

**Molekulare Mechanismen
isolierter und Syndrom-assoziiierter
Lipidstoffwechselerkrankungen**

Inaugural Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. nat. med.
der Medizinischen Fakultät
und
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Nadine Plume
aus Langenfeld

Köln 2011

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Humangenetik (Direktorin: Frau Prof. Dr. Brunhilde Wirth) der Universität zu Köln unter der wissenschaftlichen Anleitung von Herrn Dr. med. Bernd Wollnik angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. Rita Schmutzler

Prof. Dr. Peter Nürnberg

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 26.05.2011

**MEINEN ELTERN DORIS UND JÖRG,
MEINEM BRUDER CHRISTOPHER
&
MATTHIAS**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Lipidstoffwechsel	1
1.1.1 Lipoproteine	1
1.1.2 Apolipoproteine.....	2
1.1.3 Enzyme und zelluläre Transporterproteine im Lipoproteinstoffwechsel	4
1.1.4 Zentrale Rezeptoren des Lipoproteinstoffwechsels	5
1.1.4.1 LDL-Rezeptor	5
1.1.4.2 Scavenger-Rezeptor Typ B1 (SCARB1).....	7
1.1.4.3 Makrophagen Scavenger-Rezeptoren Typ A1 und A2 (SCARA1/2)	8
1.1.5 Die zelluläre Cholesterinhomöostase	9
1.1.5.1 Intrazelluläre Synthese von Cholesterin.....	9
1.1.5.2 Zelluläre Aufnahme von LDL über den LDL-Rezeptor	10
1.1.5.3 Transkriptionelle Regulation durch SREBPs.....	12
1.1.6 Stoffwechsel der Lipoproteine	16
1.1.6.1 Exogener Lipoproteinstoffwechsel.....	16
1.1.6.2 Endogener Lipoproteinstoffwechsel	17
1.1.6.3 Reverser Lipoproteinstoffwechsel.....	18
1.1.7 Lipidstoffwechselstörungen	19
1.1.8 Familiäre Hypercholesterinämie	22
1.1.8.1 <i>LDLR</i> -Mutationen	22
1.1.8.2 <i>APOB</i> -Mutationen	25
1.1.8.3 <i>PCSK9</i> -Mutationen	28
1.1.8.4 <i>ARH</i> -Mutationen	29
1.2 Angeborene Syndrome mit metabolischen Störungen	30
1.2.1 Woodhouse-Sakati Syndrom.....	30
1.2.2 Progerie	31
1.2.2.1 Natürliche Alterung und Progerie Syndrome.....	31
1.2.2.2 Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom.....	33
1.3 Gen-Identifizierung durch Exom-Sequenzierung	34
2 Zielsetzung	39
3 Material und Methoden	41
3.1 Material	41
3.1.1 Chemikalien	41
3.1.2 Lösungen, Puffer und Medien	44
3.1.3 Kommerzielle Reagenziensysteme	47
3.1.4 Primer	48
3.1.5 Enzyme.....	48
3.1.6 Vektoren	48
3.1.7 Antikörper	49
3.1.8 DNAs	49
3.1.9 Zellen und Bakterien	50
3.1.10 Verbrauchsmaterial	51
3.1.11 Arbeitsgeräte	52
3.1.12 Computerprogramme	54
3.1.13 Datenbanken.....	55

3.2 Methoden.....	56
3.2.1 Molekulargenetische Methoden	56
3.2.1.1 Isolierung von DNA aus Blut.....	56
3.2.1.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA.....	56
3.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	57
3.2.1.4 Agarosegelelektrophorese	60
3.2.1.5 Enzymatische Aufreinigung von PCR-Produkten.....	60
3.2.1.6 Sequenzierung	61
3.2.1.7 <i>Next Generation</i> Sequenzierung.....	62
3.2.1.8 Molekulargenetische Testung	63
3.2.1.9 Genomweite Kopplungsanalyse.....	64
3.2.1.10 Mikrosatelliten-Markeranalyse	66
3.2.1.11 Stammbäume	68
3.2.1.12 MLPA.....	68
3.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	70
3.2.2.1 Herstellung der Konstrukte für die Proteinexpression	70
3.2.2.2 Vektoren	73
3.2.2.3 Amplifikation der zu klonierenden Produkte	75
3.2.2.4 Kolonie PCR	76
3.2.2.5 <i>Megaprime</i> -PCR zur zielgerichteten Mutagenese.....	76
3.2.2.6 Säulenaufreinigung von PCR-Produkten	77
3.2.2.7 Restriktionsverdau.....	77
3.2.2.8 Aufreinigung von Restriktionsverdau-Produkten	78
3.2.2.9 TOPO TA Klonierung.....	79
3.2.2.10 Klonierung über Restriktionsenzym-Schnittstellen	79
3.2.3 Mikrobiologische Methoden	80
3.2.3.1 Transformation	80
3.2.3.2 Ausplattieren von Bakterienzellen	80
3.2.3.3 Bakterienkulturen	81
3.2.3.4 Mini-Plasmidpräparation.....	81
3.2.3.5 Midi-Plasmidpräparation.....	81
3.2.4 Zellbiologische Methoden.....	82
3.2.4.1 Auftauen der HEK-293-Zellen.....	82
3.2.4.2 Kultivierung von HEK-293-Zellen	82
3.2.4.3 Einfrieren der HEK-293-Zellen.....	83
3.2.5 Proteinbiochemische und immunologische Methoden	83
3.2.5.1 Transiente Transfektion.....	83
3.2.5.2 Isolierung von Proteinen aus HEK-293-Zellen.....	85
3.2.5.3 Proteinbestimmung.....	86
3.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	86
3.2.5.5 Coomassie-Färbung.....	87
3.2.5.6 Western Blot.....	88
3.2.5.7 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine.....	88
3.2.5.8 <i>Luciferase Reporter Assay</i>	89
3.2.5.9 Inhibierung der zellulären Proteindegradierung.....	92
3.2.5.10 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	92
3.2.5.11 Affinitätspräzipitation mit GST-Fusionsproteinen.....	94
4 Ergebnisse	95
4.1 Mutationsanalysen bei Patienten der LIANCO Studie	95
4.1.1 Identifizierung von Mutationen in den bekannten FH-Genen.....	95

4.1.2	<i>LDLR</i> -Mutationen	96
4.1.2.1	Identifizierung von Mutationen in <i>LDLR</i> mit Hilfe von Sequenzierung.....	100
4.1.2.2	Deletions-/Duplikationsanalyse mittels MLPA	104
4.1.3	Funktionelle Analyse der c.-188C>T Promotor-Mutation in <i>LDLR</i>	109
4.1.4	Identifizierung einer <i>APOB</i> -Mutation mittels Sequenzierung	112
4.1.5	Genotypisierung von Nonsense-SNPs in Patienten mit <i>LDLR</i> -Mutation	113
4.1.6	Identifizierung von zwei neuen Hypercholesterinämie-Genen, <i>SREBP1</i> und <i>SREBP2</i>	117
4.1.7	Funktionelle Charakterisierung der <i>SREBP1</i> - und <i>SREBP2</i> -Mutationen	120
4.1.7.1	Die Mutationen in <i>SREBP1</i> und <i>SREBP2</i> führen zu einer verminderten <i>LDLR</i> -Expression	121
4.1.7.2	Die Mutationen in <i>SREBP1</i> und <i>SREBP2</i> führen zu einer verminderten Interaktion mit dem Protein SCAP.....	125
4.1.7.3	Die Instabilität von mutanten <i>SREBP</i> -Proteinen ist nicht auf einen Abbau über das Proteasom-Ubiquitin-System zurückzuführen.....	129
4.2	Mutationsanalysen in Familien mit autosomal-dominanter familiärer Hypercholesterinämie.....	131
4.2.1	Familie FH1.....	131
4.2.1.1	Mutationsanalysen in den bekannten FH-Genen	131
4.2.1.2	Genomweite Kopplungsanalyse.....	132
4.2.1.3	Identifizierung der <i>LDLR</i> -Mutation p.C222R in der Familie FH1	134
4.2.1.4	Analyse der Region auf Chromosom 9q31.1	137
4.2.2	Familien FH2-5	140
4.2.2.1	Mutationsanalysen in den bekannten FH-Genen	140
4.2.2.2	Kopplungsanalyse in der Familie FH2.....	141
4.2.2.3	Identifizierte Veränderungen in <i>LDLR</i>	142
4.3	Identifizierung der molekularen Ursache von Woodhouse-Sakati-ähnlichen Syndromen	143
4.3.1	Familie HYPO1	143
4.3.1.1	Kopplungsanalyse und Mutationsanalysen in positionellen Kandidatengenen in der Familie HYPO1.....	144
4.3.1.2	Identifizierung der <i>C2orf37</i> -Mutation c.1091+1G>A in der Familie HYPO1 ..	147
4.3.2	Familien HYPO2 und HYPO3	148
4.3.3	Familien HYPO4-HYPO7.....	150
4.4	Identifizierung einer molekularen Ursache des Wiedemann-Rautenstrauch Syndroms.	152
5	Diskussion	161
5.1	Mutationsanalysen bei Patienten der LIANCO Studie	161
5.1.1	<i>LDLR</i> -Mutationen	162
5.1.2	Funktionelle Analyse der c.-188C>T Promotor-Mutation in <i>LDLR</i>	166
5.1.3	Genotypisierung von Nonsense-SNPs in Patienten mit <i>LDLR</i> -Mutation	170
5.1.4	Therapeutische und diagnostische Strategien	172
5.1.5	Identifizierung von zwei neuen Hypercholesterinämie-Genen - <i>SREBP1</i> und <i>SREBP2</i> - und Pathomechanismus der detektierten Mutationen	175
5.2	Mutationsanalysen in Familien mit autosomal-dominanter familiärer Hypercholesterinämie.....	179
5.3	Identifizierung der molekularen Ursache von Woodhouse-Sakati-ähnlichen Syndromen	181
5.4	Identifizierung einer molekularen Ursache des Wiedemann-Rautenstrauch Syndroms.	184
6	Zusammenfassung.....	193
7	Summary	196
8	Literaturverzeichnis	199

9 Anhang	221
-----------------------	------------

Danksagung

Lebenslauf

Publikationsverzeichnis

Erklärung

Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit werden Desoxyribonukleinsäure und Ribonukleinsäure wie im englischen mit DNA und RNA abgekürzt. Abkürzungen für Gene und Proteine werden im Text dieser Arbeit bei der ersten Erwähnung erklärt und dann als solche verwendet.

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
Bp	Basenpaar/-e
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CH ₃ COONa	Natriumacetat
cM	centi-Morgan
cm	Zentimeter
Cu ¹⁺ / Cu ²⁺	Kupfer-Ionen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ε	Extinktionskoeffizient
E _x	Extinktion bei der Wellenlänge von x nm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol

Abkürzungsverzeichnis

EtBr	Ethidiumbromid
Exo I	Exonuklease I
FH	familiäre Hypercholesterinämie
FKS	fetales Kälberserum
FL	<i>full length</i>
F-Primer	Vorwärtsprimer
G	Guanosin
g	Gramm / Erdbeschleunigung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEK-293	<i>human embryonic kidney cells</i> (humane embryonale Nierenkarzinomzellen)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
hs	homo sapiens
ins	Insertion
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Konzentration
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB-Medium	<i>luria bertani</i> Medium, Vollmedium zur Bakterienkultivierung
LOD	<i>logarithm of the odds</i>
M	Molar
Mb	Megabasen
MCS	<i>multiple cloning site</i> (Klonierungsstelle)
MeOH	Methanol
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
miRNA	micro RNA

ml	Milliliter
MLPA	<i>multiplex ligation dependent probe amplification assay</i>
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten RNA)
Mut	Mutante / Mutation
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGS	<i>Next Generation Sequenzierung</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	optische Dichte
Ori	<i>origin of replication</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pg	Picogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Proteaseinhibitor
pmol	pico mol
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	RNA-Endonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
R-Primer	Rückwärtsprimer
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase / Reverse Transkription
s	Sekunde
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (Polymorphismus eines einzelnen Nukleotids)
T	Thymidin
Tab.	Tabelle

Abkürzungsverzeichnis

TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TD	<i>Touch down</i>
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	<i>units</i> = Enzymeinheiten / Uracil
UTR	<i>untranslated region</i> (untranslatierte Region)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VF	Verdünnungsfaktor
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
%	Prozent

Drei- und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutaminsäure	Glu	E	Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

1 Einleitung

Metabolische Erkrankungen haben eine hohe gesellschaftliche Relevanz, da sie sehr häufig auftreten und mit einer hohen Mortalitäts- und Morbiditätsrate einhergehen. Bei metabolischen Erkrankungen handelt es sich um Störungen des intermediären Stoffwechsels. Sie sind häufig genetisch bedingt, können aber auch erworben sein und zeichnen sich durch einen Enzym- oder Hormonmangel oder auch durch ein Überangebot oder einen Mangel an Nährstoffen aus. Sowohl die Ausmaße als auch das Vorkommen von Stoffwechselkrankheiten sind sehr unterschiedlich und reichen von weit verbreiteten Volkskrankheiten bis hin zu seltenen Erbkrankheiten mit oftmals tödlichen Folgen. Eine Manifestation der Erkrankungen kann in jedem Alter erfolgen, teilweise treten sie bereits pränatal in Erscheinung. Stoffwechselkrankheiten sind gekennzeichnet durch eine Anhäufung oder vermehrte Ausscheidung von Stoffwechselzwischenprodukten, Produktion von veränderten Metaboliten, Speicherung von Stoffwechselprodukten mit spezifischen Verteilungsmustern im Körper oder durch Transportdefekte für bestimmte Substanzen. Störungen können sowohl im Nucleinsäurestoffwechsel, Aminosäure- und Proteinstoffwechsel, Kohlenhydratstoffwechsel, Fettstoffwechsel und Mineralstoffwechsel als auch im Porphyrinstoffwechsel auftreten.

Die weit verbreiteten metabolischen Erkrankungen Diabetes mellitus, das Metabolische Syndrom oder auch Fettstoffwechselerkrankungen stellen für kardiovaskuläre Ereignisse und die Progression der Atherosklerose bedeutende Risikofaktoren dar. Die Atherosklerose und ihre Folgen sind heute für nahezu 50 % aller Todesfälle in den westlichen Industrienationen verantwortlich (Schaefer, 1998). Sie ist nicht nur eine eigenständige Erkrankung der Arterien, sondern manifestiert sich auch in unterschiedlichen Formen. Am bedeutendsten sind die zerebrovaskuläre Manifestation (Schlaganfall), sowie die kardiale Manifestation der Atherosklerose in Form der koronaren Herzerkrankung (KHK). In Deutschland beruhen ca. 30 % aller Todesfälle auf einer KHK, wobei fast die Hälfte der Betroffenen durch einen akuten Myokardinfarkt zu Tode kommt, während die andere Hälfte an den chronischen Folgen der KHK verstirbt (Niederstadt, 1999).

1.1 Lipidstoffwechsel

1.1.1 Lipoproteine

Lipide sind wasserunlösliche organische Moleküle, die sich aus Triglyzeriden, Cholesterin, Cholesterinestern und Phospholipiden zusammensetzen. Aufgrund ihrer Hydrophobizität

können sie im wässrigen Blutplasma nicht frei zirkulieren, sondern werden stattdessen in wasserlöslichen Lipoproteinen von ihrem Absorptions- oder Syntheseort zum peripheren Gewebe transportiert. Lipoproteine sind nicht-kovalente, sphärische Komplexe aus Lipiden und Proteinen. Sie bilden Mizellenähnliche Partikel mit einem unpolaren Kern aus Cholesterinestern und Triglyzeriden und einer zur wässrigen Phase gerichteten Hülle mit polaren, hydrophilen Anteilen bestehend aus Apolipoproteinen, Phospholipiden und den Hydroxygruppen von unverestertem Cholesterin (Burnett et al., 2008). Lipoproteine unterscheiden sich in ihren physikochemischen Eigenschaften (Dichte, Ladung, Partikelgröße, Zusammensetzung) und lassen sich aufgrund dessen in verschiedene Klassen einteilen. Die am häufigsten genutzte Einteilung basiert auf der hydratisierten Dichte, welche mit zunehmendem Protein- und abnehmendem Lipidgehalt bei den Lipoproteinpartikeln steigt. Sie ermöglicht eine Auftrennung des Lipoproteinspektrums in sieben Hauptfraktionen: Chylomikronen (CM), *very-low-density*-Lipoproteine (VLDL), *intermediate-density*-Lipoproteine (IDL), *low-density*-Lipoproteine (LDL) *high-density*-Lipoproteine (HDL₂, HDL₃) und Lipoprotein(a) (Lp(a)). Zusätzlich ist die Subfraktionierung jeder einzelnen Hauptklasse in viele Unterklassen möglich, die sich in ihren Eigenschaften, metabolischen Verhaltensweisen und pathologischen Rollen unterscheiden (Berneis et al., 2002). In folgender Tabelle sind die Eigenschaften der Lipoproteine zusammengefasst.

Tabelle 1: Eigenschaften von Lipoproteinen

Lipoprotein	Dichte [g/ml]	Größe [nm]	Syntheseort	Lipid-Protein-Verhältnis	Hauptlipid
Chylomikronen	< 0,95	< 10 ⁴	Dünndarm	99:1	Triglyzeride
VLDL	< 1,006	30-80	Leber	90:10	Triglyzeride
IDL	1,006-1,019	25-35	Plasma	85:15	Cholesterin
LDL	1,019-1,063	18-25	Plasma	80:20	Cholesterin
HDL ₂	1,063-1,125	9-12	Leber, Dünndarm	60:40	Phospholipid
HDL ₃	1,125-1,210	5-9	Leber, Dünndarm	45:55	Phospholipid
Lp(a)	1,051-1,082	25-30	Leber	71:29	Cholesterin

Bei dem Lipidtransportsystem handelt es sich um ein sehr dynamisches System. Die Zusammensetzung der Lipoproteine wird durch den Transfer von Lipiden und Apolipoproteinen ständig moduliert.

1.1.2 Apolipoproteine

Der funktionell wichtigste Bestandteil der Lipoproteine sind die Apolipoproteine. Sie wirken einerseits stabilisierend auf die Partikelstruktur, andererseits ermöglichen sie durch ihre spezifischen Strukturen den gerichteten Transport der Lipide. Sie binden an

Membranrezeptoren von Zielzellen, steuern die Aufnahme von Lipiden in die Zielzellen und wirken zusätzlich über die Beeinflussung von Enzymaktivitäten auf den Lipoproteinstoffwechsel. Die Nomenklatur der Apolipoproteine geht auf Alaupovic zurück (Alaupovic et al., 1972). Apolipoproteine, welche auf ein und demselben Lipoproteinpartikel gefunden und als metabolische Einheiten aufgefasst wurden, immunochemisch jedoch distinkt sind, wurden von ihm alphabetisch in die Klassen A, B, C usw. eingeteilt. Mittlerweile ist bekannt, dass die meisten Lipoproteine jedoch verschiedene Apolipoprotein-Klassen enthalten, so dass eine große Anzahl an Lipoproteinen existiert, die sich hinsichtlich ihrer Lipid- und Proteinkomposition unterscheiden. Ein Großteil der Apolipoproteine, vor allem der A- und C-Klassen, weist als charakteristisches Strukturelement eine so genannte amphiphatische Helixstruktur auf. Die Aminosäuren sind so angeordnet, dass sich Helixbezirke ergeben, die rein hydrophob bzw. rein hydrophil sind. Die hydrophilen Bereiche sind der wässrigen Umgebung, die hydrophoben den *Core*-Lipiden der Lipoproteinpartikel zugewandt. Im Gegensatz dazu enthält das Apolipoprotein B einen geringen Anteil an α -Helices. Es besteht vornehmlich aus β -Faltblättern und liegt in den LDL in einer Form vor, wie sie von peripheren Membranproteinen bekannt ist. In der Tabelle 2 sind die Apolipoproteine mit ihren speziellen Funktionen im Lipidstoffwechsel sowie ihr Vorkommen zusammengefasst.

Tabelle 2: Übersicht über die Apolipoproteine des humanen Plasmas, ihr Vorkommen und ihre Funktion. LCAT = Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase, LRP = *low-density* Lipoprotein Rezeptorprotein. (modifiziert aus: Handbuch der Fettstoffwechselstörungen von Peter Schwandt und Klaus Parhofer, Schattauer 2000)

Apolipoprotein	Masse [kDa]	Plasma-konzentration [mg/l]	Vorkommen	Funktion
A-I	28,5	1200-1400	CM, HDL	Strukturprotein, Aktivierung der LCAT, Bindung an HDL-Rezeptor
A-II	17	350-500	HDL	Aktivierung der hepatischen Lipase
A-IV	46	< 50	CM, HDL	Triglyzeridstoffwechsel, Aktivierung der LCAT
A-V	39	0,1-0,2	CM, VLDL, HDL	Erniedrigung der Plasmatriglyzeride
B-100	550	700-900	VLDL, IDL, LDL, Lp(a)	Sekretion von Triglyzeriden und Cholesterin aus Leber und Dünndarm, Strukturprotein, Bindung an LDL-Rezeptor, Aktivierung der Lysolecithin-Acyltransferase
B-48	265	< 50	CM	Resorption von Lipiden und lipidlöslichen Vitaminen aus der Nahrung, Synthese und Sekretion von Chylomikronen, Bindung an LRP
C-I	6,5	50-80	CM, VLDL, HDL	Unterdrückung der Bindung naszierender Lipoproteine an den LDL-Rezeptor und LRP, Aktivierung der LCAT
C-II	8,8	30-70	CM, VLDL, HDL	Aktivierung der Lipoproteinlipase
C-III	8,9	100-120	CM, VLDL, IDL, HDL	Inhibierung der Lipoproteinlipase und hepatischen Lipase, Aktivierung der LCAT, inhibiert hepatische Aufnahme von triglyzeridreichen Lipoproteinen
C-IV	11	1-20	VLDL, HDL	Erhöhung der Plasmatriglyzeride
D	29	80-100	HDL	Aktivierung und Stabilisierung der LCAT
E	34	30-50	CM, VLDL, IDL, HDL	Bindung an LDL-, VLDL-, ApoE-Rezeptor und LRP, Ausschleusung von Cholesterin aus peripheren Zellen
F	30	< 50	HDL	unbekannt
G	72	< 50	VLDL	unbekannt
H	55	150-300	CM	unbekannt
(a)	350-900	variabel	Lp(a)	Beeinflussung der Blutgerinnung und Fibrinolyse, Inhibierung der Angiogenese, Tumorsuppression
J	70	70-200	VLDL, HDL	unbekannt
L	39	4-5	HDL	unbekannt
M	26	< 10	VLDL, HDL	Bildung von prä- β -HDL, Cholesterinefflux

1.1.3 Enzyme und zelluläre Transporterproteine im Lipoproteinstoffwechsel

Neben den Apolipoproteinen gibt es noch eine Reihe von Enzymen und Transferproteinen, welche ihre Hauptaktivität im Plasma und nicht intrazellulär entfalten sowie spezifische Lipidtransporter, die für die Dynamik des Lipoproteinstoffwechsels entscheidend sind. Die wichtigsten Vertreter sind in der Tabelle 3 aufgelistet. Eine detaillierte Beschreibung ihrer spezifischen Funktionen im Lipidstoffwechsel erfolgt innerhalb der nachfolgenden Abschnitte dieser Arbeit.

Tabelle 3: Enzyme, Transferproteine und Transporter des Lipoproteinstoffwechsels und deren Funktion

Protein	Funktion
Lipoproteinlipase (LPL)	Hydrolyse von Triglyzeriden in Chylomikronen und VLDL (Goldberg et al., 2001)
Hepatische Triglyzerid-Lipase (HTGL)	Hydrolyse von Triglyzeriden und Phospholipiden in Chylomikronen, IDL, VLDL und HDL ₂ (Thuren, 2000)
Endotheliale Lipase (EL)	Hydrolyse von Phospholipiden in HDL (Yasuda et al., 2010)
Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT)	Bildung von Cholesterinestern aus Cholesterin und Lecithin (Bereitstellung von > 80 % der Cholesterinester) (Glomset, 1968)
Cholesterinester-Transferprotein (CETP)	Transfer von Cholesterinestern von HDL auf VLDL und LDL im Austausch gegen Triglyzeride, Austausch von <i>Core</i> -Lipiden generell (Davidson, 2010)
Phospholipid-Transferprotein (PLTP)	Transfer von Phospholipiden und Cholesterin von triglyzeridreichen Lipoproteinen auf HDL (Lagor et al., 2010)
Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT)	Veresterung von Cholesterin, Transfer einer Acyl-Gruppe (in der Regel Oleat) von AcylCoA auf Cholesterin (Cholesterinoleat) (Chang et al., 2009)
HMG-CoA-Reduktase (HMGCR)	Schlüsselenzym der intrazellulären Synthese von Cholesterin, Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonat (Thomas, 2001)
ATP-bindender Kassettentransporter 1 (ABCA1)	Ausschleusung von freiem unveresterten Cholesterin und Phospholipiden aus dem Zellinneren auf HDL-Vorläufer (prä-β-HDL) (Fitzgerald et al., 2010)
ATP-bindender Kassettentransporter 5 bzw. 8 (ABCG5/8)	Ausschleusung von Cholesterin aus dem Zellinneren der Enterozyten des Darms zur Ausscheidung (Fitzgerald et al., 2010)
Niemann-Pick Typ C-1 Protein (NPC1L1)	Transport von über die Nahrung aufgenommenen Cholesterin in die Enterozyten des Darms (Jia et al., 2010)

1.1.4 Zentrale Rezeptoren des Lipoproteinstoffwechsels

1.1.4.1 LDL-Rezeptor

Bei dem LDL-Rezeptor handelt es sich um einen Lipoproteinrezeptor der LDL-Rezeptor-Genfamilie, der als erstes Mitglied dieser Familie in den siebziger Jahren von Goldstein und Brown identifiziert wurde (Brown et al., 1974). Die Lipoproteinrezeptoren bilden eine Gruppe von strukturverwandten Transmembranproteinen. Während der LDL-Rezeptor für die zelluläre Aufnahme von im Plasma zirkulierenden Lipoproteinen geringerer Dichte in hepatische und extrahepatische Gewebe eine zentrale Rolle in der Cholesterinhomöostase spielt, erfüllen die anderen Mitglieder verschiedenartige Aufgaben im Organismus, die nicht in direkter Beziehung zum Fettstoffwechsel stehen. Fast alle sind in die Rezeptor-vermittelte Endozytose von zahlreichen Liganden involviert und für die Signaltransduktion von Bedeutung. Weitere prominente Vertreter der LDL-Rezeptor-Genfamilie sind der VLDL-Rezeptor (Takahashi et al., 1992), Apolipoprotein E Rezeptor Typ 2 (Kim et al., 1996), LRP-1 (Herz et al., 1988), LRP-2 (Megalin) (Raychowdhury et al., 1989), LRP-3, LRP-4 (MEGF7), LRP-5, LRP-6, LRP-8, LRP-1B (LR32) und LR11 (Yamazaki et al., 1996). Alle

Mitglieder der LDL-Rezeptor-Genfamilie haben einen charakteristischen Aufbau gemeinsam (siehe Abb. 1). Die Proteine bestehen aus definierten Modulen mit spezifischen strukturellen und funktionellen Eigenschaften, die von ganz bestimmten Exons der entsprechenden Gene eindeutig kodiert werden. Jedes Mitglied der Familie besteht aus denselben Modulen die im LDL-Rezeptor vorhanden sind, nur in einer einzigartigen Konformation.

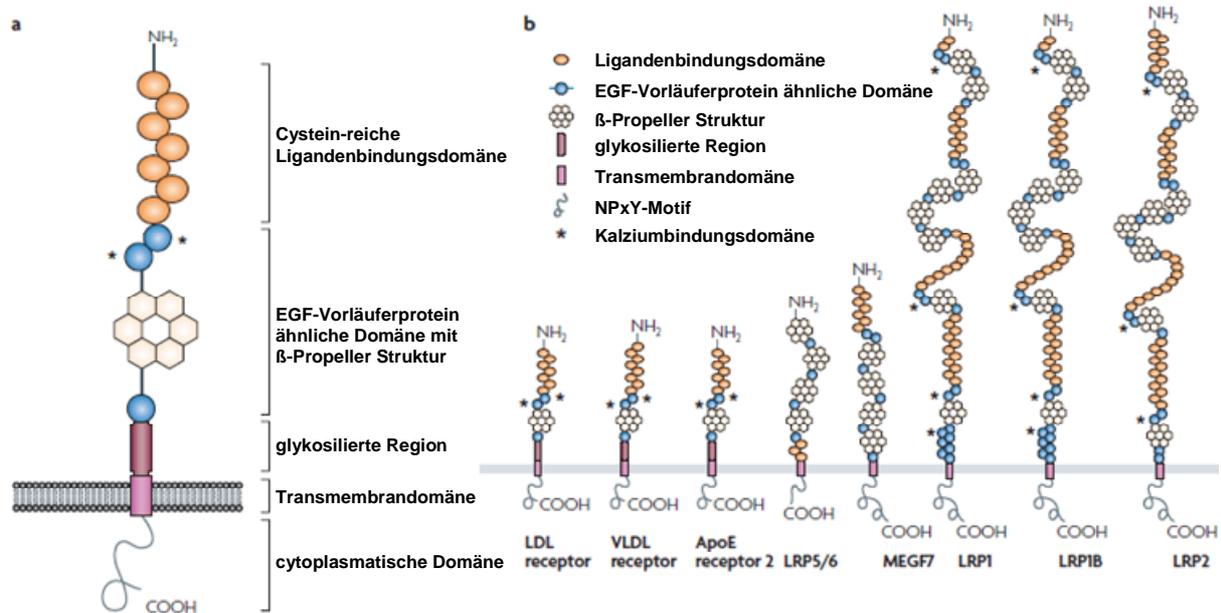


Abbildung 1: Schematische Darstellung a) des LDL-Rezeptors b) weiterer Rezeptoren der LDL-Rezeptor-Genfamilie (modifiziert aus: (Wasan et al., 2008))

Der LDL-Rezeptor setzt sich aus insgesamt 861 Aminosäuren zusammen. Das *LDLR*-Gen umfasst etwa 45 Kb, ist auf Chromosom 19p13.2 lokalisiert und besteht aus 18 kodierenden Exons (Sudhof et al., 1985). Nach Synthese des Rezeptors als 120 kDa Vorläuferprotein im endoplasmatischen Retikulum und korrekter Faltung durch molekulare Chaperone, gelangt dieser in den Golgi-Apparat, wo durch posttranslationale Glykosylierung die reife 160 kDa Form des LDL-Rezeptors entsteht (Cummings et al., 1983, Schneider et al., 1982). Der Rezeptor kommt in unterschiedlicher Anzahl auf nahezu allen Zelltypen vor und besteht aus einer Ligandenbindungsdomäne, einer EGF-Vorläuferprotein ähnlichen Domäne, einer O-glykosidischen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Domäne (siehe Abb. 1). Die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne vermittelt die Interaktion zwischen dem Rezeptor und Apolipoprotein B-100- und Apolipoprotein E-haltigen Lipoproteinen. Die 292 Aminosäuren große Domäne wird von den Exons 2-6 des Gens kodiert und besteht aus sieben sich wiederholenden *repeats* aus jeweils ungefähr 40 Aminosäuren. In jedem *repeat* findet man sechs Cysteine, welche über die Ausbildung von

Disulfidbrücken die Faltung der Domäne in eine rigide Tertiärstruktur bewirken. Dabei werden negativ geladene Aminosäuren an der Oberfläche exponiert. Die *repeats* 4 und 5 bilden eine hydrophobe Tasche aus mit der die positiven amphiphatischen Helices in Apolipoprotein B-100 und Apolipoprotein E in Wechselwirkung treten können (Boren et al., 2001, Boren et al., 1998, Innerarity et al., 1987, Wilson et al., 1991). Die EGF-Vorläuferprotein ähnliche Domäne umfasst etwa 400 Aminosäuren und wird von den Exons 7-14 kodiert. Die Domäne ist charakterisiert durch drei *repeats*, die eine Sequenzhomologie zu Teilen des Vorläuferproteins des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) aufweisen (Russell et al., 1986). Zwischen den beiden N-terminal gelegenen *repeats* und dem *repeat* am C-terminus der Domäne liegt die YWTD-Domäne. Diese setzt sich aus sechs aufeinanderfolgenden Abschnitten aus jeweils 50 Aminosäuren zusammen, wobei sich in jedem dieser Abschnitte die Konsensussequenz Tyr-Trp-Thr-Asp mehrfach wiederholt (Stenflo et al., 1988). Zusammen bilden die Abschnitte eine β -Propeller Struktur aus (Springer, 1998). Die EGF-Vorläuferprotein ähnliche Domäne ist beteiligt an der intrazellulären, pH-abhängigen Dissoziation von Rezeptor und Ligand im sauren Milieu des Endosoms (Davis et al., 1987, Innerarity, 2002). Die Ausbildung von Salzbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem β -Propeller und den *repeats* 4 und 5 in der Ligandenbindungsdomäne bei einem pH von 6 führt zur Freisetzung des via Apolipoprotein B100 und Apolipoprotein E an den Rezeptor gebundenen LDL-Komplexes. Die 58 Aminosäuren umfassende O-glykosidische Domäne des LDL-Rezeptors wird von Exon 15 kodiert und ist reich an Serin- und Threoninresten, von denen die meisten glykosiliert vorliegen (Cummings et al., 1983). Das Exon 16 und ein Teil von Exon 17 kodieren für die Transmembrandomäne des LDL-Rezeptors. Diese besteht aus 22 Aminosäuren, die den Rezeptor in der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran verankern (Russell et al., 1984). Die cytoplasmatische Domäne besteht aus 50 Aminosäuren und wird von einem Teil von Exon 17 und von Exon 18 kodiert. Sie enthält das Internalisierungsmotiv NPxY (Asp-Pro-x-Tyr, x = jede beliebige Aminosäure), an welches das ARH1-Protein in Hepatozyten spezifisch bindet und hierdurch die Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes und die Verankerung in den *coated pits* ermöglicht (Cohen et al., 2003, He et al., 2002).

1.1.4.2 Scavenger-Rezeptor Typ B1 (SCARB1)

Beim Scavenger-Rezeptor Typ B1 handelt es sich um den ersten identifizierten HDL-Rezeptor überhaupt (Acton et al., 1996). Der membranständige Rezeptor setzt sich aus 509 Aminosäuren zusammen und gehört aufgrund seiner Homologie zur CD36-Rezeptorfamilie.

Das *SCARB1*-Gen umfasst 75 Kb, ist auf Chromosom 12q24.31 lokalisiert und besteht aus 13 kodierenden Exons (Cao et al., 1997). Der Rezeptor besitzt kurze N- und C-terminale intrazelluläre Domänen, zwei Transmembrandomänen und eine große extrazelluläre, stark N-glykosylierte Schleife, über welche die Lipoproteinbindung und Cholesterinaufnahme erfolgt (Rigotti et al., 2003). Die Expression des Rezeptors erfolgt hauptsächlich in der Leber und in Zellen, die eine hohe Steroidbiosynthese aufweisen (Landschulz et al., 1996, von Eckardstein et al., 2001). Neben HDL als Hauptliganden bindet SCARB1 auch modifiziertes und natives LDL und vermittelt auch hier die Cholesterinaufnahme (Krieger, 1999). SCARB1 als HDL-Rezeptor spielt eine zentrale Rolle beim reversen Cholesterintransport, welche in der selektiven Aufnahme von Cholesterinestern aus HDL in die Leber besteht. Anders als beim LDL-Rezeptorstoffwechselweg erfolgt hierbei jedoch keine Internalisierung und endosomale Degradation des HDL-Partikels, sondern ein direkter Influx von Cholesterinestern aus dem HDL-Partikel in die Plasmamembran der Zelle. SCARB1 ist in cholesterin- und sphingomyelinreichen Caveolae lokalisiert. Nach dem Influx in die Plasmamembran gelangen die Cholesterinester in intrazelluläre Membrankompartimente. Der genaue Mechanismus hierfür ist jedoch noch unklar. Möglicherweise erfolgt nach dem Influx von Cholesterinestern aus HDL in die Caveolae der Plasmamembran eine Internalisierung der Caveolae. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Komplexe aus Caveolin und Chaperonen den Transport der Cholesterinester in die Zelle übernehmen. Es ist bekannt, dass diese Komplexe neu synthetisiertes Cholesterin direkt vom endoplasmatischen Retikulum zu den Caveolae der Plasmamembran transportieren (Graf et al., 1999).

1.1.4.3 Makrophagen Scavenger-Rezeptoren Typ A1 und A2 (SCARA1/2)

Die beiden Scavenger-Rezeptoren Typ A1 und A2 werden vom *MSR1*-Gen kodiert und durch alternatives Spleißen der mRNA generiert. Das Gen umfasst 85 Kb und ist auf Chromosom 8p22 lokalisiert (Freeman, 1994). Bei den Rezeptoren handelt es sich um homotrimerische Membranproteine mit einem Molekulargewicht von 222-260 kDa, die sich aus einer N-terminalen cytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne, einer *spacer*-Region, einer α -helikalen *coiled-coil* Domäne, einer Kollagen-homologen Domäne sowie einer cysteinreichen C-terminalen Domäne zusammensetzen (Kodama et al., 1990, Krieger et al., 1994). Sie sind in der Membran von Makrophagen lokalisiert und binden eine Vielzahl an polyanionischen Liganden über die extrazellulären Kollagen-homologen und cysteinreichen Domänen. Die Aufnahme der Liganden in die Zelle erfolgt über Rezeptor-vermittelte Endozytose. Der *scavenger pathway* spielt eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese und

Manifestation der Atherosklerose. Wenn pathologische Stoffwechselsituationen mit erhöhten LDL-Plasmakonzentrationen vorliegen, werden die LDL-Partikel nicht mehr vollständig über den LDL-Rezeptorstoffwechsel abgebaut, sondern können in den subendothelialen Raum eindringen und dort oxidativ modifiziert werden. Die Makrophagen Scavenger-Rezeptoren sind in der Lage modifizierte LDL-Partikel aufzunehmen. Da die Expression dieser Rezeptoren im Gegensatz zum LDL-Rezeptor keiner *feedback*-Regulation durch den zellulären Cholesteringehalt unterliegt, erfolgt eine unkontrollierte massive LDL-Aufnahme. Als Folge dieser unkontrollierten LDL-Aufnahme transformieren im subendothelialen Raum die Makrophagen zu Schaumzellen. Im weiteren Verlauf kann dieses initiale Ereignis zur Formation von atherosklerotischen Läsionen führen (Linton et al., 2001).

1.1.5 Die zelluläre Cholesterinhomöostase

1.1.5.1 Intrazelluläre Synthese von Cholesterin

Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil der Plasmamembran und wird zur Synthese von Steroidhormonen, Gallensäure und Vitamin D benötigt. Aufgrund seiner Wasserunlöslichkeit erfolgt der Transport von Cholesterin im Blutplasma mit Hilfe von Lipoproteinen. Bei dem Molekül handelt es sich um einen polyzyklischen Alkohol aus 27 C-Atomen. Die Biosynthese von Cholesterin findet hauptsächlich im Cytoplasma und im endoplasmatischen Retikulum von Hepatozyten statt und ist ein komplexer Prozess, der mit der Kondensation von drei Molekülen Acetyl-CoA zu HMG-CoA (3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzym A) beginnt. Im Folgenden wird HMG-CoA zu Mevalonat reduziert. Diese Reaktion ist geschwindigkeitsbestimmend für die Cholesterinsynthese und wird durch das Schlüsselenzym HMG-CoA-Reduktase katalysiert. Aus dem Zwischenprodukt Mevalonat entsteht nach Phosphorylierung und Decarboxylierung das aktive Isopren Isopentenylidiphosphat (C₅-Molekül). Im weiteren Verlauf der Synthese wird aus sechs Isopreneinheiten das C₃₀-Molekül Squalen gebildet. Durch Oxidation, Umlagerung einer Methylgruppe und Hydroxylierung am C3-Atom entsteht dann zunächst das zyklische Lanosterin. Dieses wird durch die Abspaltung von drei Methylgruppen und die Umlagerung einer Doppelbindung in Cholesterin (C₂₇-Molekül) umgewandelt. Die intrazelluläre Cholesterinsynthese kann über mehrere Stellglieder reguliert werden (Brown et al., 1973, Brown et al., 1986, Brown et al., 1974). Wenn es durch die externe Zufuhr und Aufnahme von Cholesterin über die Nahrung zu hohen intrazellulären Cholesterinkonzentrationen kommt, wird die intrazelluläre Cholesterinsynthese inhibiert. Hohe Cholesterinkonzentrationen führen zu einer Phosphorylierung der HMG-CoA-

Reduktase, die in einer Inaktivierung dieses Schlüsselenzyms resultiert. Außerdem kann Cholesterin selbst die HMG-CoA-Reduktase allosterisch hemmen sowie die Transkription dieses Enzyms und weiterer Proteine, die in der Cholesterinbiosynthese eine Rolle spielen, regulieren. Weiterhin führen hohe Cholesterinkonzentrationen zu einer Aktivierung der Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT), die das freie Cholesterin zu Cholesterinestern metabolisiert und so eine intrazelluläre Speicherung des überschüssigen Cholesterins ermöglicht. Die Ausscheidung von Cholesterin erfolgt über die Galle. In der Leber wird aus dem überschüssigen Cholesterin Gallensäure synthetisiert, die über die Gallenwege in den Darm sezerniert wird. Dort wird ein großer Teil des Cholesterins resorbiert und dem enterohepatischen Kreislauf der Leber wieder zugeführt. Nicht resorbiertes Cholesterin wird mit dem Stuhl ausgeschieden.

1.1.5.2 Zelluläre Aufnahme von LDL über den LDL-Rezeptor

Die Entdeckung des LDL-Rezeptors und die Aufklärung der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von LDL ist auf Joseph Leonard Goldstein und Michael S. Brown zurückzuführen, die im Jahre 1985 für ihre Arbeiten mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden (Goldstein et al., 1974).

Nach Synthese der LDL-Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum und posttranslationaler Glykosylierung im Golgi-Apparat werden die Rezeptoren in Vesikeln zur Plasmamembran transportiert (Tolleshaug et al., 1982) (siehe Abb. 2). Die Bindung der LDL-Partikel an die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne der Rezeptoren erfolgt über die Rezeptor-Bindungsstelle im Apolipoprotein B-100 (Boren et al., 1998). Nach Ligandenbindung erfolgt eine Rezeptor-vermittelte Endozytose von LDL (Anderson et al., 1977). Hierzu sammeln sich die Komplexe aus Rezeptoren und Liganden in besonderen Regionen der Plasmamembran, den *clathrin coated pits*. Diese Einstülpungen der Plasmamembran sind auf der cytoplasmatischen Seite vom Protein Clathrin umgeben. Die Bindung von Clathrin an die Plasmamembran wird durch das Adapterprotein AP2 vermittelt. Unter Beteiligung der GTPase Dynamin und weiterer Proteine kommt es nach der Einstülpung der Plasmamembran im Zellinneren zur Abschnürung der *clathrin coated pits*. Es entstehen Vesikel, die als *coated vesicles* bezeichnet werden. In Hepatozyten und Lymphozyten, jedoch nicht in anderen Zelltypen, wird für die Endozytose von LDLR und LDL zusätzlich das modulare Adapterprotein ARH (*autosomal recessive hypercholesterolemia*) benötigt. Es vermittelt die Lokalisation und Verankerung der Komplexe in den *coated pits*, indem es zum einen über seine Phosphotyrosin-bindende Domäne mit dem NPxY Internalisierungsmotiv in der

cytoplasmatischen Domäne von LDLR interagiert und zum anderen sowohl mit der Clathrin-Box an Clathrin, der AP2 Bindungsregion an AP2 und an Phospholipide in der Plasmamembran bindet (He et al., 2002, Michaely et al., 2004).

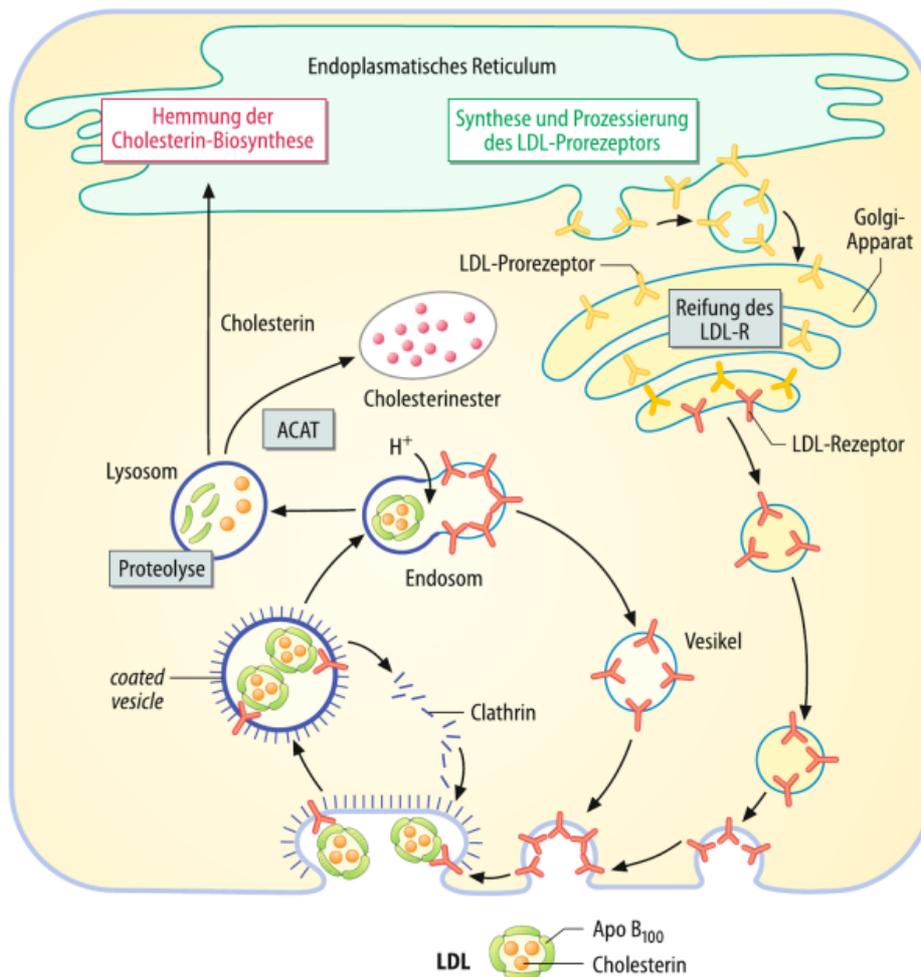


Abbildung 2: Zelluläre Aufnahme von LDL über den LDL-Rezeptor

Die frisch abgeschnürten Vesikel können nicht direkt mit den Zielkompartimenten im Zellinneren verschmelzen, sondern müssen zunächst in einer ATP-abhängigen *uncoating* genannten Reaktion ihre Hülle aus Clathrin, Adaptoren und akzessorischen Proteinen abstreifen. Die Clathrin-Moleküle werden recycelt und an die Plasmamembran zurückgeführt, wo sie für die Neuformierung von *coated vesicles* wieder zur Verfügung stehen. Die Vesikel ohne Clathrin-Hülle fusionieren mit den frühen Endosomen, die sich von den trans-Golgi-Zisternen abschnüren. Diese wiederum verschmelzen mit Transportvesikeln lysosomaler Enzyme zu späten Endosomen. Protonen-Pumpen in der Membran der späten Endosomen bewirken eine Erniedrigung des pH-Wertes von 6-6,5 auf 5,5-6, wodurch es zu einer Dissoziation von LDLR und LDL-Partikel kommt (Brown et al., 1997, Davis et al., 1987,

Innerarity, 2002). Während der Rezeptor in Recycling-Endosomen wieder an die Zelloberfläche gelangt, reifen die verbleibenden Vesikel mit den LDL-Partikeln zu Lysosomen, in denen ein proteolytischer Abbau von Apolipoprotein B-100 erfolgt. Die dabei frei werdenden Cholesterinester werden zu Cholesterin hydrolysiert, welches der Zelle zur Synthese von Plasmamembranen, Steroidhormonen und Gallensäure zur Verfügung steht oder durch die ACAT wieder verestert und intrazellulär gespeichert wird.

1.1.5.3 Transkriptionelle Regulation durch SREBPs

Die Transkriptionsfaktorfamilie *sterol regulatory element binding proteins* (SREBPs) reguliert die Expression zahlreicher Proteine, die für die endogene Synthese von Cholesterin, Fettsäuren, Triglyzeriden und Phospholipiden benötigt werden (Horton et al., 2002). Es existieren zwei *SREBP*-Gene, aus denen die drei Isoformen SREBP1a, SREBP1c und SREBP2 hervorgehen. SREBP1a und SREBP1c werden durch alternatives Spleißen des auf Chromosom 17p11.2 lokalisierten *SREBP1*-Gens generiert (Hua et al., 1995). Die beiden Transkripte entstehen durch die Verwendung von unterschiedlichen Transkriptionsstartpunkten und unterscheiden sich in ihrem ersten Exon (Exon 1a und Exon 1c). Des Weiteren wurde alternatives Spleißen am 3'-Ende beschrieben (Exon 18a und 19a oder Exon 18c und 19c). Die Exons 2-17 sind in beiden Isoformen identisch. Das *SREBP2*-Gen ist auf Chromosom 22q13 lokalisiert und umfasst 18 kodierende Exons (Miserez et al., 1997). Die SREBP1- und SREBP2-Proteine weisen eine Homologie von 47 % auf. Während SREBP1c vor allem bei der Fettsäure-Synthese und SREBP2 bei der Cholesterin-Synthese eine Rolle spielt, reguliert SREBP1a die Expression von Genen beider Signalwege. SREBPs sind *basic-helix-loop-helix-leucine zipper* (bHLH-zip) Transkriptionsfaktoren. Sie werden als etwa 1150 Aminosäuren umfassende inaktive Vorläuferproteine synthetisiert, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind (Hua et al., 1995). Die N-terminale Domäne der SREBPs besteht aus etwa 480 Aminosäuren und setzt sich aus einer Transaktivierungsdomäne, einer Prolin- und Serin-reichen Region und der bHLH-zip Region, die für die DNA-Bindung und Dimerisierung zuständig ist, zusammen. Es folgen zwei hydrophobe Transmembrandomänen, die durch eine kurze, ins ER-Lumen ragende Schleife von etwa 30 Aminosäuren getrennt werden. Am C-Terminus der SREBPs befindet sich die etwa 590 Aminosäuren umfassende regulatorische Domäne. Aufgrund der Haarnadelstruktur der Proteine befinden sich sowohl die N-terminale als auch die C-terminale Domäne im Cytoplasma. Der Transkriptionsfaktor SREBP1a weist im Gegensatz zu SREBP1c eine höhere transkriptionelle Kapazität auf, was auf die deutlich größere N-terminale

Transaktivierungsdomäne zurückzuführen ist (Shimano et al., 1997). SREBPs können, wie alle bHLH-zip Transkriptionsfaktoren, spezifisch mit der E-Box (5'-CANNTG-3', N = jede beliebige Base) in den Promotoren von Zielgenen interagieren. Zusätzlich haben sie die Fähigkeit an *sterol regulatory elements* (SREs) mit der Konsensussequenz 5'-TCACNCCAC-3' (N = jede beliebige Base) zu binden, die in zahlreichen Promotoren der Gene, die im Lipidstoffwechsel eine Rolle spielen, zu finden sind (Kim et al., 1995). SREBPs induzieren über die Bindung an SREs beispielsweise die Expression des LDL-Rezeptors, der HMG-CoA-Synthase und -Reduktase, der ACAT oder auch des Scavenger-Rezeptors Typ B1 (Amemiya-Kudo et al., 2002, Brown et al., 1997, Wong et al., 2006). Außerdem befindet sich im Promotor von *SREBP1* und *SREBP2* jeweils ein SRE, so dass die SREBPs ihre eigene Transkription induzieren können (Sato et al., 1996).

In der Membran des endoplasmatischen Retikulums interagieren SREBP-Vorläuferproteine mit dem Protein SCAP (*SREBP-cleavage-activating protein*) (Nohturfft et al., 1998). Bei SCAP handelt es sich um ein integrales Membranprotein, das sich aus 1276 Aminosäuren zusammensetzt und zwei Domänen umfasst. Die N-terminale Hälfte des Proteins besitzt acht Transmembran-Helices, wovon fünf (Helix 2-6) die *sterol sensing domain* ausmachen (Brown et al., 1997). Die cytoplasmatische C-terminale Domäne ist durch vier *WD-repeats* charakterisiert. Ein *WD-repeat* besteht gewöhnlich aus einer Sequenz von 44-60 Aminosäuren und wird meist vom namensgebenden *WD-Dipeptid* terminiert. Zwischen dieser Domäne und der regulatorischen C-terminalen cytoplasmatischen Domäne von SREBPs wird eine konstitutive Wechselwirkung postuliert (Sakai et al., 1997, Sakai et al., 1998). Wenn es zu einem intrazellulären Cholesterinmangel kommt, so dass unter anderem sowohl mehr Cholesterin synthetisiert als auch über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen werden muss, gelangt der SREBP-SCAP Komplex über COPII-Vesikel in den Golgi-Apparat, wo eine Prozessierung des SREBP-Vorläuferproteins durch zwei spezifische Proteasen erfolgt (Espenshade et al., 2002, Nohturfft et al., 2000). Die membranständige Subtilisin-ähnliche Serinprotease S1P (*site 1 protease*) spaltet eine Leucin-Serin Bindung in der Mitte der luminalen Schleife, so dass aus dem Vorläuferprotein zwei weiterhin membrangebundene Hälften entstehen (Duncan et al., 1997, Sakai et al., 1998, Seidah et al., 1999). Die neu entstandene N-terminale Hälfte, die man als intermediäre Form bezeichnet, wird anschließend durch die Metalloprotease S2P (*site 2 protease*) innerhalb der Transmembrandomäne gespalten (Rawson et al., 1997, Zelenski et al., 1999). Dieser Prozess führt zu einer Freisetzung des N-terminalen transkriptionell aktiven cytoplasmatischen Teils von SREBP. Das generierte reife SREBP-Protein wandert in den Zellkern und aktiviert dort,

über die Bindung an die SREs in den Promotoren der Gene für den LDL-Rezeptor und weiterer Enzyme der Cholesterinbiosynthese, die Transkription dieser Gene (Rawson, 2003, Sakai et al., 2001). Als Folge kommt es zu einer Steigerung der zellulären Cholesterinaufnahme über den LDL-Rezeptor und zu einer vermehrten intrazellulären Cholesterinbiosynthese. Erreicht die intrazelluläre Cholesterinkonzentration einen bestimmten Schwellenwert, so wird die Prozessierung der SREBP-Vorläuferproteine inhibiert. Cholesterin bindet direkt an die *sterol sensing domain* von SCAP und bewirkt eine Konformationsänderung (Brown et al., 2002, Radhakrishnan et al., 2004). Hierdurch wird eine Interaktion mit dem Protein INSIG (*insulin induced gene*) ermöglicht. Bei INSIG handelt es sich um ein hydrophobes Protein, das multiple Membran-assoziierte Domänen besitzt und ebenfalls in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Durch die Interaktion mit SCAP verhindert INSIG den Transport des SCAP-SREBP Komplexes über COPII-Vesikel in den Golgi-Apparat (Yabe et al., 2002, Yang et al., 2002). Folglich bleibt die Prozessierung der Vorläuferproteine aus und die Synthese von LDL-Rezeptor und Cholesterin sowie von weiteren SREBP-Vorläuferproteinen wird gedrosselt. Im Zellkern werden die reifen SREBP-Proteine ubiquitinyliert und über das 26S Proteasom degradiert (Hirano et al., 2001).

In folgender Abbildung ist die Cholesterin- bzw. Sterol-regulierte Interaktion zwischen SCAP und INSIG und die Prozessierung der SREBP-Vorläuferproteine schematisch dargestellt.

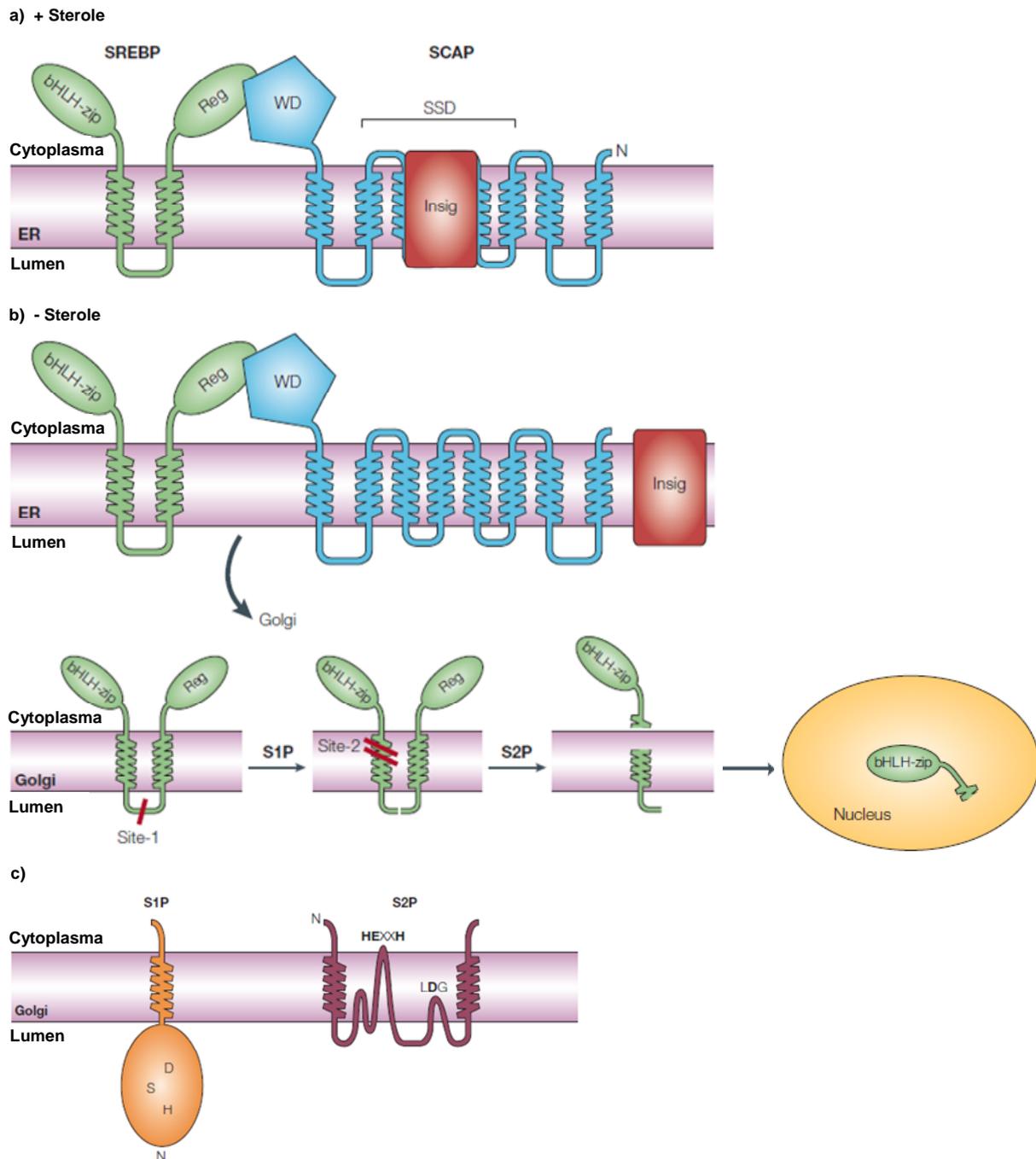


Abbildung 3: Sterol-regulierte Interaktion zwischen SCAP und INSIG und Prozessierung der SREBPs. a) In der ER-Membran interagiert die regulatorische C-terminale cytoplasmatische Domäne von SREBPs mit der hydrophilen C-terminalen cytoplasmatischen WD-Domäne von SCAP. Bei hohen Sterol-Konzentrationen (beispielsweise Cholesterin) binden die Sterole an die *sterol sensing domain* (SSD) von SCAP und bewirken eine Konformationsänderung, woraufhin eine Interaktion mit INSIG ermöglicht wird. Hierdurch wird der Transport des SREBP-SCAP Komplexes in den Golgi-Apparat verhindert. b) Bei niedrigen Sterol-Konzentrationen findet keine Interaktion zwischen SCAP und INSIG statt, so dass der SREBP-SCAP Komplex in den Golgi-Apparat gelangt, wo eine Prozessierung der SREBP-Vorläuferproteine durch die Proteasen S1P und S2P erfolgt. Das generierte reife SREBP-Protein wandert in den Zellkern und aktiviert die Transkription verschiedener Gene über die Bindung an die SREs in Promotoren. c) Schematische Darstellung der Proteasen S1P und S2P. S1P besitzt eine für die Funktion notwendige katalytische Triade aus Asp-Ser-His (DSH), S2P ein HEXXH- (X = jede beliebige Aminosäure) und LDG-Motiv. (modifiziert aus: (Rawson, 2003))

1.1.6 Stoffwechsel der Lipoproteine

1.1.6.1 Exogener Lipoproteinstoffwechsel

Mit der Nahrung werden neben Kohlenhydraten und Proteinen auch Lipide aufgenommen, die sich hauptsächlich aus Triglyzeriden, Sphingo- und Phospholipiden, Cholesterin und fettlöslichen Vitaminen zusammensetzen. Die Triglyzeride werden durch Lipasen des Speichels und des Magen- und Pankreassekretes enzymatisch gespalten. Dabei entstehen freie Fettsäuren, Mono- und Diglyzeride (Ge et al., 2010). Die Produkte der Lipolyse werden in Mizellen eingebaut, deren Grundgerüst aus Gallensäuremolekülen besteht und die passiv von den Enterozyten der Darmmukosa resorbiert werden. Die Resorption des mit der Nahrung aufgenommenen und hydrolysierten Cholesterins durch die Enterozyten erfolgt über das membranständige Protein NPC1L1 (*niemann-pick C1-like-1*) mittels vesikulärer Endozytose. In den Enterozyten kommt es zu einer intrazellulären Resynthese der Triglyzeride und einer Veresterung des Cholesterins durch die ACAT. Überschüssiges Cholesterin wird über einen heterodimeren Transporter, der sich aus den ATP-bindenden Kassettentransportern 5 und 8 zusammensetzt, zurück ins Darmlumen befördert und ausgeschieden (Graf et al., 2003, Lee et al., 2001). Durch das mikrosomale Triglyzerid-Transferprotein (MTP) wird in den Enterozyten die Synthese von Chylomikronen katalysiert. Diese bestehen aus den resynthetisierten Triglyzeriden, dem revereesterten Cholesterin, Phospholipiden sowie den Apolipoproteinen B-48, A-I und A-IV. Sie werden durch Exozytose an das Lymphsystem abgegeben und gelangen über den *Ductus thoracicus* in den systemischen Blutkreislauf (Hussain et al., 1996). Nach der Sekretion nehmen die Chylomikronen zusätzlich aus HDL-Partikeln stammende Apolipoproteine C-II und E auf. In den peripheren Geweben, besonders in den Kapillaren von Muskel- und Fettgewebe, binden die Chylomikronen an Komplexe aus dem VLDL-Rezeptor und der Lipoproteinlipase, die über Heparansulfat-Proteoglykane an die Endothelzellen gebunden ist (Oka et al., 1994). Dabei interagiert Apolipoprotein C-II als Kofaktor mit der Lipoproteinlipase, während Apolipoprotein E die spezifische Bindung an den VLDL-Rezeptor vermittelt (Beisiegel et al., 1997, Tacke et al., 2001). Durch die Lipoproteinlipase werden die Triglyzeride der Chylomikronen hydrolysiert. Die freigesetzten Fettsäuren werden resorbiert und stehen den Geweben als Substrate zur Energiegewinnung und Speicherung zur Verfügung. Im Verlauf des lipolytischen Prozesses findet eine Umverteilung der oberflächenständigen Apolipoproteine statt, indem die Chylomikronen vermehrt aus HDL-Partikeln stammende Apolipoproteine E aufnehmen und ihre Apolipoproteine A an zirkulierende HDL-Partikel abgeben. Die entstandenen

cholesterinreichen Chylomikronenremnants gelangen in die Leber und werden dort mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose über Apolipoprotein E-Bindung an den LDL-Rezeptor oder an LRP von den Hepatozyten aufgenommen (Beisiegel, 1995, Beisiegel et al., 1989, Willnow et al., 1994).

