

**ASSOZIATIONEN ZWISCHEN POLYMORPHISMEN LITHOGENER  
KANDIDATENGENE UND RISIKOFAKTOREN DER CHOLESTERINCHOLELITHIASIS**

VON DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER  
RHEINISCH-WESTFÄLISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE AACHEN  
ZUR ERLANGUNG  
DES AKADEMISCHEN GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN  
GENEHMIGTE DISSERTATION

VORGELEGT VON  
**RAMIN SCHIRIN-SOKHAN**

AUS  
ESSEN

BERICHTER: HERR UNIVERSITÄTSPROFESSOR  
DR. MED. FRANK LAMMERT

HERR UNIVERSITÄTSPROFESSOR  
DR. MED. DIPL.-BIOCHEM. SIEGFRIED MATERN

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 8. DEZEMBER 2005

DIESE DISSERTATION IST AUF DEN INTERNETSEITEN DER HOCHSCHULBIBLIOTHEK ONLINE VERFÜGBAR



---

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Gallensteinleiden.....	1
1.2 Pathogenese der Cholesterincholelithiasis .....	1
1.3 Genetik der Cholelithiasis .....	3
1.4 Identifizierung muriner Gallensteingene.....	7
1.5 Ziele der Arbeit .....	10
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Patientenkollektiv und Studienaufbau.....	11
2.2 DNA-Isolierung.....	12
2.3 Quantifizierung des DNA-Gehaltes .....	12
2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	13
2.5 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten .....	14
2.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	15

---

2.7	Genotypisierung .....	15
2.7.1	DNA-Sequenzierung .....	15
2.7.1.1	Sequenzierungs-PCR .....	16
2.7.1.2	Aufreinigung der Sequenzierungs-PCR.....	16
2.7.1.3	Kapillarelektrophorese .....	16
2.7.2	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen .....	17
2.7.2.1	<i>Scavenger Receptor Class B Type I (SRB1)</i> .....	17
2.7.2.2	<i>Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 2 (LRP2)</i> .	18
2.7.2.3	<i>Cholesterinester-Transferprotein (CETP)</i> .....	20
2.7.2.4	<i>Hepatische Lipase (LIPC)</i> .....	20
2.7.2.5	<i>Apolipoprotein E (APOE)</i> .....	21
2.7.3	SNaPshot .....	22
2.7.3.1	SNaPshot Methode.....	22
2.7.3.2	<i>ATP Binding Cassette B11 (ABCB11)</i> .....	24
2.7.3.3	PCR .....	24
2.7.3.4	Aufreinigung der PCR für die SNaPshot-Reaktion .....	25
2.7.3.5	Design der SNaPshot-Primer .....	25
2.7.3.6	SNaPshot-Reaktion .....	26
2.7.4	TaqMan MGB .....	27
2.7.4.1	TaqMan MGB Methodik .....	27
2.7.4.2	<i>Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 2 (LRP2)</i> .	28
2.7.4.3	TaqMan MGB-Reaktion .....	28
2.8	Klinisch-chemische Parameter .....	29

2.9	Statistische Verfahren und Datenbanken .....	30
2.9.1	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und De Finetti-Dreieck .....	30
2.9.2	Allgemeine statistische Verfahren.....	31
2.9.3	Datenbanken .....	31
2.10	Geräte und Reagenzien.....	32
2.10.1	Geräte und gebrauchsfertige Reagenzien .....	32
2.10.2	Hergestellte Lösungen .....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1	Patientenkollektiv .....	37
3.2	<i>Cholesterinester-Transferprotein (CETP)</i> .....	39
3.2.1	RFLP.....	39
3.2.2	Statistische Analyse.....	40
3.3	<i>Apolipoprotein E (APOE)</i> .....	42
3.3.1	RFLP.....	42
3.3.2	Statistische Analyse.....	43
3.4	<i>ATP Binding Cassette Transporter B11 (ABCB11)</i> .....	46
3.4.1	SNaPshot .....	46
3.4.2	Statistische Analyse des Exon 13-Polymorphismus.....	46
3.4.3	Statistische Analyse des Exon 9-Polymorphismus.....	48
3.5	<i>Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 2 (LRP2)</i> .....	49
3.5.1	SNP1 rs2228171 .....	49
3.5.1.1	TaqMan .....	49
3.5.1.2	Statistische Analyse .....	49

3.5.2	SNP2 rs831042 .....	52
3.5.2.1	RFLP .....	52
3.5.2.2	Statistische Analyse .....	52
3.5.2.3	TaqMan .....	54
3.5.2.4	Statistische Analyse .....	54
3.5.3	SNP3 rs2075252 .....	56
3.5.3.1	RFLP .....	56
3.5.3.2	Statistische Analyse .....	57
3.5.3.3	TaqMan .....	58
3.5.3.4	Statistische Analyse .....	58
3.6	<i>Hepatische Lipase C (LIPC)</i> .....	61
3.6.1	RFLP .....	61
3.6.2	Statistische Analyse .....	62
3.7	<i>SRBI</i> .....	64
3.7.1	Intron 5 .....	64
3.7.1.1	RFLP .....	64
3.7.1.2	Sequenzierung .....	65
3.7.1.3	Statistische Analyse .....	65
3.7.2	Exon 8 .....	68
3.7.2.1	RFLP .....	68
3.7.2.2	Sequenzierung .....	69
3.7.2.3	Statistische Analyse .....	69

---

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
4.1	Pathogenese der Cholesterincholelithiasis und genetische Analysen in einer humanen Assoziationsstudie.....	71
4.2	Varianten humaner Gene als genetische Marker der Cholesterincholelithiasis.....	75
4.2.1	<i>CETP</i> als genetische Variable im reversen Cholesterintransport.....	75
4.2.2	Die kontroverse Rolle von <i>APOE</i> .....	76
4.2.3	Die Gallensäurenexportpumpe <i>ABCB11</i> im <i>Lith1</i> -Locus als potenzielles Kandidatengen.....	77
4.2.4	<i>LRP2</i> als weiteres attraktives Kandidatengen im <i>Lith1</i> -Locus.....	78
4.2.5	<i>LIPC</i> mit Einfluss auf das Lipoproteinmuster als mögliches Gallenstein kandidatengen.....	79
4.2.6	<i>SRBI</i> – Der Rezeptor für HDL-Cholesterin, die Quelle biliären Cholesterins.....	80
4.3	Ausblick: Klinische Anwendbarkeit und genetische Risikofaktoren.....	81
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
	<b>Dank</b>	<b>94</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>95</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Adenin
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ABC</b>	<i>ATP Binding Cassette</i>
<b>abstr.</b>	<i>abstract</i>
<b>Ala</b>	Alanin
<b>APO</b>	Apolipoprotein
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BMI</b>	<i>body mass index</i>
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>C</b>	Cytosin
<b>CETP</b>	Cholesterinester-Transferprotein
<b>CI</b>	Konfidenzintervall
<b>CSI</b>	Cholesterin-Sättigungsindex
<b>CYP7A</b>	Cholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase
<b>Da</b>	Dalton
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	bidestilliertes Wasser
<b>ddNTP</b>	Dideoxynukleosidtriphosphat
<b>dl</b>	Deziliter
<b>DMSO</b>	Dimethyl-sulfoxid
<b>DNA</b>	Deoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Deoxynukleosidtriphosphat
<b>EDTA</b>	Ethyldiamintetraacetat
<b>EtBr</b>	Ethidiumbromid
<b>G</b>	Guanin
<b>GP</b>	Glykoprotein
<b>HDL</b>	<i>High Density-Lipoprotein</i>
<b>HWG</b>	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
<b>Kb</b>	Kilobasenpaare
<b>LDL</b>	<i>Low Density Lipoprotein</i>
<b>LDLR</b>	LDL-Rezeptor
<b>LIPC</b>	Hepatische Lipase



---

<b><i>Lith</i></b>	lithogen
<b>LOD</b>	<i>Logarithm of the Odds ratio</i>
<b>LRP</b>	<i>Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein</i>
<b>mg</b>	Milligramm
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>OR</b>	<i>Odds ratio</i>
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>QTL</b>	<i>Quantitative Trait Locus</i>
<b>RFLP</b>	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RWTH</b>	Rheinisch-Westfälisch Technische Hochschule
<b>sek</b>	Sekunde
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<b>SPGP</b>	<i>Sister of P-Glycoprotein</i>
<b>SRBI</b>	<i>Scavenger Receptor BI</i>
<b>T</b>	Thymin
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TG</b>	Triglyzeride
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>Tyr</b>	Tyrosin
<b>U</b>	<i>units</i>
<b>U/L</b>	<i>units</i> pro Liter
<b>U/min</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>UTR</b>	untranslated region
<b>Val</b>	Valin
<b>VLDL</b>	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
<b>vs.</b>	<i>versus</i>

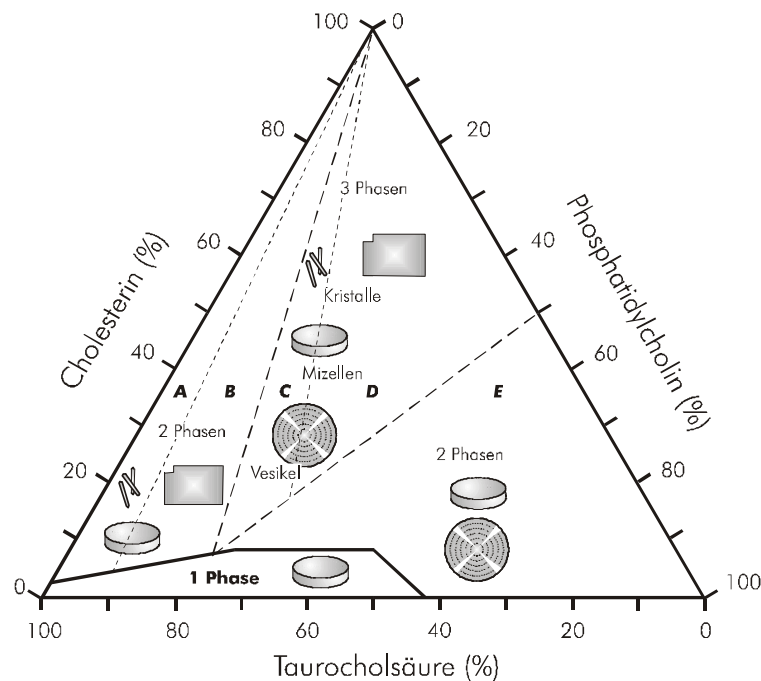
# 1 Einleitung

## 1.1 Das Gallensteinleiden

Die Cholesterincholelithiasis ist eine weltweit sehr verbreitete und zudem häufig auftretende gastroenterologische Erkrankung. In Deutschland ist das Gallensteinleiden durch eine hohe Prävalenz von etwa 10% gekennzeichnet. Demnach leben in Deutschland über acht Millionen Steinträger, von denen jedoch nur 20 – 40% im Laufe der Zeit Symptome in Form von kolikartigen Schmerzen im rechten Oberbauch, Fieber oder Gelbsucht entwickeln (1-3). Cholesterinsteine, charakterisiert durch einen Cholesterinanteil von 70 – 80%, sind mit 80% weitaus häufiger vertreten als die aus polymerisiertem Bilirubin bestehenden Pigmentsteine, die einen Bilirubinanteil von etwa 50% besitzen und sich nur bei 20% der Patienten manifestieren. Die Standardtherapie des symptomatischen Gallensteinleidens ist die laparoskopische Cholezystektomie, so dass in Deutschland jährlich 140.000 Cholezystektomien durchgeführt werden. Durch stationäre Aufenthalte und Pflegetage entstehen Kosten von über 500 Millionen Euro pro Jahr (4, 5). Das Gallensteinleiden ist somit eine der kostenintensivsten gastroenterologischen Erkrankungen in Deutschland. Effektive präventive Maßnahmen stehen bisher nicht zur Verfügung.

## 1.2 Pathogenese der Cholesterincholelithiasis

Cholesteringallensteine spiegeln einen Defekt der biliären Cholesterinhomöostase wieder (Abb. 1). Zur Zeit werden drei Pathomechanismen für die Entstehung und das Wachstum von Gallensteinen verantwortlich gemacht (6-8): die Cholesterinübersättigung der Galle, die Hypomotilität der Gallenblase und die Störung des Gleichgewichts an kinetischen Proteinfaktoren. Die primäre pathophysiologische Fehlfunktion ist die Übersättigung der Galle mit Cholesterin (9). Im Zustand der Cholesterinübersättigung ist die Galle nicht mehr in der Lage, Cholesterin mit Hilfe der sezernierten Gallensäuren und Phospholipide, zumeist Lecithin (Phosphatidylcholin), in einem Lösungsgleichgewicht zu halten. Als Maß der Übersättigung dient der Cholesterinsättigungsindex (CSI). Der CSI beschreibt das Verhältnis der Cholesterinkonzentration einer Gallenprobe zu der Konzentration, die in einer Modellgalle gleicher Lipidzusammensetzung maximal gelöst werden kann (10).



**Abb. 1** Biliäres Gleichgewichts-Phasendiagramm nach WANG und CAREY (11). In den Zonen A und B präzipitieren Cholesterinkristalle bei niedrigen Phosphatidylcholin- bzw. Cholesterinkonzentrationen. In den Zonen C und D treten nur Kristalle auf, wenn das Verhältnis von Cholesterin zu Phosphatidylcholin  $> 1$  ist.

Die Ursachen der Cholesterinübersättigung können eine hepatische Hypersekretion von Cholesterin, herabgesetzte Sekretionsraten der Leber für Gallensäuren und Phospholipide oder eine Kombination der genannten Funktionsstörungen sein. Ein Anstieg des biliären Cholesterins kann prinzipiell durch unterschiedliche Pathomechanismen verursacht werden (9): eine gesteigerte hepatische Aufnahme von Low Density Lipoprotein (LDL), ein Anstieg der *de novo* Cholesterinbiosynthese, ein herabgesetzter enzymatischer Cholesterinkatabolismus zu Gallensäuren durch die Cholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7A1) oder eine verminderte Speicherung als Cholesterinester. Zu den Hauptquellen biliären Cholesterins gehören die hepatisch aufgenommenen Chylomikronen-Remnants und das High Density Lipoprotein (HDL) (12, 13). Die Hypomotilität der Gallenblase führt zu einer verlängerten Verweildauer der Galle in der Gallenblase; hierdurch werden Nukleation, Präzipitation, Aggregation und Wachstum von Cholesterinkristallen begünstigt (14, 15). Des Weiteren wird die Entstehung und das Wachstum von Cholesterinkristallen durch eine Reihe von Promotor- ( $\alpha_1$ -Glykoprotein, Aminopeptidase N, Immunglobulin G und M, Phospholipase C) und Inhibitorproteinen (Apolipoprotein A, Immunglobulin A) beeinflusst (16).

### 1.3 Genetik der Cholelithiasis

Die Ätiologie der Cholelithiasis konnte bis heute nicht vollständig geklärt werden, doch deuten die bisherigen Erkenntnisse auf eine multifaktorielle Genese hin. Für die Entstehung von Cholesteringallensteinen wurden Risikofaktoren definiert. Hierzu zählen biologische Faktoren, wie z.B. das Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus Typ 2, erniedrigtes HDL-Cholesterin, und exogene Faktoren wie ein erhöhtes Körpergewicht in Folge falscher Ernährungsweise. Neben diesen schon lange bekannten Risikofaktoren weisen ethnische Unterschiede und die familiäre Häufung von Gallensteinen (17-20) auf eine genetische Prädisposition hin.

Mit Hilfe der nicht invasiven sonographischen Diagnostik können heute genauere Angaben über die Gallensteinprävalenz in Bevölkerungsstichproben gemacht werden. Epidemiologische Studien zeigen, dass sich die Gallensteinprävalenz in verschiedenen Populationen deutlich unterscheiden (21-23). Die höchsten Prävalenzen finden sich in Europa, mit einer Steinprävalenz von ca. 20% in Deutschland (24, 25), sowie in Nord- und Südamerika (26). In Asien hingegen treten Gallensteine wesentlich seltener auf (27-30). Afrika stellt den Kontinent mit den niedrigsten Steinprävalenzen von ca. 1% dar (31). Die beschriebenen geographischen Unterschiede spiegeln zum einen die unterschiedlichen Ernährungs- und Lebensgewohnheiten, zum anderen aber auch die genetische Prädisposition verschiedener ethnischer Gruppen wider. Deutlich wird dies an der außergewöhnlich hohen Prävalenz bei nordamerikanischen Indianerstämmen, zu denen vor allem die Pima-Indianer mit einer Gallensteinprävalenz von über 70% bei Frauen zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr zählen (32, 33).

Um einen Aufschluss über den Einfluss genetischer Risikofaktoren auf das Gallensteinleiden zu gewinnen, wurden Familien- und Zwillingsstudien durchgeführt, die eindeutige Hinweise auf eine genetische Determination zeigen konnten. Familienmitglieder mit einer positiven Familienanamnese haben ein signifikant (3:1) höheres Risiko, ebenfalls Gallensteine zu entwickeln (34-36). In der Literatur sind nur wenige Zwillingsstudien zur Cholecystolithiasis zu finden. KESÄNIEMI et al. (37) fanden unter finnischen Zwillingen zwei konkordante Paare unter fünf eineiigen Zwillingen (EZ), jedoch kein konkordantes Paar unter drei zweieiigen Zwillingen (ZZ) mit Gallensteinen. Zudem beschrieben KESÄNIEMI et al. eine signifikante Korrelation der Cholesterin- und Cholsäurekonzentration bei EZ ( $r = 0,73$ ;  $p < 0,01$ ), nicht

aber bei ZZ ( $r = -0,02$ ;  $p > 0,05$ ) (37). In Tab. 1 sind Untersuchungen an Zwillingen zur Cholelithiasis zusammengefasst. Diese Ergebnisse unterstreichen die genetische Relevanz bei der Cholelithiasis, jedoch weist die relativ niedrige Konkordanz bei EZ auf die gleichzeitige Bedeutung exogener Faktoren hin.

**Tab. 1** Zwillingsuntersuchungen zur Cholelithiasis

EZ				ZZ				Studie
konkordant		diskordant		konkordant		diskordant		
F	M	F	M	F	M	F	M	
2	0	3	0	0	0	1	1	(38)
0	0	2	1	0	0	1	3	(39)
7		11		3		34		(40)
9		14		4		38		(41)
3		4		0		6		(42)
2		3		0		3		(37)
23		38		7		87		$\Sigma$
23/61 (38%)				7/94 (7%)				Konkordanz

Innerhalb des menschlichen Genoms konnten bisher zahlreiche Varianten einzelner Gene, so genannte Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), identifiziert werden (43). Ein genetischer Polymorphismus ist als Austausch einzelner Basen innerhalb eines Gens definiert. Dieser Austausch führt zu unterschiedlichen Zustandsformen (Allele) und somit zu einem polymorphen Erscheinungsbild des Gens. Liegt ein SNP in einer kodierenden Sequenz, kann er einen Aminosäureaustausch hervorrufen und die Proteineigenschaften verändern, die wiederum Funktionsstörungen in komplexen Stoffwechselwegen bewirken können. Auch SNPs in nicht-kodierenden Sequenzen (z.B. Introns) können als genetische Marker verwendet werden.

Fall-Kontroll-Studien bieten einen viel versprechenden Ansatz zur Untersuchung von krankheitsrelevanten genetischen Varianten (44). Insbesondere komplexe polygene Erkrankungen, bei denen eine Vielzahl von Faktoren wie z.B. Umwelteinflüsse, variable Penetranz und Gen-Gen-Interaktionen eine Rolle spielen, können in einer Fall-Kontroll-Studie systematisch analysiert werden. Methodisch wird in einer Fall-Kontroll-Studie einer erkrankten Person (Fall) eine gesunde Person (Kontrolle) zugeordnet. Man vergleicht die Häufigkeiten eines entsprechenden Merkmals zwischen erkrankten (Gallensteinträger) und

gesunden (keine Gallensteine) Personen. Um mögliche bekannte Einflussvariablen auszuschließen, besteht die Möglichkeit, für einzelne Merkmale innerhalb des Kollektivs zu matchen. In dieser Arbeit wurde für die bereits bekannten lithogenen Risikofaktoren Alter, Geschlecht und body mass index (BMI) gematcht. Um zu überprüfen, ob eine Assoziation zwischen Polymorphismen und einer genetisch determinierten Erkrankung vorliegt, versucht man signifikante Häufigkeitsunterschiede für das Auftreten eines SNPs zwischen Fällen und Kontrollen nachzuweisen.

Bisher wird der Einfluss von *APOE* als Kandidatengen auf die Pathogenese der Cholesteringallensteine kontrovers diskutiert. So ist die Isoform E4 als ein Risikofaktor für die Gallensteinentstehung (45), aber auch für das Rezidiv von Gallensteinen nach erfolgreicher Stoßwellen-Lithotripsie identifiziert worden (46, 47). APOE spielt als Ligand für die LDL-Rezeptor Familie eine zentrale Rolle im Cholesterinmetabolismus. Drei in der Bevölkerung häufige Isoformen (E2, E3, E4) wurden bislang identifiziert. Die Variationen resultieren aus einem Austausch zwischen Arginin und Cystein an den Codon-Positionen 112 und 158 der Rezeptorbindungsstelle des Apolipoproteins. APOE2 besitzt an beiden Positionen Cystein, APOE4 an beiden Positionen Arginin und APOE3 an der Position 112 Cystein und an der Position 158 Arginin. Aufgrund des kodominanten Vererbungsmodus ergeben sich sechs mögliche Phänotypen: E2/2, E2/3, E2/4, E3/3, E3/4 und E4/4. Dieser Variation auf Proteinebene geht ein Unterschied auf chromosomaler Ebene voraus. Das Gen *APOE* besitzt unterschiedliche Ausprägungen (Allele  $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$  und  $\epsilon_4$ ). Die Kombination dieser drei möglichen Allele führt zu den oben beschriebenen Phänotypen. BERTOMEU et al. (45) zeigten, dass die relative Allelfrequenz von  $\epsilon_4$  bei Gallensteinpatienten erhöht war. Diese Beobachtung konnte in anderen Studien nicht bestätigt werden. Jedoch ließen sich ein erhöhter Cholesteringehalt in Gallensteinen (48), eine erhöhte Rezidivrate (46, 47) und eine Beschleunigung der Kristallisation sowie eine größere Anzahl von Gallensteinen (49) nachweisen. Der Effekt von APOE4 könnte hierbei auf einer gesteigerten hepatischen Aufnahme von Chylomikronen-Remnants, einer vermehrten intestinalen Cholesterin-Absorption oder einer Abnahme synthetisierter Gallensäuren beruhen (50).

Ein weiteres polymorphes Kandidatengen, das Cholesterinester-Transferprotein-Gen (*CETP*), greift ebenfalls in den Plasmalipidmetabolismus ein, indem es Cholesterinester und Phospholipide von HDL- auf VLDL- und LDL-Partikel überführt und die Plasma-HDL-Konzentration reguliert. Nach Genotypisierung des *TaqIB*-Polymorphismus des *CETP*-Gens

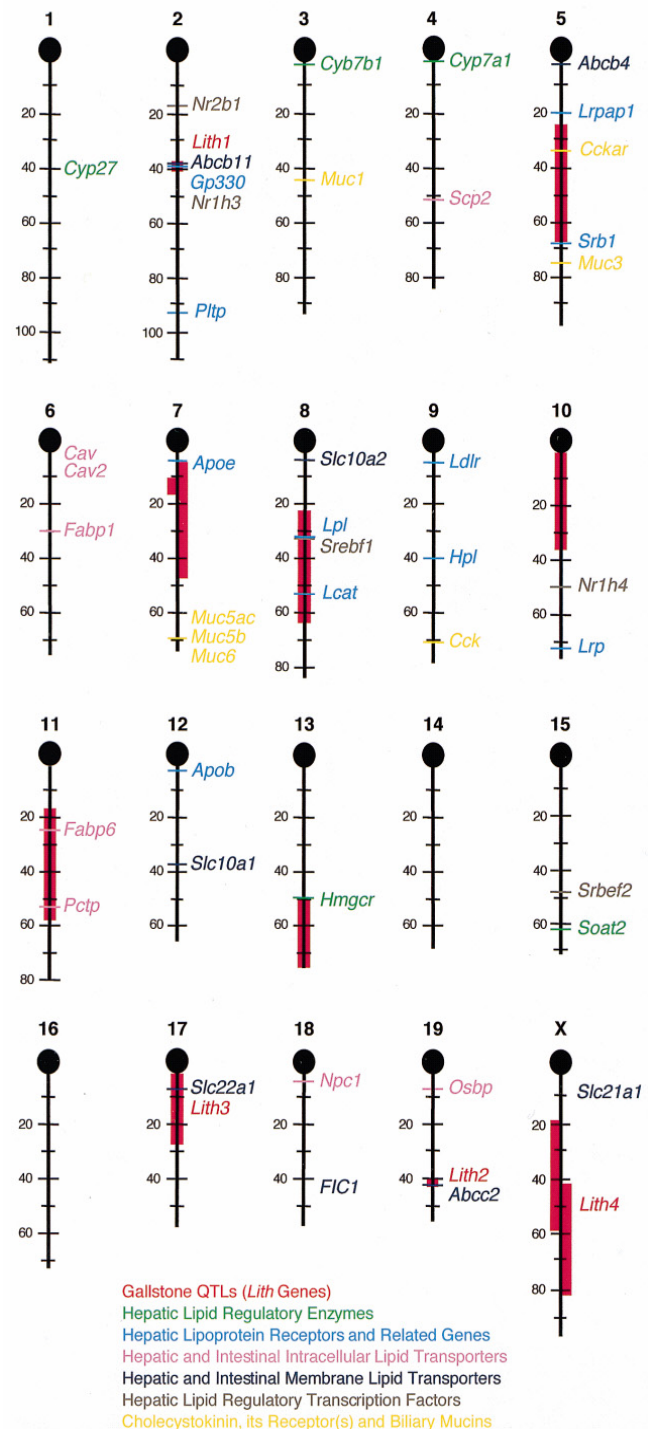
konnte eine signifikante Assoziation zwischen Trägern des Genotyps B2B2 und dem Auftreten von Gallensteinen gefunden werden (51).

In einer chinesischen Population wurde für einen Polymorphismus im Gen des LDL-Rezeptor (*LDLR*), der LDL-Partikel endozytotisch in periphere Zellen aufnimmt, eine Assoziation mit Gallensteinen nachgewiesen (52). Des Weiteren konnte in einer chinesischen Studie gezeigt werden, dass der *XbaI* Polymorphismus im Apolipoprotein B-Gen (*APOB*) mit der Cholelithiasis assoziiert war (53).

Das *CYP7A1*-Gen kodiert für die Cholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase, welches das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der hepatischen Gallensäurebiosynthese aus Cholesterin ist. In einer mexikanischen Population war ein Polymorphismus im *CYP7A1*-Gen bei Männern mit symptomatischen Gallenblasenerkrankungen assoziiert (54). PULLINGER et al. (55) beschrieben eine Familie, in der eine frame shift Mutation im *CYP7A1*-Gen zum Verlust der Enzymaktivität, erhöhten LDL-Cholesterinspiegeln und einer reduzierte Sekretion von Gallensäuren führt. Für das Gen des kanalikulären Lecithin-Transporters (*ABCB4*) wurden ebenfalls Assoziationen mit der Cholesterincholelithiasis nachgewiesen. *Abcb4*-Knockout-Mäuse, bei denen die Phosphatidylcholinflippase ausgeschaltet wurde, entwickeln intrahepatische Gallensteine (56). Das fehlende Phosphatidylcholin führt zur Übersättigung der Galle mit Cholesterin, so dass Cholesterinkristalle präzipitieren. Außerdem konnten kürzlich bei einzelnen Gallensteinpatienten Mutationen im *ABCB4*-Gen identifiziert werden (57).

## 1.4 Identifizierung muriner Gallensteingene

Murine Gallensteingene wurden durch Quantitativ Trait Locus (QTL)-Analysen in Inzuchtmausstämmen identifiziert. Die QTL-Analyse ermöglicht die Entdeckung von krankheitsrelevanten Genen, die einem speziellen Phänotyp zugrunde liegen, und eine Abgrenzung primärer Gendefekte von sekundären pathophysiologischen Konsequenzen. Die QTL-Analyse beruht auf folgender Methodik: Zwei Inzuchtstämme mit unterschiedlicher Krankheitsprädisposition werden miteinander verpaart. Bei allen Nachkommen werden krankheitsrelevante Merkmale charakterisiert. Anschließend werden genetische Marker, die sich zwischen beiden Inzuchtstämmen unterscheiden, ausgewählt und die Nachkommen genotypisiert. Das Ziel der QTL-Analyse ist die Identifizierung von Assoziationen zwischen den Marker-Genotypen und dem Phänotyp. Die Ergebnisse mehrerer QTL-Analysen wurden in einer murinen Gallensteinkarte zusammengefasst (Abb. 2). Diese Karte liefert wertvolle Hinweise für entsprechende Kandidatengene beim Menschen.



**Abb. 2** Die murine Gallensteinkarte. Kandidatengene und QTLs für die Cholesterincholelithiasis nach LAMMERT et al. (58).



Im Mausmodell identifizierte Kandidatengene können nicht vorbehaltlos auf den Menschen übertragen werden. Die hohe genetische Verwandtschaft zwischen Mensch und Maus sowie die phänotypischen Gemeinsamkeiten der Steinentstehung, legen jedoch nahe, die orthologen humanen Gene zu untersuchen. Es wurden bisher 5 *Lith*-Loci identifiziert, deren genetische Marker mit dem Auftreten von Gallensteinen assoziiert sind (58). In Tab. 2 sind die *Lith*-Loci 1-5 mit ihren Gallensteinkandidatengenen und ihren chromosomalen Lokalisationen zusammengefasst.

**Tab. 2** Murine Gallenstein-QTLs und ihre Kandidatengene

QTL-Bezeichnung	Mauschromosom	Kandidatengene	Gensymbol
<i>Lith1</i>	2	Gallensäurenexportpumpe LDL receptor-related protein 2	<i>Abcb11</i> <i>Lrp2</i>
<i>Lith2</i>	19	Multispezifischer organischer Anionentransporter	<i>Abcc2</i>
<i>Lith3</i>	17	Organischer Kationentransporter	<i>Slc22a1</i>
<i>Lith4</i>	X	3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase	<i>Nsdhl</i>
<i>Lith5</i>	9	Hepatische Lipase C	<i>Lipc</i>

*Lith1*, auf dem murinen Chromosom 2, erreichte den höchsten Logarithm of the Odds ratio (LOD-Score, ein Maß für die Kopplungswahrscheinlichkeit) und umfasst zwei in der Gallensteinpathogenese möglicherweise relevante Gene: das Gen der hepatischen Gallensäurenexportpumpe *Abcb11* und das Gen des *Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 2* (*Lrp2*).

*ABCB11* gehört zur Familie der ABC-Transportergene und wurde aufgrund der Verwandtschaft zu der MDR P-Glykoprotein Familie zuvor als Sister of P-Glycoprotein (*SPGP*) bezeichnet (59). *ABCB11* wird vorwiegend in der Leber exprimiert und transportiert ATP-abhängig monovalente Gallensäuren über die kanalikuläre Hepatozytenmembran in die Gallekanalikuli. Eine Veränderung der Proteinstruktur, der Regulation oder der Expression der Gallensäurenexportpumpe führt zu einer Störung der biliären Lipidhomöostase, die sich als progressive familiäre intrahepatische Cholestase (PFIC) manifestieren kann (60).

