

Aus dem Med. Zentrum für Innere Medizin
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Kardiologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. B. Schieffer
Arbeitsgruppe Präventive Kardiologie: Prof. Dr. J. R. Schäfer
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Mutationssuche in regulatorischen Sequenzen der Gene der
Apolipoproteine AI, AIV und CIII mithilfe der denaturierenden
Gradientengelelektrophorese**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin (Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Malte Kristof Stünkel,
aus Hamburg

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
09.10.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. J. R. Schäfer

1. Koreferent: Prof. Dr. H. Renz

2. Koreferent: Prof. Dr. G. Schratt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	<i>Aufgabenstellung</i>	5
1.2	<i>Die koronare Herzkrankheit (KHK)</i>	7
1.2.1	<i>Identifizierung von Risikofaktoren für die Entstehung der KHK</i>	7
1.2.1.1	<i>Die Bedeutung der Hypertriglyzeridämie als Risikofaktor für die KHK.....</i>	10
1.3	<i>Lipidstoffwechselstörungen.....</i>	11
1.4	<i>Der Lipoproteinstoffwechsel.....</i>	12
1.4.1	<i>Der Chylomikronen-Stoffwechselweg (exogenes System)</i>	13
1.4.2	<i>Der VLDL-, LDL-Stoffwechselweg (endogenes System)</i>	15
1.4.3	<i>Der HDL-Stoffwechselweg (reverser Cholesteroltransport)</i>	18
1.5	<i>Die physiologische Bedeutung der Triglyzeride im Menschen</i>	24
1.6	<i>Apolipoproteine</i>	24
1.6.1	<i>Die Bedeutung regulatorischer Sequenzen für die Apolipoproteinexpression</i>	26
1.6.2	<i>Der ApoAI-CIII-AIV-AV-Cluster.....</i>	28
1.6.3	<i>Das Apolipoprotein AI</i>	30
1.6.3.1	<i>Der ApoAI Promoter.....</i>	35
1.6.4	<i>Das Apolipoprotein AIV</i>	38
1.6.4.1	<i>Der ApoAIV Promoter</i>	41
1.6.5	<i>Das Apolipoprotein CIII.....</i>	45
1.6.5.1	<i>Der ApoCIII Promoter</i>	46
1.6.5.1.1	<i>Der ApoCIII Enhancer</i>	48
1.7	<i>Gegenstand parallel durchgeführter Studien</i>	53
2	Material und Methoden.....	55
2.1	<i>Studiendesign</i>	55
2.2	<i>Statistische Methoden.....</i>	56
2.3	<i>Prinzip des Vorgehens.....</i>	56
2.4	<i>Verwendete Geräte, Chemikalien, Software.....</i>	57
2.5	<i>Die Marburger Präventionsallianz.....</i>	64
2.6	<i>Isolierung von DNA aus Vollblut</i>	64
2.7	<i>Amplifizierung der Proben mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR).....</i>	66
2.8	<i>Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung der PCR-Produkte.....</i>	69
2.9	<i>Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)</i>	71
2.9.1	<i>Tray-Aufbau</i>	72
2.9.2	<i>Herstellung der Gellösungen</i>	73
2.9.3	<i>Herstellung der Gradientengele.....</i>	75
2.9.4	<i>Durchführung der DGGE</i>	76
2.10	<i>Identifizierung der DNA-Sequenz amplifizierter Proben</i>	78
3	Ergebnisse.....	80
3.1	<i>Vergleichende Sequenzstudien in verschiedenen Spezies.....</i>	80
3.2	<i>Auswahl der zu untersuchenden Gensequenzen</i>	81
3.3	<i>PCR-Bedingungen</i>	82
3.3.1	<i>Entwurf der Oligonukleotidprimersequenzen</i>	82
3.3.2	<i>Auswahl der PCR-Versuchsbedingungen</i>	86

3.4	<i>Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)</i>	94
3.5	<i>Identifizierung auffälliger Proben in der DGGE</i>	100
3.6	<i>Dokumentation einer ApoAIV Promoter-Mutation bei einem Probanden der Marburger Präventionsallianz</i>	105
3.7	<i>Statistische Auswertung der Ergebnisse</i>	109
3.7.1	<i>Deskriptive Statistik zur Fall- und Kontrollgruppe dieser Arbeit</i>	109
3.7.2	<i>Statistische Auswertung der Fall-Kontroll-Studie</i>	114
4	Diskussion	116
4.1	<i>Diskussion des Studiendesigns</i>	117
4.2	<i>Diskussion der Methodik</i>	119
4.3	<i>Diskussion der gefundenen Ergebnisse</i>	125
4.4	<i>Ausblick auf zukünftige Studien</i>	128
5	Zusammenfassung	130
6	Abstract	132
7	Literaturverzeichnis	134
8	Anhang	172
8.1	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	172
8.2	<i>In dieser Arbeit getestete Rezepturen</i>	175
8.3	<i>Verzeichnis der akademischen Lehrer</i>	182
8.4	<i>Danksagung</i>	183

1 Einleitung

1.1 Aufgabenstellung

Adipositas und hohe Triglyzeridkonzentrationen im Plasma sind neben erhöhten LDL-, Cholesterin- und Lipoprotein(a)- sowie niedrigen HDL-Spiegeln, Diabetes mellitus, Nikotinkonsum, arterieller Hypertonie, hohem Alter und familiärer Prädisposition anerkannte Risikofaktoren für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit (KHK).

Normalerweise führt die Adipositas zu einer verstärkten Freisetzung von freien Fettsäuren in den Blutstrom. Die Fettsäuren werden von der Leber aufgenommen, wodurch diese mit Triglyzeriden überladen wird. Dies führt zur verstärkten VLDL-Produktion und –Sekretion in den Blutkreislauf (Lewis, 1997) und somit zur Hypertriglyzeridämie.

Diese Regel gilt jedoch nicht ausnahmslos. Einige Patienten entwickeln eine Hypertriglyzeridämie auch bei relativ gering ausgeprägter Adipositas. Voshol et al. vermuteten daher eine gestörte Triglyzeridclearance als mögliche Ursache hierfür (Voshol et al., 2009).

In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Tiere, die keinen VLDL-Rezeptor (VLDLR) besaßen, bei gleicher Ernährung deutlich dünner waren als ihre adipösen, VLDLR-besitzenden Artgenossen (Goudriaan et al., 2001).

In einer Studie zur Assoziation von VLDLR-Mutationen mit Adipositas und Triglyzeridspiegeln fanden Soufi et al. Mutationen im VLDL-Rezeptorgen, welche im Zusammenhang mit einem geringeren Körpergewicht bei gleichzeitig erhöhten Plasma-Triglyzeridkonzentrationen zu stehen schienen (Soufi et al., 2007). Dieses Ergebnis deckte sich zwar mit der Studie von Goudriaan et al., konnte jedoch nicht als alleinige Erklärung für das beobachtete Phänomen dienen, da die gefundenen Effekte zu gering waren.

In dieser Arbeit sollte durch den Nachweis gehäuft auftretender Mutationen in den regulatorischen Sequenzen der Gene der Apolipoproteine (Apo) AI, AIV und CIII ihr Einfluss auf den Triglyzeridstoffwechsel respektive die Triglyzeridaufnahme sowie die Regulierung des Körpergewichts aufgezeigt werden.

Dafür wurden aus dem Patientenkollektiv der Marburger Präventionsallianz insgesamt 134 Patienten ausgewählt, die einen BMI von unter 25kg/m^2 sowie Triglyzeridplasmaspiegel über 150mg/dl aufwiesen. Als Kontrollen wurden 130 Patienten der Präventionsallianz ausgewählt, die ebenfalls einen BMI von unter 25kg/m^2 aber einen Triglyzeridspiegel von unter 150mg/dl aufwiesen. Mutationen wurden häufiger bei Probanden mit Hypertriglyzeridämie und niedrigem BMI erwartet.

Diese Arbeit konzentrierte sich auf regulatorische Sequenzen der Apolipoproteine AI, AIV und CIII, da solche Genabschnitte in der bisherigen Forschung wenig Beachtung gefunden haben.

Dies mag daran liegen, dass es sich um schwierig zu untersuchende Genabschnitte handelt, da sie sehr starke Homologien zu anderen Abschnitten aufweisen.

Auch konnten bisherige, in anderen Abschnitten gefundene Mutationen noch keine Erklärung für die genannte Konstellation bieten.

Die Identifikation häufig auftretender Polymorphismen in den regulatorischen Gensequenzen könnte die Erklärung für das unterschiedliche Ansprechen auf Medikamente bieten und den Weg für neue pharmakologische Ansätze ebnen.

Somit war Fragestellung 1: Gibt es häufige Mutationen in regulatorischen Sequenzen der Apolipoproteine AI, AIV oder CIII, die zu einer verzögerten Triglyzeridaufnahme führen und somit möglicherweise einen niedrigen BMI trotz hohen Triglyzeridplasmaspiegels erklären können?

2: Würden Mutationen gefunden, sollte in einer Fall-Kontroll-Studie mit den oben genannten Gruppen untersucht werden, ob die gefundenen Mutationen in der Fallgruppe signifikant häufiger vorkämen als in der Kontrollgruppe und somit einen Einfluss auf den BMI in Zusammenhang mit der Triglyzeridkonzentration im Blut haben könnten.

Die aufgestellten Hypothesen lauteten dementsprechend:

1. Nullhypothese H_0 : Die Genabschnitte der Fälle und Kontrollen sind gleich häufig mutiert ($\mu_1 = \mu_2$).

2. Alternativhypothese H_1 : Die Genabschnitte der Fälle sind signifikant häufiger bzw. seltener mutiert als die der Kontrollen ($\mu_1 \neq \mu_2$).

1.2 Die koronare Herzkrankheit (KHK)

Krankheiten des Kreislaufsystems führen seit Jahren die Todesursachenstatistik nicht nur in Deutschland an. Herzkreislauferkrankungen machen 41% der Todesfälle in Deutschland aus. Unter ihnen stellen die ischämische Herzkrankheit und der akute Myokardinfarkt den weitaus größten Teil dar (Statistisches Bundesamt Zweigstelle Bonn [destatis (BN)], 2011).

Ursache der ischämischen Herzkrankheit ist meist eine sich am Herzen manifestierende Atherosklerose, die zur koronaren Herzkrankheit (KHK) führt (Alexander et al., 1999; Schaefer, 1998).

1.2.1 Identifizierung von Risikofaktoren für die Entstehung der KHK

Vor allen anderen haben zwei große Studien Risikofaktoren für die Entstehung der KHK identifizieren können.

Bereits seit 1948 läuft die sogenannte Framingham Heart Study, in der ab 1948 in Framingham, Massachusetts, 5209 Männer und Frauen zwischen 30 und 62 Jahren eingeschlossen wurden (Castelli, 1982). Diese Studie konnte die heute anerkannten Risikofaktoren für die KHK männliches Geschlecht, hohes Alter, KHK in der Familienanamnese, Hypercholesterinämie, niedrige High Density Lipoprotein (HDL)-Cholesterinwerte, erhöhte Low Density Lipoprotein (LDL)-Plasmaspiegel, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Rauchen, körperliche Inaktivität und Adipositas identifizieren (Anderson et al., 1987; Castelli, 1982; Castelli, 1984; Castelli et al., 1986; Higgins et al., 1988; Stokes, III et al., 1989; Wilson et al., 1988).

Circa 30 Jahre nach der Framingham Heart-Studie wurde die sogenannte PROCAM-Studie (Prospective Cardiovascular Munster Study) in und um Münster gestartet. Sie untersuchte 20060 freiwillige, im Berufsleben stehende Probanden im Alter zwischen 17 und 65 Jahren und konnte die synergistische Wirkung von Einzelrisikofaktoren für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit aufzeigen. (Schulte und Assmann, 1988)

Infolge dieser Studien entwickelten die führenden kardiologischen Gesellschaften der USA und Großbritanniens Leitlinien und Algorithmen für die kardiovaskuläre Risikostratifizierung in Bezug auf die Entwicklung der KHK (British

Cardiac Society et al., 2005; Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001). Europäische Gesellschaften entwickelten ähnliche Algorithmen, die sich allerdings auf den kardiovaskulären Tod beziehen (De Backer et al., 2003; Wood et al., 1998). Nach der PROCAM-Studie entstand infolgedessen auch der gleichnamige PROCAM-Score (Assmann et al., 2002). Für die Anwendung in der Praxis unter Einbeziehung der Patientenentscheidung im Sinne des ‚shared decision making‘ entwickelte eine Marburger Arbeitsgruppe um Prof. Donner-Banzhoff die sogenannten AR-RIBA-Herz-Studie, die in verschiedenen Schritten sowohl das objektive KHK-Risiko als auch die Erwartungen und Wünsche des Patienten in die gemeinsame Arzt-Patient-Strategie einfließen lässt (Krones et al., 2008). Sowohl die europäischen als auch die amerikanischen Leitlinien führen außerdem auch die Hypertriglyzeridämie als eigenständigen Risikofaktor auf (British Cardiac Society et al., 2005; De Backer et al., 2003; Reiner et al., 2011; Wood et al., 1998).

Die den Leitlinien zugrunde liegenden Studien konnten die Bedeutung von Fettstoffwechselstörungen für die Pathogenese der koronaren Herzkrankheit belegen und wurden durch weitere groß angelegte Untersuchungen wie die Multiple Risk Factor Intervention Trial und andere unterstützt (Stamler et al., 1986). All diese Studien zeigten eine Assoziation von Fettstoffwechselstörungen mit dem Auftreten der koronaren Herzkrankheit.

Ganz ähnliche Ergebnisse erzielte auch die INTERHEART-Studie, die etwa 30000 Personen untersuchte. Die Probanden kamen hier aus 52 verschiedenen Ländern, um eine international gültige Aussage treffen zu können. Es wurden neun verschiedene Risikofaktoren für das Auftreten der KHK gefunden, von denen die bedeutendsten ein Nikotinabusus und eine Dyslipidämie in Form einer erhöhten Apolipoprotein (Apo) B/ ApoAI-Ratio waren. (Yusuf et al., 2004)

Die Bedeutung der Hyperlipidämien wurde durch Studien mit lipidsenkenden Medikamenten noch weiter unterstrichen. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass die Senkung des LDL-Cholesterin mithilfe verschiedener Enzyminhibitoren, den sogenannten Statinen, sowohl die Gesamt- als auch die

KHK-spezifische Mortalität im Vergleich zur Placebogruppe signifikant reduzieren konnte (Kjekshus und Pedersen, 1995; Pedersen et al., 1998; Sacks et al., 1996; Shepherd et al., 1995).

Zusätzlich konnten einige Studien die relevanten Dyslipidämien weiter spezifizieren.

Es existieren Hinweise darauf, dass besonders der postprandialen Hyperlipidämie eine Bedeutung in der Entstehung der KHK zukommt. So wurden zum Beispiel deutlich erhöhte postprandiale Plasmaspiegel von Remnant Like Particles (RLP) bei Patienten mit KHK gefunden (Fujioka und Ishikawa, 2009; Nakajima et al., 2008; Tanaka, 2004). Werner et al. fanden in der sogenannten Homburg Cream And Sugar Study ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit KHK und erhöhten postprandialen und Nüchtern-Triglyzeridspiegeln (Werner et al., 2011). Auch erhöhte RLP-Nüchternplasmaspiegel können mit einem erhöhten Risiko zukünftiger kardialer Ereignisse wie akutem Myokardinfarkt und kardial bedingtem Tod einhergehen (Kugiyama et al., 1999). In einer Studie fand sich zudem eine Korrelation von RLP- und Triglyzeridplasmaspiegeln (Devaraj et al., 1998).

Die Ursache der postprandialen Hyperlipidämie ist noch nicht vollständig geklärt. Auf der einen Seite fanden Cohn et al. heraus, dass in normolipidämischen Probanden der Anstieg postprandialer Triglyzeridspiegel durch eine Erhöhung ApoB48-haltiger triglyzeridreicher Lipoproteine hervorgerufen wird (Cohn et al., 1999). Auf der anderen Seite stellten andere Arbeiten fest, dass die Leber während der Nüchternphase kontinuierlich Very Low Density Lipoproteins (VLDL), also ApoB100-haltige, triglyzeridreiche Lipoproteine sezerniert und dass die Delipidierung durch die gegenseitige Behinderung mit Chylomikronen bei der Interaktion mit der Lipoproteinlipase zu einem prolongierten Verbleiben der VLDL im Blutkreislauf und darüber zu erhöhten Triglyzeridplasmaspiegeln führte (Bjorkegren et al., 1996; Karpe, 1999).

1.2.1.1 Die Bedeutung der Hypertriglyzeridämie als Risikofaktor für die KHK

Eine Vielzahl unterschiedlicher metabolischer Prozesse können zu einer Triglyzeriderhöhung führen, so zum Beispiel ein Diabetes mellitus, eine Hypothyreose, das nephrotische Syndrom oder ein Lipoproteinlipasemangel. Passend dazu wurde lange davon ausgegangen, dass ein erhöhter Plasmatriglyzeridspiegel keinen alleinigen Risikofaktor für die Entwicklung einer KHK darstelle (Hulley et al., 1980; Pocock et al., 1989). Diese Ergebnisse wurden jedoch keineswegs in allen Studien bestätigt. Carlson et al. fanden in einer Stockholmer Population von mehreren tausend Probanden neben Alter, Rauchen, Bluthochdruck, Plasmacholesterinkonzentration und anderen auch einen erhöhten Nüchternplasmaspiegel von Triglyzeriden als eigenständigen Risikofaktor (Carlson et al., 1979). Auch eine spätere Studie an über 4000 männlichen britischen Probanden identifizierte erhöhte Triglyzeridplasmaspiegel als eigenständigen Risikofaktor für die KHK (Bainton et al., 1992).

Weitere Unterstützung für die Bedeutung der Triglyzeride in der Entwicklung der KHK lieferte die bereits genannte PROCAM-Studie. Zwar zeigte sich der erhöhte Plasmaspiegel hier nicht als eigenständiger Risikofaktor, wurde jedoch bedeutsam, wenn gleichzeitig ein niedriger HDL- sowie ein hoher LDL-Cholesterinplasmaspiegel vorlagen (Assmann und Schulte, 1992a; Assmann und Schulte, 1992b).

Heute weiß man, dass die Erfassung der LDL/ HDL- oder Gesamtcholesterin/ HDL-Ratio besser als Risikoparameter geeignet ist, als das Gesamtcholesterin allein (Genest et al., 2003; Manninen et al., 1992). Die Aussagekraft wird jedoch noch besser, wenn zusätzlich die Triglyzeride in die Betrachtung einbezogen werden (Genest et al., 2003; Manninen et al., 1992; Millan et al., 2009). Aufgrund dieser Bedeutsamkeit erhöhter LDL-, Triglyzerid- und erniedrigter HDL-Plasmaspiegel spricht man bei diesen drei Parametern auch von der „Lipidtriade“ (Bestehorn et al., 2010; Girard-Mauduit, 2010).

Andere Untersuchungen favorisieren allerdings die ApoB/ ApoAI-Ratio gegenüber der LDL/ HDL- bzw. Gesamtcholesterin/ HDL-Ratio (Sniderman et al., 2006; Walldius et al., 2004).

Eine japanische Studie identifizierte vor einigen Jahren die Hypertriglyzeridämie wieder als eigenständigen Risikofaktor für die Entstehung der KHK (Iso et al., 2001) und auch in einer dänischen Kohorte von 7587 Frauen und 6394 Männern konnte eine Assoziation erhöhter Triglyzeridplasmaspiegel mit erhöhtem Risiko für die ischämische Herzkrankheit, einen akuten Myokardinfarkt und nachfolgenden Tod gefunden werden (Nordestgaard et al., 2007).

Auch die bereits genannte Multiple Risk Factor Intervention Trial fand eine Assoziation erhöhter Triglyzeridplasmaspiegel mit dem häufigeren Auftreten der koronaren Herzkrankheit (Eberly et al., 2003).

In einer Metaanalyse werteten Morrison und Hokanson 46 verschiedene populationsbasierte Arbeiten aus, die die Assoziation von Triglyzeriden und dem KHK-Risiko mit HDL als zusätzlicher Variablen untersucht hatten. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Triglyzeride als unabhängiger Prädiktor für die koronare Herzkrankheit dienen können. Dies gelte vor allem für Personen mit relativ geringem KHK-Risiko. Für Hochrisikopatienten scheine die Assoziation nicht zu gelten. (Morrison und Hokanson, 2009)

Es wird deutlich, dass der Plasmatriglyzeridspiegel eine wichtige Rolle in der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit spielt.

1.3 Lipidstoffwechselstörungen

Störungen des Lipidstoffwechsels wurden gegen Ende der sechziger Jahre zum ersten Mal kategorisiert und klassifiziert. Zuvor war lediglich generell von Dyslipidämien gesprochen worden, ohne einzelne Untergruppen zu beschreiben. Fredrickson et al. führten den Begriff der Dyslipoproteinämie ein, der bestimmte Erkrankungen spezifischer beschreiben sollte als der globale Begriff Dyslipidämie, unter dem verschiedene Krankheiten zusammengefasst worden waren (Fredrickson et al., 1967) und heute noch werden. Die Autoren differenzierten fünf verschiedene Klassen von Hyperlipoproteinämien (Fredrickson et al., 1967; Fredrickson und Lees, 1965). Tabelle 1-1 zeigt eine Übersicht über die von ihnen beschriebenen Typen. Diese Einteilung hat bis heute nahezu unverändert Bestand.

Die Grundlagen zur Erstellung dieser Einteilung wurden bereits knapp 20 Jahre zuvor geschaffen. Versuche mit der Ultrazentrifuge führten zur Auftrennung der einzelnen Lipoproteinfraktionen nach ihrer Dichte (Gofman et al., 1949; Gofman und Lindgren, 1950; Lewis und Page, 1953; Pedersen, 1945) und machten somit ihre Einteilung in Very Low Density Lipoproteins (VLDL), Low Density Lipoproteins (LDL), Intermediate Density Lipoproteins (IDL), High Density Lipoproteins (HDL) und Very High Density Lipoproteins (VHDL) erst möglich (Scanu und Edelstein, 2008; Yamashita et al., 1995).

Tabelle 1-1: Die erste Einteilung der Dyslipoproteinämien durch Fredrickson et al. hat bis heute nahezu unverändert Bestand. (Fredrickson et al., 1967; Fredrickson und Lees, 1965)

Typ	Aussehen des Serums	Plasmalipidkonzentration		Banden in der Elektrophorese
		Cholesterol	Triglyzeride	
I	milchig	±↑	↑↑↑	Chylomikronen, alle anderen ↓
II	klar	↑↑↑	normal oder ↑	β↑↑↑, prä-β±↑
III	trüb	↑↑	↑	breite β-Bande; prä-β ±↑
IV	trüb	↑	↑↑	prä-β ↑↑↑
V	trüb oder milchig	↑	↑↑	Chylomikronen-Bande; prä-β ↑

±↑: Konzentration normal bis leicht erhöht/ Bande normal bis leicht verstärkt, ↑: leicht erhöht/ verstärkt, ↑↑: deutlich erhöht, ↑↑↑: stark erhöht/ verstärkt, ↓: Bande abgeschwächt, β: entspricht den LDL, prä-β: entspricht den VLDL

Den in Tabelle 1-1 genannten primären Hyperlipidämien werden die sekundären gegenübergestellt (Mancini et al., 1991). Ihnen liegt jeweils eine spezifische endokrinologische, nephrologische oder hepatische Grunderkrankung zugrunde. Sie sind insgesamt jedoch deutlich seltener als die primären Hyperlipidämien.

1.4 Der Lipoproteinstoffwechsel

Die Bedeutung der Lipoproteine für die Atherogenese wurde in den vorangehenden Abschnitten bereits aufgezeigt. Zum weiteren Verständnis sollen im Folgenden die drei Systeme des Lipoproteinstoffwechsels dargestellt werden.

1.4.1 Der Chylomikronen-Stoffwechselweg (exogenes System)

Das exogene System beschreibt den Transport von Triglyzeriden und Cholesterin vom Darm in periphere Gewebe und die Leber.

Nahrungsfette werden im Darm durch Enzyme wie die Pankreaslipase in Fettsäuren und Mono- sowie Diacylglyceride aufgespalten (Figarella et al., 1980; Ghishan et al., 1984; Hofmann und Borgstrom, 1963) und in Form von Mizellen passiv in die Enterozyten des Dünndarms aufgenommen (Hofmann und Borgstroem, 1964; Strauss, 1966).

Mit der Nahrung zugeführtes Cholesterin wird aktiv über das sogenannte Niemann-Pick C1 Like 1-Protein (NPC1L1-Protein) aufgenommen (Altmann et al., 2004; Davis, Jr. et al., 2004).

In den Dünndarmenterozyten erfolgt nach der Aufnahme eine Resynthese der Triglyzeride (Clark und Huebscher, 1960b; Clark und Huebscher, 1960a). Das aufgenommene Cholesterin wird durch die Acyl-Coenzym-A-Cholesterintransferase (ACAT) verestert (Clark und Tercyak, 1984; Field et al., 1991; Heider et al., 1983; Krause et al., 1993).

Die wieder hergestellten Triglyzeride werden im Folgenden mit dem Cholesterin, den Cholesterinestern, Phospholipiden und den Apolipoproteinen B, AI und AIV zu Chylomikronen verarbeitet (Hussain, 2000; Imaizumi et al., 1978; Luchoo-mun und Hussain, 1999).

Die Chylomikronen werden dann per Exozytose in die Lymphe transportiert und gelangen über den Ductus thoracicus in die Blutbahn. Auf dem Weg dorthin nehmen sie die Apolipoproteine CII und E aus HDL-Partikeln auf und binden in den peripheren Kapillaren schließlich die Lipoproteinlipase (LPL), die durch ApoCII aktiviert wird (LaRosa et al., 1970; Olivecrona und Beisiegel, 1997; Shen et al., 2009). Dies aktiviert die Hydrolyse der Triglyzeride der Chylomikronen (McCoy et al., 2002), wodurch die Epithelzellen unter anderem mit freien Fettsäuren als Energielieferanten versorgt werden und die Chylomikronen das ApoCII abgeben. Dabei nehmen sie immer weiter an Größe ab, bis sie zu sogenannten Chylomikronenremnants, cholesterolesterreichen, ApoB und ApoE enthaltenden Restchylomikronen, geworden sind. Die zunächst noch enthaltenen Apolipoproteine AI und AIV werden im Verlauf dieser Schrumpfung an HDL-Partikel abgegeben.

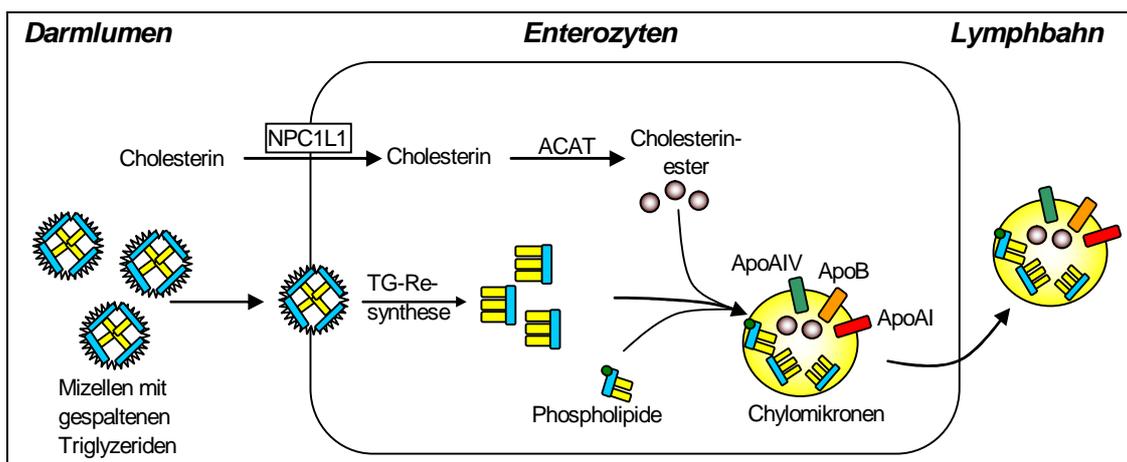


Abbildung 1: Chylomikronen werden in den Enterozyten aus Cholesterinestern, Triglyzeriden, Phospholipiden sowie den Apolipoproteinen AIV, B und AI synthetisiert und per Exozytose in die Lymphbahn verbracht. (ACAT = Acyl-Coenzym-A-Cholesterintransferase, Apo = Apolipoprotein, NPC1L1 = Niemann-Pick C1 Like 1-Protein, TG = Triglyzerid)

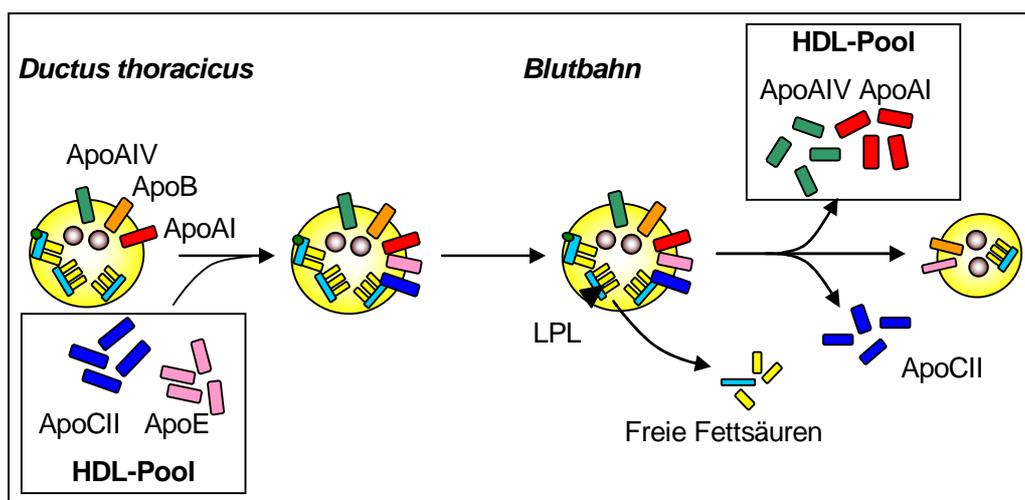


Abbildung 2: Die Umwandlung der Chylomikronen in Chylomikronenremnants erfolgt im Ductus thoracicus und den peripheren Blutkapillaren durch Hydrolyse der Triglyzeride sowie Abgabe und Aufnahme verschiedener Apolipoproteine. (Apo = Apolipoprotein, LPL = Lipoproteinlipase)

Die Chylomikronenremnants werden über den LDL-Rezeptor sowie das LDL-Related Protein (LRP) in die Leber aufgenommen (Cooper, 1997; Ellsworth et al., 1987; Floren und Chait, 1981; Ishibashi et al., 1996; Koo et al., 1988; Mahley und Huang, 2007; Quarfordt und Goodman, 1967). Die restlichen Triglyzeride der Remnants werden in den Hepatozyten nach Aufnahme über den LDL-Rezeptor und das LRP zu freien Fettsäuren und freiem Cholesterin hydrolysiert.

1.4.2 Der VLDL-, LDL-Stoffwechselweg (endogenes System)

Das endogene System des Lipoprotein-Stoffwechsels sorgt für die Versorgung peripherer Gewebe mit Triglyzeriden und Cholesterin.

In den Hepatozyten werden schrittweise Triglyzeride mit dem Apolipoprotein B100 zu einem Komplex verbunden. Im Zytoplasma wird der dabei vorgenommene Triglyzeridtransfer unter anderem mithilfe des Mikrosomalen Transferproteins (MTP) (Davis und Hui, 2001) und wahrscheinlich Apolipoprotein AV (Grosskopf et al., 2005; Pennacchio et al., 2001) durchgeführt. Im Golgi-Apparat werden weitere Triglyzeride zu den entstandenen VLDL-Vorläufern zugefügt. So entstehen die Very Low Density Lipoproteins (VLDL) (Davis et al., 1989; Millar und Packard, 1998).

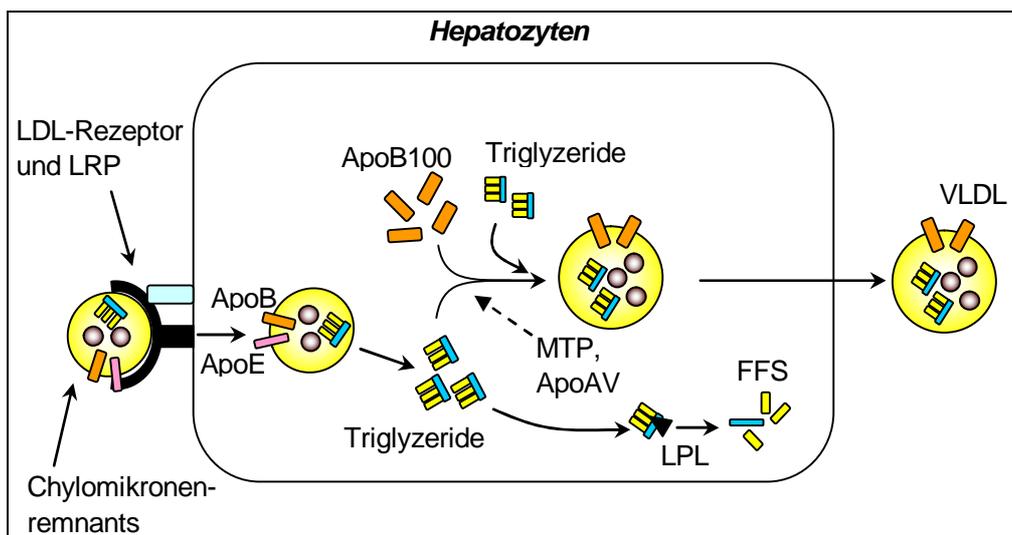


Abbildung 3: VLDL werden in Hepatozyten schrittweise aus der Verbindung von Apo-B100 und Triglyzeriden zu einem Komplex gebildet. (Apo = Apolipoprotein, FFS = freie Fettsäuren, LDL = Low Density Lipoprotein, LPL = Lipoproteinlipase, LRP = LDL-Related Protein, MTP = mikrosomales Transferprotein, VLDL = Very Low Density Lipoprotein)

Nach ihrer Exkretion nehmen die reifen VLDL im Blutkreislauf die Apolipoproteine CI, CII, CIII und E aus HDL-Partikeln auf. Die Apolipoproteine CII und E dienen als Kofaktoren für die Lipoproteinlipase. Diese stellt wieder die Versorgung von Muskel- und Fettgewebe mit Energieträgern sicher. Die Apolipoproteine CI und CIII verhindern eine vorzeitige Entfernung der Partikel aus dem Blutkreislauf.

Die ApoC-haltigen Apolipoproteine gehen nun schrittweise von den VLDL auf HDL-Partikel über, so dass Cholesterinester-reiche, ApoB100- und ApoE-haltige Intermediate Density Lipoproteins (IDL) entstehen.

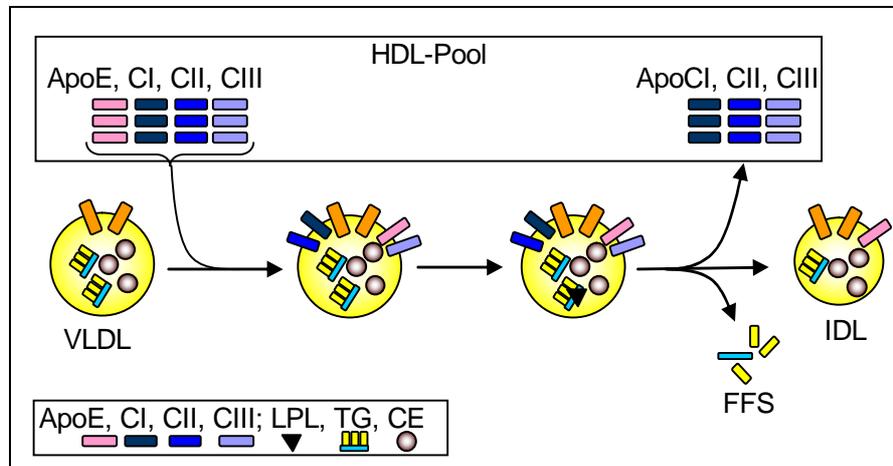


Abbildung 4: VLDL nehmen in der Blutbahn die Apolipoproteine CI, CII, CIII und E aus HDL-Partikeln auf und geben einen Teil ihrer Apolipoproteine nach Triglyzeridhydrolyse durch die Lipoproteinlipase wieder an HDL ab. Dadurch entstehen die cholesterinesterreichen Intermediate Density Lipoproteins (IDL).

(Apo = Apolipoprotein, CE = Cholesterinester, FFS = freie Fettsäuren, HDL = High Density Lipoprotein, IDL = Intermediate Density Lipoprotein, LPL = Lipoproteinlipase, TG = Triglyzeride, VLDL = Very Low Density Lipoprotein)

Die IDL werden nun zum einen mithilfe des enthaltenen ApoE an den LDL-Rezeptor und das LRP gebunden und über den LDL-Rezeptorstoffwechselweg in die Leber aufgenommen (Arbeeny und Rifici, 1984; Kowal et al., 1989; Willnow et al., 1992). Zum anderen werden sie mithilfe der hepatischen Lipase durch Triglyzeridhydrolyse in LDL umgewandelt (Cooper, 1997). Dabei nehmen sie zusätzliche Cholesterinester und Triglyzeride auf und verlieren ihren ApoE-Anteil. Die Menge der aufgenommenen Triglyzeride und Ester wird dabei durch die hepatische Lipase (Grosser et al., 1981) und das Cholesterylestertransferprotein (CETP) (Clay et al., 1991) bestimmt.

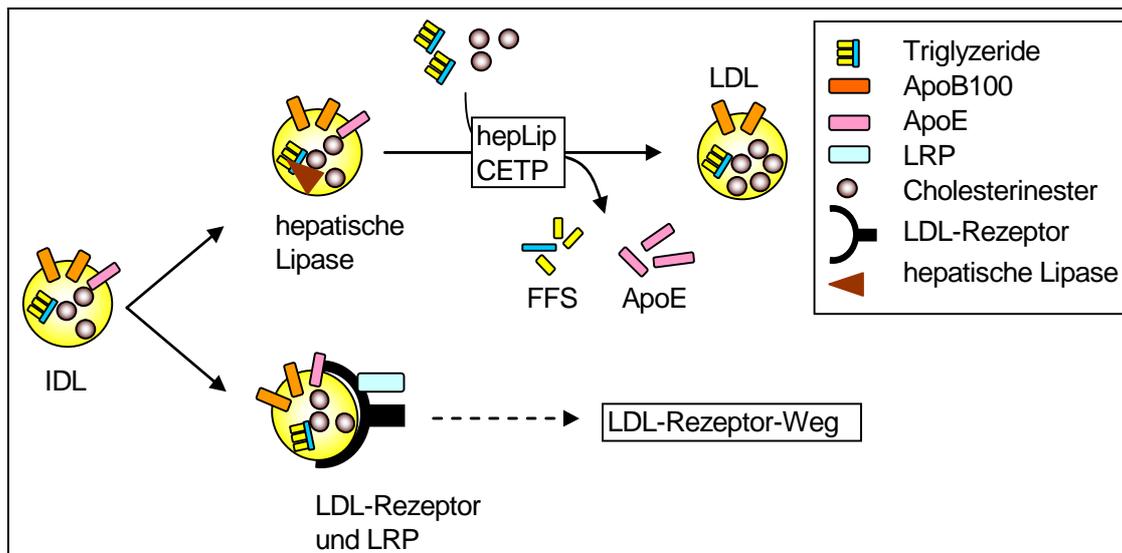


Abbildung 5: IDL werden zum einen über die Aufnahme von Triglyzeriden und Cholesterinestern und Lipolyse der vorhandenen Triglyzeride sowie Abgabe des ApoE-Anteils in LDL umgewandelt. Zum anderen werden sie nach Bindung an den LDL-Rezeptor und das LRP über den LDL-Rezeptor-Weg verstoffwechselt. (Apo = Apolipoprotein, CETP = Cholesterinester-Transfer-Protein, FFS = freie Fettsäuren, hepLip = hepatische Lipase, IDL = Intermediate Density Lipoprotein, LDL = Low Density Lipoprotein, LRP = LDL-Related Protein)

Die so entstandenen LDL können nach ihrer Größe, Dichte und Bindungsaffinität an den LDL-Rezeptor eingeteilt werden. Die sogenannten Small Dense LDL werden relativ schlecht aus dem Blutkreislauf entfernt, da ihre Affinität zum LDL-Rezeptor gering ist (März et al., 1993). Dies führt dazu, dass sie länger im Plasma verbleiben und durch eine erhöhte Affinität zu Proteoglykanen leichter das Gefäßendothel penetrieren können (Hurt-Camejo et al., 1997) sowie vermehrt über die Scavenger-Rezeptoren in Makrophagen aufgenommen werden (Skalen et al., 2002). Dadurch wird die Bildung von Schaumzellen und somit die Entstehung der Atherosklerose begünstigt (Faggiotto et al., 1984; Fogelman et al., 1980; Goldstein et al., 1979; Mahley et al., 1979).

Die Aufnahme der LDL in die Leber geschieht nach dem Prinzip der sogenannten LDL-Rezeptor-Hypothese.

Diese Hypothese besagt, dass es einen LDL-Rezeptor gibt, der abhängig von der Höhe des LDL-Plasmaspiegels auf der Oberfläche der peripheren Endothelzellen exprimiert wird und der Entfernung der LDL aus dem Plasma und der Versorgung der Zellen mit Cholesterin dient. Dabei wird er umso mehr gebildet, je höher die LDL-Plasmakonzentration ist. Ab einem Schwellenwert, bei dem

die für den Zellstoffwechsel benötigte Cholesterolmenge in der Zelle vorhanden ist, nehmen die Zellen jedoch kein weiteres LDL über den LDL-Rezeptor auf. Ab dieser Schwelle wird die Expression des Rezeptors herunterreguliert. (Goldstein und Brown, 1977)

Hinweise auf die Existenz des LDL-Rezeptors hatten bereits frühere Arbeiten geliefert. Diese zeigten auch, dass über die Expression dieses Rezeptors die Aktivität der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), also des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms in der Cholesterinbiosynthese, gesteuert wird (Brown und Goldstein, 1974; Goldstein und Brown, 1973).

Neben dem LDL-Rezeptor-Weg existiert nach Goldstein und Brown noch ein nicht vom LDL-Plasmaspiegel abhängiger Scavenger-Weg, über den konstant 15% des anfallenden LDL in die Zellen aufgenommen werden (Goldstein und Brown, 1974).

Zusätzlich zum LDL-Rezeptor und dem Scavenger-Weg dient die hepatische Lipase der Aufnahme von Lipoproteinen in die Leber, wobei sie wahrscheinlich von Molekülen wie Heparan-Sulfat-Proteoglykanen (HSPG) unterstützt wird (Borensztajn et al., 1988; Mahley und Huang, 2007; Wilsie und Orlando, 2003).

1.4.3 Der HDL-Stoffwechselweg (reverser Cholesteroltransport)

Das dritte System des Lipoproteinstoffwechsel ist der reverse Cholesteroltransport, der überschüssiges Cholesterin aus peripheren Geweben zur Leber transportiert. Dort erfolgt der weitere Abbau oder die Umwandlung in Gallensäuren mit der Modulation des Cholesterols durch die 7- α -Hydroxylase (Russell und Setchell, 1992). Der reverse Cholesteroltransport wird durch die HDL betrieben (Berrougui und Khalil, 2009; Rigotti et al., 2003; von Eckardstein et al., 2001).

HDL sind Lipoproteine mit einem Dichtebereich von 1,063 bis 1,21g/ml. Ihr Proteinanteil besteht hauptsächlich aus Apolipoprotein AI (Wu et al., 2007). Man kann sie unterteilen in lipidarme β -HDL und lipidreiche α -HDL, die aus den β -HDL entstehen.

β -HDL sind diskoidale Partikel, die als HDL-Vorläufer in Darm (Danielsen et al., 1993) und Leber (Castle et al., 1991) gebildet werden. Außerdem entstehen sie bei der Lipolyse von Chylomikronen und VLDL (Musliner et al., 1991). Als dritte Möglichkeit entstehen sie bei der Umwandlung von HDL₂ zu HDL₃ unter Mithilfe

von Phospholipid-Transferprotein (PLTP) (Jauhiainen et al., 1993; Jiang et al., 1996; von Eckardstein et al., 1996), Cholesterylester-Transferprotein (CETP) (Francone et al., 1996; Liang et al., 1994) und der hepatischen Lipase (Barrans et al., 1994).

Unverestertes Cholesterin aus peripheren Zellmembranen kann passiv per Diffusion nach Bindung an Albumin, Cyclodextrine oder Phospholipide auf HDL übergehen (Rothblat et al., 1999; Zhao und Marcel, 1996). Dieser Prozess ist allerdings ausgesprochen ineffizient. Ferner wird so nur der Efflux unveresterten Cholesterols ermöglicht. Erst der ATP-bindende Kassettentransporter 1 (ABCA 1) ermöglicht die effiziente Übertragung von Cholesterolestern auf das ApoAI nach Bindung von diskoidalen β -HDL Partikeln an der Plasmamembran (Rust et al., 1999; Schmitz et al., 2001; von Eckardstein et al., 2001; Wang et al., 2000). Zudem wird ein minimaler Teil der an ABCA1 gebundenen diskoidalen HDL internalisiert und in Endosomen transportiert, wo der Transfer der Lipide auf die HDL durch ABCA 1 und das Niemann-Pick-Protein C1 (NPC1) vorgenommen wird (Choi et al., 2003; Denis et al., 2008; Neufeld et al., 2001; Oram, 2002; Schmitz et al., 1985; Takahashi und Smith, 1999; Zhao et al., 2011). Nach der Aufnahme freien Cholesterols wird der so geschaffene Komplex direkt bzw. nach Rücktransport an die Zelloberfläche als pre- β 2-HDL in die Zirkulation entlassen (Denis et al., 2008; Faulkner et al., 2008; Schmitz et al., 1985).

Im Rahmen der Tangier-Krankheit führen Defekte im ABCA 1-Gen zu einem verminderten Cholesterolefflux aus Makrophagen mit nachfolgender Bildung von Schaumzellen und dementsprechend stark erhöhtem Risiko für die koronare Herzkrankheit und ihrer Folgen (Fitzgerald et al., 2004; Liu et al., 2011; Rust et al., 1999).

Nach dem von ABCA 1-gesteuerten Cholesterolefflux auf β -HDL wird das Cholesterin durch die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) verestert (Jauhiainen und Dolphin, 1986; Saito et al., 2004). Die hydrophobischen Ester akkumulieren im Kern der HDL-Partikel, so dass sphärische, lipidreiche α - bzw. HDL₂-Partikel entstehen.

Die durch die LCAT erstellten Cholesterolester können auf verschiedenen Wegen in die Leber transportiert werden.

Zum einen werden sie mithilfe der Scavenger-Rezeptoren Klasse B Typ 1 (SR-B1) in die Hepatozyten aufgenommen (Rigotti et al., 2003; Williams et al., 1999) und über die Galle ausgeschieden. Die SR-B1 nehmen selektiv Cholesterolester in das Gewebe auf (Acton et al., 1996). Größere HDL binden dabei besser an SR-B1 und können mehr Cholesterolester übertragen als kleinere (Thuahnai et al., 2004).

Zum anderen geben die HDL₂-Partikel unter Mitwirkung des CETP und des PLTP Cholesterolester an VLDL und IDL ab (Jiang et al., 1996; Liang et al., 1994; von Eckardstein et al., 1996). Im Gegenzug erhalten sie Triglyzeride aus diesen ApoB-haltigen Partikeln (Liang et al., 1996; Musliner et al., 1991; Patsch et al., 1978). VLDL und IDL werden nun über den LDL-Rezeptorweg aus dem Kreislauf entfernt oder in LDL umgewandelt, so dass sie wieder Cholesterin aufnehmen können.

Die hepatische Triglyzeridlipase hydrolisiert im Folgenden die Triglyzeride der HDL₂-Partikel (Brown et al., 2010). Die enthaltenen Phospholipide werden aller Wahrscheinlichkeit nach durch die endotheliale Lipase hydrolisiert (Jin et al., 2003).

Durch diese Schritte entstehen die kleinen, dichten HDL₃-Partikel, die nun erneut der Cholesterinaufnahme aus peripheren Zellen dienen können (Brown et al., 2010; von Eckardstein et al., 2001).

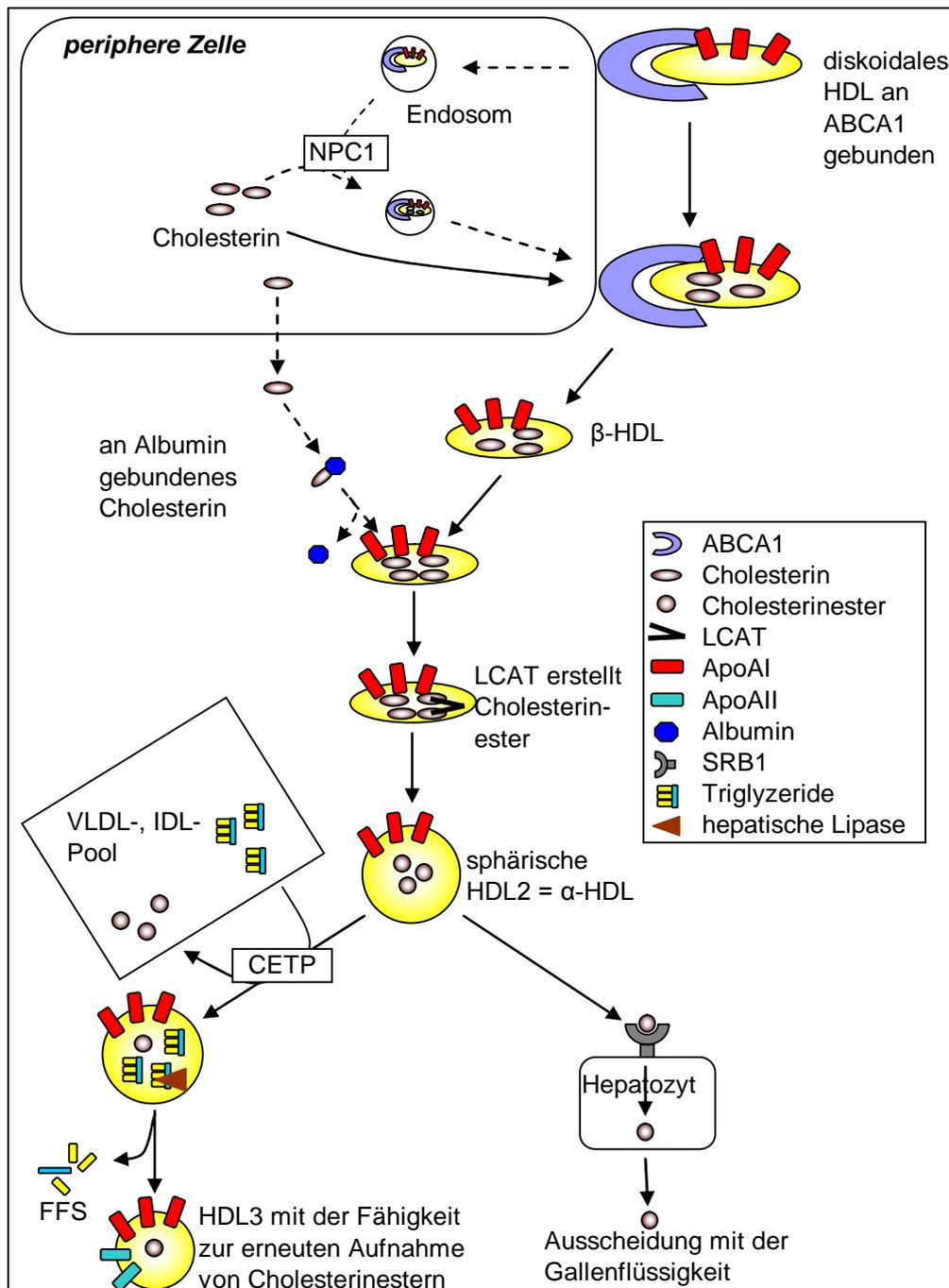


Abbildung 6: Sphärische HDL-Partikel werden an peripheren Zellen aus diskoidalen HDL-Partikeln gebildet. Ihre Cholesterinmoleküle werden durch die LCAT verestert. Die Cholesterinester werden vor allem mithilfe des CETP mit Triglyzeriden des VLDL-/IDL-Pool ausgetauscht. Die Triglyzeride werden durch die hepatische Lipase hydrolysiert, so dass HDL₃-Partikel entstehen, die für eine erneute Cholesterinaufnahme zur Verfügung stehen. Zum anderen werden die HDL₂ über den SRB1 in Hepatozyten aufgenommen und über die Gallenflüssigkeit ausgeschieden. (ABCA1 = ATP-bindender Kassettentransporter 1, Apo = Apolipoprotein, CETP = Cholesterylester-Transferprotein, HDL = High Density Lipoproteins, IDL = Intermediate Density Lipoprotein, LCAT = Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase, NPC1 = Niemann-Pick-Protein C1, SRB1 = Scavenger Rezeptor Klasse B Typ 1, VLDL = Very Low Density Lipoprotein)

Bei der Synthese der HDL₃-Partikel spielt vor allem das Cholesterylester-Transferprotein (CETP) eine herausragende Rolle. Dieses 476 Aminosäuren umfassende Molekül wurde zunächst als Stimulator der Übertragung von Cholesterylestern zwischen VLDL und LDL beschrieben (Zilversmit et al., 1975). Einige Zeit später wurde gezeigt, dass es nicht nur die Übertragung stimuliert, sondern selbst Bindungsdomänen für Cholesterylester, Triglyzeride und Phospholipide besitzt und somit als Überträger zwischen den Lipoproteinen dient (Swenson et al., 1988). Bereits einige Jahre zuvor war ein Zusammenhang zwischen der Tätigkeit des CETP, niedrigen HDL- und hohen Triglyzeridplasmaspiegeln festgestellt worden (Deckelbaum et al., 1984). Da diese Konstellation als Risikoerhöhung für die Entwicklung der Atherosklerose gilt, wurde frühzeitig nach Möglichkeiten der pharmakologischen Inhibition der CETP-Aktivität gesucht. Dies führte beispielsweise zur Entwicklung von Torcetrapib, welches die Übertragung von Triglyzeriden durch das CETP inhibiert und die Bindung von CETP an HDL deutlich steigert (Clark et al., 2006). Hieraus erwachsen große Hoffnungen, einen neuen Therapieansatz gegen Atherosklerose und die koronare Herzkrankheit gefunden zu haben. In klinischen Studien erhöhte Torcetrapib tatsächlich die Plasma-HDL-Spiegel um ca. 64% und senkte die LDL-Konzentration um 18%. Ein Effekt auf die Intima media-Dicke ließ sich jedoch nicht feststellen (Bots et al., 2007). Zudem musste die Phase 3-ILLUMINATE Studie vorzeitig beendet werden, weil in der Torcetrapibgruppe eine erhöhte Mortalität zu verzeichnen war (Barter et al., 2007). Möglicherweise ist dies bedingt durch nicht mit der CETP-Hemmung im Zusammenhang stehende Nebenwirkungen des Torcetrapibs wie eine beobachtete Erhöhung der Aldosteronkonzentration in der Torcetrapibgruppe (Barter et al., 2007; Forrest et al., 2008; Hu et al., 2009). Durchaus besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass sich etablierte Theorien als falsch erweisen können. Das CETP beschleunigt den Transport von Cholesterylestern aus der Peripherie in die Leber. Eine CETP-Hemmung könnte also beispielsweise über den größeren Verbleib von Cholesterin in der Gefäßwand proatherogenetisch wirken. Aktuell scheint es jedoch wahrscheinlicher, dass die erhöhte Sterblichkeit unter Torcetrapib durch substanzspezifische Nebenwirkungen verursacht wurde. Weitere CETP-Inhibitoren, Dalcetrapib und Anacetrapib, wurden entwickelt und befinden sich in der klinischen Prüfung. Bis dato wurde bei beiden Wirkstoffen keine erhöhte Sterblichkeit festgestellt (Cannon

et al., 2010; Stein et al., 2010). Es ist allerdings zu bemerken, dass die Studien zum Teil noch nicht abgeschlossen sind und Phase III-Studien noch fehlen. Eine sichere Aussage ist somit noch nicht möglich.