1.1.6.2 Endogener Lipoproteinstoffwechsel

Der endogene Lipoproteinstoffwechsel dient der Versorgung der peripheren Gewebe mit Triglyzeriden und Cholesterin und beginnt mit der MTP-katalysierten Synthese von VLDL in der Leber (Davis et al., 1989). Diese bestehen aus Triglyzeriden, Cholesterin, Phospholipiden und den Apolipoproteinen B-100, E und A-V (Millar et al., 1998). Nach Sekretion in den Blutkreislauf nehmen die VLDL zusätzlich die Apolipoproteine C-I, C-II, C-III sowie E aus HDL-Partikeln auf. Wie auch die Chylomikronen binden die VLDL in den peripheren Geweben an den VLDL-Rezeptor und die membranassoziierte Lipoproteinlipase. Die Triglyzeride werden hydrolysiert und die Apolipoproteine C und A-V an HDL-Partikel abgegeben. Die entstandenen cholesterinreichen VLDL-Remnants können zum einen mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose über Bindung von Apolipoprotein B-100 und E an den LDL-Rezeptor oder LRP in die Hepatozyten aufgenommen werden oder zum anderen über IDL in LDL umgewandelt werden (Kowal et al., 1989, Willnow et al., 1992). Bei der Konversion verlieren die VLDL-Remnants ihre Apolipoproteine E und reichern Cholesterinester aus HDL-Partikeln an. Der intravaskuläre Transfer von Cholesterinester wird enzymatisch durch das Cholesterinester-Transferprotein (CETP) und das Phospholipid-Transferprotein (PLTP) vermittelt. Restliche Triglyzeride in den Partikeln werden durch die hepatische Triglyzeridlipase (HTGL) hydrolysiert. Die zirkulierenden LDL-Partikel werden von der Leber und den peripheren Geweben über Rezeptor-vermittelte Endozytose durch Erkennung des Apolipoproteins B-100 von LDL-Rezeptoren aus dem Blutkreislauf aufgenommen. So erhält das Gewebe neben der geringen Eigensynthese genügend Cholesterin, um es als Hauptbestandteil von Membranen oder als Vorstufe zur Synthese von Steroidhormonen verwenden zu können. Die Bildung der LDL-Partikel ist nicht auf den Bedarf der peripheren Gewebe an Cholesterin abgestimmt, so dass es in den Gefäßen zu übermäßig hohen LDL-Spiegeln kommen kann. Außerdem können hohe LDL-Spiegel einen pathologischen Hintergrund haben. Die LDL-Partikel können in den subendothelialen Raum eindringen und nach oxidativer Modifikation von den Scavenger-Rezeptoren Typ A1 und A2, deren lineare Kinetik keiner negativen *feedback*-Regulation unterliegt, in Makrophagen aufgenommen werden. Als Folge der unkontrollierten LDL-Aufnahme transformieren die

Makrophagen zu Schaumzellen, was im weiteren Verlauf zur Formation von atherosklerotischen Läsionen führen kann (Linton et al., 2001).

1.1.6.3 Reverser Lipoproteinstoffwechsel

Der Rücktransport von freiem in den peripheren Geweben nicht benötigtem Cholesterin zurück zur Leber wird durch HDL-Partikel bewerkstelligt (Fredenrich et al., 2003, Rigotti et al., 2003, von Eckardstein et al., 2001). Durch diese Eigenschaft wirken HDL-Partikel als atheroprotektiv. Die Hepatozyten können Cholesterin für die erneute Synthese von VLDL-Partikeln nutzen oder in Gallensäure überführen, die über die Gallenwege in den Darm sezerniert und dort ausgeschieden wird. Sowohl in der Leber als auch im Darm werden lipidarme diskoidale HDL-Partikel (prä- β -HDL) synthetisiert, die hauptsächlich aus den Apolipoproteinen A (Leber: A-I, A-II, Darm: A-1, A-IV), Phospholipiden und wenigen Cholesterinestern bestehen. Diese naszenten HDL-Partikel gelangen über den Blutkreislauf in die peripheren Gewebe, wo sie mit dem membranständigen ATP-bindenden Kassettentransporter 1 (ABCA1) interagieren, der den Transport von freiem Cholesterin aus dem Zellinneren an die Membranoberfläche vermittelt (Rust et al., 1999, Schmitz et al., 2001). Der Efflux von unverestertem Cholesterin kann außerdem über passive Diffusionsmechanismen, wie z.B. durch Bindung an Albumin, Phospholipid-Vesikel oder Cyclodextrine, erfolgen (von Eckardstein et al., 2001). Die Übertragung von Cholesterin auf die prä- β -HDL-Partikel resultiert in sogenannte HDL₃-Partikel, bei denen sich das Cholesterin an der Oberfläche anreichert. Durch die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), die mit der Oberfläche der HDL-Partikel assoziiert ist und Apolipoprotein A-I als Kofaktor nutzt, wird das freie Cholesterin verestert (Ishida et al., 1990). Die entstehenden Cholesterinester sind hydrophober als freies Cholesterin und werden im hydrophoben Kern der wachsenden Partikel eingebaut. Auf diese Weise entstehen aus den diskoidalen Partikeln schließlich größere, sphärische, lipidreiche Partikel, die eine geringere Dichte aufweisen und als HDL₂ bezeichnet werden. Der weitere Transport der HDL₂-Cholesterinester kann anschließend über zwei Wege verlaufen. Die HDL₂-Partikel können die Cholesterinester im Austausch gegen Triglyzeride und Phospholipide an die Apolipoprotein B-haltigen Lipoproteine VLDL und IDL abgeben. Für den Transfer der Lipide werden das CETP und PLTP benötigt (Barter et al., 1982). VLDL und IDL werden entweder über den LDL-Rezeptor in die Leber endozytiert oder zu LDL konvertiert, über das die Zellen dann wiederum Cholesterin aufnehmen können. Die aufgenommenen Triglyzeride in den HDL₂-Partikeln werden durch die HTGL, die Phospholipide durch die endotheliale Lipase (EL) hydrolysiert. Bei diesem Prozess entstehen

wieder kleine, dichte, lipidarme HDL₃-Partikel, die für eine erneute Cholesterinaufnahme aus peripheren Zellen zur Verfügung stehen. Der zweite Weg, den die HDL-Partikel gehen können, besteht in der direkten Aufnahme über den Scavenger-Rezeptor Typ B1 in die Leber, wo letztendlich die Ausscheidung von Cholesterin über die Galle erfolgt (Acton et al., 1996).

1.1.7 Lipidstoffwechselstörungen

Bei Dyslipidämien handelt es sich um Störungen des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels, die mit einer Verschiebung der Zusammensetzung der Lipid- und Lipoprotein-Fractionen im Plasma einhergehen. Dyslipidämien mit erhöhten Gesamtcholesterin-, LDL-Cholesterin- und Triglyzerid-Spiegeln sowie erniedrigten HDL-Cholesterin-Spiegeln sind wesentliche Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und die Progression der Atherosklerose. Vor allem in den Industrienationen sind Dyslipidämien Ursache für eine hohe Morbidität und Mortalität. Man unterscheidet generell zwischen primären und sekundären Dyslipidämien. Während den primären Dyslipidämien ein mono- oder polygenetischer Defekt zugrunde liegt, sind sekundäre Dyslipidämien die Folge von Grunderkrankungen des endokrinen, nephrologischen und hepatischen Systems oder von medikamentösen Therapien. Hauptsächlich sind dabei vor allem Diabetes, Adipositas und das metabolische Syndrom ursächlich für eine sekundäre Dyslipidämie. Häufig folgen Dyslipidämien einer multifaktoriellen Vererbung, wobei eine genetische Prädisposition, Umweltfaktoren, Ernährung, der persönliche Lebensstil und im Laufe des Lebens erworbene somatische Veränderungen des genetischen Materials zur Entstehung und dem Verlauf der Erkrankung beitragen. Nach der klassischen Einteilung nach Fredrickson werden die primären Dyslipidämien in fünf phänotypische Formen unterteilt (Fredrickson, 1993). Er teilte die Erhöhungen von Plasmalipoproteinen nach deren Auftrennung in der Elektrophorese ein, einem heute eher ungebräuchlichen Verfahren (siehe Tab. 4).

Tabelle 4: Klassifikation der primären Dyslipidämien nach Fredrickson.

Phänotyp nach Fredrickson	erhöhte Lipoproteine	Cholesterin	Triglyzeride
I	Chylomikronen	→	↓↓
IIa	LDL	↑↑	→
IIb	LDL, VLDL	↑↑	↑
III	IDL	↑	↑
IV	VLDL	→↑	↑↑
V	Chylomikronen, VLDL	↑	↑↑

↑ = erhöht, ↑↑ = stark erhöht, → = normal, ↓↓ = stark erniedrigt

Die Einteilung nach Fredrickson berücksichtigt nicht die im Laufe der Zeit gewonnenen molekulargenetischen Erkenntnisse und deren metabolische Auswirkungen, weswegen heutzutage von dieser Einteilung abgesehen wird und für primäre Dyslipidämien eine Klassifikation vorgenommen wird, die den genetisch-ätiologischen Gegebenheiten folgt. Dabei erfolgt die Einteilung der primären Dyslipidämien in Hypercholesterinämie, Hypertriglyzeridämie, kombinierte Hyperlipidämie und in Dyslipidämien, bei denen eine isolierte Erniedrigung des HDL-Cholesterins vorliegt (siehe Tab. 5) (Hachem et al., 2006).

Dyslipidämien können zusätzlich zu den in der Tabelle 5 aufgezeigten monogenen Defekten einen komplexen genetischen Hintergrund haben. Im Rahmen von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) wurden zahlreiche Varianten identifiziert, die mit erhöhten Gesamtcholesterin-, LDL-Cholesterin- und Triglyzerid-Werten sowie erniedrigten HDL-Cholesterin-Werten signifikant assoziiert sind. Die größte Studie wurde 2010 von Teslovich et al. durchgeführt (Teslovich et al., 2010). Dabei wurde eine große Anzahl an Varianten in über 100.000 Individuen mit veränderten Plasmalipoprotein-Werten und einem Kontrollkollektiv ermittelt und ihre Häufigkeit durch statistische Verfahren verglichen. Es konnten insgesamt 95 Loci identifiziert werden, die signifikant mit pathogenen Plasmalipoprotein-Werten assoziiert sind. Die 95 Loci umfassen alle 36 Loci, die zuvor bereits durch GWAS detektiert wurden, sowie 59 erstmals identifizierte Loci. In etwa der Hälfte der Loci sind Gene lokalisiert, für die bekannt ist, dass sie die Plasmalipoprotein-Konzentrationen beeinflussen bzw. eine Rolle im Lipid-Metabolismus spielen (z.B. *LDLR*, *LDLRAP1*, *PCSK9*, *APOB*, *ABCG5/8*, *LPL*, *ABCA1*, *LRP2*, *LRP4*, *SCARB1*, *CETP*). Die meisten assoziierten Varianten liegen in intronischen Bereichen und haben somit wahrscheinlich keine direkten Auswirkungen auf die Proteinfunktion. Für 38 Varianten konnte gezeigt werden, dass sie mit einem veränderten Expressionsniveau von Genen signifikant korrelieren. Weitere Analysen und funktionelle Untersuchungen sind notwendig, um die klinische Relevanz der Varianten und die molekularen Mechanismen der genetischen Prädisposition zu bestimmen. Der genetische Effekt der assoziierten Varianten ist eher sehr klein auf das Risiko der Erkrankung. Zusätzlich spielen private Mutationen mit einem starken funktionellen Einfluss die Hauptrolle für das genetische Risiko.

Tabelle 5: Klassifikation der primären Dyslipidämien

primäre Dyslipidämie	Ursache	genetischer Defekt	Mechanismus
Hypercholesterinämie	polygene Hypercholesterinämie	unbekannt	-
	autosomal-dominant vererbte Familiäre Hypercholesterinämie	<i>LDLR</i> -Mutationen <i>APOB</i> -Mutationen (<i>LDLR</i> Bindungsdomäne) <i>gain-of-function PCSK9</i> -Mutationen	defekte Synthese, Funktion und beeinträchtigt Recycling von <i>LDLR</i> defekte Bindung an <i>LDLR</i>
	autosomal-rezessiv vererbte Familiäre Hypercholesterinämie	<i>ARH</i> -Mutationen	erhöhte Degradierung von <i>LDLR</i> durch <i>PCSK9</i> defekte Internalisierung von <i>LDLR</i> , Ansammlung in <i>clathrin coated pits</i> → reduzierte zelluläre <i>LDL</i> -Aufnahme, Akkumulation von <i>LDL</i> im Plasma
	Sitosterolämie	<i>ABCG5/8</i> -Mutationen	defekter Efflux von überschüssigem Cholesterin ins Darmlumen → erhöhte Absorption und Akkumulation von Cholesterin
Hypertriglyzeridämie	Familiäre Hypertriglyzeridämie	unbekannt	-
	Chylomikronämie	<i>LPL</i> - und <i>APOC2</i> -Mutationen	defekte <i>LPL</i> -Funktion → beeinträchtigt hydrolytischer Abbau und Ansammlung von triglyzeridreichen Lipoproteinen (<i>VLDL</i> , Chylomikronen)
kombinierte Hyperlipidämie	Familiäre Hyperlipidämie	unbekannt	-
	Familiäre Dysbetalipoproteinämie	<i>APOE</i> -Mutationen	defekte Bindung an <i>LDLR</i> → Akkumulation von cholesterinreichen Remnant- Lipoproteinen (<i>VLDL</i> , <i>IDL</i> , Chylomikronen)
	Familiärer <i>HTGL</i> -Mangel	<i>HTGL</i> -Mutationen	defekte <i>HTGL</i> -Funktion → gestörte Konversion von <i>VLDL</i> zu <i>LDL</i> , <i>HDL</i> ₂ zu <i>HDL</i> ₃ , Akkumulation von <i>VLDL</i> -Remnants und <i>LDL</i>
Erniedrigung des <i>HDL</i> -Cholesterins	Familiäre Hypoalphalipoproteinämie	unbekannt	-
	Apolipoprotein-A-I-Mangel <i>LCAT</i> -Mangel, Fish-Eye-Krankheit	<i>APOA1</i> -Mutationen <i>LCAT</i> -Mutationen	defekte <i>LCAT</i> -Funktion defekte <i>LCAT</i> -Funktion → erniedrigte Veresterung von freiem Cholesterin in <i>HDL</i> -Partikeln, Akkumulation von freiem Cholesterin in peripheren Geweben
	Tangier-Krankheit	<i>ABCA1</i> -Mutationen	defekter Transport von freiem Cholesterin aus dem Zellinneren peripherer Gewebe auf <i>HDL</i> → Akkumulation von Cholesterinestern in Makrophagen

1.1.8 Familiäre Hypercholesterinämie

Die familiäre Hypercholesterinämie (FH) ist eine hereditäre, hauptsächlich autosomal-dominante Dyslipidämie und zeichnet sich durch permanent und isoliert erhöhte Konzentrationen an zirkulierenden LDL-Partikeln im Plasma aus, die infolge einer reduzierten Rezeptor-vermittelten zellulären Aufnahme von LDL-Partikeln über den LDL-Rezeptor entstehen. Die erhöhten Konzentration des Gesamt- und LDL-Cholesterins im Plasma führen zu sichtbaren Ablagerungen des Cholesterins in Form von Xanthelasmen und als *Arcus lipoides corneae* im Bereich der Augen und in Form von Xanthomen in der Haut und den Sehnen, vor allem der Achillessehne. Neben diesen eher ästhetischen Störungen kommt es aber auch zu Einlagerungen des Cholesterins in die Gefäßwände, insbesondere in den Koronararterien, was zur Ausbildung einer frühzeitigen Atherosklerose führt und somit mit einem dramatisch erhöhten Risiko für Myokardinfarkt einhergeht. Neben der Hämochromatose handelt es sich bei der FH um eine der häufigsten monogenetischen Erkrankungen. Für die häufige autosomal-dominante Form der FH sind bisher Mutationen in den Genen *LDLR*, *APOB* und *PCSK9* beschrieben. Ursächliche Mutationen für die autosomal-rezessiv vererbte Form wurden im *ARH*-Gen identifiziert (Burnett et al., 2008).

1.1.8.1 *LDLR*-Mutationen

Im Jahre 1974 konnten Brown und Goldstein nachweisen, dass Defekte des LDL-Rezeptors die Ursache für FH darstellen (Brown et al., 1974). Verschiedene Studien zeigten, dass etwa 52-76 % der Patienten, die die klinischen Kriterien einer monogen vererbten Hypercholesterinämie erfüllen, Mutationen in *LDLR* tragen. In der kaukasischen Bevölkerung wurden heterozygote Träger mit einer Frequenz von 1:500 gefunden (Austin et al., 2004). Die LDL-Cholesterinwerte sind bei heterozygoten Trägern um das 2-3 fache des Normalwertes erhöht. Die Gesamtcholesterin-Werte können zwischen 350-500 mg/dl und die LDL-Werte zwischen 250-450 mg/dl liegen. Bei heterozygoten FH-Patienten können *Arcus lipoides corneae*, Xanthelasmen und Xanthome gegen Ende der zweiten Lebensdekade auftreten und sind im dritten Lebensjahrzehnt bei etwa der Hälfte und gegen Ende des Lebens bei ca. 80 % vorhanden. Die klinischen Symptome einer koronaren Herzerkrankung manifestieren sich dagegen bei 75 % der männlichen Patienten und 45 % der weiblichen Patienten zumeist bereits in der vierten Lebensdekade. Frauen sind wahrscheinlich durch den protektiven Effekt des Östrogens häufig erst einige Jahre später betroffen. Homozygote sowie *compound* heterozygote Träger der FH findet man mit einer Häufigkeit von 1:1000000. Sie sind somit selten und charakterisiert durch Gesamtcholesterin- und LDL-Werte von >700 mg/dl im

Plasma (Marks et al., 2003). Xanthome, Xanthelasmen sowie Aortenklappenstenosen und eine generalisierte Atherosklerose aller Gefäße, insbesondere der Koronararterien und Carotiden, können schon vor dem 10. Lebensjahr auftreten. Homozygote Patienten die nicht medikamentös behandelt werden, sterben meist infolge eines akuten Myokardinfarktes vor dem 20. Lebensjahr (Garg et al., 2007, Hachem et al., 2006).

Seit der Charakterisierung des *LDLR*-Gens im Jahre 1985 wurden über 1000 *LDLR*-Mutationen als kausale Ursache für FH identifiziert (Sudhof et al., 1985). Eine Übersicht über die identifizierten *LDLR*-Mutationen findet sich in zwei *LDLR*-Mutationsdatenbanken, die unter <http://www.ucl.ac.uk/ldlr/Current> und <http://www.umd.necker.fr> abrufbar sind und ständig aktualisiert werden. Mutationen sind generell in allen Domänen des Rezeptors sowie der Promotorregion zu finden, vor allem jedoch in der Ligandenbindungsdomäne und der EGF-Vorläuferprotein ähnlichen Domäne. Sie umfassen Nukleotidsubstitutionen (Missense-, Nonsense-, Spleißmutationen), kleinere Deletionen und Insertionen sowie größere strukturelle Veränderungen. Die *LDLR*-Mutationen führen zu unterschiedlichen abnormen funktionellen Eigenschaften des LDLR-Proteins und lassen sich aufgrunddessen in fünf Klassen einteilen (Hobbs et al., 1990) (siehe Abb. 4):

- Klasse-1-Mutationen (Null-Allele): Diese Mutationen verhindern eine Synthese des Proteins. Zu dieser Klasse zählen Veränderungen in der Promotorregion, die eine Transkription nicht mehr zulassen sowie Nonsense-Mutationen, Spleißmutationen und *frameshift*-Mutationen, die dazu führen, dass mRNAs abnormer Länge entstehen, welche entweder direkt selektiv über den *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) abgebaut werden oder deren pathogenes Genprodukt über das Proteasom-Ubiquitin-System degradiert wird.
- Klasse-2-Mutationen (transportdefekte Allele): Bei diesen Mutationen ist die LDL-Rezeptor-Synthese normal, aber die Rezeptoren erreichen die Zellmembran nicht, da ihr Transport vom ER zum Golgi-Apparat komplett blockiert oder verlangsamt ist, was zu einer Rezeptordefizienz an der Zelloberfläche führt. Klasse-2-Mutationen sind hauptsächlich in der Ligandenbindungsdomäne und der konservierten EGF-Vorläuferprotein ähnlichen Domäne lokalisiert. Man unterscheidet zwischen Klasse-2A- und Klasse-2B-Defekten. Klasse-2A-Allele produzieren Rezeptoren, die das ER aufgrund inkorrekt gefalteter 120 kDa LDL-Rezeptor-Vorläuferproteine nicht verlassen können, so dass keine reifen 160 kDa Formen der Rezeptoren synthetisiert werden (Tolleshaug et al., 1982). Bei Klasse-2B-Defekten gelangt ein Teil der inkorrekt gefalteten Rezeptoren in den Golgi-Apparat, jedoch erfolgt der Transport verzögert und verlangsamt.

- Klasse-3-Mutationen (bindungsdefekte Allele): Die LDL-Rezeptoren erreichen zwar die Zellmembran, sind aber nicht in der Lage LDL zu binden. Die meisten Mutationen sind in der Ligandenbindungsdomäne zu finden, vor allem in den cysteinreichen *repeats* 4 und 5, die eine hydrophobe Tasche ausbilden, mit der die positiven amphiphatischen Helices in Apolipoprotein B-100 und Apolipoprotein E in Wechselwirkung treten sowie in der EGF-Vorläuferprotein ähnlichen Domäne (Hobbs et al., 1986).

- Klasse-4-Mutationen (internalisierungsdefekte Allele): Die LDL-Rezeptoren erreichen die Zelloberfläche, binden LDL, können sich aber nicht in *clathrin coated pits* anreichern, so dass der Komplex aus Ligand und Rezeptor nicht internalisiert werden kann. Die Mutationen sind in der cytoplasmatischen Domäne oder der angrenzenden Transmembrandomäne lokalisiert. Einige Mutationen betreffen das NPxY Internalisierungsmotiv, mit welchem das modulare Adapterprotein ARH über seine Phosphotyrosin-bindende Domäne interagiert und somit die Lokalisation und Verankerung der Rezeptoren in den *coated pits* ermöglicht (Soutar et al., 2003).

- Klasse-5-Mutationen (recyclingdefekte Allele): Diese Mutationen sind in der EGF-Vorläuferprotein ähnlichen Domäne lokalisiert. Die Rezeptoren binden LDL und internalisieren diese auch. Es findet jedoch keine Dissoziation des Rezeptor-Liganden-Komplexes im sauren Milieu des Endosoms statt, was zur intrazellulären Degradation der Rezeptoren führt, so dass diese nicht mehr an die Zelloberfläche zurück gelangen können, um erneut LDL zu binden (Miyake et al., 1989).

Eine eindeutige Zuordnung der Mutationen zu einer bestimmten Klasse ist oft nicht möglich, da die entsprechenden mutanten Proteine mehrere funktionelle Defekte aufweisen.

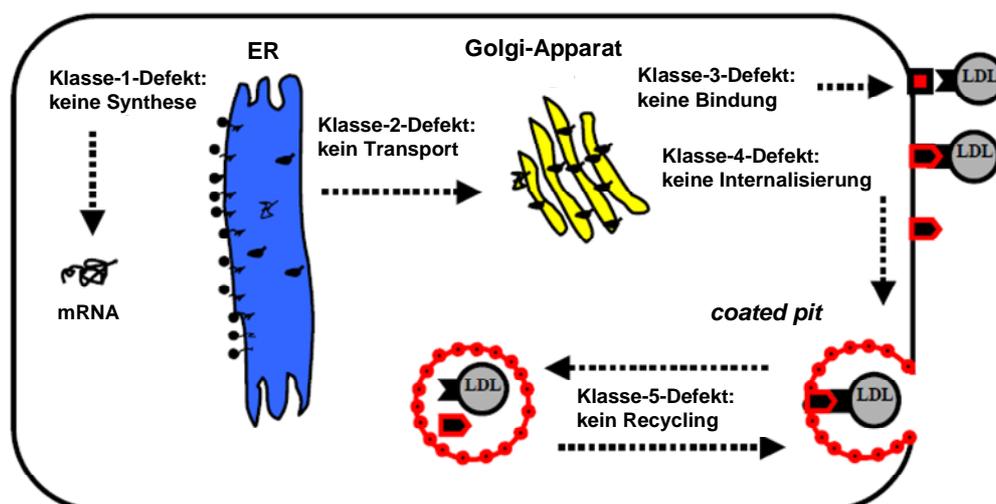


Abbildung 4: Klassifikation der unterschiedlichen LDL-Rezeptordefekte, die zur FH führen

In den Zellen von Patienten mit heterozygoten *LDLR*-Mutationen werden bei gleicher extrazellulärer LDL-Konzentration nur halb soviel funktionelle LDL-Rezeptoren exprimiert, wie in Zellen von gesunden Individuen. Das wildtypische Allel ist nicht in der Lage den Defekt des mutierten Allels zu kompensieren. Infolge der reduzierten Rezeptor-vermittelten Aufnahme kommt es zu einem intrazellulären Cholesterindefizit, welches durch eine gesteigerte Cholesterinbiosynthese ausgeglichen wird. Die Versorgung der peripheren Gewebe mit Cholesterin und Triglyzeriden erfolgt über den endogenen Lipoproteinstoffwechsel. Die Leber sezerniert VLDL-Partikel, die den Transport der Triglyzeride und des Cholesterins übernehmen. Durch Hydrolyse der Triglyzeride entstehen cholesterinreiche VLDL-Remnants die zum Teil in IDL umgewandelt werden. Ein gewisser Anteil sowohl der VLDL-Remnants als auch der IDL kann normalerweise mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose über Bindung von Apolipoprotein B-100 und E an den LDL-Rezeptor aus der Zirkulation entfernt werden. Die verbleibenden IDL werden in LDL konvertiert, von denen 60-80 % über die LDL-Rezeptoren in die Hepatozyten endozytiert werden. Bei heterozygoten *LDLR*-Mutationsträgern kommt es nun zu einer massiven Akkumulation von LDL-Cholesterin im Plasma. Grund hierfür ist zum einen die gesteigerte Synthese von LDL aus der Vorstufe IDL, da nur noch geringfügige Mengen an IDL endozytiert werden können. Zum anderen können die synthetisierten LDL-Partikel auch nicht mehr effizient genug Rezeptor-vermittelt abgebaut werden. Die meisten Mutationen führen zu keinem kompletten Funktionsverlust, so dass die phänotypische Ausprägung der FH und das Ansprechen auf lipidsenkende Therapien sowohl bei heterozygoten, als auch bei homozygoten oder *compound* heterozygoten Patienten in Abhängigkeit der vorhandenen Restaktivität des LDL-Rezeptors variieren kann (Austin et al., 2004, Soutar, 1992, Soutar, 1998). Bei homozygoten Patienten, bei denen der mutierte LDL-Rezeptor keine Restaktivität mehr aufweist, werden alle LDL-Partikel über die Scavenger-Rezeptoren Typ A1 und A2 in Makrophagen aufgenommen, was zur frühzeitigen Manifestation einer schweren Atherosklerose führt.

1.1.8.2 *APOB*-Mutationen

Mutationen in *APOB* sind wesentlich seltener die molekulare Ursache für FH als *LDLR*-Mutationen. Die Detektionsrate von *APOB*-Mutationen variiert in verschiedenen Studien bei Patienten mit FH Phänotyp zwischen 0-11 % (Fouchier et al., 2005, Humphries et al., 2006). In der europäischen Bevölkerung wurde eine Heterozygotenfrequenz von 1:500-1:700 ermittelt (Cladaras et al., 1986, Humphries et al., 1995). Die Gesamtcholesterinwerte im

Plasma liegen bei Patienten mit heterozygoten Mutationen etwa zwischen 300-400 mg/dl und die LDL-Werte etwa zwischen 200-300 mg/dl. Die Patienten bilden Xanthome, Xanthelasmen sowie eine frühzeitige Atherosklerose aus. Die phänotypische Ausprägung und Manifestation der Erkrankung ist bei den Patienten in der Regel moderater als bei FH-Patienten mit heterozygoten *LDLR*-Mutationen, trotzdem können sie klinisch nicht voneinander unterschieden werden (Miserez et al., 1995). Bisher konnte nur bei fünf Patienten eine homozygote *APOB*-Mutation identifiziert werden (Gallagher et al., 1995). Interessanterweise waren bei diesen Patienten die Cholesterinwerte nur geringfügig höher als bei Patienten mit heterozygoten *APOB*-Mutationen und deutlich niedriger als bei Patienten mit homozygoten *LDLR*-Mutationen.

Das *APOB*-Gen umfasst 45 Kb, ist auf Chromosom 2p23-p24 lokalisiert und besteht aus 29 Exons. Exon 26 des Gens umfasst 7572 Bp (Knott et al., 1985). Aus dem *APOB*-Gen gehen die beiden Isoformen Apolipoprotein B-48 und Apolipoprotein B-100 hervor. Apolipoprotein B-48 weist nur 48 % der molaren Masse von Apolipoprotein B-100 auf. Es besteht aus 2152 Aminosäuren, deren Sequenz mit dem N-terminalen Abschnitt des Apolipoproteins B-100 übereinstimmt. Das Protein wird ausschließlich in den Enterozyten des Dünndarms exprimiert und kommt als Strukturprotein nur in Chylomikronen vor. Die mRNA für Apolipoprotein B-48 entsteht, indem nach der Transkription das Codon 2153 (CAA) der Apolipoprotein B-100 mRNA in ein Stopp-Codon (UAA) umgewandelt wird. Das Enzym Cytosindesaminase katalysiert diesen *editing*-Prozess; ein Abschnitt von nicht mehr als 26 Nukleotiden genügt, um die Apolipoprotein B-100 mRNA zu erkennen. Apolipoprotein B-100 hat ein Molekulargewicht von 550 kDa, besteht aus 4536 Aminosäuren und wird ausschließlich in der Leber exprimiert. Es ist ein integrales Strukturprotein und kommt neben anderen Apolipoproteinen in VLDL, IDL und Lp(a) sowie als einziges Apolipoprotein in LDL vor. Im Gegensatz zum Apolipoprotein B-48 besitzt Apolipoprotein B-100 eine LDL-Rezeptor-Bindungsstelle, die von den Aminosäuren 3359 bis 3369 kodiert wird und die Bindung der Lipoproteine an den LDL-Rezeptor vermittelt (Boren et al., 1998). Für die Bindung an den LDL-Rezeptor ist nicht nur die Sequenz der Bindungsstelle entscheidend, sondern auch deren Konformation (Goldstein et al., 1985). Apolipoprotein B-100 weist eine ringförmige Struktur auf (Chatterton et al., 1995). Die ersten 89 % des Moleküls umrunden den Lipoprotein-Partikel gürtelförmig, während die 11 % am C-terminalen Ende bogenförmig den Gürtel überqueren. Das C-terminale Ende des Apolipoproteins B-100 fungiert als negativer Modulator und verhindert die Bindung von VLDL an den LDL-Rezeptor. Durch die Lipolyse der VLDL und die Konversion in LDL-Partikel ändert das Apolipoprotein B-100 seine

Konformation, wodurch eine essentielle spezifische Interaktion von Arginin 3500 mit Tryptophan 4369 entsteht und eine Bindung an den LDL-Rezeptor ermöglicht wird (Boren et al., 2001) (siehe Abb. 5). Alle neun bisher identifizierten *APOB*-Mutationen sind in unmittelbarer Nähe der LDL-Rezeptor-Bindungsstelle lokalisiert und beeinflussen indirekt deren Konformation, was zu einer reduzierten Bindung an den Rezeptor und einer Akkumulation von LDL im Plasma führt. Die zuerst identifizierte und am häufigsten gefundene Mutation ist eine heterozygote Nukleotidsubstitution von G>A an Position 10499 auf RNA-Ebene, die zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin an Position 3500 (p.R3500Q) führt. Als Folge wird die Interaktion mit Tryptophan 4369 verhindert und es kommt zu einer Maskierung der LDL-Rezeptor-Bindungsstelle (siehe Abb. 5). LDL mit diesen mutanten Apolipoproteinen B-100 haben weniger als 10 % der Bindungsaffinität zum LDL-Rezeptor als LDL mit wildtypischen Apolipoprotein B-100. Haplotypanalysen ergaben, dass es sich bei der R3500Q Mutation um eine Gründermutation in der europäischen Population handelt, die vor etwa 7000 Jahren erstmals aufgetreten ist (Myant et al., 1997). Der moderatere Phänotyp bei Patienten mit *APOB*-Mutation im Vergleich zu Patienten mit *LDLR*-Mutation ist darauf zurückzuführen, dass bei Patienten mit defektem Apolipoprotein B-100 die VLDL-Remnants und IDL weiterhin über Bindung von Apolipoprotein E an den LDL-Rezeptor aus der Zirkulation entfernt werden können, während bei Patienten mit defektem LDL-Rezeptor die LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose von VLDL-Remnants, IDL und LDL beeinträchtigt ist (Schaefer et al., 1997).

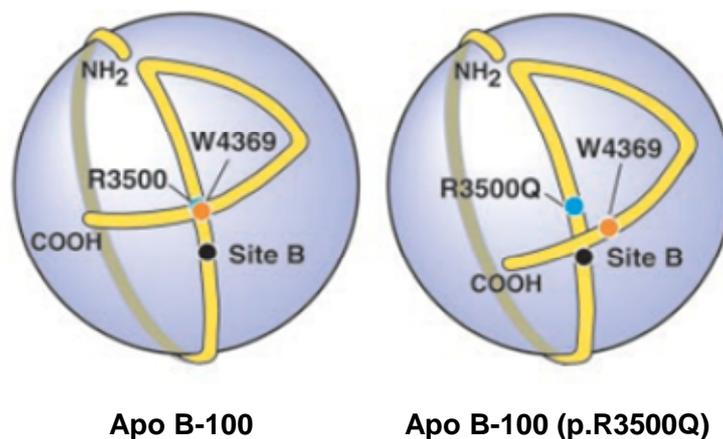


Abbildung 5: LDL mit Apolipoprotein B-100. Die Bindung von LDL an den LDL-Rezeptor ist abhängig von der Interaktion des Arginin 3500 mit Tryptophan 4369. Die Mutation p.R3500Q führt zu einer Konformationsänderung, bei der die veränderte Aminosäure (Glutamin) an Position 3500 nicht mehr mit dem Tryptophan 4369 interagieren kann. Die LDL-Rezeptor-Bindungsstelle (Site B) wird maskiert und eine Bindung von LDL an den LDL-Rezeptor ist nicht mehr möglich. (modifiziert aus: (Boren et al., 2001))

1.1.8.3 PCSK9-Mutationen

Kausale Mutationen in *PCSK9* wurden erstmals im Jahre 2003 für autosomal-dominant vererbte FH beschrieben (Abifadel et al., 2003). Das Genprodukt reguliert die Cholesterinhomöostase, indem es post-translational die zelluläre Degradation des LDL-Rezeptors induziert (Horton et al., 2007). FH-Patienten mit *PCSK9*-Mutationen unterscheiden sich klinisch nicht von FH-Patienten mit *LDLR*- oder *APOB*-Mutationen. Die Gesamtcholesterin-Werte können bei >500 mg/dl und die LDL-Werte bei >420 mg/dl im Plasma liegen. *PCSK9*-Mutationen sind eher selten und nur bei etwa 2 % der FH-Patienten zu finden (Garg et al., 2007).

Das 22 Kb umfassende *PCSK9*-Gen ist auf Chromosom 1p32.2 lokalisiert und umfasst 12 Exons. Das Gen kodiert für die sekretorische Proprotein-Konvertase Subtilisin/Kexin Typ 9. Dabei handelt es sich um eine Subtilisin-ähnliche Serin-Protease, die hauptsächlich in der Leber und im Dünndarm exprimiert wird. Das Protein besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid, einer Prodomäne, einer Subtilisin-ähnlichen katalytischen Domäne und einer cysteinreichen C-terminalen Domäne (Henrich et al., 2005). Wie alle sekretorischen Subtilisin-ähnlichen Proteasen wird *PCSK9* als Zymogen-Vorläuferprotein im ER synthetisiert und nach einem autokatalytischen Prozess und intrazellulären Transport sekretiert (Wright et al., 1969). Die Prodomäne erfüllt zwei Aufgaben. Zum einen dient sie als Chaperon bei der korrekten Proteinfaltung, zum anderen agiert sie als Inhibitor der katalytischen Aktivität (Anderson et al., 2002). Nach der autokatalytischen Abspaltung der Prodomäne von der katalytischen Domäne, bleibt diese nicht-kovalent am reifen Protein gebunden und blockiert sterisch das aktive Zentrum, wodurch die katalytische Aktivität inhibiert wird (Benjannet et al., 2004, Lagace et al., 2006). Bisher konnte noch nicht gezeigt werden, dass die Prodomäne vom reifen Protein abdissoziiert, wie es bei anderen Subtilisin-ähnlichen Proteasen der Fall ist. Nach Sekretion bindet *PCSK9* Kalzium-abhängig über die Oberfläche der katalytischen Domäne an den ersten EGF-ähnlichen *repeat* (EGF-A) der extrazellulären EGF-Vorläuferprotein ähnlichen Domäne des LDL-Rezeptors. Anschließend kommt es zu einer Rezeptor-vermittelten Endozytose des Komplexes. Im Endosom erhöht sich die Bindungsaffinität von *PCSK9* zum LDL-Rezeptor um mehr als das hundertfache aufgrund des sauren pH-Wertes, so dass es zu keiner Dissoziation des Komplexes kommt. Der Rezeptor kann nicht zurück an die Zelloberfläche gelangen, um erneut LDL zu binden, sondern wird intrazellulär im Lysosom degradiert (Kwon et al., 2008).

Ausschließlich *gain-of-function* Mutationen in *PCSK9* sind ursächlich für FH. Diese erhöhen die Bindungsaffinität zum LDL-Rezeptor, wodurch die Anzahl an Rezeptoren an der

Zelloberfläche reduziert wird und es zu einer Akkumulation von LDL-Cholesterin im Plasma kommt. *Loss-of-function* Mutationen, die beispielsweise die Prozessierung, Proteinfaltung oder Sekretion von PCSK9 beeinträchtigen, führen hingegen zur Hypocholesterinämie (Cohen et al., 2005, Cohen et al., 2006). Bisher wurden nur heterozygote *PCSK9*-Mutationen identifiziert.

1.1.8.4 *ARH*-Mutationen

In sehr seltenen Fällen wird die FH autosomal-rezessiv vererbt ($< 1:10000000$) (Soutar et al., 2004). Der zugrundeliegende molekulare Defekt konnte im Jahre 2001 aufgeklärt werden (Garcia et al., 2001). Die Erkrankung wird durch homozygote Mutationen in *ARH* (*autosomal recessive hypercholesterolemia*) hervorgerufen, einem Gen, das bereits vor über 30 Jahren charakterisiert wurde (Khachadurian et al., 1973). Der klinische Phänotyp der Patienten mit *ARH*-Mutationen ist im Allgemeinen etwas milder, als bei Patienten mit homozygoten *LDLR*-Mutationen, und die Prävalenz für eine generalisierte Atherosklerose ist reduziert. Schwerwiegende Xanthome und Xanthelasmen treten wie bei Patienten mit homozygoten *LDLR*-Mutationen bereits vor dem 10. Lebensjahr auf (Garg et al., 2007).

ARH ist auf Chromosom 1p36 lokalisiert, umfasst etwa 25 Kb und besteht aus 9 kodierenden Exons. Das Gen kodiert für ein 20 kDa großes, modulares Adapterprotein (Soutar et al., 2003). In Hepatozyten und Lymphozyten, jedoch nicht in Fibroblasten, wird *ARH* für die LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose benötigt. Es sorgt für die Lokalisation und Verankerung der Komplexe in den *coated pits*, indem es zum einen über seine Phosphotyrosin-bindende Domäne mit dem NPxY Internalisierungsmotiv in der cytoplasmatischen Domäne von *LDLR* und mit Phospholipiden in der Plasmamembran interagiert und zum anderen mit der Clathrin-Box an Clathrin und einer weiteren konservierten Region an die β 2-Adaptin-Untereinheit des Adapterproteins AP2 bindet (Dell'Angelica, 2001, He et al., 2002, Mishra et al., 2002). Mutationen in *ARH* führen dazu, dass sich die Komplexe aus LDL-Rezeptor und LDL nicht in den *clathrin coated pits* anreichern können und eine Internalisierung ausbleibt, wodurch es zu einer Akkumulation von LDL im Plasma kommt. Da *ARH* wie bereits erwähnt nur in Hepatozyten und Lymphozyten für die LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose benötigt wird, tritt der Defekt auch nur spezifisch in diesen Zellen auf. In Fibroblasten wird die Funktion von *ARH* vermutlich kompensatorisch von einem anderen Adapterprotein übernommen. Anders als bei Patienten mit *LDLR*-Mutationen, wo der LDL-Rezeptor in allen Zellen defekt ist, ist somit bei Patienten mit *ARH*-Mutationen noch eine partielle LDL-Aufnahme über funktionierende

LDL-Rezeptoren in den Fibroblasten möglich, wodurch sich der etwas moderatere Phänotyp erklären lässt (Burnett et al., 2008, Garuti et al., 2005).

1.2 Angeborene Syndrome mit metabolischen Störungen

1.2.1 Woodhouse-Sakati Syndrom

Das Woodhouse-Sakati Syndrom ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbte, multisystemische Erkrankung und wurde erstmals von Woodhouse und Sakati im Jahre 1983 bei konsanguinen saudi-arabischen Familien beschrieben (Woodhouse et al., 1983). Seitdem wurden einige konsanguine Familien aus der Türkei, Kroatien, Frankreich, Italien, Belgien, Pakistan und Indien mit überlappenden Phänotypen ohne konkrete Syndrom-Zuordnung beschrieben (Al-Semari et al., 2007, Alazami et al., 2010, Devriendt et al., 1996, Devriendt et al., 1996, Gul et al., 2000, Koshy et al., 2008, Medica et al., 2007, Schneider et al., 2008). Die Patienten weisen endokrine, metabolische und neurologische Störungen sowie faziale und körperliche Auffälligkeiten auf. In der Regel sind die Symptome erstmalig in der Adoleszenz nachzuweisen. Zu den endokrinen Störungen zählen vor allem Diabetes und Hypogonadismus. Meist liegt ein hypergonadotroper Hypogonadismus vor, in selteneren Fällen ein hypogonadotroper Hypogonadismus. Bei den Patienten bleibt die Pubertät aus oder tritt nur verzögert ein. Die primären und sekundären Geschlechtsmerkmale bilden sich zurück oder gar nicht erst aus und es kommt zu Fertilitätsstörungen. Nach Möglichkeit erfolgt oft eine Therapie mit Sexualhormonen. Grundsätzlich sind die IGF-1-Serumwerte bei den Patienten reduziert und gelten somit als Marker für die Erkrankung. Des Weiteren liegen meist eine Hypercholesterinämie, Hypertriglyzeridämie und Hyperglykämie vor. Diabetes und Dyslipidämien sind beachtenswerte Risikofaktoren für kardiovaskuläre Komplikationen und tragen bei den Patienten entscheidend zur Ausbildung einer koronaren Herzerkrankung bei. Die neurologischen Störungen umfassen mentale Retardierung, progressive extrapyramidale Defekte, Schwerhörigkeit und kognitive Beeinträchtigungen. Bei einigen Patienten wurden Veränderungen der weißen Substanz im Gehirn detektiert. Zu den fazialen und körperlichen Auffälligkeiten gehören vor allem ein längliches Gesicht mit kurzem, sehr dünnen Kopfhaar und spärlichen Augenbrauen. Generell besitzen die Patienten fast keine Körperbehaarung. Weitere seltener beschriebene Manifestationen sind abgeflachte T-Wellen im EKG, zerebrale Krämpfe, Dysarthrie, Skoliose sowie verschiedene kraniofaziale Anomalien wie hohe Stirn, flacher Hinterkopf, dreieckiges Gesicht, prominente Nasenwurzel, Hypertelorismus und antimongoloide Lidachsen. Die phänotypische Ausprägung und der

Schweregrad der Erkrankung können variabel sein. Hauptsächlich ist das Woodhouse-Sakati Syndrom jedoch charakterisiert durch Hypogonadismus, Diabetes, Alopezie, mentale Retardierung und extrapyramidale Defekte (Rachmiel et al., 2011).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war die molekulare Ursache dieser Erkrankung unbekannt.

1.2.2 Progerie

1.2.2.1 Natürliche Alterung und Progerie Syndrome

Der Alterungsprozess wird als finales Resultat einer universellen, progressiven und intrinsischen Akkumulation von DNA-Schädigungen angesehen, die in einer vermehrten somatischen Fehlfunktion resultieren und die physiologische Leistungsfähigkeit eines Individuums gefährden und zu dessen Tod führen. Auf dem Level eines einzelnen Individuums ist Alterung mit einer progressiven Minderung der Gesundheit und Lebensqualität assoziiert und vor allem durch das Auftreten von altersabhängigen Erkrankungen charakterisiert. Zu den wichtigsten altersabhängigen Erkrankungen zählen metabolische und endokrine Störungen, wie Fettstoffwechselstörungen und Diabetes, die für kardiovaskuläre Ereignisse und die Progression der Atherosklerose beachtenswerte Risikofaktoren darstellen. Weiterhin ist Alterung gekennzeichnet durch Alopezie und graue Haare, Hörverlust, Makuladegeneration, Neurodegeneration, Osteoporose, Katarakt, Lipodystrophie; eine generell erhöhte Anfälligkeit für Infektionen, Autoimmunerkrankungen und Krebs; und eine beeinträchtigte Fähigkeit mit Stress umzugehen. Der molekulare Mechanismus der Alterung ist sehr komplex und es wurden verschiedene Theorien postuliert. Eine allgemein anerkannte Theorie besagt, dass altersabhängige Veränderungen sowohl genetisch programmiert als auch stochastisch und unvorhersehbar auftreten können. So besitzen normale, humane, somatische Zellen beispielsweise nur eine begrenzte Proliferations-Kapazität und durchlaufen eine replikative Seneszenz nach einer bestimmten Anzahl an Zellteilungen. Dabei spielt der progressive Verlust der Telomere mit jeder Zellteilung eine entscheidende Rolle. Des Weiteren ist das humane Genom konstant verschiedenen Faktoren ausgesetzt, die DNA-Schäden induzieren. Zelluläre Reparaturmechanismen sind nur teilweise in der Lage DNA-Schäden zu beseitigen und somit kommt es zu einer Akkumulation dieser Schäden. Dies kann zu einer zellulären Dysfunktion in verschiedenen Geweben führen und so zum Alterungs-Phänotyp beitragen (Arboleda et al., 2007, Burtner et al., 2010).

Es gibt zahlreiche genetische Syndrome, die mit einem frühzeitigen Alterungsprozess einhergehen. Die Identifizierung der genetischen, molekularen und zellulären Veränderungen bei diesen sogenannten Progerie Syndromen trägt dazu bei, den natürlichen Alterungsprozess besser zu verstehen und aufzuklären. Die am Besten untersuchten Progerie Syndrome sind das Werner Syndrom (WS) und das Hutchinson-Gilford Progerie Syndrom (HGPS). Molekulare Studien haben gezeigt, dass eine Akkumulation von DNA-Schäden sowie zelluläre Seneszenz die zugrundeliegenden Mechanismen der pathologischen frühzeitigen Alterung in beiden Syndromen sind. Das Werner Syndrom ist ein seltenes kongenitales autosomal-rezessiv vererbtes Syndrom. Die Symptome betreffen fast alle Organe. Charakterisiert ist das Syndrom vor allem durch Kleinwüchsigkeit, bilateraler Katarakt, frühzeitiges Ergrauen, Haarausfall und Skleroderma-ähnliche Hautveränderungen. Weitere altersbedingte Symptome umfassen Osteoporose, Hypogonadismus, Diabetes, Atherosklerose und Neoplasmen. Die meisten Patienten versterben vor dem 50. Lebensjahr infolge der Komplikationen (Epstein et al., 1966). Die kausale molekulare Ursache für das Syndrom sind *loss-of-function* Mutationen im *WRN*-Gen. Dieses kodiert für eine ATP-abhängige Helikase, die zur RecQ-Familie gehört und mehrere enzymatische Funktionen aufweist. Das Protein agiert als Helikase, ATPase und Exonuklease und spielt eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und von Chromosomenenden. Zellen von Patienten mit *WRN*-Mutationen weisen schwerwiegende Defekte in der Reparatur von DNA-Schäden und der Aufrechterhaltung der Telomerenden auf, was letztendlich zum Zelltod und zur Zellseneszenz führt (Bohr, 2008, Ozgenc et al., 2006). Das Hutchinson-Gilford Progerie Syndrom ist ebenfalls charakterisiert durch einen frühzeitig eintretenden Alterungsprozess im frühen Kindesalter. Die Erkrankung ist mit einer beschriebenen Inzidenz von 1:8000000 sehr selten (Russo-Menna et al., 2010). Die Kinder werden unauffällig geboren und entwickeln erste Symptome im Alter von 6-12 Monaten. Sie bleiben kleinwüchsig und weisen Skelettdeformitäten sowie typische faziale Veränderungen, wie Mikrognathia, ein persistierendes Milchgebiss, kraniofaziale Disproportion und eine schnabelförmige Nase auf. Durch den Verlust des Unterhaut-Fettgewebes bilden sich Skleroderma-ähnliche Areale aus. Des Weiteren kommt es zu Haarausfall sowie massiver Osteoporose und Atherosklerose. Die Lebenserwartung liegt bei durchschnittlich 13 Jahren, so dass ein reproduktionsfähiges Alter in der Regel nicht erreicht wird (Korf, 2008). Das Hutchinson-Gilford Progerie Syndrom ist auf eine autosomal-dominante Vererbung zurückzuführen und wird meist durch sporadisch aufgetretene Mutationen in der paternalen Keimbahn von vergleichsweise alten Vätern hervorgerufen. Ursächlich für die Erkrankung sind Mutationen im *LMNA*-Gen, welches für das Protein Lamin A kodiert (Pollex et al.,

2004). Die meisten Patienten sind Träger der Nukleotidsubstitution C>T an Position 1824 auf RNA-Ebene, die in einer stummen Veränderung auf Protein-Ebene resultiert (p.G608G). Die Mutation führt zur Aktivierung einer kryptischen Spleiß-Donorstelle, wodurch ein um 50 Aminosäuren trunkeiertes Protein, das sogenannte Progerin, entsteht, welches nicht mehr normal prozessiert werden kann (De Sandre-Giovannoli et al., 2003, Eriksson et al., 2003). Lamin A ist ein Strukturprotein der Kernmembran und agiert außerdem als Regulator des Transportes zwischen Zellkern und Cytoplasma, der Transkription und DNA-Replikation. *LMNA*-Mutationen verursachen noch weitere Erkrankungen, die als Laminopathien zusammengefasst werden und Kardiomyopathien, Lipodystrophien und Neuropathien umfassen (Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie, Dunnigan-Lipodystrophie, Charcot-Marie-Tooth-Krankheit) (Arboleda et al., 2007).

1.2.2.2 Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom

Beim Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom handelt es sich um ein neonatales Progerie Syndrom mit frühzeitig auftretenden endokrinen und metabolischen Störungen, unter anderem Dyslipidämien. Das Syndrom unterscheidet sich von anderen Progerie Syndromen vor allem dadurch, dass der frühzeitige Alterungsprozess bereits neonatal auftritt. Es wurde erstmals von Rautenstrauch und Snigula im Jahre 1977 bei zwei Schwestern und von Wiedemann im Jahre 1979 bei zwei weiteren nicht miteinander verwandten männlichen Patienten beschrieben (Rautenstrauch et al., 1977, Wiedemann, 1979). Seitdem wurde bei etwa 30 Fällen ein Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom diagnostiziert. Die mediane Lebenserwartung liegt bei etwa 7 Monaten. Nur 6 Patienten erreichten ein etwas höheres Alter (Rautenstrauch et al., 1994, Thorey et al., 2003, Wiedemann, 1979). Spezifisch für diese Erkrankung und notwendiges diagnostisches Kriterium sind das gemeinsame Auftreten einer intrauterinen Wachstumshemmung, einer progeroiden Erscheinung und mangelhaft ausgebildetes subkutanes Fettgewebe (Hagadorn et al., 1990). Zudem haben die betroffenen Kinder charakteristische faziale dysmorphe Kennzeichen, wie eine dreieckige Kopfform, eine schnabelförmige Nase, Pseudohydrocephalus, erweiterte Fontanellen und weit offene Schädelnähte sowie prominente subkutane Venen. Häufig treten auch Hypotrichose, mentale Retardierung, natale Zähne, generelle Veränderungen der Ossifikation sowie eine paradoxe, kaudale Fettakkumulation auf (Arboleda et al., 2007). Wie bereits erwähnt ist das Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom mit endokrinen und metabolischen Störungen assoziiert. Hyperinsulinämie wurde in mehreren Fällen beschrieben und ist vermutlich die Folge einer Insulinresistenz, die mit einer generellen Lipodystrophie einhergeht (Arboleda et al., 2005,

Arboleda et al., 1997, Najjar et al., 1975, Pivnick et al., 2000). In mehreren Fällen wurden des Weiteren Hypercholesterinämien und Triglyzeridämien festgestellt (Arboleda et al., 1997, Pivnick et al., 2000).

Für das Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom wird eine autosomal-rezessive Vererbung postuliert, basierend auf der Beschreibung von betroffenen Geschwistern mit konsanguinen Eltern oder Eltern aus derselben geographischen Region (Arboleda et al., 1997, Bitoun et al., 1995, Hou et al., 1995, Pivnick et al., 2000, Rautenstrauch et al., 1977). Die kausale molekulare Ursache konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Eine Studie der Telomerlänge und replikativen Kapazität von Fibroblasten eines Wiedemann-Rautenstrauch Patienten zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu normalen Kontrollen (Korniszewski et al., 2001, Nowak et al., 2006).

1.3 Gen-Identifizierung durch Exom-Sequenzierung

In den vergangenen Jahrzehnten dienten der Identifizierung von kausalen Genen für monogene Erkrankungen vorwiegend Kopplungsanalysen mit nachfolgender positioneller Klonierung. Hierbei werden zunächst mittels genomweiter Kopplungsanalysen in großen Familien mit vielen betroffenen Personen chromosomale Regionen identifiziert, für die ein bestimmter Haplotyp mit der Erkrankung innerhalb der untersuchten Familie vererbt wird und somit gekoppelt ist. Alle in diesen chromosomalen Regionen gelegenen Gene sind positionelle Kandidaten (Collins, 1995). Im Anschluss erfolgt die Sequenzierung der positionellen und funktionellen Kandidaten in der Regel nach der Kettenabbruch-Methode, die 1977 von Sanger entwickelt wurde (Sanger et al., 1977). Der größte Nachteil der positionellen Klonierung ist die Tatsache, dass besonders große Familien mit vielen Betroffenen für die Analysen notwendig sind, um statistisch signifikante Ergebnisse und nur singuläre Kopplungsregionen zu erhalten. Des Weiteren kann die Sanger-Sequenzierung relativ aufwendig sein, vor allem wenn sehr viele Kandidatengene mit vielen Exons auf Mutationen getestet werden müssen, da diese Methode nur die Sequenzbestimmung eines kurzen und spezifisch mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmentes in einem Ansatz erlaubt. Die molekulargenetische Ursache von bis zu 2000 monogenen Erkrankungen wurde über Kopplungsanalysen und Sanger-Sequenzierung aufgeklärt.

Eine neuartige Technologie zur Identifizierung von kausalen Mutationen in Genen für u.a. monogene Erkrankungen ist die Exom-Sequenzierung mittels *Next Generation* Sequenzierung (NGS). Es gibt zurzeit mehrere kommerziell erhältliche Plattformen für die NGS (z.B. Roche/454's GS FLX, Illumina/Solexa's GA, Applied Biosystems/SOLiD) die zum Teil auf

unterschiedlichen Methoden beruhen. Auf allen Plattformen erfolgt jedoch eine massive Parallelsequenzierung von räumlich voneinander getrennten klonal amplifizierten DNA-Molekülen in einer Fließzelle (Voelkerding et al., 2009). Mit dieser Hochdurchsatz-Technologie können zurzeit etwa 400-3000 Mb Sequenzdaten in einem Lauf auf einer Plattform in nur wenigen Tagen produziert werden und neue, noch leistungsstärkere Geräte werden entwickelt. Im Vergleich dazu hat das humane Genom eine Größe von etwa 3000 Mb (Mardis, 2008). Vor der Sequenzierung wird die genomische DNA zunächst fragmentiert. Die entstandenen Fragmente werden mit spezifischen Adaptoren versehen, die Bindungsstellen für universelle Primer darstellen, und im Anschluss amplifiziert (z.B. mit Hilfe von *emulsion PCR*, *solid-phase amplification*, *bridge amplification*). Die Sequenzierung erfolgt dann auf den einzelnen Plattformen mittels *pyrosequencing*, *polymerase-based sequencing-by-synthesis* oder *ligation-based sequencing* (Mardis, 2008, Metzker, 2010).

Es gibt derzeit unterschiedliche Strategien zur Gen-Identifizierung bei monogenen Erkrankungen. Zum einen besteht die Möglichkeit unter der Verwendung von *target-enrichment* Verfahren das komplette Exom eines Patienten in kürzester Zeit zu sequenzieren (*whole exome sequencing*). Zum anderen können auch komplette genomische Bereiche spezifischer chromosomaler Regionen, für die vorab mittels Kopplungsanalyse eine eindeutige Kopplung mit der Erkrankung gezeigt wurde, angereichert und anschließend der Sequenzierung zugeführt werden (*targeted sequencing*). Neben diesen beiden Hauptstrategien, gibt es weitere Anwendungen, auf die aber nicht gesondert eingegangen werden soll. Prinzipiell erlaubt die NGS-Technologie auch die Sequenzierung des gesamten Genoms eines Patienten (*whole genome sequencing*). Da die meisten monogenen Erkrankungen jedoch durch exonische Mutationen und Spleißmutationen hervorgerufen werden, die zu einer veränderten Aminosäure-Sequenz führen, reicht es meist aus nur das Exom, welches eine Größe von etwa 30 Mb besitzt und nur 3 % des gesamten Genoms ausmacht, zu sequenzieren (Kuhlenbaumer et al., 2011). Des Weiteren ist eine Genom-Sequenzierung zur Gen-Identifizierung zum jetzigen Zeitpunkt nicht sonderlich sinnvoll, da hierbei eine enorme Anzahl an Varianten in intronischen Bereichen detektiert wird, deren mögliche Kausalität schwierig zu interpretieren ist. Abgesehen davon ist es von technischer und bioinformatischer Seite noch sehr schwierig, gesamte Genomdaten zu generieren und zu analysieren.

Ein wichtiger Faktor für den Erfolg bei der Exom-Sequenzierung ist eine gute Anreicherung aller zu sequenzierenden spezifischen Zielregionen und damit verbunden eine hohe Abdeckungsrate (*coverage*). Eine ausreichende *coverage* aller Bereiche ist zwingend

notwendig zur vollständigen Analyse. Es gibt für die Anreicherung auf dem Markt unterschiedliche verfügbare Technologien, auf die im Detail nicht weiter eingegangen wird, jedoch ist das Prinzip immer dasselbe. Nach der Fragmentierung der genomischen DNA des Patienten hybridisieren die zu sequenzierenden Fragmente entweder mit entsprechenden komplementären Oligonukleotiden, die beispielsweise mit Biotin markiert sind, in Lösung oder mit komplementären Oligonukleotiden auf Arrays. Die Komplexe aus Oligonukleotiden und DNA-Fragmenten in Lösung können mit Hilfe von Streptavidin-Beads isoliert werden. Ungebundene Fragmente werden durch Waschschrte entfernt. Bei der Array-basierten Methode werden ungebundene Fragmente zunächst durch Waschschrte entfernt und die angereicherten Fragmente danach vom Array eluiert. Im Anschluss erfolgt dann die Adapterligation, Amplifikation und Sequenzierung der spezifisch angereicherten Fragmente. Kommt es aus verschiedenen technischen Gründen zu einer unzureichenden Anreicherung verschiedener genomischer Bereiche, werden diese infolgedessen gar nicht, beziehungsweise nicht ausreichend, amplifiziert und sequenziert, was zu einer niedrigen *coverage* führt. Gegebenfalls kann die kausale Mutation bei der Exom-Sequenzierung nicht ermittelt werden, oder es kommt zur Detektion von falsch-positiven Varianten, die jedoch mittels Sanger-Resequenzierung eliminiert werden können (Koboldt et al., 2010, Kuhlenbaumer et al., 2011, Metzker, 2010).

