustierungen der PCR-Reaktionsbedingungen unerwünschte Nebenprodukte amplifizierten. Außerdem war dieser Schritt unumgänglich bei der Erstellung von pCR II-TOPO-Vektoren für die TaqMan-Standardreihen zur Untersuchung des alternativen *Splicings* im HMGCR-Gen.

Zunächst wurde im Gel unter UV-Licht die Bande mit gewünschter Länge lokalisiert und ein Gelvolumen von max. 100 µl mit einem Skalpell herausgeschnitten. Das Gelstück wurde in das Millipore Gel Extraction Kit überführt und gemäß Herstellerprotokoll verarbeitet. Die extrahierte DNA wurde daraufhin wie folgt aufgereinigt und konzentriert:

1. Überführung des extrahierten DNA-Volumens in ein neues steriles Probengefäß
2. Auffüllen mit H<sub>2</sub>O-Lichrosolv auf 200 µl Gesamtvolumen
3. Zugabe von 10 µl 3M Na-Acetat (pH 5,2); nachfolgendes Vortexen
4. Zugabe von 500 µl 100%-igem Ethanol; nachfolgendes Vortexen
5. Lagerung über Nacht bei -80°C
6. Zentrifugation für 20 min bei 14000 g und Raumtemperatur
7. Abkippen des Überstandes und Zugabe von 200 µl 70%-igem Ethanol
8. Zentrifugation für 20 min bei 14000 g und Raumtemperatur
9. Abgießen des Überstandes und Überkopftrocknen des Pellets

Das finale Pellet wurde in 15µl H<sub>2</sub>O über Nacht gelöst und nach erfolgter DNA-Konzentrationsbestimmung für die Sequenzierung verwendet.

### 2.3.10. Subklonierung von PCR-Fragmenten in pCR II-TOPO

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurden zunächst zwischen 10 und 20 µg PCR-Produkt in den 3950 bp großen Vektor pCR II-TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) ligiert. Danach folgte die chemische Transformation in kompetente E. coli-Bakterien (TOP10 One Shot, Invitrogen). Beide Schritte erfolgten gemäß des Herstellerprotokolls. Der entstehende Ansatz der transformierten Zellen wurde mit einer Impföse auf eine angewärmte, mit IPTG/X-Gal versetzte LB-Agar-Platte ausgestrichen und bei 37°C für 15-16 h inkubiert. Auf diesen Platten erfolgte eine Blau/Weiß-Selektion. Bakterienklone, deren Vektor cDNA enthielt, konnten als weiß gewachsene Kolonie identifiziert werden. Bakterien, die ein Plasmid ohne cDNA enthielten, spalteten aufgrund der nicht inhibierten β-Galacto-

## 2 Methoden und Materialien

sidase(LacZ)-Expression des Plamids X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-inolyl-[ $\beta$ ]-D-galactopyranoside) und erschienen blau (Sambrook 2001). Einzelne weiße oder schwach hellblaue Kolonien wurden mittels steriler Pipette von der Agaroberfläche abgestrichen und in ein steriles mit 2 ml Luria-Bertani(LB)-Medium gefülltes 15 ml Polystyrolröhrchen (Sarstedt) überführt. Die Vermehrung der Kolonien erfolgte über ca. 8 h in einem Schüttelinkubator (Orbital Shaker-Forma Scientific) bei 37°C und 180 U/min.

LB-Medium und LB-Agarplatten wurden wie folgt hergestellt:

**LB-Medium:** 5 g Tryptone (DIFCO); 2,5 g Hefeextrakt (DIFCO); 5 g NaCl ad 500 ml Aqua dest., anschließend autoklaviert; Zugabe von 1 ml Ampicillin (Endkonzentration 50  $\mu$ g/ml) direkt vor Verwendung des Mediums

**LB-Agar:** 500 ml LB-Medium + 7,5 g Bacto Agar (DIFCO) + 1 ml IPTG + 1 ml X-Gal + 1 ml Ampicillin (Endkonzentration 50  $\mu$ g/ml)

### 2.3.11. Präparation von Plasmid-DNA (Plasmid-Mini-Präparation)

Die gewonnenen E. coli-Klone mussten überprüft werden, ob deren Plasmide ein cDNA-Insert tragen. Dazu diente die im Folgenden beschriebene Methode (Del Sal G., Manfioletti & Schneider 1988). Die sich an die Transformation anschließende Vermehrung geschah analog wie unter 2.3.10. beschrieben. Nach Vermehrung der Kolonien im Schüttelinkubator erfolgte die Überführung von 1,5 ml Bakteriensuspension in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß. Diese wurde nach dem Protokoll des Eppendorf FastPlasmid Mini aufgearbeitet.

Der sich daran anschließende Restriktionsverdau diente der Kontrolle, ob die isolierte Plasmid-DNA das entsprechende PCR-Produkt enthielt. Bei dem verwendeten Klonierungsvektor flankierten Schnittstellen für das Restriktionsenzym *EcoR I* beide Seiten der Insertionsstelle (11 bp *upstream* 5' und 6 bp *downstream* 3'). 1  $\mu$ l *EcoR I* (20 U/ $\mu$ l [New England Biolabs, Frankfurt/Main]) wurde mit 8  $\mu$ l Plasmid-DNA und 1  $\mu$ l vom Hersteller bereitgestellten Reaktionspuffer in einem 10  $\mu$ l-Ansatz für 2 h bei 37°C verdaut. Daraufhin erfolgte das Auftragen der Proben auf ein Agarosegel, die elektrophoretische Auftrennung und die Charakterisierung der Banden nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht.

Die Erkennungssequenz GAATTC für *EcoR I* ist selten im humanen Genom. Im seltenen Fall, dass sich diese Sequenz auch innerhalb des ligierten PCR-Inserts befand, konnte auf andere Enzyme, wie *Nsi I* oder *BstX I*, die ebenfalls Schnittstellen beidseits der Insertionsstelle besitzen, zurückgegriffen werden.

### 2.3.12. DNA-Sequenzierung

Da alle in dieser Arbeit verwendeten Inserts nicht länger als 500 bp waren, konnten alle Klonierungen in den pCR II-TOPO-Vektor mittels der vom Hersteller mitgelieferten Primer M13 fwd und M13 rev (Invitrogen) per Sequenzierung auf Mutationen überprüft werden. Des Weiteren wurde von sechs spezifisch ausgewählten humanen Leberproben die DNA ca. 5,5 kbp upstream 5' des HMGCR-Gens auf unbekannte Basenmutationen geprüft. Hierfür wurde der zu sequenzierende Bereich in sieben sich einander überlappende Segmente (Primerpaare siehe Tabelle 8) geteilt. Die Spezifität der Primer für das HMGCR-Gen wurde mit dem *Basic Local Alignment Search Tool* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) verifiziert.

**Tabelle 8:** Auflistung der Sequenzen aller Primer (laborinterne Bezeichnung), die für die Sequenzierung des promotornahen Bereiches des HMGCR-Gens erstellt wurden.

Primer	Nukleotidsequenz
5U1x2HMGCRfwd	GCCCTCAGTGGATATCTACTGACCTTTG
5U1x2HMGCRrev	TTAATAGAGACGGGGTTTCGCCATAT
5U2 HMGCRfwd	TGCGGTAGTTCACGCTTGTAATC
5U2 HMGCRrev	CCTGGGTGCTAAGTCCCTCATT
5U3HMGCRfwd	AGCTGGAGTTCGGGGTGG
5U3HMGCRrev	CGAGCTGGTTGCCAATGCT
5U4HMGCRfwd	CGGCTCTACCAATCAGCAGGAT
5U4HMGCRrev	CTAGAAGTCTCAAGGACCAAATATCTCAGA
5U5x2HMGCRfwd	CTAAATCTTGGGCTAAAGCCTGTTTTG
5U5x2HMGCRrev	TGACGTATCTCTACTTTCCTGTGCGAA
5U6HMGCRfwd	ATGGGTAGGCATATCCAAGGTAAAC
5U6HMGCRrev	CCAACCAATAGCCGTTTCGAGT
5U7x2HMGCRfwd	GTAATATCACAGCCAGGACGAGCAC
5U7x2HMGCRrev	GATGATGACCGCAGTCACGAAGA

Die Sequenzreaktionen wurden in 10 µl-Ansätzen mit ca. 100 ng in 0,1 x TE-Puffer gelöstem PCR-Produkt, 1 µl Forward-/Reverse-Primer (5 µM), 2 µl Big Dye Ready Mix (Applied Biosystems) in ad 10 µl H<sub>2</sub>O durchgeführt. Die PCR-Parameter lauteten:

## 2 Methoden und Materialien

- 98°C 2 min
- 30 Zyklen mit 98°C 20 s, 50°C 15 s und 58°C 4 min

Eine Fällungsreaktion diente der Abtrennung freier Nukleotide. Nach Zugabe von 10 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 55 µl 100%-igem Ethanol folgte ein Zentrifugationsschritt (20 min, 14000 g). Ein weiterer Waschschrift mit 180 µl 70%-igem Ethanol und erneuter Zentrifugation für 20 min folgte. Das Pellet wurde bei 68°C für 10 min getrocknet.

Die Core Facility DNA-Technologie des IZKF der Medizinischen Fakultät Leipzig übernahm das Auftragen der Proben auf das Sequenziergel und die Sequenzierung der DNA mittels Kapillargelelektrophorese.

### 2.3.13. Quantitative RT-PCR

Die verschiedenen mRNA-Expressionsstudien des HMGCR-Gens wurden mit dem quantitativen, fluorogenen RT-PCR-Verfahren (TaqMan) an einem ABI Prism 7900 HT Sequence Detector System (Applied Biosystems) durchgeführt. Der TaqMan Assay nutzte die 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase um eine an die zu amplifizierende cDNA gebundene fluoreszenzmarkierte Sonde (Taq-Man Probe) zu hydrolysieren. Für den Assay mussten spezifische Sonden sowie cDNA-spezifische Primer hergestellt werden (vgl. 2.3.14.). Hierbei handelte es sich um Oligonukleotidsonden, welche an ihrem 5'-Ende mit einem „Reporter“-Fluoreszenzfarbstoff (Fluoreszinderivat) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (Rhodaminderivat) markiert waren. Diese Sonden wurden bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt. Die Sondensequenzen wurden so ausgewählt, dass sie komplementär zu einem cDNA-Strang waren und sich während der *Annealing*- und *Extension*-Phasen der PCR an diesen anlagerten. Die Sonde blieb ungebunden, wenn während der PCR kein zu ihr komplementäres Template vermehrt wurde. Da die 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase spezifisch für Doppelstränge war, blieben ungebundene Sonden intakt und aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher wurde die Fluoreszenz durch einen Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) unterdrückt und es konnte keine Reporter-Fluoreszenz gemessen werden (Heid et al. 1996). Zur cDNA komplementäre Sonden hybridisierten sich nach dem Denaturierungsschritt mit der cDNA und wurden in der darauffolgenden Extensionsphase der PCR durch die Taq-Polymerase vom 5'-Ende beginnend hydrolysiert, wodurch der Reporter- und Quencher-Farbstoff getrennt und somit der FRET zwischen Probe und Quencher unterbrochen wurde. Somit konnte die Fluoreszenz des Reporters bestimmt werden.

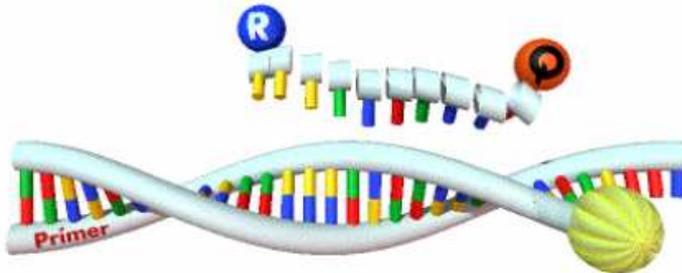
## 2 Methoden und Materialien



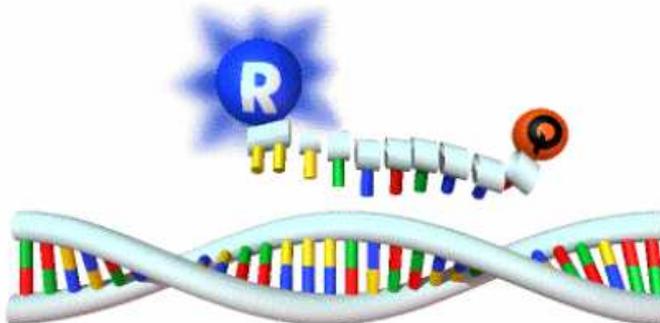
1. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und der PCR-Primer (Abbildung zeigt die Anlagerung des Forward Primers)



2. Primer-Extension und Sondenhydrolyse



3. PCR-Produkt wird vollständig synthetisiert, die Farbstoffe getrennt



4. In Abhängigkeit von der Zahl freigesetzter Reporter-moleküle wächst das Reporter-Signal

Abbildung 7: Einfluss der 5'-3'-Exonuklease Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase auf eine fluorogene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan PCR (SDS Handbuch Applied Biosystems).

Das Signal war direkt proportional zu der am Anfang des jeweiligen Zyklus bestehenden Molekülmenge. Das Konzept der „cycle threshold“ ( $C_t$ )-Bestimmung (Higuchi et al. 1993) diente der Quantifizierung der vorhandenen Menge cDNA. Die Anzahl der Zyklen bis zum Erreichen eines spezifischen Signals, welches signifikant über dem Hintergrundrauschen lag, war abhängig von der der Anzahl der Kopien an cDNA, die sich zu Beginn vor der PCR im

Analyt befanden. Die cDNA-Kopienanzahl und die Anzahl der benötigten Zyklen verhielten sich hierbei indirekt proportional (Gibson, Heid & Williams 1996). Dieser Wert wurde als für jede Probe spezifischer  $C_t$ -Wert definiert und lag in der exponentiellen Phase der Amplifikation. Mittels Verwendung einer Standardkurve war es dadurch möglich die absolute Kopienzahl des untersuchten Transkripts in jeder Probe zu berechnen.

### 2.3.14. Selektion von Primern und Sonden für die qRT-PCR

Zur Etablierung der qRT-PCR-Assays mussten entsprechende Primer und Sonden mittels der Primer Express 2.0-Software ermittelt werden. Die dafür notwendigen Sequenzinformationen wurden aus eigener Sequenzierung klonierter Plasmid-DNA generiert oder wurden der Genbank der National Library of Medicine, USA ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) oder der ensembl-Datenbank ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) entnommen. Für die Untersuchung der Splicevarianten des HMGCRC-Gens wurden Primerpaare auf benachbarte Exons gelegt und Sonden verwendet, welche über den korrespondierenden Exongrenzen hybridisierten, um die Koamplifikation genomischer DNA zu unterbinden. Bei der Untersuchung des untranslatierten 3'-Bereiches (vgl. 2.3.20 und 3.5.) des HMGCRC-Gens war diese Möglichkeit für die Sonden HMGCRCStopp400 und HMGCRCStopp1000 nicht verfügbar, da in diesem Bereich die prozessierte mRNA der DNA entspricht (Abbildung 8). Zur Kontrolle der Spezifität der verwendeten Primer wurde zunächst cDNA aus den humanen Leberproben verwendet, und diese nach erfolgter Amplifikation in einer PCR auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen. Die Reaktionsbedingungen der PCR entsprachen hierbei denen der späteren qRT-PCR. Wenn sich die Länge des erwarteten Amplikons im Gel bestätigte, so wurde das PCR-Produkt mit den jeweiligen Primern daraufhin sequenziert. In der hier vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen von Expressionsuntersuchungen des HMGCRC-Gens sieben Assays verwendet (Tabelle 9).

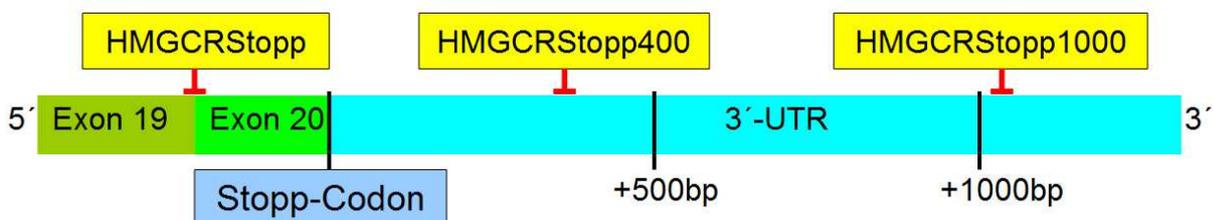


Abbildung 8: Ausschnitt der HMGCRC-mRNA nach dem Schritt des intronischen *Splicings*. Die sequenzspezifischen Positionen der fluorogenen Sonden für Untersuchungen des untranslatierten 3'-Bereiches sind mit roten horizontalen Linien abgebildet. Während die Sonde „HMGCRCStopp“ exonüberspannend erstellt wurde, konnten für die beiden anderen Sonden keine Versionen erzeugt werden, die eine DNA-Koamplifikation vermeiden.

**Tabelle 9:** Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden sowie Länge der generierten Amplikons.

Assay	Sequenz (5'→ 3')	Amplikon
<b>HMGCRmitEx13</b>		
5'-Primer	CTCTCCAGTACCTACCTTACAGGGATT	<b>90 bp</b>
3'-Primer	CAGGGATGGGCATATATCCAATAAC	
Sonde	CTCCTTGGTGATGGGAGCTTGTTGTGAGA	
<b>HMGCRohneEx13</b>		
5'-Primer	CTCTCCAGTACCTACCTTACAGGGATT	<b>82 bp</b>
3'-Primer	ATCCCATCTGCAAGGACTCG	
Sonde	CTCCTTGCTTGGTGGAGGTGCCAGC	
<b>HMGCRgesamt</b>		
5'-Primer	GAAGGGTTCGCAGTGATAAAGGA	<b>93 bp</b>
3'-Primer	AAGGTTGCGTCCAGCTATACTTGT	
Sonde	CATTTGACAGCACTAGCAGATTTGCACGTC	
<b>HMGCRStopp</b>		
5'-Primer	GGACATCTTGTCAAAAGTCACATGATT	<b>85 bp</b>
3'-Primer	CTGTCTTCTTGGTGCAAGCTCC	
Sonde	CAACAGGTCGAAGATCAATTTACAAGACCTCCA	
<b>HMGCRStopp400</b>		
5'-Primer	GTCTGGGATGTAGAACTTCAAGAAGTAAG	<b>131 bp</b>
3'-Primer	ACAGGTCCCCTTCTGAAGAATAATG	
Sonde	TGCTGGTCTATTTTGATTTTGGGGGGTAATCA	
<b>HMGCRStopp1000</b>		
5'-Primer	CCAGTGAAGGAGCCACGTGA	<b>107 bp</b>
3'-Primer	CGTTCGTGGGTCCATCAAAGA	
Sonde	CTAGTTCCTGTGGCCAGGAGGTTGGTGAC	
<b>β-Aktin</b>		
5'-Primer	CCTGGCACCCAGCACAAT	<b>70 bp</b>
3'-Primer	GCCGATCCACACGGAGTACTT	
Sonde	ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCA	

Alle Sonden sind an ihrem 5'-Ende mit dem Fluoreszinderivat FAM und an ihrem 3'-Ende mit dem Rhodaminderivat TAMRA als Reporter- bzw. Quencherfarbstoff gekoppelt.

### 2.3.15. Reagenzien, Materialien und Reaktionsbedingungen für die qRT-PCR

Die Reaktionsbedingungen im Thermocycler (ABI Prism 7900 HT Sequence Detector, Applied Biosystems) bezüglich Temperatur, Inkubationszeiten und Zyklenzahl waren für alle bestimmten cDNAs identisch. Der qRT-PCR-Ansatz setzte sich zusammen aus:

- 2,5 µl cDNA (1:15 verdünnt)
- 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Roche)
- 1 µl dNTP (2500µM)
- 1,25 µl 10 x PCR Buffer (100 mM Tris-HCl, 0,1 M EDTA, pH 8,3, Roche)
- 0,0625 µl AmpliTaq Gold (5 U/µl AmpliTaq Gold DNA Polymerase, Roche)
- 0,25 µl Oligonukleotid-Sonde (10 µM)
- je 0,1875 µl Primer (300 nM; im β-Aktin-Assay jeweils dreifache Menge)
- ad 12,5 µl H<sub>2</sub>O-Lichrosolv (Merck)

Die Parameter für den Ablauf der PCR wurden wie folgt festgelegt: 50°C 2 min, danach 95°C 10 min, gefolgt von 40 Zyklen mit 95°C 15 s und 60°C für 1 min. Die Amplifikation und Fluoreszenzmessung erfolgte in einer 384-well Platte (ABI Prism 384-well Optical Reaction Plate; Applied Biosystems). Die Auswertung der gemessenen Daten geschah mit Unterstützung der ABI Prism Sequence Detection Software 2.2 (SDS, Applied Biosystems). Alle Standards wurden als Dreifach-, alle Proben als Vierfachwertbestimmungen durchgeführt. Aufgrund der Normierung des C<sub>t</sub>-Wertes eines jeden Reaktionsansatzes auf eine Standard-Plasmidverdünnungsreihe konnte die absolute mRNA-Kopienzahl der Proben bestimmt werden.

Um Schwankungen zwischen den Proben auszugleichen, diente das *housekeeping*-Gen β-Aktin als interne Referenz einer jeden Probe. Die Absolutwerte der bestimmten HMGCRC-Genabschnitte wurden dabei stets auf 10<sup>6</sup> Kopien β-Aktin der jeweiligen Probe normalisiert.

### 2.3.16. Herstellung von cDNA für die qRT-PCR-Standardkurve

Das gleichzeitige Auftragen einer Plasmidverdünnungsreihe mit bekannter Kopienzahl auf jede 384-well Platte ermöglichte die absolute Quantifizierung der mRNA-Expression. Für die Herstellung der Plasmidverdünnungen wurden PCR-Produkte, welche die Sequenz der qRT-PCR-Amplikons beinhalteten, amplifiziert und in den Vektor pCR II-TOPO ligiert. (vgl. 2.3.10.) Die verwendeten Primer zur Erstellung der qRT-PCR-Standards sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

**Tabelle 10:** Übersicht der Primer für die Herstellung von TaqMan-Standards.

cDNA	Primersequenzen (5'→3')	Vektorlänge
<b>HMGCRmitEx13</b>		
5'-Primer	TGAGCGTGGTGTATCTATTCG	817 bp
3'-Primer	GATGGCGGTGACAATGTTT	
<b>HMGCRohneEx13</b>		
5'-Primer	TGAGCGTGGTGTATCTATTCG	658 bp
3'-Primer	GATGGCGGTGACAATGTTT	
<b>HMGCRgesamt</b>		
5'-Primer	TGAGCGTGGTGTATCTATTCG	817 bp
3'-Primer	GATGGCGGTGACAATGTTT	
<b>HMGCRStopp</b>		
5'-Primer	GGCAGCAGGACATCTTGTCAAAAG	134 bp
3'-Primer	CCAATGCCCATGTTCCAGTTCA	
<b>HMGCRStopp400</b>		
5'-Primer	CTTGAAGTTCATGGTGATCAGTGCA	264 bp
3'-Primer	CTTCCCTTGAAGAAAACAGGTCCC	
<b>HMGCRStopp1000</b>		
5'-Primer	GAAAGGGAAAGTCAGCTTTCAGAGC	259 bp
3'-Primer	TCCAAGAGCAACACTTGAAGCATTAG	
<b>β-Aktin</b>		
5'-Primer	ACCCACACTGTGCCCATCTAC	262 bp
3'-Primer	TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA	

### 2.3.17. Präparation von Plasmid-DNA (Plasmid-Maxi-Präparation)

Um ausreichende Mengen Plasmid-DNA zu erhalten, wurde zunächst ein durch Minipräparation und Restriktionsverdau charakterisierter Klon (vgl. 2.3.11.) erneut im Z-Ausstrich auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und für ca. 16 h im Inkubator (Memmert) bei 37°C angezchtet. Danach erfolgte die Inkubation einer einzelnen Kolonie des Klons in 5 ml LB-Medium für 6 h bei 37°C. Nach erfolgter Trübung des Mediums wurden 3 ml dieser Kultur anschließend in einen 2 Liter Erlenmeierkolben überführt, welcher mit 100 ml LB-Medium gefüllt war und über Nacht in einem Orbitalschüttler (GFL 3032, Forma Scientific) bei 180 U/min und 37°C inkubierte. Die darauffolgende Präparation von Plasmid-DNA aus

der Nachtkultur erfolgte mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in Abhängigkeit der Pelletgröße in 1 x TE-Puffer aufgenommen und die Nukleinsäurekonzentration mit dem NanoDrop-System bestimmt. Nachfolgende DNA-Sequenzreaktionen (vgl. 2.3.12.) dienten dem Ausschluss von PCR-Fehlern.

### 2.3.18. Linearisierung und Quantifizierung der Plasmid-DNA

Aufgrund der zirkulären Form der Plasmid-DNA musste diese vor Verwendung als Standard mittels Restriktionsverdau linearisiert werden. Dies erfolgte mit einem Restriktionsenzym, welches ausschließlich den Vektor pCR II-TOPO an einer einzigen Stelle schnitt und somit das Insert unversehrt ließ. Für alle Inserts konnte XhoI verwendet werden. Der Reaktionsansatz für die Linearisierung ergab sich wie folgt:

- 50 µg DNA
- 10 µl Rinderserumalbumin (NewEngland Biolabs, Konz. 10 mg/ml, pH 7,0, 20 mM KPO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 5% Glycerol)
- 10 µl 10 x NEBuffer 2 (NewEngland Biolabs)
- 7 µl XhoI (20000 U/ml, NewEngland Biolabs)
- ad 100 µl H<sub>2</sub>O-Lichrosolv

Dieser wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inaktivierung des Restriktionsenzym für 20 min bei 65°C in einem Thermomixer. Um die Linearisierung zu kontrollieren, wurden 1 µl des Restriktionsverdaus und 1 µl des zirkulären Plasmids auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und charakterisiert.

Die Berechnung der Konzentration und Kopienzahl für die Herstellung der Standardverdünnungsreihe geschah nach folgendem Schema: Da die Summe des Molekulargewichts der vier verschiedenen Nukleotide (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin) 1238 g/mol beträgt, ergibt sich ein mittleres Molekulargewicht von 619 g/mol für ein beliebiges Basenpaar. Mit der Länge des Vektors inklusive Insert multipliziert ergibt das Produkt daher näherungsweise das Gewicht für ein Mol linearisierten Vektor, welches nach Division mit der Avogadro-Konstante ( $6,022 \times 10^{23}$ /mol) das Gewicht eines einzelnen Vektormoleküls darstellt.

Der Quotient aus der ermittelten Nukleotidkonzentration und dem errechneten Einzelgewicht ergeben die Molekülzahl pro µl Volumen des Restriktionsverdaus bezogen auf Doppelstrang-

## 2 Methoden und Materialien

DNA. Da jedoch diese während des Denaturierungsschrittes der PCR in zwei Einzelstränge zerfällt, muss die berechnete Molekülzahl mit dem Faktor 2 multipliziert werden.

Anschließend wurde die linearisierte Plasmid-DNA in 1 x TE-Puffer und 0,06 x *First Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl [pH 8,3], 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) auf eine Endkonzentration von 10<sup>10</sup> Einzelstrangkopien DNA/μl überführt und nach erfolgter Aliquotierung bei -20°C gelagert. Aus dieser Stocklösung wurden unter Beibehaltung der Pufferkonzentrationen für jede qRT-PCR Untersuchung Verdünnungsreihen von 10<sup>6</sup> - 10<sup>1</sup> Kopien/μl hergestellt.

### 2.3.19. Aufreinigung von isolierter RNA

Da eine Assayetablierung mit fluorogenen Sonden, welche Exongrenzen überspannen, bei der Untersuchung des untranslatierten 3'-Bereiches des HMGCR-Genes nicht möglich war, musste eine DNA-Koamplifikation auf andere Weise minimiert werden. Um DNA-Kontamination in den RNA-Isolaten zu minimieren, wurden daher 100 μg isolierte RNA aus humanen Leberproben mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) gemäß Angaben des Herstellers aufgereinigt. Zusätzlich wurde zwischen Schritt 3 und 4 des Protokolls das mitgelieferte Optional On-Column DNase Digestion with the RNase-Free DNase Set (Qiagen) eingefügt, um höchstmögliche Reinheit an RNA zu erhalten. Abschließend wurde vor der Weiterverwendung erneut die Konzentration der RNA mit dem NanoDrop-System (NanoDrop-Technologies) ermittelt.

### 2.3.20. Vorarbeiten für Expressionsstudien des HMGCR-Gens in der LE-Heart Kohorte

Zur Etablierung der qRT-PCR-Assays dienten zunächst Expressionsuntersuchungen in humanen Leberproben, bevor man diese für weitere Untersuchungen in der LE-Heart-Kohorte verwendete. Für die Analysen des alternativen *Splicing* des Exon 13 des HMGCR-Gens wurden zunächst in 98 Proben humaner Leberproben vier qRT-PCR-Assays angewendet: (1)HMGCRmitEx13, (2)HMGCRohneEx13, (3)HMGCRgesamt, (4)β-Aktin (vgl. 2.3.14.). Der Assay (3) diente insbesondere der Prüfung, wie genau die Expression der beiden HMGCR-Transkripte durch diese drei Assays wiedergegeben wurde. Näherungsweise sollte (1) + (2) = (3) ergeben, um von guter Qualität mit geringer Degradation des Untersuchungsmaterials ausgehen zu können. Bei den Expressionsstudien in den humanen Leberproben stellte sich allerdings heraus, dass es zu einem starken Unterschieden bezüglich des Degradationsgrades der isolierten RNA zwischen den verschiedenen Tranchen der

## 2 Methoden und Materialien

gelieferten Leberproben gab, zum anderen das Qualitätsmerkmal  $(1) + (2) = (3)$  erheblich zwischen verschiedenen Leberproben schwankte. Eine Ursachenforschung ließ vermuten, dass vor allem sehr unterschiedliche Zeitspannen der Lagerung der nativen Leberproben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  vor der RNA-Isolierung einen großen Einfluss auf das Qualitätsmerkmal haben. Um aus diesen Tranchen eine repräsentative Gesamtgruppe zu erhalten, wurde zunächst eine Tranche von 33 Proben ausgeschlossen, da in dieser bei den meisten Proben die RNA-Degradation schon weit fortgeschritten war ( $\beta$ -Aktin Expression  $< 100.000$  Kopien). In den übrigen Tranchen zeigte sich häufiger, dass  $(1) + (2) > (3)$  ist. Daher wurden Proben, dessen Quotient  $(3) / (1+2) < 0,70$  ist – was bei einer Kopienverdopplung pro Zyklus in einer exponentiellen qRT-PCR einen Unterschied von ca.  $\frac{1}{2} C_t$  ergibt – von der Gesamtgruppe ausgeschlossen. Schließlich ergab sich eine Gruppe von 51 Leberproben, an denen die Etablierung der Assays durchgeführt wurde. Man untersuchte beide SNPs hinsichtlich einer möglichen Assoziation auf das alternative *Splicing*  $(2) / (1+2)$  bzw.  $(1) / (1+2)$  und auf die Gesamtexpression  $(1+2)$  des HMGCRC-Gens.

Aufgrund der gewonnenen Erfahrungswerte aus der Untersuchung der Leberproben, bei denen sich Proben bezüglich des Qualitätsmerkmals  $(1) + (2) = (3)$  kaum unterschieden, wenn man alle RNA-Proben unter strenger Einhaltung des gleichen Protokolls isolierte, wurde in den Expressionsstudien der LE-Heart-Kohorte auf den qRT-PCR-Assay (3)HMGCRCgesamt verzichtet und die Gesamtexpression als Summe der Assays (1)HMGCRCmitEx13 und (2)HMGCRCohneEx13 kalkuliert. Zur Beurteilung der RNA-Degradation wurde in den PBMCs ein Schwellenwert von  $\beta$ -Aktin Expression = 10.000 Kopien angesetzt.

Auch die Untersuchung der untranslatierten cDNA-Transkriptlängen im 3'-Bereich des HMGCRC-Gens wurde zunächst in ausgewählten Leberproben etabliert. Hierfür verwendete man drei qRT-PCR-Assays mit nachfolgender Normalisierung aller Daten auf  $\beta$ -Aktin. Die TaqMan-Sonde von (1)HMGCRCStopp befand sich unmittelbar vor dem SNP rs5909 und maß die Gesamtzahl an HMGCRC-Transkripten, (2)HMGCRCStopp400 bestimmte die Anzahl der Transkripte, welche ein mindestens 400 bp langes nicht translatiertes 3'-Ende besaßen, (3)HMGCRCStopp1000 ermittelte HMGCRC-Transkripte mit mindestens 1 kbp langen untranslatierten 3'-Bereichen (vgl. 2.3.14.). RNA von 12 humanen Leberproben wurden abhängig vom SNP rs5909 ausgewählt und vor der Umschreibung in cDNA und der weiteren Untersuchung aufgereinigt (vgl. 2.3.19.). Zwei Proben mussten aufgrund mangelhafter Expressionsdaten (eine Probe mit  $\beta$ -Aktin  $< 100.000$  Kopien; eine weitere Probe mit zu großer Schwankung –  $\Delta C_t = 0,9$  – der Mehrfachwerte) von der statistischen Analyse

ausgeschlossen werden. Nach der Etablierung der Assays wurde eine Stichprobe von 90 PBMCs der LE-Heart-Kohorte zur weiteren Analyse ausgewählt. Fünf Proben mussten aufgrund mangelhafter Expressionsdaten von der statistischen Analyse ausgeschlossen werden, so dass die untranslatierten cDNA-Transkriptlängen in 85 Proben untersucht wurde.

### 2.3.21. SNP-Genotypisierung mittels Schmelzkurvenanalyse

Die verschiedenen SNP-Genotypisierungen im Rahmen der Stufe 3 - Replikation in der CARLA-Kohorte und die SNP-Genotypisierungen verschiedener Genpolymorphismen des HMGCR-Genes in der LE-Heart-Kohorte wurden ebenso mit dem fluorogenen PCR-Verfahren (TaqMan) an einem ABI Prism 7900 HT Sequence Detector System (Applied Biosystems) durchgeführt (El Housni et al. 2003).

Im Gegensatz zum qRT-PCR-Verfahren wurde die fluorogene Sonde nicht durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert, da die Temperatur, bei welcher die Sonde mit dem Abschnitt der DNA im Bereich des homozygoten Wildtypallels hybridisiert, mit 55°C ca. 10°C unter der des PCR-*Annealings*schrittes liegt. Stattdessen wurde an eine PCR unter üblichen Reaktionsbedingungen ein einzelner Schritt angehängt, der es der Sonde zunächst ermöglichte, bei einer Temperatur von 20°C unspezifisch an vorhandene DNA zu hybridisieren. Danach folgte zur Schmelzkurvenbestimmung eine kontinuierliche Temperaturerhöhung mit fortlaufender Messung des Fluoreszenzsignals. Mit ansteigender Temperatur nimmt die Spezifität der Hybridisierung zwischen DNA und Sonde zu. Schließlich löst sich die Sonde von der DNA mit mutantern Allel bei geringerer Temperatur als von DNA, welches das Wildtypallel beinhaltet. Da die mittlere Länge der Sonde zum Zeitpunkt der Ablösung von der DNA infolge einer willkürlichen Konformationsänderung kürzer wird, nimmt der FRET zwischen Reporter und Quencher zu, da dieser Effekt mit der sechsten Potenz indirekt proportional zum Abstand zwischen beiden Farbstoffen ist (Didenko 2001). Der damit verbundene Abfall an Fluoreszenzsignal wurde gemessen. Je nach Allelverteilung in der jeweiligen Probe kam es zu einem von folgenden drei Signalmustern (Abbildung 9) während der Temperaturerhöhung:

1. Ein Maximum (1. Ableitung der Schmelzkurve) bei geringerer Temperatur als 55°C spricht für eine homozygot mutante Allelverteilung.
2. Ein Maximum bei ca. 55°C repräsentiert einen homozygoten Wildtyp.
3. Zwei Maxima sprechen für Heterozygotie.

## 2 Methoden und Materialien

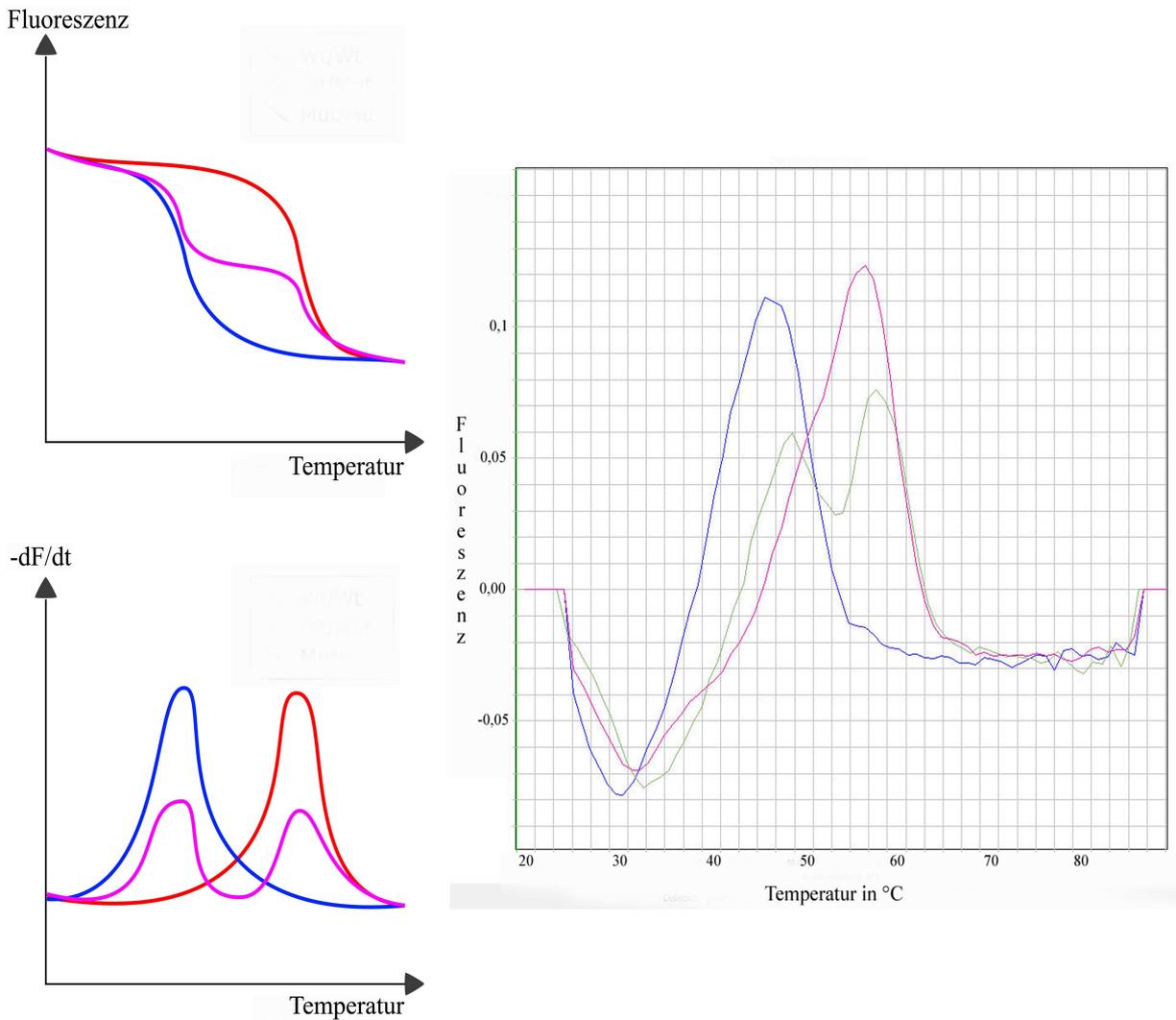


Abbildung 9: linke Seite: Schematischer Verlauf des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Temperatur für den homozygoten Wildtyp (orange), Heterozygotie (rosa) und eine homozygote Mutante (blau). Die obere Abbildung stellt die Schmelzkurve dar, die untere die erste Ableitung der Schmelzkurve.

rechte Seite: Exemplarische Darstellung der drei Signalmuster anhand der Schmelzkurvenanalyse im ABI Prism 7900 HT Sequence Detector System für den SNP rs3846662 in drei Probanden der LE-Heart Kohorte (blau: Genotyp G/G; rot: Genotyp A/A, grün: Genotyp A/G).

### 2.3.22. Reagenzien, Materialien, Reaktionsbedingungen für die Schmelzkurvenanalyse

Zum Wildtyp komplementäre, fluorogene Sonden wurden mit dem MeltCalc99-Makro für Microsoft Excel ermittelt. Die Schmelztemperatur für das mutante Allel sollte dabei 45°C nicht unterschreiten und die Temperaturdifferenz zwischen den Schmelztemperaturen für Wildtyp und Mutante sollte im Bereich von 7 - 10°C liegen. Daraufhin wurden spezifische Primer mit der Primer Express 2.0 - Software ermittelt, wobei die Schmelztemperatur im Falle eines Wildtypallels 10°C über der Schmelztemperatur der Sonde lag und eine Länge des Amplikons von ca. 100 bp angestrebt wurde. Zu Beginn einer SNP-Analyse stand eine PCR mit folgendem Ansatz:

- 1 µl DNA-*Template*
- 1 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM, Solis Biodyne)
- 0,625 µl 10 x PCR-Puffer (Reaction Buffer B, 0,8 M Tris-HCl, 0,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2% w/v Tween-20, Solis Biodyne)
- 0,625 µl dNTPs (1250 µM)
- 0,0625 µl DNA-Polymerase (5 U/µl FIREPol DNA Polymerase I, Solis Biodyne)
- 0,0625 µl Oligonukleotidsonde (10 µM)
- 0,2813 µl Primer für Sondenhybridisierungsstrang (20 pmol/µl)
- 0,0313 µl Primer für den untergeordneten Strang (20 pmol/µl)
- 0,3125 µl Kälberserumalbumin (NewEngland Biolabs, Konz. 10 mg/ml, pH 7,0, 20 mM KPO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 5% Glycerol)
- ad 6,25 µl H<sub>2</sub>O-Lichrosolv

Die Reaktionsbedingungen entsprachen denen einer Standard-PCR (vgl. 2.3.7.) und wurden im Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 durchgeführt. Die anschließende Schmelzkurvenanalyse lief unter folgenden Bedingungen im ABI Prism 7900 HT Sequence Detector System (Applied Biosystems) ab:

- 95°C 3 min
- 20°C 2,5 min
- kontinuierliche stufenlose Temperaturerhöhung von 20°C auf 95°C mit 5°C/min
- 95°C 15 s

Nachfolgend in Tabelle 11 aufgelistete Genpolymorphismen wurden mit dieser Methode analysiert.

**Tabelle 11:** Auflistung der Assays für die Untersuchung von SNPs mittels Schmelzkurvenanalyse.

SNP ID	Allele, Lage des SNP, Sequenz (5'→ 3')	Amplikon
<i>rs2294309</i>	<i>Allele: T/G, Chr. 6, 27.483.816 bp</i> 5'-Primer TACTTCAGTAGTATGATGCTTAATTTCTGCTT 3'-Primer GAAAGATGCCCTAGATACACACATATAC Sonde CTAGATGACATATAGAGGAATATC	<b>194 bp</b>
<i>rs3846662</i>	<i>Allele: A/G, Chr. 5, 74.651.084 bp</i> 5'-Primer CTGCTGGCACCTCCACCAAGC 3'-Primer GCAACAACAGAAGGTTGTCTTGTGGC Sonde CTCATTGCCTTACCTATGATGT	<b>227 bp</b>
<i>rs6029228</i>	<i>Allele: G/T, Chr. 20, 39.255.548 bp</i> 5'-Primer ATATTTGAAATGTTACAGAGCCCTCGG 3'-Primer CATATATGGAGAGCATGACAAAAGTCAGTTGAG Sonde CTCTATGGAATTGCAAGTTTGAA	<b>114 bp</b>
<i>rs6451824</i>	<i>Allele: G/A, Chr. 5, 45.841.630 bp</i> 5'-Primer GCTGGATATTAGACTTTTGTGGATGCATA 3'-Primer AATTGACAAGTGGCACCAATTAATAAGAG Sonde ACCTAAGGAACGGGAGCA	<b>134 bp</b>
<i>rs7703051</i>	<i>Allele: C/A, Chr. 5, 74.625.487 bp</i> 5'-Primer GATCACAAATTGCTTGGAAAGTTGCTG 3'-Primer AAGATTTTGGGGGAATAGGAAAGGAC Sonde CATTATACCTTGAAACACTTAGC	<b>308 bp</b>
<i>rs9384960</i>	<i>Allele: T/A, Chr. 6, 116.130.955 bp</i> 5'-Primer TAGCAGACTAGGCCAAATGAACTGTGG 3'-Primer AGAGAGGCAGAAAGAGCCGGAGTC Sonde GATAGTTTGCAGAAGTAGGC	<b>107 bp</b>
<i>rs17695653</i>	<i>Allele: C/T, Chr. 8, 18.526.498 bp</i> 5'-Primer GCTTTTCCTTTTGTATATCAGCTTAGGCC 3'-Primer GCAAGGTACGCTATGTAGGGAGATGG Sonde CTAAGTTCACGGCTAAGAAAAC	<b>217 bp</b>

Grau unterlegt ist die Base, welche sich komplementär an das Wildtypallel des Genpolymorphismus anlagert. Sind die grau unterlegte Base und das Wildtypallel gleich, so lagert sich die Sonde an das Wildtypallel des komplementären DNA-Stranges an. SNP-Position gemäß Ensembl genome browser build 60.

### 2.3.23. SNP-Genotypisierung mittels Alleldiskrimination

Da für manche Genpolymorphismen kein reliabler Assay für eine Schmelzkurvenanalyse ermittelt werden konnte, wurden mehrere Untersuchungen mit TaqMan SNP Genotyping Assays durchgeführt, welche durch Angabe der SNP-ID von Applied Biosystems als bereits funktionell validierte Assays geliefert wurden. Diese enthalten zwei fluorogene Oligonukleotidsonden, welche jeweils spezifisch für das Wildtypallel oder für die Mutante sind (Abbildung 10). An ihrem 5'-Ende sind sie mit dem VIC- (Allel 1) bzw. dem FAM-Fluoreszenzfarbstoff (Allel 2) markiert. Am 3'-Ende enthalten beide einen nicht fluoreszierenden Quencher sowie einen *Minor groove binder* (MGB). Die erste Modifikation führt zu einer größeren Messgenauigkeit, die zweite erhöht die Schmelztemperatur beider Sonden (Afonina et al. 1997), so dass kürzere Sonden für den Assay ermittelt werden können. Kürzere Sonden führen bei einem Basenaustausch zu einer größeren Temperaturdifferenz und somit zu einer reliablen Alleldiskrimination.