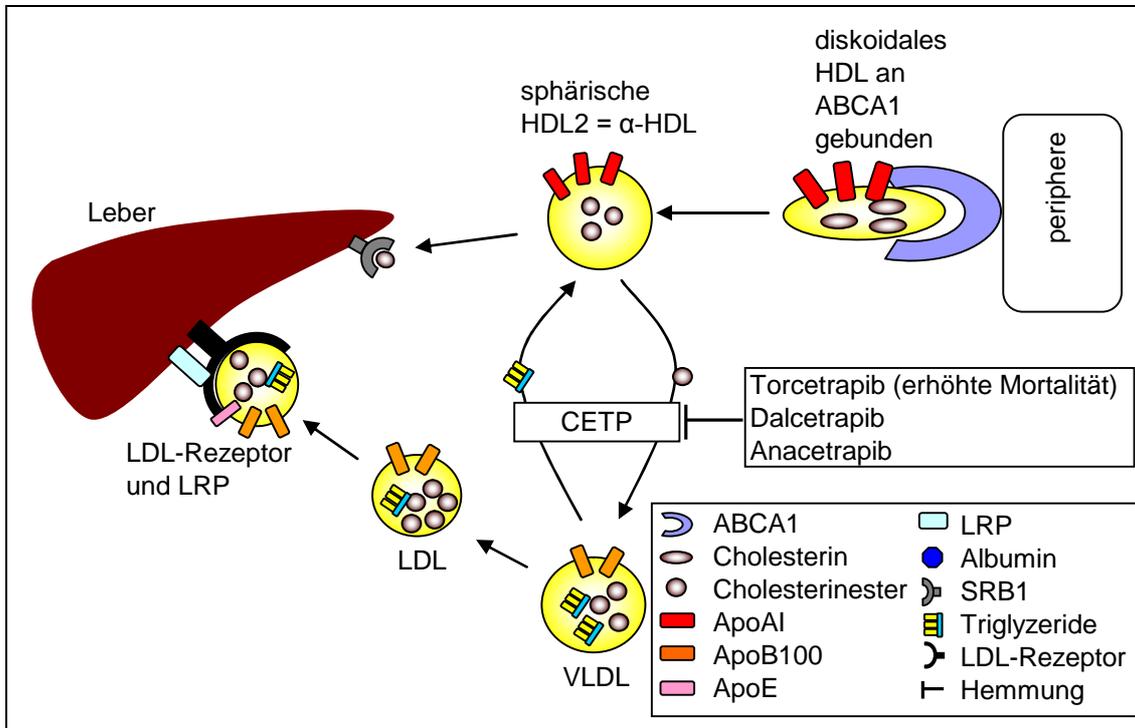


Abbildung 7: Das Cholesterylester-Transferprotein (CETP) spielt eine Schlüsselrolle im Lipoprotein-Stoffwechsel, indem es Cholesterylester von HDL auf VLDL im Austausch für Triglyzeride überträgt. Damit hemmt es den Abtransport von Cholesterin aus der Peripherie in die Leber. Selektive CETP-Inhibitoren als atheroprotektive Therapeutika sind in der Entwicklung.

HDL₂-Partikel enthalten hauptsächlich ApoAI und sind größer und weniger dicht als HDL₃-Partikel. Letztere enthalten neben ApoAI auch ApoAII (Huang et al., 1995). In einigen Studien scheinen HDL₂ aufgrund ihres höheren ApoAI-Gehalts stärker kardioprotektiv zu sein als HDL₃ (Lamarche et al., 1997). Diese Ergebnisse konnten jedoch nicht in allen Untersuchungen bestätigt werden (van der Steeg et al., 2008).

Für sehr hohe HDL-Plasmaspiegel wurde, entgegen der geltenden Meinung, dass HDL ein protektiver Faktor ist, teilweise sogar eine positive Korrelation mit dem KHK-Risiko gefunden (van der Steeg et al., 2008).

Umgekehrt zeigten Befunde der „Copenhagen City Heart Study“, dass nicht jede HDL-Erniedrigung negative Effekte haben muss (Agerholm-Larsen et al., 2000). Hier wurde ein A373P/ R451Q-Polymorphismus im CETP entdeckt, der

zu einer Reduktion der HDL-Konzentration führt (bei Frauen zwischen 0.12 bis 0.36 mmol/L entsprechend etwa 4 - 14 mg/dl; bei Männern zwischen 0.14 bis 0.21 mmol/L entsprechend etwa 5 – 8 mg/dl) und trotzdem eine Schutzfunktion zu haben scheint. Frauen hatten trotz deutlichen HDL-Abfalls ein um 36% reduziertes Herzinfarkttrisiko.

1.5 Die physiologische Bedeutung der Triglyzeride im Menschen

Triglyzeride sind die Hauptquelle der Organe für Fettsäuren, welche als Energiequelle genutzt werden können (Voshol et al., 2009).

Freie Fettsäuren werden im Ruhezustand des Körpers größtenteils in die Leber aufgenommen (Teusink et al., 2003). Dort werden sie entweder für die β -Oxidation verwendet oder aber durch Veresterung von drei Acyl-CoA-Molekülen mit Glycerol-3-Phosphat in Triglyzeride umgewandelt. Die entstandenen Triglyzeride werden nun zum Teil gespeichert. Der andere Teil wird in Form von VLDL in die Zirkulation überführt. Nach der Lipolyse der VLDL werden die aus den Triglyzeriden wieder generierten Fettsäuren hauptsächlich durch das Fettgewebe, die Skelett- und die Herzmuskulatur aufgenommen (Olivecrona et al., 1997), um dort als Energiequelle zu dienen.

In der postprandialen Situation wird die VLDL-Produktion in der Leber reduziert. Die Plasmatriglyzeride stammen dann hauptsächlich aus den im Darm synthetisierten Chylomikronen (Redgrave, 2004). Die enthaltenen Triglyzeride werden nun von der LPL des Fettgewebes hydrolysiert und die Fettsäuren in dieses Gewebe aufgenommen (Havel, 1997). Während im Nüchternzustand Triglyzeride hauptsächlich durch das Muskelgewebe aufgenommen werden, wird diese Rolle im postprandialen Zustand durch das Fettgewebe eingenommen (Olivecrona et al., 1997).

1.6 Apolipoproteine

Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt, sind die Apolipoproteine wichtige Bestandteile der Lipoproteine.

Apolipoproteine sind definiert als Proteine, die neutrale Lipide und Phospholipide binden, um lösliche, polydisperse Lipoproteinfamilien zu formen (Kostner und Alaupovic, 1972). Sie können unter anderem nach Isolierung per Ultra-

zentrifugation durch unterschiedliches Wanderverhalten in der Gelelektrophorese (Gustafson et al., 1966; Neubeck et al., 1977; Seidel et al., 1973) und durch Immunoaffinitätssäulen (Nakajima et al., 1993) unterschieden werden. Alle bisher bekannten Apolipoproteine besitzen mindestens eine α -Helix als gemeinsames Merkmal (Segrest et al., 1994).

Jedes Lipoprotein hat eine eigene Kombination verschiedener Apolipoproteine, die die für die jeweilige Lipoproteinfraktion typischen Funktionen ermöglicht.

Tabelle 1-2 gibt eine Übersicht über die bekannten Apolipoproteine, ihre Funktion und andere Eigenschaften.

Tabelle 1-2: Charakteristika humaner Apolipoproteine (Apo) (Schneider et al., 1996)

Apo	Chromosom	Molekulargewicht (kDa)	Plasmamenge (mg/dl)	Vorkommen	Ort der Synthese	Funktion
AI	11	28,5	120- 140	HDL, Chylomikronen (CM)	Leber, Darm	Aktivierung der LCAT; Bindung an SRBI und den HDL- Rezeptor
AII	1	17	35 - 50	HDL	Leber	Aktivierung der hepatischen Triglyzeridlipase
AIV	11	46	< 5	HDL, CM	Darm	Aktivierung der LCAT; Bindung an den HDL-Rezeptor?
AV	11	38	< 2	VLDL, HDL	Leber	Aktivierung der hepatischen Triglyzeridlipase
B48	2	265	< 5	CM, VLDL	Darm	Strukturprotein der Chylomikronen; Bindung an LRP
B100	2	550	70 - 90	CM, VLDL, IDL, LDL	Leber	Hauptligand des LDL-Rezeptors
CI	19	6,5	5 - 8	HDL, CM, VLDL	Leber	Aktivierung der LCAT
CII	19	8,8	3 - 7	HDL, CM, VLDL	Leber	Aktivierung der LPL

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von Seite 25

Apo	Chromosom	Molekulargewicht (kDa)	Plasmamenge (mg/dl)	Vorkommen	Ort der Synthese	Funktion
CIII	11	8,9	10 - 12	HDL,CM, VLDL	Leber	Inhibitor der LPL
D	3	29	8 - 10	HDL	Leber	Aktivierung und Stabilisierung der LCAT
E	19	34	3 - 5	HDL,IDL CM,VLDL	Leber	Ligand des LDL/VLDL-Rezeptors und LRP
(a)	6	350-900	variabel	HDL,LDL Lp(a)	Leber	Funktion noch unklar
J	8	70	7-10	HDL, VLDL	Gehirn, Leber	Funktion nicht genau bekannt. Mitwirkung bei zellulärer Apoptose
M	6	13	< 2	HDL, VLDL	Leber, Niere	Bildung von pre- β -HDL, Cholesterinefflux

In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch nicht die kodierenden Genabschnitte der Apolipoproteine untersucht, sondern ihre regulatorischen Gensequenzen.

1.6.1 Die Bedeutung regulatorischer Sequenzen für die Apolipoproteinexpression

Schon frühzeitig konnte die Bedeutung von Polymorphismen in nicht-kodierenden Abschnitten der Apolipoproteine für Pathologien des Fettstoffwechsels dargestellt werden. So wurde zum Beispiel eine Guanin/ Cytosin-Substitution in der nicht kodierenden 3'-Region des Apolipoproteins CIII entdeckt (Karathanasis et al., 1983; Rees et al., 1983; Rees et al., 1985), die signifikant häufiger bei Patienten mit Hypertriglyzeridämie gefunden wurde als in Kontrollgruppen (Rees et al., 1983; Rees et al., 1985). Diese Ergebnisse konnten zwar nicht für alle (Marcil et al., 1996; Price et al., 1989), aber doch für viele verschiedene ethnische Gruppen bestätigt werden (Dammerman et al., 1993; Ordovas et al., 1991; Shoulders et al., 1991; Shoulders et al., 1996; Surguchov et al., 1996; Tybjaerg-Hansen et al., 1993). In diesen nicht kodierenden Abschnitten liegen verschiedene regulatorische Elemente wie der ApoCIII Enhancer oder verschiedene Promoter.

Schon der Begriff „regulatorische Sequenzen“ beschreibt die Wichtigkeit dieser Genabschnitte als Regulatoren der Transkription bestimmter Gene. Am Beispiel des Apolipoprotein CIII-Gens soll dies erläutert werden.

In einer in vitro-Untersuchung aus dem Jahr 1990 wurden verschiedene Abschnitte vor dem Transkriptionsstart des ApoCIII-Gens aus der Sequenz entfernt und nachfolgend die Transkriptionsaktivität per Chloramphenicol-Acetyltransferase-(CAT-)Assay gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass die ApoCIII-Expression in der Leber bis zu 34-fach, im Darm bis 13-fach verringert werden kann, wenn ein Abschnitt 890 bis 686 Basen vor dem Transkriptionsstartpunkt des ApoCIII-Gens aus der Sequenz entfernt wird. Die Deletion des Abschnitts 1020 bis 871 Basen vor dem Transkriptionsstart führte hingegen zur zweifachen Steigerung der intestinalen Transkriptionsaktivität, ohne Auswirkung auf die hepatische Transkriptionsaktivität zu haben. (Ogami et al., 1990)

Trotz der Bedeutung der regulatorischen Abschnitte für die Gene nicht nur des Fettstoffwechsels, sind sie verhältnismäßig wenig untersucht. Bei vielen bereits bekannten Polymorphismen ist noch nicht klar, welche Auswirkung sie haben. Daher sind sie weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung (Delgado-Lista et al., 2010; Lai et al., 2005; Payseur et al., 2006; Qi et al., 2007). Aus diesem Grund wurde das Augenmerk in der vorliegenden Arbeit auf diese Genbereiche gelegt.

Die Bedeutung der hier untersuchten Genabschnitte und dadurch auch die Grundlage für das Screening werden im Folgenden detailliert beschrieben.

Das übergeordnete Ziel dieser Studien war, neue Therapiemöglichkeiten für Störungen des Lipidstoffwechsels zu entdecken und somit Risikofaktoren zum Beispiel für die koronare Herzkrankheit einzudämmen.

Erste Erfolge auf der Apolipoproteinebene haben beispielsweise die Fibrate erbracht, die über die Aktivierung des Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α) die ApoCIII-Transkription vermindern (Andersson et al., 1999) sowie die ApoAI-Transkription und HDL-Plasmaspiegel steigern können (Hennuyer et al., 1999; Staels und Auwerx, 1998; Vu-Dac et al., 1998). Die verminderte ApoCIII-Transkription könnte zu einer verbesserten Clearance triglyzeridreicher Lipoproteinremnants führen und so unter Umständen das Risi-

koprofil in Bezug auf die Entwicklung einer Artherosklerose verbessern (Andersson et al., 1999).

Weitere Erfolge konnten mit Infusionen von HDL und ApolipoproteinAI sowie ApoAI-mimetischen Peptiden erreicht werden (Meyer et al., 2009; Tardif et al., 2009; Van Lenten et al., 2008; Van Lenten et al., 2009). Ziel dieser Anwendung war auch hier die Verbesserung des Artheroskleroserisikoprofils durch Anhebung der HDL-Plasmakonzentrationen.

Um die gewünschten Plasmalevel erreichen zu können, wäre eine Möglichkeit der Transkriptionsregulierung wünschenswert. Hierfür ist jedoch das vollständige Verständnis regulatorischer Genabschnitte notwendig.

1.6.2 Der ApoAI-CIII-AIV-AV-Cluster

Anfang der 1980er Jahre wurde festgestellt, dass die Gene der Apolipoproteine AI und CIII sehr wahrscheinlich von einem gemeinsamen evolutionären Vorfahren abstammen und über gemeinsame Kontrollregionen verfügen (Karathanasis et al., 1983). Die Vermutung des gemeinsamen evolutionären Ursprungs wird gestützt durch die Entdeckung großer Homologien zwischen den Genen des Clusters (Karathanasis, 1985; Karathanasis et al., 1986).

Ihre Gene konnten auf dem langen Arm des Chromosoms 11 (11q23 – q24) lokalisiert werden (Bruns et al., 1984; Law et al., 1984).

Kurze Zeit später wurde durch Hybridisierungsstudien das Gen des Apolipoproteins AIV entdeckt und ebenfalls diesem Cluster zugeschrieben (Karathanasis, 1985).

Das ApoAI- und das ApoAIV-Gen werden in der gleichen, das ApoCIII-Gen in der entgegengesetzten Richtung transkribiert (Kardassis et al., 1996). Dies führt dazu, dass das ApoAIV- und das ApoCIII-Gen über eine gemeinsame regulatorische 5'-Region verfügen könnten und legt somit die Hypothese nahe, dass die Transkription beider Gene gemeinsam reguliert wird (Ochoa et al., 1993).

Vor wenigen Jahren wurde durch den Vergleich von Mäuse- und menschlicher DNA noch ein weiteres Apolipoproteingen, ApoAV, entdeckt und dem Cluster zugerechnet (Pennacchio et al., 2001; van der Vliet et al., 2001).

Verschiedene Studien identifizierten den ApoAI-CIII-AIV-Gencluster als Kandidatengen für die familiäre Hypercholesterinämie und damit als wichtigen Risiko-

faktor für die koronare Herzkrankheit (Dallinga-Thie et al., 1996; Dallinga-Thie et al., 1997; Hayden et al., 1987; Wojciechowski et al., 1991).

Jedes der drei Gene des Clusters bzw. deren Promoter verfügt über mindestens ein sogenanntes Hormone Response Element (HRE) (Ktistaki et al., 1994; Papazafiri et al., 1991; Talianidis et al., 1995; Tzamelis und Zannis, 1996). HRE bestehen aus zwei direkten, inversen oder umgekehrt palindromischen AGG(T)TCA-Sequenzwiederholungen auf dem Sense-Strang bzw. TGA(A)CCT auf dem Anti-Sense-Strang. Sie sind wichtig für die Transkription und gewebeabhängige Expression von Apolipoproteingenen (Zannis et al., 2003). Ihre Funktion wird hervorgerufen durch die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren. Meist handelt es sich hierbei um den Hepatic Nuclear Factor (HNF)-4, aber auch andere Stoffe können an die HRE binden (Lavrentiadou et al., 1999; Tzamelis und Zannis, 1996).

Um ihre Wirkung entfalten zu können, interagieren die HRE der verschiedenen Gene miteinander über diese Transkriptionsfaktoren (Archer et al., 2005; Ginsburg et al., 1995; Kardassis et al., 1997; Ktistaki et al., 1994; Talianidis et al., 1995).

Alle bekannten Transkriptionsfaktoren verfügen über eine DNA-Bindungsdomäne sowie eine Transkriptionsaktivierungsdomäne (Sladek, 1993; Zannis et al., 2001). Die Gruppe der leberspezifischen Transkriptionsfaktoren wird hauptsächlich vertreten durch HNF-1, -2 und -4 und das CCAAT/ Enhancer Binding Protein (C/EBP) (Sladek, 1993; Zannis et al., 2001). Diese Faktoren werden zusätzlich im Darm synthetisiert (Zannis et al., 2001) und sind ebenso wie ubiquitär vorkommende Faktoren wie das Specificity Protein 1 (SP1) (Briggs et al., 1986) und andere in die Transkription der Apolipoproteingene eingebunden. Da die Regulation der Genexpression vor allem auf der Transkriptionsebene stattfindet (Ladiaz et al., 1992), könnte die Untersuchung des ApoAI-CIII-AIV-Clusters noch zusätzliche wichtige Erkenntnisse für Pathologika des Lipidstoffwechsels liefern. Die starke funktionelle und regulatorische Verbindung der einzelnen Gene des Clusters miteinander wird in den folgenden Kapiteln im Einzelnen erläutert und war ein wichtiger Grund dafür, in dieser Arbeit die regulatorischen Sequenzen genau dieser drei Gene auf Mutationen zu untersuchen.

1.6.3 Das Apolipoprotein AI

Bereits in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde das Apolipoprotein AI als Bestandteil der High Density Lipoproteins (HDL) entdeckt (Scanu et al., 1958). Seine Masse macht etwa 70% der gesamten Proteinmasse der HDL aus (Brouillette et al., 2001; Scanu und Edelstein, 2008). Es wird hauptsächlich in der Leber und dem Dünndarm synthetisiert (Karathanasis, 1985; Sorci-Thomas et al., 1989).

Das Apolipoprotein AI besteht aus 243 Aminosäuren (Brewer, Jr. et al., 1978) und amphipathischen Helices aus 11 bzw. 22 sich wiederholenden Aminosäuren, welche durch Prolinreste voneinander getrennt werden (Segrest et al., 1992).

In fettfreier Umgebung ist es ein asymmetrisches, flexibles Molekül, das aus zwei helixförmigen Hauptdomänen besteht, die sich aus einem vier Helices umfassenden Abschnitt in den ersten 75% der N-terminalen Region sowie einem zwei Helices umfassenden Abschnitt in der C-terminalen Region zusammensetzen (Ajees et al., 2006; Edelstein und Scanu, 1980; Vitello und Scanu, 1976). Das ApoAI zeichnet sich durch eine hohe Oberflächenaktivität aus, die von den amphipathischen Eigenschaften des Moleküls abhängt (Brouillette et al., 2001; Saito et al., 2003). Lipidfreies ApoAI tendiert zur Ausbildung von Oligomeren (Davidson et al., 1996), hervorgerufen durch hydrophobische Interaktionen der C-terminalen Helices (Vitello und Scanu, 1976).

Für die Konfiguration von ApoAI im Beisein von Phospholipiden gibt es zwei große Modelle. Am breitesten anerkannt ist das sogenannte Belt Model, bei dem die amphipathischen Helices des ApoA-I-Moleküls gürtelartig um die scheibenförmig angeordnete Phospholipiddoppelschicht gewunden sind (Koppaka et al., 1999; Li et al., 2006; Segrest et al., 1999; Wu et al., 2007). Das zuerst entwickelte, sogenannte Picket Fence (deutsch: Lattenzaun) -Modell, bei dem die α -Helices des ApoAI parallel zu den Acylketten der Plasmalipide angeordnet sind (Bresseur et al., 1992; Phillips et al., 1997), ist größtenteils wieder verlassen worden.

Mittlerweile wurde noch ein drittes Modell vorgestellt, bei dem die ApoAI-Moleküle haarnadelartig um die Phospholipidacylketten angeordnet sind (Rogers et al., 1998; Tricerri et al., 2001). Dies liefert ein Modell für die Konfiguration schei-

benförmiger HDL-Partikel mit drei ApoAI-Molekülen und erklärt somit die Größenunterschiede rekonstituierter HDL-Partikel (Klon et al., 2002).

ApoAI übernimmt freies Cholesterol sowie Plasmalipide vom sogenannten ATP-Binding Cassette Transporter 1 (ABCA 1) und dient somit der Ausschleusung von Cholesterol und Lipiden aus den peripheren Zellen in die HDL (Oram, 2003; Yancey et al., 2003).

Durch ABCA 1 aus der Plasmamembran freigesetztes freies Cholesterol und Plasmalipide werden hauptsächlich durch lipidfreie und lipidarme ApoAI-Moleküle aufgenommen (Yancey et al., 2003). ApoAI kann dabei zwischen lipidreichen und lipidarmen Zuständen wechseln (Liang et al., 1995) und so als lipidarmes oder –freies Molekül von den HDL abdissoziieren, um wiederum für ABCA 1 zur Verfügung zu stehen (Rye und Barter, 2004).

Das freie Cholesterol in ApoAI-enthaltenden HDL-Partikeln, das in vivo durch ABCA 1 geformt wird, wird wiederum durch die Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCAT) in Cholesterolester umgewandelt (Saito et al., 2004). ApoAI dient dabei als obligatorischer Kofaktor und Aktivator der LCAT (Fielding et al., 1972). Dabei sind für die Aktivierung der LCAT drei Arginin-Reste in einer amphipathischen α -Helix der Klasse A zwischen den Positionen 143 und 164 (Dhoest et al., 1997; Minnich et al., 1992; Roosbeek et al., 2001) und ein Abschnitt zwischen den Positionen 159 und 180 (Wu et al., 2007) verantwortlich.

Passend zu diesen Erkenntnissen wurden verschiedene Punktmutationen in der Aminosäuresequenz des ApoAI entdeckt, die zu einer drastischen Aktivitätsabnahme der LCAT führten (Bruckert et al., 1997; Miccoli et al., 1997; Utermann et al., 1984).

Die durch die LCAT erstellten Cholesterolester der HDL können unter anderem mithilfe der Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ 1 (SR-B1) in Hepatozyten aufgenommen werden (Rigotti et al., 2003; Williams et al., 1999). ApoAI ist ein wichtiger Interaktionspartner für die SR-B1 und dient damit dem reversen Cholesteroltransport (Anantharamaiah et al., 2007; Thuahnai et al., 2003; Williams et al., 2000).

Auch in vivo konnte die Bedeutung des ApoAI für den reversen Cholesteroltransport gezeigt werden. So wurde in einem Mausmodell ein verstärkter Cho-

lesteroltransport von Makrophagen in den Fäzes ApoAI-überexprimierender Mäuse nachgewiesen (Zhang et al., 2003).

Ferner zeigte ein Mausmodell eine signifikante Zunahme der Atherosklerosehäufigkeit bei Mäusen, die kein ApoAI exprimierten (Moore et al., 2003). Passend dazu konnte die Häufigkeit der Entwicklung der Atherosklerose bzw. die Größe atherosklerotischer Plaques in Mäusen deutlich reduziert werden, nachdem ein Transfer humanen ApoAI-Gens auf diese Mäuse durchgeführt worden war (Benoit et al., 1999; Rubin et al., 1991).

Auch in Menschen konnten Hinweise auf einen protektiven Effekt des ApoAI in Bezug auf die Atheroskleroseentwicklung gefunden werden. In einer Studie wurde rekombinantes ApoAI_{Milano} (siehe unten) mit Phospholipiden in einem Komplex gebunden und 57 Patienten mit akutem Koronarsyndrom infundiert. Dies führte zu einer deutlichen Volumenreduktion atherosklerotischer Plaques (Nissen et al., 2003).

Weitere Indizien für die atheroprotektiven Eigenschaften des ApoAI konnten durch Arbeiten mit synthetischen amphipathischen Peptiden gefunden werden. Bereits 1979 konnten ApoAI-mimetische Peptide mit ApoAI-ähnlichen Oberflächeneigenschaften synthetisiert werden (Fukushima et al., 1979). Ein Jahr später konnte die Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase durch ApoAI-mimetische Peptide aktiviert werden (Yokoyama et al., 1980).

Die orale Gabe eines ApoAI-mimetischen Peptids an Affen erhöhte deren Cholesteroltansfer von Makrophagen auf HDL und verminderte die Fähigkeit der LDL, das Arterienendothel zur Produktion chemotaktisch wirksamer Stoffe zu stimulieren (Navab et al., 2004).

Bei einer Untersuchung an sechs Männern mit niedrigen HDL-Plasmaspiegeln konnte ein Anstieg der HDL-Plasmakonzentration nach Infusion lipidfreien ApoAI¹ festgestellt werden (Nanjee et al., 1996). Eine spätere Studie an 16 gesunden, männlichen Probanden zeigte, dass die Infusion von ApoAI/Lecithin den reversen Cholesterolttransport in Menschen stimulieren kann (Nanjee et al., 2001), unter anderem, indem es die LCAT aktiviert und einen Präsentationstunnel erstellt, um Cholesterol in die HDL-Partikel aufzunehmen (Jones et al., 2009).

Zudem sind die Methioninreste des ApoAI in der Lage, die Lipidperoxidation zu unterbrechen und so die Bildung von oxidiertem LDL zu vermindern (Garner et

al., 1998; Panzenbock und Stocker, 2005). Diese Fähigkeit ist wiederum abhängig vom Redox-Status des Apo AI (Zerrad-Saadi et al., 2009). Oxidiertes LDL spielt eine Schlüsselrolle in der Entstehung von Schaumzellen (Goldstein et al., 1979).

Auch strukturelle Modifikationen, wie oxidativer Stress auf das ApoAI durch die Myeloperoxidase mit nachfolgendem Verlust der Fähigkeit der Interaktion mit dem ATP-Binding Cassette Transporter 1, können zur Störung des reversen Cholesteroltransports führen (Bergt et al., 2004; Zheng et al., 2004). Dies ist interessant, da diese Situation bei Menschen vor allem bei Vorliegen der koronaren Herzkrankheit sowie in arteriellen Plaques bei Atherosklerose entsteht (Zheng et al., 2004).

Auch die Tatsache, dass HDL-Partikel in sehr hohen Konzentrationen ihre protektive in eine proatherogenetische Wirkung umkehren, dies für ApoAI jedoch nicht gilt (van der Steeg et al., 2008), ist ein Hinweis darauf, dass die atheroprotektive HDL-Wirkung durch das ApoAI bedingt wird.

Bei einem Vergleich verschiedener Studien stellten Hovingh et al. zudem fest, dass Mutationen des ApoAI verglichen mit Mutationen in anderen Komponenten des reversen Cholesteroltransports wie ABCA 1 oder der LCAT die schwerwiegendsten Auswirkungen in Bezug auf die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen haben. (Hovingh et al., 2005)

Erkenntnisse über die Regulation des ApoAI-Spiegels durch die Nahrungsaufnahme lieferte eine Studie an Kaninchen, bei der eine Kokosnusöldiät die ApoAI-mRNA-Spiegel circa eineinhalbfach steigerte (Schwab et al., 2000).

Auch die Hormonhomöostase scheint eine Regulatorrolle in Bezug auf die ApoAI-Expression einzunehmen. So konnte die Gabe von 17β -Estradiol in einer HepG2-Zellkultur sowohl den Steady State mRNA-Spiegel als auch den Cholesterolefflux aus Fibroblasten steigern (Jin et al., 1998; Lamon-Fava et al., 1999). Obwohl diese Ergebnisse durch eine andere Arbeit nicht bestätigt werden konnten (Harnish et al., 1998), gibt es deutliche Hinweise dafür, dass die Östrogensersatztherapie bei postmenopausalen Frauen zu einem Anstieg der ApoAI Plasmaspiegel führt (Applebaum-Bowden et al., 1989; Granfone et al., 1992; Schaefer et al., 1983).

Die ApoA1-Gensequenz wurde durch zwei verschiedene Arbeiten beschrieben (Breslow et al., 1982; Shoulders et al., 1983). Beide Untersuchungen nutzten die DNA-Klonierung und legten so den Grundstein zur Erforschung des ApoA1-Gens. Wie oben beschrieben wurde es noch im gleichen Jahr als Bestandteil des ApoA1/CIII-Clusters identifiziert (Karathanasis et al., 1983).

Die erste bekannte Mutation in der primären Sequenz eines Plasmalipoproteins ist das sogenannte ApoA1_{Milano}. Bei drei Mitgliedern einer italienischen Familie wurden deutlich erniedrigte HDL-Plasmaspiegel gefunden. Die Funktion der LCAT und der Lipoproteinlipase waren jedoch normal oder nur leicht reduziert. Auch klinische Zeichen der Atherosklerose fehlten vollkommen (Franceschini et al., 1980). Es wurde festgestellt, dass diese Konstellation durch das Vorkommen von Cystein und Isoleucin in der ApoA1-Aminosäuresequenz hervorgerufen wurde. Deshalb wird das ApoA1_{Milano} auch ApoA1_{cys} genannt (Weisgraber et al., 1980).

Zwei Jahre nach der Entdeckung der ApoA1_{Milano}-Variante beschrieb die ehemalige Marburger Arbeitsgruppe um Gerd Utermann zwei neue Varianten, die sie ApoA1_{Marburg} und ApoA1_{Gießen} nannte (Utermann et al., 1982a). Die ApoA1_{Gießen}-Variante wurde wenig später als Defektmutante beschrieben, die unfähig ist, das Schlüsselenzym LCAT zu aktivieren (Utermann et al., 1984).

Obwohl die ApoA1_{Marburg}-Variante in Personen mit Hypertriglyzeridämie gefunden worden war, konnte ein Zusammenhang nicht nachgewiesen werden (Utermann et al., 1982b).

Weitere Varianten wie ApoA1_{Helsinki} (Lys107 → 0) und ApoA1_{Iowa} (Gly26 → Arg) sind ebenfalls beschrieben worden (Nichols et al., 1988; Rall, Jr. et al., 1984).

Für die ApoA1_{Helsinki}-Variante konnte eine Assoziation mit niedrigen HDL- und ApoA1-Plasmaspiegeln nachgewiesen werden (Tilly-Kiesi et al., 1995).

Weder für ApoA1_{Milano} noch ApoA1_{Marburg} und ApoA1_{Iowa} konnte ein Zusammenhang mit der koronaren Herzkrankheit nachgewiesen werden (Franceschini et al., 1980; Rader et al., 1992; Utermann et al., 1982b).

Die Regulation der Expression des ApoA1-Gens geschieht vornehmlich über Interaktionen zwischen nukleären Hormonrezeptoren, die an den ApoA1 Promoter binden, und den an das HRE des ApoCIII Enhancers bindenden Rezeptoren

(Bisaha et al., 1995; Papazafiri et al., 1991; Tzamelis und Zannis, 1996; Walsh et al., 1993).

1.6.3.1 Der ApoAI Promoter

Der ApoAI Promoter enthält in seiner proximalen Region vier regulatorische Elemente A bis D (Papazafiri et al., 1991; Widom et al., 1991). Wie die anderen Gene des ApoAI/CIII/AIV-Clusters verfügt er, wie in Kapitel 1.6.2 beschrieben, über HRE (Papazafiri et al., 1991; Tzamelis und Zannis, 1996), die hier in den Elementen B und D liegen und beide HNF-4 als Bindungspartner verwenden (Tzamelis und Zannis, 1996). Element C hingegen bindet mit den C/EBP verwandte hitzestabile Faktoren, welche als verstärkende Regulatoren wirken. Zudem bindet es auch hitzelabile Faktoren, die zum Teil hemmend auf den Promoter wirken (Papazafiri et al., 1991).

Sowohl in vitro (Widom et al., 1991) als auch in vivo (Walsh et al., 1989) kann der ApoAI Promoter die Expression des ApoAI-Gens aufrechterhalten. Seine Aktivität wird jedoch maßgeblich durch den ApoCIII Enhancer bestimmt (Kardassis et al., 1997) und ist unverzichtbar zur Erreichung der vollen Transkriptionsaktivität (Kan et al., 2000; Zannis et al., 2003).

Verschiedene Studien konnten die Bedeutung der HRE für die Expression des ApoAI-Gens belegen. Artificielle Mutationen im Bereich der HRE führten in vitro zu dramatischen Aktivitätsverlusten des ApoAI Promoters (Kardassis et al., 1997) und führten in einem Mausversuch zu einer Verminderung der Expression des ApoAI Gens auf etwa 15% im Vergleich zu Wildtypmäusen (Zannis et al., 2001; Zannis et al., 2003). Die verbleibende Expressionsaktivität lässt sich am ehesten mit der Wirkung des ApoCIII Enhancers erklären und zeigt, dass dieser allein ausreichend für die Expression des ApoAI Gens ist (Zannis et al., 2001). Näheres hierzu erläutert Kapitel 1.6.5.1.

Die Wirkung des ApoAI Promoters hängt zusätzlich von den mit dem HRE interagierenden Liganden ab. Bindet HNF-4, verstärkt der Promoter die Expression des ApoAI Gens. Binden jedoch andere Faktoren wie das ApoAI Regulatory Protein 1 (ARP-1) oder das ErbA Related Protein 3 (EAR-3), wird die Transkriptionsaktivität vermindert (Tzamelis und Zannis, 1996).

Die hier untersuchte Sequenz des Apo AI Promoters umfasste 229bp zwischen den Nukleotiden 11q:116708439 bis 11q:116708667 (-329 bis -101 in Bezug auf den Transkriptionsstart, siehe Abbildung 8).

-429	[ACACMATGGACAATGGCAACTGCCACACACTCCCATGG	-391
-390	AGGGGAAGGGGATGAGTGCAGGGAACCCCGACCCACC	-353
-352	CGGGAGACCTGCAAGCCTGCAGACACTCCCCTCCCGCCC	-314
-313	CCACTGAACCCTTGACCCCTGCCCTGCASSCCCCGCAGCT	-274
-273	TGCTGTTTGCCCACTCTATTTGCCAGYCCCAGGGACAGA	-234
-233	GCTGATCCTTGAACCTTAAGTTCCACATTGCCJAGGACCA	-94
-93	GTGAGCAGCAACAGGGCCR	-75

Abbildung 8: Darstellung der Sequenz des ApoAI Promoters mit den bisher bekannten Polymorphismen. Die in dieser Arbeit untersuchte Sequenz ist durch die eckigen Klammern gekennzeichnet. Die grau hinterlegten, unterstrichenen Elemente kennzeichnen die Hormone Response Elements des Promoters (Zannis et al., 2003).

Ein bereits bekannter Typ I-Polymorphismus des ApoAI Promoters liegt 75bp vor dem Transkriptionsstart und zeichnet sich durch den Austausch von Adenin mit Guanin aus (rs670; MspI; -75A à G; siehe Abbildung 8; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=670 vom 06.12.2011). Er wurde durch zwölf verschiedene Arbeitsgruppen an über 300 Proben und durch verschiedene Methoden bestätigt. Das A-Allel kommt, je nach Untersuchung, mit einer Häufigkeit von 13,5 bis 32,2%, das G-Allel mit 68,8 bis 86,5% vor. Für die Charakterisierung dieses Single Nucleotide Polymorphism (SNP) wurden das PARC Rochester und PARC Jackson Panel, Celera Donors, das Genom von James D. Watson, eine französisch-kanadische, eine thailändische sowie eine europäische Population untersucht. Durch diese verschiedenen Arbeiten und die Untersuchungen zur Allelfrequenz konnte er validiert werden. (Brookes et al., 2000; Mullikin, 2001; Nickerson und Rieder, 2007; Ning et al., 2001; Sarkar et al., 1998; Tocharoentanaphol et al., 2008; Wang et al., 1998; Wheeler et al., 2008)

Das PARC Rochester Panel umfasst Amerikaner europäischer Abstammung aus Rochester, USA, während das PARC Jackson Panel Amerikaner afrikanischer Abstammung aus Jackson, USA, beinhaltet. Bei den Celera Donors handelt es sich um europäische und afrikanische Amerikaner sowie mexikanische

und chinesische Personen (Brookes et al., 2000; Mullikin, 2001; Nickerson und Rieder, 2007; Ning et al., 2001; Sarkar et al., 1998; Tocharoentanaphol et al., 2008; Wang et al., 1998; Wheeler et al., 2008).

In Bezug auf die Auswirkungen des MspI-Polymorphismus gibt es gegensätzliche Untersuchungen. Die Entdecker des SNPs fanden eine Assoziation mit erhöhten ApoAI- und HDL-Plasmakonzentrationen (Pagani et al., 1990; Talmud et al., 1994) und vermuteten, dass es sich um einen protektiven Polymorphismus in Bezug auf die Entwicklung einer KHK handelt. In einer anderen Untersuchung wurde postuliert, dass das A-Allel die ApoAI-Synthese durch direkte Wirkung auf die Gentranskription stimuliert (Jeenah et al., 1990). Diese These wurde durch einen CAT-Reporter-Gen-Assay gestützt, bei dem eine Assoziation zwischen dem A-Allel und erhöhten ApoAI-Serumspiegeln gefunden wurde (Angotti et al., 1994). Nur wenige Jahre später wurde eine genau gegensätzliche Beobachtung gemacht. Ebenfalls ein CAT-Gen-Assay zeigte eine um etwa 27% verringerte ApoAI-Expression bei Vorhandensein des rs670-Polymorphismus (Matsunaga et al., 1999). Auch Versuche mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Untersuchung (RFLP) konnten die These der verstärkten ApoAI-Expression bei Vorhandensein des A-Allels nicht bestätigen (Kamboh et al., 1996).

Eine weitere Untersuchung an etwa 1600 Patienten fand passend zu diesen Ergebnissen auch keinerlei Assoziation mit dem Auftreten der koronaren Herzkrankheit (Xiao et al., 2008).

Wang et al. fanden wiederum zwar keine Assoziation der Mutation mit veränderten ApoAI- oder HDL-Spiegeln, dafür jedoch ein erhöhtes KHK-Risiko bei Homozygotie für das A-Allel. Dieses Risiko erhöhte sich deutlich, wenn ein zweiter MspI-Polymorphismus 83bp 5' des Transkriptionsstarts des ApoAI-Gens vorlag. (Wang et al., 1996)

Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse wird in einem möglichen Kopplungsungleichgewicht mit anderen regulatorischen Elementen des ApoAI-Gens gesehen (Danek et al., 1998).

Die Internet-Gendatenbank Ensembl.org kennt noch vier weitere SNPs, die in dem in dieser Arbeit untersuchten Abschnitt liegen

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?g=ENSG00000118137;r=11:116706467-116708666 vom 06.12.2011).

Die Basensubstitution -425A à C (rs12718466;

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=12718466 vom 06.12.2011) kommt, je nach Untersuchung, mit einer Frequenz von 2,1 bis 2,8% für das C-Allel bzw. 97,2 bis 97,9% für das A-Allel vor. Sie wurde an insgesamt etwa 240 Proben unter anderem aus den PARC Rochester und Jackson Panels (siehe oben) sowie der KHP Korean-Population nachgewiesen.

Letztere umfasst 90 koreanische Probanden. Diese Mutation wurde durch verschiedene Entdecker und die Untersuchungen zur Allelfrequenz validiert. Über ihre Auswirkungen sind jedoch keine Erkenntnisse vorhanden. (Nickerson und Rieder, 2007)

Drei weitere SNPs, -246C à T (rs2542053), -284C à G (rs2542054) und -285G à C (rs2727786), wurden noch nicht validiert. Auch fehlen Erkenntnisse über ihre Allelfrequenzen oder ihre Auswirkungen im Organismus.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?SITE=NcbiHome&submit=Go> vom 06.12.2011)

Alle hier genannten Polymorphismen sind in Abbildung 8 mit dargestellt.

1.6.4 Das Apolipoprotein AIV

Das menschliche Apolipoprotein AIV wurde 1979 bei vergleichenden Studien von Ratten- und menschlichen Lipoproteinen entdeckt und zunächst als Bestandteil der Chylomikronen beschrieben (Beisiegel und Utermann, 1979). In Ratten wurde ApoAIV auch in HDL sowie VLDL gefunden (Swaney et al., 1974; Swaney et al., 1977). Es enthält mehrere 22 Aminosäuren umfassende, sich wiederholende Abschnitte, die amphipathische α -Helices ausbilden (Boguski et al., 1985).

Verglichen mit ApoAI ist ApoAIV relativ instabil und lässt sich leicht denaturieren (Weinberg und Spector, 1985).

Aufgrund seiner geringen Affinität zu Lipiden wird freies ApoAIV in Nüchternplasma nach Ultrazentrifugation gefunden (Green et al., 1980). Bei Menschen findet man es vornehmlich in lipoproteinfreiem Plasma (Bisgaier et al., 1985; Utermann und Beisiegel, 1979).

Hauptsyntheseort ist der Dünndarm (Wu und Windmueller, 1979), es wird jedoch auch im Hypothalamus (Liu et al., 2003) und der Leber produziert (Karathanasis et al., 1986).

Trotz diverser Gemeinsamkeiten mit der Struktur des Apolipoproteins AI, weist das ApoAIV wichtige Unterschiede auf. In der Struktur des ApoAIV fehlt beispielsweise die relativ ungeordnete, hydrophobische C-terminale Lipidbindungsdomäne des ApoAI. An deren Stelle enthält ApoAIV eine glutaminreiche C-terminale Domäne, die die Lipidbindung sogar zu behindern scheint. (Pearson et al., 2004)

Die genaue Funktion des ApoAIV ist, verglichen mit dem ApoAI, noch relativ unbekannt. In Mausmodellen konnte jedoch ein atheroprotektiver Einfluss nachgewiesen werden. Mäuse, die ApoAIV exprimieren konnten, wiesen nach einer 10 Wochen andauernden Versuchsphase deutlich kleinere atherosklerotische Läsionen auf, als solche, denen die Fähigkeit zur ApoAIV-Expression genommen war (Recalde et al., 2004). Cohen et al. fanden ähnliche Ergebnisse und erklärten den Effekt durch die Kofaktorfunktion des ApoAIV für die LCAT (Cohen et al., 1997). Gestützt wird diese These durch weitere Arbeiten, bei denen ApoAIV in vitro in der Lage war, die LCAT zu aktivieren (Chen und Albers, 1985; Steinmetz und Utermann, 1985).

Hinweise für eine Rolle des ApoAIV im reversen Cholesteroltransport lieferten unter anderem Studien unserer eigenen teils in Zusammenarbeit mit einer weiteren Arbeitsgruppe. Hierbei verstärkte ApoAIV, wie ApoAI, den Cholesterolefflux aus Fettzellkulturen und anderen in vitro (Duverger et al., 1993; Stein et al., 1986; von Eckardstein et al., 1995). Dabei benutzt es die gleichen Bindungsstellen wie ApoAI und ApoAII (Steinmetz et al., 1990). Es verstärkt zudem die Aktivierung der Lipoproteinlipase durch das Apolipoprotein CII (Goldberg et al., 1990) und stimuliert dessen Aufnahme in triglyzeridreiche Lipoproteine (Patsch et al., 1994).

ApoAIV kann auch eine Rolle in der Nahrungsaufnahme als Sättigungssignal spielen (Fujimoto et al., 1992; Fujimoto et al., 1993b; Fujimoto et al., 1993a). Diese Daten wurden nicht durchweg bestätigt (Aalto-Setälä et al., 1994). Sie werden jedoch weiter durch Studien unterstützt, die zeigen konnten, dass Insu-

lin und der endotheliale Wachstumsfaktor (EGF) die ApoAIV-Synthese stimulierten (Attia et al., 1997; Black und Ellinas, 1992). Einige Mutationen des ApoAIV-Gens sind zudem mit einem höheren BMI assoziiert (Fiegenbaum und Hutz, 2003).

Unter anderem durch unsere eigene Arbeitsgruppe wurden anhand isoelektrischer Fokussierung zwei häufige Isoproteine des ApoAIV, ApoAIV-I und ApoAIV-II, identifiziert (Menzel et al., 1982; Utermann et al., 1982a).

Eine Aminosäuresubstitution an Position 347 von Threonin zu Serin, hervorgerufen durch eine Punktmutation, die einen Adeninrest durch einen Thyminrest ersetzt, führt zum ApoAIV-I (Lohse et al., 1991). Das ApoAIV-II entsteht durch eine Substitution von Guanin mit Thymin an Position drei des Codons 360, die wiederum zu einem Austausch von Glutamin mit Histidin führt (Lohse et al., 1990a; Tenkanen et al., 1991).

Beide Isoproteine sind bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ I mit einem höheren Risiko für die koronare Herzkrankheit assoziiert (Kretowski et al., 2006). Zusätzlich gibt es weitere, seltenere Isoproteine, die ebenfalls durch Punktmutationen hervorgerufen werden (Lohse et al., 1990b; Lohse et al., 1991).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu den Auswirkungen dieser Sequenzunterschiede sind kontrovers. Personen mit dem ApoAIV-II/I-Phänotyp wiesen signifikant erhöhte HDL-Plasmaspiegel auf (Menzel et al., 1988; Menzel et al., 1990). Diese Ergebnisse konnten jedoch nicht von allen Studien bestätigt werden (de Knijff et al., 1988; Ehnholm et al., 1994; Tenkanen et al., 1992; von Eckardstein et al., 1992; Zaiou et al., 1994). Teils wurden statt der erhöhten HDL-Plasmaspiegel veränderte LDL- und Lp(a)-Plasmaspiegel gefunden (von Eckardstein et al., 1992).

In vivo-Kinetik-Studien unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass das ApoAIV deutlich schneller katabolisiert wird als beispielsweise ApoAI. Seine Plasmaspiegel hängen dabei hauptsächlich von der Produktionsrate ab. Untersuchungen der Kinetik der beiden Phänotypen ApoAIV-I und ApoAIV-II zeigten, dass ApoAIV-I schneller katabolisiert wird als ApoAIV-II. (Rader et al., 1993)

Die ApoAIV-Produktion wird unter anderem durch die Nahrungsaufnahme beeinflusst. Eine Diät mit wenig Fett und wenig Cholesterin konnte die ApoAIV-Sekretion um 37,7% während einer Phase mit regelmäßiger Nahrungsaufnah-

me bzw. 59,6% im Nüchternzustand gegenüber einer normalen Nahrungsaufnahme reduzieren (Sun et al., 2001).

Unsere Arbeitsgruppe studierte die ApoAIV-Plasmakonzentration in normgewichtigen Probanden über einen Zeitraum von 24 Stunden in Nüchtern- und Sättigungsphasen. In der Nüchternphase fiel die ApoAIV-Konzentration um etwa 50%, in der Sättigungsphase blieb die Konzentration relativ stabil. Dabei zeigte sie eine Assoziation zur Triglyzeridkonzentration. Ein zirkadianer Rhythmus fand sich nicht. (Rafat et al., 2004)

Die Expression des ApoAIV-Gens wird durch die synergistische Interaktion zwischen ApoAIV Promoter und ApoCIII Enhancer gesteuert.

Unter anderem wurde mithilfe eines Mausmodells festgestellt, dass der ApoAIV Promoter allein nicht ausreichend für die Transkription des ApoAIV-Gens ist. Erst im Zusammenspiel mit dem ApoCIII Enhancer wird die volle Transkriptionsaktivität erreicht. (Kardassis et al., 1997; Ktistaki et al., 1994; Ogami et al., 1990; Talianidis et al., 1995)

Dabei kontrolliert der ApoCIII Enhancer die hepatische und intestinale Expression des ApoAIV Gens (Le Beyec et al., 1999).

1.6.4.1 Der ApoAIV Promoter

Bis vor wenigen Jahren wurde davon ausgegangen, dass der ApoAIV Promoter insgesamt vier regulatorische Elemente enthält, von denen das Element C als Hormone Response Element (HRE) fungiert und HNF-4 als positiven sowie das ApoAI Regulatory Protein-1 (ARP-1) und das ErbA-Related Protein 3 (EAR-3) als negative Transkriptionsregulatoren binden kann. Die gegensätzliche Wirkung der Transkriptionsfaktoren wurde mit ihrer kompetitiven Interaktion mit dem ApoAIV Promoter erklärt. (Ktistaki et al., 1994)

Schließlich wurden jedoch noch weitere Elemente gefunden, von denen das Element E ebenfalls als HRE fungiert und genau wie Element C sowohl HNF-4 als auch ARP-1 und EAR-3 binden kann (Sauvaget et al., 2002).

Ein wichtiger Regulator der ApoAIV-Transkription ist zudem der Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α) aus der Familie der nukleären Hormonrezeptoren (Mangelsdorf et al., 1995). Dieser dient der Regulation der Lipid- und Glucosehomöostase (Keller und Wahli, 1993).

PPAR α -Agonisten stimulieren die ApoAIV-Synthese in menschlichen Hepatomzellen und steigern den ApoAIV-Plasmaspiegel in Hunden (Nagasawa et al., 2007).

Nun wurden Hinweise darauf gefunden, dass der ApoAIV Promoter drei Bindungsdomänen für PPAR α im Bereich 2979 bis 2967 Basen vor dem ApoAIV-Transkriptionsstart enthält. (Nagasawa et al., 2009).

Ohne die Unterstützung durch den ApoCIII Enhancer hat die Wirkung des ApoAIV Promoters allerdings nur geringe Auswirkungen auf die Transkriptionsaktivität (Ktistaki et al., 1994; Ochoa et al., 1993).