Ein weiteres Gen im *Lith1*-Locus ist das *Lrp2*-Gen. Dieser Rezeptor gehört zur LDL-Rezeptorgen-Familie und besitzt eine der größten extrazellulären Proteindomänen (61). Initial

wurde der Rezeptor als wichtigstes Autoantigen bei der Heymann-Glomerulonephritis entdeckt (61, 62). Die HEYMANNSche Nephritis wurde an Ratten in einem experimentellen Modell induziert. Auslöser sind sowohl Antigene, gewonnen aus dem Bürstensaum des renalen proximalen Tubulus, als auch Antikörper gegen diesen Bürstensaum. Als auslösendes Antigen wurde LRP2 in einem Komplex mit dem Rezeptor assoziierten Protein (RAP) identifiziert. Frühere Bezeichnungen für *LRP2* waren Glykoprotein 330 (GP330) oder Megalin (62). *LRP2* wird vornehmlich im Ileum, den proximalen Tubuli der Niere, in der Lunge und im Ventrikelsystem des ZNS exprimiert. Extrazelluläre Liganden für LRP2 sind unter anderem APOE, APOB, Vitamin-D bindendes Protein und retinal bindendes Protein. Megalin ist für die Entwicklung des Frontalhirns notwendig (63), spielt aber nicht nur im zentralnervösen Fettstoffwechsel eine entscheidende Rolle, sondern könnte auch im hepatischen Cholesterinmetabolismus relevant sein. LRP2 bindet Liganden, die im Lipidmetabolismus (APOE) sowie in der Homöostase lipophiler Hormone (Vitamin-D bindendes Protein) eine Rolle spielen. Die Aufnahme von Cholesterin, Lipoproteinen und Lipasen durch epitheliale Gewebe (Niere, ZNS, Lunge und Intestinum) über LRP2 kann möglicherweise den Lipidmetabolismus beeinflussen (64, 65).

Zudem ergaben die murinen Genomanalysen mit dem hepatischen HDL-Rezeptor (*Srb1*) auf Chromosom 5 und *ApoE* auf Chromosom 7 weitere QTL-Kandidatengene. Nach adenoviraler Überexpression von *Srb1* zeigten Inzuchtmäuse signifikant erniedrigte HDL-Plasma-Konzentrationen und erhöhte biliäre Cholesterinspiegel (66, 67). Gallensteinsusceptible Mäuse wiesen zudem eine Überexpression von *Srb1* gegenüber gallensteinresistenten Mäusen auf. Schon vorangegangene Studien ließen einen möglichen Zusammenhang zwischen dem HDL-Metabolismus, *Srb1* und Gallensteinen erkennen. MARDONES et al. (68) untersuchten *Srb1*-Knock-out Mäuse mit dem Ergebnis, dass selektiv die biliäre Cholesterinsekretion herabgesetzt wurde, wobei keine Veränderungen der Gallensäuren- bzw. Phospholipidsekretion auftraten. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Scavenger Rezeptor BI auch vom Gallenblasenepithel exprimiert wird (69). Die Expression des HDL-Rezeptors in Cholangiozyten könnte eine Rolle bei der Regulation der Cholesterinabsorption und – homöostase spielen. In einem spanischen Patientenkollektiv konnte ACTON et al. (70) drei Polymorphismen identifizieren, die mit dem BMI, dem HDL- und dem Triglyzeridspiegel assoziiert waren. Diese Erkenntnisse sprechen ebenfalls für eine potentielle Rolle des hepatischen Scavenger Rezeptors BI im hepatobiliären Cholesterinmetabolismus und der Gallensteinentstehung.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Die Identifizierung von potenziellen Kandidatengen für die Entstehung und das Wachstum von Cholesterinsteinen im Mausmodell eröffnet die Möglichkeit, die zuvor noch nicht bei Gallensteinpatienten untersuchten orthologen humanen Gene zu testen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Assoziationen zwischen der Cholesterincholelithiasis bzw. lithogenen Risikofaktoren und genetischen Varianten in humanen Kandidatengen zu identifizieren und charakterisieren.

Zunächst sollten Polymorphismen in viel versprechenden Kandidatengen ausgewählt werden. Hierfür wurde auf die murine Gallensteinkarte zurückgegriffen. Die bereits in der Maus identifizierten *Lith*-Gene (*Abcb11*, *Lrp2*, *Lipc* und *Srb1*) wurden herangezogen, um genetische Varianten in den orthologen humanen Genen zu identifizieren und zu typisieren. Weiterhin sollten Polymorphismen attraktiver humaner Kandidatengene aufgenommen werden, über die bereits in der Literatur oder in Datenbanken Informationen bestanden. Entscheidend waren hierbei Angaben zu Allelfrequenzen und Proteinstrukturen, die eine Wertung der Polymorphismen ermöglichen. Zudem sollten als Kontrollen bekannte humane Kandidatengene (*APOE* und *CETP*) in diese Arbeit aufgenommen werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Genotypisierungen waren anschließend mit Hilfe uni- und multivariater Methoden sowie populationsgenetischer Tests auszuwerten, um Assoziationen zwischen den genetischen Markern und dem Auftreten von Gallensteinen oder Surrogatmarkern des Cholesterinstoffwechsels aufzudecken.

Mit Untersuchungen zu humanen *LITH*-Genen sollen sich primäre genetische Determinanten der Cholesterincholelithiasis von sekundären pathophysiologischen Einflüssen abgrenzen lassen. Die Identifizierung genetischer Risikofaktoren bildet die Voraussetzung für neue Ansätze zur Risikoabschätzung, Prävention und Therapie der Cholesterincholelithiasis.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv und Studienaufbau

Im Zeitraum von Oktober 2000 bis November 2001 wurden 700 Patienten der Medizinischen Klinik III und 47 Patienten der Chirurgischen Klinik des Klinikums der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule (RWTH) Aachen rekrutiert. Die Rekrutierung des Patientenkollektivs begann, sobald das Votum der Ethikkommission gemäß den geltenden Richtlinien vorlag.

Die chirurgischen Patienten wiesen symptomatische Gallensteine auf, welche durch eine abdominelle Ultraschalluntersuchung verifiziert und operativ durch eine Cholezystektomie entfernt wurden. Im Ultraschall wurden Gallensteine diagnostiziert, wenn mobile intraluminale echoreiche Strukturen mit dorsalem Schallschatten in der Gallenblase vorhanden waren. Unter den internistischen Patienten, bei denen ebenfalls eine abdominelle Ultraschalluntersuchung durchgeführt wurde, ließen sich bei 188 Patienten asymptomatische Gallensteine (26,9%) nachweisen.

Die vorliegende Arbeit wurde in Form einer Fall-Kontroll-Studie durchgeführt. Bei der Auswahl der Versuchspersonen wurde beachtet, dass die Kontrollen frei von der zu untersuchenden Erkrankung (Gallensteine) waren und - um möglichst gleiche Rahmenbedingungen zu schaffen - aus dem gleichen Patientenkollektiv stammten (71, 72).

Um genetische Faktoren der Cholecystolithiasis aufzudecken, muss der Einfluss von Risikofaktoren innerhalb einer Studie möglichst klein gehalten werden. Dies ist bei einer Fall-Kontroll-Studie dadurch möglich, dass Fälle und Kontrollen so in Paaren zusammengefasst werden, dass diese identische Risikofaktoren besitzen (Matching). In dieser Arbeit wurde für die Risikofaktoren Alter, Geschlecht und BMI gematcht und 184 Paare gebildet. Der BMI wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{BMI} = \frac{\text{Gewicht in Kilogramm}}{(\text{Größe in Meter})^2}$$

## 2.2 DNA-Isolierung

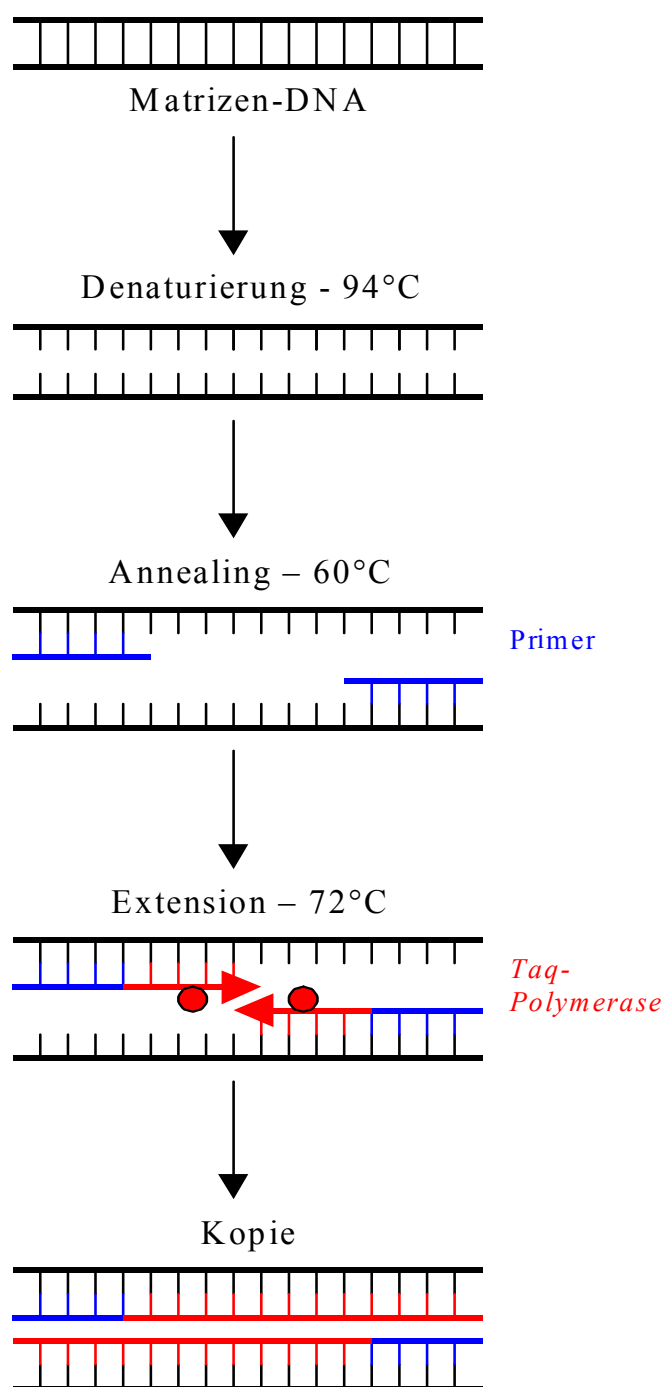
Die DNA Isolierung erfolgte aus Vollblut. Das aus einer cubitalen Venenpunktion gewonnene Vollblut wurde zur Gerinnungshemmung mit EDTA (Ethyldiamintetraacetat) versetzt, welches zugleich Aktivitäten von Nukleasen reduziert. Die Aufbewahrung der EDTA-Monovette erfolgte bis zum Zeitpunkt der Isolation bei 4°C; ansonsten wurden die Proben bei -70°C eingefroren. Die Isolation genomischer DNA wurde mit Hilfe des *DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Dazu wurden 200 µl Vollblut mit 200 µl Buffer AL, zur Lyse der Blutzellen, und 20 µl Protease, zum weitgehenden Abbau denaturierter Proteine, versetzt, gut vermischt (Vortex) und anschließend bei 56°C 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl 100% Ethanol und anschließendem Vortexen wurde die Probe in eine *QIAamp Spin Column* mit integriertem Sammelröhrchen pipettiert. Diese wurde 1 min bei 8.000 U/min zentrifugiert. Eine in der *Spin Column* enthaltene Silika-Gel-Membran bindet die durch den Alkohol dehydratisierte genomische DNA pH-abhängig. Waschschriffe mit 500 µl AW1-Buffer (1 min bei 8.000 U/min) und 500 µl AW2-Buffer (3 min bei 14.000 U/min) dienen zur Aufreinigung der Probe von Salzrückständen. Um die genomische DNA von der Silika-Gel-Membran zu lösen, wurde die Probe mit 2 x 100µl *Elutions Buffer* oder ddH<sub>2</sub>O 1 min bei 8.000 U/min zentrifugiert und in ein Reaktionsgefäß eluiert. Die DNA-Ausbeute betrug ca. 3-12 µg (~ 30 ng/µl). Anschließend wurde die DNA bei 70°C eingefroren.

## 2.3 Quantifizierung des DNA-Gehaltes

Zur Quantifizierung des DNA-Gehaltes diente ein Fluorometer (Biorad, München) mit Verwendung des Farbstoffes Pico-Green (Molecular Probes, Leiden NL). Dieser Farbstoff ändert seine Extinktions- und Emissionseigenschaften abhängig vom DNA-Gehalt in der Lösung. Die Messung wurde mit UV-Licht einer Wellenlänge von 360 nm durchgeführt. Als Leuchtquelle stand eine Quecksilberlampe zur Verfügung. Diese Methode ermöglicht nur die Messung relativer Werte und muss mit Hilfe einer Standardprobe geeicht werden. Als Standard wurde DNA des Bakteriophagen λ (2ng/µl, Molecular Probes, Leiden NL) genutzt, und als Probenpuffer diente TNE (10 mM TRIS, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4). Der DNA-Gehalt einer Probe ließ sich durch den Fluoreszenzunterschied zwischen Probe und Standardprobe ermitteln.

## 2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient zur exponentiellen Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Abschnittes einer DNA-Matrize (template). Ausgangspunkt ist eine thermische Denaturierung der genomischen DNA bei 94°C. Die im Überschuss zugesetzten Primer (Oligonukleotide, MWG, Ebersberg) binden mit einer Länge von 18 - 34 bp temperaturabhängig (50-70°C) an die entstandenen DNA-Einzelstränge (annealing). Je höher die Annealing-Temperatur gewählt wird, desto spezifischer wird die PCR. Bei Fragmenten bis zu 3 Kilobasenpaaren (kb) Länge wurde die *Taq*-DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (Peqlab, Erlangen) verwendet. Die Amplifikation erfolgte in 25-40 PCR-Zyklen, durch deren Anzahl die Quantität und Spezifität des Produktes gegenläufig beeinflusst wurden. Das Pipettierschema in Tab. 3 wurde für die durchgeführten PCR-Reaktionen verwendet.



**Abb. 3** Schematische Darstellung der PCR

Eine Ausnahme bildet die *APOE*-Genotypisierung, bei der mit Hilfe von 2  $\mu\text{l}$  des PCR-Beschleunigers Dimethyl-sulfoxid (DMSO) die Effektivität und Spezifität der PCR gesteigert werden konnte. Außerdem wurde bei den PCR-Reaktionen für die SNaPshot-Methode (s.u.) kein Kresol-Rot eingesetzt.

**Tab. 3** Pipettierschema für PCR-Reaktionen

3 $\mu\text{l}$	DNA (20-100 ng)
9,1 $\mu\text{l}$	ddH <sub>2</sub> O
1 $\mu\text{l}$	Forward Primer (10pmol/ $\mu\text{l}$ )
1 $\mu\text{l}$	Reverse Primer (10pmol/ $\mu\text{l}$ )
0,1 $\mu\text{l}$	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )
3 $\mu\text{l}$	Kresol-Rot
0,8 $\mu\text{l}$	dNTP Lösung (10 mM gesamt)
20 $\mu\text{l}$	Gesamtvolumen

## 2.5 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Nukleinsäuren besitzen chemisch-physikalisch geladene oder ionisierbare Gruppen. Aufgrund dieser Eigenschaft können sie in einem elektrischen Feld gerichtet bewegt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt in erster Linie von der Länge, der Konformation, dem pH-Wert, dem Laufpuffer, der Spannung und der Gelkonzentration ab. Der Logarithmus der elektrophoretischen Beweglichkeit der DNA-Moleküle ist proportional zur Agarosekonzentration. Agarose ist ein lineares Polysaccharid (...D-galactose/3,6-anhydro-L-galactose...), das aus Seetang extrahiert wird. Durch Aufkochen in einer Pufferlösung wurde sie geschmolzen und in eine Gelform gebracht. Dabei bildete sich eine homogene Gelmatrix, deren Porengröße bzw. Vernetzungsgrad konzentrationsabhängig war. Es wurden 0,5 - 4%ige Agarosegele (Roth, Karlsruhe) und 4% NuSieve Agarosegele 3:1 (Biozym) verwendet. Als Laufpuffer diente TBE (90 mM TRIS/Borat, 0,5 mM EDTA, pH 8) und als Probenpuffer Kresol-Rot (6% Saccharose, 1mM Kresol-Rot). Um Nukleinsäuren für das menschliche Auge sichtbar zu machen, wurden 3  $\mu\text{l}/\text{ml}$  Ethidiumbromid (EtBr) der Agarose zugesetzt. EtBr ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der auf Grund seines Ringsystems mit den DNA-Basenpaaren interkaliert und fixiert wird. Durch UV Licht wird der Fluoreszenzfarbstoff angeregt und leuchtet orange-rot. Des Weiteren wurden DNA-Marker (Roche, Mannheim) als Größenstandards eingesetzt. Um die Ergebnisse der Agarosegele elektronisch zu dokumentieren, wurde ein Charged Coupled Device (CCD)-Kamera-System (Fluor S Multiimager, Biorad, München) verwendet.

## 2.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um amplifizierte DNA-Fragmente nach einer Gelelektrophorese weiter verarbeiten zu können, z. B. für eine DNA-Sequenzierung, erfolgte eine Gelextraktion mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden). Die aus dem Agarosegel geschnittene DNA-Bande wurde mit dem dreifachen Volumen QG Puffer bei 50°C für 10 min bis zur vollständigen Auflösung der Agarose inkubiert. Anschließend wurde nach Zugabe eines Volumens Isopropanol die Lösung in eine *Spin Column* pipettiert und bei 13.000 U/min 1 min zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit 500 µl QG Puffer bzw. 750 µl PE Puffer (Zentrifugation mit 13.000 U/min für 1 min). Der letzte Schritt beinhaltete die Elution des DNA-Fragmentes durch Zentrifugation (1 min bei 13.000 U/min) mit 50 µl EB Puffer. Das gewonnene DNA-Fragment wurde bei -20°C eingefroren.

## 2.7 Genotypisierung

### 2.7.1 DNA-Sequenzierung

Die heute gebräuchliche „Kettenabbruch“-Methode nach Sanger beruht auf der enzymatischen Neusynthese eines markierten komplementären DNA-Einzelstranges, die basenspezifisch unterbrochen wird (73). Wichtige Bestandteile dieser Technik sind die Verwendung spezifischer Primer bei der Durchführung der PCR, die Zugabe von Deoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), der basenspezifische Kettenabbruch durch die Zugabe von fluoreszenzmarkierten Dideoxynukleosidtriphosphaten (ddNTP, Abbruchnukleotide), deren fehlende 3'-OH-Gruppe eine weitere Strangsynthese unmöglich macht, und der Gebrauch von denaturierenden Polyacrylamidgelen, die es erlauben, Einzelstrang-DNA-Fragmente, die sich in ihrer Länge nur um eine Base unterscheiden, aufzutrennen. Die neu synthetisierten Einzelstränge mit den fluoreszenzmarkierten ddNTPs wurden bei angelegter Spannung der Größe nach im Polymer aufgetrennt. Die fluoreszenzmarkierten Nukleotide wurden nach einer definierten Strecke durch einen Laser detektiert. Die basenspezifischen und der Größe nach sortierten Signale ergaben dann die DNA-Sequenz.



### 2.7.1.1 Sequenzierungs-PCR

Für die Sequenzierungs-PCR wurden, abhängig von der Fragmentlänge, 10 – 100 ng geextrahierte DNA eingesetzt. Der 20 µl Sequenzierungs-PCR-Ansatz bestand aus 4 µl *Big Dye Terminator Reaction Mix* (Applied Biosystems, Weiterstadt), in dem dNTPs und fluoreszenzmarkierte ddNTPs, 0,5 µM des spezifischen Primers und ddH<sub>2</sub>O enthalten waren. Das Programm für die Sequenzierung ist Tab. 4 zu entnehmen.

**Tab. 4** PCR Programm zur Sequenzierung

Schritte	Temperatur	Dauer	Zyklen
1.	96°C	20 sek	
2.	50°C	20 sek	
3.	60°C	4 min	3. an 1. - 25 x
4.	4°C	Pause	

### 2.7.1.2 Aufreinigung der Sequenzierungs-PCR

Der 20 µl Sequenzierungs-PCR-Ansatz wurde mit 80 µl ddH<sub>2</sub>O, 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 250 µl absolutem Ethanol gut vermischt und 25 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen (8 min bei 13.000 U/min zentrifugiert). Nach wiederholtem Verwerfen des Überstandes trocknete das Pellet bei Raumtemperatur und wurde anschließend bei –20°C gelagert.

### 2.7.1.3 Kapillarelektrophorese

Zur Sequenzierungsvorbereitung wurde das Pellet in 24 µl *Template Suppression Reagent* (Applied Biosystems) gelöst und 10 min unter Lichtabschluss inkubiert, anschließend 2 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte auf dem Polymer POP-

**Tab. 5** Laufbedingungen für Sequenzen

Injektionszeit	30 sec
Injektionsspannung	2,0 kV
Laufzeit	36 min
Laufspannung	15,0 kV
Temperatur	50°C

6 im automatischen Kapillar-Sequenzierer *ABI Prism 310* (Applied Biosystems) mit den in Tab. 5 genannten Laufbedingungen. Zur Analyse der Sequenzen wurde die „*Sequencing Analysis*“-Software (Applied Biosystems) herangezogen.

## 2.7.2 Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen

Die Genotypisierung erfolgte neben der Sequenzierung als zeit- und kostengünstigere Methode auch mit Hilfe des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP). Diese Methode nutzte Endonukleasen (Restriktionsenzyme), die spezifische DNA-Sequenzen erkannten und an definierten Stellen schnitten. War diese Erkennungssequenz so verändert, dass ein Erkennen durch das spezifische Restriktionsenzym nicht mehr möglich war, blieb die DNA ungeschnitten. Veränderungen der Sequenz können unterschiedlicher Genese sein, wie z.B. Insertionen, Deletionen oder wie die in dieser Arbeit untersuchten SNPs. Fragmente definierter Länge wurden somit durch Restriktionsenzyme genotypabhängig in unterschiedlich große Fragmente geschnitten. Falls beide Allele die Schnittstelle aufwiesen, wurden die Fragmente vollständig geschnitten. Besaß jedoch kein Allel die zum Schneiden benötigte Sequenz, verblieben die Amplifikate ungeschnitten. War nun eine Heterozygotie für die Schnittstelle vorhanden, wurde eine Hälfte der DNA-Fragmente geschnitten und die zweite blieb ungeschnitten bestehen. Somit resultierte aus der Variation des Genotyps die Variabilität der Fragmentgrößen bei einem RFLP.

### 2.7.2.1 *Scavenger Receptor Class B Type I (SRB1)*

Zwei SNPs im Exon 8 und Intron 5 des *SRB1*-Gens wurden als RFLPs untersucht. Diese Polymorphismen wurden zuvor von ACTON et al. an einem spanischen Kollektiv getestet (70). Der Exon 8 Polymorphismus befindet sich an der Position 1050 der cDNA und führt zu einem Basenpaaraustausch zwischen Cytosin und Thymin, allerdings zu keinem Aminosäureaustausch an der Position 350 des Proteins. Mit den in Tab. 6 aufgeführten PCR-Bedingungen wurde das 218 bp lange Exon 8-Fragment amplifiziert und anschließend bei 37°C 1 h mit 5 Units *HaeIII* (10 U/µl) und 2 µl SuRE/Cut-Puffer M (Roche, Mannheim) verdaut. Das Intron 5 Fragment mit einer Länge von 291 bp wurde mit den in Tab. 7 genannten PCR-Bedingungen vervielfältigt. Hier wurde das PCR-Produkt 1 h bei 30°C mit 5 Units der Endonuklease *ApaI* (10 U/µl) und 2 µl SuRE/Cut-Puffer A inkubiert.

**Tab. 6** PCR-Programm – *SRBI* Exon 8 SNP

Schritte	Temp.	Dauer	Zyklen
1.	94°C	2 min	
2.	94°C	40 sec	
3.	<b>66°C</b>	30 sec	
4.	72°C	1 min	4. an 2. - 35 x
5.	72°C	5 min	
6.	4°C	Pause	

**Tab. 7** PCR-Programm – *SRBI* Intron 5 SNP

Schritte	Temp.	Dauer	Zyklen
1.	94°C	2 min	
2.	94°C	40 sec	
3.	<b>57°C</b>	30 sec	
4.	72°C	1 min	4. an 2. - 35 x
5.	72°C	5 min	
6.	4°C	Pause	

Die DNA wurden anschließend auf ein 4%iges NuSieves 3:1 Agarosegel aufgetragen und bei einer Spannung von 120 V und einer Laufzeit von 2 - 3 h gelelektrophoretisch aufgetrennt. Mit dem Charged Coupled Device (CCD)-Kamera-System (Biorad, München) wurden die Gele mit UV-Licht dokumentiert. Die resultierenden DNA-Fragmente zur Identifizierung des Genotyps sind der Tab. 8 zu entnehmen.

**Tab. 8** PCR Primer, Restriktionsenzyme und Fragmentlängen für die SNPs im *SRBI*-Gen

SNP	Primer	Enzym	Fragmentlängen, bp
Exon 8 (C/T)	forward: 5'- CCT TGT TTC TCT CCC ATC CTC ACT TCC TCA AGG C -3'	<i>HaeIII</i> (1 U) 37°C, >1h 5'...GG!CC...3'	CC: 154, 33, 31
	reverse: 5'- CAC CAC CCC AGC CCA CAG CAG C -3'		CT: 154, 64, 33, 31
			TT: 154, 64
Intron 5 (C/T)	forward: 5'- GCC CAG AAT GTT CAG ACC AG -3'	<i>ApaI</i> (1 U) 30°C, >1h 5'...GGGCC!C...3'	CC: 194, 67, 30
	reverse: 5'- GCA CCC TCT TCA CGA CAA AG -3'		CT: 194, 97, 67, 30
			TT: 194, 97

### 2.7.2.2 Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 2 (*LRP2*)

Die beiden SNPs im *LRP2*-Gen, SNP-2 (rs831042, IMS-JST002717) und SNP-3 (rs2075252, IMS-JST002712), befinden sich in der codierenden DNA-Sequenz. Der SNP-2 Polymorphismus befindet sich im Exon 24 und führt zu einer Silent Mutation, bei der die Aminosäure Alanin bestehen bleibt. Die genetische Variation SNP-3 in Exon 66 führt zu einem Aminosäureaustausch, wobei Glutamin durch Arginin ersetzt wird. Beide

Polymorphismen wurden mit den in Tab. 11 genannten Primern und den spezifischen PCR-Programmen typisiert (Tab. 9 und Tab. 10).

**Tab. 9** PCR-Programm – *LRP2* SNP-2

Schritte	Temp.	Dauer	Zyklen
1.	94°C	2 min	
2.	94°C	40 sec	
3.	<b>58°C</b>	30 sec	
4.	72°C	1 min	4. an 2. - 34 x
5.	72°C	5 min	
6.	4°C	Pause	

**Tab. 10** PCR-Programm – *LRP2* SNP-3

Schritte	Temp.	Dauer	Zyklen
1.	94°C	2 min	
2.	94°C	40 sec	
3.	<b>59°C</b>	30 sec	
4.	72°C	1 min	4. an 2. - 35 x
5.	72°C	5 min	
6.	4°C	Pause	

Das 414 bp große Amplifikat von SNP-2 wurde anschließend mit 5 Units des Restriktionsenzym *AciI* (10 U/μl) und 2 μl Buffer 3 (New England Biolabs, Frankfurt) 12 h bei 37°C inkubiert. Die spezifischen Größen der entstandenen Fragmente können aus der Tab. 11 entnommen und den Genotypen zugeordnet werden. Dem 366 bp langen PCR-Produkt wurden 5 Units *HpyI88III* (10U/μl), 0,2 μl BSA und 2 μl Buffer 4 (New England Biolabs, Frankfurt) beigemischt und 12 h bei 37°C inkubiert. In diesem Fragment befanden sich zwei obligate Schnittstellen für das Restriktionsenzym *HpyI88III*, aus diesem Grund ergaben sich immer drei Fragmente der Größe 83 bp, 43 bp und 40 bp. Der untersuchte Polymorphismus bildete die dritte Schnittstelle und abhängig vom Genotyp entstanden bis zu sechs Fragmente. Die Produkte wurden anschließend auf ein 4%iges NuSieves 3:1 Agarosegel aufgetragen und anschließend dokumentiert (s.o.).

**Tab. 11** PCR Primer, PCR Bedingungen und Restriktionsenzyme für die SNPs im *LRP2*-Gen

SNP	Primer	Enzym	Fragmentlängen, bp
SNP-2 (G/A)	forward: 5'- GAT GGG TTG ATG GGT GCA G -3'	<i>AciI</i> (1 U)	GG: 282, 132
	reverse: 5'- CCT TTG AGG ATA CTT TCC CCC -3'	37°C, >1h	GA: 414, 282, 132
		5'...C!CGC...3'	AA: 414
SNP-3 (G/A)	forward: 5'- GCT CTC CTT TGT TGC TAC TGC C -3'	<i>HpyI88III</i> (1 U)	GG: 160, 40, (83,43,40)
	reverse: 5'- AGG ATA AAC CCC AGT GAT CGG -3'	37°C, >1h	GA: 200, 160, 40, (83,43,40)
		5'...TC!NNGA...3'	AA: 200 (83,43,40)

### 2.7.2.3 Cholesterinester-Transferprotein (CETP)

Der untersuchte Polymorphismus im *CETP*-Gen befindet sich im Intron 1. Mit dem in Tab. 12 gezeigtem PCR-Programm und in den in Tab. 13 aufgeführten Primern konnte ein 524 bp großes Fragment amplifiziert werden. Durch zweistündige Inkubation mit 5 Units (10U/ $\mu$ l) *TaqI* und 2  $\mu$ l Buffer B (Roche,

Mannheim) wurde das Fragment bei 65°C verdaut. Die resultierenden Genotypen sind aus der Tab. 13 abzulesen. Die Produkte wurden anschließend auf ein 4%iges NuSieves 3:1 Agarosegel aufgetragen und anschließend dokumentiert (s.o.).

**Tab. 12** PCR Programm *CETP-TaqIB* SNP

Schritte	Temperatur	Dauer	Zyklen
1.	94°C	2 min	
2.	94°C	40 sec	
3.	58°C	30 sek	
4.	72°C	1 min	4. an 2. - 29 x
5.	72°C	5 min	
6.	4°C	Pause	

**Tab. 13** PCR Primer, PCR Bedingungen und Restriktionsenzyme für den SNP im *CETP*-Gen

SNP	Primer	Enzym	Fragmentlänge, bp
<i>CETP</i>	forward: 5'- CAC TAG CCC AGA GAG AGG AGT GCC -3'	<i>TaqI</i> (1 U)	B1B1: 350, 174
<i>TaqIB</i>	reverse: 5'- CTG AGC CCA GCC GCA CAC TAA C -3'	65°C, >1h	B1B2: 524, 350, 174
		5'...T!CGA...3'	B2B2: 524

### 2.7.2.4 Hepatische Lipase (LIPC)

Das Gen der hepatischen Lipase wurde auf einen Promotor-Polymorphismus hin untersucht, der sich an der Position -514 befindet und einen Austausch der Basen Cytosin und Thymin zur Folge hat. Mit dem spezifischen PCR-Programm und den dazugehörigen Primern wurde ein Fragment mit der Länge von 300 bp amplifiziert (Tab. 14 und 15). Der 20  $\mu$ l

**Tab. 14** PCR Programm *LIPC* SNP

Schritte	Temperatur	Dauer	Zyklen
1.	96°C	3 min	
2.	96°C	1 min	
3.	58°C	1 min	
4.	72°C	1 min	4. an 2. - 35 x
5.	72°C	5 min	
6.	4°C	Pause	

PCR-Ansatz wurde anschließend mit 5 Units (10 U/ $\mu$ l) *NlaIII*, 0,2  $\mu$ l BSA und 2  $\mu$ l Buffer 4 (New England Biolabs, Frankfurt) 1 h bei 37°C inkubiert. Die resultierenden Fragmente und deren Genotypen sind aus Tab. 15 ersichtlich. Die Produkte wurden anschließend auf ein 4%iges Nusieves 3:1 Agarosegel aufgetragen und anschließend dokumentiert (s.o.).