Bei der Exom-Sequenzierung wird eine enorme Menge an Daten generiert und es ist eine große Herausforderung diese Daten bioinformatisch auszuwerten. Zunächst werden die gewonnen Sequenzdaten zur Detektion von Varianten mit einer Referenzsequenz verglichen. In einem kaukasischen Exom werden etwa 5000-10000 Nonsense- und Missense-Mutationen, Spleißmutationen sowie kleinere Insertionen und Deletionen gefunden (Kuhlenbaumer et al., 2011). Um darunter die kausale pathogene Mutation zu identifizieren, müssen verschiedene genetische und funktionelle Filterstrategien angewendet werden. Vernachlässigt werden können beispielsweise Varianten, die in SNP Datenbanken annotiert sind und in anderen Exomen oder Kontrollindividuen detektiert wurden. Die Anzahl der potentiell kausalen Varianten kann so etwa auf 400-700 reduziert werden (Kuhlenbaumer et al., 2011). Des Weiteren ist eine Abschätzung hilfreich, ob es sich bei dem Gen, in dem eine bestimmte Variante lokalisiert ist, um ein gutes Kandidatengen handelt, dessen Funktion und Expressionsmuster mit der Erkrankung vereinbar ist. Außerdem kann überprüft werden, ob die Varianten in konservierten Regionen liegen und die Funktion des Proteins beeinträchtigen. Die Exom-Sequenzierung wird von vielen derzeit zur Gen-Identifizierung genutzt, jedoch ist diese neue Technologie in ihrer Anwendung noch nicht perfekt. Die bioinformatischen

Methoden sind immer noch in der Entwicklung und so werden beispielsweise viele verschiedene Algorithmen sowie Methoden zum Abgleich der gewonnen Exom-Daten mit bestimmten Datenbanken getestet. Die Detektion von Deletionen und Duplikationen erweist sich immer noch als schwierig und fehlerhaft. Dennoch wird in Zukunft die Exom-Sequenzierung durch die Weiterentwicklung der Technik und die wachsende Erfahrung im Umgang mit enormen Datenmengen die Methode der Wahl zur Identifizierung von neuen krankheitsrelevanten Genen sein.

Welche Strategie zur Gen-Identifizierung angewendet wird, ist abhängig von der Art der Vererbung. Theoretisch genügt die Sequenzierung des Exoms von einem einzigen Patienten, um das kausale Gen zu identifizieren, jedoch hat sich dies als sehr schwierig erwiesen. Bei dominanten Erkrankungen ist es sinnvoll mehrere Patienten mit der gleichen Erkrankung zu analysieren und nach Genen zu suchen, in denen bei allen Betroffenen potentiell kausale Varianten detektiert wurden. Dabei ist zu beachten, dass der Erfolg bei der Analyse mehrerer nicht miteinander verwandter Patienten von der genetischen Locus-Heterogenität abhängt. Bei *de novo* aufgetretenen dominanten Mutationen ist man am ehesten erfolgreich, wenn man Familien-Trios, sprich den Patienten und dessen gesunde Eltern analysiert und beim Vergleich der Daten beim Patienten nach heterozygoten Varianten sucht, die bei keinem Elternteil vorhanden sind. Hoischen et al. konnten Anfang 2010 erstmalig die molekulare Ursache einer dominant vererbten monogenen Erkrankung mittels Exom-Sequenzierung aufklären (Hoischen et al., 2010). Sie führten eine Exom-Sequenzierung bei vier nicht miteinander verwandten Patienten mit Schinzel-Giedion Syndrom durch. Bei allen Betroffenen trat die Erkrankung sporadisch auf, was für heterozygote *de novo* Mutationen in einem einzigen Gen sprach. Pro Individuum wurden etwa 21800 Varianten detektiert, davon 5321 nicht-synonyme Veränderungen. Nach dem Aussortieren von bekannten SNPs blieben 12 Gene übrig, in denen alle Individuen Varianten trugen. Davon wurden nur zwei Gene näher in Betracht gezogen, in denen bei den vier Individuen Varianten an unterschiedlichen genomischen Positionen gefunden wurden. Die Autoren konnten zeigen, dass *de novo* Mutationen in *SETBP1* ursächlich sind. Bei rezessiven Erkrankungen und elterlicher Konsanguinität bietet es sich u.a. an gewonnene Exom-Daten mittels Analyse auf homozygote Bereiche zu filtern. In konsanguinen Familien haben betroffene Kinder zwei Haplotypen im Krankheitslocus gemeinsam, die von einem einzelnen gemeinsamen Vorfahren abstammen (homozygot *by descent*). Bei dieser besonders effizienten Strategie werden nur die detektierten Varianten als möglicherweise kausal erachtet, die bei den betroffenen Individuen in größeren homozygoten Regionen lokalisiert sind. Rezessive

Erkrankungen können auch durch *compound* heterozygote Mutationen hervorgerufen werden. Hierbei ist es wiederum sinnvoll mehrere Patienten mit derselben Erkrankung zu analysieren und nach Genen zu suchen, in denen bei allen Betroffenen zwei potentiell kausale Varianten detektiert wurden. Die erste erfolgreiche Anwendung der Exom-Sequenzierung überhaupt wurde von Ng et al. beschrieben (Ng et al., 2010). Sie identifizierten das kausale Gen für das seltene autosomal-rezessiv vererbte Miller Syndrom. In einem Geschwisterpaar sowie zwei weiteren nicht miteinander verwandten Individuen fanden sie mittels Exom-Sequenzierung *compound* heterozygote Mutationen in *DHODH*. Zur Gen-Identifizierung bei X-chromosomalen Erkrankungen ist es empfehlenswert bei mehreren Betroffenen entweder alle kodierenden Bereiche des X-Chromosoms zu sequenzieren oder nur Bereiche des X-Chromosoms, für die vorab mittels Kopplungsanalyse eine mögliche Kopplung mit der Erkrankung gezeigt wurde.

2 Zielsetzung

Metabolische Störungen stellen den Hauptrisikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse und die Progression der Atherosklerose dar. Sie sind von großem Interesse, da die Atherosklerose mit einer zerebrovaskulären und kardialen Manifestation in Form der koronaren Herzerkrankung einhergeht und für 50 % der Todesfälle in den westlichen Industrienationen verantwortlich ist. Neben Umweltfaktoren spielt bei metabolischen Störungen auch eine Vielzahl genetischer Faktoren eine Rolle, jedoch sind diese noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher neue genetische Faktoren sowie molekulare Mechanismen von Lipidstoffwechselerkrankungen entschlüsselt und untersucht werden.

Um den Einfluss genetischer Faktoren auf die Entstehung von Hypercholesterinämie zu untersuchen, wurden eine große deutsche Kohorte sowie mehrere Familien mit diagnostizierter Hypercholesterinämie molekulargenetisch untersucht. Über die Identifizierung von neuen und bereits beschriebenen Mutationen und Mutationstypen in den bekannten FH-Genen sowie modifizierenden Faktoren sollten Erkenntnisse erlangt werden, die für diagnostische und therapeutische Strategien sowie für eine Risikoabschätzung wichtig sind. Zusätzlich sollten neue ursächliche Gene für die Hypercholesterinämie identifiziert und funktionell charakterisiert werden, um neue Einblicke in die Pathophysiologie der Erkrankung zu gewinnen.

Neben dieser isolierten Stoffwechselerkrankung, sollten im Rahmen dieser Arbeit auch molekulare Ursachen für zwei ausgewählte Syndrome identifiziert werden, die bekannterweise mit Lipidstoffwechselstörungen oder anderen metabolischen Störungen einhergehen. Das Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom ist ein sehr seltenes autosomal-rezessives Progerie Syndrom und bei Patienten treten frühzeitig Hypercholesterinämie und Hypertriglyzeridämie auf. Mit Hilfe der neuartigen Exom-Sequenzierung sollte die molekulare Ursache der Erkrankung erstmals aufgedeckt werden. Familien mit Diabetes und einem Woodhouse-Sakati-ähnlichen Phänotyp sollten mittels klassischer Gen-Identifizierungsmethoden untersucht werden, um ursächliche Gene zu finden. Allgemein war es Ziel dieser Arbeit über die Identifizierung neuer krankheits-assoziiertes Gene und Aufklärung molekularer Mechanismen neue Einblicke in die Pathogenese metabolischer Erkrankungen zu erlangen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Agar	Agar	<i>Roth</i>
Agarose	SeaKem LE Agarose	<i>Cambrex</i>
Amphotericin	Amphotericin B	<i>Biochrom AG</i>
Ampicillin	Ampicillin Natriumsalz	<i>Roth</i>
Antioxidationsmittel	Antioxidant	<i>Invitrogen</i>
BSA	Rinderserumalbumin, 10 mg/ml	<i>New England Biolabs</i>
CH ₃ COONa	Natriumacetat	<i>Merck</i>
Chemolumineszenz	SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate	<i>Pierce</i>
Chloroform	Chloroform:Isoamylalkohol 24:1	<i>AppliChem</i>
Cholesterol	Cholesterol	<i>Sigma</i>
Coomassie	Coomassie Brilliantblau R250	<i>AppliChem</i>
dATPs	dATPs, 100 mM	<i>Fermentas</i>
DEPC-H ₂ O	DEPC behandeltes Wasser	<i>Fermentas</i>
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (1x) + 4500 mg/l Glucose + L-Glutamin - Pyruvat	<i>Gibco</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	<i>Fermentas</i>
DNA-Längenstandards	GeneRuler 100 bp DNA Ladder, 0,5 µg/µl GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 0,5 µg/µl	<i>Fermentas</i> <i>Fermentas</i>
dNTPs	Desoxynukleotide gemischt, je 10mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP	<i>Fermentas</i>
DTT	Dithiothreitol, 1 M	<i>Qiagen</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat	<i>Merck</i>

Entwicklerlösungen	Entwickler G153	
	Fixierer G354	<i>AGFA</i>
EtBr	1 %ige Ethidiumbromid-Lösung	<i>Roth</i>
EtOH	Ethanol	<i>Roth</i>
FKS	fetales Kälberserum	<i>Biochrom AG</i>
	fetales Kälberserum ohne Lipoproteine	<i>Sigma</i>
Formaldehyd	Formaldehyd 37 %	<i>Roth</i>
Formamid	Hi-Di Formamide	<i>Applied Biosystems</i>
Gelatine	Gelatine	<i>AppliChem</i>
Glutathion-Agarose	Protino [®] Glutathione Agarose 4B	<i>Macherey-Nagel</i>
Glycerin	Glycerin	<i>Merck</i>
Glycin	Glycin	<i>AppliChem</i>
HCl	32 %ige Salzsäure	<i>AppliChem</i>
Hefe-Extrakt	Hefe-Extrakt für die Bakteriologie	<i>Roth</i>
25-Hydroxycholesterol	25-Hydroxycholesterol	<i>Sigma</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	<i>Roth</i>
KOH	Kaliumhydroxid	<i>Merck</i>
Isopropanol	2-Propanol	<i>Roth</i>
Ladepuffer	6 x Loading Dye Solution	<i>Fermentas</i>
Längenstandard	genRES LS500 _{ROX} , (ABI Genetic Analysers)	<i>Serac</i>
	Internal Lane Standard 600	<i>Promega</i>
MeOH	Methanol 100 %	<i>Roth</i>
Mevalonat	Mevalonat	<i>Sigma</i>
Mevastatin	Mevastatin	<i>Sigma</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	<i>AppliChem</i>
MgSO ₄	Magnesiumsulfat	<i>AppliChem</i>
Milchpulver	Milchpulver	<i>Roth</i>
NaCl	Natriumchlorid	<i>Merck</i>
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat	<i>Roth</i>
NaOH	Natriumhydroxid	<i>Roth</i>
NaN ₃	Natriumazid	<i>Roth</i>
Opti-MEM	Opti-MEM	<i>Gibco</i>

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung Dulbecco (1x) ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺	<i>Invitrogen</i>
PenStrep	Penicillin & Streptomycin	<i>Gibco</i>
PI	Proteaseinhibitor Cocktail	<i>Sigma</i>
Primer	Oligonukleotidstartermoleküle	<i>Metabion</i>
Probenpuffer	NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	<i>Invitrogen</i>
Proteasominhibitor	MG132	<i>Sigma</i>
Protein-Standard	SeeBlue Plus 2 Pre-Stained Standard HiMark Pre-Stained High Molecular Weight Protein Standard	<i>Invitrogen</i>
QG-Puffer	Buffer QG Solubilization buffer	<i>Qiagen</i>
Q-Lösung	5 x Q-Solution	<i>Qiagen</i>
Reduktionsmittel	NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	<i>Invitrogen</i>
RIPA Puffer	RIPA Puffer	<i>Sigma</i>
SDS-Elektrophoresepuffer	NuPAGE MES SDS Running Buffer (20 x) NOVEX Tris-Acetate SDS Running Buffer (20 x)	<i>Invitrogen</i>
Sephadex	Sephadex TM G-50 Superfine	<i>GE Healthcare</i>
Stripping Puffer	Restore Fluorescent Western Blot Stripping Buffer	<i>Thermo Scientific</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer (10x)	<i>Invitrogen</i>
Transfektionsreagenzien	Lipofectamine TM 2000 Reagent FuGENE HD Transfection Reagent	<i>Invitrogen</i> <i>Roche</i>
Transferpuffer	NuPAGE Transfer Buffer (20 x)	<i>Invitrogen</i>
Tri-Reagenz	TRIzol Reagent	<i>Invitrogen</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan	<i>Roth</i>
Triton X 100	Triton X 100 Lösung	<i>Roth</i>
Trypsin	Trypsin-EDTA-Lösung (1x)	<i>Gibco</i>
Trypton	Pepton aus Casein	<i>Roth</i>

3.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

Die erforderliche Einstellung der pH-Werte aller Lösungen, Puffer und Medien erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit NaOH bzw. HCl.

Agarosegele (1,5 %) (Zusammensetzung für 1 Gel)

Agarose	3 g
1x TBE-Puffer	200 ml
EtBr	10 µl

Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin (Endkonzentration 100 mg/ml) in H₂O dest. / EtOH 1:1 lösen

5 x Bakterieneinfriermedium (Zusammensetzung für 50 ml)

50 % Glycerin	25 ml Glycerin 100 %
4 M NaCl	11,67 g
1 M MgSO ₄	6,02 g
1 M Tris/pH7,5	6,06 g
1 % Gelatine	0,5 g
dH ₂ O	ad 50 ml

Lagerung der Bakterienkulturen bei -80°C

Bakterien-Lysepuffer (Zusammensetzung für 100 ml)

50 mM Tris-HCl	5 ml 1 M Tris-HCl/pH7,5
150 mM NaCl	15 ml 1 M NaCl
5 mM DTT	0,5 ml 1 M DTT
dH ₂ O	ad 100 ml

Coomassie-Färbelösung (Zusammensetzung für 500 ml)

Coomassie R250	0,125 g
MeOH 100 %	200 ml
Essigsäure 100 %	35 ml
dH ₂ O	ad 500 ml

Coomassie-Entfärbelösung (Zusammensetzung für 1 l)

30 % MeOH	300 ml MeOH 100 %
10 % Essigsäure	100 ml Essigsäure 100%
dH ₂ O	600 ml

ExoSap-Mix (Zusammensetzung für 100 Reaktionen)

Exonuklease I	7,5 µl
<i>shrimp alkaline phosphatase</i>	30 µl
dH ₂ O	ad 200 µl

Frischblut-Lysispuffer (Zusammensetzung für 1 l)

1 M NH ₄ Cl	200 ml 5 M NH ₂ Cl
10 mM KHCO ₃	100 ml 100 mM KHCO ₃
0,1 mM EDTA	1 ml 100 mM EDTA
dH ₂ O	ad 1 l
pH auf 7,4 einstellen	

Kern-Lysispuffer (Zusammensetzung für 1 l)

10 mM Tris/pH 8,0	10 ml 1 M Tris/pH 8,0
400 mM NaCl	80 ml 5 M NaCl
2 mM EDTA	4 ml 0,5 M EDTA
dH ₂ O	ad 1 l
pH auf 8,2 einstellen	

LB-Medium (Zusammensetzung für 1 l)

Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	5 g
dH ₂ O	ad 1 l
pH auf 7,5 einstellen, anschließend autoklavieren, Lagerung bei 4°C	

LB-Agar

LB-Medium	500 ml
Agar	7,5 g

autoklavieren, Lagerung bei 4°C

NaCl-Lösung gesättigt (Zusammensetzung für 1 l)

NaCl	350 g
dH ₂ O	ad 1 l

10 x TBS-Puffer (Zusammensetzung für 1 l)

Tris	24,2 g
NaCl	87,6 g
dH ₂ O	ad 1 l

pH auf 7,4 einstellen

TBST-Puffer (Zusammensetzung für 1 l)

10 x TBS-Puffer	100 ml
Tween 20	500 µl
dH ₂ O	ad 1 l

TE⁻⁴-Puffer (Zusammensetzung für 100 ml)

10 mM Tris/pH 8,0	1 ml 1 M Tris/pH 8,0
100 nM EDTA/pH 8,0	20 µl 0,5 M EDTA/pH 8,0
dH ₂ O	ad 100 ml

steril filtrieren

Vollmedium für HEK-293-Zellen (Zusammensetzung für 500 ml)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (1x) 500 ml

(D-MEM) + 4500 mg/l Glucose

+ L-Glutamin

- Pyruvat

Fetales Kälberserum (FKS)	50 ml
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	5 ml
Amphotericin B	1,4 ml

Vollmedium für HEK-293-Zellen ohne Lipoproteine (Zusammensetzung für 500 ml)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (1x)	500 ml
(D-MEM) + 4500 mg/l Glucose	
+ L-Glutamin	
- Pyruvat	
Fetales Kälberserum ohne Lipoproteine	50 ml
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	5 ml
Amphotericin B	1,4 ml
Mevastatin	9,76275 mg (Endkonzentration 50 µM)
Mevalonat	4,25 mg (Endkonzentration 50 µM)

3.1.3 Kommerzielle Reagenziensysteme

DNA-Aufreinigungskit

Säulenaufreinigung	QIAquick PCR Purification Kit	<i>Qiagen</i>
--------------------	-------------------------------	---------------

Gelaufreinigung	QIAquick Gel Extraction Kit	<i>Qiagen</i>
-----------------	-----------------------------	---------------

Luciferase Assay	Dual-Luciferase Reporter Assay System	<i>Promega</i>
------------------	---------------------------------------	----------------

Plasmidpräparationskit

Midi-Maßstab	QIAGEN Plasmid Midi Kit	<i>Qiagen</i>
--------------	-------------------------	---------------

Mini-Maßstab	PureLink	
--------------	----------	--

	Quick Plasmid Miniprep Kit	<i>Invitrogen</i>
--	----------------------------	-------------------

	Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	<i>Zymo Research</i>
--	-----------------------------	----------------------

MLPA-Kit

	Multiplex Ligation-Dependent	
--	------------------------------	--

	Probe Amplification-Kit, P062 LDLR	<i>MRC-Holland b.v.</i>
--	------------------------------------	-------------------------

Proteinbestimmungskit	BCA Protein Assay Kit	<i>Pierce</i>
-----------------------	-----------------------	---------------

RNA-Aufreinigungskit	RNeasy Minelute Kit	<i>Qiagen</i>
----------------------	---------------------	---------------

Sequenzierkit

	Big Dye Terminator V1.1 Cycle	
--	-------------------------------	--

	Sequencing Kit	<i>Applied Biosystems</i>
--	----------------	---------------------------

TOPO TA Klonierungskit	pCR2.1-TOPO TA Expression Kit	<i>Invitrogen</i>
------------------------	-------------------------------	-------------------

	pcDNA3.1 / V5-His-TOPO TA	
--	---------------------------	--

	Expression Kit	<i>Invitrogen</i>
--	----------------	-------------------

3.1.4 Primer

Alle verwendeten Primer befinden sich im Anhang in den Tabellen 39 bis 69.

3.1.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> (CIAP), 1 U/ μ l	<i>Fermentas</i>
DNase	<i>DNaseI from bovine pancreas Grade II</i>	<i>Boehringer Mannheim GmbH</i>
Exonuklease I	Exonuklease I, 20000 U/ml	<i>New England Biolabs</i>
Ligase	T4 DNA Ligase, 5 U/ μ l	<i>Fermentas</i>
Polymerasen	Taq DNA Polymerase, 5 U/ μ l	<i>Fermentas</i>
	Long PCR Enzyme Mix, 5 U/ μ l	<i>Fermentas</i>
	Pfu DNA Polymerase, 5 U/ μ l	<i>Fermentas</i>
Proteinase K	Pronase	<i>Roche</i>
Restriktionsendonukleasen	NheI, 10 U/ μ l	<i>Fermentas</i>
	Eco81I, 10 U/ μ l	<i>Fermentas</i>
	NotI, 10 U/ μ l	<i>Fermentas</i>
	XbaI, 10 U/ μ l	<i>Fermentas</i>
	SanDI, 10 U/ μ l	<i>Fermentas</i>
	Eco72I, 10 U/ μ l	<i>Fermentas</i>
	ClaI, 10 U/ μ l	<i>Fermentas</i>
SalI, 10 U/ μ l	<i>Fermentas</i>	
RNase-Inhibitor	RNase out, 40 U/ μ l	<i>Invitrogen</i>
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i> , 1 U/ μ l	<i>Promega</i>

3.1.6 Vektoren

pCR2.1-TOPO	<i>Invitrogen</i>
pcDNA3.1 / V5-His-TOPO	<i>Invitrogen</i>
pcDNA3.1 <i>lacZ</i>	<i>Invitrogen</i>
pGEX-4T-1	<i>Amersham Bioscience</i>
pGL4.10[<i>luc2</i>]	<i>Promega</i>

pGL4.7[<i>hRluc</i>]	<i>Promega</i>
pTK-HSV-SCAP-T7	<i>ATCC</i>
pTK-HSV-BP2	<i>ATCC</i>
pSREBP-1a	<i>ATCC</i>

3.1.7 Antikörper

primäre Antikörper	α -HSV- <i>tag</i> , rabbit polyclonal IgG	<i>GenScript</i>
	α -Luciferase, mouse monoclonal IgG ₁	<i>Santa Cruz</i>
	α -Aktin, mouse monoclonal IgM	<i>Santa Cruz</i>
sekundäre Antikörper	goat anti-rabbit IgG-HRP	<i>Santa Cruz</i>
	goat anti-mouse IgG-HRP	<i>Santa Cruz</i>
	goat anti-mouse IgM-HRP	<i>Santa Cruz</i>

3.1.8 DNAs

Für die im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführten Analysen wurde genomische DNA von gesunden und an familiärer Hypercholesterinämie erkrankten Mitgliedern mehrerer türkischer Familien (FH1-5) verwendet. Die klinische Diagnose wurde von Dr. Meral Kayikcioglu (Department of Cardiology, Faculty of Medicine, Ege University, Turkey) durchgeführt. Die DNA wurde am Institut für Humangenetik der Uniklinik Köln aus EDTA-Blut isoliert oder durch den Kooperationspartner zur Verfügung gestellt.

Des Weiteren wurde genomische DNA von 200 deutschen Patienten (HC1-200) mit diagnostizierter Hypercholesterinämie der LIANCO (Lipid-Analytic-Cologne) Studie verwendet. Von 1999 bis 2002 wurden 5000 Patienten im Raum Köln rekrutiert. Die Studie läuft unter der Leitung von Herrn Prof. Wilhelm Krone und Frau Prof. Gouni-Berthold vom Institut für Innere Medizin II der Uniklinik Köln. Die LIANCO Studie wurde angelegt, um den Zusammenhang zwischen genetischen Mutationen, Serumlipoproteinen, anderen biochemischen Parametern und klinischen Daten und Atherosklerose zu bewerten. Einschlusskriterium für die Studie war das Vorliegen eines kardiovaskulären Risikofaktors (Gouni-Berthold et al., 2005). Allen Patienten der Studie wurde eine LIANCO ID zugeteilt.

Prof. Marquardt (Universitätsklinikum Münster, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Allgemeine Pädiatrie) stellte genomische DNA von gesunden Patienten und von Patienten, bei denen Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom diagnostiziert wurde, von je

einer türkischen und einer deutschen Familie zur Verfügung (WR1, WR2). Von Dr. Yasemin Alanay (Hacettepe University, Ihsan Dogramaci Children's Hospital, Ankara, Turkey) wurde für Analysen genomische DNA von gesunden Patienten und von Wiedemann-Rautenstrauch Patienten von zwei türkischen Familien zugesandt (WR3, WR4).

Mehrere Kooperationspartner stellten genomische DNAs von Patienten mit Woodhouse-Sakati-ähnlichen Syndromen zur Verfügung. Initial schickte Dr. Abdulgani Tatar aus der Türkei (Department of Medical Genetics, School of Medicine, Atatürk University, Erzurum, Turkey) genomische DNAs von gesunden und erkrankten Mitgliedern einer türkischen Familie (HYPO1) (Tatar et al., 2009). Später wurde genomische DNA von zwei palästinensischen Geschwistern mit einem Woodhouse-Sakati-ähnlichem Syndrom, sowie von deren gesunden Eltern zur Verfügung gestellt (HYPO2) (Megarbane et al., 2003). Die klinische Diagnose und Präparation der DNA wurde von Dr. André Mégarbané vorgenommen (Unité de Génétique Médecine, Université Saint-Joseph, Paris, France). Professor Koenraad Devriendt (Centrum voor Menselijke Erfelijkheid, Universitaire Ziekenhuizen Leuven, Leuven, België) schickte zur Analyse genomische DNAs von zwei kaukasischen Geschwisterpaaren (HYPO3, HYPO4) (Devriendt et al., 1996, Devriendt et al., 1996). Von Prof. Regina Betz (Institut für Humangenetik, Universität Bonn, Bonn) wurden genomische DNAs von drei Patienten zweier deutscher Familien (HYPO5, HYPO6) zur Verfügung gestellt. Außerdem fanden genomische DNAs von gesunden und erkrankten Mitgliedern einer türkischen Familie (HYPO7) Verwendung. Klinische Diagnose und Präparation der DNA wurden von Ferda Percin (Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Gazi University, Ankara, Turkey) vorgenommen.

Die verwendeten deutschen, genomischen Kontroll-DNAs wurden im Institut für Humangenetik der Universität zu Köln aus EDTA-Blut von gesunden Personen gewonnen. Kontroll-DNAs anderer Populationen wurden von verschiedenen Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt.

3.1.9 Zellen und Bakterien

eukaryotische Zellen	HEK-293 (Slp-In TM -293)	<i>Invitrogen</i>
Bakterien	TOP10 elektrokompetente E. coli, Stamm K12	<i>Invitrogen</i>
	NEB 5-alpha chemischkompetente E. coli, Stamm K12	<i>New England Biolabs</i>

BL21 (DE3)
 chemischkompetente E.coli *New England Biolabs*

3.1.10 Verbrauchsmaterial

Bakterienröhrchen	PP-Tubes 10 ml	<i>Greiner</i>
Einfrierröhrchen	Cyro-Tube-Vial 1,8 ml	<i>Nunc</i>
Filterpapier	Hybond blotting paper	<i>Amersham Biosciences</i>
Gewebekulturplatte	Gewebekulturplatte 10 cm	<i>Greiner</i>
	Multiwell, 12-well	<i>Falcon</i>
Impfösen	Impfösen 1 µl	<i>Greiner</i>
Kanülen	Einmal-Injektions-Kanülen	
	100 Sterican, 23 G	<i>Braun</i>
Küvetten	UV-Vetten	<i>Eppendorf</i>
Mikrotiterplatte	Assay Plate, 96-well	<i>Costar</i>
Nitrocellulose-Membran	Hybond-ECL	<i>GE Healthcare</i>
Pasteurpipetten	Pasteurpipetten aus Glas	<i>Brand</i>
Petrischalen	Petrischalen 10 cm	<i>Greiner</i>
Proteingele	NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gele	
	1,0 mm x 15 well, 1,5 mm x 10 well	
	NuPAGE 7 % Tris-Acetat Gele	
	1,0 mm x 15 well, 1,5 mm x 10 well	<i>Invitrogen</i>
Septen	96-well Plate Septa	<i>Applied Biosystems</i>
Skalpelle	Surgical disposable scalpels	<i>Braun</i>
Sterilfilter	Sterilfilter 0,2 µm	<i>Schleicher&Schuell</i>
96-well Auffangplatte	96-well Microplatte	<i>Greiner</i>
96-well Filtrationsplatte	MultiScreen Filter Plates	<i>Millipore</i>
96-well MicroAmp Platten	96-well MicroAmp Platten	<i>Applied Biosystems</i>
96-well Platte	96-well Optical Reaction Plate	<i>Applied Biosystems</i>
Western-Blot Film	Hyperfilm ECL	<i>GE Healthcare</i>
Zellschaber	Zellschaber	<i>Greiner</i>
Zentrifugenröhrchen	Reaktionsgefäß 15 ml, 50 ml	<i>Greiner</i>

3.1.11 Arbeitsgeräte

Agarosegel-Laufkammer	MGU-402T, MGU602T	<i>C.B.S. Scientific</i>
Entwicklermaschine	Curix 60	<i>AGFA</i>
Foto-Kassette	BioMax Cassette	<i>Kodak</i>
Gel-Dokumentationsgerät	Chemidoc XRS	<i>Bio-Rad</i>
Heizblock	Thermomixer comfort	<i>Eppendorf</i>
Inkubator (Bakterien)	Kelvitron T	<i>Heraeus</i>
Inkubator (Zellkultur)	Hera cell 150	<i>Heraeus</i>
Lichtmikroskop	Leica DMIL	<i>Leica</i>
Luminometer	GloMex [®] 96 Microplate Luminometer	<i>Promega</i>
Magnetrührer	MR 3100	<i>Heidolph</i>
Mikrowelle	Micro-chef FM 2915Q	<i>Moulinex</i>
Netzgerät (Gelkammer)	EC250-90	<i>Thermo Electron Corporation</i>
PCR-Maschine	Dyad	<i>MJ Research</i>
	Tetrad	<i>MJ Research</i>
pH-Meter	inolab pH level 1	<i>WTW</i>
Photometer	Biophotometer	<i>Eppendorf</i>
	Nanodrop ND-1000	<i>Peqlab</i>
Pipetten	Pipetten	<i>Eppendorf</i>
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	<i>Integra Bioscience</i>
Rotator	LD-79	<i>Labinco BV</i>
Schüttelinkubator	Innova 4299	<i>New Brunswick Scientific</i>
Schüttler	Unimax 1010	<i>Heidolph</i>
SDS-Gelelektrophorese / Western-Blot-Kammer	XCell SureLock Electrophoresis Cell	<i>Invitrogen</i>
Sequenziergeräte	Humangenetik: ABI PRISM 3100–Avant Genetic Analyzer	<i>Applied Biosystems</i>
	CCG, AG Nürnberg: ABI PRISM 3730	<i>Applied Biosystems</i>
Sterilbank Zellkultur	Hera Safe	<i>Kendro</i>
Transilluminator	Bio view	<i>Biostep</i>
Ultraschallgerät	SONOPULS HD 2070	<i>Bandelin electronic</i>

Vortexer	M10	VWR
Waage	EW	Kern
(Fein-)Waage	ARJ 120-4M	Kern
Wasserbad	GFL1083	GFL
Western-Blot-Modul	XCell Blot Module	Invitrogen
Zentrifugen	Centrifuge 5415D	Eppendorf
	Centrifuge 5415R	Eppendorf
	Centrifuge 5804	Eppendorf
	Biofuge stratos	Heraeus

3.1.12 Computerprogramme

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Computerprogramme einschließlich ihrer Anwendung

Computerprogramme	Anwendung	Internet-Adresse
DNASTAR-Lasergene Editseq Seqbuilder PrimerSelect Seqman	Verwalten von DNA- und Proteinsequenzen Erstellen von linearen und zirkulären DNA-Karten, Veranschaulichung von Domänen in Aminosäuresequenzen Auffinden von Primern für PCR Darstellung von Elektropherogrammen, Sequenzanalyse	http://dnastar.com
BioEdit	Darstellung von Elektropherogrammen, Sequenzanalyse	http://bioedit.com
EndNote	Literaturverwaltung	http://endnote.com
Microsoft Office 2003 Powerpoint Excel Word	Graphikerstellung Datenverarbeitung Schreibprogramm	http://www.microsoft.com
Applied Biosystems Data Collection Software version 1.0 GeneScan Software 3.7	Datenerhebung Analyse und Auswertung von Mikrosatelliten / MLPA	http://www.appliedbiosystems.com
Bio-Rad Quantity One	Geldokumentation	http://www.bio-rad.com
Linkage 5.2	LOD-Score Berechnung	http://linkage.rockefeller.edu/software/linkage
Multiple Sequence Alignment by ClustalW	Abgleich verschiedener Sequenzen	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw/
PolyPhen	Vorhersage Auswirkungen von Punktmutationen auf Struktur und Funktion des Proteins	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/
ConSeq	Identifizierung von funktionell und strukturell wichtigen Aminosäuren in einem Protein	http://conseq.tau.ac.il/
SpliceView	Spleißvorhersage (Donor- und Akzeptorstellen) durch Vergleich mit Konsensussequenzen	http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview.html
NetGene2 Server	Spleißvorhersage (Donor- und Akzeptorstellen) durch Vergleich mit Konsensussequenzen	http://cbs.dtu.dk/services/NetGene2/
Human Splicing Finder Version 2.4.1	Spleißvorhersage (Donor- und Akzeptorstellen) durch Vergleich mit Konsensussequenzen	http://www.umd.be/HSF/
SplicePort	Spleißvorhersage (Donor- und Akzeptorstellen) durch Vergleich mit Konsensussequenzen	http://spliceport.cs.umd.edu/

3.1.13 Datenbanken

Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org/index.html
1000 Genomes	http://www.1000genomes.org/page.php
Human gene mutation database	http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
LDLR Mutationsdatenbanken	http://www.ucl.ac.uk/ldlr/ http://www.umd.necker.fr
miRBase	http://www.mirbase.org/search.shtml
NCBI (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
PubMed	http://www.pubmed.gov
TargetScanHuman Prediction of microRNA targets	http://www.targetscan.org/
The GBD Human Genome Database	http://www.gdb.org/
UCSC Genome Bioinformatics	http://www.genome.ucsc.edu/
ZB MED	
Deutsche Zentralbibliothek für Medizin	http://www.zbmed.de/

3.2 Methoden

3.2.1 Molekulargenetische Methoden

3.2.1.1 Isolierung von DNA aus Blut

5-10 ml EDTA-Blut wurden mit Frischblut-Lysispuffer auf 50 ml aufgefüllt, durch invertieren gemischt und dann 15-20 min auf Eis inkubiert bis die Lösung klar wurde. Die Leukozyten wurden durch Zentrifugation (15 min, 1.500 rpm, RT) pelletiert, der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml Kern-Lysispuffer resuspendiert. Die Proteine wurden durch Zugabe von 330 μ l 10 %-SDS denaturiert und mit 250 μ l Pronase über Nacht bei 37°C inkubiert. Dann wurden 1,66 ml gesättigte NaCl-Lösung hinzugegeben, kräftig geschüttelt und zentrifugiert (10 min, 4.000 rpm, RT). Der Überstand wurde in ein 50 ml Falcon überführt und die DNA mit 7 ml Isopropanol gefällt. Die DNA wurde mit Hilfe einer Glaspipette kurz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 70 % Ethanol getaucht. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 400 μ l TE⁻⁴ gelöst.

3.2.1.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

DNA-Lösungen haben ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich bei 260 nm. Diese Eigenschaft kann benutzt werden, um die DNA-Konzentration in einer Lösung photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm zu bestimmen. Die Extinktion, also der Anteil des Lichts, der von der Lösung absorbiert wird, ist abhängig von der Schichtdicke der Meßküvette und der Konzentration des gelösten Stoffes. Eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml.

Für die Konzentrationsbestimmung wurden 5 μ l einer unbekannt konzentrierten DNA-Lösung zu 95 μ l dH₂O gegeben. Zunächst wurde das Photometer mit 100 μ l dH₂O bei 260 nm auf Null geeicht. Anschließend wurde die Extinktion der DNA-Lösung dreimal gemessen, um ein möglichst genaues Ergebnis zu erhalten, und der Mittelwert in die nachfolgende Gleichung eingesetzt:

$$K [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \varepsilon \times E_{260} \times \text{VF}$$

(K = Konzentration, ε = Extinktionskoeffizient ($\varepsilon_{\text{DNA}} = 50$), E_{260} = Extinktion bei 260 nm, VF = Verdünnungsfaktor (hier 20)).

Anhand der Extinktion bei 280 nm kann man eine Aussage über die Reinheit der DNA machen, da bei dieser Wellenlänge Proteine ihr Absorptionsmaximum besitzen. Die Reinheit der DNA ergibt sich aus dem Verhältnis E_{260} / E_{280} . Werte von etwa 1,8 entsprechen reiner

DNA. Ein zu niedriges Verhältnis (<1,7) weist auf Verunreinigung mit Proteinen, ein zu hohes Verhältnis (>1,9) weist auf Verunreinigung mit RNA hin.

Die Konzentration und Reinheit von DNA wurde außerdem durch Messung mit dem Nanodrop ND-1000 System bestimmt.

3.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

Standard-PCR

Die 1985 von Kary Mullis entwickelte PCR ist eine Methode, um selektiv spezifische DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. Grundlage ist die Tatsache, dass eine DNA-abhängige thermostabile Polymerase in Gegenwart eines freien 3'OH-Endes in der Lage ist, durch Verknüpfung einzelner Desoxynukleotide (dNTPs) komplementäre Stränge an einzelsträngige DNA zu synthetisieren. Die PCR ist ein zyklischer Prozess aus Denaturierung, Hybridisierung und Extension.

Durch die Denaturierung bei 94°C wird der DNA-Doppelstrang durch das Auflösen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen in zwei komplementäre Tochterstränge aufgetrennt. Um kurze doppelsträngige Bereiche als Ansatzstelle für die Polymerase zu schaffen, werden kurze, zum Anfangs- und Endstück des zu amplifizierenden Bereiches komplementäre Oligonukleotide (Primer) von durchschnittlich 18-23 Basenpaaren Länge hinzugegeben. Bei der Hybridisierung (*Annealing*) binden die beiden Primer (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) bei einer Temperatur zwischen 50-70°C gegenläufig an ihre komplementären DNA-Stränge. Die Hybridisierungstemperatur ist abhängig von der Basenzusammensetzung und Länge der Primer. Bei Primern bis ~20 Bp Länge kann die Schmelztemperatur über den GC-Gehalt grob abgeschätzt werden:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2 \times (\text{Anzahl A bzw. T})$$

Die Primer wurden mit dem Programm PrimerSelect (Lasergene) ausgewählt, das auch die Schmelztemperatur berechnet, oder selbst ausgesucht. Primer sollten eine Länge von 18-23 Bp und einen GC-Gehalt von 50-60 % haben, mit G oder C beginnen und enden (GC-Klammer) sowie keine repetitiven Basenabfolgen besitzen. Außerdem sollte die Selbst-Dimerisierung bzw. die Dimerisierung mit dem jeweils anderen Primer vermieden werden.

Die Synthese des komplementären Strangs findet während der Extension i.d.R. bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Polymerase, statt. Die Länge des Extensionsschrittes ist abhängig von der Syntheserate der Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden Abschnitts (durchschnittlich 1 Kb/min). Meist wird eine thermostabile, genetisch modifizierte DNA-Polymerase aus dem Archaeobakterium *Thermus aquaticus*, die so genannte Taq-Polymerase,

benutzt. Die DNA-Polymerase verlängert unter der Verwendung von dNTPs die 3'OH-Enden der Primer.

Ein PCR-Zyklus wird in der Regel 25-35 mal wiederholt. Bei jedem Zyklus dienen die neusynthetisierten DNA-Stränge des vorangegangenen Zyklus wiederum selbst als DNA-Matrize, so dass die Zielsequenz exponentiell vervielfältigt wird, bis eine Sättigung erreicht wird und die Vervielfältigung nach etwa 35 Zyklen aufgrund der Enzyminaktivierung und des Verbrauchs von dNTPs und Primer stoppt.

Die Polymerase hat ihr Aktivitätsoptimum bei pH 8,8. Die Salzkonzentration des Puffers beeinflusst die Ausbeute an PCR-Produkt. MgCl₂ beeinflusst die Hybridisierung der Primer, die Trennung der Stränge während der Denaturierung, die Produktspezifität, die Bildung von Primerdimeren und die Fehlerrate der Polymerase. Außerdem braucht die Polymerase freies Mg²⁺ für ihre Aktivität. Die Spezifität einer PCR kann durch Erhöhung des MgCl₂-Anteils im PCR-Puffer, durch Zugabe von denaturierenden Agentien, wie DMSO oder Q-Lösung oder durch Erhöhung der Hybridisierungstemperatur verbessert werden.

Um Kontaminationen der PCR mit Fremd-DNA auszuschließen, wurde bei jeder PCR eine Leerkontroll-Probe einbezogen, bei der ein PCR-Ansatz ohne DNA-Matrizen eingesetzt wurde. Um festzustellen, ob die PCR-Amplifikation erfolgreich und spezifisch war, wurden 5 µl des PCR-Ansatzes neben 5 µl der Leerkontrolle und 3 µl eines Längenstandards auf ein Agarosegel aufgetragen und in einem elektrischen Feld aufgetrennt (siehe 3.2.1.4).

Verwendete Polymerasen und ihre jeweilige Syntheseraten sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze und die PCR-Bedingungen sind der Tabelle 8 und der Tabelle 9 zu entnehmen. Die Hybridisierungstemperatur und die Extensionszeit wurden für jedes Amplikon empirisch bestimmt und sind daher in den allgemeinen Schemata als X (Hybridisierungstemperatur) bzw. Y (Extensionszeit) angegeben. Die Werte für die einzelnen Amplikons sind in den Tabellen 39 bis 65 und 69 im Anhang angegeben.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Polymerasen

Polymerase	Syntheserate	Max. Leistung	Anwendung	Proofreading	Enden
Taq DNA Polymerase	2,8 Kb/min	3 Kb	Standard-PCR, Mikrosatelliten	nein	<i>sticky ends</i>
Long PCR Enzyme Mix	2,8 Kb/min	20 Kb	Amplikons bis 10 Kb, TA Klonierung, GC-reiche Amplikons	ja	<i>sticky ends</i>
Pfu DNA Polymerase	0,5 Kb/min		Amplikons bis 10 Kb, Klonierung, Mutagenese	ja	<i>blunt ends</i>

Tabelle 8: Zusammensetzung der PCR-Ansätze für die verwendeten Polymerasen

	Taq DNA Polymerase	Long PCR Enzyme Mix	Pfu DNA Polymerase
Puffer [10 x]	2,5 µl	2,5 µl	5 µl
MgCl ₂	1,5 µl [25 mM]	im Mix	im Mix
dNTPs [je 10 mM]	4 µl	4 µl	8 µl
F-Primer [10 pmol/µl]	1 µl	1 µl	1 µl
R-Primer [10 pmol/µl]	1 µl	1 µl	1 µl
Polymerase	0,15 µl [5 U/µl]	0,2 µl [5 U/µl]	1 µl [10 U/µl]
DNA [20 ng]	1-5 µl	1-5 µl	1-5µl
dH ₂ O	ad 25 µl	ad 25 µl	ad 50 µl

Tabelle 9: PCR-Bedingungen der verschiedenen Polymerasen. Die Zyklenzahl bezieht sich auf die Wiederholung der grau unterlegten Schritte.

	Taq DNA Polymerase		Long PCR Enzyme Mix		Pfu DNA Polymerase	
	°C	Zeit	°C	Zeit	°C	Zeit
1° Denaturierung	95	5 min	94	5 min	95	5 min
Denaturierung	95	1 min	94	30 s	95	1 min
Hybridisierung (X)	X	1 min	X	40 s	X	1 min
Extension (Y)	72	Y min	68	Y min	72	Y min
Zyklenzahl	30-35		30-35		30-40	
finale Extension	72	10 min	68	10 min	72	10 min
Reaktionsende	4	10 min	4	10 min	4	10 min

Gradienten-PCR

Bei schwierigen Amplikons, bei denen unter Standardbedingungen kein bzw. kein sauberes Produkt entstand, wurde eine Etablierung mittels Gradienten-PCR durchgeführt. Hierfür wurde die PCR 12 x angesetzt und einem PCR-Programm unterzogen, in dem für jeden Ansatz eine andere Hybridisierungstemperatur zwischen 50-70°C benutzt wurde (siehe Tab. 10).

Tabelle 10: Temperaturen der Gradienten-PCR 50-70°C (Tetrad-PCR-Maschine)

Slot	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
°C	50	50,5	51,7	53,2	55,5	58,4	61,8	64,6	66,8	68,4	69,6	70

Touch down-PCR

Bei einem *Touch down*-Programm wird die Hybridisierungstemperatur im Laufe der PCR schrittweise gesenkt, so dass anfangs stringenter Bedingungen herrschen und keine unspezifischen Nebenprodukte entstehen. Sind nach einigen Zyklen genügend spezifische Matrizen vorhanden, wird die Hybridisierungstemperatur herabgesetzt um eine höhere Ausbeute zu erreichen. Nachfolgend ist ein Beispiel für ein TD-Programm angegeben.

TD56

95°C	5 min	
95°C	15 s	} je 3x
60/58°C	10 s	
72°C	30 s	
95°C	15 s	} 30x
56°C	10 s	
72°C	30 s	
72°C	10 min	
4°C	10 min	

3.2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden verschieden lange DNA-Abschnitte entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Grundlage hierfür ist dabei das konstante Verhältnis der Größe einer Sequenz zu ihrer Ladung, welche durch das anionisch vorliegende Phosphat des Zucker-Phosphat-Rückgrates der DNA bestimmt wird. Die Quervernetzungen innerhalb eines Agarosegels hindern größere DNA-Fragmente stärker in ihrer Wanderung als kleine DNA-Fragmente. Die Wanderungsbewegung der DNA wird durch Anlegen einer Spannung hervorgerufen, die bewirkt, dass die negativ geladene DNA zur Anode wandert.

Für ein 1,5 %iges Gel wurden 3 g Agarose zu 200 ml 1 x TBE-Puffer gegeben. Die Agarose wurde durch Aufkochen in einer Mikrowelle vollständig gelöst. Um die DNA sichtbar machen zu können, wurden nach kurzem Abkühlen 10 µl EtBr beigemischt. EtBr ist ein interkalierendes Reagenz, das sich spezifisch zwischen den Basen anlagert und aufgrund seiner aromatischen Ringsysteme UV-Licht absorbiert. Das noch flüssige Gel wurde in eine Gelkammer mit einem darin hängenden Kamm, der die Probestaschen bildet, gegossen. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet. Von jeder Probe wurden 5 µl, versetzt mit 1 µl Ladepuffer, in eine Geltasche gefüllt. Zur Längenbestimmung wurden 5 µl eines DNA-Längenstandards aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 150 V für 30-40 min durchgeführt. Durch UV-Licht wurden die Banden visualisiert und anschließend dokumentiert.

3.2.1.5 Enzymatische Aufreinigung von PCR-Produkten

Bevor ein PCR-Produkt in eine Sequenzierreaktion eingesetzt werden kann, müssen alle Primer- und Nukleotidreste entfernt werden, da in der Sequenzierreaktion nur ein Strang synthetisiert werden darf. Hierfür wurden die PCR-Produkte mit Exonuklease I (ExoI) und *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) verdaut. ExoI spaltet einzelne Nukleotide von einzelsträngigen DNAs (d.h. nicht gebundener Primer) ab, während SAP die

Phosphatgruppen dieser freien Nukleotide abspaltet, so dass diese während der Sequenzierreaktion nicht eingebaut werden können. Es wurden 8 µl PCR-Produkt mit 2 µl des ExoSap-Mixes versetzt und 30 min bei 37°C gefolgt von 5 min bei 95°C im Thermocycler inkubiert.

3.2.1.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode, die 1977 von Sanger entwickelt wurde (Sanger et al., 1977). Im Gegensatz zur PCR wird bei der Sequenzierung nur ein Primer eingesetzt und die DNA linear amplifiziert. Neben den normalen dNTPs enthält der Reaktionsansatz im spezifischen Verhältnis zusätzlich mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen markierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) (Ansorge et al., 1987). Der Einbau der ddNTPs sorgt für eine gezielte, aber statistisch verteilte Unterbrechung der Komplementärstrang-Synthese, da die für die Kettenverlängerung notwendige 3'OH-Gruppe fehlt. Dies geschieht zufallsmäßig an jeder Stelle des Fragments, so dass eine Kollektion unterschiedlich langer Fragmente entsteht. Die Synthese-Produkte werden ihrer Länge nach kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Während der Wanderung im elektrischen Feld werden die eingebauten ddNTPs durch einen Laserstrahl angeregt und entsenden infolge Fluoreszenz-Markierung Licht verschiedener Farbe, welches detektiert wird. Vor der Sequenzierung wurden die zu analysierenden PCR-Produkte enzymatisch aufgereinigt (siehe 3.2.1.5).

Tabelle 11: PCR-Ansatz und Amplifikationsbedingung für die Sequenzierung

PCR-Ansatz		Sequenzier-PCR	
PCR-Produkt	x µl	95°C	30 s
Primer [10 pmol/µl]	1,0 µl	95°C	10 s
5 x Puffer V1.1	4,0 µl	55°C	5 s
Big Dye-Mix V1.1	0,5 µl	60°C	3 min
dH ₂ O	ad 20 µl	4°C	10 min

Zur Entfernung von Enzymen, Primern und nicht eingebauten ddNTPs wurden die Produkte nach der Sequenzier-PCR aufgereinigt. Dazu wurde Sephadex™ G-50 Superfine auf einen MultiScreen Column Loader gegeben, das Sephadex auf eine 96-well Filtrationsplatte übertragen und mit je 300 µl dH₂O aufgefüllt. Das Sephadex wurde für drei Stunden bei RT oder ü. N. bei 4°C quellen gelassen. Das überschüssige Wasser wurde durch Zentrifugation entfernt (910 g, 5 min). Die Sequenzier-Produkte wurden auf die Sephadex-Säulen gegeben und zentrifugiert (910 g, 5 min), die aufgereinigten Produkte wurden in einer 96-well Sammelplatte aufgefangen. 2 µl der Proben wurden in eine 96-well Microamp Platte pipettiert

und mit je 10 µl Formamid versetzt. Die Platte wurde mit einem Septum verschlossen und in das Sequenziergerät (3100-Avant) geladen.

Alternativ wurden die Aufreinigungen und Sequenzierungen vom Sequenzierservice des Cologne Center for Genomics (CCG, AG Nürnberg), Universität zu Köln, durchgeführt.

3.2.1.7 Next Generation Sequenzierung

Bei einem Patienten mit diagnostiziertem Wiedemann-Raustenstrauch Syndrom wurde mittels *Next Generation* Technologie das Exom sequenziert. Die Sequenzierung wurde vom Service des Cologne Center for Genomics (CCG, AG Nürnberg), Universität zu Köln, durchgeführt.

Hierzu wurde die genomische DNA des Patienten mit dem Covaris S220 System (*Covaris*) zunächst definiert fragmentiert. Im Anschluss erfolgte die vollautomatische Erstellung der DNA-Bibliothek mit dem SPRIworks Fragment Library System I von *Beckman Coulter*, welches die SPRI-Technologie (Solid Phase Reversible Immobilization) nutzt, ein auf der Anwendung paramagnetischer Beads basierendes Verfahren zur Nukleinsäure-Aufreinigung. Diese Erstellung erfolgt im SPRI-TE-Gerät (plus Methodenkarte) mit nur einer Kartusche pro DNA-Bibliothek, die den gesamten Prozess beginnend mit fragmentierter DNA, allen notwendigen enzymatischen Reaktionen, entsprechenden Aufreinigungen und der variablen Größenselektion bis hin zum für die PCR fertigen Probe abbildet. Für die Adapterligation und anschließende Anreicherung der DNA-Bibliothek wurde das SureSelect Human All Exon 50 Mb Kit (SureSelect Target Enrichment System for Illumina Paired-End Sequencing Library) von *Agilent Technologies* verwendet.

Die *Next Generation* Sequenzierung erfolgte mit dem Illumina Genome Analyzer IIX. Es wurden zwei *single read* Läufe mit insgesamt drei Spuren einer Fließzelle (eine Fließzelle umfasst acht Spuren, auf welche die DNA-Bibliothek geladen werden kann) durchgeführt. Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Burrows-Wheeler Aligner's Smith-Waterman Alignment Algorithmus mit der Referenzsequenz des Humangenoms hg19 verglichen (Li et al., 2009). Für die weitere Prozessierung der Sequenzalignments sowie die Detektion von Sequenzvarianten (Einzelnukleotide, Indels) wurde SAMtools 0.1.7 verwendet (Li et al., 2009). Die detektierten Varianten wurden mit eigens von Holger Thiele (CCG, AG Nürnberg) intern entwickelten Algorithmen gefiltert, um annotierte SNPs in dbSNP auszuschließen. Alle funktionellen Analysen der Varianten bezogen sich auf das Humangenom hg19 und Ensemble build61. Die Pathogenität der detektierten Varianten wurde beispielsweise mit PolyPhen prädiziert (Adzhubei et al., 2010).

3.2.1.8 Molekulargenetische Testung

Für die bekannten FH-Gene *LDLR*, *APOB* und *PCSK9* und für die putative Promotorregion von *LDLR* wurden bei Patienten der LIANCO Studie (HC1-200) sowie bei verschiedenen Betroffenen und Nicht-Betroffenen aller FH Familien (FH1-5) Mutationsanalysen durchgeführt. Patienten der LIANCO Studie, bei denen eine Mutation in *LDLR* identifiziert werden konnte, wurden für die Nonsense-SNPs rs10491178 in dem Gen *ABCA10*, rs11089781 in dem Gen *APOL3* und rs328 in dem Gen *LPL* genotypisiert. Bei Patienten der LIANCO Studie, bei denen eine kausale Mutation in den bekannten Genen ausgeschlossen werden konnte, wurden außerdem die Gene *SCARB1*, *SREBP1* und *SREBP2* getestet. Bei den Familien FH1-5 wurden zusätzlich konservierte Bindungsstellen für die miRNA Familien miR-130/301, miR-17-5p/20/93.mr/106/519.d und miR-148/152 in der 3'UTR von *LDLR* überprüft (siehe Tab. 13). Nach genomweiter Kopplungsanalyse und Feinkartierung wurde bei Familie FH1 das Kandidatengen *ABCA1* untersucht. Bei Familie HYPO1 wurden nach genomweiter Kopplungsanalyse und Feinkartierung die Kandidatengene *DLX1*, *DLX2*, *FGF1*, *GPR155* und *C2orf37* getestet. Bei allen weiteren Familien und Patienten mit Woodhouse-Sakati-ähnlichen Syndromen (HYPO3-9) wurde das Gen *C2orf37* überprüft. Eine Sequenzierung des gesamten Exoms und eine anschließende Re-Sequenzierung von Exon 5 des *PYCR1*-Gens erfolgten bei einem Wiedemann-Rautenstrauch Patienten einer türkischen Familie (WR1). Nachfolgend wurden bei weiteren Patienten mit Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom Mutationsanalysen in allen kodierenden und angrenzenden nicht-kodierenden Bereichen von *PYCR1* durchgeführt (WR2-4). Alle Exons, die Promotorregion von *LDLR*, miRNA Bindungsstellen und alle Bereiche mit putativen kausalen Veränderungen wurden mittels Standard- oder *Touch down*-PCR (siehe 3.2.1.3) amplifiziert, aufgereinigt (siehe 3.2.1.5) und anschließend sequenziert (siehe 3.2.1.6). Die Tabellen mit den verwendeten Primerpaaren, sowie den jeweiligen Hybridisierungstemperaturen und Extensionszeiten befinden sich im Anhang (siehe Tab. 39-53). Die Sequenzierung erfolgte in der Regel für jedes Amplikon sowohl mit dem Vorwärts-, als auch mit dem Rückwärtsprimer.

Tabelle 12: Chromosomale Lokalisation, Anzahl der Exons und GenBank-Einträge untersuchter Gene

Gen	Beschreibung	Chromosomale Lokalisation	Anzahl Exons	GenBank
<i>LDLR</i>	<i>low density lipoprotein receptor</i>	19p13.2	18	NM_000527
<i>APOB</i>	<i>apolipoprotein B</i>	2p24.1	29	NM_000384
<i>PCSK9</i>	<i>proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>	1p32.2	12	NM_174936
<i>SCARB1</i>	<i>scavenger receptor class B, member 1</i>	12q24.31	12	NM_005505
<i>SREBP1</i>	<i>sterol regulatory element binding protein 1</i>	17p11.2	19	NM_004176
<i>SREBP2</i>	<i>sterol regulatory element binding protein 2</i>	22q13.2	19	NM_004599
<i>ABCA1</i>	<i>ATP-binding cassette transporter 1</i>	9q31.1	50	NM_005502
<i>C2orf37</i>	<i>open reading frame 37 on chromosome 2</i>	2q31.1	14	NM_025000
<i>DLX1</i>	<i>homeobox protein DLX-1</i>	2q31.1	3	NM_178120
<i>DLX2</i>	<i>homeobox protein DLX-2</i>	2q31.1	3	NM_004405
<i>FGF1</i>	<i>fibroblast growth factor 1</i>	5q31.3	4	NM_001144892
<i>GPR155</i>	<i>G protein-coupled receptor 155</i>	2q31.1	14	NM_152529
<i>PYCR1</i>	<i>pyrroline-5-carboxylate reductase 1</i>	17q25.3	7	NM_006907

Tabelle 13: Getestete konservierte miRNA Bindungsstellen in der 3'UTR des *LDLR*-Gens. Die gesamte 3'UTR des *LDLR*-Gens umfasst 2498 Bp.

miRNA Familie	Sequenz der Bindungsstelle	Anzahl der Bindungsstellen	Position der Bindungsstellen
miR-130/301	UUGCACU	4	813-819 871-877 1970-1976 2161-2167
miR-148/152	UGCAGUG	2	872-878 1971-1978
miR-17-5p/20/93.mr/106/519.d	GCACUUU	4	815-821 1153-1159 1629-1635 2163-2169

3.2.1.9 Genomweite Kopplungsanalyse

Die genomweite Kopplungsanalyse ist eine Möglichkeit zur genetischen Kartierung von Genorten (Loci), die in einer Familie mit der Erkrankung vererbt werden und somit „gekoppelt“ sind. Hierbei wird mit Hilfe von sog. Markern die Häufigkeit von Rekombinationsereignissen untersucht. Befinden sich zwei Genloci auf verschiedenen Chromosomen, so tritt nach dem Unabhängigkeitsgesetz von Mendel eine freie Rekombination, also eine unabhängige Vererbung auf. Liegen zwei Genloci auf einem Chromosom nahe beieinander, so werden sie häufiger gemeinsam vererbt. Man spricht dann von Kopplung. Je weiter jedoch zwei Genloci auf einem Chromosom voneinander entfernt liegen, desto unabhängiger werden sie vererbt, da mit der Entfernung die Wahrscheinlichkeit für meiotische Rekombination zunimmt. Die Kopplungswahrscheinlichkeit von zwei genetischen Markern ist ihrem Abstand untereinander umgekehrt proportional und somit ein Maß für ihre Entfernung zueinander. Bei vollständiger Kopplung ist die

Rekombinationshäufigkeit 0 bei freier Rekombination beträgt sie maximal 0,5. Der Abstand der Loci wird in Centi-Morgan [cM] angegeben. Eine Rekombinationshäufigkeit von 1 % bedeutet, dass sie in 100 untersuchten Meiosen 99 mal gemeinsam und einmal getrennt vererbt wurden und entspricht einem genetischen Abstand von 1 cM. Der genetische Abstand entspricht allerdings nicht dem physikalischen, da die Rekombinationswahrscheinlichkeit im Genom nicht an jedem Locus gleich ist, sondern sich Rekombinationsereignisse im Laufe der Meiose mehrfach an der gleichen Stelle im Chromosom ereignen können.

Um den Ort eines krankheitsverursachenden Gens zu kartieren, vergleicht man die Vererbung von Allelen verschiedener Marker innerhalb von Familien mit der Vererbung der Erkrankung und errechnet die statistische Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmtes Allel eines Markers mit der Erkrankung innerhalb einer Familie gekoppelt ist. Als Marker können beispielsweise polymorphe Mikrosatelliten oder auch „*single nucleotide polymorphisms*“ (SNPs) benutzt werden. Letztere sind zwar nicht sehr informativ, allerdings bietet die Analyse von Tausenden SNPs über das Genom verteilt die Möglichkeit, diese fehlende Informativität eines einzelnen SNPs durch die extreme Quantität auszugleichen.

Bei der statistischen Auswertung von (genomweiten) Markeranalysen berechnet man die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung im Verhältnis zur Nicht-Kopplung. Die statistische Maßzahl hierfür ist der so genannte LOD-Score (*logarithm of the odds*). Man berechnet den LOD-Score, indem man folgendes Wahrscheinlichkeitsverhältnis aufstellt und dieses Verhältnis zur Basis 10 ausdrückt:

$$\frac{\text{Wahrscheinlichkeit, dass zwei Loci gekoppelt sind}}{\text{Wahrscheinlichkeit, dass zwei Loci nicht gekoppelt sind}}$$

(Rekombinationshäufigkeit 0)

(Rekombinationshäufigkeit 0,5)

Eine Kopplung wird als signifikant betrachtet, wenn der LOD-Score über 3,3 liegt. Es ist somit über 1000 mal wahrscheinlicher, dass Kopplung zwischen dem Allel eines Markers und der Vererbung der Erkrankung in der untersuchten Familie vorliegt. Ein LOD-Score von -2 oder weniger schließt eine Kopplung aus.

Es wurden Kopplungsanalysen in der Familie FH1, sowie den Familien HYPO1 und HYPO7 mittels genomweiter SNP Genotypisierung durchgeführt. Für alle Familien wurde der Affymetrix GeneChip Human Mapping 250 K Sty Array verwendet, welcher 238.000 SNPs umfasst, die über das ganze Genom verteilt sind. Der mittlere physikalische Abstand zwischen den SNPs beträgt 2,5 Kb, der durchschnittliche Abstand 5,8 Kb. Jeder SNP ist

entweder 24 oder 40 mal auf dem Array vorhanden (als 25 Bp Oligonukleotid mit *perfect match*- und *mismatch*-Proben). Pro Array wurden 250 ng DNA benötigt, die nach Herstellerangaben aufgearbeitet wurden und auf einer GeneChip® Scanner 3000 7G-Plattform (*Affymetrix*) analysiert wurden. Die erhaltenen Daten wurden mittels GeneChip® Genotyping Analysis Software (GTYPE) 4.1 (*Affymetrix*) und PedCheck (O'Connell et al., 1998) ausgewertet. Für die Berechnung der parametrischen LOD-Scores wurde das Programm MERLIN (Abecasis et al., 2002) verwendet. Die Berechnung der nicht-parametrischen LOD-Scores wurde mit dem Programm GENHUNTER 2.1 durchgeführt, mit sich überschneidenden Sets von jeweils 110-200 SNPs (Kruglyak et al., 1996, Strauch et al., 2000). Außerdem wurde das Programm ALLEGRO für die Berechnung der LOD-Scores verwendet (Gudbjartsson et al., 2000). Die LOD-Scores über das gesamte Genom wurden graphisch dargestellt. Die Haplotypen wurden mit der Software HaploPainter (Thiele et al., 2005) erstellt und mit ALOHOMORA (Ruschendorf et al., 2005) graphisch dargestellt. Alle hier angegebenen Kopplungsanalysen wurden von der AG Nürnberg, Cologne Center for Genomics (CCG), Universität zu Köln, durchgeführt.