Bei Studien mit HepG2- und CaCo2-Zellen wurden widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die Wirkung des ApoAIV Promoters gefunden. Einerseits konnte die Transkriptionsaktivität mithilfe der Promotersequenz im Vergleich zu Versuchen mit nicht-hepatischen und nicht-intestinalen Zellen circa 10fach gesteigert werden (Elshourbagy et al., 1987). Andererseits zeigte eine andere Studie, dass in HepG2- und CaCo2-Zellen der proximale Promoter allein nicht ausreichte, um die Transkription zu unterhalten (Ochoa et al., 1993). Erst unter dem Einfluss des ApoCIII Enhancers konnte die Aktivität um das circa 9- bis 10fache gesteigert werden (Ktistaki et al., 1994). Ktistaki et al. zeigten zudem, dass das HRE in Element C und HNF-4 unerlässlich für die Funktion des ApoAIV-Promoters ist (Ktistaki et al., 1994)

Die in dieser Arbeit untersuchte ApoAIV Promoter-Sequenz umfasste die Nukleotide 11q:116693995 bis 11q:11669444231 (-439 bis -3 in Bezug auf den Transkriptionsstart, 437bp, siehe Abbildung 9).

Im ApoAIV Promotergen sind bereits einige SNPs bekannt

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?g=ENSG00000110244;r=11:116691419-116694022;t=ENST00000357780 vom 06.12.2011).

Die rs1268833-Mutation (-874C à T) wurde durch Frequenzanalysen, und durch das 1000Genome-Projekt validiert. Beide Allele kommen mit einer Frequenz von 50% vor. Zur klinischen Bedeutung fehlen noch Erkenntnisse.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1268833 vom 06.12.2011)

Das 1000Genome-Projekt hat sich zum Ziel gesetzt, das Genom von etwa 2500 Probanden zu sequenzieren, um so 95% der Mutationen mit einer Frequenz von wenigstens 1% zu entdecken und diese Daten über entsprechende Datenbanken weltweit zugänglich zu machen (Altshuler et al., 2010).

Der rs5089-SNP (-349G à A) wurde an etwa 400 Personen des PARC Jackson Panels, der HYP1-Population (80 Probanden aus Harare bzw. Simbabwe) und anderen validiert. Das A-Allel kommt mit einer Frequenz von 1,4 bis 10%, das G-Allel mit 90 bis 98,6% vor. Die klinische Bedeutung ist auch hier noch unbekannt. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=5089 vom 07.12.2011)

Rs7929134 (-346G à T) und rs13306180 (-222C à T) konnten über Frequenz- und Clusteranalysen sowie das 1000Genome-Projekt validiert werden. Die klinische Bedeutung bleibt aktuell noch unklar.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=7929134 und http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=13306180 vom 30.04.2013)

Rs5090 (-63G à C) wurde anhand von Frequenzstudien validiert. Sein C-Allel kommt mit einer Häufigkeit von 4,0 bis 6,2%, das G-Allel mit 93,8 bis 96% vor. Die klinische Signifikanz ist noch unklar.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=5090 vom 30.04.2013)

Auch rs5091 (-13G à A) wurde durch Frequenz- und Clusteranalysen und das 1000Genome-Projekt validiert. Sein A-Allel kommt mit einer Frequenz von 4,2 bis 15%, das G-Allel mit 85 bis 95,8% vor. Über die klinische Bedeutung gibt es noch keine Erkenntnisse.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=5091 vom 30.04.2013)

Zu rs1263178 (-208C à T), rs1263179 (-318G à C) und rs7926125 (-252T à G) liegen weder Erkenntnisse über Allelfrequenzen noch die klinische Bedeutung vor. Auch die Validierung steht noch aus.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1263178;
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1263179 und

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=7926125 vom
30.04.2013)

```

-914 GAGATTTAAAGTATGTGGGAGGCTGTGCTTAGGTTATATG YAAA -871
-870 TACTATGCCATTTTATATCAAGGACTTGAACATCCATGGATTTTG -826
-825 GTATCTGCAGAGGGTCCTGGAATCAATTTCCCATGGAGACTGA -783
-782 GAGATGACCGTACTACCCACTTCGCAAGCAATGTCTTCTTTAAT -739
-738 GTACTIONAACCATCCCATTGTTTCAGAGGAGAACTGAAGCTCAG -696
-695 GGCTTTGAATAACTAGACCAAGGAGGCACAGCATGGGAGTGG -654
-653 GACATGAAGCACTCTACAATTAACCCTTTCAGGACAAGGCCCTG -610
-609 TCTCCCACACCCATCTGCCCAAAGGCTCTCCAGGGCCCCCTCC -567
-566 TCTTGGGTGTACCTTGACAAGAGACCTAGATTTTAGCTCACTAT -523
-522 GCTGTCTGCAGTCCTGGATGGTCCCACTCCAGTGTCTGGTGCT -480
-479 CTGAGATGGAGTCAGCATTAGTGGCGGATGTGGAGACTGGJGG -438

                                Element E
-437 GGACCTGTCTTCACTGGGGTAGACAGAGGAGATTGTGGACTTTG -395
-394 CCCCCCATGAGCCCGGCACAAACCCAGAGCCGCCAGCAGGGC -353
-352 CTCRAGKCATCAGTCCCGGGCTCATGGGCTCCCTSAGGTGTTT -310
-309 CTCCTACTGTTTTCCGTTCCCTCCTCCCTTCCATGCTGAGGTT -266
-265 GGTGGGGTGGGGGKGGGGGTGCCACGCACGGAACAGCCAC -225
-224 CA YTTCTAACTATCGC YTGAGCCCTGATCTGCTGTCAGCTTCCA -181

                                Element C
-180 CGTAGTCTCAGGGTCACAAAAGTCCAAGAGGCCTCTTGGGAAT -138
-137 GTGTCACCTTCCAGCGTGGAGTCACACTGAGGAAGGAGGAGG -96
-95 GGAGGGCAGCCAGGGGGGTGGCGATAGGGAGASAGTTTAAA -55
-54 TGTCTGGCTGGCTCTGAGCTTCAGTCAGTTCCCACTGCAGC YC -12
-11 AGGTGAGCTJCTC +1

```

Abbildung 9: Sequenz des Apo AIV Promoters nach Karathanasis et. al (Karathanasis et al., 1986) mit den Hormone Response Elements in den Elementen C und E (durch graue Hinterlegung und Unterstrich gekennzeichnet) (Ktistaki et al., 1994; Sauvaget et al., 2002). Die in dem gezeigten Bereich vorbekannten Mutationen sind durch Fett- und Kursivdruck gekennzeichnet. Die eckigen Klammern markieren den in dieser Arbeit untersuchten Bereich.

1.6.5 Das Apolipoprotein CIII

Das Apolipoprotein CIII besteht aus 79 Aminosäureresten und hat eine molekulare Masse von 8,8kDa. Sein Exon 4 kodiert für zwei amphipathische α -Helices (Li et al., 1988). Eine α -Helix am C-terminalen Ende fungiert als Mediator für die Bindung von ApoCIII an Plasmalipide (Bolanos-Garcia und Miguel, 2003). Die Autoren einer anderen Studie vermuteten, dass auch das N-terminale Ende an der Interaktion des ApoCIII mit Plasmalipiden beteiligt ist (Lins et al., 2002).

ApoCIII ist ein Hauptbestandteil der VLDL, kommt jedoch auch in HDL vor (Lavrentiadou et al., 1999). Es moduliert die Bindungseigenschaften von Lipoproteinen an Zellrezeptoren und wirkt somit auf den Stoffwechsel triglyzeridreicher Lipoproteine (Brown und Baginsky, 1972; Krauss et al., 1973; Quarfordt et al., 1982; Shelburne et al., 1980; Windler et al., 1980).

ApoCIII hemmt die Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL) *in vitro* und vermindert so die Hydrolyse triglyzeridreicher Lipoproteine (Krauss et al., 1973; Lambert et al., 1996; Wang et al., 1985).

Ferner hemmt ApoCIII die Interaktion triglyzeridreicher Lipoproteine mit dem LDL-Rezeptor in der Leber (Clavey et al., 1995; Shelburne et al., 1980; Windler und Havel, 1985). Es konnte gezeigt werden, dass eine fehlende ApoCIII-Expression die LPL-abhängige Aufnahme von Triglyzeriden in das Fettgewebe steigert, ohne jedoch die LPL-Expression zu beeinflussen (Duivenvoorden et al., 2005).

Passend zu diesen Ergebnissen wurde in einem Mausmodell eine Assoziation zwischen Überexpression des ApoCIII-Gens und dem häufigeren Auftreten von Hypertriglyzeridämie (Ito et al., 1990) sowie in einer Studie mit ApoCIII-knock-out-Mäusen ein Zusammenhang zwischen fehlendem ApoCIII und einer Hypotriglyzeridämie (Maeda et al., 1994) gefunden.

Auch Studien an gesunden (Shoulders et al., 1991) und hyperlipidämischen (Schonfeld et al., 1979) Probanden zeigten eine positive Korrelation von ApoCIII-Plasmakonzentration und Triglyzeridplasmaspiegel.

Die hepatische Transkription des ApoCIII-Gens wird durch verschiedene nukleäre Hormonrezeptoren reguliert, die mit dem proximalen sowie distalen ApoCIII Promoter interagieren. Durch verschiedene Studien konnte gezeigt werden,

dass der ApoCIII Promoter in der Lage ist, die Expression des ApoCIII-Gens zu stimulieren (de Silva et al., 1994; Ogami et al., 1990; Talianidis et al., 1995). Dies wird in den folgenden Kapiteln weiter erläutert.

1.6.5.1 Der ApoCIII Promoter

Der ApoCIII Promoter besteht aus vier proximalen (A bis D) und sechs distal liegenden (E bis J) regulatorischen Elementen (Ogami et al., 1990). Die distal liegenden Elemente F bis J bilden den sogenannten ApoCIII Enhancer (Kardassis et al., 1997; Zannis et al., 2003). Für weitere Informationen über die Enhancerfunktion wird auf Kapitel 1.6.5.1.1 verwiesen.

Element B fungiert als HRE und kann unter anderem HNF-4, ARP-1, EAR-2, EAR-3 sowie Heterodimere aus zwei Molekülen des Retinoic X-Rezeptors α (RXR α) binden (Kardassis et al., 1997; Ladas et al., 1992; Lavrentiadou et al., 1999; Talianidis et al., 1995). Die Elemente C und D können sowohl mit C/EBP-verwandten, hitzestabilen als auch hitzelabilen Faktoren interagieren (Kardassis et al., 1997).

Artifiziell eingebrachte Mutationen im Bereich des Elements B führten zu dramatischen Aktivitätsverlusten des ApoCIII Promoters in HepG2- und CaCo-2-Zellen (Kardassis et al., 1997; Ladas et al., 1992; Ogami et al., 1990; Talianidis et al., 1995).

Der ApoCIII Promoter enthält in diese Elemente überlappenden Bereichen drei Bindungsstellen für den aktivierenden Transkriptionsfaktor 2 (ATF-2). Eine dieser Bindungsstellen liegt im Element I des distalen ApoCIII Promoters, während die anderen beiden, D/E und B/C genannt, im Bereich des proximalen Promoters liegen. Mutationen in den ATF-2-Bindungsdomänen D/E und dem distal gelegenen Element I verminderten die Promoteraktivität auf 33% und 9%, so dass daraus geschlossen werden kann, dass ATF-2 ein positiver Regulator der ApoCIII Promoteraktivität ist. (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1998)

Für den transcriptional growth factor-Signalpfad konnte ebenfalls eine verstärkende Regulatorfunktion durch Interaktion von SMAD-Proteinen mit dem HNF-4 nachgewiesen werden (Kardassis et al., 2000).

Mitglieder der Jun-Transkriptionsfaktorfamilie hingegen führten bei Vorhandensein des gesamten proximalen und distalen ApoCIII Promoters zu einer Repression der Transkriptionsaktivität. Wurde hingegen der distale Anteil, also der ApoCIII Enhancer, entfernt, wurden die verbleibenden Bereiche durch Jun

transaktiviert. Daraus wurde geschlossen, dass die Jun-Transkriptionsfaktoren mit anderen Faktoren im Bereich des ApoCIII Enhancers interagieren und im Zusammenspiel mit diesen Faktoren die Transkription des gesamten Promoters vermindern. (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1998)

In HepG2-Zellen ist auch Interleukin 1 in der Lage, die ApoCIII Genexpression zu vermindern. Eine Studie lieferte Hinweise darauf, dass Interleukin 1 C/EBP δ phosphoryliert und dieses bei Bindung an Element D des ApoCIII Promoters dessen Aktivität vermindert (Lacorte et al., 1997b). Auch andere Faktoren, wie der Tumornekrosefaktor α (TNF α) reduzieren die ApoCIII Promoteraktivität (Lacorte et al., 1997a).

Die hier untersuchte ApoCIII Promotersequenz umfasste 226bp (Nukleotide 11q:116700604 bis 11q:116700351, -251 bis -26 in Bezug auf den Transkriptionsstart, siehe Abbildung 10). In dieser Sequenz sind der Internetdatenbank Ensembl.org drei Polymorphismen bekannt (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?g=ENSG00000110245;time=1265276479287.287 vom 06.12.2011).

Das A-Allel des -136A à G-Polymorphismus (rs12721091) kommt mit einer Frequenz von 0,7 bis 2,1%, das G-Allel mit 99,3 bis 97,9% vor. Er wurde durch Arbeiten an etwa 400 Personen, unter anderem aus den PARC Rochester und Jackson Panels, validiert. (National Center for Biotechnology Information, 2011; Nickerson und Rieder, 2007)

Die -221C à del-Mutation (rs13306209) wurde noch nicht validiert. Angaben über die Allelfrequenzen oder klinische Auswirkungen fehlen ebenfalls noch. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=13306209 vom 06.12.2011).

Rs113344456 (-97C à T) ist ebenfalls noch nicht validiert. Die Frequenzen für beide Allele werden mit 50% angegeben. Die klinische Signifikanz ist noch unklar. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=113344456 vom 06.12.2011).

```

-251 5'-GAAGGAATGAGGGCTCCCCAGGCCACCCCCAGTTCCTG -213
-212 AGCTCATCTGGGCTGCAGGGCTGGCGGGACAGCAGCGTGG -173
-172 ACTCAGTCTCCTAGGGATTTCCCAACTCTCCCGCCCCRCTTGC -131
-130 TGCATCTGGACACCCTGCCTCAGGCCCTCATCTYCACTGGTC -89
-88 AGCAGGTGACCTTTGCCCAAGCGCCCTGGGTCCTCAGTGCCT -48
-47 GCTGCCCTGGAGATGATATAAA-3' -26

```

Abbildung 10: Die in dieser Arbeit untersuchte Sequenz des proximalen ApoCIII Promoters enthält drei vorbekannte Polymorphismen (durch Fett- und Kursivdruck gekennzeichnet). Das in diesem Bereich liegende HRE ist grau hinterlegt und unterstrichen.

1.6.5.1.1 Der ApoCIII Enhancer

Der ApoCIII Enhancer erstreckt sich von den Positionen -795 bis -590 der in Abbildung 11 gezeigten Sequenz (Zannis et al., 2003). In dieser Arbeit wurde eine 340bp umfassende Sequenz von Nukleotid 11q:116700210 bis 11q:116699819, -800 bis -471 in Bezug auf den Transkriptionsstart untersucht.

```

-800 5'-TGGGGGCTGGGGAGGGCCCCAGACATGAGACCAGCTCCT -762
-761 CCCCAGGGGATGTTATCAGTGGGTCCAGAGGGCAAAATAG -721
-720 GGAGCCTGGTGGAGGGAGGGGCAAAGGCCTCGGGCTCTGA -781
-780 GCGGCCTTGGCCCTTCTCCACCAACCCCTGCCCTACTMA -640
-639 GGGGGAGGCRGCGGGGGGCACACAGGGTGGGGGCGGGTG -602
-601 GGGGGCTGCTGGGTGAGCAGCACTCGCCTGCCTGGATTGAA -561
-560 ACCCAGAGATGGAGGTGCTGGGAGGGGCTGTGAGAGCTCAG -520
-519 CCCTGTAACCAGGCCTTGCCGGAGCCACTGATGCCYGGTCTT -476
-475 CTGTG-3' -471

```

Abbildung 11: Die in dieser Arbeit untersuchte Sequenz des ApoCIII-Enhancers umfasste 340bp. Die darin bisher bekannten Mutationen sind durch Fett- und Kursivdruck gekennzeichnet. Die HRE sind grau hinterlegt und unterstrichen.

Der ApoCIII Enhancer verstärkt die Transkription aller Gene des ApoAI/CIII/AIV-Clusters. Diese Hypothese wurde sowohl in vitro (Kardassis et al., 1997; Ktistaki et al., 1994; Talianidis et al., 1995) als auch in vivo (Georgopoulos et al., 2000; Kan et al., 2000) bestätigt. So konnte für das jeweils untersuchte Gen eine 4- bis 24-fache Verstärkung der Transkriptionsaktivität durch das Promo-

ter/ Enhancer-Konstrukt erzielt werden (Kardassis et al., 1997; Ogami et al., 1990; Talianidis et al., 1995).

Die Expression des ApoAV-Gens wird durch den ApoCIII Enhancer nicht verstärkt (Gao et al., 2005; Li et al., 2008).

Für die Expression des ApoCIII-Gens ist der Enhancer unentbehrlich, wie ein CAT-Assay mit in die Enhancersequenz eingebrachten Mutationen zeigte (Zannis et al., 2001). Wie in Kapitel 1.6.3.1 beschrieben, ist er in der Lage, eine Mutation im Bereich des ApoAI Promoters zu kompensieren, die die Bindung von C/EBP und anderen Faktoren vermindert, und kann die Transkription des ApoAI-Gens weiter aufrecht halten (Kardassis et al., 1997).

In Bezug auf das ApoAIV-Gen steuert der ApoCIII Enhancer die intestinale und hepatische Expression (Le Beyec et al., 1999).

Für diese Eigenschaft nutzt er Hormone Response Elements (HRE) auf dem jeweiligen zu verstärkenden Gen (Kardassis et al., 1997). Alle drei Gene des Clusters besitzen, wie in Kapitel 1.6.2 beschrieben, mindestens ein HRE. Der ApoCIII Enhancer verfügt über zwei HRE in den Elementen G und I₄, drei sogenannte Specificity Protein 1- (SP1-) Bindungsdomänen in den Elementen F, H und I, sowie im Element G eine Bindungsdomäne für ApoAI Regulatory Protein 1 (ARP-1) und ErbA-Related Protein 3 (EAR-3) aus der Gruppe der Kernrezeptoren (Lavrentiadou et al., 1999; Talianidis et al., 1995; Zannis et al., 2003).

Die Bindung mehrerer Specificity Proteins 1 (SP1) an ihre jeweilige Domäne kann die regulatorische Wirkung des Hepatic Nuclear Factors-4 (HNF-4) an den HRE noch steigern (Talianidis et al., 1995). Mutationen in diesen Bindungsdomänen können zu einem kritischen Abfall der Aktivität des ApoCIII Enhancers und des ApoCIII Promoters führen (Lavrentiadou et al., 1999; Ogami et al., 1990; Talianidis et al., 1995). Beispielsweise konnte die Expression eines CAT-Gens in Mäusen durch gezieltes Einbringen von Mutationen in die HRE-Sequenzen des ApoCIII Enhancers auf etwa zwei Prozent im Vergleich zur Expression in Wildtypmäusen reduziert werden (Zannis et al., 2003).

Auch die Expression des ApoAI-Gens wurde durch Mutationen in den HRE bzw. einer SP1-Bindungsdomäne des ApoCIII Enhancers dramatisch verringert (Georgopoulos et al., 2000; Kardassis et al., 1997), wie Abbildung 12 verdeutlicht.

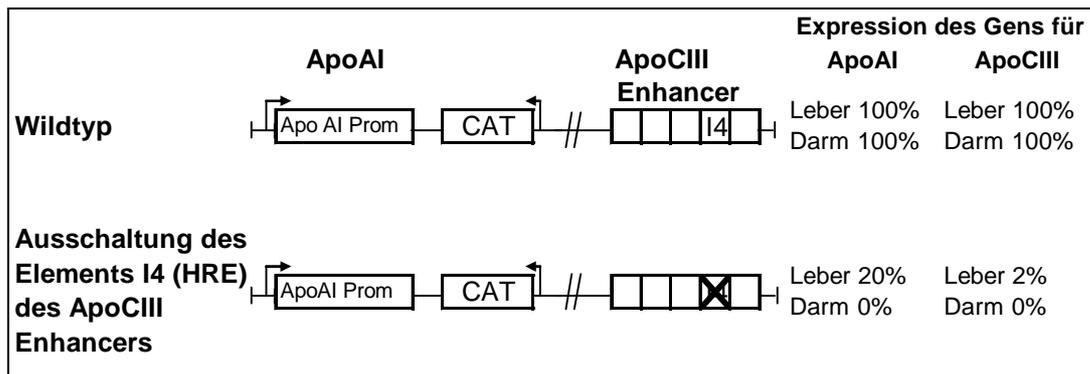


Abbildung 12: Vergleich der Expression des ApoAI- und ApoCIII-Gens in Wildtypmäusen und Mäusen mit eingebrachten Mutanten im ApoCIII Enhancer. Die Expression beider Gene ist stark abhängig von der Funktionsfähigkeit des ApoCIII Enhancers, im Speziellen von der Funktionsfähigkeit der Hormone Response Elements des ApoCIII Enhancers (Zannis et al., 2003).

Die einzelnen Elemente des ApoCIII Enhancers und des proximalen ApoCIII Promoters wirken hierbei synergistisch (Kardassis et al., 2002). Um seine volle Wirkung entfalten zu können, müssen SP1 und HNF-4 simultan an die jeweiligen Bindungsdomänen des ApoCIII Enhancers binden (Kardassis et al., 1997; Kardassis et al., 2002).

Wahrscheinlich bilden dabei die HNF-4- und die SP1-Moleküle einen Komplex, der direkt oder indirekt über die TATA-Box des ApoCIII Enhancers mit einem basalen Transkriptionskomplex interagiert und die Transkription des Zielgens aktiviert (Zannis et al., 2001).

Der ApoCIII Promoter und ApoCIII Enhancer potenzieren zudem ihre Wirksamkeit bei gemeinsamer Aktivität (Kardassis et al., 2002; Zannis et al., 2003).

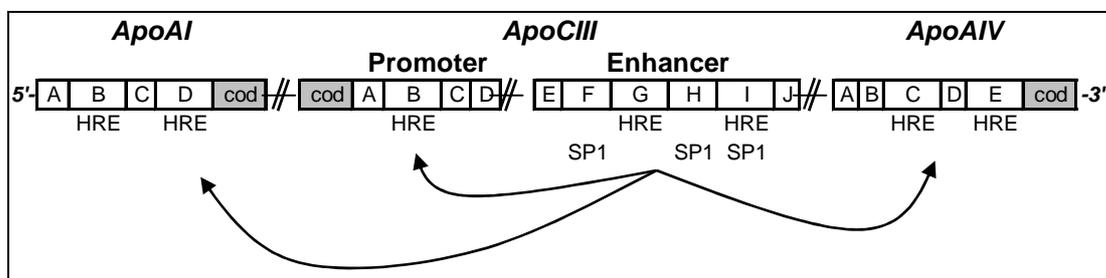


Abbildung 13: Der ApoCIII Enhancer verstärkt die Wirkung aller regulatorischen Abschnitte des ApoAI-CIII-AIV-Clusters. Maßgeblich für diese Wirkung ist die Interaktion der HRE und SP1-Bindungs-Domänen der einzelnen Elemente miteinander. (cod = codierender Genabschnitt, HRE = Hormone Response Element, SP1 = Specificity Protein 1) (Zannis et al., 2003)

In den frühen 1990er Jahren wurden durch eine Untersuchung an Patienten mit Hypertriglyzeridämie fünf Polymorphismen im Bereich des ApoCIII Enhancers entdeckt, die in starkem Kopplungsungleichgewicht miteinander stehen und in dem in dieser Arbeit untersuchten Abschnitt liegen. Aus bestimmten Kombinationen der einzelnen SNPs miteinander, ergeben sich zwei relativ häufige verschiedene Haplotypen neben der Wildtypsequenz. (Dammerman et al., 1993) Tabelle 1-3 zeigt die jeweilige Basenkonfiguration.

Tabelle 1-3: Häufige Haplotypen des ApoCIII Enhancers. Die einzelnen SNPs stehen in starkem Kopplungsungleichgewicht zueinander, so dass sich neben dem Wildtyp zwei häufige Haplotypen ergeben (Dammerman et al., 1993).

Position Haplotyp	Base				
	-641 (rs2542052)	-630 (rs10892037)	-625 (rs11568823)	-482 (rs2854117)	-455 (rs2854116)
1 (= Wildtyp)	C	G	T	C	T
2	A	A	Deletion	T	C
3	A	A	Deletion	C	C

Rs2542052 kommt mit seinem A-Allel mit einer Frequenz von 36,7 bis 77,6%, mit seinem C-Allel mit einer Frequenz von 22,4 bis 63,3% vor. Er wurde durch Arbeiten mit den PARC Rochester und Jackson Panels, der Celera Donors- und KHP Korean-Population sowie mit den Genomen von James D. Watson und J. Craig Venter, das 1000Genome-Projekt und durch Allelfrequenzanalysen validiert. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2542052 vom 07.12.2011), (Dammerman et al., 1993)

Der rs10892037-SNP wurde in den PARC Rochester und Jackson Panels sowie der Celera Donors-Population an etwa 250 Personen nachgewiesen. Seine Allele kommen mit einer Frequenz von 54,2 bis 65,2% (A-Allel) bzw. 34,8 bis 45,8% (G-Allel) vor. (Dammerman et al., 1993), (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=10892037 vom 07.12.2011)

Die Deletion an Position -625 (rs11568823) wurde durch Untersuchungen an der Celera Donors-Population und J. Craig Venters Genom validiert. Bei Probanden mit Hypertriglyzeridämie kommt sie in 43% der Fälle vor, bei Personen

ohne Hypertriglyzeridämie in 42,3% der Fälle. (Dammerman et al., 1993), (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=11568823 vom 07.12.2011)

Die Untersuchung der PARC Jackson und Rochester Panels, der Celera Donors- und der R12 ISDP2-Populationen ergab für die rs2854117-Mutation Allelfrequenzen von 25 bis 50% (A-Allel) bzw. 50 bis 75% (G-Allel).

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2854117 vom 30.04.2013)

Arbeiten an den gleichen Populationen sowie dem Probanden der AK1-Population erbrachten für den rs2854116-SNP eine Frequenz von 44,4 bis 75% für das A-Allel und 25 bis 55,6% für das G-Allel. Auch dieser Polymorphismus wurde zusätzlich per Genotypisierung durch das HapMap-Projekt validiert.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2854116 vom 07.12.2011)

Außer den in Tabelle 1-3 genannten, kennt die Ensembl.org-Datenbank noch eine weitere Mutation, -626T à G à del (rs12721082)

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?g=ENSG00000110245;time=1265277112854.854 vom 07.12.2011). Die Frequenzen ihrer Allele werden mit 55,6 bis 65,2% für die Deletion, 1,4% für das G-Allel und 34,8 bis 43,1% für das T-Allel angegeben. Sie ist validiert durch Frequenz- und Clusteranalysen. Die klinische Bedeutsamkeit ist noch unklar.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=12721082 vom 07.12.2011)

Die zwei SNPs -455T à C und -482C à T liegen in einem sogenannten Insulin Response Element (IRE) (Li et al., 1995), welches wichtig für die Expression des ApoCIII-Gens ist, da die ApoCIII-Transkription unter anderem durch Insulin gesteuert wird (Chen et al., 1994). Für diese Mutationen konnte eine Assoziation mit erhöhten Apolipoprotein CIII- und Triglyzeridplasmaspiegeln (Li et al., 1995; Olivieri et al., 2003), sowie einer Risikoerhöhung in Bezug auf die Entwicklung einer KHK gefunden werden (Olivieri et al., 2002; Olivieri et al., 2003). Der -455 T à C-Polymorphismus geht außerdem mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung des metabolischen Syndroms einher (Pollex et al., 2007). Bei

Patienten mit metabolischem Syndrom und dem -455C-Allel ist das Risiko für eine KHK deutlich erhöht (Olivieri et al., 2003).

Der -482-C à T-SNP ist mit verminderten HDL-Plasmaspiegeln assoziiert (Li et al., 2004). Dieser Zusammenhang der Polymorphismen mit Plasmalipidspiegeln konnte nicht in allen Studien bestätigt werden (Groenendijk et al., 1999; Shoulders et al., 1996).

Die SNPs -482C à T und -625T à del stehen in Kopplungsungleichgewicht mit dem bereits vorbekannten Sst I-Polymorphismus und erhöhen bei paarweisem Vorkommen das Risiko für die Entwicklung einer Hypertriglyzeridämie (Dammerman et al., 1993).

Der Sst I-Polymorphismus beschreibt das sogenannte S2-Allel (3238C à G) in der nicht translatierten 3'-Region des ApoCIII-Gens und geht mit niedrigem HDL-, erhöhtem ApoCIII-Plasmaspiegel sowie geringerer LDL-Partikelgröße und erhöhtem Nüchtern-Insulinplasmaspiegel einher. Eine statistische Assoziation mit dem häufigeren Auftreten einer KHK konnte trotz dieser Veränderungen nicht nachgewiesen werden. (Olivier et al., 2004; Russo et al., 2001)

Die Kombination des -455C- mit dem -625del-Allel führte in einer Studie an 336 zufällig ausgewählten Probanden zu erhöhten LDL- und Cholesterolplasmakonzentrationen (Brown et al., 2003).

Kommen die -641C à A-, -630G à A- oder -625T à del-Mutation allein vor, haben sie keinen Effekt auf die Plasmalipidkonzentration (Surguchov et al., 1996).

Es wird also deutlich, wie wichtig die Funktionalität insbesondere des ApoCIII Enhancers aber auch der anderen genannten regulatorischen Elemente der Apolipoproteingene für die Expression dieser Gene und damit für die Synthese der dazugehörigen Lipoproteine sind. Ferner wird deutlich, dass bereits kleinere Mutationen schwerwiegende Folgen für die Expression haben können.

1.7 Gegenstand parallel durchgeführter Studien

Auch für andere Apolipoproteingene gibt es ähnlich wichtige regulatorische Elemente, so z.B. in Analogie zum ApoAI/CIII/AIV-Cluster einen Cluster für die Gene der Apolipoproteine E, CI, CII und CIV (Allan et al., 1995a; Myklebost und Rogne, 1988; Smit et al., 1988).

Die Expression dieser Gene wird entscheidend durch die Aktivität zweier sogenannter Hepatic Control Regions (HCR1 und HCR2), sowie zweier Multiple Enhancer (ME) bestimmt.

Die HCR sind etwa 600bp lange Abschnitte 15 bzw. 27kb in 3'-Richtung auf dem ApoE Gen (Allan et al., 1995b; Dang et al., 1995). HCR1 scheint eher auf die Expression des ApoE- und ApoCI-Gens zu wirken, während HCR2 eher einen Einfluss auf das ApoCIV- und ApoCII-Gen hat (Allan et al., 1997).

Die ME1 und ME2 befinden sich 3,3 und 15kb downstream des ApoE-Gens. Sie können unabhängig voneinander die ApoE-Genexpression in Makrophagen und Adipozyten beeinflussen. (Grehan et al., 2001; Shih et al., 2000)

Damit haben sie für den ApoE/CI/CIV/CII-Gencluster eine ebenso große Bedeutung, wie die HRE für die Expression des ApoAI/CIII/AIV-Genclusters. Aus diesem Grund wurden sie in einer parallel durchgeführten Arbeit mit der gleichen Methodik untersucht, wie die in der vorliegenden Studie untersuchten Abschnitte.

Außerdem untersuchte die genannte Arbeit das Gen der Lipoproteinlipase auf Mutationen.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Zur Überprüfung der Fragestellung wurde zunächst ein Mutationsscreening an 264 DNA-Proben der Marburger Präventionsallianz durchgeführt. Diese Proben waren bereits im Vorfeld in eine Fall- und eine Kontrollgruppe unterteilt worden, um im Anschluss an das Screening gegebenenfalls eine statistische Analyse in Form einer Fall-Kontroll-Studie durchführen zu können.

Frühere Arbeiten zeigten, dass bei fehlendem VLDL-Rezeptor und hochkalorischer Ernährung, trotz hohen Triglyzeridplasmaspiegels, ein niedriges Körpergewicht bewahrt werden kann. Als Folge des niedrigen Körpergewichts kann auch eine Insulinresistenz gering gehalten werden. In der Kontrollgruppe, welche über den VLDL-Rezeptor verfügte, wurde bei gleicher Ernährung ein deutlich höheres Körpergewicht erzielt, in dessen Folge auch die Insulinresistenz zunahm. (Goudriaan et al., 2001)

Diese Ergebnisse zeigten, dass der VLDL-Rezeptor bei Mäusen maßgeblich an der Entstehung des metabolischen Syndroms beteiligt zu sein scheint.

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse auf die Übertragbarkeit auf Menschen wurde in einer vorhergehenden Arbeit von Soufi et al. eine Fall-Kontroll-Studie durchgeführt, bei der nach Mutationen im Gen des VLDL-Rezeptors gefahndet wurde. In Anlehnung an die oben genannte Arbeit Goudriaans wurde die Fallgruppe aus Personen mit einem Triglyzeridspiegel über 150mg/dl bei einem BMI unter 25kg/m² gebildet, während die Kontrollgruppe aus Personen mit einer Triglyzeridkonzentration von unter 150mg/dl und einem BMI von unter 25kg/m² bestand, wobei unsere Arbeitsgruppe neue, bislang nicht bekannte Defekte des VLDLR nachweisen konnte. (Soufi et al., 2007)

In der vorliegenden Arbeit sollte ebenfalls eine Fall-Kontroll-Studie durchgeführt werden, für die die gleichen Aufnahmekriterien für die Fall- und Kontrollgruppe galten, wie in der oben genannten Arbeit von Soufi et al.

Mit diesen Kriterien wurde eine Studiengröße von 134 Fall- und 130 Kontrollproben erreicht.

2.2 *Statistische Methoden*

Zur Bewertung der Ergebnisse und zur Überprüfung der aufgestellten Hypothesen wurden zunächst die erfassten Merkmale der untersuchten Gruppen deskriptiv gegenübergestellt und auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Hierzu wurden die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen bzw. die relativen Häufigkeiten berechnet. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde bei kontinuierlichen Variablen durch Ermittlung von Konfidenzintervallen mittels eines zweiseitigen T-Tests überprüft. Bei kategorialen Variablen wurde die statistische Signifikanz der Unterschiede durch Ermittlung des p-Werts mittels Fishers exaktem Test überprüft.

Im Rahmen der Fall-Kontroll-Studie wurde zur Bewertung des Unterschieds in der Auftretenswahrscheinlichkeit von Mutationen zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe mithilfe einer zweidimensionalen Kontingenztafel die Odds Ratio berechnet.

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse der Fall-Kontroll-Studie wurde im Rahmen eines zweiseitigen Tests mit Fishers exaktem Test ermittelt.

Das Niveau des α -Fehlers war vor Beginn der Studie auf $\alpha = 5\%$ festgelegt worden. Alle Berechnungen wurden mit der Software Microsoft Excel durchgeführt.

2.3 *Prinzip des Vorgehens*

Zunächst wurde für diese Arbeit DNA aus EDTA-Blut von koronarangiographierten Patienten der Marburger Präventionsallianz isoliert.

Aus der DNA wurden nun im Rahmen einer Multiplex- bzw. Nested Polymerasekettenreaktion (PCR) erste Fragmente amplifiziert, die jeweils ein bis zwei der zu untersuchenden Genabschnitte umfassten. In einem zweiten Schritt wurden die jeweiligen regulatorischen Elemente aus diesen ersten PCR-Produkten mithilfe einer weiteren PCR amplifiziert.

Zur Überprüfung der Ergebnisse der PCRs wurde jeweils eine Elektrophorese durchgeführt, bei der die Größe der PCR-Produkte mit einem vordefinierten PCR-Marker verglichen wurde. Nach erfolgreicher Amplifizierung wurden die einzelnen DNA-Proben durch eine Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) separiert.

Unterschieden sich hier einzelne Amplifikate von den anderen, wurde in einem Sequenzierungsverfahren die genaue DNA-Sequenz ermittelt und mit der Wildtypsequenz verglichen.

2.4 Verwendete Geräte, Chemikalien, Software

Die Tabellen 2-1 bis 2-3 zeigen Aufstellungen der verwendeten Chemikalien, Geräte, Software und Internetressourcen.

Tabelle 2-1: Übersicht über verwendete Chemikalien und Kits in alphabetischer Reihenfolge

Chemikalie	Hersteller, Sitz
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1))	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose (Certified Molecular Biology Agarose)	Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Ammoniumperoxidsulfat	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Betaine 5M	Fa. ICN Biomedicals; MP Biomedicals Europe, Illkirch, Frankreich
Bromphenolblau	Fa. Riedel-de Haën®, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO), MW=78,13g/mol	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat Titrierkomplex, MW=372,24	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure 100%, wasserfrei	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Seite 57

Chemikalie	Hersteller, Sitz
Ethanol absolute	Fa. Riedel-de Haën®, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland
Ethanol vergällt (Sorte: 642)	Fa. Stockmeier Chemie Dillenburg, Dillenburg, Deutschland
Ethidiumbromid	Fa. Sigma-Aldrich Chemie Holding GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Formamid deionisiert	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol (etwa 87%)	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerol (UltraPure™)	Fa. Invitrogen, Carlsbad, California, USA
Guanidiniumthiocyanat	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff, ≥99,5%, p.a.	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol p.A.)	Fa. Acros Organics, New Jersey, USA
Lithium-Chlorid	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
100 mM dNTP Set mit dATP, dCTP, dGTP und dTTP	Fa. Invitrogen, Carlsbad, California, USA
PCR-Marker (BenchTop PCR Markers)	Fa. Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Seite 58

Chemikalie	Hersteller, Sitz
Phenol (Roti®-Phenol: äquibriertes mit TE-Puffer überschichtetes Phenol (pH 8,0))	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Polymerase (Platinum® Taq DNA Polymerase + 10x PCR Puffer, 50mM MgCl ₂)	Fa. Invitrogen, Carlsbad, California, USA
Qiaex II Gel Extraction Kit (150)	Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland
Salzsäure, 37%, rauchend, LabGrade ACS	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS Dodecylsulfat-Natrium-Salz	Fa. SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bayer silicone	Fa. Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Temed	Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Tris Pufferan® ≥99,9 %, p.a. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid, Tris-HCl	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Fa. SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wasser, steril (Wasser Chromanorm für die HPLC)	Fa. VWR International GmbH, Wien Österreich

Tabelle 2-2: Übersicht über die verwendeten Geräte in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Fabrikat	Hersteller
Caps für PCR-Plates		Fa. Biozym Scientific GmbH, Hessesisch Oldendorf, Deutschland
DGGE-Kammer und Zubehör	Protean® II xi 2-D cell	Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
Einmalpipette	Pasteurpipette	Fa. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Elektrophoresekammer	Mini-Sub Cell GT System, with 7 x 10 cm tray	Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
Faltenfilter		ehemals Fa. Schleicher & Schüll, jetzt Fa. Whatman, Maidstone, England
Filterpapier	Filter Papper	Fa. Munktell Filter AB, Falun, Schweden
Kanülen	BD Microlance 3	Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Magnetrührer	RH basic KT/C IKAMAG® safety control	Fa. IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph MR 2002	Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Seite 60

Gerät	Fabrikat	Hersteller
Mikrowelle		Fa. Sharp Electronics (Europe) GmbH, Hamburg, Deutschland
Parafilm	PARAFILM® M Verschlussfolie	Fa. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
PCR-plates		Fa. Biozym Scientific GmbH, Hessesisch Oldendorf, Deutschland
pH-Meter	pH-Meter 761 Calimatic	Fa. Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Pumpe zur DGGE-Gel-Herstellung	Minipuls3 Peristaltic Pump	Fa. Gilson, Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Pumpe für DGGE-System-Puffer	NDP Pump Range 35/3	Fa. Totton Pumps, Southampton, England
Pumpe für DGGE-Tray-Puffer	Variable-Speed Pump -- Medium Flow 0.4 to 85.0 ml/minute	Fa. Control Company, Friendswood, Texas, USA
0,5ml Reaktionsgefäß	0,5 ml PCR Gefäße, dünnwandig mit angebundenem Deckel, farblos	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
1,5ml Reaktionsgefäß	Safe-Lock Reaktionsgefäß 1,5ml	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Seite 61

Gerät	Fabrikat	Hersteller
2,0ml Reaktionsgefäß	Safe-Lock Reaktionsgefäß 2,0ml	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rüttler	Reax2000	Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Sandwich clamps	PROTEAN II Sandwich Clamps, 16 cm set	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
Schüttler	Köttermann 4010	Fa. Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Spritze zum Auftragen der DGGE-Proben	Model 1810 100µl Pst2	Fa. Mplus GmbH, Bremen, Deutschland
Spritzenfilter	Minisart® 0,2µm Syringe Filter Holders	Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland
Stromaggregat für die DGGE	Power Pac 300	Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
Stromaggregat für die Agarosegelelektrophorese	Power Pac 3000	Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
Thermocycler	MJ Research PTC-200	Fa. Global Medical Instrumentation, Inc., Minnesota, USA

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Seite 62

Gerät	Fabrikat	Hersteller
Thermometer	ama-digit ad 14th	Fa. Amarell GmbH & Co. KG, Kreuzwertheim, Deutschland
Thermostat	2219 Multitempl Thermostatic Circu- lator	Fa. LKB Bromma, existiert nicht mehr
Transilluminator	Transilluminator 4000	Fa. Stratagene, La Jolla, California, USA
Waage	SBC 51	Fa. Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf 3200	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutsch- land
Zentrifuge	Eppendorf Centrifu- ge 5414S	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutsch- land

Tabelle 2-3: Übersicht über die verwendete Software und Internetressourcen

Programm/ Datenbank	Internetadresse	Hersteller
Bio-CaptMW		Fa. Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
BioEdit		Fa. Ibis Biosciences, Carlsbad, Ca- lifornia, USA
WinMelt		Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Seite 63

Programm/ Datenbank	Internetadresse	Hersteller
Datenbank Bioinformatic Harvester	http://harvester.fzk.de/harvester/	Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland
Datenbank Ensembl	http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html	European Bioinformatics Institute und Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, United Kingdom
Datenbank NCBI dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Be- thesda MD, 20894 USA

2.5 Die Marburger Präventionsallianz

Die DNA für die Untersuchungen stammte von 264 ausgewählten Patienten der „Marburger Präventionsallianz“. Hierbei handelt es sich um eine Datenbank zur Erfassung von Risikofaktoren einer koronaren Herzkrankheit mit den Daten von circa 5000 Patienten, bei denen am Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg, eine Herzkatheteruntersuchung durchgeführt worden ist. Die erfassten Daten beinhalten Angaben wie Alter und Geschlecht der Patienten, gesamt-Cholesterin-, HDL-, LDL-, Triglyzeridplasmaspiegel, BMI und eine Unterscheidung zwischen Patienten mit und ohne KHK bzw. Myokardinfarkt, sowie Rauchern und Nichtrauchern (Schaefer et al., 2000).

Ein Votum zur Durchführung von Studien mit diesem Kollektiv, welches auf der Basis der Helsinki-Deklaration von 1975 in der revidierten Form von 1996 beruht, wurde durch die Ethikkommission der Philipps-Universität-Marburg (Aktenzeichen Studie: 10/03) erteilt. Alle in dieses Register eingeschlossenen Patienten haben der Teilnahme zugestimmt.

2.6 Isolierung von DNA aus Vollblut

Für die DNA-Isolierung wurden 200µl EDTA-Vollblut in ein 2,0ml Reaktionsgefäß übertragen. Diese wurden unter einem Abzug mit 600µl DNA-Isolations-

lösung (siehe Tabelle 2-4) versetzt und circa zehn Sekunden lang auf einem Rüttler vermischt.

Anschließend erfolgte eine Zentrifugierung mit 13000rpm über zwei Minuten. Der die DNA enthaltende wässrige Überstand wurde abpipettiert und in ein neues 2ml-Reaktionsgefäß gegeben. Der im ersten Reaktionsgefäß enthaltene Unterstand wurde verworfen.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 750µl Isopropanol nach vorsichtigem Vermischen durch Umkipfung des Reaktionsgefäßes.

Die entstandene Emulsion wurde bei 13000rpm für zwei Minuten zentrifugiert und der nun erzeugte Überstand vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe unter Belassung des abzentrifugierten DNA-Pellets entfernt. Zur Reinigung wurde das Pellet mit 1250µl 70%-igem Ethanol (siehe unten) versetzt und kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder unter Belassung des Pellets mit einer Wasserstrahlpumpe entfernt und das so isolierte DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 350µl sterilem Aqua dest. aufgenommen. Es ergab sich eine DNA-Konzentration von 2ng/µl.

Nach Durchmischung auf dem Rüttler wurde die DNA bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 2-4: Zusammensetzung der DNA-Isolutionslösung

Reagenz	Menge
DNA-Isolutions-Stammlösung (s. Tabelle 2-5)	300ml
Phenol (Roti®-Phenol)	100ml

Tabelle 2-5: Zusammensetzung der DNA-Isolutions-Stammlösung

Reagenz	Menge
3M Guanidiniumisothiocyanat	141,20g
2M Lithium-Chlorid	33,60g
3M Harnstoff, ≥99,5%, p.a.	72,00g
30mM Tris Pufferan® ≥99,9 %, p.a.	1,44g
0,5M EDTA-Lösung, pH 8,0	2,232g
SDS Dodecylsulfat-Natriumsalz	2,00g
Triton X-100	800µl
Wasser, steril	ad 200ml

Zur Herstellung der DNA-Isolationsstammlösung wurden die Zutaten unter dem Abzug zusammengegeben und die Lösung mit einem Magnetrührer über Nacht durchmischt, anschließend mit einem Papierfilter filtriert und danach bei 25°C Raumtemperatur in einer durchsichtigen Glasflasche gelagert.

Die Herstellung des 70%-Ethanol erfolgte durch Zugabe von 210ml Ethanol absolute zu 90ml Aqua dest.

Zur Herstellung der 0,5M EDTA-Lösung (pH 8,0) wurde EDTA-Titrierkomplex auf einem Magnetrührer in Wasser gelöst und anschließend mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 8,0 titriert. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter gemessen. Tabelle 2-6 zeigt das genaue Rezept zur Herstellung der EDTA-Lösung.

Tabelle 2-6: Rezept zur Herstellung der 0,5M EDTA-Lösung mit pH 8,0

Chemikalie	Menge
EDTA-Titrierkomplex (MW = 372,24)	93,06g
Aqua dest.	ad 500ml
Salzsäure, 37%, rauchend, LabGrade ACS	bis pH 8,0

2.7 Amplifizierung der Proben mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Vervielfältigung der zu untersuchenden regulatorischen Elemente erfolgte durch die Polymerasekettenreaktion (PCR). Bei diesem Verfahren wird mithilfe einer hitzestabilen Polymerase (Taq Polymerase) und zweier Oligonukleotid-Primer ein durch die Primer bestimmter DNA-Abschnitt exponentiell vermehrt (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988).

Die verwendeten Primer wurden auf Basis der in der Gendatenbank Ensembl (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html) erhältlichen Gensequenzen für die zu untersuchenden Fragmente entworfen und bei der Firma Invitrogen (Carlsbad, California, USA) erworben.

Zur Optimierung der Sensitivität der nachfolgenden DGGE wurden die Primer für die zweite PCR mit einer GC-reichen Sequenz, einer sogenannten „gc-clamp“, versehen. Tabelle 2-7 zeigt die Sequenzen der verwendeten Primer.

Tabelle 2-7: Übersicht über die entworfenen Primersequenzen

Primer	upstream 3'-5'-Primer	downstream 5'-3'-Primer
<i>Multiplex- bzw. nested PCR-Primer</i>		
ApoA1 Promoter	5'-agtctctaagcagccagctc-3'	5'-tggaatgctggtggtggggga-3'
ApoA4 Promoter	5'-cggccttcaggaacatcctg-3'	5'-ctatgctgtctgcagtcctg-3'
ApoC3 Enhancer/ Promoter	5'-gagggcattacctggagcag ctg-3'	5'-tcccacagccagggggca gtg-3'
<i>Primer für DGGE-target-Sequenzen (GC-Clamps in eckigen Klammern)</i>		
ApoA1 Promoter	5'-[gggggggggcccgcgggcggg ggcggcgggacgggcgcggggc gcggcgggcg]ctgttgctgctcact ggtcct-3'	5'-acacaatggacaatggcaa ctgcc-3'
ApoA4 Promoter	5'-[gggggggggcccgcgggcggg ggcggcgggacgggcgcggggc gcggcgggcg]ctgacagagaggt cctcaggag-3'	5'-tagtggcggatgtggagact gg-3'
ApoC3 Enhancer	5'-cacagaagaccaggcatcagt gg-3'	5'-[cgcccgcgcgccccgcg cccgtcccgcgccccgcgcg gcccccccc]tgaacgaga gaatcagtcctgg-3'
ApoC3 Promoter	5'-[gggggggggcccgcgggcggg ggcggcgggacgggcgcggggc gcggcgggcg]gacaggcaggagg gttctgacctgt-3'	5'-gaaggaatgagggtccc caggcc-3'

Zur Herstellung der Primer-Stocklösung wurden die crude Oligonukleotide mit sterilem Wasser auf eine Primerkonzentration von 100pmol/µl verdünnt und bei

-20°C aufbewahrt. Als Primerstock für die PCR wurden jeweils 10µl des upstream und downstream Primers zusammengegeben und mit 680µl sterilem Wasser versetzt. Diese Mischung diente als sogenannte working solution. Sie enthielt jeweils 5pmol aller korrespondierenden Primerpaare für die zu amplifizierende Targetsequenz. Alle Angaben über die verwendeten Primermengen beziehen sich auf diese Lösung.

Die Oligonukleotide wurden mit Taq Polymerase, 10xPCR Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 50mM MgCl₂, deoxy-Nukleosidtriphosphaten, Aqua dest. und Kombinationen von Dimethylsulfoxid (DMSO), Betaine und Glycerol versetzt.

Zur Justierung der Versuchsbedingungen wurden zunächst Test-PCRs durchgeführt, um die für ein optimales Versuchsergebnis nötigen Bedingungen zu identifizieren. Näheres hierzu erläutert Kapitel 3.1 auf Seite 80.

Die ersten Fragmente des ApoAI Promoters, des ApoAIV Promoters, sowie des ApoCIII Enhancers wurden durch eine Multiplex-PCR erzeugt, welche, wie alle anderen PCRs, 5µl Primer je PCR enthielt. Hierbei wurden jedoch 5µl Primer-Mix verwendet, der zu gleichen Teilen das jeweilige Primerpaar 1 für die genannten Fragmente enthielt.

Für den ApoCIII Promoter wurde die PCR mit 5µl ApoCIII Promoter-Primerpaar 1 durchgeführt.

Näheres zu den Oligonukleotiden und Primerpaaren siehe auch Kapitel 3.3.1.

Zum Ansatz für die erste PCR wurden 5µl der isolierten DNA (2ng/µl) als Template verwendet. Nach Abschluss der ersten Multiplex-PCR-Amplifikation wurde der gesamte Reaktionsansatz mit 150µl Aqua dest. versetzt, gemischt und bei -20°C aufbewahrt. Diese Lösung diente als Stock-Template für die nested-PCR-Amplifikation zur Generierung der individuellen PCR-Fragmente, die mittels DGGE-Analyse im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

Für die nested PCR-Reaktionen, die der Synthese der zu untersuchenden Zielsequenzen und der Einführung der GC-Clamps in diese Sequenzen diente, wurden jeweils 5µl des Stock-Templates eingesetzt. Diese wurden mit Taq Po-

lymerase, 10xPCR Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 50mM MgCl₂, deoxy-Nukleosidtriphosphaten, sterilem Aqua dest. und 5µl des Primerpaars 2 versetzt. Durch die Verwendung der mit der GC-reichen Sequenz versehenen Primer (Primerpaar 2) wurde diese GC-clamp an die amplifizierten Sequenzen angehängt.

Die PCR- Reaktionen erfolgten in einem Thermocycler. Zunächst erfolgte eine initiale Denaturierung über fünf Minuten bei 94°C, gefolgt von 45 Zyklen mit je 20 Sekunden Denaturierung bei 94°C (Denaturierungsphase), 30 Sekunden bei 56°C (Annealing-Phase oder Anlagerungsphase) und drei Minuten bei 72°C (Polymerisationsphase). Das Programm schloss mit einer Abkühlungsphase von fünf Minuten bei einer Temperatur von 20°C. Dieser Ablauf war für alle PCRs gleich.

Nach Ende der zweiten PCR wurden in jedes Tube 25µl Ladepuffer für die folgenden Elektrophoresen gegeben. Tabelle 2-8 zeigt das Rezept zur Herstellung des Ladepuffers.

Tabelle 2-8: Rezept zur Herstellung des Ladepuffers

Chemikalie	Menge
Bromphenolblau	0,5ml
Glycerol, etwa 87%	8,0ml
Aqua dest.	2,5ml

2.8 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung der PCR-Produkte

Zur Überprüfung der PCRs wurde nach jedem Reaktionslauf eine Gelelektrophorese in 2%-Agarosegel mit einem vordefinierten PCR-Marker zum Vergleich mit stichprobenartig ausgewählten PCR-Proben durchgeführt.