**Tab. 15** PCR Primer und Restriktionsenzyme für den SNP im *LIPC*-Gen

SNP	Primer	Enzym	Fragmentlängen, bp
<i>LIPC</i>	forward: 5'- AAG AAG TGT GTT TAC TCT AGG ATC A -3'	<i>NlaIII</i> (1 U) 37°C	CC: 300
	reverse: 5'- GGT GGC TTC CAC GTG GCT GCC TAA G -3'		CT: 300, 215, 85 TT: 215, 85

### 2.7.2.5 Apolipoprotein E (APOE)

In dem Gen für das Apolipoprotein E befinden sich zwei Polymorphismen an den Codonpositionen 112 und 158. Beide Polymorphismen führen zu einem Aminosäureaustausch zwischen Arginin und Cystein und sind die Ursache für drei verschiedene Isoformen des Proteins. APOE2 besitzt an beiden Positionen Cystein, APOE4 an beiden Positionen Arginin und APOE3 an der Position 112 Cystein und an der Position 158 Arginin. Aus diesem Sachverhalt ergeben sich sechs mögliche Genotypen ( $\epsilon$ 2/2,  $\epsilon$ 2/3,  $\epsilon$ 2/4,  $\epsilon$ 3/3,  $\epsilon$ 3/4 und  $\epsilon$ 4/4). Das 244 bp lange PCR-Produkt wurde mit Hilfe des in Tab. 16 aufgelisteten PCR-Programms, den spezifischen Primern (Tab. 17) und unter Verwendung von DMSO nach dem Protokoll von HIXON et al. amplifiziert (74). Eine Inkubation über 12 h bei 37°C mit der Endonuklease *HhaI*

(10U/ $\mu$ l), 0,2  $\mu$ l BSA und 2  $\mu$ l Buffer 4 (New England Biolabs, Frankfurt) führte zum Verdau des Fragmentes. Die resultierenden Fragmentlängen und Genotypen fasst Tab. 17 zusammen. Die Produkte wurden anschließend auf ein 4%iges Nusieves 3:1 Agarosegel aufgetragen und dokumentiert (s.o.).

**Tab. 16** PCR Programm *APOE*

Schritte	Temperatur	Dauer	Zyklen
1.	95°C	5 min	
2.	95°C	30 sek	
3.	60°C	30 sek	
4.	72°C	45 sek	4. an 2. - 29 x
5.	72°C	5 min	
6.	4°C	Pause	

**Tab. 17** PCR Primer und Restriktionsenzyme für den SNP im *APOE*-Gen

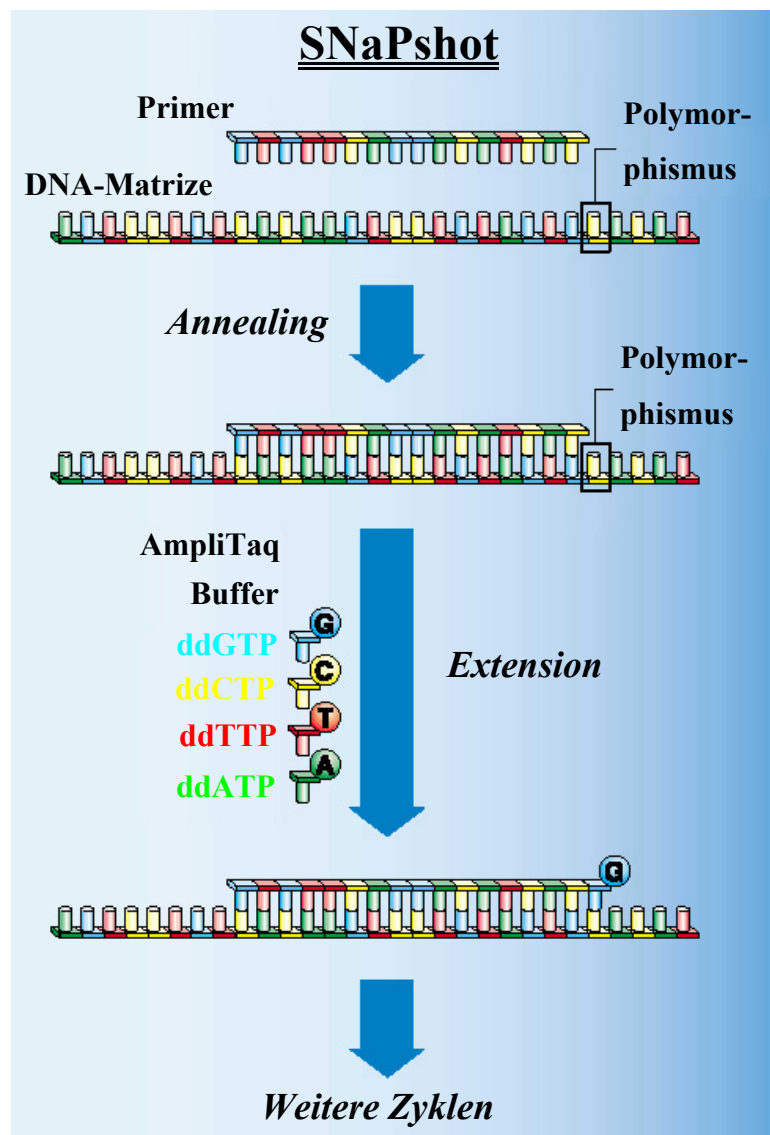
SNP	Primer	Enzym	Fragmentlänge, bp
<i>APOE</i>	forward: 5'- TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A -3'	<i>HhaI</i> (1 U)	ε2/2: 91, 83
	reverse: 5'- ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC -3'	37°C	ε2/3: 91, 83, 48, 35
		5'...GCG!C...3'	ε3/3: 91, 48, 35
			ε2/4: 91, 83, 72, 48, 35, 19
			ε3/4: 91, 72, 48, 35, 19
			ε4/4: 72, 48, 35, 19

### 2.7.3 SNaPshot

#### 2.7.3.1 SNaPshot Methode

Zur Genotypisierung zweier SNPs im *ABCB11*-Gen wurde die SNaPshot-Methode genutzt (75, 76). Diese Methode war zum Nachweis von SNPs der Sequenzierung und dem RFLP überlegen. Ihr Vorteil zeigte sich in einem höheren Durchsatz von Proben in verhältnismäßig geringer Zeit, zudem war eine Genotypisierung jedes Polymorphismus, unabhängig von der Existenz eines passenden Restriktionsenzym, möglich. Jedoch verursachte diese Methode höhere Kosten und musste zunächst etabliert werden, so dass nicht alle Polymorphismen mit dieser Methode typisiert wurden. In einer SNaPshot-Reaktion befanden sich aufgereinigtes PCR-Amplifikat, spezifische Primer und der *SNaPshot Multiplex Ready Mix* (Applied Biosystems). Im Mix waren die fluoreszenzmarkierten Abbruchnukleotide ddATP-dR6G, ddCTP-dTAMRA<sup>TM</sup>, ddUTP-dROX<sup>TM</sup> und ddGTP-dR110, die *Taq*-Polymerase AmpliTaq<sup>®</sup> und der *Multiplex Reaction Buffer* (Applied Biosystems) enthalten. Methodische Ähnlichkeiten zur Sequenzierung sind erkennbar (vgl. 1.7.1). In einer SNaPshot-Reaktion wurden die Primer so gewählt, dass sie exakt eine Base vor den zu untersuchenden Polymorphismus spezifisch an das amplifizierte Fragment binden. Durch die Amplifikationszyklen wurden, wie bei der Sequenzierung, farbmarkierte DNA-Stränge gebildet, die in diesem Fall aber nur eine Base lang waren, da in dem SNaPshot-Ansatz nur Abbruchnukleotide und keine dNTPs enthalten waren („Kurzsequenzierung“). Als Produkt erhielt man den spezifischen Primer mit einem an die Stelle des Polymorphismus eingebauten fluoreszenzmarkierten Abbruchnukleotid. Um eine Steigerung der Effizienz zu erzielen, können prinzipiell mehrere Polymorphismen in einer SNaPshot-Reaktion gleichzeitig

untersucht werden. Diesbezüglich können die verschiedenen PCR-Fragmente gepoolt (multiplexen) und später mit spezifischen Primern, die sich in ihrer Länge unterscheiden, in eine SNaPshot-Reaktion eingesetzt werden. Als Ergebnis resultieren die jeweils unterschiedlich großen Primer mit einer zusätzlich eingebauten fluoreszierenden Base. Nach kapillar-elektrophoretischer Auftrennung der SNaPshot-Fragmente im *Abi Prism 310* zeigen sich an den größenspezifischen Positionen die fluoreszenzmarkierten Basen, und diese konnten anschließend den verschiedenen Polymorphismen zugeordnet werden.



**Abb. 4** Schematische Darstellung der SNaPshot Methode

(Quelle: Applied Biosystems, Product Bulletin, ABI Prism SNaPshot Multiplex System)



### 2.7.3.2 ATP Binding Cassette B11 (*ABCB11*)

Die beiden untersuchten Polymorphismen des *ABCB11*-Gens befinden sich in Exon 9 und in Exon 13. Der Exon 9 Polymorphismus führt zu einem Basenaustausch zwischen Cytosin und Thymin (C/T) an der Exon Position 24 jedoch zu keinem Aminosäureaustausch (Tyr269Tyr). Auch der Exon 13 Polymorphismus führt zu einem Basenaustausch von Cytosin und Thymin (C/T) an der Position 23 im Exon 13, geht allerdings mit einem Aminosäureaustausch (Val444Ala) einher.

### 2.7.3.3 PCR

Zu Beginn wurde ein DNA-Fragment mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Die Primer und das spezifische PCR-Programm sind der Tab. 18 zu entnehmen. Das PCR-Produkt sollte eine Länge von maximal 200 bp aufweisen, um eine möglichst hohe Molarität des PCR-Produktes zu erhalten.

**Tab. 18** PCR Programm - *ABCB11* SNPs

Schritte	Temperatur	Dauer	Zyklen
1.	95°C	5 min	
2.	95°C	30 sec	
3.	60°C	30 sek	
4.	72°C	3 min	4. an 2. – 36 x
5.	72°C	5 min	
6.	4°C	Pause	

**Tab. 19** PCR-Primer für die Exon 13 und Exon 9 Polymorphismen *ABCB11*-Gen

SNP	Primer	Fragmentlängen (bp)
<i>ABCB11</i> Exon-9	forward: 5' – ATC TGC ATG TGT CTC TGG CG – 3'	592
	reverse: 5' – CCG CTT TGC ACA AAC TGA GAG – 3'	
<i>ABCB11</i> Exon-13	forward: 5' – ACT TCT TGG TCA TGG CTC TCA G – 3'	517
	reverse: 5' – AGC GTG TCC CAT CAA TTC AG – 3'	

In einem späteren Schritt wurden 0,01 bis 0,40 pmol dieses Amplifikats in eine SNaPshot-Reaktion eingesetzt. Die Molarität ließ sich mit folgender Formel berechnen:

$$\frac{10.000}{\text{Molekulargewicht des PCR-Produktes (Da)}} \times \text{DNA-Konzentration (ng/}\mu\text{l)} = \text{pmol/}\mu\text{l} ,$$

wobei sich das Molekulargewicht des PCR-Produktes wie folgt ergibt:

$$\text{Längedes PCR-Produktes (bp)} \times \frac{650 \text{ Da}}{\text{bp}} = \text{Molekulargewicht (Da)}$$

### 2.7.3.4 Aufreinigung der PCR für die SNaPshot-Reaktion

Nach der durchgeführten PCR befand sich die DNA in einer Lösung mit Primern, dNTPs, Enzymen und Puffer. Primer und dNTPs wurden mit den Enzymen *SAP* (*shrimp alkaline phosphatase*, 1 U/ $\mu$ l) oder *CIP* (*calf alkaline phosphatase*, 10 U/ $\mu$ l) und *EXO1* (*exonuclease I*, 20 U/ $\mu$ l) zersetzt. Zu 20  $\mu$ l PCR-Ansatz wurden 6 Units *SAP* oder *CIP* und 2,66 Units *EXO1* hinzugefügt und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme 15 min bei 75°C inaktiviert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

### 2.7.3.5 Design der SNaPshot-Primer

Die SNaPshot-Primer mussten einige Besonderheiten aufzuweisen. Die Länge der Primer sollte sich um mehr als vier Basen unterscheiden, um die generierten Signale der Sequenzierung auf dem *Abi Prism 310* besser differenzieren zu können. Ihre Länge konnte modifiziert werden, indem am 5'-Ende nicht homologe Polynukleotide mit geringer Neigung zu Sekundärstrukturen angehängt wurden. Die Mobilität eines Oligonukleotids wird bestimmt durch die Größe, Nukleotidzusammensetzung und die spezifische Probenlösung. Um eine bessere elektrophoretische Auftrennung zu ermöglichen, wurden nur Primer mit einer Länge von mindestens 36 Basen verwendet. Aus Tab. 20 können die Daten zu den verwendeten SNaPshot-Primern entnommen werden.

**Tab. 20** SNaPshot-Primer für die Exon 13 und Exon 9 Polymorphismen im *ABCB11*-Gen

Primer	Sequenz	Länge (Primer + Poly-A)
<i>ABCB11</i> Exon-9 (C/T)	5' – AAA AAA AAA AAA AAA AAG AGT GTG TCC AAG TTT ACG GAC TA – 3'	41 (24 + 17)
<i>ABCB11</i> Exon-13 (C/T)	5' – AAA AAA AAA AAC AGA TTC TAA ATG ACC TCA ACA TGG – 3'	36 (25 + 11)

### 2.7.3.6 SNaPshot-Reaktion

Beide Polymorphismen Exon 9 und Exon 13 wurden in einer SNaPshot-Reaktion gepoolt (multiplexen). Um befriedigende Ergebnisse zu produzieren, lag die Menge an eingesetztem PCR-Produkt zwischen 0,01 und 0,40 pmol. Zudem waren 0,2  $\mu\text{M}$  jedes SNaPshot-Primers im Ansatz vorhanden. Mit dem in Tab. 22 erwähnten SNaPshot-PCR-Programm wurden die Fragmente amplifiziert. Nicht eingebaute [F]ddNTPs komigrieren bei der Kapillarelektrophorese und stören somit bei der Auswertung der zu untersuchenden Fragmente. Um dies zu verhindern, wurde der SNaPshot-Ansatz mit 1 Unit *CIP* oder *SAP*, welche die 5'-Phosphoryl-Gruppen der [F]ddNTPs entfernen (s. 2.7.3.4), bei 37°C 1h inkubiert.

**Tab. 21** Pipettierschema der SNaPshot-Reaktion

5 $\mu\text{l}$	Multiplex Ready Reaction Mix
1,5 $\mu\text{l}$	PCR-Produkt Exon-9
1,5 $\mu\text{l}$	PCR-Produkt Exon-13
0,2 $\mu\text{l}$	SNaPshot Primer Exon-9 (10 $\mu\text{M}$ )
0,2 $\mu\text{l}$	SNaPshot Primer Exon-13 (10 $\mu\text{M}$ )
1,6 $\mu\text{l}$	ddH <sub>2</sub> O
10 $\mu\text{l}$	Gesamt

**Tab. 22** SNaPshot-PCR Programm

Schritte	Temperatur	Dauer	Zyklen
1.	96°C	10 sek	
2.	50°C	5 sec	
3.	60°C	30 sek	3. an 1. – 25 x
4.	4°C	Pause	

Es schloss sich eine Inaktivierung der Enzyme bei 75°C an (15 min). Zur Vorbereitung der Proben für den Sequenzierungslauf wurden 0,5  $\mu\text{l}$  des SNaPshot-Produktes mit 0,5  $\mu\text{l}$  *GeneScan-120 LIZ size standard* (Applied Biosystems) und 9  $\mu\text{l}$  Hi-Di-Formamid (Applied Biosystems) gut vermischt, bei 95°C für 5 min denaturiert und anschließend sofort auf Eis

(4°C) gekühlt. Die Auftrennung erfolgte auf dem Polymer POP-6 (Polymer) im automatischen Kapillar-Sequenzierer *Abi Prism 310*. Die Laufbedingungen der SNaPshot-Proben sind in der Tab. 23 notiert. Zur Analyse der Proben wurde die „*GeneScan*“-Software (Applied Biosystems) herangezogen.

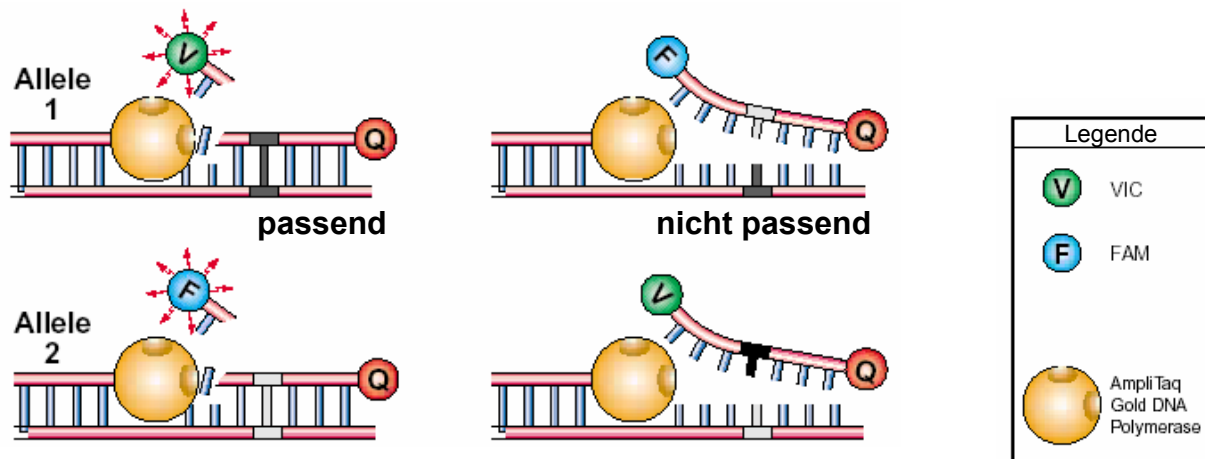
**Tab. 23** Laufbedingungen der SNaPshot Proben

Injektionszeit	5 sec
Injektionsspannung	15,0 kV
Laufzeit	20 min
Laufspannung	15,0 kV
Temperatur	60°C

## 2.7.4 TaqMan MGB

### 2.7.4.1 TaqMan MGB Methodik

Diese neue Methode erlaubt ebenfalls die Untersuchung von Genpolymorphismen. Sie ist sehr effizient und zeitsparend und den anderen herangezogenen Methoden hinsichtlich Probendurchsatz und Kosten überlegen. Ähnlich wie bei der SNaPshot Methode bilden fluoreszierende Farbstoffe die Grundlage der allelischen Diskriminierung. In einer PCR Reaktion waren zusätzlich noch zwei Oligonukleotide enthalten. Diese beiden Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie mit der Patienten-DNA, und zwar genau mit der Sequenz in der sich der Polymorphismus befindet, hybridisieren konnten. Das eine Oligonukleotid besaß an der Position des Polymorphismus die Base, die das Allel 1 definierte, und das zweite Oligonukleotid besaß die passende Base, die das Allel 2 charakterisierte. Zudem befanden sich an den 5' Enden der Oligonukleotide fluoreszierende Farbstoffe (*VIC* für Allel 1 und *FAM* für Allel 2). In der PCR amplifizierte die 5' *Taq*-Polymerase entlang des DNA Stranges und setzte nur bei passenden Oligonukleotiden den fluoreszierenden Farbstoff frei. Jede Probe wurde fluorometrisch auf die fluoreszierenden Farbstoffe untersucht, um die allelische Diskriminierung durchzuführen (Abb. 5).



**Abb. 5** Schematische Darstellung der TaqMan MGB Methode

(Quelle: Applied Biosystems, Assay-on-Demand SNP Genotyping Products Protocol)

#### 2.7.4.2 Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 2 (LRP2)

Für die Bestimmung von drei Polymorphismen im *LRP2*-Gen wurden Reagenzien von Applied Biosystems (Applied Biosystems) verwendet (Tab. 24). Informationen hierzu sind unter [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com) erhältlich (Assay-on-Demand).

**Tab. 24** SNPs im *LRP2*-Gen

SNP	Assay-on-Demand Identifikation	Art der Mutation
SNP1	C__3017531_1_ (rs2228171)	Missense Mutation
SNP2	C__3017575_1_ (rs831042)	Silent Mutation
SNP3	C__16165996_10_ (rs2075252)	Missense Mutation

#### 2.7.4.3 TaqMan MGB-Reaktion

Für eine Probe wurden Reagenzien nach folgendem Schema zusammengegeben (Tab. 25). Der TaqMan Universal PCR Master Mix enthielt die für die PCR notwendigen Bestandteile,

**Tab. 25** TaqMan - Pipettierschema

12,50 µl	2 x TaqMan Universal PCR Master Mix
1,25 µl	20 x SNP Genotyping Mix
11,25 µl	1 -20 ng DNA in DNase freiem Wasser
25,00 µl	Gesamt Reaktionsvolumen

wegen in dem SNP Genotyping Mix die Polymorphismen spezifischen Oligonukleotide mit den fluoreszierenden Farbstoffen vorhanden waren.

**Tab. 26** TaqMan - PCR Programm

Schritte	Temperatur	Dauer	Zyklen
1.	95°C	10 min	
2.	92°C	15 sec	
3.	60°C	1 min	3. an 2. – 40 x

Für die PCR wurden 1 – 20 ng DNA verwendet, in 11,25 µl DNase freiem Wasser verdünnt und jeder Probe hinzugefügt. Anschließend wurde eine PCR mit dem Programm aus Tab. 26 durchgeführt. Die Proben wurden im Abi Prism 7700 Sequence Detection System (TaqMan) der fluorometrischen Messung unterzogen. Mit Hilfe der SDS 1.7 Software (Applied Biosystems) wurde für jede einzelne Probe die allelspezifischen fluoreszierenden Marker bestimmt und digital in ein Diagramm eingefügt. Dieses Diagramm gibt quantitativ die Allelhäufigkeiten an und definiert die Frequenzen der Genotypen.

## 2.8 Klinisch-chemische Parameter

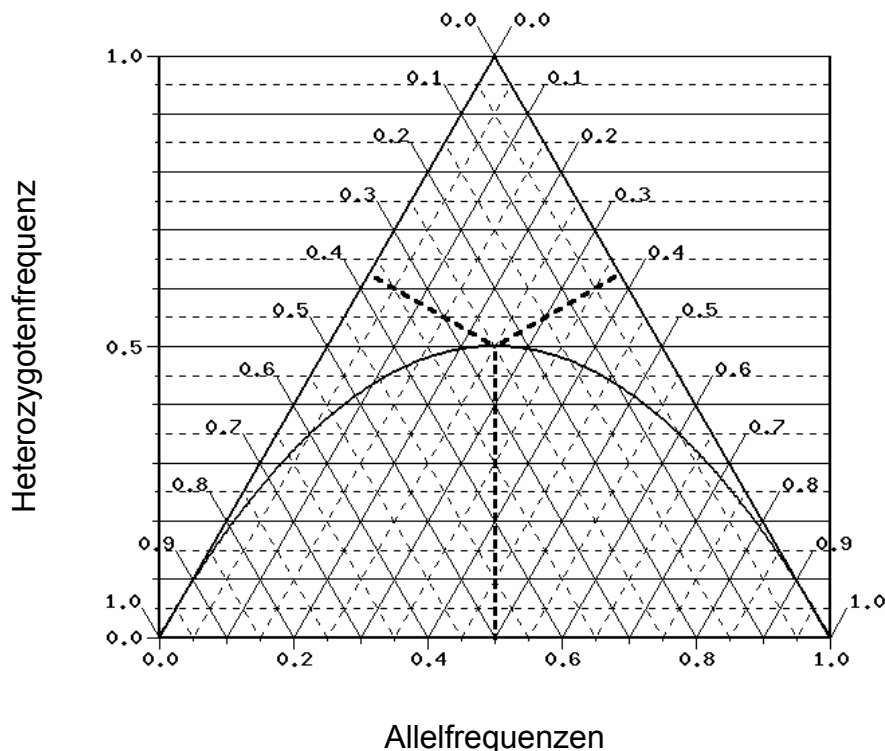
Die zur Analyse herangezogenen klinisch-chemischen Parameter wurden bei sämtlichen Patienten durch das Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der RWTH Aachen mit Standard-Labormethoden bestimmt. Die folgende Liste gibt die Auswahl der in die Studie aufgenommenen Parameter wieder:

- gesamtes Bilirubin
- direktes Bilirubin
- Haptoglobin
- Glukose
- Fruktosamin
- Hämoglobin (HbA<sub>1c</sub>)
- Triglyzeride
- gesamtes Cholesterin
- HDL-Cholesterin
- LDL-Cholesterin
- Glutamatoxalacetattransaminase (GOT)  
Aspartataminotransferase (AST)
- Glutamatpyruvattransaminase (GPT)  
Alaninaminotransferase (ALT)
- Gamma-Glutamyltranspeptidase (γ-GT)
- Glutamatdehydrogenase (GLDH)
- Alkalische Phosphatase (AP)
- Pseudocholinesterase (PCHE)
- Lactatdehydrogenase (LDH)

## 2.9 Statistische Verfahren und Datenbanken

### 2.9.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und De Finetti-Dreieck

Das De Finetti-Dreieck ist nach dem italienischen Mathematiker De Finetti (1906-1985) benannt worden, der erstmals ein gleichseitiges Diagramm zur genetischen Veranschaulichung von Populationen erarbeitete (77). Die Berechnungen für Populationszustände im De Finetti-Dreieck basieren auf dem "Exakten Test" von ELSTON et al. (78). Diese Populationszustände werden im Diagramm zur Visualisierung in Form von Punkten dargestellt. Jeder Populationszustand kann durch einen Punkt innerhalb dieses Dreiecks dargestellt werden. Die Grundlinie (Abszisse) gibt die Allelfrequenzen der Population wieder, die Seiten geben die Homozygotenfrequenzen und die Ordinate die Heterozygotenfrequenz an. Das Lot des Populationspunktes auf die Grundlinie unterteilt diese in die beiden Allelfrequenzen Allel 1 und Allel 2.



**Abb. 6** De Finetti-Dreieck

(Institut für Humangenetik TU München, Quelle: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>)

Die in diesem Dreieck eingezeichnete Parabel markiert das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG). Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ist für zwei Allele wie folgt definiert:

$p^2 + 2pq + q^2 = 1$  (p: Homozygote 1, 2pq: Heterozygote, q: Homozygote 2). In einer Population mit Panmixie (zufällige Paarung) und einem Gleichgewicht zwischen Mutation und Selektion stehen die Genfrequenzen von zwei oder mehreren Allelen in einem Gleichgewicht.

## 2.9.2 Allgemeine statistische Verfahren

Als statistische Tests wurden STUDENTS *t*-Test für unabhängige Stichproben,  $\chi^2$ -Test oder Trend-Test eingesetzt. Um phänotypische Parameter (quantitative Merkmale) zwischen verschiedenen Gruppen zu vergleichen, wurde der STUDENTS *t*-Test verwendet. Bei Vergleichen von qualitativen Merkmalen (Ausprägung der Phänotypen) in verschiedenen Gruppen wurden der  $\chi^2$ -Test oder der Trend-Test herangezogen. Der Trend-Test errechnet in 2 x 3 Kreuztabellen, bei denen beide Variablen qualitativ waren, das Maß des linearen Zusammenhangs zwischen beiden Parametern. In der vorliegenden Arbeit wurde das Signifikanzniveau mit  $p = 0,05$  definiert. Des Weiteren wurde die Odds Ratio (OR) berechnet. Die OR gibt an, um welchen Faktor das Krankheitsrisiko einer Person steigt, wenn sie Träger eines bestimmten Allels oder Genotyps ist. Um die Signifikanz der OR beurteilen zu können, wurde das zugehörige Konfidenzintervall (CI) angegeben. Als Software wurde für alle statistischen Kalkulationen SPSS 7.5 verwendet.

## 2.9.3 Datenbanken

Die Suche nach geeigneten Polymorphismen zur genetischen Analyse wurde mit Hilfe von elektronischen Datenbanken durchgeführt. Im Internet stehen diverse Datenbanken zur Verfügung, die Informationen über Polymorphismen aus unterschiedlichen Populationen bereitstellen. Die folgenden Datenbanken wurden zur Auswahl der SNPs verwendet:

- NCBI LocusLink (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/LocusLink>)
- JSNP Database (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index.html>)
- HGVbase (<http://hgvbase.cgb.ki.se>)



## 2.10 Geräte und Reagenzien

### 2.10.1 Geräte und gebrauchsfertige Reagenzien

#### DNA-Extraktion:

DNA Blood Mini Kit	Qiagen
Zentrifuge Eppendorf	Eppendorf
Pipetten 10, 100, 200 und 1000µl	Eppendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
Thermomixer compact	Eppendorf

#### DNA-Quantifizierung:

Fluorometer	Biorad
Pico Green dsDNA quantification reagent	Molecular Probes
λ-DNA	Molecular Probes
20 x TE-Puffer	Molecular Probes

#### DNA-Gelelektrophorese:

NuSieve Agarose 3:1	Biozym
DNA-Marker:	
- DNA Molecular Weight Marker IX (250 µg / ml, 72-1353 bp)	Roche
- DNA Molecular Weight Marker VIII (250 µg / ml, 19-1114 bp)	Roche
- 100 bp Leiter	Roche
Tris(hydroxymethyl)aminoethan (TRIS)	Merck
EDTA-Natriumsalz	Sigma
Borsäure	Merck
Ethidiumbromid (10 mg / ml)	Sigma
Kresol-Rot	Sigma

Elektrophorese-Kammern	Serva
Spannungsquellen	Biorad

DNA-Isolierung aus Agarosegelen:

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Ethanol absolut p.a.	Merck
2-Propanol p.a.	Merck

PCR:

10 x Puffer mit Magnesiumchlorid (1,5 mM)	Roche
PCR Nukleotidemix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 mM je dNTP; pH 8,3	Roche
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	Roche
Primer	MWG Biotech
PCR-Röhrchen 0,2 und 0,5 ml	Biozym und Eppendorf
PCR-Thermocycler	Biometra

Restriktionsverdau:

Restriktionsendonuklease <i>HaeIII</i>	Roche
SuRE/Cut Buffer M	Roche
Restriktionsendonuklease <i>Apal</i>	Roche
SuRE/Cut Buffer M	Roche
Restriktionsendonuklease <i>TaqI</i>	Roche
SuRE/Cut Buffer B	Roche
Restriktionsendonuklease <i>Hpy188III</i>	New England Biolabs
1 x NEBuffer 4	New England Biolabs
Restriktionsendonuklease <i>NlaIII</i>	New England Biolabs
1 x NEBuffer 4	New England Biolabs
Restriktionsendonuklease <i>AciI</i>	New England Biolabs
1 x NEBuffer 3	New England Biolabs
Restriktionsendonuklease <i>HhaI</i>	New England Biolabs

1 x NEBuffer 4	New England Biolabs
BSA (Rinderserumalbumin)	New England Biolabs

Sequenzierung:

ABI Prism 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems
<i>Template Suppression Reagent</i>	Applied Biosystems
<i>Big Dye Terminator Reaction Mix</i>	Applied Biosystems
Ethanol absolut p.a.	Merck

SNaPshot:

Abi Prism 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix	Applied Biosystems
Hi-Di Formamid	Applied Biosystems
Gene-Scan-120 LIZ size standard	Applied Biosystems

TaqMan:

TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
SNP Genotyping Mix	Applied Biosystems
Abi Prism 7000 SDS (Sequence Detection System)	Applied Biosystems

## 2.10.2 Hergestellte Lösungen

### PCR:

#### 0,1% Kresol-Rot:

0,01 g Kresol-Rot und 6 g Saccharose wurden in 10 ml destilliertem Wasser gelöst.