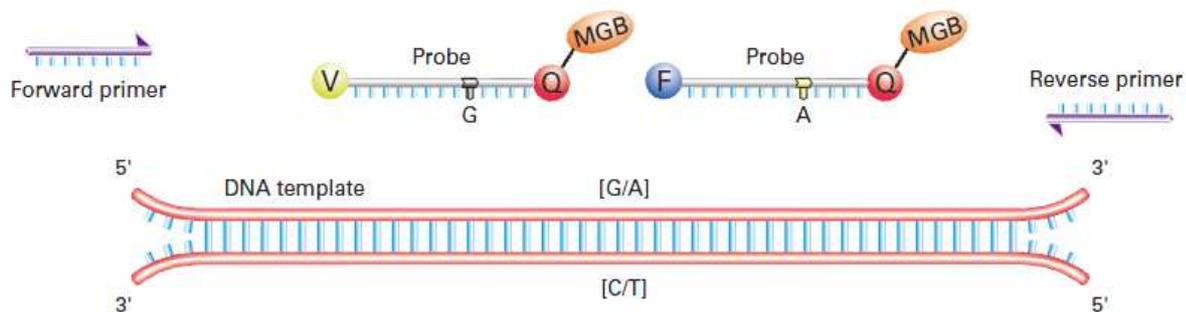


Abbildung 10: SNP-Genotyping mittels SNP-Alleldiskrimination. Jeweils eine Sonde bindet spezifisch an den Matrizenstrang mit der komplementären Base des zugehörigen Allels und generiert nach Hydrolyse durch die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase ein entsprechendes Fluoreszenzsignal. Aus TaqMan SNP Genotyping assays protocol (Applied Biosystems).

Die Generierung eines Fluoreszenzsignals entsprach hierbei der Methodik der qRT-PCR (vgl. 2.3.13.), wobei die Schmelztemperaturen beider Sonden so gewählt wurden, dass sich diese während der *Annealing*-Phase der PCR jeweils möglichst spezifisch an die für sie komplementäre Sequenz anlagerten. Aufgrund des generierten Fluoreszenzsignalmusters während der 40 PCR-Zyklen konnte dann mittels der SDS-Software (Applied Biosystems) die Zuordnung zum entsprechenden Genotyp erfolgen.

### 2.3.24. Reagenzien, Materialien, Reaktionsbedingungen für die Alleldiskrimination

Die Alleldiskrimination wurde als RT-PCR auf 384-*well* Platten mit folgendem Ansatz durchgeführt:

- 1  $\mu\text{l}$  DNA-*Template*
- 2,5  $\mu\text{l}$  2 x TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems)
- 0,1  $\mu\text{l}$  20 x TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems; 1 x TE-Puffer; Primerkonzentration 18 pmol/ $\mu\text{l}$ ; Sondenkonzentration 4 $\mu\text{M}$ )
- 1,4  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O-Lichrosolv

Die verwendeten Geräte zur Fluoreszenzmessung und die Konditionen der PCR entsprachen denen der quantitativen fluorogenen RT-PCR (vgl. 2.3.15.).

Nach der PCR-Amplifikation erfolgte eine Endpunktauslesung der 384-*well* Platte, in welcher die SDS-Software die Fluoreszenzmessungen umrechnet, welche während der 40 Zyklen durchgeführt wurden, und als graphische Darstellung ausgibt, auf welcher die drei möglichen Allelkombinationen als Cluster zu erkennen sind und somit jeder Probe zugeordnet werden können (Abbildung 11). Mit dieser Methode wurden die SNPs rs10999614, rs7082886, rs5909, rs17562686 und HMGCR 1 analysiert.

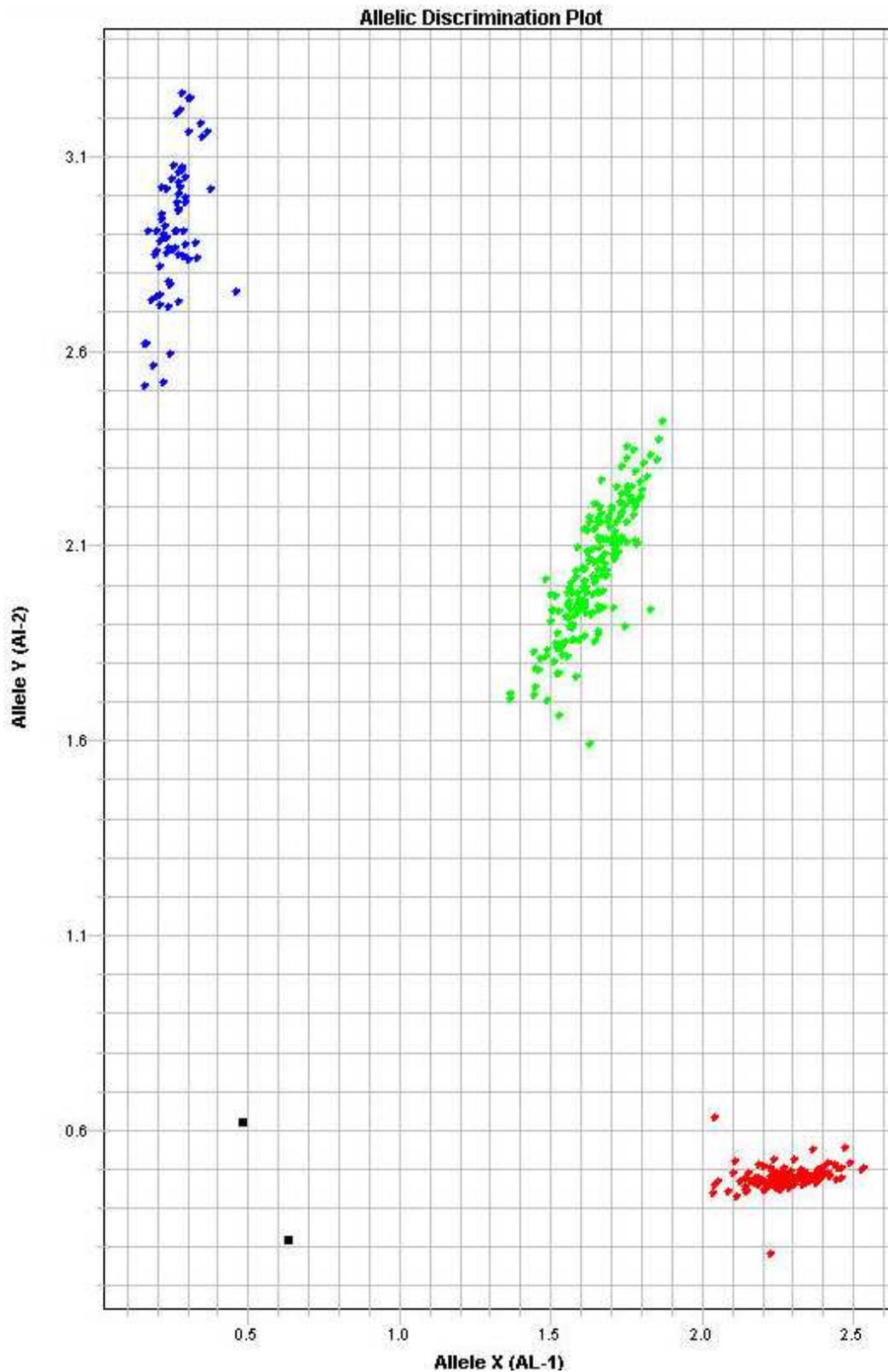


Abbildung 11: Beispiel der SNP-Alleldiskrimination in einem ABI Prism 7900 HT Sequence Detector (Applied Biosystems) mittels SDS-Software für den SNP rs7082886 in einem Teil der CARLA-Kohorte. Die rote Punktewolke stellt Träger mit homozygotem Wildtypallel (T/T) dar, grüne Punkte bilden heterozygote Merkmalsträger ab, blau dargestellt sind Probanden mit homozygoter Mutante (C/C) für den SNP.

### 2.4. HMG-CoA-Reduktase Enzymaktivitätsassay

#### 2.4.1. Probenaufbereitung von humanem Lebergewebe

Da bereits bei der RNA-Isolation aus humanen Leberproben deutliche Schwankungen bezüglich der Qualität zwischen den einzelnen Tranchen auffielen, verwendete man für die Aktivitätsuntersuchung der HMG-CoA-Reduktase ausschließlich solche Proben, deren RNA-Degradation nur gering war. Insgesamt wählte man aus den vorhandenen Leberproben 48 Gewebeproben und isolierte aus jeweils ca. 40 mg kryokonserviertem Lebergewebe Aliquote zur weiteren biochemischen Untersuchung. Des Weiteren wurden zwei murine Lebern zur Assayetablierung unmittelbar nach der Entnahme kryokonserviert und im Folgenden wie humane Leberproben behandelt. Die Aliquote wurden derart aufgearbeitet, dass sie angereicherte Mikrosomenfraktionen ohne Zytosol enthielten, da nachgewiesen werden konnte, dass zytosolische Enzyme, welche HMG-CoA spalten, zu einer Substratdepletion während des Enzymaktivitätsassays führen können und die spezifische HMG-CoA-Reduktase-Aktivität somit im Experiment unzuverlässig bestimmt wird (Young & Berger 1981). Die Mikrosomenisolierung aus Leberproben lief wie folgt ab (Heinemann & Ozols 1998):

1. Aufschluss von ca. 40 mg kryokonserviertem Gewebe mit 2,8 mm Keramikugeln im Precellys24 (bertin technologies) für 30 s bei 5000 U/min in 600 µl Gewebepuffer (100 mM Tris-Base, pH 7,5; 100 mM KCl, 2 mM EDTA, 0,5 mM DTT)
2. Überführung der Gewebesuspension in ein neues steriles Tube und sequentielle Zentrifugation des jeweiligen Überstandes in drei Schritten
3. Abzentrifugation von Membranbestandteilen und Nucleoli bei 600 g für 5 min
4. Abzentrifugation der mitochondrialen Fraktion bei 10000 g für 20 min
5. Abzentrifugation des Zytosols bei 170000 g für 90 min
6. Resuspendierung des mikrosomalen Pellets in 400 µl Gewebepuffer und darauffolgender Lagerung bei -80°C nach erfolgter Aliquotierung

#### 2.4.2. Probenaufbereitung von peripheren mononukleären Zellen humanen Blutes

Dem Hauptexperiment vorausgehend erfolgten zunächst mehrere Testläufe mit jeweils zwei PBMC-Proben zur Überprüfung der Validität der gewonnenen Ergebnisse. Zum einen wurde geprüft, wie viele Vacutainer CPT pro Proband notwendig wären, um sowohl stabile

## 2 Methoden und Materialien

Proteinkonzentrationen im Zielbereich von 50-200 mg/dl als auch stabile Aktivitätsangaben für eine definierte Probe zu erhalten. Zum anderen waren verschiedene Modifikationen im Protokoll – vor allem bei der Zusammensetzung des Reaktionsgemisches und der Probenvolumina – auf Reliabilität zu prüfen. Nach erfolgreicher Etablierung wurden die Proben für das Hauptexperiment nach einem strengen Protokoll innerhalb von drei Wochen gewonnen und aufgearbeitet, um lange Lagerungszeiten im -80°C-Kühlschrank zu vermeiden. Die Auswahl der Probanden war randomisiert. Die Präferenz lag auf der Rekrutierung nicht nüchterner Probanden ohne Statinmedikation.

Unmittelbar nach Gewinnung von PBMCs und deren Überführung in 1 ml TEDK-Puffer (vgl. 2.2.2.) erfolgte noch am Tag der Blutentnahme aus diesen Zellen die Isolation der Mikrosomenfraktionen nach folgendem Protokoll (Harwood et al. 1984):

1. Aufschluss der Zellsuspension mit 1,4 mm Keramikkugeln im Precellys24 für 2 x 20 s bei 6500 U/min mit Zwischenlagerung auf Eis für 5 min
2. Überführung der Zellsuspension in ein neues steriles Tube und Zentrifugation bei 2000 g für 10 min
3. Überführung des Überstandes in ein neues Tube und Zentrifugation bei 170000 g für 90 min
4. Resuspendierung des mikrosomalen Pellets in 180 µl TEDK-Puffer und darauffolgende Lagerung bei -80°C nach erfolgter Aliquotierung

### 2.4.3. Proteinkonzentrationsbestimmung

Da es zwischen den Proben während der Isolierung der Mikrosomenfraktion zu Unterschieden bezüglich der Effizienz der einzelnen Arbeitsschritte kommen konnte, wurde die gemessene Enzymaktivität auf die Gesamtproteinkonzentration im Isolat normalisiert. So weit nicht anders erwähnt, wurde der Mittelwert von vier Konzentrationsbestimmungen berechnet und für die weitere Kalkulation verwendet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration beruhte auf der Verwendung von Bicinchoninsäure (BCA) (Smith et al. 1985). Zunächst wurden mittels der Biuretreaktion  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch gelöste Proteine komplexiert und im alkalischen Medium zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert. Ein  $\text{Cu}^+$ -Ion bildet daraufhin mit zwei Molekülen BCA ein Chelat und führt zu einem purpurnen Farbumschlag, welcher in seiner Intensität mit der Proteinkonzentration korreliert. Hierfür benutzte man den auf dieser Methode basierenden BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce). Sämtliche Konzentrationsbestimmungen wurden in 96-well Mikrotiterplatten unter Verwendung einer Standardkurve nach Angaben

## 2 Methoden und Materialien

des Herstellers durchgeführt. Alle Proben wurden mit NaCl verdünnt, so dass alle chelatbildenden und reduzierenden Puffersubstanzen innerhalb der vom Hersteller tolerierten Konzentrationsbereiche lagen. Die Auslesung des Farbumschlages der Reaktion geschah auf einem Tecan SPECTRA Fluor mit der Tecan Magellan 6 Software bei 562 nm.

### 2.4.4. Aktivitätsassay

Zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität der HMG-CoA-Reduktase wurden je Probe zwei Aliquots (A und B) á 50 µl 15 min bei 37°C und ein Aliquot (L) als Leerwertbestimmung bei 95°C im Thermomixer vorinkubiert und danach durch Zugabe von je 50 µl Reaktionsmedium (Tabelle 12) bei 37°C für 1 h zur Reaktion gebracht. Als NADPH-Regenerator wurde die Umwandlung von Glukose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconolacton verwendet, so dass schließlich die in Abbildung 12 dargestellte Reaktionsschleife ablief.

**Tabelle 12:** Zusammenstellung des Reaktionsmediums für den HMG-CoA-Reduktase-Aktivitätsassay mit Angabe des verwendeten humanen Zelltyp.

Volumen des gesamten Reaktionsgemisches	100 µl
Proteinmenge	50 – 200 mg
Reaktionsmedium für Lebermikrosomen (Walli & Seidel 1984)	100 mM Tris-Base, pH 7,5; 5 mM Dithiothreitol (Sigma) ; 3 mM NADP (Roche); 22 mM Glukose-6-Phosphat (Sigma); 5 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Roche); 0,03 µCi [3- <sup>14</sup> C]-HMG-CoA (59 mCi/mmol, GE Healthcare); 5,5 nM HMG-CoA (Sigma)
Reaktionsmedium für PBMC-Mikrosomen (modifiziert nach Harwood et al. 1984)	50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM Dithiothreitol (Sigma); 3 mM NADP (Roche); 22 mM Glukose-6-Phosphat (Sigma); 5 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Roche); 25 mM EDTA (Sigma); 0,04 µCi [3- <sup>14</sup> C]-HMG-CoA (59 mCi/mmol, GE Healthcare); 5,5 nM HMG-CoA (Sigma)

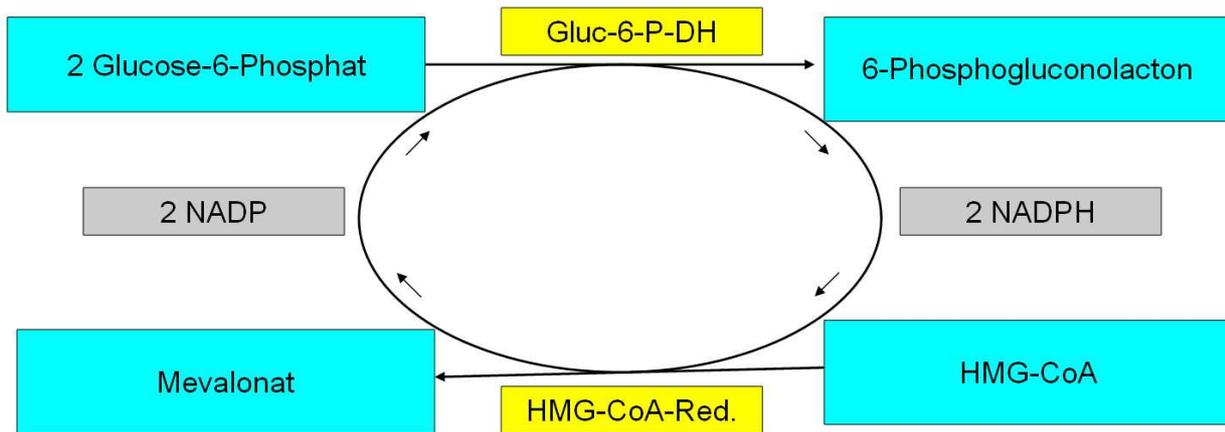


Abbildung 12: Biochemischer Reaktionsablauf im HMG-CoA-Reduktase-Aktivitätsassay. In einer Hilfsreaktion werden durch die Umwandlung von zwei Molekülen Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconolacton mittels der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zwei Moleküle NADPH erzeugt, welche als Co-Faktor für die Bildung von einem Molekül Mevalonat aus HMG-CoA benötigt werden.

Nach 1 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 30  $\mu$ l Konversionspuffer gestoppt und das Gesamtvolumen noch einmal für 20 min bei 37°C inkubiert. 30  $\mu$ l Konversionspuffer enthielten als internen Standard (Brown, Dana & Goldstein 1974) 0,04 $\mu$ Ci [5-<sup>3</sup>H]-Mevalonolacton (29,1 Ci/mmol in Ethanol, Sigma) und 2,5 M HCl, welche neu synthetisiertes Mevalonat in Mevalonolacton umwandelte.

#### 2.4.5. Anionenaustausch-Säulenchromatographie

Zur Auftrennung von <sup>14</sup>C-HMG-CoA und <sup>14</sup>C-Mevalonolacton wurden Anionenaustauschsäulen verwendet, da dieses Verfahren weniger radioaktives Material benötigt und einfacher zu handhaben ist als die früher meist verwendete Dünnschicht-Siliziumchromatographie (Ong, Khor & Tan 1991). Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 12000 g bei 4°C wurden 50  $\mu$ l des 130  $\mu$ l umfassenden Gesamtvolumens (vgl. 2.4.4.) auf eine 0,5 x 5 cm mit Aqua dest. equilibrierte Säule Anionenaustauschharz (Bio-Rex 5, Chlorid-Form, 100-200  $\mu$ m Trockensiebgröße, Bio-Rad) gegeben und dann mit 2 ml Aqua dest. in ein Szintillationsgefäß, genannt „nach Säule“ (nS), eluiert (Alberts et al. 1980). <sup>14</sup>C-HMG-CoA wurde gegen Chlorid-Ionen ausgetauscht und akkumulierte in der Säule, während <sup>14</sup>C-Mevalonolacton die Säule passierte. Weitere 50  $\mu$ l desselben Probenaliquots und 2 ml Aqua dest. wurden direkt in ein zweites Szintillationsgefäß, genannt „vor Säule“ (vS), gegeben (Abbildung 13).

## 2 Methoden und Materialien

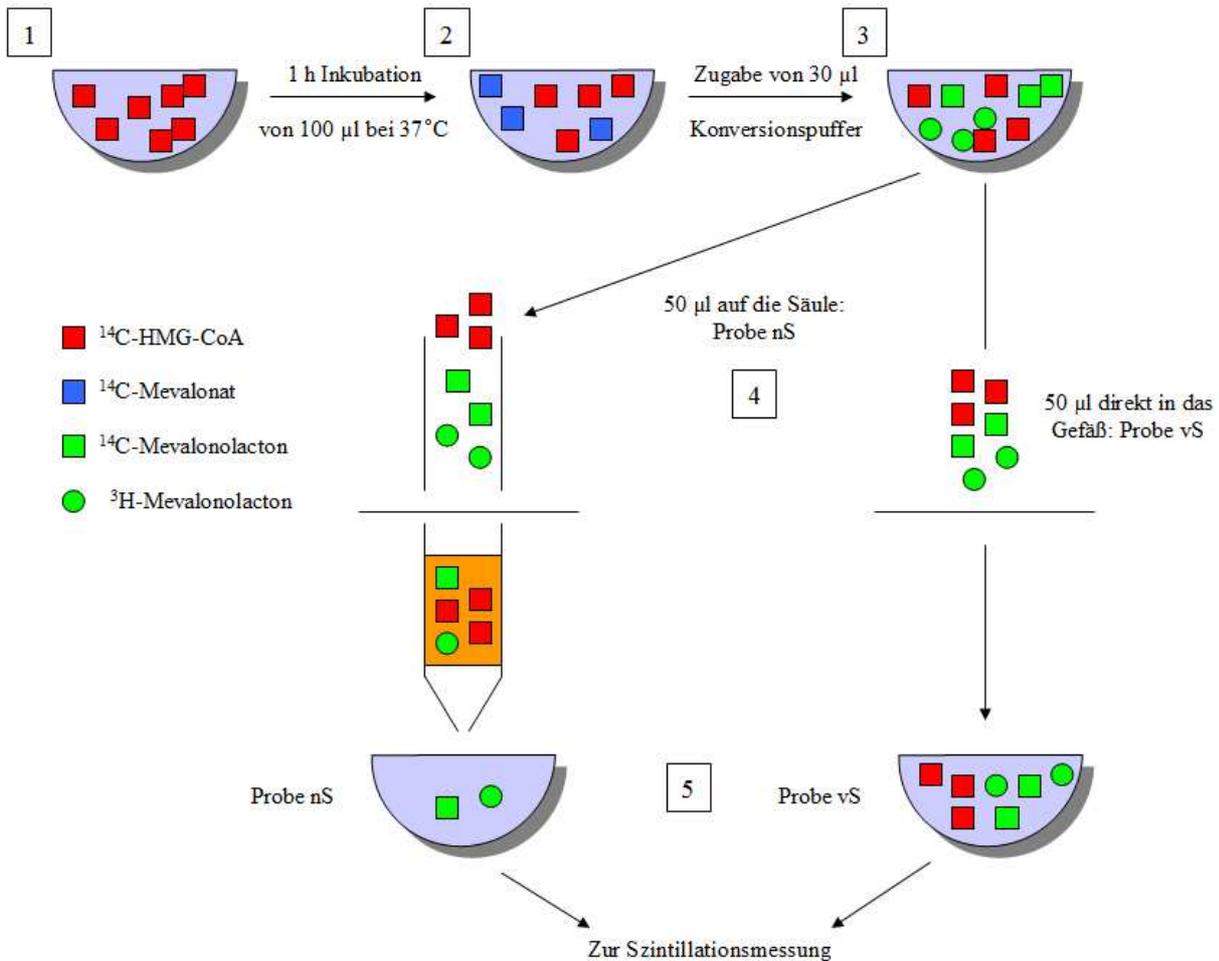


Abbildung 13: Schematische Abfolge der Aktivitätsmessung. Die HMG-CoA-Reduktase bildet Mevalonat (blauer Kasten) aus HMG-CoA (roter Kasten), welches nachfolgend durch HCl zu Mevalonolacton (grüner Kasten) umgewandelt wird. Mevalonolacton passiert größtenteils die Anionenaustauschsäule, während HMG-CoA in der Säule verbleibt. Hinzugefügtes [ $5\text{-}^3\text{H}$ ]-Mevalonolacton (grüner Kreis) dient zur Bestimmung der *recovery* einer jeden Säule. Das Verhältnis der Symbole zueinander als auch das Verhältnis der Symbole zwischen Schritt 3 und 4 entspricht nicht den tatsächlichen experimentellen Bedingungen. Die Symbole dienen ausschließlich der Veranschaulichung. Weitere Einzelheiten und Abkürzungen siehe Text.

### 2.4.6. Bestimmung des enzymatischen Stoffumsatzes mittels Szintillationsmessung

Nach Herstellung der sechs jeweils 2,05 ml Messvolumen beinhaltenden Szintillationsgefäße pro Leber-/PBMC-Probe wurde jeweils 10 ml Ultima Gold<sup>TM</sup> XR-Szintillationsflüssigkeit (PerkinElmer) hinzugegeben und auf Grundlage der von Noakes (Noakes, Kim & Stipp 1965) etablierten Methode untersucht. Im Speziellen wurde in der vorliegenden Arbeit die für schwache  $\beta$ -Strahlung besonders geeignete Flüssigszintillation mit einem TriCarb Flüssigszintillationsspektrometer (PerkinElmer) verwendet. Von den instabilen Isotopen  $^3\text{H}$  und  $^{14}\text{C}$  wird  $\beta$ -Strahlung emittiert, welche den Flüssigszintillator anregt und zur Abgabe von Lichtblitzen führt. Diese Lichtblitze werden durch einen Photomultiplier in elektrische

## 2 Methoden und Materialien

Impulse umgewandelt und einer Zählordnung zugeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Energie der ausgesendeten  $\beta$ -Teilchen von 19 keV für  $^3\text{H}$  und 156 keV für  $^{14}\text{C}$  ist es möglich, die Aktivität beider Radionuklide simultan zu messen (Abbildung 14).

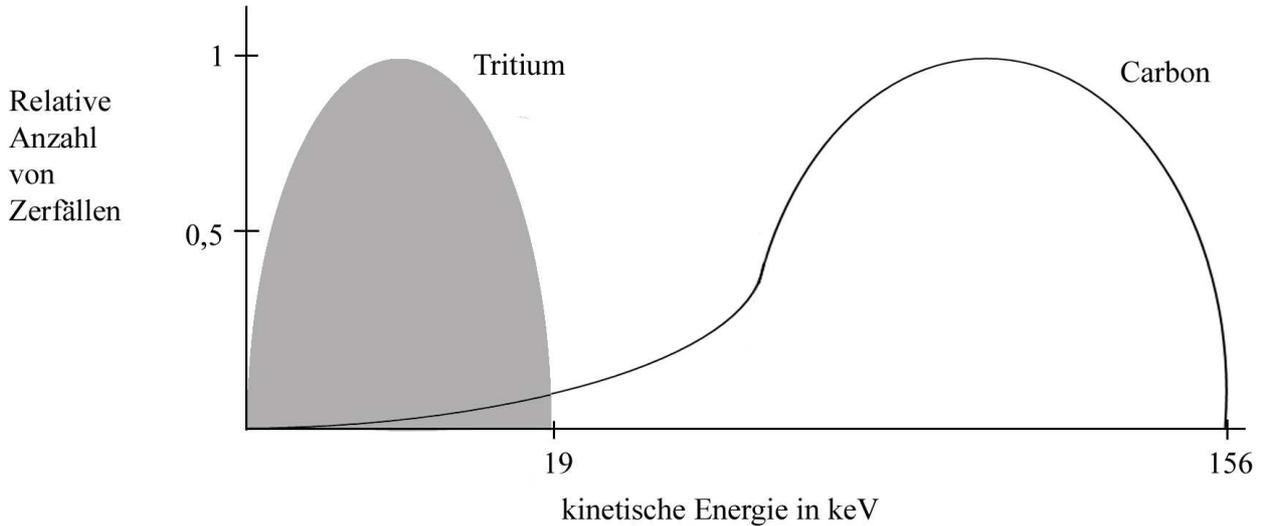


Abbildung 14: Energiespektren für  $\beta$ -Teilchen der Radionukleotide  $^3\text{H}$  und  $^{14}\text{C}$ . Die x-Achse ist logarithmisch dargestellt.

Mittels der Software QuantaSmart<sup>TM</sup> (PerkinElmer) und mitgelieferter Standardproben wurde das Gerät vor einer Messreihe kontrolliert, die entstehenden Spektren nach 3 min Messzeit analysiert und die Lichtblitze pro Minute (Abkürzung: cpm) dem  $^3\text{H}$ - und  $^{14}\text{C}$ -Isotop zugeordnet und nach Berücksichtigung der Kalibration in Zerfälle pro Minute (Abkürzung: dpm) umgerechnet.

Der Quotient aus [ $^3\text{H}$  dpm, „nS“] und [ $^3\text{H}$  dpm, „vS“] eines jeden Probenaliquots diente zur spezifischen Bestimmung des eluierten Anteils des 50  $\mu\text{l}$ -Volumen in jeder Säule (*recovery*). Damit ließ sich dann der  $^{14}\text{C}$  dpm-Wert des Probenaliquots berechnen:

$$^{14}\text{C}_{dpm}(\text{Aliquot}) = \frac{^{14}\text{C}_{dpm}(\text{nS}) \times ^3\text{H}_{dpm}(\text{vS})}{^3\text{H}_{dpm}(\text{nS})}$$

Daraufhin ermittelte man den  $^{14}\text{C}$  dpm-Wert einer humanen Probe, welcher stellvertretend für die spezifische Enzymaktivität dieser Probe stand:

$$^{14}\text{C}_{dpm}(\text{P}) = \frac{^{14}\text{C}_{dpm}(\text{A}) + ^{14}\text{C}_{dpm}(\text{B}) - 2 \times ^{14}\text{C}_{dpm}(\text{L})}{2}$$

## 2 Methoden und Materialien

Um Vergleichbarkeit zwischen den Proben zu wahren, wurde auf die Gesamtproteinkonzentration oder bei PBMCs auch auf die Zellzahl der Probe normalisiert, welche aufgrund des simultan abgenommenen maschinellen Differentialblutbildes eines jeden LE-Heart-Probanden leicht berechnet werden konnte:

$$^{14}C_{dpm}(P_{norm}) = ^{14}C_{dpm}(P) \times \frac{100 \text{ mg/dl}}{\text{Proteinkonzentration in mg/dl}}$$

$$^{14}C_{dpm}(P_{norm}) = ^{14}C_{dpm}(P) \times \frac{50 \times 10^6}{\text{Zellzahl in } 10^6}$$

Daraus wurde schließlich die spezifische Enzymaktivität pro mg Gesamtprotein bzw. pro 1.000.000 Zellen nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{spezifische Aktivität (pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}) = \frac{^{14}C_{dpm}(P_{norm})}{F \times 60 \text{ min} \times 1 \text{ mg/ml} \times \frac{0,05 \text{ ml} \times 0,05 \text{ ml}}{0,13 \text{ ml}}}$$

$$\text{spezifische Aktivität (pmol} \times \text{min}^{-1}) = \frac{^{14}C_{dpm}(P_{norm}) / 50 \times 10^6}{F \times 60 \text{ min} \times 1 \times 10^6 \times \frac{0,05 \text{ ml} \times 0,05 \text{ ml}}{0,13 \text{ ml}}}$$

F = Faktor für dpm pro umgesetztes pmol HMG-CoA  
(Leber: 10,933 dpm/pmol, PBMC: 13,974 dpm/pmol)

## 2.5. Sterolmessung

### 2.5.1. Konzentrationsbestimmung von Sterolen mittels LC-MS/MS

Für die Bestimmung von Lanosterol, freiem und veresterten Cholesterin – sowie von freiem und veresterten Desmosterol in der LE-Heart-Kohorte – wurde die mit einer Flüssigchromatographie gekoppelte Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) verwendet, welche eine APPI- (dt.: Atmosphärendruck Photoionisation) Ionenquelle enthielt (Robb, Covey & Bruins 2000). Dieses Verfahren wurde am ILM Leipzig zunächst für die Messung von Phytosterolen etabliert (Lembcke et al. 2005; Teupser et al. 2010) und nachfolgend auch für die Metabolite Lanosterol und Desmosterol angewandt.

Sämtliche Proben wurden als Ansätze zu je 60 Proben, 16 Kontrollen und 8 Kalibratoren zusammengestellt. Die Probenaufbereitung je Ansatz geschah nach vorgebenem Protokoll:

## 2 Methoden und Materialien

1. Herstellung der Internen Standard-Gebrauchslösung
  - 50 ml 1:1 Methanol/Isopropanol (Merck, LiChrosolv)
  - 100 µl Interner Standard d<sub>5</sub>-Phytosterole (1g/l Isopropanol)
  - 100 µl Interner Standard d<sub>7</sub>-Cholesterin (100 mg/l Isopropanol)
2. Herstellung der Eichkurven
  - Sterolkalibratoren (C1: 0,1 mg/l; C2: 0,5 mg/l; C3: 2 mg/l; C4: 10 mg/l in Isopropanol)
  - Cholesterinkalibratoren (CC001: 10 mg/l; CC1: 100 mg/l; CC2: 500 mg/l; CC3: 2000 mg/l in Isopropanol)
3. Vorlegen von 490 µl Interner Standard-Gebrauchslösung in sterile 1,5 ml Eppendorf-Gefäße und Zugabe von 10 µl Probe, Kalibrator bzw. Kontrolle
4. mindestens 1 Minute Vortexen, daraufhin Zentrifugation bei 13000 g für 10 min
5. Abpipetieren des Überstandes in Autosampler-Vials (Wicom, 2 ml Gewindeflasche) und Lagerung bei -40°C

Die Messung eines Ansatzes wurde dann gemäß des etablierten Protokolls durchgeführt. Mittels eines 200er Autosamplers mit integriertem Mikropumpensystem (Perkin-Elmer) wurden von jedem Überstand 25 µl abgenommen und die veresterten Sterole von den nicht veresterten mittels Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC, Chromolith SpeedRod RP-18e, Merck) unter Verwendung eines Lösungsmittelgradienten von 3:1 Methanol/H<sub>2</sub>O und Isopropanol getrennt. Die HPLC-Bedingungen waren wie folgt: konstante Flussrate 600 µl/min, 40°C, Äquilibrierung mit 3:1 Methanol/Wasser 1 min, linearer Gradient zu 100% Isopropanol 1 min, *steady state* 100% Isopropanol 3,5 min. Unter diesen Bedingungen betragen die Retentionszeiten 4,17 min für freie Sterole bzw. 4,94 min für die Ester. Die nachfolgende Photoionisation und massenspektrometrische Analyse erfolgte in einem MDS SCIEX API 3000 Tripel-Quadrupol Massenspektrometer von Applied Biosystems. Im ersten Quadrupol wurde das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) der kompletten Sterolmoleküle bestimmt, im dritten dann das Verhältnis eines Fragmentes nachdem das Molekül im zweiten Quadrupol durch Kollision mit Stickstoff aufgespaltet wurde (Abbildung 15). Dadurch erhielt man für jedes Sterol spezifische Massentransitionen. Korrespondierende Ester der jeweiligen Sterole, welche in der HPLC separiert worden waren, konnten durch die gleiche Massentransition bestimmt werden, da die Photoionisation zur Spaltung der Esterbindung führte.

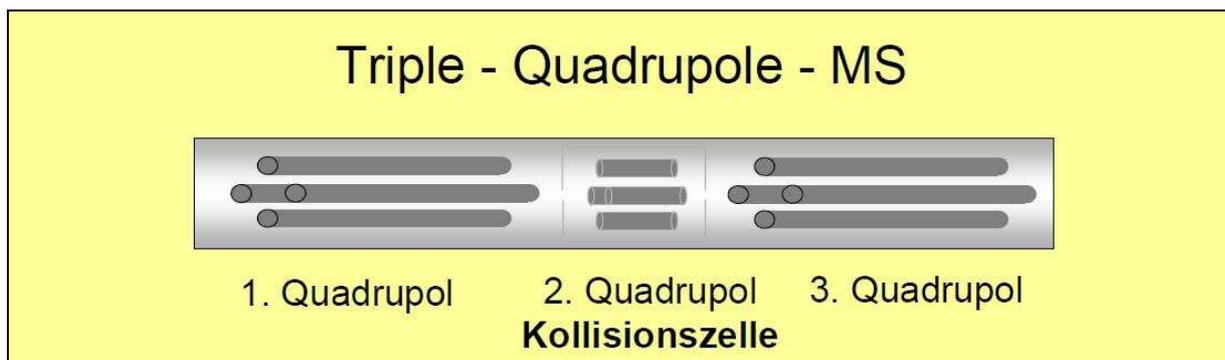


Abbildung 15: Schematische Anordnung eines Triple-Quadrupole-MS. Die Ionen gelangen von links in den ersten Quadrupol, welcher für die Bestimmung des Masse-Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ) der kompletten Sterolmoleküle verwendet wird. Um eine höhere Sensitivität zu erhalten, werden diese Moleküle im zweiten Quadrupol mit Stickstoff beschossen und im dritten Quadrupol das Masse-Ladungs-Verhältnis der Fragmente bestimmt (Bestimmung der spezifischen Massentransition).

### 2.5.2. Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software „Analyst 1.4.1.“ (Applied Biosystems). Dabei wurden die jeweiligen Konzentrationen der einzelnen Sterole als Flächenintegrale über die Zeit ermittelt und ins Verhältnis mit der Fläche des Internen Standards gesetzt (Lembcke et al. 2005). Nach Auswertung der Daten wurden die Konzentrationen aller Sterole anhand der mitgeführten Kontrollen überprüft und die Eichkurven des Ansatzes ggf. adjustiert um Vergleichbarkeit zwischen den Ansätzen zu wahren.

## 2.6. Materialien, Reagenzien und Statistik

### 2.6.1. Laborchemikalien, Reagenzien

Agarose	Gibco BRL, Berlin
Ampicillin	Gibco BRL, Berlin
Ampli Taq Gold 5 U $\mu$ l	Applied Biosystems, Foster City, USA
Bacto Agar	DIFCO, Sparks, USA
Bacto Hefeextrakt	DIFCO, Sparks, USA
Bacto Trypton	DIFCO, Sparks, USA
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
3700 Big Dye v 3.0	Applied Biosystems, Foster City, USA
Bio-Rex 5 Resin 100-200 mesh chloride form	Bio-Rad, Hercules, USA
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
d <sub>7</sub> -Cholesterol	Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, USA
2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphate (dNTPs) 100 mM	Promega, Madison, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethyl Sulphoxide)	Sigma, Deisenhofen
DNA Gel Extraction Kit	Millipore Corporation, Billerica, USA
DTT (Dithiothreitol) 0,1 M	Sigma, Deisenhofen
PBS Dulbecco, w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> low endotoxin	Biochrom AG, Berlin
Eco R1 mit Eco R1 Puffer	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid 1%	Serva, München
FastPlasmid Mini®	Eppendorf, Hamburg
FIREPol® DNA Polymerase I	Solis Biodyne, Tartu, Estland
First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Glucose-6-Phosphat	Sigma, Deisenhofen
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Roche Diagnostics, Mannheim

## 2 Methoden und Materialien

Glycerol Gelatine	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
Invisorb Spin Blood Maxi Kit	Invitek, Berlin
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
3-Hydroxy-3-methyl-3-glutaryl Coenzym A	Sigma, Deisenhofen
3-Hydroxy-3-methyl[3- $^{14}$ C]glutaryl Coenzym A 10 $\mu$ Ci	Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Kälberserumalbumin	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
LiChrosolv Wasser	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roche Diagnostics, Mannheim
Magnesiumchlorid	Solis Biodyne, Tartu, Estland
Methanol	Merck, Darmstadt
Mevalonolakton	Sigma, Deisenhofen
[5- $^3$ H] Mevalonolakton 250 $\mu$ Ci	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Molecular Weight Marker X	Roche Diagnostics, Mannheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
One Shot® E. Coli	Invitrogen, Carlsbad, USA
PCR Puffer 10 x	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR-Puffer 10 x	Solis Biodyne, Tartu, Estland
d <sub>5</sub> -Phytosterole	Medical Isotopes Inc., Pelham, USA
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Proteinase K, recombinant	Roche Diagnostics, Mannheim
Qiagen Blood Kit	Qiagen, Hilden
Random Hexamer Primer	Roche Diagnostics, Mannheim
Recombinant RNAsin	Promega, Madison, USA
RPMI 1640 Medium	Sigma, Deisenhofen
Sarcosyl	Sigma, Deisenhofen
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe

## 2 Methoden und Materialien

Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
TOPO TA Cloning Kit "pCR® II-TOPO®"	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tris Hydrochlorid	ICN Biomedicals, Inc., Aurora, USA
Tris Ultra pure Base	ICN Biomedicals, Inc., Aurora, USA
TRIzol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
ULTIMA Gold XR	PerkinElmer, Waltham, USA
XhoI mit NEBuffer 2	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Xylen-Cyanol	Sigma, Deisenhofen

### 2.6.2. Laborgeräte

ABI 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Agarose Gelelektrophoresesystem	OWL Scientific Inc., Woburn, USA
Analysenwaage MC1 Analytic AC 120 S	Sartorius, Göttingen
Autoklav Typ 24	Melag Medizintechnik, Berlin
Autoklav 5075	ELV Tuttnauer, Breda (NL)
Autosampler mit Mikropumpensystem	PerkinElmer, Waltham, USA
Brutschrank, Modell 300	Memmert, Schwabach
Cordless Tube Topper	Beckmann, Krefeld
Electrophoresis Power Supply 301	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA
Electrophoresis Power Supply 601	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA
Flüssig-Szintillationsspektrometer TriCarb®	PerkinElmer, Waltham, USA
Gefrierschrank Hera freeze HFU 586 Top	Kendro, Langenselbold
Gefrierschrank Biomedical Freezer -40°C	Sanyo, San Diego, USA
HPLC, Chromolith SpeedRod RP-18e	Merck, Darmstadt
Massenspektrometer MDS SCIEX	Applied Biosystems, Foster City, USA
API 3000 Tripel-Quadrupol	
Micromat	AEG, Frankfurt am Main
Mikrotiterplattenlesergerät SPECTRA Fluor	TECAN, Männedorf, Schweiz
Multifuge 3 S-R	Heraus Instruments, Hanau
NanoDrop-Spektrophotometer	Kisker, Steinfurt
Picofuge	Stratagene, La Jolla, USA

## 2 Methoden und Materialien

Pipetus® akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipette Eppendorf reference	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf Research pro	Eppendorf, Hamburg
Polytron PT 1300 D	Kinematica AG, Littau-Luzern, Schweiz
Pipettierroboter Genesis RSP 150	TECAN, Männedorf, Schweiz
Schüttler Orbital Shaker	Forma Scientific Inc., Marietta, USA
Sterilwerkbank HeraSafe	Heraus Instruments, Hanau
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact/comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischschüttler MTS 2/4 digital	IKA Werke GmbH, Staufen
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckmann, Krefeld
Ultrazentrifugationsrotor Typ 70 Ti	Beckmann, Krefeld
UV-Kammer	MWG-Biotech, München
UV-Licht Platte, TFP-20M	Vilber Lourmat, Marne la Vallee, Frankreich
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zell- und Gewebshomogenisator precellys 24 lysis & homogenization	bertin technologies, Montigny le Bretonneux, Frankreich
Zentrifuge 1-15 K	Sigma, Osterode am Harz
Zentrifuge 2-6 E	Sigma, Osterode am Harz
Zentrifuge Mikro 22 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

### 2.6.3. Verbrauchsmaterialien

ABI Prism 384-well Optical Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City, USA
ABI Prism Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Foster City, USA
Blutabnehmeröhrchen Vacutainer® CPT	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Blutabnehmeröhrchen Citrat-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
Blutabnehmeröhrchen EDTA-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
Blutabnehmeröhrchen S-Monovette Serum-Gel	Sarstedt, Nümbrecht

## 2 Methoden und Materialien

Eppendorfgefäß 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf PCR Tubes	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeierkolben	Schott, Mainz
Gefäße Flüssigszintillation 20ml	Wheaton Millville (New Jersey, USA)
GeneChip® Mapping 500K Array Set	Affymetrix, Santa Clara, USA
Glaskapillaren	Hirschmann Laborgeräte, eberstadt
Glas-Pasteurpipetten 150mm	VWR International, West Chester, USA
Handschuhe peha-soft	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Kryoröhrchen 2ml	Nalgene, Rochester, USA
Mikrotiterplatte 96-well	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Pipettenspitzen 10, 100, 200, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 2 , 5, 10, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Polystyrolröhrchen 15 und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Quick-Seal Centrifuge Tubes 16 x 77 mm	Beckman Instruments, Palo Alto, USA
Transferpipette 6ml	Sarstedt, Nümbrecht
Watte	Rauscher-Lößnitztal GmbH Oederan
Wattestäbchen	Paul Hartmann AG, Heidenheim

### 2.6.4. Statistik

Statistische Auswertungen des SNP-Genotyping im Rahmen der GWA und der Untersuchungen von Genexpressionen in der LE-Heart Kohorte erfolgten durch Herrn Dr. Markus Scholz am IMISE der Medizinischen Fakultät Leipzig.

Das GraphPad Prism Programm (Version 4.0c) diente der statistischen Auswertung von Experimenten mit humanen Leberproben und von PBMC-Kohorten  $n < 100$  im Rahmen der Enzymaktivitätsuntersuchung sowie der Untersuchung der mRNA-Stabilität des HMGCR-Gens. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test geprüft. Mittelwertdifferenzen von normalverteilten Daten wurden mit dem t-Test bzw. für nichtnormalverteilte Daten mit dem Mann-Whitney U Test geprüft. Der Kruskal-Wallis Test (kombiniert mit Dunn's Multiple Comparison Test) diente der statistischen Analyse kleinerer Fall- bzw. Probenzahlen beim gleichzeitigen Vergleich von  $> 2$  Testgruppen.

### 3. Ergebnisse

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine dreistufige genomweite Assoziationsstudie durchgeführt, um genetische Faktoren zu identifizieren, welche die humane endogene Cholesterinbiosynthese beeinflussen. In der ersten Stufe (KORA-S3/F3-Kohorte) wurden zunächst Genpolymorphismen in einer Kohorte von 1495 Probanden der Normalbevölkerung genomweit auf Assoziationen mit Serumspiegeln von Lanosterol und Cholesterin überprüft. Nachfolgend wurden die Assoziationen von SNPs, die in der Stufe 1 das Signifikanzniveau von  $p < 3,16 \times 10^{-5}$  ( $-\log p > 4,5$ ) erreichten, in einer zweiten (KORA-S3/F3-Kohorte) und dritten (CARLA-Kohorte) unabhängigen Kohorte geprüft. Mittels eines SNP-*fine mapping* in der CARLA-Kohorte wurde ein Genlocus mit signifikanter Assoziation auf mögliche funktionelle SNPs untersucht. Zwei weitere unabhängige Kohorten (LE-Heart-Kohorte und humane Leberproben aus dem Institut für Pathologie) dienen zum einen der Prüfung des *fine mapping* und zum anderen der weiterführenden funktionellen Untersuchung auf Genexpressions- und Proteinfunktionsebene (Abbildung 16).