Für die Herstellung des Agarosegels wurden 0,6g Agarose in einen Messkolben gegeben und mit Aqua dest. auf 30ml aufgefüllt. Diese Mischung wurde in einer Mikrowelle mehrfach aufgeköcht.

Nach Abkühlen auf Handwärme erfolgten die Zugabe von 2µl Ethidiumbromid (10mg Ethidiumbromid/ 1ml Aqua dest.), das Vermischen der Suspension, das

Umfüllen in die Gelform (Tray), das Einsetzen der Kämme und das Abkühlen bis zur vollständigen Gelierung über circa 30 Minuten.

Die Gelform wurde in die zum Mini-Sub Cell GT System gehörige Elektrophoresekammer eingehängt, welche mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt wurde. Die Tabellen 2-9 und 2-10 zeigen die Rezepte zur Herstellung des TAE-Puffers.

Tabelle 2-9: Rezept zur Herstellung des 50x TAE-Puffers

Chemikalie	Menge
TrisHCl (2M) (g)	242
100% Essigsäure (ml)	57,1
0,5M EDTA, pH 8,0 (ml)	100
Aqua dest. (ml)	ad 1000

Tabelle 2-10: Rezept zur Herstellung des 1x TAE-Puffers

Chemikalie	Menge
50x TAE-Puffer (ml)	20
Aqua dest. (ml)	ad 1000

Um die generelle Funktionsfähigkeit der entworfenen PCR-Bedingungen zu überprüfen, wurden dann acht Proben stichprobenartig ausgewählt und jeweils 8µl der PCR-Produkt/ Ladepuffer-Mischung auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden auf jedes Gel 4µl DNA-Längenstandard (PCR-Marker) mit 4µl Ladepuffer aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 70V über 30 Minuten.

Die Elektrophoresen wurden unter UV-Licht mithilfe eines Transilluminators und der BioCaptMW–Software ausgewertet und als JPEG-Datei per Computer dokumentiert.

Die durchgeführten Reaktionen galten als erfolgreich, wenn Banden in der entsprechenden Größe des gesuchten Fragments im Vergleich mit den Banden des vordefinierten PCR-Markers gefunden wurden.

2.9 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) ist ein Verfahren zur Detektion von Mutationen in DNA-Molekülen. Für diese Arbeit fiel die Wahl auf dieses Verfahren, da mit einer Sensitivität von etwa 95% (Myers et al., 1985a; Sheffield et al., 1989) die höchstmögliche Trefferquote bei der Suche nach Mutationen erzielt werden kann.

Alternative Verfahren, wie zum Beispiel die Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), Heteroduplex-Analyse oder Chemical Mismatch Cleavage (CMC) sind aufwendiger oder weniger sensitiv (Cai und Tuitou, 1993; Cotton et al., 1988; Hayashi, 1992; Highsmith et al., 1999; Kozlowski und Krzyzosiak, 2001; Palais et al., 2005; Sheffield et al., 1993; Winter et al., 1985; Ziemssen et al., 2001).

Bei einer DGGE wird eine Elektrophorese mit DNA-Doppelsträngen in einem Polyacrylamidgel mit einem linear ansteigenden Denaturationskonzentrationsgradienten durchgeführt.

Die Konzentration an Denaturans steht dabei in einem linearen Zusammenhang mit einer bestimmten Temperatur T_m , bei der die dem DNA-Fragment eigenen Schmelzdomänen aufschmelzen (Fischer und Lerman, 1979) und dadurch zu einem abrupten Abstoppen der Wanderung („mobility shift“) des DNA-Strangs im Elektrophoresegel führen. Schmelzdomänen sind dabei Abschnitte der DNA, die bei derselben Temperatur T_m aufschmelzen.

Domänen mit einem niedrigeren Schmelzpunkt werden dabei vor solchen mit höherem Schmelzpunkt aus der Doppelstrangkonfiguration geführt (Sheffield et al., 1989). Dies hat wiederum zur Folge, dass bei Vorhandensein mehrerer Schmelzdomänen nur diejenige mit dem jeweils niedrigsten Schmelzpunkt ein Abstoppen des DNA-Strangs bewirkt. Durch die Konfigurationsänderung in dieser Domäne erreichen diejenigen mit höherem Schmelzpunkt keine ausreichende Denaturationskonzentration mehr, um aufzuschmelzen. Daraus folgt, dass nur solche Mutationen gefunden werden können, die außerhalb der Schmelzdomäne mit dem höchsten Schmelzpunkt liegen (Gille et al., 1998; Myers et al., 1985b; Myers et al., 1985a).

Diese Schmelztemperatur T_m liegt erfahrungsgemäß bei etwa 68 bis 84°C.

Im Experiment kann diese Temperatur erreicht werden, in dem der Elektrophoresepuffer auf etwa 60°C erwärmt wird. Die fehlende Temperaturdifferenz wird durch das verwendete Denaturans erreicht. Dabei entsprechen 3% Denaturanskonzentration etwa 1°C. Die Temperatur nimmt durch den Denaturansgradienten im Gel somit von oben nach unten zu.

Das Abstoppen der Moleküle ist allerdings in erster Linie von der Basensequenz des untersuchten Moleküls und erst nachrangig von der Temperatur T_m abhängig (Fischer und Lerman, 1979; Lerman et al., 1984).

Im Vergleich zu DNA-Fragmenten ohne Mutation, die auf dem gleichen Gel aufgetragen werden, stoppen mutierte DNA-Stränge an einer anderen Position innerhalb des Gels, da Variationen der Basensequenz die Interaktion mit dem verwendeten Denaturans verändern. Dadurch schmelzen Abschnitte mit Polymorphismus bei einer anderen Denaturanskonzentration und damit an einer anderen Position im Gradientengel auf. (Sheffield et al., 1989) So ist es möglich, mutierte von nicht mutierten DNA-Molekülen zu unterscheiden.

Derjenige Abschnitt, welcher einen sogenannten mismatch enthält, eine falsche Basenpaarung, also zum Beispiel auch eine zu detektierende Mutation, wird Heteroduplex genannt. Heteroduplexe sind also komplementäre Einzelstränge, die eine leicht unterschiedliche Basenabfolge aufweisen. Dies kann, wie oben beschrieben, dazu führen, dass die Konformation des Doppelstrangs verändert und der Strang dadurch destabilisiert wird. Dies führt wiederum dazu, dass der Schmelzpunkt der Heteroduplexbande bei einer geringeren Temperatur liegt. Heteroduplexe wandern in der DGGE stets langsamer als die korrespondierenden Homoduplexe (Nagamine et al., 1989a; Sheffield et al., 1989).

Mit der DGGE kann bereits der Austausch nur einer Base in der DNA-Sequenz (Collins und Myers, 1987) sowie die Methylierung eines einzelnen Basenpaares (Myers et al., 1985a) nachgewiesen werden.

2.9.1 Tray-Aufbau

Für die Elektrophorese wurde das System PROTEAN II xi 2-D Cell der Firma Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA, verwendet.

Zur Vorbereitung des Elektrophorese-Aufbaus wurden die Spacer und Glasplatten zunächst mit handelsüblichem Spülmittel und Leitungswasser sowie mit

Ethanol gereinigt. Die Spacer wurden mit Aqua dest. angefeuchtet und zwischen die Glasplatten gelegt. Dieser Aufbau wurde mit sogenannten Sandwich-Clamps stabilisiert und in der zu dem System gehörenden Halterung mit Aqua dest. auf Dichtigkeit geprüft.

Nach bestandener Dichtigkeitsprüfung erfolgte das Trocknen des Aufbaus mithilfe von Filterpapieren.

2.9.2 Herstellung der Gellösungen

Als Denaturans wurde für diese Arbeit ein Harnstoff-Formamid-Gradient verwendet.

Für die Herstellung eines Gels mit einem Denaturansgradienten wurden zwei verschiedene Lösungen mit je einmal der höchsten und einmal der niedrigsten zu erreichenden Denaturanskonzentration hergestellt, für ein Gel mit einem Denaturansgradienten von beispielsweise 0% bis 80% also eine Lösung mit 0% und eine mit 80%iger Denaturanskonzentration.

Hierfür wurde Harnstoff grammgenau abgewogen und mit Formamid, Acrylamid und 50xTAE-Puffer nach dem jeweiligen Rezept zusammengegeben, auf die gewünschte Menge mit sterilem Aqua dest. aufgefüllt und auf einem Magnetrührer verrührt, bis sich eine klare Flüssigkeit gebildet hatte.

Bei 0%iger Lösung wurde der Ansatz ohne Harnstoff und Formamid hergestellt. Danach erfolgte die Filtrierung der Lösung mithilfe einer 50ml-Spritze mit aufgesetztem 0,2µm-Spritzenfilter.

Nach abgeschlossener Filtrierung wurden die Lösungen mit Parafilm abgedeckt und bei Raumtemperatur in durchsichtigen Glasbehältern bis zu maximal vier Wochen gelagert.

Die Rezepte zur Herstellung der verwendeten Gellösungen zeigen die Tabellen 2-11 bis 2-14. Alle getesteten Rezepte für die Gellösungen sind in Tabelle 8-3 im Anhang aufgeführt.

Die Zusammensetzung des 50x TAE-Puffers ist in Tabelle 2-9 in Kapitel 2.8 dargestellt.

Tabelle 2-11: Rezept zur Herstellung einer Gellösung mit 60% Denaturans und 6% Acrylamid

Chemikalie	Menge
Harnstoff, ≥99,5%, p.a. (g)	25,2
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)) (ml)	15
50x TAE-Puffer (ml)	2
Formamid deionisiert (ml)	24
Glycerol (UltraPure™) (ml)	10
Aqua dest. (ml)	ad 100

Tabelle 2-12: Rezept zur Herstellung einer Gellösung mit 70% Denaturans und 10% Acrylamid

Chemikalie	Menge
Harnstoff, ≥99,5%, p.a. (g)	29,4
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)) (ml)	25
50x TAE-Puffer (ml)	2
Formamid deionisiert (ml)	28
Glycerol (UltraPure™) (ml)	10
Aqua dest. (ml)	ad 100

Tabelle 2-13: Rezept zur Herstellung einer Gellösung mit 0% Denaturans und 6% Acrylamid

Chemikalie	Menge
Harnstoff, ≥99,5%, p.a. (g)	--
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)) (ml)	15
50x TAE-Puffer (ml)	2
Formamid deionisiert (ml)	--
Glycerol (UltraPure™) (ml)	10
Aqua dest. (ml)	ad 100

Tabelle 2-14: Rezept zur Herstellung einer Gellösung mit 80% Denaturans und 10% Acrylamid

Chemikalie	Menge
Harnstoff, $\geq 99,5\%$, p.a. (g)	33,6
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)) (ml)	25
50x TAE-Puffer (ml)	2
Formamid deionisiert (ml)	32
Glycerol (UltraPure™) (ml)	10
Aqua dest. (ml)	ad 100

2.9.3 Herstellung der Gradientengele

Die Vorrichtung zur Herstellung der DGGE-Gele war eine Eigenkonstruktion und bestand aus einem Gradientenmischer auf einem Magnetrührer, aus dem die vermischten Gellösungen durch eine peristaltische Pumpe über je eine Kanüle in die Gel-Trays geleitet wurden.

Zunächst wurde mit einer Einmalpipette der Verbindungsschlauch zwischen den Gefäßen des Gradientenmischers mit der Gellösung mit höherer Denaturanskonzentration befüllt und mit einer Klemme mittig verschlossen.

Es wurden dann jeweils 30ml der beiden Gellösungen in je ein neues Behältnis abgefüllt und zu jeder Lösung 200 μ l 10%ige Ammoniumperoxidsulfat-(APS-) Lösung (Rezept zur Herstellung siehe Tabelle 2-15) und 20 μ l Temed hinzugegeben. Die Gemische wurden geschüttelt und die Gellösung mit niedrigerer Denaturanskonzentration in das hintere Gefäß, die höher konzentrierte Lösung in das vordere Gefäß gefüllt.

Nach Anschalten des Magnetrührers und der Pumpe wurde so der höher konzentrierten Gellösung niedrig konzentrierte Lösung beigemischt, so dass im Tray ein Gradient mit von unten nach oben abnehmender Konzentration entstand. Die Gele wurden bis etwa 1 bis 1,5cm unter den Rand gegossen, die Kanülen entfernt und das Gefäß-Schlauch-System mit Aqua dest. gut durchspült.

Bis zur vollständigen Aushärtung musste etwa eine halbe Stunde gewartet werden. Der wässrige Überstand wurde dann abgegossen und der Rest mit Filterpapier abgesaugt.

In den verbleibenden Freiraum wurde ein zwölfprozentiges Stackinggel gegossen, in dem die Taschen für das spätere Auftragen der Proben durch Einsetzen eines Kamms gebildet wurden.

Dafür wurden für 2 Gele 5ml Stacking-Lösung (Rezept siehe Tabelle 2-16) mit 50µl 10%-APS-Lösung und 5µl Temed versetzt und geschüttelt.

Mit dieser Lösung wurden die Trays mit den ausgehärteten Gelen mithilfe einer Einmalpipette abschließend befüllt und die zuvor mit Ethanol gereinigten Käme eingesetzt. Nach etwa 20 bis 30 Minuten war die Polymerisation abgeschlossen.

Die Gele konnten mit handelsüblicher Haushaltsfolie abgedeckt bis zu einer Woche im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

Tabelle 2-15: Rezept zur Herstellung der 10%-Ammoniumperoxidsulfat-Lösung

Chemikalie	Menge
Ammoniumperoxidsulfat (g)	1
Aqua dest. (ml)	ad 10

Tabelle 2-16: Rezept zur Herstellung der zwölfprozentigen Stacking-Lösung

Chemikalie	Menge
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)) (ml)	15
50x TAE-Puffer (ml)	1
Glycerol (UltraPure™) (ml)	5
Aqua dest. (ml)	ad 50

2.9.4 Durchführung der DGGE

Die Elektrophoresekammer des o.g. DGGE-Systems PROTEAN II xi wurde mit einer Pumpe (Pumpe 1, s. Abbildung 14, Seite 77) und einer Glasspirale verbunden, so dass ein geschlossener Kreislauf geschaffen wurde.

Die Kammer wurde nun mit 5L 1x TAE-Puffer (s. Tab. 2-10) befüllt. Ein mit Aqua dest. befüllter Thermostat erhitzte den durch die Glasspirale laufenden Puffer auf 50°C.

Die Puffertemperatur wurde mit einem Thermometer kontrolliert und etwa eine halbe Stunde nach Einschalten des Thermostats erreicht.

Während dieser Zeit wurden die Geltrays in die dazugehörige Halterung eingespannt und die Konstruktion mit Aqua dest. auf Dichtigkeit geprüft. Notfalls wurden Leckagen mit Siliconpaste verschlossen. Die Konstruktion wurde mit 1x TAE-Puffer befüllt, bis die Elektroden mit Flüssigkeit benetzt waren. Nach Entfernung aller Luftblasen wurden die zu untersuchenden Proben mithilfe einer 100µl-Spritze aufgetragen. Das aufgebrauchte Volumen ist Tabelle 3-3 auf Seite 96 zu entnehmen.

Nach Einhängen der Trayhalterung in die Elektrophoresekammer wurde diese mit dem Deckel verschlossen und ein weiteres Schlauchsystem angebracht. Hier führte ein Schlauch aus dem Puffer in der Kammer durch eine Pumpe (Pumpe 2, s. Abbildung 14) in die Trayhalterung. Nachdem durch das Einschalten dieser Pumpe das Trockenlaufen der Elektroden verhindert wurde, konnte das angeschlossene Stromaggregat konfiguriert und eingeschaltet werden. Abbildung 14 zeigt eine Fotografie des gesamten Aufbaus zur Durchführung der DGGE.

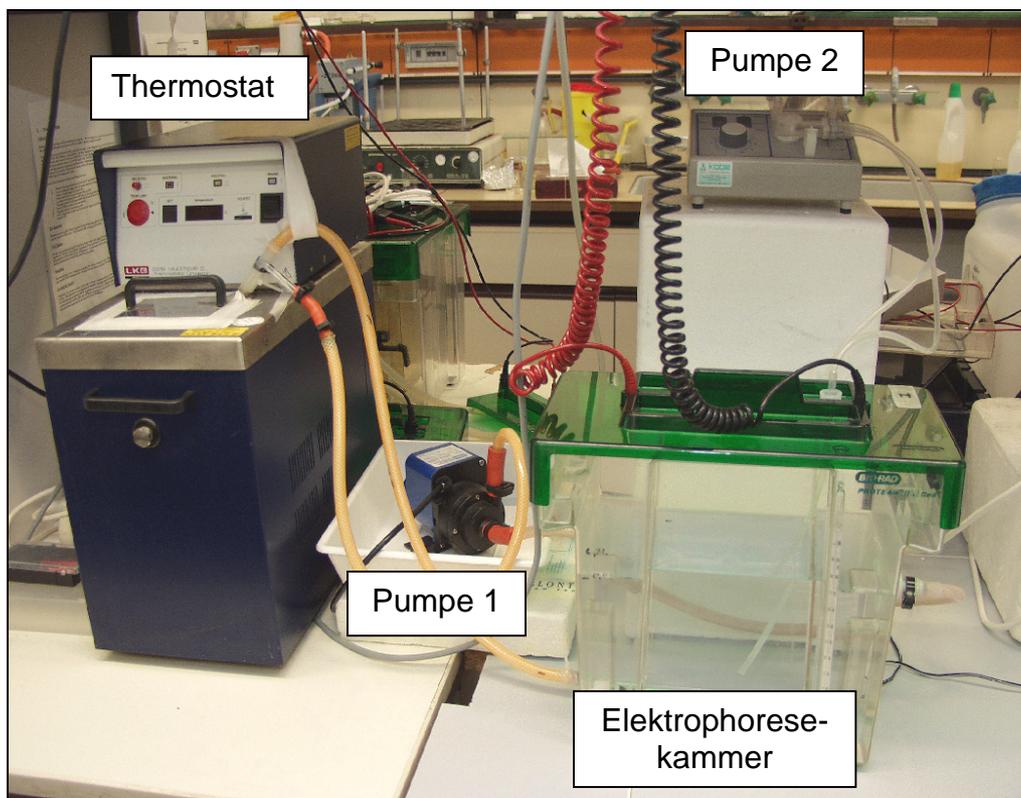


Abbildung 14: Über die Pumpe 1 wird der Elektrophoresepuffer durch ein Wasserbad im Thermostat gepumpt. Dort wird der Puffer erhitzt und läuft zurück in die Elektrophoresekammer. Pumpe 2 verhindert das Austrocknen der Elektroden, indem sie Puffer aus der Kammer in die Trayhalterung pumpt.

Nach Ende der geplanten Elektrophoresedauer wurde die Trayhalterung der Kammer entnommen und der in der Halterung befindliche Puffer verworfen. Der Puffer in der Kammer wurde noch zwei- bis dreimal wiederverwendet.

Die Gele wurden nun 15 Minuten in 400ml Aqua dest. mit 25µl Ethidiumbromid (10mg/ml Aqua dest.) auf einem Schüttler gefärbt und im Anschluss fünf Minuten in einem Aqua dest.-Bad entfärbt.

Wie die Agarosegele zur Auswertung der PCR wurden auch die DGGE-Gele mithilfe der Software BioCaptMW unter UV-Licht auf einem Transilluminator ausgewertet und als JPEG-Datei per Computer dokumentiert.

2.10 Identifizierung der DNA-Sequenz amplifizierter Proben

Zur Aufreinigung der in der DGGE auffälligen DNA-Proben wurde das Qiaex II Gel Extraction Kit der Firma Qiagen verwendet.

Die Proben wurden mithilfe einer PCR unter den in Tabelle 3-2 auf Seite 92 genannten Bedingungen erneut amplifiziert und etwa 60 Minuten in einem 2% Agarosegel per Gelelektrophorese aufgetrennt (Herstellungsweise und verwendete Geräte s. Kapitel 2.8).

Die Fragmente wurden unter UV-Licht auf einem Transilluminator identifiziert und die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben.

Anschließend wurden je 20µl Solubilisierungspuffer aus dem oben genannten Kit pro 10mg Agarose, mindestens jedoch 200µl, zu den Agarosestückchen gegeben, um die Agarose aufzulösen. Zusätzlich wurden 10µl Kit-Glasmatrix (Qiaex II Suspension) hinzugefügt, die die DNA binden sollte.

Diese Mischung wurde circa 20 Sekunden lang auf einem Rüttler geschüttelt, dann etwa zwei Minuten stehen gelassen. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. War dies der Fall, wurden die Proben ungefähr 30 Sekunden bei 13000rpm zentrifugiert und der Überstand unter Belassung des DNA-Glasmatrix-Pellets mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Es wurden dann 500µl Solubilisierungspuffer in die Gefäße gegeben, um die restliche Agarose zu entfernen. Die Proben wurden wieder etwa 20 Sekunden

geschüttelt, anschließend 20 Sekunden zentrifugiert und der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Im nächsten Schritt wurden 500µl Waschpuffer aus dem Kit zu den Pellets gegeben, 20 Sekunden auf einem Rüttler vermischt, 20 Sekunden zentrifugiert und der Überstand wieder mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Die Gefäße wurden dann etwa 45 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, bis das Ethanol vollständig verdunstet war. Anschließend wurden jeweils 20µl steriles Wasser in die Reaktionsgefäße gegeben.

Zwischenzeitlich wurden 2µl Primer ohne GC-Clamp für das interessierende Fragment aus dem Primerpaar 2 mit 18µl sterilem Wasser vermischt, geschüttelt und je 2µl dieser Mischung in 0,5ml Reaktionsgefäße gegeben. (Näheres zu den verwendeten Primern siehe Kapitel 3.3.1.) Danach wurden 5µl der zugehörigen DNA-Probe hinzugefügt. Diese derart vorbereiteten Proben wurden zur Sequenzierung an die Firma SEQLAB – Sequence Laboratories Göttingen GmbH zur Sequenzierung geschickt.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleichende Sequenzstudien in verschiedenen Spezies

Zannis et al. zeigten in vergleichenden Studien hochkonservierte Regionen in den Sequenzen des ApoAI und proximalen ApoCIII Promoters. In diesen Regionen liegen bedeutende regulatorische Sequenzen, die zum Teil Hormone Response Elements enthalten. Auch andere Abschnitte wie C/EBP-Bindungsdomänen und eine TATA-Box zeigten einen hohen Konservierungsgrad. (Zannis et al., 2003)

Für diese Arbeit wurden vergleichende Sequenzstudien des ApoAIV Promoters verschiedener Affenarten und des menschlichen ApoAIV Promoters über die Internetdatenbank Ensembl.org durchgeführt. Hierbei zeigte sich für den gesamten Promoter eine hochkonservierte Sequenz. Die Abbildungen 15 und 16 zeigen exemplarisch die gegenübergestellten Sequenzen der Elemente E und C des ApoAIV Promoters des Menschen (*Homo sapiens*), Schimpansen (*Pan troglodytes*), Westlichen Gorillas (*Gorilla gorilla*), Orang Utans (*Pongo pygmaeus*) und Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), die jeweils HRE enthalten.

<i>Element E</i>			
Mensch	-407	GATGTGGACTTTGCCCCCATGAGCCCGG	-379
Schimpanse		GATGTGGACTTTGCCCCCATGAGCCCGG	
Gorilla		GATGTGGACTTTGCCCCCATGAGCCCGG	
Orang Utan		GATGTGGACTTTGCCCCCATGAGCCTGG	
Rhesusaffe		GATGTGGACTTTGCCCCCATGAGCCTGG	

Abbildung 15: Die gesamte Sequenz des ApoAIV Promoters ist hochkonserviert. Vor allem fällt auch der hohe Konservierungsgrad der HRE in den Elementen E und C auf (s. auch Abbildung 16).

Element C			
Mensch	-178	TAGTCTCAGGGTCACAAAAGTCCAAGAGGCCT	-147
Schimpanse		TAGTCTCAGGGTCACAAAAGTCCAAGAGGCCT	
Gorilla		TAGTCTCAGGGTCACAAAAGTCCAACAGGCCT	
Orang Utan		TAGTCTCAGGGTCACAAAAGTCCAAGAGACCT	
Rhesusaffe		TAGTCTCAGGGTCACAAAAGTCCAAGAGGCCT	
Mensch	-146	CTTGGGAATGTGTCACCTTCCAGCGTGGAG	-117
Schimpanse		CTTGGGAATGTGTCACCTTCCAGCGTGGAG	
Gorilla		CTTGGGAATGTGTCACCTTCCAGCGTGGAG	
Orang Utan		CTTGGGAATGTGTCACCTTCCAGCGTGGAG	
Rhesusaffe		CTTCGGAATGTGTCACCTTCCAGCGTGGAG	

Abbildung 16: Auch das Element C des ApoAIV Promoters weist in verschiedenen Spezies identische bzw. nahezu identische Sequenzen auf.

Der hohe Konservierungsgrad wird noch einmal verdeutlicht, wenn die Übereinstimmung der Sequenzen untereinander untersucht wird. Es zeigen sich zu 90 bis etwa 99% identische Sequenzen des ApoAIV Promoters des Menschen, Schimpansen, Gorillas, Orang Utans und Rhesusaffen (siehe Abbildung 17).

	Mensch	Schimpanse	Gorilla	Orang Utan	Rhesusaffe
Mensch	---	0,983	0,976	0,945	0,902
Schimpanse	0,983	---	0,985	0,95	0,907
Gorilla	0,976	0,985	---	0,945	0,909
Orang Utan	0,945	0,95	0,945	---	0,92
Rhesusaffe	0,902	0,907	0,909	0,92	---

Abbildung 17: Die Sequenzen des ApoAIV Promoters verschiedener Spezies stimmen zu mindestens 90 bis circa 99% überein.

3.2 Auswahl der zu untersuchenden Gensequenzen

Die Gene der Apolipoproteine AI, AIV und CIII haben einen gemeinsamen evolutionären Ursprung und verfügen über gemeinsame Kontrollregionen (Karathanasis et al., 1983). Der hohe Konservierungsgrad der regulatorischen Genabschnitte dieser Apolipoproteine weist, genau wie die in Kapitel 1.6 erläuterten Auswirkungen von Mutationen in den Promoter- und Enhancerbereichen,

auf die große Bedeutung dieser Gensequenzen für die Transkription der Apolipoproteinogene hin.

Die in dieser Arbeit untersuchten Genabschnitte liegen innerhalb dieser regulatorischen Bereiche. Bei der Auswahl der zu analysierenden Sequenzen wurde darauf geachtet, dass sie die in der Literatur beschriebenen für die Regulatorfunktion besonders wichtigen Elemente enthalten, vor allem die in Kapitel 1.6.2 erläuterten Hormone Response Elements (Ktistaki et al., 1994; Ogami et al., 1990; Zannis et al., 2003). Mit diesen Kriterien wurden die im Folgenden beschriebenen Primersequenzen ausgewählt.

3.3 PCR-Bedingungen

3.3.1 Entwurf der Oligonukleotidprimersequenzen

Die Herstellung der Oligonukleotidprimer ist einer der entscheidenden Schritte bei der Planung einer Polymerasekettenreaktion.

Es wurde deshalb darauf geachtet, dass die Bindungsstelle für die Primer der ersten PCR bis zu 80 Basenpaare vor der Zielsequenz der zweiten PCR lag, um die gesuchte Sequenz sicher zu amplifizieren und alle dort möglichen Mutationen detektieren zu können.

Je größer die sogenannte normalisierte Länge der Primer ist, desto höher liegt die Temperatur T_p , bei der optimale Bedingungen für die Primerhybridisierung vorliegen (Saiki et al., 1988; Wu et al., 1991).

Die normalisierte Länge berücksichtigt die etwa doppelt so hohe Bindungsstärke von Guanin-Cytosin-(GC-)Bindungen im DNA-Strang gegenüber Adenin-

Thymin-(AT-)Bindungen und errechnet sich durch die Formel $L_n = 2 * n_{GC} + n_{AT}$.

Dabei geben n_{GC} und n_{AT} die Anzahl der jeweiligen Basen in der Primersequenz an (Wu et al., 1991). Durch den linearen Zusammenhang der Temperatur T_p mit der normalisierten Länge L_n , welcher durch die Formel $T_p = 22 + 1,46 * L_n$ beschrieben wird, ist ersichtlich, dass bei einer normalisierten Primerlänge von 38 oder mehr eine Temperatur von deutlich über 74°C für optimale Annealingbedingungen erreicht werden müsste. Dies wäre jedoch ungünstig, da die optimale Temperatur für die Polymerisation der DNA durch die thermostabile Polymerase bei ca. 74°C liegt (Saiki et al., 1988). Aus diesem Grund wurde darauf geachtet,

dass die normalisierte Länge der Primersequenzen möglichst nicht über $L_n = 38$ lag.

Die denaturierende Gradientengelelektrophorese ist in ihrer einfachsten Anwendung in der Lage, etwa 50% aller Ein-Basen-Mutationen zu erkennen. Ein großes Problem stellen unterschiedliche Schmelzdomänen innerhalb eines DNA-Fragments dar. Mutationen können lediglich in der Schmelzdomäne mit der niedrigsten Schmelztemperatur gefunden werden, da in Bezug auf Mutationen in der Domäne mit der höchsten Schmelztemperatur der DNA-Doppelstrang bereits vor Erreichen der für das Abstoppen notwendigen Denaturationskonzentration aufschmilzt (Fischer und Lerman, 1983; Gille et al., 1998; Myers et al., 1985b; Myers et al., 1985a).

Durch Anhängen einer guanin- und cytosinreichen Sequenz an das zu untersuchende Fragment kann die Sensitivität auf etwa 95% verbessert werden. Durch diese sogenannte GC-Clamp wird die Anzahl der unterschiedlichen Schmelzdomänen des Fragments zum einen erheblich reduziert. Zum anderen entsteht durch die GC-Clamp eine zusätzliche Schmelzdomäne, deren Schmelzpunkt bei einer deutlich höheren Temperatur liegt, als der des restlichen Fragments. Somit liegen im optimalen Fall alle Domänen der zu untersuchenden Gensequenz innerhalb der Schmelzdomäne mit der niedrigsten Schmelztemperatur, so dass in der durchzuführenden DGGE Mutationen gefunden werden können, die der Detektion ansonsten entgehen würden (Myers et al., 1985a; Narayanaswami und Taylor, 2001; Sheffield et al., 1989).

Da bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die PCR ein suffizientes Mittel ist, um GC-Clamps an ein zu untersuchendes Fragment zu synthetisieren (Sheffield et al., 1989), wurde in dieser Arbeit schon beim Entwurf jeweils an einen Primer des Primerpaars 2 eine 52 Basenpaare umfassende GC-reiche Sequenz angehängt. Diese wurde dann mithilfe der PCR an das zu untersuchende Fragment angefügt. Dies geschah in Abhängigkeit der auf Basis verschiedener Algorithmen ermittelbaren Schmelzkurven für bekannte DNA-Sequenzen (Fixman und Freire, 1977; Schwarz, Jr. und Poland, 1974), welche mit der Software WinMelt (Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA) simuliert wurden.

Die Abbildungen 18 und 19 zeigen exemplarisch den Effekt der GC-Clamp auf die Schmelzkurve des Apo AI Promoters.

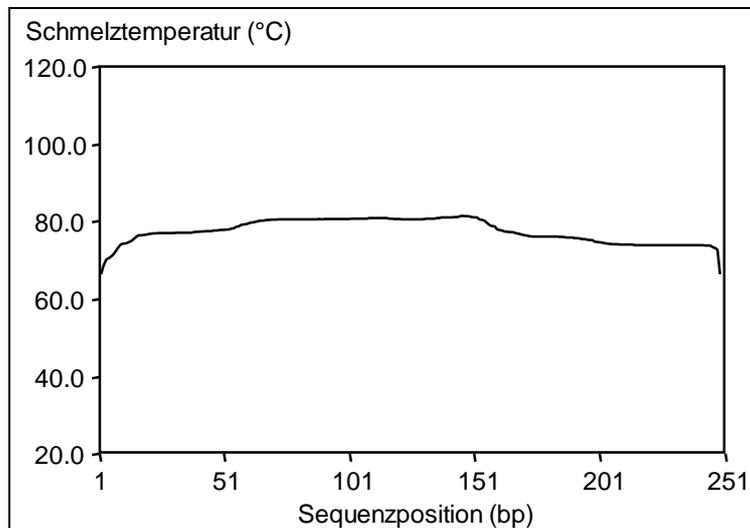


Abbildung 18: Schmelzkurve des ApoAI Promoters ohne GC-Clamp. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Apo AI-Fragment ohne das Vorhandensein der GC-reichen Sequenz viele verschiedene Schmelzdomänen aufweist.

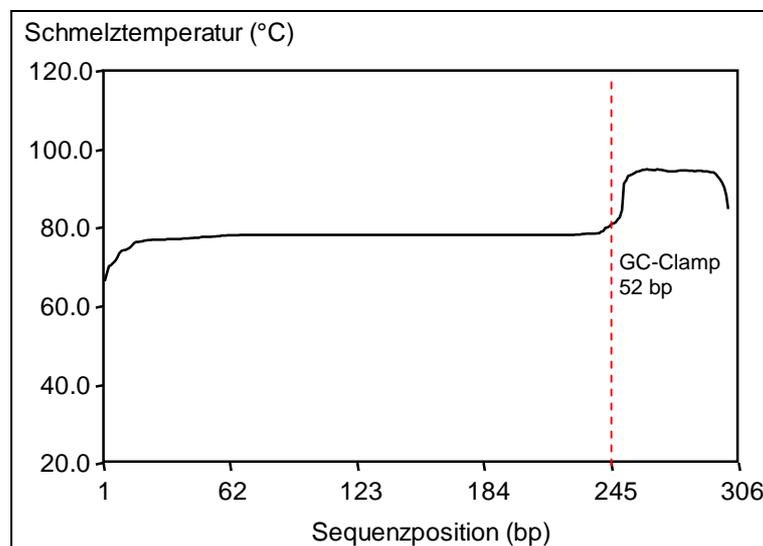


Abbildung 19: Schmelzkurve des ApoAI Promoters mit einer GC-Clamp am 3'-Ende. Durch Anhängen der GC-Clamp werden die unterschiedlichen Schmelztemperaturen angeglichen und eine weitere Schmelzdomäne mit deutlich höherem Schmelzpunkt erzeugt. Basierend auf diesen Kenntnissen wurden die in Tabelle 3-1 gezeigten Sequenzen der verwendeten Primer entworfen.

Tabelle 3-1: Übersicht über die entworfenen Primersequenzen

Primer	upstream 3'-5'-Primer	downstream 5'-3'-Primer
<i>Multiplex- bzw. nested PCR-Primer</i>		
ApoA1 Promoter	5'-agtctctaagcagccagctc-3'	5'-tggaatgctggtggtggggga-3'
ApoA4 Promoter	5'-cggccttcaggaacatcctg-3'	5'-ctatgctgtctgcagctctg-3'
ApoC3 Enhancer/ Promoter	5'-gagggcattacctggagcag ctg-3'	5'-tcc cac agc cag ggg gca gtg-3'
<i>Primer für DGGE-target-Sequenzen (GC-Clamps in eckigen Klammern)</i>		
ApoA1 Promoter	5'-[ggggggggccgcgggcggg ggcggcgggacgggcgcggggc gcggcgggcg]ctgttgctgctcact ggtcct-3'	5'-acacaatggacaatggcaa ctgcc-3'
ApoA4 Promoter	5'-[ggggggggccgcgggcggg ggcggcgggacgggcgcggggc gcggcgggcg]ctgacagagaggt cctcaggag-3'	5'-tagtggcggatgtggagact gg-3'
ApoC3 Enhancer	5'-cacagaagaccaggcatcagt gg-3'	5'-[cgcccgcgcgccccgcg cccgtcccgcgccccgcg gccccccc]tgaacgaga gaatcagtcctgg-3'
ApoC3 Promoter	5'-[ggggggggccgcgggcggg ggcggcgggacgggcgcggggc gcggcgggcg]gacaggcaggagg gttctgacctgt-3'	5'-gaaggaatgagggtccc caggcc-3'

3.3.2 Auswahl der PCR-Versuchsbedingungen

Bei einer einfachen PCR ist die Amplifikation ungewünschter Nebenprodukte ein bekanntes Problem (Roux, 1995).

Deshalb erfolgte die Amplifizierung der Zielsequenzen zur Verbesserung der Sensitivität und Spezifität der PCRs mithilfe sogenannter Nested PCRs.

Bei dieser Technik wird zunächst mit einem ersten Primerpaar (Primerpaar 1) ein größeres Element amplifiziert, das wiederum als Matrize für eine zweite PCR mit einem zweiten Primerpaar (Primerpaar 2) dient. Das Primerpaar 2 bindet dabei an Abschnitte innerhalb des in der ersten PCR erzeugten DNA-Templates. Dies reduziert die Wahrscheinlichkeit der Amplifizierung einer nicht gesuchten DNA-Sequenz (Saroj et al., 2008). Außerdem können mit dieser Technik Genabschnitte amplifiziert werden, die in einer herkömmlichen PCR nicht zu vervielfältigen sind (Sun et al., 2008).

Für die Fragmente des ApoA1 Promoters, ApoAIV Promoters sowie des ApoCIII Enhancers wurde die erste PCR als Multiplex-PCR durchgeführt. Das heißt, dass hierbei in einer einzigen ersten PCR alle drei genannten Genabschnitte amplifiziert wurden. Die zweite PCR erfolgte dann unter Verwendung des für die jeweiligen Fragmente spezifischen zweiten Primerpaars in einzelnen PCRs. Die Amplifizierung des Fragments des ApoCIII Promoters erfolgte trotz des mit dem ApoC3 Enhancer gemeinsamen Primerpaars 1 als einfache Nested PCR, da auf diese Weise das beste Ergebnis erzielt werden konnte.

Abbildung 20 zeigt das Prinzip der in dieser Arbeit verwendeten PCR-Abläufe.

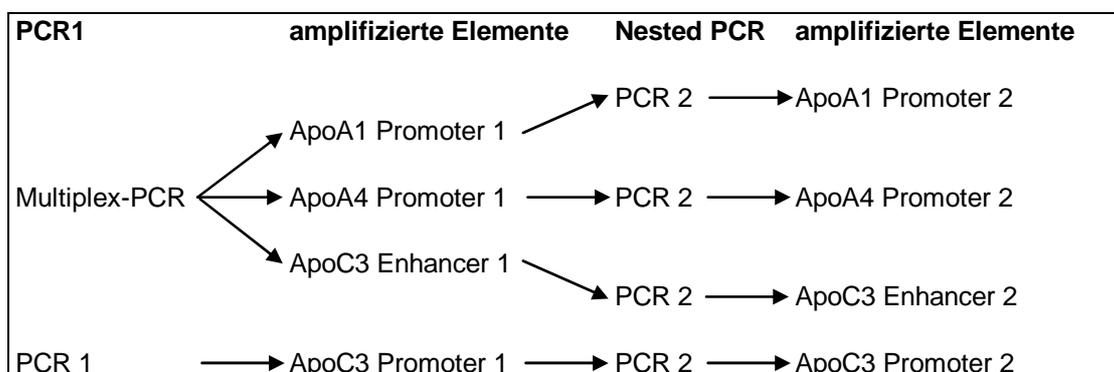


Abbildung 20: Prinzip der PCR-Abfolge in dieser Arbeit. Aus einer Multiplex-PCR wurden Fragmente des ApoA1 Promoters, ApoAIV Promoters und ApoCIII Enhancers amplifiziert. In jeweils einer zweiten PCR je Fragment wurde die zu analysierende Sequenz mit spezifischen Primern amplifiziert. Für den ApoCIII Promoter wurde eine Nested PCR nur mit für den ApoCIII Promoter spezifischen Primern durchgeführt.

Von einer Grundeinstellung ausgehend wurde in einer ersten Versuchsreihe die Menge des zugesetzten MgCl_2 variiert, da Magnesium-Ionen als zweiwertige Ionen essentiell für die Funktion von DNA-Polymerasen sind (Kramer und Coen, 2001; Yang et al., 2004) und bereits in früheren Arbeiten festgestellt wurde, dass der MgCl_2 -Gehalt die Genauigkeit der Taq Polymerase beeinflussen kann (Leung et al., 1989). Hierbei ist zu beachten, dass die verwendeten dNTPs Komplexe mit den Magnesium-Ionen des Reaktionsansatzes bilden können, so dass der Reaktion eine bestimmte Menge Mg^{2+} entzogen wird (Roux, 1995). Aus diesem Grund kann eine Variation der Magnesiumkonzentration erforderlich werden, um der Polymerase die benötigte Menge an freien Ionen zur Verfügung zu stellen.

Diese Maßnahme allein brachte jedoch nicht das gewünschte Resultat. Zwar wurden in der ersten PCR teilweise verwendbare Ergebnisse erzielt, diese konnten dann jedoch nicht erfolgreich als Template für die zweite PCR dienen.

Andere Arbeiten beschreiben Zusätze mit Betaine, Dimethylsulfoxid (DMSO), Glycerol und anderen, durch die bei sonst nicht erfolgreichen PCRs Amplifikate nachgewiesen werden konnten (Baskaran et al., 1996; Bookstein et al., 1990; Hung et al., 1990; Pomp und Medrano, 1991; Sun et al., 1993; Weissensteiner und Lanchbury, 1996). Dies wird durch verschiedene Mechanismen erklärt.

In einigen Fällen kann es vorkommen, dass die denaturierte DNA während der Annealingphase Sekundärstrukturen, sogenannte Stem Loops, durch Basenpaarung ausbildet. Diese führen dazu, dass die Polymerase während der Replikationsphase bestimmte Abschnitte des Templates überspringt (Viswanathan et al., 1999) (s. Abb 21). Dies ist vor allem bei guanin- und cytosinreichen Templates der Fall (Musso et al., 2006), wie sie in dieser Arbeit vorlagen. Alle zu amplifizierenden Fragmente wiesen einen G/C-Gehalt von über 60 Prozent auf (ApoAI Promoter 61,6%, ApoAIV Promoter 60,3%, ApoCIII Enhancer 69,6%, ApoCIII Promoter 62,8%).

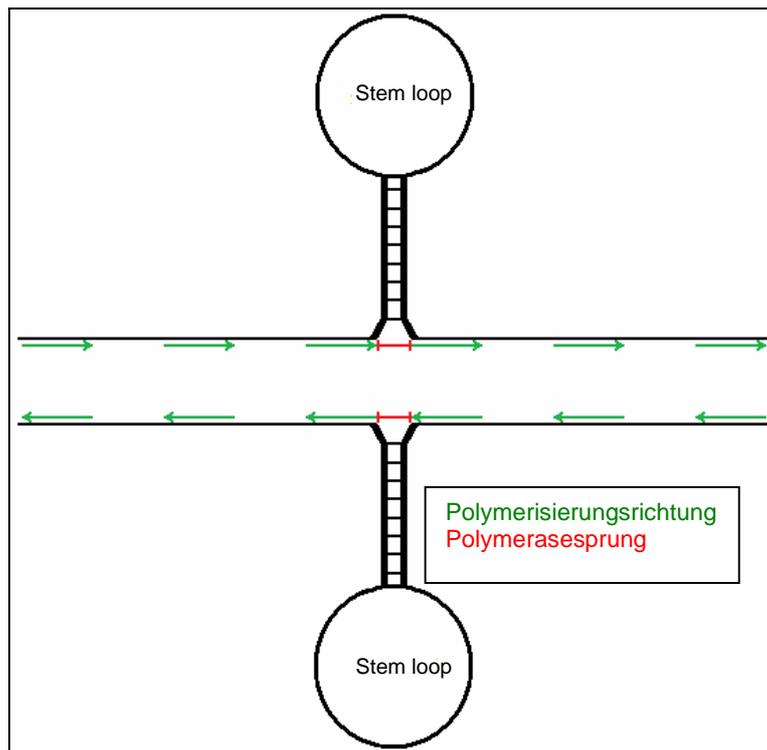


Abbildung 21: Die Ausbildung sogenannter Stem Loops kann in der PCR zu Lesefehlern der Taq-Polymerase durch Überspringen der konformitätsgeänderten Sequenzbereiche führen (sogenannter Polymerasesprung).

Die Ausbildung dieser Sekundärstrukturen durch ungewünschte Basenpaarungen kann durch Betaine, Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Glycerol verhindert oder zumindest reduziert werden (Baskaran et al., 1996; Henke et al., 1997; Musso et al., 2006; Winship, 1989).

Die Temperatur, bei der ein DNA-Doppelstrang vollständig denaturiert, ist unter anderem abhängig von der Sequenz. Dabei benötigen Guanin-Cytosin-Paarungen eine höhere Temperatur als Adenin-Thymin-Bindungen (Anderson und Bauer, 1978).

Derivate des Tetraalkylammoniums (TAA) wie Betaine sind in der Lage diese Temperaturen anzugleichen. Dieser Effekt wird Isostabilisierung genannt (Rees et al., 1993). Zudem erhöhen sie die Spezifität der PCR, so dass unspezifische Hintergrundprodukte reduziert werden (Musso et al., 2006; Weissensteiner und Lanchbury, 1996).

Bei gleichzeitiger Verwendung mehrerer der genannten Additive können diese synergistisch wirken (Musso et al., 2006). Aus diesem Grund wurden für diese Arbeit verschiedene Kombinationen getestet. Dazu wurde jeweils 1ml der jewei-

ligen Substanz im Verhältnis 1:1 mit einer bzw. im Verhältnis 1:1:1 mit den beiden anderen vermischt. Aus dieser Lösung wurden 2,5µl für den PCR-Ansatz verwendet. Es wurden die Kombinationen 5M Betaine/ 78,13M DMSO, 5M Betaine/ ≥99,5 prozentiges Glycerol, 78,13M DMSO/ ≥99,5 prozentiges Glycerol und 5M Betaine/ 78,13M DMSO/ ≥99,5 prozentiges Glycerol jeweils in Kombination mit 1,5µl und 0,75µl 50mM MgCl₂ getestet.

Da diese Zusätze in der DGGE zu Verschmierungen führten, wurden sie nur in der ersten PCR verwendet. Für die zweiten PCRs wurde lediglich der MgCl₂-Gehalt variiert.

Erst dieser Testaufbau führte zu befriedigenden Reaktionsergebnissen.

Die Abbildungen 22 bis 24 zeigen Ergebnisse der Gelelektrophoresen zur Kontrolle der zweiten PCR für die in den Beschriftungen genannten Fragmente nach Verwendung einer Betaine/ DMSO-Kombination, sowie 0,75µl MgCl₂ für die Multiplex- und Nested PCR und die PCR 2 für den ApoCIII Promoter bzw. 1,5µl MgCl₂ je PCR 2 für die ApoAI und ApoAIV Promoter und den ApoCIII Enhancer. Nach jedem PCR-Lauf wurde eine stichprobenartige Auswahl der amplifizierten Proben elektrophoretisch aufgetrennt, um den Erfolg der PCR zu überprüfen. Abbildung 22 zeigt exemplarisch die Elektrophorese mit einigen ApoAI Promoter-Proben. Hier lässt sich in etwa auf Höhe der 300bp-Bande des PCR-Markers deutlich ein Amplifikat nachweisen. Dieses hat also annähernd die Größe des gewünschten zu untersuchenden Bereichs des ApoAI Promoters (229bp). Somit wurde diese PCR als Erfolg gewertet. Die Elektrophorese zeigt zudem etwas oberhalb der 500bp-Bande ein zweites, ungewünschtes Amplifikat.

Im Fall des ApoAIV Promoters zeigen sich in der Elektrophorese zwei distinkte Banden auf Höhe der 1000bp-Bande und auf Höhe der 500bp-Bande des PCR-Markers (siehe Abbildung 23). Letztere galt als Beweis der erfolgreichen Amplifikation des gewünschten ApoAIV Promoter-Abschnitts, welcher 437bp umfasste. Die größere Bande stellt ein ungewünschtes Nebenprodukt dar.

Die Elektrophorese nach PCR mit dem ApoCIII Promoter als Ziel zeigte drei scharfe Banden auf Höhe der 1000bp-, etwas oberhalb der 500bp- und etwa auf Höhe der 300bp-Bande des PCR-Markers (Abbildung 24). Die deutliche Bande mit etwa 300bp Größe lag somit für das ApoCIII Promoterfragment im gewünschten Bereich. Die geplante Sequenz umfasste 226bp. Die größeren Amplifikate sind auch hier ungewünschte Nebenprodukte.

Für die genannten Fragmente ließ sich somit für alle untersuchten Proben eine erfolgreiche Amplifikation nachweisen.

Lediglich im Fall des ApoCIII Enhancers ließen sich zwei der untersuchten Proben nicht amplifizieren. Abbildung 25 zeigt exemplarisch die Elektrophorese erfolgreich amplifizierter ApoCIII Enhancer-Proben. Auf Höhe der 500bp Bande des PCR-Markers ließ sich hier eine Bande nachweisen. Diese war somit etwas größer als gewünscht, da die ausgewählte ApoCIII Enhancer-Sequenz lediglich 340bp umfasste. Da die DGGE gleichmäßige Wanderverhalten für diese Proben und die Sequenzierung von ApoCIII Enhancer-Proben die gewünschte Sequenz zeigte, wurden auch diese PCRs als Erfolg gewertet.

Bei den in allen PCRs nachweisbaren Nebenprodukten könnte es sich um Reste aus der ersten PCR handeln. Auch Fehlamplifikationen durch die Taq Polymerase sind denkbar. Eine Übersicht über die endgültigen Reaktionsansätze ist in Tabelle 3-2 aufgeführt. Alle weiteren getesteten Rezepte sind im Anhang in Tabelle 8-1 gezeigt.

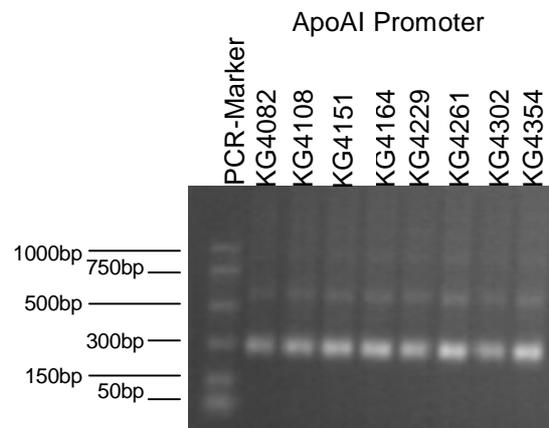


Abbildung 22: Analytisches Agarosegel zur Veranschaulichung der erfolgreichen zweiten PCR für den ApoAI Promoter. Dargestellt sind die Proben Nr. 4082, 4108, 4151, 4164, 4229, 4261, 4302 und 4354 der Kontrollgruppe (KG) der Marburger Präventionsallianz nach Amplifikation nach den in Tabelle 3-2 genannten Versuchsbedingungen. Mit ca. 300bp wurde ein Fragment in etwa in der Größe der gewünschten Sequenz (229bp) amplifiziert. Dies wurde als erfolgreiche Amplifizierung des ApoAI Promoterausschnitts gewertet. Bei ca. 500bp zeigt sich ein ungewünschtes Nebenprodukt. Die angegebenen Nummern entsprechen den laufenden Nummern der Marburger Präventionsallianz.

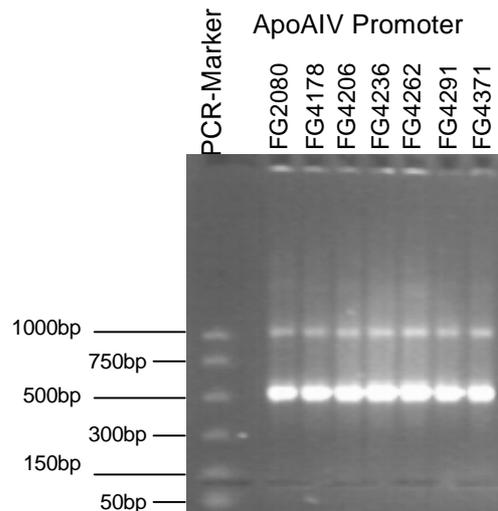


Abbildung 23: Analytisches Agarosegel zur Veranschaulichung der erfolgreichen zweiten PCR für den ApoAIV Promoter nach den in Tabelle 3-2 genannten Versuchsbedingungen. Dargestellt sind die Proben Nr. 2080, 4178, 4206, 4236, 4262, 4291 und 4371 der Fallgruppe (FG) der Marburger Präventionsallianz. Wie die ausgewählte zu untersuchende Sequenz des ApoAIV Promoters (437bp) ist das Amplifikat etwa 500bp groß. Die Amplifikate auf Höhe der 1000bp-Bande sind ungewünschte Nebenprodukte. Die angegebenen Nummern entsprechen den laufenden Nummern der Marburger Präventionsallianz.