3.2.1.10 Mikrosatelliten-Markeranalyse

Um die ermittelte(n) Regione(n) mit einer zweiten Methode zu bestätigen und eventuell näher einzugrenzen, wurde im Anschluss an die genomweite Kopplungsanalyse eine Mikrosatelliten-Markeranalyse zur Feinkartierung durchgeführt. Mikrosatelliten-Marker der entsprechenden Regionen wurden aus den Datenbanken ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>) und UCSC (<http://www.genome.ucsc.edu>) ausgewählt (siehe 3.1.13). Jeder Mikrosatelliten-Marker wurde zunächst mit flankierenden PCR-Primern mittels Standard-PCR amplifiziert (siehe 3.2.1.3), wobei alle Vorwärtsprimer einen Überhang am 5'-Ende besaßen, zu dem ein zusätzliches, fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid komplementär war (siehe Tab. 54-64 im Anhang). Dieses mit dem fluoreszierenden Farbstoff HEX (=grün) markierte Oligonukleotid wurde zusammen mit den Mikrosatelliten-Primern der Standard-PCR-Reaktion beigemischt, so dass ein fluoreszenzmarkiertes PCR-Produkt entstand (Jagiello et al., 2004).

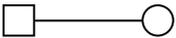
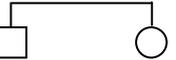
Die Fragmentlängenbestimmung, also die Analyse der PCR-Produkte, wurde mittels automatisierter Kapillargelelektrophorese über ein vier Kapillarensystem (ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems) durchgeführt. In den Kapillaren befand sich ein harnstoffhaltiges Polymer (POP6), so dass die Fragmente während der Elektrophoresezeit der Größe nach aufgetrennt wurden. Das System ermöglichte eine exakte Größenbestimmung

der jeweils vorliegenden Allele der untersuchten Marker. Die PCR-Produkte wurden zusätzlich mit einem ebenfalls fluoreszenzmarkierten, internen Längenstandard aufgetragen, der aus einer Reihe von verschiedenen Fragmenten bekannter Größe in einem Bereich von 50-500 Bp bestand. Während der Elektrophorese passierten die DNA-Fragmente ein Detektionsfenster, in dem die Fluoreszenzmarkierungen der eingebauten Primer durch einen Laser angeregt wurden. Das Fluoreszenzsignal wurde von einer CCD-Kamera (charged-coupled deviced-camera) aufgenommen und mittels Data-Collection Software v 1.0 (*Applied Biosystems*) gesammelt und in digitale Daten umgewandelt. Anschließend wurden die digitalen Informationen über die GeneScan Software 3.7 (*Applied Biosystems*) analysiert. Jede Probe wurde mit 1 µl zu einer Denaturierungslösung aus 0,5 µl Längenstandard ROX und 9,5 µl HiDi-Formamid in eine 96-well Platte pipettiert. Die Proben wurden bei 94°C für 2 min denaturiert und anschließend in das Gerät gestellt.

Die Zwei-Punkt-LOD-Scores der untersuchten Marker wurden mit dem Programm LINKAGE 5.2 berechnet. Für die Analyse wurden bei den Familien FH1 und FH2 ein autosomal-dominanter Vererbungsmodus, entweder mit vollständiger Penetranz oder einer Penetranz von 0,8 und eine Frequenz des Krankheitsallels von 0,001 verwendet. Für die Familie HYPO1 wurden ein autosomal-rezessiver Vererbungsmodus und eine Frequenz des Krankheitsallels von 0,001 verwendet. Die Allelfrequenzen für jeden polymorphen Marker sowie die Rekombinationsfrequenzen in Frauen und Männern wurden als gleichwertig angenommen. Abschließend wurden Haplotypen der analysierten Marker in der jeweiligen chromosomalen Region erstellt. Die Haplotypen im Stammbaum der Familien wurden mit den jeweiligen Allelgrößen der Mikrosatelliten-Marker dargestellt, wobei die Allelgrößen zur besseren Darstellbarkeit einstellig umkodiert wurden.

3.2.1.11 Stammbäume

Zur Erstellung und Interpretation von Stammbäumen wurden folgende Symbole benutzt:

Geschlecht	 männlich	 weiblich	 unbekannt	
Status	 nicht betroffen	 betroffen	 verstorben	 unbekannt
Verhältnis	 Partnerschaft	 blutsverwandt	 Geschwister	

3.2.1.12 MLPA

Die im Jahr 2002 erstmals beschriebene „*multiplex ligation-dependent probe amplification*“ (MLPA)-Methode ist ein Verfahren, mit welchem Kopienanzahlen von spezifischen Nukleinsäure-Sequenzen bestimmt werden können (Schouten et al., 2002). Es ist mit dieser Technik möglich, Abweichungen von der normalen Kopienanzahl durch vollständige und partielle Deletionen oder Duplikationen eines Gens oder einzelner Exons nachzuweisen. Mit der MLPA-Methode können Nukleinsäure-Proben mittels Multiplex-PCR, in welcher bis zu 45 spezifische Nukleinsäure-Sequenzen gleichzeitig mit einem einzigen Primer-Paar amplifiziert werden, verwendet werden. Für die Reaktion werden minimal 20 ng humane DNA benötigt. Das Verfahren beruht auf der Hybridisierung von Sequenz-spezifischen Sonden mit genomischer DNA, gefolgt von einer Amplifikation der hybridisierten Sonden. Jede der eingesetzten Sonden besteht aus zwei Oligonukleotiden, die an benachbarte Nukleotide der Zielsequenz binden (siehe Abb.). Jedes Oligonukleotid enthält je eine von zwei Sequenzen, die vom PCR-Primerpaar erkannt werden (Primer-Bindungssequenz), sowie eine komplementäre Zielsequenz (DNA-Bindungssequenz). Zusätzlich enthält eines der beiden Oligonukleotide zwischen den genannten Sequenzen ein Teilstück von variabler Länge (variables Fragment). Dieses Teilstück ist dafür verantwortlich, dass sich die Längen jedes Amplifikationsproduktes der verschiedenen Proben unterscheiden (Längen zwischen 120-480 Nukleotiden). Wenn beide Oligonukleotide an die Zielsequenz binden, werden sie durch eine Ligation mit einer thermostabilen Ligase zu einem Strang verknüpft. Dieser Strang wird in der weiteren Reaktion mittels der universellen PCR-Primer amplifiziert. Einer der beiden Primer ist dabei fluoreszenzmarkiert. Der „Trick“ der MLPA ist, dass nicht die DNA-Proben selbst amplifiziert werden, sondern die gebundenen Sonden. Hybridisiert kein Oligonukleotid

oder nur ein Oligonukleotid mit der Zielsequenz, kann die Ligation nicht stattfinden und somit auch das Fragment nicht amplifiziert werden. Die Anzahl der Ligationsprodukte ist abhängig von der Anzahl der Zielsequenzen in der DNA-Probe. Die resultierenden fluoreszenzmarkierten PCR-Amplifikate können aufgrund ihrer unterschiedlichen Längen kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert werden. Hierbei zeigen Verschiebungen der Peakfläche eines Fluoreszenzsignals einer Probe Veränderungen der Kopienanzahl an.

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde das MLPA-Kit P062-LDLR von *MRC Holland* verwendet, welches jeweils eine spezifische Sonde für die 18 bekannten Exons von *LDLR* enthält, sowie eine weitere Sonde für Exon 1 und 18 Kontrollsonden. Zwischenzeitlich wurde das Kit überarbeitet. Die neuere Version enthält ebenfalls jeweils eine spezifische Sonde für alle Exons von *LDLR*, jeweils eine weitere Sonde für Exon 1 und Exon 15, sowie 17 Kontrollsonden. Für die Reaktionen wurden jeweils 100 ng DNA von Patienten der LIANCO Studie (HC1-200) ohne kausale Mutation in den bekannten FH-Genen, sowie 100 ng einer Kontroll-DNA eingesetzt. Die Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen sowie das Protokoll sind der Beschreibung des Herstellers zu entnehmen. Die Analyse der mit dem fluoreszierenden Farbstoff FAM (=blau) markierten PCR-Produkte erfolgte mittels automatisierter Kapillargelelektrophorese über ein vier Kapillarensystem (ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer, *Applied Biosystems*). Für die Erhebung der Daten wurde die Data-Collection Software v 1.0 (*Applied Biosystems*) verwendet und für die Auswertung die GeneScan Software 3.7 (*Applied Biosystems*) (siehe 3.1.12). Jede Probe wurde mit 1 µl zu einer Denaturierungslösung aus 0,5 µl Längenstandard Internal Lane Standard 600 und 9 µl HiDi-Formamid in eine 96-well Platte pipettiert.

Die Proben wurden bei 94°C für 2 min denaturiert und anschließend in das Gerät gestellt. Die einzelnen *LDLR* Peak-Profile wurden mit den Kontroll Peak-Profilen verglichen und analysiert. Die relative Peakfläche eines jeden Amplifikationsproduktes reflektiert die relative Kopienanzahl der Zielsequenz einer Sonde in der analysierten Probe. Eine heterozygote Deletion eines Exons beispielsweise spiegelt sich in einer um etwa 50 % verminderten relativen Peakfläche des Amplifikationsproduktes der Sonde für dieses Exon wieder.

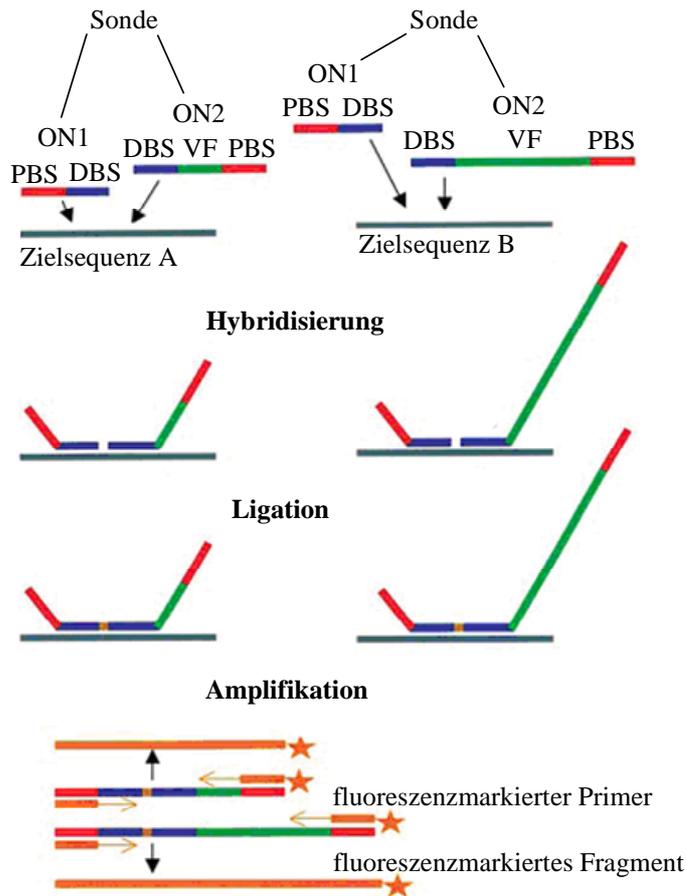


Abbildung 6: Prinzip der MLPA-Methode. DBS = DNA-Bindungssequenz, VF = variables Fragment, PBS = Primer-Bindungssequenz, ON1 = Oligonukleotid 1, ON2 = Oligonukleotid 2

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Herstellung der Konstrukte für die Proteinexpression

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden für funktionelle Studien mehrere Konstrukte zur Proteinexpression hergestellt. Für die Expression von Proteinen in HEK-293-Zellen wurden die Vektoren pTK-HSV und pcDNA3.1 / V5-His-TOPO sowie für den *Luciferase Reporter Assay* pGL4.10[*luc2*] verwendet. Zur Expression von Proteinen in Bakterien wurde der Vektor pGEX-4T-1 verwendet. Alle Konstrukte enthalten ausschließlich humane cDNA.

Tabelle 14: Übersicht über alle hergestellten Konstrukte

Nr.	Insert	Exprimiertes Protein / Promotor	Ausgangsmaterial
pcDNA3.1 / V5-His-TOPO			
1	HSV-S1_WT-FLAG	wildtypisches SREBP1a, N-terminal mit HSV-tag, C-terminal mit FLAG-tag	pSREBP-1a
2	HSV-S1_812-FLAG	SREBP1a mit p.R812Q Mutation, N-terminal mit HSV-tag, C-terminal mit FLAG-tag	Nr. 1
3	HSV-S2_Δ13-FLAG	SREBP2 mit Deletion der AS1-13, N-terminal mit HSV-tag, C-terminal mit FLAG-tag	pTK-HSV-BP2
4	S2_WT-FLAG	wildtypisches SREBP2, C-terminal mit FLAG-tag	pTK-HSV-BP2
5	HSV-S2_WT-FLAG	wildtypisches SREBP2, N-terminal mit HSV-tag, C-terminal mit FLAG-tag	Nr. 4
6	S2_645-FLAG	SREBP2 mit p.R645Q Mutation, C-terminal mit FLAG-tag	Nr. 4
7	S2_852-FLAG	SREBP2 mit p.G852R Mutation, C-terminal mit FLAG-tag	Nr. 4
pTK-HSV			
8	HSV-S2_WT-FLAG	wildtypisches SREBP2, N-terminal mit HSV-tag, C-terminal mit FLAG-tag	Nr. 5
9	HSV-S2_645-FLAG	SREBP2 mit p.R645Q Mutation, N-terminal mit HSV-tag, C-terminal mit FLAG-tag	Nr. 6
10	HSV-S2_852-FLAG	SREBP2 mit p.G852R Mutation, N-terminal mit HSV-tag, C-terminal mit FLAG-tag	Nr. 7
pGEX-4T-1			
11	S1_WT_COOH	wildtypische SREBP1a COOH-Domäne (AS563-1148)	Nr. 1
12	S1_812_COOH	SREBP1a COOH-Domäne mit p.R812Q Mutation	Nr. 2
13	S2_WT_COOH	wildtypische SREBP2 COOH-Domäne (AS556-1142)	Nr. 5
14	S2_645_COOH	SREBP2 COOH-Domäne mit p.R645Q Mutation	Nr. 6
15	S2_852_COOH	SREBP2 COOH-Domäne mit p. G852R Mutation	Nr. 7
pGL4.10[luc2]			
16	LDLR_Promotor_WT	wildtypische <i>LDLR</i> Promotorregion (Position -704-Start-ATG)	DNA eines Patienten der LIANCO Studie mit heterozygoter <i>LDLR</i> Mutation -188C>T
17	LDLR_Promotor_-188	<i>LDLR</i> Promotorregion mit Mutation -188C>T (Position -704-Start-ATG)	DNA eines Patienten der LIANCO Studie mit heterozygoter <i>LDLR</i> Mutation -188C>T

In den nachfolgenden Fluss-Schemata werden die Arbeitsschritte zur Herstellung der Konstrukte zusammenfassend dargestellt.

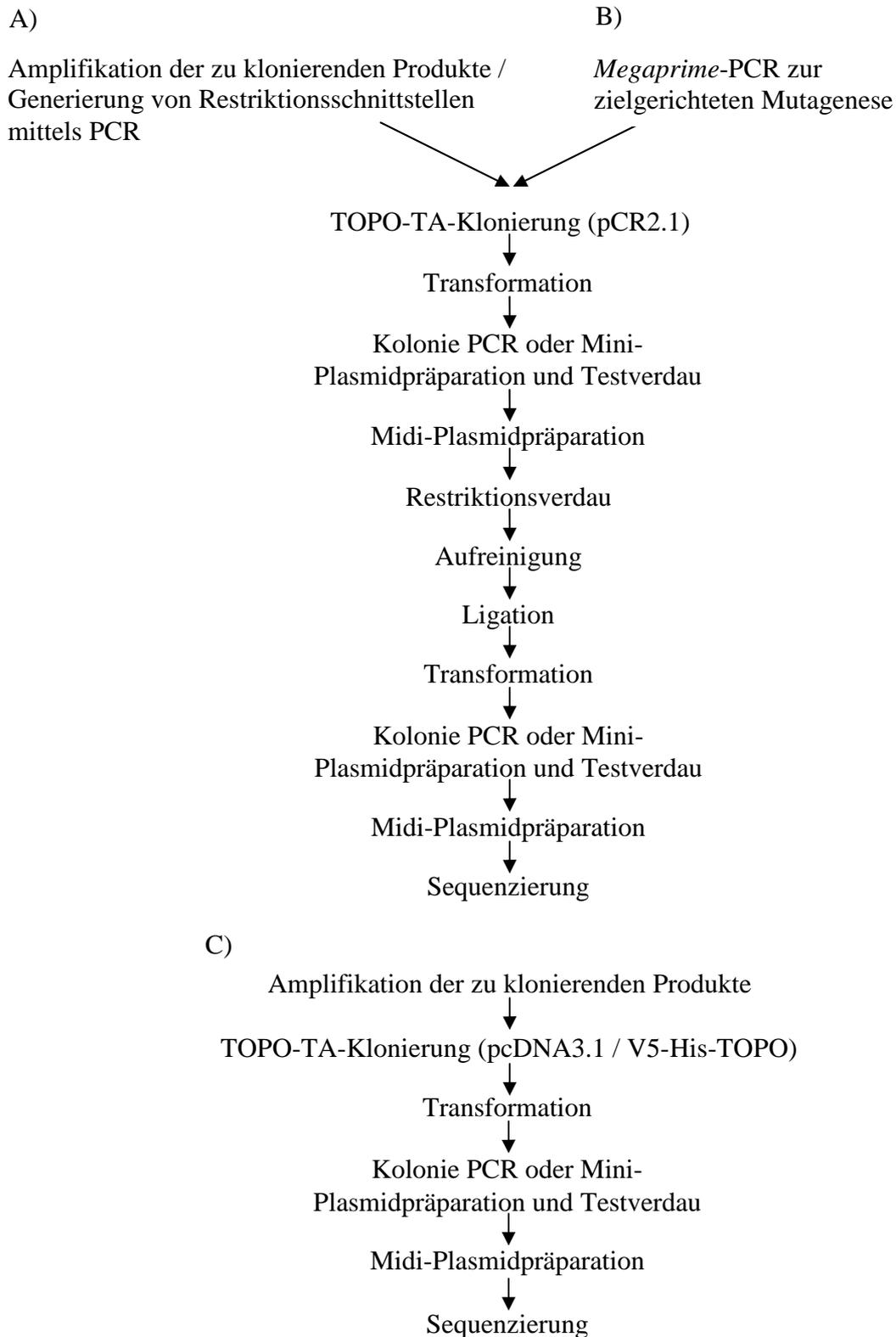


Abbildung 7: Fluss-Schemata zur Herstellung der Konstrukte A) Nr. 5, 8-17; B) Nr. 2, 6, 7; C) Nr. 1, 3, 4

3.2.2.2 Vektoren

Unter dem Begriff Vektor versteht man in der Molekularbiologie Transportvehikel für exogene Nukleinsäuren in eine pro- oder eukaryotische Wirtszelle. Eine Art von Vektor ist das häufig verwendete Plasmid. Bei Plasmiden handelt es sich um künstlich hergestellte, zirkuläre DNA-Moleküle, die Abkömmlinge von natürlich vorkommenden bakteriellen Episomen sind. Jedes Plasmid enthält mindestens eine DNA-Sequenz, die als *origin of replication* (Startpunkt der DNA-Replikation), kurz *ori* genannt, dient, wodurch das Plasmid unabhängig von der chromosomalen DNA repliziert werden kann. Plasmide sind somit selbstreplizierend und können so in einer Zelle in vielen Kopien vorliegen. Die meisten in der Gentechnik verwendeten Plasmide besitzen zum einen Antibiotikaresistenzgene, wodurch den Trägerzellen ein Selektionsvorteil verschafft wird und zum anderen eine *multiple cloning site* (MCS). Die MCS ist eine Sequenz innerhalb des Plasmids, die eine Vielzahl von Restriktionsschnittstellen aufweist und für den Klonierungsvorgang über Schnittstellen essentiell ist.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vektoren pTK-HSV, pcDNA3.1 / V5-His-TOPO und pGEX-4T-1 sind Expressionsvektoren, d.h. sie enthalten Promotoren und andere regulatorische Elemente für die Expression eingebrachter Fremd-Gene. Die Expression der Proteine in pTK-HSV wird durch einen schwachen Herpes Simplex Virus Thymidinkinase Promotor reguliert. Bei pTK-HSV handelt es sich um ein Phagemid mit einer Größe von 5,8 Kb und einem Ampicillinresistenzgen. Im pcDNA3.1 / V5-His-TOPO Vektor wird die Expression gesteuert durch den konstitutiven, sehr starken CMV Promotor, welcher aus dem humanen Cytomegalievirus stammt. Für die Expression von Proteinen in E.coli mittels pGEX-4T-1 ist ein *tac*-Promotor verantwortlich. Der pGL4.10[*luc2*] Luciferase Reporter Vektor beinhaltet die codierende Sequenz des Gens *luc2*. In den Abbildungen 8-10 sind die Eigenschaften von pcDNA3.1 / V5-His-TOPO, pGEX-4T-1 und pGL4.10[*luc2*] schematisch dargestellt.

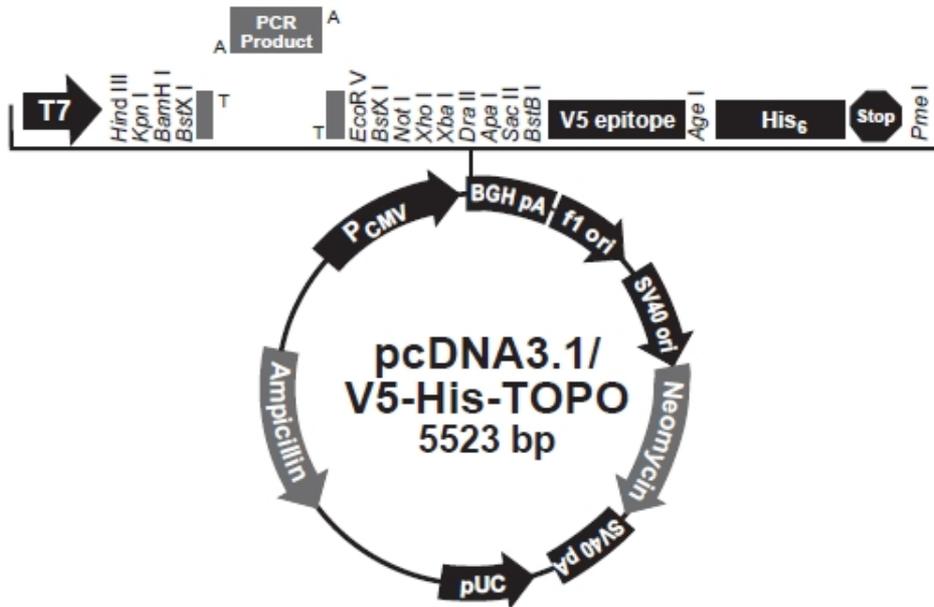


Abbildung 8: Eigenschaften von pcDNA3.1/V5-His-TOPO (modifiziert aus: www.invitrogen.com)

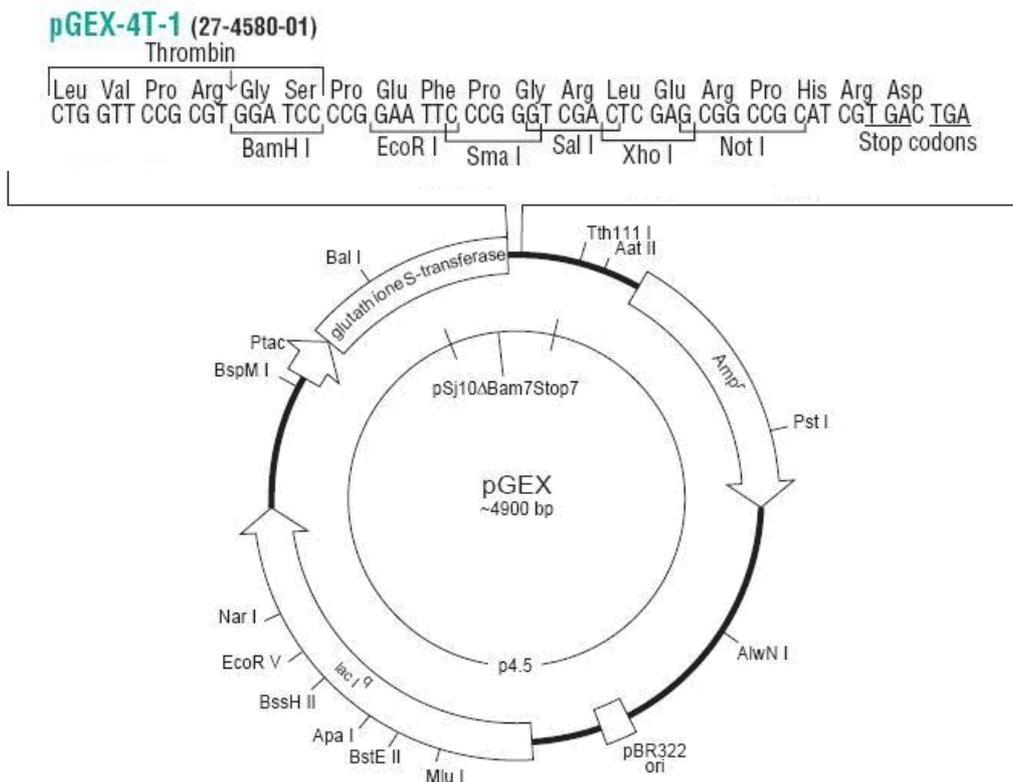


Abbildung 9: Eigenschaften von pGEX-4T-1 (modifiziert aus: www.gelifesciences.com)

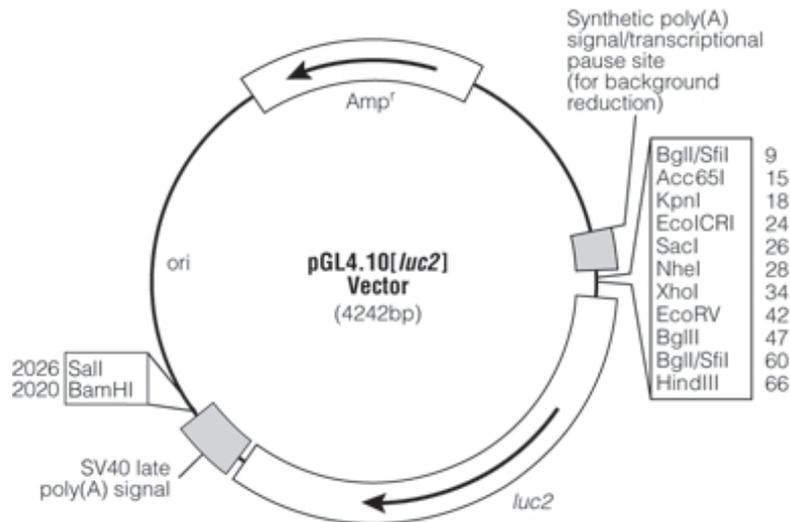


Abbildung 10: Eigenschaften von pGL4.10[luc2] (modifiziert aus: www.promega.com)

Polyadenylierungs- und Terminationssignale des SV-40-Virus und des Rinderwachstumshormons (BGH, *bovine growth hormone*) sorgen in pcDNA3.1 / V5-His-TOPO und pTK-HSV für die Anheftung eines für die Translation essentiellen poly-A-Schwanzes an das 3'-Ende der mRNA. pGL4.10[luc2] beinhaltet ein Polyadenylierungs- und Terminationssignal des SV-40-Virus. pTK-HSV und pGEX-4T-1 sind so konstruiert, dass bei der Ligation eines Inserts in die MCS automatisch ein Fusionskonstrukt mit einem weiteren *open reading frame* (ORF) entsteht. Auf Proteinebene entsteht bei pGEX-4T-1 eine N-terminale Fusion mit der Glutathion-S-Transferase (*GST-tag*). Bei pTK-HSV entsteht eine N-terminale Fusion mit dem Glycoprotein D des Herpes Simplex Virus (*HSV-tag*).

3.2.2.3 Amplifikation der zu klonierenden Produkte

Die cDNA Fragmente, die zur Herstellung der Konstrukte Nr. 1 und 3-5 benötigt wurden, mussten zunächst mittels PCR amplifiziert werden. Als *template* dienten dazu zum einen die käuflich erworbenen Vektoren pSREBP-1a und pTK-HSV-BP2, sowie später die pcDNA3.1 / V5-His-TOPO Konstrukte selbst, die das gewünschte cDNA Fragment besitzen. Als *template* für alle pTK-HSV und pGEX-4T-1 Konstrukte (Nr. 8-15) dienten die wildtypischen und mutanten pcDNA3.1 / V5-His-TOPO Konstrukte mit gewünschtem Insert. Als *template* für die Konstrukte Nr. 16 und 17 diente die genomische DNA eines Patienten der LIANCO Studie, der heterozygoter Träger der *LDLR* Mutation -188C>T war. Sowohl die F- als auch die R-Primer hatten an ihren 5'Enden Überhänge, welche die jeweiligen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen im Laufe der PCR-Reaktion generierten. Des Weiteren wurden die an *SREBP1* und *SREBP2* fusionierten C-terminalen

FLAG-tags bei den Konstrukten Nr. 1-10, sowie die N-terminalen HSV-tags bei den Konstrukten Nr. 1-3 und 5 mit einem Primerüberhang entsprechend deren cDNAs generiert. Alle verwendeten Primer und die entsprechenden PCR-Bedingungen sind dem Anhang (siehe Tab. 65) zu entnehmen.

3.2.2.4 Kolonie PCR

Nach der Klonierung und Transformation des jeweiligen Plasmids in chemisch kompetente Bakterienzellen, wurden auf Selektionsplatten angewachsene Kolonien auf die erfolgreiche Aufnahme des gewünschten Konstrukts getestet. Eine Methode für eine solche Verifizierung ist die Kolonie-PCR. Als *template* wird dabei nicht DNA, sondern ein Bakterienklon (eine Kolonie) eingesetzt. Zur Lyse der Bakterien wurde eine einzelne Kolonie mit Hilfe einer Impföse von einer Agarplatte entnommen und in 15 µl dH₂O gelöst. Durch den osmotischen Schock platzt ein Großteil der Bakterien. 5 µl dieser Suspension wurden als *template* in einer Standard-PCR (siehe 3.2.1.3) eingesetzt. Für die Amplifikation wurden Primer benutzt, die im jeweiligen Vektor die MCS flankieren. Anhand der Produktgröße konnte einerseits eine Aussage darüber gemacht werden, ob das gewünschte Fragment in den Vektor aufgenommen wurde, und andererseits, ob eine Mehrfachinsertion vorlag. Die Klonierung war nicht erfolgreich, wenn kein PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte. Da die Sequenzen von *full-length SREBP1* und *SREBP2* eine Länge von nahezu 3,5 Kb aufweisen, wurde der Einsatz von zwei Vektorprimern bei den *full-length* Konstrukten vermieden. Die verwendeten Primer setzten sich entweder aus einem im Vektor und einem in der Insertsequenz liegenden Primer oder aus zwei Primern, die im Insert binden zusammen. Die Sequenzen der Primer sind den Tabellen 66 bis 68 im Anhang zu entnehmen. Bei der PCR wurden grundsätzlich 30 Zyklen bei einer Hybridisierungstemperatur von 55°C durchgeführt. Zur Kontrolle wurden 5 µl des PCR-Produktes auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.2.1.4). Die restliche Bakteriensuspension wurde im Falle eines positiven Klons zum Animpfen der Kultur für die Plasmidpräparation (siehe 3.2.3.4) benutzt.

3.2.2.5 Megaprime-PCR zur zielgerichteten Mutagenese

Die *Megaprime*-PCR erlaubt die direkte Fusion zweier DNA-Abschnitte im PCR-Verfahren. Zunächst wurden die zu fusionierenden DNA-Fragmente in getrennten PCRs so amplifiziert, dass ein komplementärer Sequenzabschnitt im 3'-Bereich des 5'-Fragmentes zum 5'-Bereich des 3'-Fragmentes entsteht. Anschließend wurden die PCR-Produkte aufgereinigt (siehe 3.2.1.5) und in einer zweiten PCR gemeinsam mit dem 5'-Primer des 5'-Fragmentes und dem

3'-Primer des 3'-Fragmentes eingesetzt. Das entstehende PCR-Produkt umfasste die fusionierten DNA-Fragmente.

Die *Megaprime*-PCR wurde verwendet, um zielgerichtet eine bestimmte Mutation an einer definierten Stelle in der wildtypischen cDNA-Sequenz einzuführen. Bei den ersten getrennten PCRs wurde jeweils ein mutagener Primer verwendet. Dieser bindet im 3'-Bereich des 5'-Fragmentes und im 5'-Bereich des 3'-Fragmentes. Beide mutagenen Primer waren komplementär zueinander. Bei der Primerwahl wurde berücksichtigt, dass die Mutation jeweils in der Mitte der Primer lag und die Primer darüber hinaus beiderseits der mutierten Stelle mindestens 15 zur Zielsequenz komplementäre Basen aufwiesen, um die Bindung trotz einer abweichenden Base zu gewährleisten. Sowohl der 5'-Primer des 5'-Fragmentes, als auch der 3'-Primer des 3'-Fragmentes hatten an ihren 5'-Enden Überhänge, welche Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen im Laufe der PCR-Reaktion generierten. Das entstehende PCR-Produkt enthielt die gewünschte Mutation, wurde aufgereinigt (siehe 3.2.2.6), in pcDNA2.1-TOPO zwischenkloniert (siehe 3.2.2.9), mit Restriktionsendonukleasen verdaut (siehe 3.2.2.7) und letztendlich in den gewünschten Vektor kloniert, aus dem zuvor das entsprechende wildtypische Fragment des Inserts mit Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten wurde. Die verwendeten Primer und die PCR-Bedingungen sind dem Anhang zu entnehmen (siehe Tab. 69).

3.2.2.6 Säulenaufreinigung von PCR-Produkten

Mit der Pfu DNA Polymerase amplifizierte PCR Fragmente mussten vor der Ligation mit Taq DNA Polymerase und dATPs behandelt werden, um 3'-A-Überhänge zu generieren (siehe 3.2.2.9). Dafür wurden die PCR-Fragmente zuvor über das QIAquick PCR Purification Kit von *Qiagen* aufgereinigt. Pufferzusammensetzungen und das Protokoll sind den Herstellerangaben zu entnehmen.

3.2.2.7 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs, welche die DNA durch Spaltung innerer Phosphodiester-Bindungen abbauen. *In vivo* dienen sie dem Schutz des Bakteriums vor artfremder DNA. Sie erkennen und spalten die nicht-methylierte Fremd-DNA, die ins bakterielle Genom eingeschleust wurde. Die eigene DNA wird aufgrund von Bakterienstamm-spezifischen Methylierungsmustern nicht geschnitten. Die Erkennung läuft meist über palindromische Tetra- bis Oktamere ab und führt dann zu einer Spaltung des DNA-Strangs innerhalb der Erkennungssequenz oder in unmittelbarer Nähe. Dabei kann die

DNA glatt (*blunt ends*) oder mit Nukleotidüberhängen (*sticky ends*) geschnitten werden. Letztere sind dabei für die Klonierung von größerer Bedeutung.

Neben der Kolonie-PCR (siehe 3.2.2.4) ist der Restriktionsverdau eine weitere Möglichkeit um positive Klone zu testen. Nach einer Plasmidpräparation (siehe 3.2.3.4 und 3.2.3.5) wurden jeweils 2 µg DNA der Konstrukte mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Nach erfolgreicher Ligation des Inserts in den Vektor und anschließendem Restriktionsverdau wurden auf einem Agarosegel die geschnittenen DNA-Fragmente analysiert. Im Fall eines Nichteinbaus des Inserts lag der Vektor nur linearisiert vor. Außerdem kamen bei der Umklonierung der zunächst in den Vektor pCR2.1-TOPO klonierten Fragmente in die Vektoren pcDNA3.1 / V5-His-TOPO, pTK-HSV, pGEX-4T-1 und pGL4.10[*luc2*] verschiedene Restriktionsenzyme zum Einsatz. In der folgenden Tabelle sind die eingesetzten Enzyme für den jeweiligen Klonierungsprozess zusammengestellt.

Tabelle 15: Übersicht über die verwendeten Restriktionsendonukleasen für die Klonierungen

Konstrukt Nr.	Vektor	Restriktionsendonukleasen
2	pcDNA3.1 / V5-His-TOPO	NheI, Eco81I
6	pcDNA3.1 / V5-His-TOPO	Eco81I, SanDI
7	pcDNA3.1 / V5-His-TOPO	Exo81I, Eco72I
5	pcDNA3.1 / V5-His-TOPO	NotI, XbaI
8-10	pTK-Hsv	ClaI, XbaI
11-15	pGEX-4T-1	Sall, NotI
16, 17	pGL4.10[<i>luc2</i>]	XhoI, HindIII

Alle Restriktionen wurden im Doppelverdau nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Tabelle 16: Standardansatz für eine Restriktion mit zwei Enzymen

Vektor (2-5 µg)	x µl
Enzym 1 [10 U/µl]	1 µl
Enzym 2 [10 U/µl]	1 µl
10 x Puffer	2 µl (1 x), 4 µl (2 x)
dH ₂ O	ad 20 µl

Alle Enzyme haben ihr Aktivitätsoptimum bei 37°C. Die Inkubation erfolgte beim Temperaturoptimum der Enzyme für mindestens 1 h. Im Anschluss wurden die Produkte aufgereinigt (siehe 3.2.2.8).

3.2.2.8 Aufreinigung von Restriktionsverdau-Produkten

Um ein PCR-Fragment über Restriktionsschnittstellen in einen Vektor zu klonieren müssen die verdauten Fragmente / Vektoren aufgereinigt werden. Nach dem Restriktionsverdau wurde das gesamte Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt

und auf einem Transilluminator (Wellenlänge 312 nm) mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung des Produktes erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von *Qiagen*. Die Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen sowie das Protokoll sind der Beschreibung des Herstellers zu entnehmen. Zur Kontrolle wurden 5 µl des aufgereinigten Produktes auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.2.1.4).

3.2.2.9 TOPO TA Klonierung

Die verwendeten TOPO TA Klonierungskits ermöglichen eine direkte Insertion von DNA-Fragmenten mit beliebigen Enden in den pCR2.1-TOPO und pcDNA3.1 / V5-His-TOPO Vektor, so dass eine vorhergehende Generierung von Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen nicht erforderlich ist. Die in den Kits enthaltenen Vektoren liegen linearisiert vor und besitzen einzelne 3'-Thymidin-Überhänge. Diese sind komplementär zu den von fast jeder DNA-Polymerase matrizenunabhängig an das 3'-OH-Ende des PCR-Produktes angehängten Adenine. Beide Enden der linearisierten TOPO-Vektoren tragen kovalent gebundene Typ-I-DNA-Topoisomerasen des Vaccina Virus. Diese verhindern so eine ungewollte Zirkulierung des Vektors und ligieren das PCR-Produkt in den Vektor. PCR-Fragmente, die mit der Pfu DNA Polymerase generiert wurden, die kein 3'-überhängendes A anfügt, mussten vor der Klonierung einer Taq-Nachbehandlung unterzogen werden. Pro 21,5 µl aufgereinigtem PCR-Produkt wurden 0,5 µl Taq DNA Polymerase, 2,5 µl Puffer [10 x], 1,5 µl MgCl₂ und 4 µl dATPs [10 mM] zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 72°C inkubiert. Anschließend wurde nach Herstellerangaben verfahren und der TOPO-Reaktionsansatz in DH5α- oder TOP 10-Bakterien transformiert.

3.2.2.10 Klonierung über Restriktionsenzym-Schnittstellen

Für die Ligation wurden die zirkulären Vektoren pcDNA3.1 / V5-His-TOPO, pTK-HSV, pGEX-4T-1 und pGL4.10[*luc2*] mit den zwei entsprechenden Restriktionsenzymen (siehe Tab. 15) verdaut und dadurch linearisiert. Die zu klonierenden Fragmente, welche sich im pCR2.1-TOPO Vektor befanden, wurden jeweils mit den gleichen Enzymen verdaut, so dass komplementäre Überhänge entstanden (*sticky ends*). Während der Ligationsreaktion wurden diese Überhänge durch das Enzym Ligase miteinander verbunden, so dass wieder ein zirkulärer Vektor entstand. Um eine Religation der Vektoren zu vermeiden und um den Einbau von Fremd-DNA in den Vektor zu fördern, wurden die Vektoren mit dem Enzym Alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Dazu wurde das gesamte Eluat eines Vektors aus

der vorangegangenen Aufreinigung (siehe 3.2.2.8) mit 1 μl des Enzyms (CIAP) und 3,5 μl Puffer versetzt und bei 37°C für 45 min inkubiert. Die alkalische Phosphatase wurde im Anschluss für 15 min bei 85°C inaktiviert. Das eingesetzte Mengenverhältnis von Insert zu Vektor bei der Ligation betrug 3:1. Um das Verhältnis zu bestimmen, wurden nach dem Verdau und der Aufreinigung gleiche Mengen des Vektors und Inserts auf ein Agarosegel aufgetragen und die Banden hinsichtlich ihrer Intensität, unter Berücksichtigung der jeweiligen Größe, miteinander verglichen. Die Ligationsreaktion erfolgte für mindestens eine Stunde bei 21°C.

Tabelle 17: Standardansatz für Ligationsreaktionen

Vektor, verdaut	x μl
Insert, verdaut	y μl
10 x DNA Ligasepuffer	2 μl
T4 DNA Ligase [5 U/ μl]	1 μl
dH ₂ O	ad 20 μl

3.2.3 Mikrobiologische Methoden

3.2.3.1 Transformation

Die Transformation bezeichnet die natürliche Aufnahme von Fremd-DNA aus der Umgebung in die Bakterienzelle durch deren Zellwand. In der Mikrobiologie wird dieses Prinzip genutzt, um z.B. künstlich hergestellte Vektoren in chemisch- oder elektrokompente Bakterienzellen einzuschleusen und diese *in vivo* vervielfältigen zu lassen.

25 μl chemischkompetente Bakterien wurden mit der zu transformierenden DNA versetzt (2 μl TOPO-Reaktionsansatz, 4 μl Ligationsansatz) und für 30 min auf Eis inkubiert (Anlagerung der Plasmid-DNA an die Zellwand). Es folgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42°C im Wasserbad, wodurch die Zellmembran vorübergehend permeabilisiert und das Plasmid in die Zelle aufgenommen wurde. Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis gestellt, dann mit 400 μl angewärmten LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator bei 200 rpm inkubiert. Zum Schluss wurden die Bakterien auf Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert, so dass einzelne resistente Klone wachsen konnten.

3.2.3.2 Ausplattieren von Bakterienzellen

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde LB-Agar aufgeköcht, auf Handwärme abgekühlt und mit dem Antibiotikum Ampicillin (Endkonzentration 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt. Pro Petrischale wurden ca. 25 ml LB-Agar benötigt. Zum Ausplattieren wurden 50-400 μl

Bakteriensuspension (aus Transformation oder Kultur) mit Hilfe eines sterilen Glasspatels auf einer vorgewärmten Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das in den Agarplatten enthaltene Ampicillin diente der Selektion der Bakterien, da nur solche Bakterien überleben, die erfolgreich den Vektor aufgenommen haben. Alle verwendeten Vektoren tragen das Ampicillin-Resistenzgen, welches die Bakterien natürlicherweise nicht besitzen.

3.2.3.3 Bakterienkulturen

Zum Kultivieren von Bakterien wurden 3 ml LB-Medium mit dem Antibiotikum Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) versetzt, mit einer Einzelkolonie oder Bakteriensuspension angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm in 10 ml Bakterienröhrchen inkubiert. Um größere Mengen an Bakterienkultur zu erhalten, wurden 200 oder 250 ml LB-Medium mit 1 ml einer 3 ml Kultur angeimpft.

3.2.3.4 Mini-Plasmidpräparation

Die Präparation der Plasmide im kleinen Maßstab erfolgte mit Hilfe des Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit von *Zymo Research*. Es wurden 2 ml Bakterienkultur verwendet. Die Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen sowie das Protokoll sind der Beschreibung des Herstellers zu entnehmen. Die Konzentration der aufgereinigten Plasmide wurde photometrisch bestimmt (siehe 3.2.1.2). Die anschließend durchgeführte Sequenzierung (siehe 3.2.1.6) diente zur Verifizierung der richtigen Insertsequenz. Es wurden 500 ng Plasmid-DNA bei der Sequenzierung eingesetzt.

3.2.3.5 Midi-Plasmidpräparation

Für die Präparation der Plasmide im mittleren Maßstab wurde das Plasmid Midi Kit von *Qiagen* verwendet. Es wurden 200 ml Bakterienkultur eingesetzt. Die Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen sowie das Protokoll sind der Beschreibung des Herstellers zu entnehmen. Die Konzentrationsbestimmung wurde photometrisch durchgeführt (siehe 3.2.1.2). Bei der anschließend durchgeführten Sequenzierung (siehe 3.2.1.6) wurden 500 ng Plasmid-DNA eingesetzt. 800 µl verbliebene Bakterienkultur wurde mit 200 µl 5 x Bakterieneinfriermedium versetzt, in ein Einfrierröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Zur späteren Verwendung wurden alle Kulturen bei -80°C gelagert.

3.2.4 Zellbiologische Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden HEK-293-Zellen verwendet. HEK steht für „*human embryonic kidney*“. Diese menschliche embryonale Nierenzelllinie ist eine seit Ende der 1970er Jahre bestehende humane Zelllinie, die als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 geschaffen wurde. Alle Arbeiten mit diesen Zellen erfolgten zur Vermeidung von Kontaminationen unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank. Alle benutzten Materialien waren entweder zum Einmalgebrauch vorgesehen oder wurden zuvor autoklaviert. Außerdem wurden dem Zellkulturmedium die Antibiotika Penicillin und Streptomycin, die dem Schutz vor Kontamination mit Bakterien dienen, sowie das pilzhemmende Amphotericin B zugesetzt. Die Nährstoffgrundlage der eukaryotischen Zellen bildete fetales Kälberserum, welches die erforderlichen Wachstumsfaktoren enthält. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im CO₂-Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und unter Wasserdampfsättigung.

3.2.4.1 Auftauen der HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden in speziellen Einfrierröhrchen bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum schonenden Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen für kurze Zeit in 37°C warmem Wasser geschwenkt bis die Zellsuspension nahezu aufgetaut war und dann mit einer kleinen Menge Kulturmedium versetzt. Der gesamte Inhalt wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 5 ml Kulturmedium gemischt und für 10 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das Zellpellet in 8 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine 10 cm Gewebekulturplatte gegeben und gleichmäßig verteilt. Anschließend wurde die Platte im Brutschrank gelagert, so dass sich die Zellen nach kurzer Zeit absetzen und auf dem Boden der Gewebekulturplatte adhärent wachsen konnten. Ein Mediumswechsel erfolgte, wenn ein Farbumschlag von rot nach orange / gelb (Nährstoffverbrauch) stattfand.

3.2.4.2 Kultivierung von HEK-293-Zellen

Die Dichte der Zellen wurde unter einem Lichtmikroskop überprüft. Da HEK-293-Zellen über keinerlei laterale Kontaktinhibition verfügen, wachsen sie bei dichtem Wachstum auch übereinander. Aus diesem Grund müssen die Zellen bei einer Konfluenz von 70-90 % gesplittet, d.h. auf mehrere Gewebekulturplatten verteilt werden. Hierfür wurde zunächst das

alte Medium abgesaugt und verworfen. Der Zellrasen wurde mit 5 ml 1 x PBS ohne die zweiwertigen Ionen Calcium und Magnesium gewaschen. Dies diente einerseits dem Entfernen von Zelltrümmern und toten Zellen aus der Kultur, andererseits auch der Abschwächung des Zellkontaktes zur Gewebekulturplatte. Um die Zellen endgültig abzulösen, wurden sie mit 2,5 ml Trypsin-EDTA Lösung versetzt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit löst das Trypsin den Kontakt zur Kulturplatte enzymatisch auf und sorgt für die Vereinzelung der Zellen. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 ml Medium abgestoppt, um Zellschäden durch Proteolyse zu verhindern. Die erhaltene Zellsuspension wurde gleichmäßig auf mehrere Gewebekulturplatten verteilt, jeweils mit Medium auf 8 ml aufgefüllt und in den Brutschrank überführt. Das Aufsplittungsverhältnis lag in der Regel bei 1:4.

3.2.4.3 Einfrieren der HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen können in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert werden. Damit die Zellen bei diesen Temperaturen gelagert werden können, müssen sie gegen Eiskristallbildung geschützt werden, um Membranbeschädigungen zu verhindern. Hierfür wurde ein Einfriermedium aus 90 % FKS und 10 % DMSO hergestellt und steril filtriert. Die Zellen wurden wie unter 3.2.4.2 beschrieben mit 1 x PBS gewaschen und trypsiniert. Die Suspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das verbliebene Pellet in 1 ml Einfriermedium vollständig resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen überführt. Dieses wurde zunächst über Nacht bei -80°C gelagert und anschließend in den Stickstofftank überführt.

3.2.5 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

3.2.5.1 Transiente Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen zellfremder DNA in eukaryotische Zellen. Man unterscheidet zwischen dem zeitlich befristeten Einbau (transient) und dem permanenten Einbau in das Genom (stabile Transfektion). Im Gegensatz zur stabilen Transfektion unterliegt die fremde DNA bei der transienten Transfektion Abbauprozessen. Ziel ist die Expression eines Gens, welches vorher in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert wurde, und die anschließende funktionelle Analyse des entsprechenden Genprodukts. Weit verbreitete Methoden der Transfektion sind die Kopräzipitationsmethode mit Kalziumphosphat, die Elektroporation, die Transduktion mittels Viren und die Lipofektion,

welche im Rahmen dieser Arbeit erfolgte (Felgner et al., 1987). Dabei interagieren Vesikel aus kationischen und neutralen Lipiden (Liposomen) durch ihre positiv geladenen Kopfgruppen mit der polyanionischen DNA und bilden Liposomen-DNA-Komplexe. Deren positive Gesamtladung ermöglicht eine hohe Transfektionseffizienz. Die enge Assoziation der Komplexe mit der negativ geladenen Plasmamembran der Zielzelle führt schließlich zur Aufnahme der DNA durch Endozytose.

Die Lipofektion erfolgte mit den Transfektionsreagenzien LipofectamineTM2000 von *Invitrogen* oder FuGENE HD von *Roche*. Die zu transfizierenden HEK-293-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion ausgesät. Da die Medienkomponenten FKS, Antibiotika und Antimykotika die Transfektionseffizienz negativ beeinflussen, wurde unmittelbar vor der Transfektion das Medium von den Schalen abgesaugt und durch Medium ohne Zusätze ersetzt. Nach 5 h Inkubation wurde die Transfektionsmischung durch frisches Vollmedium ersetzt. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion entweder lysiert und die Proteine isoliert oder die Aktivität des *LDLR* Promotors bzw. des Reportergens wurde mittels *Luciferase Reporter Assay* bestimmt.

Die Vorläufer der SREBP-Proteine sind in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert und interagieren dort über ihre regulatorische Domäne mit der WD-Domäne des SCAP-Proteins. Bei hohen intrazellulären Cholesterinkonzentrationen binden die Proteine INSIG 1 und 2 an die *sterol sensing* Domäne von SCAP und verhindern so die Prozessierung der SREBP-Vorläuferproteine im Golgi-Apparat. Der Signalweg wird inhibiert und es findet keine Transkription der Zielgene statt. Kommt es zu einem intrazellulären Cholesterinmangel, so dissoziieren die INSIG-Proteine von SCAP ab und der SREBP / SCAP-Komplex wandert zum Golgi-Apparat, wo die SREBP-Vorläuferproteine proteolytisch gespalten werden und anschließend in den Zellkern wandern und dort die Transkription der Zielgene aktivieren. Um *in vitro* eine dauerhafte Aktivierung des Signalweges hervorzurufen, wurde bei einigen Experimenten 5 h nach Transfektion das Medium ohne Zusätze anstatt durch ein normales Vollmedium durch ein Vollmedium ohne Lipoproteine ersetzt. Anstatt des vollwertigen fetalen Kälberserums wurde dem Medium ein fetales Kälberserum ohne Lipoproteine zugesetzt. Außerdem enthielt das spezielle Medium Reagenzien, die eine Senkung der Cholesterolkonzentration bewirken. Um nach der Transfektion eine Suppression des Signalweges herbeizuführen (Kontrolle), wurden Cholesterol (Endkonzentration 1 µg/ml) und 25-Hydroxycholesterol (Endkonzentration 10 µg/ml) zu den Zellen gegeben.

Transiente Transfektion mittels Lipofectamine™2000

Zur Transfektion von Plasmid-DNA wurde diese mit Opti-MEM gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Parallel dazu wurde Lipofectamine™2000 mit Opti-MEM in einem separaten Reaktionsgefäß vermischt und ebenfalls für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Gemische in einem Reaktionsgefäß vereint und für 20 min bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde dann langsam tropfenweise zu den Zellen hinzugegeben.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Transfektionsansatzes in Abhängigkeit der Größe der Gewebekulturplatte und somit der Zellmenge. Es wurden unterschiedliche Mengen an Plasmid-DNA, Opti-MEM und Lipofectamine™2000 verwendet.

Gewebe-kulturplatte	Menge Plasmid-DNA	Opti-MEM	Lipofectamine	Opti-MEM	DMEM ohne Zusätze oder Opti-MEM	Endvolumen
12-well	1,505 µg	100 µl	10 µl	130 µl	750 µl	~ 1 ml
10cm Schale	3 µg	500 µl	20 µl	480 µl	7 ml	~ 8 ml
10 cm Schale	5 µg	500 µl	20 µl	480 µl	7 ml	~ 8 ml

Transiente Transfektion mittels FuGENE HD

Im ersten Schritt der Transfektion wurden entsprechende Mengen an Opti-MEM und Plasmid-DNA zusammenpipettiert und gemischt. Nach Zugabe von FuGENE HD inkubierte der Ansatz für 20 min bei RT und wurde dann tropfenweise auf die Zellen gegeben.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Transfektionsansatzes in Abhängigkeit der Größe der Gewebekulturplatte und somit der Zellmenge. Es wurden unterschiedliche Mengen an Plasmid-DNA, Opti-MEM und Lipofectamine™2000 verwendet.

Gewebe-kulturplatte	Menge Plasmid-DNA	Opti-MEM	FuGENE HD	DMEM ohne Zusätze oder Opti-MEM	Endvolumen
12-well	1,505 µg	50 µl	1,125 µl	950 µl	~ 1 ml
10cm Schale	3 µg	500 µl	22,5 µl	7,5 ml	~ 8 ml
10 cm Schale	5 µg	500 µl	37,5 µl	7,5 ml	~ 8 ml

3.2.5.2 Isolierung von Proteinen aus HEK-293-Zellen

Die Isolierung der Proteine aus HEK-293-Zellen erfolgte durch Zelllyse. Zunächst wurde das Medium von den Zellen abgenommen und diese dann dreimal mit 5 ml kaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde sorgfältig entfernt und die Zellen mit 500 µl RIPA Puffer versetzt. Nach kurzer Inkubationszeit auf Eis wurde das Lysat mit dem Zellschaber eingengt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (vorgekühlt) überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 12.000 rpm und 4°C, um die Proteine von den Zelltrümmern zu trennen. Der Überstand wurde in neues vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren

Analyse eingefroren. Das Einfrieren erhöht den Lysis-Effekt und erzielt somit eine bessere Zugänglichkeit zu den Proteinen.

3.2.5.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit der Firma *Pierce*. Die Zusammensetzungen der Lösungen sowie das Protokoll sind der Beschreibung des Herstellers zu entnehmen. Der Nachweis beruht darauf, dass Proteine mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex bilden, wodurch die zweiwertigen Cu-Ionen zu Cu^{1+} -Ionen reduziert werden (Biuret-Reaktion). Die Reduktion erfolgt durch die Seitenketten von Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan und die Peptidbindung. Die 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (BCA) reagiert mit Cu^{1+} -Ionen, wobei zwei Bicinchoninsäure-Moleküle einen intensiv purpur gefärbten Chelatkomplex mit dem Cu^{1+} -Ion eingehen. Die Intensität der Farbstoffbildung ist unter anderem von der Temperatur abhängig, so dass durch deren Variation die Sensitivität des Tests modifiziert werden kann. Die Absorption dieses Farbkomplexes wurde bei 562 nm photometrisch gemessen. Anhand einer Eichreihe aus Rinderserumalbumin (BSA) bekannter Konzentrationen (20-2000 $\mu\text{g/ml}$) konnte die unbekannte Proteinkonzentration der zu testenden Probe bestimmt werden.

3.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Anders als bei Nukleinsäuren besteht bei Proteinen kein konstantes Verhältnis zwischen Größe und Ladung. Die Nettoladung variiert in Abhängigkeit von der Anzahl an Aminosäuren mit positiven und negativen Seitenketten und wird durch den pH-Wert beeinflusst. Daher werden die Proteine mit dem stark anionischen Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) versetzt, welches sich etwa an jede zweite Aminosäure der Proteine anlagert. Die Proteine werden somit denaturiert und erhalten eine zu ihrem Molekulargewicht proportionale negative Ladung. Die Eigenladung und die dreidimensionale Struktur der Proteine spielt nur eine untergeordnete Rolle für die elektrophoretische Auftrennung. Das Laufverhalten der Proteine im elektrischen Feld ist nahezu unabhängig von ihrer Eigenladung und wird durch ihr Molekulargewicht bestimmt (Laemmli, 1970).

Das Trägermaterial der SDS-PAGE ist das Polyacrylamid (PAA), ein Polymer aus Acrylamid (AA) und Methylen-Bisacrylamid (BIS). Die Porenweite eines Polyacrylamid-Gels hängt von der AA-Konzentration ab. Das Verhältnis zwischen AA und BIS bleibt dabei konstant. Je

höher der prozentuale Anteil an AA innerhalb eines Gels ist, desto engmaschiger ist es. Bei einer diskontinuierlichen Elektrophorese verfügen Polyacrylamid-Gele oftmals über verschiedene Porengrößen, wodurch eine scharfe Auftrennung der Proteine erreicht werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem NuPAGE Elektrophorese System von *Invitrogen* gearbeitet. Es wurden sowohl NuPAGE 7 % Tris-Acetat Gele, als auch NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gele verwendet. Während die Tris-Acetat Gele besonders für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in einer Größenordnung von 80-160 kDa geeignet waren, wurden die Bis-Tris Gele für kleinere Proteine verwendet. Die Bis-Tris Gele besitzen einen Gradienten an AA. Mit einem AA-Anteil von 4 % im oberen Gelbereich sind die Poren relativ groß, während die Porengröße mit der kontinuierlichen Zunahme des AA-Anteils bis auf 12 % abnimmt. Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch Zugabe von NuPAGE Sample Reducing Agent, welches eine Reduzierung der Disulfidbrücken verursacht.

65 µl Proteinlysate wurden mit 25 µl NuPAGE LDS Sample Buffer und 10 µl Reducing Agent versetzt, für 5 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die aufgetragene Proteinmenge betrug je nach Experiment und Fragestellung zwischen 20 und 80 µg. Zur Größenbestimmung wurden 12 µl eines Protein-Standards in eine Geltasche gefüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 150 V für 90 min in der XCell SureLock Elektrophoresis Cell. Die Zusammensetzung der Komponenten sowie das Protokoll sind den Angaben des Herstellers zu entnehmen.

3.2.5.5 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung ist ein Verfahren zur Visualisierung von Proteinen nach einer Polyacrylamidgelelektrophorese. Die Färbung des Gels erfolgte durch eine 30minütige Inkubation in einer Methanol / Essigsäurelösung, der der Triphenylmethan-Textilfarbstoff Coomassie Brilliant Blue R-250 zugesetzt wurde. Der anionische Farbstoff bindet an kationische und an unpolare hydrophobe Seitenketten der Proteine und färbt diese somit unspezifisch an. Um den nichtgebundenen Farbstoff aus dem Gel auszuwaschen, wurde das Gel in eine Methanol / Essigsäurelösung überführt, die keinen Farbstoff enthält. Die Gele wurden mit Hilfe eines Dokumentationsgerätes fotografiert. Mit diesem Färbeverfahren können Proteinmengen bis zu 100 ng pro Proteinbande nachgewiesen werden.

3.2.5.6 Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran. Durch eine angelegte Spannung wanderten die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran. Es wurde das NuPAGE Elektrophorese System von *Invitrogen* verwendet. Vor dem Proteintransfer wurde die auf die Größe des Gels zugeschnittene Membran, die benötigten Schwämmchen und das Filterpapier für 20 min in 1 x NuPAGE Transferpuffer equilibriert. Anschließend wurde die Membran auf das SDS-Gel aufgelegt und von Filterpapieren und Schwämmchen umgeben so in das XCell Blot Modul eingesetzt, dass die Proteine sich in Richtung Anode bewegen und auf der Membran haften bleiben konnten. Das innere der Blotkammer wurde mit 1 x NuPAGE Transferpuffer gefüllt und die äußere Kammer mit H₂O zur Kühlung der Elektrophorese. Der Transfer erfolgte für 2,5 h bei 30 V und RT.

3.2.5.7 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Der immunologische Nachweis der Proteine auf der Membran erfolgte mit Hilfe von Antikörpern. Der primäre Antikörper erkennt spezifisch das Zielprotein, indem er an das für den Antikörper spezifische Epitop bindet. Dieses kann entweder genspezifisch oder spezifisch für einen Protein-*tag* (HSV oder FLAG) sein. Gegen den primären Antikörper einer Art ist ein sekundärer Antikörper gerichtet, der mit einem chemilumineszenten Enzym gekoppelt ist. Über eine Chemilumineszenzreaktion kann dann die spezifische Interaktion des primären Antikörpers autoradiographisch sichtbar gemacht werden.