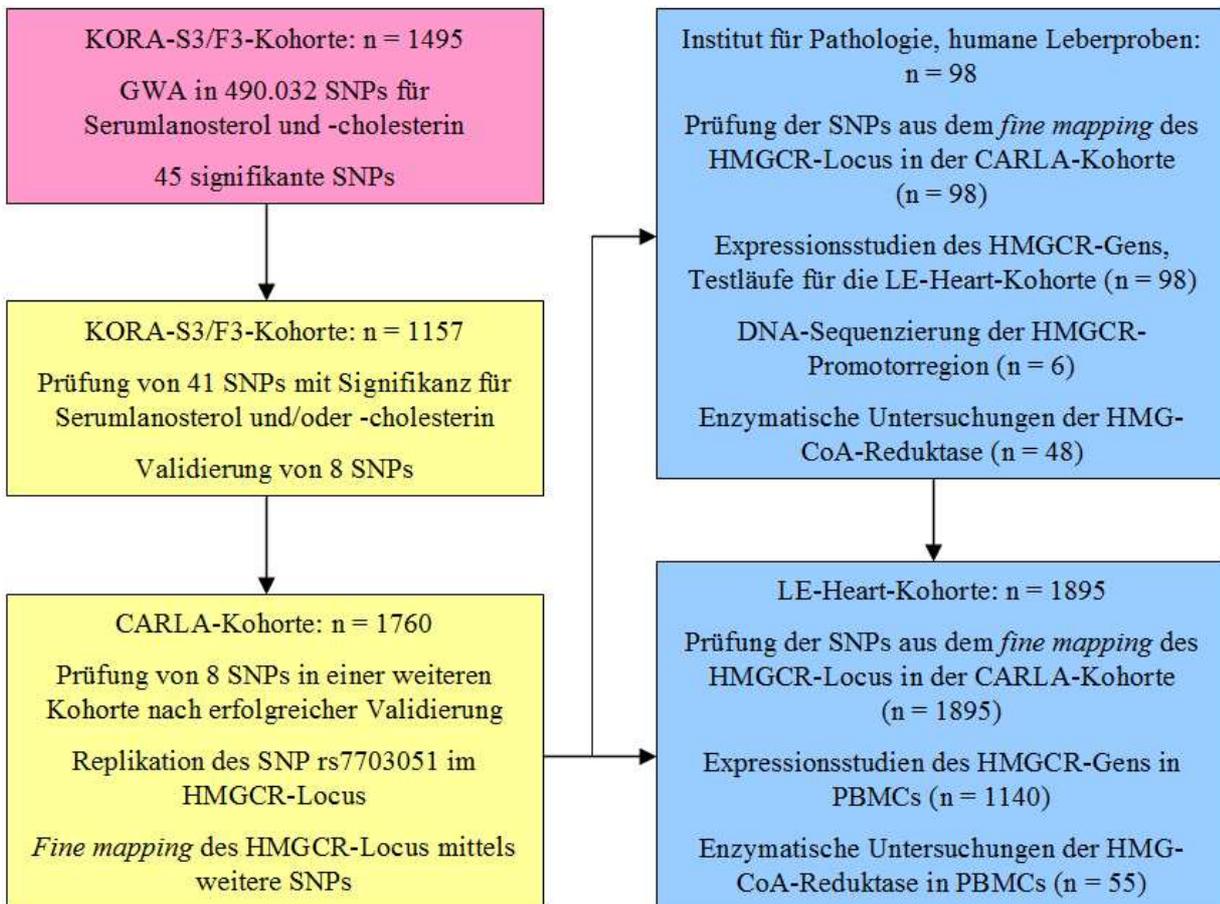


Abbildung 16: Abfolge der experimentellen Untersuchungen in der hier vorliegenden Arbeit, Ergebnisse und Abkürzungen siehe Text.

## 3 Ergebnisse

Lanosterol stellt einen essentiellen Präkursor des Cholesterins dar (vgl. 1.1.1.) und gilt als valider Marker der Cholesterinbiosynthese (Clarenbach et al. 2005). Cholesterin wurde ausgewählt, weil es ein Stoffwechsellendprodukt darstellt und dessen Konzentration nicht nur durch die Synthese- sondern auch durch die Eliminationsrate bestimmt wird. Außerdem stellt Cholesterin einen eigenständigen Risikofaktor für die Entwicklung einer KHK dar und geht u.a. in die Berechnung des 10-Jahres-Risiko einer KHK mittels Framingham Risk Score ein (Expert Panel on Detection 2001).

### 3.1. Mehrstufige genomweite Assoziationsstudie der Cholesterinbiosynthese

#### 3.1.1. Stufe 1 – GWA in der KORA-S3/F3-Kohorte

In Stufe 1 wurde eine genomweite Untersuchung von SNPs in 1495 Probanden der KORA-S3/F3-Kohorte durchgeführt. Es wurden in allen Probanden 490.032 SNPs mit dem GeneChip Mapping 500K Array Set (Affymetrix) untersucht. Nach Durchführung einer stringenten Qualitätskontrolle aller SNPs (Einschlusskriterien: *call rate*  $\geq 95\%$ , Frequenz des selteneren Allels  $\geq 1\%$ , p-Wert HWE-Test  $\geq 10^{-6}$ ) wurden 390.130 SNPs nach Adjustierung auf Alter, Geschlecht und Statineinnahme eines jeden Probanden in folgenden sechs Modellen auf Assoziationen zwischen Genotyp und Phänotyp überprüft:

- Additives Vererbungsmodell:      Serumlanosterol (Abbildung 17)  
   Serumcholesterin (Abbildung 18)  
   Serumlanosterol normalisiert auf Cholesterin
- Rezessives Vererbungsmodell:      Serumlanosterol  
   Serumcholesterin  
   Serumlanosterol normalisiert auf Cholesterin

### 3 Ergebnisse

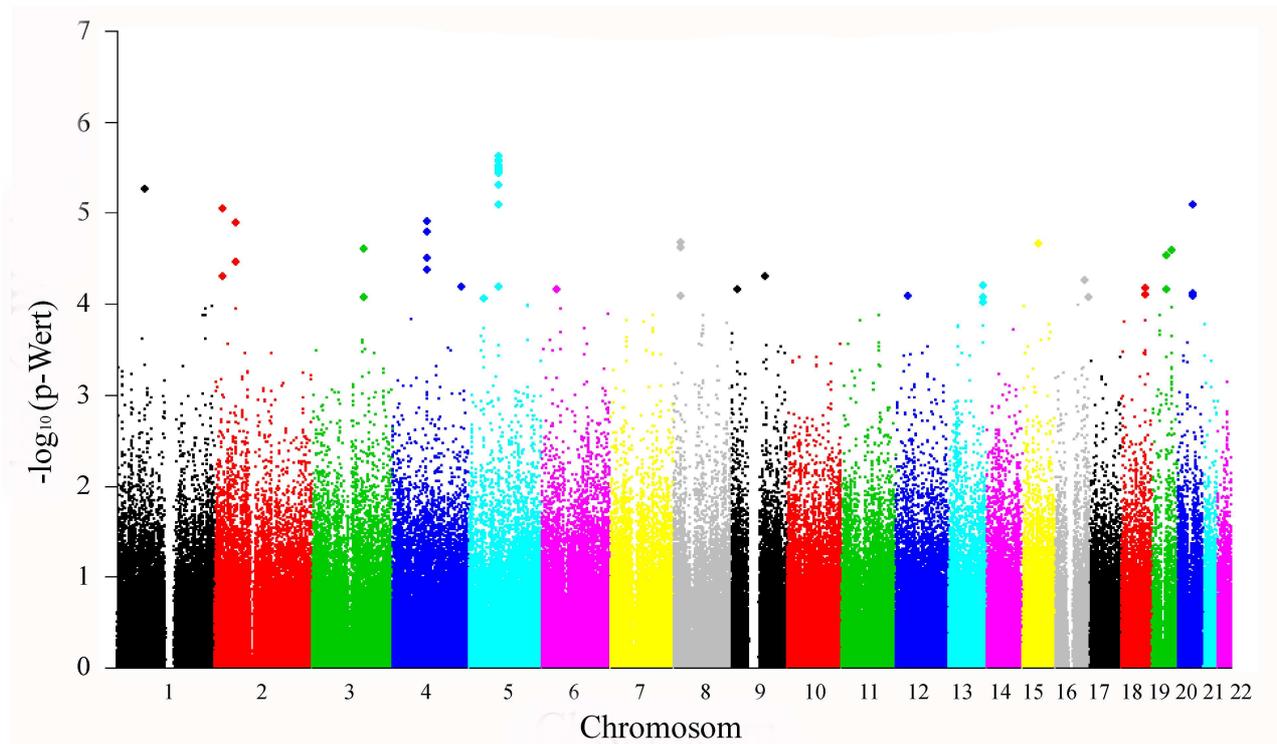


Abbildung 17: Signifikanzniveaus der genomweiten Assoziationen von 390.130 SNPs mit Serumlanosterol im additiven Modell (KORA-S3/F3, 1495 Probanden).

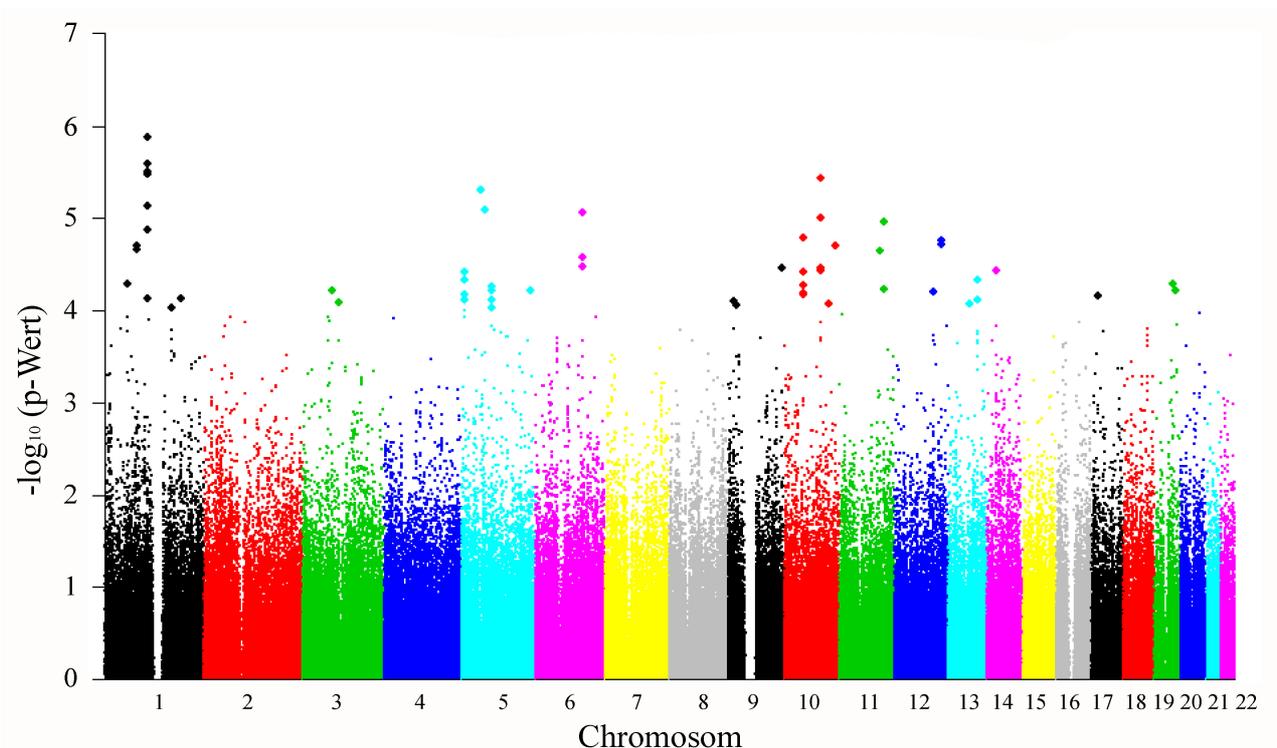


Abbildung 18: Signifikanzniveaus der genomweiten Assoziationen von 390.130 SNPs mit Serumcholesterin im additiven Modell (KORA-S3/F3, 1495 Probanden).

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 13:** SNPs der GWA in der Stufe 1 (n = 1495) zur weiteren Validierung in Stufe 2.

SNP ID	chr	base	hwe	call	maf	aa	ab	bb	additives Modell			rezessives Modell		
									la	ch	la/ch	la	ch	la/ch
rs7516564	1	68.748.123	0,2	0,998	0,448	506	800	335	5,3	1,5	4,4	5	1,3	4,3
rs6424669	1	80.190.866	1,1	0,986	0,042	1486	135	0	1,3	4,7	0,1	1,3	4,7	0,1
rs1330400	1	104.637.526	3	0,992	0,033	1529	96	6	0,8	5,9	0,2	1	5,5	0
rs10494007	1	104.638.728	0,3	0,991	0,048	1478	146	5	1,5	5,6	0,2	1,5	5,6	0,1
rs6128	1	169.562.904	0,6	0,974	0,148	1157	415	29	0,9	4	0	1	4,6	0
rs1431140	1	190.929.003	0,5	0,957	0,084	1316	249	8	2	4,1	0,6	1,8	4,6	0,4
rs10753470	1	224.656.216	0,2	0,991	0,072	1402	220	7	3,9	0,2	5,1	3,8	0,2	4,9
rs16984718	2	18.509.254	0,3	0,988	0,018	1564	60	0	5,1	1,1	4,4	5,1	1,1	4,4
rs1528804	2	51.734.676	0,6	0,985	0,173	1102	475	42	4,5	0,7	4,2	3,7	0,4	3,7
rs777491	3	126.164.782	0,1	0,998	0,032	1537	101	2	4,6	0,9	4,2	4,9	1	4,3
rs17009317	4	85.769.856	0,3	0,993	0,327	745	708	180	4,8	0,5	4,8	4,3	0,7	4
rs6451824	5	45.841.630	1,9	0,954	0,087	1299	265	4	1	5,3	0	1,1	5	0
rs889310	5	55.965.167	0	1	0,43	533	808	303	0,2	5,1	0,8	0,5	5,2	0,4
rs918623	5	74.596.682	0,6	0,969	0,247	895	609	89	5,3	2,9	3,6	4,1	2,1	2,8
rs7703051	5	74.625.487	0,4	0,999	0,381	621	790	231	5,4	0,5	5,5	4,1	0,2	4,5
rs17562686	5	74.668.589	0,4	0,993	0,096	1336	279	18	5,6	3,8	3,4	6,7	4,2	4,2
rs2294309	6	27.483.816	0,5	0,981	0,374	623	775	215	2	1	1,5	4,6	1,6	0,6
rs236486	6	36.686.407	0,1	0,995	0,317	760	714	161	4,2	0,1	4,7	3,4	0	0,1
rs9374570	6	116.076.012	0	0,97	0,301	777	673	144	1,7	5,1	0,3	1	3,3	0,6
rs9387366	6	116.098.280	0,2	0,998	0,373	649	760	232	2,8	4,6	1	2,1	3,5	0,7
rs9384960	6	116.130.955	0,4	0,996	0,356	687	735	216	1,3	4,5	0,1	0,9	3,4	1
rs17075934	8	5.929.378	0,1	1	0,263	894	635	115	3,3	0,5	4,7	2,4	0,3	3,3
rs17695653	8	18.526.498	0,4	0,999	0,021	1574	68	0	4,7	0	5,6	4,7	0	5,6
rs17148102	9	134.488.535	0,1	0,996	0,088	1361	264	12	1,1	4,5	0	0,8	4	0
rs11243489	9	134.602.956	0,3	0,987	0,075	1386	229	7	0,8	4,5	0,1	0,5	3,5	0,2
rs10999614	10	72.719.130	0,5	0,999	0,116	1279	346	18	3,3	0,2	4,2	3,9	0,1	4,9
rs12257526	10	87.928.843	0,2	0,999	0,15	1190	413	39	0,4	4,5	0,4	0,7	5,1	0,2
rs7082886	10	125.946.185	0,2	0,996	0,381	632	762	243	1,2	4,7	0,1	0,9	3,4	0,1
rs2028979	11	92.652.273	1,1	0,971	0,042	1463	134	0	3,3	0,5	4,8	3,3	0,5	4,8
rs334218	11	98.663.429	0,7	0,967	0,031	1493	97	0	1,8	4,6	0,4	1,8	4,6	0,4
rs17607380	11	107.579.561	0,1	0,951	0,095	1282	267	15	1	5	0	1	4,8	0
rs4032492	12	30.170.897	0	0,996	0,439	517	804	316	4,1	0,1	4,7	3	0,2	3,9
rs3810784	12	95.147.482	0,6	0,996	0,359	662	775	201	2,8	0,1	3,5	3,5	0,3	4,7
rs7799	13	41.533.052	0,2	0,999	0,285	844	661	138	3,8	0,1	4,6	3,6	0,2	3,9
rs17191442	15	60.800.145	0,9	0,996	0,086	1372	249	17	4,7	0,9	4,2	4,4	0,8	4
rs4261509	15	90.709.376	0,9	0,988	0,452	503	774	348	1,8	0,3	2,4	3,4	0,5	4,9
rs8061371	16	77.043.677	0,2	0,97	0,209	1000	521	73	4,3	2,9	2,7	4,6	3,4	2,8
rs747430	19	29.989.938	1	0,976	0,262	861	646	97	4,5	2,4	3,1	3,2	2,1	2,1
rs880108	19	44.115.140	0,7	0,989	0,145	1183	415	28	4,6	1,8	3,5	3,7	2	2,5
rs417699	19	49.109.415	0,9	0,993	0,474	436	845	352	3,5	0,3	4,5	1,8	0,4	2,5
rs6029228	20	39.255.548	0,3	0,999	0,407	584	781	278	5,1	2,6	3,5	4	1,7	3

chr, Chromosom; base, Basenposition in Ensembl build 60; hwe,  $-\log(p)$  des Hardy-Weinberg Gleichgewicht Test; call, *call rate*; maf, Minorallel-Frequenz; aa, Zahl der Probanden mit Homozygotie für das häufigere Allel; ab, Zahl heterozygoter Probanden; bb, Zahl der Probanden mit Homozygotie für das seltenerer Allel; la,  $-\log(p)$  der Assoziation für Lanosterolserumspiegel; la/ch,  $-\log(p)$  der Assoziation für Lanosterolserumspiegel normalisiert auf Cholesterin; ch,  $-\log(p)$  der Assoziation für Cholesterinserumspiegel. gelb:  $p < 0,0001$  ( $-\log(p) > 4$ ); rot:  $p < 0,00001$  ( $-\log(p) > 5$ ); magenta:  $p < 0,000001$  ( $-\log(p) > 6$ ). n = 1644 für SNP-Qualitätskriterien.

Als Schwellenwert (*cut-off*) für die Überführung eines SNPs aus Stufe 1 der GWA zur Validierung in Stufe 2 wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 3,16 \times 10^{-5}$  ( $-\log p > 4,5$ ) in mindestens einem der sechs Assoziationsmodelle gewählt, da keiner der untersuchten SNPs ein genomweites Signifikanzniveau von  $p < 10^{-7}$  erreichte. In der vorliegenden Studie erfüllten 45 SNPs der Stufe 1 dieses Kriterium. Mittels eines Taggingalgorithmus (Johnson et al. 2001) wurden aus diesen 41 ausgewählt (Tabelle 13) und in der Stufe 2 genotypisiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1.2. Stufe 2 – Validierung in der KORA-S3/F3-Kohorte

In der zweiten Stufe wurden 41 signifikante SNPs aus Stufe 1 durch das Helmholtzzentrum, München, in 1157 disjunkten Individuen der KORA-S3/F3-Kohorte untersucht. Die Überprüfung erfolgte in den gleichen sechs Assoziationsmodellen der Stufe 1 nach entsprechender Adjustierung auf Alter, Geschlecht und Statineinnahme (Tabelle 14).

**Tabelle 14:** SNPs in der Stufe 2 Validierung (n = 1157).

SNP ID	chr	base	hwe	call	maf	aa	ab	bb	additives Modell			rezessives Modell		
									la	ch	la/ch	la	ch	la/ch
rs7516564	1	68.748.123	0,4	0,981	0,429	381	548	219	0,05	0,1	0,1	0,03	0,18	0,11
rs6424669	1	80.190.866	0,4	0,979	0,041	1054	88	3	0,02	0,02	0,02	0	0,09	0,04
rs1330400	1	104.637.526	0,2	0,984	0,032	1077	74	0	0,01	0,08	0,05	0,01	0,08	0,05
rs10494007	1	104.638.728	0,8	0,99	0,044	1055	103	0	0,02	0,18	0,1	0,02	0,18	0,1
rs6128	1	169.562.904	0,3	0,979	0,147	831	294	21	0,24	0	0,27	0,28	0	0,3
rs1431140	1	190.929.003	0,2	0,989	0,088	961	189	7	0,04	0,39	0,2	0,24	0,23	0,39
rs10753470	1	224.656.216	0,3	0,991	0,087	968	180	11	0,16	0,12	0,24	0,19	0,19	0,31
rs16984718	2	18.509.254	0	0,991	0,018	1118	41	0	0,42	0,46	0,24	0,42	0,46	0,24
rs1528804	2	51.734.676	1,2	0,974	0,17	794	304	42	0,93	0,25	0,83	0,46	0,01	0,51
rs777491	3	126.164.782	0,2	0,984	0,038	1066	83	2	1,27	0,2	1,23	1,21	0,21	1,15
rs17009317	4	85.769.856	0,5	0,991	0,304	569	475	115	0,08	1,15	0,22	0,17	1	0,09
rs6451824	5	45.841.630	0,2	0,977	0,086	957	176	10	0,23	2,18	1,09	0,16	2,18	0,93
rs889310	5	55.965.167	0,2	0,962	0,449	346	548	232	0,29	0,86	0,03	0,39	0,62	0,17
rs918623	5	74.596.682	0,2	0,974	0,254	637	426	76	0,36	0,02	0,42	0,01	0,04	0,01
rs7703051	5	74.625.487	1	0,989	0,395	410	581	166	0,93	0,1	1,14	1,57	0,13	1,62
rs17562686	5	74.668.589	0,8	0,974	0,09	940	195	5	0,15	0,1	0,22	0,21	0,14	0,31
rs2294309	6	27.483.816	0,6	0,983	0,367	470	517	163	0,39	1,62	0,02	0,22	1,04	0,06
rs236486	6	36.686.407	2	0,958	0,335	476	538	107	0	0,5	0,17	0,02	0,26	0,12
rs9374570	6	116.076.012	0,1	0,991	0,291	582	482	96	0,28	0,24	0,45	0,79	0,01	0,88
rs9387366	6	116.098.280	0,2	0,978	0,371	457	526	161	0,02	0,87	0,32	0,2	0,11	0,29
rs9384960	6	116.130.955	0	0,979	0,372	453	533	160	0,06	2,81	0,61	0,03	1,4	0,36
rs17075934	8	5.929.378	0,2	0,991	0,254	649	433	78	0,1	0,08	0,07	0,15	0,11	0,11
rs17695653	8	18.526.498	0	0,979	0,017	1106	40	0	0,14	1,73	0,27	0,14	1,73	0,27
rs17148102	9	134.488.535	0,2	0,977	0,084	961	173	9	0,51	0,79	0,22	0,5	0,6	0,27
rs11243489	9	134.602.956	0,2	0,906	0,07	918	136	6	0,47	0,56	0,25	0,35	0,46	0,17
rs10999614	10	72.719.130	0	0,99	0,106	925	220	13	3,18	2,41	1,88	3,02	2,09	1,87
rs12257526	10	87.928.843	0	0,978	0,142	843	278	23	0,53	0,31	0,82	0,26	0,33	0,47
rs7082886	10	125.946.185	0,2	0,966	0,378	440	525	165	2,01	0,16	2,07	1,69	0,35	1,54
rs2028979	11	92.652.273	1,3	0,983	0,043	1057	88	5	1,23	0,49	0,99	1,16	0,54	0,89
rs334218	11	98.663.429	0	0,979	0,029	1079	65	1	0,5	0,74	0,22	0,5	0,76	0,22
rs17607380	11	107.579.561	0,1	0,98	0,102	925	209	13	0,06	0,03	0,08	0,02	0,16	0,08
rs4032492	12	30.170.897	1,2	0,956	0,446	328	583	207	0,34	0,27	0,23	0,11	0,13	0,06
rs3810784	12	95.147.482	0,1	0,983	0,363	470	526	154	0,62	0,53	0,39	0,09	0,46	0,05
rs7799	13	41.533.052	0,7	0,985	0,331	506	531	116	0,36	0,14	0,31	0,34	0,02	0,39
rs17191442	15	60.800.145	0,7	0,99	0,093	948	204	6	0,38	0,24	0,29	0,39	0,13	0,34
rs4261509	15	90.709.376	0,1	0,989	0,441	359	575	223	0,11	0,8	0,43	0,19	0,54	0,46
rs8061371	16	77.043.677	0,1	0,933	0,214	676	364	52	0,17	0,14	0,12	0,33	0,38	0,18
rs747430	19	29.989.938	1,3	0,98	0,26	615	467	65	0,17	0,67	0,02	0,08	0,78	0,14
rs880108	19	44.115.140	0,1	0,992	0,14	860	277	24	0,56	0,64	0,3	0,45	0,46	0,27
rs417699	19	49.109.415	0,1	0,979	0,469	326	565	255	0,75	0,45	0,55	0,25	0,48	0,08
rs6029228	20	39.255.548	0,2	0,98	0,396	414	557	176	0,99	0,77	1,74	0,44	0,78	0,93

gelb:  $p < 0,05$  ( $-\log(p) > 1,3$ ); rot:  $p < 0,001$  ( $-\log(p) > 3$ ). n = 1157 für SNP-Qualitätskriterien Alle weiteren Angaben siehe Legende Tabelle 13, Seite 72

### 3 Ergebnisse

Acht SNPs, welche ein nominelles Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  in mindestens einem Assoziationsmodell unterschritten, konnten validiert werden und wurden nachfolgend in der CARLA-Kohorte untersucht, um mögliche Assoziationen in einer zweiten unabhängigen Kohorte zu bestätigen.

#### 3.1.3. Stufe 3 – Replikation in der CARLA-Kohorte

Mittels Schmelzkurvenanalyse und SNP-Alleldiskrimination wurden in 1760 Probanden der CARLA-Kohorte acht SNPs auf Assoziationen mit Serumlanosterol und Serumcholesterin überprüft. Zwei SNPs konnten repliziert werden und zeigten nach Adjustierung auf Alter, Geschlecht und Statineinnahme signifikante Assoziationen in mindestens einem Assoziationsmodell (Tabelle 15).

**Tabelle 15:** SNPs der Stufe 3 Replikation in CARLA (n = 1760).

SNP ID	chr	base	hwe	call	maf	aa	ab	bb	additives Modell			rezessives Modell		
									la	ch	la/ch	la	ch	la/ch
rs6451824	5	45.841.630	0	0,988	0,064	1537	211	7	0,75	1,13	0,26	0,66	0,99	0,24
rs7703051	5	74.625.487	0,2	0,928	0,386	626	772	251	4,38	1,39	3,44	2,68	1,16	1,98
rs2294309	6	27.483.816	0,7	0,995	0,352	729	832	206	0,53	0,12	0,7	0,19	0,19	0,31
rs9384960	6	116.130.955	0,2	0,956	0,388	629	818	250	1,42	0,77	0,99	0,64	0,26	0,51
rs17695653	8	18.526.498	0	0,992	0,024	1676	84	1	0,35	0,18	0,28	0,36	0,17	0,29
rs10999614	10	72.719.130	0,8	0,986	0,116	1374	347	30	0,15	0,03	0,15	0,42	0,27	0,3
rs7082886	10	125.946.185	0,3	0,99	0,391	646	852	261	0,31	0,49	0,11	0,51	0,33	0,36
rs6029228	20	39.255.548	0,5	0,981	0,406	604	861	277	0,07	0,29	0,04	0,3	0,66	0,05

gelb:  $p < 0,05$  ( $-\log(p) > 1,3$ ); rot:  $p < 0,001$  ( $-\log(p) > 3$ ). n = 1776 für SNP-Qualitätskriterien. Alle weiteren Angaben siehe Legende Tabelle 13, Seite 72

#### 3.1.4. Ergebnis der mehrstufigen genomweiten Assoziationsstudie

Zunächst konnten 2 SNPs in der dritten Stufe repliziert werden. Der SNP rs9384960 befindet sich ca. 130 kbp proximal vom nächsten bekannten Gen entfernt (Ensembl genome browser 60: FRK, fyn-related kinase) und liegt damit nicht innerhalb der Haplotyp-Struktur dieses Gens. Des Weiteren waren in den einzelnen Stufen inverse Effektgrößen für Serumcholesterin (Stufe 1: -2,8%, Stufe 2: +2,4%, Stufe 3: +0,9%) zu beobachten, so dass anhand einer kumulativen Analyse der drei Stufen der GWA gezeigt wurde, dass sich die beobachteten Assoziationen des SNP rs9384960 in den 3 Kohorten nicht bestätigen (vgl. Tabelle 16,  $p = 0,71$ ). Daher zeigt schließlich nur der SNPs rs7703051 im HMGCR-Gen in der kumulativen Analyse eine Assoziation zu Serumlanosterol (additives Modell  $p = 1,4 \times 10^{-10}$ , rezessives Modell  $p = 1,1 \times 10^{-8}$ ).

### 3 Ergebnisse

Dieses Gen codiert die HMG-CoA-Reduktase – das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese. Des Weiteren erreichte rs7703051 in der kumulativen Analyse eine nominelle Signifikanz von  $p = 0,04$  für den Phänotyp Serumcholesterin (Tabelle 16).

Nachdem in der vorliegenden GWA nur der HMGCR-Locus eine Assoziation zu Serumlanosterol zeigte, wurde der SNP rs17562686 im HMGCR-Gen, welcher in Stufe 1 unter allen SNPs das höchste Signifikanzniveau erreichte (Serumlanosterol rezessiv:  $p = 1,8 \times 10^{-7}$ , vgl. Tabelle 13), auch in Stufe 3 untersucht, obwohl er in Stufe 2 das vorgegebene Signifikanzniveau nicht erreichte. In der kumulativen Analyse aller drei Kohorten wies rs17562686 eine Assoziation mit Serumlanosterol auf (additiv:  $p = 1,5 \times 10^{-5}$ , rezessiv:  $p = 4,3 \times 10^{-6}$ ). Die Effektgrößen von rs7703051 und rs17562686 waren gleichgerichtet – das seltenere Allel ist mit höherem Serumlanosterol assoziiert – und betrug im additiven Modell +7,1% für den SNP rs7703051 bzw. +7,8% für den SNP rs17562686 (Tabelle 16).

**Tabelle 16:** Validierung und Replikation der wichtigsten genetischen Assoziationen mit Serumspiegeln des Lanosterols und Cholesterins.

Kohorte	SNP <i>Gen</i>	Allele MAF	CR	HWE	Additives Modell - Alleleffekt und p-Wert der Assoziation			Rezessives Modell - Alleleffekt und p-Wert der Assoziation		
					LA	CH	LA/CH	LA	CH	LA/CH
KORA S3 500k  (n = 1495)	rs7703051 <i>HMGCR</i>	C>A 0,381	0,999	0,43	8,6 % $3,6 \times 10^{-6}$	0,7 % 0,30	7,8 % $3,4 \times 10^{-6}$	10,3 % $7,7 \times 10^{-5}$	0,5 % 0,64	9,8 % $3,4 \times 10^{-5}$
	rs17562686 <i>HMGCR</i>	G>A 0,096	0,993	0,40	14,5 % $2,4 \times 10^{-6}$	4,3 % $1,5 \times 10^{-4}$	9,8 % $3,6 \times 10^{-4}$	17,8 % $1,8 \times 10^{-7}$	5,0 % $5,7 \times 10^{-5}$	12,2 % $5,7 \times 10^{-5}$
	rs9348960 <i>unknown</i>	T>A 0,356	0,996	0,39	- 3,3 % 0,05	- 2,8 % $3,3 \times 10^{-5}$	- 0,6 % 0,73	- 3,7 % 0,13	- 3,3 % $3,8 \times 10^{-4}$	- 0,4 % 0,86
KORA S3 Stufe 2  (n = 1157)	rs7703051 <i>HMGCR</i>	C>A 0,394	0,989	0,14	3,1 % 0,12	- 0,2 % 0,80	3,3 % 0,07	6,4 % 0,03	0,4 % 0,74	6,0 % 0,02
	rs17562686 <i>HMGCR</i>	G>A 0,09	0,974	0,20	-1,3 % 0,71	0,4 % 0,79	-1,6 % 0,60	-1,7 % 0,62	0,5 % 0,73	-2,2 % 0,49
	rs9348960 <i>unknown</i>	T>A 0,372	0,979	0,85	0,3 % 0,88	2,4 % $1,6 \times 10^{-3}$	- 2,1 % 0,24	0,2 % 0,94	2,2 % 0,04	- 1,9 % 0,43
CARLA Stufe 3  (n = 1760)	rs7703051 <i>HMGCR</i>	C>A 0,386	0,928	0,60	7,7 % $4,2 \times 10^{-5}$	1,6 % 0,04	6,1 % $3,6 \times 10^{-4}$	8,7 % $2,1 \times 10^{-3}$	2,1 % 0,07	6,6 % 0,01
	rs17562686 <i>HMGCR</i>	G>A 0,107	0,989	0,21	9,2 % $1,2 \times 10^{-3}$	1,2 % 0,42	7,9 % $2,1 \times 10^{-3}$	10,0 % $1,0 \times 10^{-3}$	1,3 % 0,35	8,5 % $2,1 \times 10^{-3}$
	rs9348960 <i>unknown</i>	T>A 0,388	0,956	0,57	3,8 % 0,04	0,9 % 0,17	2,9 % 0,1	2,9 % 0,23	0,6 % 0,55	2,3 % 0,31
kum.. Analyse  (n = 4412)	rs7703051 <i>HMGCR</i>	C>A	-	0,36	7,1 % $1,4 \times 10^{-10}$	0,9 % 0,04	6,2 % $6,6 \times 10^{-10}$	9,0 % $1,1 \times 10^{-8}$	1,1 % 0,07	7,8 % $4,2 \times 10^{-8}$
	rs17562686 <i>HMGCR</i>	G>A	-	0,21	7,8 % $1,5 \times 10^{-5}$	1,7 % 0,01	6,0 % $2,6 \times 10^{-4}$	8,9 % $4,3 \times 10^{-6}$	2,0 % $7,2 \times 10^{-3}$	6,8 % $1,2 \times 10^{-4}$
	rs9348960 <i>unknown</i>	T>A	-	0,76	0,8 % 0,45	0,2 % 0,71	0,7 % 0,50	0,2 % 0,90	-0,2 % 0,67	0,4 % 0,76

Genomweite Assoziationsstudie in KORA-S3/F3, Validierung in einer zweiten Gruppe von Individuen der KORA-S3/F3, Replikation in der CARLA-Kohorte und kombinierte Analyse der SNPs mit Hinweisen für genetische Assoziationen mit Serumlanosterol oder Serumcholesterin. LA, Lanosterol; CH, Cholesterin; LA/CH, Lanosterol normalisiert auf Cholesterin; Allele, Majorallel > Minorallel; MAF, *minor allele frequency*; CR, *call rate*; HWE, p-Wert der Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht.

### 3 Ergebnisse

Eine Untersuchung des sehr großen – u.a. das HMGCR-Gen umfassenden – Haploblocks mittels aller entsprechenden SNPs auf dem GeneChip Mapping 500K Array Set (Affymetrix) aus Stufe 1 konnte die Spezifität von relevanten SNPs im Bereich des HMGCR-Gens bekräftigen. Trotz des starken LD vieler SNPs zueinander über einen Bereich von ca. 1 Mbp, in welchem sich auch andere Gene befinden, lagen SNPs mit den höchsten p-Werten für Assoziationen mit Serumlanosterol ausschließlich im Bereich des HMGCR-Gens (Abbildung 19). Daher wurden ab diesem Zeitpunkt alle weiteren funktionellen Untersuchungen auf den HMGCR-Locus fokussiert.

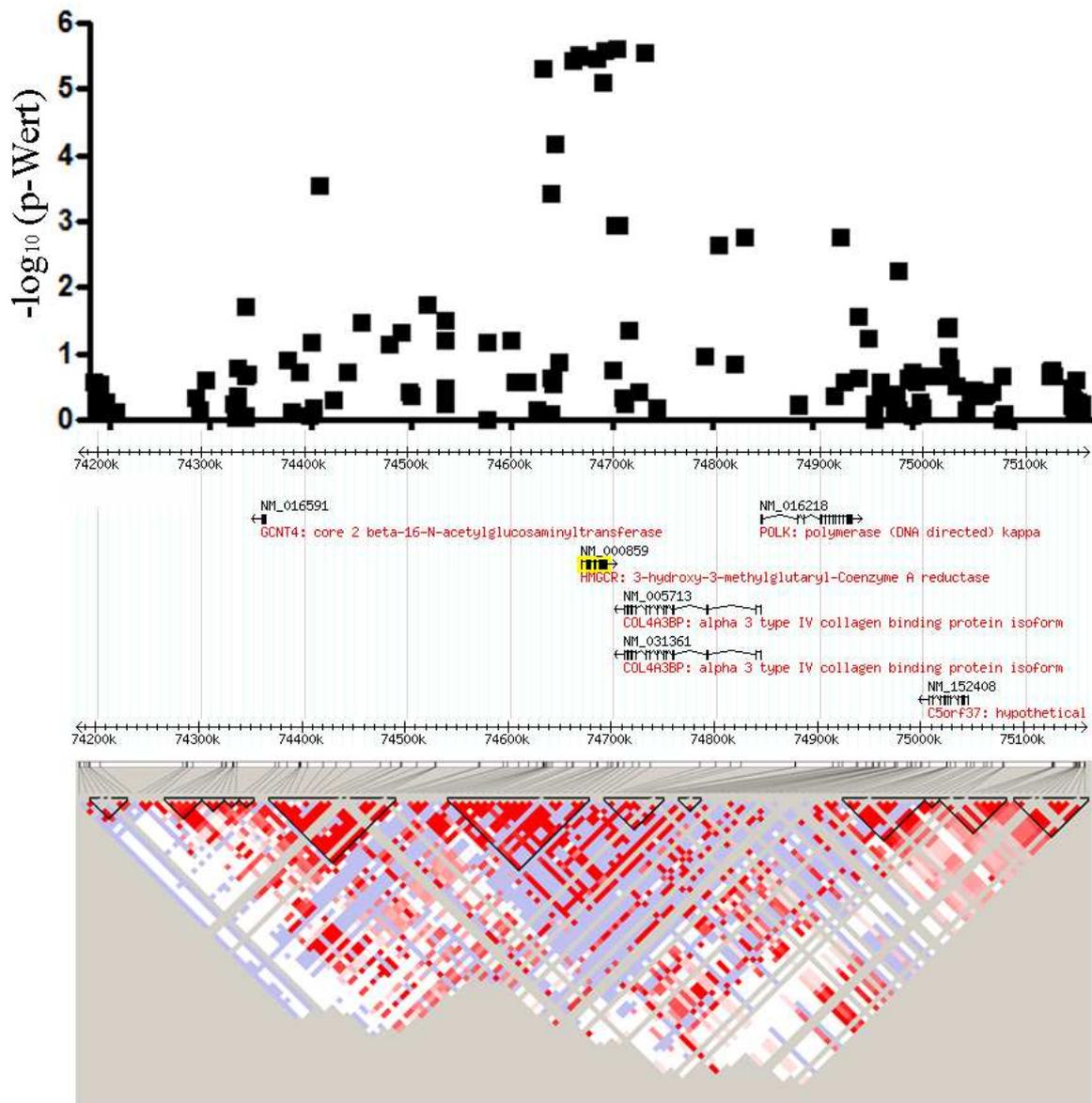


Abbildung 19: Haploblock des Bereichs Chromosom 5: 74.180.000 bp bis 75.180.000 bp auf Grundlage der HapMap Data Rel 24/phaseII Nov08; Oben: grafische Darstellung der  $-\log(p)$ -Werte aller SNPs auf dem GeneChip<sup>®</sup> Mapping 500K Array Set für Assoziationen zu Serumlanosterol in 1495 Probanden der GWA, Stufe 1; Mitte: Darstellung der Lage des HMGCR-Gens (gelb unterlegt) innerhalb des Haploblockes; Unten: LD-Plot (D') des Haploblocks.

### 3.2. Assoziationsuntersuchungen relevanter SNPs innerhalb des HMGCR-Locus

#### 3.2.1. Untersuchung der Haplotyp-Struktur des HMGCR-Bereiches

Der SNP rs7703051 steht mit dem SNP rs17562686 nur in schwachem LD (Abbildung 21;  $r^2 = 0,23$ ; HapMap Data Rel 24/phaseII Nov08). Außerdem beträgt die Frequenz des selteneren Allels des SNP rs7703051 39%, des SNP rs17562686 hingegen nur 10%. Daher bilden beide SNPs unterschiedliche Haplotypen und es war davon auszugehen, dass verschiedene Mechanismen den beobachteten Assoziationen mit Serumlanosterol zugrunde liegen.

Ebenso zeigte eine Haplotyp-Analyse von rs7703051 und rs17562686 in der CARLA-Kohorte, dass Assoziationen der selteneren Allele mit erhöhten Konzentrationen von Serumlanosterol additiv und somit unabhängig voneinander sind (Abbildung 20).

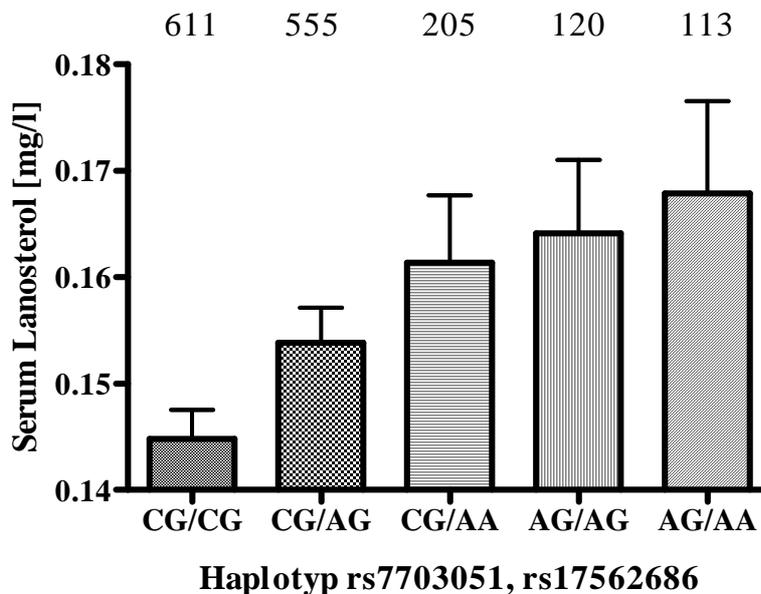


Abbildung 20: Geometrische Mittelwerte und Standardfehler von Serumlanosterol in der CARLA-Kohorte ( $n = 1760$ ) der genetisch relevanten Haplotypen des HMGCR-Locus nach Durchführung einer genomweiten Assoziationsstudie ( $n = 4412$ ). Die Haplotypen wurden durch die SNPs rs7703051 (C/A) und rs17562686 (G/A) definiert. Von neun möglichen Haplotypen wurden vier aufgrund einer Frequenz  $< 1\%$  von der Analyse ausgeschlossen.

Im Folgenden wurde eine Analyse der *Linkage*-Struktur des HMGCR-Locus in der HapMap-Datenbank durchgeführt, um weitere Genpolymorphismen mit möglicher funktioneller Bedeutung, die mit dem *tagging* SNP rs7703051 bzw. rs17562686 in LD stehen, aufzudecken (vgl. 1.4.2 und 1.4.3.). Der SNP rs7703051 liegt in unmittelbarer Nähe aber nicht innerhalb des HMGCR-Gens oder seines Promotors. In der HapMap-Analyse zeigte sich, dass mehrere SNPs in starkem LD ( $r^2 > 0,8$ ; HapMap Data Rel 24/phaseII Nov08) mit SNP rs7703051 stehen (Abbildung 21). Diese sind alle in nicht kodierenden Bereichen des HMGCR-Gens

### 3 Ergebnisse

lokalisiert. Für das Exon 13 des HMGCRC-Gens ist ein alternatives *Splicing* beschrieben (Johnson et al. 2003). Da der SNP rs3846662 im Intron 13 liegt, war zu vermuten, dass dieser mit dem SNP rs7703051 in LD stehende Genpolymorphismus die kausale Assoziation von Genotyp und Phänotyp darstellt. Ebenso liegt der SNP rs17562686 nicht innerhalb des HMGCRC-Gens, steht aber mit mehreren Genpolymorphismen in sehr starkem LD ( $r^2 = 1,0$ ; HapMap Data Rel 24/phaseII Nov08). Einer dieser SNPs ist der SNP rs5909, welcher acht Basenpaare vom Stopp-Codon des HMGCRC-Gens entfernt liegt. Weiterhin waren auch die SNPs rs3761738, rs17238330, rs3761740 von Interesse (Abbildung 21), da sie innerhalb des bekannten Promotorbereiches des HMGCRC-Gens liegen (Lagor et al. 2007). Da allerdings bereits nachgewiesen wurde, dass der SNP rs3761740 die Expression des HMGCRC-Gens

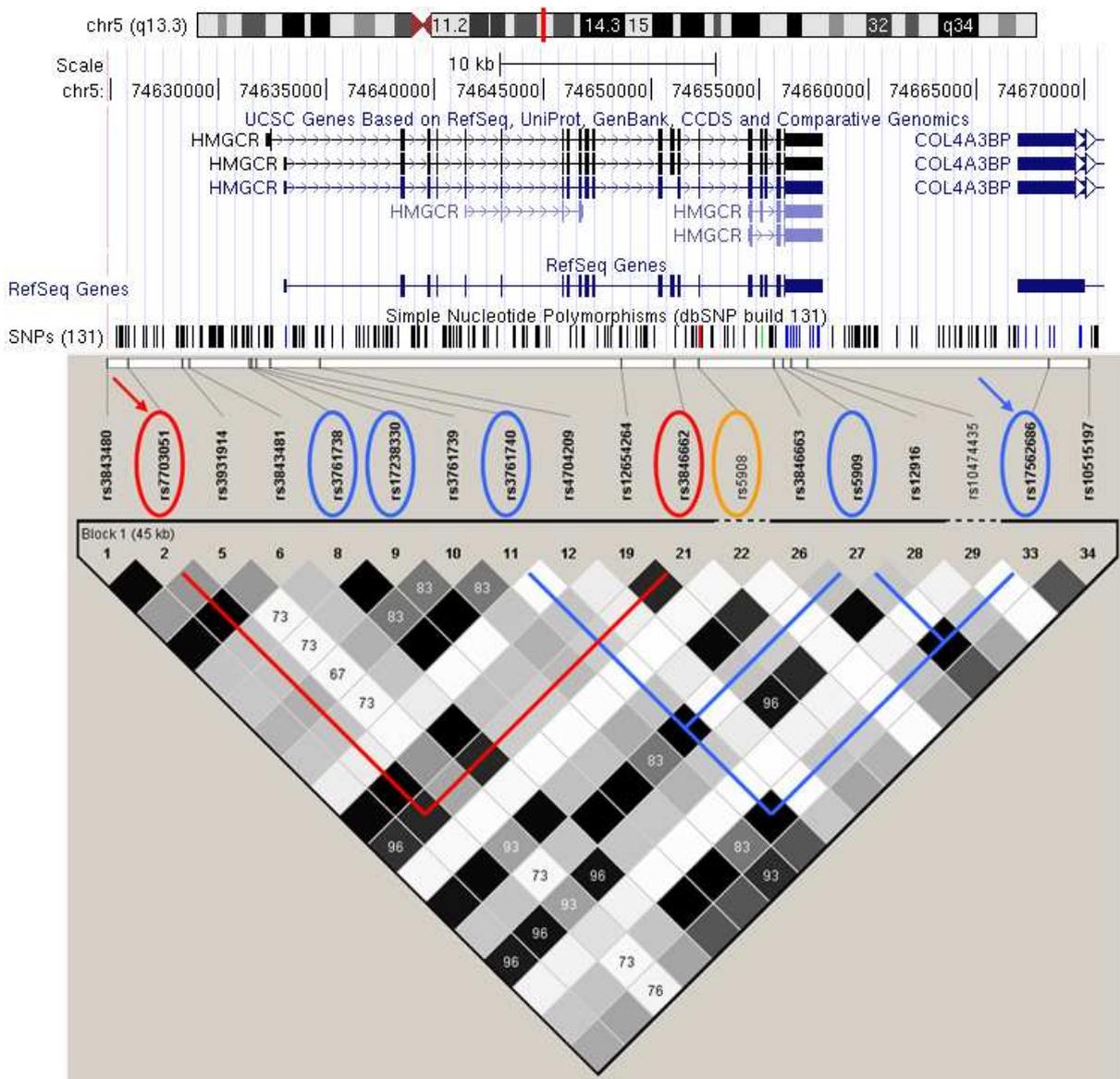


Abbildung 21: Übersicht des Bereiches Chromosom 5: 74.625.000 bp bis 74.671.000 bp auf Grundlage des UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19). Erstellung des LD-Plots ( $r$ -squared) auf Grundlage der HapMap Data Rel 24/phaseII Nov08. Der rote Pfeil markiert den tagging SNP rs7703051 aus der GWA, der blaue Pfeil markiert den tagging SNP rs17562686. Orange umrandet ist der SNP rs5909.