### Gelelektrophorese:

Nach Aufkochen der Agarose wurden diese in einen Gelschlitten gegossen und ein Kamm für die zu entstehenden Taschen eingesetzt. Nach Abkühlung des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Gelkammer gesetzt.

#### 10 x TBE-Puffer:

Zur Herstellung von 10 x TBE-Puffer wurden 108 g TRIS, 55 g Borsäure und 40 ml EDTA (0,5M, pH 8) mit 1000 ml destilliertem Wasser gemischt. Dieser 10 x Puffer diente anschließend zur Herstellung von 1 x TBE-Puffer, der in den Gelkammern als Laufpuffer und Gelherstellung verwendet wurde.

#### 1 - 2% Agarose:

Zur Herstellung eines 1% Agarose-Gels wurden 0,5 g bzw. 1 g Agarose und 50 ml 1 x TBE-Puffer in einen Erlenmeyerkolben gefüllt und anschließend aufgeköcht. Noch vor Erstarren des Gels wurden 1,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) beigemischt.

#### 4% Nusieve Agarose 3:1:

Abhängig von der Gelgröße wurden am Vortag 4 g Agarose pro 100 ml 1 x TBE-Puffer vermischt und erhitzt, um ein homogenes Netzwerk der Agarose zu erzielen. Noch vor Erstarren des Gels wurden 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 100 ml TBE-Puffer beigemischt.

DNA-Quantifizierung:TE-Puffer:

Zur Herstellung eines 20 x TE-Puffers wurden 10 mM Tris-Base, 200 mM NaCl und 1 mM EDTA pH 7,4 vermengt.

Working Solution:

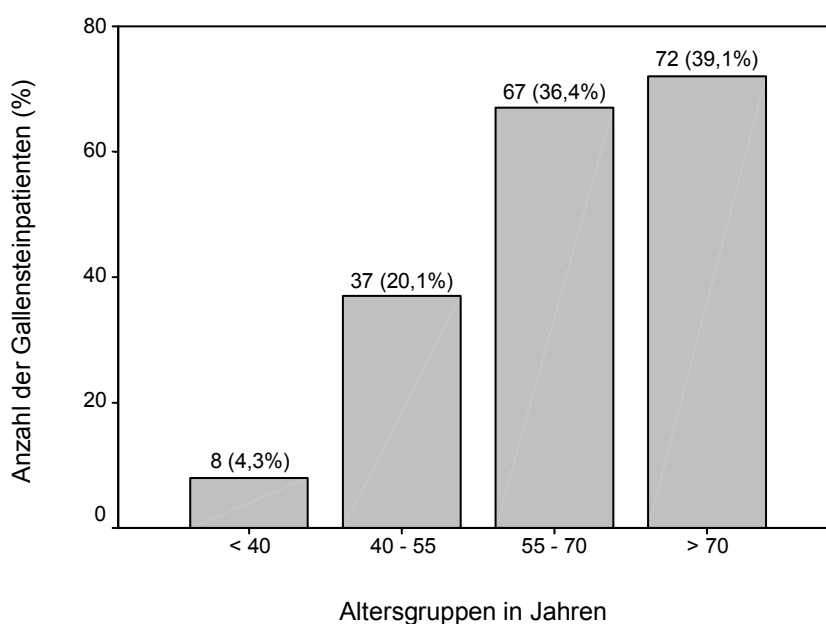
Der Farbstoff Pico-Green (*Molecular Probes*, Leiden NL) wurde in einer 200fachen Verdünnung in TE-Puffer gelöst.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patientenkollektiv

Das aus 747 stationären Patienten bestehende Kollektiv aus dem Universitätsklinikum Aachen wies ein Durchschnittsalter von 64,8 Jahren und eine Gallensteinprävalenz von 32,8% auf. Aus diesem Kollektiv wurden 368 Probanden für eine Fall-Kontroll-Studie ausgewählt und nach Gallensteinen, Alter, Geschlecht und BMI gematcht. Das Durchschnittsalter der Patienten dieser Fall-Kontroll-Studie betrug 64,1 Jahre (Altersspannweite 30 - 89 Jahren) und setzte sich aus 206 Frauen und 162 Männern zusammen. Der Altersdurchschnitt der weiblichen Patienten lag mit  $63,9 \pm 13,0$  Jahren gering unter dem der männlichen Patienten mit  $64,4 \pm 13,2$  Jahren.

In Abb. 7 lässt sich ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Cholelithiasis und dem Alter erkennen. Mit steigendem Alter der Patienten nimmt zugleich der Anteil der Gallensteinpatienten zu. Von 184 Steinträgern dieser Fall-Kontroll-Studie waren nur 8 Patienten (4,3%) jünger als 40 Jahre, wohingegen 72 (39,1%) älter als 70 Jahre waren. Die Verteilung von Frauen und Männern war in den Altersgruppen nahezu identisch. Das Ergebnis dieser Stichprobe gab die erwartete Verteilung von Gallensteinträgern der Bevölkerung wieder (24).



**Abb. 7** Altersverteilung der Gallensteinpatienten

Bei der Erhebung des Patientenkollektivs wurden klinisch-chemische Laborparameter erfasst und in Tab. 27 aufgelistet. Das nach Alter, Geschlecht und BMI gematchte Kollektiv wurde in zwei gleich große Gruppen aufgeteilt, zum einen in Gallensteinträger und zum anderen in Kontrollpersonen. Beim Vergleich der Laborwerte zwischen Steinträgern und Kontrollen ergaben sich signifikante Unterschiede für  $\gamma$ -GT, ALT, LDH, Gesamt-Bilirubin, Fruktosamin und HbA1c.

**Tab. 27** Laborparameter von Gallensteinpatienten und Kontrollen <sup>a</sup>

	Gallensteinpatienten	Kontrollen
Anzahl (n)	184	184
Geschlecht (F/M)	103/81	103/81
Alter (Jahren)	64 ± 1	64 ± 1
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,1 ± 0,3	25,4 ± 0,3
ALT (U/l)	26,3 ± 3,5 <sup>b</sup>	18,3 ± 1,5
AP (U/l)	196 ± 18	158 ± 13
AST (U/l)	20 ± 2	16 ± 1
Fruktosamin (µmol/l)	230 ± 19 <sup>b</sup>	287 ± 17
Gesamt-Bilirubin (mg/dl)	2,2 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,3 ± 0,2
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	200 ± 4	202 ± 4
GLDH (U/l)	13 ± 7	5 ± 1
Glukose (mg/dl)	112 ± 3	122 ± 4
Haptoglobin (g/l)	3,0 ± 1,2	2,1 ± 0,2
HbA1c (%)	7,2 ± 0,3 <sup>b</sup>	8,4 ± 0,5
HDL-Cholesterin (mg/dl)	47,6 ± 1,5	50,1 ± 1,5
LDH (U/l)	189 ± 5 <sup>b</sup>	222 ± 15
LDL-Cholesterin (mg/dl)	122 ± 4	125 ± 3
PCHE (U/l)	4834 ± 154	4932 ± 143
Triglyzeride (mg/dl)	143 ± 6	146 ± 8
$\gamma$ -GT (U/l)	87 ± 13 <sup>b</sup>	52 ± 6

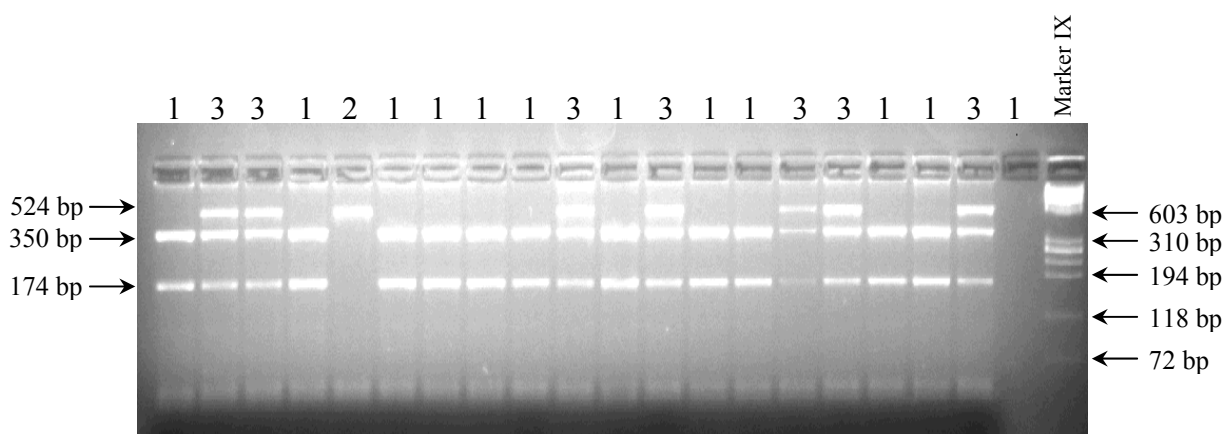
<sup>a</sup> Angaben als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM)

<sup>b</sup> p < 0,05 verglichen mit Kontrollen (*t*-Test bei unabhängigen Stichproben)

## 3.2 Cholesterinester-Transferprotein (CETP)

### 3.2.1 RFLP

Das Allel mit einer vorhandenen Schnittstelle wird als B1 bezeichnet und ergab die Fragmente der Größen 350 bp und 174 bp, wogegen das Allel ohne Schnittstelle als B2 definiert wurde und in der Gelelektrophorese ein einzelnes ungeschnittenes Fragment der Länge 524 bp sichtbar wurde (51, 79, 80). Bei Trägern beider Allele entstanden drei Fragmente mit den Größen 524, 350 und 174 bp (Abb. 8).



**Abb. 8** RFLP des Intron 1 Polymorphismus im *CETP*-Gen

1 = Homozygot für B1

2 = Homozygot für B2

3 = Heterozygot für B1/B2



### 3.2.2 Statistische Analyse

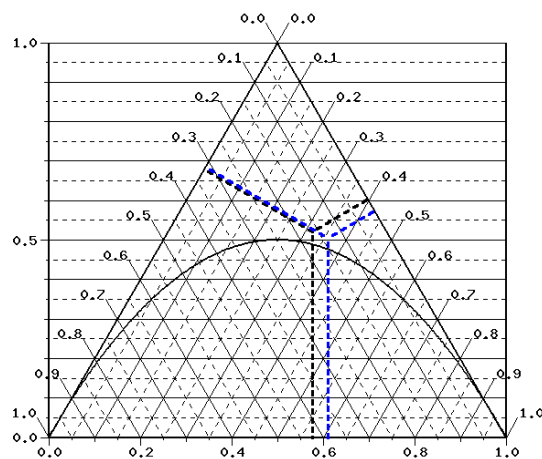
Die Tab. 28 zeigt die Genotypen und die Allelfrequenzen des *TaqI*-Polymorphismus im *CETP*-Gen. Der Trend-Test ergab kein signifikantes Ergebnis für die Genotypenverteilung zwischen Steinträgern und Kontrollen ( $p > 0.3$ ). Dieser Polymorphismus lag sowohl für Gallensteinpatienten (blau) als auch für Kontrollen (schwarz) im HWG (Abb. 9).

**Tab. 28** Allelfrequenzen und Genotypverteilung des *CETP*-Polymorphismus

	Allelfrequenzen		Genotypen		
	Allel 1	Allel 2	Homozygot 1	Heterozygot 12	Homozygot 2
Steinträger	B1 (0,612)	B2 (0,388)	66 (35,9%)	93 (50,5%)	25 (13,6%)
Kontrollen	B1 (0,576)	B2 (0,424)	58 (31,5%)	96 (52,2%)	30 (16,3%)
Gesamt	B1 (0,594)	B2 (0,406)	124 (33,7%)	189 (51,4%)	55 (14,9%)

Genotypen:  $p = 0,352$  (Trend-Test)

Allelfrequenzen:  $p = 0,368$  ( $\chi^2$ -Test)



**Abb. 9** De Finetti-Dreieck: Intron 1 Polymorphismus im *CETP*-Gen  
(Diagrammerklärung siehe S. 30, Abb. 6)

Bei Verwendung des *t*-Tests für unabhängige Stichproben wurden der Genotyp als Gruppenvariable und die demographischen bzw. laborchemischen Parameter als Testvariablen definiert. Der *TaqI*-Polymorphismus ließ keine signifikanten Differenzen zwischen den Trägern des B1 und B2 Allels erkennen. In einer Subgruppenanalyse, in der nur weibliche Patienten untersucht wurden, hatten Frauen mit dem homozygoten Genotypen (B1/B1) signifikant niedrigere HDL-Cholesterinspiegel ( $47 \pm 3$  vs.  $54 \pm 2$  mg/dl,  $p < 0.05$ ) als heterozygote (B1/B2) Patientinnen.

**Tab. 29** Demographische und laborchemische Daten in Abhängigkeit von den *CETP*-Genotypen <sup>a</sup>

	Genotypen		
	B1 B1 (n = 124)	B1 B2 (n = 189)	B2 B2 (n = 55)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25,8 ± 0,4	25,7 ± 0,3	26,1 ± 0,6
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	201 ± 5	202 ± 4	200 ± 7
Glukose (mg/dl)	117 ± 4	116 ± 4	122 ± 8
HDL-Cholesterin (mg/dl)	46 ± 2	51 ± 2	50 ± 3
LDL-Cholesterin (mg/dl)	125 ± 4	121 ± 3	127 ± 6
Triglyzeride (mg/dl)	149 ± 7	142 ± 8	146 ± 10

<sup>a</sup> Angaben als Mittelwerte ± SEM

### 3.3 Apolipoprotein E (APOE)

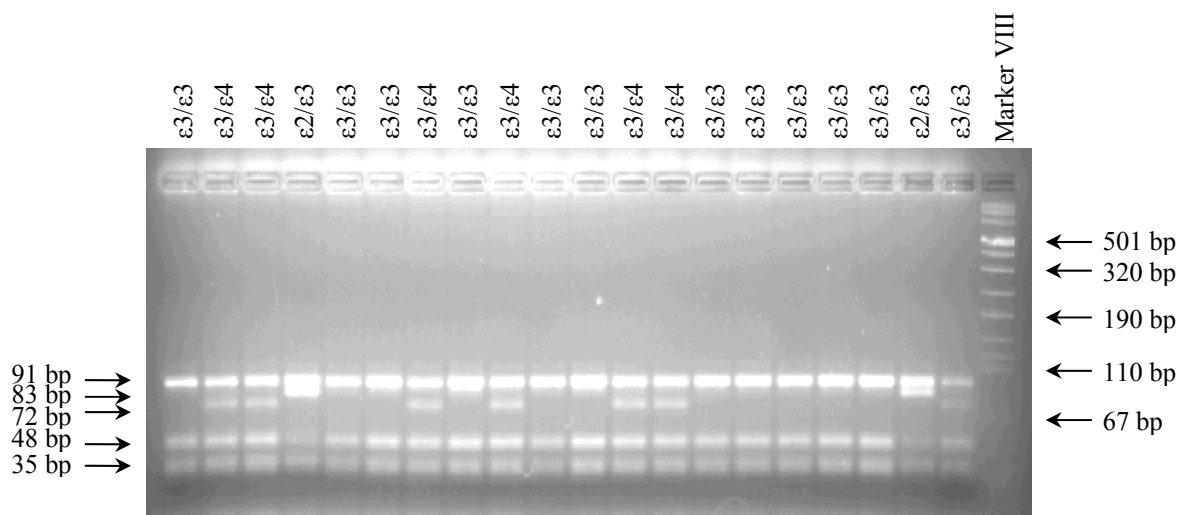
#### 3.3.1 RFLP

Innerhalb des amplifizierten Fragmentes von *APOE* befinden sich an den Positionen 112 und 158 die polymorphen Basenpaare, wobei drei mögliche Allele und sechs unterschiedliche Genotypen ( $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$  und  $\epsilon 4/\epsilon 4$ ) auftreten. Um die Genotypen identifizieren zu können, wurde ein 244 bp langes Fragment amplifiziert, mit dem Enzym *HhaI* inkubiert und das Produkt in einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 10).

Das Bandenmuster zeigte die unterschiedlichen Genotypen, die sich aus den drei Allelen  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$  für das *APOE*-Gen zusammensetzten. Die Fragmentgrößen der Genotypen lassen sich aus Tab. 30 entnehmen.

**Tab. 30** Genotypen und Fragmentgrößen des *APOE*-Gens

Genotyp	Fragmentgrößen (bp)
$\epsilon 2/2$	91, 83
$\epsilon 2/3$	91, 83, 48, 35
$\epsilon 3/3$	91, 48, 35
$\epsilon 2/4$	91, 83, 72, 48, 35, 19
$\epsilon 3/4$	91, 72, 48, 35, 19
$\epsilon 4/4$	72, 48, 35, 19



**Abb. 10** RFLP des *APOE*-Gens

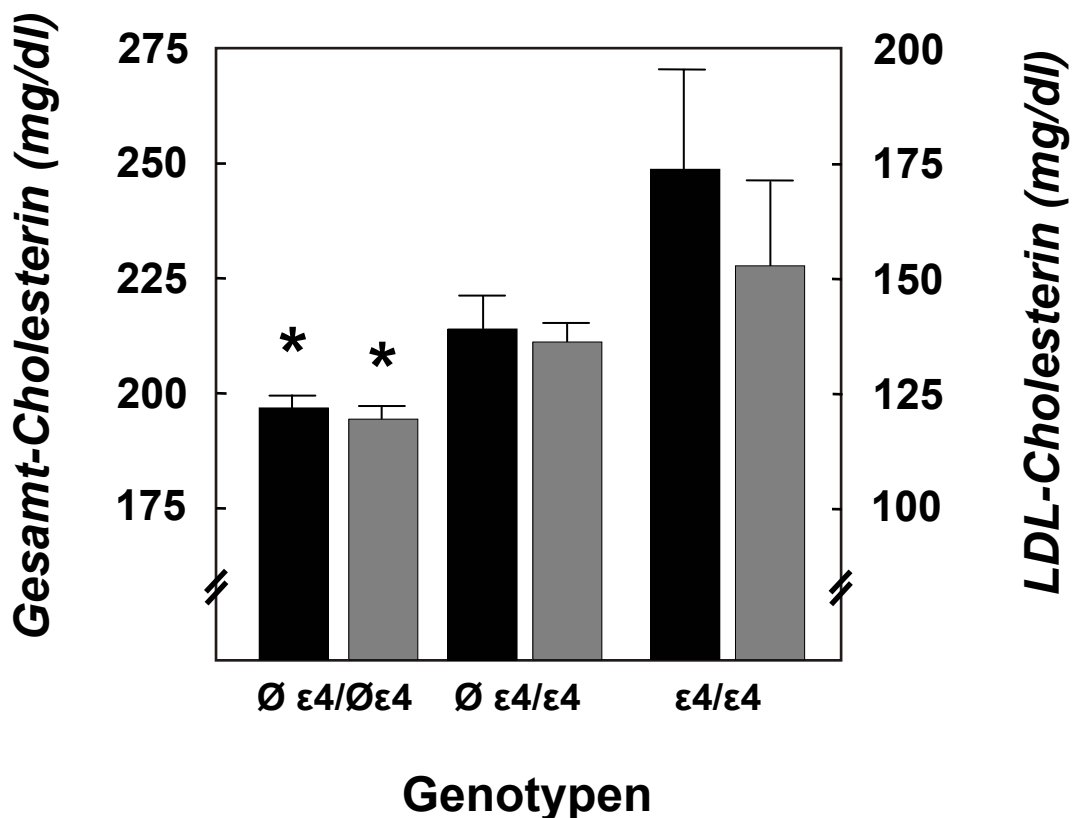
$\epsilon 2/\epsilon 3 = 112 \text{ T}, 158 \text{ T} / 112 \text{ T}, 158 \text{ C}$

$\epsilon 3/\epsilon 3 = 112 \text{ T}, 158 \text{ C} / 112 \text{ T}, 158 \text{ C}$

$\epsilon 3/\epsilon 4 = 112 \text{ T}, 158 \text{ C} / 112 \text{ C}, 158 \text{ C}$



Die statistische Analyse der Laborparameter ergab signifikante Assoziationen zwischen dem *APOE*-Polymorphismus und Gesamt-Cholesterin bzw. LDL-Cholesterin (Tab. 32). Patienten die das Allel  $\epsilon 4$  besaßen, zeigten signifikant höhere Gesamt-Cholesterinwerte (schwarz) ( $245 \pm 24$  vs.  $197 \pm 3$  mg/dl,  $p < 0.05$ ) sowie höhere LDL-Cholesterinwerte (grau) ( $154 \pm 18$  vs.  $119 \pm 3$  mg/dl,  $p < 0.05$ ) als Patienten ohne das  $\epsilon 4$  Allel (Abb. 12).



**Abb. 12** *APOE* und Gesamt-Cholesterin bzw. LDL-Cholesterin  
schwarz = Gesamt-Cholesterin, grau = LDL-Cholesterin

**Tab. 32** Demographische und laborchemische Daten in Abhängigkeit von den *APOE*-Genotypen <sup>a</sup>

	Genotypen		
	Ø ε4 / Ø ε4 (n = 282)	Ø ε4 / ε4 (n=81)	ε4 / ε4 (n = 5)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25,9 ± 0,3	25,3 ± 0,5	25,1 ± 1,0
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	197 ± 3 <sup>b</sup>	212 ± 7	245 ± 24
Glukose (mg/dl)	119 ± 3	113 ± 6	88 ± 7
HDL-Cholesterin (mg/dl)	49 ± 1	49 ± 2	65 ± 11
LDL-Cholesterin (mg/dl)	119 ± 3 <sup>c</sup>	135 ± 6	154 ± 18
Triglyzeride (mg/dl)	144 ± 6	146 ± 10	157 ± 30

<sup>a</sup> Angaben als Mittelwerte ± SEM

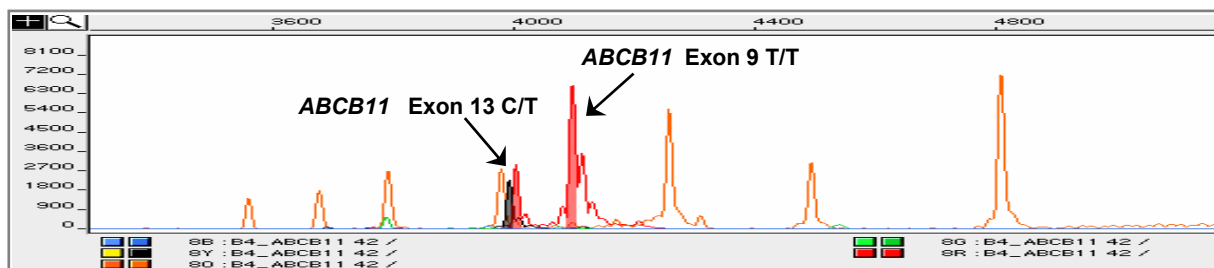
<sup>b</sup> p < 0,05 verglichen mit Ø ε4 / ε4 und ε4 / ε4 (*t*-Test)

<sup>c</sup> p < 0,05 verglichen mit Ø ε4 / ε4 (*t* -Test)

### 3.4 ATP Binding Cassette Transporter B11 (ABCB11)

#### 3.4.1 SNaPshot

Bei der SNaPshot-Reaktion (Minisequenzierung) wurde durch Sequenzierung nur einer Base der Genotyp an der spezifischen Position bestimmt. Abb. 13 zeigt einen Patienten, der für den Exon 13 Polymorphismus Heterozygot (C/T) an der Position 36 und für den Exon 9 Polymorphismus Homozygot (T/T) an der Position 41 war.



**Abb. 13** SNaPshot Genotypisierung im *ABCB11*-Gen. Orange kennzeichnet den Längenstandard (*Gene-Scan-120 LIZ size standard*) mit 15, 20, 25, 35, 50, 62, 80, 110 und 120 bp. Die Farben rot = T bzw. schwarz = C definieren die jeweilige Base.

#### 3.4.2 Statistische Analyse des Exon 13-Polymorphismus

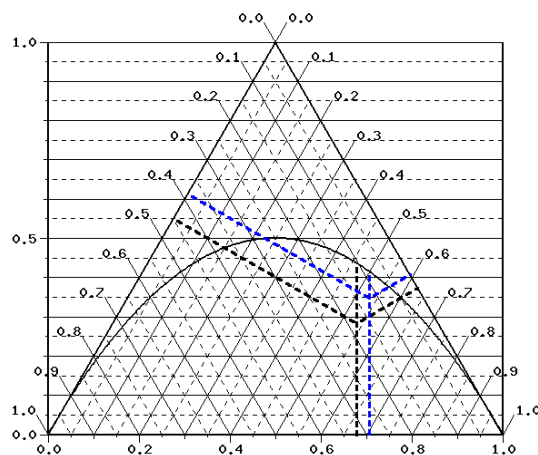
Die Verteilung der Genotypen zwischen Gallensteinpatienten und Kontrollen ist mit den zugehörigen Allelfrequenzen in Tab. 33 wiedergegeben. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Gallensteinen und dem *ABCB11* Exon 13 Polymorphismus zeigt. Dieser Polymorphismus wich bei Fällen (blau) und Kontrollen (schwarz) in geringem Ausmaß vom HWG ab (Abb. 14).

**Tab. 33** Allelfrequenzen und Genotypverteilung des *ABCB11*-Polymorphismus Exon 13

	Allelfrequenzen		Genotypen		
	Allel 1	Allel 2	Homozygot 1	Heterozygot 12	Homozygot 2
Steinträger	C (0,707)	T (0,293)	98 (53,3%)	64 (34,8%)	22 (12,0%)
Kontrollen	C (0,680)	T (0,320)	99 (53,8%)	52 (28,3%)	33 (17,9%)
Gesamt	C (0,693)	T (0,307)	197 (53,5%)	116 (31,5%)	55 (19,9%)

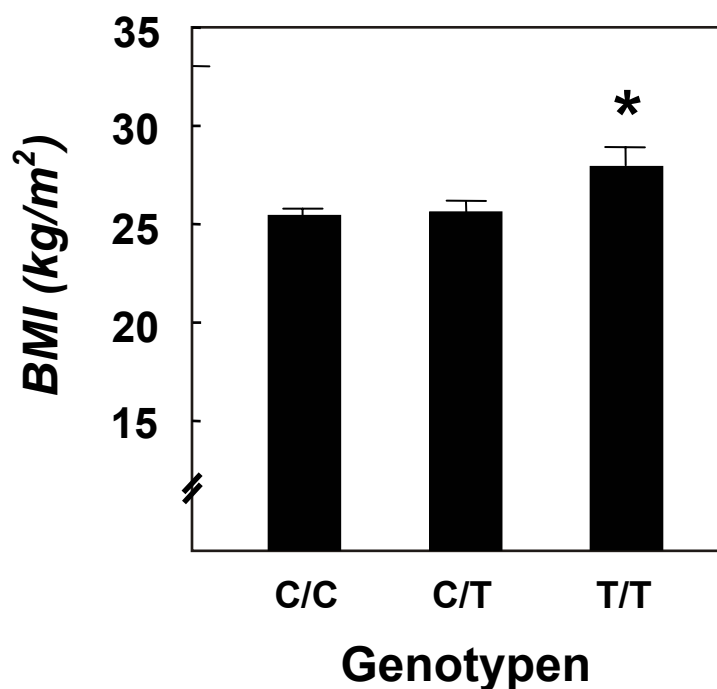
Genotypen:  $p = 0,522$  (Trend-Test)

Allelfrequenzen:  $p = 0,472$  ( $\chi^2$ -Test)



**Abb. 14** De Finetti-Dreieck: Exon 13 SNP im *ABCB11*-Gen  
(Diagrammerklärung siehe S. 30, Abb. 6)

In der statistischen Analyse zeigte der Exon 13 Polymorphismus einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen bezüglich des body mass index (BMI). Homozygote (T/T) Träger der Base Thymin wiesen einen signifikant höheren BMI auf als heterozygote (C/T) Patienten ( $25,4 \pm 0,3$  vs.  $27,3 \pm 0,7$  kg/m<sup>2</sup>;  $p < 0,05$ ) und homozygote (C/C) Patienten für Cytosin ( $25,4 \pm 0,3$  vs.  $27,3 \pm 0,7$  kg/m<sup>2</sup>;  $p < 0,05$ ) (Abb. 15). Weitere laborchemische Parameter gaben keinen Hinweis auf eine signifikante Assoziation mit der Cholecystolithiasis (Tab. 34).



**Abb. 15** *ABCB11* und BMI



**Tab. 34** Demographische und laborchemische Daten in Abhängigkeit von den Genotypen des *ABCB11* SNP im Exon 13 <sup>a</sup>

	Genotypen		
	C / C (n = 197)	C / T (n = 116)	T / T (n = 55)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25,4 ± 0,3	25,6 ± 0,4	27,3 ± 0,7 <sup>b</sup>
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	201 ± 4	200 ± 5	205 ± 7
Glukose (mg/dl)	119 ± 4	116 ± 5	113 ± 6
HDL-Cholesterin (mg/dl)	49 ± 1	48 ± 2	50 ± 3
LDL-Cholesterin (mg/dl)	124 ± 3	120 ± 4	129 ± 6
Triglyzeride (mg/dl)	145 ± 6	134 ± 6	167 ± 19

<sup>a</sup> Angaben als Mittelwerte ± SEM

<sup>b</sup>  $p < 0,05$  verglichen mit den Genotypen C/C und C/T (*t*-Test)

### 3.4.3 Statistische Analyse des Exon 9-Polymorphismus

Die Verteilung der Genotypen zeigte eine sehr geringe Prävalenz des C-Allels, wohin gegen fast alle Patienten homozygot für Thymin waren (Tab. 35). Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung zwischen Kontrollen und Fällen. Aufgrund des geringen Auftretens des Allels 1 (Minor-Allel) bei der Genotypisierung des Exon 9 Polymorphismus, wurde keine weitere statistische Auswertung angeschlossen. Dieser Polymorphismus zeigte in einem japanischen Kollektiv eine ausgewogene Genotypverteilung (81), was die unterschiedliche Häufigkeit dieses Polymorphismus in verschiedenen ethnischen Gruppen verdeutlicht.