Die proteinbeladene Membran wurde zur vollständigen Absättigung von unspezifischen Bindestellen für 1 h in einer TBST-Lösung mit einem Milchpulver-Anteil von 5 % bei RT geschwenkt. Anschließend wurde die Membran in ein Falcon überführt und mit 10 ml TBST-Lösung versetzt, die den primären Antikörper in der entsprechenden vom Hersteller angegebenen Verdünnung enthielt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Rotator. Am nächsten Tag wurde nicht-gebundener Antikörper durch viermaliges Waschen für jeweils 15 min in TBST-Lösung entfernt. Der sekundäre Antikörper wurde in 30 ml TBST-Lösung verdünnt und die Membran für 1 h bei RT mit dem Antikörper auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran erneut 4 x 15 min bei RT mit TBST-Lösung gewaschen und danach mit der Chemilumineszenz-Lösung versetzt.

Verwendet wurde das SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate der Firma *Pierce*. Die verwendeten sekundären Antikörper waren an Meerrettich-Peroxidase (*horseradish*

peroxidase, HRP) gekoppelt. Dieses Enzym ist in der Lage, das in der Chemilumineszenz-Lösung enthaltene Luminol durch Spaltung von Wasserstoffperoxid zu oxidieren. Die freiwerdende Energie wird in Form von Licht mit einer Wellenlänge von 400-700 nm abgegeben. Die Fluoreszenzsignale wurden mittels Filmbelichtung gemessen. Zum Entwickeln der Filme wurde die überschüssige Chemilumineszenz-Lösung nach 5 min abgegossen und die Membran in eine Filmkassette unter eine eingeklebte, durchsichtige Plastikfolie gelegt. In der Dunkelkammer wurde der lichtempfindliche Film aufgelegt und abhängig von der Fluoreszenzintensität belichtet. Die Filme wurden anschließend sofort in die Entwicklermaschine eingeführt und automatisch entwickelt. Je stärker die Oxidation, desto intensiver war das Signal auf dem entwickelten Film. Mit dem Geldokumentationssystem Chemidoc XRS der Firma *Biorad* wurde ein digitales Durchlichtbild der Autoradiographie erstellt.

Wenn dieselbe Nitrozellulose-Membran nacheinander mit zwei verschiedenen primären und sekundären Antikörpern unterschiedlicher Spezies inkubiert wurde, musste die Peroxidase vor der zweiten Inkubation mittels 10 %iger Natriumazid-Lösung (in dH₂O) inaktiviert werden um Überlagerungen der jeweiligen Detektionen auszuschließen. Zur Inaktivierung wurden 500 µl Natriumazid (10 %) mit 20 ml TBST zur Membran gegeben und für 2-3 h geschüttelt. Aufgrund der unterschiedlichen Spezies sind eine Kreuzreaktion der sekundären Antikörper mit den noch vorhandenen anderen primären Antikörpern, sowie eine Chemilumineszenzreaktion der bereits inaktivierten sekundären Antikörper ausgeschlossen. Im Falle der Inkubation zweier Antikörper der gleichen Spezies wurden die Antikörper vor der zweiten Inkubation von der Membran entfernt („stripping“). Hierzu wurde der Restore Fluorescent Western Blot Stripping Buffer von *Thermo Scientific* verwendet. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

Tabelle 20: Übersicht über die Eigenschaften und Verwendung der Antikörper

primärer Antikörper	Konzentration	Verdünnung	sekundärer Antikörper	Konzentration	Verdünnung
α -HSV- <i>tag</i> , rabbit polyclonal IgG	0,5 µg/µl	1:200	goat anti-rabbit IgG-HRP	0,4 µg/µl	1:10000
α -Luciferase, mouse monoclonal IgG ₁	0,2 µg/µl	1:300	goat anti-mouse IgG-HRP	0,4 µg/µl	1:10000
α -Aktin, mouse monoclonal IgM	0,2 µg/µl	1:300	goat anti-mouse IgM-HRP	0,4 µg/µl	1:10000

3.2.5.8 *Luciferase Reporter Assay*

Zur funktionellen Analyse einer Mutation im *LDLR* Promotor sowie mehrerer Mutationen in SREBP1 und SREBP2, zwei Transkriptionsfaktoren von *LDLR*, die an die SRE-

Bindungsstellen des Promotors binden, wurde ein *Luciferase Reporter Assay* durchgeführt. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Dual-Luciferase Assay System Kit der Firma *Promega* macht sich die *Firefly*- und *Renilla-Luciferase* zu nutze und ermöglicht eine Quantifizierung der Aktivität beider Enzyme in einem Reaktionsansatz. Luciferasen sind Enzyme, in deren Anwesenheit Luciferine mit Sauerstoff zu energiereichen, instabilen Dioxetanen oder Dioxetanonen reagieren (Oxidation). Beim Zerfall dieser Substanzen kommt es zur Biolumineszenz. Die *Firefly-Luciferase* ist ein Enzym des Glühwürmchens *Photinus pyralis*, während es sich bei der *Renilla-Luciferase* um ein Enzym der Seefeder *Renilla reniformis* handelt. Emittiertes Licht kann mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden. Das hier verwendete *Firefly-Luciferase*-Reporter-gen-Konstrukt enthält die Promotorregion des *LDLR*-Gens. Endogen vorhandene Transkriptionsfaktoren in den HEK-293-Zellen sowie die überexprimierten Transkriptionsfaktoren SREBP1 und SREBP2 banden an den Promotor und ermöglichten so die Transkription der *Firefly-Luciferase*. Die Aktivität der Luciferase und somit die transkriptionelle Aktivierung konnte luminometrisch gemessen werden.

Zunächste wurden HEK-293-Zellen in 12-well Platten ausgesät und am nächsten Tag bei einer Konfluenz von 70 % entweder nur mit dem wildtypischen oder mutanten *LDLR*-Promotor-Reporter-gen-Konstrukt und dem Expressionskonstrukt der *Renilla-Luciferase* co-transfiziert oder mit dem wildtypischen *LDLR*-Promotor-Reporter-gen-Konstrukt sowie den Expressionskonstrukten für die wildtypischen oder mutanten Transkriptionsfaktoren SREBP1 oder SREBP2 und der *Renilla-Luciferase* co-transfiziert. Alle Transfektionen wurden im Triplikate durchgeführt. Die Transfektionsansätze sind den folgenden Tabellen 21-23 zu entnehmen.

Funktionelle Analyse der *LDLR*-Promotor-Mutation

Tabelle 21: Transfektionsansatz zur funktionellen Analyse der *LDLR*-Promotor-Mutation

Vektor	A	B	C
pcDNA3.1 <i>lac Z</i>	1,5 µg	0	0
pGL4.7[<i>hRluc</i>]	5 ng	5 ng	5 ng
pGL4.10[luc2]_LDLR_Promotor_WT	0	1,5 µg	0
pGL4.10[luc2]_LDLR_Promotor_-188	0	0	1,5 µg
transfizierte DNA gesamt [µg]	1,505	1,505	1,505

Die Transfektion erfolgte mittels LipofectamineTM2000 wie unter 3.2.5.1 beschrieben. 5 h nach Transfektion wurde das Medium durch normales Vollmedium ersetzt. Das Experiment wurde außerdem unter supprimierenden Bedingungen durch Zugabe von Cholesterol und 25-Hydroxycholesterol zum normalen Vollmedium durchgeführt.

Funktionelle Analyse der SREBP1- und SREBP2-Mutationen**Tabelle 22: Transfektionsansatz zur funktionellen Analyse der SREBP1- und SREBP2-Mutationen unter Verwendung der pcDNA3.1 Konstrukte**

Vektor	A	B	C	D	E	F	G
pcDNA3.1 <i>lac Z</i>	1,5 µg	750 ng	0	0	0	0	0
pGL4.7[<i>hRluc</i>]	5 ng						
pGL4.10[luc2]_LDLR_Promotor_WT	0	750 ng					
pcDNA3.1_HSV-S1_WT-FLAG	0	0	750 ng	0	0	0	0
pcDNA3.1_HSV-S1_812-FLAG	0	0	0	750 ng	0	0	0
pcDNA3.1_HSV-S2_WT-FLAG	0	0	0	0	750 ng	0	0
pcDNA3.1_HSV-S2_645-FLAG	0	0	0	0	0	750 ng	0
pcDNA3.1_HSV-S2_852-FLAG	0	0	0	0	0	0	750 ng
transfizierte DNA gesamt [µg]	1,505	1,505	1,505	1,505	1,505	1,505	1,505

Die Transfektion erfolgte mittels Lipofectamine™2000 wie unter 3.2.5.1 beschrieben. 5 h nach Transfektion wurde das Medium durch normales Vollmedium ersetzt. Der CMV Promotor in den pcDNA3.1 Vektoren führt zu einer sehr starken Überexpression der Proteine in den Zellen, wodurch die SREBP-Proteine unspezifisch proteolytisch gespalten werden und der Signalweg nicht mehr durch Sterole regulierbar ist. Aus diesem Grund wurde das Experiment außerdem für die SREBP2-Proteine mit den pTK-HSV Konstrukten durchgeführt.

Tabelle 23: Transfektionsansatz zur funktionellen Analyse der SREBP2-Mutationen unter Verwendung der pTK-HSV Konstrukte

Vektor	A	B	C	D	E
pcDNA3.1 <i>lac Z</i>	1,5 µg	750 ng	0	0	0
pGL4.7[<i>hRluc</i>]	5 ng				
pGL4.10[luc2]_LDLR_Promotor_WT	0	750 ng	750 ng	750 ng	750 ng
pTK-HSV-S2_WT-FLAG	0	0	750 ng	0	0
pTK-HSV-S2_645-FLAG	0	0	0	750 ng	0
pTK-HSV-S2_852-FLAG	0	0	0	0	750 ng
transfizierte DNA gesamt [µg]	1,505	1,505	1,505	1,505	1,505

Die Transfektion erfolgte mittels FuGENE HD wie unter 3.2.5.1 beschrieben. 5 h nach der Transfektion wurde das Medium durch spezielles Vollmedium ohne Lipoproteine ersetzt. Das Experiment wurde jeweils mit und ohne Zugabe von Cholesterol und 25-Hydroxycholesterol durchgeführt.

Nach etwa 24 h wurden die transfizierten Zellen mit 100 µl des *Passive Lysis*-Puffer aus dem Kit lysiert. Nach 10 min Inkubation auf dem Schüttler wurden die Lysate aliquotiert und jeweils 10 µl für die Messung in 96-well Mikrotiterplatten vorgelegt. Die Messung erfolgte im GloMex® 96 Microplate Luminometer (*Promega*) mit zwei Injektoren. Der erste Injektor wurde mit dem Puffer für die Aktivitätsmessung der *Firefly-Luciferase* (LAR2) befüllt. Der

zweite Injektor hingegen mit dem Stop&Glow Puffer, welcher die Aktivität der *Firefly-Luciferase* abstoppt und die Messung der *Renilla-Luciferase* ermöglicht. Es wurden automatisch 50 µl der Puffer nacheinander durch die Injektoren zugegeben und jeweils die Aktivität der Luciferasen sequentiell gemessen. Zur Bestimmung der relativen Aktivität des *Firefly-Luciferase*-Reporter-gen-Konstruktes wurden jeweils die Messergebnisse dieses Konstruktes mit den Messwerten für die *Renilla-Luciferase* normalisiert, um eventuelle Schwankungen in der Zellzahl und der Transfektionseffizienz zu berücksichtigen. Die Ergebnisse wurden mittels Western Blot Analyse verifiziert.

3.2.5.9 Inhibierung der zellulären Proteindegradierung

In der Zelle gibt es zwei große Abbaumechanismen, über die die meisten Proteine abgebaut und recycelt werden. Dabei handelt es sich zum einen um das Proteasom-Ubiquitin-System und zum anderen um das Lysosom. MG132 ist ein spezifischer Proteasominhibitor, der die Degradierung von Ubiquitin-konjugierten Proteinen reduziert. Um zu analysieren, ob eingebrachte Zielproteine einem proteolytischen Abbau über das Proteasom-Ubiquitin-System unterzogen werden, wurden HEK-293-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transient transfiziert und anschließend für mehrere Stunden mit 10 µM MG132 inkubiert. Die Transfektion erfolgte jeweils in 10 cm Schalen mit 3 µg pcDNA3.1 Konstrukt mittels LipofectamineTM2000 oder mit 5 µg pTK-HSV Konstrukt mittels FuGENE HD. 5 h nach Transfektion wurde das Medium durch normales Vollmedium ersetzt. Nach 9 h Inkubation mit dem Proteasominhibitor wurden die Proteine isoliert (siehe 3.2.5.2) und per Western Blot analysiert (siehe 3.2.5.4 und 3.2.5.6).

3.2.5.10 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Expression von Fusionsproteinen bestehend aus dem Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) und einem Zielprotein erfolgte unter Verwendung des GST Gene Fusion Systems (*Amersham Bioscience*). Die Expression des GST-Fusionsproteins im pGEX-4T-1 Vektor wird über den *tac*-Promotor gesteuert, der über das Lactose-Analogon IPTG (Isopropyl-β-thiogalactopyranosid) induziert wird, so dass eine kontrollierte Expression in Verbindung mit dem *E.coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) möglich ist. Der Vektor verfügt zusätzlich über das *lac I^f* Gen, das für den Repressor des *tac*-Promotors kodiert und somit auch dazu beiträgt, dass kein GST-Fusionsprotein in Abwesenheit von IPTG gebildet wird.

Bei der chemischen Transformation wurden jeweils 50 µl BL21(DE3) Zellen mit 1 µl pGEX-4T-1-Konstrukt (Konzentration 50 ng/µl) versetzt. Für die Expression der GST-Fusionsproteine im großen Maßstab, wurde zunächst eine Einzelkolonie in 3 ml LB-Medium

über Nacht angezogen. 250 ml LB-Medium wurden dann mit 1 ml der frischen Übernachtskultur angeimpft und im Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37°C bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,6-0,8 inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 100 µM IPTG. Nach 3-5 h Expression wurde die Bakteriensuspension für 15 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei -80°C eingefroren, wodurch die Proteinsynthese gestoppt wurde.

Eine Optimierung der Expressionsbedingungen erfolgte zunächst im kleineren Maßstab. Hierzu wurden 50 ml LB-Medium angeimpft und unter Schütteln testweise bei 200 rpm und 37°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6-0,8 kultiviert und anschließend die Proteinexpression durch Zugabe von 100 µM IPTG induziert. Nach Induktion wurde stündlich 1 ml der Kultur abgenommen. Die letzte Abnahme erfolgte nach 6 h. Die Proben wurden für 5 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 10 µl NuPAGE LDS Sample Buffer und 5 µl Reducing Agent versetzt, für 10 min bei 95°C aufgekocht und anschließend auf ein Bis-Tris Gel aufgetragen (siehe 3.2.5.4). Der Nachweis der exprimierten Proteine erfolgte mittels Coomassie-Färbung (siehe 3.2.5.5). Die folgende Tabelle gibt die Expressionsparameter für die einzelnen pGEX-4T-1 Konstrukte wieder.

Tabelle 24: Expressionsbedingungen

Konstrukt	Expressionstemperatur	Expressionsdauer
pGEX-4T-1	37°C	5
pGEX-4T-1_S1_WT_COOH	37°C	3
pGEX-4T-1_S1_812_COOH	37°C	3
pGEX-4T-1_S2_WT_COOH	37°C	4
pGEX-4T-1_S2_645_COOH	37°C	4
pGEX-4T-1_S2_852_COOH	37°C	4

Im Anschluss an eine Lagerung bei -80°C wurde das Pellet auf Eis aufgetaut und in 10 ml eisgekühltem Bakterien-Lysepuffer resuspendiert und einer Ultraschalllyse unterzogen. Dazu wurde eine Ultraschallsonde in die Zellsuspension getaucht, welche dann für 4x30 s beschallt wurde. Die Zellsuspension wurde währenddessen in Eiswasser gekühlt. Nach der Zugabe von 1 ml einer 10 % Triton X 100 Lösung wurde das Lysat erst 30 min auf Eis inkubiert und dann durch Zentrifugation bei 4°C und 6000 rpm für 1 h geklärt. Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine aus dem Überstand erfolgte durch die Zugabe von 0,5 ml equilibrierter Glutathion-Agarose und Inkubation über Nacht bei 4°C auf dem Rotator. Im Anschluss wurden durch Zentrifugation für 40 s bei 13000 rpm und 4°C die Komplexe aus GST-Fusionsproteinen und Glutathion-Agarose am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurden die Komplexe in 1 ml PBS resuspendiert und

gewaschen. Zentrifugations- und Waschschrte wurden insgesamt dreimal wiederholt. Zuletzt wurden die Komplexe in 0,5 ml PBS aufgenommen.

3.2.5.11 Affinitätspräzipitation mit GST-Fusionsproteinen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung von wildtypischen und mutanten SREBP1 und SREBP2 GST-Fusionsproteinen an das Protein SCAP untersucht. Hierzu wurden zunächst HEK-293-Zellen transient mit 5 µg des Konstruktes pTK-HSV-SCAP-T7 transfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels FuGENE HD wie unter 3.2.5.1 beschrieben. 5 h nach der Transfektion wurde das Medium durch normales Vollmedium ersetzt. Die Isolierung der Proteine erfolgte durch Zellyse mittels RIPA Puffer (siehe 3.2.5.2). 200 µg des Lysates wurden mit jeweils 50 µl der Komplexe aus wildtypischen oder mutanten GST-Fusionsproteinen und Glutathion-Agarose versetzt und über Nacht bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Nachfolgend wurde die Agarose-Matrix dreimal mit 500 µl RIPA Puffer gewaschen und zum Schluss mit 12,5 µl NuPAGE LDS Sample Buffer und 5 µl Reducing Agent versetzt, für 5 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend auf ein Bis-Tris Gel aufgetragen und mittels Western Blot analysiert (siehe 3.2.5.4 und 3.2.5.6).

4 Ergebnisse

4.1 Mutationsanalysen bei Patienten der LIANCO Studie

Für die Analysen stand genomische DNA von 200 deutschen Patienten (HC1-200) der LIANCO Studie zur Verfügung, bei denen eine Hypercholesterinämie diagnostiziert wurde. Bei allen 200 Patienten lag der Gesamtcholesterinspiegel zum Zeitpunkt der Rekrutierung zwischen 200-600 mg/dl. Der familiäre Hintergrund für die Erkrankung war nicht bei allen Patienten bekannt. Zur Bestimmung des Mutationsspektrums in den bekannten FH-Genen wurden in der LIANCO Kohorte molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt.

4.1.1 Identifizierung von Mutationen in den bekannten FH-Genen

Die bekannten FH-Gene *LDLR*, *APOB* und *PCSK9* sowie die putative Promotorregion von *LDLR* wurden bei Patienten der LIANCO Studie auf Mutationen untersucht. Bei *APOB* wurden allerdings nicht alle 29 Exons untersucht, sondern nur eine relevante Region in Exon 26, welche für die LDLR-Bindungsdomäne kodiert. Die Mutationsanalyse umfasste die Amplifikation der Exons und der Promotorregion, die anschließende Aufreinigung und Sequenzierung der Produkte. Außerdem wurde mit Hilfe der MLPA-Methode untersucht, ob krankheitsverursachende größere Deletionen oder Duplikationen in *LDLR* vorliegen. Zu Beginn der Untersuchungen stellte sich heraus, dass für die Mutationsanalysen 8 der 200 genomischen DNAs aufgrund zu niedriger Konzentration und schlechter Qualität nicht verwendet werden konnten.

In folgender Tabelle ist das Ergebnis der Mutationsanalyse dargestellt.

Tabelle 25: Übersicht über die Anzahl getesteter Patienten und identifizierter Mutationen

Gen	Anzahl getesteter HC Patienten	Patienten mit Mutation	
		absolut	[%]
<i>LDLR</i>	192	39	20,31
<i>APOB</i>	153	1	0,65
<i>PCSK9</i>	48	0	0

Bei 39 von 192 untersuchten Patienten (20 %) konnte in den getesteten kodierenden und nicht-kodierenden Bereichen des *LDLR*-Gens eine kausale heterozygote Mutation gefunden werden. Im Anschluss wurde bei allen Patienten ohne Mutation in *LDLR* das Gen *APOB* auf Mutationen untersucht. Hier wurde nur bei einem Patienten eine kausale heterozygote Mutation identifiziert. Um zu testen, ob Mutationen in *PCSK9* häufig die molekulare Ursache

der Hypercholesterinämie in der Kohorte sind, wurde initial bei 48 Patienten eine Mutationsanalyse in diesem Gen durchgeführt. Da eine *PCSK9*-Mutation als häufiger ursächlicher Faktor ausgeschlossen werden konnte, wurden keine weiteren Patienten getestet.

4.1.2 *LDLR*-Mutationen

Die Mutationsanalyse führte zur Identifizierung von insgesamt 41 heterozygoten Mutationen in *LDLR* in 39 Patienten. Die Patienten HC66 und HC168 trugen jeweils zwei *LDLR*-Mutationen. Einige Patienten waren Träger der gleichen Mutation, so dass insgesamt 30 unterschiedliche Mutationen gefunden wurden (siehe Tab. 28). Etwa die Hälfte der identifizierten Mutationen in *LDLR* waren Missense-Mutationen. Somit handelte es sich hierbei um den am häufigsten vorkommenden Mutationstyp. Die restlichen identifizierten Mutationen deckten ein breites Spektrum an weiteren Mutationstypen ab (siehe Tab. 26).

Tabelle 26: Häufigkeit der identifizierten Mutationstypen in *LDLR*.

Mutationstyp	Gesamtzahl	Anzahl unterschiedliche Mutationen
Promotor-Mutation	1	1
Missense-Mutation	20	14
Nonsense-Mutation	5	5
Spleißmutation	8	5
kleinere Deletionen / Duplikationen	3	2
größere Deletionen / Duplikationen	4	3
Σ	41	30

Der Abbildung 11 ist zu entnehmen, dass in der Promotorregion sowie fast allen kodierenden Bereichen Mutationen gefunden wurden. Durch diese gleichmäßige Verteilung über das ganze Protein war keine Proteindomäne vermehrt betroffen und funktionell eingeschränkt. Die meisten Mutationen (26,83 %) waren im Exon 4 lokalisiert. Dieses Exon kodiert für 14,75 % des Proteins und ist mit 381 Bp auch das größte Exon. In den drei kleinsten Exons (1, 16, 18) wurden keine Mutationen identifiziert.

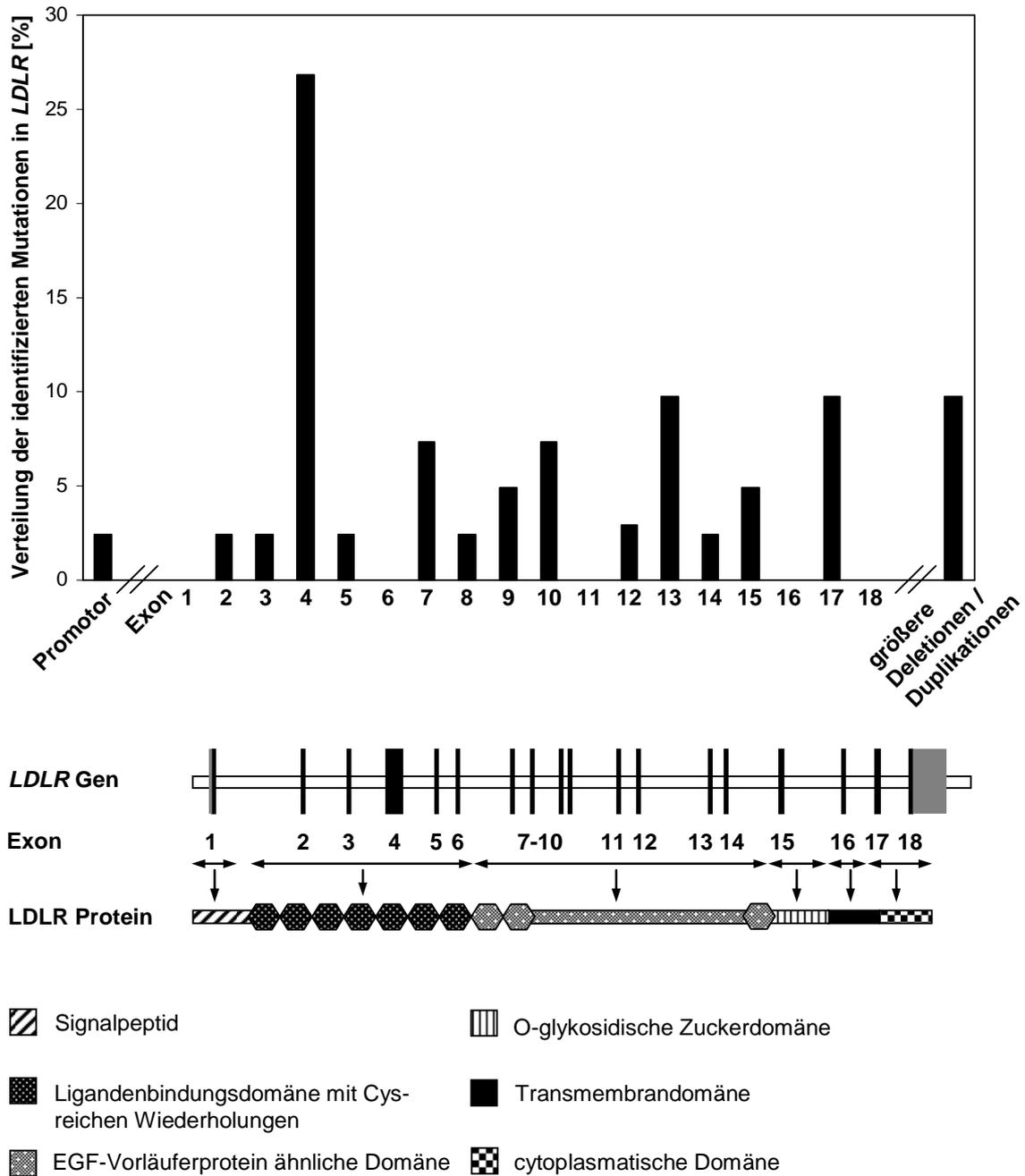


Abbildung 11: Prozentualer Anteil an identifizierten *LDLR*-Mutationen in der Promotorregion, den einzelnen Exons und an größeren Deletionen und Duplikationen sowie graphische Darstellung des *LDLR*-Gens und des *LDLR*-Proteins.

Es konnte festgestellt werden, dass zwischen der Anzahl bzw. dem prozentualen Anteil an identifizierten Mutationen in jedem Exon und der jeweiligen Exongröße eine grobe Korrelation besteht (siehe Tab. 27).

Tabelle 27: Vergleich der Exongröße mit dem prozentualen Anteil an identifizierten Mutationen im jeweiligen Exon.

Exon	Größe Exon [Bp]	Exonanteil am Gesamttranskript [%]	Verteilung der Mutationen [%]
1	67	2,59	0
2	123	4,76	2,44
3	123	4,76	2,44
4	381	14,75	26,83
5	123	4,76	2,44
6	123	4,76	0
7	120	4,65	7,32
8	126	4,88	2,44
9	172	6,66	4,88
10	228	8,83	7,32
11	119	4,61	0
12	140	5,42	2,88
13	142	5,49	9,76
14	153	5,92	2,44
15	171	6,62	4,88
16	78	3,02	0
17	158	6,12	9,76
18	36	1,39	0

Die Tabelle 28 gibt eine Übersicht aller 30 identifizierten *LDLR*-Mutationen in den 39 Patienten. 24 Mutationen wurden zuvor bereits in der Literatur beschrieben. Bei sechs Mutationen handelt es sich um neue, noch nicht beschriebene Mutationen.

Tabelle 28: Übersicht über alle identifizierten Mutationen in *LDLR*

Patient	LIANCO ID	Mutation	Lokalisation	Mutationstyp	beschrieben?	
HC39	4143	-188C>T	Promotor <i>repeat 1</i>	Promotor	ja	
HC28	710	c.G82T	p.E28X	Exon 2	Missense	nein
HC92	897	c.C304T	p.Q102X	Exon 3	Nonsense	ja
HC31	708	c.324_325delinsTC	p.C109R	Exon 4	Missense	ja
HC82	26990	c.324_325delinsTC	p.C109R	Exon 4	Missense	ja
HC108	176	c.324_325delinsTC	p.C109R	Exon 4	Missense	ja
HC142	4456	c.324_325delinsTC	p.C109R	Exon 4	Missense	ja
HC151	27473	c.324_325delinsTC	p.C109R	Exon 4	Missense	ja
HC168	27700	c.324_325delinsTC	p.C109R	Exon 4	Missense	ja
		c.A1874C	p.N625T	Exon 13	Missense	ja
HC192	1494	c.G337T	p.E113X	Exon 4	Nonsense	ja
HC86	16757	c.G397C	p.D133H	Exon 4	Missense	nein
HC110	1363	c.C501A	p.C167X	Exon 4	Nonsense	ja
HC22	625	c.A662G	p.D221G	Exon 4	Missense	ja
HC107	636	c.649+2T>C		Intron 4	Spleiß	ja
HC47	21586	c.T798A	p.D266E	Exon 5	Missense	ja
HC181	5874	c.G1027A	p.G343S	Exon 7	Missense	ja
HC164	21901	c.C1048T	p.R350X	Exon 7	Nonsense	ja
HC63	17471	c.1053_1060dup6	p.D354CfsX8	Exon 7	Duplikation mit <i>frameshift</i>	nein
HC101	2565	c.1061-8T>C		Intron 7	Spleiß	ja
HC156	4194	c.G1329C	p.W443C	Exon 9	Missense	ja
HC182	4237	c.G1329C	p.W443C	Exon 9	Missense	ja
HC27	2932	c.1359-1G>A		Intron 9	Spleiß	ja
HC87	2513	c.1359-1G>A		Intron 9	Spleiß	ja
HC94	1208	c.1359-1G>A		Intron 9	Spleiß	ja
HC122	2368	c.C1720T	p.R574C	Exon 12	Missense	ja
HC106	567	c.G1775A	p.G592E	Exon 12	Missense	ja
HC61	21909	c.1904_1905delCA	p.T653RfsX8	Exon 13	Deletion mit <i>frameshift</i>	nein
HC62	21910	c.1904_1905delCA	p.T653RfsX8	Exon 13	Deletion mit <i>frameshift</i>	nein
HC153	712	c.T1961A	p.V639D	Exon 13	Missense	ja
HC45	19238	c.2140+5G>A		Intron 14	Spleiß	ja
HC169	4323	c.C2177T	p.T726I	Exon 15	Missense	ja
HC66	4759	c.G2231A	p.R744Q	Exon 15	Missense	ja
		c.G2479A	p.V827I	Exon 15	Missense	ja
HC25	6167	c.2390-2A>G		Intron 16	Spleiß	ja
HC90	889	c.2390-2A>G		Intron 16	Spleiß	ja
HC67	23642	c.G2487C	p.Q829H	Exon 17	Missense	nein
HC104	153	EX1del		Exon 1	Deletion	ja
HC33	4780	EX7_10del		Exon 7-10	Deletion	nein
HC145	4781	EX7_10del		Exon 7-10	Deletion	nein
HC89	1353	EX16_18del		Exon 16-18	Deletion	ja

Bei der Mutationsanalyse wurden außerdem annotierte und nicht annotierte heterozygote SNPs identifiziert, deren Kausalität nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Bei dem Patienten HC173 wurde in Exon 4 die heterozygote Nukleotidsubstitution c.C507T gefunden. Dabei handelt es sich um eine stumme Mutation, die zu keinem Aminosäureaustausch führt (p.N169N). Alle anderen SNPs waren in Introns lokalisiert. Mutationen in Introns haben eher keinen direkten Effekt auf die Sequenz des Proteins, das durch das Gen kodiert wird. In

einigen Fällen jedoch betreffen die Mutationen Sequenzen, die für das Spleißen wichtig sind und führen so zu einem falschen Prozessieren der prä-mRNA oder schaffen eine neue Spleißstelle. Eine Analyse mit verschiedenen Spleißvorhersage-Programmen ergab, dass alle identifizierten SNPs mit hoher Wahrscheinlichkeit zu keinem veränderten Spleißen führen.

Tabelle 29: Übersicht über detektierte SNPs

Patient	LIANCO ID	Veränderung	Lokalisation	Referenz SNP ID	verändertes Spleißen
HC173	3849	c.C507T, p.N169N	Exon 4	-	unwahrscheinlich
HC152	5158	c.818-15C>G	Intron 5	rs79433354	unwahrscheinlich
HC1	3044	c.1060+40G>A	Intron 7	-	unwahrscheinlich
HC145	4781	c.1060+103A>G	Intron 7	-	unwahrscheinlich
HC168	27700	c.1061-60C>T	Intron 7	-	unwahrscheinlich
HC64	27477	c.1186+29C>A	Intron 8	-	unwahrscheinlich
HC17	4043	c.2548-54C>T	Intron 17	-	unwahrscheinlich

4.1.2.1 Identifizierung von Mutationen in *LDLR* mit Hilfe von Sequenzierung

27 heterozygote Mutationen in *LDLR* konnten mittels Sequenzierung in 35 Patienten identifiziert werden. Bei fünf der 27 Mutationen handelt es sich um neue, zuvor noch nicht in der Literatur beschriebene Mutationen (siehe Abb. 12). In Exon 2 des Patienten HC28 wurde die Nukleotidsubstitution c.G82T gefunden. Dabei handelt es sich um eine Nonsense-Mutation, da das für die Aminosäure Glutamat kodierende Codon 28 durch den Austausch von G>C auf RNA-Ebene in das Stopp-Codon TAA umgewandelt wird (p.E28X). Bei den Patienten HC61 und HC62 wurde eine 2-Bp-Deletion c.1904_1905delCA in Exon 13 identifiziert, bei dem Patienten HC63 eine 6-Bp-Duplikation c.1053_1060dup6 in Exon 7. Beide Mutationen führen zu einer Verschiebung des Leserahmens und zu einem vorzeitigen Stopp-Codon (p.T635RfsX8, p.D354CfsX8). Weiterhin führte die Sequenzierung zur Identifizierung der Nukleotidsubstitution c.G397C bei dem Patienten HC86 und der Nukleotidsubstitution c.G2487C bei dem Patienten HC67 (siehe Abb. 12). Der Austausch von G>C an Position 397 auf RNA-Ebene führt dazu, dass die Aminosäure Aspartat an Position 133 gegen die Aminosäure Histidin ausgetauscht wird (p.D133H), während der Austausch von G>C an Position 2487 auf RNA-Ebene zu einem Austausch der Aminosäure Glutamin gegen Histidin führt (p.Q829H).

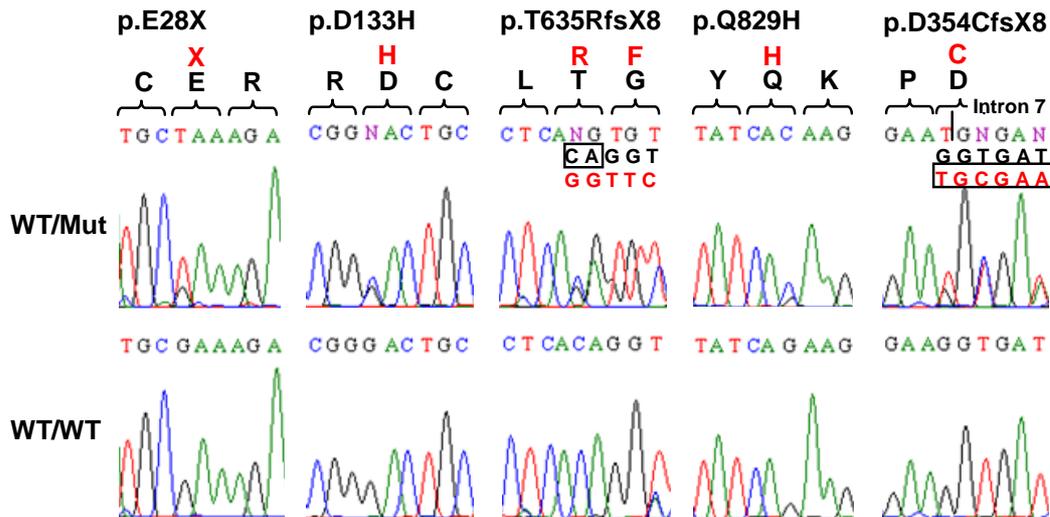


Abbildung 12: Sequenzieroelektropherogramme der neuen heterozygoten *LDLR*-Mutationen. Das obere Elektropherogramm zeigt jeweils die heterozygote Mutation, die bei dem/den Patienten gefunden wurde. Das untere Elektropherogramm zeigt die normale WT-Sequenz.

Keine der neuen identifizierten Mutationen war in einer der verwendeten Datenbanken als SNP verzeichnet. Des Weiteren wurden für die nicht beschriebenen Mutationen ethnisch abgegliche Kontrollindividuen getestet. Keine der Mutationen wurde in 100 Kontrollen gefunden.

Die Aminosäure Aspartat an Position 133 ist in der Ligandenbindungsdomäne, die Aminosäure Glutamin an Position 829 in der cytoplasmatischen Domäne des LDL-Rezeptors lokalisiert. Um die Konservierung der ausgetauschten Aminosäuren an den Positionen 133 und 829 in *LDLR* zu untersuchen, wurde die humane Aminosäuresequenz mit orthologen Sequenzen verschiedener Spezies verglichen. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis des Vergleichs, der mit Hilfe des Programmes ClustalW erstellt wurde. Des Weiteren wurde die Konservierung mit dem Programm ConSeq bestimmt, welches auch funktionell und strukturell wichtige Aminosäuren identifiziert. Die Sequenzen von Mensch, Maus, Rind, Ratte, Zebrafisch, Hund und Katze tragen an Position 133 der Aminosäuresequenz von *LDLR* die Aminosäure Aspartat und an Position 829 die Aminosäuresequenz Glutamin. Somit konnte gezeigt werden, dass beide Positionen in den funktionellen Domänen hochkonserviert sind. Die Analyse mit ConSeq zeigte ebenfalls eine hohe Konservierung für beide Positionen an. Die orthologen Sequenzen der verglichenen Spezies sind auch in der direkten Umgebung der beiden Positionen, vor allem der Position 829, bis auf wenige Abweichungen konserviert. Bei den Aminosäuren in der direkten Umgebung der beiden Positionen sowie bei Glutamin an Position 829 selbst, handelt es sich außerdem um exponierte Aminosäuren mit vorhergesagten funktionellen Aminosäureresten.

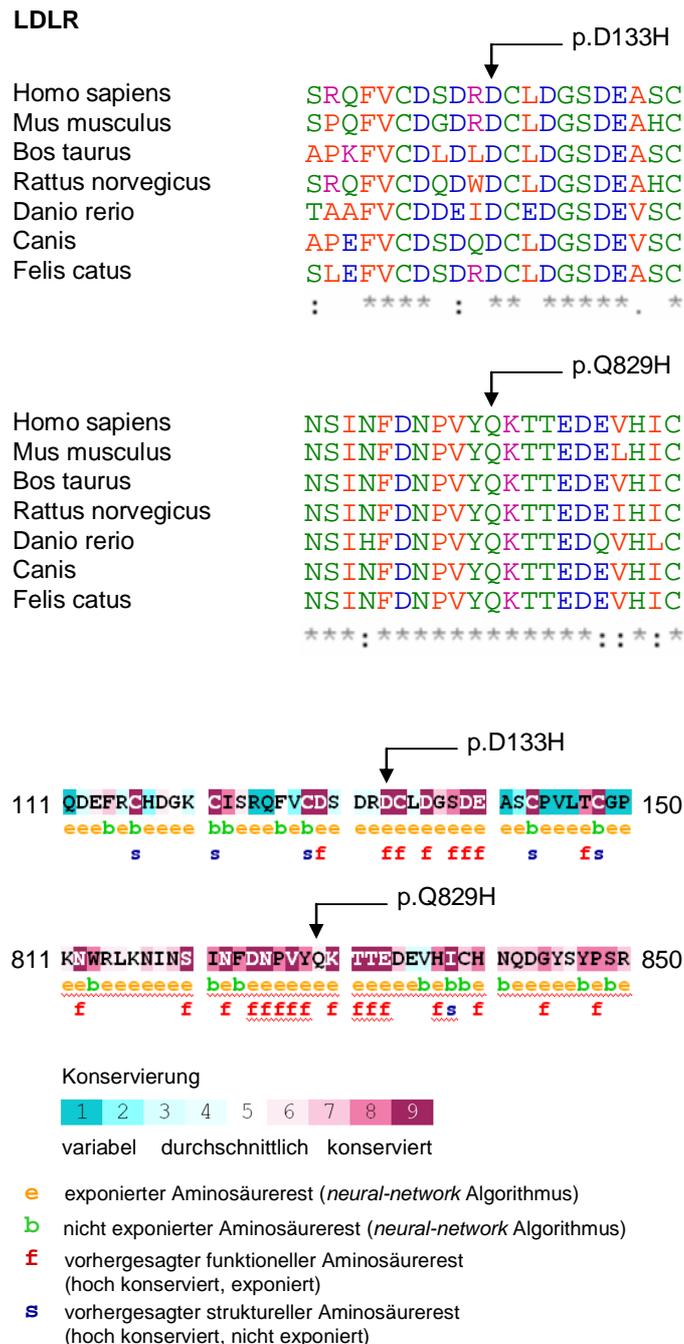
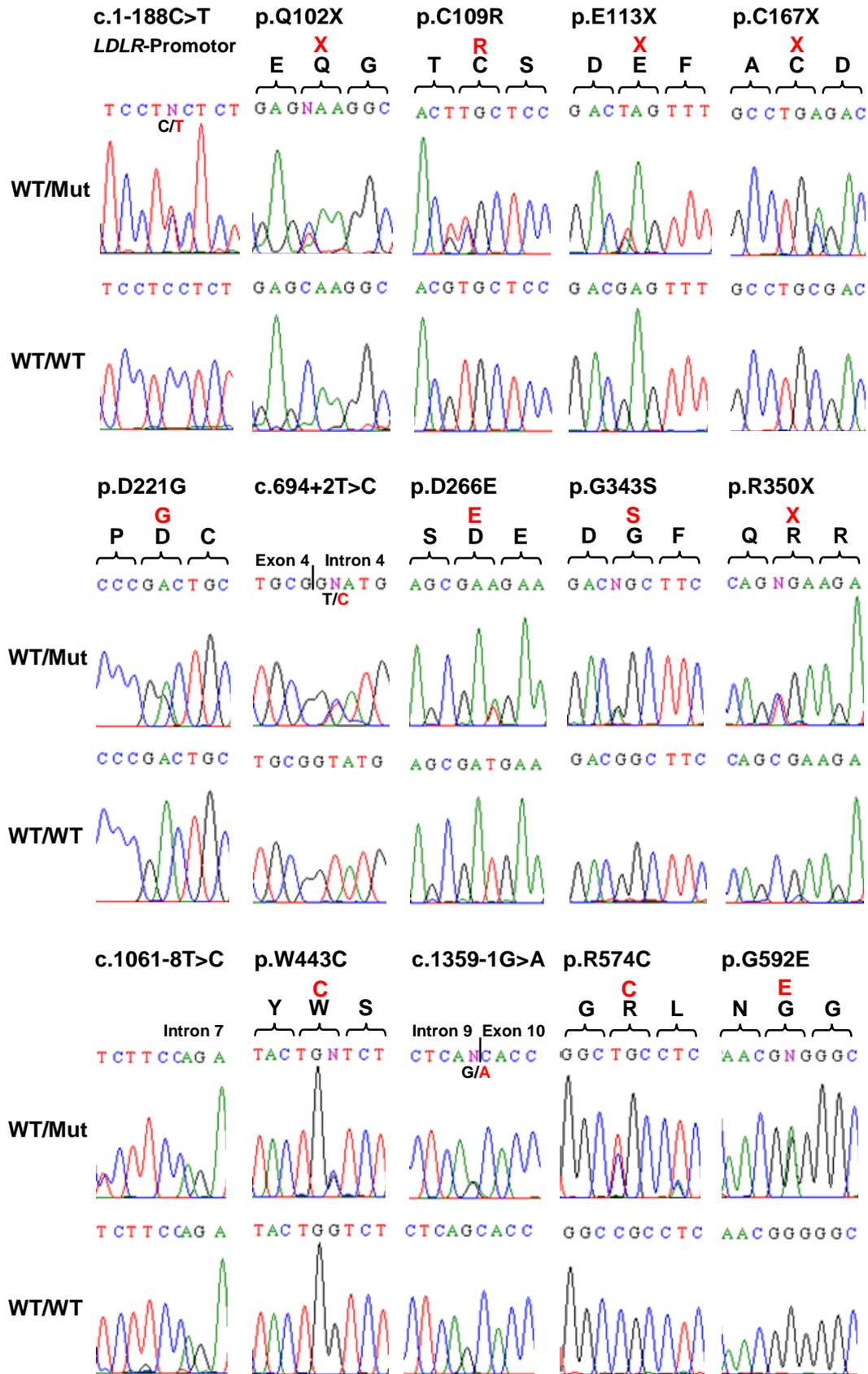


Abbildung 13: Konservierung der Aminosäurepositionen 133 und 829 in LDLR. *oben:* Dargestellt ist die humane Aminosäuresequenz von LDLR im Vergleich zu orthologen Sequenzen verschiedener Spezies. Die Pfeile markieren die Aminosäuren an den Positionen 133 und 829. Die Sterne unter den Sequenzen markieren hochkonservierte Aminosäuren. Aminosäuren mit gleichen physikalisch-chemischen Eigenschaften sind farblich gleich dargestellt. Das *multiple sequence alignment* erfolgte mit dem Alignment-Programm ClustalW. *unten:* Bestimmung der Konservierung sowie Identifizierung von funktionell und strukturell wichtigen Aminosäuren mit dem Programm ConSeq. Die Pfeile markieren die Aminosäuren an den Positionen 133 und 829.

Für die restlichen 22 identifizierten Mutationen in LDLR wurden weder die Konservierung überprüft noch ethnisch abgegliche Kontrollindividuen getestet, da es sich um bekannte, bereits zuvor in der Literatur beschriebene Mutationen handelt (siehe Abb. 14).



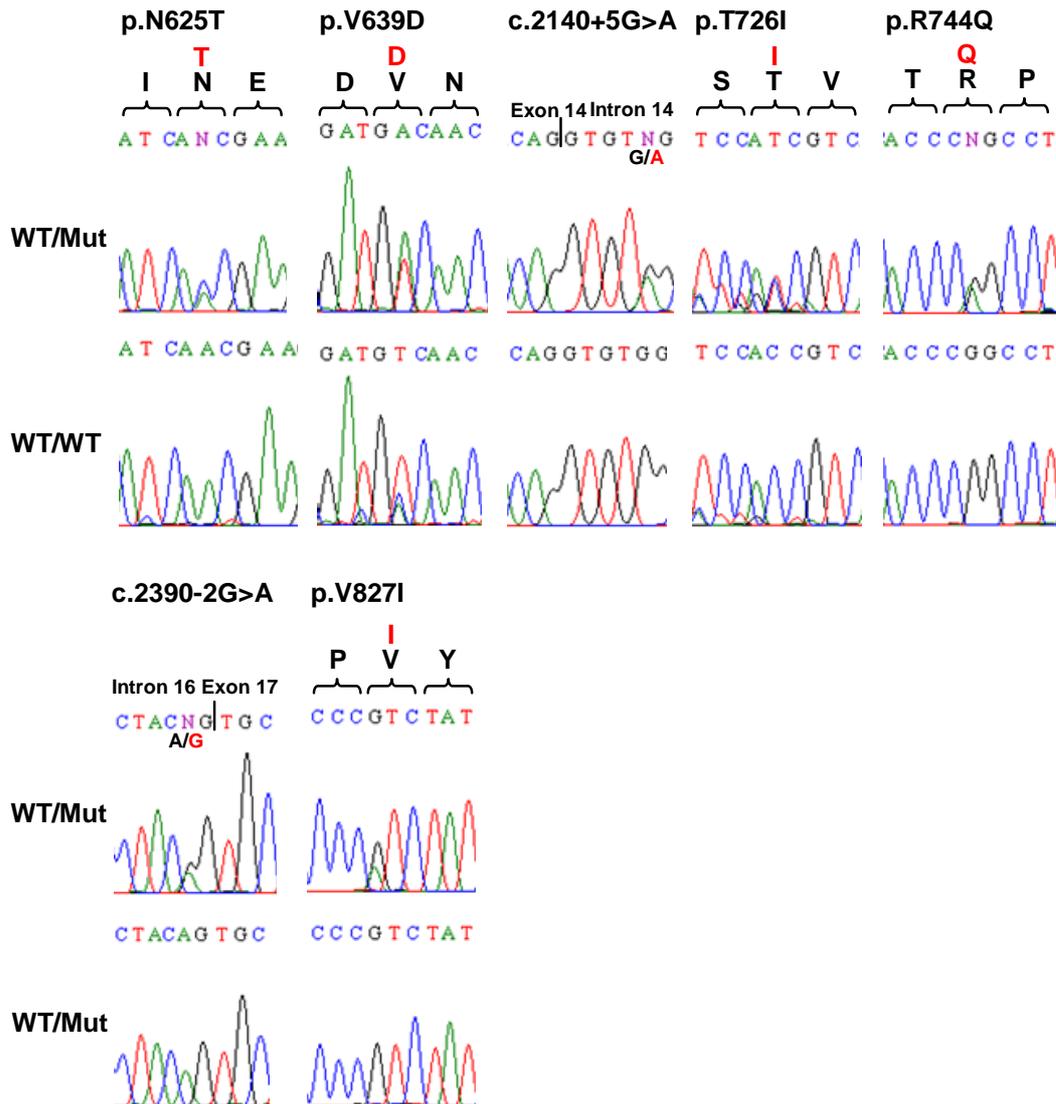


Abbildung 14: Sequenzieroelektropherogramme der bereits beschriebenen heterozygoten *LDLR*-Mutationen. Das obere Elektropherogramm zeigt jeweils die heterozygote Mutation, die bei dem/den Patienten gefunden wurde. Das untere Elektropherogramm zeigt die normale WT-Sequenz.

4.1.2.2 Deletions-/Duplikationsanalyse mittels MLPA

Mit Hilfe der MLPA-Methode wurde das *LDLR*-Gen auf Deletionen und Duplikationen untersucht. Das verwendete Kit enthielt jeweils eine spezifische Sonde für die 18 bekannten Exons von *LDLR*, sowie eine weitere Sonde für Exon 1. Zwischenzeitlich wurde das Kit überarbeitet, so dass für die Analysen ebenfalls eine neuere Version verwendet wurde, die noch eine weitere Sonde für Exon 15 enthielt. Alle anderen in den beiden Kits enthaltenen Sonden dienten der Kontrolle. Drei heterozygote Deletionen in *LDLR* konnten mit Hilfe dieser Methode in vier Patienten identifiziert werden. In der Abbildung 15 sind die resultierten Peak-Profile der MLPA-Analyse der Mutationsträger sowie von Kontrollindividuen zusammengestellt.

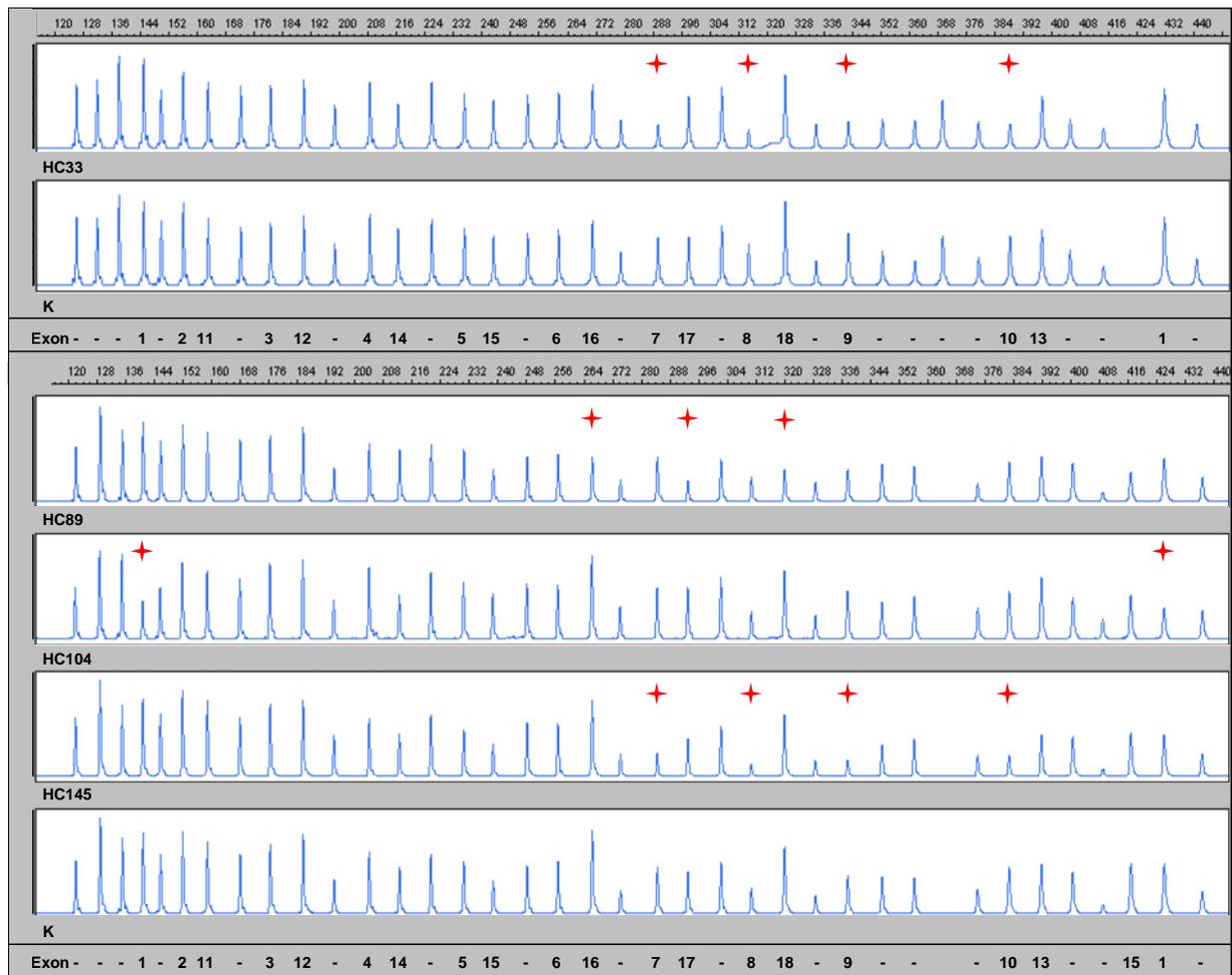


Abbildung 15: Peak-Profil der MLPA-Analyse. Für die ersten beiden Profile wurde die ältere Version des Kits verwendet, für die restlichen Profile das überarbeitete Kit. Unter dem zweiten Profil und dem untersten Profil sind die Peaks, die die Kopienanzahl von Exon 1-18 sowie die Peaks der Kontroll-Sonden repräsentieren entsprechend gekennzeichnet. Die roten Sterne kennzeichnen Peaks, deren Signal in der Höhe im Vergleich zur Kontrolle reduziert ist. K = Kontrollindividuum

Die Auswertung der MLPA-Ergebnisse zeigte eine deutliche Reduktion der Peakhöhen für die Proben der Exons 7, 8, 9 und 10 bei den Patienten HC33 und HC145, während alle anderen Proben keine Abweichungen der Peakhöhe vom Kontrollindividuum zeigten. Bei dem Patienten HC89 waren die Peakhöhen für die Proben der Exons 16, 17 und 18, bei dem Patienten HC104 für beide Proben des Exons 1 deutlich reduziert. Die MLPA-Reaktion und Analyse wurde insgesamt dreimal unabhängig wiederholt. Für die genaue quantitative Auswertung wurde für jeden Peak, der die Kopienanzahl eines Exons von *LDLR* repräsentiert, die relative Fläche berechnet. Dazu wurde jeweils die Fläche des entsprechenden Peaks durch die Summe aller Flächen der Kontroll-Peaks einer Analyse dividiert.

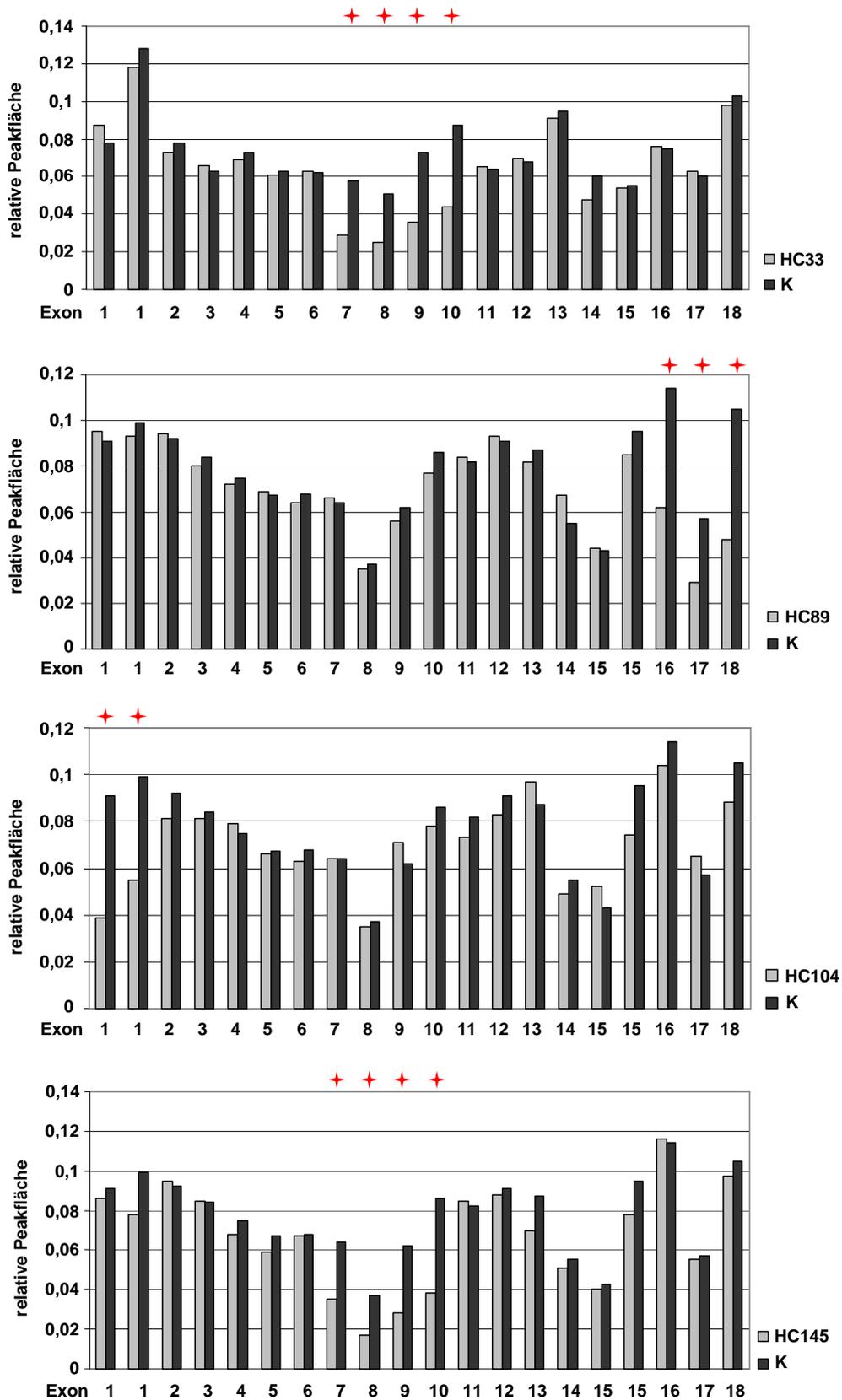


Abbildung 16: Darstellung der relativen Peakflächen von Exon 1-18 für die Patienten HC33, HC89, HC104 und HC145 jeweils im Vergleich zum Kontrollindividuum. Die roten Sterne kennzeichnen Peaks, deren relative Peakfläche im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert ist. K = Kontrollindividuum

Diese Auswertung zeigte (siehe Abb. 16), dass die relativen Peakflächen für die Proben von Exon 7, 8, 9, und 10 bei den Patienten HC33 und HC145 im Vergleich zu denen des Kontrollindividuums um bis zu 50 % reduziert waren, wohingegen die relativen Peakflächen der Proben aller restlichen Exons denen des Kontrollindividuums entsprachen. Bei dem Patienten HC89 sind die relativen Peakflächen der Proben des Exons 16, 17 und 18 um bis zu 50 % im Vergleich zu denen des Kontrollindividuums reduziert, bei dem Patienten HC104 die relativen Peakflächen der Proben von Exon 1. Des Weiteren wurde die prozentuale Reduktion oder Vergrößerung der relativen Peakflächen von Exon 1-18 im Vergleich zum Kontrollindividuum für jeden Patienten graphisch dargestellt (siehe Abb. 17). Diese zeigte eine bis zu 50 %ige Reduktion der Exon 7, 8, 9 und 10 Signale bei den Patienten HC33 und HC145, der Exon 16, 17 und 18 Signale bei dem Patienten HC89 und der Exon 1 Signale bei dem Patienten HC104 und bestätigte das Vorliegen von heterozygoten Deletionen der entsprechenden Exons. Alle anderen Exons liegen in normaler doppelter Kopienanzahl vor. Erstmals konnte eine Deletion der Exons 7-10 bei Patienten als Ursache der Erkrankung gefunden werden. Eine heterozygote Deletion des Exons 1 sowie von Exon 16-18 wurde zuvor bereits in der Literatur beschrieben (Taylor et al., 2009). Die Bruchpunkte der Deletionen wurden nicht bestimmt, so dass auch noch keine Aussage über die Größe der Deletion gemacht werden konnte, diese Aussage aber auch für die Fragestellung nicht relevant war. Die Deletion von Exon 1 führt nicht nur zum Verlust des Start-Codons, sondern auch zum Verlust des N-terminalen Signalpeptids, welches für die korrekte Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran essentiell ist. Die Deletion von Exon 16-18 führt zum Verlust des Stopp-Codons. Auf Proteinebene geht diese zum einen mit einem Verlust der Transmembrandomäne einher, ohne die eine korrekte Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran ebenfalls nicht erfolgen kann und zum anderen mit einem Verlust der cytoplasmatischen Domäne, die für die Internalisierung und das Recycling des Rezeptors von Bedeutung ist. Bei der Deletion von Exon 7-10 liegen die Bruchpunkte der Deletion mit hoher Wahrscheinlichkeit im intronischen Bereich, so dass auf Proteinebene am ehesten die Veränderung p.G314AfsX18 prädiagnostiziert werden kann. Alle Mutationen führen zu einem kompletten Funktionsverlust des LDL-Rezeptors.