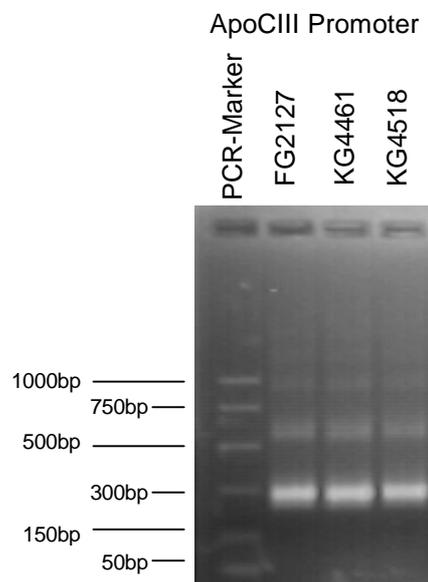


Abbildung 24: Ergebnisse der zweiten PCR für den ApoCIII Promoter nach den in Tabelle 3-2 genannten Versuchsbedingungen. Dargestellt sind die Proben 4518 und 4461 der Kontrollgruppe (KG) bzw. 2127 der Fallgruppe (FG) der Marburger Präventionsallianz. Auf Höhe der 300bp-Bande des PCR-Markers lässt sich deutlich ein Amplifikat erkennen. Dieses hat somit in etwa die gleiche Größe wie die geplante Sequenz (226bp). Etwas oberhalb der 500bp- und auf Höhe der 1000bp-Bande zeigen sich weitere Amplifikate. Diese stellen ungewünschte Nebenprodukte dar. Die angegebenen Nummern entsprechen den laufenden Nummern der Marburger Präventionsallianz.

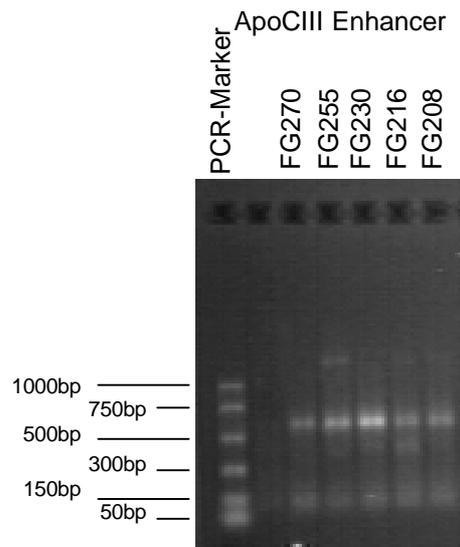


Abbildung 25: Analytisches Agarosegel zur Veranschaulichung der erfolgreichen zweiten PCR für den ApoCIII Enhancer nach den in Tabelle 3-2 genannten Versuchsbedingungen. Dargestellt sind die Proben 2080, 2169, 2307, 2558 und 2702 der Fallgruppe (FG) der Marburger Präventionsallianz. Mit ca. 500bp ist das amplifizierte Fragment größer als die geplante Sequenz (340bp). Sequenzierungen von ApoCIII Enhancer-Proben zeigten jedoch die geplante Sequenz, so dass die PCR trotzdem als Erfolg gewertet wurde. Die angegebenen Nummern entsprechen den laufenden Nummern der Marburger Präventionsallianz.

Tabelle 3-2: endgültige PCR-Ansätze für jeweils eine PCR

amplifiziertes Element	Reagenz	Volumen
<i>Multiplex-/ nested PCR-Ansatz 1</i>		
	10xPCR Puffer	2,5µl
	Betaine/ DMSO	2,5µl
	50mM MgCl ₂	0,75µl
	25mM dNTPs	0,2µl
	5pmol Primer	5µl
	Wasser, steril	8,95µl
	Taq-Polymerase	0,1µl
	gesamt	20µl

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Seite 92

amplifiziertes Element	Reagenz	Menge
<i>Ansätze für die zweiten PCRs</i>		
ApoAI Promoter	10xPCR Puffer	2,5µl
	50mM MgCl ₂	1,5µl
	25mM dNTPs	0,2µl
	5pmol Primer	5µl
	Wasser, steril	10,7µl
	Taq-Polymerase	0,1µl
	gesamt	20µl
ApoAIV Promoter	10xPCR Puffer	2,5µl
	50mM MgCl ₂	1,5µl
	25mM dNTPs	0,2µl
	5pmol Primer	5µl
	Wasser, steril	10,7µl
	Taq-Polymerase	0,1µl
	gesamt	20µl
ApoCIII Enhancer	10xPCR Puffer	2,5µl
	50mM MgCl ₂	1,5µl
	25mM dNTPs	0,2µl
	5pmol Primer	5µl
	Wasser, steril	10,7µl
	Taq-Polymerase	0,1µl
	gesamt	20µl
ApoCIII Promoter	10xPCR Puffer	2,5µl
	50mM MgCl ₂	0,75µl
	25mM dNTPs	0,2µl
	5pmol Primer	5µl
	Wasser, steril	11,45µl
	Taq-Polymerase	0,1µl
	gesamt	20µl

3.4 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Für die DGGE wurden die Versuchsbedingungen zunächst in Anlehnung an die Originalarbeit über die Entdeckung der DGGE (Fischer und Lerman, 1979) entworfen und getestet.

Es wurde dafür ein Gel mit einem Denaturansgradienten von 0% bis 80% und einer Acrylamidkonzentration von 8% hergestellt. Die Elektrophorese wurde über 5 Stunden bei einer Temperatur von 60°C und einer Spannung von 120V durchgeführt, was jedoch nicht zu ausreichenden Ergebnissen führte.

Fischer und Lerman beschreiben in ihrer Arbeit deutlichere Ergebnisse durch die Einengung des Denaturansgradienten. Deshalb wurden die nächsten Versuche mit einem Gradienten von 40% bis 80% beziehungsweise 50% bis 70% durchgeführt. Durch diese Maßnahme verteilt sich ein kleinerer Gradient auf die gleich bleibend weite Strecke durch das Gel, so dass eine genauere Auftrennung möglich sein müsste. Die weiteren Parameter wurden wie zuvor gewählt. Jedoch brachte auch diese Variation nicht das gewünschte Resultat.

Neben der Denaturanskonzentration ist auch die Acrylamidkonzentration eine wichtige Variable bei der Herstellung von Gradientengelen. Da die Acrylamidkonzentration die Porengröße der durch das Acrylamid erzeugten Gitterstruktur im Gradientengel bestimmt, ist der Gehalt an Acrylamid in der Gellösung essentiell für die Detektion von Mutationen (Hayes et al., 1999). Es muss also ein Minimum an Polyacrylamid vorhanden sein, um zum einen die Analyse der Proben überhaupt zu ermöglichen und zum anderen die Stabilität des Gels zu gewährleisten. Wird allerdings zu viel Acrylamid in das Gel gegeben, werden die Poren der Netzstruktur zu eng, um Moleküle passieren zu lassen, so dass wiederum die Auftrennung der DNA-Doppelstränge verhindert wird. Eine Arbeit beschreibt eine optimale Bandenseparation nur bei einer Acrylamidkonzentration von 9%, sowohl eine niedrigere als auch eine höhere Konzentration führte zu weniger klaren Banden (Hayes et al., 1999). Weiterhin beschrieben Hayes et al. eine Temperatur von 60°C sowie eine Spannung von 100 bis 200V über sieben Stunden Laufzeit als optimale Versuchsbedingungen.

Basierend auf dieser Erkenntnis und den oben aufgeführten Ergebnissen von Lerman und Fischer, wurde der Denaturansgradient auf 50 bis 65% bei neun Prozent Acrylamidkonzentration eingengt und die DGGE bei einer Temperatur

von 60°C und 120V Spannung über sieben Stunden durchgeführt. Trotz der oben genannten Erkenntnisse brachte auch diese Versuchsreihe nicht das gewünschte Resultat.

Auch die Variation der angelegten Spannung sowie der Acrylamidkonzentration führte zunächst nicht zu erkennbaren Banden.

Unschärfe Banden können auch durch die Unterschiede im Wanderverhalten von Heteroduplexen im Vergleich zu Homoduplexen entstehen, das heißt vor allem durch das Aufschmelzen an unterschiedlichen Positionen im Harnstoff-Formamid-Gradientengel (Nagamine et al., 1989a; Sheffield et al., 1989). Durch die zusätzliche Einführung eines Acrylamidgradienten in die DGGE-Gele können durch Heteroduplexe entstandene Verschmierungen deutlich verringert werden. Dieser zusätzliche Gradient bietet für alle Moleküle optimale Schmelzbedingungen an distinkten Positionen innerhalb des Gels. Dadurch können breite, als Verschmierung imponierende Banden in einzelne scharfe Banden überführt werden, wodurch die vergleichende Analyse ermöglicht wird (Cremonesi et al., 1997).

Erst die Einführung eines solchen Doppelgradienten führte zu erkennbaren Banden.

Hierbei wurde zu dem bereits vorhandenen Harnstoff-Formamid-Konzentrationsgradienten ein Acrylamidgradient mit Konzentrationen von sechs bis zehn Prozent hinzugefügt, indem die Lösung mit der niedrigsten Harnstoff-Formamid-Konzentration mit sechs und diejenige mit der höchsten Konzentration mit zehn Prozent Acrylamid angesetzt wurde.

Durch den zweiten Gradienten konnten jedoch nur schwache, etwas unscharfe Banden erzeugt werden. Dieses Problem konnte durch die Senkung der Puffer-temperatur zum Teil gelöst werden.

Hier führte die Überlegung, dass die bisher angelegte Grundtemperatur das Erreichen der optimalen Denaturationskonzentration durch ein zu frühes Aufschmelzen verhindern könnte, zu der Lösung des Problems der weiterhin unscharfen Banden.

Zuletzt wurde das aufgetragene DNA-Volumen variiert, um schwache Banden zu verstärken bzw. zu helle, die Umgebung überstrahlende Banden etwas abzu-schwächen.

Diese Testläufe führten letztendlich zu den in Tabelle 3-3 genannten optimalen Bedingungen für jedes Fragment.

Tabelle 3-3: Übersicht über die endgültigen DGGE-Bedingungen. Ausgehend von den Versuchsbedingungen aus der Originalarbeit über die Entdeckung der DGGE (Fischer und Lerman, 1979) wurden die verschiedenen Parameter variiert, um optimale Resultate zu erzielen. Erst die Einführung eines Denaturans/ Acrylamid-Doppelgradienten führte zu verwertbaren Ergebnissen. Zudem wurde die Puffertemperatur auf 50°C reduziert, um ein zu frühes Aufschmelzen der DNA-Stränge zu vermeiden. Durch die Variation der auf die Gele geladenen DNA-Volumina konnten zu schwache Banden verstärkt, zu helle Banden abgeschwächt werden.

Fragment	Denaturans- Apo- gradient	Acrylamid- gradient	Temperatur	Spannung	Lauf- zeit	DNA- Volumen
A1 Promoter	60-70%	6-10%	50°C	120V	6h	10µl
A4 Promoter	60-70%	6-10%	50°C	120V	6h	4µl
C3 Enhancer	0-80%	6-10%	50°C	120V	6h	5µl
C3 Promoter	0-80%	6-10%	50°C	120V	6h	10µl

Tabelle 8-2 im Anhang zeigt alle getesteten Variationen aufgeteilt nach den untersuchten Fragmenten.

Die Abbildungen 26 bis 29 zeigen für die Mutationssuche in dieser Arbeit verwendete Gradientengele, die unter den in Tabelle 3-3 gezeigten Bedingungen erstellt wurden.

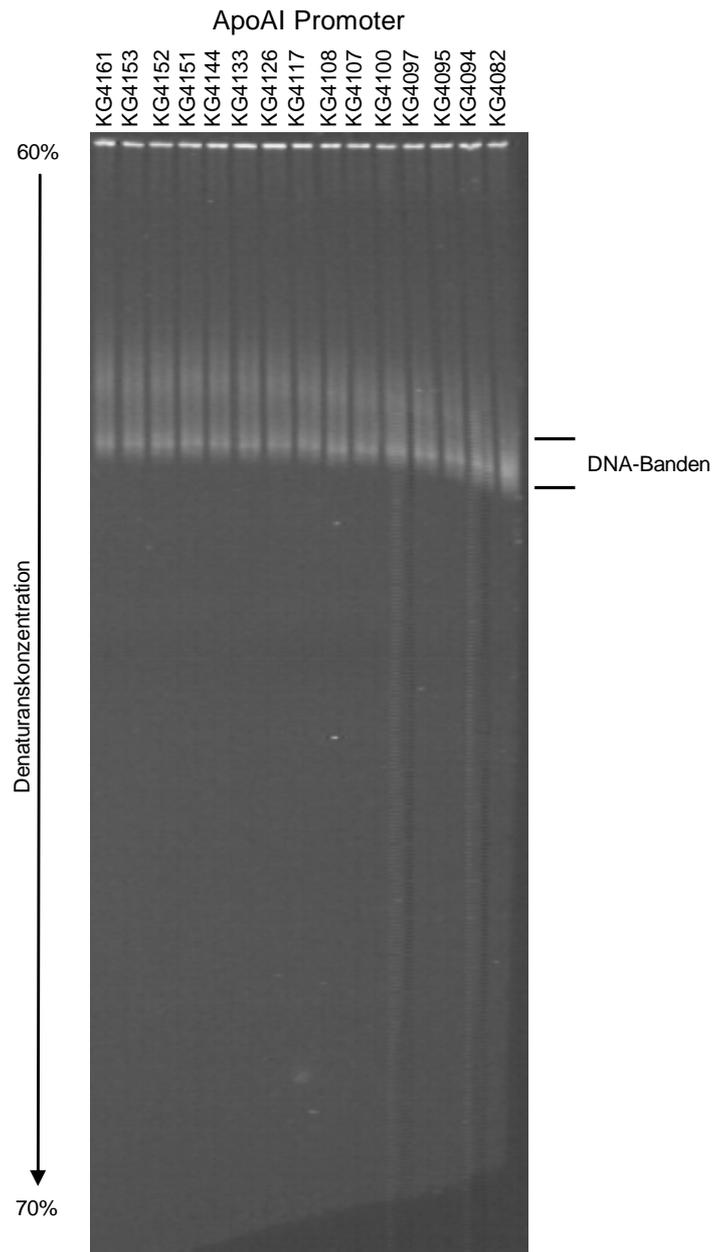


Abbildung 26: DGGE mit nebeneinander aufgetragenen Proben der Kontrollgruppe (KG) des ApoAI Promoters nach den in Tabelle 3-3 gezeigten Bedingungen in Laufrichtung von oben nach unten. Es zeigt sich eine schärfere untere und eine etwas unscharfe obere Bande. Die angegebenen Nummern entsprechen den laufenden Nummern der Marburger Präventionsallianz.

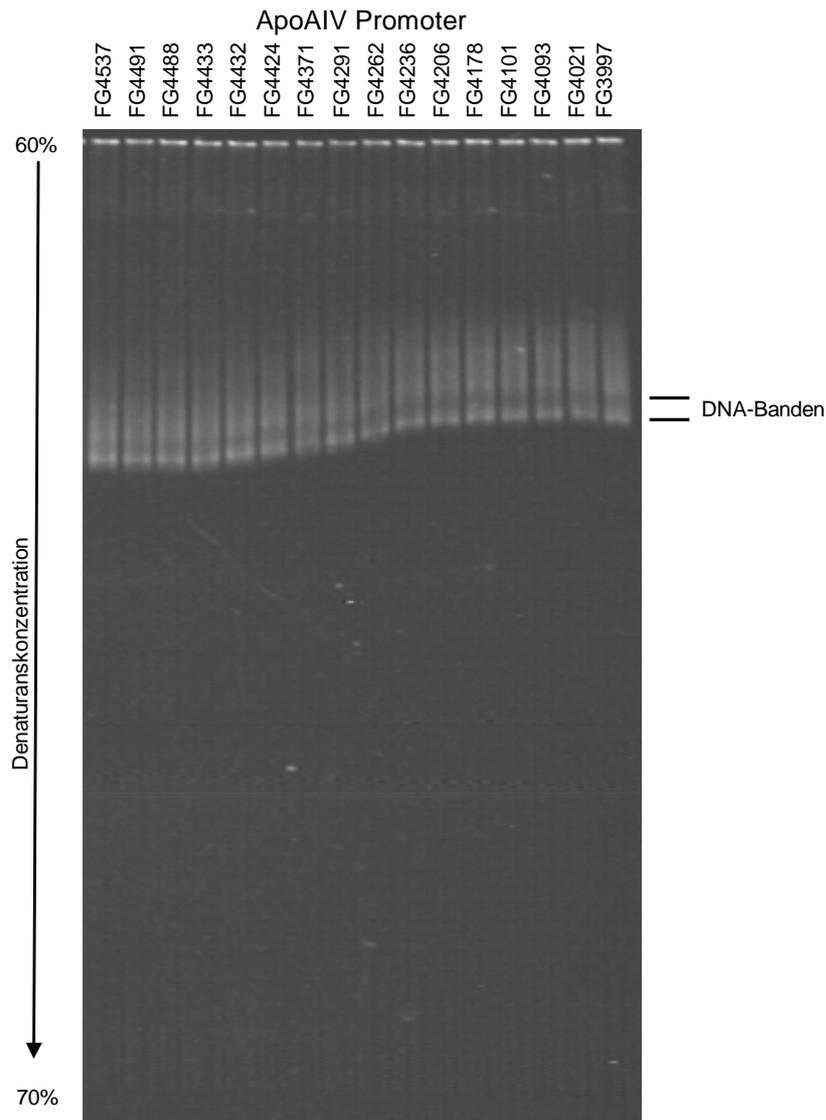


Abbildung 27: DGGE mit nebeneinander aufgetragenen Proben der Fallgruppe (FG) des ApoAIV Promoters nach den in Tabelle 3-3 gezeigten Bedingungen in Laufrichtung von oben nach unten. Auch hier zeigen sich eine untere schärfere und eine obere unschärfere Bande. Die angegebenen Nummern entsprechen den laufenden Nummern der Marburger Präventionsallianz.

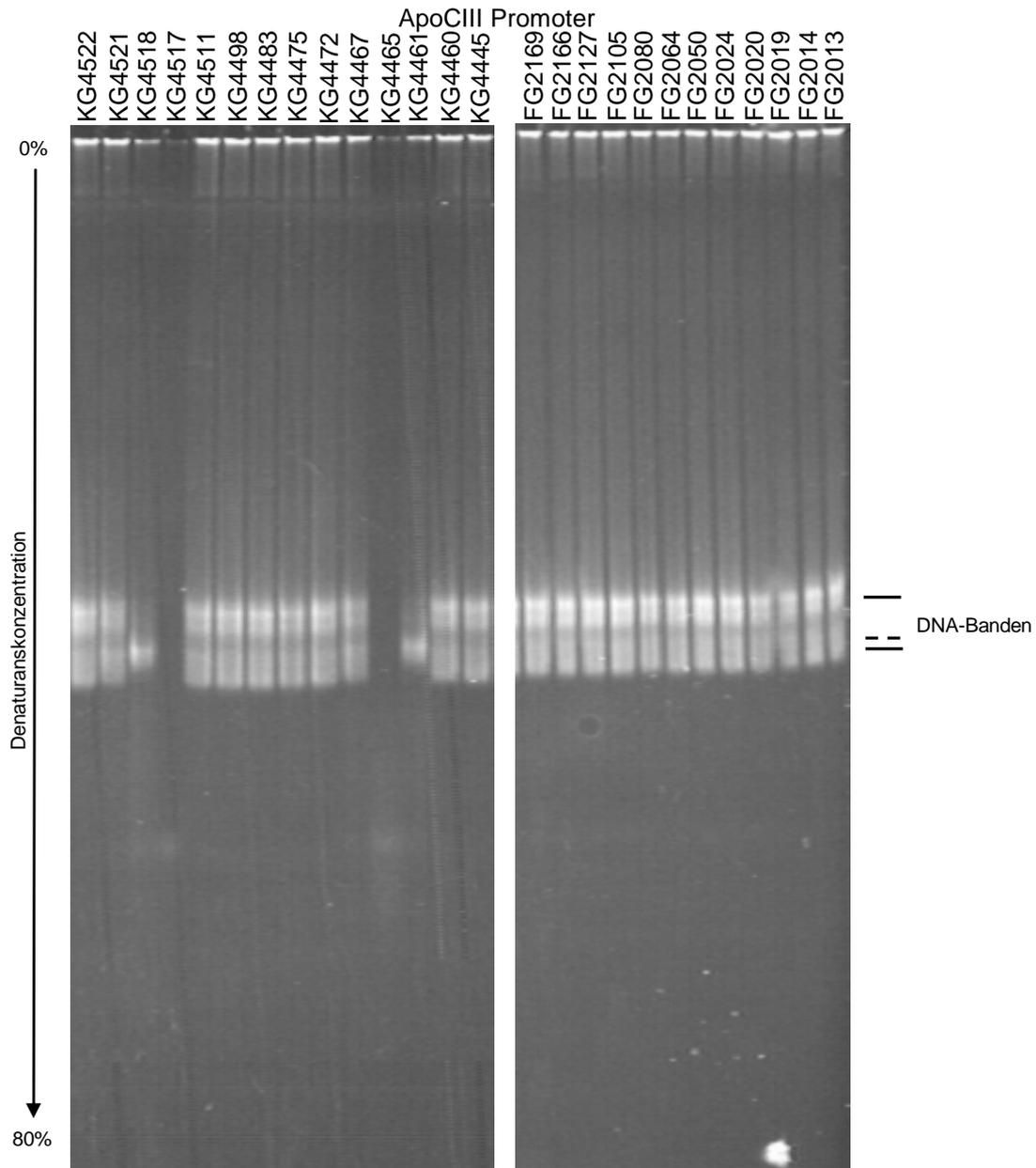


Abbildung 28: DGGE mit nebeneinander aufgetragenen Proben der Kontrollgruppe (KG) bzw. der Fallgruppe (FG) des ApoCIII Promoters nach den in Tabelle 3-3 gezeigten Bedingungen in Laufrichtung von oben nach unten. Auch hier kommen zwei Banden zur Darstellung. Beide sind jedoch relativ unscharf. Bei zwei Proben kommt nur eine (KG4518, KG4461) bzw. keine (KG4517, KG4465) Bande zur Darstellung. Näheres hierzu siehe Kapitel 3.5. Die angegebenen Nummern entsprechen den laufenden Nummern der Marburger Präventionsallianz.

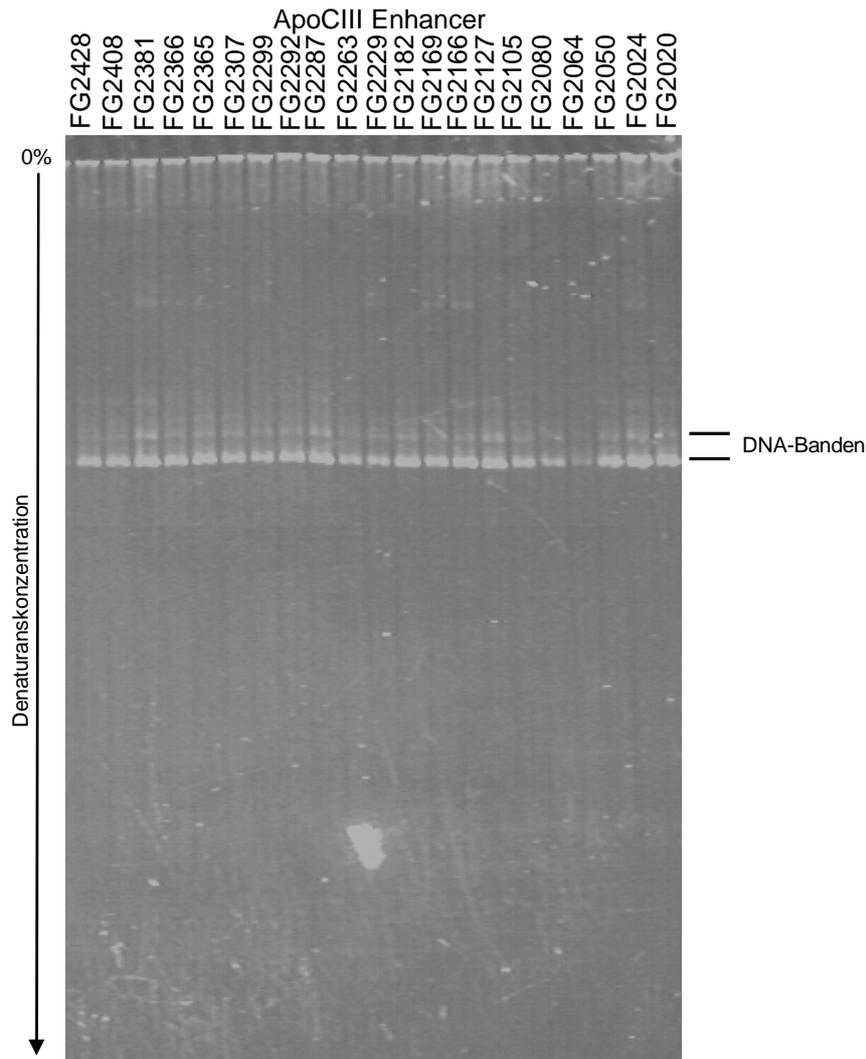


Abbildung 29: DGGE mit nebeneinander aufgetragenen Proben der Fallgruppe (FG) des ApoCIII Enhancers nach den in Tabelle 3-3 gezeigten Bedingungen in Laufrichtung von oben nach unten. Hier kommen zwei relativ scharfe Banden zur Darstellung. Die angegebenen Nummern entsprechen den laufenden Nummern der Marburger Präventionsallianz.

3.5 Identifizierung auffälliger Proben in der DGGE

Zum Zweck der Identifizierung bisher unbekannter Mutationen in den bis dato nur wenig untersuchten Genabschnitten der regulatorischen Sequenzen von Apolipoproteinen wurde für diese Arbeit ein Mutationsscreening ausgewählter Apolipoproteingenabschnitte von 264 Patienten der Marburger Präventionsallianz durchgeführt.

Von diesen insgesamt 1056 untersuchten Proben waren 988 auswertbar. Unter diesen fanden sich insgesamt 14 in der DGGE auffällige Proben, die dann sequenziert wurden. Dabei zeigte sich lediglich eine echte Mutation im Gen des ApoAIV Promoters. Bei den nicht auswertbaren Proben ließen sich auch durch

die Variation der Versuchsbedingungen keine PCR-Amplifikate in der DGGE darstellen. Möglicherweise ist dies durch eine nicht vollständige Verhinderung der Ausbildung von Stem Loops in der PCR zu erklären. Hierdurch könnten fehlerhafte DNA-Templates entstanden sein, die dann in der DGGE nicht zur Darstellung kommen können.

Zum Teil ließen sich Proben jedoch nicht amplifizieren. Da die PCRs nur stichprobenartig überprüft wurden, könnten somit nicht amplifizierte Proben auf die DGGE-Gele geladen worden sein. Diese kämen dann nicht zur Darstellung. Zum endgültigen Nachweis von Mutationen in den auffälligen Proben aus der DGGE, wurden die fraglichen Proben, sowie eine der als unauffällig deklarierten Proben erneut amplifiziert, auf einem Agarosegel aufgetrennt, mithilfe des Qiaex II Gel Extraction Kits der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) isoliert und anschließend sequenziert.

Tabelle 3-4: Übersicht über die Anzahl (n) der untersuchten, verwendbaren, auffälligen und mutierten Proben. Von 1056 untersuchten Proben, konnten 988 ausgewertet werden, von denen wiederum 14 als auffällig in der DGGE deklariert wurden. Diese 14 Proben wurden sequenziert und brachten eine Mutation hervor. (n = Anzahl der Proben)

Fragment	n_{untersucht}	n_{verwendbar}	n_{auffällig}	n_{mutiert}
ApoAI Promoter	264	262	2	0
ApoAIV Promoter	264	260	1	1
ApoCIII Enhancer	264	226	2	0
ApoCIII Promoter	264	240	9	0
gesamt	1056	988	14	1

Die Abbildungen 30 bis 34 zeigen Gelausschnitte der Elektrophoresen, bei denen als auffällig deklarierte Proben auftraten.

Bei den Proben des ApoAI Promoters zweier Patienten kommt jeweils einmal die obere und einmal die untere Bande nicht zur Darstellung. Alle weiteren Proben wiesen eine unscharfe obere, sowie eine schärfere untere Bande auf. Die Sequenzierung dieser beiden als auffällig betrachteten Proben zeigte jedoch die Wildtypsequenz des ApoAI Promoters.

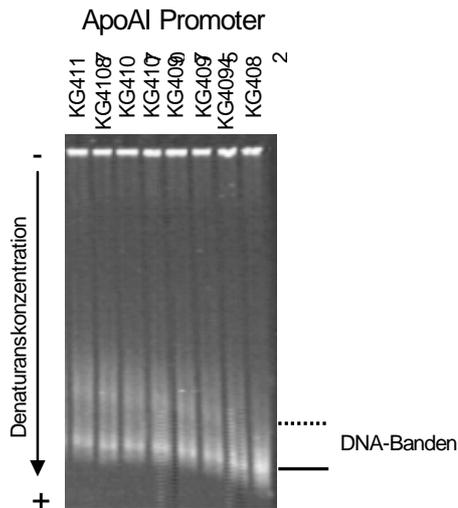


Abbildung 30: Abgebildet ist die obere Hälfte eines DGGE-Gels mit Proben der Kontrollgruppe (KG) des ApoAI Promoters. Bei Probe 4082 scheint die bei allen Proben ohnehin nur schwach zu erkennende obere Bande (gestrichelte Linie) gänzlich zu fehlen. Die Sequenzierung dieser Probe zeigte jedoch auch für diesen Patienten die Wildtypsequenz.

Die in den Abbildungen angegebenen Nummern entsprechen den laufenden Nummern der Marburger Präventionsallianz.

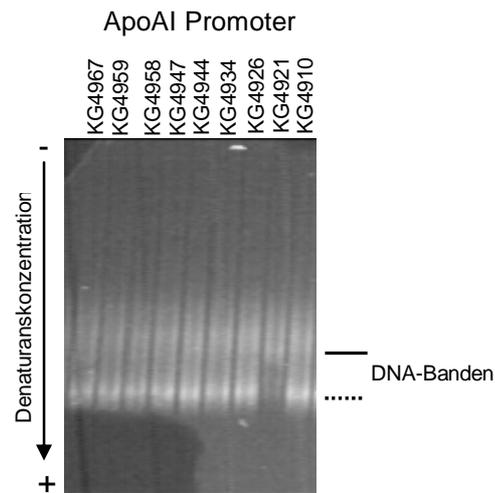


Abbildung 31: Abgebildet ist hier die obere Hälfte eines DGGE-Gels mit Proben der Kontrollgruppe (KG) des ApoAI Promoters. Bei Probe 4921 scheint die untere Bande (gestrichelte Linie) zu fehlen. Die Sequenzierung dieser Probe zeigte trotzdem die Wildtypsequenz des ApoAI Promoters.

Die Auswertung der DGGE des ApoCIII Promoters zeigte neun Proben, bei denen nicht die zwei relativ unscharfen Banden der sonstigen ApoCIII Promoter-Proben auftraten. Hier erschien jeweils nur eine Bande, welche etwas oberhalb der unteren Wildtypbande lag. Die Sequenzierung aller dieser Proben zeigte jedoch ebenfalls die Wildtypsequenz des ApoCIII Promoters.

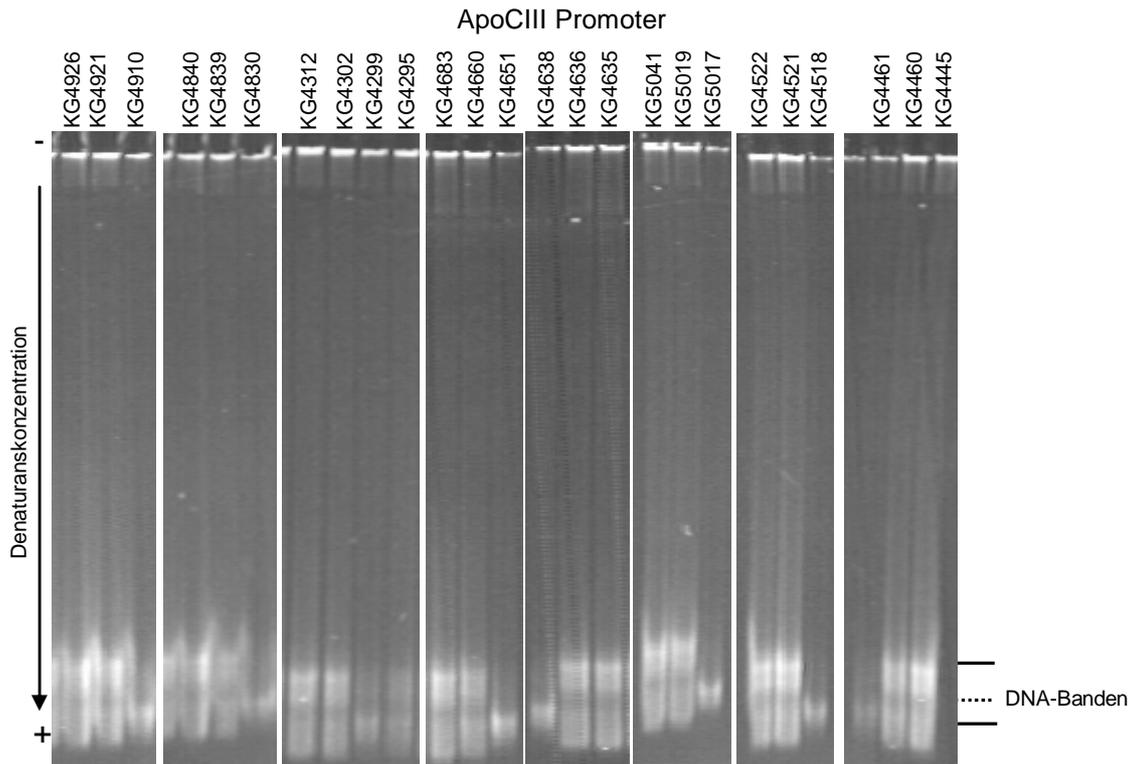


Abbildung 32: Mehrere DGGE mit Proben der Kontrollgruppe des ApoCIII Promoters zeigten ähnlich veränderte Proben (Proben 4461, 4518, 5017, 4638, 4651, 4295, 4299, 4830 und 4910). Gezeigt ist hier jeweils nur der obere Abschnitt des jeweiligen DGGE-Gels. Bei allen auffälligen Proben erscheint anstelle zweier eher unscharfer Banden eine relativ scharfe Bande (gestrichelte Linie) zwischen den beiden Banden der als Wildtyp deklarierten Proben. Die angegebenen Nummern entsprechen den laufenden Nummern der Marburger Präventionsallianz.

Die DGGE des ApoCIII Enhancers zeigten in einem Fall eine Probe mit drei scharf abgebildeten Banden, während die weiteren Proben nur zwei Banden zeigten. Teilweise schien auch bei anderen Proben diese dritte Bande aufzutreten. Diese war dann jedoch deutlich schwächer als bei der in Abbildung 33 gezeigten Probe 2019. Die Sequenzierung der auffälligen Probe zeigte die Wildtypsequenz des ApoCIII Enhancers.

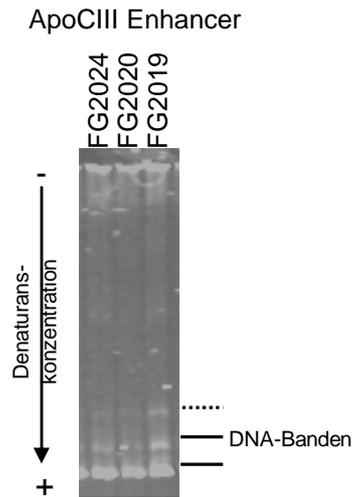


Abbildung 33: Zu sehen ist die obere Hälfte eines DGGE-Gels mit Proben der Fallgruppe des ApoCIII Enhancers. Bei der Probe 2019 tritt eine dritte Bande (gestrichelte Linie) deutlich zu Tage. Die Sequenzierung zeigte trotzdem die Wildtypsequenz des ApoCIII Enhancers. Die angegebenen Nummern entsprechen den laufenden Nummern der Marburger Präventionsallianz.

Im Falle des ApoAIV Promoters zeigte sich nur eine leicht veränderte Probe. Hier schien die untere der beiden Banden leicht abgeschwächt im Vergleich zu den anderen Proben des ApoAIV Promoters. Abbildung 34 zeigt den diskreten Unterschied zwischen mehreren Wildtypproben und der als auffällig deklarierten Probe.

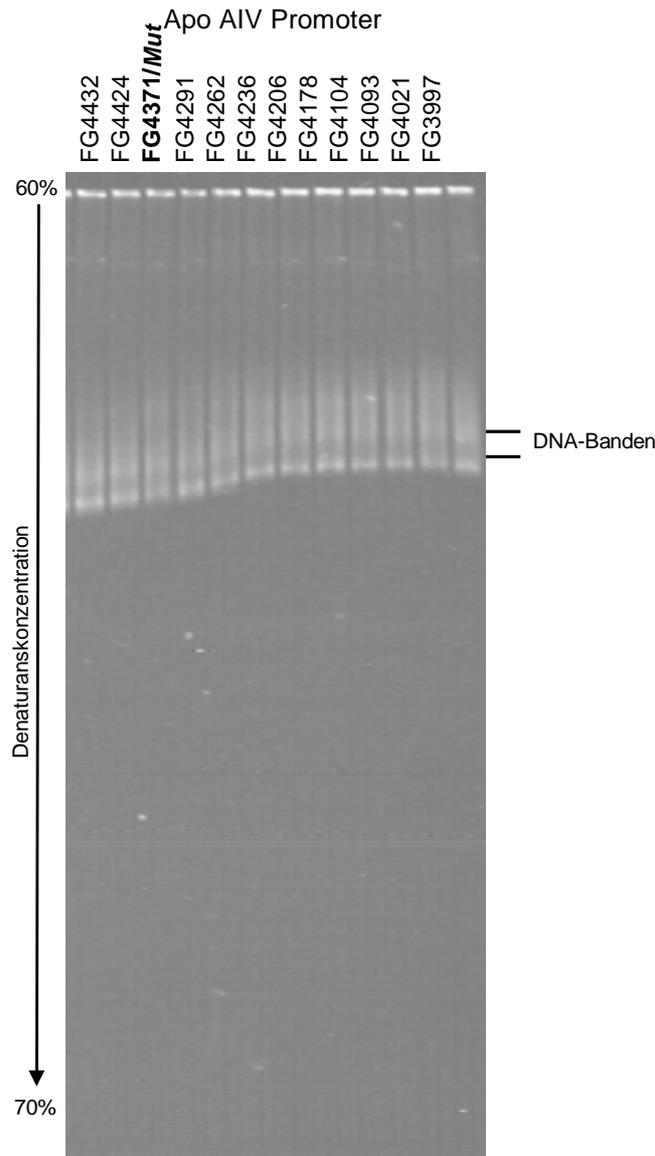


Abbildung 34: Identifizierung einer auffälligen Probe in einem DGGE-Gel mit Proben der Fallgruppe (FG) des ApoAIV Promoters (FG4371/ Mut). Die untere Bande der auffälligen Probe erscheint abgeschwächt. Abbildung 35 auf Seite 106 zeigt das Ergebnis der Sequenzierung dieser Probe.

3.6 Dokumentation einer ApoAIV Promoter-Mutation bei einem Probanden der Marburger Präventionsallianz

Alle Proben mit auffälligem Wanderungsverhalten in der DGGE wurden sequenziert. In keiner Probe des ApoAI Promoters, ApoCIII Enhancers und ApoCIII Promoters konnten Mutationen nachgewiesen werden. Die Sequenz der auffälligen Probe des ApoAIV Promoters zeigte jedoch eine echte Mutation. Es handelt sich hierbei um eine Basensubstitution von Cytosin durch Guanin an Nukleotidposition -63 des ApoAIV-Gens (s. Abbildung 35). Diese war zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung unbekannt. Mittlerweile ist sie als rs5090 (-63G à C,

APOA4_M35) in die Ensembl.org-Datenbank aufgenommen.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=5089 vom 07.12.2011)

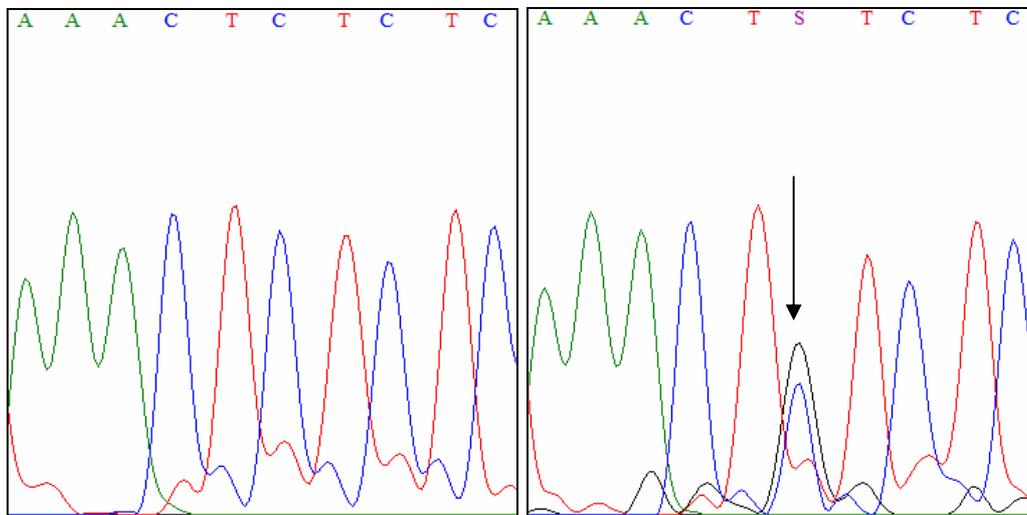


Abbildung 35: ApoAIV Wildtyp (links) versus ApoAIV Promoter -63C à G (rechts, entsprechend der markierten Probe „FG4371/ Mut“ in Abbildung 34).

Dieser SNP liegt an Nukleotidposition 11q:116694055

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?g=ENSG00000110244;r=11:116691419-116694022;t=ENST00000357780 vom 08.12.2011). Sein

ursprüngliches Allel, das C-Allel, kommt je nach Untersuchung mit einer Frequenz von 4 bis 6,2%, sein G-Allel mit 93,8 bis 95% vor. Die klinische Signifikanz ist noch unklar. Die Validierung wurde durch das 1000Genome-Projekt (s. Kap. 1.6.4.1), Frequenzanalysen und sogenannte Cluster-Eingaben, das heißt verschiedene Einzelarbeiten, ermöglicht. (Liu et al., 2009),

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=5090 vom 08.12.2011)

Die Probe mit der Mutation stammte von einem zum Zeitpunkt der Datenerhebung 49jährigen, 184cm großen, 73kg schweren, männlichen Probanden, bei dem 2003 aufgrund eines Nicht-ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkts eine Herzkatheteruntersuchung durchgeführt worden war. Hierbei wurde die Diagnose einer koronaren Dreifäßkrankheit gestellt. Bis zu diesem Zeitpunkt hatte der Patient keinerlei antihypertensive oder lipidsenkende Therapie erhalten. Das kardiovaskuläre Risikoprofil wies eine erhöhte Triglyzeridkonzentration (175mg/dl), geringfügig erniedrigte HDL- (38mg/dl) und erhöhte Lipoprotein(a)- (46mg/dl) Konzentrationen auf. Der LDL-Spiegel war mit 92mg/dl im gewünschten Bereich. Eine arterielle Hypertonie oder ein Diabetes mellitus lagen nicht vor.

Selbst im Vergleich zu den Probanden der Fallgruppe wies der betroffene Patient relativ hohe ApoAI-Spiegel (136mg/dl) auf.

Abbildung 36 zeigt die gesamte bekannte ApoAIV Promotersequenz (Karathanasis, 1985) mit dem in dieser Arbeit analysierten Bereich. Der gefundene Polymorphismus liegt 57 Basen vor dem HRE des Elements C im proximalen ApoAIV Promoterbereich. Mit dieser sind im gesamten ApoAIV Promoter lediglich sieben Polymorphismen bekannt. Diese liegen alle in dem in dieser Arbeit untersuchten Bereich.

-914	GAGATTTAAAGTATGTGGGAGGCTGTGCTTAGGTTATATGYAAA	-871
-870	TACTATGCCATTTTATATCAAGGACTTGAACATCCATGGATTTTG	-826
-825	GTATCTGCAGAGGGTCCTGGAATCAATTTCCCATGGAGACTGA	-783
-782	GAGATGACCGTACTACCCACTTCGCAAGCAATGTCTTCTTTAAT	-739
-738	GTACTGAACCATCCCATTGTTTCAGAGGAGAACTGAAGCTCAG	-696
-695	GGCTTTGAATAACTAGACCAAGGAGGCACAGCATGGGAGTGG	-654
-653	GACATGAAGCACTCTACAATTAACCCTTTCAGGACAAGGCCCTG	-610
-609	TCTCCCACACCCATCTGCCCAAAGGCTCTCCAGGGCCCCCTCC	-567
-566	TCTTGGGTGTACCTTGACAAGAGACCTAGATTTTAGCTCACTAT	-523
-522	GCTGTCTGCAGTCCTGGATGGTCCCCTCCAGTGTCTGGTGCT	-480
-479	CTGAGATGGAGTCAGCATTAGTGGCGGATGTGGAGACTGGJGG	-438
Element E		
-437	GGACCTGTCTTCACTGGGGTAGACAGAGGAGAT <u>GTGGACTTTG</u>	-395
-394	<u>CCCCC</u> CATGAGCCCGGCACAAACCCAGAGCCGCCAGCAGGGC	-353
-352	CTC RAGK CATCAGTCCCGGGCTCATGGGCTCCCT S AGGTGTTT	-310
-309	CTCCTACTGTTTTCCGTTCCCCTCCTCCCTTCCATGCTGAGGTT	-266
-265	GGTGGGGTGGGGG K GGGGGTGCCACGCACGGAACAGCCAC	-225
-224	CA Y TTCTAACTATCGC Y TGAGCCCTGATCTGCTGTCAGCTTCCA	-181
Element C		
-180	CGTAGTCTCAGGGTCACAAAAGTCCAAGAGGCCCTCTTGGGAAT	-138
-137	<u>GTGTCACCTTCCAGCGTG</u> GAGTCACACTGAGGAAGGAGGAGG	-96
-95	GGAGGGCAGCCAGGGGGGTGGCGATAGGGAGAS S AGTTTAAA	-55
-54	TGTCTGGCTGGCTCTGAGCTTCAGTCAGTTCCCCTGCAGCYC	-12
-11	AGGTGAGCTJCTC	+1

Abbildung 36: Sequenz des ApoAIV Promoters nach Karathanasis et. al (Karathanasis et al., 1986) mit den Hormone Response Elements in den Elementen C und E (durch graue Hinterlegung und Unterstrich gekennzeichnet) (Ktistaki et al., 1994; Sauvaget et al., 2002). Die in dem gezeigten Bereich bekannten Mutationen sind durch Fett- und Kursivdruck gekennzeichnet. Die in der vorliegenden Arbeit entdeckte Mutation ist durch Fett- und Kursivdruck und graue Hinterlegung markiert. Die eckigen Klammern markieren den in dieser Arbeit untersuchten Bereich.

3.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse

3.7.1 Deskriptive Statistik zur Fall- und Kontrollgruppe dieser Arbeit

Das Studiendesign sah eine Einteilung der Studienpopulation in eine Fallgruppe mit einem BMI unter 25kg/m^2 und Triglyzeridkonzentrationen über 150mg/dl sowie eine Kontrollgruppe mit einem BMI unter 25kg/m^2 und Triglyzeridspiegeln unter 150mg/dl vor.

Mit einem mittleren BMI von $22,8\text{kg/m}^2$ in der Fall- und $22,96\text{kg/m}^2$ in der Kontrollgruppe zeigte sich hier ein gutes Matching dieses Parameters. Entsprechend zeigte das errechnete Konfidenzintervall $([-0,55; 0,22])$ keinen statistisch signifikanten Unterschied auf.

Die mittlere Triglyzeridkonzentration in der Fallgruppe war mit $219,67\text{mg/dl}$ im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $93,41\text{mg/dl}$ statistisch signifikant erhöht (Konfidenzintervall (KI): $[111,09; 141,43]$). Dies entsprach ebenfalls dem Studiendesign.

Entgegen dem geplanten Design ergaben sich jedoch auch statistisch signifikant erhöhte Cholesterinwerte in der Fallgruppe (Mittelwert (MW): $199,76\text{mg/dl}$) gegenüber der Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von $172,77\text{mg/dl}$ (KI: $[16,21; 37,77]$).

Auch die LDL-Konzentration war in der Fallgruppe (MW: $118,73\text{mg/dl}$) statistisch signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe (MW: $107,59\text{mg/dl}$; KI: $[1,57; 20,72]$).

Die mittlere HDL-Konzentration war in der Fallgruppe mit $38,66\text{mg/dl}$ statistisch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (MW: $46,5\text{mg/dl}$; KI: $[-11,12; -4,56]$).

Ebenfalls zeigte sich mit einem p-Wert $p < 0,05$ ($p = 0,031$) in der Fallgruppe ($25,4\%$ der Patienten) statistisch signifikant häufiger ein Diabetes mellitus Typ II als in der Kontrollgruppe ($16,8\%$ der Probanden).

Die Patienten der Fallgruppe mit diesem im Allgemeinen als noch ungünstiger anzusehenden kardiovaskulären Risikoprofil wiesen allerdings im Mittel statistisch signifikant höhere ApoAI-Konzentrationen auf (MW der Fallgruppe: $130,66\text{mg/dl}$) als die Patienten der Kontrollgruppe (MW: $113,19\text{mg/dl}$; KI: $[10,11; 24,87]$).

Interessanterweise war die Prävalenz der KHK in der Fallgruppe (67,42%) nahezu gleich der Prävalenz in der Kontrollgruppe (67,7%). Entsprechend fand sich hier kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 1,05$), ebenso wie auch im Bezug auf das mittlere Alter ($MW_{\text{Fallgruppe}}: 61,86$ Jahre, $MW_{\text{Kontrollgruppe}}: 60,82$ Jahre; KI: [-2,59; 4,68]).

Insgesamt waren Männer in beiden Studiengruppen überrepräsentiert (Fallgruppe: ♀: 36,57% ♂: 63,43% vs. Kontrollgruppe: ♀: 37,7% ♂: 62,3%). Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Geschlechtsverteilung zwischen Fall- und Kontrollgruppe ergab sich nicht ($p = 0,100$).

Tabelle 3-5 zeigt eine tabellarische Gegenüberstellung der einzelnen Parameter der Fall- und Kontrollgruppe mit den Standardabweichungen und Konfidenzintervallen bzw. p-Werten.

Tabelle 3-5: Vergleich der Fall- mit der Kontrollgruppe. In der äußeren rechten Spalte sind die zugehörigen Konfidenzintervalle bzw. p-Werte angegeben. Die Unterschiede zwischen den Triglyzerid-, Cholesterin-, LDL- und HDL-Plasmakonzentrationen, sowie zwischen den Prävalenzen eines Diabetes mellitus sind statistisch signifikant (Kursivdruck). Trotz insgesamt ungünstigeren Risikoprofils der Patienten der Fallgruppe ist die KHK-Prävalenz in beiden Gruppen etwa gleich hoch. Als protektiver Faktor fällt eine im Mittel höhere ApoA1-Konzentration in der Fallgruppe auf. (KG = Kontrollgruppe, FG = Fallgruppe, n = Anzahl der Proben in der jeweiligen Gruppe, KI = Konfidenzintervall, p = p-Wert)

Variable	Kontrollgruppe (n =130)	Fallgruppe _{gesamt} (n =134)	KG vs FG _{gesamt}
Triglyzeride (mg/dl; KI)	93,41 ± 29,35	219,67 ± 83,38	<i>[111,09; 141,43]</i>
BMI (kg/m ² ; KI)	22,96 ± 1,52	22,8 ± 1,65	<i>[-0,55; 0,22]</i>
Cholesterin (mg/dl; KI)	172,77 ± 41,60	199,76 ± 47,47	<i>[16,21; 37,77]</i>
HDL (mg/dl; KI)	46,50 ± 14,46	38,66 ± 12,7	<i>[-11,12; -4,56]</i>

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von Seite 110

Variable	Kontrollgruppe (n =130)	Fallgruppe _{gesamt} (n =134)	KG vs FG _{gesamt}
LDL (mg/dl; KI)	107,59 ± 35,92	118,73 ± 42,36	[1,57; 20,72]
Apo AI (mg/dl; KI)	113,18 ± 30,60	130,66 ± 30,56	[10,11; 24,87]
Alter (Jahre; KI)	60,82 ± 16,48	61,86 ± 13,58	[-2,59; 4,68]
KHK (%; p)	67,7	67,42	p = 0,105
Typ II Diabetes (%; p)	16,8	25,4	p = 0,031
Geschlecht (%; p)	♂: 62,3 ♀: 37,7	♂: 63,43 ♀: 36,57	p = 0,100

Der Patient mit Polymorphismus weist gegenüber den anderen Probanden der Fallgruppe mit 175mg/dl gegenüber 220,0mg/dl eine eher niedrige Triglyzeridkonzentration auf. Entsprechend dem Studiendesign lag diese Konzentration jedoch deutlich über der mittleren Triglyzeridkonzentration der Kontrollgruppe (MW: 93,41mg/dl). Passend zu der Beobachtung eines im Mittel etwa gleich hohen BMI in der Fall- und Kontrollgruppe (MW: 22,91 kg/m² bzw. 22,96 kg/m²), wich auch der BMI des Patienten mit Mutation nur geringfügig von diesen Mittelwerten ab (BMI = 21,6 kg/m²).