### 3 Ergebnisse

nicht beeinflusst (Porcellini et al. 2007), wurde eine Assoziationsuntersuchung der SNPs rs3761738, rs17238330, rs3761740 nicht weiter in Betracht gezogen. Stattdessen wurde der Bereich, in dem diese SNPs liegen, einer Sequenzierung unterzogen, um mögliche unbekannte Mutationen aufzudecken (vgl. 3.4.1).

Der Genpolymorphismus rs5908, welcher als einziger SNP im HMGCR-Gen zu einem Aminosäureaustausch (Isoleucin→Valin) führt, steht mit keiner von beiden Gruppen in LD und scheidet daher als kausaler SNP für die beobachteten Assoziationen aus (Abbildung 21).

#### 3.2.2. Untersuchung der SNPs rs3846662 und rs5909 in CARLA und LE-Heart

Die Genotypisierung der CARLA-Kohorte bestätigte das in der HapMap angegebene LD sowohl zwischen dem *tagging* SNP rs7703051 und rs3846662 ( $r^2 = 0,73$ ) als auch zwischen dem *tagging* SNP rs17562686 und rs5909 ( $r^2 = 0,92$ ) (Abbildung 22) und zeigte für beide SNPs nach entsprechender Adjustierung eine starke Assoziation zu Serumlanosterol (rs3846662: additives Modell  $p = 2,9 \times 10^{-4}$ , rezessives Modell  $p = 1,5 \times 10^{-3}$ ; rs5909: additives Modell  $p = 3,8 \times 10^{-3}$ , rezessives Modell  $p = 2,6 \times 10^{-3}$ , Abbildung 23). Die *call rate* der Genotypisierungen betrug 0,984 bzw. 0,98. Es wurde nachgewiesen, dass die beiden *tagging* SNPs rs7703051 und rs17562686 in geringem LD zueinander stehen ( $r^2 = 0,18$ ) und somit zwei Haplotypen bilden.

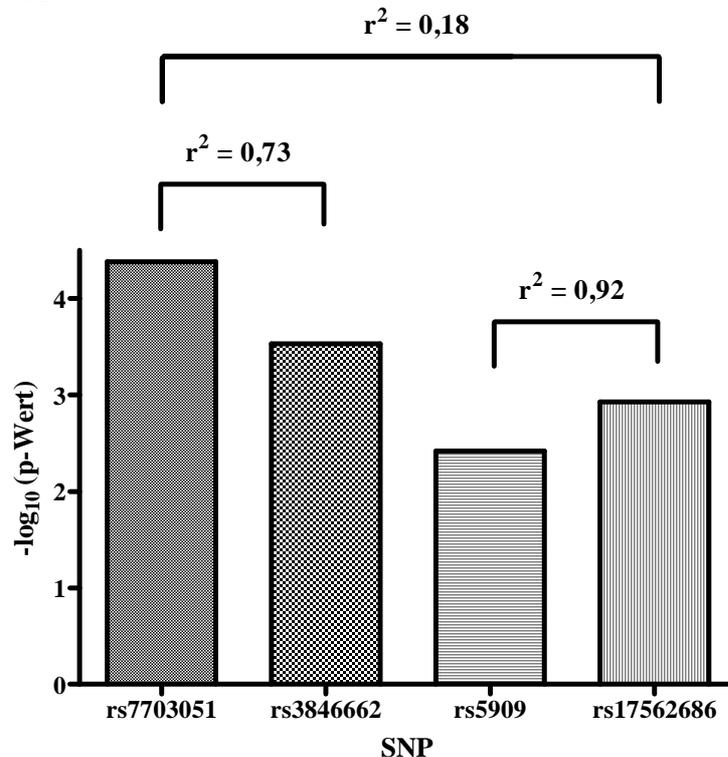
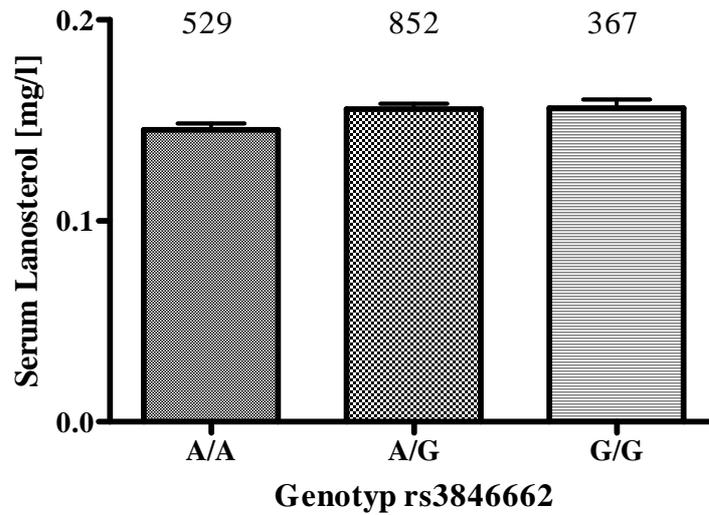
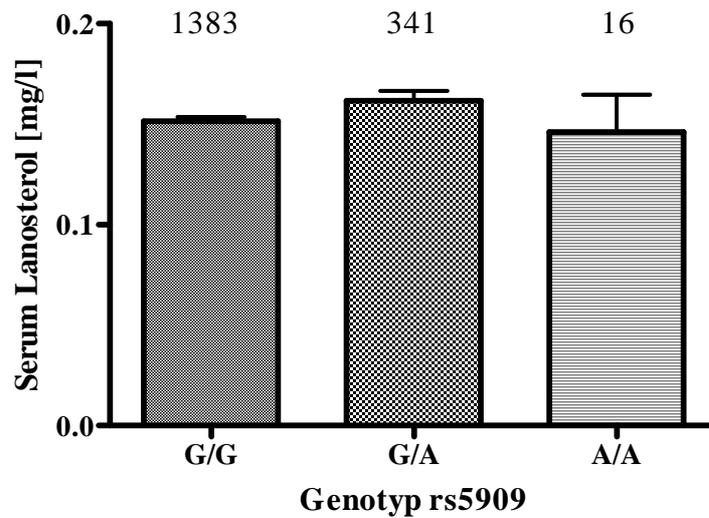


Abbildung 22: Linkage Disequilibrium in  $r^2$  von vier SNPs im HMGCR-Gen in der CARLA-Kohorte ( $n = 1760$ ) und deren Signifikanzwerte zum Phänotyp Serumlanosterol im additiven Modell. rs7703051 und rs17562686: *tagging* SNPs aus der GWA Stufe 1. rs3846662 und rs5909: SNPs mit vermuteter funktioneller Bedeutung.

### 3 Ergebnisse



rs3846662:            Frequenz des selteneren Allels: 45,4%  
                           $p(\text{additiv}) = 2,9 \times 10^{-4}$   
                           $\text{eff}(\text{additiv}): + 6,3\%$



rs5909:                Frequenz des selteneren Allels: 10,7%  
                           $p(\text{additiv}) = 3,8 \times 10^{-3}$   
                           $\text{eff}(\text{additiv}): + 8,0\%$

Abbildung 23: Assoziationsuntersuchungen der SNPs rs3846662 und rs5909 in der CARLA-Kohorte (n = 1760) für Serumlanosterol; homozygoten häufigeres Allel: rs3846662 A/A, rs5909 G/G; mit heterozygoter Allelverteilung A/G; homozygoten selteneres Allel: rs3846662 G/G, rs5909 A/A;  $p(\text{additiv})$  beziffert das Signifikanzniveau der beobachteten Assoziation zu Serumlanosterol im additiven Modell,  $\text{eff}(\text{additiv})$  den relativen Effekt eines mutierten Allels auf Serumlanosterol.

### 3 Ergebnisse

Die SNPs rs3846662 und rs5909 wurden als potentielle funktionelle SNPs des Weiteren in 1895 Probanden der LE-Heart Kohorte untersucht. Zum einen wurde hiermit eine vierte unabhängige Kohorte für Assoziationsstudien von Serumlanosterol und Serumcholesterin mit verschiedenen Genpolymorphismen des HMGCR-Gens generiert. Zum anderen konnten in dieser Kohorte funktionelle Einflüsse von Genpolymorphismen auf der Expressionsebene untersucht werden, da von allen Studienteilnehmer PBMCs isoliert wurden, um in diesen Zellen die Genexpression von Kandidatengenen zu messen. Die *call rate* der Genotypisierungen für beide SNPs betrug 0,99 und 0,97. Die Assoziation des SNP rs3846662 mit Serumlanosterol konnte bestätigt werden (additives Modell  $p = 1,0 \times 10^{-5}$ , rezessives Modell  $p = 1,2 \times 10^{-5}$ ). Außerdem zeigte sich eine Assoziation mit Serumcholesterin (additives Modell  $p = 0,001$ , rezessives Modell  $p = 0,003$ ) (Tabelle 17). Für den SNP rs5909 konnte die Effektrichtung für Serumlanosterol in LE-Heart repliziert werden, ohne ein entsprechendes Signifikanzniveau zu erreichen (additives Modell  $p = 0,10$ ). In der LE-Heart-Kohorte wurde weiterhin gezeigt werden, dass Desmosterol als Marker der Cholesterinbiosynthese bedeutsam ist, wenn auch die beobachtete Assoziation mit dem SNP rs3846662 ca. drei log-Stufen unter der Assoziation von Lanosterol liegen (additives Modell  $p = 0,011$ , rezessives Modell  $p = 8,5 \times 10^{-3}$ ). Gleichzeitig wurden in dieser Kohorte Assoziationen zwischen SNPs und den Phänotypen LDL-C und HDL-C überprüft. Der SNP rs3846662 zeigte eine signifikante Assoziation zu LDL-C (additives Modell  $p = 2,1 \times 10^{-5}$ , Effektgröße +4,3%; rezessives Modell  $p = 8,2 \times 10^{-5}$ , Effektgröße +6,2%) aber nicht zu HDL-C (Tabelle 17). Eine Analyse der untersuchten SNPs in LE-Heart bzgl. einer Assoziation mit der Ausprägung der Atherosklerose – Dicke der Intima und Media der Aa. carotidae (Bestimmung mittels Ultraschall) und Ausprägung einer KHK (Herzkatheter) – erbrachte keine signifikanten Ergebnisse.

**Tabelle 17:** Untersuchung von Genpolymorphismen des HMGCR-Gens auf Assoziationen mit Phänotypen des Lipidstoffwechsels in LE-Heart (n = 1895).

SNP <i>Gen</i>	Allele MAF	CR	HWE	Additives Modell - Alleleffekt und p-Wert der Assoziation				Rezessives Modell - Alleleffekt und p-Wert der Assoziation			
				LA	CH	LDL	HDL	LA	CH	LDL	HDL
rs3846662 <i>HMGCR</i>	A>G 0,456	0,991	0,26	8,8 % $1 \times 10^{-5}$	2,2 % $1 \times 10^{-3}$	4,3 % $2 \times 10^{-5}$	-1,4 % 0,12	13,8 % $1 \times 10^{-5}$	2,9 % $3 \times 10^{-3}$	6,2 % $8 \times 10^{-5}$	-0,3 % 0,82
rs5909 <i>HMGCR</i>	G>A 0,109	0,967	0,04	5,1 % 0,10	0,9 % 0,48	1,9 % 0,24	-1,0 % 0,46	5,2 % 0,13	1,1 % 0,41	2,1 % 0,23	-1,4 % 0,37

LA, Serumlanosterol; CH, Serumcholesterin; LDL, Serum LDL-Cholesterin; HDL, Serum HDL-Cholesterin; Allele, häufigeres Allel > selteneres Allel; MAF, minor allele frequency; CR, call rate; HWE, p-Wert der Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht.

### 3 Ergebnisse

#### 3.2.3. Kumulative Analyse relevanter SNPs innerhalb des HMGCR-Locus

Nachdem alle Assoziationsuntersuchungen im Rahmen des *fine mapping* in der CARLA- und LE-Heart-Kohorte abgeschlossen waren, erfolgte in der hier vorgestellten Arbeit eine kumulative Analyse aller untersuchten SNPs innerhalb des HMGCR-Locus. Hierbei zeigten sich signifikante Assoziationen der 4 SNPs in allen sechs Assoziationsmodellen (Tabelle 18).

**Tabelle 18:** Kumulative Analyse relevanter SNPs innerhalb des HMGCR-Gens nach Abschluss der Assoziationsuntersuchungen mit jeweils maximal verfügbarer Fallzahl.

SNP <i>Gen</i>	Allele MAF	CR	HWE	Additives Modell - Alleleffekt und p –Wert der Assoziation			Rezessives Modell - Alleleffekt und p –Wert der Assoziation		
				LA	CH	LA/CH	LA	CH	LA/CH
rs7703051 <i>HMGCR</i>	C>A 0,392	0,975	0,40	8,0 % $1,3 \times 10^{-15}$	1,5 % $4,7 \times 10^{-5}$	6,5 % $8,3 \times 10^{-13}$	11,1 % $1,4 \times 10^{-14}$	2,0 % $6,0 \times 10^{-5}$	8,9 % $7,1 \times 10^{-12}$
n = 6307: KORA Stage 1+2, CARLA, LE-Heart									
rs17562686 <i>HMGCR</i>	G>A 0,103	0,984	0,34	8,1 % $3,8 \times 10^{-7}$	1,5 % $7,4 \times 10^{-3}$	6,5 % $7,5 \times 10^{-6}$	9,1 % $1,6 \times 10^{-7}$	1,8 % $3,5 \times 10^{-3}$	7,1 % $5,2 \times 10^{-6}$
n = 6307: KORA Stage 1+2, CARLA, LE-Heart									
rs3846662 <i>HMGCR</i>	A>G 0,455	0,987	0,64	7,8 % $5,4 \times 10^{-9}$	1,6 % $6,3 \times 10^{-4}$	6,1 % $5,9 \times 10^{-7}$	11,7 % $2,1 \times 10^{-8}$	2,1 % $3,1 \times 10^{-3}$	9,4 % $9,2 \times 10^{-7}$
n = 3655: CARLA, LE-Heart									
rs5909 <i>HMGCR</i>	G>A 0,105	0,977	0,76	9,3 % $2,6 \times 10^{-7}$	2,0 % $1,3 \times 10^{-3}$	7,1 % $1,4 \times 10^{-5}$	10,6 % $6,5 \times 10^{-8}$	2,3 % $6,5 \times 10^{-4}$	8,0 % $5,6 \times 10^{-6}$
n = 5150: KORA Stage 1, CARLA, LE-Heart									

kumulative Analyse der SNPs mit Hinweisen für genetische Assoziationen mit Serumlanosterol oder Serumcholesterin. LA, Lanosterol; CH, Cholesterin; LA/CH, Lanosterol normalisiert auf Cholesterin; Allele, Majorallel > Minorallel; MAF, minor allele frequency; CR, call rate; HWE, p-Wert der Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht.

#### 3.2.4. Kombinierte Analyse der *tagging* SNPs innerhalb des HMGCR-Locus

Eine kombinierte Analyse der beiden *tagging* SNPs rs7703051 und rs17562686 in allen vier Kohorten (KORA Stufe 1 + 2, CARLA, LE-Heart, n = 6307, vgl. Abbildung 16) der hier vorgestellten Arbeit zu den Phänotypen Serumlanosterol und -cholesterin zeigte schließlich, dass der SNP rs7703051 der bedeutendere SNP bezüglich aller beobachteten Assoziationen in der GWA ist und Assoziationen des SNP rs17562686 zum Teil durch das vorhandene LD erklärt werden können. Insbesondere wird in der kombinierten Analyse beider SNPs nur eine gering höhere erklärte Varianz (*explained variance*) als durch rs7703051 allein erreicht (z.B. 1,13% zu 1,04% für Serumlanosterol). Trotzdem stellt der SNP rs17562686 nicht nur in der kumulativen sondern auch in der kombinierten Analyse mit einer Effektgröße von 3,3%

### 3 Ergebnisse

(additiv) bzw. 4,8% (rezessiv) eine konsistente eigenständige Assoziation zu Serumlanosterol dar, so dass für die folgenden Untersuchungen stets beide SNPs mit möglicher funktioneller Bedeutung (rs3846662 steht mit rs7703051 in LD, rs5909 mit rs17562686, vgl. 3.2.1.) berücksichtigt wurden (Tabelle 19).

**Tabelle 19:** Vergleich der kumulativen (vgl. Tabelle 18) und kombinierten Analyse von rs7703051 und rs17562686 zu Assoziationen mit Serumlanosterol und -cholesterin.

SNP <i>Gen</i>	Allele MAF	CR		Additives Modell - Alleleffekt und p-Wert der Assoziation			Rezessives Modell - Alleleffekt und p-Wert der Assoziation		
				LA	CH	LA/CH	LA	CH	LA/CH
Kumulative Analyse (n = 6307)									
rs7703051 <i>HMGCR</i>	C>A 0,392	0,975	eff	8,0 %	1,5 %	6,5 %	11,1 %	2,0 %	8,9 %
			p-Wert	$1 \times 10^{-15}$	$5 \times 10^{-5}$	$8 \times 10^{-13}$	$1 \times 10^{-14}$	$6 \times 10^{-5}$	$7 \times 10^{-12}$
			expvar	1,04 %	0,27 %	0,84 %	0,97 %	0,26 %	0,77 %
rs17562686 <i>HMGCR</i>	G>A 0,103	0,984	eff	8,1 %	1,5 %	6,5 %	9,1 %	1,8 %	7,1 %
			p-Wert	$4 \times 10^{-7}$	$7 \times 10^{-3}$	$8 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-7}$	$4 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-6}$
			expvar	0,42 %	0,12 %	0,33 %	0,45 %	0,14 %	0,34 %
Kombinierte Analyse (n = 6307)			expvar	1,13 %	0,29 %	0,91 %	1,10 %	0,30 %	0,87 %
rs7703051 <i>HMGCR</i>	C>A 0,392	0,974	eff	7,2 %	1,3 %	5,8 %	9,6 %	1,8 %	7,8 %
			p-Wert	$1 \times 10^{-10}$	$8 \times 10^{-4}$	$7 \times 10^{-9}$	$5 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-3}$	$3 \times 10^{-8}$
rs17562686 <i>HMGCR</i>	G>A 0,103	0,984	eff	3,3 %	0,6 %	2,7 %	4,8 %	1,0 %	3,8 %
			p-Wert	0,06	0,37	0,08	$9 \times 10^{-3}$	0,14	0,02

LA, Serumlanosterol; CH, Serumcholesterin; LA/CH, Lanosterol normalisiert auf Cholesterin; Allele, häufigeres Allel > selteneres Allel; MAF, minor allele frequency; CR, call rate; eff, Effektgröße eines mutierten Allels in %; p-Wert, Signifikanzniveau der Assoziation; expvar, erklärte Varianz durch den/die untersuchten SNPs als prozentualer Anteil der beobachteten Gesamtvarianz.

### 3.3. Untersuchung der HMGCR-Expression in humanen Zellen

#### 3.3.1. Untersuchung in humanen Leberproben

Die Expressionsuntersuchungen des HMGCR-Gens wurden in zwei Stufen durchgeführt mit dem Ziel, mögliche funktionelle Einflüsse von Genpolymorphismen auf die HMGCR-Expression zu überprüfen. Zunächst wurde ein möglicher Einfluss des SNP rs3846662 auf das alternative *Splicing* des Exon 13 in humanen Leberproben mittels transkriptspezifischer qRT-PCRs untersucht. Außerdem diente die kleinere Fallzahl dieser Gruppe als Testplattform der qRT-PCR-Assays, bevor diese für Expressionsuntersuchungen in einer großen Kohorte angewendet wurden (vgl. 2.3.20.). Weiterhin wurde ein möglicher Einfluss des SNP rs5909 auf die Genexpression geprüft. Die Allelverteilung in der Untersuchungspopulation von 51 der insgesamt 98 humanen Leberproben ist in Tabelle 20 abgebildet (vgl.2.3.20.).

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 20:** Allelverteilung möglicher funktionell bedeutsamer SNPs in 51 humanen Leberproben.

SNP und Allele	rs3846662 A/G	rs5909 G/A
häufigeres Allel homozygot	18	42
heterozygot	20	6
selteneres Allel homozygot	12	2
unbekannt	1	1

Es zeigte sich für den SNP rs3846662 eine signifikante Assoziation,  $p < 0,01$ , bezüglich des Splicingverhaltens. Proben mit dem Genotyp A/A wiesen 37,2% Exon 13 gesplictes Transkript auf, Proben mit dem Genotyp G/G 35,2% (Abbildung 24). Bezüglich der Gesamtexpression gab es keine mit dem Genotyp assoziierten Unterschiede (A/A: 67632 Kopien; G/G: 59930 Kopien;  $p = 0,68$ ). Hinsichtlich des SNP rs5909 konnten in der Kohorte humaner Leberproben aufgrund der geringen Anzahl von Heterozygoten (Genotyp: G/A) und homozygoten Trägern des selteneren Allels (Genotyp: A/A) keine Effekte beobachtet werden.

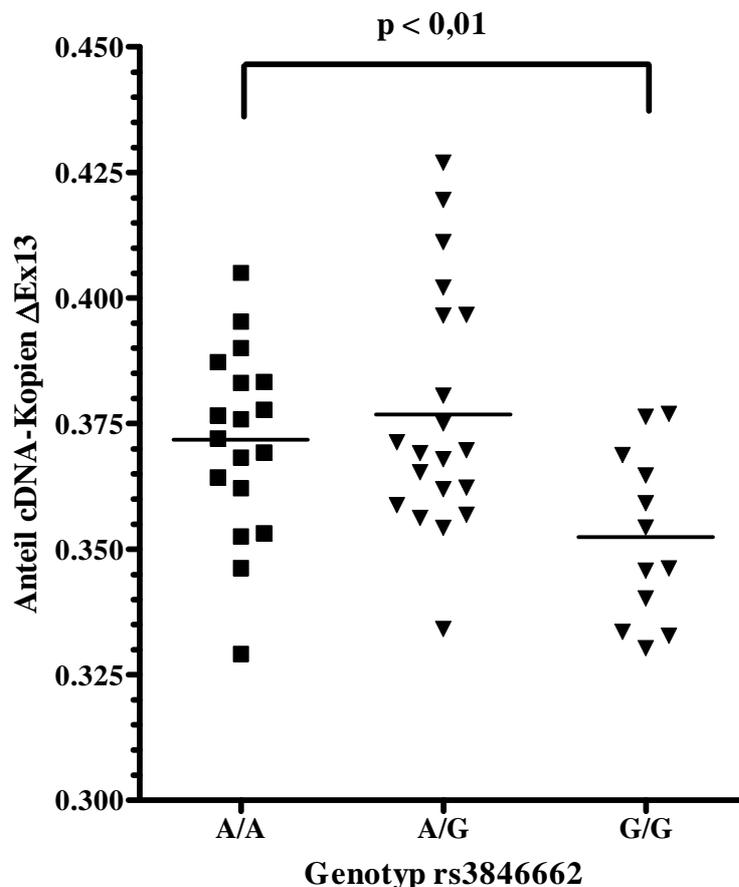


Abbildung 24: Splicingverhalten des HMGCR-Gens in humanen Leberproben ( $n = 51$ ); 18 Proben mit homozygotem häufigerem Allel A/A, 20 Proben mit heterozygoter Allelverteilung A/G, 12 Proben mit homozygotem seltenerem Allel G/G; Erläuterung:  $\Delta$ Ex13: Transkript des HMGCR-Gens ohne Exon 13.

### 3.3.2. Untersuchung in humanen PBMCs der LE-Heart Kohorte

Nach erfolgreicher Etablierung der qRT-PCR-Assays in humanen Leberproben wurde die HMGCR-Expression in PBMCs der LE-Heart-Kohorte überprüft. Zum Zeitpunkt der experimentellen Untersuchung waren 1140 Proben verfügbar. Proben mit einer  $\beta$ -Aktin Expression  $< 10.000$  Kopien wurden von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen (vgl. 2.3.20.), so dass 958 PBMC-Proben die in Tabelle 21 dargestellten Kohorten bildeten.

**Tabelle 21:** Allelverteilung möglicher funktionell bedeutsamer SNPs in 958 humanen PBMCs und Auflistung der Signifikanzniveaus für unterschiedliche Aspekte der SNP assoziierten HMGCR-Genexpression, Effektgrößen siehe Text

SNP und Allele	rs3846662 A/G	rs5909 G/A
häufigeres Allel homozygot	275	748
Heterozygot	470	169
selteneres Allel homozygot	203	6
call rate	0,99	0,96
Signifikanzwert für SNP-assoziertes alternatives <i>Splicing</i>	additiv: $p = 2,1 \times 10^{-7}$	rezessiv: $p = 0,82$
Signifikanzwert für SNP-assozierte Expression des gespligten Transkriptes	additiv: $p = 4,2 \times 10^{-4}$	rezessiv: $p = 0,05$
Signifikanzwert für SNP-assozierte Expression des HMGCR-Gens	additiv: $p = 0,24$	rezessiv: $p = 0,04$

Assoziationsuntersuchungen zwischen Genpolymorphismen und Genexpression erfolgten analog zu den Untersuchungen in den humanen Leberproben. Zusätzlich zur Normalisierung aller HMGCR-Expressionswerte auf  $10^6$  Kopien  $\beta$ -Aktin wurden vor der statistischen Analyse jeweils alle Expressionsdaten einer 384-*well* Platte einer Quantilnormalisierung unterzogen, um die Vergleichbarkeit zwischen den 14 384-*well* Platten pro Assay zu gewährleisten. Es bestätigte sich das mit dem SNP rs3846662 assoziierte Splicingverhalten des HMGCR-Gens (Abbildung 25). PBMCs, welche das homozygote häufigere Allel trugen, wiesen relativ zur Gesamtexpression des HMGCR-Gens in allen Vererbungsmodellen signifikant mehr Exon 13 gespligte Transkripte auf (A/A: 45,1%, A/G: 44,5%, G/G: 43,4%; additiv:  $p = 2,1 \times 10^{-7}$ , rezessiv:  $p = 7,5 \times 10^{-5}$ , dominant:  $p = 3,3 \times 10^{-6}$ ) und bestätigten somit die Befunde in humanen Leberproben.

### 3 Ergebnisse

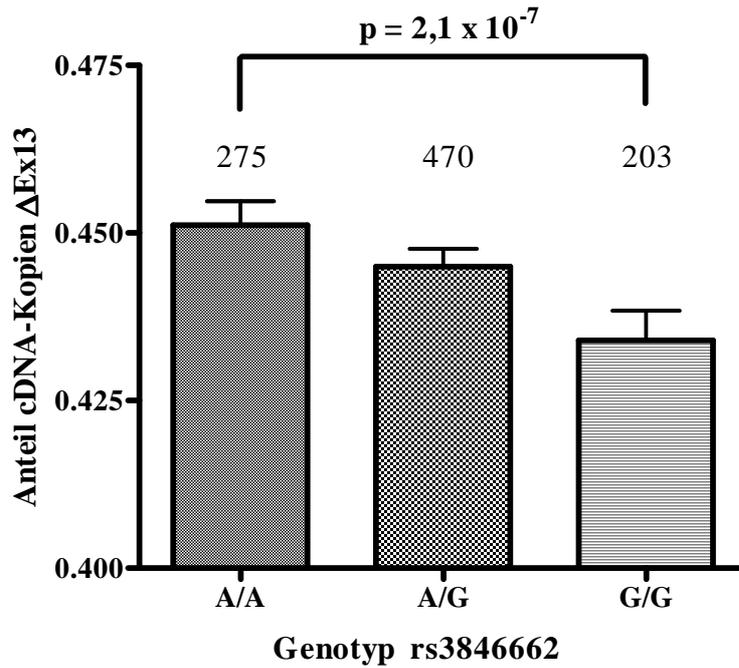


Abbildung 25: Splicingverhalten des HMGCRC-Gens in humanen PBMCs der LE-Heart Kohorte (n = 958); 275 Proben mit homozygotem häufigerem Allel A/A, 470 Proben mit heterozygoter Allelverteilung A/G, 203 Proben mit homozygotem seltenerem Allel G/G; Erläuterung:  $\Delta$ Ex13: Transkript des HMGCRC-Gens ohne Exon 13.

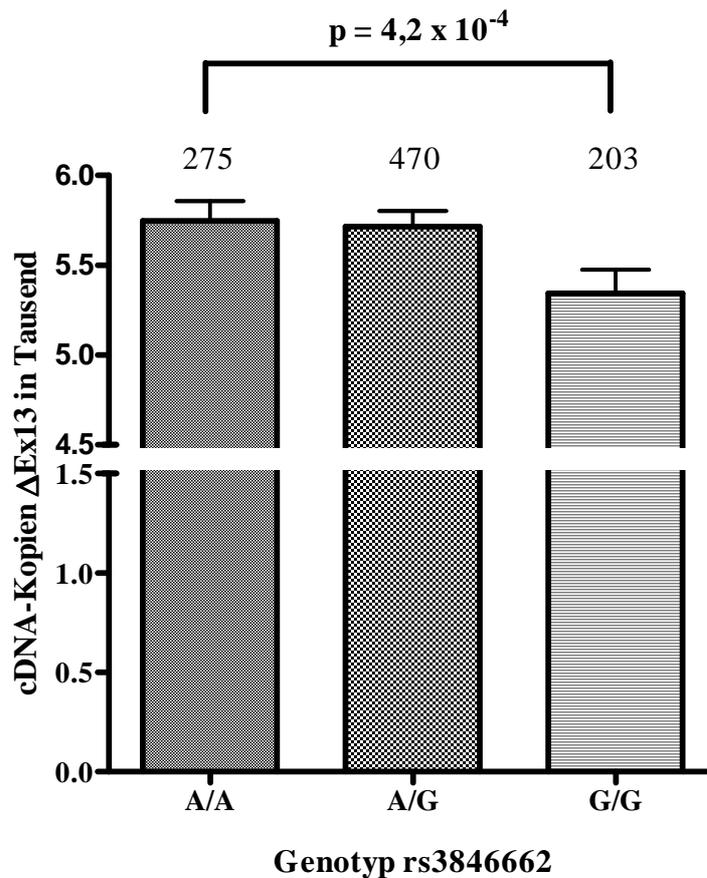


Abbildung 26: Expression des Exon 13 gespligten HMGCRC-Transkriptes in humanen PBMCs der LE-Heart Kohorte (n = 958); 275 Proben mit homozygotem häufigerem Allel A/A, 470 Proben mit heterozygoter Allelverteilung A/G, 203 Proben mit homozygotem seltenerem Allel G/G; Erläuterung: cDNA-Kopienanzahl nach Normalisierung auf  $10^6$  Kopien  $\beta$ -Aktin und Quantilnormalisierung der 384-well Platten;  $\Delta$ Ex13: Transkript des HMGCRC-Gens ohne Exon 13.

### 3 Ergebnisse

Auch bezogen auf Absolutwerte war das häufigere Allel mit einer signifikanten Erhöhung der Expression des Exon 13 gespligten Transkriptes assoziiert (Abbildung 26; A/A: 5746 Kopien, G/G: 5344 Kopien; additiv:  $p = 4,2 \times 10^{-4}$ , rezessiv:  $p = 0,03$ , dominant:  $p = 2,0 \times 10^{-4}$ ). Jedoch zeigte sich in keinem der 3 Vererbungsmodelle eine signifikante Assoziation zwischen dem Genotyp des SNP rs3846662 und der HMGCR-Gesamtexpression (bester Wert: dominant  $p = 0,12$ ).

Die Untersuchung der Expression der HMGCR-Transkripte in Abhängigkeit vom SNP rs5909 bestätigte zunächst die Hypothese, dass unterschiedliche Mechanismen zu signifikanten Assoziationen von Serumlanosterol mit den Genotypen beider SNPs führen könnten. Eine Assoziation mit dem Splicingverhalten konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 27; relativ erhöhte Expression des Exon 13 gespligten Transkriptes, additiv:  $p = 0,97$ , rezessiv:  $p = 0,82$ ). Hingegen bestand für die Gesamtexpression des HMGCR-Gens ein Trend dahingehend, dass die Kopienanzahl in der Gruppe der homozygoten Träger des häufigeren Allels höher ist (Abbildung 28; Mittelwerte normalisiert: Genotyp G/G 13014 HMGCR-Kopien; Genotyp G/A + G/G 12185 Kopien; additiv:  $p = 0,05$ , rezessiv:  $p = 0,04$ ). Zwei Arbeitshypothesen für diese Beobachtung führten zu im Folgenden beschriebenen Untersuchungen. Zum einen könnten unbekannte SNPs im Promotorbereich, welche mit den SNPs rs3761740 und rs5909 in LD stehen, zu einer unterschiedlichen Genexpression führen, indem durch Basenmutationen DNA-Motive für Transkriptionsfaktoren verändert werden. Andererseits könnte der SNP rs5909 selbst aufgrund seiner räumlichen Nähe zum Stopp-Codon oder ein anderer gelinkter Genpolymorphismus zu einer Änderung der mRNA-Stabilität des 3'-UTR führen (Winzen et al. 2004).

### 3 Ergebnisse

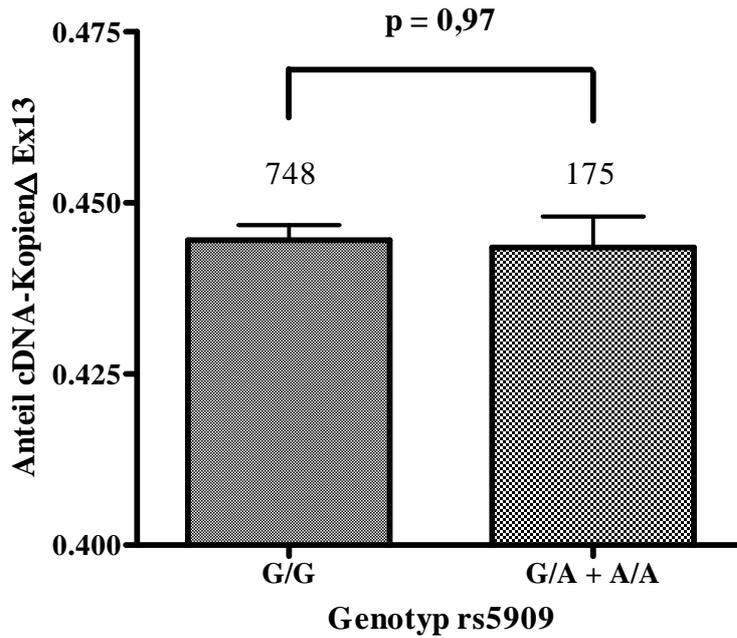


Abbildung 27: Splicingverhalten des HMGCR-Gens in humanen PBMCs der LE-Heart Kohorte (n = 958); 748 Proben mit homozygotem häufigerem Allel G/G, 169 Proben mit Heterozygotie G/A, 6 Proben mit homozygotem seltenerem Allel A/A; Erläuterung:  $\Delta$ Ex13: Transkript des HMGCR-Gens ohne Exon 13.

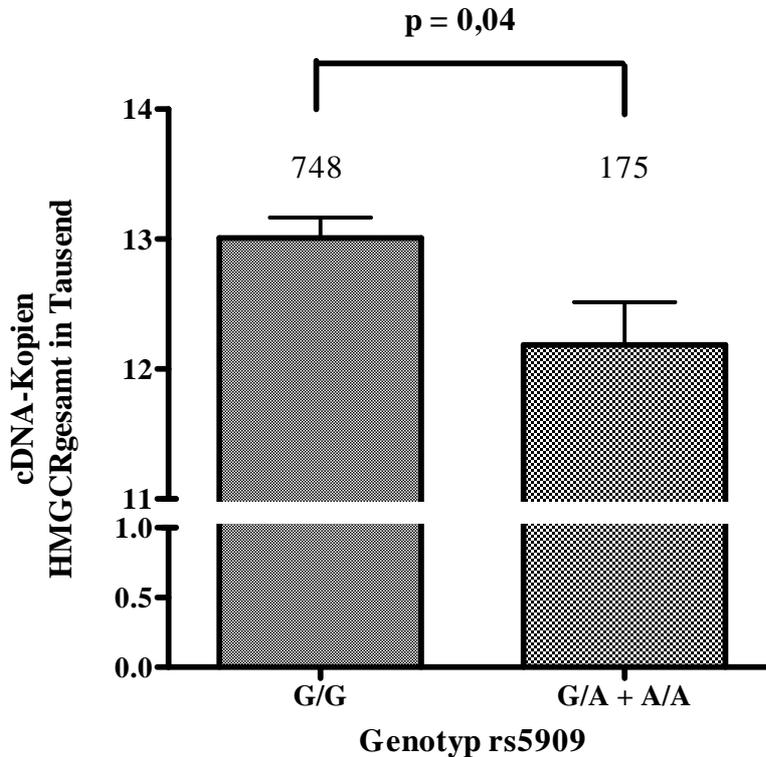


Abbildung 28: Gesamtexpression des HMGCR-Gens in humanen PBMCs der LE-Heart Kohorte (n = 958); 748 Proben mit homozygotem häufigerem Allel G/G, 169 Proben mit Heterozygotie G/A, 6 Proben mit homozygotem seltenerem Allel A/A; Erläuterung: cDNA-Kopienanzahl nach Normalisierung auf  $10^6$  Kopien  $\beta$ -Aktin und Quantilnormalisierung der 384-well Platten.

### 3.4. Untersuchung der Promotorregion des HMGCR-Gens

#### 3.4.1. Sequenzierung der DNA proximal des HMGCR-Gens

Um die Hypothese zu prüfen ob unbekannte Genpolymorphismen, die mit dem *tagging* SNP rs17562686 gelinkt sind, die Expression des HMGCR-Gens beeinflussen, wurde zunächst die DNA von 6 humanen Leberproben (jeweils 2 Proben der Genotypen G/G, G/A, A/A für den SNP rs5909) untersucht. Der untersuchte Bereich umfasste ca. 5,5 kbp, erstreckte sich von Chr. 5:74627941 bp bis Chr. 5:74633452 (Ensembl genome browser 60) und beinhaltete somit DNA, die den bisher bekannten Bereich des HMGCR-Promotors und alle darin enthaltenen SNPs umfasste, welche laut HapMap-Datenbank mit dem SNP rs17562686 stark gelinkt sind (Abbildung 30). Das äußerst starke LD ( $r^2 = 1,0$ ) aus der HapMap-Datenbank zwischen mehreren SNPs im Promotorbereich und dem SNP rs17562686 sowie dem SNP rs5909 konnte durch die Sequenzierung bestätigt werden (Abbildung 29). Weiterhin wies die Sequenzierung dieser sechs Proben einen bis dato unbekanntem Genpolymorphismus (laborinterne Bezeichnung: SNP HMGCR 1) nach, welcher sich an Position Chr. 5:74633014 (Ensembl genome browser 60) 67 bp *upstream* (proximal) des SNP rs17244722 befindet und daher in unmittelbarer räumlicher Nähe des Transkriptionsstarts des HMGCR-Gens lokalisiert ist.

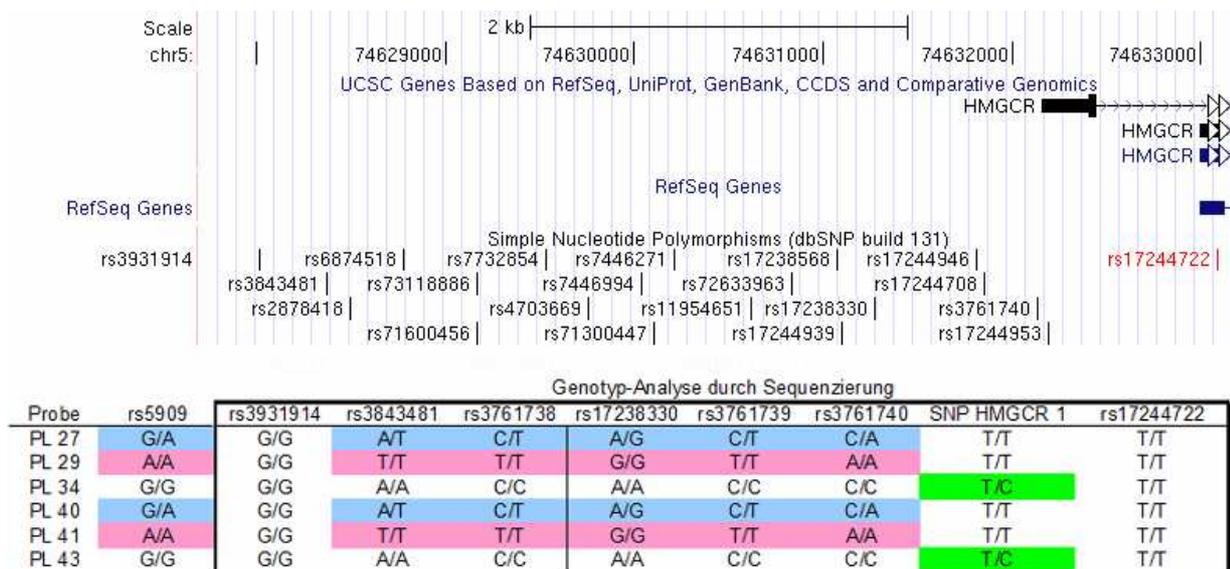


Abbildung 29: Überblick a) vom ersten bis zum letzten bekannten SNP im untersuchten Chromosomenbereich, b) von verschiedenen Genpolymorphismen, welche in starkem LD mit dem SNP rs5909 stehen und c) des neu entdeckten SNP HMGCR 1 an Position Chr. 5:74633014 (Ensembl genome browser 60).

### 3 Ergebnisse

Dieser Genpolymorphismus lag heterozygot bei den beiden Proben vor, welche das häufigere Allel homozygot für den SNP rs5909 trugen. Allerdings konnte dieser SNP keiner bekannten DNA-Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden (Abfrage der Genomatix-Datenbank am 17.08.2009).

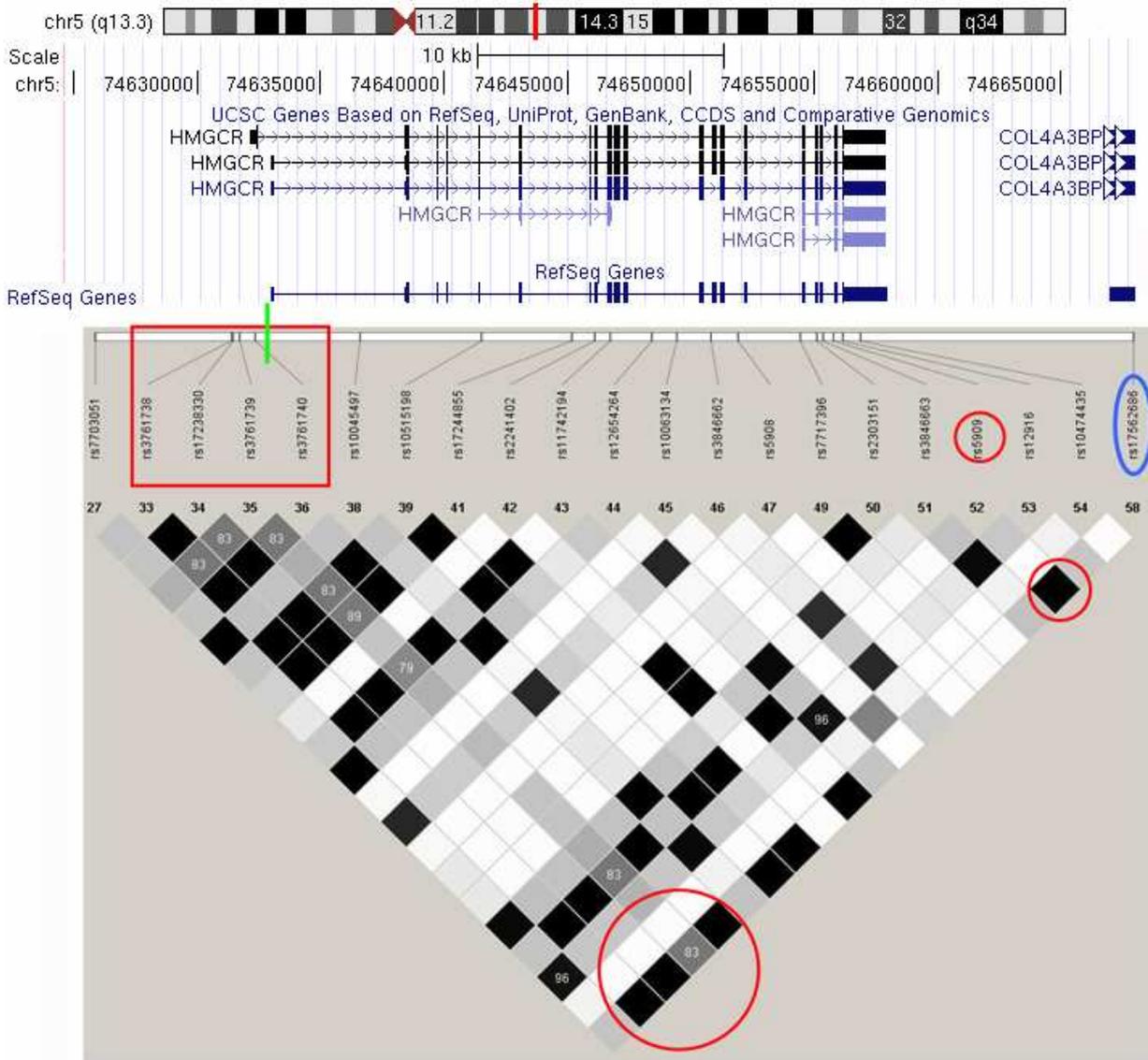


Abbildung 30: Übersicht des Bereiches Chromosom 5: 74.624.000 bp bis 74.668.000 bp auf Grundlage des UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19). Erstellung des LD-Plots ( $r$ -squared) auf Grundlage der HapMap Data Rel 24/phaseII Nov08. Mit rotem Viereck sind bekannte SNPs nahe der Promotorregion des HMGCR-Gens umrahmt, welche in starkem LD (großer roter Kreis) mit dem tagging SNP rs17562686 (blauer Kreis) und dem SNP rs5909 stehen (kleiner roter Kreis). Darstellung der Lage des HMGCR-Gens mit Maßstab im oberen Teil der Grafik und relativ dazu die Lage des per Sequenzierung neu entdeckten SNPs (grüne Linie).