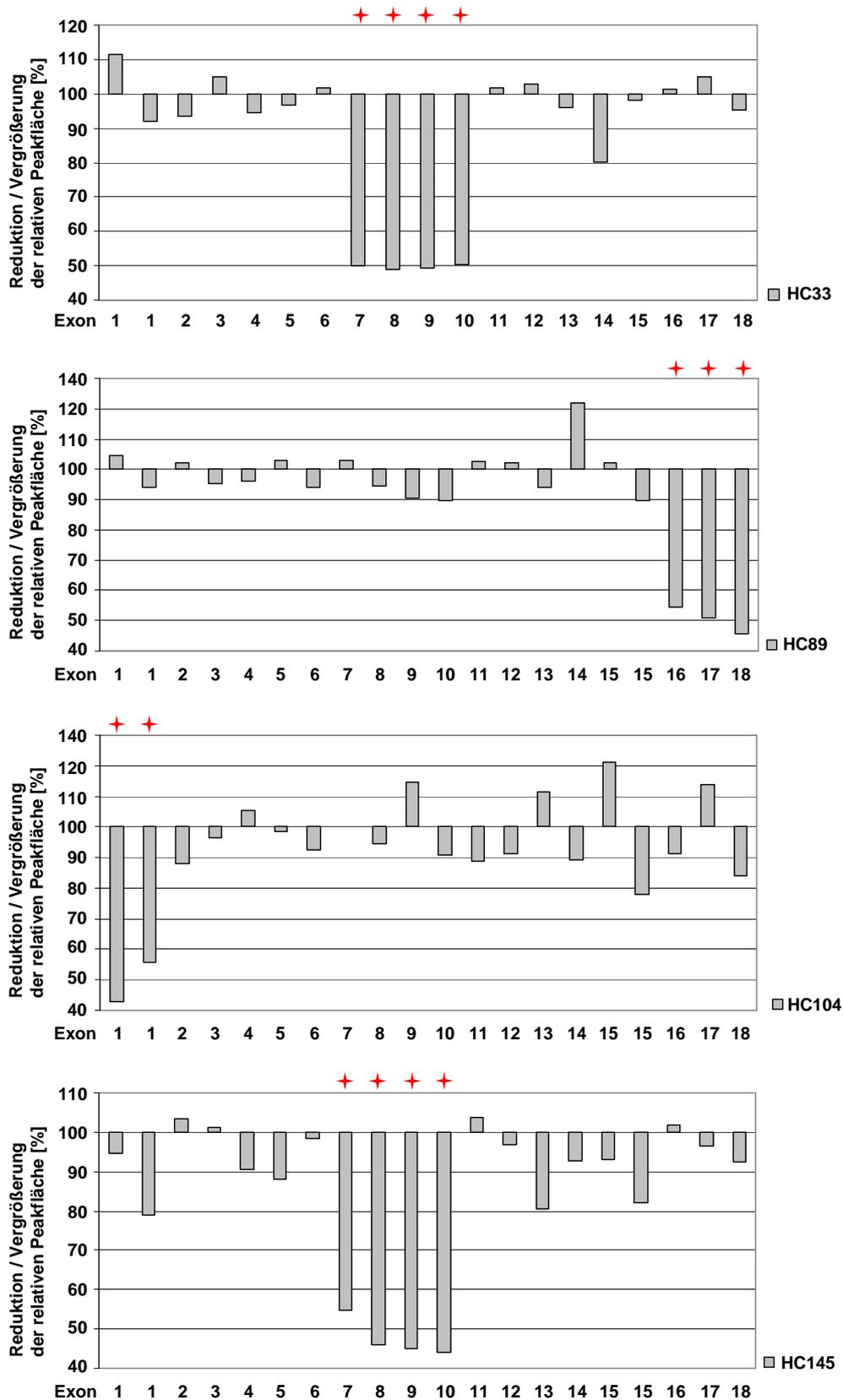


Abbildung 17: Prozentuale Reduktion der relativen Peakflächen. Die relativen Peakflächen von *LDLR* Exon 1-18 des Kontrollindividuum wurden gleich 100 % gesetzt und die berechneten Werte der relativen Peakflächen der MLPA Analyse der Patienten entsprechend den Abweichungen in Relation zu 100 % dargestellt. Die roten Sterne kennzeichnen Peaks, deren Peakfläche im Vergleich zur Kontrolle um bis zu 50 % reduziert ist. K = Kontrollindividuum.

4.1.3 Funktionelle Analyse der c.-188C>T Promotor-Mutation in *LDLR*

Bei dem Patienten HC39 konnte in der Promotorregion des *LDLR*-Gens die heterozygote Nukleotidsubstitution c.-188C>T identifiziert werden (siehe Abb. 18a).

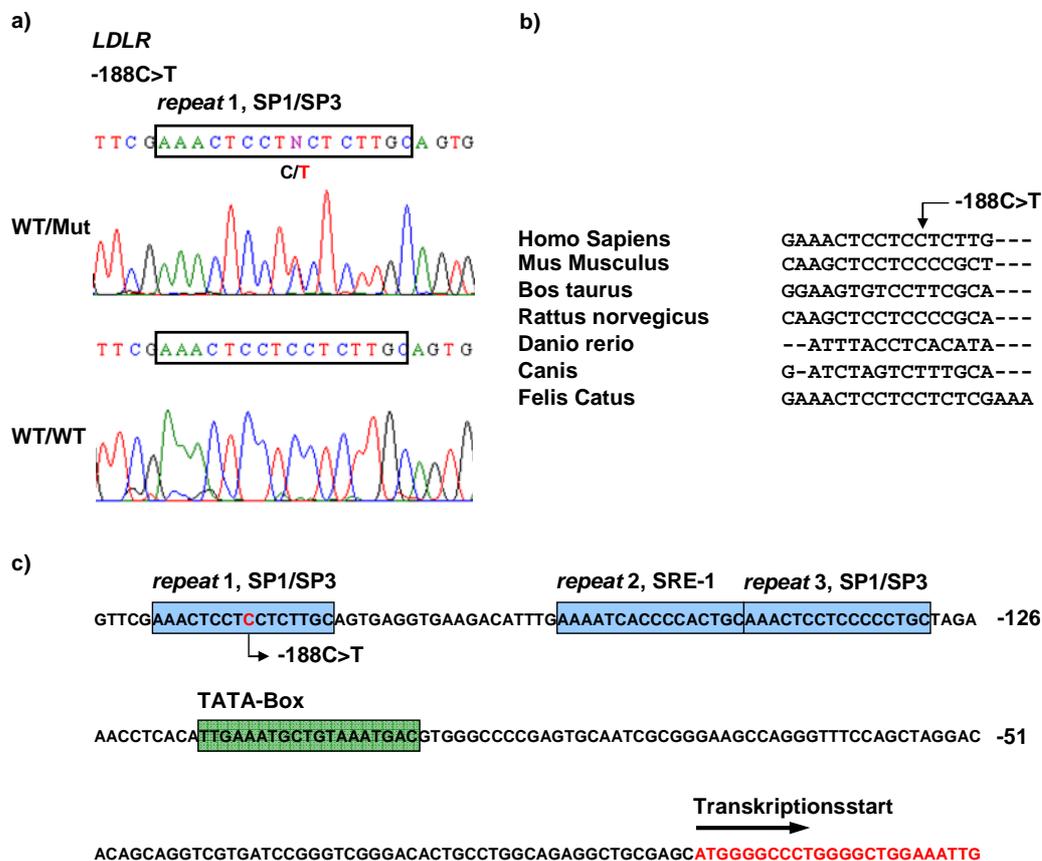


Abbildung 18: Struktur des *LDLR*-Promotors sowie Identifizierung und Analyse einer Promotor-Mutation. a) Sequenziererelektropherogramm der c.-188C>T Promotor-Mutation in *LDLR*. Das obere Elektropherogramm zeigt die heterozygote c.-188C>T Mutation, die bei dem Patienten HC39 gefunden wurde. Das untere Elektropherogramm zeigt die normale WT-Sequenz. b) *Multiple sequence alignment*. Dargestellt ist die humane Sequenz der Promotorregion von *LDLR* im Vergleich zu orthologen Sequenzen verschiedener Spezies. Der Pfeil markiert die Base an der Position -188 in der humanen Sequenz. Das *multiple sequence alignment* erfolgte mit dem Alignment-Programm ClustalW. c) Graphische Darstellung der humanen Promotorregion des *LDLR*-Gens. In der Abbildung wurde die AT-reiche TATA-Box grün markiert, die drei GC-reichen Wiederholungen aus jeweils 16 Basenpaaren (*repeat* 1-3) blau. Während *repeat* 1 und 3 Bindungsstellen für die ubiquitären Transkriptionsfaktoren SP1 und SP3 aufweisen, beinhaltet *repeat* 2 als Bindungsstelle ein *sterol regulatory element* (SRE), an welches die Transkriptionsfaktoren SREBP1 und SREBP2 binden (Sudhof et al., 1987).

Die Mutation ist im GC-reichen *repeat* 1 des Promotors lokalisiert, welcher Bindungsstellen für die ubiquitären Transkriptionsfaktoren SP1 und SP3 aufweist (siehe Abb. 18c). Um die Konservierung der ausgetauschten Base an Position -188 5' vom ATG Startcodon zu untersuchen, wurde die humane Sequenz der Promotorregion mit orthologen Sequenzen verschiedener Spezies verglichen (siehe Abb. 18b). Die Sequenzen von Mensch, Maus, Ratte,

Zebrafisch und Katze tragen an der entsprechenden Position die Base Cytosin, die Sequenzen von Rind und Hund die Base Thymin. Somit konnte gezeigt werden, dass die Position durchschnittlich konserviert ist.

Bei der c.-188C>T Mutation handelt es sich zwar um eine bekannte, zuvor in der Literatur beschriebene Veränderung, jedoch wurde diese noch nicht funktionell charakterisiert und somit war die Kausalität unklar. Zur Testung, ob die Mutation die Promotoraktivität und somit die transkriptionelle Aktivierung von *LDLR* beeinträchtigt, wurde ein *Luciferase Reporter Assay* durchgeführt. Hierzu wurden zunächst die wildtypische und die mutante Promotorregion des *LDLR*-Gens von Position -1 bis -704 5' vom ATG Startcodon in den Vektor pGL4.10[luc2] kloniert. Anschließend wurden HEK-293-Zellen mit den *LDLR*-Promotor-Reporter-Konstrukten pGL4.10[luc2]_{LDLR_Promotor_WT} (WT), pGL4.10[luc2]_{LDLR_Promotor_-188} (Mut-188C>T) oder mit dem Kontroll-Vektor pcDNA3.1 *lac Z* (K), der weder die Promotorregion von *LDLR* noch das Reporter-gen enthält, transfiziert. Jeweils co-transfiziert wurde das Expressionskonstrukt pGL4.7[*hRluc*] für die *Renilla-Luciferase*, welche als interne Transfektionskontrolle diente. Durch hohe intrazelluläre Cholesterinkonzentrationen wird die Prozessierung der endogen in den HEK-293-Zellen vorhandenen Vorläuferproteine der beiden Transkriptionsfaktoren SREBP1 und SREBP2 im Golgi-Apparat verhindert und somit die Transkription von Zielgenen inhibiert. Eines der Zielgene ist *LDLR*, so dass durch eine Inkubation der transfizierten HEK-293-Zellen mit Sterolen eine Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren an die *LDLR*-Promotorregion sowohl des endogenen *LDLR*-Gens, als auch der Reporter-gen-Konstrukte ausbleiben sollte. Als interne Kontrolle des physiologischen Systems und um zu testen, welchen Effekt die c.-188C>T Mutation hat, wenn die transkriptionelle Aktivität des Promotors inhibiert ist, wurde das Experiment jeweils ohne Zugabe (induzierende Bedingungen) und mit Zugabe (supprimierende Bedingungen) von Sterolen durchgeführt. Zur Herstellung von supprimierenden Bedingungen wurde den Zellen 5 h nach Transfektion entweder nur Cholesterol oder 25-Hydroxycholesterol zugefügt oder es erfolgte eine gemeinsame Zugabe von Cholesterol und 25-Hydroxycholesterol. Die Promotoraktivität wurde in Form der Luciferase-Aktivität luminometrisch bestimmt. Die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 19 in Form eines Diagramms wiedergegeben. Alle Transfektionen wurden pro Experiment im Triplikate durchgeführt.

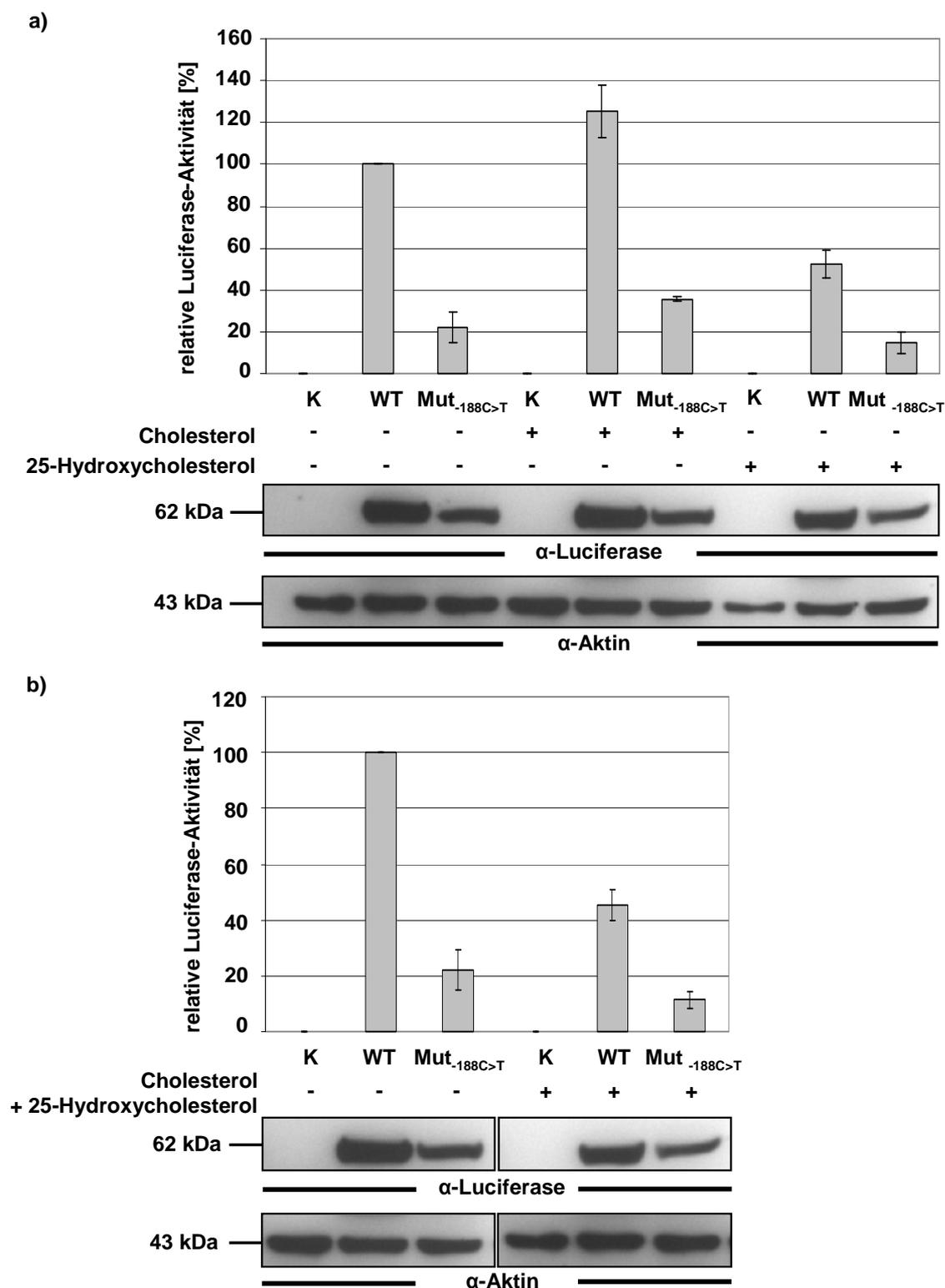


Abbildung 19: Graphische Darstellung der relativen Luciferase-Aktivität und repräsentative Western Blots der Zell-Lysate, welche im *Luciferase Reporter Assay* eingesetzt wurden, zur Verifizierung der Messwerte. a) mit Zugabe von Cholesterol oder 25-Hydroxycholesterol b) mit gemeinsamer Zugabe von Cholesterol und 25-Hydroxycholesterol. Zellen wurden folgendermaßen transfiziert: K = pcDNA3.1 *lac Z*, WT = pGL4.10[luc2]_{LDLR_Promotor_WT}, Mut_{-188C>T} = pGL4.10[luc2]_{LDLR_Promotor_-188}. Die gemessenen absoluten Werte der *Firefly*-Luciferase-Aktivitäten wurden jeweils mit der entsprechenden *Renilla*-Luciferase-Aktivität zur Transfektionskontrolle normalisiert. Die Luciferase-Aktivität von WT (ohne Sterole) wurde gleich 100 % gesetzt und die restlichen Werte in Relation dazu dargestellt.

Die relative Luciferase-Aktivität des Kontroll-Vektors pcDNA3.1 *lac Z* lag in allen Versuchen erwartungsgemäß bei 0 %. Unter induzierenden Bedingungen (ohne Sterole) zeigte die Analyse der Luciferase-Aktivität für den mutanten *LDLR*-Promotor eine deutliche Reduktion auf 22,18 % ($\pm 7,33$ %) der Aktivität, die für den wildtypischen Promotor gemessen werden konnte. Eine deutliche Reduktion der Luciferase-Aktivität für das mutante *LDLR*-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukt im Vergleich zum wildtypischen *LDLR*-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukt konnte ebenfalls grundsätzlich nach Inkubation mit Sterolen nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von 25-Hydroxycholesterol zwar die transkriptionelle Aktivität des Promotors nicht vollständig inhibiert wurde, aber sowohl die Promotoraktivität des wildtypischen als auch des mutanten *LDLR*-Promotors jeweils um etwa 40-50 % gesenkt wurde, im Vergleich zu den Aktivitäten unter induzierenden Bedingungen. Die alleinige Zugabe von Cholesterol führte zu einer Steigerung der Aktivität des wildtypischen und mutanten *LDLR*-Promotors. Wurden die transfizierten HEK-293-Zellen gleichzeitig mit Cholesterol und 25-Hydroxycholesterol behandelt, führte dies zu einer Reduktion der Aktivität des wildtypischen Promotors auf 45,45 % ($\pm 5,4$ %) der Aktivität, die für den wildtypischen Promotor unter induzierenden Bedingungen gemessen werden konnte. Die Aktivität des mutanten Promotors wurde auf 11,59 % ($\pm 3,02$ %) gesenkt. Somit führte die gemeinsame Zugabe von Cholesterol und 25-Hydroxycholesterol zu keiner vollständigen Inhibierung des Systems, aber zu einer etwas stärkeren Reduktion der Luciferase-Aktivität, als die alleinige Zugabe von 25-Hydroxycholesterol. Der Nachweis von Luciferase in den Zell-Lysaten, welche für den *Luciferase Reporter Assay* eingesetzt wurden, mittels Western Blot, bestätigte die luminometrisch gemessenen Luciferase-Aktivitäten. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet (siehe Abb. 19). Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass die c.-188C>T Mutation im *repeat 1* des *LDLR*-Promotors signifikant die Effizienz des Promotors reduziert. Die Beeinträchtigung der transkriptionellen Aktivität führte zu einer Reduktion des Expressionslevels von *LDLR* und erklärt somit die erhöhte LDL-Konzentration im Serum des Patienten. Die c.-188C>T Mutation ist eine funktionell relevante Mutation.

4.1.4 Identifizierung einer *APOB*-Mutation mittels Sequenzierung

Bei dem Patienten HC171 konnte mittels Sequenzierung die heterozygote Nukleotidsubstitution c.G10499A identifiziert werden (siehe Abb. 20). Der Austausch von G>A an Position 10499 auf RNA-Ebene führt dazu, dass die Aminosäure Arginin an Position 3500 gegen die Aminosäure Glutamin ausgetauscht wird (p.R3500Q). Bei der p.R3500Q

Mutation handelt es sich um eine sehr häufige, bereits beschriebene Mutation. Sie führt zu einer verminderten Bindungsaffinität des Proteins an den LDL-Rezeptor, wodurch es bei den betroffenen Patienten zu einem Anstieg des Serumspiegels an LDL-Cholesterin kommt.

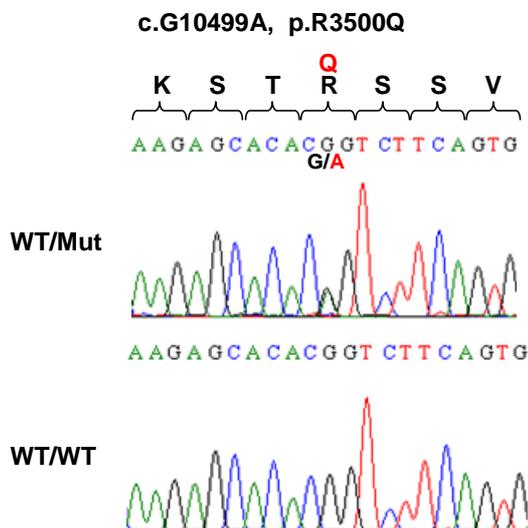


Abbildung 20: Sequenzieroelektropherogramme der identifizierten *APOB*-Mutation. Das obere Elektropherogramm zeigt die heterozygote c.G10499A Mutation, die bei dem Patienten HC171 gefunden wurde. Das untere Elektropherogramm zeigt die normale WT-Sequenz.

4.1.5 Genotypisierung von Nonsense-SNPs in Patienten mit *LDLR*-Mutation

Nonsense-Mutationen/-SNPs, Insertionen und Deletionen, die einen *frameshift* bewirken, sowie alternatives Spleißen können zu einem vorzeitigen Stopp-Codon im offenen Leseraster der mRNA führen (Cartegni et al., 2002). Ein vorzeitiges Stopp-Codon kann zu einem verkürzten, potentiell schädlichen Protein führen, jedoch ist die mRNA meist instabil und wird in der Regel selektiv über den phylogenetisch hochkonservierten *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) abgebaut, so dass nur Proteine der vollen Länge synthetisiert werden (Maquat, 2004, Nagy et al., 1998). Die Häufigkeit von Nonsense-SNP-Allelen in der Population schien, bis zur Pilotstudie des *1000 Genomes Project*, gering zu sein, da sie schädlich und meist mit einer Erkrankung assoziiert sind (Durbin et al., 2010). Gesunde Individuen sind fast ausschließlich heterozygot für Nonsense-SNPs. Im Jahre 2009 haben Bryndis Yngvadottir et al. 805 Nonsense-SNPs im humanen Genom in 1151 Individuen aus 56 weltweiten Populationen genotypisiert (Yngvadottir et al., 2009). In 169 Genen wurden Nonsense-SNPs identifiziert, für die die genotypisierten Individuen teilweise heterozygot waren. Bei 99 der 169 Gene waren in mindestens einem Individuum sogar beide Genkopien inaktiviert. Unter anderem konnten bei einigen Individuen homozygote Nonsense-SNPs in den Genen *ABCA10* (rs10491178), *APOL3* (rs11089781) und *LPL* (rs328) identifiziert werden. Alle drei Gene scheinen in den Lipidstoffwechsel involviert zu sein. Bei *ABCA10*

handelt es sich um einen ABC-Transporter, der in der Membran von Makrophagen lokalisiert ist und zur großen Familie von Membranproteinen gehört, die als gemeinsames Strukturelement eine ATP-bindende Kasette besitzen und spezifisch Substrate aktiv über eine Zellmembran transportieren. Durch den Import von Cholesterin in die Makrophagen wird die Expression des Transporters supprimiert (Wenzel et al., 2003). Apolipoprotein L Proteine, zu denen auch APOL3 zählt, gehören zur Familie der Lipoproteine mit hoher Dichte. Viel ist über die genaue Funktion noch nicht bekannt, jedoch scheinen sie eine Rolle im Cholesterin-Transport zu spielen (Page et al., 2001). *LPL* kodiert für das hepatische Enzym Lipoproteinlipase. *LPL* ist auf den Endothelzellen extrahepatischer Kapillaren vorhanden und vermittelt den hydrolytischen Abbau von triglyzeridreichen Lipoproteinen, insbesondere von Chylomikronen und VLDL. Mutationen in *LPL* führen zur Hypertriglyzeridämie (Wang et al., 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die Nonsense-SNPs in *ABCA10*, *APOL3* und *LPL* möglicherweise als modifizierende Faktoren wirken und den Phänotypen von Patienten mit Lipidstoffwechselstörungen im Zusammenspiel mit einer kausalen Mutation beeinflussen. Um dies zu testen, wurden alle Patienten der LIANCO Studie mit kausaler *LDLR*-Mutation für die entsprechenden Nonsense-SNPs genotypisiert. Im Anschluß wurde geprüft, ob das Vorhandensein von Nonsense-SNPs im heterozygoten oder homozygoten Zustand bei den Patienten Auswirkungen auf den Cholesterinspiegel oder den BMI hat. Des Weiteren wurden die Häufigkeiten der Nonsense-Allele bestimmt und mit den von Bryndis Yngvadottir et al. (Yngvadottir et al., 2009) gewonnenen Daten verglichen.

In der Tabelle 30 ist das Ergebnis der Genotypisierung zusammengefasst. Bei insgesamt 14 der 39 genotypisierten Patienten konnte mindestens ein Nonsense-Allel der getesteten SNPs detektiert werden. Acht Patienten (HC92, HC82, HC142, HC151, HC47, HC61, HC169, HC33) waren heterozygot für den Nonsense-SNP rs10491178 in *ABCA10*, ein Patient (HC164) war homozygot für diesen SNP. Für das Nonsense-Allel des SNPs rs328 in *LPL* waren insgesamt sieben Patienten (HC92, HC31, HC22, HC181, HC61, HC62, HC66) heterozygot. Der Patient HC82 war homozygot für das Nonsense-Allel des SNPs rs328 in *LPL*. Bei keinem Patienten konnte das Allel mit dem Nonsense-SNP rs11089781 in *APOL3* identifiziert werden. Für insgesamt fünf Patienten lagen keine phänotypischen Daten vor, unter anderem auch für zwei, bei denen jeweils ein Nonsense-Allel eines SNPs gefunden wurde. Trotzdem war zu erkennen, dass die Nonsense-Allele bei den genotypisierten Patienten keine sichtbaren Auswirkungen auf den BMI oder den Gesamt-, HDL- und LDL-Cholesterinspiegel sowie den Triglyzeridspiegel im Serum hatten. Die Werte waren bei

keinem Patienten mit einem vorzeitigen Stopp-Codon signifikant höher als bei den restlichen Patienten. Eine offensichtliche Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp bestand nicht. Man kann folglich davon ausgehen, dass bei den 39 genotypisierten Patienten die Nonsense-SNPs keine modifizierende Funktion haben.

Tabelle 30: Übersicht über die Genotypen der Nonsense-SNPs in Patienten der LIANCO Studie mit kausaler Mutation in *LDLR*. Das jeweilige Nonsense-Allel ist rot markiert. Für einige Patienten liegen keine phänotypischen Daten vor. TC = Gesamtcholesterin, BMI = *body mass index*, HDL = HDL-Cholesterin, LDL = LDL-Cholesterin, TGL = Triglyzeride, w = weiblich, m = männlich

Patient	LIANCO ID	Geschlecht	TC [mg/dl]	BMI [kg/m ²]	LDL [mg/dl]	HDL [mg/dl]	TGL [mg/dl]	<i>LDLR</i> Mutation	Nonsense-SNP		
									<i>ABCA10</i> rs10491178	<i>APOL3</i> rs11089781	<i>LPL</i> rs328
HC39	4143							c.1-188C>T	G/G	G/G	G/G
HC28	710	w	330	21,3	261	56	84	c.G82T, p.E28X	G/G	G/G	G/G
HC92	897	w	356	21,6	285	60	73	c.C304T, p.Q102X	G/A	G/G	G/C
HC31	708	m	518	26,6	456	38	157	c.324_325delinsTC, p.C109R	G/G	G/G	G/C
HC82	26990	m	441	21,6	379	67	69	c.324_325delinsTC, p.C109R	G/A	G/G	C/C
HC108	176	m	376	27,5	304	44	206	c.324_325delinsTC, p.C109R	G/G	G/G	G/G
HC142	4456	w	293	26,6	183	52	257	c.324_325delinsTC, p.C109R	G/A	G/G	G/G
HC151	27473	m	286	25,4	198	68	107	c.324_325delinsTC, p.C109R	G/A	G/G	G/G
HC168	27700	w	288	20,8	202	45	86	c.324_325delinsTC, p.C109R; c.A1874C, p.N625T	G/G	G/G	G/G
HC192	1494	m	392	25	180	32	362	c.G337T, p.E113X	G/G	G/G	G/G
HC86	16757	m	304	21,7	227	55	91	c.G397C, p.D133H	G/G	G/G	G/G
HC110	1363	w	468	23,3	345	66	288	c.C501A, p.C167X	G/G	G/G	G/G
HC22	625	m	300	27,1	218	72	66	c.A662G, p.D221G	G/G	G/G	G/C
HC107	636	m	482	23,4	402	43	218	c.694+2T>C	G/G	G/G	G/G
HC47	21586	w	346	25,6	230	41	282	c.T798A, p.D266E	G/A	G/G	G/G
HC181	5874	m	299	24,7	232	61	127	c.G1027A, p.G343S	G/G	G/G	G/C
HC164	21901	m	295	22,5	192	56	169	c.C1048T, p.R350X	A/A	G/G	G/G
HC63	17471	m	312	23,1	206	54	147	c.1053_1058dup6, p.D354CfsX8	G/G	G/G	G/G
HC101	2565	w	323	29,3	226	45	151	c.1061-8T>C	G/G	G/G	G/G
HC156	4194	w	296	25	212	62	96	c.G1329C, p.W443C	G/G	G/G	G/G
HC182	4237	w	287	32,9	148	39	510	c.G1329C, p.W443C	G/G	G/G	G/G
HC27	2932	m	351	23,9	260	38	174	c.1359-1G>A	G/G	G/G	G/G
HC87	2513	m	324	19,3	284	39	92	c.1359-1G>A	G/G	G/G	G/G
HC94	1208	w	426	22,3	357	58	126	c.1359-1G>A	G/G	G/G	G/G
HC122	2368	w	318	19,7	250	52	76	c.C1720T, p.R574C	G/G	G/G	G/G
HC106	567	m	310	23,1	233	58	122	c.G1775A, p.G592E	G/G	G/G	G/G
HC61	21909	m	348	19	287	38	114	c.1904_1905delCA, p.T635RfsX8	G/A	G/G	G/C
HC62	21910							c.1904_1905delCA, p.T635RfsX8	G/G	G/G	G/C
HC153	712	w	284	24,8	223	46	94	c.T1916A, p.V639D	G/G	G/G	G/G
HC45	19238	w	309	27,9	201	61	271	c.2140+5G>A	G/G	G/G	G/G
HC169	4323	m	296	29,8	186	53	240	c.C2177T, p.T726I	G/A	G/G	G/G
HC66	4759	m	429	23,3	284	78	299	c.G2231A, p.R744Q c.G2479A, p.V827I	G/G	G/G	G/C
HC25	6167	m	342	30,1	184	40	478	c.2390-2A>G	G/G	G/G	G/G
HC90	889	m	302	26,5	225	55	140	c.2390-2A>G	G/G	G/G	G/G
HC67	23642	w	363	32,9	270	67	132	c.G2487C, p.Q829H	G/G	G/G	G/G
HC104	153	w	284	24,8	223	46	94	EX1del	G/G	G/G	G/G
HC33	4780							EX7_10del	G/A	G/G	G/G
HC145	4781							EX7_10del	G/G	G/G	G/G
HC89	1353							EX16_18del	G/G	G/G	G/G

Die Häufigkeiten der Nonsense-Allele der SNPs rs10491178 in *ABCA10* und rs11089781 in *APOL3* entsprachen in etwa den angegebenen Häufigkeiten von Bryndis Yngvadottir et al. (Yngvadottir et al., 2009) (siehe Tab. 31). Für das Nonsense-Allel in *LPL* konnte bei den Patienten der LIANCO Studie eine etwas höhere Häufigkeit detektiert werden. Eine funktionelle Charakterisierung der Nonsense-SNPs wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, könnte aber helfen neue Erkenntnisse über die molekulare Funktion der Nonsense-SNPs zu gewinnen.

Tabelle 31: Häufigkeiten und Auswirkungen der Nonsense-Allele. Vergleich der von Yngvadottir et al. gewonnenen Daten mit den Nonsense-Allelhäufigkeiten bei Patienten der LIANCO Studie mit kausaler Mutation in *LDLR*.

Gen	Referenz SNP ID	Häufigkeit Nonsense-Allel (Yngvadottir et al.)	Häufigkeit Nonsense-Allel	Verkürzung des Peptids [%]	NMD Kandidat
<i>ABCA10</i>	rs10491178	0,1119	0,1282	14,38	ja
<i>APOL3</i>	rs11089781	0,0222	0	85,61	ja
<i>LPL</i>	rs328	0,0856	0,1154	0,42	nein

4.1.6 Identifizierung von zwei neuen Hypercholesterinämie-Genen, *SREBP1* und *SREBP2*

In 152 Patienten der LIANCO Studie konnte keine kausale Mutation in den bekannten FH-Genen *LDLR*, *APOB* und *PCSK9* identifiziert werden. Kandidatengene wurden aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften ausgewählt und anschließend molekulargenetisch untersucht. Initial wurde bei 48 Patienten eine Mutationsanalyse in den Genen *SCARB1*, *SREBP1* und *SREBP2* durchgeführt. Die getesteten Gene spielen zentrale Rollen im Lipidstoffwechsel. Die Mutationsanalyse umfasste die Amplifikation der Exons und anschließende Sequenzierung.

In *SCARB1* konnte bei keinem Patienten eine Mutation gefunden werden. Da eine *SCARB1*-Mutation als häufiger ursächlicher Faktor somit ausgeschlossen werden konnte, wurden keine weiteren Patienten untersucht. Die Mutationsanalyse in *SREBP1* führte zur Identifizierung der heterozygoten Nukleotidsubstitution c.G2435A bei dem Patienten HC52 (siehe Abb. 21). Die Veränderung ist in Exon 13 des Gens lokalisiert. Das für die Aminosäure Arginin kodierende Codon 812 (CGA) wird durch den Austausch von G zu A auf RNA-Ebene in das Codon CAA umgewandelt, welches die Aminosäure Glutamin kodiert (p.R812Q). Bei dem Patienten HC78 wurde in Exon 14 des *SREBP2*-Gens die heterozygote Nukleotidsubstitution c.G2554A identifiziert (siehe Abb. 21). Der Austausch von G>A auf RNA-Ebene führt dazu, dass die Aminosäure Glycin an Position 852 gegen die Aminosäure Arginin ausgetauscht wird (p.G852R).

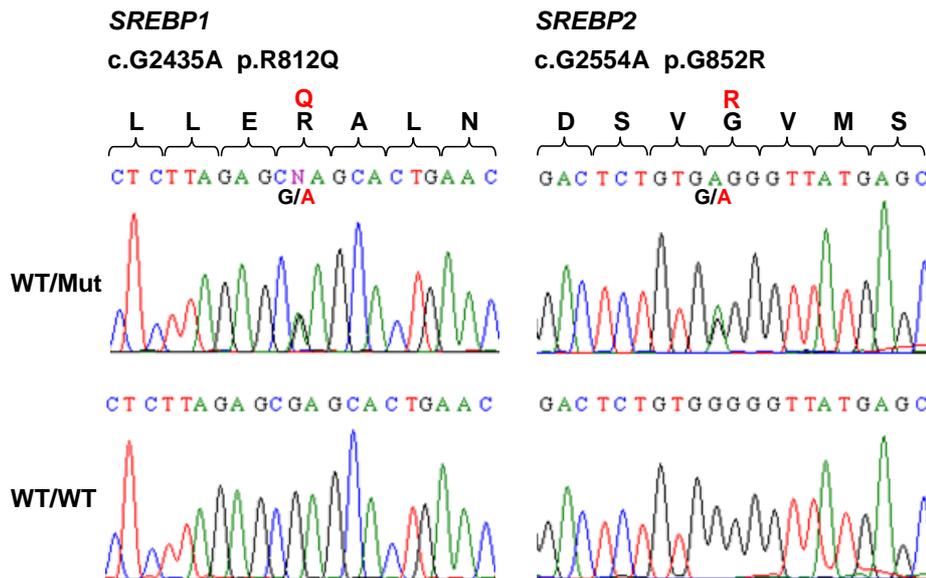


Abbildung 21: Sequenzieroelektropherogramme der identifizierten Mutationen p.R812Q in *SREBP1* und p.G852R in *SREBP2*. Das obere Elektropherogramm zeigt jeweils die heterozygote Mutation, die bei dem Patienten gefunden wurde. Das untere Elektropherogramm zeigt die normale WT-Sequenz.

Beide putativen Mutationen waren in den verwendeten Datenbanken nicht als SNP annotiert. Mit dem Programm ConSeq wurde die Konservierung der veränderten Aminosäuren untersucht (siehe Abb. 22). Bei beiden Aminosäuren handelt es sich um Aminosäuren mit exponierten Resten. Für die Aminosäure Arginin an Position 812 in *SREBP1* wurde eine durchschnittliche Konservierung vorhergesagt, während die Aminosäure Glycin an Position 852 in *SREBP2* in verschiedenen Spezies variabel zu sein scheint.

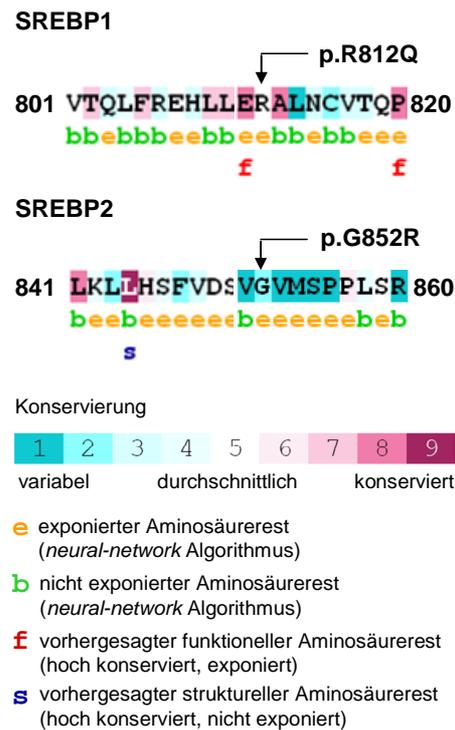


Abbildung 22: Konservierung der Aminosäurepositionen 812 in SREBP1 und 852 in SREBP2. Bestimmung der Konservierung sowie Identifizierung von funktionell und strukturell wichtigen Aminosäuren mit dem Programm ConSeq. Die Pfeile markieren die Aminosäuren an den Positionen 812 in SREBP1 und 852 in SREBP2.

Für die putativen Mutationen in *SREBP1* und *SREBP2* wurden ethnisch abgegliche Kontrollindividuen getestet. Keine der beiden Mutationen wurde in 100 Kontrollen gefunden. Des Weiteren wurden bei den restlichen 104 Patienten der LIANCO Studie, in denen keine kausale Mutation in den bekannten FH-Genen gefunden wurde, Mutationsanalysen in *SREBP1* und *SREBP2* durchgeführt. Es wurden keine weiteren Mutationen gefunden.

Beide identifizierten Veränderungen sind in der C-terminalen regulatorischen Domäne des jeweiligen Proteins lokalisiert (siehe Abb. 23). Es ist bekannt, dass in der Membran des endoplasmatischen Retikulums eine Interaktion der C-terminalen Domäne in SREBP1 und SREBP2 mit der WD-Domäne in SCAP stattfindet.

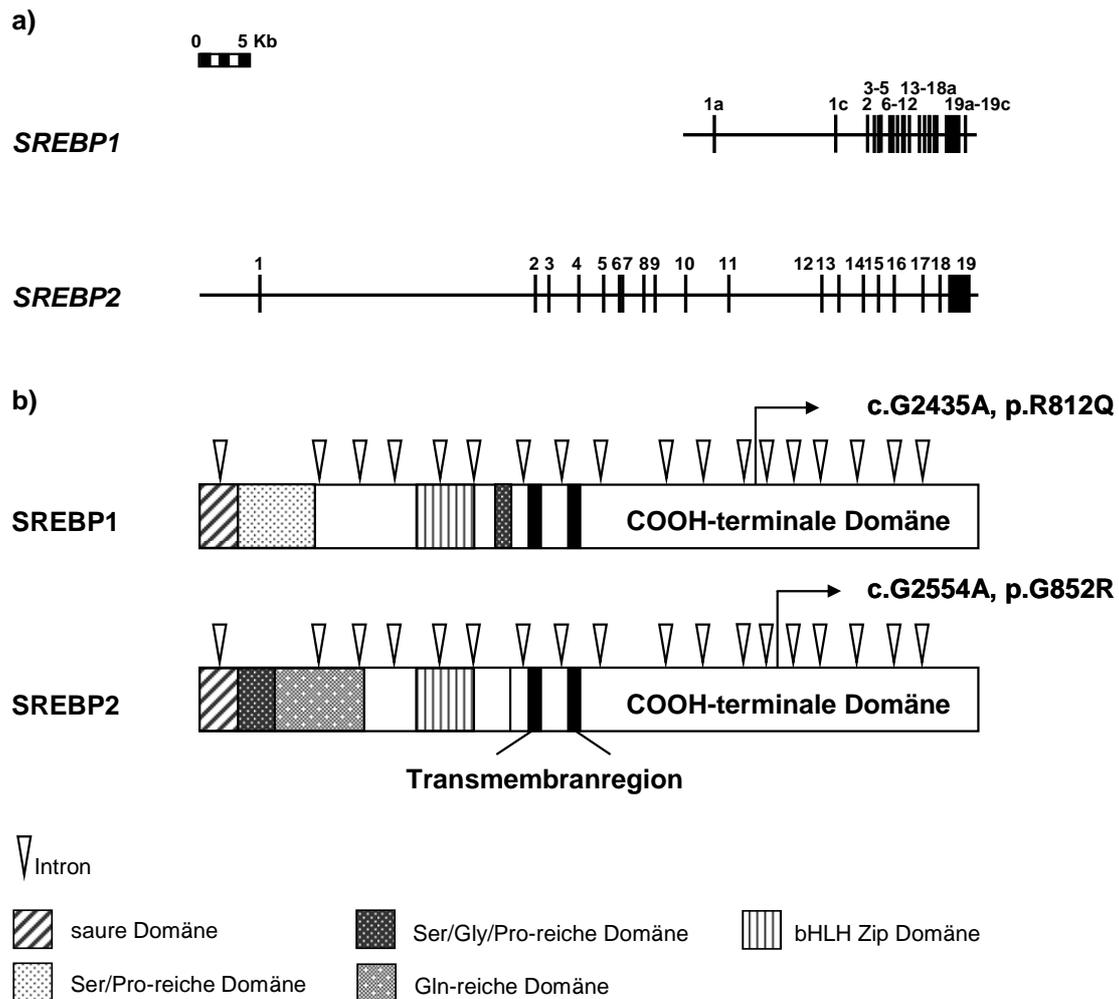


Abbildung 23: SREBP1 und SREBP2. a) Schematische Darstellung der Genstruktur von *SREBP1* und *SREBP2*. Exons werden durch Boxen repräsentiert, Introns durch Linien. b) Schematische Darstellung der SREBP1- und SREBP2-Proteine. Die weißen Pfeile markieren die Grenzen einzelner Abschnitte die durch unterschiedliche Exons kodiert werden.

4.1.7 Funktionelle Charakterisierung der SREBP1- und SREBP2-Mutationen

Der Gen- und Proteinaufbau, die gewebespezifische Expression, Interaktionen sowie eine Vielzahl funktioneller Eigenschaften von SREBP1 und SREBP2 sind gut aufgeklärt und beschrieben. Um nun die Kausalität der identifizierten Mutationen in SREBP1 und SREBP2 zu überprüfen und den pathophysiologischen Mechanismus dieser Mutationen aufzuklären, wurden im Rahmen dieser Arbeit funktionelle Studien durchgeführt. Im Jahre 2002 identifizierten P.Y Muller und A.R. Miserez bei einem Patienten mit Hypercholesterinämie eine Substitution der Aminosäure Arginin an Position 645 gegen Glutamin in SREBP2 (Muller et al., 2002). Die kausale Relevanz dieser Veränderung ist unbekannt und es wurden

keine funktionellen Studien durchgeführt. Daher wurde diese Variante in die Analysen mit einbezogen und ebenfalls funktionell charakterisiert.

4.1.7.1 Die Mutationen in SREBP1 und SREBP2 führen zu einer verminderten *LDLR*-Expression

Im Golgi-Apparat erfolgt eine sterolsensitive Prozessierung der SREBP1 und SREBP2-Vorläuferproteine. Die proteolytisch abgespaltenen N-terminalen Transkriptionsfaktor-Domänen der Proteine SREBP1 und SREBP2 übernehmen die transkriptionelle Kontrolle der intrazellulären Cholesterinbiosynthese. Sie binden spezifisch an die SRE's in den Promotoren ihrer Zielgene, die eine zentrale Rolle im Lipidstoffwechsel spielen. Zur Testung, ob die identifizierten Mutationen in der C-terminalen Domäne von SREBP1 und SREBP2 die Expression des Zielgens *LDLR* beeinträchtigen, wurde ein *Luciferase Reporter Assay* durchgeführt. Hierzu wurden zunächst die kodierenden Sequenzen der wildtypischen und mutanten SREBP-Proteine in den Expressionsvektor pcDNA3.1 / V5-His-TOPO kloniert. Die wildtypische Promotorregion des *LDLR*-Gens von Position -1 bis -704 5' vom ATG Startcodon wurde zuvor schon in den Vektor pGL4.10[luc2] kloniert (siehe 4.1.3). Anschließend wurden HEK-293-Zellen mit dem *LDLR*-Promotor-Reportergen-Konstrukt pGL4.10[luc2]_LDLR_Promotor_WT und zusätzlich mit einem der pcDNA3.1 / V5-His-TOPO Konstrukte mit dem Insert HSV-S1_WT-FLAG (S1_{WT}), HSV-S1_812-FLAG (S1₈₁₂), S2_WT-FLAG (S2_{WT}), S2_645-FLAG (S2₆₄₅) oder S2_852-FLAG (S2₈₅₂) transfiziert. Außerdem wurden HEK-293-Zellen zur Kontrolle entweder nur mit dem Kontroll-Vektor pcDNA3.1 *lac Z* (-), der weder die Promotorregion von *LDLR* noch das Reportergen enthält oder dem Kontroll-Vektor und dem *LDLR*-Promotor-Reportergen-Konstrukt (K) transfiziert. Jeweils co-transfiziert wurde das Expressionskonstrukt pGL4.7[*hRluc*] für die *Renilla-Luciferase*, welche als interne Transfektionskontrolle diente. Die Aktivierung der Luciferase-Expression über den *LDLR*-Promotor wurde in Form der Luciferase-Aktivität luminometrisch bestimmt. Die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 24 in Form eines Diagramms wiedergegeben. Alle Transfektionen wurden pro Experiment im Triplikate durchgeführt.

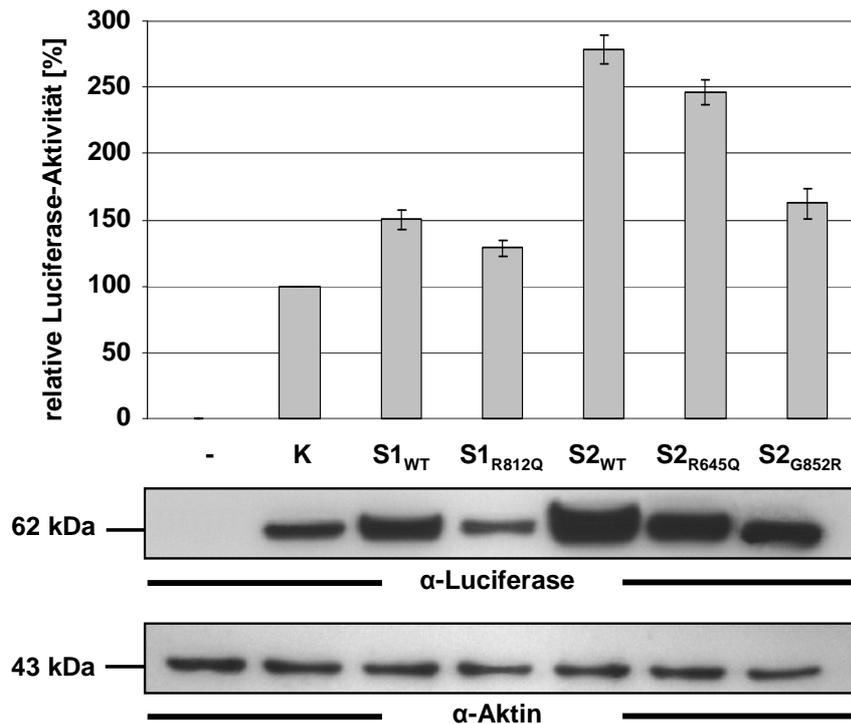


Abbildung 24: Graphische Darstellung der relativen Luciferase-Aktivität und repräsentative Western Blots der Zell-Lysate, welche im *Luciferase Reporter Assay* eingesetzt wurden, zur Verifizierung der Messwerte. Zellen wurden folgendermaßen transfiziert: - = Kontroll-Vektor, K = *LDLR*-Promotor-Reportergen-Konstrukt + Kontroll-Vektor, Säulen 3-7: *LDLR*-Promotor-Reportergen-Konstrukt + Expressionsvektoren für wildtypisches oder mutantes SREBP1 oder SREBP2. Die gemessenen absoluten Werte der *Firefly*-Luciferase-Aktivitäten wurden jeweils mit der entsprechenden *Renilla*-Luciferase-Aktivität zur Transfektionskontrolle normalisiert. Die Luciferase-Aktivität von K wurde gleich 100 % gesetzt und die restlichen Werte in Relation dazu dargestellt.

Die relative Luciferase-Aktivität des Kontroll-Vektors pcDNA3.1 *lac Z* lag erwartungsgemäß bei 0 %. Die Überexpression der SREBP1- und SREBP2-Proteine in den HEK-293-Zellen führte zu einer deutlich erhöhten Luciferase-Aktivität, verglichen mit der Luciferase-Aktivität, die durch endogen in den Zellen vorhandene Transkriptionsfaktoren erreicht wurde (K). Die Überexpression von wildtypischen SREBP1 (S1_{WT}) führte zu einer Steigerung der Luciferase-Aktivität von 100 % auf 150,34 % ($\pm 7,5$ %), die Überexpression von wildtypischen SREBP2 (S2_{WT}) führte sogar zu einer Steigerung der Luciferase-Aktivität auf 278,55 % ($\pm 11,24$ %). Für alle mutanten SREBP1- und SREBP2-Proteine konnte gezeigt werden, dass die Luciferase-Aktivitäten im Vergleich zu den wildtypischen Proteinen deutlich reduziert wurden. Die stärkste Reduktion lag für das Protein SREBP2 mit der Mutation p.G852R (S2_{G852R}) vor. Das mutante Protein führte nur zu einer Erhöhung der Luciferase-Aktivität auf 162,56 % ($\pm 11,5$ %), verglichen mit der Luciferase-Aktivität, die durch endogen in den Zellen vorhandene Transkriptionsfaktoren erreicht wurde (K). Somit war das Protein SREBP2 durch die Mutation p.G852R um mehr als die Hälfte in seiner Funktion, bzw. der

Fähigkeit die Expression der Luciferase zu aktivieren, reduziert. Der nachweisbare negative Effekt des anderen mutanten SREBP2-Proteins fiel etwas geringer aus. Die Mutation p.R645Q in SREBP2 (S2_{R645Q}) führte, im Vergleich zum wildtypischen Protein, nur zu einer um 20 % reduzierten Aktivierung der Luciferase-Expression. Weiterhin zeigte die Analyse der Luciferase-Aktivität, dass die Aktivierung der Luciferase-Expression durch SREBP1 mit der Mutation p.R812Q (S1_{R812Q}), verglichen mit dem wildtypischen Protein (S1_{WT}), um etwa die Hälfte reduziert war. Der Nachweis von Luciferase in den Zell-Lysaten, welche für den *Luciferase Reporter Assay* eingesetzt wurden, mittels Western Blot, bestätigte die luminometrisch gemessenen Luciferase-Aktivitäten (siehe Abb. 24).

Hohe intrazelluläre Cholesterinkonzentrationen verhindern die Prozessierung der SREBP-Vorläuferproteine im Golgi-Apparat, wodurch die Transkription von Zielgenen inhibiert wird. Zur internen Kontrolle des physiologischen Systems wurde der *Luciferase Reporter Assay*, wie oben beschrieben, unter induzierenden und supprimierenden Bedingungen wiederholt. Hierfür wurden andere Expressionsvektoren für wildtypisches und mutantes SREBP2 verwendet. Im pcDNA3.1 / V5-His-TOPO Vektor wird die Expression durch den konstitutiven CMV Promotor gesteuert, was zu einer sehr starken Überexpression der Proteine führt, die eine Regulation des Systems durch Sterole nicht mehr zulässt. Aus diesem Grund wurden die kodierenden Sequenzen der wildtypischen und mutanten SREBP2-Proteine in den Expressionsvektor pTK-HSV kloniert, in welchem die Expression durch den schwachen Herpes Simplex Virus Thymidinkinase Promotor reguliert wird. Um die supprimierenden Bedingungen zu erhalten, wurde den Zellen 5 h nach Transfektion Cholesterol und 25-Hydroxycholesterol zugefügt. Die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 25 in Form eines Diagramms wiedergegeben. Alle Transfektionen wurden pro Experiment im Triplikat durchgeführt.

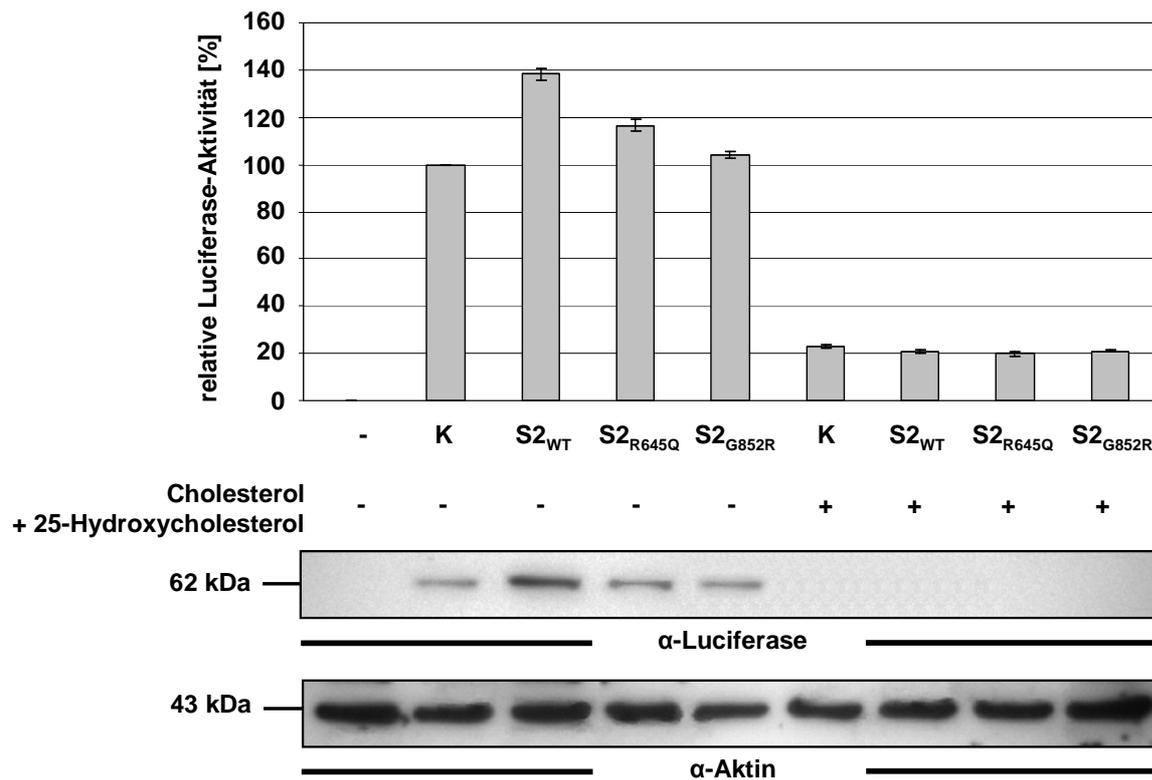


Abbildung 25: Graphische Darstellung der relativen Luciferase-Aktivität und repräsentative Western Blots der Zell-Lysate, welche im *Luciferase Reporter Assay* eingesetzt wurden, zur Verifizierung der Messwerte. Zellen wurden folgendermaßen transfiziert: - = Kontroll-Vektor, K = *LDLR*-Promotor-Reportergen-Konstrukt + Kontroll-Vektor, Säulen 3-5 und 7-9: *LDLR*-Promotor-Reportergen-Konstrukt + Expressionsvektoren für wildtypisches oder mutantes SREBP2. -/+ = ohne / mit Cholesterol und 25-Hydroxycholesterol. Die gemessenen absoluten Werte der *Firefly*-Luciferase-Aktivitäten wurden jeweils mit der entsprechenden *Renilla*-Luciferase-Aktivität zur Transfektionskontrolle normalisiert. Die Luciferase-Aktivität von K wurde gleich 100 % gesetzt und die restlichen Werte in Relation dazu dargestellt.

Das Ergebnis des *Luciferase Reporter Assays*, bei welchem die pcDNA3.1 / V5-His-TOPO Expressionsvektoren verwendet wurden, konnte beim *Luciferase Reporter Assay*, der mit den pTK-HSV Expressionsvektoren durchgeführt wurde, bestätigt werden. Die relative Luciferase-Aktivität des Kontroll-Vektors pcDNA3.1 *lac Z* lag erwartungsgemäß wieder bei 0 %. Unter induzierenden Bedingungen führte die Überexpression der SREBP2-Proteine zu einer erhöhten Luciferase-Aktivität, verglichen mit der Luciferase-Aktivität, die durch endogen in den Zellen vorhandene Transkriptionsfaktoren erreicht wurde (K). Für die mutanten SREBP2-Proteine konnte gezeigt werden, dass die Luciferase-Aktivitäten im Vergleich zu dem wildtypischen Protein signifikant reduziert wurden. Die Reduktion der Luciferase-Aktivität fiel unter der Verwendung der pTK-HSV Expressionsvektoren bei den mutanten Proteinen sogar noch etwas größer aus, als unter Verwendung der pcDNA3.1 / V5-His-TOPO Expressionsvektoren. Die Zugabe von Cholesterol und 25-Hydroxycholesterol führte zu einer fast vollständigen Inhibierung des Systems. Sowohl bei dem wildtypischen, als

auch den mutanten Proteinen, führten die supprimierenden Bedingungen zu einer Reduktion der Luciferase-Aktivität auf 20 %. Die reduzierte Aktivierung der Luciferase-Expression durch die mutanten Proteine konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Durch die Sterole wurde nicht nur die Prozessierung des überexprimierten wildtypischen Proteins und der überexprimierten mutanten Proteine inhibiert, sondern auch die der endogen in den Zellen vorhandenen SREBP-Proteine. In Zellen, die mit dem *LDLR*-Promotor-Reportergen-Konstrukt und dem Kontroll-Vektor transfiziert wurden, konnte ebenfalls nur noch eine Luciferase-Aktivität von 20 % nachgewiesen werden. Der Nachweis von Luciferase in den Zell-Lysaten, welche für den *Luciferase Reporter Assay* eingesetzt wurden, mittels Western Blot, bestätigte die luminometrisch gemessenen Luciferase-Aktivitäten (siehe Abb. 25). Unter supprimierenden Bedingungen war die Menge an exprimierter Luciferase so gering, dass das Protein auf der Membran nicht mehr detektiert werden konnte.

Die Ergebnisse der *Luciferase Reporter Assays* zeigten, dass es sich bei den identifizierten Mutationen um kausale Mutationen handelt. Die Mutationen in der C-terminalen Domäne von SREBP1 und SREBP2 führten zu einer reduzierten Expression des Zielgens *LDLR* und erklären somit die erhöhte LDL-Konzentration im Serum der Patienten.

4.1.7.2 Die Mutationen in SREBP1 und SREBP2 führen zu einer verminderten Interaktion mit dem Protein SCAP

Die reduzierte Expression des Gens *LDLR*, zu der die Mutationen in SREBP1 und SREBP2 führen, ist nicht auf eine verminderte Bindung der reifen Transkriptionsfaktoren an das SRE in der Promotorregion von *LDLR* zurückzuführen. Die identifizierten Mutationen sind in der regulatorischen C-terminalen Domäne der Proteine lokalisiert, die im Golgi-Apparat proteolytisch von der N-terminalen Transkriptionsfaktor-Domäne abgespalten wird. Demnach beeinträchtigen die Mutationen den Signalweg vermutlich vor der Prozessierung. In der Membran des endoplasmatischen Retikulums interagiert die regulatorische C-terminale cytoplasmatische Domäne von SREBP1 und SREBP2 mit der hydrophilen C-terminalen cytoplasmatischen WD-Domäne von SCAP (Sakai et al., 1997). Es wird eine konstitutive Wechselwirkung der beiden Proteine postuliert. Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob die Mutationen in SREBP1 und SREBP2 zu einer verminderten Interaktion zwischen diesen Proteinen und SCAP führen. Um die Hypothese zu prüfen, wurde eine *in vitro*-Interaktionsstudie etabliert, mit der die Bindung der wildtypischen und mutanten Proteine an SCAP untersucht wurde. Hierzu wurden die wildtypischen und mutanten C-terminalen Domänen von SREBP1 und SREBP2 in den bakteriellen Expressionsvektor

pGEX-4T-1 kloniert und nach Transformation von BL21(DE3) Zellen als GST-Fusionsproteine exprimiert. Die Aufreinigung der cytoplasmatisch gelösten Proteine erfolgte nach Ultraschall-Lyse der Bakterien über Affinitätspräzipitation an Glutathion-Agarose. Um genug Protein zu erhalten, wurde in einem Test-Experiment die optimale Expressionsdauer für jedes Protein bestimmt (siehe Abb. 26). Anhand der Coomassie-gefärbten SDS-Gele wurde ersichtlich, dass für das wildtypische und mutante GST-SREBP1-Fusionsprotein eine Expressionsdauer von 3 h am effizientesten war, da die Proteinbanden in den entsprechenden Spuren die stärkste Färbung aufwiesen. Für alle GST-SREBP2-Fusionsproteine konnte eine optimale Expressionsdauer von 4 h bestimmt werden. Für das GST-Protein alleine lag die optimale Expressionsdauer bei 5 h. Die berechneten Molekulargewichte lagen bei je 64 kDa für die wildtypischen und mutanten C-terminalen Domänen von SREBP1 und SREBP2. Für die GST-Komponente mussten bei den GST-Fusionsproteinen außerdem 28 kDa addiert werden.