**Tab. 35** Genotypverteilung des *ABCB11* Polymorphismus im Exon 9

	Allelfrequenzen		Genotypen		
	Allel 1	Allel 2	Homozygot 1	Heterozygot 12	Homozygot 2
Steinträger	C (0,000)	T (1,000)	0 (0%)	0 (0%)	184 (100%)
Kontrollen	C (0,008)	T (0,992)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	182 (98,9%)
Gesamt	C (0,004)	T (0,996)	1 (0,3%)	1 (0,3%)	366 (99,5%)

Genotypen:  $p = 0,499$  (Trend-Test)

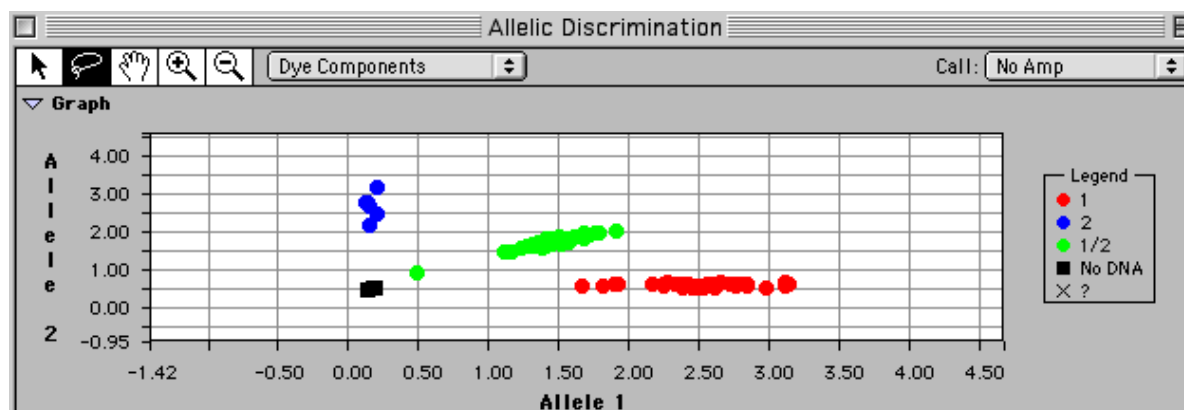
Allelfrequenzen:  $p = 0,247$  ( $\chi^2$ -Test)

### 3.5 Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 2 (LRP2)

#### 3.5.1 SNP1 rs2228171

##### 3.5.1.1 TaqMan

Die Patientenproben für den SNP1 Polymorphismus wurden im Abi Prism 7000 Sequence Detection System typisiert und anschließend mit der SDS Software ausgewertet. Mit der Auswertung der Proben wurde ein Diagramm erstellt, in welchem jeder Punkt eine Patientenprobe widerspiegelte (Abb. 16). Die Achsen dieses Koordinatensystems entsprachen der Intensität der Fluoreszenzfarbstoffe, die spezifisch für beide Allele definiert wurden.



**Abb.16** TaqMan Auswertung für den SNP1 Polymorphismus im *LRP2*-Gen (SDS Software)

Blaue Punkte = Homozygot für Allel 2 (Thymin)

Grüne Punkte = Heterozygot für Allel 1/2 (Cytosin / Thymin)

Rote Punkte = Homozygot für Allel 1 (Cytosin)

Schwarze Punkte = Negativ-Kontrollen (ohne DNA)

##### 3.5.1.2 Statistische Analyse

In Tab. 36 ist das Ergebnis der Genotypisierung des SNP1 Polymorphismus wiedergegeben. Gallensteinträger und Kontrollen wiesen eine ähnliche Verteilung der Genotypen auf. Der Trend-Test ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem SNP1 Polymorphismus

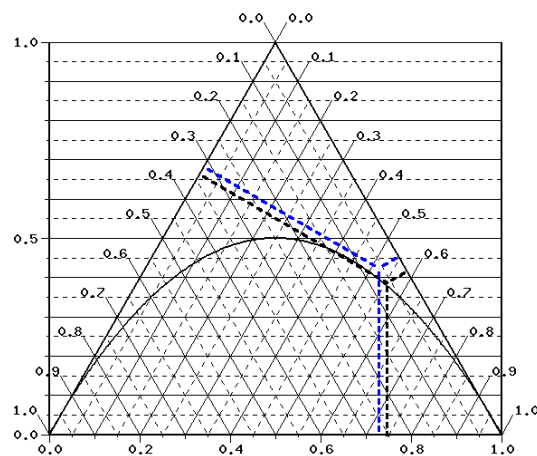
im *LRP2*-Gen und Cholesterincholelithiasis ( $p = 0.607$ ). Dieser Polymorphismus lag bei Fällen (blau) und Kontrolle (schwarz) im HWG (Abb. 17).

**Tab. 36** Allelfrequenzen und Genotypverteilung des SNP1 rs228171 im *LRP2*-Gen

	Allelfrequenzen		Genotypen		
	Allel 1	Allel 2	Homozygot 1	Heterozygot 12	Homozygot 2
Steinträger	C (0,728)	T (0,272)	95 (51,6%)	78 (42,4%)	11 (6,0%)
Kontrollen	C (0,747)	T (0,253)	102 (55,4%)	71 (38,6%)	11 (6,0%)
Gesamt	C (0,738)	T (0,262)	197 (53,5%)	149 (40,5%)	22 (6,0%)

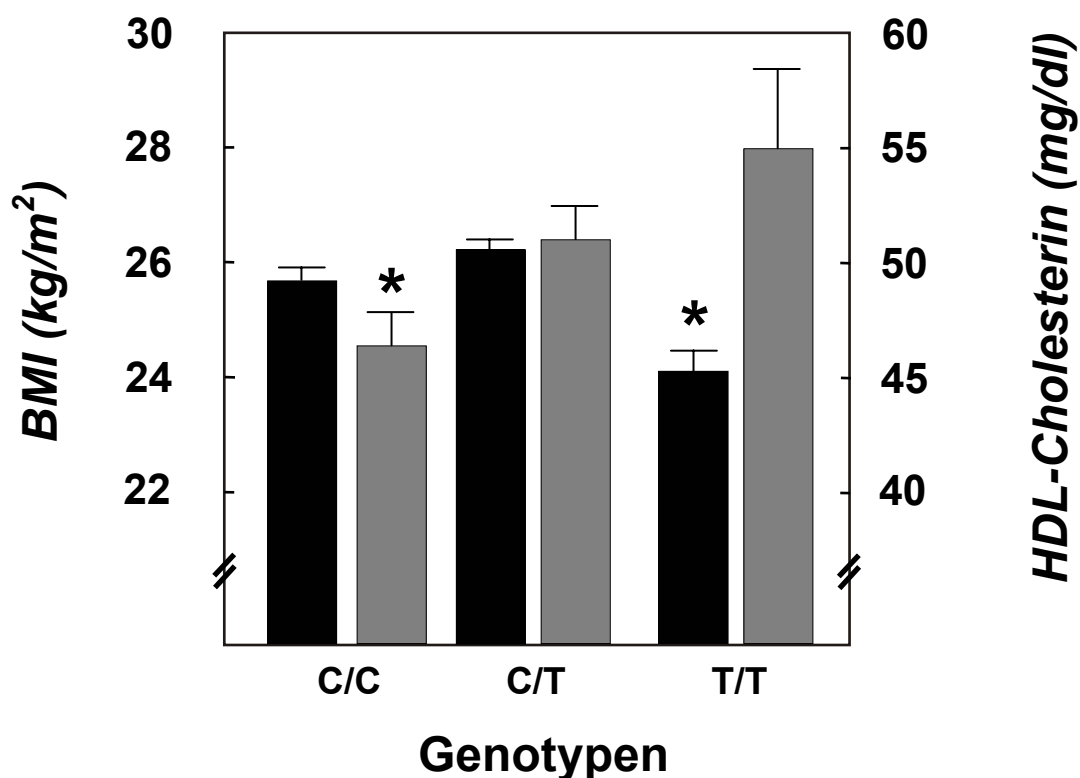
Genotypen:  $p = 0,607$  (Trend-Test)

Allelfrequenzen:  $p = 0,615$  ( $\chi^2$ -Test)



**Abb. 17** De Finetti-Dreieck: SNP1 Polymorphismus im *LRP2*-Gen  
(Diagrammerklärung siehe S. 30, Abb. 6)

Aus den erhobenen Laborparametern ließ sich unter Verwendung des *t*-Tests ein signifikanter Unterschied zwischen dem BMI bei Trägern verschiedener Genotypen des SNP1 Polymorphismus nachweisen (Tab. 37). Patienten, die den homozygoten (T/T) Genotyp besaßen, hatten einen signifikant niedrigeren BMI (schwarz) als heterozygote (C/T) Patienten ( $24,4 \pm 0,8$  vs.  $26,3 \pm 0,3$  kg/m<sup>2</sup>;  $p < 0,05$ ). Dieser Polymorphismus zeigte auch eine signifikante Assoziation mit den HDL-Cholesterinwerten (grau). Homozygote (C/C) Träger wiesen im Vergleich zu heterozygoten (C/T) Patienten deutlich niedrigere HDL-Cholesterinwerte auf ( $47 \pm 2$  vs.  $51 \pm 2$  mg/dl;  $p < 0,05$ ) (Abb. 18).



**Abb. 18** SNP1 im *LRP2*-Gen und BMI bzw. HDL-Cholesterin  
schwarz = BMI, grau = HDL-Cholesterin

**Tab. 37** Demographische und laborchemische Daten in Abhängigkeit von den Genotypen des *LRP2* SNP1 rs228171 <sup>a</sup>

	Genotypen		
	C / C (n = 197)	C / T (n = 149)	T / T (n = 22)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25,6 ± 0,3	26,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	24,4 ± 0,8
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	200 ± 4	204 ± 5	188 ± 9
Glukose (mg/dl)	119 ± 4	115 ± 4	118 ± 10
HDL-Cholesterin (mg/dl)	47 ± 2 <sup>c</sup>	51 ± 2	55 ± 3
LDL-Cholesterin (mg/dl)	124 ± 3	124 ± 4	111 ± 8
Triglyzeride (mg/dl)	148 ± 6	146 ± 9	113 ± 10

<sup>a</sup> Angaben als Mittelwerte ± SEM

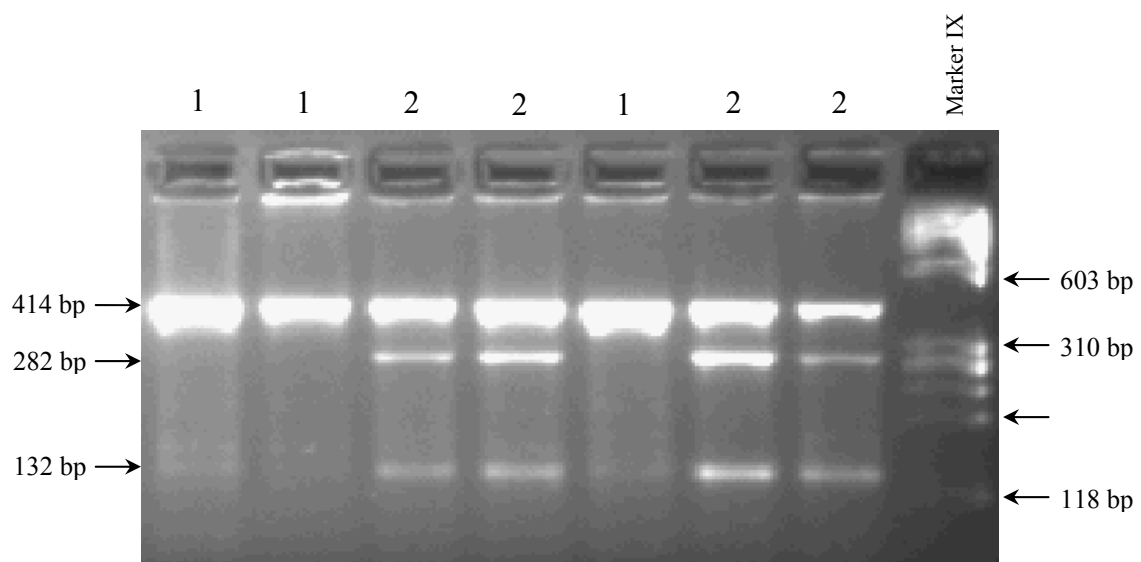
<sup>b</sup>  $p < 0,05$  verglichen mit dem Genotypen T/T (*t*-Test)

<sup>c</sup>  $p < 0,05$  verglichen mit dem Genotypen C/T (*t*-Test)

### 3.5.2 SNP2 rs831042

#### 3.5.2.1 RFLP

Das 414 bp große amplifizierte Fragment enthielt eine Schnittstelle mit dem zu typisierenden Polymorphismus. Trugen beide Allele Adenin an der Position des Polymorphismus, konnte das Enzym die zum Schneiden notwendige Sequenz nicht erkennen und beließ das Fragment ungeschnitten. Fand auf einem Allel ein Austausch zu Guanin statt, wurde das Fragment in 282 und 132 bp große Teilstücke geschnitten. Bei heterozygoten Patienten mit wurden drei Fragmente im Agarosegel sichtbar (414, 282, 132 bp).



**Abb. 19** RFLP des SNP2-Polymorphismus im *LRP2*-Gen

1 = Homozygot für Arginin (A)

2 = Heterozygot für Arginin und Guanin (A/G)

#### 3.5.2.2 Statistische Analyse

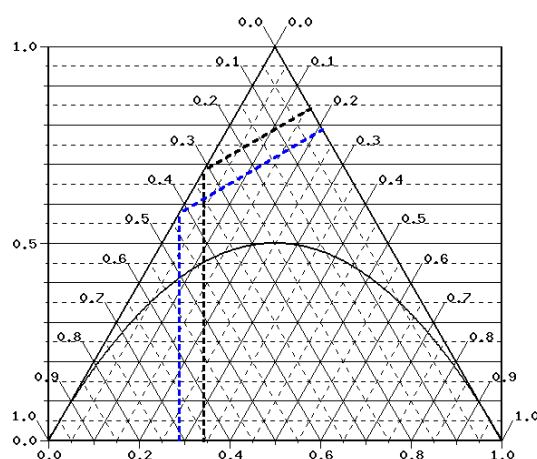
In Tab. 38 ist die Verteilung der Genotypen des SNP1-Polymorphismus im *LRP2*-Gen wiedergegeben. Der  $\chi^2$ -Test ergab einen signifikanten Unterschied der Genotypenverteilung zwischen Steinträgern und Kontrollen ( $p < 0.05$ ). Patienten, die homozygot für Arginin waren, haben vermeintlich ein erhöhtes Risiko, Gallensteine zu entwickeln (Odds Ratio 1,6,

95%-Konfidenzintervall [1,0; 2,5]). Dieser Polymorphismus wich jedoch bei Fällen (blau) und Kontrollen (schwarz) signifikant vom HWG ab (Abb. 20). In einer Population getestete genetische Variationen sollen im Allgemeinen nicht vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abweichen. Der Abweichung vom HWG, könnten verschiedene Ursachen zu Grunde liegen, wie z.B. Genotypisierungsfehler (RFLP) oder Genduplikaturen. Die Berechnung des HWG dient somit auch der Kontrolle der Genotypisierung eines Polymorphismus. Weitere statistische Auswertungen wurden für diesen Polymorphismus auf Grund der signifikanten Abweichung vom HWG nicht angeschlossen.

**Tab. 38** Allelfrequenzen und Genotypverteilung des SNP2 rs831042 im *LRP2*-Gen

	Allelfrequenzen		Genotypen		
	Allel 1	Allel 2	Homozygot 1	Heterozygot 12	Homozygot 2
Steinträger	G (0,288)	A (0,712)	0	106 (57,6%)	78 (42,4%)
Kontrollen	G (0,342)	A (0,658)	0	126 (68,5%)	58 (31,5%)
Gesamt	G (0,315)	A (0,685)	0	232 (63,0%)	136 (37,0%)

$p = 0,04$  ( $\chi^2$ -Test); OR 1,599, 95% CI [1,043; 2,450]

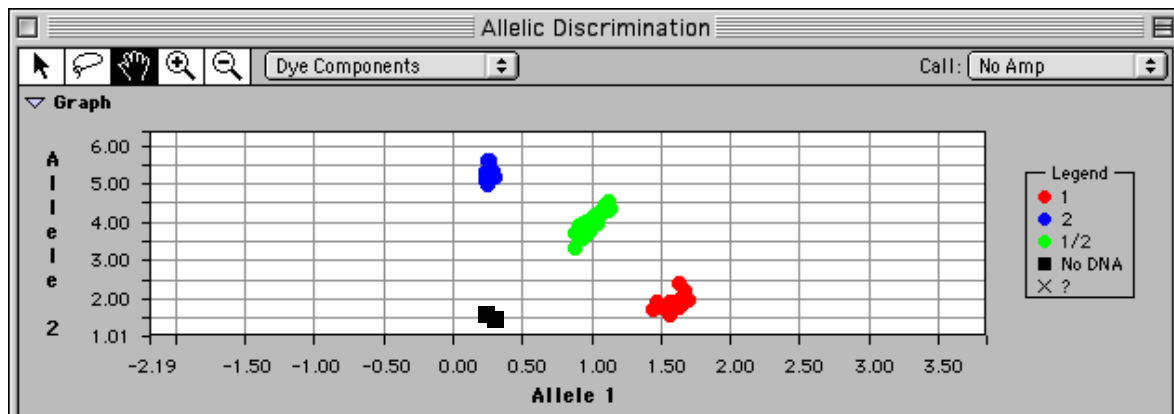


**Abb. 20** De Finetti-Dreieck: SNP2 rs831042 im *LRP2*-Gen

(Diagrammerklärung siehe S. 30, Abb. 6)

### 3.5.2.3 TaqMan

Für den SNP2 Polymorphismus im *LRP2*-Gen wurde aufgrund der Abweichung des RFLP vom HWG auch das TaqMan Verfahren zur Genotypisierung verwendet. Die graphische Auswertung und Genotypisierung ist in Abb. 21 zu erkennen.



**Abb. 21** TaqMan Auswertung für den SNP2 rs831042 im *LRP2*-Gen (SDS Software)

Blaue Punkte = Homozygot für Allel 2 (Adenin)

Grüne Punkte = Heterozygot für Allel 1/2 (Guanin / Adenin)

Rote Punkte = Homozygot für Allel 1 (Guanin)

Schwarze Punkte = Negativ-Kontrollen (ohne DNA)

### 3.5.2.4 Statistische Analyse

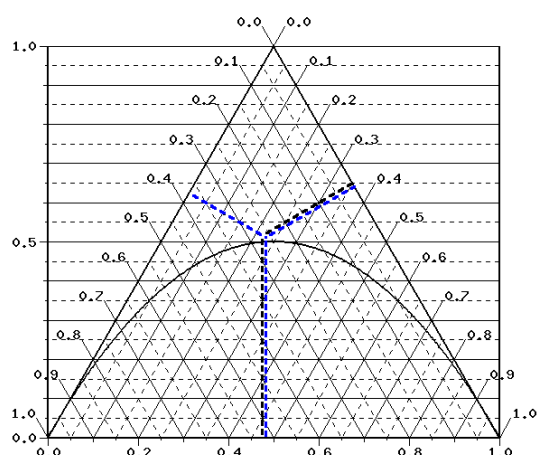
Aus Tab. 39 sind die Häufigkeiten der Genotypen und Allelfrequenzen von Fällen und Kontrollen zu entnehmen. Mit Hilfe des Trend-Tests wurde keine signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten von Cholezystolithiasis und dem SNP2 im *LRP2*-Gen berechnet ( $p = 0,881$ ). Der mit Hilfe der TaqMan-Methode typisierte Polymorphismus lag in der Gruppe der Gallensteinpatienten (blau) und bei den Kontrollen (schwarz) im HWG (Abb. 22).

**Tab. 39** Allelfrequenzen und Genotypverteilung des SNP2 rs831042 im *LRP2*-Gen

	Allelfrequenzen		Genotypen		
	Allel 1	Allel 2	Homozygot 1	Heterozygot 12	Homozygot 2
Steinträger	G (0,484)	A (0,516)	42 (22,8%)	94 (51,1%)	48 (26,1%)
Kontrollen	G (0,476)	A (0,524)	40 (21,7%)	95 (51,6%)	49 (26,6%)
Gesamt	G (0,480)	A (0,520)	82 (22,3%)	189 (51,4%)	97 (26,3%)

Genotypen:  $p = 0,881$  (Trend-Test)

Allelfrequenzen:  $p = 0,883$  ( $\chi^2$ -Test)

**Abb. 22** De Finetti-Dreieck: SNP2 rs831042 im *LRP2*-Gen

(Diagrammerklärung siehe S. 30, Abb. 6)

Für die laborchemischen Daten konnte kein signifikanter Unterschied für den SNP2 Polymorphismus erhoben werden. Die wichtigen Laborparameter sind in Tab. 40 aufgeführt.

**Tab. 40** Demographische und laborchemische Daten in Abhängigkeit von den Genotypen des *LRP2* SNP2 rs831042 <sup>a</sup>

	Genotypen		
	G / G (n = 82)	G / A (n = 189)	A / A (n = 97)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25,6 ± 0,4	26,1 ± 0,3	25,2 ± 0,5
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	197 ± 6	205 ± 4	198 ± 5
Glukose (mg/dl)	124 ± 6	116 ± 4	114 ± 5
HDL-Cholesterin (mg/dl)	47 ± 2	49 ± 2	50 ± 2
LDL-Cholesterin (mg/dl)	119 ± 6	128 ± 3	118 ± 4
Triglyzeride (mg/dl)	155 ± 10	144 ± 7	138 ± 8

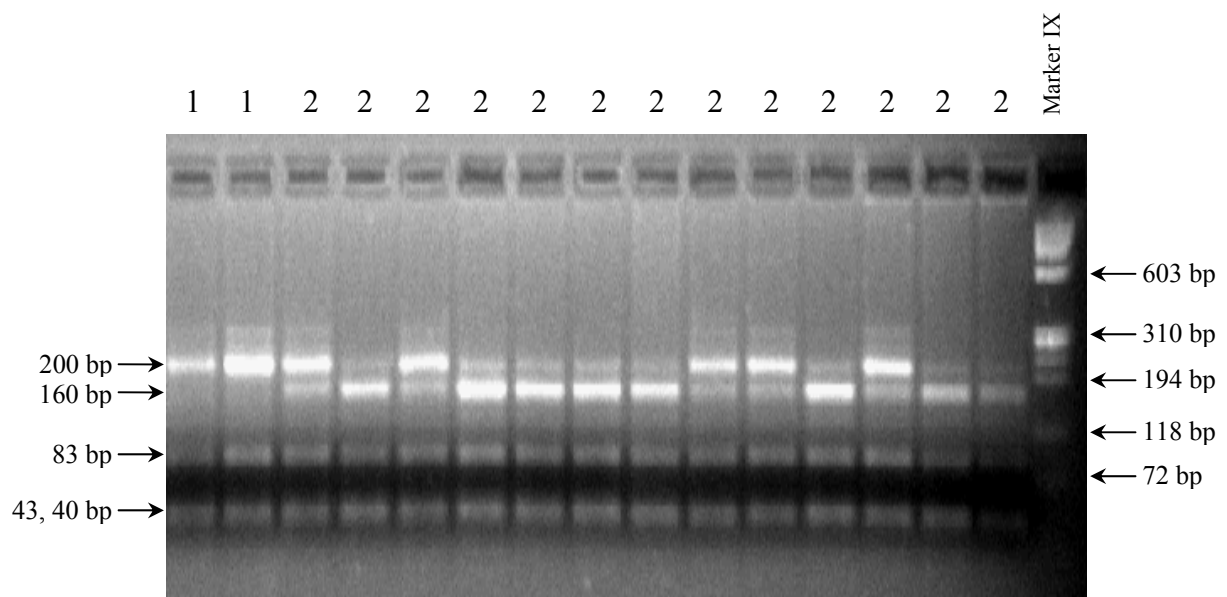
<sup>a</sup> Angaben als Mittelwerte ± SEM



### 3.5.3 SNP3 rs2075252

#### 3.5.3.1 RFLP

Innerhalb des 366 bp langen amplifizierten Fragmentes sind drei obligate Schnittstellen vorhanden und führen zur Bildung von vier Fragmenten der Größen 200, 83, 43 und 40 bp. Der Polymorphismus befand sich in dem 200 bp langen Teilstück. Bei Patienten, die auf beiden Allelen an der Position des Polymorphismus die Base Arginin trugen, erkannte das Restriktionsenzym die Schnittstelle nicht. Somit entstanden bei homozygoten Patienten für Adenin vier Fragmente (200, 83, 43, 40 bp). War aber auf einem Allel die Base Adenin durch Guanin ersetzt worden, wurde das 200 bp lange Fragment in ein 160 und ein 40 bp großes Teilstück geschnitten. Heterozygote Patienten ließen sich somit in der Gelelektrophorese durch die Fragmente mit den Größen 200, 160, 83, 43, 40, 40 identifizieren, wobei die kleineren Fragmente (43, 40) sich nicht mehr auftrennten und sich daher in einer Bande darstellten (Abb. 23).



**Abb. 23** RFLP des SNP3-Polymorphismus im *LRP2*-Gen

1 = Homozygot für Arginin (A)

2 = Heterozygot für Arginin und Guanin (A/G)

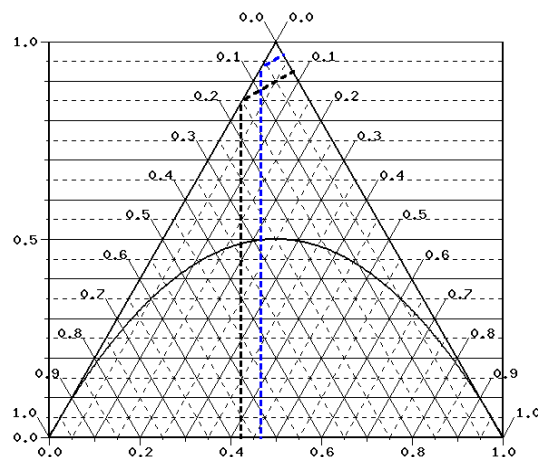
### 3.5.3.2 Statistische Analyse

Der SNP3-Polymorphismus im *LRP2*-Gen war signifikant mit dem Auftreten von Gallensteinen assoziiert ( $p < 0.05$ ). Der homozygote Genotyp war unter den Kontrollen, im Gegensatz zu den Steinträgern, vermeintlich mehr als doppelt so häufig vertreten (OR 2,6; CI [1,3; 5,2]) (Tab. 41). Dieser Polymorphismus wich jedoch bei Fällen (blau) und Kontrollen (schwarz) signifikant vom HWG ab (Abb. 24). Wie bei SNP2 im *LRP2*-Gen (s.o.) ist eine Abweichung dieses Polymorphismus vom HWG ein Hinweis auf einen möglichen Typisierungsfehler (RFLP). Auch hier wurde daher keine weitere statistische Auswertung vorgenommen.

**Tab. 41** Allelfrequenzen und Genotypverteilung des SNP3 rs2075252 im *LRP2*-Gen

	Allelfrequenzen		Genotypen		
	Allel 1	Allel 2	Homozygot 1	Heterozygot 12	Homozygot 2
Steinträger	G (0,467)	A (0,533)	0	172 (93,5%)	12 (6,5%)
Kontrollen	G (0,424)	A (0,576)	0	156 (84,8%)	28 (15,2%)
Gesamt	G (0,445)	A (0,555)	0	328 (89,1%)	40 (10,9%)

$p = 0,011$  ( $\chi^2$ -Test); OR 2,57, 95% CI [1,264; 5,236]

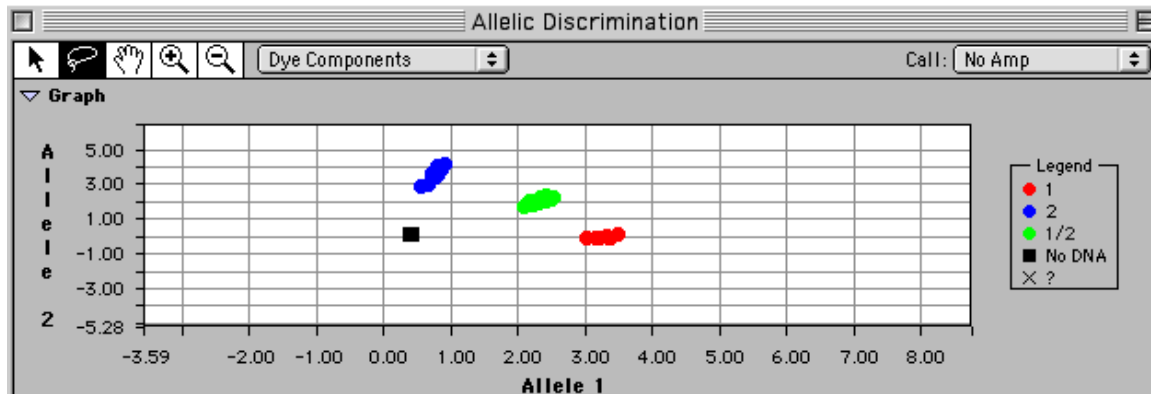


**Abb. 24** De Finetti-Dreieck: SNP3 im *LRP2*-Gen

(Diagrammerklärung siehe S. 30, Abb. 6)

### 3.5.3.3 TaqMan

Für den SNP3 Polymorphismus im *LRP2*-Gen wurde neben der RFLP Genotypisierung das TaqMan Verfahren verwendet, um die Typisierung dieses Polymorphismus zu überprüfen. In der folgenden Abb. 25 sind die graphisch dargestellten Genotypen zu erkennen.



**Abb.25** TaqMan Auswertung für den SNP3 Polymorphismus im *LRP2*-Gen (SDS Software)

Blaue Punkte = Homozygot für Allel 2 (Cytosin)

Grüne Punkte = Heterozygot für Allel 1/2 (Thymin / Cytosin)

Rote Punkte = Homozygot für Allel 1 (Thymin)

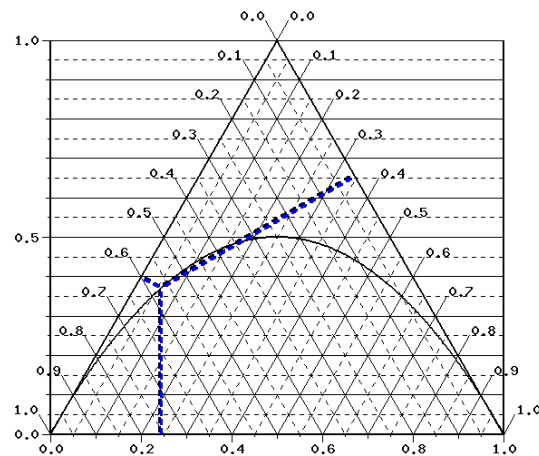
Schwarze Punkte = Negativ-Kontrollen (ohne DNA)

### 3.5.3.4 Statistische Analyse

In Tab. 42 sind die Ergebnisse der Genotypisierung mit den Allelfrequenzen für den SNP3 Polymorphismus gezeigt. Die statistische Untersuchung mit Hilfe des Trend-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Auftreten von Gallensteinen und dem SNP3 Polymorphismus ( $p = 1,000$ ). Der mit Hilfe des TaqMan-Verfahrens typisierte Polymorphismus lag bei Fällen (blau) und Kontrollen (schwarz) im HWG (Abb. 26).