Das Risikoprofil in Bezug auf die Entwicklung einer KHK erscheint bei Betrachtung der erfassten Parameter für den Patienten mit Mutation eher ein moderates Risiko für eine KHK zu ergeben. Die Gesamtcholesterinkonzentration liegt mit 165mg/dl vs. 200,02mg/dl in der Fall- und 172,77mg/dl in der Kontrollstudie niedriger als in den beiden Studienarmen. Ebenso liegt die LDL-Konzentration

(92mg/dl) bei diesem Patienten niedriger als in der Fallgruppe (MW: 118,94mg/dl) und der Kontrollgruppe (MW: 107,59mg/dl). Der ApoAI-Spiegel ist zudem mit 136mg/dl höher als in den beiden anderen Gruppen (MW_{Fallgruppe}: 129,65mg/dl; MW_{Kontrollgruppe}: 113,18mg/dl). Auch ist der Patient mit 49 Jahren etwa 10 Jahre jünger als die erfassten Probanden der beiden anderen Gruppen im Mittel (MW_{Fallgruppe}: 61,95 Jahre; MW_{Kontrollgruppe}: 60,82 Jahre). Die Diagnose eines Diabetes mellitus war für den Patienten bisher nicht gestellt worden. Lediglich die HDL-Konzentration lag mit 38mg/dl etwa gleich hoch wie in der Fallgruppe (MW: 38,55mg/dl) und damit deutlich unter der mittleren HDL-Konzentration der Probanden der Kontrollgruppe (MW: 46,50mg/dl). Trotz dieser Parameter war der Patient mit dem Polymorphismus aufgrund eines Nicht-ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkts bei Drei-Gefäß-KHK aufgenommen worden. Tabelle 3-6 zeigt eine tabellarische Gegenüberstellung der Parameter der Fallgruppe ohne den Patienten mit Mutation, der Kontrollgruppe und des Patienten mit mutiertem ApoAIV Promoter. Konfidenzintervalle sind hier nicht angegeben, da diese bei Einzelwerten keine verwertbare Aussage liefern können.

Tabelle 3-6: Vergleich der erfassten Parameter des Patienten mit Mutation und den weiteren Probanden der Fall- und Kontrollgruppe. Cholesterin-, LDL- und ApoAI-Konzentration, sowie der studienbedingt relativ niedrige BMI, ein im Vergleich niedriges Alter und das Fehlen eines Diabetes mellitus Typ 2 erscheinen als protektive Faktoren. Lediglich der Triglyzeridspiegel ist (studienbedingt) gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Die HDL-Konzentration ist vergleichbar mit der mittleren HDL-Konzentration in der Fallgruppe und etwas niedriger als in der Kontrollgruppe. Trotz dieses eher moderaten Risikoprofils in Bezug auf die Entwicklung einer KHK wurde bei dem Patienten mit Mutation eine Drei-Gefäß-KHK diagnostiziert. n = Anzahl der Proben in der jeweiligen Gruppe

Variable	Fallgruppe		Patient mit Mutation (ApoAIV Prom -63C à G; n = 1)
	ohne Patienten mit Mutation (n =133)	Kontrollgruppe (n =130)	
Triglyzeride (mg/dl)	220,01 ± 83,60	93,41 ± 29,35	175

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Seite 112

Variable	Fallgruppe ohne Patienten mit Mutation (n =133)	Kontrollgruppe (n =130)	Patient mit Mutation (ApoAIV Prom -63C à G; n = 1)
BMI (kg/m ²)	22,81 ± 1,65	22,96 ± 1,52	21,6
Cholesterin (mg/dl)	200,02 ± 47,55	172,77 ± 41,60	165
HDL (mg/dl)	38,55 ± 12,75	46,50 ± 14,46	38
LDL (mg/dl)	118,94 ± 42,26	107,59 ± 35,92	92
Apo AI (mg/dl)	129,65 ± 30,72	113,18 ± 30,60	136
Alter (Jahre)	61,95 ± 13,58	60,82 ± 16,48	49
KHK (%; ja/ nein)	67,18	67,7	ja
Typ II Diabetes (%; ja/ nein)	25,6	16,8	nein
Geschlecht (%)	♂: 63,16 ♀: 36,84	♂: 62,3 ♀: 37,7	♂

Aufgrund der relativ inhomogenen Verteilung der Laborparameter lassen sich die Unterschiede zwischen der Fall- und Kontrollgruppe nicht durch Mutationen in den regulatorischen Sequenzen der untersuchten Genbereiche erklären. In Hinblick auf die Auswirkungen der gefundenen Mutation kann aufgrund eines Einzelbefundes keine statistisch sinnvolle Aussage getroffen werden.

3.7.2 Statistische Auswertung der Fall-Kontroll-Studie

Es ist offensichtlich, dass bei einer Fallzahl von $n = 1$ keine statistisch belastbare Aussage möglich ist. Bei den erhobenen Daten handelt es sich um Daten eines zweiseitigen Tests im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie. Aufgrund der geringen Anzahl gefundener Mutationen darf zur Berechnung der statistischen Signifikanz des Häufigkeitsunterschieds von Mutationen zwischen der Fall- und Kontrollgruppe lediglich Fishers exakter Test angewendet werden. Im Rahmen der Fall-Kontroll-Studie darf zudem die Odds Ratio für das Auftreten einer Mutation in der entsprechenden Gruppe berechnet werden. Wie in der medizinischen Wissenschaft üblich, wurde für diese Studie das Niveau des α -Fehlers auf $\alpha = 5\%$ festgelegt.

Insgesamt konnte eine Mutation identifiziert werden.

Tabelle 3-7: Die Vierfeldertafel zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse der Studie.

TG = Triglyzeridplasmaspiegel in mg/dl; BMI = Body Mass Index in kg/m^2

	Kontrollgruppe TG<250, BMI<25	Fallgruppe TG>250, BMI <25
mutiert	0	1
nicht mutiert	130	133

Für die Abschätzung der Auswirkung der untersuchten Risikofaktoren auf das zugrunde gelegte Merkmal dient in einer Fall-Kontroll-Studie die Odds Ratio (OR). Bei den vorliegenden Merkmalsausprägungen lässt sich jedoch kein Wert ermitteln. Sie würde wie folgt errechnet:

$$OR = \frac{1/0}{133/130} = \emptyset$$

Dazu passt die Tatsache, dass auch nach Fishers exaktem Test der Unterschied der Häufigkeiten von Mutationen zwischen Fall- und Kontrollgruppe mit einem p-Wert von $p > 0,05$ nicht signifikant ist. Der p-Wert für die einseitige Fragestellung wurde hier nach folgender Formel berechnet:

$$P_{\text{einseitiger_Test}} = \frac{(0+1)! * (130+133)! * (0+130)! * (1+133)!}{264! * 0! * 1! * 130! * 133!} = 0,508$$

Somit ergibt sich für die zweiseitige Fragestellung ein p-Wert von

$$P_{\text{zweiseitiger_Test}} = 0,508 + 0,508 = 1,016 .$$

Im Hinblick auf die Fragestellung kann keine statistisch einwandfrei gestützte Aussage getroffen werden. Mit diesen Resultaten muss die Nullhypothese weiterhin angenommen werden.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde nach Mutationen in regulatorischen Sequenzen der Gene der Apolipoproteine AI, AIV und CIII gesucht, um zum einen neue Defekte der Lipidregulation, zum anderen aber auch eine weitere Erklärung der von Goudriaan et al. beschriebenen Konstellation von niedrigem BMI und hohem Triglyzeridplasmaspiegel bei fehlendem VLDL-Rezeptor (Goudriaan et al., 2001) beizutragen.

Die Regulation des Triglyzeridstoffwechsels ist überaus komplex und auch die Atherogenität erhöhter Triglyzeride scheint von der primären Ursache der Triglyzeriderhöhung abhängig zu sein (i.e. Triglyzeriderhöhung bei Diabetes oder bei Lipasedefekten, nephrotischem Syndrom oder ausgeprägter Adipositas). In der Tat spielen zahlreiche regulative Elemente des Triglyzeridstoffwechsels eine wesentliche Rolle sowohl für den Triglyzeridspiegel, als auch für dessen Atherogenität. Potentielle Effektoren sind zum Beispiel die Apolipoproteine, die, wie in Kapitel 1.4 beschrieben, wichtige Funktionen für den Transport und die Clearance der Triglyzeride haben.

Die Gene der hier untersuchten Apolipoproteine sind in einem gemeinsamen Gencluster organisiert und werden zum Teil durch gemeinsame Regulatoren in ihrer Expression beeinflusst (Karathanasis et al., 1983; Karathanasis, 1985). Hier ist besonders der ApoCIII Enhancer, der distale Abschnitt des ApoCIII Promoters, von Bedeutung, der alle drei Gene in ihrer Transkription verstärkt, wie Kapitel 1.6.5.1.1 erläutert.

Die regulatorischen Sequenzen der Apolipoproteine sind insgesamt bisher nur wenig untersucht. Einige Polymorphismen sind vorbeschrieben, von denen einige wenige mit bestimmten Phänotypen in Verbindung gebracht werden konnten. Hier ist exemplarisch der MspI-Polymorphismus (rs670; -75A à G) des ApoAI Promoters zu nennen, für den bei Homozygotie für das A-Allel ein erhöhtes KHK-Risiko gefunden wurde (Wang et al., 1996).

Großenteils sind die bekannten Mutationen jedoch noch nicht validiert, wie an weiteren bekannten ApoAI Promotermutationen zu sehen ist (-246C à T (rs2542053), -284C à G (rs2542054) und -285G à C (rs2727786)). Die letzte bekannte ApoAI Promotermutation (-325A à C (rs12718466)) ist zwar validiert, weitere Erkenntnisse, zum Beispiel zur klinischen Signifikanz, fehlen jedoch

noch. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?SITE=NcbiHome&submit=Go> vom 06.12.2011) Es wird deutlich, dass hier noch viel Forschungspotential vorhanden ist.

Aufgrund dieser eher spärlichen Datenlage wurde in dieser Arbeit das Hauptaugenmerk auf potentielle Mutationen in regulatorischen Bereichen gelegt. Deren mögliche Auswirkung auf den Triglyzeridstoffwechsel sollte durch eine Fallkontrollstudie aufgedeckt werden. Dafür wurden aus dem Kollektiv der Marburger Präventionsallianz (Schaefer et al., 2000) 264 Patienten ausgewählt, aus denen eine Kontroll- und eine Fallgruppe gebildet wurden.

4.1 Diskussion des Studiendesigns

Einschlusskriterien für die Kontrollgruppe war die gemeinhin als normal bezeichnete Konstellation von niedrigem BMI (unter 25kg/m^2) und niedrigem Triglyzeridplasmaspiegel (unter 150mg/dl). Nach diesen Vorgaben wurden 130 Personen aus dem Kollektiv der Marburger Präventionsallianz für die Kontrollgruppe ausgewählt. In die Fallgruppe wurden 134 Personen mit einem BMI von weniger als 25kg/m^2 und einer Triglyzeridplasmakonzentration von mehr als 150mg/dl aufgenommen. Diese Einteilung entsprach der bereits in der Arbeit von Soufi et al. am VLDL-Rezeptor verwendeten Gruppen (Soufi et al., 2007).

Zunächst wurde das gesamte Studienkollektiv auf Polymorphismen gescreent. Eine mit den Ergebnissen durchgeführte Fall-Kontroll-Studie sollte dann Klarheit darüber verschaffen, ob die entdeckten Polymorphismen einen Einfluss auf die beschriebene BMI-Triglyzerid-Konstellation hätten.

Fall-Kontroll-Studien eignen sich sehr gut, um einen möglichen Zusammenhang zwischen einem Risikofaktor und dem dazugehörigen Merkmal aufzudecken. Durch die retrospektive Untersuchung der Daten lassen sie sich zudem deutlich schneller, einfacher und günstiger im Sinne einer ersten „Pilotstudie“ durchführen als zum Beispiel prospektive Kohortenstudien. Deshalb eignen sie sich in einem relativ unerforschten Gebiet, wie dem hier vorgestellten, deutlich besser zur Klärung unklarer Zusammenhänge von vermuteten Risikofaktoren und einer bestimmten Laborwert- oder Krankheitsausprägung.

Der gravierende Nachteil solch retrospektiver Studien liegt im Allgemeinen in der Datenqualität. Fehlende Daten über die untersuchte Population können

oftmals nicht mehr oder nur mit sehr großem Aufwand ergänzt werden. Auch in dieser Arbeit musste das Studienkollektiv aufgrund dieses Problems um 14 Patienten reduziert werden, so dass im Endeffekt das oben genannte Kollektiv von 264 Patienten untersucht werden konnte. Gemessen an der großen Zahl der in der Marburger Präventionsallianz erfassten Daten, ist dies allerdings eine zu vernachlässigende Größenordnung.

Außerdem kann es bei retrospektiven Studien leicht zu einem Sampling Bias kommen (s. Kap. 4.2). In die Datenbank der Marburger Präventionsallianz werden nur Patienten aufgenommen, die einer Herzkatheteruntersuchung unterzogen worden sind. Damit haben sie per se ein höheres Risiko für eine koronare Herzkrankheit als die Normalbevölkerung.

Wichtig für die spätere Aussagekraft einer Fall-Kontroll-Studie ist ein gutes Matching der Kontroll- mit der Fallgruppe, das heißt eine möglichst hohe Übereinstimmung aller Parameter, die nicht die Einteilung in Fall- oder Kontrollgruppe bedingen. Tabelle 3-5 auf Seite 110 zeigt eine Gegenüberstellung der für diese Studie erfassten Parameter. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Plasmatriglyzeridspiegeln erklären sich durch das Studiendesign.

Da erhöhte Triglyzeride vermehrt bei Patienten mit Diabetes zu finden sind, erklärt dies die erhöhte Zahl von Diabetikern in dem untersuchten Kollektiv. Da zudem hohe Triglyzeridkonzentrationen meist mit niedrigen HDL Spiegeln vergesellschaftet sind, erklärt diesen Unterschied ebenfalls unser Einschlusskriterium „hohe vs normale Triglyzeride“.

Trotzdem fallen zusätzlich signifikante Unterschiede zwischen den LDL-, Cholesterin und ApoA1-Konzentrationen der beiden Gruppen auf. Ein besseres Matching wäre für weitere Studien wünschenswert, um eventuelle Auswirkungen von Mutationen erklären zu können.

Ein weiterer Kritikpunkt am Design der hier vorgestellten Studie für die klinische Relevanz können auch die untersuchten Parameter selbst sein. Das über der gesamten Arbeit stehende Interesse liegt in der Erforschung von Risikokonstellationen in Bezug auf die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit sowie in der Identifizierung möglicher neuer Therapieansätze. Mit der Klärung der Frage, ob bestimmte Mutationen in regulatorischen Abschnitten von Apolipoproteingen trotz normalen Body Mass Index' zu hohen Triglyzeridspiegeln führen und somit ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer KHK bedingen können, wird

jedoch ein Surrogatkriterium untersucht. Im Rahmen der Grundlagenforschung ist dies ein durchaus vertretbares Vorgehen für eine initiale Findungsstudie, da bisher nur spärliches Wissen über die Entstehung und die Bedeutung dieser Konstellation existiert. Folgende Studien sollten jedoch das Vorliegen einer KHK mit in die Entscheidung für die Einteilung in die verschiedenen Gruppen der Studienpopulation einfließen lassen. Nur so kann am Ende auch eine verlässliche Aussage über den Einfluss der Laborwertkonstellation auf die Entstehung der KHK getroffen werden.

4.2 Diskussion der Methodik

Zunächst wurde die DNA der gesamten Studienpopulation aufgereinigt und per Nested Polymerasekettenreaktion (Nested PCR) vervielfältigt. Diese Proben wurden dann mithilfe der DGGE auf Unterschiede im Wanderungsverhalten untersucht. Auffällig erscheinende Proben wurden sequenziert und so der eindeutige Nachweis bzw. Ausschluss von Mutationen erbracht.

Zum Nachweis neuer Mutationen in bestimmten Genbereichen gibt es eine Vielzahl von Verfahren, die sich in ihrer Sensitivität und Praktikabilität unterscheiden, wie z.B. den Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), die Heteroduplex-Analyse oder Chemical Mismatch Cleavage (CMC).

Als Standard diente lange Zeit der sogenannte Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Assay (RFLP), der den Nachweis von Mutationen durch den Verdau der DNA mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen nach Entstehung bzw. Verlust von Enzymbindungsstellen durch Mutationen ermöglicht (Botstein et al., 1980). Einige Ein-Basen-Mutationen bewirken jedoch weder die Entstehung noch den Verlust solcher Bindungsdomänen und sind somit durch den RFLP nicht detektierbar (Sheffield et al., 1989).

Bei der Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)-Methode werden zunächst die DNA-Doppelstränge denaturiert und dann auf einem Acrylamidgel aufgetrennt (Orita et al., 1989). Bei Vorliegen einer Basensubstitution verändern die DNA-Einzelstränge ihre Konformation und stoppen daher an einer anderen Stelle im Gel (Nakabayashi und Nishigaki, 1996; Nishigaki et al., 1986). Die Einzelstränge können dann beispielsweise per Silberfärbung detektiert werden (Somerville und Wang, 1981).

In GC-reichen Gensequenzen, wie den in dieser Arbeit vorliegenden, kommt es jedoch seltener zu Konformitätsänderungen als in AT-reichen. Dadurch wird die Sensitivität des SSCP in GC-reichen Genbereichen vermindert. Dies kann wiederum nur durch eine aufwendige Variation der Versuchsparameter ausgeglichen werden. (Ziemssen et al., 2001)

Frühere Arbeiten geben für die SSCP-Methode eine Sensitivität von 90% an (Kozłowski und Krzyżosiak, 2001).

Bei der Chemical Mismatch Cleavage (CMC)-Methode werden Heteroduplexe aus Wildtyp- und mutierten DNA-Strängen gebildet. Durch Versetzen der Heteroduplexe mit Hydroxylamin bzw. Osmiumtetroxid werden falsche Basenpaarungen zunächst markiert. In einem zweiten Schritt schneiden bestimmte Chemikalien wie Piperidine den DNA-Doppelstrang an der markierten Position mit dem Basenaustausch. Die so entstandenen DNA-Fragmente können dann in einer vergleichenden Elektrophorese aufgrund des unterschiedlichen Wanderhaltens identifiziert werden. (Cotton et al., 1988; Ren, 2001; Shenk et al., 1975)

Diese Methode ist im Vergleich zu der für diese Arbeit verwendeten Vorgehensweise jedoch aufwendiger, da eine größere Zahl verschiedener Schritte vorgenommen werden muss.

Bei der klassischen Heteroduplexanalyse werden die zu untersuchenden DNA-Sequenzen einer Wildtypprobe und einer Probe mit wahrscheinlicher Mutation per PCR amplifiziert. Durch Denaturierung und nachfolgender Renaturierung werden so je zwei Heteroduplexe und zwei Homoduplexe gebildet. Diese werden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch die Unterschiede im Wanderverhalten können Proben mit Basenaustausch (Heteroduplexe) von den Wildtypproben (Homoduplexe) unterschieden werden. (Nagamine et al., 1989b) Es können nur solche Mutationen detektiert werden, durch die eine ausreichende Konformitätsänderung hervorgerufen wird, so dass sie in einem Polyacrylamidgel differenziert werden können. Für diese Methode wurde von Kozłowski et al. eine Sensitivität von 81% ermittelt (Kozłowski und Krzyżosiak, 2001).

Vielfach wurde die SSCP-Methode mit der Heteroduplexanalyse kombiniert. Dadurch kann die Sensitivität insgesamt deutlich gesteigert werden (Kozlowski und Krzyzosiak, 2001; Rossetti et al., 1995). Dieses Vorgehen ist dann jedoch aufwendiger als das in dieser Arbeit beschriebene.

Aus diesen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Technik der DGGE verwendet. Für sie wurde die höchstmögliche Sensitivität aller Mutations-Nachweis-Verfahren beschrieben, je nach Untersuchung etwa 95% (Myers et al., 1985c; Nollau und Wagener, 1997; Zijngel et al., 2006).

Frühere Arbeiten unserer eigenen und anderer Arbeitsgruppen konnten zudem mit dem hier verwendeten Vorgehen erfolgreich bislang unbekannte, der Familiären Hypercholesterinämie zugrunde liegende Mutationen im LDL-Rezeptorgen und eine ebenfalls unbekannte Mutation im ApoB 100-Gen identifizieren (Nissen et al., 1998; Soufi et al., 2004; Soufi et al., 2009).

In ihrer einfachsten Ausführung ist die DGGE in der Lage, etwa 50% aller Ein-Basen-Mutationen in einer untersuchten Sequenz zu erkennen. Der Grund dafür liegt in den Schmelzdomänen der untersuchten DNA-Abschnitte, die in Kapitel 3.3.1 bereits erläutert wurden. Mutationen in Schmelzdomänen mit der höchsten Schmelztemperatur können in einer einfachen DGGE nicht gefunden werden, da die DNA schon vor Erreichen der notwendigen Denaturationskonzentration aufschmilzt (Fischer und Lerman, 1983; Gille et al., 1998; Myers et al., 1985b; Myers et al., 1985a).

Mithilfe der Polymerasekettenreaktion kann eine guanin- und cytosinreiche Sequenz, eine sogenannte GC-clamp, an die zu untersuchende Sequenz angehängt werden. Dadurch entstehen eine Domäne mit relativ niedriger Schmelztemperatur im Bereich der zu untersuchenden Sequenz und eine weitere Domäne mit sehr hoher Schmelztemperatur im Bereich der GC-clamp. Somit kann die untersuchte DNA in der DGGE vollständig aufschmelzen und die gesamte Sequenz untersucht werden. Dadurch wird die Sensitivität der DGGE auf etwa 95% verbessert. (Myers et al., 1985a; Sheffield et al., 1989)

Zum Nachweis einzelner Basensubstitutionen mithilfe der DGGE werden normalerweise etwa fünf bis zehn Mikrogramm DNA benötigt (Myers et al., 1985c). Durch die vorangehende Anwendung der PCR kann die benötigte DNA-Menge

auf unter fünf Nanogramm reduziert werden, ohne dabei die Sensitivität der Elektrophorese zu beeinträchtigen (Sheffield et al., 1989).

Die Anwendung der Polymerasekettenreaktion erhöht zusätzlich auch die Spezifität der gesamten Untersuchung, da durch die selektive Vermehrung der durch die Oligonukleotidprimer definierten DNA-Abschnitte nur noch diese Zielsequenzen das Wanderungsverhalten und die Bandenbildung in der DGGE bedingen. Ohne die PCR müssten die zu untersuchenden Fragmente radioaktiv markiert werden, um dann auch detektiert werden zu können. Durch die Amplifikation per PCR ist die Detektion der Produkte nach der DGGE mit Anfärbung der Amplifikate durch Ethidiumbromid möglich, was das Verfahren stark vereinfacht. (Sheffield et al., 1989)

Um die Sensitivität und Spezifität der PCR weiter zu erhöhen, wurde sie in dieser Arbeit als sogenannte Nested PCR durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.2).

Durch die Amplifizierung von größeren Genabschnitten durch eine Vor-PCR wird die Wahrscheinlichkeit der Amplifikation ungewünschter Bereiche in der zweiten PCR deutlich reduziert. Auch der Mehraufwand lässt sich mindern, indem die erste PCR, wie in dieser Arbeit geschehen, als Multiplex-PCR durchgeführt wird. Durch die Zugabe der für jeden gewünschten Abschnitt spezifischen Primerpaare werden so die definierten DNA-Bereiche vervielfältigt. In einer zweiten PCR wird dann aus diesen mithilfe eines zweiten Primerpaars nur noch der jeweils gewünschte Bereich des zu untersuchenden Gens weiter amplifiziert. Da die PCR die definierten DNA-Sequenzen exponentiell vermehrt, kann die mengenmäßige Überlegenheit der in der zweiten PCR amplifizierten Abschnitte gegenüber den in der Reaktionsmischung aus der ersten PCR noch vorhandenen Produkte eine Verfälschung der nachfolgenden Versuche verhindern.

Trotz dieses Vorgehens zeigen die Elektrophoresen nach den zweiten PCRs des ApoAI Promoters, des ApoAIV Promoters und des ApoCIII Promoters jeweils wenigstens ein weiteres Produkt (siehe Abbildungen 22 bis 25 in Kapitel 3.3.2). Hierbei könnte es sich noch um die größeren Fragmente der ersten PCR handeln. Dies würde auch erklären, warum die jeweiligen Banden dieser Nebenprodukte deutlich schwächer als die Banden der Produkte der zweiten PCR sind. Diese verbliebenen Amplifikate könnten trotz der starken Verdünnung mit

zu dem beobachteten Hintergrundrauschen in der DGGE beitragen, das in den Abbildungen des Kapitels 3.4 deutlich zu erkennen ist.

Dies kann zusätzlich durch eine gewisse Fehlerrate der Taq Polymerase bei der PCR hervorgerufen werden (Paabo und Wilson, 1988; Saiki et al., 1988). Die dadurch entstehenden fehlerhaften PCR-Produkte weisen durch diese artifiziellen Mutationen andere Schmelzpunkte auf als die gewünschten Produkte (Sheffield et al., 1989) und werden somit an anderen Positionen innerhalb des DGGE-Gels sichtbar.

Während die Versuchsbedingungen ausgetestet wurden, konnte festgestellt werden, dass in der zweiten PCR verwendete Additive wie Betaine, Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Glycerol zu starken Verschmierungen in der DGGE führten. Reste aus der ersten PCR könnten nun auch verantwortlich für das verbleibende Hintergrundrauschen in der DGGE sein. Dies musste als Kompromiss akzeptiert werden. Ohne die Reaktionszusätze in der ersten PCR wäre die gesamte Untersuchung nicht möglich gewesen.

Die Überprüfung der PCRs erfolgte zunächst stichprobenartig mithilfe einer Agarosegelelektrophorese. Jede amplifizierte PCR-Probe wurde in der nachfolgenden DGGE-Analyse auf Mutationen hin untersucht. Amplifizierte Patientenproben, welche in der ersten DGGE-Analyse nicht auswertbar waren, wurden dokumentiert und einer zweiten Analyse zugeführt (erneute DNA-Isolierung aus Patientenblut und Amplifikation nach den in dieser Arbeit beschriebenen Methoden).

Bei der Auswertung der Auffälligkeiten von Proben im DGGE-Gel handelt es sich um ein subjektives Verfahren. Die Auffälligkeit der mutierten ApoAIV-Promoter-Probe besteht in einer leichten Abschwächung einer Bande. Theoretisch hätten andere eigentlich auffällige Proben als unauffällig deklariert werden können, wenn ihr Unterschied zu den danebenliegenden Proben noch etwas weniger deutlich gewesen wäre.

Trotz der vielen in der Literatur beschriebenen positiven Erfahrungen verschiedenster Arbeitsgruppen mit der DGGE (Myers et al., 1985a; Nollau und Wagner, 1997; Zijngel et al., 2006), zeigte die vorliegende Arbeit eine klare Schwachstelle auf. Die mehrfach beschriebene ausgesprochen hohe Sensitivi-

tät ging mit einer großen Anzahl falsch positiver Ergebnisse einher. Von den insgesamt 14 auffällig erscheinenden Proben in dieser Arbeit, wies nur eine wirklich eine Mutation auf. Damit liegt die Falsch-Positiv-Rate bei $\frac{13}{14} = 0,929$, also 92,9%.

Der in dieser Arbeit gefundene rs5090-Polymorphismus wurde zwischenzeitlich in der Internetdatenbank Ensembl.org beschrieben. Hier wird die Frequenz des C-Allels mit 4 bis 6,2% angegeben. Bei 264 untersuchten ApoAIV Promoterproben wären somit 10 bis 16 Proben mit Mutation zu erwarten gewesen. Tatsächlich wurde jedoch nur eine Probe mit Mutation in dieser Arbeit entdeckt, entsprechend ca. 0,4%. Die einfachste Erklärung für dieses Resultat könnte der bereits in Kapitel 4.2 genannte Sampling Bias sein. Angenommen der rs5090-SNP hätte eine protektive Auswirkung in Bezug auf die Entwicklung einer KHK, dann wäre durch den Einschluss ausschließlich von Patienten, die einer Linksherzkatheteruntersuchung zugeführt wurden, eine niedrigere SNP-Frequenz in dem untersuchten Kollektiv zu erwarten, da die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer KHK bei diesen Patienten gegenüber der Normalbevölkerung erhöht ist.

Obwohl unsere Arbeitsgruppe mehrfach erfolgreiche Mutationssuchen mit der DGGE durchführen konnte (Soufi et al., 2004; Soufi et al., 2009; Soufi et al., 2012; Soufi et al., 2013), ist die Diskrepanz zwischen erwarteter und tatsächlich gefundener SNP-Frequenz als Hinweis dafür zu verstehen, dass die DGGE-Ergebnisse weiterer Überprüfung bedürfen. Möglicherweise ist die Sensitivität der DGGE in den oben genannten Arbeiten von Myers et al., Nollau und Wagner und Zijng et al. überschätzt worden. Das für diese Arbeit untersuchte Studienkollektiv müsste daher am besten zusätzlich mit verschiedenen alternativen Methoden wie dem SSCP oder dem RFLP analysiert werden. Eine Kombination dieser Methoden wäre jedoch zwingend erforderlich, um ihre jeweiligen Schwachstellen auszugleichen. Somit kann die alleinige Anwendung der DGGE, ohne parallele Überprüfung durch andere Verfahren, als Kritikpunkt an der vorliegenden Arbeit herangezogen werden.

4.3 Diskussion der gefundenen Ergebnisse

Im Vergleich der erfassten Parameter der Fall- und Kontrollgruppe fallen statistisch signifikant erhöhte Triglyzerid-, Cholesterin- und LDL-Konzentrationen auf. Die Diabetes mellitus Typ II-Prävalenz in der Fallgruppe war statistisch signifikant erhöht. Zudem war die mittlere HDL-Konzentration in der Fallgruppe statistisch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe.

Es lagen im Vergleich also gewichtige Risikofaktoren für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit vor, so dass erwartet werden könnte, dass die Prävalenz der KHK in der Fallgruppe höher läge als in der Kontrollgruppe. Trotzdem ergab sich hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Fall- und Kontrollgruppe.

Es können also protektive Faktoren bei den Probanden der Fallgruppe vermutet werden, so dass diese trotz eigentlich als schlechter anzusehendem Risikoprofil nicht häufiger an einer KHK erkranken als die Probanden der Kontrollgruppe.

Hier könnte von den erfassten Parametern der BMI eine Rolle spielen. Entsprechend dem Studiendesign war dieser in beiden Gruppen jedoch etwa gleich hoch. Als alleinigem Schutzfaktor würde der BMI hier sicher zudem überschätzt. Es fallen jedoch auch statistisch signifikant erhöhte ApoAI-Konzentrationen bei den Patienten der Fallgruppe auf. Wie in Kapitel 1.6.3 beschrieben, wird dem Apolipoprotein AI über die Stimulation des reversen Cholesteroltransports eine atheroprotektive Wirkung zugeschrieben. Somit wäre die erhöhte mittlere ApoAI-Konzentration in der Fallgruppe ein möglicher protektiver Effektor.

Aufgrund der Aufgabenstellung mit entsprechender Auswahl der Studienpopulation mit Konzentration auf BMI und Triglyzeridkonzentration ist allerdings keine statistisch einwandfrei gestützte Aussage in Bezug auf die Auswirkung einer höheren ApoAI-Konzentration auf die Entwicklung einer KHK möglich.

Im Vergleich der Laborparameter des Patienten mit dem rs5090-Polymorphismus mit den anderen Probanden der Fallgruppe und den Probanden der Kontrollgruppe scheint sich ein vergleichsweise günstiges Risikoprofil in Bezug auf die Entwicklung einer KHK zu ergeben. Die Cholesterin- und LDL-Konzentrationen dieses Patienten (Cholesterin: 165mg/dl, LDL: 92mg/dl) sind niedriger als die jeweilige mittlere Konzentration in der Fall- (Cholesterin: 200,02mg/dl, LDL: 118,94mg/dl) und der Kontrollgruppe (Cholesterin:

172,77mg/dl, LDL: 107,59mg/dl). Der Patient hat im Mittel gegenüber den Probanden der Fallgruppe einen etwas erhöhten ApoAI-Spiegel (136mg/dl vs. 129,65mg/dl). Zudem war er bei Datenerfassung etwa 10 Jahre jünger als die Probanden der beiden anderen Populationen im Mittel (49 Jahre vs. Alter_{Fallgruppe}: 61,95 Jahre vs. Alter_{Kontrollgruppe}: 60,82 Jahre). Auch ein Diabetes mellitus lag bei dem Patienten mit Polymorphismus nicht vor. Lediglich die HDL-Konzentration lag in etwa gleich hoch wie bei den anderen Probanden der Fallgruppe (38mg/dl vs. 38,55mg/dl) und damit niedriger als im Mittel in der Kontrollgruppe (46,50mg/dl).

Trotz allem wurde bei diesem Patienten mit einer Drei-Gefäß-KHK die maximale Ausprägung der koronaren Herzkrankheit diagnostiziert. Somit müssen andere, nicht erfasste Parameter, das Risiko für eine KHK bei diesem Patienten erhöht haben. Da bei ihm eine Mutation im ApoAIV Promoter gefunden wurde, wäre auch die Auswirkung beispielsweise einer Loss of Function-Mutation des ApoAIV Promoters als Ursache denkbar. Durch die geringe Fallzahl von nur einer Mutation lässt sich diese These jedoch statistisch durch diese Arbeit nicht stützen.

Zur Klärung der Auswirkung der gefundenen Mutation, das heißt, ob es sich um eine Loss oder Gain of Function Mutation handelt, könnte in Zukunft eine ApoAIV-Expressionsanalyse mit vergleichenden Experimenten mit der Wildtyp- und der mutierten Sequenz des ApoAIV Promoters erfolgen. Auch ein CAT-Assay, wie von Zannis et al. beschrieben (Zannis et al., 2003), wäre eine denkbare Möglichkeit, diese Frage zu klären.

Die Überexpression des Apolipoproteins AIV führte in Mäusen zu einer schwächeren Ausprägung atherosklerotischer Läsionen sowie zu erhöhten HDL-Plasmaspiegeln (Cohen et al., 1997; Recalde et al., 2004). Ferner verstärkt es die Aktivierung der Lipoproteinlipase durch das Apolipoprotein CII (Goldberg et al., 1990), sowie in vitro den reversen Cholesteroltransport durch Stimulation des Cholesterolefflux' aus Fettzellkulturen (Stein et al., 1986; von Eckardstein et al., 1995). In Ratten dient es außerdem als Sättigungssignal (Fujimoto et al., 1992; Fujimoto et al., 1993b; Fujimoto et al., 1993a).

Dies ist für einige Isoproteine, die durch Punktmutationen hervorgerufen werden, bereits belegt (Kretowski et al., 2006). Auch eine Assoziation mit veränderten

HDL-Plasmaspiegeln scheint möglich zu sein (Menzel et al., 1988; Menzel et al., 1990).

In dieser Arbeit wurden jedoch regulatorische Sequenzen, im Fall des ApoAIV der ApoAIV Promoter, untersucht. Sollte dieser durch eine Mutation in seiner Aktivität geschwächt werden, würde die Expression des ApoAIV vermindert. Infolgedessen müsste der gegenteilige Fall zu der von Cohen et al. und Recalde et al. beschriebenen Konstellation eintreten und die betroffenen Personen häufiger an Atherosklerose leiden, sowie niedrigere HDL-Spiegel aufweisen. Die abgeschwächte Stimulation des reversen Cholesteroltransports könnte zudem zu erhöhten Cholesterolplasmaspiegeln führen. Außerdem müsste durch die verminderte Aktivierung der Lipoproteinlipase die Hydrolyse von Triglyceriden verringert sein und die untersuchten Patienten demnach höhere Triglyceridkonzentrationen aufweisen als Patienten ohne Mutation. Infolge der Funktion des ApoAIV als Sättigungssignal könnte eine Affektion seiner Expression zu einer verminderten Kontrolle der Nahrungsaufnahme führen und das Auftreten einer Adipositas beschleunigen.

Die Unterschiede zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe in dieser Studie könnten diese Überlegungen stützen. Die Probanden der Fallgruppe wiesen neben den selektionsbedingt signifikant erhöhten Triglyceridplasmaspiegeln auch erhöhte LDL- und Cholesterin- sowie erniedrigte HDL-Konzentrationen auf. Auch die Prävalenz eines Diabetes mellitus lag in der Fallgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Bemerkenswert ist die signifikant höhere ApoAI-Konzentration bei den Probanden der Fallgruppe trotz niedrigerer HDL-Spiegel. Möglicherweise ist dies als Rückkopplung auf die erhöhten Cholesterinkonzentrationen zu deuten.

Vergleicht man den Probanden mit der Mutation mit der Kontrollgruppe, fallen deutlich höhere Triglyceridplasmaspiegel des Probanden im Vergleich zur Kontrollgruppe bei sonst nicht signifikant unterschiedlichen Laborwertkonstellationen auf. Da sich jedoch bei einer Einzelprobe keine statistisch signifikanten Häufigkeitsunterschiede von Polymorphismen zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe ermitteln lassen und die erhöhten Triglyceridspiegel sich durch das Studiendesign ergeben, sind die hier gezeigten Ergebnisse nicht geeignet, diesbezüglich eine sichere, statistisch einwandfrei gestützte Aussage zu treffen. Die Nullhypothese muss weiterhin angenommen werden.

Anfang der 1980er Jahre wurde festgestellt, dass die Gene der Apolipoproteine AI, CIII und AIV sehr wahrscheinlich von einem gemeinsamen evolutionären Vorfahren abstammen und über gemeinsame Kontrollregionen verfügen (Karathanasis et al., 1983; Karathanasis, 1985). Diese Theorie wurde durch die Entdeckung großer Homologien zwischen den einzelnen Genen des Clusters gestützt (Karathanasis, 1985; Karathanasis et al., 1986).

Vergleicht man zudem die Sequenz des ApoAIV Promoters verschiedener Spezies miteinander, zeigen sich auch hier größte Übereinstimmungen von etwa 90 bis 99 Prozent. Die Sequenz des gesamten Promoters ist hoch konserviert. Dies unterstreicht einerseits seine Bedeutung, andererseits sinkt dadurch jedoch auch die Wahrscheinlichkeit, häufige Mutationen zu finden, drastisch.

4.4 Ausblick auf zukünftige Studien

Aufgrund der starken Konservierung der untersuchten Sequenzen in verschiedenen Säugetierspezies, kann auf ihre große Bedeutung im Lipoprotein- und Triglyzeridstoffwechsel geschlossen werden. Der Nachweis von Mutationen in diesen Abschnitten könnte diese wichtige Rolle weiter unterstreichen.

Der Triglyzeridstoffwechsel ist jedoch ein ausgesprochen komplexer Vorgang mit vielen verschiedenen Einflussfaktoren. Allein das Vorliegen eines Diabetes mellitus oder einer Hypothyreose kann zur Entstehung erhöhter Triglyzeridspiegel führen. Dies macht die Erstellung geeigneter Studienpopulationen für die Suche nach Genpolymorphismen äußerst schwierig. Selbst bei eindeutig definierten Erkrankungen wie der Typ III Hyperlipoproteinämie, die mit erhöhten Triglyzerid- und Cholesterinplasmakonzentrationen einhergeht, haben aufwendige Studien, wie die von Henneman et al., Schwierigkeiten einen Zusammenhang von Genpolymorphismen und der Entstehung der Erkrankung einwandfrei zu belegen (Henneman et al., 2009). Ungleich schwieriger ist die Erklärung einer weit weniger bekannten und in ihrer Bedeutung noch nicht vollständig geklärten Laborwertkonstellation, wie der in dieser Arbeit vorliegenden.

Zukünftige Studien sollten diesen Tatsachen Rechnung tragen. Noch größere Studienkollektive als in der vorliegenden Arbeit sind notwendig, um der hohen

Konservierung der Gensequenz zu begegnen und eine statistisch signifikante Aussagekraft der Ergebnisse zu erreichen.

Der Ausschluss an Diabetes mellitus oder einer Hypothyreose leidender Personen aus dem Studienkollektiv könnte eine eventuell anderweitig bedingte Hypertriglyzeridämie als verfälschenden Faktor ausschließen und so die Repräsentativität der Stichprobe erhöhen.

Zudem sollte darauf geachtet werden, dass sich die einzelnen Gruppen möglichst nur durch die Triglyzeridplasmaspiegel unterscheiden, um einen Selektionsbias infolge eines unzureichenden Matchings auszuschließen.

Wenn in dieser Arbeit auch keine häufigen Mutationen der regulatorischen Sequenzen ausgewählter Apolipoproteine gefunden werden konnten, unterstreichen die Ergebnisse doch die Bedeutung der untersuchten Regionen. In dieser Richtung sollten weitere Forschungsanstrengungen unternommen werden, um letztendlich die Entstehung der koronaren Herzkrankheit zur Gänze erklären zu können und neuen, zum Beispiel die Apolipoproteine modulierenden Therapien die Entwicklung zu ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Adipositas und hohe Triglyzeridkonzentrationen sind neben erhöhten LDL-, Cholesterin- und Lipoprotein(a)- sowie niedrigen HDL-Spiegeln, Diabetes mellitus, Nikotinkonsum, arterieller Hypertonie, hohem Alter und familiärer Prädisposition anerkannte Risikofaktoren für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit (KHK). Im Allgemeinen führt eine Adipositas zu einer verstärkten Freisetzung von freien Fettsäuren und darüber zu einer Hypertriglyzeridämie. Es gibt jedoch noch eine Vielzahl anderer Ursachen für eine Hypertriglyzeridämie, und einige Patienten entwickeln eine Hypertriglyzeridämie auch bei relativ gering ausgeprägter Adipositas. Die Apolipoproteine AI, AIV und CIII spielen sowohl im Cholesterin- als auch im Triglyzeridstoffwechsel Schlüsselrollen. Ihre regulatorischen Genabschnitte, die Promoter und Enhancer, sind unerlässlich für ihre Expression. Die vorliegende Arbeit sollte untersuchen, ob Mutationen im ApoAI, ApoAIV oder ApoCIII Promoter, sowie dem ApoCIII Enhancer eine Erklärung für einen niedrigen BMI bei gleichzeitig erhöhtem Triglyzeridspiegel bieten können. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Fall-Kontroll-Studie entworfen, um einen Zusammenhang zwischen eventuellen häufigen Mutationen und der BMI-Triglyzerid-Konstellation belegen zu können. Die Zielabschnitte der DNA der gesamten Studienpopulation wurden dann auf Mutationen gescreent. Dazu wurden 264 EDTA-Blut-Proben von Patienten der Marburger Präventionsallianz in eine Fallgruppe (BMI unter 25kg/m² und Triglyzeridplasmaspiegel über 150mg/dl, 134 Proben) und eine Kontrollgruppe (BMI unter 25kg/m² und Triglyzeridplasmaspiegel unter 150mg/dl, 130 Proben) eingeteilt. Die DNA der Probanden wurde isoliert und mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Die Amplifikate wurden mithilfe der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) auf Auffälligkeiten im Laufverhalten untersucht. Die DGGE wurde vielfach als das zurzeit effektivste Screeningverfahren zur Mutationssuche mit einer Sensitivität von etwa 95% und der Möglichkeit, relativ viele Proben zeitgleich zu untersuchen, beschrieben. In der DGGE detektierte auffällige Proben wurden sequenziert.

Die untersuchten Abschnitte sind in einem gemeinsamen Gencluster auf dem langen Arm des Chromosoms 11 organisiert. Die hier untersuchte Sequenz des ApoAI Promoters umfasste 229bp zwischen den Nukleotiden 116708439 bis

116708667 (-329 bis -101 in Bezug auf den Transkriptionsstart). Die untersuchte ApoAIV Promotersequenz umfasste 437bp zwischen den Nukleotiden 116693995 bis 11669444231 (-439 bis -3). Die ApoCIII Promotersequenz umfasste 226bp zwischen den Nukleotiden 116700604 bis 116700351 (-251 bis -26). In allen Bereichen gibt es vereinzelte bekannte Mutationen, deren Bedeutung jeweils noch nicht geklärt ist. Lediglich im ApoCIII Enhancergen (hier untersucht: 340bp zwischen den Nukleotiden 116700210 bis 116699819, -800 bis -471) gibt es mehrere Polymorphismen, deren Auswirkungen in Studien belegt werden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir eine Mutation (-63C à G) im ApoAIV Promotergen nachweisen. Diese wurde mittlerweile unter anderem durch das 1000Genome-Projekt validiert und als rs5090 veröffentlicht. Die in anderen Arbeiten beobachtete, durchweg sehr hohe Sensitivität der DGGE ließ sich in dieser Arbeit nicht bestätigen. Trotz einer beschriebenen C-Allelfrequenz des rs5090-SNP von 4 bis 6%, fand sich in 264 Proben lediglich eine Mutation. Weder bei den Kontrollpersonen noch bei den Patienten mit Hypertriglyzeridämie fanden sich weitere Mutationen. Weitere Studien sollten folgen, um zum Beispiel in einem Expressionsmodell die Relevanz der gefundenen Mutation zu überprüfen.

6 Abstract

Adipositas and high concentrations of triglycerides in human plasma apart from high LDL, cholesterol, lipoprotein(a) and low HDL concentrations and diabetes mellitus, smoking, arterial hypertension, age and familial predisposition are known risk factors for the development of coronary artery disease (CAD). In general, adipositas leads to the release of free fatty acids leading to hypertriglyceridemia. However, some patients develop hypertriglyceridemia although suffering from only mild adipositas. The apolipoproteins AI, AIV and CIII are key players in the metabolism of triglycerides. Their regulatory elements, the promoters and enhancers, are crucial for sufficient expression. The goal of this work was to search for mutations in regulatory regions of the genes of apolipoproteins AI, AIV and CIII that were able to explain a low body mass index (BMI) and high triglyceride concentration in plasma at the same time. We designed a case control study to be able to proof a correlation of found mutations and the BMI-triglyceride-constellation. The DNA target segments have then been screened for mutations. 264 patients of the "Marburger Praeventionsallianz" were assigned to a case group (BMI under 25kg/m^2 and triglycerides above 150mg/dl , 134 patients) and a control group (BMI under 25kg/m^2 and triglycerides under 150mg/dl , 130 patients). The DNA of all patients was isolated from EDTA blood and the target sequences amplified by polymerase chain reaction. A denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) followed to show differences in electrophoretic mobility. At present, the DGGE is described as the most effective method for screening a population for specific mutations. Its sensitivity reaches about 95 per cent and it is possible to examine a rather big number of samples at a time. Samples showing a mobility shift were sequenced. The segments examined in this study are organized in a joint gene cluster on the long arm of chromosome 11. The ApoAI promoter sequence in this work consisted of 229bp reaching from nucleotide 116708439 to 116708667 (position -329 to -101 with regard to the transcription start point). The ApoAIV promoter sequence covered nucleotides 116693995 to 1166944231 (-439 bis -3, 437bp). The ApoCIII promoter sequence spanned 226bp (nucleotides 116700604 to 116700351, -251 bis -26). Different mutations are known in all regions. However, their clinical significance has not been clarified yet. Only the ApoCIII en-

hancer gene (340bp, nucleotides 116700210 to 116699819, -800 to -471) has certain polymorphisms with known effects that were examined in different studies. In this work we found one mutation in the gene of apolipoprotein AIV (-63C à G), that was validated by the 1000genome project and published as rs5090 by now. The high sensitivity of the DGGE that has been described in different studies could not be supported by our study. Although a frequency of 4 to 6% for the C-allele of the rs5090 SNP has been described only one out of 264 samples showed a variation. No more polymorphisms could be found in the study population. More studies have to be carried out to show the mutation's possible effect on triglyceride metabolism, for example, in an expression model.

7 Literaturverzeichnis

- Aalto-Setälä, K.; Bisgaier, C. L.; Ho, A. et al. Intestinal expression of human apolipoprotein A-IV in transgenic mice fails to influence dietary lipid absorption or feeding behavior. *J.Clin.Invest* 93(4), S. 1776-1786. 1994.
- Acton, S.; Rigotti, A.; Landschulz, K. T. et al. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271(5248), S. 518-520. 1996.
- Agerholm-Larsen, B.; Tybjaerg-Hansen, A.; Schnohr, P. et al. Common cholesteryl ester transfer protein mutations, decreased HDL cholesterol, and possible decreased risk of ischemic heart disease - The Copenhagen City Heart Study. *Circulation* 102(18), S. 2197-2203. 2000.
- Ajees, A. A.; Anantharamaiah, G. M.; Mishra, V. K. et al. Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective effect against cardiovascular diseases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103(7), S. 2126-2131. 2006.
- Alexander, K.; Daniel, W. G.; Diener, H.-C. et al. *Thiemes Innere Medizin - TIM*. Alexander, K. 1. 1999. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Allan, C. M.; Taylor, S.; Taylor, J. M. Two hepatic enhancers, HCR.1 and HCR.2, coordinate the liver expression of the entire human apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster. *J.Biol.Chem.* 272(46), S. 29113-29119. 1997.
- Allan, C. M.; Walker, D.; Segrest, J. P. et al. Identification and characterization of a new human gene (APOC4) in the apolipoprotein E, C-I, and C-II gene locus. *Genomics* 28(2), S. 291-300. 1995a.
- Allan, C. M.; Walker, D.; Taylor, J. M. Evolutionary duplication of a hepatic control region in the human apolipoprotein E gene locus. Identification of a second region that confers high level and liver-specific expression of the human apolipoprotein E gene in transgenic mice. *J.Biol.Chem.* 270(44), S. 26278-26281. 1995b.
- Altmann, S. W.; Davis, H. R., Jr.; Zhu, L. J. et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303(5661), S. 1201-1204. 2004.
- Altshuler, D. L.; Durbin, R. M.; Abecasis, G. R. et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467(7319), S. 1061-1073. 2010.
- Anantharamaiah, G. M.; Mishra, V. K.; Garber, D. W. et al. Structural requirements for antioxidative and anti-inflammatory properties of apolipoprotein A-I mimetic peptides. *J.Lipid Res.* 48(9), S. 1915-1923. 2007.

- Anderson, K. M.; Castelli, W. P.; Levy, D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study. *JAMA* 257(16), S. 2176-2180. 1987.
- Anderson, P. und Bauer, W. Supercoiling in closed circular DNA: dependence upon ion type and concentration. *Biochemistry* 17(4), S. 594-601. 1978.
- Andersson, Y.; Majd, Z.; Lefebvre, A. M. et al. Developmental and pharmacological regulation of apolipoprotein C-II gene expression. Comparison with apo C-I and apo C-III gene regulation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19(1), S. 115-121. 1999.
- Angotti, E.; Mele, E.; Costanzo, F. et al. A polymorphism (G-->A transition) in the -78 position of the apolipoprotein A-I promoter increases transcription efficiency. *J.Biol.Chem.* 269(26), S. 17371-17374. 1994.
- Applebaum-Bowden, D.; McLean, P.; Steinmetz, A. et al. Lipoprotein, apolipoprotein, and lipolytic enzyme changes following estrogen administration in postmenopausal women. *J.Lipid Res.* 30(12), S. 1895-1906. 1989.
- Arbeeny, C. M. und Rifichi, V. A. The uptake of chylomicron remnants and very low density lipoprotein remnants by the perfused rat liver. *J.Biol.Chem.* 259(15), S. 9662-9666. 1984.
- Archer, A.; Sauvaget, D.; Chauffeton, V. et al. Intestinal apolipoprotein A-IV gene transcription is controlled by two hormone-responsive elements: a role for hepatic nuclear factor-4 isoforms. *Mol.Endocrinol.* 19(9), S. 2320-2334. 2005.
- Assmann, G.; Cullen, P.; Schulte, H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation* 105(3), S. 310-315. 2002.
- Assmann, G. und Schulte, H. Role of triglycerides in coronary artery disease: lessons from the Prospective Cardiovascular Munster Study. *Am.J.Cardiol.* 70(19), S. 10H-13H. 1992a.
- Assmann, G. und Schulte, H. The importance of triglycerides: results from the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) Study. *Eur.J.Epidemiol.* 8 Suppl 1, S. 99-103. 1992b.
- Attia, N.; Touzani, A.; Lahrichi, M. et al. Response of apolipoprotein AIV and lipoproteins to glycaemic control in young people with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet.Med.* 14(3), S. 242-247. 1997.
- Bainton, D.; Miller, N. E.; Bolton, C. H. et al. Plasma triglyceride and high density lipoprotein cholesterol as predictors of ischaemic heart disease in British men. The Caerphilly and Speedwell Collaborative Heart Disease Studies. *Br.Heart J.* 68(1), S. 60-66. 1992.
- Barrans, A.; Collet, X.; Barbaras, R. et al. Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich

- HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *J.Biol.Chem.* 269(15), S. 11572-11577. 1994.
- Barter, P. J.; Caulfield, M.; Eriksson, M. et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *New England Journal of Medicine* 357(21), S. 2109-2122. 2007.
- Baskaran, N.; Kandpal, R. P.; Bhargava, A. K. et al. Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. *Genome Res.* 6(7), S. 633-638. 1996.
- Beisiegel, U. und Utermann, G. An apolipoprotein homolog of rat apolipoprotein A-IV in human plasma. Isolation and partial characterisation. *Eur.J.Biochem.* 93(3), S. 601-608. 1979.
- Benoit, P.; Emmanuel, F.; Caillaud, J. M. et al. Somatic gene transfer of human ApoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models. *Circulation* 99(1), S. 105-110. 1999.
- Bergt, C.; Pennathur, S.; Fu, X. et al. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101(35), S. 13032-13037. 2004.
- Berrougui, H. und Khalil, A. Age-associated decrease of high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport activity. *Rejuvenation.Res.* 12(2), S. 117-126. 2009.
- Bestehorn, K.; Smolka, W.; Pittrow, D. et al. Atherogenic dyslipidemia as evidenced by the lipid triad: prevalence and associated risk in statin-treated patients in ambulatory care. *Curr.Med.Res.Opin.* 26(12), S. 2833-2839. 2010.
- Bisaha, J. G.; Simon, T. C.; Gordon, J. I. et al. Characterization of an enhancer element in the human apolipoprotein C-III gene that regulates human apolipoprotein A-I gene expression in the intestinal epithelium. *J.Biol.Chem.* 270(34), S. 19979-19988. 1995.
- Bisgaier, C. L.; Sachdev, O. P.; Megna, L. et al. Distribution of apolipoprotein A-IV in human plasma. *J.Lipid Res.* 26(1), S. 11-25. 1985.
- Bjorkegren, J.; Packard, C. J.; Hamsten, A. et al. Accumulation of large very low density lipoprotein in plasma during intravenous infusion of a chylomicron-like triglyceride emulsion reflects competition for a common lipolytic pathway. *J.Lipid Res.* 37(1), S. 76-86. 1996.
- Black, D. D. und Ellinas, H. Apolipoprotein synthesis in newborn piglet intestinal explants. *Pediatr.Res.* 32(5), S. 553-558. 1992.
- Boguski, M. S.; Elshourbagy, N.; Taylor, J. M. et al. Comparative analysis of repeated sequences in rat apolipoproteins A-I, A-IV, and E. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82(4), S. 992-996. 1985.