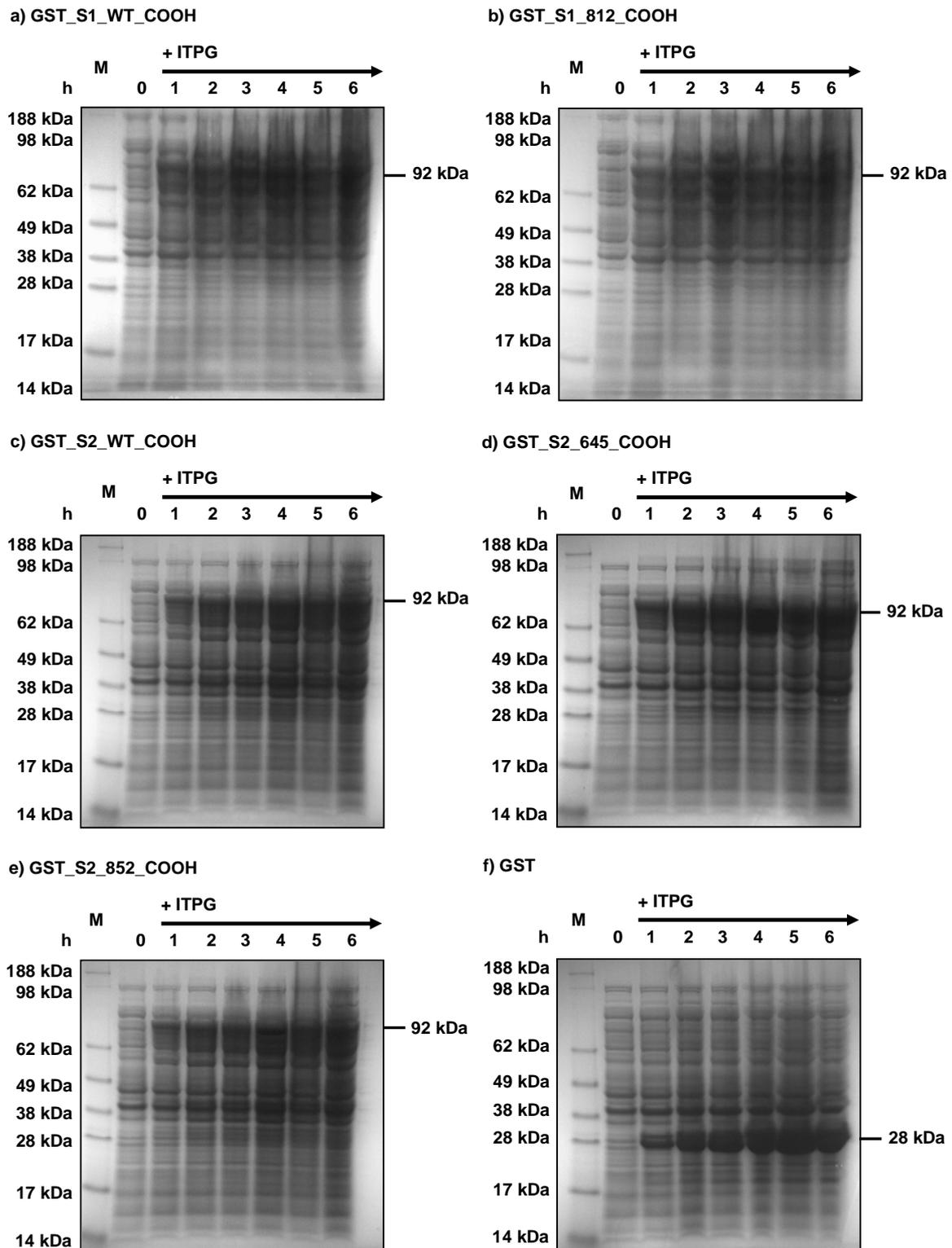


Abbildung 26: Wildtypische und mutante GST-Fusionsproteine nach Expression in BL21(DE3) Zellen (Coomassie-gefärbte SDS-Gele). 50 ml LB-Medium wurden mit Kulturen von transformierten BL21(DE3) Zellen angeimpft und unter Schütteln bei 200 rpm und 37°C bis zu einer OD_{578} von 0,6-0,8 kultiviert. Die Proteinexpression wurde durch 100 μ M IPTG induziert. Vor der Induktion und stündlich nach der Induktion wurde je 1 ml der Kulturen abgenommen. Die letzte Abnahme erfolgte nach 6 h. Nach Zentrifugation der Proben wurden die Pellets im Anschluss mit Sample Buffer und Reducing Agent versetzt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. M = Protein-Standard. Die schwarzen Striche am rechten Rand der Gele kennzeichnen die rekombinanten Proteine.

Nach Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurden HEK-293-Zellen zur Überexpression von SCAP mit dem Konstrukt pTK-HSV-SCAP-T7 transfiziert und anschließend lysiert. Um nun die Interaktion zwischen SCAP und den wildtypischen und mutanten C-terminalen Domänen von SREBP1 und SREBP2 zu analysieren, wurde mit den verschiedenen Komplexen aus GST-Fusionsproteinen und Glutathion-Agarose das Protein SCAP aus den Zell-Lysaten präzipitiert.

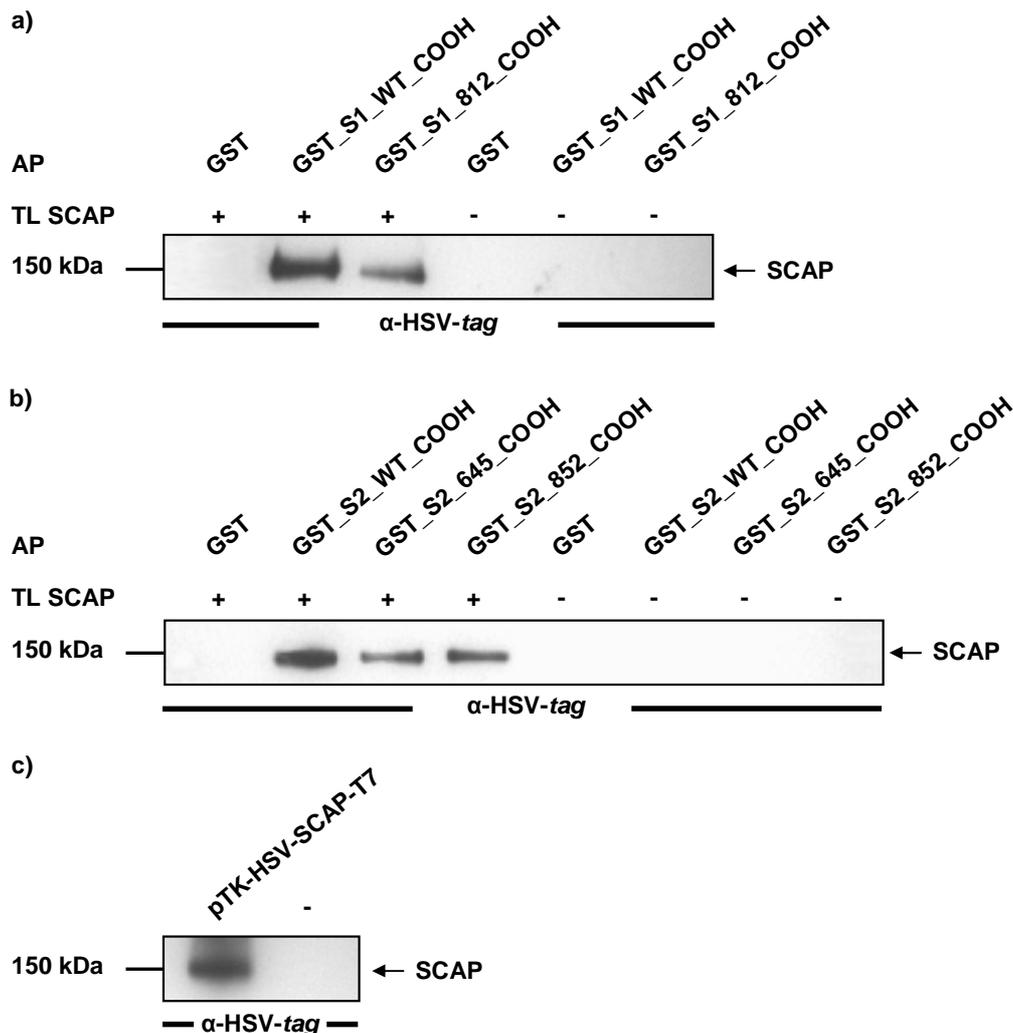


Abbildung 27: Interaktion zwischen SCAP und den wildtypischen und mutanten C-terminalen Domänen a) von SREBP1 und b) von SREBP2. HEK-293-Zell-Lysate (TL = Totallysate) von mit pTK-HSV-SCAP-T7 transfizierten Zellen (TL SCAP +) und zur Kontrolle von untransfizierten Zellen (TL SCAP -) wurden einer Affinitätspräzipitation (AP) mit GST-Fusionsproteinen unterzogen. Dazu wurden GST, GST_S1_WT_COOH, GST_S1_812_COOH, GST_S2_WT_COOH, GST_S2_645_COOH und GST_S2_852_COOH eingesetzt. Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Western Blot analysiert. Der α -HSV-tag Antikörper wurde eingesetzt, um über die verschiedenen GST-Fusionsproteine präzipitiertes SCAP zu identifizieren. Das Experiment wurde für alle SREBP1 und SREBP2 Proteine jeweils viermal durchgeführt. c) Nachweis von SCAP mittels α -HSV-tag Antikörper im Totallysate von Zellen die mit pTK-HSV-SCAP-T7 transfiziert wurden und in untransfizierten Zellen.

Aus dem Zell-Lysat von untransfizierten Zellen sowie mit dem GST-Protein alleine konnte erwartungsgemäß das SCAP-Protein nicht präzipitiert werden (siehe Abb. 27). Weiter zeigte die Analyse, dass SCAP nicht im gleichen Ausmaß von den wildtypischen und mutanten C-terminalen Domänen von SREBP1 und SREBP2 präzipitiert wurde. Mit den wildtypischen SREBP1 und SREBP2 GST-Fusionsproteinen konnte deutlich mehr SCAP präzipitiert werden, als mit den mutanten GST-Fusionsproteinen.

Die Studie führte zu dem Ergebnis, dass die identifizierten Mutationen in den regulatorischen C-terminalen cytoplasmatischen Domänen von SREBP1 und SREBP2 eine verminderte Interaktion mit der hydrophilen C-terminalen cytoplasmatischen WD-Domäne von SCAP bedingen.

4.1.7.3 Die Instabilität von mutanten SREBP-Proteinen ist nicht auf einen Abbau über das Proteasom-Ubiquitin-System zurückzuführen

In der Zelle gibt es zwei große Abbaumechanismen, über die die meisten Proteine abgebaut und recycelt werden. Dabei handelt es sich zum einen um das Proteasom-Ubiquitin-System und zum anderen um das Lysosom. Das Proteasom-Ubiquitin-System greift durch (signalgesteuerte) Proteolyse von Regulatoren oder anderen Zielproteinen kontrollierend in unterschiedliche zelluläre Funktionen ein. Es ist bekannt, dass das Proteasom-Ubiquitin-System die Stabilität von SREBPs und somit die Expression von Zielgenen reguliert. Reife SREBP-Proteine sind nach Induktion der Expression von Zielgenen sehr instabil und werden kontrolliert über das Proteasom-Ubiquitin-System degradiert (Hirano et al., 2001). Mutationen in Proteinen können zu Fehlern in der Proteinfaltung führen und fehlgefaltete und geschädigte Proteine beeinträchtigen die Zelle nachhaltig. Die Beseitigung solcher fehlerhafter Proteine ist für die Zelle von essentieller Bedeutung und wird ebenfalls vom Proteasom-Ubiquitin-System übernommen. Vorexperimente hatten gezeigt, dass vor allem das mutante p.G852R SREBP2-Vorläuferprotein eine geringere Stabilität als das wildtypische Vorläuferprotein aufweist. Für das Protein p.R645Q SREBP2 konnte nur eine geringfügige Reduktion der Stabilität im Vergleich zum wildtypischen Protein festgestellt werden. Zwischen dem wildtypischen und mutanten SREBP1-Protein wurde kein eindeutiger Unterschied in der Stabilität gefunden (Originaldaten nicht gezeigt, siehe Abb. 28). Zur Analyse, ob die eingebrachten mutanten Zielproteine einem proteolytischen Abbau über das Proteasom-Ubiquitin-System unterzogen werden, wurden HEK-293-Zellen mit den entsprechenden wildtypischen und mutanten Expressionskonstrukten für SREBP1 (pcDNA3.1 / V5-His-TOPO Konstrukte mit den Inserts HSV-S1_WT-FLAG (S1_{WT}) und HSV-S1_812-

FLAG (S1₈₁₂) und SREBP2 (pTK-HSV Konstrukte mit den Inserts HSV-S2_WT-FLAG (S2_{WT}), HSV-S2_645-FLAG (S2₆₄₅) und HSV-S2_852-FLAG (S2₈₅₂)) transfiziert und anschließend mit MG132 behandelt, bzw. zur Kontrolle nicht behandelt. MG132 ist ein spezifischer Proteasominhibitor, der die Degradierung von Ubiquitin-konjugierten Proteinen reduziert. Nach 8 h Inkubation wurden die Proteine isoliert und per Western Blot analysiert (siehe Abb. 28).

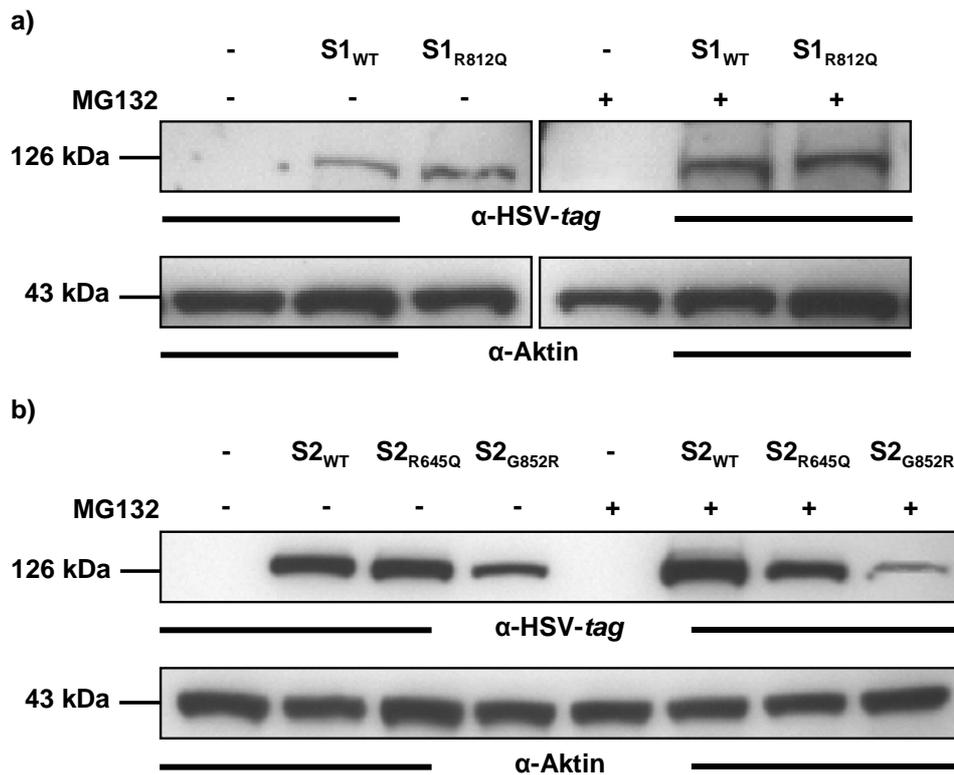


Abbildung 28: Western Blot - Proteinestabilität der wildtypischen und mutanten SREBP1- und SREBP2-Vorläuferproteine ohne und mit Inhibition des Proteasoms durch MG132. a) Stabilität der SREBP1-Proteine. Zellen wurden folgendermaßen transfiziert: Spur 1 und 4 = Leer-Vektor, Spur 2, 3, 5 und 6 = Expressionsvektoren für wildtypisches oder mutantes SREBP1. b) Stabilität der SREBP2-Proteine. Zellen wurden folgendermaßen transfiziert: Spur 1 und 5 = Leer-Vektor, Spur 2-4 und 6-8 = Expressionsvektoren für wildtypisches oder mutantes SREBP2. Die Inkubation mit MG132 erfolgte für 8 h. Die Detektion der SREBP1- und SREBP2-Vorläuferproteine erfolgte mit dem α -HSV-tag-Antikörper. Als Ladekontrolle diente Aktin.

Für alle der hier untersuchten Proteine wurde beobachtet, dass die Behandlung mit MG132 zu keiner Zunahme der Zielproteinmenge führte. Für die Instabilität der SREBP2-Proteine scheint somit das Proteasom-Ubiquitin-System keine Rolle zu spielen. Möglicherweise greifen andere Ubiquitin-unabhängige Abbauege.

Die funktionellen Analysen zeigten eine deutliche funktionelle Wirkung der Mutationen in SREBP1 und SREBP2 und somit konnte die Kausalität der Mutationen gezeigt werden. *SREBP1* und *SREBP2* sind zwei neue Gene für Hypercholesterinämie.

4.2 Mutationsanalysen in Familien mit autosomal-dominanter familiärer Hypercholesterinämie

Bei etwa einem Fünftel der Patienten der LIANCO Studie wurde die molekulare Ursache der Hypercholesterinämie identifiziert. Neben zahlreichen Mutationen in bekannten FH-Genen konnten mit Hilfe des positionsunabhängigen Kandidatengenverfahrens zwei neue krankheitsverursachende Gene für die Hypercholesterinämie identifiziert werden. Um nun die molekulare Ursache der Hypercholesterinämie noch genauer aufzuklären und weitere neue Gene zu identifizieren, sollten im Rahmen dieser Doktorarbeit klassische positionelle Klonierungs- und Kandidatengenstrategien angewendet werden. Insgesamt fünf türkische Familien (FH1-5) mit familiärer Hypercholesterinämie standen für die Analysen zur Verfügung.

4.2.1 Familie FH1

In dieser aus der Türkei stammenden Familie wird die Hypercholesterinämie bei 14 erkrankten Personen über fünf Generationen autosomal-dominant vererbt (siehe Abb. 30). Die klinischen Merkmale bei allen betroffenen Personen erlaubten die Diagnose einer klassischen familiären Hypercholesterinämie.

4.2.1.1 Mutationsanalysen in den bekannten FH-Genen

Um Mutationen in den bekannten FH-Genen zunächst auszuschließen, wurden bei dem Indexpatienten III:5 Mutationsanalysen in den Genen *LDLR*, *APOB* und *PCSK9* sowie der putativen Promotorregion von *LDLR* durchgeführt. Außerdem wurden konservierte Bindungsstellen für die miRNA Familien miR-130/301, miR-17-5p/20/93.mr/106/519.d und miR-148/152 in der 3'UTR von *LDLR* auf Mutationen untersucht. Die Mutationsanalyse umfasste die Amplifikation der Exons und Regionen, die anschließende Aufreinigung und Sequenzierung der Produkte. Mit Hilfe der MLPA-Methode wurde untersucht, ob eine krankheitsverursachende größere Deletion oder Duplikation von *LDLR* vorliegt.

Bei dem Indexpatienten III:5 konnte in den getesteten kodierenden und nicht-kodierenden Bereichen der drei Gene keine kausale Mutation gefunden werden.

Zum sicheren Ausschluss der betreffenden Genregionen (Loci) auf Chromosom 19p13.2 (*LDLR*), 2p24.1 (*APOB*) und 1p32.2 (*PCSK9*), wurden nachfolgend bei allen Patienten von denen DNA Proben vorhanden waren, polymorphe Mikrosatelliten-Marker in diesen Regionen typisiert und Haplotypen erstellt.

Die Haplotypanalyse des *LDLR*-Locus sprach nicht für eine Co-Segregation mit der Erkrankung in der Familie.

4.2.1.2 Genomweite Kopplungsanalyse

Die Familie FH1 war aufgrund ihrer Familienstruktur für eine genomweite Kopplungsanalyse geeignet. Insgesamt 12 Personen der Familie (II:4, II:8, III:6, III:9, III:10, III:12, III:13, IV:5, IV:6, IV:7, IV:8, V:2) konnten für die genomweite Kopplungsanalyse mittels Affymetrix GeneChip Human Mapping 250 K Sty Array typisiert werden.

Durch eine parametrische Analyse der Kopplungsdaten unter Berücksichtigung eines autosomal-dominanten Erbgangs, einer reduzierten Penetranz von 0,99 und einer Frequenz des Krankheitsallels von 0,0001 fanden sich keine gekoppelten Regionen mit einem statistisch signifikanten LOD-Score. Aus diesem Grund wurde eine nicht-parametrische Analyse, bei der kein Vererbungsmodell berücksichtigt wird, angewandt. Bei parameterfreien Kopplungsanalysen wird untersucht, ob bei erkrankten Verwandten ein Chromosomensegment häufiger gemeinsam auftritt, als es nach einer zufälligen, erkrankungsunabhängigen Mendelschen Verteilung zu erwarten ist. Modellfreie Methoden haben allerdings den Nachteil, dass sie über eine geringere statistische Macht zum Nachweis tatsächlich bestehender, kausaler Zusammenhänge verfügen. Man entgeht auf diese Weise aber dem Risiko, durch die Verwendung unzutreffender Modelle falsche Kopplungsergebnisse zu erhalten.

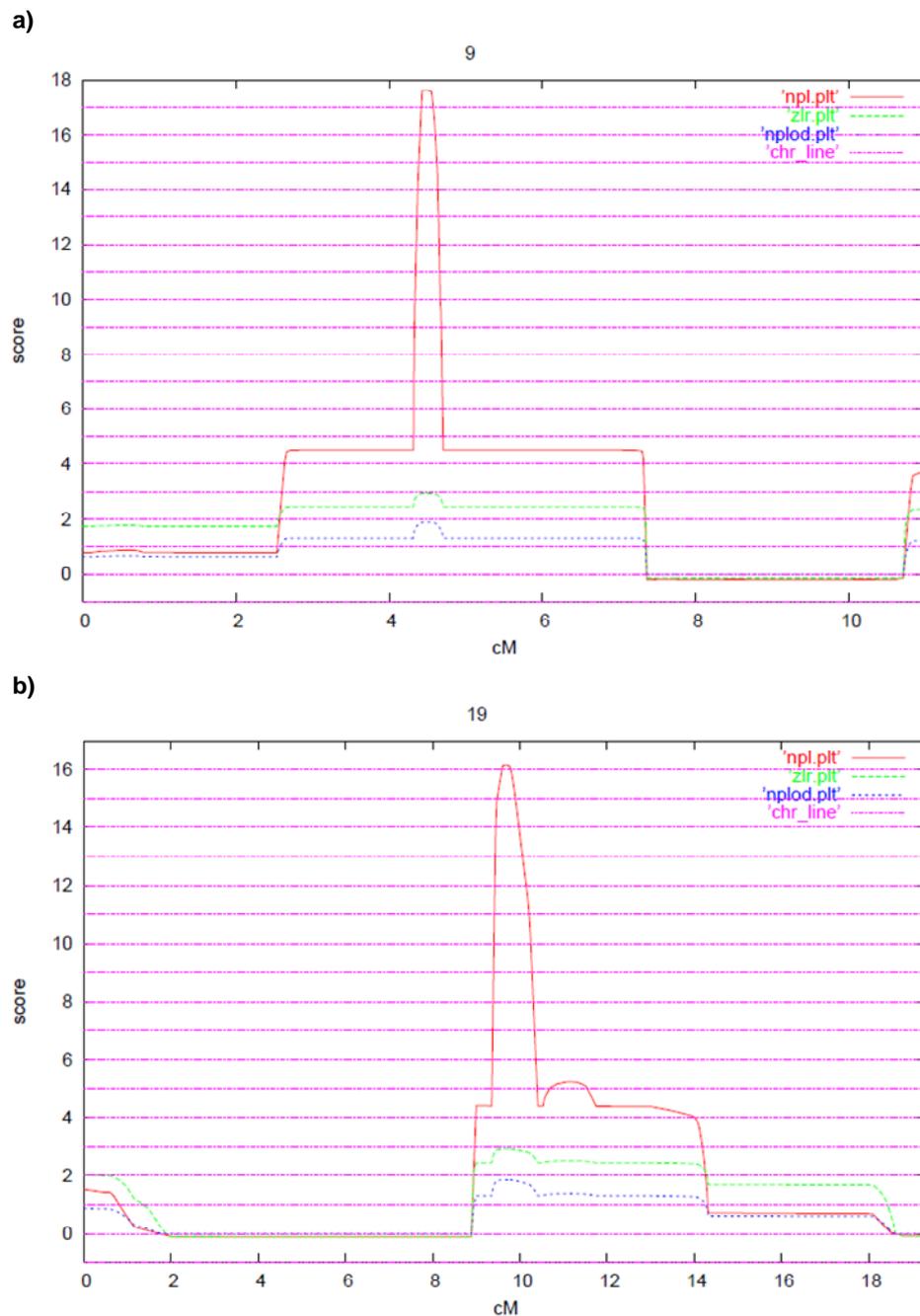


Abbildung 29: Graphische Darstellung der genomweiten nicht-parametrischen NPL-Scores. Ergebnisse für a) Chromosom 9 und b) Chromosom 19. Die rote Linie gibt den NPL-Score an.

Bei der nicht-parametrischen Analyse der Kopplungsdaten fanden sich zwei Regionen auf Chromosom 9q31.1 und Chromosom 19p13.2 mit hohen signifikanten NPL-Scores (siehe Abb. 29). Für die Region auf Chromosom 9 wurde ein NPL-Score von etwa 17,5 erreicht, auf Chromosom 19 von etwa 16. Die 4,9 Mb große Region auf Chromosom 9q31.1 wurde durch die SNPs rs4743664 und rs791868 begrenzt, während die 4,3 Mb große kritische Region auf Chromosom 19p13.2 durch die SNPs rs11666596 und rs4926157 definiert wurde. Bei der Analyse der positionellen Kandidatengene in den identifizierten Loci zeigte sich, dass in der

kritischen Region auf Chromosom 19q13.2 *LDLR* lokalisiert ist, das Hauptgen für Hypercholesterinämie, welches vorher als kausales Gen in der Familie ausgeschlossen wurde.

4.2.1.3 Identifizierung der *LDLR*-Mutation p.C222R in der Familie FH1

Mutationsanalysen in *LDLR* bei dem Indexpatienten III:5 der Familie FH1 führten zuvor zum Ausschluss einer kausalen Mutation in diesem Gen. Das Ergebnis der Kopplungs- und Haplotypanalyse mit polymorphen Mikrosatelliten-Markern für die Region auf Chromosom 19 war mit einer Kopplung der Region mit der Erkrankung nicht vereinbar (siehe Abb. 30). Zwar wurde bei sieben der neun betroffenen Familienmitgliedern ein gemeinsamer Haplotyp identifiziert (rot markiert), der möglicherweise mit der Erkrankung vererbt wird, jedoch wurde eine Co-Segregation letztendlich ausgeschlossen, da die betroffenen Mitglieder III:5 und II:8 eben diesen Haplotyp nicht trugen. Rekombinationsmarker wurden nicht identifiziert, so dass die Größe der kritischen *LDLR*-Region gegenüber der SNP-Analyse nicht weiter verringert werden konnte. Mit dem Programm LINKAGE 5.2 wurden die Zwei-Punkt-LOD-Scores der untersuchten Mikrosatelliten-Marker für die Region auf Chromosom 19q13.2 berechnet (siehe Tab. 32). Für die Analyse wurde ein autosomal-dominanter Vererbungsmodus mit einer Penetranz von 0,8 und einer Frequenz des Krankheitsallels von 0,001 verwendet. In der Literatur wurden für heterozygote *LDLR*-Mutationen Penetranzen zwischen 0,85 und 0,95 beschrieben, das heisst etwa 85-95 % der Personen mit einer Mutation in *LDLR* entwickelten den assoziierten Phänotyp (Durst et al., 2001, Pimstone et al., 1998).

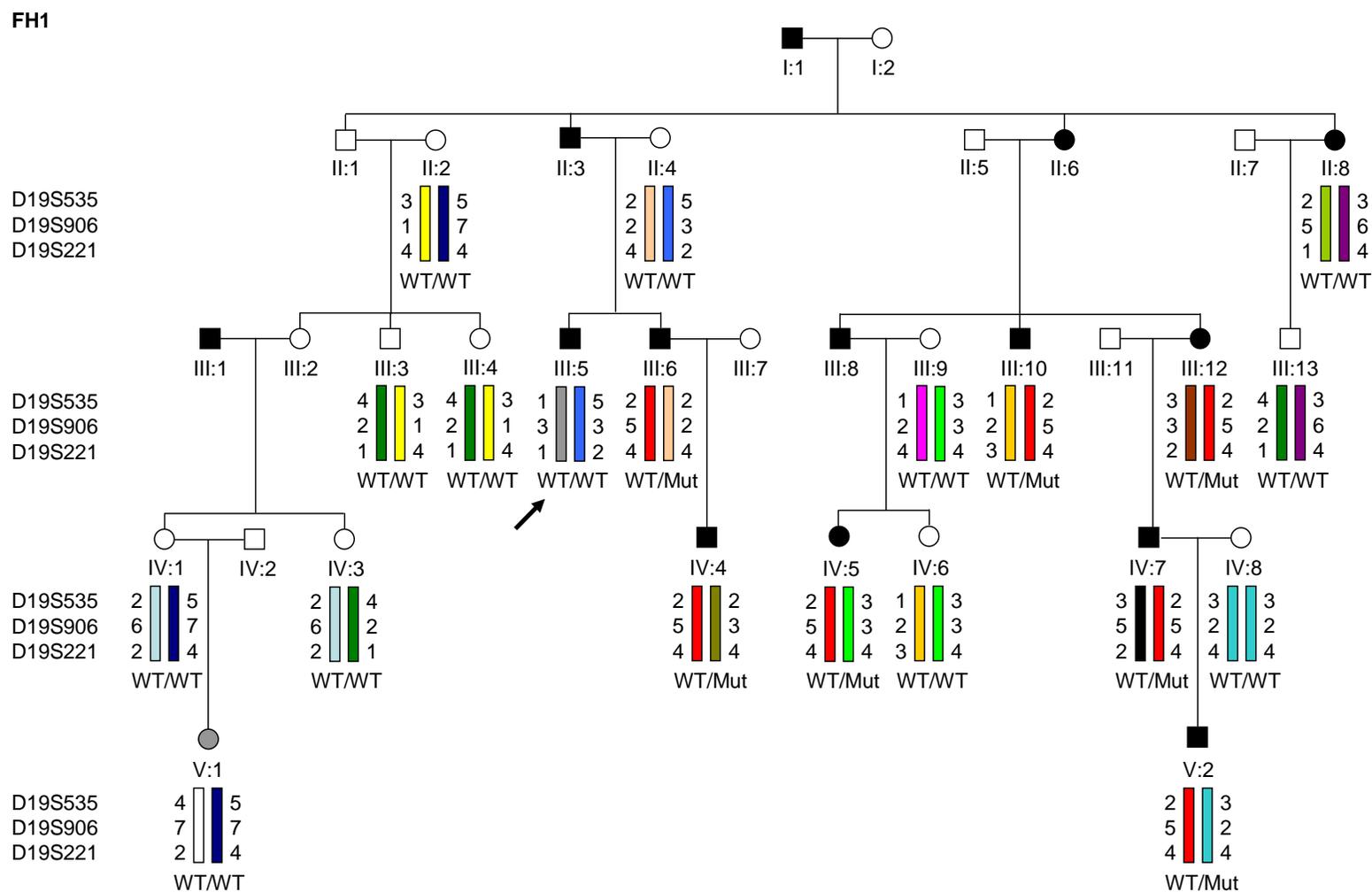


Abbildung 30: Ergebnis der Haplotypanalyse bei der Familie FH1 mit Hilfe von Mikrosatelliten-Markern auf Chromosom 19q13.2. Unterschiedliche Haplotypen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt, während identische Haplotypen jeweils mit der gleichen Farbe gekennzeichnet wurden. Unter den Haplotypen wurde angegeben, ob die Familienmitglieder heterozygote Träger der *LDLR*-Mutation p.C222R (WT/Mut) sind oder homozygot das wildtypische Allel tragen (WT/WT). Der Pfeil markiert den initial getesteten Indexpatienten III:5.

Tabelle 32: Zwei-Punkt-LOD-Score Ergebnisse der Mikrosatelliten-Marker auf Chromosom 19q13.2. Der maximale LOD-Score (Z_{\max}) für jeden Marker wird durch fetten Druck hervorgehoben

Marker	physikalische Position [Mb]	Rekombinationshäufigkeit θ						
		0,0	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
D19S535	10,2	-0,25	0,91	1,36	1,35	1,03	0,58	0,18
D19S906	11,7	-0,59	0,63	1,08	1,07	0,72	0,24	0,03
D19S221	12,5	-1,04	0,40	0,89	0,93	0,72	0,42	0,16

LDLR liegt auf Chromosom 19 bei 11,2 Mb und ist somit zwischen den Mikrosatelliten-Markern D19S535 und D19S906 lokalisiert. Die parametrische Berechnung der Zwei-Punkt-LOD-Scores erbrachte für den Marker D19S535 bei einer Rekombinationshäufigkeit von 0,05 einen maximalen LOD-Score von 1,36. Für die angrenzenden Marker wurden ebenfalls positive LOD-Scores erreicht.

Da bei der nicht-parametrischen Berechnung der genomweiten Kopplungsdaten ein hoher NPL-Score für Chromosom 19q13.2 erreicht wurde, wurde erneut eine Mutationsanalyse in *LDLR* durchgeführt, diesmal bei allen betroffenen und nicht-betroffenen Mitgliedern der Familie FH1.

Mit Ausnahme des initial getesteten Indexpatienten III:5 sowie des Patienten II:8, konnten alle restlichen betroffenen Familienmitglieder als Träger einer heterozygoten *LDLR*-Mutation identifiziert werden. Diese Tatsache war mit dem Ergebnis der Kopplungs- und Haplotypanalyse mit Mikrosatelliten-Markern vereinbar (siehe Abb. 30). Bei allen Betroffenen mit *LDLR*-Mutation konnte eine Segregation der identifizierten Mutation mit einem Haplotyp gezeigt werden (rot markiert). Die beiden Betroffenen III:5 und II:8 sowie alle gesunden Familienmitglieder ohne *LDLR*-Mutation trugen eben diesen Haplotyp nicht. Die Sequenzierung des Gens führte zur Identifizierung der heterozygoten Nukleotidsubstitution c.T664C in Exon 4 von *LDLR* (siehe Abb. 31a). Der Austausch von T>C an Position 664 auf RNA-Ebene führt dazu, dass die Aminosäure Cystein an Position 222 gegen die Aminosäure Arginin ausgetauscht wird (p.C222R). Die Mutation ist bekannt und wurde zuvor bereits in der Literatur für Hypercholesterinämie beschrieben. Mit dem Programm ConSeq wurde die Konservierung der veränderten Aminosäure untersucht (siehe Abb. 31b). Die Analyse zeigte, dass es sich bei der Aminosäure Cystein an Position 222 um eine hochkonservierte, exponierte Aminosäure mit einem funktionellen Aminosäurerest handelt.

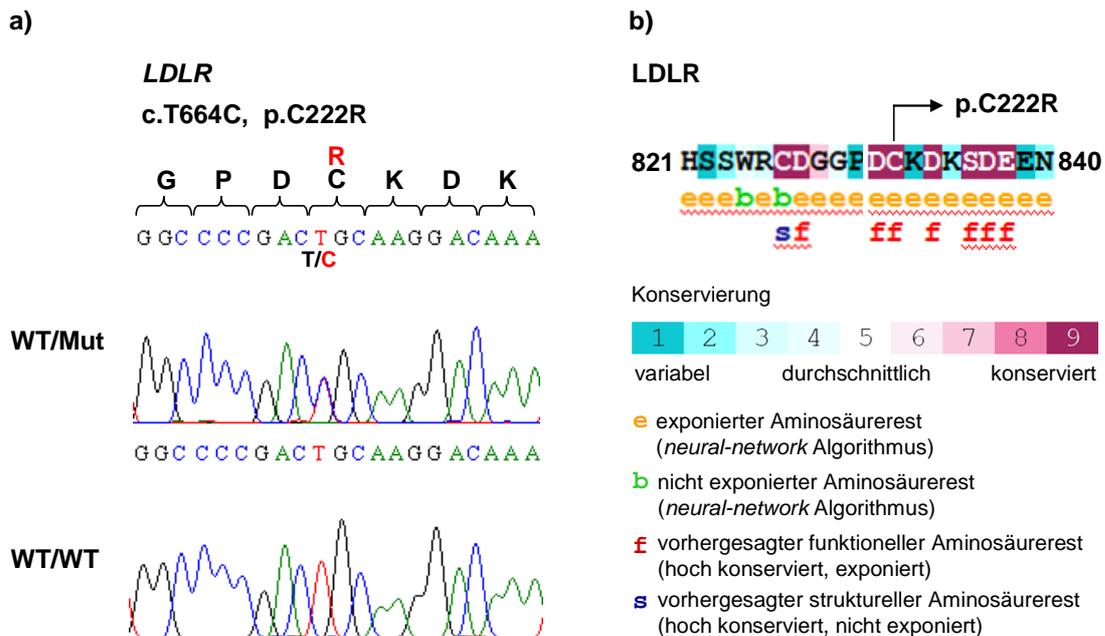


Abbildung 31: LDLR-Mutation. a) Sequenzierelektropherogramme der identifizierten *LDLR*-Mutation. Das obere Elektropherogramm zeigt die heterozygote c.T664C Mutation, die bei Betroffenen der Familie FH1 gefunden wurde. Das untere Elektropherogramm zeigt die normale WT-Sequenz. b) Konservierung der Aminosäureposition 222 in *LDLR*. Bestimmung der Konservierung sowie Identifizierung von funktionell und strukturell wichtigen Aminosäuren mit dem Programm ConSeq. Der Pfeil markiert die Aminosäure an der Position 222 in *LDLR*.

Die beiden Familienmitglieder III:5 und II:8 stellten eine Phänokopie dar. Sie prägten eine klassische Hypercholesterinämie aus und waren phänotypisch nicht von den restlichen Betroffenen der Familie zu unterscheiden, obwohl sie die *LDLR*-Mutation p.C222R nicht trugen. Die Ursache der Hypercholesterinämie ist bei den betroffenen Mitgliedern der Familie somit unterschiedlich.

4.2.1.4 Analyse der Region auf Chromosom 9q31.1

Es stellte sich die Frage, ob die zweite Region auf Chromosom 9q13.1, die sich bei der nicht-parametrischen Berechnung der Kopplungsdaten fand, eine Bedeutung hatte. Es wurde vermutet, dass in der Familie FH1 zusätzlich zur kausalen *LDLR*-Mutation noch weitere modifizierende erbliche Faktoren existieren könnten, die an die Region auf Chromosom 9 gekoppelt sind und den Phänotyp mitbestimmen. Solche genetischen Faktoren könnten möglicherweise auch eine Erklärung für die vorliegenden Phänokopien sein. Aus diesem Grund wurde der Locus genauer untersucht.

Bei der Analyse der positionellen Kandidatengene in dem identifizierten Locus fiel auf, dass in der kritischen Region das in diesem Zusammenhang besonders relevante Gen *ABCA1* liegt. *ABCA1* kodiert für einen ABC-Transporter, der in der Membran von Makrophagen lokalisiert

ist und zur großen Familie von Membranproteinen gehört, die als gemeinsames Strukturelement eine ATP-bindende Kasette besitzen und spezifisch Substrate aktiv über eine Zellmembran transportieren. Das Protein spielt eine zentrale Rolle im Lipidstoffwechsel. Mutationen des *ABCA1*-Gens wurden im Falle der Tangier-Krankheit und des erblichen HDL-Mangels beschrieben.

Der Locus konnte durch die Markeranalyse bestätigt werden (siehe Abb. 32). In der gekoppelten Region wurde ein bestimmter Haplotyp mit der Erkrankung innerhalb der Familie vererbt (rot markiert), wobei zu beachten ist, dass das nicht-betroffene Familienmitglied IV:6 ebenfalls diesen Haplotyp trug. Es besteht die Möglichkeit, dass bei dem Patienten IV:6 eine etwas andere Haplotypkonstellation als angegeben vorlag, da eine vorangegangene Rekombination beim Vater nicht ausgeschlossen werden konnte. Aufgrund der Tatsache, dass vom Vater jedoch keine DNA vorlag, konnte dies nicht nachvollzogen und geprüft werden. Rekombinationsereignisse wurden bei keinem Familienmitglied identifiziert, so dass die Größe der kritischen Region gegenüber der SNP-Analyse nicht weiter verringert werden konnte. Die Zwei-Punkt-LOD-Scores der untersuchten Mikrosatelliten-Marker für die Region auf Chromosom 9q13.1 wurden mit dem Programm LINKAGE 5.2 berechnet (siehe Tab. 33). Bei der Berechnung wurde von einem autosomal-dominanten Vererbungsmodus mit einer Penetanz von 0,8 und einer Frequenz des Krankheitsallels von 0,001 ausgegangen. Die Berechnung erbrachte für den Marker D9S1866 bei einer Rekombinationshäufigkeit von 0,1 einen maximalen LOD-Score von 1,08. Für die angrenzenden Marker wurden ebenfalls positive LOD-Scores erreicht.

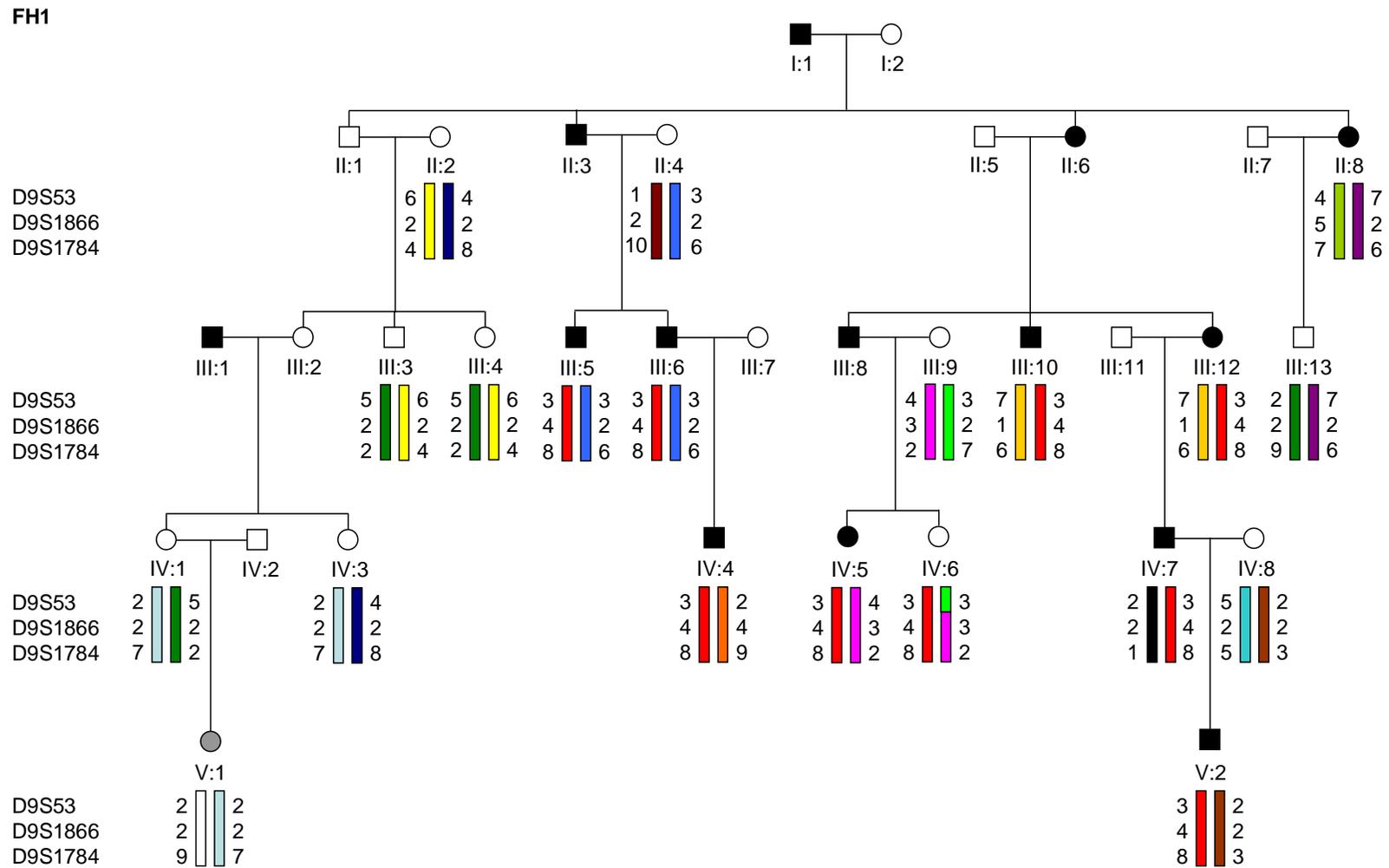


Abbildung 32: Ergebnis der Haplotypanalyse bei der Familie FH1 mit Hilfe von Mikrosatelliten-Markern auf Chromosom 9q13.1. Unterschiedliche Haplotypen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt, während identische Haplotypen jeweils mit der gleichen Farbe gekennzeichnet wurden.

Tabelle 33: Zwei-Punkt-LOD-Score Ergebnisse der Mikrosatelliten-Marker auf Chromosom 9q13.1. Der maximale LOD-Score (Z_{\max}) für jeden Marker wird durch fetten Druck hervorgehoben.

Marker	physikalische Position [Mb]	Rekombinationshäufigkeit θ						
		0,0	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
D9S53	106,6	-1,03	-0,02	0,52	0,64	0,57	0,36	0,14
D9S1866	106,8	-0,65	0,45	0,98	1,08	0,94	0,65	0,30
D9S1784	107,0	-0,73	0,33	0,85	0,95	0,81	0,53	0,22

Um zu überprüfen, ob in *ABCA1* eine Mutation vorlag, wurden bei dem Indexpatienten IV:7 alle 50 Exons und deren Spleißstellen amplifiziert und sequenziert. Es konnten jedoch keine Mutationen identifiziert werden. Die phänotypische Ausprägung bei den Mitgliedern der Familie FH1 war somit nicht auf Mutationen in den kodierenden Bereichen von *ABCA1* zurückzuführen. Es wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter überprüft, ob in der gekoppelten Region ein modifizierender genetischer Faktor vorlag, da weitere Gene auf Chromosom 9q13.1 aufgrund ihrer Funktion als nicht relevant betrachtet wurden.

4.2.2 Familien FH2-FH5

Bei vier weiteren türkischen Familien, bei denen eine klassische familiäre Hypercholesterinämie diagnostiziert wurde, sollte die molekulare Ursache der Erkrankung identifiziert werden.

4.2.2.1 Mutationsanalysen in den bekannten FH-Genen

Zum Ausschluss von Mutationen in den bekannten FH-Genen, wurden bei je einem Indexpatienten der vier Familien Mutationsanalysen in den Genen *LDLR*, *APOB* und *PCSK9* durchgeführt. Außerdem wurden die putative Promotorregion von *LDLR* sowie konservierte miRNA-Bindungsstellen in der 3'UTR von *LDLR* auf Mutationen untersucht. Krankheitsverursachende größere Deletionen oder Duplikationen von *LDLR* sollten mit Hilfe der MLPA-Methode detektiert werden.

Bei keinem Indexpatienten konnte eine kausale Mutation in den bekannten FH-Genen gefunden werden. Aufgrund der Familienstruktur (Größe der Familie, Anzahl der Betroffenen) eignete sich nur die Familie FH2 für weitere Analysen. Bei den restlichen Familien wurde die Identifizierung der molekularen Ursache der Erkrankung zunächst nicht weiter verfolgt.

4.2.2.2 Kopplungsanalyse in der Familie FH2

In der Familie FH2 wird die Hypercholesterinämie bei 11 erkrankten Personen über drei Generationen autosomal-dominant vererbt (siehe Abb. 33).

Um die betreffenden Loci auf Chromosom 19p13.2 (*LDLR*), 2p24.1 (*APOB*) und 1p32.2 (*PCSK9*) sicher auszuschließen, wurden bei allen Familienmitgliedern, von denen DNA-Proben vorhanden waren, polymorphe Mikrosatelliten-Marker in diesen Regionen typisiert und Haplotypen erstellt.

Bis auf den *LDLR*-Locus konnten alle Loci mit Hilfe der Marker- und Haplotypanalyse ausgeschlossen werden. Die vier typisierten Mikrosatelliten-Marker für Chromosom 19p13.2 waren mit einer kausalen Rolle des *LDLR*-Locus vereinbar (siehe Abb. 33). In der gekoppelten Region wurde ein bestimmter Haplotyp mit der Erkrankung innerhalb der Familie vererbt (rot markiert).

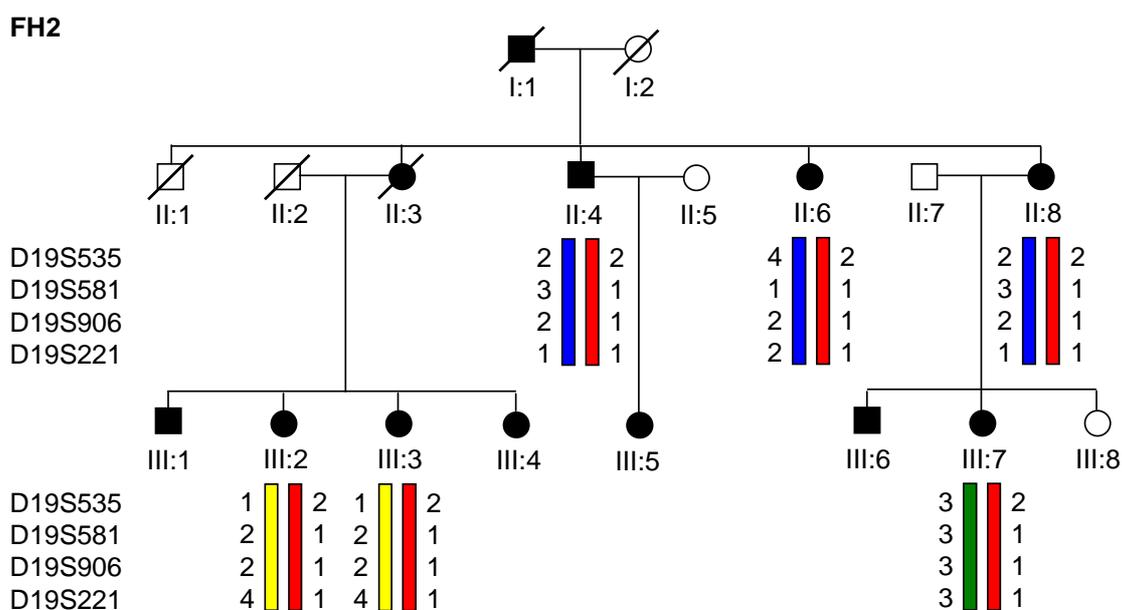


Abbildung 33: Ergebnis der Haplotypanalyse bei der Familie FH2 mit Hilfe von Mikrosatelliten-Markern auf Chromosom 19q13.2. Unterschiedliche Haplotypen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt, während identische Haplotypen jeweils mit der gleichen Farbe gekennzeichnet wurden.

Das Ergebnis wurde durch die parametrische Berechnung der Zwei-Punkt-LOD-Scores bestätigt, welche einen maximalen LOD-Score von 0,55 für den Marker D19S906 zeigte, sowie weitere positive LOD-Scores für die angrenzenden Marker (siehe Tab. 34). Eine Rekombinationshäufigkeit von 0,0 wurde bestätigt.

Tabelle 34: Zwei-Punkt-LOD-Score Ergebnisse der Mikrosatelliten-Marker auf Chromosom 19q13.2. Der maximale LOD-Score (Z_{\max}) für jeden Marker wird durch fetten Druck hervorgehoben.

Marker	physikalische Position [Mb]	Rekombinationshäufigkeit θ						
		0,0	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
D19S535	10,2	0,32	0,32	0,28	0,23	0,14	0,07	0,02
D19S581	10,5	0,23	0,22	0,17	0,12	0,05	0,01	0,00
D19S906	11,7	0,55	0,54	0,46	0,38	0,22	0,10	0,03
D19S221	12,5	0,32	0,32	0,28	0,23	0,14	0,07	0,02

4.2.2.3 Identifizierte Veränderungen in *LDLR*

Mutationsanalysen in *LDLR* bei dem Indexpatienten II:8 der Familie FH2 führten zum Ausschluss einer kausalen Mutation in diesem Gen, dennoch konnte eine Kopplung der Erkrankung mit dem *LDLR*-Locus nicht ausgeschlossen werden. Es stellte sich nun die Frage, ob versehentlich eine kausale Mutation übersehen wurde.

Bei der Mutationsanalyse wurden beim Indexpatienten II:8 sieben Sequenzveränderungen gefunden, die in den Datenbanken als SNPs annotiert waren und somit zunächst nicht als pathogen eingestuft wurden (siehe Tab. 35). Eine Co-Segregation der Sequenzveränderungen mit der Erkrankung innerhalb der Familie wurde noch nicht überprüft.

Tabelle 35: Übersicht über detektierte SNPs

Veränderung	Lokalisation	Referenz SNP ID	verändertes Spleißen
c.940+36G>A	Intron 6	rs13306513	unwahrscheinlich
c.1060+7T>C	Intron 7	rs273442	unwahrscheinlich
c.1060+10G>C	Intron 7	rs 12710260	unwahrscheinlich
c.1359-30C>T	Intron 9	rs1003723	unwahrscheinlich
c.1706-69G>C	Intron 11	rs7259278	unwahrscheinlich
c.2389+47G>A	Intron 16	rs13306501	unwahrscheinlich
c.2548-42A>G	Intron 17	rs6413504	unwahrscheinlich

Es ist bekannt, dass selbst krankheitsverursachende Mutationen fälschlicherweise als sehr seltene SNPs in den Datenbanken verzeichnet wurden. Alle identifizierten Sequenzveränderungen sind in den intronischen Bereichen von *LDLR* lokalisiert und beeinflussen möglicherweise das Spleißen. Zur Testung, ob die Veränderungen tatsächlich Auswirkungen auf das Spleißen haben könnten, wurden *in-silico*-Prädiktionen durchgeführt.

Eine Analyse mit verschiedenen Spleißvorhersage-Programmen ergab, dass alle identifizierten intronischen SNPs mit hoher Wahrscheinlichkeit zu keinem veränderten Spleißen führen. Im Jahre 2002 identifizierten Amsellem et al. bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie ebenfalls die Sequenzveränderung c.1060+10G>C und außerdem einen Austausch von G>A an derselben Position (Amsellem et al., 2002). Analysen mit einem Spleißvorhersage-Programm (<http://www.fruitfly.org>) ergaben bei Ihnen für die putative neue

Donorspleißstelle an Position c.1060+10 eine Erhöhung des *splice scores* von 0,24 für das wildtypische G-Allel auf 0,87 für das mutante A-Allel, so dass wahrscheinlich eine Konkurrenz zwischen der aberranten und der natürlichen Donorspleißstelle entsteht. Ein verändertes Spleißen für das mutante C-Allel wurde auch bei ihren Analysen nicht vorhergesagt.

Nach Bestätigung einer Co-Segregation der Sequenzveränderungen mit der Erkrankung innerhalb der Familie sollte zur Analyse eines tatsächlichen Effektes der identifizierten Sequenzveränderungen auf das Spleißen der mRNA von *LDLR* eine RT-PCR mit RNA eines Indexpatienten und eines gesunden Kontroll-Individuums durchgeführt werden. Jedoch stand keine RNA von betroffenen Mitgliedern der Familie FH2 zur Verfügung, so dass auch hier weitere Analysen in der Familie nicht durchgeführt wurden.

4.3 Identifizierung der molekularen Ursache von Woodhouse-Sakati-ähnlichen Syndromen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die molekulare Ursache von autosomal-rezessiven Woodhouse-Sakati-ähnlichen Syndromen mittels positioneller Klonierung aufgeklärt werden. Insgesamt wurden sieben Familien (HYPO1-7) analysiert, bei denen unter anderem Hypogonadismus und Alopezie diagnostiziert wurde. Weitere Symptome, die teilweise bei den Betroffenen in unterschiedlicher phänotypischer Ausprägung vorlagen waren beispielsweise extrapyramidale Störungen, Müller-Gang Hypoplasie sowie mentale Retardierung.

4.3.1 Familie HYPO1

Initial standen für die Analysen DNAs einer konsanguinen, türkischen Familie (HYPO1), in der bei zwei Schwestern ein Woodhouse-Sakati-ähnliches Syndrom diagnostiziert worden war zur Verfügung (siehe Abb. 34) (Tatar et al., 2009). Die Eltern der beiden betroffenen Schwestern sind Cousin und Cousine ersten Grades und haben vier weitere Töchter, die gesund sind. Bei beiden betroffenen Schwestern wurde im Alter von 23 bzw. 34 Jahren primärer hypergonadotroper Hypogonadismus, partielle Alopezie sowie eine Hypoplasie des Müller-Gangs festgestellt. Damit assoziiert waren milde mentale Retardierung, Mikrozephalie, flaches Hinterhaupt, kurze und spärliche Augenbrauen, milde bis mäßige Kyphose und eine dünne Oberlippe. Weder Ovarien und Uterus, noch Brustgewebe waren vorhanden. Bei einer der Schwestern lag zusätzlich eine unilaterale sensorineurale Schwerhörigkeit vor.

Extrapyramidale Störungen sowie Diabetes mellitus wurden nicht diagnostiziert, jedoch waren die Serumwerte des strukturell dem Insulin sehr ähnlichen Wachstumsfaktors IGF-1 im Vergleich zu normalen Individuen reduziert.

4.3.1.1 Kopplungsanalyse und Mutationsanalysen in positionellen Kandidatengen in der Familie HYPO1

Zur Identifikation und positionellen Klonierung des ursächlichen Gens wurde eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt. Alle acht Mitglieder der Familie wurden mittels Affymetrix GeneChip Human Mapping 250 K Sty Array typisiert.

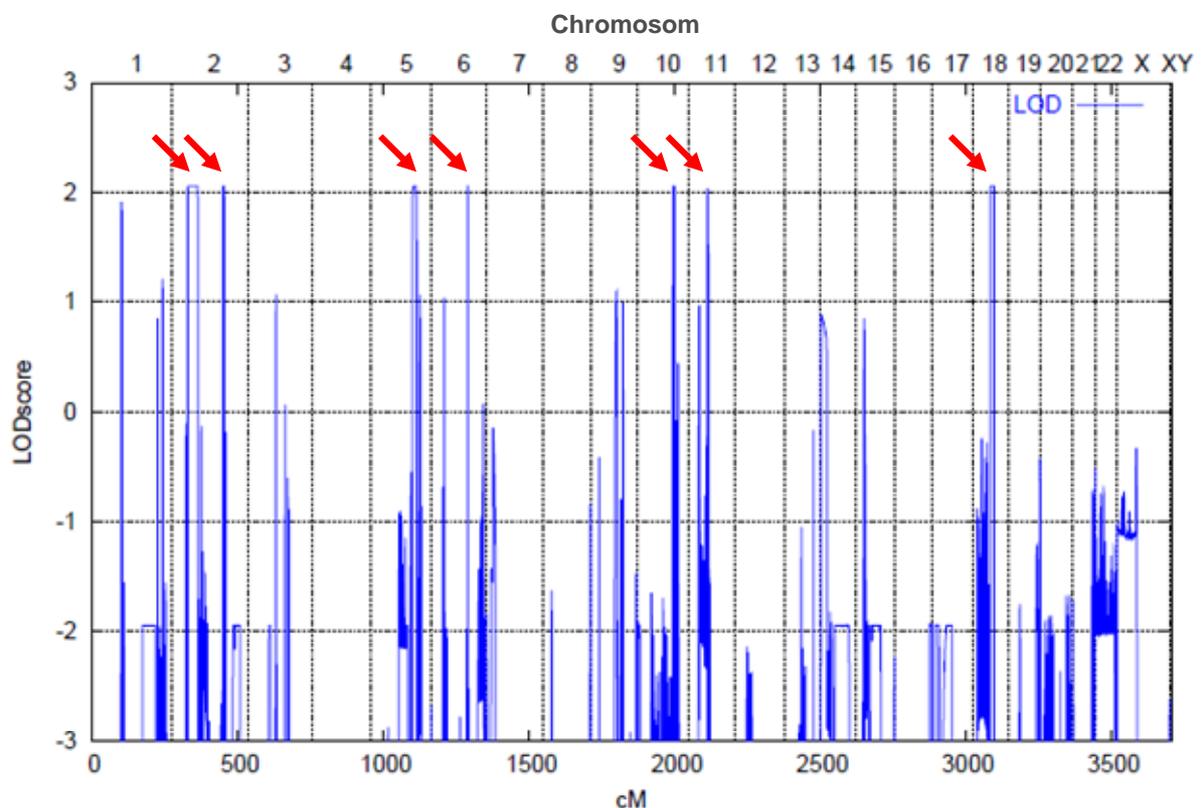


Abbildung 34: Graphische Darstellung der genomweiten parametrischen LOD-Score Ergebnisse. Die sieben Regionen, welche den theoretisch maximalen LOD-Score zeigten, sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

Unter Berücksichtigung eines autosomal-rezessiven Erbgangs und der Annahme von *homozygosity by descent* aufgrund der parental Konsanguinität, wurde ein theoretisch maximaler parametrischer LOD-Score von 2,06 für sieben Loci auf Chromosom 2p22.3-2p13.3 (34,9 Mb), 2q31.1 (5,3 Mb), 5q31.3-5q33.1 (9,0 Mb), 10q25.1-10q25.2 (6,2 Mb), 11q12.1-11q12.2 (0,6 Mb) und 18q12.3-18q21.2 (12,8 Mb) erreicht (siehe Abb. 34). Diese

sieben putativen Regionen wurden auch durch nicht-parametrische NPL-Scores bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Zur Überprüfung der möglichen Kopplung der sieben Loci mit der Erkrankung und der gefundenen Homozygotie mit einer weiteren Methode sowie zur Feinkartierung der Intervallgrenzen, wurden polymorphe Mikrosatelliten-Marker innerhalb dieser Regionen typisiert und Haplotypen für alle Familienmitglieder erstellt.