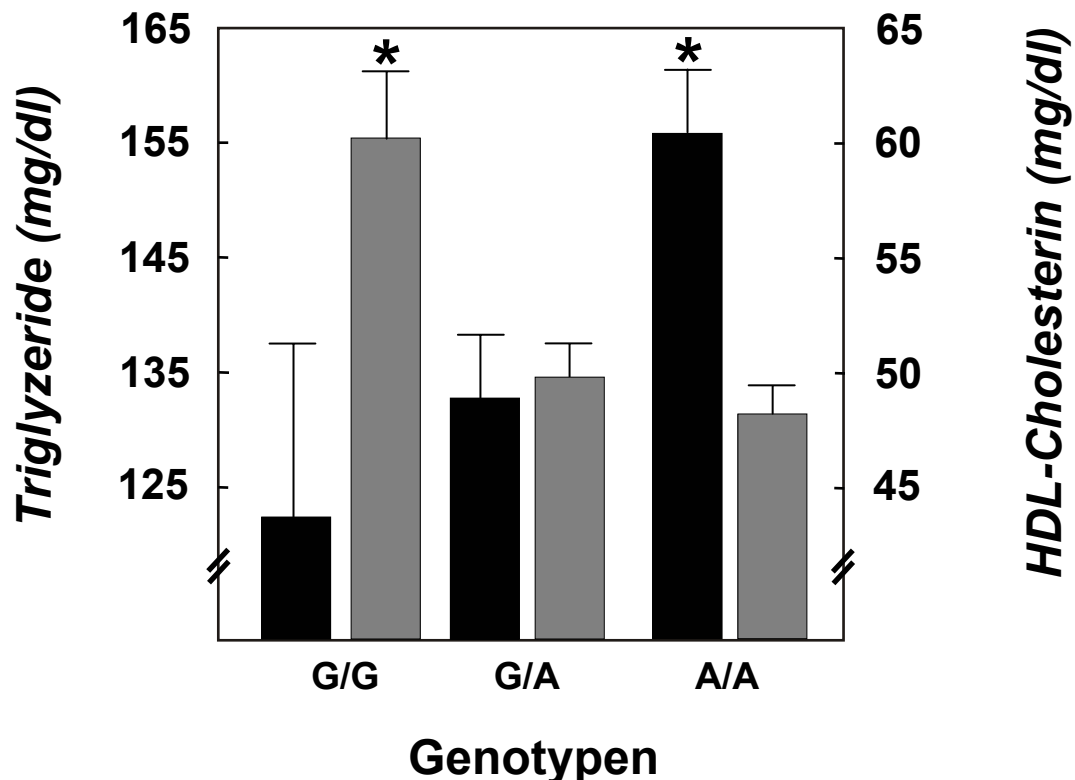
**Tab. 42** Allelfrequenzen und Genotypverteilung des SNP3 rs2075252 im *LRP2*-Gen

	Allelfrequenzen		Genotypen		
	Allel 1	Allel 2	Homozygot 1	Heterozygot 12	Homozygot 2
Steinträger	A (0,245)	G (0,755)	11 (5,9%)	68 (37,0%)	105 (57,1%)
Kontrollen	A (0,242)	G (0,758)	10 (5,4%)	69 (37,5%)	105 (57,1%)
Gesamt	A (0,243)	G (0,757)	21 (5,7%)	137 (37,2%)	210 (57,1%)

Genotypen:  $p = 1,000$  (Trend-Test)Allelfrequenzen:  $p = 1,000$  ( $\chi^2$ -Test)**Abb. 26** De Finetti-Dreieck: SNP3 im *LRP2*-Gen

(Diagrammerklärung siehe S. 30, Abb. 6)

Die laborchemischen und demographischen Daten sind für den SNP3 Polymorphismus in Tab. 43 wiedergegeben. Die statistische Auswertung zeigt signifikante Unterschiede der HDL-Cholesterin- und Triglyzeridwerte in Abhängigkeit von den Genotypen. Homozygote (G/G) Patienten für Guanin weisen signifikant höhere HDL-Cholesterinwerte (grau) auf als heterozygote (A/G) oder für Adenin homozygote (A/A) Patienten ( $59 \pm 4$  vs.  $49 \pm 2$  mg/dl;  $p < 0,05$  und  $59 \pm 4$  vs.  $48 \pm 1$  mg/dl;  $p < 0,05$ ). Homozygote (A/A) Patienten zeigen signifikant höhere Triglyzeridwerte (schwarz) als heterozygote (A/G) Patienten ( $133 \pm 6$  vs.  $155 \pm 7$  mg/dl;  $p < 0,05$ ) (Abb. 27).



**Abb. 27** SNP3 im *LRP2*-Gen und Triglyzeride bzw. HDL-Cholesterin  
schwarz = Triglyzeride, grau = HDL-Cholesterin

**Tab. 43** Demographische und laborchemische Daten in Abhängigkeit von den Genotypen des *LRP2* SNP3 rs2075252<sup>a</sup>

	Genotypen		
	G / G (n = 115)	G / A (n = 156)	A / A (n = 97)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25,4 ± 0,8	26,0 ± 0,4	25,7 ± 0,3
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	195 ± 12	198 ± 5	204 ± 4
Glukose (mg/dl)	117 ± 14	117 ± 4	117 ± 4
HDL-Cholesterin (mg/dl)	59 ± 4 <sup>b</sup>	49 ± 2	48 ± 1
LDL-Cholesterin (mg/dl)	117 ± 9	119 ± 4	127 ± 3
Triglyzeride (mg/dl)	123 ± 16	133 ± 6	155 ± 7 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Angaben als Mittelwerte ± SEM

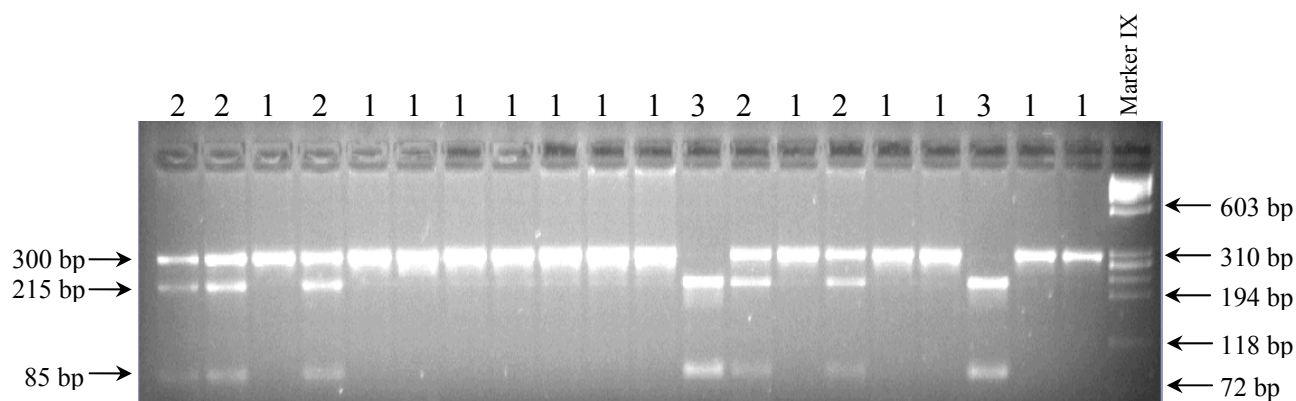
<sup>b</sup> p < 0,05 verglichen mit dem Genotypen G/A und A/A (*t*-Test)

<sup>c</sup> p < 0,05 verglichen mit dem Genotypen G/A (*t*-Test)

### 3.6 Hepatische Lipase C (*LIPC*)

#### 3.6.1 RFLP

Die Genotypisierung der Patienten für den *LIPC*-Polymorphismus wurde ebenfalls mit Hilfe eines RFLP durchgeführt. Homozygote Patienten für Cytosin wiesen keine Schnittstelle auf, so dass nur eine Bande mit der Länge von 300 bp auftrat. Durch das Einfügen von Thymin anstelle des Cytosins wurde ein Restriktionsverdau des Fragments ermöglicht. Somit besaßen heterozygote Patienten drei Banden (300, 215, 85 bp) und Patienten, die homozygot für Thymin waren, zwei Banden (215, 85 bp). In der folgenden Abb. 28 ist die Genotypisierung mit dem spezifischen Bandenmuster für den *LIPC*-Polymorphismus dargestellt.



**Abb. 28** RFLP des -514 Promotor Polymorphismus des *LIPC*-Gens

1 = Homozygot für Cytosin (C)

2 = Heterozygot für Cytosin und Thymin (C/T)

3 = Homozygot für Thymin (T)

### 3.6.2 Statistische Analyse

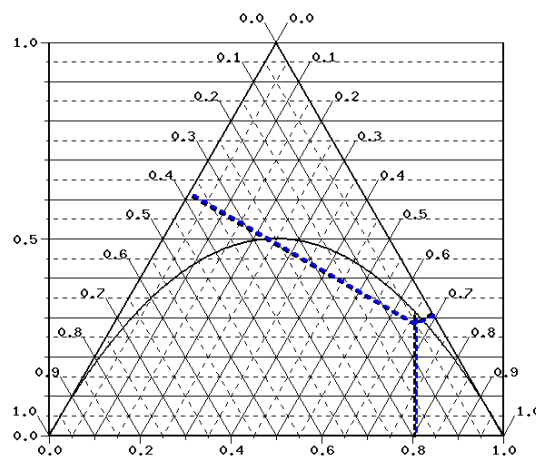
Tab. 44 zeigt das Ergebnis der Genotypisierung des Polymorphismus im *LIPC*-Gen. Aus der Verteilung der Genotypen war kein signifikanter Unterschied zwischen Steinträgern und Kontrollen zu entnehmen ( $p > 0.9$ ). Dieser Polymorphismus lag bei Kontrollen (schwarz) und Fällen (blau) im HWG und somit auf der Parabel im De Finetti-Dreieck (Abb. 29).

**Tab. 44** Allelfrequenzen und Genotypverteilung des *LIPC*-Polymorphismus

	Allelfrequenzen		Genotypen		
	Allel 1	Allel 2	Homozygot 1	Heterozygot 12	Homozygot 2
Steinträger	C (0,810)	T (0,190)	123 (66,8%)	52 (28,3%)	9 (4,9%)
Kontrollen	C (0,805)	T (0,195)	122 (66,3%)	52 (28,3%)	10 (5,4%)
Gesamt	C (0,808)	T (0,192)	245 (66,6%)	104 (28,3%)	19 (5,2%)

Genotypen:  $p = 0,929$  (Trend-Test)

Allelfrequenzen:  $p = 0,926$  ( $\chi^2$ -Test)



**Abb. 29** De Finetti-Dreieck: *LIPC*-Gen  
(Diagrammerklärung siehe S. 30, Abb. 6)

Aus den in Tab. 45 genannten Parametern ließ sich bei Anwendung des *t*-Tests ein signifikant höherer BMI bei homozygoten (T/T) Patienten für Thymin gegenüber homozygoten (C/C) Patienten für Cytosin feststellen ( $28,0 \pm 1,0$  vs.  $25,6 \pm 0,3$  kg/m<sup>2</sup>;  $p < 0,05$ ) (Abb. 30). Für weitere Parameter konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden, jedoch zeigte derselbe Genotyp (T/T), der mit dem BMI signifikant assoziiert ist, eine Tendenz zu höheren Gesamt-Cholesterin- und Triglyzeridwerten (Tab. 45).

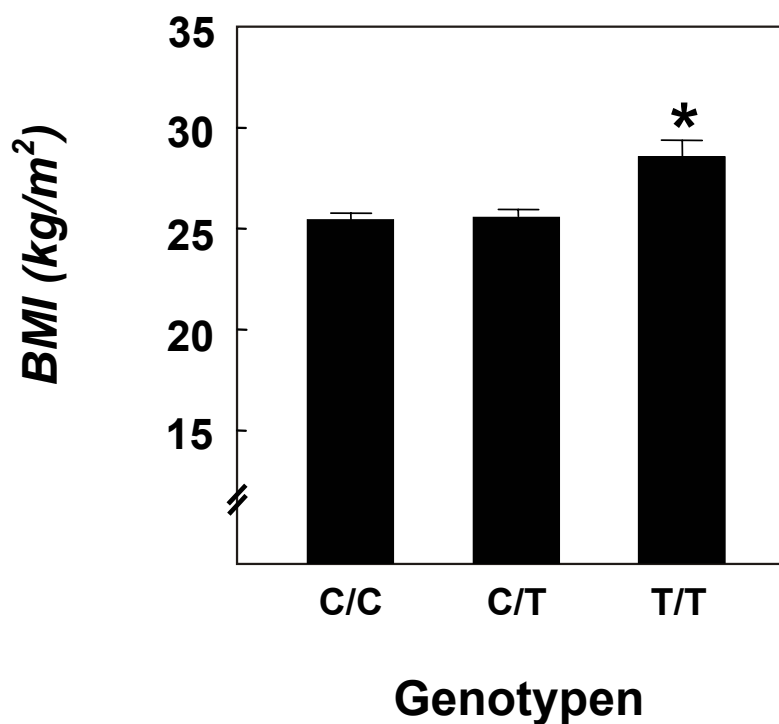


Abb. 30 BMI und *LIPC*

Tab. 45 Demographische und laborchemische Daten in Abhängigkeit von den *LIPC*-Genotypen <sup>a</sup>

	Genotypen		
	C / C (n = 245)	C / T (n = 104)	T / T (n = 19)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25,6 ± 0,3	25,8 ± 0,5	28,0 ± 1,0 <sup>b</sup>
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	200 ± 3	201 ± 5	219 ± 13
Glukose (mg/dl)	115 ± 3	122 ± 6	119 ± 12
HDL-Cholesterin (mg/dl)	49 ± 1	49 ± 2	54 ± 4
LDL-Cholesterin (mg/dl)	124 ± 3	119 ± 4	139 ± 9
Triglyzeride (mg/dl)	143 ± 6	145 ± 7	167 ± 44

<sup>a</sup> Angaben als Mittelwerte ± SEM

<sup>b</sup> p < 0,05 verglichen mit C/C (*t*-Test)

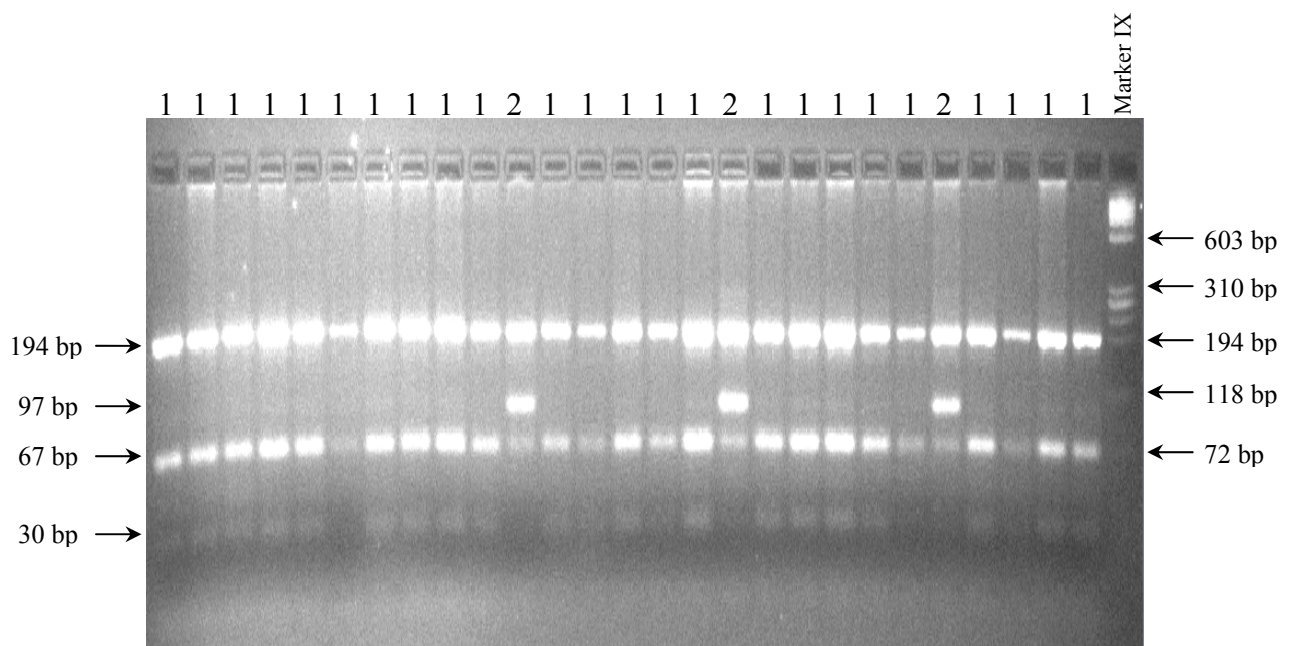


### 3.7 *SRB1*

#### 3.7.1 Intron 5

##### 3.7.1.1 RFLP

Die Genotypisierung des SNP im Intron 5 des Scavenger Rezeptors B1 erfolgte mit Hilfe der RFLP-Methode. Der Verdau des 291 bp großen PCR-Produktes führte nach gelelektrophoretischer Auftrennung zu einem spezifischen Bild im Agarosegel (Abb. 31). Trugen beide Allele ein Cytosin (C), zeigten sich im Agarosegel drei Banden der Größe 194, 67 und 30 bp; falls jedoch auf einem Allel der Austausch mit Thymin (T) stattgefunden hatte, ging eine Schnittstelle verloren, und ein weiteres Fragment mit einer Länge von 97 bp entstand.



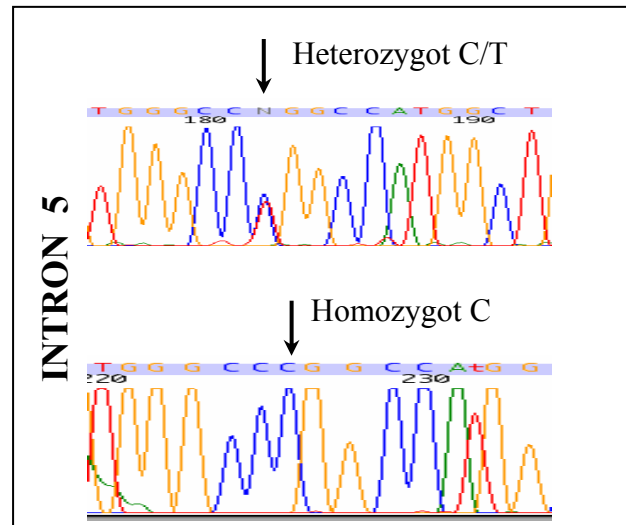
**Abb. 31** RFLP des Intron 5 Polymorphismus im *SRB1*-Gen:

1 = Homozygot für Cytosin (C)

2 = Heterozygot für Cytosin und Thymin (C/T)

### 3.7.1.2 Sequenzierung

Zur Verifizierung der Genotypen wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Die farbkodierten Signale der Intron 5 Sequenz zeigten zwischen zwei Patienten einen genetischen Unterschied in nur einer Base. In der oberen Sequenz der Abb. 32 deuten zwei gleich hohe Signale auf das Vorliegen einer Heterozygotie für die Basen Cytosin (blau) und Thymin (rot) hin. In der unteren Sequenz liegt jedoch an der gleichen Position nur ein Signal für Cytosin (blau) vor, somit ist dieser Patient homozygot für Cytosin.



**Abb. 32** Exemplarische Darstellung der Sequenz eines heterozygoten (C/T) und eines homozygoten (T/T) Patienten für den Intron 5 Polymorphismus im *SRBI*-Gen.

### 3.7.1.3 Statistische Analyse

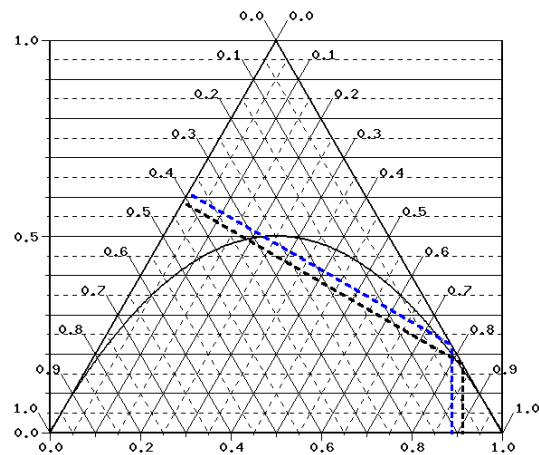
Bei Verteilung der Genotypen zeigte sich, dass 295 Patienten homozygot (C) und 73 heterozygot (C / T) waren, jedoch kein Patient homozygot (T). Es lag kein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung zwischen Steinträgern und Kontrollen vor ( $p > 0,05$ ). Der *SRBI* Intron 5 Polymorphismus lag bei Kontrollprobanden (schwarz) im HWG und wich mit den Fällen (blau) nur gering davon ab (Abb. 33).

**Tab. 46** Allelfrequenzen und Genotypverteilung des Intron 5 Polymorphismus im *SRBI*-Gen

	Allelfrequenzen		Genotypen		
	Allel 1	Allel 2	Homozygot 1	Heterozygot 12	Homozygot 2
Steinträger	C (0,889)	T (0,111)	143 (77,7%)	41 (22,3%)	0
Kontrollen	C (0,913)	T (0,087)	152 (82,6%)	32 (17,4%)	0
Gesamt	C (0,901)	T (0,099)	295 (80,2%)	73 (19,8%)	0

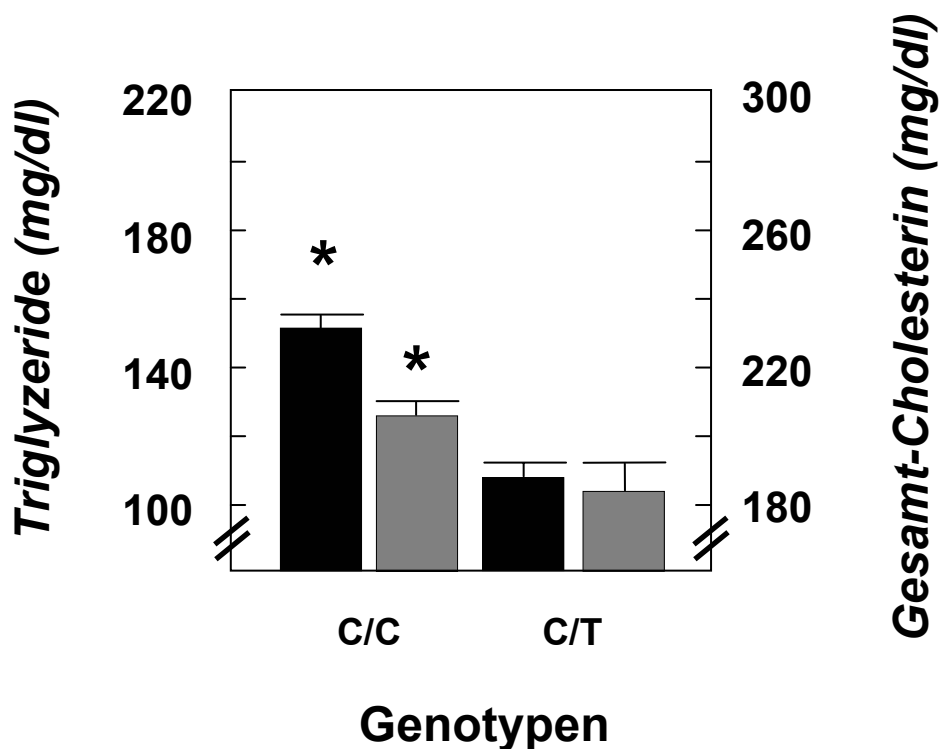
Genotypen:  $p = 0,296$  ( $\chi^2$ -Test)

Allelfrequenzen:  $p = 0,324$  ( $\chi^2$ -Test)



**Abb. 33** De Finetti-Dreieck: Intron 5 Polymorphismus im *SRBI*-Gen  
(Diagrammerklärung siehe S. 30, Abb. 6)

Signifikante Resultate ergaben sich für die Triglyzeride sowie für das Gesamt-Cholesterin. Patienten die den homozygoten Genotyp (C/C) trugen, hatten signifikant höhere Triglyzeridspiegel (schwarz) ( $153 \pm 6$  vs.  $114 \pm 6$  mg/dl;  $p < 0,05$ ) sowie höhere Gesamt-Cholesterinwerte (grau) ( $204 \pm 3$  vs.  $186 \pm 7$  mg/dl;  $p < 0,05$ ) (Abb. 34, Tab. 47). Für weitere Testvariablen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 34** *SRBI* Intron 5 Polymorphismus und Triglyzeride / Gesamt-Cholesterin  
schwarz = Triglyzeride, grau = Gesamt-Cholesterin

**Tab. 47** Demographische und laborchemische Daten in Abhängigkeit von den Genotypen des *SRBI* SNP im Intron 5 <sup>a</sup>

	Genotypen	
	C / C (n = 295)	C / T (n = 73)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25,7 ± 0,2	26,0 ± 0,5
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	204 ± 3 <sup>b</sup>	186 ± 7
Glukose (mg/dl)	118 ± 3	112 ± 5
HDL-Cholesterin (mg/dl)	49 ± 1	50 ± 3
LDL-Cholesterin (mg/dl)	124 ± 3	119 ± 7
Triglyzeride (mg/dl)	153 ± 6 <sup>b</sup>	114 ± 6

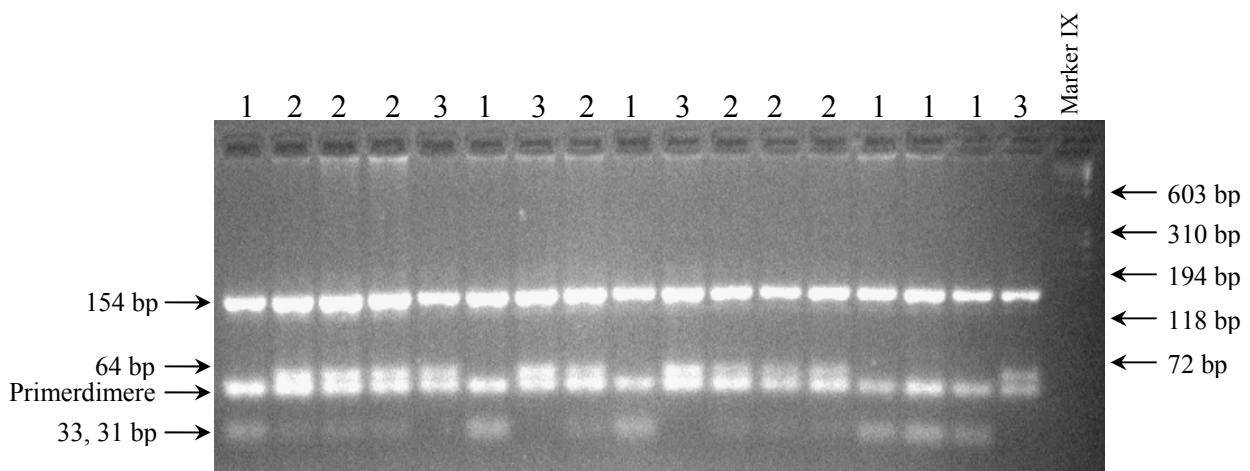
<sup>a</sup> Angaben als Mittelwerte ± SEM

<sup>b</sup> p < 0,05 verglichen mit C/T (*t*-Test bei unabhängigen Stichproben)

### 3.7.2 Exon 8

#### 3.7.2.1 RFLP

Der Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus des SNPs im Exon 8 des *SRBI*-Gens stellte sich im 4% NuSieve-Agarosegel, wie in Abb. 35 zu erkennen, durch ein spezifisches Bandenmuster dar. Das PCR-Amplifikat besaß eine obligate Schnittstelle, die zu einer Teilung in ein 64 bp, auf dem sich der SNP befand, und ein 154 bp großes Fragment führte. Der Wildtyp [3], der mit der Base Thymin auf beiden Allelen keine weitere Schnittstelle aufwies, hatte demzufolge auch die beiden Banden der Größe 154 und 64 bp. Mit dem Austausch der Base Thymin durch Cytosin auf einem Allel ergab sich für den heterozygoten Genotyp [2] ein Bandenmuster mit Längen von 154, 64, 33 und 31 bp. Bei homozygoten Patienten [1] für Cytosin wurde das 64 bp lange Teilstück in zwei DNA-Fragmente geschnitten, und somit zeigten sich im Agarosegel die Banden der Größe 154, 33 und 31 bp.



**Abb. 35** RFLP des Exon 8 Polymorphismus im *SRBI*-Gen :

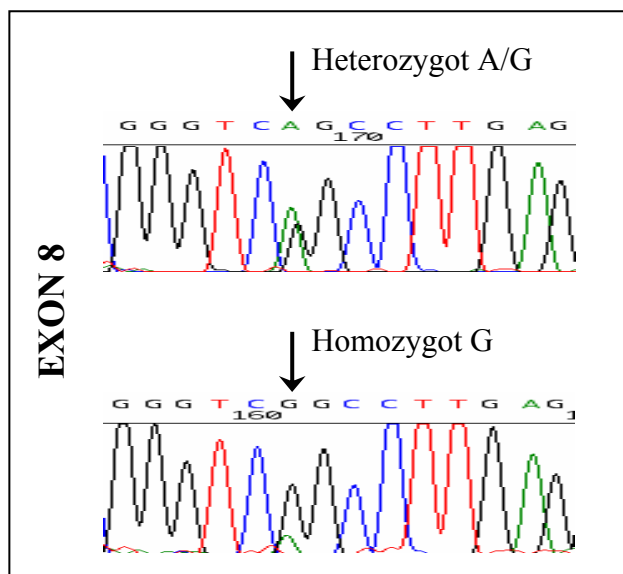
1 = Homozygot für Cytosin (C)

2 = Heterozygot für Cytosin und Thymin (C/T)

3 = Homozygot für Thymin (T)

### 3.7.2.2 Sequenzierung

Auch beim Exon 8 Polymorphismus im *SRBI*-Gen wurde eine Sequenzierung durchgeführt, um eine Bestätigung der Ergebnisse des vorangegangenen RFLP zu erzielen. Abb. 36 zeigt zwei Sequenzen, verschiedener Patienten, die sich in einer Base der DNA-Sequenz unterscheiden. Dieser Unterschied der Basen stellt den SNP im Exon 8 des *SRBI*-Gens dar. Die Sequenz des oberen heterozygoten Patienten zeigt die Basen Arginin (grün) und Guanin (schwarz), wohin gegen die Sequenz des unteren Patienten auf beiden Allelen die Base Guanin besitzt und somit einen homozygoten Genotyp (G/G) charakterisiert.



**Abb. 36** Sequenz des Exon 8 Polymorphismus im *SRBI*-Gen.

### 3.7.2.3 Statistische Analyse

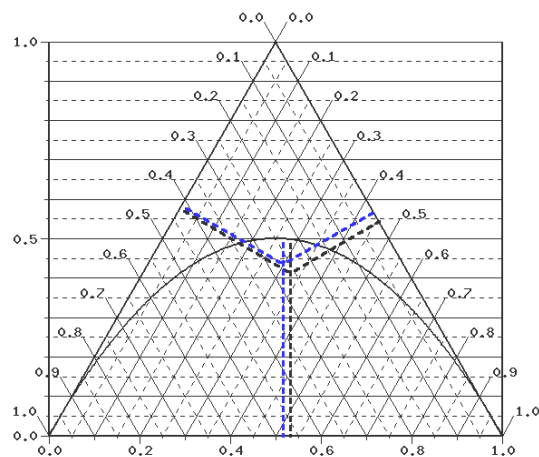
Aus Tab. 48 ist die Verteilung der Genotypen des Polymorphismus im Exon 8 des *SRBI*-Gens zu entnehmen. Die Berechnung des Trend-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied in der Genotypverteilung ( $p > 0,7$ ). Dieser Polymorphismus lag bei Fällen (blau) im HWG und wich nur geringfügig bei den Kontrollen (schwarz) davon ab (Abb. 37).

**Tab. 48** Genotypverteilung und Allelfrequenzen des Exon 8 Polymorphismus im *SRBI*-Gen

	Allelfrequenzen		Genotypen		
	Allel 1	Allel 2	Homozygot 1	Heterozygot 12	Homozygot 2
Steinträger	C (0,516)	T (0,484)	55 (29,9%)	80 (43,5%)	49 (26,6%)
Kontrollen	C (0,533)	T (0,467)	60 (32,6%)	76 (41,3%)	48 (26,1%)
Gesamt	C (0,524)	T (0,476)	115 (31,3%)	156 (42,4%)	97 (26,4%)

Genotypen:  $p = 0,731$  (Trend-Test)

Allelfrequenzen:  $p = 0,712$  ( $\chi^2$ -Test)



**Abb. 37** De Finetti-Dreieck: Exon 8 Polymorphismus im *SRBI*-Gen  
(Diagrammerklärung siehe S. 30, Abb. 6)

Aus demographischen sowie laborchemischen Daten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen einzelnen Genotypen mit Hilfe des *t*-Tests erhoben werden. Die erhobenen Laborparameter sind in Tab. 49 aufgelistet.