### 3.4.2. Assoziationsuntersuchung des SNP HMGCR 1 in CARLA und LE-Heart

Nach erfolgreicher Identifikation eines unbekanntes Genpolymorphismus wurde überprüft, ob dieser in der CARLA- und der LE-Heart-Kohorte eine Assoziation mit Serumlanosterol und Serumcholesterin zeigte. Die Genotypisierung des SNP HMGCR 1 ergab in beiden Kohorten übereinstimmend eine sehr niedrige Allelfrequenz des selteneren Allels von 2,2 % (Tabelle 22). Des Weiteren stand dieser SNP auch in keinem LD mit SNP rs5909 ( $r^2 = 0,00$ ), was die Sequenzierung der 6 Proben zunächst vermuten ließ (Abbildung 31).

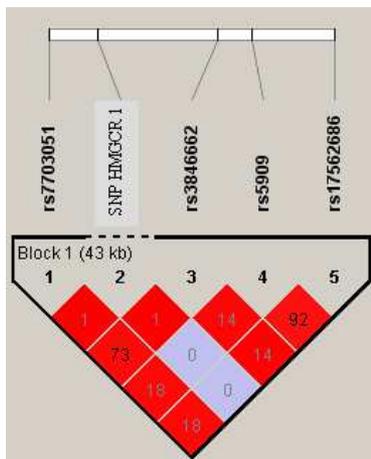


Abbildung 31: LD-Plot ( $D'$ ) für fünf SNPs, welche im Rahmen der HMGCR-Untersuchung in der CARLA-Kohorte ( $n=1760$ ) genotypisiert wurden. Die Zahlen in den Feldern entsprechen den  $r$ -square-Werten zwischen zwei SNPs.

**Tabelle 22:** Allelverteilung des neu entdeckten SNP HMGCR 1 in verschiedenen Untersuchungskohorten.

SNP HMGCR 1	CARLA	LE-HEART
häufigeres Allel homozygot T/T	1676	1815
heterozygot T/C	77	80
selteneres Allel homozygot C/C	0	1
<i>minor allele frequency</i>	0,022	0,022
<i>call rate</i>	0,987	0,994

Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs der heterozygoten und homozygoten Minorallelträger war die *Power* der Assoziationsstudie in beiden Kohorten unzureichend und erreichte in keinem der sechs Assoziationsmodelle ein statistisch relevantes Signifikanzniveau (Assoziation zu Serumlanosterol: CARLA additiv/rezessiv  $p = 0,22$ ; LE-Heart additiv/rezessiv  $p = 0,36/0,48$ ). Auch eine kombinierte Analyse dieser beiden Kohorten zeigte in keinem der 6 untersuchten Assoziationsmodelle eine statistische Signifikanz (bester Wert:

Serumlanosterol additives Modell  $p = 0,13$ ). Ebenso lieferte eine Untersuchung der Genexpression in 958 PBMCs der LE-Heart-Kohorte keine signifikante Assoziation mit dem SNP HMGCR 1.

### 3.5. Untersuchung der 3'-UTR-Stabilität des HMGCR-Gens

#### 3.5.1. Untersuchung in humanen Leberproben

Nachdem eine Untersuchung von Genpolymorphismen im Promotorbereich des HMGCR-Gens keine signifikanten Resultate erbrachte, wurde geprüft, ob es eine Assoziation zwischen dem SNP rs5909 und der mRNA-Stabilität der HMGCR-Transkripte gibt. Die Arbeitshypothese beinhaltete die Annahme, dass der SNP rs5909, welcher sich nahe des Stopp-Codons des HMGCR-Gens befindet (vgl. 3.2.1.), zu unterschiedlichen Verteilungen der Längen der untranslatierten 3'-Bereiche der HMGCR-Transkripte führte und somit aufgrund von möglichen Unterschieden in der mRNA-Stabilität zu Unterschieden in der Gesamtexpression führen könnte.

Die Etablierung erfolgte zunächst erneut in humanen Leberproben, welche entsprechend ihrer Allelverteilung für den SNP rs5909 selektiert wurden (vgl. 2.3.20.). Die Probenmenge umfasste 3 homozygote Träger des häufigeren Allels, 5 Heterozygote und 2 homozygote Träger des selteneren Allels. Die Analyse zeigte mit rs5909 assoziierte signifikante Unterschiede der untranslatierten 3'-Enden. Homozygote Träger des häufigeren Allels G/G exprimierten signifikant mehr cDNA-Transkripte mit längeren 3'-Enden als Träger von 1 oder 2 selteneren Allelen.

Der Quotient der Anzahl von HMGCR-Transkripten mit einem mindestens 400 bp langen untranslatierten 3'-Ende durch die Zahl aller HMGCR-Transkripte (vgl. 2.3.14.:  $\text{HMGCRStopp400}/\text{HMGCRStopp}$ ) betrug 0,97 (G/G) respektive 0,70 (G/A) und 0,73 (A/A;  $p < 0,01$ ). Der Quotient der Anzahl von HMGCR-Transkripten mit einem mindestens 1 kbp langen untranslatierten 3'-Ende durch die Anzahl aller HMGCR-Transkripte (vgl. 2.3.14.:  $\text{HMGCRStopp1000}/\text{HMGCRStopp}$ ) ergab 0,49 (G/G) bzw. 0,40 (G/A) und 0,36 (A/A;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 32).

Unterschiede in der HMGCR-Expression entsprachen den Beobachtungen in der LE-Heart-Kohorte ohne ein entsprechendes Signifikanzniveau zu erreichen (Mittelwerte HMGCRStopp: G/G 59062, G/A 28490, A/A 31657).

### 3 Ergebnisse

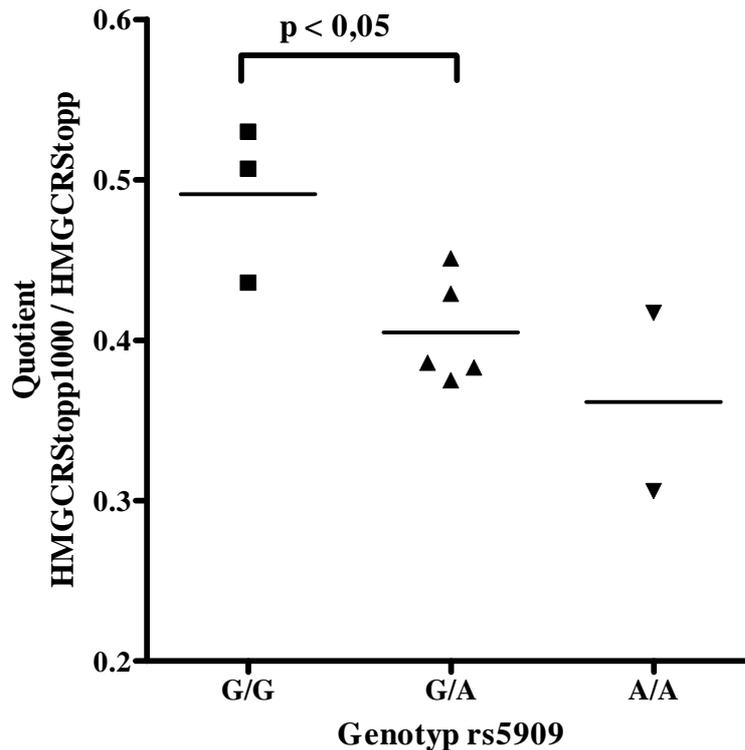


Abbildung 32: Überprüfung der untranslatierten cDNA-Transkriptlängen im 3'-Bereich des HMGCRCR-Gens mittels Quotienten aus den Expressionsdaten der Sonden HMGCRCRStopp und HMGCRCRStopp1000 in Abhängigkeit vom Genotyp des SNP rs5909 für zehn humane Leberproben. 3 Proben mit homozygotem häufigerem Allel G/G, 5 Proben mit heterozygoter Allelverteilung G/A, 2 Proben mit homozygotem seltenerem Allel A/A.

#### 3.5.2. Untersuchung in humanen PBMCs der LE-Heart-Kohorte

Zur Bestätigung der gewonnenen Ergebnisse in humanen Leberproben wurde cDNA einer Stichprobe von 90 PBMC-Proben aus der LE-Heart-Kohorte auf einer 384-well Platte zusammengefasst und analog zur Untersuchung der humanen Leberproben verfahren. Proben mit einer  $\beta$ -Aktin Expression  $< 10.000$  Kopien wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen (vgl. 2.3.20.). Die SNP-Genotypisierung ermittelte unter den 85 übrigen Proben 67 homozygote Träger des häufigeren Allels, 14 Heterozygote und zwei homozygote Träger des selteneren Allels. In zwei Proben konnte der Genotyp des SNPs rs5909 nicht bestimmt werden. Die Analyse der PBMCs zeigte einen Trend ( $p = 0,21$  bzw.  $p = 0,30$  wenn G/A- und A/A-Träger zu einer Gruppe zusammengefasst werden) auf, der den Beobachtungen in den humanen Leberproben entsprach, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen (Abbildung 33). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde auf weiter gehende Untersuchungen verzichtet.

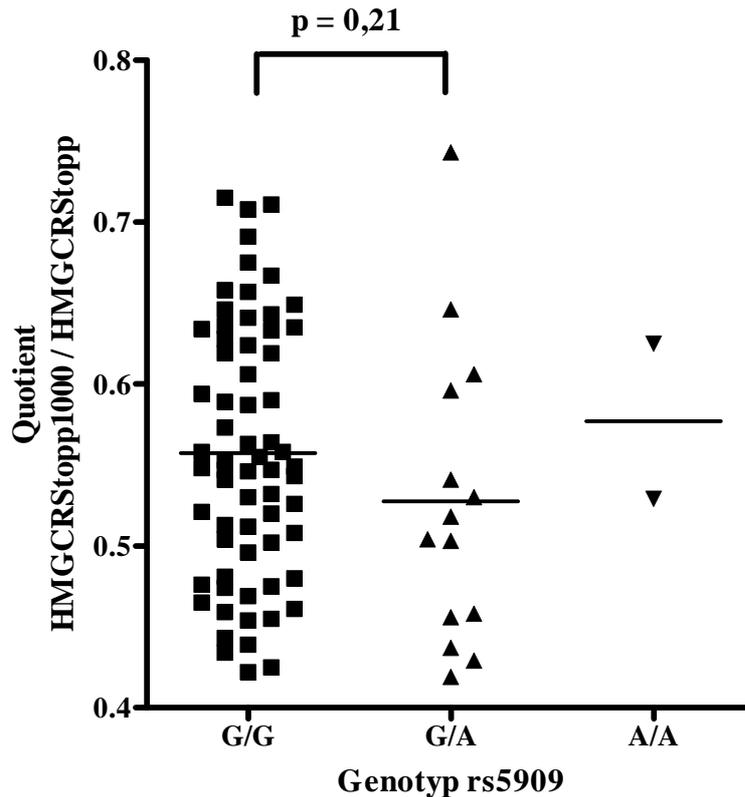


Abbildung 33: Überprüfung der untranslatierten cDNA-Transkriptlängen im 3'-Bereich des HMGCRR-Gens mittels Quotienten aus den Expressionsdaten der Sonden HMGCRRStopp und HMGCRRStopp1000 in Abhängigkeit vom Genotyp des SNP rs5909 für 83 humane PBMCs. 67 Proben mit homozygotem häufigerem Allel G/G, 14 Proben mit heterozygoter Allelverteilung G/A, 2 Proben mit homozygotem seltenerem Allel A/A;

### 3.6. Aktivitätsuntersuchungen der HMG-CoA-Reduktase

#### 3.6.1. Untersuchung in humanen Leberproben

Nachdem Zusammenhänge zwischen SNPs und verschiedenen Expressionsmustern des HMGCRR-Gens nachgewiesen werden konnten, wurde in einem weiteren Schritt überprüft, ob Unterschiede in der genetischen Expression zu relevanten funktionellen Unterschieden auf der Proteinebene führen. In der vorliegenden Arbeit wurden daher mögliche Assoziationen zwischen den SNPs rs5909 und rs3844462 mit der Enzymaktivität der HMG-CoA Reduktase in humanen Leberproben und PBMCs analysiert.

Insgesamt wurden 48 humane Leberproben für die Aktivitätsuntersuchung ausgewählt. Es stellte sich allerdings trotz mehrerer Testläufe heraus, dass der Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA zu  $^{14}\text{C}$ -Mevalonolaktone in vielen Proben nur sehr gering war. Eine mögliche Korrelation von geringer HMG-CoA Reduktase Aktivität infolge niedriger HMGCRR-Expression bestand hierbei nicht (Abbildung 34). Die Gründe für die geringe Aktivität sind unklar. Es ist jedoch

### 3 Ergebnisse

zu vermuten, dass die Gewinnung der Leberproben mit anschließender Kryokonservierung durch einen Kooperationspartner aufgrund eines für die hier vorgestellten Untersuchungen nicht angepassten Protokolls zu einer teilweise sehr starken Enzymdegradation führte. Murine Leberproben aus unserem Institut, welche während der Etablierung des Assays als Kontrollproben verwendet wurden, wiesen nach der Normalisierung auf Gesamtprotein Aktivitätswerte der HMG-CoA-Reduktase auf, die z.T. um den Faktor 30 höher waren als einige der humanen Leberproben.

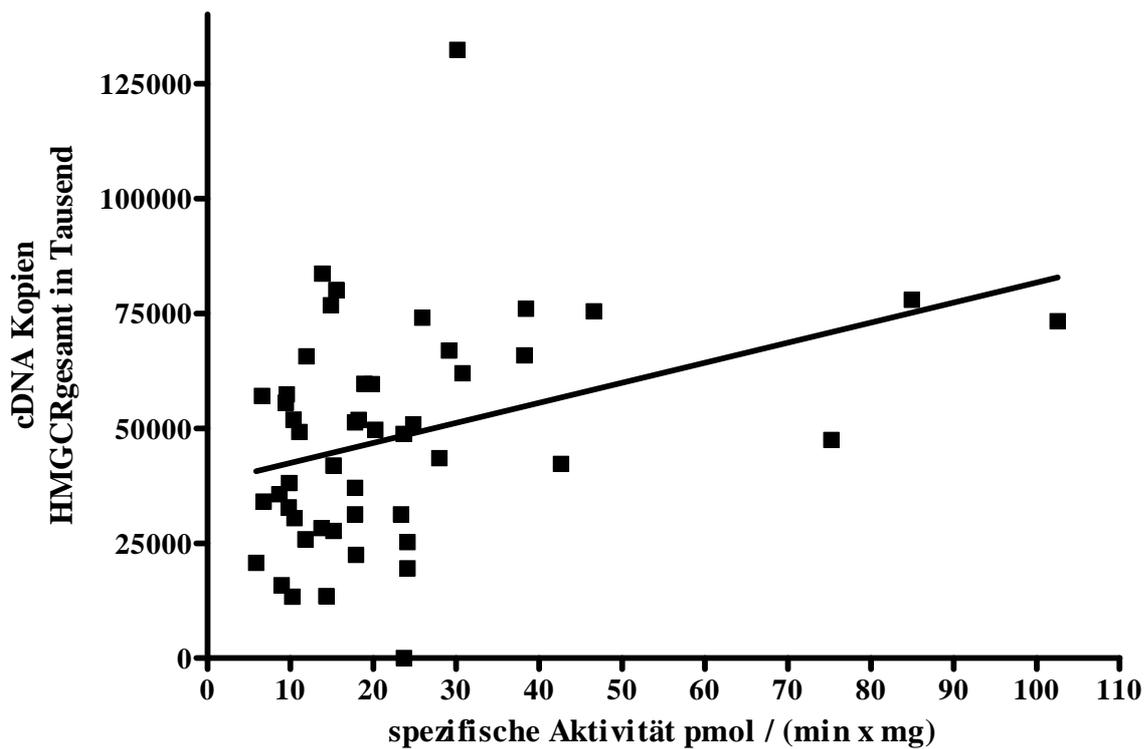


Abbildung 34: HMG-CoA-Reduktase Aktivität (x-Achse) im Verhältnis zur HMGCR-Expression (y-Achse) von 48 humanen Leberproben; y-Achse: auf  $\beta$ -Aktin normierte Expressionswerte des HMGCRgesamt qRT-PCR Assays. x-Achse: Darstellung der spezifischen Aktivität der HMG-CoA Reduktase nach Normalisierung auf 100 mg/dl Gesamtproteinkonzentration.

### 3.6.2. Untersuchung in humanen PBMCs der LE-Heart Kohorte

Für die weitere Untersuchung der HMG-CoA-Reduktase Aktivität wurden PBMC von 55 randomisiert ausgewählten Probanden der LE-Heart-Kohorte verwendet. Den größten Anteil dieser bildete die Gruppe von 39 nicht nüchternen Proben ohne Statinmedikation. Eine Genotypisierung der SNPs rs3846662 und rs5909 in diesen Probanden ergab eine Verteilung der Genotypen, die den großen Untersuchungskohorten entsprach (Tabelle 23).

**Tabelle 23:** Allelverteilung möglicher funktionell bedeutsamer SNPs in 39 humanen PBMCs

SNP und Allele	rs3846662 A/G	rs5909 G/A
häufigeres Allel homozygot	15	31
heterozygot	17	6
selteneres Allel homozygot	7	0
unbekannt	0	2

Aufgrund der geringen Stichprobenmenge heterozygoter Probanden des SNP rs5909 konnte keine Signifikanz erreicht werden. Es bestand ein Trend zu erhöhten Aktivitätswerten bei homozygoten Trägern des häufigeren Allels mit dem Genotyp G/G ( $p = 0,48$  bzw.  $p = 0,14$  bei Normalisierung auf pmol HMG-CoA Umsatz pro Minute und mg Gesamtprotein bzw. auf pmol HMG-CoA Umsatz pro 1.000.000 Zellen). Eine ANOVA-Analyse der gemessenen Aktivitäten bezogen auf den SNP rs3846662 zeigte einen Trend an erhöhten Aktivitätswerten in homozygoten Trägern des häufigeren Allels (A/A) im Vergleich zu Trägern von 1 oder 2 selteneren Allelen (Abbildung 35; Mittelwert der spez. Aktivität in  $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  Genotyp A/A: 101,4, Genotyp A/G: 59,19, Genotyp G/G: 74,49). Die Effektrichtung widersprach somit der Beobachtung, dass homozygote Träger des häufigeren Allels (A/A) erniedrigte Spiegel von Lanosterol im Serum aufwiesen. Die Expression der beiden HMGCR-Transkripte konnte nach Ausschluss von 3 Proben aufgrund unzureichender Expressionsdaten in 36 PBMCs geprüft werden und es bestätigte sich das Splicingverhalten der großen Kohorte in Assoziation zum SNP rs3846662 (vgl. 3.3.2; Abbildung 36).

### 3 Ergebnisse

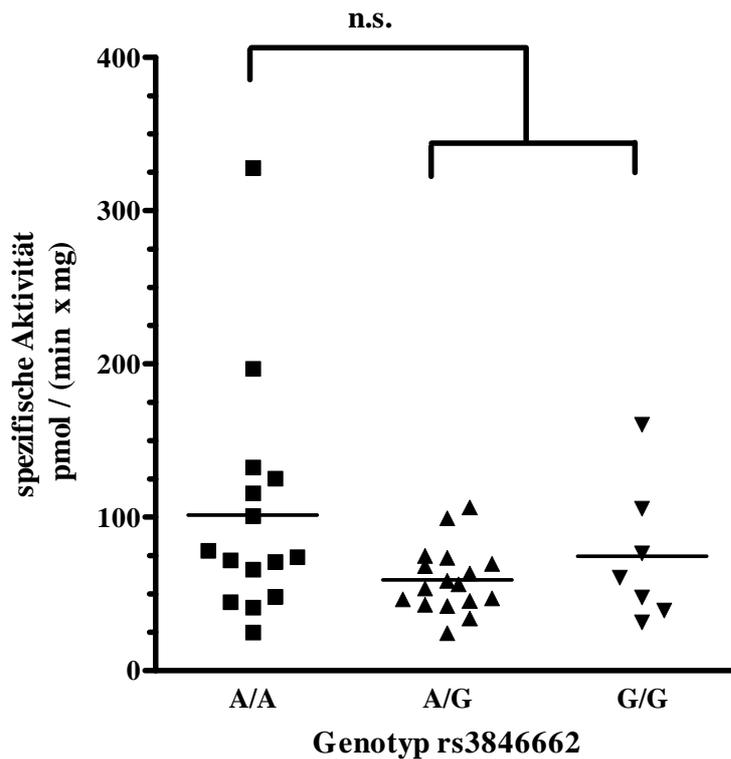


Abbildung 35: HMG-CoA-Reduktase Aktivität in Abhängigkeit vom Genpolymorphismus rs3846662 in 39 humanen PBMCs von nicht nüchternen Probanden ohne Statinmedikation; 15 Proben mit homozygotem häufigerem Allel A/A, 17 Proben mit heterozygoter Allelverteilung A/G, 7 Proben mit homozygotem seltenerem Allel G/G; Abgebildet ist die spezifische Enzymaktivität ( $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ) von 39 PBMCs nach Normalisierung auf 100 mg/dl.

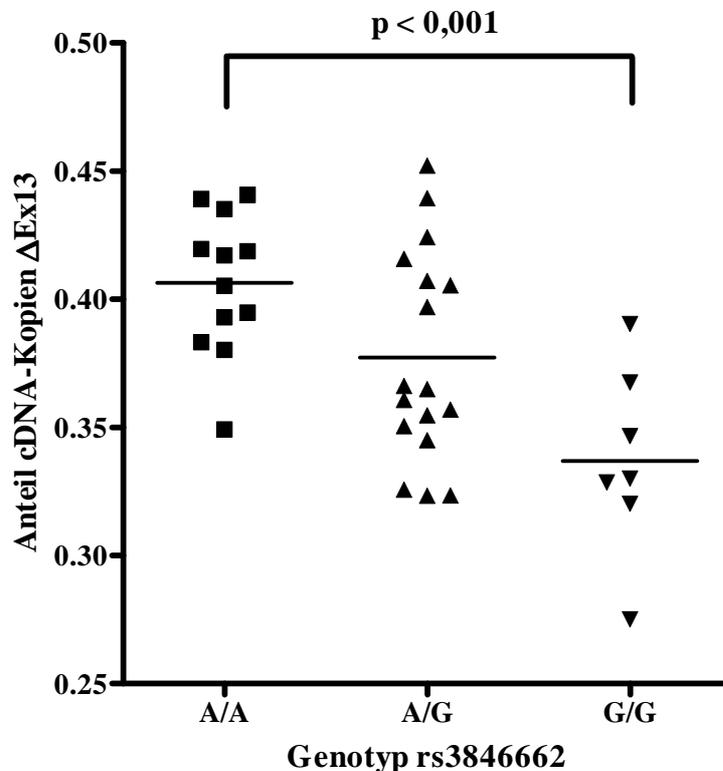


Abbildung 36: Splicingverhalten des HMGR-Genes in humanen PBMCs in Abhängigkeit vom Genotyp des SNPs rs3846662 (n = 36); 12 Proben mit homozygotem häufigerem Allel A/A, 17 Proben mit heterozygoter Allelverteilung A/G, 7 Proben mit homozygotem seltenerem Allel G/G; Erläuterung:  $\Delta\text{Ex13}$  - Transkript des HMGR-Genes ohne Exon 13.

### 4. Diskussion

Die hier vorgestellte Arbeit hatte zum Ziel, neue hereditäre Faktoren des Cholesterinstoffwechsels zu identifizieren. Neben dem bekannten Phänotyp Gesamtcholesterin (TC) wurde erstmalig die humane Cholesterinbiosynthese mittels des subtilen Intermediärphänotyps Lanosterol untersucht. Mit Hilfe einer GWA konnte das HMG-CoA-Reduktase-Gen als genetischer Faktor der Lanosterolkonzentration im humanen Serum identifiziert werden.

In einem dreistufigen Ansatz erfolgte nach einer initialen genomweiten Analyse von Genpolymorphismen die Validierung und Replikation in zwei weiteren Kohorten. Schließlich konnte der SNP rs7703051 im HMGCR-Locus in allen drei Kohorten sowie in einer zusätzlichen vierten Kohorte konsistent mit Serumlanosterol assoziiert werden ( $n = 6307$ ,  $p = 1,3 \times 10^{-15}$ , Effektgröße +8,0%). Außerdem konnte der SNP rs7703051 in der kumulativen Analyse mit dem Phänotyp Gesamtcholesterin assoziiert werden und bestätigt somit eine bereits bekannte Assoziation des HMGCR-Locus aus anderen Studien (Chasman et al. 2009; Kathiresan et al. 2009; Teslovich et al. 2010).

Der identifizierte SNP rs7703051 steht in hohem LD mit dem SNP rs3846662 im Intron 13 des HMGCR-Gens. Letzterer ist mit einer unterschiedlichen Ausprägung des alternativen *Splicings* des Exon 13 der HMGCR-mRNA *in vivo* assoziiert ( $p = 2,1 \times 10^{-7}$ ) ohne Auswirkungen auf die Gesamtexpression dieses Gens zu haben. Weiterhin konnte in der kumulativen Analyse aller verwendeten Kohorten erstmalig der seltenere SNP rs17562686 im HMGCR-Locus mit Serumlanosterol assoziiert werden ( $n = 6307$ ,  $p = 1,6 \times 10^{-7}$ , Effektgröße +9,1%). Die kombinierte Analyse beider SNPs zeigte, dass der SNP rs7703051 die wichtigere Assoziation darstellt, da beobachtete Assoziationen des SNP rs17562686 zum Teil durch LD zu rs7703051 erklärt werden konnten.

Bisherige GWAs untersuchten in humanem Serum hauptsächlich die Phänotypen TAG, TC, LDL-C, sdLDL-Cholesterin, VLDL-Cholesterin (VLDL-C) und HDL-C. Auf diesem Weg – insbesondere auch mit Einsatz von Meta-Analysen – konnten zahlreiche neue Erkenntnisse gewonnen werden. Dennoch erklären die bisher identifizierten Loci nur 10 - 25% der genetischen Variabilität (Manolio et al. 2009).

Wissenschaftliche Publikationen zur Cholesterinbiosynthese verwenden verschiedene Präkursoren, um die entsprechenden Stoffwechselwege und Assoziationen zu Krankheiten, Phänotypen und Medikamentenwirkung zu beschreiben. Am meisten verbreitet ist die

## 4 Diskussion

Bestimmung von Lanosterol, Lathosterol und Desmosterol als Surrogatmarker der Cholesterinbiosynthese. In der vorliegenden Arbeit wurde Lanosterol ausgewählt, da es stets als Metabolit im Syntheseweg durchlaufen werden muss, während Lathosterol als Zwischenprodukt des Kandutsch-Russell-Weges und Desmosterol innerhalb des Bloch-Weges synthetisiert wird (vgl. Abb. 1, Kap. 1.1.1.).

Über die Validität der einzelnen Marker herrscht allerdings noch Uneinigkeit. Mittlerweile gibt es viele Hinweise dafür, dass das von Bloch und Clayton aufgestellte Paradigma, welches besagt, dass jedes Molekül Lanosterol schließlich zu Cholesterin umgewandelt werden würde (Clayton & Bloch 1956), nicht zutrifft. Vielmehr werden aus verschiedenen Zwischenmetaboliten – wie auch dem Lanosterol – vor allem durch CYP27A1-Enzyme Oxysterole gebildet, die unterschiedlichste aktuell noch unzureichend verstandene Funktionen im Stoffwechsel haben (Fakheri & Javitt 2011). Aktuell ist weder geklärt, wie hoch der Anteil der Oxysterolbildung im Rahmen der Cholesterinsynthese ist, noch ist bekannt, welche Zwischenmetabolite der Cholesterinbiosynthese in höherem oder niedrigerem Maße oxidiert werden. Somit sind viele Prozesse in diesem Gebiet noch unzureichend verstanden und es kann daher prinzipiell bei keinem Präkursor von einer zweifelsfreien Korrelation zur *de novo* Cholesterinbiosynthese gesprochen werden. Anhand von massenspektrometrischen Messungen von Serumkonzentrationen des 24S,25-Epoxycholesterol und 27-Hydroxycholesterol scheint der Anteil der Oxysterolbildung eher gering zu sein (Honda et al. 2009). Lathosterol wird von vielen Autoren aufgrund seiner einfachen Quantifizierbarkeit u.a. mittels Gasflüssigkeitschromatographie favorisiert und zeigte valide Korrelationen zwischen dessen Serumkonzentration, der Serumkonzentration TC und der HMG-CoA-Reduktase Aktivität auf (Bjorkhem et al. 1987; Kempen et al. 1988; Miettinen, Tilvis & Kesaniemi 1990). Es konnte nachgewiesen werden, dass Lanosterol in simultanen Messungen gute Korrelationen (Pearson-Koeffizient: 0,78 - 0,87) zu Lathosterol aufzeigt (Clarenbach et al. 2005). Die Nutzung von Desmosterol als Marker muss jedoch noch kritisch bewertet werden. Frühere Messungen mittels Gasflüssigkeitschromatographie weisen für Desmosterol eine deutlich schlechtere Korrelation zur HMG-CoA-Reduktase Aktivität auf als für Lathosterol und Lanosterol (Bjorkhem et al 1987). Moderne Nachweisverfahren unter Verwendung der Massenspektrometrie scheinen dies aber nicht zu bestätigen und stellen Desmosterol als validen gleichwertigen Marker dar (Acimovic et al. 2009). In der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten LE-Heart Studie wurden simultan Desmosterol und Lanosterol bestimmt. Beide Metabolite zeigten eine Assoziation zum SNP rs3846662 in humanem Serum von  $p < 0,01$ , wobei Lanosterol einen um drei log-Stufen höheren Signifikanzwert aufwies. Mögliche

## 4 Diskussion

Gründe für diesen beobachteten Unterschied sind komplex. Da Lanosterol im Gegensatz zu Desmosterol stets im Syntheseweg des Cholesterins durchlaufen wird (vgl. 1.1.1.), könnte die Sensitivität in Bezug auf die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase größer sein. Außerdem ist von Lanosterol im Gegensatz zu Desmosterol bekannt, dass es direkt in die Enzymregulation der HMG-CoA-Reduktase eingreift (Song, Javitt & Bose-Boyd 2005). Daher könnten Genpolymorphismen im HMGCR-Locus zu stärkeren Unterschieden der Lanosterol- als der Desmosterolkonzentration führen. Da in der LE-Heart Kohorte beide Metabolite ausschließlich mit Bezug zum HMGCR-Locus untersucht wurden, bleibt abzuwarten, wie sich Lanosterol und Desmosterol in Untersuchungen mit anderen Ansatzpunkten verhalten. Die simultane Messung von Lanosterol und Desmosterol bei anderen Fragestellungen zur Cholesterinhomöostase stellte beide Metabolite als gleichwertig dar (Wolff et al. 2011).

Ein wesentliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit war die Identifikation von SNPs im HMG-CoA-Reduktase Gen als genetische Faktoren für das Vorliegen unterschiedlicher Lanosterolspiegel im humanen Serum.

Bereits Goldstein & Brown (1973) zeigten die Bedeutung der HMG-CoA-Reduktase im Rahmen des Cholesterinstoffwechsels auf, deren Bedeutung seit Einführung der Arzneimittelklasse der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) weiter zugenommen hat. Da es aber keine Mutationen innerhalb des HMGCR-Gens gibt, die zu einem monogenetischen Krankheitsbild führen, konnten genetische Risikofaktoren der Dyslipidämie innerhalb des HMGCR-Locus erst spät verifiziert werden.

Erste Hinweise auf eine Assoziation eines Genpolymorphismus innerhalb des HMGCR-Gens mit Veränderungen im Lipidprofil gab es bei der Untersuchung von 330 chinesischen Probanden (Tong et al. 2004) Hier konnte in einem hypothesenbasierten Ansatz ein seit langem bekannter Polymorphismus (rs3843482) im zweiten Intron (Leitersdorf, Hwang & Luskey 1990) mit unterschiedlichen Plasmaspiegeln an VLDL-C und TAG in Verbindung gebracht werden. Im gleichen Jahr wurde der HMGCR-Locus in einer familienbasierten Linkage-Analyse mit Variationen von TAG im Serum assoziiert (Bosse et al. 2004). Hypothesenfreie GWAs der letzten fünf Jahre konnten diese Ergebnisse zwar nicht bestätigen, lieferten jedoch stichhaltige Evidenz für den HMGCR-Locus bezüglich des TC- und LDL-C-Phänotyps. Es zeigt sich allerdings auch, dass dieser erst in großen Kohorten eine sichere Assoziation vorrangig mit TC und auch LDL-C zeigt und die absolute Effektgröße der Serumkonzentrationen je nach Publikation mit 1-2% pro Allel sehr gering ist. Erst Kathiresan et al. (2008) ermittelten in einer kumulativen Analyse für den SNP rs12654264 in 18.554

## 4 Diskussion

Probanden europäischer Abstammung eine starke Assoziation zu LDL-C ( $p = 1 \times 10^{-20}$ ), nachdem einzelne GWAs (DGI  $n = 2758$ , FUSION  $n = 1874$ , SARDINIA  $n = 4184$ ) aus dieser Meta-Analyse den HMGCR-Locus nicht abbildeten. Chasman et al. (2009) konnten diesen Befund in der *Women's Genome Health Study* (WGHS) mit 17.296 Probanden europäischer Abstammung bestätigen ( $p = 1,6 \times 10^{-12}$  für den SNP rs3846662,  $p = 8,8 \times 10^{-9}$  für den SNP rs5744680). Eine weitere GWA in einer mikronesischen Bevölkerungsgruppe ( $n = 2346$ ,  $p = 1,75 \times 10^{-5}$  für den SNP rs7703051) zeigte, dass Assoziationen von HMGCR-Polymorphismen zu LDL-C nicht auf Personen mit europäischer Abstammung beschränkt sind (Burkhardt et al. 2008).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte in der kumulativen Analyse innerhalb des HMGCR-Locus neben dem SNP rs7703051 auch der SNP rs17562686 mit dem Phänotyp Serumlanosterol assoziiert werden. Somit stellen diese beiden SNPs die bisher einzigen bekannten genetischen Assoziationen zu einem humanen Phänotyp der Cholesterinbiosynthese bzw. -homöostase dar.

Allerdings konnte nur der SNP rs7703051 zuverlässig in allen drei Stufen der GWA repliziert werden und zeigte in allen 4 Kohorten einen kumulativen p-Wert von  $p = 1,3 \times 10^{-15}$  zu Serumlanosterol mit einer Effektgröße von 8,0% je Allel. Dieser SNP befindet sich in sehr starkem LD mit den oben erwähnten SNPs rs3843482, rs12654264, rs3846662, rs5744680 und bestätigt somit den HMGCR-Locus der bisher publizierten GWAs in einem neuen Phänotyp. Daher kann behauptet werden, dass bekannte Cholesterineffekte des HMGCR-Locus anhand des Präkursors Lanosterol auf Varianzen der Cholesterinbiosynthese zurückgeführt werden können. Zusätzliche Evidenz für diesen Sachverhalt ergab die Untersuchung der SNPs rs7703051 und rs3846662 in der LE-Heart Kohorte, welche sowohl eine Assoziation mit Serumlanosterol als auch mit LDL-C bei gleichgerichtetem Effekt zeigte. Diese Effektrichtung stimmte weiterhin mit den Angaben bisheriger Publikationen überein. In der genomweiten Untersuchung konnte keine Assoziation mit TC beobachtet werden. In der kumulativen Analyse aller 4 Kohorten wurde allerdings eine nominelle Signifikanz von  $p = 4,7 \times 10^{-5}$  für den Phänotyp TC erreicht. Die Effektrichtung und die Effektgröße (+1,5%) der Assoziation entspricht damit bereits publizierten Ergebnissen (Teslovich et al. 2010).

Im Kontext zeigen die hier vorgestellten Daten, dass bei genetischen Assoziationsuntersuchungen des HMGCR-Locus der Phänotyp Serumlanosterol eine höhere Sensitivität aufweist, da bereits eine wesentlich kleinere Untersuchungskohorte zu einer

## 4 Diskussion

validen Assoziation führte bzw. der Phänotyp Serumlanosterol in der kumulativen Analyse ein um ca. 10 log-Stufen höheres Signifikanzniveau aufweist als der Phänotyp TC.

Bezüglich des SNP rs17562686 war aufgrund einer wesentlich geringeren Frequenz des selteneren Allels (10% zu 39%) zunächst davon auszugehen, dass die beobachteten Assoziationen unabhängig von rs7703051 sind. Das Signifikanzniveau des SNPs rs17562686 war aufgrund der niedrigen Frequenz des selteneren Allels bedeutend niedriger ( $10^{-7}$  zu  $10^{-15}$ ) bei vergleichbarer Effektgröße (+8,1% zu +8,0%). Eine Haplotyp-Untersuchung beider SNPs wies nur ein geringes LD zueinander auf (CARLA mit  $n = 1760$ :  $r^2 = 0,18$ ) und ließ eine additive Wirkung für Serumlanosterol vermuten. Eine kombinierte Analyse beider SNPs in allen sechs untersuchten Assoziationsmodellen konnte schließlich nachweisen, dass beobachtete Assoziationen des SNP rs17562686 zum Teil durch das schwache LD zu rs7703051 erklärt werden. Diese Analyse bewies anhand der erklärten Varianz (*explained variance*) zum einen, dass der SNP rs7703051 die bedeutendste Assoziation innerhalb des HMGCR-Locus darstellt (*explained variance* = 1,04%). Zum anderen wurde in dieser Analyse gezeigt, dass der SNP rs17562686 einen eigenständigen Effekt auf Serumlanosterol im Menschen hat. Allerdings beträgt dieser je nach Assoziationsmodell nur ca. 10 - 15 % der erklärten Varianz von rs7703051.

Zusammenfassend kann daher erstmals in der vorliegenden Arbeit behauptet werden, dass der SNP rs17562686 eine eigenständige Assoziation zu Variationen in der humanen Cholesterinbiosynthese darstellt.

Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen wird aufgrund dieser Assoziation einmal mehr deutlich, wie komplex die Entschlüsselung der Bedeutung signifikanter SNPs in GWAs ist und die Aufklärung von *Linkage* Strukturen innerhalb signifikanter Genloci eine entscheidende Rolle spielt (vgl. auch 1.4.3.). Da keine andere bisher publizierte GWA eine Assoziation zum SNP rs17562686 oder einem in LD stehenden SNP zeigte, spricht dieses Ergebnis ebenso für die bedeutend höhere Sensitivität des Phänotyps Serumlanosterol im Rahmen der Untersuchungen des HMGCR-Locus.

Es konnte lediglich ein erhöhtes Risiko für die Alzheimer-Erkrankung (*odds ratio* = 1,84) für das seltenere Allel des promotornahen SNP rs3761740, der mit dem SNPs rs17562686 in sehr starkem LD steht, gezeigt werden. Einerseits wurden keine funktionellen Veränderungen der Genexpression nachgewiesen (Porcellini et al. 2007), andererseits konnte in einer anderen Arbeit dargestellt werden, dass es bei Patienten mit der Alzheimer-Erkrankung zu Veränderungen des Cholesterin-Stoffwechsels kommt. Alzheimer-Patienten weisen im Blutplasma sowie im cerebrospinalen Liquor signifikant niedrigere Konzentrationen der

## 4 Diskussion

Präkursoren Lanosterol und Lathosterol auf (Kölsch et al. 2010). Die hier dargestellten Ergebnisse widersprechen der Hypothese dieser beiden Arbeiten, da in der hier vorgestellten GWA das seltenere Allel in der kumulativen Analyse mit höheren Lanosterolspiegeln im Serum assoziiert war. Des Weiteren ist es aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse möglich, dass das beobachtete erhöhte Alzheimerisiko für den SNP rs3761740 vielmehr auf den SNP rs7703051 zurückgeführt werden kann. Daher sind weitere Untersuchungen von SNPs im HMGCR-Gen notwendig, um die Bedeutung möglicher genetischer Einflussfaktoren auf die Alzheimer-Erkrankung zu prüfen.

Neben oben beschriebenen Untersuchungen zur Alzheimer-Erkrankung wurde die Cholesterinhomöostase unabhängig von genetischen Faktoren in verschiedenen anderen Aspekten geprüft. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die sonographisch bestimmte Dicke der Intima und Media der Karotiden in Probanden ohne bekannte Atherosklerose – deren Bedeutung als valider Prädiktor für die Entwicklung einer Atherosklerose allerdings umstritten ist (Lorenz et al. 2010) – nicht nur positiv mit Serumspiegeln für TC sondern auch für Lathosterol korreliert (Weingartner et al. 2010). Im Rahmen der *Framingham Offspring Study Cycle-6* wurde nachgewiesen, dass Probanden mit hohem Risiko für die Entwicklung einer KHK eine gestörte Cholesterinhomöostase haben. In dieser Studie zeigte sich, dass Hochrisikoprobanden im Vergleich zu den Kontrollen bei gleichen Serumspiegeln für TC, LDL-C und HDL-C einerseits erhöhte Werte für Surrogatmarker der Cholesterinabsorption andererseits erniedrigte Serumspiegel für Lathosterol aufwiesen (Matthan et al. 2009). Ähnliche Untersuchungen wurden auch bei Diabetikern durchgeführt und zeigten bei Typ 1-Diabetikern vergleichbare Resultate wie bei den KHK-Hochrisikoprobanden (Miettinen et al. 2004).

Anhand der aufgeführten Beispiele wird ersichtlich, dass weitere Untersuchungen von Phänotypen der Cholesterinhomöostase einen wichtigen Beitrag für das Verständnis verschiedener Krankheitsbilder liefern können. Somit stellt die hier vorliegende Arbeit einen wichtigen neuen Forschungsansatz dar, da bisher keine genetischen Assoziationsuntersuchungen der humanen Cholesterinhomöostase bekannt sind. Lediglich in Zwillingsuntersuchungen ist die Bedeutung von Markern der Cholesterinhomöostase geprüft worden. Dabei stellte man fest, dass das Maß der Cholesterin-Absorption invers mit der *de novo* Synthese von Cholesterin korreliert und sowohl Absorption als auch Neusynthese durch eine genetische Komponente beeinflusst werden (Gylling & Miettinen 2002).

## 4 Diskussion

Neben den bereits erwähnten Genpolymorphismen wurden durch andere Arbeitsgruppen weitere SNPs im HMGCR-Locus mit möglicher funktioneller Bedeutung identifiziert, die mit den oben beschriebenen SNPs nicht oder nur im geringen LD stehen. Im Rahmen von pharmakogenetischen Studien konnte man nachweisen, dass zwei SNPs (rs17244841 und rs17238540) mit niedriger Frequenz des selteneren Allels (< 5%) mit einer verminderten Statinantwort assoziiert sind (Chasman et al. 2004; Krauss et al. 2008). Die Datenlage, ob die LDL-C- oder Gesamtcholesterinreduktion geringer ausfällt, scheint hierbei nicht ganz eindeutig (Donnelly et al. 2008). Bezüglich statinunabhängiger LDL- oder Gesamtcholesterinspiegel haben diese beiden SNPs bisher keine Assoziationen gezeigt und konnten auch in der hier vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Neueste Analysen in großen Kohorten zeigen, dass das seltenere Allel beider SNPs fast ausschließlich in homozygoten Trägern des häufigeren Allels des SNP rs3846662 vorkommt und beobachtete Assoziationen somit vielmehr vom SNP rs3846662 abhängen könnten (Medina 2010).

Polymorphismen im HMGCR-Locus scheinen auch eine Rolle in der Tumörprävention zu spielen. Es ist seit einiger Zeit bekannt, dass in mehreren Tumorentitäten die *feedback*-Regulation der HMG-CoA-Reduktase gestört ist (Larsson 1996). Es wird daher diskutiert, dass die Gabe von Statinen eine präventive Rolle – im Sinne einer Risikoreduzierung an bestimmten Tumoren zu erkranken (Poynter et al. 2005) – spielen könnte. Vor kurzem konnte in einem Kandidatengen-basierten Ansatz gezeigt werden, dass der SNP rs12654264, welcher wie oben beschrieben mit dem SNP rs3846662 und rs7703051 in starkem LD steht, mit der Inzidenz von Kolorektalkarzinomen (KRK) assoziiert ist. In einer Fall-Kontrollstudie zur Langzeittherapie mit Statinen in 3643 Probanden konnte gezeigt werden, dass das häufigere Allel A unter Statineinnahme sowohl zu einem signifikant geringeren Auftreten von KRK führt, als auch mit einer verstärkten Reduktion von LDL-C unter Statingabe assoziiert ist. Eine Assoziation zwischen KRK und dem Genotyp für den SNP rs12654264 ohne Einnahme von Statinen konnte nicht gezeigt werden (Lipkin et al. 2010).

Die aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass Genpolymorphismen im HMGCR-Locus in unterschiedlichsten Bereichen eine Rolle zu spielen scheinen. In Anbetracht der bisher bekannten Publikationen zu Genpolymorphismen des HMGCR-Gens kann behauptet werden, dass der SNP rs7703051 und mit ihm in LD stehenden Genpolymorphismen die bedeutendsten Assoziationen zu verschiedenen untersuchten Phänotypen darstellen. Weitere nicht oder nur in schwachem LD stehende SNPs spielen als genetische Faktoren ebenso eine relevante Rolle.