- Bolanos-Garcia, V. M. und Miguel, R. N. On the structure and function of apolipoproteins: more than a family of lipid-binding proteins. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 83(1), S. 47-68. 2003.
- Bookstein, R.; Lai, C. C.; To, H. et al. PCR-based detection of a polymorphic BamHI site in intron 1 of the human retinoblastoma (RB) gene. *Nucleic Acids Res.* 18(6), S. 1666. 1990.
- Borensztajn, J.; Getz, G. S.; Kotlar, T. J. Uptake of chylomicron remnants by the liver: further evidence for the modulating role of phospholipids. *J.Lipid Res.* 29(8), S. 1087-1096. 1988.
- Bots, M. L.; Visseren, F. L.; Evans, G. W. et al. Torcetrapib and carotid intima-media thickness in mixed dyslipidaemia (RADIANCE 2 study): a randomised, double-blind trial. *Lancet* 370(9582), S. 153-160. 2007.
- Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am.J.Hum.Genet.* 32(3), S. 314-331. 1980.
- Brasseur, R.; Lins, L.; Vanloo, B. et al. Molecular modeling of the amphipathic helices of the plasma apolipoproteins. *Proteins* 13(3), S. 246-257. 1992.
- Breslow, J. L.; Ross, D.; McPherson, J. et al. Isolation and characterization of cDNA clones for human apolipoprotein A-I. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 79(22), S. 6861-6865. 1982.
- Brewer, H. B., Jr.; Fairwell, T.; LaRue, A. et al. The amino acid sequence of human APOA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 80(3), S. 623-630. 1978.
- Briggs, M. R.; Kadonaga, J. T.; Bell, S. P. et al. Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* 234(4772), S. 47-52. 1986.
- British Cardiac Society; British Hypertension Society; Diabetes UK et al. JBS 2: Joint British Societies' guidelines on prevention of cardiovascular disease in clinical practice. *Heart* 91 Suppl 5, S. v1-52. 2005.
- Brookes, A. J.; Lehvaslaiho, H.; Siegfried, M. et al. HGBASE: a database of SNPs and other variations in and around human genes. *Nucleic Acids Res.* 28(1), S. 356-360. 2000.
- Brouillette, C. G.; Anantharamaiah, G. M.; Engler, J. A. et al. Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review. *Biochim.Biophys.Acta* 1531(1-2), S. 4-46. 2001.
- Brown, M. S. und Goldstein, J. L. Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 71(3), S. 788-792. 1974.

- Brown, R. J.; Lagor, W. R.; Sankaranarayanan, S. et al. Impact of Combined Deficiency of Hepatic Lipase and Endothelial Lipase on the Metabolism of Both High-Density Lipoproteins and Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins. *Circulation Research* 107(3), S. 357-U90. 2010.
- Brown, S.; Ordovas, J. M.; Campos, H. Interaction between the APOC3 gene promoter polymorphisms, saturated fat intake and plasma lipoproteins. *Atherosclerosis* 170(2), S. 307-313. 2003.
- Brown, W. V. und Baginsky, M. L. Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 46(2), S. 375-382. 1972.
- Bruckert, E.; von Eckardstein, A.; Funke, H. et al. The replacement of arginine by cysteine at residue 151 in apolipoprotein A-I produces a phenotype similar to that of apolipoprotein A-IMilano. *Atherosclerosis* 128(1), S. 121-128. 1997.
- Bruns, G. A.; Karathanasis, S. K.; Breslow, J. L. Human apolipoprotein A-I--C-III gene complex is located on chromosome 11. *Arteriosclerosis* 4(2), S. 97-102. 1984.
- Cai, Q. Q. und Tuitou, I. Excess Pcr Primers May Dramatically Affect Sscp Efficiency. *Nucleic Acids Research* 21(16), S. 3909-3910. 1993.
- Cannon, C. P.; Shah, S.; Dansky, H. M. et al. Safety of Anacetrapib in Patients with or at High Risk for Coronary Heart Disease. *New England Journal of Medicine* 363(25), S. 2406-2415. 2010.
- Carlson, L. A.; Bottiger, L. E.; Ahfeldt, P. E. Risk factors for myocardial infarction in the Stockholm prospective study. A 14-year follow-up focussing on the role of plasma triglycerides and cholesterol. *Acta Med.Scand.* 206(5), S. 351-360. 1979.
- Castelli, W. P. [Clinical risk factors in coronary disease. The Framingham study]. *Wien.Med.Wochenschr.* 132 Spec No 2, S. I-IX. 1982.
- Castelli, W. P. Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham study. *Am.J.Med.* 76(2A), S. 4-12. 1984.
- Castelli, W. P.; Garrison, R. J.; Wilson, P. W. et al. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JA-MA* 256(20), S. 2835-2838. 1986.
- Castle, C. K.; Pape, M. E.; Marotti, K. R. et al. Secretion of pre-beta-migrating apoA-I by cynomolgus monkey hepatocytes in culture. *J.Lipid Res.* 32(3), S. 439-447. 1991.
- Chen, C. H. und Albers, J. J. Activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by apolipoproteins E-2, E-3, and A-IV isolated from human plasma. *Biochim.Biophys.Acta* 836(3), S. 279-285. 1985.

- Chen, M.; Breslow, J. L.; Li, W. et al. Transcriptional regulation of the apoC-III gene by insulin in diabetic mice: correlation with changes in plasma triglyceride levels. *J.Lipid Res.* 35(11), S. 1918-1924. 1994.
- Choi, H. Y.; Karten, B.; Chan, T. et al. Impaired ABCA1-dependent lipid efflux and hypoalphalipoproteinemia in human Niemann-Pick type C disease. *J.Biol.Chem.* 278(35), S. 32569-32577. 2003.
- Clark, B. und Huebscher, G. Biosynthesis of glycerides in the mucosa of the small intestine. *Nature* 185, S. 35-37. 1960b.
- Clark, B. und Huebscher, G. Biosynthesis of glycerides in the mucosa of the small intestine. *Nature* 185, S. 35-37. 1960a.
- Clark, R. W.; Ruggeri, R. B.; Cunningham, D. et al. Description of the torcetrapib series of cholesteryl ester transfer protein inhibitors, including mechanism of action. *Journal of Lipid Research* 47(3), S. 537-552. 2006.
- Clark, S. B. und Tercyak, A. M. Reduced cholesterol transmucosal transport in rats with inhibited mucosal acyl CoA:cholesterol acyltransferase and normal pancreatic function. *J.Lipid Res.* 25(2), S. 148-159. 1984.
- Clavey, V.; Lestavel-Delattre, S.; Copin, C. et al. Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII, and E. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15(7), S. 963-971. 1995.
- Clay, M. A.; Newnham, H. H.; Barter, P. J. Hepatic lipase promotes a loss of apolipoprotein A-I from triglyceride-enriched human high density lipoproteins during incubation in vitro. *Arterioscler.Thromb.* 11(2), S. 415-422. 1991.
- Cohen, R. D.; Castellani, L. W.; Qiao, J. H. et al. Reduced aortic lesions and elevated high density lipoprotein levels in transgenic mice overexpressing mouse apolipoprotein A-IV. *J.Clin.Invest* 99(8), S. 1906-1916. 1997.
- Cohn, J. S.; Marcoux, C.; Davignon, J. Detection, quantification, and characterization of potentially atherogenic triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19(10), S. 2474-2486. 1999.
- Collins, M. und Myers, R. M. Alterations in DNA helix stability due to base modifications can be evaluated using denaturing gradient gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 198(4), S. 737-744. 1987.
- Cooper, A. D. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J.Lipid Res.* 38(11), S. 2173-2192. 1997.
- Cotton, R. G. H.; Rodrigues, N. R.; Campbell, R. D. Reactivity of Cytosine and Thymine in Single-Base-Pair Mismatches with Hydroxylamine and Osmium-Tetroxide and Its Application to the Study of Mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(12), S. 4397-4401. 1988.

- Cremonesi, L.; Firpo, S.; Ferrari, M. et al. Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations. *Biotechniques* 22(2), S. 326-330. 1997.
- Dallinga-Thie, G. M.; Bu, X. D.; Linde-Sibenius, T. M. et al. Apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in familial combined hyperlipidemia: effects on LDL-cholesterol and apolipoproteins B and C-III. *J.Lipid Res.* 37(1), S. 136-147. 1996.
- Dallinga-Thie, G. M.; Linde-Sibenius, T. M.; Rotter, J. I. et al. Complex genetic contribution of the Apo A-I-C-III-A-IV gene cluster to familial combined hyperlipidemia. Identification of different susceptibility haplotypes. *J.Clin.Invest* 99(5), S. 953-961. 1997.
- Dammerman, M.; Sandkuijl, L. A.; Halaas, J. L. et al. An apolipoprotein CIII haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3' untranslated region polymorphisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90(10), S. 4562-4566. 1993.
- Danek, G. M.; Valenti, M.; Baralle, F. E. et al. The A/G polymorphism in the -78 position of the apolipoprotein A-I promoter does not have a direct effect on transcriptional efficiency. *Biochim.Biophys.Acta* 1398(1), S. 67-74. 1998.
- Dang, Q.; Walker, D.; Taylor, S. et al. Structure of the hepatic control region of the human apolipoprotein E/C-I gene locus. *J.Biol.Chem.* 270(38), S. 22577-22585. 1995.
- Danielsen, E. M.; Hansen, G. H.; Poulsen, M. D. Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes. *J.Cell Biol.* 120(6), S. 1347-1356. 1993.
- Davidson, W. S.; Hazlett, T.; Mantulin, W. W. et al. The role of apolipoprotein AI domains in lipid binding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93(24), S. 13605-13610. 1996.
- Davis, H. R., Jr.; Zhu, L. J.; Hoos, L. M. et al. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J.Biol.Chem.* 279(32), S. 33586-33592. 2004.
- Davis, R. A. und Hui, T. Y. 2000 George Lyman Duff Memorial Lecture: atherosclerosis is a liver disease of the heart. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21(6), S. 887-898. 2001.
- Davis, R. A.; Prewett, A. B.; Chan, D. C. et al. Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins: immunologic characterization of apolipoprotein B in lipoproteins and hepatic membrane fractions and its intracellular distribution. *J.Lipid Res.* 30(8), S. 1185-1196. 1989.
- De Backer, G.; Ambrosioni, E.; Borch-Johnsen, K. et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur.Heart J.* 24(17), S. 1601-1610. 2003.

- de Knijff, P.; Rosseneu, M.; Beisiegel, U. et al. Apolipoprotein A-IV polymorphism and its effect on plasma lipid and apolipoprotein concentrations. *J.Lipid Res.* 29(12), S. 1621-1627. 1988.
- de Silva, H. V.; Lauer, S. J.; Wang, J. et al. Overexpression of human apolipoprotein C-III in transgenic mice results in an accumulation of apolipoprotein B48 remnants that is corrected by excess apolipoprotein E. *J.Biol.Chem.* 269(3), S. 2324-2335. 1994.
- Deckelbaum, R. J.; Granot, E.; Oschry, Y. et al. Plasma Triglyceride Determines Structure-Composition in Low and High-Density Lipoproteins. *Arteriosclerosis* 4(3), S. 225-231. 1984.
- Delgado-Lista, J.; Perez-Jimenez, F.; Ruano, J. et al. Effects of variations in the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster on different parameters of postprandial lipid metabolism in healthy young men. *Journal of Lipid Research* 51(1), S. 63-73. 2010.
- Denis, M.; Landry, Y. D.; Zha, X. H. ATP-binding cassette A1-mediated lipidation of apolipoprotein A-I occurs at the plasma membrane and not in the endocytic compartments. *Journal of Biological Chemistry* 283(23), S. 16178-16186. 2008.
- Devaraj, S.; Vega, G.; Lange, R. et al. Remnant-like particle cholesterol levels in patients with dysbetalipoproteinemia or coronary artery disease. *Am.J.Med.* 104(5), S. 445-450. 1998.
- Dhoest, A.; Zhao, Z.; De Geest, B. et al. Role of the Arg123-Tyr166 paired helix of apolipoprotein A-I in lecithin:cholesterol acyltransferase activation. *J.Biol.Chem.* 272(25), S. 15967-15972. 1997.
- Duivenvoorden, I.; Teusink, B.; Rensen, P. C. et al. Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice. *Diabetes* 54(3), S. 664-671. 2005.
- Duverger, N.; Ghalim, N.; Ailhaud, G. et al. Characterization of ApoA-Iv-Containing Lipoprotein Particles Isolated from Human Plasma and Interstitial Fluid. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 13(1), S. 126-132. 1993.
- Eberly, L. E.; Stamler, J.; Neaton, J. D. Relation of triglyceride levels, fasting and nonfasting, to fatal and nonfatal coronary heart disease. *Arch.Intern.Med.* 163(9), S. 1077-1083. 2003.
- Edelstein, C. und Scanu, A. M. Effect of guanidine hydrochloride on the hydrodynamic and thermodynamic properties of human apolipoprotein A-I in solution. *J.Biol.Chem.* 255(12), S. 5747-5754. 1980.
- Ehnholm, C.; Tenkanen, H.; de Knijff, P. et al. Genetic polymorphism of apolipoprotein A-IV in five different regions of Europe. Relations to plasma lipoproteins and to history of myocardial infarction: the EARS study. *European Atherosclerosis Research Study. Atherosclerosis* 107(2), S. 229-238. 1994.

- Ellsworth, J. L.; Kraemer, F. B.; Cooper, A. D. Transport of beta-very low density lipoproteins and chylomicron remnants by macrophages is mediated by the low density lipoprotein receptor pathway. *J.Biol.Chem.* 262(5), S. 2316-2325. 1987.
- Elshourbagy, N. A.; Walker, D. W.; Paik, Y. K. et al. Structure and expression of the human apolipoprotein A-IV gene. *J.Biol.Chem.* 262(17), S. 7973-7981. 1987.
- Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285(19), S. 2486-2497. 2001.
- Faggiotto, A.; Ross, R.; Harker, L. Studies of hypercholesterolemia in the non-human primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis* 4(4), S. 323-340. 1984.
- Faulkner, L. E.; Panagotopulos, S. E.; Johnson, J. D. et al. An analysis of the role of a retroendocytosis pathway in ABCA1-mediated cholesterol efflux from macrophages. *Journal of Lipid Research* 49(6), S. 1322-1332. 2008.
- Fiegenbaum, M. und Hutz, M. H. Further evidence for the association between obesity-related traits and the apolipoprotein A-IV gene. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 27(4), S. 484-490. 2003.
- Field, F. J.; Albright, E.; Mathur, S. Inhibition of acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase activity by PD128042: effect on cholesterol metabolism and secretion in CaCo-2 cells. *Lipids* 26(1), S. 1-8. 1991.
- Fielding, C. J.; Shore, V. G.; Fielding, P. E. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 46(4), S. 1493-1498. 1972.
- Figarella, C.; De Caro, A.; Leupold, D. et al. Congenital pancreatic lipase deficiency. *J.Pediatr.* 96(3 Pt 1), S. 412-416. 1980.
- Fischer, S. G. und Lerman, L. S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16(1), S. 191-200. 1979.
- Fischer, S. G. und Lerman, L. S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80(6), S. 1579-1583. 1983.
- Fitzgerald, M. L.; Okuhira, K.; Short, G. F. et al. ATP-binding cassette transporter A1 contains a novel C-terminal VFVNFA motif that is required for its cholesterol efflux and ApoA-I binding activities. *Journal of Biological Chemistry* 279(46), S. 48477-48485. 2004.
- Fixman, M. und Freire, J. J. Theory of DNA melting curves. *Biopolymers* 16(12), S. 2693-2704. 1977.

- Floren, C. H. und Chait, A. Uptake of chylomicron remnants by the native LDL receptor in human monocyte-derived macrophages. *Biochim.Biophys.Acta* 665(3), S. 608-611. 1981.
- Fogelman, A. M.; Shechter, I.; Seager, J. et al. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77(4), S. 2214-2218. 1980.
- Forrest, M. J.; Bloomfield, D.; Briscoe, R. J. et al. Torcetrapib-induced blood pressure elevation is independent of CETP inhibition and is accompanied by increased circulating levels of aldosterone. *British Journal of Pharmacology* 154(7), S. 1465-1473. 2008.
- Franceschini, G.; Sirtori, C. R.; Capurso, A. et al. A-IMilano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J.Clin.Invest* 66(5), S. 892-900. 1980.
- Francone, O. L.; Royer, L.; Haghpasand, M. Increased prebeta-HDL levels, cholesterol efflux, and LCAT-mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes. *J.Lipid Res.* 37(6), S. 1268-1277. 1996.
- Fredrickson, D. S. und Lees, R. S. A System For Phenotyping Hyperlipoproteinemia. *Circulation* 31, S. 321-327. 1965.
- Fredrickson, D. S.; Levy, R. I.; Lees, R. S. Fat transport in lipoproteins--an integrated approach to mechanisms and disorders. *N.Engl.J.Med.* 276(5), S. 273-281. 1967.
- Fujimoto, K.; Cardelli, J. A.; Tso, P. Increased apolipoprotein A-IV in rat mesenteric lymph after lipid meal acts as a physiological signal for satiation. *Am.J.Physiol* 262(6 Pt 1), S. G1002-G1006. 1992.
- Fujimoto, K.; Fukagawa, K.; Sakata, T. et al. Suppression of food intake by apolipoprotein A-IV is mediated through the central nervous system in rats. *J.Clin.Invest* 91(4), S. 1830-1833. 1993a.
- Fujimoto, K.; Machidori, H.; Iwakiri, R. et al. Effect of intravenous administration of apolipoprotein A-IV on patterns of feeding, drinking and ambulatory activity of rats. *Brain Res.* 608(2), S. 233-237. 1993b.
- Fujioka, Y. und Ishikawa, Y. Remnant lipoproteins as strong key particles to atherogenesis. *J.Atheroscler.Thromb.* 16(3), S. 145-154. 2009.
- Fukushima, D.; Kupferberg, J. P.; Yokoyama, S. et al. A synthetic amphiphilic helical docosapeptide with the surface properties of plasma apolipoprotein A-I. *Journal of the.American Chemical.Society.* 101(13), S. 3703-3704. 1979.

- Gao, J.; Wei, Y.; Huang, Y. et al. The expression of intact and mutant human apoA1/CIII/AIV/AV gene cluster in transgenic mice. *J.Biol.Chem.* 280(13), S. 12559-12566. 2005.
- Garner, B.; Waldeck, A. R.; Witting, P. K. et al. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *J.Biol.Chem.* 273(11), S. 6088-6095. 1998.
- Genest, J.; Frohlich, J.; Fodor, G. et al. Recommendations for the management of dyslipidemia and the prevention of cardiovascular disease: summary of the 2003 update. *CMAJ.* 169(9), S. 921-924. 2003.
- Georgopoulos, S.; Kan, H. Y.; Reardon-Alulis, C. et al. The SP1 sites of the human apoCIII enhancer are essential for the expression of the apoCIII gene and contribute to the hepatic and intestinal expression of the apoA-I gene in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 28(24), S. 4919-4929. 2000.
- Ghishan, F. K.; Moran, J. R.; Durie, P. R. et al. Isolated congenital lipase-colipase deficiency. *Gastroenterology* 86(6), S. 1580-1582. 1984.
- Gille, C.; Gille, A.; Booms, P. et al. Bipolar clamping improves the sensitivity of mutation detection by temperature gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis* 19(8-9), S. 1347-1350. 1998.
- Ginsburg, G. S.; Ozer, J.; Karathanasis, S. K. Intestinal apolipoprotein AI gene transcription is regulated by multiple distinct DNA elements and is synergistically activated by the orphan nuclear receptor, hepatocyte nuclear factor 4. *J.Clin.Invest* 96(1), S. 528-538. 1995.
- Girard-Mauduit, S. The lipid triad, or how to reduce residual cardiovascular risk? *Ann.Endocrinol.(Paris)* 71(2), S. 89-94. 2010.
- Gofman, J. W. und Lindgren, F. The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis. *Science* 111(2877), S. 166-171. 1950.
- Gofman, J. W.; Lindgren, F. T.; Elliott, H. Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J.Biol.Chem.* 179(2), S. 973-979. 1949.
- Goldberg, I. J.; Scheraldi, C. A.; Yacoub, L. K. et al. Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *J.Biol.Chem.* 265(8), S. 4266-4272. 1990.
- Goldstein, J. L. und Brown, M. S. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 70(10), S. 2804-2808. 1973.
- Goldstein, J. L. und Brown, M. S. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J.Biol.Chem.* 249(16), S. 5153-5162. 1974.

- Goldstein, J. L. und Brown, M. S. Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism* 26(11), S. 1257-1275. 1977.
- Goldstein, J. L.; Ho, Y. K.; Basu, S. K. et al. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76(1), S. 333-337. 1979.
- Goudriaan, J. R.; Tacke, P. J.; Dahlmans, V. E. et al. Protection from obesity in mice lacking the VLDL receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21(9), S. 1488-1493. 2001.
- Granfone, A.; Campos, H.; McNamara, J. R. et al. Effects of estrogen replacement on plasma lipoproteins and apolipoproteins in postmenopausal, dyslipidemic women. *Metabolism* 41(11), S. 1193-1198. 1992.
- Green, P. H.; Glickman, R. M.; Riley, J. W. et al. Human apolipoprotein A-IV. Intestinal origin and distribution in plasma. *J.Clin.Invest* 65(4), S. 911-919. 1980.
- Grehan, S.; Tse, E.; Taylor, J. M. Two distal downstream enhancers direct expression of the human apolipoprotein E gene to astrocytes in the brain. *J.Neurosci.* 21(3), S. 812-822. 2001.
- Groenendijk, M.; Cantor, R. M.; Blom, N. H. et al. Association of plasma lipids and apolipoproteins with the insulin response element in the apoC-III promoter region in familial combined hyperlipidemia. *J.Lipid Res.* 40(6), S. 1036-1044. 1999.
- Grosser, J.; Schrecker, O.; Greten, H. Function of hepatic triglyceride lipase in lipoprotein metabolism. *J.Lipid Res.* 22(3), S. 437-442. 1981.
- Grosskopf, I.; Barouk, N.; Lee, S. J. et al. Apolipoprotein A-V deficiency results in marked hypertriglyceridemia attributable to decreased lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins and removal of their remnants. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25(12), S. 2573-2579. 2005.
- Gustafson, A.; Alaupovic, P.; Furman, R. H. Studies of the composition and structure of serum lipoproteins. Separation and characterization of phospholipid-protein residues obtained by partial delipidization of very low density lipoproteins of human serum. *Biochemistry* 5(2), S. 632-640. 1966.
- Hadzopoulou-Cladaras, M.; Lavrentiadou, S. N.; Zannis, V. I. et al. Transactivation of the ApoCIII promoter by ATF-2 and repression by members of the Jun family. *Biochemistry* 37(40), S. 14078-14087. 1998.
- Harnish, D. C.; Evans, M. J.; Scicchitano, M. S. et al. Estrogen regulation of the apolipoprotein AI gene promoter through transcription cofactor sharing. *J.Biol.Chem.* 273(15), S. 9270-9278. 1998.
- Havel, R. J. Postprandial lipid metabolism: an overview. *Proc.Nutr.Soc.* 56(2), S. 659-666. 1997.

- Hayashi, K. Pcr-Sscp - A Method for Detection of Mutations. *Genetic Analysis-Biomolecular Engineering* 9(3), S. 73-79. 1992.
- Hayden, M. R.; Kirk, H.; Clark, C. et al. DNA polymorphisms in and around the Apo-A1-CIII genes and genetic hyperlipidemias. *Am.J.Hum.Genet.* 40(5), S. 421-430. 1987.
- Hayes, V. M.; Wu, Y.; Osinga, J. et al. Improvements in gel composition and electrophoretic conditions for broad-range mutation analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 27(20), S. e29. 1999.
- Heider, J. G.; Pickens, C. E.; Kelly, L. A. Role of acyl CoA:cholesterol acyltransferase in cholesterol absorption and its inhibition by 57-118 in the rabbit. *J.Lipid Res.* 24(9), S. 1127-1134. 1983.
- Henke, W.; Herdel, K.; Jung, K. et al. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 25(19), S. 3957-3958. 1997.
- Henneman, P.; van der Sman-de Beer; Moghaddam, P. H. et al. The expression of type III hyperlipoproteinemia: involvement of lipolysis genes. *Eur.J.Hum.Genet.* 17(5), S. 620-628. 2009.
- Hennuyer, N.; Poulain, P.; Madsen, L. et al. Beneficial effects of fibrates on apolipoprotein A-I metabolism occur independently of any peroxisome proliferative response. *Circulation* 99(18), S. 2445-2451. 1999.
- Higgins, M.; Kannel, W.; Garrison, R. et al. Hazards of obesity--the Framingham experience. *Acta Med.Scand.Suppl* 723, S. 23-36. 1988.
- Highsmith, W. E.; Jin, Q.; Nataraj, A. J. et al. Use of a DNA toolbox for the characterization of mutation scanning methods. I: Construction of the toolbox and evaluation of heteroduplex analysis. *Electrophoresis* 20(6), S. 1186-1194. 1999.
- Hofmann, A. F. und Borgstroem, B. The Intraluminal Phase of Fat Digestion in Man: The Lipid Content of the Micellar and Oil Phases of Intestinal Content Obtained during Fat Digestion and Absorption. *J.Clin.Invest* 43, S. 247-257. 1964.
- Hofmann, A. F. und Borgstrom, B. Hydrolysis of long-chain monoglycerides in micellar solution by pancreatic lipase. *Biochim.Biophys.Acta* 70, S. 317-331. 1963.
- Hovingh, G. K.; de Groot, E.; van der, S. W. et al. Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis. *Curr.Opin.Lipidol.* 16(2), S. 139-145. 2005.
- Hu, X.; Dietz, J. D.; Xia, C. S. et al. Torcetrapib Induces Aldosterone and Cortisol Production by an Intracellular Calcium-Mediated Mechanism Independently of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition. *Endocrinology* 150(5), S. 2211-2219. 2009.

- Huang, Y.; von Eckardstein, A.; Wu, S. et al. Cholesterol efflux, cholesterol esterification, and cholesteryl ester transfer by LpA-I and LpA-I/A-II in native plasma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15(9), S. 1412-1418. 1995.
- Hulley, S. B.; Rosenman, R. H.; Bawol, R. D. et al. Epidemiology as a guide to clinical decisions. The association between triglyceride and coronary heart disease. *N.Engl.J.Med.* 302(25), S. 1383-1389. 1980.
- Hung, T.; Mak, K.; Fong, K. A specificity enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 18(16), S. 4953. 1990.
- Hurt-Camejo, E.; Olsson, U.; Wiklund, O. et al. Cellular consequences of the association of apoB lipoproteins with proteoglycans. Potential contribution to atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17(6), S. 1011-1017. 1997.
- Hussain, M. M. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis* 148(1), S. 1-15. 2000.
- Imaizumi, K.; Fainaru, M.; Havel, R. J. Composition of proteins of mesenteric lymph chylomicrons in the rat and alterations produced upon exposure of chylomicrons to blood serum and serum proteins. *J.Lipid Res.* 19(6), S. 712-722. 1978.
- Ishibashi, S.; Perrey, S.; Chen, Z. et al. Role of the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants. A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or both. *J.Biol.Chem.* 271(37), S. 22422-22427. 1996.
- Iso, H.; Naito, Y.; Sato, S. et al. Serum triglycerides and risk of coronary heart disease among Japanese men and women. *Am.J.Epidemiol.* 153(5), S. 490-499. 2001.
- Ito, Y.; Azrolan, N.; O'Connell, A. et al. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science* 249(4970), S. 790-793. 1990.
- Jauhiainen, M. und Dolphin, P. J. Human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. An elucidation of the catalytic mechanism. *J.Biol.Chem.* 261(15), S. 7032-7043. 1986.
- Jauhiainen, M.; Metso, J.; Pahlman, R. et al. Human plasma phospholipid transfer protein causes high density lipoprotein conversion. *J.Biol.Chem.* 268(6), S. 4032-4036. 1993.
- Jeenah, M.; Kessling, A.; Miller, N. et al. G to A substitution in the promoter region of the apolipoprotein AI gene is associated with elevated serum apolipoprotein AI and high density lipoprotein cholesterol concentrations. *Mol.Biol.Med.* 7(3), S. 233-241. 1990.
- Jiang, X.; Francone, O. L.; Bruce, C. et al. Increased prebeta-high density lipoprotein, apolipoprotein AI, and phospholipid in mice expressing the hu-

- man phospholipid transfer protein and human apolipoprotein AI transgenes. *J.Clin.Invest* 98(10), S. 2373-2380. 1996.
- Jin, F. Y.; Kamanna, V. S.; Kashyap, M. L. Estradiol stimulates apolipoprotein A-I- but not A-II-containing particle synthesis and secretion by stimulating mRNA transcription rate in Hep G2 cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 18(6), S. 999-1006. 1998.
- Jin, W. J.; Millar, J. S.; Broedl, U. et al. Inhibition of endothelial lipase causes increases HDL cholesterol levels in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 111(3), S. 357-362. 2003.
- Jones, M. K.; Catta, A.; Li, L. et al. Dynamics of activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 48(47), S. 11196-11210. 2009.
- Kamboh, M. I.; Aston, C. E.; Nestlerode, C. M. et al. Haplotype analysis of two APOA1/MspI polymorphisms in relation to plasma levels of apo A-I and HDL-cholesterol. *Atherosclerosis* 127(2), S. 255-262. 1996.
- Kan, H. Y.; Georgopoulos, S.; Zannis, V. A hormone response element in the human apolipoprotein CIII (ApoCIII) enhancer is essential for intestinal expression of the ApoA-I and ApoCIII genes and contributes to the hepatic expression of the two linked genes in transgenic mice. *J.Biol.Chem.* 275(39), S. 30423-30431. 2000.
- Karathanasis, S. K. Apolipoprotein multigene family: tandem organization of human apolipoprotein AI, CIII, and AIV genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 82, S. 6374-6378. 1985.
- Karathanasis, S. K.; McPherson, J.; Zannis, V. I. et al. Linkage of human apolipoproteins A-I and C-III genes. *Nature* 304(5924), S. 371-373. 1983.
- Karathanasis, S. K.; Oettgen, P.; Haddad, I. A. et al. Structure, evolution, and polymorphisms of the human apolipoprotein A4 gene (APOA4). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83(22), S. 8457-8461. 1986.
- Kardassis, D.; Falvey, E.; Tsantili, P. et al. Direct physical interactions between HNF-4 and Sp1 mediate synergistic transactivation of the apolipoprotein CIII promoter. *Biochemistry* 41(4), S. 1217-1228. 2002.
- Kardassis, D.; Laccotripe, M.; Talianidis, I. et al. Transcriptional regulation of the genes involved in lipoprotein transport. The role of proximal promoters and long-range regulatory elements and factors in apolipoprotein gene regulation. *Hypertension* 27(4), S. 980-1008. 1996.
- Kardassis, D.; Pardali, K.; Zannis, V. I. SMAD proteins transactivate the human ApoCIII promoter by interacting physically and functionally with hepatocyte nuclear factor 4. *J.Biol.Chem.* 275(52), S. 41405-41414. 2000.
- Kardassis, D.; Tzamelis, I.; Hadzopoulou-Cladaras, M. et al. Distal apolipoprotein C-III regulatory elements F to J act as a general modular enhancer for proximal promoters that contain hormone response elements. *Synergism*

- between hepatic nuclear factor-4 molecules bound to the proximal promoter and distal enhancer sites. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17(1), S. 222-232. 1997.
- Karpe, F. Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J.Intern.Med.* 246(4), S. 341-355. 1999.
- Keller, H. und Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptors A link between endocrinology and nutrition? *Trends Endocrinol.Metab* 4(9), S. 291-296. 1993.
- Kjekshus, J. und Pedersen, T. R. Reducing the risk of coronary events: evidence from the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Am.J.Cardiol.* 76(9), S. 64C-68C. 1995.
- Klon, A. E.; Segrest, J. P.; Harvey, S. C. Comparative models for human apolipoprotein A-I bound to lipid in discoidal high-density lipoprotein particles. *Biochemistry* 41(36), S. 10895-10905. 2002.
- Koo, C.; Wernette-Hammond, M. E.; Garcia, Z. et al. Uptake of cholesterol-rich remnant lipoproteins by human monocyte-derived macrophages is mediated by low density lipoprotein receptors. *J.Clin.Invest* 81(5), S. 1332-1340. 1988.
- Koppaka, V.; Silvestro, L.; Engler, J. A. et al. The structure of human lipoprotein A-I. Evidence for the "belt" model. *J.Biol.Chem.* 274(21), S. 14541-14544. 1999.
- Kostner, G. und Alaupovic, P. Studies of the composition and structure of plasma lipoproteins. Separation and quantification of the lipoprotein families occurring in the high density lipoproteins of human plasma. *Biochemistry* 11(18), S. 3419-3428. 1972.
- Kowal, R. C.; Herz, J.; Goldstein, J. L. et al. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86(15), S. 5810-5814. 1989.
- Kozlowski, P. und Krzyzosiak, W. J. Combined SSCP/duplex analysis by capillary electrophoresis for more efficient mutation detection. *Nucleic Acids Research* 29(14), S. art-e71. 2001.
- Kramer, M. F. und Coen, D. M. Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. *Curr.Protoc.Immunol.* Chapter 10, S. Unit. 2001.
- Krause, B. R.; Anderson, M.; Bisgaier, C. L. et al. In vivo evidence that the lipid-regulating activity of the ACAT inhibitor CI-976 in rats is due to inhibition of both intestinal and liver ACAT. *J.Lipid Res.* 34(2), S. 279-294. 1993.
- Krauss, R. M.; Herbert, P. N.; Levy, R. I. et al. Further observations on the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins. *Circ.Res.* 33(4), S. 403-411. 1973.

- Kretowski, A.; Hokanson, J. E.; McFann, K. et al. The apolipoprotein A-IV Gln360His polymorphism predicts progression of coronary artery calcification in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 49(8), S. 1946-1954. 2006.
- Krones, T.; Keller, H.; Sönnichsen, A. et al. Absolute cardiovascular disease risk and shared decision making in primary care: a randomized controlled trial. *The Annals of Family Medicine* 6(3), S. 218-227. 2008.
- Ktistaki, E.; Lacorte, J. M.; Katrakili, N. et al. Transcriptional regulation of the apolipoprotein A-IV gene involves synergism between a proximal orphan receptor response element and a distant enhancer located in the upstream promoter region of the apolipoprotein C-III gene. *Nucleic Acids Res.* 22(22), S. 4689-4696. 1994.
- Kugiyama, K.; Doi, H.; Takazoe, K. et al. Remnant lipoprotein levels in fasting serum predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 99(22), S. 2858-2860. 1999.
- Lacorte, J. M.; Beigneux, A.; Parant, M. et al. Repression of apoC-III gene expression by TNFalpha involves C/EBPdelta/NF-IL6beta via an IL-1 independent pathway. *FEBS Lett.* 415(2), S. 217-220. 1997a.
- Lacorte, J. M.; Ktistaki, E.; Beigneux, A. et al. Activation of CAAT enhancer-binding protein delta (C/EBPdelta) by interleukin-1 negatively influences apolipoprotein C-III expression. *J.Biol.Chem.* 272(38), S. 23578-23584. 1997b.
- Ladias, J. A.; Hadzopoulou-Cladaras, M.; Kardassis, D. et al. Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII, and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. *J.Biol.Chem.* 267(22), S. 15849-15860. 1992.
- Lai, C. Q.; Parnell, L. D.; Ordovas, J. M. The APOA1/C3/A4/A5 gene cluster, lipid metabolism and cardiovascular disease risk. *Curr.Opin.Lipidol.* 16(2), S. 153-166. 2005.
- Lamarche, B.; Moorjani, S.; Cantin, B. et al. Associations of HDL2 and HDL3 subfractions with ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17(6), S. 1098-1105. 1997.
- Lambert, D. A.; Catapano, A. L.; Smith, L. C. et al. Effect of the apolipoprotein C-II/C-III1 ratio on the capacity of purified milk lipoprotein lipase to hydrolyse triglycerides in monolayer vesicles. *Atherosclerosis* 127(2), S. 205-212. 1996.
- Lamon-Fava, S.; Ordovas, J. M.; Schaefer, E. J. Estrogen increases apolipoprotein (apo) A-I secretion in hep G2 cells by modulating transcription of the apo A-I gene promoter. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19(12), S. 2960-2965. 1999.

- LaRosa, J. C.; Levy, R. I.; Herbert, P. et al. A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 41(1), S. 57-62. 1970.
- Lavrentiadou, S. N.; Hadzopoulou-Cladaras, M.; Kardassis, D. et al. Binding specificity and modulation of the human ApoCIII promoter activity by heterodimers of ligand-dependent nuclear receptors. *Biochemistry* 38(3), S. 964-975. 1999.
- Law, S. W.; Gray, G.; Brewer, H. B., Jr. et al. Human apolipoprotein A-I and C-III genes reside in the p11---q13 region of chromosome 11. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 118(3), S. 934-942. 1984.
- Le Beyec, J.; Chauffeton, V.; Kan, H. Y. et al. The -700/-310 fragment of the apolipoprotein A-IV gene combined with the -890/-500 apolipoprotein C-III enhancer is sufficient to direct a pattern of gene expression similar to that for the endogenous apolipoprotein A-IV gene. *J.Biol.Chem.* 274(8), S. 4954-4961. 1999.
- Lerman, L. S.; Fischer, S. G.; Hurley, I. et al. Sequence-determined DNA separations. *Annu.Rev.Biophys.Bioeng.* 13, S. 399-423. 1984.
- Leung; Chen, E.; Goeddel, D. V. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique - J.Methods Cell Mol.Biol.* 1, S. 11-15. 1989.
- Lewis, G. F. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr.Opin.Lipidol.* 8(3), S. 146-153. 1997.
- Lewis, L. A. und Page, I. H. Electrophoretic and ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins of normal, nephrotic and hypertensive persons. *Circulation* 7(5), S. 707-717. 1953.
- Li, G. P.; Wang, J. Y.; Yan, S. K. et al. Genetic effect of two polymorphisms in the apolipoprotein A5 gene and apolipoprotein C3 gene on serum lipids and lipoproteins levels in a Chinese population. *Clin.Genet.* 65(6), S. 470-476. 2004.
- Li, W. H.; Tanimura, M.; Luo, C. C. et al. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *J.Lipid Res.* 29(3), S. 245-271. 1988.
- Li, W. W.; Dammerman, M. M.; Smith, J. D. et al. Common genetic variation in the promoter of the human apo CIII gene abolishes regulation by insulin and may contribute to hypertriglyceridemia. *J.Clin.Invest* 96(6), S. 2601-2605. 1995.
- Li, Y.; Kijac, A. Z.; Sligar, S. G. et al. Structural analysis of nanoscale self-assembled discoidal lipid bilayers by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys.J.* 91(10), S. 3819-3828. 2006.
- Li, Y. J.; Wei, Y. S.; Fu, X. H. et al. The apolipoprotein CIII enhancer regulates both extensive histone modification and intergenic transcription of human

- apolipoprotein AI/CIII/AIV genes but not apolipoprotein AV. *J.Biol.Chem.* 283(42), S. 28436-28444. 2008.
- Liang, H. Q.; Rye, K. A.; Barter, P. J. Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. *J.Lipid Res.* 35(7), S. 1187-1199. 1994.
- Liang, H. Q.; Rye, K. A.; Barter, P. J. Cycling of apolipoprotein A-I between lipid-associated and lipid-free pools. *Biochim.Biophys.Acta* 1257(1), S. 31-37. 1995.
- Liang, H. Q.; Rye, K. A.; Barter, P. J. Remodelling of reconstituted high density lipoproteins by lecithin:cholesterol acyltransferase. *Journal of Lipid Research* 37(9), S. 1962-1970. 1996.
- Lins, L.; Flore, C.; Chapelle, L. et al. Lipid-interacting properties of the N-terminal domain of human apolipoprotein C-III. *Protein Eng* 15(6), S. 513-520. 2002.
- Liu, M.; Chung, S.; Shelness, G. S. et al. Hepatic ABCA1 and VLDL triglyceride production. *Biochim Biophys Acta Epub ahead of print.* 2011.
- Liu, M.; Shen, L.; Doi, T. et al. Neuropeptide Y and lipid increase apolipoprotein AIV gene expression in rat hypothalamus. *Brain Res.* 971(2), S. 232-238. 2003.
- Liu, Y. J.; Ordovas, J. M.; Gao, G. M. et al. Pharmacogenetic association of the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster and lipid responses to fenofibrate: the Genetics of Lipid-Lowering Drugs and Diet Network study. *Pharmacogenetics and Genomics* 19(2), S. 161-169. 2009.
- Lohse, P.; Kindt, M. R.; Rader, D. J. et al. Genetic polymorphism of human plasma apolipoprotein A-IV is due to nucleotide substitutions in the apolipoprotein A-IV gene. *J.Biol.Chem.* 265(17), S. 10061-10064. 1990a.
- Lohse, P.; Kindt, M. R.; Rader, D. J. et al. Human plasma apolipoproteins A-IV-0 and A-IV-3. Molecular basis for two rare variants of apolipoprotein A-IV-1. *J.Biol.Chem.* 265(21), S. 12734-12739. 1990b.
- Lohse, P.; Kindt, M. R.; Rader, D. J. et al. Three genetic variants of human plasma apolipoprotein A-IV. apoA-IV-1(Thr347----Ser), apoA-IV-0(Lys167----Glu,Gln360----His), and apoA-IV-3(Glu165----Lys). *J.Biol.Chem.* 266(21), S. 13513-13518. 1991.
- Luchoomun, J. und Hussain, M. M. Assembly and secretion of chylomicrons by differentiated Caco-2 cells. Nascent triglycerides and preformed phospholipids are preferentially used for lipoprotein assembly. *J.Biol.Chem.* 274(28), S. 19565-19572. 1999.
- Maeda, N.; Li, H.; Lee, D. et al. Targeted disruption of the apolipoprotein C-III gene in mice results in hypotriglyceridemia and protection from postprandial hypertriglyceridemia. *J.Biol.Chem.* 269(38), S. 23610-23616. 1994.

- Mahley, R. W. und Huang, Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J.Clin.Invest* 117(1), S. 94-98. 2007.
- Mahley, R. W.; Innerarity, T. L.; Weisgraber, K. B. et al. Altered metabolism (in vivo and in vitro) of plasma lipoproteins after selective chemical modification of lysine residues of the apoproteins. *J.Clin.Invest* 64(3), S. 743-750. 1979.
- Mancini, M.; Steiner, G.; Betteridge, D. J. et al. Acquired (secondary) forms of hypertriglyceridemia. *Am.J.Cardiol.* 68(3), S. 17A-21A. 1991.
- Mangelsdorf, D. J.; Thummel, C.; Beato, M. et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83(6), S. 835-839. 1995.
- Manninen, V.; Tenkanen, L.; Koskinen, P. et al. Joint effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study. Implications for treatment. *Circulation* 85(1), S. 37-45. 1992.
- Marcil, M.; Boucher, B.; Gagne, E. et al. Lack of association of the apolipoprotein A-I-C-III-A-IV gene XmnI and SstI polymorphisms and of the lipoprotein lipase gene mutations in familial combined hyperlipoproteinemia in French Canadian subjects. *J.Lipid Res.* 37(2), S. 309-319. 1996.
- März, W.; Baumstark, M. W.; Scharnagl, H. et al. Accumulation of "small dense" low density lipoproteins (LDL) in a homozygous patients with familial defective apolipoprotein B-100 results from heterogenous interaction of LDL subfractions with the LDL receptor. *J.Clin.Invest* 92(6), S. 2922-2933. 1993.
- Matsunaga, A.; Sasaki, J.; Han, H. et al. Compound heterozygosity for an apolipoprotein A1 gene promoter mutation and a structural nonsense mutation with apolipoprotein A1 deficiency. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19(2), S. 348-355. 1999.
- McCoy, M. G.; Sun, G. S.; Marchadier, D. et al. Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *J.Lipid Res.* 43(6), S. 921-929. 2002.
- Menzel, H. J.; Boerwinkle, E.; Schrangl-Will, S. et al. Human apolipoprotein A-IV polymorphism: frequency and effect on lipid and lipoprotein levels. *Hum.Genet.* 79(4), S. 368-372. 1988.
- Menzel, H. J.; Kovary, P. M.; Assmann, G. Apolipoprotein A-IV polymorphism in man. *Hum.Genet.* 62(4), S. 349-352. 1982.
- Menzel, H. J.; Sigurdsson, G.; Boerwinkle, E. et al. Frequency and effect of human apolipoprotein A-IV polymorphism on lipid and lipoprotein levels in an Icelandic population. *Hum.Genet.* 84(4), S. 344-346. 1990.
- Meyer, P.; Nigam, A.; Marcil, M. et al. The therapeutic potential of high-density lipoprotein mimetic agents in coronary artery disease. *Curr.Atheroscler.Rep.* 11(5), S. 329-333. 2009.

- Miccoli, R.; Zhu, Y.; Daum, U. et al. A natural apolipoprotein A-I variant, apoA-I (L141R)Pisa, interferes with the formation of alpha-high density lipoproteins (HDL) but not with the formation of pre beta 1-HDL and influences efflux of cholesterol into plasma. *J.Lipid Res.* 38(6), S. 1242-1253. 1997.
- Millan, J.; Pinto, X.; Munoz, A. et al. Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vasc.Health Risk Manag.* 5, S. 757-765. 2009.
- Millar, J. S. und Packard, C. J. Heterogeneity of apolipoprotein B-100-containing lipoproteins: what we have learnt from kinetic studies. *Curr.Opin.Lipidol.* 9(3), S. 197-202. 1998.
- Minnich, A.; Collet, X.; Roghani, A. et al. Site-directed mutagenesis and structure-function analysis of the human apolipoprotein A-I. Relation between lecithin-cholesterol acyltransferase activation and lipid binding. *J.Biol.Chem.* 267(23), S. 16553-16560. 1992.
- Moore, R. E.; Kawashiri, M. A.; Kitajima, K. et al. Apolipoprotein A-I deficiency results in markedly increased atherosclerosis in mice lacking the LDL receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23(10), S. 1914-1920. 2003.
- Morrison, A. und Hokanson, J. E. The independent relationship between triglycerides and coronary heart disease. *Vasc.Health Risk Manag.* 5(1), S. 89-95. 2009.
- Mullikin, J. Clone overlap SNPs detected from the public human 19-Mar-2001 draft sequence (unveröffentlicht). 2001.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 51 Pt 1, S. 263-273. 1986.
- Musliner, T. A.; Long, M. D.; Forte, T. M. et al. Dissociation of high density lipoprotein precursors from apolipoprotein B-containing lipoproteins in the presence of unesterified fatty acids and a source of apolipoprotein A-I. *J.Lipid Res.* 32(6), S. 917-933. 1991.
- Musso, M.; Bocciardi, R.; Parodi, S. et al. Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *J.Mol.Diagn.* 8(5), S. 544-550. 2006.
- Myers, R. M.; Fischer, S. G.; Lerman, L. S. et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 13(9), S. 3131-3145. 1985a.
- Myers, R. M.; Fischer, S. G.; Maniatis, T. et al. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 13(9), S. 3111-3129. 1985b.

- Myers, R. M.; Lumelsky, N.; Lerman, L. S. et al. Detection of single base substitutions in total genomic DNA. *Nature* 313(6002), S. 495-498. 1985c.
- Myklebost, O. und Rogne, S. A physical map of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 19. *Hum.Genet.* 78(3), S. 244-247. 1988.
- Nagamine, C. M.; Chan, K.; Lau, Y. F. A PCR artifact: generation of heteroduplexes. *Am.J.Hum.Genet.* 45(2), S. 337-339. 1989a.
- Nagamine, C. M.; Chan, K.; Lau, Y. F. C. A Pcr Artifact - Generation of Heteroduplexes. *American Journal of Human Genetics* 45(2), S. 337-339. 1989b.
- Nagasawa, M.; Akasaka, Y.; Ide, T. et al. Highly sensitive upregulation of apolipoprotein A-IV by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonist in human hepatoma cells. *Biochem.Pharmacol.* 74(12), S. 1738-1746. 2007.
- Nagasawa, M.; Hara, T.; Kashino, A. et al. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) response element (PPRE) in the human apolipoprotein A-IV gene. *Biochem.Pharmacol.* 78(5), S. 523-530. 2009.
- Nakabayashi, Y. und Nishigaki, K. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) can be explained by semistable conformation dynamics of single-stranded DNA. *Journal of Biochemistry* 120(2), S. 320-325. 1996.
- Nakajima, K.; Nakajima, Y.; Takeichi, S. et al. Plasma remnant-like lipoprotein particles or LDL-C as major pathologic factors in sudden cardiac death cases. *Atherosclerosis* 198(1), S. 237-246. 2008.
- Nakajima, K.; Saito, T.; Tamura, A. et al. Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti apo B-100 and anti apo A-I immunoaffinity mixed gels. *Clin.Chim.Acta* 223(1-2), S. 53-71. 1993.
- Nanjee, M. N.; Cooke, C. J.; Garvin, R. et al. Intravenous apoA-I/lecithin discs increase pre-beta-HDL concentration in tissue fluid and stimulate reverse cholesterol transport in humans. *J.Lipid Res.* 42(10), S. 1586-1593. 2001.
- Nanjee, M. N.; Crouse, J. R.; King, J. M. et al. Effects of intravenous infusion of lipid-free apo A-I in humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 16(9), S. 1203-1214. 1996.
- Narayanaswami, G. und Taylor, P. D. Improved efficiency of mutation detection by denaturing high-performance liquid chromatography using modified primers and hybridization procedure. *Genet.Test.* 5(1), S. 9-16. 2001.
- National Center for Biotechnology Information, N. L. o. M. Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). dbSNP accession:{ss1 or ss1 - ss100}, (dbSNP Build ID: {build ID}). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> . 2011.

- Navab, M.; Ananthramaiah, G. M.; Reddy, S. T. et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J.Lipid Res.* 45(6), S. 993-1007. 2004.
- Neubeck, W.; Wieland, H.; Habenicht, A. et al. Improved assessment of plasma lipoprotein patterns. III. Direct measurement of lipoproteins after gel-electrophoresis. *Clin.Chem.* 23(7), S. 1296-1300. 1977.
- Neufeld, E. B.; Remaley, A. T.; Demosky, S. J. et al. Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *Journal of Biological Chemistry* 276(29), S. 27584-27590. 2001.
- Nichols, W. C.; Dwulet, F. E.; Liepnieks, J. et al. Variant apolipoprotein AI as a major constituent of a human hereditary amyloid. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 156(2), S. 762-768. 1988.
- Nickerson, D. A. und Rieder, M. J. Pharmacogenetics and Risk of Cardiovascular Disease (unveröffentlicht). 2007.
- Ning, Z.; Cox, A. J.; Ilikin, J. C. SSAHA: A Fast Search Method for Large DNA Databases (unveröffentlicht). 2001.
- Nishigaki, K.; Husimi, Y.; Tsubota, M. Detection of Differences in Higher-Order Structure Between Highly Homologous Single-Stranded Dnas by Low-Temperature Denaturant Gradient Gel-Electrophoresis. *Journal of Biochemistry* 99(3), S. 663-671. 1986.
- Nissen, H.; Lestavel, S.; Hansen, T. S. et al. Mutation screening of the LDLR gene and ApoB gene in patients with a phenotype of familial hypercholesterolemia and normal values in a functional LDL receptor apolipoprotein B assay. *Clinical Genetics* 54(1), S. 79-82. 1998.
- Nissen, S. E.; Tsunoda, T.; Tuzcu, E. M. et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* 290(17), S. 2292-2300. 2003.
- Nollau, P. und Wagener, C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. The IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques. *J.Int.Fed.Clin.Chem.* 9(4), S. 162-170. 1997.
- Nordestgaard, B. G.; Benn, M.; Schnohr, P. et al. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 298(3), S. 299-308. 2007.
- Ochoa, A.; Bovard-Houppermans, S.; Zakin, M. M. Human apolipoprotein A-IV gene expression is modulated by members of the nuclear hormone receptor superfamily. *Biochim.Biophys.Acta* 1210(1), S. 41-47. 1993.
- Ogami, K.; Hadzopoulou-Cladaras, M.; Cladaras, C. et al. Promoter elements and factors required for hepatic and intestinal transcription of the human ApoCIII gene. *J.Biol.Chem.* 265(17), S. 9808-9815. 1990.