**Tab. 49** Demographische und laborchemische Daten in Abhängigkeit von den Genotypen des *SRBI* SNP im Exon 8 <sup>a</sup>

	Genotypen		
	C / C (n = 115)	C / T (n = 156)	T / T (n = 97)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	26,1 ± 0,4	25,03 ± 0,3	26,0 ± 0,4
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	201 ± 5	200 ± 5	202 ± 5
Glukose (mg/dl)	112 ± 4	119 ± 4	120 ± 6
HDL-Cholesterin (mg/dl)	49 ± 2	48 ± 2	51 ± 2
LDL-Cholesterin (mg/dl)	124 ± 4	120 ± 4	128 ± 5
Triglyzeride (mg/dl)	143 ± 8	146 ± 7	145 ± 10

<sup>a</sup> Angaben als Mittelwerte ± SEM

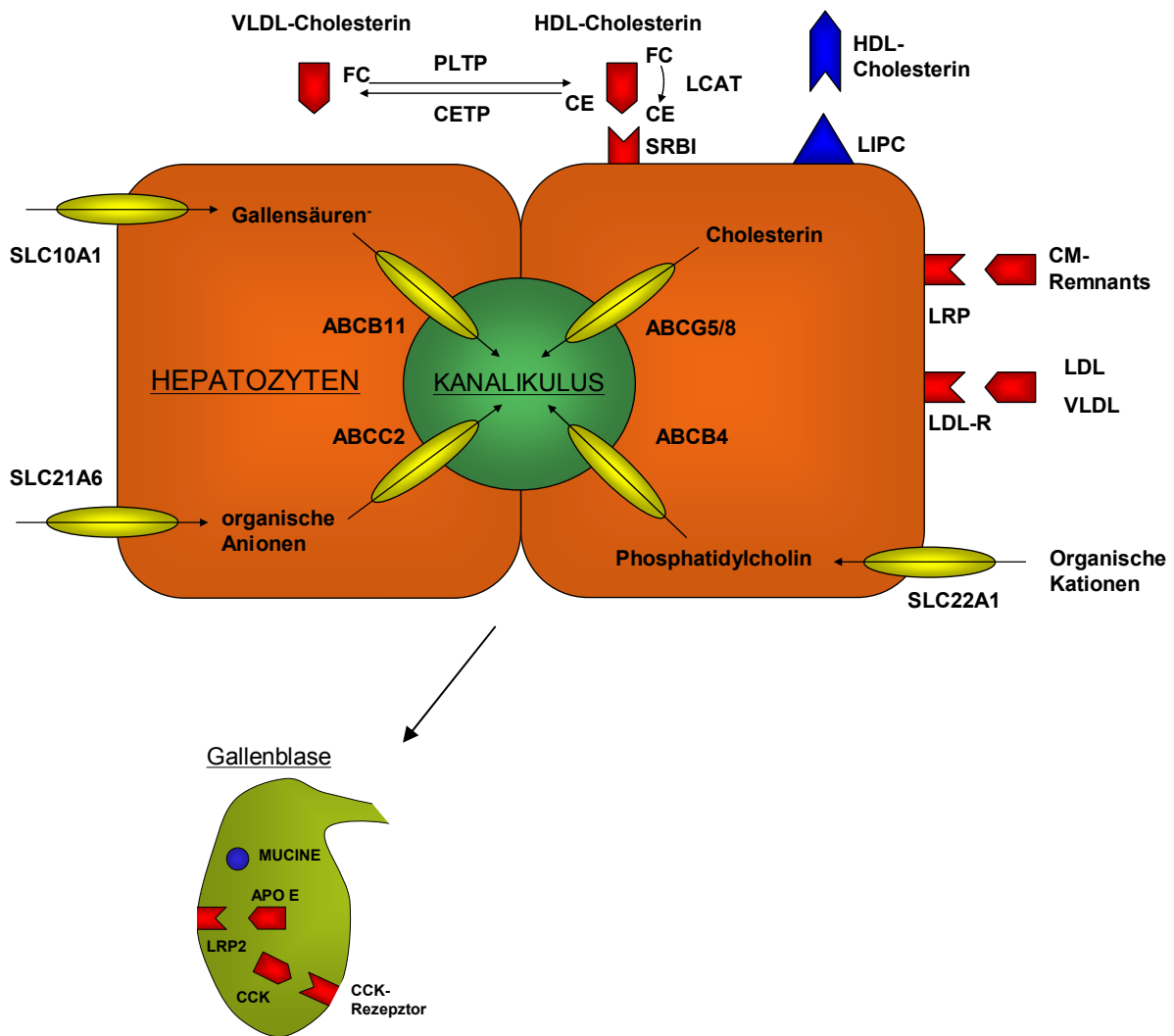
## 4 Diskussion

### 4.1 Pathogenese der Cholesterincholelithiasis und genetische Analysen in einer humanen Assoziationsstudie

Das Verständnis der molekularen Pathogenese der Gallensteinentstehung hat sich in den letzten Jahren entscheidend erweitert. Von der Beschreibung exogener Risikofaktoren ist man dazu übergegangen, zunehmend die molekularen Pathomechanismen zu explorieren und die Genetik und potentielle Kandidatengene in den Fokus der Analysen zu stellen. Zudem hat sich in der Medizin und Biologie das Verständnis über die molekulargenetischen Grundlagen von Erkrankungen bedeutend weiterentwickelt (82, 83). Die Aufklärung des Metabolismus und des Transports von Cholesterin hat grundlegende Einblicke in die Funktion der Leber und die Bildung der Galle ermöglicht. Die am hepatischen und biliären Cholesterinmetabolismus beteiligten Transportsysteme können Abb. 38 entnommen werden.

In einer Reihe epidemiologischer Studien wurden geographische und ethnische Unterschiede in der Gallensteinprävalenz gefunden. Genomanalysen im Mausmodell haben zudem zur Entdeckung von Kandidatengenen, die eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Cholesterincholelithiasis spielen, geführt. Mit Hilfe der Quantitative Trait Locus (QTL)-Analyse konnten lithogene (*Lith*) Genloci identifiziert und eine murine Gallensteinkarte erstellt werden (84-86). Ein QTL ist definiert als eine chromosomale Region, die mindestens ein Gen enthält, das den untersuchten Phänotyp beeinflusst. Die QTL-Analyse lokalisiert chromosomale Regionen in experimentellen Kreuzungen gallensteinsuszeptibler und -resistenter Inzuchtmausstämme, die mit den Phänotypen assoziiert sind und eine genetische Ursache für die Entstehung der Cholesterincholelithiasis darstellen können. Diese Ergebnisse legten nahe, die Übertragbarkeit der im Mausmodell erzielten Daten in einer humanen Studie zu prüfen. Ein derartiger Transfer ist unter molekularbiologischer und genetischer Hinsicht zulässig, weil zahlreiche Stoffwechselprozesse in der Maus mit denen des Menschen übereinstimmen und für 99% der murinen Gene orthologe humane Gene existieren (87). Nicht automatisch zeigen krankheitsrelevante Gene der Maus die gleichen funktionellen Effekte beim Menschen, doch sind wichtige Regulationsmechanismen genetisch konserviert und nehmen bei unterschiedlichen Spezies dieselben Schlüsselrollen in der Pathogenese ein.





**Abb. 38** Schematische Darstellung des hepatischen und biliären Cholesterinmetabolismus  
 Abkürzungen vergleiche Abkürzungsverzeichnis; SLC, Solute Carrier; CCK, Cholecystokinin;  
 CE, Cholesterinester; FC, freies Cholesterin; LCAT, Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase;  
 PLTP, Phospholipid-Transferprotein

Genetische Polymorphismen sind Variationen in der DNA-Sequenz mit einer Allelfrequenz innerhalb einer Population von mindestens 1%. Polymorphismen lassen sich hinsichtlich verschiedener Aspekte charakterisieren: repetitive Polymorphismen, Intron-Polymorphismen, Exon-Polymorphismen, Insertionen und Deletionen. Die häufigsten DNA-Sequenz-Varianten im humanen Genom sind SNPs. Für die Auswahl von Polymorphismen sind ihre Lokalisation und ihre funktionelle Relevanz von besonderer Bedeutung. Da im menschlichen Genom über eine Million SNPs existieren, ist eine gezielte Selektion der in einer Assoziationsstudie

untersuchten Polymorphismen besonders wichtig. Die Gesichtspunkte für die Wahl von geeigneten Polymorphismen sind in Tab. 50 zusammengefasst (88).

**Tab. 50** Kriterien der SNP Selektion

Art der Variation	Lokalisation	Charakteristika	Häufigkeit	Phänotypischer Effekt
Nonsense	Kodierende Sequenz	Abbruch der Aminosäure-Sequenz	Sehr niedrig	Sehr stark
Missense / nicht-synonym	Kodierende Sequenz	Änderung der Aminosäure-Sequenz mit möglicher Änderung der Proteineigenschaften	Niedrig	Mittelmäßig bis stark
Insertion / Deletion	Kodierende Sequenz	Änderung der Aminosäure-Sequenz mit möglicher Änderung der Proteineigenschaften	Niedrig	Niedrig bis sehr stark
Synonym	Kodierende Sequenz	Keine Änderung der Aminosäure-Sequenz / kann aber zu Splice-Varianten führen	Mittelmäßig	Niedrig bis stark
Promotor / regulatorische Region	Promotor, 5'UTR, 3'UTR	Keine Änderung der Aminosäure-Sequenz / kann aber die Genexpression beeinflussen	Niedrig bis mittelmäßig	Niedrig bis hoch
Intron-Bereich	Intron	Keine bekannte Funktion / kann aber die Genexpression oder die mRNA Stabilität beeinflussen	Hoch	Sehr schwach

Die Recherche nach geeigneten Polymorphismen erfolgte mit Hilfe von Publikationen und elektronischen Datenbanken im Internet. Innerhalb dieser Datenbanken sind Gene mit den bisher bekannten Varianten veröffentlicht. Weitere Informationen, wie z.B. die Lokalisation und funktionelle Effekte, werden teilweise ebenfalls angegeben. In wenigen Fällen sind auch Allelfrequenzen bekannt, die in definierten Populationen ermittelt wurden. Aus diesem Grund ist es für den Studienaufbau wichtig, aus welcher geographischen Region bzw. ethnischen Gruppe diese Informationen stammten.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Auswahl der Kandidatengene zum einen anhand der murinen Gallensteinkarte (Abb. 2) und zum anderen anhand humaner Studienergebnisse (45, 70, 89). Aus der murinen Gallensteinkarte wurden diejenigen Gene ausgewählt, die eine deutliche Assoziation mit der Genese von Gallensteinen zeigten, so genannte *Lith*-Gene. Die beiden Gene *Abcb11* und *Lrp2* wurden im *Lith1*-Locus identifiziert. Weiterhin wurde das Gen der hepatischen Lipase (*Lipc*) im *Lith5*-Locus in diese Arbeit aufgenommen. Aufgrund der

Ergebnisse humaner Studien wurden zudem die Gene des Apolipoproteins E (*APOE*), des hepatischen HDL-Rezeptors (*SRBI*) und des Cholesterinester-Transferproteins (*CETP*) in die genetischen Analysen einbezogen.

Um Polymorphismen zu identifizieren, die mit der Gallensteinpathogenese beim Menschen assoziiert sind, gibt es die Möglichkeit, Familienuntersuchungen oder Fall-Kontroll-Studien durchzuführen. In dieser Arbeit wurde eine Assoziationsstudie mit 184 Gallensteinpatienten sowie 184 nach Alter, Geschlecht und BMI gematchten Kontrollen durchgeführt. Diese Methode bietet den Vorteil eines effektiven Designs, birgt aber die Gefahr eines Fehlers bei der Auswahl des Kontrollkollektivs. Entscheidend ist die Tatsache, dass alle Patienten dieser Studie aus dem Universitätsklinikum Aachen rekrutiert wurden, so dass Fälle sowie Kontrollen aus demselben Kollektiv stammen (71, 72). Um bekannte Risikofaktoren der Gallensteinentstehung herauszufiltern und genetische Risikofaktoren zu identifizieren, wurden die Patienten zudem nach Alter, Geschlecht und BMI gematcht.

## 4.2 Varianten humaner Gene als genetische Marker der Cholesterincholelithiasis

Ziel dieser Studie war es, Assoziationen zwischen Polymorphismen (SNPs) in Gallensteinkandidatengen und Cholesterincholelithiasis in einer Fall-Kontroll-Studie zu untersuchen sowie Zusammenhänge mit bekannten lithogenen Risikofaktoren aufzudecken.

### 4.2.1 *CETP* als genetische Variable im reversen Cholesterintransport

Das Cholesterinester-Transferprotein ist ein Mitglied der Lipidtransfer-Proteine und kann nahezu jedes Lipoprotein binden. Obwohl das Cholesterinester-Transferprotein mit jedem Lipoprotein interagieren kann, ist seine Hauptaufgabe der Transfer von Cholesterinester (CE) und Triglyzeriden (TG) im humanen Plasma, insbesondere der CE-Transfer von HDL auf VLDL, LDL bzw. IDL und der TG-Transfer in entgegengesetzter Richtung. Aus diesen Funktionen lässt sich für das Cholesterinester-Transferprotein eine bedeutende Rolle im reversen Cholesterintransport ableiten (90, 91). Die Verteilung eines RFLP im *CETP*-Gen (*TaqIB*) unterschied sich in einer finnischen Studie signifikant zwischen Patienten mit Cholesteringallensteinen und steinfreien Kontrollen, wobei die homozygoten Gallensteinpatienten verminderte Serum-HDL-Spiegel besaßen (51). Hiermit ist auch das *CETP*-Gen ein attraktives Kandidatengen hinsichtlich der Entstehung der Cholesterincholelithiasis. In der vorliegenden Studie wurde der *TaqIB* Polymorphismus ausgewählt und analysiert. Eine Assoziation zwischen dem SNP und Gallensteinen konnte nicht ermittelt werden. Die weitere Analyse ergab, dass Frauen mit dem homozygoten Genotypen (B1/B1) signifikant niedrigere HDL-Cholesterinspiegel als heterozygote (B1/B2) Patientinnen hatten. Dieser Zusammenhang ist in früheren Studien über den *TaqIB* Polymorphismus beschrieben worden und konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (51, 79, 80). Die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen aus vorangegangenen Studien über das *CETP*-Gen ist ein Beleg für die korrekte Auswahl repräsentativer Patienten- und Kontrollkollektive in der vorliegenden Assoziationsstudie. Es konnte zwar keine direkte Assoziation zwischen dem *CETP*-Gen und Gallensteinen gezeigt werden, doch ist dieser Polymorphismus mit einem bekannten Risikofaktor für die Steinentwicklung signifikant assoziiert.

#### 4.2.2 Die kontroverse Rolle von *APOE*

Die aminoternale Domäne des Apolipoprotein E kann Bindungen mit dem LDL-Rezeptor und dem LDL receptor-related protein (LRP) eingehen. Die drei APOE Isoformen haben unterschiedliche Bindungsaffinitäten, wobei E2 eine verminderte Affinität aufweist. APOE4 Partikel werden schnell aus dem Plasma beseitigt und führen so zu einer Repression der hepatischen LDL-Rezeptoren und zu einer Erhöhung der Plasma-Cholesterinkonzentration (92). Zudem ist APOE in der Galle identifiziert worden und könnte als Promotor- oder Inhibitorprotein die Cholesterinkristallisation modulieren (93); mitunter steigt die APOE-Expression in Epithelzellen der Gallenblase bei Anreicherung von Cholesterin an (94). Bisher wird der Einfluss von *APOE* auf die Pathogenese der Cholesteringallensteine kontrovers diskutiert. So ist die Isoform E4 als ein Risikofaktor für die Gallensteinentstehung (45), aber auch für das Wiederauftreten von Gallensteinen nach erfolgreicher Stoßwellen-Lithotripsie identifiziert worden (46, 47). Eine japanische Studie von HASEGAWA et al. (95) konnte jedoch keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Gallensteinen und dem *APOE* Polymorphismus feststellen. Eine Untersuchung von schwangeren Patientinnen ergab ebenfalls keine signifikante Assoziation zwischen der Gallensteinprävalenz und der E4 Isoform (96). Die Arbeitsgruppe um VAN ERPECUM et al. (49) konnte ebenso wenig einen signifikanten Unterschied in der Cholesterinkristallisation bzw. der Anzahl von Cholesterinsteinen zwischen APOE4-Trägern und Patienten ohne die Isoform E4 ermitteln. In der vorliegenden Studie konnte kein signifikanter Unterschied der *APOE* Genotypen zwischen Steinträgern und Kontrollen nachgewiesen werden. Wie auch in den Studien zuvor (48, 97-99) konnte in dieser Arbeit jedoch eine Assoziation mit Serumlipiden belegt werden. Die Daten unterstreichen die Validität der getesteten Population in dieser Arbeit. Patienten mit dem  $\epsilon$ 4 Allel hatten signifikant höhere Gesamt-Cholesterin- und LDL-Cholesterinwerte im Gegensatz zu Probanden ohne  $\epsilon$ 4 Allel (45, 93, 100, 101). Die genannten Ergebnisse stützen die Hypothese, dass *APOE* eine wichtige Rolle im Cholesterinmetabolismus spielt und einen lithogenen Risikofaktor darstellt.

### 4.2.3 Die Gallensäureexportpumpe *ABCB11* im *Lith1*-Locus als potenzielles Kandidatengen

Die biliäre Sekretion von Gallensäuren durch Hepatozyten geschieht mit Hilfe von ATP-abhängigen Transportsystemen. Diese Transporter sind in der Gallebildung geschwindigkeitsbestimmend. Monovalente Gallensäuren werden über die in der kanalikulären Hepatozytenmembran lokalisierte Gallensäureexportpumpe ABCB11, früher BSEP (Bile salt export pump) bzw. SPGP (Sister-of-p-glycoprotein) genannt (102), gegen den Konzentrationsgradienten in die Gallekanalikululi sezerniert. Funktionsstörungen dieses Gens führen zur progressiven familiären intrahepatischen Cholestase (PFIC) (60, 103). Die PFIC ist eine autosomal rezessiv erbliche, schwere cholestatische Lebererkrankung mit Manifestation in der Kindheit, die meist rasch zur Leberzirrhose fortschreitet. Dieser Transporter kann zu einer veränderten biliären Lipidsekretion der Leber und zu einer Verschiebung der Lipidzusammensetzung der Galle aus der mizellaren Phase (Phase 1) im Gleichgewichts-Phasendiagramm nach WANG und CAREY (Abb. 1) führen, die die Bildung von Gallensteinen begünstigt. Das Gen des kanalikulären Gallensäuretransporters *Abcb11* stellt aufgrund seiner Kolokalisation mit dem Hauptlocus *Lith1* und seiner differenziellen Expression in gallenstein-suszeptiblen und –resistenten Inzuchtmausstämmen ein attraktives Kandidatengen für die Cholesterincholelithiasis dar (104, 105). *Abcb11*-transgene Mäuse zeigen nach Fütterung einer cholesterin- und cholsäurereichen Diät eine tendenziell erhöhte Gallenstein-suszeptibilität (106).

In der vorliegenden Studie wurden zwei SNPs (Exon 9, Exon 13) im *ABCB11*-Gen analysiert. Hier ergaben sich keine signifikanten Assoziationen zwischen der Cholesterincholelithiasis und den beiden Exon-Polymorphismen. Der Exon 9 Polymorphismus zeigte eine sehr niedrige Minorallelfrequenz von nur 0,4%, so dass wir bei diesem Polymorphismus aufgrund der kleinen Fallzahlen keine weiteren Analysen anschlossen. Bei der statistischen Analyse des Exon 13 Polymorphismus zeigte sich, dass homozygote (T/T) Patienten einen signifikant höheren BMI als heterozygote (T/C) bzw. homozygote (C/C) Probanden hatten. Damit konnte erstmals für *ABCB11* eine signifikante Assoziation mit einem lithogenen Risikofaktor gezeigt werden. Die oben beschriebenen Ergebnisse sowie die Beobachtungen, dass der Exon 13 Polymorphismus mit einem lithogenen Risikofaktor (BMI) assoziiert ist, weisen auf einen relevanten Effekt des Gallenstein-kandidatengens *ABCB11* in der Pathogenese der Cholesterincholelithiasis hin.

#### 4.2.4 *LRP2* als weiteres attraktives Kandidatengen im *Lith1*-Locus

*LRP2*, auch als Glykoprotein 330 bzw. Megalin bekannt, ist ein Lipoproteinrezeptor, der zur LDL-Rezeptor-Genfamilie gehört und strukturelle Ähnlichkeiten mit dem LDL-Rezeptor aufweist (61). Primär wurde dieser Rezeptor in Ratten als Bestandteil des HEYMANN Nephritis Antigen Komplex (*LRP2* und RAP (Rezeptor Assoziiertes Protein)) identifiziert. *LRP2* wird auf speziellen Epithelien exprimiert, wie z.B. im Ileum, den proximalen Tubuli der Niere, in der Lunge und im Ventrikelsystem des ZNS. Kürzlich konnte auch eine Expression in Cholangiozyten nachgewiesen werden (DAVIDS, N., LAMMERT, F., unveröffentlichte Beobachtungen). Aufgrund der Expression von *LRP2* in der Leber oder der Gallenblase könnte dieser Rezeptor eine entscheidende Rolle in der hepatischen Cholesterinhomöostase und der Cholesteringallensteinbildung spielen (64, 65), da zu den extrazelluläre Liganden unter anderem APOE, APOB, Vitamin-D bindendes Protein und retinal bindendes Protein zählen, die im Lipidstoffwechsel eine wichtige Rolle spielen. Als Vitamin A-Rezeptor könnte *LRP2* die Retinolsekretion beeinflussen und über nukleäre Rezeptoren zudem an der Regulation des Gallensäuretransporters ABCB11 beteiligt sein.

In dieser Arbeit konnte zunächst eine Assoziation zwischen zwei RFLPs im *LRP2*-Gen und der Cholesterincholelithiasis detektiert werden. Jedoch zeigt die Verteilung beider Polymorphismen einen Heterozygoten-Überschuss. Im De Finetti-Dreieck wichen die Populationen (Fälle und Kontrollen) deutlich von der Parabel (HWG) nach oben ab (Abb. 20 und 24). Eine solche Genotypenverteilung mit einem Überhang an heterozygoten Patienten ist in einer natürlichen Population nicht zu erwarten. Eine Ausnahme bietet der balancierte Polymorphismus, bei dem eine umweltbedingte Selektion vorliegt; ein Beispiel hierfür ist die Interaktion zwischen Malaria und der Sichelzellanämie (107). Eine solche Selektion war in dieser Arbeit nicht zu erwarten, so dass eine weitere Überprüfung erfolgte. Die Ursache für das signifikante Abweichen beider getesteter SNPs im *LRP2*-Gen könnten Genduplikaturen im humanen Genom sein, bei denen ein Fragment ohne den Polymorphismus zusätzlich amplifiziert wurde, so dass die Genotypisierung zu Ergebnissen führt, die in einem natürlichen Kollektiv nicht auftreten können. Aus diesem Grund wurden zur Kontrolle beide Polymorphismen sowie ein zusätzlich ausgewählter SNP mit einer weiteren Methode (TaqMan) überprüft und typisiert. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte, dass alle drei getesteten SNPs im HWG bzw. auf der Parabel im De Finetti-Dreieck lagen. Sie wiesen damit eine andere Genotypverteilung im Vergleich zum getesteten RFLP auf. Diese Beobachtung bestätigte, dass mit der Methode des RFLP bei der Genotypisierung der *LRP2*

Polymorphismen ein Genotypisierungsfehler aufgetreten ist, mit der TaqMan Methode dagegen valide Ergebnisse erzielt wurden. Mit Hilfe der TaqMan Genotypisierung zeigte kein SNP eine signifikante Assoziation mit dem Auftreten von Gallensteinen. Für den SNP1 (rs2228171) konnte allerdings eine signifikante Assoziation mit lithogenen Risikofaktoren gezeigt werden. Homozygote (C/C) Patienten hatten signifikant niedrigere HDL-Cholesterinwerte im Vergleich zu heterozygoten Patienten. Auch wiesen Heterozygote einen signifikant höheren BMI auf als homozygote (T/T) Patienten. Zudem waren tendenziell die LDL-Cholesterinwerte und auch die Triglyzeridkonzentrationen bei homozygoten (C/C) Patienten erhöht. Ebenso war der SNP3 (rs2075252) signifikant mit Risikofaktoren für das Gallensteinleiden assoziiert. Homozygote (G/G) Patienten hatten signifikant höhere HDL-Cholesterinspiegel als heterozygote (G/A) oder homozygote (A/A) Patienten, homozygote (A/A) Patienten hatten deutlich höhere Triglyzeridwerte im Vergleich mit heterozygoten (G/A) Patienten. Diese Ergebnisse beschreiben erstmals eine Assoziation zwischen dem *LRP2*-Gen und lithogenen Risikofaktoren. Die signifikanten Zusammenhänge zwischen Polymorphismen im *LRP2*-Gen und Laborparametern, die Ausdruck des Cholesterinstoffwechsels sind, weisen auf die potentielle Rolle von LRP2 in der Cholesterinhomöostase hin. Die Identifizierung mehrerer Kandidatengene innerhalb eines QTLs bedeutet nicht, dass diese Gene einander als Kandidatengene ausschließen. Es ist durchaus denkbar, dass *Lith1* eine Gruppe von funktionell verwandten Genen darstellt und den additiven Effekt mehrerer Polymorphismen widerspiegelt. Bei einem additiven Effekt ist ein entsprechend hoher LOD-Score ( $> 3,3$  für *Lith1*) bei der QTL-Analyse zu erklären. Dies bedeutet, dass Kandidatengene an einem genetischen Ort zu finden sind, die eine Assoziation mit dem Phänotyp aufweisen. Somit lässt sich für diesen Locus ein höherer LOD-Score errechnen.

#### **4.2.5 *LIPC* mit Einfluss auf das Lipoproteinmuster als mögliches Gallensteinkandidatengen**

Die hepatische Lipase ist ein lipolytisches Enzym, das in Hepatozyten synthetisiert wird (108). Durch ihre Sekretion und die extrazelluläre Lokalisation greift die hepatische Lipase in den Lipoproteinmetabolismus ein. In Studien über Polymorphismen der hepatischen Lipase zeigen sich Effekte im Hinblick auf das Lipoproteinmuster (HDL, LDL, VLDL). Bedeutend ist die inverse Korrelation zwischen der Enzym-Aktivität und dem HDL-Cholesterinspiegel (109-111). Zudem findet sich für das murine Gen *Lipc* eine Kolokalisation mit *Lith5*. Somit



ist *Lipc* ein weiteres attraktives Kandidatengen für die Cholelithiasis. Diese Beobachtungen führen zu der Überlegung, dass eine Variation im Gen der hepatischen Lipase zur Entstehung von Gallensteinen beitragen kann. Obgleich der -514 Promotor-Polymorphismus in dieser Arbeit keine signifikante Assoziation mit Cholesterincholelithiasis zeigte, ergab sich ein Zusammenhang mit dem BMI. Patienten die homozygot (T/T) waren, zeigten einen signifikant höheren BMI als heterozygote (C/T) oder homozygote (C/C) Patienten. In einem kanadischen Kollektiv konnte zuvor schon eine Assoziation zwischen dem -514 Promotor-Polymorphismus und dem BMI bzw. dem HDL-Cholesterin gezeigt werden (112). In dieser Arbeit wiesen homozygote Patienten (T/T) ebenfalls tendenziell höhere HDL-Cholesterinwerte auf. Dieser Promotor-Polymorphismus beeinträchtigt die Aktivität der hepatischen Lipase signifikant und greift in den Lipoproteinmetabolismus ein (113). Diese Arbeit konnte die Ergebnisse einer zuvor beschriebene Assoziation des -514 Promotor-Polymorphismus mit dem BMI (112) bestätigen und macht die Relevanz des *LIPC*-Gens im humanen Cholesterinstoffwechsel deutlich.

#### **4.2.6 *SRBI* – Der Rezeptor für HDL-Cholesterin, die Quelle biliären Cholesterins**

Der hepatische HDL-Rezeptor der Leber spielt eine bedeutende Rolle im Cholesterinstoffwechsel. In vorangegangenen Studien (114) konnte eine Korrelation zwischen dem HDL-Cholesterinspiegel und dem biliären Cholesterin aufgedeckt werden. Niedrige HDL-Cholesterinkonzentrationen korrelieren mit einer Cholesterinanreicherung der Galle und steigern das Risiko der Gallensteinentstehung (115). ROBINS et al. (116) konnten zeigen, dass zirkulierendes HDL als Hauptquelle für freies Cholesterin in der Galle dient. Zudem ergaben murine QTL-Analysen, dass der hepatische HDL-Rezeptor mit einem genetischen Locus kolokalisiert, der mit dem HDL-Spiegel assoziiert ist (117). Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass Cholesterin aus HDL-Partikeln über den hepatischen HDL-Rezeptor aufgenommen und transhepatisch in die Galle gelangt. Dieses Cholesterin reichert sich in der Galle an und trägt zur Cholesterinübersättigung und zur Bildung von Cholesteringallensteinen bei. In dieser Arbeit konnte keine Assoziation zwischen Gallensteinen und Polymorphismen in Intron 5 und Exon 8 des *SRBI*-Gens gezeigt werden. Signifikante Unterschiede ergaben sich in der statistischen Auswertung von Laborparametern nur für den Intron 5 Polymorphismus. Für diesen SNP konnte ein Zusammenhang mit Gesamt-Cholesterin und Triglyzeriden gezeigt werden. Patienten die für den SNP im Intron 5 homozygot (C/C) sind, wiesen signifikant höhere Gesamt-Cholesterin- und Triglyzeridwerte als heterozygote (C/T)

Patienten auf. Diese Resultate zeigen, dass der Intron 5 Polymorphismus zwar nicht direkt mit dem Auftreten von Gallensteinen, jedoch ebenfalls mit lithogenen Risikofaktoren wie dem Gesamt-Cholesterin und den Triglyzeriden assoziiert ist.

### 4.3 Ausblick: Klinische Anwendbarkeit und genetische Risikofaktoren

Die vorliegende Studie ist die erste humane Assoziationsstudie, die murine *Lith*-Gene systematisch an Gallensteinpatienten analysiert hat. Die im Mausmodell identifizierten *Lith*-Gene wurden am Menschen untersucht, um zu erkennen, ob sich die in der Maus gefundenen Ergebnisse auch in einem humanen Patientenkollektiv bestätigen lassen.

Die in dieser Studie untersuchten Kandidatengene mit ihren Polymorphismen zeigten keine direkte Assoziation mit dem Auftreten von Gallensteinen. Jedoch wurden signifikante Zusammenhänge mit wichtigen Risikofaktoren ermittelt, z.B. BMI, Gesamt-Cholesterin-, LDL-Cholesterin- und HDL-Cholesterinspiegel. Die Daten dieser Arbeit geben daher weitere Hinweise auf die pathogenetische Relevanz genetischer Risikofaktoren bei der Gallensteinentstehung. Zu weiteren Analysen sind zusätzliche *LITH*-Gene sowie eine größere Anzahl von Polymorphismen zu untersuchen. Zu diesen gehören Mucingene (118-121), die hochmolekulare Glykoproteine kodieren, welche von Epithelzellen der Gallenwege sezerniert werden. Störungen der Mucinsekretion begünstigen die Entwicklung von Cholesteinsteinen, zudem kolokalisieren diese Gene mit Gallenstein-QTLs (122). Auch die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMGCR) (123), welches das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Cholesterinbiosynthese ist, ist bisher noch nicht in Assoziationsstudien bei Gallensteinpatienten untersucht worden. Kürzlich ist für den heterodimeren kanalikulären Cholesterintransporter *Abcg5/8* eine Kolokalisation mit einem QTL auf Mauschromosom 17 identifiziert worden (124). *ABCG5/G8* wird beim Menschen insbesondere in der Leber und im Intestinum exprimiert. In der Leber erfolgt über *ABCG5/G8* eine Cholesterinsekretion in die Galle, während der Transporter im Darm eine Barrierefunktion gegenüber einer übermäßigen Cholesterinresorption besitzt und damit einer Hypercholesterinämie entgegenwirkt. Patienten mit Mutationen im *ABCG5/G8*-Gen und einer Dysfunktion des Proteins entwickeln eine Sitosterolämie, bei der die Serumkonzentration von pflanzlichen Sterolen erhöht ist. Im Falle einer Überexpression von *ABCG5/G8* in der Leber

könnte eine gesteigerte hepatische Cholesterinsekretion die Entstehung von Cholesteringallensteinen fördern (125).