## 4 Diskussion

Nachdem die oben beschriebenen genetischen Assoziationsuntersuchungen in dieser Arbeit abgeschlossen waren, erfolgten weiterführende funktionelle Analysen auf der Ebene der Genexpression des HMGCR-Gens sowie der Proteinfunktion der HMG-CoA-Reduktase.

Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass der SNP rs3846662, welcher mit dem SNP rs7703051 in starkem LD steht und sich im Intron 13 des HMGCR-Gens befindet, einen hoch signifikanten Einfluss auf das alternative *Splicing* des Exon 13 des HMGCR-Gens hat ( $p = 2,1 \times 10^{-7}$ ). Sowohl *in vivo* - Untersuchungen in humanen Leberproben als auch in humanen PBMCs zeigten eine starke Assoziation zwischen dem häufigeren Allel A und einer relativen sowie absoluten Zunahme Exon 13 - gesplicerter HMGCR-Transkripte. Diese Arbeit unterstützt somit die Befunde von *in vitro* - Experimenten, welche mittels einer Basenmutation in einem Minigen-Konstrukt nachwies, dass die Effizienz des alternativen *Splicings* des Exon 13 direkt vom Genotyp des SNP rs3846662 abhängt (Burkhardt et al. 2008). Vermutlich verändert der SNP die Bindungsstelle eines sogenannten *intronic splicing enhancers* oder *silencers* (Matlin, Clark & Smith 2005) und verschiebt somit das Gleichgewicht des alternativen *Splicings* des Exon 13 (Fu 2004). Eine Verifizierung der funktionellen Bedeutung des SNPs steht noch aus. Da alternatives *Splicing* der humanen prä-mRNA keine Besonderheit sondern vielmehr Normalität ist (Johnson et al. 2003), könnte dieser Mechanismus mit Hinblick auf die außerordentliche Häufung signifikanter intronisch gelegener SNPs (Hardy & Singleton 2009) in bisher veröffentlichten GWAs auch in anderen neu ermittelten Loci eine entscheidende Rolle spielen.

Das Protein HMG-CoA-Reduktase, welches durch das HMGCR-Gen exprimiert wird, umfasst 888 Aminosäuren. Das Exon 13 codiert die Aminosäuren 522 bis 574 und verschiebt im Falle eines *Splicings* nicht den Leserahmen für das HMGCR-Gen. Die Aminosäuren 1 bis 339 sind sehr hydrophob und vermitteln über Transmembrandomänen die Bindung des Proteins an das ER. Die Aminosäuren 340 bis 888 sind hingegen recht hydrophil und beinhalten ein ca. 80 Aminosäuren langes Verbindungsstück sowie den katalytisch wirksamen Teil (Liscum et al. 1985). Die katalytischen Teile bilden *in vivo* hierbei Tetramere aus, welche der Stabilisierung des Proteins dienen und den Abbau vermindern (Cheng et al. 1999). Kristallographische Untersuchungen des katalytisch wirksamen Teils in hochaufgereinigter Form konnten zeigen, dass dieser aus drei großen Domänen besteht. Einer dieser Domänen, die sogenannte L-Domäne (Aminosäuren 528 - 590), ist sehr spezifisch für das Enzym HMG-CoA-Reduktase und dessen Funktion. N-terminale Aminosäuren dieser Domäne bilden viele Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zwei Monomeren und eine stark konservierte Sequenz (ENVIGX3I/LP) wirkt als Schlüsselement für die Dimerisierung und nachfolgende

## 4 Diskussion

Oligomerisierung des Proteins. Des Weiteren wurde postuliert, dass die Aminosäure 559 als Protonen-*Donor* für das Zwischenprodukt Mevaldehyd fungiert (Istvan et al. 2000). Somit sind Aminosäuren des Exons 13 wichtig für die Funktionalität des Enzyms und ein *Splicing* des Exons 13 könnte das Ablaufen der enzymatischen Reaktion verringern oder sogar verhindern. Diese Hypothese wird zum einen durch GWAs gestützt, welche das häufigere Allel A des SNP rs3846662 oder eines anderen in LD stehenden SNPs mit erniedrigten LDL-C-Spiegeln (vgl. S. 101 f.) bzw. – wie in der vorliegenden Studie – mit erniedrigten Lanosterolspiegeln assoziieren. Zum anderen konnten auch funktionelle Untersuchungen Hinweise für diese Hypothese geben. Burkhardt et al. (2008) zeigten, dass die Transfektion des kompletten HMGCRCR-Transkriptes in UT-2 Zelllinien, welche konstitutiv keine enzymatisch aktive HMG-CoA-Reduktase exprimieren (Mosley et al. 1983), dazu führt, dass diese Zellen ohne Mevalonat-Supplementierung überleben. UT-2 Zelllinien mit einem transfizierten inkompletten HMGCRCR-Transkript ohne Exon 13 gehen jedoch ohne Mevalonat-Zugabe zugrunde. Genotypassoziierte Unterschiede der Enzymaktivität in lymphoblastoiden Zellen konnten nicht ermittelt werden. Im Rahmen von Untersuchungen ohne einen genetischen Ansatz wurde geprüft, ob eine Deregulation der HMG-CoA-Reduktase das Wachstum von Tumoren fördert. Hierfür wurden Genexpressionskonstrukte, welche das vollständige (cHMGCRCR-FL) oder das Exon 13 - gespligte katalytische Zentrum (cHMGCRCR-D13) ektopisch exprimieren, in unterschiedliche Zelllinien transfiziert. In verschiedenen funktionellen Versuchsreihen mit HepG2-Zellen, transformierten MCF7 *breast carcinoma* Zellen und nicht-transformierten MCF10A *breast carcinoma* Zellen konnte kein Unterschied zwischen der Transfektion des einen oder des zweiten Konstruktes festgestellt werden. Dagegen konnte in murinen Knochenmarkszellen und fetalen Leberzellen ein onkogenes Potential des cHMGCRCR-FL- aber nicht des cHMGCRCR-D13-Konstruktes ermittelt werden. Somit bleibt offen, ob es einen Unterschied in der Funktionalität zwischen beiden Protein-Isoformen gibt (Clendening et al. 2010).

Weiterhin wurde die Effizienz einer Statinmedikation mit SNPs im HMGCRCR-Gen assoziiert. Unter Statin-Gabe konnten Medina et al. (2008) sowie die bereits oben erwähnte Arbeitsgruppe um Lipkin et al. (2010) zeigen, dass das häufigere Allel A des SNP rs3846662 bzw. SNP rs 12654264 mit einer stärkeren Hochregulation der Expression des vollständigen als des Exon 13 - gespligten HMGCRCR-Transkriptes assoziiert ist. Die Bedeutung dieses Befundes ist unklar, zeigt aber, dass womöglich weitere noch unbekannte Faktoren einen Einfluss auf die Effizienz des alternativen *Splicings* haben. Im Rahmen der Studien der beiden Arbeitsgruppen wurde auch untersucht, ob die LDL-C-Reduktion durch Statine infolge des

## 4 Diskussion

alternativen *Splicings* verändert wird. In einer Kohorte von 170 immortalisierten Lymphozytenlinien konnte zunächst gezeigt werden, dass vermehrtes alternatives *Splicing* des HMGCR-Gens vor der Inkubation mit Statinen mit einer verstärkten Expression des LDL-Rezeptors assoziiert ist (Medina et al. 2008) und somit – im Falle einer fehlenden enzymatischen Aktivität des alternativ gespligten Proteins – den von Goldstein und Brown beschriebenen Regulationsmechanismus der intrazellulären Cholesterinhomöostase widerspiegelt (vgl. 1.1.3.). Die gleiche Arbeit zeigte ebenso, dass bei Inkubation mit Simvastatin vorrangig das vollständige Transkript in Lymphozyten mit homozygotem häufigerem Allel A/A hochreguliert wird, jedoch nicht das Exon 13 - gespligte. Medina et al. (2008) zeigten weiterhin, dass Patienten, deren Lymphozytenkulturen verstärkt Exon 13 - gespligte Transkripte exprimieren, schlechter auf Statine ansprechen und die LDL-C-Reduktion geringer ausfällt. Die gezeigten Untersuchungen dazu sind aber zum Teil widersprüchlich. Die Kohorte von 944 Probanden, welche Simvastatin über einen Zeitraum von vier bzw. sechs Wochen einnahmen, bestand zu 35% aus Personen afro-amerikanischer Herkunft. Die *in vitro* - Untersuchungen der HMGCR-Expression und Enzymaktivität fanden hingegen in einer Lymphozytenkohorte mit 65% afro-amerikanischem Anteil statt. Die Frequenz für das Allel A des SNP rs3846662 beträgt in Populationen mit europäischem Hintergrund ca. 55%, in denen mit afrikanischem Hintergrund ca. 10%. Schließlich ist das LD-Muster beider Populationen nicht vergleichbar, so dass der genetische Hintergrund der Statistik in dieser Arbeit fragwürdig erscheint. In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, dass ein *knockdown* vollständiger HMGCR-Transkripte mittels siRNA in Lymphozyten mit sukzessiver Anreicherung der Exon 13 - gespligten Transkripte zu einer geringeren Inhibition der Enzymaktivität infolge einer Simvastatin-Inkubation führt. Dies suggeriert die Hypothese, dass Proteine, welche aus Exon 13 - gespligten Transkripten translatiert werden, weniger gut auf Simvastatin ansprechen und somit der Grund für die beobachtete geringere Statineffizienz sind. Es erklärt jedoch nicht den Widerspruch der vorgestellten Arbeit, dass einerseits vermehrtes alternatives *Splicing* des HMGCR-Gens vor der Inkubation mit Statinen mit einer verstärkten Expression des LDL-Rezeptors assoziiert ist, hingegen eine relative Anreicherung Exon 13 - gespligter Transkripte im *in vitro* - Experiment aber nicht zu einer gleichwertigen Hochregulation von LDLR führt. Lipkin et al. (2010) zeigten in ihren Untersuchungen ebenso, dass bei einer Kultivierung von KRK-Zelllinien mit dem häufigerem Allel A unter Statinzugabe die Zunahme der Expression des vollständigen Transkriptes höher ist als die des Exon 13 - gespligten Transkriptes im Vergleich zu KRK-Zelllinien mit dem selteneren Allel

## 4 Diskussion

G. Diesen Effekt konnten sie mit verstärkter LDL-C-Reduktion assoziieren und somit die von Medina et al. (2008) aufgestellte Hypothese der unterschiedlichen Statinsensitivität stützen.

Auf Grundlage dieser beiden Arbeiten kann somit behauptet werden, dass die Exon 13 - gesplicte Form des Proteins keine oder nur eine geringe enzymatische Potenz besitzt. Es ist aber nicht geklärt, warum unter Statingabe ein anderer Effekt – im Sinne einer Statinresistenz mit erhöhter Aktivität – beobachtet werden kann. Allerdings ist festzustellen, dass die bisherigen *in vitro* - Untersuchungen den *in vivo* - Zustand nur unzureichend widerspiegeln. Zwar wiesen einige Untersuchungen der Arbeitsgruppe Burkhardt et al. 2008 starke Indizien für eine fehlende Aktivität des Exon 13 - gesplicten Proteins auf, doch wurde das experimentelle Design derart gestaltet, dass verwendete UT-2 Zellen nur Homotetramere des Enzyms ausbilden konnten. Aufgrund des hohen relativen Anteils Exon 13 - gesplicter Transkripte *in vivo* – wie in der hier vorgestellten Arbeit in zwei verschiedenen Geweben gezeigt wurde – kann man jedoch davon ausgehen, dass das Enzym *in vivo* in der Regel zu Heterotetrameren oligomerisiert. Somit gestaltet sich der gesamte Sachverhalt wesentlich komplexer und ist vielleicht auch der Grund für die auf den ersten Blick widersprüchlichen Befunde in den Experimenten unter Statingabe.

Die hier vorgestellte Arbeit prüfte, ob mit dem Genotyp assoziierte Unterschiede der Enzymaktivität *in vivo* bestehen. Weder in dieser Arbeit dargelegte *in vivo* Messungen der Enzymaktivität in Leberproben noch in PBMCs konnten allerdings signifikante Unterschiede darstellen. Die Ursachen dafür scheinen vielfältig. Einerseits war die beobachtete Differenz des alternativen *Splicing* zwischen den Genotypen A/A und G/G (im Mittel 2-3%) wesentlich geringer als bei *in vitro* - Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen. Andererseits beträgt die *Intraassay*-Variation ca. 7%, die intraindividuelle Variabilität ca. 6% für den verwendeten Aktivitätsassay (Harwood, Jr., Schneider & Stacpoole 1984). Mögliche Aktivitätsunterschiede hätten vermutlich auch bei genauer Einhaltung des experimentellen Protokolls nur in größeren Kohorten gemessen werden können, um die entsprechende statistische *Power* zu erhalten. Zwar sind Leberproben aufgrund ihrer Funktion im Lipidstoffwechsel zur Untersuchung der HMG-CoA-Reduktase gut geeignet, doch bedarf es aufgrund der Komplexität des Versuchsaufbaus einer entsprechenden Qualität der Präanalytik, um eine vergleichbare Viabilität aller Proben zu erhalten. Auf diese hatte die vorliegende Arbeit aufgrund der externen Entnahme allerdings keine Einflussmöglichkeit und daher war die Enzymaktivität nur sehr gering ausgeprägt. Für weitere enzymatische *in vivo* - Untersuchungen in anderen Zelltypen konnten in der vorliegenden Arbeit nur PBMCs gewonnen werden. Allerdings ist

## 4 Diskussion

die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in peripheren Leukozyten stark supprimiert (Fogelman et al. 1975) und die Detektion von Unterschieden somit bedeutend schwieriger. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die bisherigen Hypothesen des alternativen *Splicings* in Bezug auf die Funktion des *in vivo* - Enzyms zu prüfen. Eine Möglichkeit wäre, verschiedene Homo- und Heterotetramere des Enzyms in reiner Form anzureichern, um dann daran Untersuchungen durchzuführen. Auch könnte man Transfektionsversuche in HMGCR-defizienten Zelllinien mit beiden Transkripten durchführen, wobei man durch variable Überexpression eines von beiden Transkripten verschiedene Transkriptverhältnisse schafft. Ein anderer Weg wäre die Transfektion nur eines Transkriptes z.B. in HepG2-Zellen ähnlich der Methode von Clendening et al. (2010), um die Expression dieses Transkriptes hochzuregulieren. Da das Enzym sehr stark konserviert ist und zwischen verschiedenen Spezies nur wenige Aminosäuresubstitutionen bestehen (Luskey & Stevens 1985), könnten schließlich Aktivitätsbestimmungen des Enzyms in Leberproben z.B. im standardisierten Modell mit Nagern neue Erkenntnisse bringen. Die Aminosäuresequenz für das Exon 13 im Speziellen stimmt zum Beispiel zwischen Maus und Mensch überein. Zwar ist eine Translation eines Versuches auf andere Spezies speziell im Bereich der Genexpression nicht ohne weiteres möglich, doch gibt es Erkenntnisse, dass Mechanismen für die Regulation des alternativen *Splicing* speziesübergreifend hoch konserviert sind (Irimia et al. 2009) und somit eine enzymatische Analyse beider Splicevarianten der HMG-CoA Reduktase in Erwägung gezogen werden sollte.

Im Rahmen der funktionellen Untersuchungen der SNPs im HMGCR-Bereich konnten keine weiteren Veränderungen der Genexpression ermittelt werden. Eine Haploblock-Analyse zeigte, dass der SNP rs17562686 mit verschiedenen anderen SNPs über den gesamten HMGCR-Locus in äußerst starkem LD steht, doch eine schwach signifikante Assoziation des SNP rs5909 mit der Genexpression von HMGCR in 958 Probanden der LE-Heart-Kohorte konnte nicht funktionell begründet werden. Weder konnte ein Reportergenassay nachweisen, dass ein SNP im Bereich des Promotors einen Einfluss auf die Genexpression besitzt (Porcellini et al. 2007), noch lieferte die vorliegende Arbeit stichhaltige Hinweise, dass der SNP rs5909 und andere SNPs im Bereich des Stopp-Codons einen Einfluss auf die Stabilität des untranslatierten 3'-Bereiches haben. Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit eine Sequenzierung des promotornahen Bereiches des HMGCR-Gens durchgeführt. Dieser zeigte einen bis dato unbekanntem SNP auf, der aber weder in der CARLA- noch in der LE-Heart-Kohorte eine signifikante Assoziation zu den Phänotypen Serum Lanosterol, TC, LDL-C und

## 4 Diskussion

HDL-C erreichte. Auch hatte dieser SNP keinen signifikanten Einfluss auf die Expression des HMGCR-Gens in PBMCs der LE-Heart. Somit konnte nur für den Primär-SNP der kombinierten Analyse rs7703051 eine Assoziation mit der Genexpression des HMGCR-Gens ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden SNPs des HMGCR-Locus auf eine Assoziation zur Ausprägung einer Atherosklerose und KHK in der LE-Heart Kohorte untersucht. Es zeigte sich hierbei keine statistische Signifikanz bei einem der gemessenen Parameter (u.a. Intima-Media-Dicke der Aa. carotidae; Anzahl, Grad und Verteilung von Stenosen in den Herzkranzgefäßen). Mehrere Studien mit zum Teil wesentlich größeren Fallzahlen konnten jedoch nachweisen, dass SNPs innerhalb des HMGCR-Gens mit Endpunkten der Atherosklerose assoziiert sind. In einer Kohorte von 3819 Japanern konnte das seltenere Allel des SNPs rs3846662 sowohl mit erhöhtem LDL-C als auch mit einem erhöhten Myokardinfarkttrisiko (*odds ratio* 1,15, 95% KI 1.04 - 1.28;  $p = 0.0075$ ) assoziiert werden (Hiura et al. 2010). Eine europäische Kohorte mit 23.011 Probanden weist bei Probanden mit dem selteneren Allel des SNPs rs17238540 ein vermehrtes Auftreten von Schlaganfällen auf (*odds ratio*: 1,44, 95% KI: 1.05 - 1.97,  $p = 0.025$ ) jedoch keine erhöhte Inzidenz anderer Endpunkte der Atherosklerose (Freitas et al. 2010). Dagegen konnte eine andere Studie mit 26.864 Probanden nur einen Trend zwischen einem SNP, der in starkem LD mit rs3846662 steht, und der KHK aufzeigen bei deutlicher Signifikanz der oben beschriebenen Variationen des LDL-C (Waterworth et al. 2010). Die letztgenannte Kohorte bildet allerdings eine Meta-Analyse von insgesamt neun Einzelstudien ab, welche insbesondere in der Definition der KHK stark voneinander abweichen. Schließlich sind an dieser Stelle zwei aktuelle Meta-Analysen des C4D- und CARDIoGRAM-Konsortiums genannt. In der ersten konnten in mehr als 70.000 Probanden 16 Loci mit der KHK assoziiert werden (The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium 2011). Unter diesen sind der SORT1-, LDLR- und PCSK9-Locus auch mit Phänotypen der Dyslipidämie assoziiert, der HMGCR-Locus erreichte in diesem Zusammenhang nicht das geforderte Signifikanzniveau. Die zweite Meta-Analyse in mehr als 143.000 Probanden konnte 23 Loci mit der KHK assoziieren. Der AB0-, APOA1-, LPA-, SORT1-, LDLR-, PCSK9-Locus sind ebenso mit der Dyslipidämie assoziiert. Hingegen zeigte der HMGCR-Locus auch hier keine Signifikanz (Schunkert et al. 2011).

Wie bereits dargestellt, konnten mittlerweile genomweit 95 Loci mit Veränderungen des Lipid- bzw. Lipoproteinprofils im humanen Blut in Verbindung gebracht werden. Vor

## 4 Diskussion

Einführung von GWAs wurden bereits Polymorphismen in 11 Loci ermittelt, die mit seltenen monogenetischen Veränderungen des Lipidprofils assoziiert sind (vgl. 1.4.3.). Nach Prüfung aller SNPs im dreistufigen GWA-Modell der vorliegenden Arbeit konnte der bereits für TC und LDL-C bekannte HMGCR-Locus in Assoziation mit dem Phänotyp Serumlanosterol ermittelt werden. Eine Locusanalyse der 390.130 SNPs aus der ersten Stufe ergab weitere folgende Assoziationen ( $p < 0,001$ ) zu in LD stehenden SNPs bereits bekannter Loci, welche entweder in den folgenden Stufen nicht validiert bzw. repliziert werden konnten oder in der ersten Stufe das festgelegte Signifikanzniveau von  $p < 3,16 \times 10^{-5}$  ( $-\log p > 4,5$ ) nicht erreichten, um in der zweiten Stufe analysiert zu werden (vgl. 3.1.1.). Erstens konnte der SORT1-Locus in der vorliegenden Arbeit für TC repliziert werden (additives Modell:  $p = 1,1 \times 10^{-4}$ ), nachdem er bereits mehrfach mit LDL-C und TC assoziiert wurde (Kathiresan et al. 2008; Teslovich et al. 2010). Zweitens konnte der für TAG, aber auch für TC, LDL-C und HDL-C bekannte TRIB1-Locus (Kathiresan et al. 2008), mit TC (rezessives Modell:  $p = 7 \times 10^{-4}$ ) und Serumlanosterol (rezessives Modell:  $p = 5 \times 10^{-4}$ ) assoziiert werden. Drittens wies der seit langem bekannte APOE-Locus (Rall, Jr. et al. 1982) eine Replikation für TC (additives Modell:  $p = 1,3 \times 10^{-4}$ ) auf. Schließlich konnte der NAT2-Locus (Teslovich et al. 2010) für TC (additives Modell:  $p = 3 \times 10^{-4}$ ) bestätigt werden. Bis auf den zuletzt beschriebenen Locus ist die Funktion des im jeweiligen Locus liegenden Genes im Rahmen der Dyslipidämie mittlerweile bekannt (vgl. 1.3.2.2. und 1.4.3.). Weiterhin wiesen die Loci LACTB und LCAT in der ersten Stufe der GWA eine Assoziation mit Serumlanosterol (additives Modell:  $p = 8 \times 10^{-4}$  bzw.  $p = 9 \times 10^{-4}$ ) auf, verfehlten aber eine Replikation von publizierten Phänotypen.

Die Hauptursachen für den geringen Grad der Replizierung bekannter Loci sind sehr wahrscheinlich in der geringen Stichprobengröße  $n = 1495$  der genomweiten Untersuchung begründet, was zu einer niedrigen statistischen *Power* führt (Hirschhorn & Daly 2005). Mehrere frühe GWAs, wie z.B. eine GWA in der *Framingham Heart Study* mit 1087 Probanden (Kathiresan et al. 2007) oder die *Diabetes Genetics Initiative* (Saxena et al. 2007) mit bereits 2758 Probanden konnten ebenso keine neuen Risikofaktoren identifizieren und erst nachfolgende Studien, in denen mehr als 10.000 (Chasman et al. 2009) und schließlich mehr als 100.000 Probanden (Teslovich et al. 2010) mittels kombinierter Analysen bzw. Meta-Analysen ausgewertet wurden, führten zum rapiden Anstieg der Anzahl bekannter Loci.

Von den 41 für mindestens ein Assoziationsmodell selektiv besten SNPs aus der ersten Stufe konnten in der zweiten Stufe nur acht validiert werden. Zwar entsprach der statistische Erwartungswert für die Anzahl der falsch positiven SNPs ( $500,000 \times (-\log p = 4,5) = 15,8$ )

## 4 Diskussion

den beobachteten signifikanten SNPs je Assoziationsmodell in Stufe 1, trotzdem sei an dieser Stelle erwähnt, dass die Stufe 2 mit  $n = 1157$  Probanden nicht der Stichprobengröße (1,5- bis 2-fach der Stufe 1) entspricht, die aus statistischen Gründen propagiert wird (Khor & Goh 2010; van den Oord & Sullivan 2003). Aus verschiedenen Gründen war dies allerdings in der vorliegenden Studie nicht möglich, was dazu geführt haben könnte, dass auch richtig positive SNPs der ersten Stufe nicht die zweite Stufe passiert haben. Bestes Beispiel hierfür ist der SNP rs7703051, welcher als einziger in allen drei Stufen repliziert werden konnte und in der kombinierten Analyse im additiven wie im rezessiven Modell für Lanosterol hoch signifikant ist. Den Schwellenwert der zweiten Stufe passierte dieser SNP im additiven Modell nicht, im rezessiven Modell nur knapp. Möglicherweise hätte auch ein noch liberalerer Schwellenwert in der ersten Stufe zu weiteren Ergebnissen geführt. Kathiresan et al. (2008), welche den HMGCR-Locus für den Phänotyp LDL-C als erste validierten, führten eine Replikation des signifikantesten HMGCR-SNPs durch, nachdem dieser in der DGI-Studie ( $n = 2758$ ) einen  $p$ -Wert von  $4 \times 10^{-4}$  erreichte und somit in einer fast doppelt so großen Studie um eine Zehnerpotenz niedriger lag als der *cut-off* der hier vorgestellten GWA ( $p < 3,16 \times 10^{-5}$ ). Ebenso konnten viele Loci nicht repliziert werden, da aus der KORA-Kohorte neben Lanosterol nur der Phänotyp für TC, nicht aber für LDL-C, HDL-C und TAG vorlag. Von den 95 bekannten Loci sind 52 mit TC assoziiert und nur in 25 Loci ist TC das Hauptmerkmal. Da in der hier vorliegenden GWA aufgrund der geringen Fallzahl SNPs mit einer Frequenz des selteneren Allels  $< 1\%$  ausgeschlossen wurden, konnten auch keine neuen Loci gemäß der *common disease rare variant hypothesis* (Sandhu et al. 2008) identifiziert werden, welche einen deutlichen Teil der genetischen Variabilität erklären könnten und deren Bedeutung vermutlich in naher Zukunft durch das *1000 Genome Project* (Pennisi 2010) fassbar wird. Schließlich handelte es sich beim vorliegenden eingesetzten Chip um einen reinen SNP-Chip. Daher wurde der große Bereich der CNVs (vgl. 1.4.3.) bereits aufgrund des Studiendesigns ausgeschlossen und konnte nicht analysiert werden. Allerdings scheinen CNVs eher bei psychiatrischen Erkrankungen als bei der Dyslipidämie eine große Rolle zu spielen.

Einerseits ist in der Zusammenschau der hier vorgestellten Daten eine Assoziation von SNPs im HMGCR-Locus zu Phänotypen des Cholesterinstoffwechsels aber nicht zur Atherosklerose geklärt. Andererseits ist der HMGCR-Locus ein sehr gutes Beispiel, um den Nutzen von GWAs zu demonstrieren. Zwar sind die genetischen Effekte von Genpolymorphismen bzgl. der Effektgrößen für Serumlanosterol (ca. 7%) und Serumspiegel des LDL-C (1-4%) gering, doch steht mittlerweile die Bedeutung der Medikamentenklasse

## 4 Diskussion

der Statine in der Prävention und Therapie der KHK außer Frage. Obwohl es keine gesicherte Assoziation des HMGCR-Locus mit der Ausprägung einer KHK gibt, kann durch die Absenkung des LDL-C von 1 mmol/l mittels Statingabe die 5-Jahresinzidenz der Endpunkte einer KHK um 21% reduziert werden (Baigent et al. 2005). Somit stellen GWAs eine sehr wertvolle Methode zur Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen dar.

## 5. Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

### *Genetische Faktoren der humanen Cholesterinbiosynthese*

eingereicht von: Jan Baier

angefertigt am: Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie  
und Molekulare Diagnostik (ILM), Universität Leipzig

betreut von: Prof. Dr. med. Daniel Teupser  
Prof. Dr. med. Joachim Thiery

eingereicht im: November 2011

Hypothese: Genpolymorphismen beeinflussen sowohl den Gesamtcholesterinspiegel als auch die humane Cholesterinhomöostase und stellen daher Risikofaktoren für die Ausbildung einer Koronaren Herzkrankheit dar.

Zielstellung: Genomweite Assoziationsstudien (GWAs) haben bereits fast 100 Genloci mit Varianzen im humanen Serumlipidprofil identifiziert. Nichtsdestotrotz erklären diese nur einen geringen Teil der beobachteten Heritabilität. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit mittels einer mehrstufigen genomweiten Assoziationsstudie erstmals Genpolymorphismen identifiziert, welche eine Assoziation zum subtilen Intermediärphänotyp Serumlanosterol und/oder Serumcholesterin aufweisen. Darauf folgten Untersuchungen der Genexpression und Proteinfunktion, um die funktionelle Bedeutung eines signifikanten Genpolymorphismus aufzuklären.

## 5 Zusammenfassung

Methoden: Im Rahmen einer dreistufigen genomweiten Assoziationsstudie wurden zunächst in der Stufe 1 490.032 SNPs in 1495 Probanden der KORA-S3/F3-Kohorte mittels eines GeneChip Mapping 500K Array Set (Affymetrix) bezüglich der Phänotypen Serumlanosterol und Serumcholesterin untersucht. Signifikante SNPs wurden in der Stufe 2 in 1157 disjunkten Individuen der KORA-S3/F3-Kohorte und bei erfolgreicher Validierung in der Stufe 3 in 1760 Individuen der CARLA-Kohorte überprüft. Ein weiterführendes *fine mapping* von SNPs im HMGCR-Locus wurde in 1760 Probanden der CARLA-Kohorte durchgeführt. Die Validierung dieser SNPs erfolgte in 1895 Probanden der LE-Heart Studie. Die Bestimmung der Serumkonzentrationen verschiedener Sterole in diesen vier Kohorten erfolgte mittels LC-MS/MS. DNA-Sequenzierungen des Promotorbereichs des HMGCR-Gens wurden in sechs humanen Leberproben durchgeführt. Funktionelle Untersuchungen der Expression des HMGCR-Gens erfolgten mittels qRT-PCR-Assays der cDNA aus 51 humanen Leberproben und 958 PBMCs von Probanden der LE-Heart Studie. Enzymaktivitätsmessungen der HMG-CoA Reduktase mittels Anionenaustausch-Säulenchromatographie und Szintillationsmessung unter Verwendung von [3-<sup>14</sup>C]-HMG-CoA und [5-<sup>3</sup>H]-Mevalonolaktone erfolgten in Lysaten aus 48 humanen Leberproben und 55 PBMCs von Probanden der LE-Heart Studie.

Ergebnisse: In Stufe 1 der dreistufigen GWA erreichten von 490.032 SNPs 45 ein liberales Signifikanzniveau von  $p < 3,16 \times 10^{-5}$ . Mittels eines Taggingalgorithmus wurden aus diesen SNPs 41 Genpolymorphismen zur weiteren Validierung in Stufe 2 ausgewählt. Hier überschritten acht SNPs ein nominelles Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Schließlich konnte in Stufe 3 nur der SNP rs7703051 im HMGCR-Locus für Serumlanosterol repliziert werden, welcher in einer kumulativen Analyse aller drei Stufen einen Signifikanzwert von  $p = 1,4 \times 10^{-10}$  erreichte. Des Weiteren wies dieser SNP in der kumulativen Analyse eine nominelle Signifikanz von  $p = 0,04$  für Serumcholesterin auf. Eine darauffolgende kumulative Analyse weiterer untersuchter SNPs im HMGCR-Locus wies auch für den SNP rs17562686 eine signifikante Assoziation zu Serumlanosterol auf ( $p = 4,3 \times 10^{-6}$ ). Eine Haplotyp-Analyse in der CARLA-Kohorte ließ zunächst vermuten, dass die beobachteten Effekte unabhängig und additiv sind. Eine kombinierte Analyse zeigte jedoch, dass beobachtete Assoziationen des SNPs rs17562686 zum Teil durch LD zum SNP rs7703051 erklärt werden können und der SNP rs7703051 somit die wichtigste genetische Assoziation des HMGCR-Locus darstellt. Es konnte aber nachgewiesen werden, dass der SNP rs17562686 einen eigenständigen Effekt zu Serumlanosterol aufweist. Somit wird der SNP rs17562686 in der vorliegenden Arbeit erstmals mit einem Phänotyp des humanen Lipidprofils assoziiert. Ein *fine mapping* zur

## 5 Zusammenfassung

Bestimmung möglicher funktionell bedeutsamer SNPs wies den mit dem SNP rs7703051 in starkem LD stehenden SNP rs3846662 im Intron 13 des HMGCR-Gens nach, der in CARLA als auch in LE-Heart eine signifikante Assoziation zu Serumlanosterol zeigte. Auch konnte eine bereits bekannte Assoziation mit LDL-C bei gleichgerichteter Effektgröße in LE-Heart ermittelt werden. Funktionelle Genexpressionsuntersuchungen *in vivo* in 51 Leberproben als auch in peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) von 958 Probanden der LE-Heart Studie zeigten signifikante Assoziationen des SNPs rs3846662 zum prozentualen Ausmaß des alternativen Splicings des Exon 13 der HMGCR-mRNA auf ( $p < 0,01$  bzw.  $p = 2,1 \times 10^{-7}$ ) ohne Auswirkungen auf die Gesamtexpression des HMGCR-Gens zu haben. Weiterführende Untersuchungen der Enzymaktivität der HMG-CoA Reduktase in oben genannten humanen Zellen erbrachten keine signifikanten Ergebnisse. Auch konnten keine Assoziationen zwischen dem SNP rs3846662 und dem Ausmaß einer KHK in der LE-Heart Studie nachgewiesen werden. Das *fine mapping* in CARLA wies des Weiteren den SNP rs5909 nahe des Stopp-Codons als auch mehrere SNPs im Promotorbereich nach, die in sehr starkem LD mit dem SNP rs17562686 stehen. Weiterführende funktionelle Untersuchungen wie oben beschrieben als auch Untersuchungen der 3'-UTR-Transkriptlängen erbrachten keine signifikanten Ergebnisse. Eine DNA-Sequenzierung des Promotorbereichs ermittelte einen bis dato unbekanntem SNP. Aufgrund einer Allelfrequenz der Mutante von 2,2% erreichte dieser in CARLA und LE-Heart keine Signifikanz in einem der untersuchten Phänotypen oder in den funktionellen Studien.

Zusammenfassung: Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmalig den Intermediärphänotyp Serumlanosterol der Cholesterinhomöostase im Rahmen einer genomweiten Assoziationsstudie. Der SNP rs7703051 oder ein mit diesem in LD stehender SNP im HMGCR-Locus konnten mit den Phänotypen Serumlanosterol, Serumcholesterin und Serum LDL-C assoziiert werden. Bereits bekannte Assoziationen dieser Genpolymorphismen im HMGCR-Locus mit LDL-C und Gesamtcholesterin können daher auf Varianzen in der Cholesterinbiosynthese zurückgeführt werden. Der SNP rs17562686 konnte erstmals in einer GWA mit einem Phänotyp des humanen Serumlipidprofils assoziiert werden.

Nachfolgende funktionelle Untersuchungen zeigten eine hoch signifikante Assoziation des SNPs rs3846662 mit Veränderungen im alternativen Splicing des HMGCR-Gens auf. Dieser SNP steht in starkem LD mit rs7703051. Ein signifikanter Einfluss des alternativen Splicings auf die Enzymaktivität oder eine Assoziation dieser SNPs mit der Ausprägung einer KHK konnten nicht nachgewiesen werden.

### Abstract

Background: Genome-wide association studies (GWAs) have identified almost one hundred genetic loci associated with variances in human blood lipid phenotypes including very low-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, total cholesterol and triglycerides. Nevertheless the revealed loci only explain a small fraction of heritability and therefore a subtle phenotype of cholesterol homeostasis was examined in our study for the very first time.

Methods and Results: Using a multi-stage approach of a GWA, firstly, a genome-wide analysis (Affymetrix 500K GeneChip) for serum lanosterol and serum total cholesterol using LC-MS/MS was conducted in 1495 participants of the KORA-S3/F3 cohort with subsequent replication in two additional independent samples of the the KORA-S3/F3 cohort (n = 1157) and CARLA cohort (n = 1760). Two genetic variants, SNP rs7703051 and rs17562686, in the HMGCR locus were significantly associated with serum lanosterol and showed similar effects of elevated serum lanosterol for each minor allele (combined n = 4412: p =  $1,4 \times 10^{-10}$ , +7,1% and p =  $4,3 \times 10^{-6}$ , +7,8%). Furthermore, rs7703051 showed a nominal statistical significance to serum cholesterol (p = 0,04). A combined analysis of both SNPs demonstrated that observed associations of rs17562686 can be partly explained by LD with rs7703051 being the primary polymorphism in that study. Nevertheless, rs17562686 shows consistent independent effects on serum lanosterol, thus being associated to a lipid phenotype for the very first time. The following SNP-fine mapping of the HMGCR locus was carried out in the CARLA cohort with subsequent validation in the LE-Heart cohort (n = 1895). The recently published SNP rs3846662 being in tight LD with rs7703051 could be associated with variances of serum lanosterol in both cohorts and functional *in vivo* studies of gen expression using qRT-PCR assays demonstrated a highly significant association of higher expression of alternatively spliced HMGCR mRNA lacking exon 13 with homozygosity for the rs3846662 major allele in 51 human liver samples (p < 0,01) and 958 human PBMCs (p =  $2,1 \times 10^{-7}$ ). The overall HMGCR gen expression was not affected. Further investigation of *in vivo* HMG-CoA reductase enzyme activity in both human samples (n = 48 and n = 55) using anionic exchange column chromatography and scintillation counting of [3-<sup>14</sup>C]-HMG-CoA and [5-<sup>3</sup>H]-mevalonolacton did not show any significant results. In addition there was not any association in the LE-Heart cohort between these SNPs and the development of CAD. Finally, rs7703051 could be replicated for already published total cholesterol (combined n = 4412) and

## 5 Zusammenfassung

rs3846662 for LDL-cholesterol (LE-Heart n = 1895). Since fine mapping in CARLA showed several SNPs throughout the HMGCR locus being in LD with rs17562686 we performed a DNA sequencing of the extended 5'-HMGCR promotor region in six human liver samples. A unknown SNP was discovered in the promotor but could not be associated with any of the examined phenotypes mentioned above. The minor allele of SNP rs5909 situated next to the stop codon and being in high LD with rs17562686 was associated with elevated serum lanosterol and slightly reduced HMGCR gen expression, but further studies including the above mentioned as well as measurement of 3'-UTR transcript lengths using qRT-PCR assays did not produce significant results.

Conclusion: The phenotype serum lanosterol could be associated with genetic polymorphisms (e.g. rs7703051) in the HMGCR locus. Therefore already published associations of HMGCR with total cholesterol and LDL-cholesterol can be explained by variances of cholesterol homeostasis. The SNP rs17562686 could be associated with a phenotype of human blood lipids for the very first time.

Subsequent gen expression analyses demonstrated a highly significant association of rs3846662 with variant patterns of HMGCR alternative splicing. A significant effect of alternatively spliced protein on enzyme activity and a association of these SNPs with CAD could not be shown.

## 6. Literaturverzeichnis

Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J. P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derre, A., Vileger, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J. M., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, N. G. & Boileau, C. 2003, "Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia", *Nat.Genet.*, vol. 34, no. 2, pp. 154-156.

Acimovic, J., Lovgren-Sandblom, A., Monostory, K., Rozman, D., Golicnik, M., Lutjohann, D. & Bjorkhem, I. 2009, "Combined gas chromatographic/mass spectrometric analysis of cholesterol precursors and plant sterols in cultured cells", *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, vol. 877, no. 22, pp. 2081-2086.

Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H. & Krieger, M. 1996, "Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor", *Science*, vol. 271, no. 5248, pp. 518-520.

Afonina, I., Zivarts, M., Kutuyavin, I., Lukhtanov, E., Gamper, H. & Meyer, R. B. 1997, "Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder", *Nucleic Acids Res.*, vol. 25, no. 13, pp. 2657-2660.

Agranoff, B. W., Eggerer, H., Henning, U. & Lynen, F. 1960, "Biosynthesis of terpenes. VII. Isopentenyl pyrophosphate isomerase", *J.Biol.Chem.*, vol. 235, pp. 326-332.

Aiello, R. J., Brees, D., Bourassa, P. A., Royer, L., Lindsey, S., Coskran, T., Haghpassand, M. & Francone, O. L. 2002, "Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, vol. 22, no. 4, pp. 630-637.

Akita, H., Chiba, H., Tsuchihashi, K., Tsuji, M., Kumagai, M., Matsuno, K. & Kobayashi, K. 1994, "Cholesteryl ester transfer protein gene: two common mutations and their effect on plasma high-density lipoprotein cholesterol content", *J.Clin.Endocrinol.Metab*, vol. 79, no. 6, pp. 1615-1618.

Akita, H., Suzuki, H., Ito, K., Kinoshita, S., Sato, N., Takikawa, H. & Sugiyama, Y. 2001, "Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump", *Biochim.Biophys.Acta*, vol. 1511, no. 1, pp. 7-16.

Alberts, A. W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., bers-Schonberg, G., Hensens, O., Hirshfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J. & Springer, J. 1980, "Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 77, no. 7, pp. 3957-3961.

Albers, J. J., Lin, J. & Roberts, G. P. 1979, "Effect of human plasma apolipoproteins on the activity of purified lecithin: cholesterol acyltransferase", *Artery*, vol. 5, no. 1, pp. 61-75.

Alpy, F. & Tomasetto, C. 2005, "Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals", *J.Cell Sci.*, vol. 118, no. Pt 13, pp. 2791-2801.

## 6 Literaturverzeichnis

- Altmann, S. W., Davis, H. R., Jr., Zhu, L. J., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N. & Graziano, M. P. 2004, "Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption", *Science*, vol. 303, no. 5661, pp. 1201-1204.
- Amos, C. I. 2007, "Successful design and conduct of genome-wide association studies", *Hum.Mol.Genet.*, vol. 16 Spec No. 2, p. R220-R225.
- Anber, V., Griffin, B. A., McConnell, M., Packard, C. J. & Shepherd, J. 1996, "Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans", *Atherosclerosis*, vol. 124, no. 2, pp. 261-271.
- Anderson, R. G., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1977, "Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts", *Cell*, vol. 10, no. 3, pp. 351-364.
- Anderson, R. G., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 1976, "Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 73, no. 7, pp. 2434-2438.
- Ansell, B. J., Navab, M., Hama, S., Kamranpour, N., Fonarow, G., Hough, G., Rahmani, S., Mottahedeh, R., Dave, R., Reddy, S. T. & Fogelman, A. M. 2003, "Inflammatory/anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment", *Circulation*, vol. 108, no. 22, pp. 2751-2756.
- AntiSense 2010, "Aufbau eines Lipoproteins.jpg", [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/52/Aufbau\\_eines\\_Lipoproteins.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/52/Aufbau_eines_Lipoproteins.jpg).
- Antonny, B. & Schekman, R. 2001, "ER export: public transportation by the COPII coach", *Curr.Opin.Cell Biol.*, vol. 13, no. 4, pp. 438-443.
- Arai, T., Wang, N., Bezouevski, M., Welch, C. & Tall, A. R. 1999, "Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene", *J.Biol.Chem.*, vol. 274, no. 4, pp. 2366-2371.
- Asp, L., Magnusson, B., Rutberg, M., Li, L., Boren, J. & Olofsson, S. O. 2005, "Role of ADP ribosylation factor 1 in the assembly and secretion of ApoB-100-containing lipoproteins", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, vol. 25, no. 3, pp. 566-570.
- Assmann, G., Cullen, P. & Schulte, H. 2002, "Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study", *Circulation*, vol. 105, no. 3, pp. 310-315.
- Attie, A. D., Pittman, R. C. & Steinberg, D. 1982, "Hepatic catabolism of low density lipoprotein: mechanisms and metabolic consequences", *Hepatology*, vol. 2, no. 2, pp. 269-281.

- Austin, M. A., King, M. C., Bawol, R. D., Hulley, S. B. & Friedman, G. D. 1987, "Risk factors for coronary heart disease in adult female twins. Genetic heritability and shared environmental influences", *Am.J.Epidemiol.*, vol. 125, no. 2, pp. 308-318.
- Babaev, V. R., Gleaves, L. A., Carter, K. J., Suzuki, H., Kodama, T., Fazio, S. & Linton, M. F. 2000, "Reduced atherosclerotic lesions in mice deficient for total or macrophage-specific expression of scavenger receptor-A", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, vol. 20, no. 12, pp. 2593-2599.
- Baigent, C., Keech, A., Kearney, P. M., Blackwell, L., Buck, G., Pollicino, C., Kirby, A., Sourjina, T., Peto, R., Collins, R. & Simes, R. 2005, "Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins", *Lancet*, vol. 366, no. 9493, pp. 1267-1278.
- Balding, D. J. 2006, "A tutorial on statistical methods for population association studies", *Nat.Rev.Genet.*, vol. 7, no. 10, pp. 781-791.
- Barrett-Connor, E. & Khaw, K. 1984, "Family history of heart attack as an independent predictor of death due to cardiovascular disease", *Circulation*, vol. 69, no. 6, pp. 1065-1069.
- Batt, K. V., Avella, M., Moore, E. H., Jackson, B., Suckling, K. E. & Botham, K. M. 2004, "Differential effects of low-density lipoprotein and chylomicron remnants on lipid accumulation in human macrophages", *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*, vol. 229, no. 6, pp. 528-537.
- Baumann, N. A., Sullivan, D. P., Ohvo-Rekila, H., Simonot, C., Pottekat, A., Klaassen, Z., Beh, C. T. & Menon, A. K. 2005, "Transport of newly synthesized sterol to the sterol-enriched plasma membrane occurs via nonvesicular equilibration", *Biochemistry*, vol. 44, no. 15, pp. 5816-5826.
- Berg, K. 1981, "Twin research in coronary heart disease", *Prog.Clin.Biol.Res.*, vol. 69 Pt C, pp. 117-130.
- Berge, K. E., Tian, H., Graf, G. A., Yu, L., Grishin, N. V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R. & Hobbs, H. H. 2000, "Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters", *Science*, vol. 290, no. 5497, pp. 1771-1775.
- Berriot-Varoqueaux, N., Dannoura, A. H., Moreau, A., Verthier, N., Sassolas, A., Cadiot, G., Lachaux, A., Munck, A., Schmitz, J., Aggerbeck, L. P. & Samson-Bouma, M. E. 2001, "Apolipoprotein B48 glycosylation in abetalipoproteinemia and Anderson's disease", *Gastroenterology*, vol. 121, no. 5, pp. 1101-1108.
- Bjorkhem, I., Miettinen, T., Reihner, E., Ewerth, S., Angelin, B. & Einarsson, K. 1987, "Correlation between serum levels of some cholesterol precursors and activity of HMG-CoA reductase in human liver", *J.Lipid Res.*, vol. 28, no. 10, pp. 1137-1143.
- Blanco-Vaca, F., Via, D. P., Yang, C. Y., Massey, J. B. & Pownall, H. J. 1992, "Characterization of disulfide-linked heterodimers containing apolipoprotein D in human plasma lipoproteins", *J.Lipid Res.*, vol. 33, no. 12, pp. 1785-1796.