- Olivecrona, G. und Beisiegel, U. Lipid binding of apolipoprotein CII is required for stimulation of lipoprotein lipase activity against apolipoprotein CII-deficient chylomicrons. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17(8), S. 1545-1549. 1997.
- Olivecrona, T.; Hultin, M.; Bergo, M. et al. Lipoprotein lipase: regulation and role in lipoprotein metabolism. *Proc.Nutr.Soc.* 56(2), S. 723-729. 1997.
- Olivier, M.; Wang, X.; Cole, R. et al. Haplotype analysis of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 11. *Genomics* 83(5), S. 912-923. 2004.
- Olivieri, O.; Bassi, A.; Stranieri, C. et al. Apolipoprotein C-III, metabolic syndrome, and risk of coronary artery disease. *J.Lipid Res.* 44(12), S. 2374-2381. 2003.
- Olivieri, O.; Stranieri, C.; Bassi, A. et al. ApoC-III gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *J.Lipid Res.* 43(9), S. 1450-1457. 2002.
- Oram, J. F. ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. *Current Opinion in Lipidology* 13(4), S. 373-381. 2002.
- Oram, J. F. HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23(5), S. 720-727. 2003.
- Ordovas, J. M.; Civeira, F.; Genest, J., Jr. et al. Restriction fragment length polymorphisms of the apolipoprotein A-I, C-III, A-IV gene locus. Relationships with lipids, apolipoproteins, and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 87(1), S. 75-86. 1991.
- Orita, M.; Iwahana, H.; Kanazawa, H. et al. Detection of Polymorphisms of Human Dna by Gel-Electrophoresis As Single-Strand Conformation Polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(8), S. 2766-2770. 1989.
- Paabo, S. und Wilson, A. C. Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. *Nature* 334(6181), S. 387-388. 1988.
- Pagani, F.; Sidoli, A.; Giudici, G. A. et al. Human apolipoprotein A-I gene promoter polymorphism: association with hyperalphalipoproteinemia. *J.Lipid Res.* 31(8), S. 1371-1377. 1990.
- Palais, R. A.; Liew, M. A.; Wittwer, C. T. Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping. *Analytical Biochemistry* 346(1), S. 167-175. 2005.
- Panzenbock, U. und Stocker, R. Formation of methionine sulfoxide-containing specific forms of oxidized high-density lipoproteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1703(2), S. 171-181. 2005.
- Papazafiri, P.; Ogami, K.; Ramji, D. P. et al. Promoter elements and factors involved in hepatic transcription of the human ApoA-I gene positive and

- negative regulators bind to overlapping sites. *J.Biol.Chem.* 266(9), S. 5790-5797. 1991.
- Patsch, J. R.; Gotto, A. M.; Olivecrona, T. et al. Formation of High-Density Lipoprotein-2-Like Particles During Lipolysis of Very Low-Density Lipoproteins In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75(9), S. 4519-4523. 1978.
- Patsch, W.; Sharrett, A. R.; Chen, I. Y. et al. Associations of allelic differences at the A-I/C-III/A-IV gene cluster with carotid artery intima-media thickness and plasma lipid transport in hypercholesterolemic-hypertriglyceridemic humans. *Arterioscler.Thromb.* 14(6), S. 874-883. 1994.
- Payseur, B. A.; Clark, A. G.; Hixson, J. et al. Contrasting multi-site genotypic distributions among discordant quantitative phenotypes: The APO-A1/C3/A4/A5 gene cluster and cardiovascular disease risk factors. *Genetic Epidemiology* 30(6), S. 508-518. 2006.
- Pearson, K.; Saito, H.; Woods, S. C. et al. Structure of human apolipoprotein A-IV: a distinct domain architecture among exchangeable apolipoproteins with potential functional implications. *Biochemistry* 43(33), S. 10719-10729. 2004.
- Pedersen, K. O. Ultracentrifugal studies on serum and serum fractions. 1945. Uppsala.
- Pedersen, T. R.; Olsson, A. G.; Faergeman, O. et al. Lipoprotein changes and reduction in the incidence of major coronary heart disease events in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Circulation* 97(15), S. 1453-1460. 1998.
- Pennacchio, L. A.; Olivier, M.; Hubacek, J. A. et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 294(5540), S. 169-173. 2001.
- Phillips, J. C.; Wriggers, W.; Li, Z. et al. Predicting the structure of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein disks. *Biophys.J.* 73(5), S. 2337-2346. 1997.
- Pocock, S. J.; Shaper, A. G.; Phillips, A. N. Concentrations of high density lipoprotein cholesterol, triglycerides, and total cholesterol in ischaemic heart disease. *BMJ* 298(6679), S. 998-1002. 1989.
- Pollex, R. L.; Ban, M. R.; Young, T. K. et al. Association between the -455T>C promoter polymorphism of the APOC3 gene and the metabolic syndrome in a multi-ethnic sample. *BMC.Med.Genet.* 8, S. 80. 2007.
- Pomp, D. und Medrano, J. F. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. *Biotechniques* 10(1), S. 58-59. 1991.

- Price, W. H.; Morris, S. W.; Kitchin, A. H. et al. DNA restriction fragment length polymorphisms as markers of familial coronary heart disease. *Lancet* 1(8652), S. 1407-1411. 1989.
- Qi, L.; Liu, S. M.; Rifai, N. et al. Associations of the apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride and HDL cholesterol levels in women with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 192(1), S. 204-210. 2007.
- Quarfordt, S. H. und Goodman, D. S. Metabolism of doubly-labeled chylomicron cholesteryl esters in the rat. *J.Lipid Res.* 8(3), S. 264-273. 1967.
- Quarfordt, S. H.; Michalopoulos, G.; Schirmer, B. The effect of human C apolipoproteins on the in vitro hepatic metabolism of triglyceride emulsions in the rat. *J.Biol.Chem.* 257(24), S. 14642-14647. 1982.
- Rader, D. J.; Gregg, R. E.; Meng, M. S. et al. In vivo metabolism of a mutant apolipoprotein, apoA-IIowa, associated with hypoalphalipoproteinemia and hereditary systemic amyloidosis. *J.Lipid Res.* 33(5), S. 755-763. 1992.
- Rader, D. J.; Schafer, J.; Lohse, P. et al. Rapid In-Vivo Transport and Catabolism of Human Apolipoprotein A-VI-1 and Slower Catabolism of the ApoA-Iv-2 Isoprotein. *Journal of Clinical Investigation* 92(2), S. 1009-1017. 1993.
- Rafat, N.; Sattler, A. M.; Hackler, R. et al. Apolipoprotein A-IV in the fed and fasting states. *Clinical Chemistry* 50(7), S. 1270-1271. 2004.
- Rall, S. C., Jr.; Weisgraber, K. H.; Mahley, R. W. et al. Abnormal lecithin:cholesterol acyltransferase activation by a human apolipoprotein A-I variant in which a single lysine residue is deleted. *J.Biol.Chem.* 259(16), S. 10063-10070. 1984.
- Recalde, D.; Ostos, M. A.; Badell, E. et al. Human apolipoprotein A-IV reduces secretion of proinflammatory cytokines and atherosclerotic effects of a chronic infection mimicked by lipopolysaccharide. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24(4), S. 756-761. 2004.
- Redgrave, T. G. Chylomicron metabolism. *Biochem.Soc.Trans.* 32(Pt 1), S. 79-82. 2004.
- Rees, A.; Shoulders, C. C.; Stocks, J. et al. DNA polymorphism adjacent to human apoprotein A-1 gene: relation to hypertriglyceridaemia. *Lancet* 1(8322), S. 444-446. 1983.
- Rees, A.; Stocks, J.; Sharpe, C. R. et al. Deoxyribonucleic acid polymorphism in the apolipoprotein A-1-C-III gene cluster. Association with hypertriglyceridemia. *J.Clin.Invest* 76(3), S. 1090-1095. 1985.
- Rees, W. A.; Yager, T. D.; Korte, J. et al. Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry* 32(1), S. 137-144. 1993.

- Reiner, Z.; Catapano, A. L.; De Backer, G. et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. *European Heart Journal* 32(14), S. 1769-1818. 2011.
- Ren, J. C. Capillary electrophoresis - An attractive alternative tool for analyses of genetic mutations/polymorphisms. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 29(4), S. 461-465. 2001.
- Rigotti, A.; Miettinen, H. E.; Krieger, M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr.Rev.* 24(3), S. 357-387. 2003.
- Rogers, D. P.; Roberts, L. M.; Lebowitz, J. et al. Structural analysis of apolipoprotein A-I: effects of amino- and carboxy-terminal deletions on the lipid-free structure. *Biochemistry* 37(3), S. 945-955. 1998.
- Roosbeek, S.; Vanloo, B.; Duverger, N. et al. Three arginine residues in apolipoprotein A-I are critical for activation of lecithin:cholesterol acyltransferase. *J.Lipid Res.* 42(1), S. 31-40. 2001.
- Rossetti, S.; Corra, S.; Biasi, M. O. et al. Comparison of Heteroduplex and Single-Strand Conformation Analyses, Followed by Ethidium Fluorescence Visualization, for the Detection of Mutations in 4 Human Genes. *Molecular and Cellular Probes* 9(3), S. 195-200. 1995.
- Rothblat, G. H.; Llera-Moya, M.; Atger, V. et al. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J.Lipid Res.* 40(5), S. 781-796. 1999.
- Roux, K. H. Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods Appl.* 4(5), S. S185-S194. 1995.
- Rubin, E. M.; Krauss, R. M.; Spangler, E. A. et al. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 353(6341), S. 265-267. 1991.
- Russell, D. W. und Setchell, K. D. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 31(20), S. 4737-4749. 1992.
- Russo, G. T.; Meigs, J. B.; Cupples, L. A. et al. Association of the Sst-I polymorphism at the APOC3 gene locus with variations in lipid levels, lipoprotein subclass profiles and coronary heart disease risk: the Framingham offspring study. *Atherosclerosis* 158(1), S. 173-181. 2001.
- Rust, S.; Rosier, M.; Funke, H. et al. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat.Genet.* 22(4), S. 352-355. 1999.
- Rye, K. A. und Barter, P. J. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24(3), S. 421-428. 2004.

- Sacks, F. M.; Pfeffer, M. A.; Moye, L. A. et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N.Engl.J.Med.* 335(14), S. 1001-1009. 1996.
- Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839), S. 487-491. 1988.
- Saito, H.; Dhanasekaran, P.; Nguyen, D. et al. Domain structure and lipid interaction in human apolipoproteins A-I and E, a general model. *J.Biol.Chem.* 278(26), S. 23227-23232. 2003.
- Saito, H.; Lund-Katz, S.; Phillips, M. C. Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins. *Prog.Lipid Res.* 43(4), S. 350-380. 2004.
- Sarkar, C.; Ortigao, F. R.; Gyllensten, U. et al. Human genetic bi-allelic sequences (HGBASE), a database of intra-genic polymorphisms. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 93(5), S. 693-694. 1998.
- Saroj, S. D.; Shashidhar, R.; Karani, M. et al. Rapid, sensitive, and validated method for detection of Salmonella in food by an enrichment broth culture - Nested PCR combination assay. *Mol.Cell Probes* . 2008.
- Sauvaget, D.; Chauffeton, V.; Citadelle, D. et al. Restriction of apolipoprotein A-IV gene expression to the intestine villus depends on a hormone-responsive element and parallels differential expression of the hepatic nuclear factor 4alpha and gamma isoforms. *J.Biol.Chem.* 277(37), S. 34540-34548. 2002.
- Scanu, A.; Lewis, L. A.; Bumpus, F. M. Separation and characterization of the protein moiety of human alpha1-lipoprotein. *Arch.Biochem.Biophys.* 74(2), S. 390-397. 1958.
- Scanu, A. M. und Edelstein, C. HDL: bridging past and present with a look at the future. *FASEB J.* 22(12), S. 4044-4054. 2008.
- Schaefer, E. J.; Foster, D. M.; Zech, L. A. et al. The effects of estrogen administration on plasma lipoprotein metabolism in premenopausal females. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 57(2), S. 262-267. 1983.
- Schaefer, J. R. Präventive Kardiologie. Prophylaxe der koronaren Herzkrankheit. 1998. Stuttgart-New York, Schattauer Verlag.
- Schaefer, J. R.; Simon, B.; Soufi, M. et al. Strategies to optimize CAD prevention in modern cardiology. The "Marburg CAD Prevention Project". *Herz* 25(2), S. 113-116. 2000.
- Schmitz, G.; Langmann, T.; Heimerl, S. Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J.Lipid Res.* 42(10), S. 1513-1520. 2001.

- Schmitz, G.; Robenek, H.; Lohmann, U. et al. Interaction of high density lipoproteins with cholesteryl ester-laden macrophages: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high density lipoproteins by macrophages. *EMBO J.* 4(3), S. 613-622. 1985.
- Schneider, J.; Steinmetz, A.; Schaefer, J. R. *Lipidtherapie*. 1. 1996. Stuttgart, Schattauer Verlag.
- Schonfeld, G.; George, P. K.; Miller, J. et al. Apolipoprotein C-II and C-III levels in hyperlipoproteinemia. *Metabolism* 28(10), S. 1001-1010. 1979.
- Schulte, H. und Assmann, G. [Results of the "Munster Prospective Cardiovascular" study]. *Soz.Praventivmed.* 33(1), S. 32-36. 1988.
- Schwab, D. A.; Rea, T. J.; Hanselman, J. C. et al. Elevated hepatic apolipoprotein A-I transcription is associated with diet-induced hyperalphalipoproteinemia in rabbits. *Life Sci.* 66(18), S. 1683-1694. 2000.
- Schwarz, M., Jr. und Poland, D. Statistical thermodynamics of triple-helix unzipping for the collagen model (Gly-Pro-Pro)_n and implications for natural collagen. *Biopolymers* 13(4), S. 687-701. 1974.
- Segrest, J. P.; Garber, D. W.; Brouillette, C. G. et al. The amphipathic alpha helix: a multifunctional structural motif in plasma apolipoproteins. *Adv.Protein Chem.* 45, S. 303-369. 1994.
- Segrest, J. P.; Jones, M. K.; De Loof, H. et al. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J.Lipid Res.* 33(2), S. 141-166. 1992.
- Segrest, J. P.; Jones, M. K.; Klon, A. E. et al. A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein. *J.Biol.Chem.* 274(45), S. 31755-31758. 1999.
- Seidel, D.; Wieland, H.; Ruppert, C. Improved techniques for assessment of plasma lipoprotein patterns. I. Precipitation in gels after electrophoresis with polyanionic compounds. *Clin.Chem.* 19(7), S. 737-739. 1973.
- Sheffield, V. C.; Beck, J. S.; Kwitek, A. E. et al. The Sensitivity of Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis for the Detection of Single Base Substitutions. *Genomics* 16(2), S. 325-332. 1993.
- Sheffield, V. C.; Cox, D. R.; Lerman, L. S. et al. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86(1), S. 232-236. 1989.
- Shelburne, F.; Hanks, J.; Meyers, W. et al. Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. *J.Clin.Invest* 65(3), S. 652-658. 1980.

- Shen, Y.; Lookene, A.; Zhang, L. et al. Site-directed mutagenesis of apolipoprotein CII to probe the role of its secondary structure for activation of lipoprotein lipase. *J.Biol.Chem.* 2009.
- Shenk, T. E.; Rhodes, C.; Rigby, P. W. J. et al. Biochemical Method for Mapping Mutational Alterations in Dna with S1 Nuclease - Location of Deletions and Temperature-Sensitive Mutations in Simian Virus 40. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(3), S. 989-993. 1975.
- Shepherd, J.; Cobbe, S. M.; Ford, I. et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N.Engl.J.Med.* 333(20), S. 1301-1307. 1995.
- Shih, S. J.; Allan, C.; Grehan, S. et al. Duplicated downstream enhancers control expression of the human apolipoprotein E gene in macrophages and adipose tissue. *J.Biol.Chem.* 275(41), S. 31567-31572. 2000.
- Shoulders, C. C.; Grantham, T. T.; North, J. D. et al. Hypertriglyceridemia and the apolipoprotein CIII gene locus: lack of association with the variant insulin response element in Italian school children. *Hum.Genet.* 98(5), S. 557-566. 1996.
- Shoulders, C. C.; Harry, P. J.; Lagrost, L. et al. Variation at the apo AI/CIII/AIV gene complex is associated with elevated plasma levels of apo CIII. *Atherosclerosis* 87(2-3), S. 239-247. 1991.
- Shoulders, C. C.; Kornblihtt, A. R.; Munro, B. S. et al. Gene structure of human apolipoprotein A1. *Nucleic Acids Res.* 11(9), S. 2827-2837. 1983.
- Skalen, K.; Gustafsson, M.; Rydberg, E. K. et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 417(6890), S. 750-754. 2002.
- Sladek, F. M. Orphan receptor HNF-4 and liver-specific gene expression. *Receptor* 3(3), S. 223-232. 1993.
- Smit, M.; Kooij-Meijis, E.; Frants, R. R. et al. Apolipoprotein gene cluster on chromosome 19. Definite localization of the APOC2 gene and the polymorphic Hpa I site associated with type III hyperlipoproteinemia. *Hum.Genet.* 78(1), S. 90-93. 1988.
- Sniderman, A. D.; Jungner, I.; Holme, I. et al. Errors that result from using the TC/HDL C ratio rather than the apoB/apoA-I ratio to identify the lipoprotein-related risk of vascular disease. *J.Intern.Med.* 259(5), S. 455-461. 2006.
- Somerville, L. L. und Wang, K. The Ultrasensitive Silver Protein Stain Also Detects Nanograms of Nucleic-Acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 102(1), S. 53-58. 1981.

- Sorci-Thomas, M.; Prack, M. M.; Dashti, N. et al. Differential effects of dietary fat on the tissue-specific expression of the apolipoprotein A-I gene: relationship to plasma concentration of high density lipoproteins. *J.Lipid Res.* 30(9), S. 1397-1403. 1989.
- Soufi, M.; Kurt, B.; Schweer, H. et al. Genetics and kinetics of familial hypercholesterolemia, with the special focus on FH-(Marburg) p.W556R. *Atherosclerosis Supplements* 10(5), S. 5-11. 2009.
- Soufi, M.; Rust, S.; Walter, M. et al. A combined LDL receptor/LDL receptor adaptor protein 1 mutation as the cause for severe familial hypercholesterolemia. *Gene* 521(1), S. 200-203. 2013.
- Soufi, M.; Sattler, A.; Ruppert, V. et al. Nachweis von neuen VLDL-Rezeptor-Mutationen bei Patienten aus dem KHK-Kollektiv der Marburger Präventions-Allianz und deren Assoziation mit Adipositas. *Clin Res Cardiol* 96 96(1). 2007.
- Soufi, M.; Sattler, A. M.; Kurt, B. et al. Mutation Screening of the APOA5 Gene in Subjects With Coronary Artery Disease. *Journal of Investigative Medicine* 60(7), S. 1015-1019. 2012.
- Soufi, M.; Sattler, A. M.; Maerz, W. et al. A new but frequent mutation of apoB-100-apoB His3543Tyr. *Atherosclerosis* 174(1), S. 11-16. 2004.
- Staels, B. und Auwerx, J. Regulation of apo A-I gene expression by fibrates. *Atherosclerosis* 137 Suppl, S. S19-S23. 1998.
- Stamler, J.; Wentworth, D.; Neaton, J. D. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 256(20), S. 2823-2828. 1986.
- Statistisches Bundesamt Zweigstelle Bonn [destatis (BN)]. Todesursachenstatistik: Sterbefälle (ab 1998). <http://www.gbe-bund.de> . 2011.
- Stein, E. A.; Roth, E. M.; Rhyne, J. M. et al. Safety and tolerability of dalcetrapib (RO4607381/JTT-705): results from a 48-week trial. *European Heart Journal* 31(4), S. 480-488. 2010.
- Stein, O.; Stein, Y.; Lefevre, M. et al. The role of apolipoprotein A-IV in reverse cholesterol transport studied with cultured cells and liposomes derived from an ether analog of phosphatidylcholine. *Biochim.Biophys.Acta* 878(1), S. 7-13. 1986.
- Steinmetz, A.; Barbaras, R.; Ghalim, N. et al. Human apolipoprotein A-IV binds to apolipoprotein A-I/A-II receptor sites and promotes cholesterol efflux from adipose cells. *J.Biol.Chem.* 265(14), S. 7859-7863. 1990.
- Steinmetz, A. und Utermann, G. Activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein A-IV. *J.Biol.Chem.* 260(4), S. 2258-2264. 1985.

- Stokes, J., III; Kannel, W. B.; Wolf, P. A. et al. Blood pressure as a risk factor for cardiovascular disease. The Framingham Study--30 years of follow-up. *Hypertension* 13(5 Suppl), S. I13-I18. 1989.
- Strauss, E. W. Electron microscopic study of intestinal fat absorption in vitro from mixed micelles containing linolenic acid, monoolein, and bile salt. *J.Lipid Res.* 7(2), S. 307-323. 1966.
- Sun, C.; Liu, Z.; Gao, J. et al. Investigations into the natural infection rate of *Haemaphysalis qinghaiensis* with *Piroplasma* using a nested PCR. *Exp.Appl.Acarol.* 44(2), S. 107-114. 2008.
- Sun, Y.; Hegamyer, G.; Colburn, N. H. PCR-direct sequencing of a GC-rich region by inclusion of 10% DMSO: application to mouse c-jun. *Biotechniques* 15(3), S. 372-374. 1993.
- Sun, Z. Y.; Welty, F. K.; Dolnikowski, G. G. et al. Effects of a National Cholesterol Education Program Step II Diet on apolipoprotein A-IV metabolism within triacylglycerol-rich lipoproteins and plasma. *American Journal of Clinical Nutrition* 74(3), S. 308-314. 2001.
- Surguchov, A. P.; Page, G. P.; Smith, L. et al. Polymorphic markers in apolipoprotein C-III gene flanking regions and hypertriglyceridemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 16(8), S. 941-947. 1996.
- Swaney, J. B.; Braithwaite, F.; Eder, H. A. Characterization of the apolipoproteins of rat plasma lipoproteins. *Biochemistry* 16(2), S. 271-278. 1977.
- Swaney, J. B.; Reese, H.; Eder, H. A. Polypeptide composition of rat high density lipoprotein: characterization by SDS-gel electrophoresis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 59(2), S. 513-519. 1974.
- Swenson, T. L.; Brocia, R. W.; Tall, A. R. Plasma Cholesteryl Ester Transfer Protein Has Binding-Sites for Neutral Lipids and Phospholipids. *Journal of Biological Chemistry* 263(11), S. 5150-5157. 1988.
- Takahashi, Y. und Smith, J. D. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(20), S. 11358-11363. 1999.
- Talianidis, I.; Tambakaki, A.; Toursounova, J. et al. Complex interactions between SP1 bound to multiple distal regulatory sites and HNF-4 bound to the proximal promoter lead to transcriptional activation of liver-specific human APOCIII gene. *Biochemistry* 34(32), S. 10298-10309. 1995.
- Talmud, P. J.; Ye, S.; Humphries, S. E. Polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein AI gene associated with differences in apolipoprotein AI levels: the European Atherosclerosis Research Study. *Genet.Epidemiol.* 11(3), S. 265-280. 1994.
- Tanaka, A. Postprandial hyperlipidemia and atherosclerosis. *J.Atheroscler.Thromb.* 11(6), S. 322-329. 2004.

- Tardif, J. C.; Heinonen, T.; Noble, S. High-density lipoprotein/apolipoprotein A-I infusion therapy. *Curr.Atheroscler.Rep.* 11(1), S. 58-63. 2009.
- Tenkanen, H.; Koskinen, P.; Metso, J. et al. A novel polymorphism of apolipoprotein A-IV is the result of an asparagine to serine substitution at residue 127. *Biochim.Biophys.Acta* 1138(1), S. 27-33. 1992.
- Tenkanen, H.; Lukka, M.; Jauhiainen, M. et al. The mutation causing the common apolipoprotein A-IV polymorphism is a glutamine to histidine substitution of amino acid 360. *Arterioscler.Thromb.* 11(4), S. 851-856. 1991.
- Teusink, B.; Voshol, P. J.; Dahlmans, V. E. et al. Contribution of fatty acids released from lipolysis of plasma triglycerides to total plasma fatty acid flux and tissue-specific fatty acid uptake. *Diabetes* 52(3), S. 614-620. 2003.
- Thuahnai, S. T.; Lund-Katz, S.; Anantharamaiah, G. M. et al. A quantitative analysis of apolipoprotein binding to SR-BI: multiple binding sites for lipid-free and lipid-associated apolipoproteins. *J.Lipid Res.* 44(6), S. 1132-1142. 2003.
- Thuahnai, S. T.; Lund-Katz, S.; Dhanasekaran, P. et al. Scavenger receptor class B type I-mediated cholesteryl ester-selective uptake and efflux of unesterified cholesterol. Influence of high density lipoprotein size and structure. *J.Biol.Chem.* 279(13), S. 12448-12455. 2004.
- Tilly-Kiesi, M.; Zhang, Q.; Ehnholm, S. et al. ApoA-IHelsinki (Lys107-->0) associated with reduced HDL cholesterol and LpA-I:A-II deficiency. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15(9), S. 1294-1306. 1995.
- Tocharoentanaphol, C.; Promso, S.; Zelenika, D. et al. Evaluation of resequencing on number of tag SNPs of 13 atherosclerosis-related genes in Thai population. *J.Hum.Genet.* 53(1), S. 74-86. 2008.
- Tricerri, M. A.; Behling Agree, A. K.; Sanchez, S. A. et al. Arrangement of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein disks: an alternative model based on fluorescence resonance energy transfer experiments. *Biochemistry* 40(16), S. 5065-5074. 2001.
- Tybjaerg-Hansen, A.; Nordestgaard, B. G.; Gerdes, L. U. et al. Genetic markers in the apo AI-CIII-AIV gene cluster for combined hyperlipidemia, hypertriglyceridemia, and predisposition to atherosclerosis. *Atherosclerosis* 100(2), S. 157-169. 1993.
- Tzamelis, I. und Zannis, V. I. Binding specificity and modulation of the ApoA-I promoter activity by homo- and heterodimers of nuclear receptors. *J.Biol.Chem.* 271(14), S. 8402-8415. 1996.
- Utermann, G. und Beisiegel, U. Apolipoprotein A-IV: a protein occurring in human mesenteric lymph chylomicrons and free in plasma. Isolation and quantification. *Eur.J.Biochem.* 99(2), S. 333-343. 1979.

- Utermann, G.; Feussner, G.; Franceschini, G. et al. Genetic variants of group A apolipoproteins. Rapid methods for screening and characterization without ultracentrifugation. *J.Biol.Chem.* 257(1), S. 501-507. 1982a.
- Utermann, G.; Haas, J.; Steinmetz, A. et al. Apolipoprotein A-I Giessen (Pro143---Arg). A mutant that is defective in activating lecithin:cholesterol acyltransferase. *Eur.J.Biochem.* 144(2), S. 325-331. 1984.
- Utermann, G.; Steinmetz, A.; Paetzold, R. et al. Apolipoprotein A I Marburg: studies on two kindreds with a mutant of human apolipoprotein A I. *Hum.Genet.* 61(4), S. 329-337. 1982b.
- van der Steeg, W. A.; Holme, I.; Boekholdt, S. M. et al. High-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein particle size, and apolipoprotein A-I: significance for cardiovascular risk: the IDEAL and EPIC-Norfolk studies. *J.Am.Coll.Cardiol.* 51(6), S. 634-642. 2008.
- van der Vliet, H. N.; Sammels, M. G.; Leegwater, A. C. et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J.Biol.Chem.* 276(48), S. 44512-44520. 2001.
- Van Lenten, B. J.; Wagner, A. C.; Anantharamaiah, G. M. et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptides. *Curr.Atheroscler.Rep.* 11(1), S. 52-57. 2009.
- Van Lenten, B. J.; Wagner, A. C.; Jung, C. L. et al. Anti-inflammatory apoA-I-mimetic peptides bind oxidized lipids with much higher affinity than human apoA-I. *J.Lipid Res.* 49(11), S. 2302-2311. 2008.
- Viswanathan, V. K.; Krcmarik, K.; Cianciotto, N. P. Template secondary structure promotes polymerase jumping during PCR amplification. *Biotechniques* 27(3), S. 508-511. 1999.
- Vitello, L. B. und Scanu, A. M. Studies on human serum high density lipoproteins. Self-association of apolipoprotein A-I in aqueous solutions. *J.Biol.Chem.* 251(4), S. 1131-1136. 1976.
- von Eckardstein, A.; Funke, H.; Schulte, M. et al. Nonsynonymous polymorphic sites in the apolipoprotein (apo) A-IV gene are associated with changes in the concentration of apo B- and apo A-I-containing lipoproteins in a normal population. *Am.J.Hum.Genet.* 50(5), S. 1115-1128. 1992.
- von Eckardstein, A.; Huang, Y.; Wu, S. et al. Lipoproteins containing apolipoprotein A-IV but not apolipoprotein A-I take up and esterify cell-derived cholesterol in plasma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15(10), S. 1755-1763. 1995.
- von Eckardstein, A.; Jauhiainen, M.; Huang, Y. et al. Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL. *Biochim.Biophys.Acta* 1301(3), S. 255-262. 1996.
- von Eckardstein, A.; Nofer, J. R.; Assmann, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol trans-

- port. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21(1), S. 13-27. 2001.
- Voshol, P. J.; Rensen, P. C.; van Dijk, K. W. et al. Effect of plasma triglyceride metabolism on lipid storage in adipose tissue: studies using genetically engineered mouse models. *Biochim.Biophys.Acta* 1791(6), S. 479-485. 2009.
- Vu-Dac, N.; Chopin-Delannoy, S.; Gervois, P. et al. The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and Rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J.Biol.Chem.* 273(40), S. 25713-25720. 1998.
- Walldius, G.; Jungner, I.; Aastveit, A. H. et al. The apoB/apoA-I ratio is better than the cholesterol ratios to estimate the balance between plasma proatherogenic and antiatherogenic lipoproteins and to predict coronary risk. *Clin.Chem.Lab Med.* 42(12), S. 1355-1363. 2004.
- Walsh, A.; Azrolan, N.; Wang, K. et al. Intestinal expression of the human apoA-I gene in transgenic mice is controlled by a DNA region 3' to the gene in the promoter of the adjacent convergently transcribed apoC-III gene. *J.Lipid Res.* 34(4), S. 617-623. 1993.
- Walsh, A.; Ito, Y.; Breslow, J. L. High levels of human apolipoprotein A-I in transgenic mice result in increased plasma levels of small high density lipoprotein (HDL) particles comparable to human HDL3. *J.Biol.Chem.* 264(11), S. 6488-6494. 1989.
- Wang, C. S.; McConathy, W. J.; Kloer, H. U. et al. Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *J.Clin.Invest* 75(2), S. 384-390. 1985.
- Wang, D. G.; Fan, J. B.; Siao, C. J. et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280(5366), S. 1077-1082. 1998.
- Wang, N.; Silver, D. L.; Costet, P. et al. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J.Biol.Chem.* 275(42), S. 33053-33058. 2000.
- Wang, X. L.; Liu, S. X.; McCredie, R. M. et al. Polymorphisms at the 5'-end of the apolipoprotein AI gene and severity of coronary artery disease. *J.Clin.Invest* 98(2), S. 372-377. 1996.
- Weinberg, R. B. und Spector, M. S. Structural properties and lipid binding of human apolipoprotein A-IV. *J.Biol.Chem.* 260(8), S. 4914-4921. 1985.
- Weisgraber, K. H.; Bersot, T. P.; Mahley, R. W. et al. A-Imilano apoprotein. Isolation and characterization of a cysteine-containing variant of the A-I apoprotein from human high density lipoproteins. *J.Clin.Invest* 66(5), S. 901-907. 1980.

- Weissensteiner, T. und Lanchbury, J. S. Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing. *Biotechniques* 21(6), S. 1102-1108. 1996.
- Werner, C.; Filmer, A.; Fritsch, M. et al. The Homburg Cream and Sugar Study (HCS): Prospective evaluation of postprandial triglycerides and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. 2011. 409.
- Wheeler, D. A.; Srinivasan, M.; Egholm, M. et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 452(7189), S. 872-876. 2008.
- Widom, R. L.; Ladias, J. A.; Kouidou, S. et al. Synergistic interactions between transcription factors control expression of the apolipoprotein AI gene in liver cells. *Mol.Cell Biol.* 11(2), S. 677-687. 1991.
- Williams, D. L.; Connelly, M. A.; Temel, R. E. et al. Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr.Opin.Lipidol.* 10(4), S. 329-339. 1999.
- Williams, D. L.; Llera-Moya, M.; Thuahnai, S. T. et al. Binding and cross-linking studies show that scavenger receptor BI interacts with multiple sites in apolipoprotein A-I and identify the class A amphipathic alpha-helix as a recognition motif. *J.Biol.Chem.* 275(25), S. 18897-18904. 2000.
- Willnow, T. E.; Goldstein, J. L.; Orth, K. et al. Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J.Biol.Chem.* 267(36), S. 26172-26180. 1992.
- Wilsie, L. C. und Orlando, R. A. The low density lipoprotein receptor-related protein complexes with cell surface heparan sulfate proteoglycans to regulate proteoglycan-mediated lipoprotein catabolism. *J.Biol.Chem.* 278(18), S. 15758-15764. 2003.
- Wilson, P. W.; Abbott, R. D.; Castelli, W. P. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis* 8(6), S. 737-741. 1988.
- Windler, E.; Chao, Y.; Havel, R. J. Regulation of the hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in the rat. Opposing effects of homologous apolipoprotein E and individual C apoproteins. *J.Biol.Chem.* 255(17), S. 8303-8307. 1980.
- Windler, E. und Havel, R. J. Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and humans on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver. *J.Lipid Res.* 26(5), S. 556-565. 1985.
- Winship, P. R. An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Res.* 17(3), S. 1266. 1989.
- Winter, E.; Yamamoto, F.; Almoguera, C. et al. A Method to Detect and Characterize Point Mutations in Transcribed Genes - Amplification and Overexpression of the Mutant C-Ki-Ras Allele in Human-Tumor Cells. *Proceed-*

- ings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82(22), S. 7575-7579. 1985.
- Wojciechowski, A. P.; Farrall, M.; Cullen, P. et al. Familial combined hyperlipidaemia linked to the apolipoprotein AI-CII-AIV gene cluster on chromosome 11q23-q24. *Nature* 349(6305), S. 161-164. 1991.
- Wood, D.; De Backer, G.; Faergeman, O. et al. Prevention of coronary heart disease in clinical practice: recommendations of the Second Joint Task Force of European and other Societies on Coronary Prevention. *Atherosclerosis* 140(2), S. 199-270. 1998.
- Wu, A. L. und Windmueller, H. G. Relative contributions by liver and intestine to individual plasma apolipoproteins in the rat. *J.Biol.Chem.* 254(15), S. 7316-7322. 1979.
- Wu, D. Y.; Ugozzoli, L.; Pal, B. K. et al. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol.* 10(3), S. 233-238. 1991.
- Wu, Z.; Wagner, M. A.; Zheng, L. et al. The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 14(9), S. 861-868. 2007.
- Xiao, J.; Zhang, F.; Wiltshire, S. et al. The apolipoprotein AII rs5082 variant is associated with reduced risk of coronary artery disease in an Australian male population. *Atherosclerosis* 199(2), S. 333-339. 2008.
- Yamashita, S.; Ishigami, M.; Arai, T. et al. Very high density lipoproteins induced by plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP) have a potent antiatherogenic function. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 748, S. 606-608. 1995.
- Yancey, P. G.; Bortnick, A. E.; Kellner-Weibel, G. et al. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23(5), S. 712-719. 2003.
- Yang, L.; Arora, K.; Beard, W. A. et al. Critical role of magnesium ions in DNA polymerase beta's closing and active site assembly. *J.Am.Chem.Soc.* 126(27), S. 8441-8453. 2004.
- Yokoyama, S.; Fukushima, D.; Kupferberg, J. P. et al. The mechanism of activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by apolipoprotein A-I and an amphiphilic peptide. *J.Biol.Chem.* 255(15), S. 7333-7339. 1980.
- Yusuf, S.; Hawken, S.; Ounpuu, S. et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 364(9438), S. 937-952. 2004.
- Zaiou, M.; Visvikis, S.; Gueguen, R. et al. DNA polymorphisms of human apolipoprotein A-IV gene: frequency and effects on lipid, lipoprotein and apolipoprotein levels in a French population. *Clin.Genet.* 46(3), S. 248-254. 1994.

- Zannis, V. I.; Kan, H. Y.; Kritis, A. et al. Transcriptional regulatory mechanisms of the human apolipoprotein genes in vitro and in vivo. *Curr.Opin.Lipidol.* 12(2), S. 181-207. 2001.
- Zannis, V. I.; Liu, T.; Zanni, M. et al. Regulatory gene mutations affecting apolipoprotein gene expression: functions and regulatory behavior of known genes may guide future pharmacogenomic approaches to therapy. *Clin.Chem.Lab Med.* 41(4), S. 411-424. 2003.
- Zerrad-Saadi, A.; Therond, P.; Chantepie, S. et al. HDL3-mediated inactivation of LDL-associated phospholipid hydroperoxides is determined by the redox status of apolipoprotein A-I and HDL particle surface lipid rigidity: relevance to inflammation and atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29(12), S. 2169-2175. 2009.
- Zhang, Y.; Zanotti, I.; Reilly, M. P. et al. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation* 108(6), S. 661-663. 2003.
- Zhao, G. J.; Yin, K.; Fu, K. C. et al. The Interaction of ApoA-I and ABCA1 Triggers Signal Transduction Pathways to Mediate Efflux of Cellular Lipids. *Mol.Med.* 2011.
- Zhao, Y. und Marcel, Y. L. Serum albumin is a significant intermediate in cholesterol transfer between cells and lipoproteins. *Biochemistry* 35(22), S. 7174-7180. 1996.
- Zheng, L.; Nukuna, B.; Brennan, M. L. et al. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J.Clin.Invest* 114(4), S. 529-541. 2004.
- Ziemssen, F.; Schnepf, R.; Pfeiffer, A. Single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis in detection of point mutations: a technique and its limitations in the diagnostics of maturity onset diabetes in the young. *Medizinische Klinik* 96(9), S. 515-520. 2001.
- Zijngel, V.; Welling, G. W.; Degener, J. E. et al. Denaturing gradient gel electrophoresis as a diagnostic tool in periodontal microbiology. *Journal of Clinical Microbiology* 44(10), S. 3628-3633. 2006.
- Zilversmit, D. B.; Hughes, L. B.; Balmer, J. Stimulation of Cholesterol Ester Exchange by Lipoprotein-Free Rabbit Plasma. *Biochimica et Biophysica Acta* 409(3), S. 393-398. 1975.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ABCA1	ATP-bindender Kassettentransporter 1
ACAT	Acyl-Coenzym-A-Cholesterintransferase
AdML	Adenovirus major late
Apo	Apolipoprotein
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Arp-1	ApoAI-regulierendes Protein 1
ATF-2	aktivierender Transkriptionsfaktor 2
BAD	BCL2-associated agonist of cell death
Bcl 2	B-cell lymphoma 2
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CD40	cluster of differentiation 40
CE	Cholesterinester
C/EBP (δ)	CCAAT/ enhancer binding protein (δ)
CETP	Cholesterylester-Transferprotein
CM	Chylomikronen
CMC	chemical mismatch cleavage
cod	codierender Genabschnitt
DGGE	denaturierende Gradientengelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
DmT2	Diabetes mellitus Typ 2
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EAR-2, -3	ErbA related protein 2, 3
EGF	endothelial growth factor
FFS	freie Fettsäuren
FG	Fallgruppe
HCR	hepatic control region

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Seite 172

HDL	high density lipoprotein
hepLip	hepatische Lipase
HMG-CoA-Reduktase	Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase
HNF-1, -2, -4	hepatic nuclear factor 1, 2, 4
HRE	hormone response element
HSPG	Heparan-Sulfat-Proteoglykan
IDF	International Diabetes Federation
IDL	intermediate density lipoprotein
IFG	impaired fasting glucose (gestörter Nüchtern-glukose-plasmaspiegel)
IGT	impaired glucose tolerance (gestörte Glukosetoleranz)
IL-1 β	Interleukin 1 β
IRE	insulin response element
KG	Kontrollgruppe
KHK	Koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	low density lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL-related protein
MCP 1	monocyte chemoattractant protein 1
ME	multiple enhancer
mRNA	messenger ribonucleic acid
MTP	mikrosomales Transferprotein
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NCEP	National Cholesterol Education Program
NCEP ATP III	National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III
NPC1	Niemann-Pick-Protein C1

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Seite 173

NPC1L1	Niemann-Pick C1 Like 1-Protein
oxLDL	oxidiertes low density lipoprotein
p	p-Wert
PAI 1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
PP2C	Protein Phosphatase 2C
PPAR α , γ , δ	Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor α , γ , δ
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RLP	remnant like particle
rpm	rounds per minute
RXR α	retinoic X-receptor α
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SSCP	single strand conformation polymorphism
SNP	single nucleotide polymorphism
SP1	specificity protein 1
SRB1	Scavenger Rezeptor Klasse B Typ 1
TAA	Tetraalkylammonium
TG	Triglyzeride
TNF α	Tumornekrosefaktor α
VHDL	very high density lipoprotein
VLDL	very low density lipoprotein
VLDLR	very low density lipoprotein-Rezeptor
vs	versus
WHO	World Health Organization

8.2 In dieser Arbeit getestete Rezepturen

Tabelle 8-1: Zusammenstellung der getesteten PCR-Ansätze für je eine PCR

Ansatz	Reagenz	Volumen	Ansatz	Reagenz	Volumen
1)	10xPCR	2,5 µl	4.1)	10xPCR	2,5 µl
	50mM MgCl ₂	1,5 µl		Betaine	2,5 µl
	25mM dNTPs	0,2 µl		50mM MgCl ₂	1,5 µl
	5pmol Primer	5 µl		25mM dNTPs	0,2 µl
	H ₂ O	10,7 µl		5pmol Primer	5 µl
	Taq-Polymerase	0,1 µl		H ₂ O	8,2 µl
		20 µl	Taq-Polymerase	0,1 µl	20 µl
2)	10xPCR	2,5 µl	4.2)	10xPCR	2,5 µl
	50mM MgCl ₂	0,75 µl		Betaine/ Glycerol	2,5 µl
	25mM dNTPs	0,2 µl		50mM MgCl ₂	1,5 µl
	5pmol Primer	5 µl		25mM dNTPs	0,2 µl
	H ₂ O	11,45 µl		5pmol Primer	5 µl
	Taq-Polymerase	0,1 µl		H ₂ O	8,2 µl
		20 µl	Taq-Polymerase	0,1 µl	20 µl
3)	10xPCR	2,5 µl	4.3)	10xPCR	2,5 µl
	DMSO/ Glycerol	2,5 µl		Betaine/ DMSO	2,5 µl
	50mM MgCl ₂	1,5 µl		50mM MgCl ₂	1,5 µl
	25mM dNTPs	0,2 µl		25mM dNTPs	0,2 µl
	5pmol Primer	5 µl		5pmol Primer	5 µl
	H ₂ O	8,2 µl		H ₂ O	8,2 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl	Taq-Polymerase	0,1 µl	20 µl	
		20 µl			

Fortsetzung der Tabelle auf der folgenden Seite

Fortsetzung der Tabelle von Seite 175

Ansatz	Reagenz	Volumen	Ansatz	Reagenz	Volumen
4.4)	10xPCR	2,5 µl	5.3)	10xPCR	2,5 µl
	Betaine/ Glycerol/ DMSO	2,5 µl		Betaine/ DMSO	2,5 µl
	50mM MgCl ₂	1,5 µl		50mM MgCl ₂	0,75 µl
	25mM dNTPs	0,2 µl		25mM dNTPs	0,2 µl
	5pmol Primer	5 µl		5pmol Primer	5 µl
	H ₂ O	8,2 µl		H ₂ O	8,95 µl
	Taq-Polymerase	0,1 µl		Taq-Polymerase	0,1 µl
		20 µl			20 µl
5.1)	10xPCR	2,5 µl	5.4)	10xPCR	2,5 µl
	Betaine	2,5 µl		Betaine/ Glycerol/ DMSO	2,5 µl
	50mM MgCl ₂	0,75 µl		50mM MgCl ₂	0,75 µl
	25mM dNTPs	0,2 µl		25mM dNTPs	0,2 µl
	5pmol Primer	5 µl		5pmol Primer	5 µl
	H ₂ O	8,95 µl		H ₂ O	8,95 µl
	Taq-Polymerase	0,1 µl		Taq-Polymerase	0,1 µl
	20 µl		20 µl		
5.2)	10xPCR	2,5 µl			
	Betaine/ Glycerol	2,5 µl			
	50mM MgCl ₂	0,75 µl			
	25mM dNTPs	0,2 µl			
	5pmol Primer	5 µl			
	H ₂ O	8,95 µl			
	Taq-Polymerase	0,1 µl			
	20 µl				

Tabelle 8-2: Zusammenstellung aller getesteten DGGE-Bedingungen

Fragment	Denaturans/ %	Acrylamid/ %	Laufzeit/ h	Spannung/ V	Tempera- tur/ °C
ApoAI	0-80	8	5	120	60
Promoter	0-80	4	6	120	60
	0-80	4	6	120	50
	0-80	6-10	6	120	60
	0-80	6-10	6	120	50
	40-80	8	5	120	60
	50-65	9	7	120	60
	50-65	8	6	120	60
	50-70	8	6	120	60
	60-70	6-10	6	120	60
	60-70	6-10	6	120	50
	60-70	6-10	6	200	60
	ApoAIV	0-80	8	5	120
Promoter	0-80	4	6	120	60
	0-80	4	6	120	50
	0-80	6-10	6	120	60
	0-80	6-10	6	120	50
	40-80	8	5	120	60
	50-65	8	6	120	60
	50-65	7,5	7	120	60
	50-65	6-10	6	200	60
	60-70	6-10	6	120	60
	60-70	6-10	6	120	50
	60-70	6-10	6	200	60
	ApoCIII	0-80	6-10	5	120
Enhancer	0-80	6-10	6	120	50
	0-80	6-10	6	120	60

Fortsetzung der Tabelle auf der Folgeseite

Fortsetzung der Tabelle von Seite 177

Fragment	Denaturans/ %	Acrylamid/ %	Laufzeit/ h	Spannung/ V	Tempera- tur/ °C
ApoCIII	0-80	8	5	120	60
Promoter	0-80	4	6	120	60
	0-80	4	6	120	50
	0-80	6-10	6	120	50
	0-80	6-10	5	120	50
	0-80	6-10	6	120	60
	40-80	8	5	120	60
	50-65	9	7	120	60
	50-65	8	6	120	60
	60-70	6-10	6	120	50
	60-70	6-10	6	120	60
	60-70	6-10	6	200	60

Tabelle 8-3: Übersicht über die hergestellten Gellösungen für die DGGE

Chemikalie	Volumen
50% Denaturans, 8% Acrylamid	
Harnstoff, >=99,5%, p.a. (g)	21
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)) (ml)	20
50x TAE-Puffer (ml)	2
Formamid deionisiert (ml)	20
Glycerol (UltraPure™) (ml)	--
Aqua dest. (ml)	ad 100
60% Denaturans, 4 % Acrylamid	
Harnstoff, >=99,5%, p.a. (g)	25,2
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)) (ml)	10
50x TAE-Puffer (ml)	2
Formamid deionisiert (ml)	24
Glycerol (UltraPure™) (ml)	10
Aqua dest. (ml)	ad 100

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Seite 178

Chemikalie	Volumen
60% Denaturans, 6% Acrylamid	
Harnstoff, >=99,5%, p.a. (g)	25,2
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)) (ml)	15
50x TAE-Puffer (ml)	2
Formamid deionisiert (ml)	24
Glycerol (UltraPure™) (ml)	10
Aqua dest. (ml)	ad 100
65% Denaturans, 8% Acrylamid	
Harnstoff, >=99,5%, p.a. (g)	27,3
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)) (ml)	20
50x TAE-Puffer (ml)	2
Formamid deionisiert (ml)	26
Glycerol (UltraPure™) (ml)	--
Aqua dest. (ml)	ad 100
65% Denaturans, 10% Acrylamid	
Harnstoff, >=99,5%, p.a. (g)	27,3
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)) (ml)	25
50x TAE-Puffer (ml)	2
Formamid deionisiert (ml)	26
Glycerol (UltraPure™) (ml)	10
Aqua dest. (ml)	ad 100
70% Denaturans, 10% Acrylamid	
Harnstoff, >=99,5%, p.a. (g)	29,4
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)) (ml)	25
50x TAE-Puffer (ml)	2
Formamid deionisiert (ml)	28
Glycerol (UltraPure™) (ml)	10
Aqua dest. (ml)	ad 100
Fortsetzung der Tabelle auf der Folgeseite	

Fortsetzung der Tabelle von Seite 179

Chemikalie	Volumen
80% Denaturans, 4 % Acrylamid	
Harnstoff, >=99,5%, p.a. (g)	33,6
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)) (ml)	10
50x TAE-Puffer (ml)	2
Formamid deionisiert (ml)	32
Glycerol (UltraPure™) (ml)	10
Aqua dest. (ml)	ad 100
80% Denaturans, 7,5% Acrylamid	
Harnstoff, >=99,5%, p.a. (g)	33,6
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)) (ml)	17,75
50x TAE-Puffer (ml)	2
Formamid deionisiert (ml)	32
Glycerol (UltraPure™) (ml)	--
Aqua dest. (ml)	ad 100
80% Denaturans, 8% Acrylamid	
Harnstoff, >=99,5%, p.a. (g)	33,6
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)) (ml)	20
50x TAE-Puffer (ml)	2
Formamid deionisiert (ml)	32
Glycerol (UltraPure™) (ml)	--
Aqua dest. (ml)	ad 100
80% Denaturans, 9% Acrylamid	
Harnstoff, >=99,5%, p.a. (g)	33,6
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)) (ml)	22
50x TAE-Puffer (ml)	2
Formamid deionisiert (ml)	32
Glycerol (UltraPure™) (ml)	--
Aqua dest. (ml)	ad 100

Fortsetzung der Tabelle auf der Folgeseite

Fortsetzung der Tabelle von Seite 180

Chemikalie	Volumen
80% Denaturans, 10% Acrylamid	
Harnstoff, $\geq 99,5\%$, p.a. (g)	33,6
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)) (ml)	25
50x TAE-Puffer (ml)	2
Formamid deionisiert (ml)	32
Glycerol (UltraPure™) (ml)	10
Aqua dest. (ml)	ad 100

8.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren

Adamkiewicz, Aumüller, Basler, Baum, Czubayko, Daut, Dettmeyer, Eilers, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Gerdes, Görg, Gress, Grundmann, Grzeschik, Hermann-Lingen, Hertl, Hilt, Höffken, Jungclas, Klenk, Klose, Koolman, Krieg, Lang, Lenz, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Martin, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertl, Plant, Renz, Richter, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schofer, Schrader, Tibesku, Vogelmeier, Wagner, Werner, Wulf

8.4 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an

...Herrn Prof. Dr. Schaefer für die Bereitstellung des Themas, der Räumlichkeiten und Gerätschaften und der Ermöglichung dieser Arbeit.

...Muhidien Soufi für die Unterstützung während der Versuchsphase.

...Sabine und Ulrike, dem Rückgrat des Labors, für unermüdliche Hilfe und Erklärungen nicht nur während der Einarbeitung.

...meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums, Unterstützung und Aufmunterung, auch wenn es mal nicht so gut lief.

...Corinna, meiner Quelle der Kraft in allen Situationen, ohne die ich Marburg wahrscheinlich verlassen hätte, bevor ich diese Arbeit begonnen habe.

...Johanna für eine tolle Zusammenarbeit, perfekte Abstimmung, eine Menge Spaß während der Laborarbeit und guten und produktiven Austausch auch noch während des Schreibens der Arbeit.

...allen, die meinen Ärger und meine Freude immer geduldig ausgehalten haben, ohne genervt zu sein.