Durch die Identifizierung von krankheitsrelevanten SNPs können mögliche Prognosefaktoren zur individuellen Risikoabschätzung gewonnen werden, um prädiktive Untersuchungen bei phänotypisch Gesunden durchzuführen. In der Praxis könnten genetische Tests von *LITH*-Genen bei Patienten mit Adipositas und/oder metabolischem Syndrom sinnvoll sein, insbesondere dann, wenn aufgrund von Begleiterkrankungen ein hohes Operationsrisiko vorliegt. Ebenso ist es denkbar, eine patientenbezogene Risikoabschätzung durchzuführen, um in Abhängigkeit des individuellen Risikos eine primärpräventive Therapie bzw. neue diätetische oder pharmakologische Präventions- und Interventionsstrategien einzuleiten und der Entstehung von Gallensteinen vorzubeugen. Aufgrund der erheblichen Kosten, die die Gallensteinerkrankung mit sich bringt, könnte gerade eine Primärprävention gesundheitsökonomisch durchaus sinnvoll sein.

## 5 Zusammenfassung

Die Cholesterincholelithiasis ist eine polygene Erkrankung, bei der Umweltfaktoren sowie zahlreiche Gene und deren komplexen Interaktionen die Gallensteinprädisposition entscheidend beeinflussen. Kreuzungsversuche im Mausmodell haben mit Hilfe der Quantitative Trait Locus (QTL)-Analyse Gallensteinloci identifiziert und zur Erstellung einer murinen Gallensteinkarte geführt. Zudem haben einzelne Studien humane Gallenstein kandidatengene untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden systematisch genetische Variationen (Polymorphismen) in Gallenstein kandidatengenen ausgewählt und in einer Fall-Kontroll-Studie mit 184 gematchten Paaren analysiert, um Assoziationen zwischen SNPs in Kandidatengenen und der Cholesterincholelithiasis zu identifizieren. Für die Auswahl geeigneter Kandidatengene wurde die im Mausmodell erarbeitete murine Gallensteinkarte herangezogen. Aus dem *Lith1*-Locus wurden die beiden Gene für das Low Density Lipoprotein Related Protein (*LRP2*) und den kanalikulären Gallensäuretransporter (*ABCB11*) ausgewählt. Weitere Kandidatengene waren die hepatische Lipase (*LIPC*) im *Lith5*-Locus und der hepatische HDL-Rezeptor (*SRB1*), der in QTL-Analysen mit HDL-Cholesterinwerten assoziiert ist. Zudem dienten bekannte humane Kandidatengene wie das Apolipoprotein E (*APOE*) und das Cholesterinester-Transferprotein (*CETP*) als "Kontroll-Gene", für die bereits Assoziationen mit lithogenen Risikofaktoren beschrieben worden waren.

Die Suche nach geeigneten Polymorphismen erfolgte mit Hilfe von Publikationen und elektronischen Datenbanken (NCBI LocusLink, JSNP Database, HGVbase). Die Auswahl geeigneter SNPs wurde anhand ihrer Lokalisation und ihrer funktionellen Relevanz getroffen. Zur molekularbiologischen Genotypisierung wurden verschiedene Methoden (Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP), DNA-Sequenzierung, SNaPshot Minisequenzierung und TaqMan Methode) verwendet, um eine effektivere Genotypisierung zu erzielen. Das TaqMan Verfahren erwies sich als überlegene Methode bei der Genotypisierung größerer Kollektive und in Hinblick auf Reproduzierbarkeit und Validität der Ergebnisse.

Die statistische Analyse zeigte, dass keiner der typisierten Polymorphismen direkt mit Cholesteringallensteinen assoziiert war, jedoch konnten mehrere genetische Assoziationen mit lithogenen Risikofaktoren aufgezeigt werden. Bei einer komplexen Erkrankung wie der Cholelithiasis ist davon auszugehen, dass nicht eine einzelne Genvariante entscheidend ist, sondern dass multiple genetische Varianten einen additiven Effekt auf die Steinbildung ausüben. Signifikante Assoziationen konnten für SNPs in den, *ABCB11*-, *APOE*-, *CETP*-, *LIPC*-, *LRP2*- und *SRBI*-Genen mit lithogenen Risikofaktoren wie dem body mass index, Gesamt-Cholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin und Triglyzeriden nachgewiesen werden. Diese Arbeit konnte erstmals einen Zusammenhang zwischen humanen *LITH*-Genen und lithogenen Risikofaktoren zeigen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse bestätigen damit die im Mausmodell identifizierten *Lith*-Gene. Zu klären bleibt, ob weitere Polymorphismen oder Haplotypen der *LITH*-Gene und deren Interaktionen (Epistase) oder die Identifizierung von Haplotypen die Entstehung von Gallensteinen beeinflussen.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht die Rolle genetischer Risikofaktoren bei der Entstehung von Gallensteinen und trägt damit zum besseren molekularen Verständnis des Pathomechanismus der Cholesterincholelithiasis bei. Die Aufklärung von genetischen Prädispositionen und die Identifizierung genetischer Risikofaktoren bildet die Voraussetzung für neue Ansätze zur Risikoabschätzung, Prävention und Therapie der Cholesterincholelithiasis.

## Literaturverzeichnis

1. Matern S. Cholelithiasis. In: Hepatologie. Gerok W, Blum HE (Hrsg.). Urban & Schwarzenberg, München 1995, S. 565-596
2. Lammert F, Matern S. Leber. In: Klinische Pathophysiologie. Siegenthaler W (Hrsg.). Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2001, S. 847-876
3. Diehl A, Sugarek N, Todd K. Clinical evaluation for gallstone disease: usefulness of symptoms and signs in diagnosis. *Am J Med* 1990;89:29-33
4. Bundesministerium für Gesundheit. Ernährungsabhängige Krankheiten und ihre Kosten. Nomos Verlagsgesellschaft, Baden-Baden. 1993;
5. Gerste B. Operationshäufigkeit in Krankenhäusern 1996 bis 1999. In: Krankenhaus-Report 2000. Arnold M, Litsch M, Schellschmidt H (Hrsg.). Schattauer, Stuttgart 2001, S. 415-424
6. Busch N, Matern S. Current concepts in cholesterol gallstone pathogenesis. *Eur J Clin Invest* 1991;21:453-460
7. Paumgartner G, Sauerbruch T. Gallstones: pathogenesis. *Lancet* 1991;338:1117-1121
8. Apstein MD, Carey MC. Pathogenesis of cholesterol gallstones: a parsimonious hypothesis. *Eur J Clin Invest* 1996;26:343-352
9. LaMont JT, Carey MC. Cholesterol gallstone formation. 2. Pathobiology and pathomechanics. *Prog Liver Dis* 1992;10:165-191
10. Carey MC. Critical tables for calculating the cholesterol saturation of native bile. *J Lipid Res* 1978;19:945-55.
11. Wang DQ, Carey MC. Complete mapping of crystallization pathways during cholesterol precipitation from model bile: influence of physical-chemical variables of pathophysiologic relevance and identification of a stable liquid crystalline state in cold, dilute and hydrophilic bile salt-containing systems. *J Lipid Res* 1996;37:606-630
12. Amigo L, Quinones V, Mardones P, Zanlungo S, Miquel JF, Nervi F, Rigotti A. Impaired biliary cholesterol secretion and decreased gallstone formation in apolipoprotein E-deficient mice fed a high-cholesterol diet. *Gastroenterology* 2000;118:772-779
13. Schwartz CC, Halloran LG, Vlahcevic ZR, Gregory DH, Swell L. Preferential utilization of free cholesterol from high-density lipoproteins for biliary cholesterol secretion in man. *Science* 1978;200:62-64.
14. Pauletzki J, Althaus R, Holl J, Sackmann M, Paumgartner G. Gallblader emptying and gallstone formation: a prospective study on gallstone recurrence. *Gastroenterology* 1996;111:765-771
15. Roslyn J, Pitt H, Mann L, Ament M, DenBesten L. Gallbladder disease in patients on long-term parenteral nutrition. *Gastroenterology* 1983;84:148-154
16. Busch N, Lammert F, Matern S. Biliary secretory immunoglobulin A is a major constituent of the new group of cholesterol crystal-binding proteins. *Gastroenterology* 1998;115:129-138
17. Bennion LJ, Grundy SM. Risk factors for the development of cholelithiasis in man (second of two parts). *N Engl J Med* 1978;299:1221-1227.
18. Maclure KM, Hayes KC, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE, Willett WC. Weight, diet, and the risk of symptomatic gallstones in middle-aged women. *N Engl J Med* 1989;321:563-569.

19. Attili AF, Capocaccia R, Carulli N, Festi D, Roda E, Barbara L, Capocaccia L, Menotti A, Okolicsanyi L, Ricci G *et al.* Factors associated with gallstone disease in the MICOL experience. Multicenter Italian Study on Epidemiology of Cholelithiasis. *Hepatology* 1997;26:809-818.
20. Nakeeb A, et al. Gallstones: genetics versus environment. *Ann Surg* 2002;235:842-849
21. Bennion LJ, Knowler WC. Epidemiology of gallstones. In: Genetics and heterogeneity of common gastrointestinal disorders. Rotter JJ, Samloff IM, Rimoin DL (Hrsg). Academic Press, New York 1980, S. 297-312
22. Burkitt DP, Tunstall M. Gallstones: geographical and chronological features. *J Trop Med Hyg* 1975;78:140-144.
23. Brett M, Barker DJ. The world distribution of gallstones. *Int J Epidemiol* 1976;5:335-341
24. Kratzer W, Kachele V, Mason RA, Hill V, Hay B, Haug C, Adler G, Beckh K, Muche R. Gallstone prevalence in Germany: the Ulm Gallbladder Stone Study. *Dig Dis Sci* 1998;43:1285-1291.
25. Kratzer W, Kron M, Hay B, Pfeiffer MM, Kachele V. Prävalenz der Cholezystolithiasis in Süddeutschland - eine sonographische Untersuchung an 2.498 Personen einer ländlichen Bevölkerung. *Z Gastroenterol* 1999;37:1157-1162.
26. Everhart JE, Khare M, Hill M, Maurer KR. Prevalence and ethnic differences in gallbladder disease in the United States. *Gastroenterology* 1999;117:632-639
27. Sarin SK, Kapur BML, Tandon RK. Cholesterol and pigment gallstones in Northern India. A prospective analysis. *Dig Dis Sci* 1986;31:1041-1045
28. Sarin SK, Negi VS, Dewan R, Sasan S, Saraya A. High familial prevalence of gallstones in the first-degree relatives of gallstone patients. *Hepatology* 1995;22:138-141
29. Khuroo MS, Mahajan R, Zargar SA, Javid G, Sapru S. Prevalence of biliary tract disease in India: a sonographic study in adult population in Kashmir. *Gut* 1989;30:201-205.
30. Nomura H, Kashiwagi S, Hayashi J, Kajiyama W, Ikematsu H, Noguchi A, Tani S, Goto M. Prevalence of gallstone disease in a general population of Okinawa, Japan. *Am J Epidemiol* 1988;128:598-605.
31. Edington GM. Observations on hepatic disease in the Gold Coast: with special reference to cirrhosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1957;51:48-55
32. Sampliner RE, Bennett PH, Comess LJ, Rose FA, Burch TA. Gallbladder disease in Pima Indians. Demonstration of high prevalence and early onset by cholecystography. *N Engl J Med* 1970;283:1358-1364.
33. Comess LJ, Bennett PH, Burch TA. Clinical gallbladder disease in Pima Indians. Its high prevalence in contrast to Framingham, Massachusetts. *N Engl J Med* 1967;277:894-898.
34. Gilat T, Feldman C, Halpern Z, Dan M, Bar-Meir S. An increased familial frequency of gallstones. *Gastroenterology* 1983;84:242-246
35. Van der Linden W, Simonson N. Familial occurrence of gallstone disease: incidence in parents of young patients. *Human Heredity* 1973;23:123-127
36. Jørgensen T. Gallstones in a Danish population: familial occurrence and social factors. *J Biosoc Sci* 1988;20:111-120
37. Kesäniemi YA, Koskenvuo M, Vuoristo M, Miettinen TA. Biliary lipid composition in monozygotic and dizygotic pairs of twins. *Gut* 1989;30:1750-1756
38. Von Vershuer O. Wirksame Faktoren im Leben des Menschen. Beobachtungen an ein- und zweieigenen Zwillingen durch 25 Jahre. Franz Steiner, Wiesbaden 1954, S. 288.

39. Duis BT. Zwillingskatamnesen. Klinische Befunde bei Nachuntersuchung einer auslesefreien Zwillingsserie. *Acta Geneticae Medicae et Gemellologiae* 1956;5:15-103
40. Harvald B, Hauge M. A catamnestic investigation of Danish twins. A preliminary report. *Dan Med Bull* 1956;3:150-158
41. Doig RK. Illness in twins. III. Cholelithiasis. *Med J Aust* 1957;44:716-717
42. Koch G. Interne Befunde aus der Nachuntersuchung der Berliner Zwillingsserie nach 20 bis 25 Jahren. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin* 1959;64:273-277
43. The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001;409:928-933
44. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human disease. *Science* 1996;273:1516-1517
45. Bertomeu A, Ros E, Zambon D, Vela M, Perez-Ayuso RM, Targarona E, Trias M, Sanllehy C, Casals E, Ribo JM. Apolipoprotein E polymorphism and gallstones. *Gastroenterology* 1996;111:1603-1610
46. Portincasa P, van Erpecum KJ, van De Meeberg PC, Dallinga-Thie GM, de Bruin TW, van Berge-Henegouwen GP. Apolipoprotein E4 genotype and gallbladder motility influence speed of gallstone clearance and risk of recurrence after extracorporeal shock-wave lithotripsy. *Hepatology* 1996;24:580-587
47. Venneman NG, van Berge-Henegouwen GP, Portincasa P, Stolk MF, Vos A, Plaisier PW, van Erpecum KJ. Absence of apolipoprotein E4 genotypes, good gallbladder motility and presence of solitary stones delay rather than prevent gallstones recurrence after extracorporeal shock wave lithotripsy. *J Hepatol* 2001;35:10-16
48. Juvonen T, Kervinen K, Kairaluoma MI, Lajunen LH, Kesaniemi YA. Gallstone cholesterol content is related to apolipoprotein E polymorphism. *Gastroenterology* 1993;104:1806-1813.
49. Van Erpecum KJ, van Berge-Henegouwen GP, Eckhardt ER, Portincasa P, van De Heijning BJ, Dallinga-Thie GM, Groen AK. Cholesterol crystallization in human gallbladder bile: relation to gallstone number, bile composition, and apolipoprotein E4 isoform. *Hepatology* 1998;27:1508-1156
50. Van Erpecum KJ, Carey MC. Apolipoprotein E4: another risk factor for cholesterol gallstone formation? *Gastroenterology* 1996;111:1764-1767
51. Juvonen T, Savolainen MJ, Kairaluoma MI, Lajunen LH, Humphries SE, Kesaniemi YA. Polymorphisms at the *apoB*, *apoA-I*, and cholesteryl ester transfer protein gene loci in patients with gallbladder disease. *J Lipid Res* 1995;36:804-812.
52. Feng D, Han T, Chen S. [Polymorphism at the LDL receptor gene locus in patients with cholesterol gallstone disease]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1998;78:63-65
53. Han T, Jiang Z, Suo G, Zhang S. Apolipoprotein B-100 gene *XbaI* polymorphism and cholesterol gallstone disease. *Clin Genet* 2000;57:304-308.
54. Lin JP, Hanis CL, Boerwinkle E. Genetic epidemiology of gallbladder disease in Mexican-Americans and cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene variation. *Am J Hum Genet* 1994;55:A48
55. Pullinger CR, Eng C, Salen G, Shefer S, Batta AK, Erickson SK, Verhagen A, Rivera CR, Mulvihill SJ, Malloy MJ *et al.* Human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J Clin Invest* 2002;110:109-117
56. Lammert F, Wang DQ, Hillebrandt S, Geier A, Fickert P, Trauner M, Matern S, Paigen B, Carey MC. Spontaneous cholecysto- and hepatolithiasis in Mdr2<sup>-/-</sup> mice: a model for low phospholipid-associated cholelithiasis. *Hepatology* 2004;39:117-128
57. Rosmorduc O, Hermelin B, Boelle PY, Parc R, Taboury J, Poupon R. ABCB4 gene mutation-associated cholelithiasis in adults. *Gastroenterology* 2003;125:452-459



58. Lammert F, Carey MC, Paigen B. Chromosomal organization of candidate genes involved in cholesterol gallstone formation: a murine gallstone map. *Gastroenterology* 2001;120:221-238.
59. Childs S, Yeh RL, Georges E, Ling V. Identification of a sister gene to P-glycoprotein. *Cancer Res* 1995;55:2029-2034
60. Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V *et al.* A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 1998;20:233-238
61. Saito A, Pietromonaco S, Loo AK, Farquhar MG. Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9725-9729
62. Farquhar MG, Saito A, Kerjaschki D, Orlando RA. The Heymann nephritis antigenic complex: megalin (gp330) and RAP. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:35-47.
63. Willnow TE, Hilpert J, Armstrong SA, Rohlmann A, Hammer RE, Burns DK, Herz J. Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8460-8464
64. Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J Mol Med* 1999;77:306-15
65. Willnow TE, Nykjaer A, Herz J. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol* 1999;1:E157-62.
66. Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 1997;387:414-417.
67. Fuchs M, Ivandic B, Muller O, Schalla C, Scheibner J, Bartsch P, Stange EF. Biliary cholesterol hypersecretion in gallstone-susceptible mice is associated with hepatic up-regulation of the high-density lipoprotein receptor SRBI. *Hepatology* 2001;33:1451-1459.
68. Mardones P, Quinones V, Amigo L, Moreno M, Miquel JF, Schwarz M, Miettinen HE, Trigatti B, Krieger M, VanPatten S *et al.* Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res* 2001;42:170-180.
69. Johnson M, *et al.* Expression of scavenger receptor class B type I in gallbladder columnar epithelium. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:713-720
70. Acton S, Osgood D, Donoghue M, Corella D, Pocovi M, Cenarro A, Mozas P, Keilty J, Squazzo S, Woolf EA *et al.* Association of polymorphisms at the SR-BI gene locus with plasma lipid levels and body mass index in a white population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1734-1743.
71. Schulz K, Grimes D. Case-control studies: research in reverse. *Lancet* 2002;359:431-434
72. Grimes D, Schulz K. Bias and causal associations in observational research. *Lancet* 2002;359:248-252
73. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-5467
74. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990;31:545-548
75. Applied Biosystems, ABI PRISM® SNaPshot™, Multiplex System. PRODUCT BULLETIN Genetic Analysis 2003;
76. Applied Biosystems, Assay-on-Demand, SNP Genotyping Products Protocol. 2002;
77. De Finetti B. Considerazioni matematiche sull'ereditarieta mendeliana. *Metron* 1926;6:29-37

78. Elston R, Forthofer R. Testing for Hardy-Weinberg equilibrium in small samples. *Biometrics* 1977;33:536-542
79. Ordovas JM, Cupples LA, Corella D, Otvos JD, Osgood D, Martinez A, Lahoz C, Coltell O, Wilson PW, Schaefer EJ. Association of cholesteryl ester transfer protein-TaqIB polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk: the Framingham study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1323-1329.
80. Brousseau ME, O'Connor JJ, Jr., Ordovas JM, Collins D, Otvos JD, Massov T, McNamara JR, Rubins HB, Robins SJ, Schaefer EJ. Cholesteryl ester transfer protein TaqI B2B2 genotype is associated with higher HDL cholesterol levels and lower risk of coronary heart disease end points in men with HDL deficiency: Veterans Affairs HDL Cholesterol Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1148-1154
81. Saito S, Iida A, Sekine A, Miura Y, Ogawa C, Kawauchi S, Higuchi S, Nakamura Y. Three hundred twenty-six genetic variations in genes encoding nine members of ATP-binding cassette, subfamily B (ABCB/MDR/TAP), in the Japanese population. *J Hum Genet* 2002;47:38-50
82. Lander ES. Genomics: launching a revolution in medicine. *J Law Med Ethics* 2000;28:3-14
83. Lander ES, Weinberg RA. Genomics: journey to the center of biology. *Science* 2000;287:1777-1782
84. Lammert F, Carey MC, Paigen B. Chromosomal organization of candidate genes involved in cholesterol gallstone formation: a murine gallstone map. *Gastroenterology* 2001;120:221-238
85. Wang DQ-H, Lammert F, Paigen B, Carey MC. Phenotypic characterization of *Lith* genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice: pathophysiology of biliary lipid secretion. *J Lipid Res* 1999;40:2066-2079
86. Lammert F, Wang DQ, Wittenburg H, Bouchard G, Hillebrandt S, Taenzler B, Carey MC, Paigen B. Lith genes control mucin accumulation, cholesterol crystallization, and gallstone formation in A/J and AKR/J inbred mice. *Hepatology* 2002;36:1145-1154
87. Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002;420:520-562
88. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* 2002;3:391-397
89. Juvonen T, Savolainen MJ, Kairaluoma MI, Lajunen LH, Humphries SE, Kesäniemi YA. Polymorphisms at the apoB, apoA-I, and cholesteryl ester transfer protein gene loci in patients with gallbladder disease. *J Lipid Res* 1995;36:804-812
90. Bruce C, Chouinard RA, Jr., Tall AR. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu Rev Nutr* 1998;18:297-330
91. Lagrost L. Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: review of in vitro and in vivo studies. *Biochim Biophys Acta* 1994;1215:209-236
92. Miettinen TA. Impact of apo E phenotype on the regulation of cholesterol metabolism. *Ann Med* 1991;23:181-186.
93. Juvonen T, Kervinen K, Kairaluoma MI, Lajunen LH, Kesäniemi YA. Gallstone cholesterol content is related to apolipoprotein E polymorphism. *Gastroenterology* 1993;104:1806-1813
94. Lee J, Tauscher A, Seo DW, Oram JF, Kuver R. Cultured gallbladder epithelial cells synthesize apolipoproteins a-I and E. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285 (3):G630-641

95. Hasegawa K, Terada S, Kubota K, Itakura H, Imamura H, Ohnishi S, Aoki T, Ijichi M, Saiura A, Makuuchi M. Effect of apolipoprotein E polymorphism on bile lipid composition and the formation of cholesterol gallstones. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1605-1609
96. Ko CW, Beresford SA, Alderman B, Jarvik GP, Schulte SJ, Calhoun B, Tsuchida AM, Koepsell TD, Lee SP. Apolipoprotein E genotype and the risk of gallbladder disease in pregnancy. *Hepatology* 2000;31:18-23
97. Braekman L, De Bacquer D, Rosseneu M, De Backer G. Apolipoprotein E polymorphism in middle-aged Belgian men: phenotype distribution and relation to serum lipids and lipoproteins. *Atherosclerosis* 1996;120:67-73
98. Lin QY, Du JP, Zhang MY, Yao YG, Li L, Cheng NS, Yan LN, Xiao LJ. Effect of apolipoprotein E gene Hha I restricting fragment length polymorphism on serum lipids in cholecystolithiasis. *World J Gastroenterol* 1999;5:228-230
99. Eggertsen G, Tegelman R, Ericsson S, Angelin B, Berglund L. Apolipoprotein E polymorphism in a healthy Swedish population: variation of allele frequency with age and relation to serum lipid concentrations. *Clin Chem* 1993;39:2125-9.
100. Miettinen TA, Gylling H, Vanhanen H, Ollus A. Cholesterol absorption, elimination, and synthesis related to LDL kinetics during varying fat intake in men with different apoprotein E phenotypes. *Arterioscler Thromb* 1992;12:1044-1052.
101. Angelin B, Holmquist L, Leijd B, Einarsson K. Bile acid metabolism in familial dysbetalipoproteinaemia: studies in subjects with the apolipoprotein E-2/2 phenotype. *Eur J Clin Invest* 1990;20:143-149.
102. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 1998;273:10046-10050
103. Thompson R, Strautnieks S. BSEP: function and role in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Semin Liver Dis* 2001;21:545-550
104. Lammert F, Beier DR, Wang DQ-H, Carey MC, Paigen B, Cohen DE. Genetic mapping of hepatocanalicular transporters establishes Sister-P-glycoprotein (*Spgp*) as a candidate for the major gallstone gene (*Lith1*). *Hepatology* 1997;26:358A
105. Bouchard G, Nelson HM, Lammert F, Rowe LB, Carey MC, Paigen B. High-resolution maps of the murine Chromosome 2 region containing the cholesterol gallstone locus, *Lith1*. *Mamm Genome* 1999;10:1070-1074
106. Figge A, Lammert F, Paigen B, Henkel A, Matern S, Korstanje R, Shneider BL, Chen F, Stoltenberg E, Spatz K *et al.* Hepatic overexpression of murine Abcb11 increases hepatobiliary lipid secretion and reduces hepatic steatosis. *J Biol Chem* 2004;279:2790-2799
107. Lell B, May J, Schmidt-Ott RJ, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Schmid D, Herbich K, Mockenhaupt FP *et al.* The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria. *Clin Infect Dis* 1999;28:794-799
108. Breedveld B, Schoonderwoerd K, Verhoeven AJ, Willemsen R, Jansen H. Hepatic lipase is localized at the parenchymal cell microvilli in rat liver. *Biochem J* 1997;321 (Pt 2):425-430
109. Cohen JC, Wang Z, Grundy SM, Stoesz MR, Guerra R. Variation at the hepatic lipase and apolipoprotein AI/CIII/AIV loci is a major cause of genetically determined variation in plasma HDL cholesterol levels. *J Clin Invest* 1994;94:2377-2384
110. Cohen JC, Vega GL, Grundy SM. Hepatic lipase: new insights from genetic and metabolic studies. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:259-267

111. Guerra R, Wang J, Grundy SM, Cohen JC. A hepatic lipase (LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4532-7
112. St-Pierre J, Miller-Felix I, Paradis ME, Bergeron J, Lamarche B, Despres JP, Gaudet D, Vohl MC. Visceral obesity attenuates the effect of the hepatic lipase -514C>T polymorphism on plasma HDL-cholesterol levels in French-Canadian men. *Mol Genet Metab* 2003;78:31-36
113. Tahvanainen E, Syvanne M, Frick MH, Murtomaki-Repo S, Antikainen M, Kesaniemi YA, Kauma H, Pasternak A, Taskinen MR, Ehnholm C. Association of variation in hepatic lipase activity with promoter variation in the hepatic lipase gene. The LOCAT Study Investigators. *J Clin Invest* 1998;101:956-960
114. Thornton JR, Heaton KW, Macfarlane DG. A relation between high-density-lipoprotein cholesterol and bile cholesterol saturation. *Br Med J* 1981;283:1352-1354.
115. Petitti DB, Friedman GD, Klatsky AL. Association of a history of gallbladder disease with a reduced concentration of high-density-lipoprotein cholesterol. *N Engl J Med* 1981;304:1396-1398.
116. Robins SJ, Fasulo JM. High density lipoproteins, but not other lipoproteins, provide a vehicle for sterol transport to bile. *J Clin Invest* 1997;99:380-384
117. Machleder D, Ivandic B, Welch C, Castellani L, Reue K, Lusis AJ. Complex genetic control of HDL levels in mice in response to an atherogenic diet. Coordinate regulation of HDL levels and bile acid metabolism. *J Clin Invest* 1997;99:1406-1419.
118. Cornberg M, Enss ML, Wagner S. Differenzielle Muzinexpression im Gastrointestinaltrakt. *Z Gastroenterol* 2001;39:369-378
119. Vandehaute B, Buisine MP, Debailleul V, Clement B, Moniaux N, Dieu MC, Degand P, Porchet N, Aubert JP. Mucin gene expression in biliary epithelial cells. *J Hepatol* 1997;27:1057-1066
120. Lee SP, LaMont T, Carey MC. Role of gallbladder mucus hypersecretion in the evolution of cholesterol gallstones. Studies in the prairie dog. *J Clin Invest* 1981;67:1712-1723
121. Gum JR. Mucin genes and the proteins they encode: structure, diversity, and regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:557-564.
122. Schmitz F, Wang DQ-H, Blaeker M, Nguyen M, Chiu M, Beinborn M, Carey MC, Kopin AS. CCK-A receptor deficient mice have an increased susceptibility to cholesterol gallstones. *Hepatology* 1996;24:246A
123. Lammert F, Wang DQ, Paigen B, Carey MC. Phenotypic characterization of *Lith* genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice: integrated activities of hepatic lipid regulatory enzymes. *J Lipid Res* 1999;40:2080-2090
124. Wittenburg H, Lyons MA, Li R, Churchill GA, Carey MC, Paigen B. FXR and ABCG5/ABCG8 as determinants of cholesterol gallstone formation from quantitative trait locus mapping in mice. *Gastroenterology* 2003;125:868-881
125. Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 2002;110:671-80



# Dank

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Dipl.-Biochem. Siegfried Matern, Direktor der Medizinischen Klinik III der RWTH Aachen, danke ich sehr für die Unterstützung und die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Klinik durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Frank Lammert für die ausgezeichnete und intensive Betreuung meiner Promotion, für das jederzeit offene Ohr für Fragen und Diskussion, sowie die außergewöhnliche begleitende und unterstützende Vorbereitung bei der Ausarbeitung von Dias, Postern und Vorträgen.

Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Ralf-Dieter Hilgers und den Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Statistik danke ich, für die intensive Unterstützung bei statistischen Fragen und Problemen.

Danken möchte ich auch der gesamten Forschungsabteilung für die dauernde Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen, die tolle Zusammenarbeit und die nette Atmosphäre. Besonders danken möchte ich Daniela Falk und Michaela Styrnik für die nachsichtige Einarbeitung in die Methodik, Anne Figge für die inhaltlichen Anregungen und unendlichen Tipps und Tricks sowie Sonja Hillebrandt für ständige produktive Diskussionen. Hilde Keppeler danke ich für die Mitarbeit bei den SNaPshot und TaqMan Genotypisierungen.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern, Schwestern, Pflegern und Ärzten der gastroenterologischen Stationen IM 31 und 32, der Poliklinik und der Endoskopie für die freundliche Mitarbeit, insbesondere für die Hilfe bei Blutabnahmen, Probensammlung und der Aktenbeschaffung.

Ein großes Dankeschön geht an meine Eltern für die ständige Hilfe und den tollen Rückhalt in jeder Lebensphase.

Von ganzem Herzen danke ich Uta, die mich zu jeder Zeit unterstützte und einfach immer für mich da war.

# Lebenslauf

Name: Ramin Schirin-Sokhan  
Geburtsdatum: 06.05.1976  
Geburtsort: Essen  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: seit 2003 verheiratet mit Uta von Basum

## Schulbildung

1982-1987 Christ-König-Grundschule, Rheurdt  
1987-1996 Pelizaeus Gymnasium, Paderborn  
Juni 1996 Abitur  
  
1996-1997 Zivildienst, Internat Haus Overbach, Jülich-Barmen

## Studium

1997-1999 Medizinstudium an der Freien Universität Berlin  
seit 1999 Medizinstudium an der RWTH-Aachen  
1999 Ärztliche Vorprüfung  
2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## Beruf

August – Arzt im Praktikum in der Medizinischen Klinik III,  
September 2004 Universitätsklinikum Aachen  
  
Oktober 2004 – Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik III,  
Universitätsklinikum Aachen