## 6 Literaturverzeichnis

- Bloch, K. & Rittenberg, D. 1942, "On the Utilization of Acetic Acid for Cholesterol Formation", *J.Biol.Chem.*, vol. 145, pp. 625-636.
- Boisvert, W. A. & Curtiss, L. K. 1999, "Elimination of macrophage-specific apolipoprotein E reduces diet-induced atherosclerosis in C57BL/6J male mice", *J.Lipid Res.*, vol. 40, no. 5, pp. 806-813.
- Bosse, Y., Chagnon, Y. C., Despres, J. P., Rice, T., Rao, D. C., Bouchard, C., Perusse, L. & Vohl, M. C. 2004, "Genome-wide linkage scan reveals multiple susceptibility loci influencing lipid and lipoprotein levels in the Quebec Family Study", *J.Lipid Res.*, vol. 45, no. 3, pp. 419-426.
- Bostrom, K., Boren, J., Wettsten, M., Sjoberg, A., Bondjers, G., Wiklund, O., Carlsson, P. & Olofsson, S. O. 1988, "Studies on the assembly of apo B-100-containing lipoproteins in HepG2 cells", *J.Biol.Chem.*, vol. 263, no. 9, pp. 4434-4442.
- Breckenridge, W. C., Little, J. A., Steiner, G., Chow, A. & Poapst, M. 1978, "Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II", *N.Engl.J.Med.*, vol. 298, no. 23, pp. 1265-1273.
- Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L. H., Roomp, K., van, D. M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J. A., Molhuizen, H. O., Loubser, O., Ouelette, B. F., Fichter, K., shbourne-Excoffon, K. J., Sensen, C. W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J. J., Genest, J., Jr. & Hayden, M. R. 1999, "Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency", *Nat.Genet.*, vol. 22, no. 4, pp. 336-345.
- Brown, M. S., Anderson, R. G. & Goldstein, J. L. 1983, "Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins", *Cell*, vol. 32, no. 3, pp. 663-667.
- Brown, M. S., Dana, S. E. & Goldstein, J. L. 1974, "Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia", *J.Biol.Chem.*, vol. 249, no. 3, pp. 789-796.
- Brown, M. S., Dana, S. E. & Goldstein, J. L. 1975, "Cholesterol ester formation in cultured human fibroblasts. Stimulation by oxygenated sterols", *J.Biol.Chem.*, vol. 250, no. 10, pp. 4025-4027.
- Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1974, "Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 71, no. 3, pp. 788-792.
- Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1986, "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis", *Science*, vol. 232, no. 4746, pp. 34-47.
- Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 2004, "Lowering plasma cholesterol by raising ldl receptors. 1981", *Atheroscler.Suppl*, vol. 5, no. 3, pp. 57-59.

## 6 Literaturverzeichnis

Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 2009, "Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL", *J.Lipid Res.*, vol. 50 Suppl, p. S15-S27.

Burkhardt, R., Kenny, E. E., Lowe, J. K., Birkeland, A., Josowitz, R., Noel, M., Salit, J., Maller, J. B., Pe'er, I., Daly, M. J., Altshuler, D., Stoffel, M., Friedman, J. M. & Breslow, J. L. 2008, "Common SNPs in HMGCR in micronesians and whites associated with LDL-cholesterol levels affect alternative splicing of exon13", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, vol. 28, no. 11, pp. 2078-2084.

Burkhardt, R., Toh, S. A., Lagor, W. R., Birkeland, A., Levin, M., Li, X., Robblee, M., Fedorov, V. D., Yamamoto, M., Satoh, T., Akira, S., Kathiresan, S., Breslow, J. L. & Rader, D. J. 2010, "Trib1 is a lipid- and myocardial infarction-associated gene that regulates hepatic lipogenesis and VLDL production in mice", *J.Clin.Invest*, vol. 120, no. 12, pp. 4410-4414.

Cannon, C. P., Braunwald, E., McCabe, C. H., Rader, D. J., Rouleau, J. L., Belder, R., Joyal, S. V., Hill, K. A., Pfeffer, M. A. & Skene, A. M. 2004, "Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes", *N.Engl.J.Med.*, vol. 350, no. 15, pp. 1495-1504.

Cariello, N. F., Keohavong, P., Sanderson, B. J. & Thilly, W. G. 1988, "DNA damage produced by ethidium bromide staining and exposure to ultraviolet light", *Nucleic Acids Res.*, vol. 16, no. 9, p. 4157.

Cartwright, I. J. & Higgins, J. A. 2001, "Direct evidence for a two-step assembly of ApoB48-containing lipoproteins in the lumen of the smooth endoplasmic reticulum of rabbit enterocytes", *J.Biol.Chem.*, vol. 276, no. 51, pp. 48048-48057.

Chambenoit, O., Hamon, Y., Marguet, D., Rigneault, H., Rosseneu, M. & Chimini, G. 2001, "Specific docking of apolipoprotein A-I at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter", *J.Biol.Chem.*, vol. 276, no. 13, pp. 9955-9960.

Chasman, D. I., Pare, G., Mora, S., Hopewell, J. C., Peloso, G., Clarke, R., Cupples, L. A., Hamsten, A., Kathiresan, S., Malarstig, A., Ordovas, J. M., Ripatti, S., Parker, A. N., Miletich, J. P. & Ridker, P. M. 2009, "Forty-three loci associated with plasma lipoprotein size, concentration, and cholesterol content in genome-wide analysis", *PLoS.Genet.*, vol. 5, no. 11, p. e1000730.

Chasman, D. I., Posada, D., Subrahmanyam, L., Cook, N. R., Stanton, V. P., Jr. & Ridker, P. M. 2004, "Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction", *JAMA*, vol. 291, no. 23, pp. 2821-2827.

Chen, S. H., Habib, G., Yang, C. Y., Gu, Z. W., Lee, B. R., Weng, S. A., Silberman, S. R., Cai, S. J., Deslypere, J. P., Rosseneu, M. & . 1987, "Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon", *Science*, vol. 238, no. 4825, pp. 363-366.

Cheng, H. H., Xu, L., Kumagai, H. & Simoni, R. D. 1999, "Oligomerization state influences the degradation rate of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase", *J.Biol.Chem.*, vol. 274, no. 24, pp. 17171-17178.

- Chiang, J. Y. 2004, "Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms", *J.Hepatol.*, vol. 40, no. 3, pp. 539-551.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. 1987, "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction", *Anal.Biochem.*, vol. 162, no. 1, pp. 156-159.
- Clarenbach, J. J., Lindenthal, B., Dotti, M. T., Federico, A., Kelleher, J. K. & von, B. K. 2005, "Isotopomer spectral analysis of intermediates of cholesterol synthesis in patients with cerebrotendinous xanthomatosis", *Metabolism*, vol. 54, no. 3, pp. 335-344.
- Clayton, R. B. & Bloch, K. 1956, "The biological conversion of lanosterol to cholesterol", *J.Biol.Chem.*, vol. 218, no. 1, pp. 319-325.
- Conroy, R. M., Pyorala, K., Fitzgerald, A. P., Sans, S., Menotti, A., De, B. G., De, B. D., Ducimetiere, P., Jousilahti, P., Keil, U., Njolstad, I., Oganov, R. G., Thomsen, T., Tunstall-Pedoe, H., Tverdal, A., Wedel, H., Whincup, P., Wilhelmsen, L. & Graham, I. M. 2003, "Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project", *Eur.Heart J.*, vol. 24, no. 11, pp. 987-1003.
- Craddock, A. L., Love, M. W., Daniel, R. W., Kirby, L. C., Walters, H. C., Wong, M. H. & Dawson, P. A. 1998, "Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter", *Am.J.Physiol*, vol. 274, no. 1 Pt 1, p. G157-G169.
- Cremer, P., Nagel, D., Mann, H., Labrot, B., Muller-Berninger, R., Elster, H. & Seidel, D. 1997, "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*, vol. 129, no. 2, pp. 221-230.
- Cresson, E. L., Folkers, K., Hoffmann, C. H., MacRae, G. D., Skeggs, H. R., Wolf, D. E. & Wright, L. D. 1956, "Discovery of a new acetate-replacing factor", *J.Bacteriol.*, vol. 72, no. 4, pp. 519-524.
- Cullen, P., Cignarella, A., Brennhansen, B., Mohr, S., Assmann, G. & von, E. A. 1998, "Phenotype-dependent differences in apolipoprotein E metabolism and in cholesterol homeostasis in human monocyte-derived macrophages", *J.Clin.Invest*, vol. 101, no. 8, pp. 1670-1677.
- Cushing, S. D., Berliner, J. A., Valente, A. J., Territo, M. C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C. J. & Fogelman, A. M. 1990, "Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 87, no. 13, pp. 5134-5138.
- Cybulsky, M. I. & Gimbrone, M. A., Jr. 1991, "Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis", *Science*, vol. 251, no. 4995, pp. 788-791.
- Dahlen, G., Ericson, C., de, F. U., Iselius, L. & Lundman, T. 1983, "Genetic and environmental determinants of cholesterol and HDL-cholesterol concentrations in blood", *Int.J.Epidemiol.*, vol. 12, no. 1, pp. 32-35.

- Davi, G., Romano, M., Mezzetti, A., Procopio, A., Iacobelli, S., Antidormi, T., Bucciarelli, T., Alessandrini, P., Cuccurullo, F. & Bittolo, B. G. 1998, "Increased levels of soluble P-selectin in hypercholesterolemic patients", *Circulation*, vol. 97, no. 10, pp. 953-957.
- Dawson, P. A., Hubbert, M., Haywood, J., Craddock, A. L., Zerangue, N., Christian, W. V. & Ballatori, N. 2005, "The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter", *J.Biol.Chem.*, vol. 280, no. 8, pp. 6960-6968.
- de Faire, U. 1974, "Ischaemic heart disease in death discordant twins. A study on 205 male and female pairs", *Acta Med.Scand.Suppl*, vol. 568, pp. 1-109.
- del Sal G., Manfioletti, G. & Schneider, C. 1988, "A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing", *Nucleic Acids Res.*, vol. 16, no. 20, p. 9878.
- de Villiers, W. J., Fraser, I. P., Hughes, D. A., Doyle, A. G. & Gordon, S. 1994, "Macrophage-colony-stimulating factor selectively enhances macrophage scavenger receptor expression and function", *J.Exp.Med.*, vol. 180, no. 2, pp. 705-709.
- de Waard, A., Phillips, AH. & Bloch, K. 1958, "Mechanism of formation of isopentenyl phosphate", *J.Am.Chem.Soc.*, vol. 81, pp. 2913-2914.
- Didenko, V. V. 2001, "DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications", *Biotechniques*, vol. 31, no. 5, pp. 1106-1.
- Dietschy, J. M. & Turley, S. D. 2002, "Control of cholesterol turnover in the mouse", *J.Biol.Chem.*, vol. 277, no. 6, pp. 3801-3804.
- Donnelly, L. A., Doney, A. S., Dannfald, J., Whitley, A. L., Lang, C. C., Morris, A. D., Donnan, P. T. & Palmer, C. N. 2008, "A paucimorphic variant in the HMG-CoA reductase gene is associated with lipid-lowering response to statin treatment in diabetes: a GoDARTS study", *Pharmacogenet.Genomics*, vol. 18, no. 12, pp. 1021-1026.
- Doring, A., Gieger, C., Mehta, D., Gohlke, H., Prokisch, H., Coassin, S., Fischer, G., Henke, K., Klopp, N., Kronenberg, F., Paulweber, B., Pfeufer, A., Roszkopf, D., Volzke, H., Illig, T., Meitinger, T., Wichmann, H. E. & Meisinger, C. 2008, "SLC2A9 influences uric acid concentrations with pronounced sex-specific effects", *Nat.Genet.*, vol. 40, no. 4, pp. 430-436.
- Duan, L. P., Wang, H. H. & Wang, D. Q. 2004, "Cholesterol absorption is mainly regulated by the jejunal and ileal ATP-binding cassette sterol efflux transporters Abcg5 and Abcg8 in mice", *J.Lipid Res.*, vol. 45, no. 7, pp. 1312-1323.
- Dudman, N. P., Hicks, C., Wang, J. & Wilcken, D. E. 1991, "Human arterial endothelial cell detachment in vitro: its promotion by homocysteine and cysteine", *Atherosclerosis*, vol. 91, no. 1-2, pp. 77-83.
- Duncan, E. A., Brown, M. S., Goldstein, J. L. & Sakai, J. 1997, "Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2", *J.Biol.Chem.*, vol. 272, no. 19, pp. 12778-12785.
- Durr, I. F. & Rudney, H. 1960, "The reduction of beta-hydroxy-beta-methyl-glutaryl coenzyme A to mevalonic acid", *J.Biol.Chem.*, vol. 235, pp. 2572-2578.

- Ehnholm, C., Mahley, R. W., Chappell, D. A., Weisgraber, K. H., Ludwig, E. & Witztum, J. L. 1984, "Role of apolipoprotein E in the lipolytic conversion of beta-very low density lipoproteins to low density lipoproteins in type III hyperlipoproteinemia", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 81, no. 17, pp. 5566-5570.
- Eisenberg, S. 1985, "Preferential enrichment of large-sized very low density lipoprotein populations with transferred cholesteryl esters", *J.Lipid Res.*, vol. 26, no. 4, pp. 487-494.
- El Housni, H., Heimann, P., Parma, J. & Vassart, G. 2003, "Single-nucleotide polymorphism genotyping by melting analysis of dual-labeled probes: examples using factor V Leiden and prothrombin 20210A mutations", *Clin.Chem.*, vol. 49, no. 10, pp. 1669-1672.
- Elston, R. C., Lin, D. & Zheng, G. 2007, "Multistage sampling for genetic studies", *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.*, vol. 8, pp. 327-342.
- Eschenmoser, A., Ruzicka, L., Jeger, O. & Arigoni, D. 1955, "Eine stereochemische Interpretation der biogenetischen Isoprenregel bei den Triterpenen", *Helv.Chim.Acta*, vol. 36, pp. 1611-1614.
- Espenshade, P. J., Li, W. P. & Yabe, D. 2002, "Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 99, no. 18, pp. 11694-11699.
- Expert Panel on Detection, E. a. T. o. H. B. C. i. A. 2001, "Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)", *JAMA*, vol. 285, no. 19, pp. 2486-2497.
- Fakheri, R. J. & Javitt, N. B. 2011, "Autoregulation of cholesterol synthesis: physiologic and pathophysiologic consequences", *Steroids*, vol. 76, no. 3, pp. 211-215.
- Fazio, S., Babaev, V. R., Murray, A. B., Hasty, A. H., Carter, K. J., Gleaves, L. A., Atkinson, J. B. & Linton, M. F. 1997, "Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 94, no. 9, pp. 4647-4652.
- Febbraio, M., Hajjar, D. P. & Silverstein, R. L. 2001, "CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism", *J.Clin.Invest*, vol. 108, no. 6, pp. 785-791.
- Febbraio, M., Podrez, E. A., Smith, J. D., Hajjar, D. P., Hazen, S. L., Hoff, H. F., Sharma, K. & Silverstein, R. L. 2000, "Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice", *J.Clin.Invest*, vol. 105, no. 8, pp. 1049-1056.
- Fielding, C. J., Shore, V. G. & Fielding, P. E. 1972, "A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase", *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, vol. 46, no. 4, pp. 1493-1498.
- Fitzgerald, M. L., Morris, A. L., Rhee, J. S., Andersson, L. P., Mendez, A. J. & Freeman, M. W. 2002, "Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can

disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I", *J.Biol.Chem.*, vol. 277, no. 36, pp. 33178-33187.

Fogelman, A. M., Edmond, J., Seager, J. & Popjak, G. 1975, "Abnormal induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in leukocytes from subjects with heterozygous familial hypercholesterolemia", *J.Biol.Chem.*, vol. 250, no. 6, pp. 2045-2055.

Fraser, R., Dobbs, B. R. & Rogers, G. W. 1995, "Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis", *Hepatology*, vol. 21, no. 3, pp. 863-874.

Frei, B., Stocker, R. & Ames, B. N. 1988, "Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 85, no. 24, pp. 9748-9752.

Freitas, R. N., Khaw, K. T., Wu, K., Bowman, R., Jeffery, H., Luben, R., Wareham, N. J. & Rodwell, S. 2010, "HMGCR gene polymorphism is associated with stroke risk in the EPIC-Norfolk study", *Eur.J.Cardiovasc.Prev.Rehabil.*, vol. 17, no. 1, pp. 89-93.

Friedlander, Y., Cohen, T., Stenhouse, N., Davies, A. M. & Stein, Y. 1982, "Familial aggregation of total cholesterol, triglyceride and high-density lipoprotein-cholesterol in an Israeli population sample", *Isr.J.Med.Sci.*, vol. 18, no. 11, pp. 1137-1143.

Fu, X. D. 2004, "Towards a splicing code", *Cell*, vol. 119, no. 6, pp. 736-738.

Fujioka, Y., Cooper, A. D. & Fong, L. G. 1998, "Multiple processes are involved in the uptake of chylomicron remnants by mouse peritoneal macrophages", *J.Lipid Res.*, vol. 39, no. 12, pp. 2339-2349.

Funke, H., von, E. A., Pritchard, P. H., Albers, J. J., Kastelein, J. J., Droste, C. & Assmann, G. 1991, "A molecular defect causing fish eye disease: an amino acid exchange in lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) leads to the selective loss of alpha-LCAT activity", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 88, no. 11, pp. 4855-4859.

Gaw, A., Packard, C. J., Lindsay, G. M., Griffin, B. A., Caslake, M. J., Lorimer, A. R. & Shepherd, J. 1995, "Overproduction of small very low density lipoproteins (Sf 20-60) in moderate hypercholesterolemia: relationships between apolipoprotein B kinetics and plasma lipoproteins", *J.Lipid Res.*, vol. 36, no. 1, pp. 158-171.

Geier, A., Wagner, M., Dietrich, C. G. & Trauner, M. 2007, "Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration", *Biochim.Biophys.Acta*, vol. 1773, no. 3, pp. 283-308.

Gelernter, J., Goldman, D. & Risch, N. 1993, "The A1 allele at the D2 dopamine receptor gene and alcoholism. A reappraisal", *JAMA*, vol. 269, no. 13, pp. 1673-1677.

Gelissen, I. C., Harris, M., Rye, K. A., Quinn, C., Brown, A. J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L. & Jessup, W. 2006, "ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, vol. 26, no. 3, pp. 534-540.

## 6 Literaturverzeichnis

Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L., Roth, J., Hofmann, A. F. & Meier, P. J. 1998, "The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver", *J.Biol.Chem.*, vol. 273, no. 16, pp. 10046-10050.

Gibbons, G. F., Islam, K. & Pease, R. J. 2000, "Mobilisation of triacylglycerol stores", *Biochim.Biophys.Acta*, vol. 1483, no. 1, pp. 37-57.

Gibbs, R. A. 2003, "The International HapMap Project", *Nature*, vol. 426, no. 6968, pp. 789-796.

Gibson, U. E., Heid, C. A. & Williams, P. M. 1996, "A novel method for real time quantitative RT-PCR", *Genome Res.*, vol. 6, no. 10, pp. 995-1001.

Gimbrone, M. A., Jr. 1995, "Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis", *Am.J.Cardiol.*, vol. 75, no. 6, pp. 67B-70B.

Ginsberg, H. N., Le, N. A., Short, M. P., Ramakrishnan, R. & Desnick, R. J. 1987, "Suppression of apolipoprotein B production during treatment of cholesteryl ester storage disease with lovastatin. Implications for regulation of apolipoprotein B synthesis", *J.Clin.Invest*, vol. 80, no. 6, pp. 1692-1697.

Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 1973, "Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 70, no. 10, pp. 2804-2808.

Goldstein, J. L., Brunschede, G. Y. & Brown, M. S. 1975, "Inhibition of proteolytic degradation of low density lipoprotein in human fibroblasts by chloroquine, concanavalin A, and Triton WR 1339", *J.Biol.Chem.*, vol. 250, no. 19, pp. 7854-7862.

Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K. & Brown, M. S. 1979, "Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 76, no. 1, pp. 333-337.

Gong, Y., Lee, J. N., Lee, P. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S. & Ye, J. 2006, "Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake", *Cell Metab*, vol. 3, no. 1, pp. 15-24.

Gordon, D. J., Probstfield, J. L., Garrison, R. J., Neaton, J. D., Castelli, W. P., Knoke, J. D., Jacobs, D. R., Jr., Bangdiwala, S. & Tyroler, H. A. 1989, "High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies", *Circulation*, vol. 79, no. 1, pp. 8-15.

Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B. & Dawber, T. R. 1977, "High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study", *Am.J.Med.*, vol. 62, no. 5, pp. 707-714.

Gould, A. L., Rossouw, J. E., Santanello, N. C., Heyse, J. F. & Furberg, C. D. 1998, "Cholesterol reduction yields clinical benefit: impact of statin trials", *Circulation*, vol. 97, no. 10, pp. 946-952.

Graf, G. A., Yu, L., Li, W. P., Gerard, R., Tuma, P. L., Cohen, J. C. & Hobbs, H. H. 2003, "ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion", *J.Biol.Chem.*, vol. 278, no. 48, pp. 48275-48282.

Graham, I., Atar, D., Borch-Johnsen, K., Boysen, G., Burell, G., Cifkova, R., Dallongeville, J., De, B. G., Ebrahim, S., Gjelsvik, B., Herrmann-Lingen, C., Hoes, A., Humphries, S., Knapton, M., Perk, J., Priori, S. G., Pyorala, K., Reiner, Z., Ruilope, L., Sans-Menendez, S., Op Reimer, W. S., Weissberg, P., Wood, D., Yarnell, J. & Zamorano, J. L. 2007, "European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary", *Atherosclerosis*, vol. 194, no. 1, pp. 1-45.

Greiser, K. H., Kluttig, A., Schumann, B., Kors, J. A., Swenne, C. A., Kuss, O., Werdan, K. & Haerting, J. 2005, "Cardiovascular disease, risk factors and heart rate variability in the elderly general population: design and objectives of the CARdiovascular disease, Living and Ageing in Halle (CARLA) Study", *BMC.Cardiovasc.Disord.*, vol. 5, p. 33.

Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Merz, C. N., Brewer, H. B., Jr., Clark, L. T., Hunninghake, D. B., Pasternak, R. C., Smith, S. C., Jr. & Stone, N. J. 2004, "Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines", *Circulation*, vol. 110, no. 2, pp. 227-239.

Guzik, T. J., West, N. E., Black, E., McDonald, D., Ratnatunga, C., Pillai, R. & Channon, K. M. 2000, "Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors", *Circ.Res.*, vol. 86, no. 9, p. E85-E90.

Gylling, H. & Miettinen, T. A. 2002, "Inheritance of cholesterol metabolism of probands with high or low cholesterol absorption", *J.Lipid Res.*, vol. 43, no. 9, pp. 1472-1476.

Hagenbuch, B. & Meier, P. J. 1994, "Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter", *J.Clin.Invest*, vol. 93, no. 3, pp. 1326-1331.

Hajjar, D. P., Pomerantz, K. B., Falcone, D. J., Weksler, B. B. & Grant, A. J. 1987, "Herpes simplex virus infection in human arterial cells. Implications in arteriosclerosis", *J.Clin.Invest*, vol. 80, no. 5, pp. 1317-1321.

Han, K. H., Han, K. O., Green, S. R. & Quehenberger, O. 1999, "Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia. Differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function", *J.Lipid Res.*, vol. 40, no. 6, pp. 1053-1063.

Harwood, H. J., Jr., Schneider, M. & Stacpoole, P. W. 1984, "Measurement of human leukocyte microsomal HMG-CoA reductase activity", *J.Lipid Res.*, vol. 25, no. 9, pp. 967-978.

Hauge, M., Harvald, b., Fischer, M., Gotlieb-Jensen, K., Juel-Nielsen, N., Raebild, I., Shapiro, R. & Videbech, T. 1968, "The Danish twin register", *Acta Genet.Med.Gemellol.* (Roma.), vol. 17, no. 2, pp. 315-332.

Havel, R. J. & Gordon, R. S. 1960, "Idiopathic hyperlipemia: metabolic studies in an affected family", *J.Clin.Invest*, vol. 39, pp. 1777-1790.

Hegele, R. A., Vezina, C., Moorjani, S., Lupien, P. J., Gagne, C., Brun, L. D., Little, J. A. & Connelly, P. W. 1991, "A hepatic lipase gene mutation associated with heritable lipolytic deficiency", *J.Clin.Endocrinol.Metab*, vol. 72, no. 3, pp. 730-732.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. 1996, "Real time quantitative PCR", *Genome Res.*, vol. 6, no. 10, pp. 986-994.

Heinemann, F. S. & Ozols, J. 1998, "Isolation and structural analysis of microsomal membrane proteins", *Front Biosci.*, vol. 3, p. d483-d493.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. 1993, "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions", *Biotechnology (N.Y.)*, vol. 11, no. 9, pp. 1026-1030.

Hirschhorn, J. N. & Daly, M. J. 2005, "Genome-wide association studies for common diseases and complex traits", *Nat.Rev.Genet.*, vol. 6, no. 2, pp. 95-108.

Hirschhorn, J. N., Lohmueller, K., Byrne, E. & Hirschhorn, K. 2002, "A comprehensive review of genetic association studies", *Genet.Med.*, vol. 4, no. 2, pp. 45-61.

Hiura, Y., Tabara, Y., Kokubo, Y., Okamura, T., Goto, Y., Nonogi, H., Miki, T., Tomoike, H. & Iwai, N. 2010, "Association of the functional variant in the 3-hydroxy-3-methylglutaryl - coenzyme a reductase gene with low-density lipoprotein-cholesterol in Japanese", *Circ.J.*, vol. 74, no. 3, pp. 518-522.

Hobbs, H. H., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1992, "Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia", *Hum.Mutat.*, vol. 1, no. 6, pp. 445-466.

Holdt, L. M., Beutner, F., Scholz, M., Gielen, S., Gabel, G., Bergert, H., Schuler, G., Thiery, J. & Teupser, D. 2010, "ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, vol. 30, no. 3, pp. 620-627.

Honda, A., Yamashita, K., Hara, T., Ikegami, T., Miyazaki, T., Shirai, M., Xu, G., Numazawa, M. & Matsuzaki, Y. 2009, "Highly sensitive quantification of key regulatory oxysterols in biological samples by LC-ESI-MS/MS", *J.Lipid Res.*, vol. 50, no. 2, pp. 350-357.

Horkko, S., Binder, C. J., Shaw, P. X., Chang, M. K., Silverman, G., Palinski, W. & Witztum, J. L. 2000, "Immunological responses to oxidized LDL", *Free Radic.Biol.Med.*, vol. 28, no. 12, pp. 1771-1779.

Horton, J. D., Shimomura, I., Brown, M. S., Hammer, R. E., Goldstein, J. L. & Shimano, H. 1998, "Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2", *J.Clin.Invest*, vol. 101, no. 11, pp. 2331-2339.

Houten, S. M., Watanabe, M. & Auwerx, J. 2006, "Endocrine functions of bile acids", *EMBO J.*, vol. 25, no. 7, pp. 1419-1425.

- Hunt, S. C., Hasstedt, S. J., Kuida, H., Stults, B. M., Hopkins, P. N. & Williams, R. R. 1989, "Genetic heritability and common environmental components of resting and stressed blood pressures, lipids, and body mass index in Utah pedigrees and twins", *Am.J.Epidemiol.*, vol. 129, no. 3, pp. 625-638.
- Hunter, D. J., Altshuler, D. & Rader, D. J. 2008, "From Darwin's finches to canaries in the coal mine--mining the genome for new biology", *N.Engl.J.Med.*, vol. 358, no. 26, pp. 2760-2763.
- Hussain, M. M., Maxfield, F. R., Mas-Oliva, J., Tabas, I., Ji, Z. S., Innerarity, T. L. & Mahley, R. W. 1991, "Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor", *J.Biol.Chem.*, vol. 266, no. 21, pp. 13936-13940.
- Infante, R. E., bi-Mosleh, L., Radhakrishnan, A., Dale, J. D., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 2008, "Purified NPC1 protein. I. Binding of cholesterol and oxysterols to a 1278-amino acid membrane protein", *J.Biol.Chem.*, vol. 283, no. 2, pp. 1052-1063.
- Irimia, M., Rukov, J. L., Roy, S. W., Vinther, J. & Garcia-Fernandez, J. 2009, "Quantitative regulation of alternative splicing in evolution and development", *Bioessays*, vol. 31, no. 1, pp. 40-50.
- Istvan, E. S., Palnitkar, M., Buchanan, S. K. & Deisenhofer, J. 2000, "Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis", *EMBO J.*, vol. 19, no. 5, pp. 819-830.
- Ji, Z. S., Brecht, W. J., Miranda, R. D., Hussain, M. M., Innerarity, T. L. & Mahley, R. W. 1993, "Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells", *J.Biol.Chem.*, vol. 268, no. 14, pp. 10160-10167.
- Jimenez-Sanchez, G., Childs, B. & Valle, D. 2001, "Human disease genes", *Nature*, vol. 409, no. 6822, pp. 853-855.
- Johnson, G. C., Esposito, L., Barratt, B. J., Smith, A. N., Heward, J., Di, G. G., Ueda, H., Cordell, H. J., Eaves, I. A., Dudbridge, F., Twells, R. C., Payne, F., Hughes, W., Nutland, S., Stevens, H., Carr, P., Tuomilehto-Wolf, E., Tuomilehto, J., Gough, S. C., Clayton, D. G. & Todd, J. A. 2001, "Haplotype tagging for the identification of common disease genes", *Nat.Genet.*, vol. 29, no. 2, pp. 233-237.
- Johnson, J. M., Castle, J., Garrett-Engle, P., Kan, Z., Loerch, P. M., Armour, C. D., Santos, R., Schadt, E. E., Stoughton, R. & Shoemaker, D. D. 2003, "Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays", *Science*, vol. 302, no. 5653, pp. 2141-2144.
- Kandutsch, A. A. & Russell, A. E. 1960, "Preputial gland tumor sterols. 3. A metabolic pathway from lanosterol to cholesterol", *J.Biol.Chem.*, vol. 235, pp. 2256-2261.
- Kane, J. P., Hardman, D. A. & Paulus, H. E. 1980, "Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 77, no. 5, pp. 2465-2469.

- Kannel, W. B. 1996, "Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment", *JAMA*, vol. 275, no. 20, pp. 1571-1576.
- Kannel, W. B. & McGee, D. L. 1979, "Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study", *JAMA*, vol. 241, no. 19, pp. 2035-2038.
- Kathiresan, S., Manning, A. K., Demissie, S., D'Agostino, R. B., Surti, A., Guiducci, C., Gianniny, L., Burt, N. P., Melander, O., Orho-Melander, M., Arnett, D. K., Peloso, G. M., Ordovas, J. M. & Cupples, L. A. 2007, "A genome-wide association study for blood lipid phenotypes in the Framingham Heart Study", *BMC.Med.Genet.*, vol. 8 Suppl 1, p. S17.
- Kathiresan, S., Melander, O., Guiducci, C., Surti, A., Burt, N. P., Rieder, M. J., Cooper, G. M., Roos, C., Voight, B. F., Havulinna, A. S., Wahlstrand, B., Hedner, T., Corella, D., Tai, E. S., Ordovas, J. M., Berglund, G., Vartiainen, E., Jousilahti, P., Hedblad, B., Taskinen, M. R., Newton-Cheh, C., Salomaa, V., Peltonen, L., Groop, L., Altshuler, D. M. & Orho-Melander, M. 2008, "Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans", *Nat.Genet.*, vol. 40, no. 2, pp. 189-197.
- Kathiresan, S., Willer, C. J., Peloso, G. M., Demissie, S., Musunuru, K., Schadt, E. E., Kaplan, L., Bennett, D., Li, Y., Tanaka, T., Voight, B. F., Bonnycastle, L. L., Jackson, A. U., Crawford, G., Surti, A., Guiducci, C., Burt, N. P., Parish, S., Clarke, R., Zelenika, D., Kubalanza, K. A., Morken, M. A., Scott, L. J., Stringham, H. M., Galan, P., Swift, A. J., Kuusisto, J., Bergman, R. N., Sundvall, J., Laakso, M., Ferrucci, L., Scheet, P., Sanna, S., Uda, M., Yang, Q., Lunetta, K. L., Dupuis, J., de Bakker, P. I., O'Donnell, C. J., Chambers, J. C., Kooner, J. S., Hercberg, S., Meneton, P., Lakatta, E. G., Scuteri, A., Schlessinger, D., Tuomilehto, J., Collins, F. S., Groop, L., Altshuler, D., Collins, R., Lathrop, G. M., Melander, O., Salomaa, V., Peltonen, L., Orho-Melander, M., Ordovas, J. M., Boehnke, M., Abecasis, G. R., Mohlke, K. L. & Cupples, L. A. 2009, "Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia", *Nat.Genet.*, vol. 41, no. 1, pp. 56-65.
- Kempen, H. J., Glatz, J. F., Gevers Leuven, J. A., van, d., V & Katan, M. B. 1988, "Serum lathosterol concentration is an indicator of whole-body cholesterol synthesis in humans", *J.Lipid Res.*, vol. 29, no. 9, pp. 1149-1155.
- Khan, B., Wilcox, H. G. & Heimberg, M. 1989, "Cholesterol is required for secretion of very-low-density lipoprotein by rat liver", *Biochem.J.*, vol. 258, no. 3, pp. 807-816.
- Khor, C. C. & Goh, D. L. 2010, "Strategies for identifying the genetic basis of dyslipidemia: genome-wide association studies vs. the resequencing of extremes", *Curr.Opin.Lipidol.*, vol. 21, no. 2, pp. 123-127.
- Kjolby, M., Andersen, O. M., Breiderhoff, T., Fjorback, A. W., Pedersen, K. M., Madsen, P., Jansen, P., Heeren, J., Willnow, T. E. & Nykjaer, A. 2010, "Sort1, encoded by the cardiovascular risk locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export", *Cell Metab*, vol. 12, no. 3, pp. 213-223.
- Kölsch, H., Heun, R., Jessen, F., Popp, J., Hentschel, F., Maier, W. & Lutjohann, D. 2010, "Alterations of cholesterol precursor levels in Alzheimer's disease", *Biochim.Biophys.Acta*, vol. 1801, no. 8, pp. 945-950.

Kowal, R. C., Herz, J., Goldstein, J. L., Esser, V. & Brown, M. S. 1989, "Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 86, no. 15, pp. 5810-5814.

Krauss, R. M., Mangravite, L. M., Smith, J. D., Medina, M. W., Wang, D., Guo, X., Rieder, M. J., Simon, J. A., Hulley, S. B., Waters, D., Saad, M., Williams, P. T., Taylor, K. D., Yang, H., Nickerson, D. A. & Rotter, J. I. 2008, "Variation in the 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme a reductase gene is associated with racial differences in low-density lipoprotein cholesterol response to simvastatin treatment", *Circulation*, vol. 117, no. 12, pp. 1537-1544.

Krieger, M. & Herz, J. 1994, "Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)", *Annu.Rev.Biochem.*, vol. 63, pp. 601-637.

Kullak-Ublick, G. A., Ismail, M. G., Stieger, B., Landmann, L., Huber, R., Pizzagalli, F., Fattinger, K., Meier, P. J. & Hagenbuch, B. 2001, "Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver", *Gastroenterology*, vol. 120, no. 2, pp. 525-533.

Kunjathoor, V. V., Febbraio, M., Podrez, E. A., Moore, K. J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J. S., Silverstein, R., Hoff, H. F. & Freeman, M. W. 2002, "Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages", *J.Biol.Chem.*, vol. 277, no. 51, pp. 49982-49988.

Lagor, W. R., Heller, R., de Groh, E. D. & Ness, G. C. 2007, "Functional analysis of the hepatic HMG-CoA reductase promoter by in vivo electroporation", *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*, vol. 232, no. 3, pp. 353-361.

Lander, E. S. & Schork, N. J. 1994, "Genetic dissection of complex traits", *Science*, vol. 265, no. 5181, pp. 2037-2048.

Lange, Y., Ory, D. S., Ye, J., Lanier, M. H., Hsu, F. F. & Steck, T. L. 2008, "Effectors of rapid homeostatic responses of endoplasmic reticulum cholesterol and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase", *J.Biol.Chem.*, vol. 283, no. 3, pp. 1445-1455.

Larsson, O. 1996, "HMG-CoA reductase inhibitors: role in normal and malignant cells", *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, vol. 22, no. 3, pp. 197-212.

Law, M. R., Morris, J. K. & Wald, N. J. 1997, "Environmental tobacco smoke exposure and ischaemic heart disease: an evaluation of the evidence", *BMJ*, vol. 315, no. 7114, pp. 973-980.

Leitersdorf, E., Hwang, M. & Luskey, K. L. 1990, "ScrFI polymorphism in the 2nd intron of the HMGCR gene", *Nucleic Acids Res.*, vol. 18, no. 18, p. 5584.

Lembcke, J., Ceglarek, U., Fiedler, G. M., Baumann, S., Leichtle, A. & Thiery, J. 2005, "Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using APPI-LC-MS/MS", *J.Lipid Res.*, vol. 46, no. 1, pp. 21-26.

- Lerman, A. & Burnett, J. C. 1992, "Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion", *Circulation*, vol. 86, no. 6 Suppl, p. III12-III19.
- Lerman, A., Webster, M. W., Chesebro, J. H., Edwards, W. D., Wei, C. M., Fuster, V. & Burnett, J. C., Jr. 1993, "Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in hypercholesterolemic pigs", *Circulation*, vol. 88, no. 6, pp. 2923-2928.
- Levine, Y. K. & Wilkins, M. H. 1971, "Structure of oriented lipid bilayers", *Nat.New Biol.*, vol. 230, no. 11, pp. 69-72.
- Lipkin, S. M., Chao, E. C., Moreno, V., Rozek, L. S., Rennert, H., Pinchev, M., Dizon, D., Rennert, G., Kopelovich, L. & Gruber, S. B. 2010, "Genetic variation in 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase modifies the chemopreventive activity of statins for colorectal cancer", *Cancer Prev.Res.(Phila)*, vol. 3, no. 5, pp. 597-603.
- Liscum, L., Finer-Moore, J., Stroud, R. M., Luskey, K. L., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1985, "Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum", *J.Biol.Chem.*, vol. 260, no. 1, pp. 522-530.
- Lloyd-Jones, D. M., Leip, E. P., Larson, M. G., D'Agostino, R. B., Beiser, A., Wilson, P. W., Wolf, P. A. & Levy, D. 2006, "Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age", *Circulation*, vol. 113, no. 6, pp. 791-798.
- Lorenz, M. W., Schaefer, C., Steinmetz, H. & Sitzer, M. 2010, "Is carotid intima media thickness useful for individual prediction of cardiovascular risk? Ten-year results from the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS)", *Eur.Heart J.*, vol. 31, no. 16, pp. 2041-2048.
- Lotta, L. A. 2010, "Genome-wide association studies in atherothrombosis", *Eur.J.Intern.Med.*, vol. 21, no. 2, pp. 74-78.
- Lowe, C. E., Cooper, J. D., Chapman, J. M., Barratt, B. J., Twells, R. C., Green, E. A., Savage, D. A., Guja, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Tuomilehto-Wolf, E., Tuomilehto, J., Todd, J. A. & Clayton, D. G. 2004, "Cost-effective analysis of candidate genes using htSNPs: a staged approach", *Genes Immun.*, vol. 5, no. 4, pp. 301-305.
- Lowel, H., Doring, A., Schneider, A., Heier, M., Thorand, B. & Meisinger, C. 2005, "The MONICA Augsburg surveys - Basis for prospective cohort studies", *Gesundheitswesen*, vol. 67, p. S13-S18.
- Lu, S., Yao, Y., Cheng, X., Mitchell, S., Leng, S., Meng, S., Gallagher, J. W., Shelness, G. S., Morris, G. S., Mahan, J., Frase, S., Mansbach, C. M., Weinberg, R. B. & Black, D. D. 2006, "Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid secretion in IPEC-1 cells by increasing chylomicron size", *J.Biol.Chem.*, vol. 281, no. 6, pp. 3473-3483.
- Lund-Katz, S., Liu, L., Thuahnai, S. T. & Phillips, M. C. 2003, "High density lipoprotein structure", *Front Biosci.*, vol. 8, p. d1044-d1054.
- Lusis, A. J., Fogelman, A. M. & Fonarow, G. C. 2004, "Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways", *Circulation*, vol. 110, no. 13, pp. 1868-1873.

- Luskey, K. L. & Stevens, B. 1985, "Human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Conserved domains responsible for catalytic activity and sterol-regulated degradation", *J.Biol.Chem.*, vol. 260, no. 18, pp. 10271-10277.
- Lynen, F., Eggerer, H., Henning, U. & Kessel, I. 1958a, "Zur Biosynthese der Terpene III.", *Angew.Chemie*, vol. 70, pp. 738-742.
- Lynen, F., Henning, U., Bublitz, C., Sorbo, B. & Kroplin-Rueff, L. 1958b, "The chemical mechanism of acetic acid formation in the liver", *Biochem.Z.*, vol. 330, no. 4, pp. 269-295.
- Malarstig, A. & Hamsten, A. 2010, "Genetics of atherothrombosis and thrombophilia", *Curr.Atheroscler.Rep.*, vol. 12, no. 3, pp. 159-166.
- Malle, E., Waeg, G., Schreiber, R., Grone, E. F., Sattler, W. & Grone, H. J. 2000, "Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/halide system in human atherosclerotic lesions: colocalization of myeloperoxidase and hypochlorite-modified proteins", *Eur.J.Biochem.*, vol. 267, no. 14, pp. 4495-4503.
- Manolio, T. A., Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorff, L. A., Hunter, D. J., McCarthy, M. I., Ramos, E. M., Cardon, L. R., Chakravarti, A., Cho, J. H., Guttmacher, A. E., Kong, A., Kruglyak, L., Mardis, E., Rotimi, C. N., Slatkin, M., Valle, D., Whittemore, A. S., Boehnke, M., Clark, A. G., Eichler, E. E., Gibson, G., Haines, J. L., Mackay, T. F., McCarroll, S. A. & Visscher, P. M. 2009, "Finding the missing heritability of complex diseases", *Nature*, vol. 461, no. 7265, pp. 747-753.
- Mansbach, C. M. 1973, "Complex lipid synthesis in hamster intestine", *Biochim.Biophys.Acta*, vol. 296, no. 2, pp. 386-402.
- Mansbach, C. M., II, Dowell, R. F. & Pritchett, D. 1991, "Portal transport of absorbed lipids in rats", *Am.J.Physiol*, vol. 261, no. 3 Pt 1, p. G530-G538.
- Matlin, A. J., Clark, F. & Smith, C. W. 2005, "Understanding alternative splicing: towards a cellular code", *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, vol. 6, no. 5, pp. 386-398.
- Matthan, N. R., Pencina, M., LaRocque, J. M., Jacques, P. F., D'Agostino, R. B., Schaefer, E. J. & Lichtenstein, A. H. 2009, "Alterations in cholesterol absorption/synthesis markers characterize Framingham offspring study participants with CHD", *J.Lipid Res.*, vol. 50, no. 9, pp. 1927-1935.
- McCarroll, S. A., Huett, A., Kuballa, P., Chilewski, S. D., Landry, A., Goyette, P., Zody, M. C., Hall, J. L., Brant, S. R., Cho, J. H., Duerr, R. H., Silverberg, M. S., Taylor, K. D., Rioux, J. D., Altshuler, D., Daly, M. J. & Xavier, R. J. 2008, "Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease", *Nat.Genet.*, vol. 40, no. 9, pp. 1107-1112.
- McCarthy, M. I. & Hirschhorn, J. N. 2008, "Genome-wide association studies: potential next steps on a genetic journey", *Hum.Mol.Genet.*, vol. 17, no. R2, p. R156-R165.
- Medina, M. W. 2010, "The relationship between HMGCR genetic variation, alternative splicing, and statin efficacy", *Discov.Med.*, vol. 9, no. 49, pp. 495-499.

Medina, M. W., Gao, F., Ruan, W., Rotter, J. I. & Krauss, R. M. 2008, "Alternative splicing of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase is associated with plasma low-density lipoprotein cholesterol response to simvastatin", *Circulation*, vol. 118, no. 4, pp. 355-362.

Miettinen, T. A., Gylling, H., Tuominen, J., Simonen, P. & Koivisto, V. 2004, "Low synthesis and high absorption of cholesterol characterize type 1 diabetes", *Diabetes Care*, vol. 27, no. 1, pp. 53-58.

Miettinen, T. A., Tilvis, R. S. & Kesaniemi, Y. A. 1990, "Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population", *Am.J.Epidemiol.*, vol. 131, no. 1, pp. 20-31.

Mimura, G. 1975, "Genetic control of fatty acid metabolism, especially study of genetic control of cholesterol", *Jpn.Circ.J.*, vol. 39, no. 3, pp. 303-309.

Monte, M. J., Marin, J. J., Antelo, A. & Vazquez-Tato, J. 2009, "Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology", *World J.Gastroenterol.*, vol. 15, no. 7, pp. 804-816.

Mosley, S. T., Brown, M. S., Anderson, R. G. & Goldstein, J. L. 1983, "Mutant clone of Chinese hamster ovary cells lacking 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase", *J.Biol.Chem.*, vol. 258, no. 22, pp. 13875-13881.

Mowri, H. O., Patsch, J. R., Gotto, A. M., Jr. & Patsch, W. 1996, "Apolipoprotein A-II influences the substrate properties of human HDL2 and HDL3 for hepatic lipase", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 755-762.

Mülhardt, C. 2003, *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, 4. Auflage edn, Spektrum Akademischer Verlag.

Muhlestein, J. B., Hammond, E. H., Carlquist, J. F., Radicke, E., Thomson, M. J., Karagounis, L. A., Woods, M. L. & Anderson, J. L. 1996, "Increased incidence of Chlamydia species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease", *J.Am.Coll.Cardiol.*, vol. 27, no. 7, pp. 1555-1561.

Musunuru, K., Strong, A., Frank-Kamenetsky, M., Lee, N. E., Ahfeldt, T., Sachs, K. V., Li, X., Li, H., Kuperwasser, N., Ruda, V. M., Pirruccello, J. P., Muchmore, B., Prokunina-Olsson, L., Hall, J. L., Schadt, E. E., Morales, C. R., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Wong, J., Cantley, W., Racie, T., Ejebe, K. G., Orho-Melander, M., Melander, O., Koteliansky, V., Fitzgerald, K., Krauss, R. M., Cowan, C. A., Kathiresan, S. & Rader, D. J. 2010, "From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus", *Nature*, vol. 466, no. 7307, pp. 714-719.

Napolitano, M., Rivabene, R., Avella, M., Botham, K. M. & Bravo, E. 2001, "The internal redox balance of the cells influences the metabolism of lipids of dietary origin by J774 macrophages: implications for foam cell formation", *J.Vasc.Res.*, vol. 38, no. 4, pp. 350-360.

Navab, M., Hama, S. Y., Hough, G. P., Subbanagounder, G., Reddy, S. T. & Fogelman, A. M. 2001, "A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids", *J.Lipid Res.*, vol. 42, no. 8, pp. 1308-1317.

NCEP ATP III 2002, "Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report", *Circulation*, vol. 106, no. 25, pp. 3143-3421.

Nelson, D. L. & Cox, M. M. 2006, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th edn, W.H. Freeman.

Nigon, F., Lesnik, P., Rouis, M. & Chapman, M. J. 1991, "Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor", *J.Lipid Res.*, vol. 32, no. 11, pp. 1741-1753.

Noakes, J. E., Kim, S. & Stipp, J. J. "Chemical and counting advances in liquid scintillation age dating". USAEC 650-652, 68-92. 1965. NBS, Washington, DC, Proc. Int. Conf. on <sup>14</sup>C and Tritium Dating (eds.) Chatters, R.M. and Olson, E.A.

Nohturfft, A., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1998, "Sterols regulate processing of carbohydrate chains of wild-type SREBP cleavage-activating protein (SCAP), but not sterol-resistant mutants Y298C or D443N", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 95, no. 22, pp. 12848-12853.

Oemar, B. S., Tschudi, M. R., Godoy, N., Brovkovich, V., Malinski, T. & Luscher, T. F. 1998, "Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis", *Circulation*, vol. 97, no. 25, pp. 2494-2498.

Olkkonen, V. M., Johansson, M., Suchanek, M., Yan, D., Hynynen, R., Ehnholm, C., Jauhiainen, M., Thiele, C. & Lehto, M. 2006, "The OSBP-related proteins (ORPs): global sterol sensors for co-ordination of cellular lipid metabolism, membrane trafficking and signalling processes?", *Biochem.Soc.Trans.*, vol. 34, no. Pt 3, pp. 389-391.

Ong, K. K., Khor, H. T. & Tan, D. T. 1991, "Assay of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity using anionic-exchange column chromatography", *Anal.Biochem.*, vol. 196, no. 2, pp. 211-214.

Oram, J. F. & Vaughan, A. M. 2000, "ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins", *Curr.Opin.Lipidol.*, vol. 11, no. 3, pp. 253-260.

Out, R., Hoekstra, M., Hildebrand, R. B., Kruit, J. K., Meurs, I., Li, Z., Kuipers, F., Van Berkel, T. J. & Van, E. M. 2006, "Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, vol. 26, no. 10, pp. 2295-2300.

Packard, C. J. & Shepherd, J. 1997, "Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, vol. 17, no. 12, pp. 3542-3556.

Pennacchio, L. A. & Rubin, E. M. 2003, "Apolipoprotein A5, a newly identified gene that affects plasma triglyceride levels in humans and mice", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, vol. 23, no. 4, pp. 529-534.

Pennisi, E. 2010, "Genomics. 1000 Genomes Project gives new map of genetic diversity", *Science*, vol. 330, no. 6004, pp. 574-575.

Popjak, G., Lowe, A. E., Moore, D., Brown, L. & Smith, F. A. 1959, "Scintillation counter for the measurement of radioactivity of vapors in conjunction with gas-liquid chromatography", *J.Lipid Res.*, vol. 1, pp. 29-39.

Porcellini, E., Calabrese, E., Guerini, F., Govoni, M., Chiappelli, M., Tumini, E., Morgan, K., Chappell, S., Kalsheker, N., Franceschi, M. & Licastro, F. 2007, "The hydroxy-methylglutaryl CoA reductase promoter polymorphism is associated with Alzheimer's risk and cognitive deterioration", *Neurosci.Lett.*, vol. 416, no. 1, pp. 66-70.

Powell, L. M., Wallis, S. C., Pease, R. J., Edwards, Y. H., Knott, T. J. & Scott, J. 1987, "A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine", *Cell*, vol. 50, no. 6, pp. 831-840.

Poynter, J. N., Gruber, S. B., Higgins, P. D., Almog, R., Bonner, J. D., Rennert, H. S., Low, M., Greenson, J. K. & Rennert, G. 2005, "Statins and the risk of colorectal cancer", *N.Engl.J.Med.*, vol. 352, no. 21, pp. 2184-2192.

Price, A. L., Patterson, N. J., Plenge, R. M., Weinblatt, M. E., Shadick, N. A. & Reich, D. 2006, "Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies", *Nat.Genet.*, vol. 38, no. 8, pp. 904-909.

Pritchard, J. K. & Rosenberg, N. A. 1999, "Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies", *Am.J.Hum.Genet.*, vol. 65, no. 1, pp. 220-228.

Pritchard, K. A., Jr., Groszek, L., Smalley, D. M., Sessa, W. C., Wu, M., Villalon, P., Wolin, M. S. & Stemerman, M. B. 1995, "Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion", *Circ.Res.*, vol. 77, no. 3, pp. 510-518.

Rader, D. J., Alexander, E. T., Weibel, G. L., Billheimer, J. & Rothblat, G. H. 2009, "The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis", *J.Lipid Res.*, vol. 50 Suppl, p. S189-S194.

Radhakrishnan, A., Goldstein, J. L., McDonald, J. G. & Brown, M. S. 2008, "Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance", *Cell Metab*, vol. 8, no. 6, pp. 512-521.

Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H. J., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 2007, "Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 104, no. 16, pp. 6511-6518.

Radhakrishnan, A., Sun, L. P., Kwon, H. J., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 2004, "Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain", *Mol.Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 259-268.

Rall, S. C., Jr., Weisgraber, K. H., Innerarity, T. L. & Mahley, R. W. 1982, "Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 79, no. 15, pp. 4696-4700.

## 6 Literaturverzeichnis

- Rao, D. C., Williams, W. R., McGue, M., Morton, N. E., Gulbrandsen, C. L., Rhoads, G. G., Kagan, A., Laskarzewski, P., Glueck, C. J. & Russell, J. M. 1983, "Cultural and biological inheritance of plasma lipids", *Am.J.Phys.Anthropol.*, vol. 62, no. 1, pp. 33-49.
- Rawson, R. B., Zelenski, N. G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M. T., Chang, T. Y., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1997, "Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs", *Mol.Cell*, vol. 1, no. 1, pp. 47-57.
- Redgrave, T. G. 1970, "Formation of cholesteryl ester-rich particulate lipid during metabolism of chylomicrons", *J.Clin.Invest.*, vol. 49, no. 3, pp. 465-471.
- Risch, N. & Merikangas, K. 1996, "The future of genetic studies of complex human diseases", *Science*, vol. 273, no. 5281, pp. 1516-1517.
- Robb, D. B., Covey, T. R. & Bruins, A. P. 2000, "Atmospheric pressure photoionisation: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry", *Analytical Chemistry*, vol. 72, no. 15, pp. 3653-3659.
- Robinson, R. 1934, "On the mechanism of the conversion of squalene to sterols", *J.Chem.Soc.Ind.*, vol. 53, pp. 1062-1075.
- Rosenfeld, M. E., Butler, S., Ord, V. A., Lipton, B. A., Dyer, C. A., Curtiss, L. K., Palinski, W. & Witztum, J. L. 1993, "Abundant expression of apoprotein E by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions", *Arterioscler.Thromb.*, vol. 13, no. 9, pp. 1382-1389.
- Ross, R. 1986, "The pathogenesis of atherosclerosis--an update", *N.Engl.J.Med.*, vol. 314, no. 8, pp. 488-500.
- Ross, R. 1993, "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s", *Nature*, vol. 362, no. 6423, pp. 801-809.
- Ross, R. 1999, "Atherosclerosis--an inflammatory disease", *N.Engl.J.Med.*, vol. 340, no. 2, pp. 115-126.
- Ross, R., Glomset, J. & Harker, L. 1977, "Response to injury and atherogenesis", *Am.J.Pathol.*, vol. 86, no. 3, pp. 675-684.
- Russell, D. W. 2003, "The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis", *Annu.Rev.Biochem.*, vol. 72, pp. 137-174.
- Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J. C., Deleuze, J. F., Brewer, H. B., Duverger, N., Deneffe, P. & Assmann, G. 1999, "Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1", *Nat.Genet.*, vol. 22, no. 4, pp. 352-355.
- Rustaeus, S., Stillemark, P., Lindberg, K., Gordon, D. & Olofsson, S. O. 1998, "The microsomal triglyceride transfer protein catalyzes the post-translational assembly of apolipoprotein B-100 very low density lipoprotein in McA-RH7777 cells", *J.Biol.Chem.*, vol. 273, no. 9, pp. 5196-5203.

## 6 Literaturverzeichnis

Sabesin, S. M., Clark, S. B. & Holt, P. R. 1977, "Ultrastructural features of regional differences in chylomicron secretion by rat intestine", *Exp.Mol.Pathol.*, vol. 26, no. 2, pp. 277-289.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. 1988, "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase", *Science*, vol. 239, no. 4839, pp. 487-491.

Sakakura, Y., Shimano, H., Sone, H., Takahashi, A., Inoue, N., Toyoshima, H., Suzuki, S. & Yamada, N. 2001, "Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis", *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, vol. 286, no. 1, pp. 176-183.

Sambrook, J. R. D. W. 2001, *Molecular Cloning - a laboratory handbook* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sandhu, M. S., Waterworth, D. M., Debenham, S. L., Wheeler, E., Papadakis, K., Zhao, J. H., Song, K., Yuan, X., Johnson, T., Ashford, S., Inouye, M., Luben, R., Sims, M., Hadley, D., McArdle, W., Barter, P., Kesaniemi, Y. A., Mahley, R. W., McPherson, R., Grundy, S. M., Bingham, S. A., Khaw, K. T., Loos, R. J., Waeber, G., Barroso, I., Strachan, D. P., Deloukas, P., Vollenweider, P., Wareham, N. J. & Mooser, V. 2008, "LDL-cholesterol concentrations: a genome-wide association study", *Lancet*, vol. 371, no. 9611, pp. 483-491.

Saxena, R., Voight, B. F., Lyssenko, V., Burt, N. P., de Bakker, P. I., Chen, H., Roix, J. J., Kathiresan, S., Hirschhorn, J. N., Daly, M. J., Hughes, T. E., Groop, L., Altshuler, D., Almgren, P., Florez, J. C., Meyer, J., Ardlie, K., Bengtsson, B. K., Isomaa, B., Lettre, G., Lindblad, U., Lyon, H. N., Melander, O., Newton-Cheh, C., Nilsson, P., Orho-Melander, M., Rastam, L., Speliotes, E. K., Taskinen, M. R., Tuomi, T., Guiducci, C., Berglund, A., Carlson, J., Gianniny, L., Hackett, R., Hall, L., Holmkvist, J., Laurila, E., Sjogren, M., Sterner, M., Surti, A., Svensson, M., Svensson, M., Tewhey, R., Blumenstiel, B., Parkin, M., Defelice, M., Barry, R., Brodeur, W., Camarata, J., Chia, N., Fava, M., Gibbons, J., Handsaker, B., Healy, C., Nguyen, K., Gates, C., Sougnez, C., Gage, D., Nizzari, M., Gabriel, S. B., Chirn, G. W., Ma, Q., Parikh, H., Richardson, D., Rieke, D. & Purcell, S. 2007, "Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels", *Science*, vol. 316, no. 5829, pp. 1331-1336.

Schoenheimer, R. & Breusch, F. 1933, "Synthesis and destruction of cholesterol in the organism", *J.Biol.Chem.*, vol. 103, pp. 439-448.

Schunkert, H., Konig, I. R., Kathiresan, S., Reilly, M. P., Assimes, T. L., Holm, H., Preuss, M., Stewart, A. F., Barbalic, M., Gieger, C., Absher, D., Aherrahrou, Z., Allayee, H., Altshuler, D., Anand, S. S., Andersen, K., Anderson, J. L., Ardissino, D., Ball, S. G., Balmforth, A. J., Barnes, T. A., Becker, D. M., Becker, L. C., Berger, K., Bis, J. C., Boekholdt, S. M., Boerwinkle, E., Braund, P. S., Brown, M. J., Burnett, M. S., Buyschaert, I., Carlquist, J. F., Chen, L., Cichon, S., Codd, V., Davies, R. W., Dedoussis, G., Dehghan, A., Demissie, S., Devaney, J. M., Diemert, P., Do, R., Doering, A., Eifert, S., Mokhtari, N. E., Ellis, S. G., Elosua, R., Engert, J. C., Epstein, S. E., de, F. U., Fischer, M., Folsom, A. R., Freyer, J., Gigante, B., Girelli, D., Gretarsdottir, S., Gudnason, V., Gulcher, J. R., Halperin, E., Hammond, N., Hazen, S. L., Hofman, A., Horne, B. D., Illig, T., Iribarren, C., Jones, G. T., Jukema, J. W., Kaiser, M. A., Kaplan, L. M., Kastelein, J. J., Khaw, K. T., Knowles, J. W., Kolovou, G., Kong, A., Laaksonen, R., Lambrechts, D., Leander, K., Lettre, G., Li, M., Lieb, W., Loley, C., Lotery, A. J., Mannucci, P. M., Maouche, S., Martinelli, N., McKeown, P. P.,

## 6 Literaturverzeichnis

Meisinger, C., Meitinger, T., Melander, O., Merlini, P. A., Mooser, V., Morgan, T., Muhleisen, T. W., Muhlestein, J. B., Munzel, T., Musunuru, K., Nahrstaedt, J., Nelson, C. P., Nothen, M. M., Olivieri, O., Patel, R. S., Patterson, C. C., Peters, A., Peyvandi, F., Qu, L., Quyyumi, A. A., Rader, D. J., Rallidis, L. S., Rice, C., Rosendaal, F. R., Rubin, D., Salomaa, V., Sampietro, M. L., Sandhu, M. S., Schadt, E., Schafer, A., Schillert, A., Schreiber, S., Schrezenmeir, J., Schwartz, S. M., Siscovick, D. S., Sivananthan, M., Sivapalaratnam, S., Smith, A., Smith, T. B., Snoep, J. D., Soranzo, N., Spertus, J. A., Stark, K., Stirrups, K., Stoll, M., Tang, W. H., Tennstedt, S., Thorgeirsson, G., Thorleifsson, G., Tomaszewski, M., Uitterlinden, A. G., van Rij, A. M., Voight, B. F., Wareham, N. J., Wells, G. A., Wichmann, H. E., Wild, P. S., Willenborg, C., Witterman, J. C., Wright, B. J., Ye, S., Zeller, T., Ziegler, A., Cambien, F., Goodall, A. H., Cupples, L. A., Quertermous, T., Marz, W., Hengstenberg, C., Blankenberg, S., Ouwehand, W. H., Hall, A. S., Deloukas, P., Thompson, J. R., Stefansson, K., Roberts, R., Thorsteinsdottir, U., O'Donnell, C. J., McPherson, R., Erdmann, J. & Samani, N. J. 2011, "Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease", *Nat.Genet.*, vol. 43, no. 4, pp. 333-338.

Schwartz, C. C., Berman, M., Vlahcevic, Z. R., Halloran, L. G., Gregory, D. H. & Swell, L. 1978, "Multicompartmental analysis of cholesterol metabolism in man. Characterization of the hepatic bile acid and biliary cholesterol precursor sites", *J.Clin.Invest.*, vol. 61, no. 2, pp. 408-423.

Sever, N., Yang, T., Brown, M. S., Goldstein, J. L. & Bose-Boyd, R. A. 2003, "Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain", *Mol.Cell*, vol. 11, no. 1, pp. 25-33.

Siddiqi, S. A., Gorelick, F. S., Mahan, J. T. & Mansbach, C. M. 2003, "COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle", *J.Cell Sci.*, vol. 116, no. Pt 2, pp. 415-427.

Siddiqi, S. A., Siddiqi, S., Mahan, J., Peggs, K., Gorelick, F. S. & Mansbach, C. M. 2006, "The identification of a novel endoplasmic reticulum to Golgi SNARE complex used by the prechylomicron transport vesicle", *J.Biol.Chem.*, vol. 281, no. 30, pp. 20974-20982.

Simionescu, M. & Simionescu, N. 1993, "Proatherosclerotic events: pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration", *FASEB J.*, vol. 7, no. 14, pp. 1359-1366.

Smith, G. D. & Pekkanen, J. 1994, "Scandinavian simvastatin study (4S)", *Lancet*, vol. 344, no. 8939-8940, pp. 1766-1768.

Smith, J. R., Osborne, T. F., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 1990, "Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene", *J.Biol.Chem.*, vol. 265, no. 4, pp. 2306-2310.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. 1985, "Measurement of protein using bicinchoninic acid", *Anal.Biochem.*, vol. 150, no. 1, pp. 76-85.

Sonderhoff, R. & Thomas, H. 1937, "Die enzymatische Dehydrierung der Trideutero-essigsäure", *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, vol. 530, pp. 195-213.

- Song, B. L., Javitt, N. B. & Bose-Boyd, R. A. 2005, "Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol", *Cell Metab*, vol. 1, no. 3, pp. 179-189.
- Song, B. L., Sever, N. & Bose-Boyd, R. A. 2005, "Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase", *Mol.Cell*, vol. 19, no. 6, pp. 829-840.
- Soria, L. F., Ludwig, E. H., Clarke, H. R., Vega, G. L., Grundy, S. M. & McCarthy, B. J. 1989, "Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 86, no. 2, pp. 587-591.
- Sparks, D. L. & Pritchard, P. H. 1989, "Transfer of cholesteryl ester into high density lipoprotein by cholesteryl ester transfer protein: effect of HDL lipid and apoprotein content", *J.Lipid Res.*, vol. 30, no. 10, pp. 1491-1498.
- Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2009. Fachserie 12 Reihe 4. 2010a. Wiesbaden.
- Statistisches Bundesamt. Kapitel 9.9: Direkte Krankheitskosten nach ausgewählten Diagnosen, Alter und Geschlecht. Statistisches Jahrbuch 2010. 2010b. Wiesbaden.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C. & Witztum, J. L. 1989, "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity", *N.Engl.J.Med.*, vol. 320, no. 14, pp. 915-924.
- Steyrer, E. & Kostner, G. M. 1988, "Activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein D: comparison of proteoliposomes containing apolipoprotein D, A-I or C-I", *Biochim.Biophys.Acta*, vol. 958, no. 3, pp. 484-491.
- Stillemark-Billton, P., Beck, C., Boren, J. & Olofsson, S. O. 2005, "Relation of the size and intracellular sorting of apoB to the formation of VLDL 1 and VLDL 2", *J.Lipid Res.*, vol. 46, no. 1, pp. 104-114.
- Stralfors, P. 1990, "Autolysis of isolated adipocytes by endogenously produced fatty acids", *FEBS Lett.*, vol. 263, no. 1, pp. 153-154.
- Sun, L. P., Seemann, J., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 2007, "Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 104, no. 16, pp. 6519-6526.
- Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., Azuma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura, H., Yazaki, Y., Kodama, T. & . 1997, "A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection", *Nature*, vol. 386, no. 6622, pp. 292-296.
- Tall, A. R. 1995, "Plasma cholesteryl ester transfer protein and high-density lipoproteins: new insights from molecular genetic studies", *J.Intern.Med.*, vol. 237, no. 1, pp. 5-12.

Tall, A. R., Krumholz, S., Olivecrona, T. & Deckelbaum, R. J. 1985, "Plasma phospholipid transfer protein enhances transfer and exchange of phospholipids between very low density lipoproteins and high density lipoproteins during lipolysis", *J.Lipid Res.*, vol. 26, no. 7, pp. 842-851.

Taylor, J. A., Xu, Z. L., Kaplan, N. L. & Morris, R. W. 2006, "How well do HapMap haplotypes identify common haplotypes of genes? A comparison with haplotypes of 334 genes resequenced in the environmental genome project", *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, vol. 15, no. 1, pp. 133-137.

Tchen, T. T. & Bloch, K. 1957, "On the conversion of squalene to lanosterol in vitro", *J.Biol.Chem.*, vol. 226, no. 2, pp. 921-930.

Teslovich, T. M., Musunuru, K., Smith, A. V., Edmondson, A. C., Stylianou, I. M., Koseki, M., Pirruccello, J. P., Ripatti, S., Chasman, D. I., Willer, C. J., Johansen, C. T., Fouchier, S. W., Isaacs, A., Peloso, G. M., Barbalic, M., Ricketts, S. L., Bis, J. C., Aulchenko, Y. S., Thorleifsson, G., Feitosa, M. F., Chambers, J., Orho-Melander, M., Melander, O., Johnson, T., Li, X., Guo, X., Li, M., Shin, C. Y., Jin, G. M., Jin, K. Y., Lee, J. Y., Park, T., Kim, K., Sim, X., Twee-Hee, O. R., Croteau-Chonka, D. C., Lange, L. A., Smith, J. D., Song, K., Hua, Z. J., Yuan, X., Luan, J., Lamina, C., Ziegler, A., Zhang, W., Zee, R. Y., Wright, A. F., Witteman, J. C., Wilson, J. F., Willemsen, G., Wichmann, H. E., Whitfield, J. B., Waterworth, D. M., Wareham, N. J., Waeber, G., Vollenweider, P., Voight, B. F., Vitart, V., Uitterlinden, A. G., Uda, M., Tuomilehto, J., Thompson, J. R., Tanaka, T., Surakka, I., Stringham, H. M., Spector, T. D., Soranzo, N., Smit, J. H., Sinisalo, J., Silander, K., Sijbrands, E. J., Scuteri, A., Scott, J., Schlessinger, D., Sanna, S., Salomaa, V., Saharinen, J., Sabatti, C., Ruukonen, A., Rudan, I., Rose, L. M., Roberts, R., Rieder, M., Psaty, B. M., Pramstaller, P. P., Pichler, I., Perola, M., Penninx, B. W., Pedersen, N. L., Pattaro, C., Parker, A. N., Pare, G., Oostra, B. A., O'Donnell, C. J., Nieminen, M. S., Nickerson, D. A., Montgomery, G. W., Meitinger, T., McPherson, R., McCarthy, M. I., McArdle, W., Masson, D., Martin, N. G., Marroni, F., Mangino, M., Magnusson, P. K., Lucas, G., Luben, R., Loos, R. J., Lokki, M. L., Lettre, G., Langenberg, C., Launer, L. J., Lakatta, E. G., Laaksonen, R., Kyvik, K. O., Kronenberg, F., König, I. R., Khaw, K. T., Kaprio, J., Kaplan, L. M., Johansson, A., Jarvelin, M. R., Janssens, A. C., Ingelsson, E., Igl, W., Kees, H. G., Hottenga, J. J., Hofman, A., Hicks, A. A., Hengstenberg, C., Heid, I. M., Hayward, C., Havulinna, A. S., Hastie, N. D., Harris, T. B., Haritunians, T., Hall, A. S., Gyllenstein, U., Guiducci, C., Groop, L. C., Gonzalez, E., Gieger, C., Freimer, N. B., Ferrucci, L., Erdmann, J., Elliott, P., Ejebe, K. G., Doring, A., Dominiczak, A. F., Demissie, S., Deloukas, P., de Geus, E. J., de, F. U., Crawford, G., Collins, F. S., Chen, Y. D., Caulfield, M. J., Campbell, H., Burt, N. P., Bonnycastle, L. L., Boomsma, D. I., Boehholdt, S. M., Bergman, R. N., Barroso, I., Bandinelli, S., Ballantyne, C. M., Assimes, T. L., Quertermous, T., Altshuler, D., Seielstad, M., Wong, T. Y., Tai, E. S., Feranil, A. B., Kuzawa, C. W., Adair, L. S., Taylor, H. A., Jr., Borecki, I. B., Gabriel, S. B., Wilson, J. G., Holm, H., Thorsteinsdottir, U., Gudnason, V., Krauss, R. M., Mohlke, K. L., Ordovas, J. M., Munroe, P. B., Kooner, J. S., Tall, A. R., Hegele, R. A., Kastelein, J. J., Schadt, E. E., Rotter, J. I., Boerwinkle, E., Strachan, D. P., Mooser, V., Stefansson, K., Reilly, M. P., Samani, N. J., Schunkert, H., Cupples, L. A., Sandhu, M. S., Ridker, P. M., Rader, D. J., van Duijn, C. M., Peltonen, L., Abecasis, G. R., Boehnke, M. & Kathiresan, S. 2010, "Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids", *Nature*, vol. 466, no. 7307, pp. 707-713.

The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium 2011, "A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease", *Nat.Genet.*, vol. 43, no. 4, pp. 339-344.

Teupser, D., Baber, R., Ceglarek, U., Scholz, M., Illig, T., Gieger, C., Holdt, L. M., Leichtle, A., Greiser, K. H., Huster, D., Linsel-Nitschke, P., Schafer, A., Braund, P. S., Tired, L., Stark, K., Raaz-Schrauder, D., Fiedler, G. M., Wilfert, W., Beutner, F., Gielen, S., Grosshennig, A., König, I. R., Lichtner, P., Heid, I. M., Kluttig, A., El Mokhtari, N. E., Rubin, D., Ekici, A. B., Reis, A., Garlachs, C. D., Hall, A. S., Matthes, G., Wittekind, C., Hengstenberg, C., Cambien, F., Schreiber, S., Werdan, K., Meitinger, T., Loeffler, M., Samani, N. J., Erdmann, J., Wichmann, H. E., Schunkert, H. & Thiery, J. 2010, "Genetic regulation of serum phytosterol levels and risk of coronary artery disease", *Circ.Cardiovasc.Genet.*, vol. 3, no. 4, pp. 331-339.

Teupser, D., Beutner, F., Gielen, S., Schink, A., Leichtle, A., Burkhardt, R., Schuler, G. & Thiery, J. The Leipzig Heart Study (LE-Heart Study) - Phenotyping of cardiovascular characteristics, environmental factors and risk factors in angiographically assessed CHD patients for genome-wide analyses. 1, 334. 2007. *J Clin Lipidol.*

Teupser, D., Stein, O., Burkhardt, R., Nebendahl, K., Stein, Y. & Thiery, J. 1999, "Scavenger receptor activity is increased in macrophages from rabbits with low atherosclerotic response: studies in normocholesterolemic high and low atherosclerotic response rabbits", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, vol. 19, no. 5, pp. 1299-1305.

Thomas, D. C., Haile, R. W. & Duggan, D. 2005, "Recent developments in genomewide association scans: a workshop summary and review", *Am.J.Hum.Genet.*, vol. 77, no. 3, pp. 337-345.

Thuahnai, S. T., Lund-Katz, S., Dhanasekaran, P., de, I. L.-M., Connelly, M. A., Williams, D. L., Rothblat, G. H. & Phillips, M. C. 2004, "Scavenger receptor class B type I-mediated cholesteryl ester-selective uptake and efflux of unesterified cholesterol. Influence of high density lipoprotein size and structure", *J.Biol.Chem.*, vol. 279, no. 13, pp. 12448-12455.

Timmins, J. M., Lee, J. Y., Boudyguina, E., Kluckman, K. D., Brunham, L. R., Mulya, A., Gebre, A. K., Coutinho, J. M., Colvin, P. L., Smith, T. L., Hayden, M. R., Maeda, N. & Parks, J. S. 2005, "Targeted inactivation of hepatic *Abca1* causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I", *J.Clin.Invest*, vol. 115, no. 5, pp. 1333-1342.

Tong, Y., Zhang, S., Li, H., Su, Z., Kong, X., Liu, H., Xiao, C., Sun, Y. & Shi, J. J. 2004, "8302A/C and (TTA)<sub>n</sub> polymorphisms in the HMG-CoA reductase gene may be associated with some plasma lipid metabolic phenotypes in patients with coronary heart disease", *Lipids*, vol. 39, no. 3, pp. 239-241.

Tribble, D. L., Holl, L. G., Wood, P. D. & Krauss, R. M. 1992, "Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size", *Atherosclerosis*, vol. 93, no. 3, pp. 189-199.

Trigatti, B. L., Krieger, M. & Rigotti, A. 2003, "Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, vol. 23, no. 10, pp. 1732-1738.

- Ueda, Y., Royer, L., Gong, E., Zhang, J., Cooper, P. N., Francone, O. & Rubin, E. M. 1999, "Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice", *J.Biol.Chem.*, vol. 274, no. 11, pp. 7165-7171.
- van den Oord, E. J. & Sullivan, P. F. 2003, "False discoveries and models for gene discovery", *Trends Genet.*, vol. 19, no. 10, pp. 537-542.
- van der Velde, A. E., Brufau, G. & Groen, A. K. 2010, "Transintestinal cholesterol efflux", *Curr.Opin.Lipidol.*, vol. 21, no. 3, pp. 167-171.
- Varki, A. 1994, "Selectin ligands", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 91, no. 16, pp. 7390-7397.
- Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martasek, P., Hogg, N., Masters, B. S., Karoui, H., Tordo, P. & Pritchard, K. A., Jr. 1998, "Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 95, no. 16, pp. 9220-9225.
- Vaughan, A. M. & Oram, J. F. 2006, "ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL", *J.Lipid Res.*, vol. 47, no. 11, pp. 2433-2443.
- Vergeer, M., Holleboom, A. G., Kastelein, J. J. & Kuivenhoven, J. A. 2010, "The HDL hypothesis: does high-density lipoprotein protect from atherosclerosis?", *J.Lipid Res.*, vol. 51, no. 8, pp. 2058-2073.
- Vijayagopal, P., Srinivasan, S. R., Radhakrishnamurthy, B. & Berenson, G. S. 1992, "Lipoprotein-proteoglycan complexes from atherosclerotic lesions promote cholesteryl ester accumulation in human monocytes/macrophages", *Arterioscler.Thromb.*, vol. 12, no. 2, pp. 237-249.
- Virchow, R. 1858, *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre* August Hirschwald, Berlin.
- Vollmert, C., Windl, O., Xiang, W., Rosenberger, A., Zerr, I., Wichmann, H. E., Bickeboller, H., Illig, T. & Kretzschmar, H. A. 2006, "Significant association of a M129V independent polymorphism in the 5' UTR of the PRNP gene with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a large German case-control study", *J.Med.Genet.*, vol. 43, no. 10, p. e53.
- Walli, A. K. & Seidel, D. 1984, "Role of lipoprotein-X in the pathogenesis of cholestatic hypercholesterolemia. Uptake of lipoprotein-X and its effect on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and chylomicron remnant removal in human fibroblasts, lymphocytes, and in the rat", *J.Clin.Invest*, vol. 74, no. 3, pp. 867-879.
- Wang, C. S., McConathy, W. J., Kloer, H. U. & Alaupovic, P. 1985, "Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III", *J.Clin.Invest*, vol. 75, no. 2, pp. 384-390.
- Wang, H., Thomas, D. C., Pe'er, I. & Stram, D. O. 2006, "Optimal two-stage genotyping designs for genome-wide association scans", *Genet.Epidemiol.*, vol. 30, no. 4, pp. 356-368.

Wang, N., Silver, D. L., Costet, P. & Tall, A. R. 2000, "Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1", *J.Biol.Chem.*, vol. 275, no. 42, pp. 33053-33058.

Warner, G. J., Stoudt, G., Bamberger, M., Johnson, W. J. & Rothblat, G. H. 1995, "Cell toxicity induced by inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase and accumulation of unesterified cholesterol", *J.Biol.Chem.*, vol. 270, no. 11, pp. 5772-5778.

Waterworth, D. M., Ricketts, S. L., Song, K., Chen, L., Zhao, J. H., Ripatti, S., Aulchenko, Y. S., Zhang, W., Yuan, X., Lim, N., Luan, J., Ashford, S., Wheeler, E., Young, E. H., Hadley, D., Thompson, J. R., Braund, P. S., Johnson, T., Struchalin, M., Surakka, I., Luben, R., Khaw, K. T., Rodwell, S. A., Loos, R. J., Boehholdt, S. M., Inouye, M., Deloukas, P., Elliott, P., Schlessinger, D., Sanna, S., Scuteri, A., Jackson, A., Mohlke, K. L., Tuomilehto, J., Roberts, R., Stewart, A., Kesaniemi, Y. A., Mahley, R. W., Grundy, S. M., McArdle, W., Cardon, L., Waeber, G., Vollenweider, P., Chambers, J. C., Boehnke, M., Abecasis, G. R., Salomaa, V., Jarvelin, M. R., Ruukonen, A., Barroso, I., Epstein, S. E., Hakonarson, H. H., Rader, D. J., Reilly, M. P., Witteman, J. C., Hall, A. S., Samani, N. J., Strachan, D. P., Barter, P., van Duijn, C. M., Kooner, J. S., Peltonen, L., Wareham, N. J., McPherson, R., Mooser, V. & Sandhu, M. S. 2010, "Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, vol. 30, no. 11, pp. 2264-2276.

Weingartner, O., Pinsdorf, T., Rogacev, K. S., Blomer, L., Grenner, Y., Graber, S., Ulrich, C., Girndt, M., Bohm, M., Fliser, D., Laufs, U., Lutjohann, D. & Heine, G. H. 2010, "The relationships of markers of cholesterol homeostasis with carotid intima-media thickness", *PLoS.One.*, vol. 5, no. 10, p. e13467.

Whitman, S. C., Rateri, D. L., Szilvassy, S. J., Cornicelli, J. A. & Daugherty, A. 2002, "Macrophage-specific expression of class A scavenger receptors in LDL receptor(-/-) mice decreases atherosclerosis and changes spleen morphology", *J.Lipid Res.*, vol. 43, no. 8, pp. 1201-1208.

Wichmann, H. E., Gieger, C. & Illig, T. 2005, "KORA-gen - Resource for population genetics, controls and a broad spectrum of disease phenotypes", *Gesundheitswesen*, vol. 67, p. S26-S30.

Willer, C. J., Speliotes, E. K., Loos, R. J., Li, S., Lindgren, C. M., Heid, I. M., Berndt, S. I., Elliott, A. L., Jackson, A. U., Lamina, C., Lettre, G., Lim, N., Lyon, H. N., McCarroll, S. A., Papadakis, K., Qi, L., Randall, J. C., Roccascocca, R. M., Sanna, S., Scheet, P., Weedon, M. N., Wheeler, E., Zhao, J. H., Jacobs, L. C., Prokopenko, I., Soranzo, N., Tanaka, T., Timpson, N. J., Almgren, P., Bennett, A., Bergman, R. N., Bingham, S. A., Bonnycastle, L. L., Brown, M., Burtt, N. P., Chines, P., Coin, L., Collins, F. S., Connell, J. M., Cooper, C., Smith, G. D., Dennison, E. M., Deodhar, P., Elliott, P., Erdos, M. R., Estrada, K., Evans, D. M., Gianniny, L., Gieger, C., Gillson, C. J., Guiducci, C., Hackett, R., Hadley, D., Hall, A. S., Havulinna, A. S., Hebebrand, J., Hofman, A., Isomaa, B., Jacobs, K. B., Johnson, T., Jousilahti, P., Jovanovic, Z., Khaw, K. T., Kraft, P., Kuokkanen, M., Kuusisto, J., Laitinen, J., Lakatta, E. G., Luan, J., Luben, R. N., Mangino, M., McArdle, W. L., Meitinger, T., Mulas, A., Munroe, P. B., Narisu, N., Ness, A. R., Northstone, K., O'Rahilly, S., Purmann, C., Rees, M. G., Ridderstrale, M., Ring, S. M., Rivadeneira, F., Ruukonen, A., Sandhu, M. S., Saramies, J., Scott, L. J., Scuteri, A., Silander, K., Sims, M. A., Song, K., Stephens, J., Stevens, S., Stringham, H. M., Tung, Y. C., Valle, T. T., van Duijn, C. M., Vimalaswaran, K. S., Vollenweider, P., Waeber, G., Wallace, C., Watanabe, R. M., Waterworth, D. M., Watkins,

- N., Witteman, J. C., Zeggini, E., Zhai, G., Zillikens, M. C., Altshuler, D., Caulfield, M. J., Chanock, S. J., Farooqi, I. S., Ferrucci, L., Guralnik, J. M., Hattersley, A. T., Hu, F. B., Jarvelin, M. R., Laakso, M., Mooser, V., Ong, K. K., Ouwehand, W. H., Salomaa, V., Samani, N. J., Spector, T. D., Tuomi, T., Tuomilehto, J., Uda, M., Uitterlinden, A. G., Wareham, N. J., Deloukas, P., Frayling, T. M., Groop, L. C., Hayes, R. B., Hunter, D. J., Mohlke, K. L., Peltonen, L., Schlessinger, D., Strachan, D. P., Wichmann, H. E., McCarthy, M. I., Boehnke, M., Barroso, I., Abecasis, G. R. & Hirschhorn, J. N. 2009, "Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation", *Nat.Genet.*, vol. 41, no. 1, pp. 25-34.
- Williams, K. J. & Tabas, I. 1995, "The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, vol. 15, no. 5, pp. 551-561.
- Willnow, T. E. 1997, "Mechanisms of hepatic chylomicron remnant clearance", *Diabet.Med.*, vol. 14 Suppl 3, p. S75-S80.
- Wilson, P. W., D'Agostino, R. B., Levy, D., Belanger, A. M., Silbershatz, H. & Kannel, W. B. 1998, "Prediction of coronary heart disease using risk factor categories", *Circulation*, vol. 97, no. 18, pp. 1837-1847.
- Winzen, R., Gowrishankar, G., Bollig, F., Redich, N., Resch, K. & Holtmann, H. 2004, "Distinct domains of AU-rich elements exert different functions in mRNA destabilization and stabilization by p38 mitogen-activated protein kinase or HuR", *Mol.Cell Biol.*, vol. 24, no. 11, pp. 4835-4847.
- Wolff, E., Vergnes, M. F., Defoort, C., Planells, R., Portugal, H., Nicolay, A. & Lairon, D. 2011, "Cholesterol absorption status and fasting plasma cholesterol are modulated by the microsomal triacylglycerol transfer protein -493 G/T polymorphism and the usual diet in women", *Genes Nutr.*, vol. 6, no. 1, pp. 71-79.
- Wu, X., Zhou, M., Huang, L. S., Wetterau, J. & Ginsberg, H. N. 1996, "Demonstration of a physical interaction between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B during the assembly of ApoB-containing lipoproteins", *J.Biol.Chem.*, vol. 271, no. 17, pp. 10277-10281.
- Xu, S., Benoff, B., Liou, H. L., Lobel, P. & Stock, A. M. 2007, "Structural basis of sterol binding by NPC2, a lysosomal protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease", *J.Biol.Chem.*, vol. 282, no. 32, pp. 23525-23531.
- Xu, S., Laccotripe, M., Huang, X., Rigotti, A., Zannis, V. I. & Krieger, M. 1997, "Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake", *J.Lipid Res.*, vol. 38, no. 7, pp. 1289-1298.
- Xu, X. X. & Tabas, I. 1991, "Sphingomyelinase enhances low density lipoprotein uptake and ability to induce cholesteryl ester accumulation in macrophages", *J.Biol.Chem.*, vol. 266, no. 36, pp. 24849-24858.
- Yang, T., Espenshade, P. J., Wright, M. E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 2002, "Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of

SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER", *Cell*, vol. 110, no. 4, pp. 489-500.

Yen, C. L. & Farese, R. V., Jr. 2003, "MGAT2, a monoacylglycerol acyltransferase expressed in the small intestine", *J.Biol.Chem.*, vol. 278, no. 20, pp. 18532-18537.

Yla-Herttuala, S., Lipton, B. A., Rosenfeld, M. E., Sarkioja, T., Yoshimura, T., Leonard, E. J., Witztum, J. L. & Steinberg, D. 1991, "Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions", *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, vol. 88, no. 12, pp. 5252-5256.

Yla-Herttuala, S., Rosenfeld, M. E., Parthasarathy, S., Glass, C. K., Sigal, E., Witztum, J. L. & Steinberg, D. 1990, "Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 87, no. 18, pp. 6959-6963.

Young, N. L. & Berger, B. 1981, "Assay of S-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase", *Methods Enzymol.*, vol. 71 Pt C, pp. 498-509.

Yu, L., Hammer, R. E., Li-Hawkins, J., Von, B. K., Lutjohann, D., Cohen, J. C. & Hobbs, H. H. 2002, "Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 99, no. 25, pp. 16237-16242.

Zannis, V. I., Cole, F. S., Jackson, C. L., Kurnit, D. M. & Karathanasis, S. K. 1985, "Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages", *Biochemistry*, vol. 24, no. 16, pp. 4450-4455.

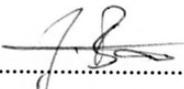
Zethelius, B., Berglund, L., Sundstrom, J., Ingelsson, E., Basu, S., Larsson, A., Venge, P. & Arnlov, J. 2008, "Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes", *N.Engl.J.Med.*, vol. 358, no. 20, pp. 2107-2116.

### **Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

07.11.2011

Datum

  
.....

Unterschrift

## Lebenslauf

### Persönliches

Name Jan Baier  
Anschrift Kurt-Eisner-Str. 33, 04275 Leipzig  
Geburtstag/Geburtsort 21.08.1982 in Jena  
Familienstand ledig

### Studium

12/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/2010 – 07/2010 PJ-Ausbildung: Department Medizin am Kantonsspital Luzern/Schweiz  
12/2009 – 03/2010 PJ-Ausbildung: Klinik für Chirurgie am Ev. Diakonissenkrankenhaus Leipzig  
09/2009 – 12/2009 PJ-Ausbildung: Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche Leipzig  
02/2009 – 03/2009 Famulatur in der Klinik für Innere Medizin am Kilimanjaro Christian Medical Centre, Moshi/Tansania  
09/2008 Famulatur in der Facharztpraxis für Orthopädie, Dr. Streifeneder, Schwerin  
09/2008 Famulatur in der Gemeinschaftspraxis für Kinder- und Jugendheilkunde, Dr. Triebel und Dr. Neubert, Schwerin  
02/2008 Famulatur am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Universität Leipzig  
09/2006 – 07/2007 DAAD-Stipendiat an der Medizinischen Universität Timisoara/Rumänien  
02/2006 Famulatur in der Klinik für Herzchirurgie am Herzzentrum Leipzig  
09/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2003 – 2010 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig

## **voruniversitärer Werdegang**

2002 – 2003	Wehrersatzdienst in der Notaufnahme der Pfeifferschen Stiftungen, Magdeburg
2000 – 2002	Hegel-Gymnasium, Magdeburg Abschluss: Abitur
1993 - 2000	Gymnasium Carolinum, Bernburg

## **Beruflicher und wissenschaftlicher Werdegang**

### Arzt in Weiterbildung

seit 04/2011	Assistenarzt in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. D. Körholz),
--------------	---

### Promotion

10/2007 – 11/2011	Doktorand am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Universität Leipzig (Direktor: Prof. Dr. med. J. Thiery)
-------------------	---

### Studentische Hilfskraft

2007 – 2009	Intensivstation Kardiologie, Herzzentrum Leipzig
2007 – 2009	Referat Lehre der Medizinischen Fakultät Leipzig Tätigkeit: Aktualisierung der Semesterpläne und Begleithefte für den Unterricht am Krankenbett
2004 – 2006	Referat Lehre der Medizinischen Fakultät Leipzig Tätigkeit: Umsetzung der neuen ÄAppO im klinischen Abschnitt, Entwicklung der Semesterpläne und Erstellung der Begleithefte für den Unterricht am Krankenbett

## **Sprachliche Qualifikationen**

Englisch:	sehr gute Kenntnisse	Abschlüsse:	UniCert III – Medical English; Note: 2,0 TOEFL 2010: 108 von 120 Punkten
Russisch:	gute Kenntnisse		
Rumänisch:	gute Kenntnisse		
Latein:	gute Kenntnisse	Abschluss:	Latinum
Französisch:	Grundkenntnisse	Abschluss:	UniCert I

## **Veröffentlichungen**

*ausstehend*

## **Danksagung**

Da an diesem Projekt so zahlreiche viele Personen mitgewirkt haben, ist jegliche Danksagung sicherlich unvollständig. Insbesondere ist es mir an dieser Stelle nicht möglich, allen involvierten Menschen namentlich zu danken, da ich viele niemals persönlich kennen gelernt habe. Es ist mir bewusst, dass ohne die tausenden freiwilligen Probanden diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre und mit Sicherheit wären für die Erstellung dieser Arbeit nicht nur vier Jahre notwendig gewesen, wenn das Probenmaterial für die Untersuchungen der Kohorten KORA, CARLA und LE-Heart nicht durch zahlreiche Mitarbeiter der entsprechenden Institute gewonnen worden wäre.

Ich bedanke mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Joachim Thiery für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas, für die Möglichkeit der Mitarbeit an seinem Institut und in diesem Rahmen auch allen Mitarbeitern des Institutes, die zum einen an vielen Punkten geholfen haben, zum anderen mir stets das Gefühl gegeben haben willkommen zu sein.

Herrn Prof. Dr. Daniel Teupser danke ich für die kontinuierliche wissenschaftliche Betreuung, für die positiven Rückmeldungen als auch stets kritischen Bemerkungen, Gedanken und Ratschläge, die schließlich entscheidend zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. An dieser Stelle danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Teupser, die mir oft Antworten auf viele fachliche Fragen geben konnten, mich zum Teil anleiteten und die in den vergangenen Jahren zu einer angenehmen Atmosphäre im Labor beitrugen. Insbesondere möchte ich hierbei Herrn Ronny Baber danken. Ohne ihn wären viele Experimente und Untersuchungen mit Sicherheit wesentlich langsamer voran gegangen. Außerdem gab es am Ende schon eine gewisse Vorfreude auf die fast wöchentlichen Fußballaktivitäten, welche von ihm organisiert wurden. Bei Herrn Wolfgang Wilfert bedanke ich mich vielmals für seine unendliche Geduld auch in hektischen Arbeitsphasen mich in das ein oder andere Geheimnis der molekularbiologischen Laborarbeit einzuweihen. Auf fast jede praktische Fragestellung eine Antwort zu haben, hat mir mit Sicherheit viele Nerven erspart. Frau Dr. Lesca Holdt danke ich für die freundliche Bereitstellung der LE-Heart Proben und für die Unterstützung bei Experimenten im Rahmen der LE-Heart Untersuchungen. In diesem Zusammenhang möchte ich Herrn Dr. Frank Beutner für die Rekrutierung der Patienten des LE-Heart Projektes danken, von dem auch ich sehr profitieren konnte.

Des Weiteren danke ich der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Uta Ceglarek für die Durchführung der Sterolmessungen in allen vier Kohorten. Hierbei danke ich insbesondere Frau Babette Niescher für die methodische Hilfe bei den Probenmessungen der LE-Heart Kohorte.

Ein großer Dank gebührt Herrn Dr. Markus Scholz für die vielen sehr umfassenden statistischen Auswertungen im Rahmen der Kohortenstudien.

Ich danke meiner Familie für die jahrelange Unterstützung, ohne die diese Arbeit mit Sicherheit ungleich schwieriger realisiert worden wäre. Ein besonderer Dank schließlich an meine Freundin – Susanne Harlfinger –, ohne ihre beständige Motivation und Hilfe nach langen Arbeitstagen wäre diese Arbeit nicht zum Abschluss gekommen.