Durch die Analyse konnten die putativen Krankheitsloci auf Chromosom 2p22.3-2p13.3, 10q25.1-10q25.2, 11q12.1-11q12.2 und 18q12.3-18q21.2 ausgeschlossen werden. Homozygotie der Regionen auf Chromosom 2q31.1 und 5q31.3-5q33.1 konnte durch die Markeranalyse bestätigt werden.

Eine anschließende Analyse der positionellen Kandidatengene beruhte zunächst auf der Überlegung, ob die bekannten funktionellen Eigenschaften der Gene mit den Symptomen in der Familie vereinbar waren. Als besonders relevante Kandidatengene der Regionen wurden *DLX1*, *DLX2*, *GPR155* (2q31.1) und *FGF1* (5q31.1-5q33.1) betrachtet. Alle Exons und deren Spleißstellen der vier Gene wurden bei der Indexpatientin II:2 amplifiziert und sequenziert. Krankheitsauslösende Mutationen waren in keinem der Gene nachweisbar.

Während der Sequenzierung von Kandidatengen wurde ein Gen für das pleiotrope Woodhouse-Sakati Syndrom veröffentlicht (Alazami et al., 2008). Die seltene systemische Erkrankung ist vor allem charakterisiert durch Hypogonadismus, Alopezie, Diabetes mellitus, mentale Retardierung, extrapyramidale Störungen und Schwerhörigkeit (Medica et al., 2007, Woodhouse et al., 1983). Alazami et al. identifizierten das bis dato nicht annotierte *C2orf37*-Gen und beschrieben eine homozygote 1Bp-Deletion, die sich als Gründermutation in der saudi-arabischen Population herausstellte sowie drei weitere homozygote *loss-of-function* Mutationen in Patienten anderer Ethnizitäten. Außerdem zeigten sie, dass das *C2orf37*-Protein im Nucleolus vorkommt, über seine Funktion dort ist jedoch nichts weiter bekannt. Aufgrund der phänotypischen Überlappungen wurde *C2orf37* als relevantes Kandidatengen für das diagnostizierte Syndrom in Familie HYPO1 in Betracht gezogen.

C2orf37 liegt auf Chromosom 2q31.1 und somit genau in dem Locus, für den eine mögliche Kopplung mit der Erkrankung in der Familie HYPO1 identifiziert wurde. In Abbildung 35 ist das Ergebnis der Haplotypanalyse bei der Familie HYPO1 mit Hilfe von Mikrosatelliten-Markern auf Chromosom 2q31.1 dargestellt. Beide betroffenen Schwestern zeigten Homozygotie für sieben Marker. *C2orf37* liegt zwischen den Markern D2S2177 und D2S333.

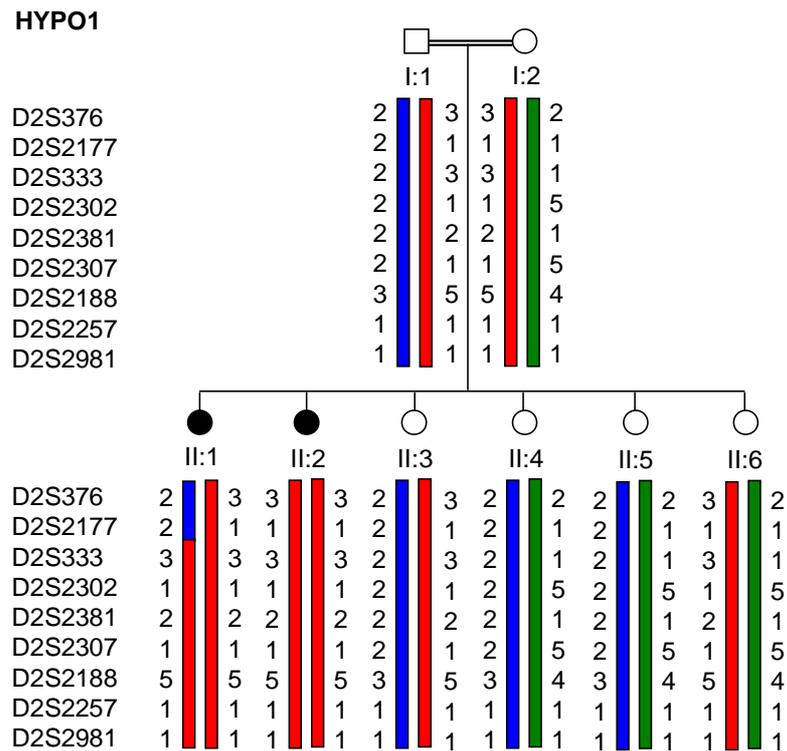


Abbildung 35: Ergebnis der Haplotypanalyse bei Familie HYPO1 mit Hilfe von Mikrosatelliten-Markern auf Chromosom 2q31.1. Unterschiedliche Haplotypen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt, während identische Haplotypen jeweils mit der gleichen Farbe gekennzeichnet wurden. Bei den Betroffenen lag Homozygotie für diesen Locus auf Chromosom 2 vor.

Die parametrische Berechnung der Zwei-Punkt LOD-Scores der untersuchten Marker bestätigte das Ergebnis (siehe Tab. 36). Die Berechnung mit dem Programm LINKAGE 5.2 erfolgte unter der Annahme eines autosomal-rezessiven Vererbungsmodus und einer Frequenz des Krankheitsallels von 0,001. Der theoretisch maximale LOD-Score von 1,64 wurde für die Marker D2S333, D2S2302, D2S2307 und D2S2188 bei einer Rekombinationshäufigkeit von 0,0 erbracht. Für die Marker D2S376 und D2S2177 wurde eine Kopplung mit der Erkrankung ausgeschlossen.

Tabelle 36: Zwei-Punkt-LOD-Score Ergebnisse der Mikrosatelliten-Marker auf Chromosom 2q31.1. Der maximale LOD-Score (Z_{\max}) für jeden Marker wird durch fetten Druck hervorgehoben.

Marker	physikalische Position [Mb]	Rekombinationshäufigkeit θ						
		0,0	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
D2S378	171,3	$-\infty$	-0,63	-0,04	0,13	0,17	0,10	0,03
D2S2177	171,5	$-\infty$	-1,21	-0,56	-0,32	-0,13	-0,04	-0,00
D2S333	172,0	1,64	1,60	1,45	1,25	0,86	0,49	0,18
D2S2302	172,2	1,64	1,60	1,45	1,25	0,86	0,49	0,18
D2S2381	172,3	0,80	0,78	0,70	0,60	0,41	0,24	0,09
D2S2307	175,1	1,64	1,60	1,45	1,25	0,86	0,49	0,18
D2S2188	175,3	1,64	1,60	1,45	1,25	0,86	0,49	0,18
D2S2257	175,8	0,20	0,19	0,16	0,12	0,07	0,03	0,01
D2S2981	175,8	0,20	0,19	0,16	0,12	0,07	0,03	0,01

4.3.1.2 Identifizierung der *C2orf37*-Mutation c.1091+1G>A in der Familie HYPO1

Das *C2orf37*-Gen besteht aus insgesamt 14 Exons und kodiert für ein 520 Aminosäure großes Protein. Die Amplifikation und direkte Sequenzierung aller kodierenden Exons von *C2orf37* bei der Indexpatientin II:2 führte zur Identifizierung eines homozygoten Basenaustausches an Position +1 der Donor-Spleißstelle in Intron 10 (c.1091+1G>A) (siehe Abb. 36). Die Segregationsanalyse anhand aller Familienmitglieder ergab, dass beide betroffenen Schwestern homozygot und die Eltern heterozygot für die Mutation waren. Die gesunden Schwestern der beiden Betroffenen waren homozygot für das Wildtyp-Allel.

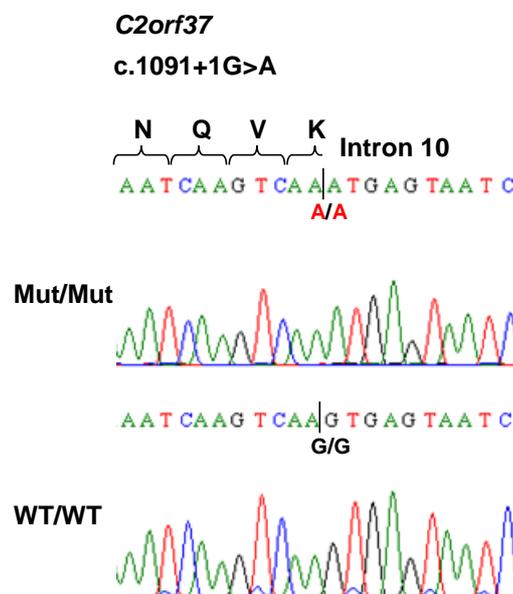


Abbildung 36: Sequenzierungselektropherogramme der identifizierten *C2orf37*-Mutation. Das obere Elektropherogramm zeigt die homozygote c.1091+1G>A Mutation, die bei den betroffenen Schwestern (II1, II:2) gefunden wurde. Das untere Elektropherogramm zeigt die normale homozygote WT-Sequenz.

Die identifizierte neue Mutation war in keiner der verwendeten Datenbanken als SNP verzeichnet. Mittels Sequenzierung wurden 100 gesunde türkische Kontrollindividuen genotypisiert. Der Basenaustausch war im Kontrollkollektiv nicht nachweisbar.

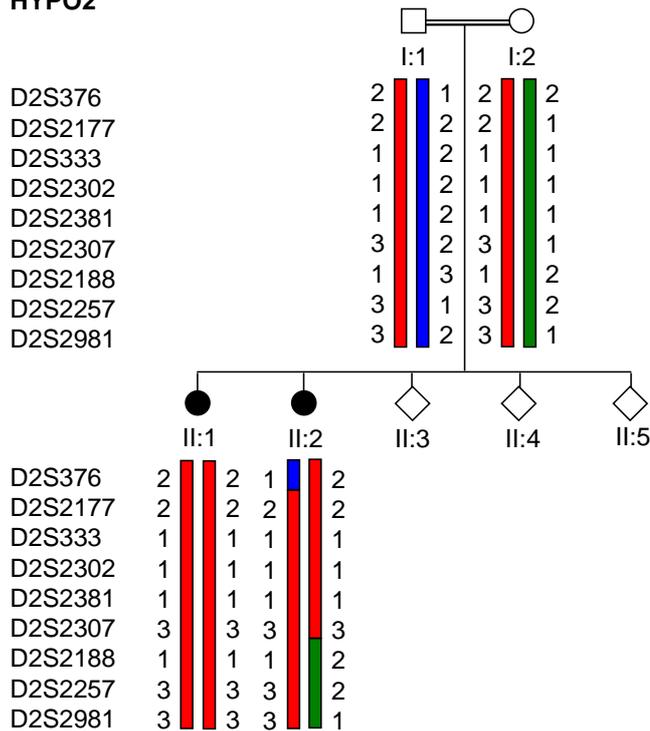
Alazami et al. identifizierten in Zwillingen mit diagnostiziertem Woodhouse-Sakati Syndrom aus dem Mittleren Osten die Spleißmutation c.1091+6T>G und konnten zeigen, dass die Mutation ein *skipping* von Exon 10 bewirkt. Bei der identifizierten c.1091+1G>A Mutation kann man mit Sicherheit davon ausgehen, dass durch die Veränderung der konservierten Konsensussequenz der 5'-Spleiß-Donorstelle durch den Austausch von G>A an der Position +1 in Intron 10, diese durch das Spleißosom nicht mehr erkannt wird und ein irregulär gespleißtes Transkript entsteht. Höchst wahrscheinlich kommt es bei der Prozessierung der prä-mRNA ebenfalls zu einem *skipping* von Exon 10.

4.3.2 Familien HYPO2 und HYPO3

In zwei weiteren konsanguinen Familien mit Woodhouse-Sakati-ähnlichem Syndrom konnten bei betroffenen Mitgliedern krankheitsrelevante homozygote Mutationen in *C2orf37* identifiziert werden. In der aus Palästina stammenden Familie HYPO2 wurde bei zwei Schwestern ein Woodhouse-Sakati-ähnliches Syndrom diagnostiziert. Die Familie HYPO3 ist belgischen Ursprungs und auch hier tritt ein Woodhouse-Sakati-ähnliches Syndrom bei zwei Geschwistern auf. Die klinische Beschreibung aller Betroffenen wurde bereits vor einigen Jahren veröffentlicht (Devriendt et al., 1996, Megarbane et al., 2003). Die phänotypischen Ausprägungen gleichen denen, die für Familie HYPO1 beschrieben wurden, wobei die beiden belgischen Schwestern zusätzlich progressive extrapyramidale Störungen aufweisen. Die Eltern in beiden Familien sind Cousin und Cousine ersten Grades und haben weitere, nicht betroffene Kinder.

Um herauszufinden, ob in den Familien ein homozygoter Haplotyp der *C2orf37*-Region auf Chromosom 2q31.1 vorlag, wurden initial Mikrosatelliten-Marker für diese Region typisiert. Die Betroffenen zeigten Homozygotie für die Region, in der *C2orf37* lokalisiert ist (siehe Abb. 37). Somit waren die Haplotypen der Familien HYPO2 und HYPO3 mit homozygoten kausalen Mutationen in diesem Gen vereinbar.

HYPO2



HYPO3

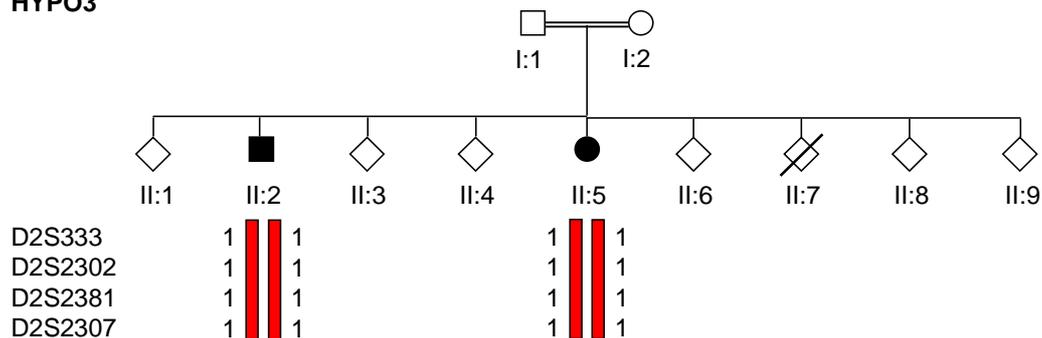


Abbildung 37: Ergebnis der Haplotypanalyse bei den Familien HYPO2 und HYPO3 mit Hilfe von Mikrosatelliten-Markern auf Chromosom 2q31.1. Unterschiedliche Haplotypen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt, während identische Haplotypen jeweils mit der gleichen Farbe gekennzeichnet wurden. Bei den Betroffenen lag Homozygotie für diesen Locus auf Chromosom 2 vor.

Mutationsanalysen führten zur Identifizierung der 1 Bp-Deletion c.436delC bei den betroffenen Schwestern II:1 und II:2 der Familie HYPO2 und der 1 Bp-Deletion c.54delC bei den betroffenen Geschwistern II:2 und II:5 der Familie HYPO3 (siehe Abb. 38). Die Mutationen führen zu einer Verschiebung des Leserahmens und zu einem vorzeitigen Stoppcodon (p.Q146LfsX204, p.G18AfsX59). Die Eltern waren jeweils heterozygot für die entsprechende Mutation und die gesunden Geschwister homozygot für das Wildtyp-Allel. Bei der c.436delC Mutation handelt es sich um die Gründermutation, die bereits von Alazami et al. in acht saudi-arabischen Familien identifiziert wurde (Alazami et al., 2008).

HYPO2

C2orf37

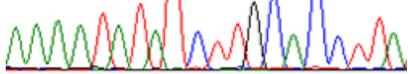
c.436delC, p.Q146LfsX204

K I Y L H L I
 A A A A T A T A T T T G C A C C T T A T
 delC/delC

Mut/Mut

K I Y Q A P Y
 A A A A T A T A T C T T G C A C C T T A
 C/C

WT/WT

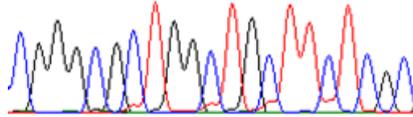


HYPO3

C2orf37

c.54delG, p.G18AfsX59

R A L A A S R
 C G G G C G C T G G C T G C T T C T C G C
 delG/delG



R A L G C F S
 C G G G C G C T G G G C T G C T T C T C G C
 G/G

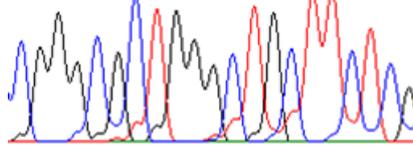


Abbildung 38: Sequenzieroelektropherogramme der identifizierten *C2orf37*-Mutationen in den Familien HYPO2 und HYPO3. Das obere Elektropherogramm zeigt jeweils die homozygote Mutation, die bei den Betroffenen gefunden wurde. Das untere Elektropherogramm zeigt die normale WT-Sequenz.

4.3.3 Familien HYPO4-HYPO7

Bei einer nicht-konsanguinen belgischen Familie (HYPO4) und einer deutschen Familie (HYPO5), einer konsanguinen türkischen Familie (HYPO7) sowie einer weiteren möglicherweise konsanguinen deutschen Familie (HYPO6) mit Woodhouse-Sakati-ähnlichen Syndromen, konnten bei den betroffenen Mitgliedern keine kausalen Mutationen in *C2orf37* identifiziert werden.

Durch initiale Typisierung von Mikrosatelliten-Markern für die *C2orf37*-Region konnte das *C2orf37*-Gen bei allen Familien zunächst nicht ausgeschlossen werden (siehe Abb. 39).

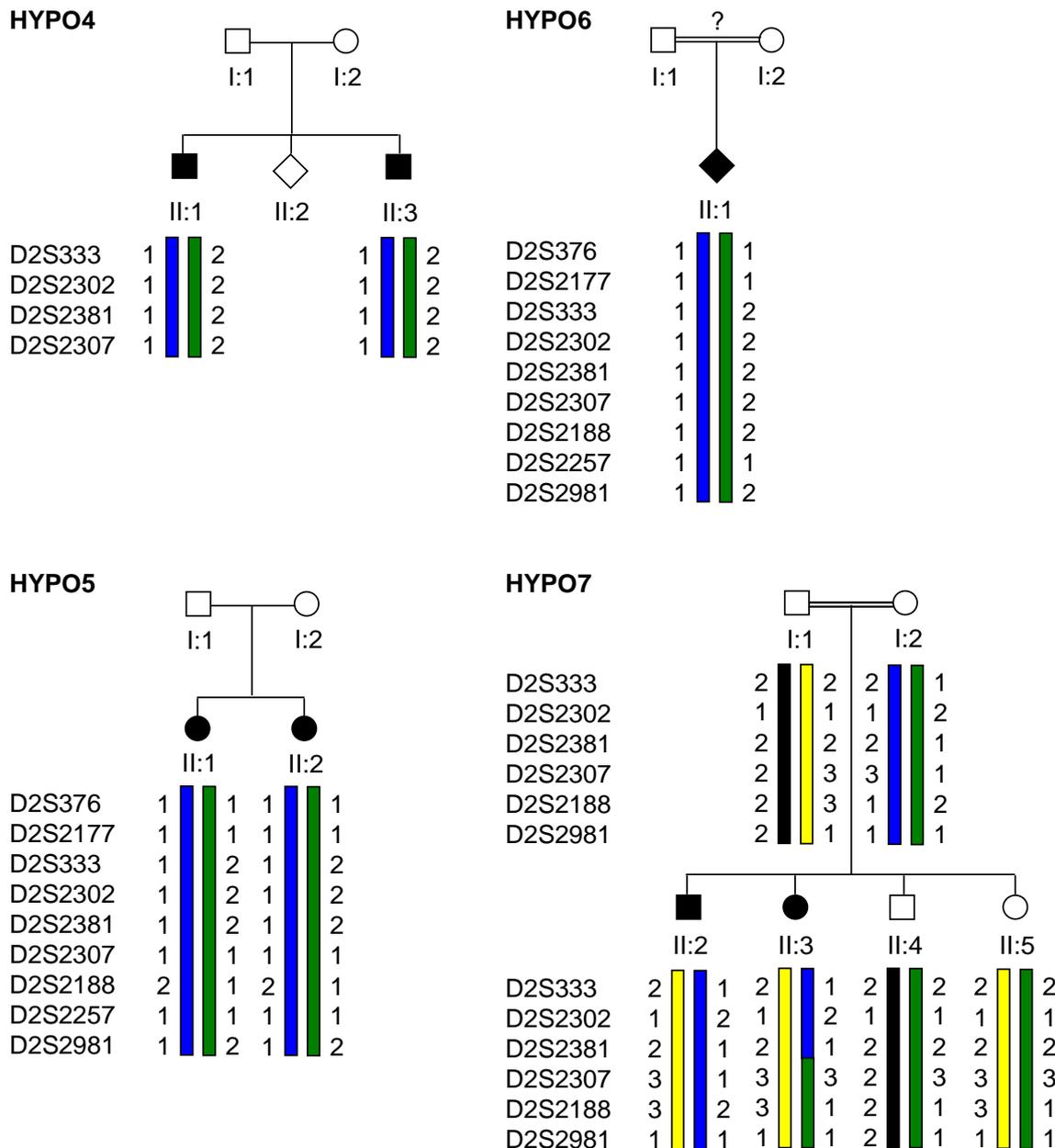


Abbildung 39: Ergebnis der Haplotypanalyse bei den Familien HYPO4, HYPO5, HYPO6 und HYPO7 mit Hilfe von Mikrosatelliten-Markern auf Chromosom 2q31.1. Unterschiedliche Haplotypen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt, während identische Haplotypen jeweils mit der gleichen Farbe gekennzeichnet wurden.

Bei der anschließenden Amplifikation und direkten Sequenzierung aller kodierenden Exons von *C2orf37* wurden jedoch bei den Betroffenen keine Mutationen identifiziert.

Bei der Familie HYPO7 wurde nach Ausschluss einer kausalen Mutation in *C2orf37* zur Identifikation und positionellen Klonierung des ursächlichen Gens eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt. Alle sechs Mitglieder wurden mittels Affymetrix GeneChip Human Mapping 250 K Sty Array typisiert. Unter Berücksichtigung eines autosomal-

rezessiven Erbgangs und der Annahme von *homozygosity by descent* aufgrund der parentalen Konsanguinität, wurde ein theoretisch maximaler parametrischer LOD-Score von 2,05 für fünf Loci auf Chromosom 6q22.33-6q23.2 (6,6 Mb), 9p24.1-9p23 (1,8 Mb), 14q11.2-14q12 (9,7 Mb), 16 p13.1-16p12.3 (4,2 Mb) und 16p12.1-16p11.2 (3,4 Mb) erreicht. Diese fünf putativen Regionen wurden auch durch nicht-parametrische NPL-Scores bestätigt (Daten nicht gezeigt). Eine Exom-Sequenzierung (*targeted exome sequencing*) in den gekoppelten Regionen wird nun durchgeführt.

4.4 Identifizierung einer molekularen Ursache des Wiedemann-Rautenstrauch Syndroms

Die kausale molekulare Ursache des autosomal-rezessiven Wiedemann-Rautenstrauch Syndroms ist bisher unbekannt. Zur Identifizierung des krankheitsverursachenden Gens wurde bei einem Patienten mit diagnostiziertem Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom, der aus einer türkischen konsanguinen Familie (WR1) stammt, eine Exom-Sequenzierung durchgeführt.

Initial erfolgte auf dem Illumina Genome Analyzer Iix ein *single read* Lauf mit zwei Spuren. Nach Filterung der Exom-Daten wurden mehrere potentiell krankheitsrelevante Varianten untersucht. Mittels Sanger-Sequenzierung konnten alle getesteten Varianten entweder nicht verifiziert werden oder das Ergebnis der Segregationsanalyse in der Familie war mit der Erkrankung nicht vereinbar. Da nachfolgend keine interessanten Kandidatengene übrig geblieben sind und aufgefallen ist, dass die *coverage* nicht gut war, wurde zur Erhöhung der *coverage* ein zweiter Lauf auf einer dritten Spur der Fließzelle durchgeführt. Nach zwei Läufen betrug die Gesamtanzahl an *reads* 122167407 und die durchschnittliche *coverage* 126. Dabei lag die *coverage* für 91,58 % aller Bereiche bei mindestens 5 und für 77,67 % bei mindestens 30. Insgesamt wurden 583363 Varianten mittels Exom-Sequenzierung detektiert. Um darunter die kausale pathogene Mutation zu identifizieren, wurden verschiedene bioinformatische Filterstrategien genetisch und funktionell angewendet. Die Filterstrategie ist in Abbildung 40 graphisch dargestellt.

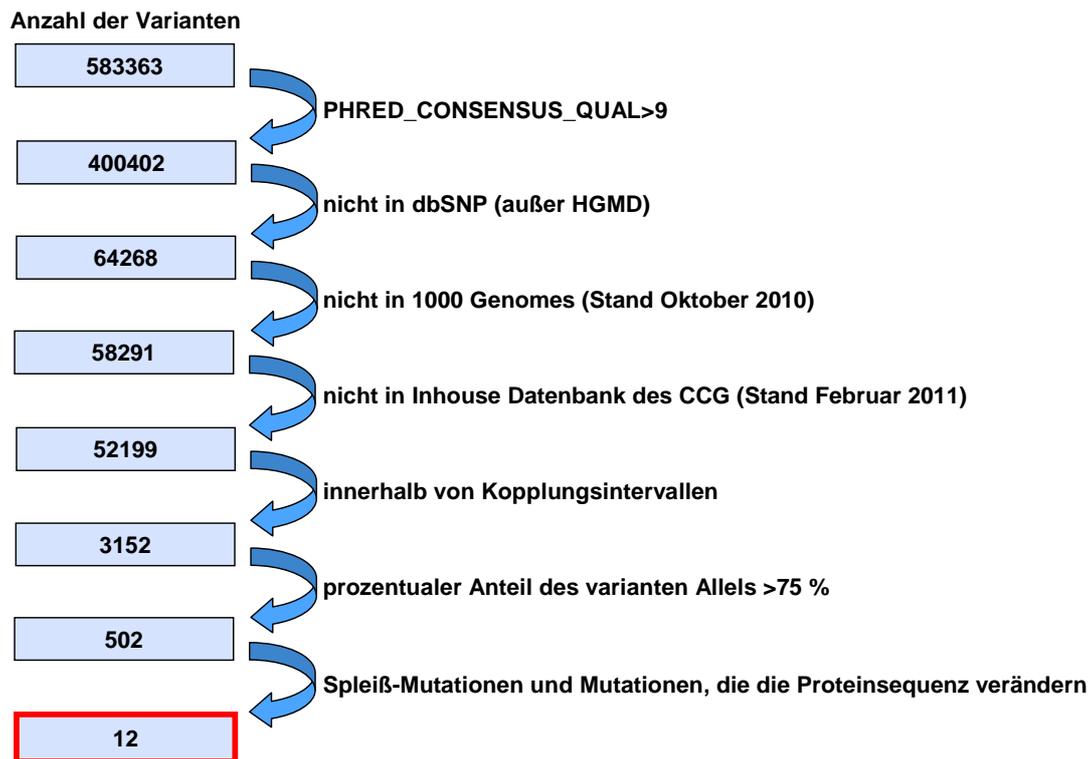


Abbildung 40: Filterstrategie zur Identifizierung der kausalen Mutation bei einem Patienten mit Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom. Die Anzahl der mittels Exom-Sequenzierung detektierten, potentiell krankheitsrelevanten Varianten konnte durch verschiedene genetische und funktionelle Filter von insgesamt 583363 auf 12 reduziert werden.

Zunächst wurden Varianten vernachlässigt, für die der Qualitäts-Score der SAMtools *variation caller software* < 9 lag. Dieser Schritt diente dem Aussortieren von falsch positiven Ergebnissen. Weiterhin führte eine Filterung nach häufigen Varianten zu einer Reduktion der Anzahl an potentiellen krankheitsrelevanten Varianten um den Faktor 8. Dabei wurden Varianten, die in dbSNP und gleichzeitig nicht in der Human Gene Mutation Database (HGMD) sowie in *1000 Genomes* und der Inhouse Datenbank des CCGs annotiert waren, außer Betracht gelassen. Aufgrund des autosomal-rezessiven Erbgangs der Erkrankung und der parentalen Konsanguinität bot es sich an Kopplungsdaten als Filter zu nutzen. Es wurde bei dem Patienten eine Bestimmung homozygoter Regionen basierend auf einer genomweiten SNP-Analyse durchgeführt, die der Detektion von homozygoten Haplotypen diente. Die Berechnung des LOD-Scores für jeden einzelnen SNP des Patienten erfolgte mit dem Programm ALLEGRO und ausschließlich für bekannte SNPs mit rs-Nummer. Dabei wurde ein autosomal-rezessiver Vererbungsmodus mit vollständiger Penetranz und einer Frequenz des Krankheitsallels von 0,001 verwendet. Außerdem wurde bei der Analyse davon ausgegangen, dass bei den Eltern des Patienten eine Konsanguinität ersten Grades vorliegt. Insgesamt konnten 55 putative homozygote chromosomale Regionen identifiziert werden

(siehe Tab. 37). Es wurden nur Regionen berücksichtigt, in denen für die SNPs positive LOD-Scores erreicht wurden. Alle mittels Exom-Sequenzierung detektierten Varianten, die nicht innerhalb der Kopplungsintervalle lagen, wurden als potentiell krankheitsrelevante Varianten ausgeschlossen. Diese Filterung nach Kopplung erwies sich als besonders effizient, da hierdurch die Anzahl der Varianten um den Faktor 17 von 52199 auf 3152 reduziert werden konnte. Durch das Aussortieren von varianten Allelen, deren Häufigkeit unter 75 % lag, wurde die Anzahl an Varianten auf 502 verringert. In einem letzten Schritt wurden nur solche Varianten als potentiell krankheitsrelevant in Betracht gezogen, die zu einer veränderten Proteinsequenz führen oder möglicherweise das Spleißen beeinträchtigen, wodurch die Anzahl der Varianten auf 12 reduziert wurde. Diese 12 Varianten sind in Tabelle 37 aufgelistet.

Tabelle 37: Mittels Kopplungsanalyse identifizierte homozygote chromosomale Regionen beim Patienten mit Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom. SIGNAL_FROM und SIGNAL_TO = Start- und Endposition der SNPs, die die homozygoten Regionen begrenzen. In der grau unterlegten Region befindet sich *PYCR1*.

CHROMOSOM	SIGNAL_FROM	SIGNAL_TO	MAX_LOD
1	247921791	248525639	1,0908
2	84339452	88230028	0,7595
4	164438791	169812834	1,1995
4	170483485	175788210	1,1984
4	151024106	153884094	0,5990
4	157824258	160196207	0,9233
6	25689487	26091336	0,1177
7	106272305	113518434	1,1996
8	12878830	13959749	1,0834
9	123903840	125075782	0,2845
9	74846189	77684690	0,0664
9	69846339	74450815	1,1996
9	35562329	37305830	0,6718
9	33116239	34834494	1,1993
9	127089775	137135579	1,1997
9	20295035	24249659	0,0738
9	16775725	19023796	0,5146
10	90984787	91679668	0,6364
11	48387424	49192906	0,388
11	46356978	47350287	0,7626
13	33344242	34405366	0,3216
13	19700642	19999913	1,0446
13	43872453	46358321	1,0252
13	74771594	78211376	1,1573
13	79894879	95715149	1,1989
13	98115374	103297436	1,1996
13	49785877	50244041	1,1919
14	100103539	101656225	1,0655
14	51434126	54417522	1,1984
15	97387857	102187181	1,1996
15	66063428	67292960	0,7256
15	23603413	27890491	1,1749
15	91304325	91795203	0,9876
15	74659609	75614821	0,0863
16	28374197	29113498	1,1991
16	79245961	82182832	1,1996
16	46433043	50353708	1,1120
16	21809190	23713315	0,1910
16	29809635	32399425	1,1065
16	8449478	11862378	1,1996
16	15116625	20956100	1,1996
17	78196744	80577127	1,1995
17	7726667	8655415	1,1805
18	23866585	30349691	1,1996
18	49139415	51889056	1,0781
18	18517247	22128052	1,1994
18	11619800	12264550	0,7637
18	7135797	10568160	0,4035
20	49747179	54578843	1,1793
20	44269077	47957298	1,1996
20	34148012	41949737	1,1996
20	20439237	21346442	0,7354
20	5753579	6662309	1,1791
20	2739583	5513629	1,1902
22	24034288	24622648	0,2387

Tabelle 38: Krankheitsrelevante Varianten nach Filterung der Exom-Daten. CHR = Chromosom, POSITION = Position der Variante, PHRED CONSENSUS QUAL = Qualitäts-Score der SAMtools *variation caller software*, TOTAL DEPTH = *coverage*, Gesamtzahl der *reads*, welche die Variation überspannen, VAR = Variation, VAR FREQ = prozentualer Anteil des varianten Allels, ENS TRANSCRIPT ID = Ensemble Transcript ID, GENE = Gen, GENE STRAND = Genorientierung, PROT CHANGE = Mutation auf Proteinebene, POLYPHEN PREDICT = Polyphen Vorhersage der Pathogenität einer Mutation, LOD SEGM SIZE = Größe der homozygoten chromosomalen Region, MAX LOD = maximal erreichter LOD-Score in der homozygoten Region. Die im Rahmen dieser Arbeit für das Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom detektierte kausale Variante in *PYCR1* wurde grau unterlegt.

CHR	POSITION	PHRED CONSENSUS QUAL	TOTAL DEPTH	VAR	VAR FREQ	GENE	GENE STRAND	PROT CHANGE	POLYPHEN PREDICT	LOD SEGM SIZE [Bp]	MAX LOD
9	130941362	10	3	A>C	100	<i>CIZ1</i>	-	Val375Gly	benign	10045804	1,1997
9	33470059	140	50	G>A	98	<i>NOL6</i>	-	Thr170Ile	probably damaging	1718255	1,1993
9	131073230	255	169	G>A	99	<i>TRUB2</i>	-	Asn202Lys	benign	10045804	1,1997
14	531909694	255	141	A>G	100	<i>PSMC6</i>	+	Ile331Val	benign	2983396	1,1984
14	52899057	255	155	G>A	99	<i>TXNDC16</i>	-	Arg815Cys	benign	2983396	1,1984
15	101586235	255	117	G>A	97	<i>LRRK1</i>	+	Gly1005Ser		4799324	1,1996
16	20084887	10	3	A>G	100	<i>GPR139</i>	-	Ser18Pro	benign	5839475	1,1996
17	79612534	10	3	A>C	100	<i>TSPAN10</i>	+	Thr185Pro	probably damaging	2380383	1,1995
17	80332687	10	3	A>C	100	<i>UTS2R</i>	+	Lys163Gln	benign	2380383	1,1995
17	80046287	11	3	A>G	100	<i>FASN</i>	-	Ser858Pro	probably damaging	2380383	1,1995
17	79892546	42	5	C>T	100	<i>PYCR1</i>	-	Gly206Arg	probably damaging	2380383	1,1995
20	3674342	42	5	A>G	100	<i>SIGLECI</i>	-	Val1087Ala	probably damaging	2774046	1,1902

Bei einer der 12 detektierten Varianten, die nach Filterung der Exom-Daten übrig blieben und als potentiell krankheitsrelevant betrachtet wurden, handelte es sich um die homozygote Nukleotidsubstitution c.G616A im *PYCR1*-Gen (siehe Tab. 38). Der Austausch von G>A auf RNA-Ebene führt dazu, dass die Aminosäure Glycin an Position 206 gegen die Aminosäure Arginin ausgetauscht wird (p.G206R). Im Jahre 2009 konnte unsere Arbeitsgruppe im Rahmen der von Reversade et al. durchgeführten Studie, *PYCR1* als kausales Gen für verschiedene spezifische syndromale Erkrankungen, die klinisch überlappende Phänotypen aufweisen, beschreiben (Reversade et al., 2009). Es wurden Missense-, Spleiß- und *frameshift*-Mutationen in Patienten mit Geroderma Osteodysplastika, Wrinkly Skin Syndrom und de Barys Syndrom identifiziert. Hauptsächlich sind die Erkrankungen durch einen progeroiden Aspekt, laxe und faltige Haut sowie Osteopenie gekennzeichnet. Zusätzlich zu der typischen Cutis laxa fanden sich bei den Patienten eine intrauterine Wachstumsverzögerung, eine schwere mentale Retardierung und eine typische Facies, sowie eine Agenesie oder Hypoplasie des Corpus callosum und eine Katarakt. *PYCR1* besteht aus sieben Exons und kodiert für die 319 Aminosäuren umfassende Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat Reduktase, ein Enzym welches den letzten Schritt der *de novo* Synthese von Prolin katalysiert. Reversade et al. konnten zeigen, dass das PYCR1-Protein mitochondrial lokalisiert ist und sowohl zur Aufrechterhaltung der normalen mitochondrialen Morphologie und des mitochondrialen Membranpotentials beiträgt, als auch gleichzeitig eine protektive Funktion gegen oxidativen Stress ausübt, möglicherweise durch Inhibition von Apoptose. Aufgrund der progeroiden phänotypischen Überlappungen von Geroderma Osteodysplastika, dem Wrinkly Skin Syndrom und dem de Barys Syndrom mit dem Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom wurde die Variante in *PYCR1*, im Vergleich zu den restlichen Varianten, die nach Filterung der Exom-Daten übrig geblieben sind, in diesem Zusammenhang als besonders relevant betrachtet.

Die *coverage* der mittels Exom-Sequenzierung detektierten Variante in *PYCR1* war mit 5 sehr niedrig und somit konnte es sich durchaus um eine falsch positive Variante handeln (siehe Tab. 38). Zur Verifizierung der Variante und zur Segregationsanalyse innerhalb der Familie WR1 wurde Exon 5, in welchem die c.G616A Mutation in *PYCR1* lokalisiert ist, bei dem betroffenen Patienten und dessen gesunden Eltern amplifiziert und direkt nach der Sanger-Methode re-sequenziert (siehe Abb. 41).

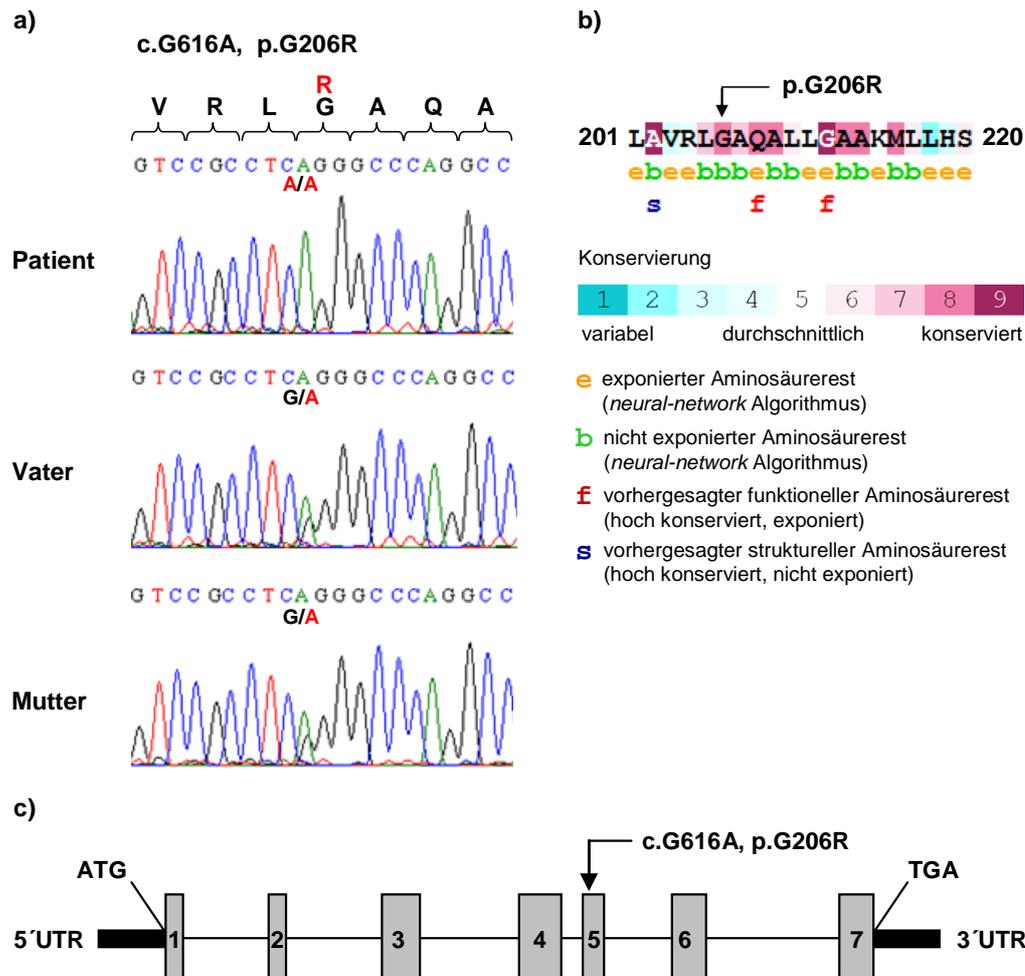


Abbildung 41: Kausale *PYCR1*-Mutation. a) Sequenzieroelektropherogramme der identifizierten *PYCR1*-Mutation. Das obere Elektropherogramm zeigt die identifizierte homozygote c.G616A Mutation bei dem Patienten mit Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom. Die unteren Elektropherogramme zeigen die c.G616A Mutation im heterozygoten Zustand bei den Eltern des Patienten. b) Konservierung der Aminosäureposition 206 in *PYCR1*. Bestimmung der Konservierung sowie Identifizierung von funktionell und strukturell wichtigen Aminosäuren mit dem Programm ConSeq. Der Pfeil markiert die Aminosäure an der Position 206 in *PYCR1*. c) Schematische Darstellung der Genstruktur von *PYCR1*. Exons werden durch Boxen repräsentiert, Introns durch Linien.

Durch die Analyse konnte das Vorhandensein der c.G616A Mutation im homozygoten Zustand beim Patienten bestätigt werden. Die gesunden Eltern waren heterozygote Träger der Mutation. Die meisten der von Reversade et al. identifizierten *PYCR1*-Mutationen traten gehäuft in den Exons 4-6 auf, die für die katalytische Domäne des Proteins kodieren (Reversade et al., 2009). Bei einem Patienten mit diagnostizierter Gerodermia Osteodysplastika wurde ebenfalls die c.G616A (p.G206R) Mutation gefunden, was für die Kausalität dieser Variante bezogen auf das Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom sprach. Weiterhin wurden für die Mutation 130 ethnisch abgeglichene Kontrollindividuen getestet. Die Nukleotidsubstitution war im Kontrollkollektiv nicht nachweisbar. Mit dem Programm

ConSeq wurde die Konservierung der veränderten Aminosäure untersucht (siehe Abb. 41). Die Analyse zeigte, dass es sich bei dem Glycin an Position 206 um eine hochkonservierte Aminosäure in einer funktionellen Domäne handelt. Für die Aminosäuren in der direkten Umgebung wurde ebenfalls eine hohe Konservierung vorhergesagt.

Bei drei weiteren Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom (WR2-4) wurden Mutationsanalysen in *PYCR1* durchgeführt. Bei keinem Patienten konnte eine weitere Mutation gefunden werden.

Mit Hilfe der Exom-Sequenzierung ist es gelungen, die molekulare Ursache des Wiedemann-Rautenstrauch Syndroms bei einem Patienten aus einer konsanguinen türkischen Familie aufzuklären. Vor allem die Verwendung von Kopplungsdaten bei der Filterung der Exom-Daten erwies sich dabei als besonders effizient. Durch die Identifizierung der kausalen p.G206R Mutation in *PYCR1*, wurde auf molekularer Ebene gezeigt, dass das Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom zum selben klinischen Spektrum wie Gerodermia Osteodysplastika, das Wrinkly Skin Syndrom und das de Barsy Syndrom gehört. Es handelt sich vermutlich um allelische Erkrankungen. Weitere genetische und funktionelle Analysen sind notwendig, um Faktoren zu identifizieren, die eine Rolle in der Pathogenese spielen und die unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbilder der Erkrankungen erklären.

5 Diskussion

Verschiedene metabolische Störungen stellen für kardiovaskuläre Ereignisse und die Progression der Atherosklerose Hauptrisikofaktoren dar. Sie sind von größtem Interesse, da die Atherosklerose mit einer zerebrovaskulären und kardialen Manifestation in Form der koronaren Herzerkrankung einhergeht und für etwa 50 % der Todesfälle in den westlichen Industrienationen verantwortlich ist. Neben Umweltfaktoren spielt bei metabolischen Störungen auch eine Vielzahl genetischer Faktoren eine Rolle, jedoch sind diese noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher neue genetische Faktoren sowie molekulare Mechanismen von Lipidstoffwechselstörungen identifiziert und untersucht werden.

5.1 Mutationsanalysen bei Patienten der LIANCO Studie

Bei der LIANCO Studie handelt es sich um eine sehr gut charakterisierte und publizierte Kohorte (Gouni-Berthold et al., 2005, Gouni-Berthold et al., 2005). Sie wurde von Herrn Prof. Wilhelm Krone und Frau Prof. Gouni-Berthold vom Institut für Innere Medizin II der Uniklinik Köln initiiert, um den Zusammenhang zwischen genetischen Mutationen, Serumlipoproteinen, anderen biochemischen Parametern und klinischen Daten und Atherosklerose zu bewerten. Von 1999 bis 2002 wurden im Raum Köln 5000 deutsche Patienten rekrutiert. Einschlusskriterium für die Studie war das Vorliegen von kardiovaskulären Risikofaktoren. Die klinischen Daten der Patienten wurden erhoben, Lipid-Parameter analysiert und Blutproben zur späteren DNA-Extraktion eingefroren. Bei vielen der Patienten wurde eine Hypercholesterinämie und / oder Hypertriglyzeridämie festgestellt. Eine molekulargenetische Untersuchung dieser Patienten, hinsichtlich der vorliegenden Dyslipidämie, war bisher nicht erfolgt und wurde aus diesem Grund im Rahmen dieser Arbeit initiiert. Für die Analysen standen 200 genomische DNAs von Patienten der LIANCO Studie mit diagnostizierter Hypercholesterinämie zur Verfügung, die zum Zeitpunkt der Rekrutierung im Plasma Gesamtcholesterin-Werte zwischen 200-600 mg/dl und LDL-Werte zwischen 150-500 mg/dl aufwiesen. Zur Bestimmung des Mutationsspektrums wurden die bekannten FH-Gene *LDLR*, *APOB* und *PCSK9* bei den Patienten auf Mutationen untersucht. Auf Mutationsanalysen in *ARH* wurde verzichtet, da aufgrund der LDL-Werte und der weiteren phänotypischen Ausprägung bei den Patienten nicht davon auszugehen war, dass eine autosomal-rezessive Form der FH vorliegt.

Bei immerhin 20 % der molekulargenetisch untersuchten Patienten ohne beschriebene positive Familienanamnese konnte eine kausale heterozygote Mutation in *LDLR* identifiziert werden. Neuste Studien haben gezeigt, dass in der Gesamtbevölkerung bei 52-76 % der Patienten mit diagnostizierter FH, Mutationen in *LDLR* gefunden werden. Die geringere Häufigkeit an identifizierten *LDLR*-Mutationen in der Kohorte lässt sich mit der Tatsache begründen, dass für die Patienten eine positive Familienanamnese für FH eben nicht beschrieben war. Es ist beachtenswert in einer nicht familiär-basierten Kohorte bei immerhin 20 % der Patienten eine monogene Mutation zu finden. Ursache für die erhöhten Cholesterin-Werte bei Patienten der LIANCO Studie ohne kausale Mutation in den bekannten FH-Genen sind wahrscheinlich andere genetische Faktoren oder auch Umweltfaktoren, wie die Ernährung, Gewicht und der persönliche Lebensstil, die generell zur Entstehung und dem Verlauf der Erkrankung beitragen. Bei der identifizierten *APOB*-Mutation c.G10499A bei dem Patienten HC171, die zu einem Austausch der Aminosäure Arginin an Position 3500 gegen Glutamin führt (p.R3500Q), handelt es sich um eine bekannte Gründermutation in der europäischen Gesellschaft, die vor 7000 Jahren erstmals aufgetreten ist (Myant et al., 1997). Eine weitere Missense-Mutation an derselben Position, die eine Substitution von Arginin gegen Tryptophan bewirkt (p.R3500W), stellt eine Gründermutation in der asiatischen Population dar und kommt dort mit einer ähnlich hohen Frequenz wie p.R3500Q in Europa vor (Choong et al., 1997).

5.1.1 *LDLR*-Mutationen

In den meisten Populationen tritt die heterozygote Form der FH mit einer Prävalenz von 0,2 % auf. Auf molekularer Ebene ist die FH eine sehr heterogene Erkrankung. Seit der Charakterisierung des *LDLR*-Gens im Jahre 1985 wurden über 1000 *LDLR*-Mutationen als kausale Ursache für FH identifiziert und die Anzahl steigt stetig weiter an (Sudhof et al., 1985). Eine exzellente Übersicht über die identifizierten *LDLR*-Mutationen findet sich in zwei *LDLR*-Mutationsdatenbanken, die unter <http://www.ucl.ac.uk/ldlr/Current> und <http://www.umd.necker.fr> abrufbar sind und ständig aktualisiert werden. In sehr wenigen Populationen segregieren nur einige verschiedene Mutationen, die auf Gründereffekte zurückzuführen sind. Dazu zählen die niederländische und dänische Population, in denen Gründermutationen bis zu 15 % der FH erklären (Defesche et al., 1993, Jensen et al., 1994, Top et al., 1990).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bei 39 Patienten der LIANCO Studie insgesamt 30 unterschiedliche heterozygote *LDLR*-Mutationen identifiziert werden, von denen sechs zuvor

noch nicht in der Literatur beschrieben wurden. Die Patienten HC66 und HC168 trugen jeweils zwei *LDLR*-Mutationen, wobei nicht geprüft werden konnte, ob die Patienten *compound* heterozygot waren oder die Mutationen auf demselben Allel lagen. Die homozygote und *compound* heterozygote Form der FH tritt sehr selten auf und ist charakterisiert durch extrem hohe LDL-Werte (700-800 mg/dl) und einem frühzeitigen Auftreten von Xanthomen, Xanthelasmen sowie einer generalisierten Atherosklerose (Marks et al., 2003). Der Patient HC66 wies zum Zeitpunkt der Rekrutierung einen LDL-Wert von 284 mg/dl auf, der Patient HC168 einen LDL-Wert von 202 mg/dl. Aufgrund des vorliegenden Phänotyps bei den beiden Patienten ist es von daher wahrscheinlicher, dass die Mutationen auf demselben Allel lokalisiert waren. Insgesamt konnte bei allen Patienten der LIANCO Studie ein breites Spektrum an Mutationstypen gefunden werden. Bei etwa 50 % der detektierten Mutationen handelte es sich um Nonsense-Mutationen, Spleißmutationen, kleinere Deletionen und Duplikationen sowie größere Deletionen, die zu einem Klasse-1-Defekt führen und mit einem vollständigen Funktionsverlust des Proteins einhergehen (Hobbs et al., 1990). Die anderen 50 % der identifizierten Mutationen umfassten Missense-Mutationen, die in der Regel ursächlich sind für mehrere funktionelle Defekte und somit keinem bestimmten Klassen-Defekt eindeutig zugeordnet werden können. Sie können sowohl zu einem funktionslosen Protein, als auch zu einem Protein mit Restaktivität führen. Am häufigsten wurde die Mutation c.324_325delinsTC gefunden, die auf Proteinebene zu einem Austausch der Aminosäure Cytosin gegen Arginin an Position 109 führt (p.C109R). Insgesamt sechs Patienten waren Träger dieser heterozygoten bekannten Veränderung, während bei fast allen anderen Patienten unterschiedliche Mutationen die kausale Ursache der Erkrankung darstellten. Eine Gründermutation konnte in der deutschen Population noch nicht nachgewiesen werden und da auch die c.324_325delinsTC Mutation bisher in keiner deutschen Studie mit einer erhöhten Frequenz auftrat, ist davon auszugehen, dass es sich hier auch um keine Gründermutation handelt. Mutationen wurden in allen funktionellen Domänen des LDL-Rezeptors identifiziert, wobei die meisten Mutationen (26,83 %) im Exon 4 lokalisiert waren, welches mit 381 Bp auch das größte Exon ist und für einen Teil der Ligandenbindungsdomäne kodiert. Generell wurde zwischen dem prozentualen Anteil an identifizierten Mutationen in jedem Exon und der jeweiligen Exongröße eine grobe Korrelation festgestellt. Die Abwesenheit von *hot-spot* Mutationen und die stattdessen auftretende breite Verteilung von pathogenen Mutationen über das gesamte Protein unterstreicht die strukturelle Relevanz, die jede Region des LDL-Rezeptors besitzt, um die physiologische Funktion des Gesamtproteins zu gewährleisten. Die Ergebnisse der

Mutationsanalysen bestätigten die Heterogenität von *LDLR*-Mutationen, die bereits bei verschiedenen europäischen Populationen mit kaukasischem Ursprung, beispielsweise der französischen, italienischen und englischen Population beschrieben wurde (Bertolini et al., 1995, Lelli et al., 1991, Loux et al., 1992). Außerdem führten andere molekulargenetische Untersuchungen in deutschen Kohorten zu den gleichen Resultaten (Dedoussis et al., 2004, Ebhardt et al., 1999, Nauck et al., 2001, Weiss et al., 2000).

Mittels Sequenzierung wurden im Rahmen der molekulargenetischen Untersuchungen bei Patienten der LIANCO Studie fünf bisher nicht beschriebene, heterozygote Mutationen identifiziert. Dabei handelt es sich um die Mutationen p.E28X (c.G82T), p.D354CfsX8 (c.1053_1060dup6), p.T653RfsX8 (c.1904_1905delCA), p.D133H (c.G397C) und p.Q829H (c.G2487C). Die identifizierten Veränderungen waren in keiner der verwendeten Datenbanken als SNP verzeichnet. Dass es sich um kausale Veränderungen handelt, wurde weiter durch die Abwesenheit dieser Nukleotidsubstitutionen und kleineren Duplikationen sowie Deletionen in insgesamt 100 Kontroll-DNAs von gesunden Individuen vergleichbarer ethnischer Abstammung unterstützt. Die Nonsense-Mutation p.E28X ist im Exon 2 lokalisiert, welches für einen Teil der Ligandenbindungsdomäne des LDL-Rezeptors kodiert und führt zu einem um 833 Aminosäuren verkürzten Protein. Die beiden anderen Mutationen, die mit einem frühzeitigen Stopp-Codon einhergehen p.D354CfsX8 und p.T653RfsX8, sind in der EGF-Vorläuferprotein ähnlichen Domäne lokalisiert und führen zu einem um 499 bzw. 200 Aminosäuren verkürzten LDL-Rezeptor. Die frühzeitigen Stopp-Codons bewirken einen Klasse-1-Defekt, bei dem die Synthese eines funktionellen Proteins verhindert wird (Hobbs et al., 1990). Die entstehenden mRNAs mit abnormer Länge werden wahrscheinlich direkt selektiv über den *nonsense-mediated mRNA decay* abgebaut. Falls doch trunkierte, pathogene Proteine in den Zellen der Patienten synthetisiert werden, kann man davon ausgehen, dass sie höchstwahrscheinlich instabil und nicht funktionsfähig sind und über das Proteasom-Ubiquitin-System degradiert werden. Die fehlenden C-terminalen Bereiche der Proteine beinhalten Regionen, die sowohl für die Lokalisation der Rezeptoren in der Plasmamembran als auch für die Internalisierung und das Recycling des Rezeptors essentiell sind. Im Falle der p.E28X Mutation fehlt zusätzlich noch ein großer Teil der Ligandenbindungsdomäne. Für die beiden Missense-Mutationen p.D133H und p.Q829H konnte durch Sequenzvergleiche der humanen Region mit verschiedenen Spezies gezeigt werden, dass beide Positionen hochkonserviert sind, wodurch eine mögliche Kausalität der gefundenen Veränderungen bekräftigt wurde. Im Falle der p.D133H Mutation kommt es zu einer Substitution eines sauren Aminosäurerestes gegen einen basischen Aminosäurerest, im Falle der p.Q829H Mutation zu

einer Substitution eines neutralen Aminosäurerestes gegen einen basischen Aminosäurerest, was die Vermutung zulässt, dass die Mutationen wahrscheinlich eine Konformations- oder Funktionsänderung des Rezeptors bewirken. Die p.D133H Mutation ist im cysteinreichen *repeat* 4 der Ligandenbindungsdomäne des LDL-Rezeptors lokalisiert, welcher zusammen mit dem *repeat* 5 eine hydrophobe Tasche ausbildet, mit der die positiven amphiphatischen Helices in Apolipoprotein B-100 und Apolipoprotein E in Wechselwirkung treten können. Möglicherweise wird durch die Mutation die Bindung von LDL an den LDL-Rezeptor beeinträchtigt (Klasse-3-Defekt) (Hobbs et al., 1986). Weiterhin könnte die Mutation auch als Klasse-2-Mutation agieren und zu einem transportdefekten Allel führen. Der pathophysiologische Mechanismus beruht hierbei auf einem defekten Transport des Rezeptors zur Plasmamembran, aufgrund einer inkorrekten Faltung des Vorläufer-Proteins im ER, was zu einer Rezeptordefizienz an der Zelloberfläche führt. Die p.Q829H Mutation ist in der cytoplasmatischen Domäne des LDL-Rezeptors lokalisiert. Mutationen in dieser Domäne verhindern meist eine Anreicherung der LDL-Rezeptoren in den *clathrin coated pits*, so dass eine Internalisierung der Komplexe aus Ligand und Rezeptor ausbleibt (Klasse-4-Defekt). Die funktionellen Konsequenzen von neu identifizierten Missense-Mutationen sind sehr schwer und nicht eindeutig vorauszusagen. Erst durch funktionelle Untersuchungen der Mutationen kann die tatsächliche pathophysiologische Auswirkung aufgeklärt und ihre Kausalität verifiziert werden.

Mit Hilfe der MLPA-Methode wurden bei vier Patienten der LIANCO Studie drei verschiedene, kausale heterozygote Deletionen in *LDLR* identifiziert. Erstmals konnte eine Deletion der Exons 7-10 bei einem Patienten (HC33, HC145) als Ursache der Erkrankung gefunden werden. Eine heterozygote Deletion des Exons 1 (HC104) sowie von Exon 16-18 (HC89) wurde zuvor bereits in der Literatur beschrieben (Taylor et al., 2009). Diese größeren strukturellen Mutationen in *LDLR*, führen zu einem Klasse-1-Defekt, der mit einem vollständigen Funktionsverlust des Rezeptors einhergeht. Die quantitative Auswertung folgte den internationalen Standards der MLPA-Analyse. Generell spricht eine Reduktion der relativen Peakfläche um 35-55 % in Bezug auf die einzelnen Kontrollfragmente eindeutig für eine Deletion. Die relativen Peakflächen der Proben von Exon 7, 8, 9 und 10 bei den Patienten HC33 und HC145, von Exon 1 bei dem Patienten HC104 und von Exon 16, 17 und 18 bei dem Patienten HC89 waren, im Vergleich zu denen der Kontrollindividuen, um bis zu 50 % reduziert. Die relativen Peakflächen von allen anderen Proben bei den Patienten sowie die relativen Peakflächen aller Proben bei den Kontrollindividuen befanden sich im Normbereich und zeigten keinen Hinweis auf das Vorliegen veränderten Kopienanzahlen.

Allgemeine Variationen in den relativen Peakflächen von Proben von bis zu 10-15 % werden als normal angegeben und liegen im angemessenen Rahmen. Dies gilt für Proben, die sowohl Regionen in normaler doppelter Kopienanzahl, als auch mit veränderter Kopienanzahl repräsentieren. Die Ergebnisse zeigten, dass die relativen Peakflächen und somit die relativen Kopienanzahlen, sowohl bei den beiden Proben für Exon 15 als auch für Exon 1 jeweils im Vergleich zueinander unterschiedlich waren. Unter bestimmten Bedingungen hybridisieren manche Sonden im Vergleich zu anderen Sonden möglicherweise mit einer geringeren Effizienz mit ihrer Zielsequenz. Mindestens ein Oligonukleotid einer Sonde könnte zudem unspezifisch mit einer falschen Zielsequenz hybridisieren, was letztendlich in einer reduzierten Kopienanzahl resultiert, da keine Ligation stattfinden kann und das Fragment nicht amplifiziert wird. Bei den Patienten der LIANCO-Studie wurde das Vorhandensein von SNPs in den Hybridisierungsregionen der Sonden durch Sequenzierung der genomischen DNA ausgeschlossen, wodurch die Spezifität der MLPA-Reaktion gewährleistet wurde. Die MLPA-Analyse lieferte hier in ihrer Anwendung ein sehr zuverlässiges und spezifisches Ergebnis. Bei allen drei Wiederholungen des Experimentes konnten die Deletionen bei den Patienten konstant und problemlos nachgewiesen werden. Mittlerweile wird diese Methode (in der Regel unter Verwendung des von *MRC Holland* entwickelten Kits) grundsätzlich zur Identifizierung von Deletionen und Duplikationen in *LDLR* bei Patienten mit FH angewandt (Goldmann et al., 2010, Taylor et al., 2009, Tosi et al., 2007, Wang et al., 2005). Die anerkannte Methode ist sehr effizient und gut etabliert, so dass eine Bestätigung der hier identifizierten Deletionen mit einer weiteren Methode (z.B. FISH-Analyse, quantitative-PCR, Bruchpunktklonierung) nicht notwendig war. Von einer aufwendigen Bruchpunktbestimmung, um eine Aussage über die genaue Größe der Deletionen treffen zu können wurde abgesehen, da dies im Rahmen dieser Arbeit nicht zielführend war.

5.1.2 Funktionelle Analyse der c.-188C>T Promotor-Mutation in *LDLR*

Die Expression der Gene in eukaryotischen Zellen ist sowohl zeitlich als auch räumlich genau reguliert. Eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen die Transkriptionsfaktoren. Diese Proteine können in den Promotorregionen eukaryotischer Gene, welche sich meistens über etwa 500 Bp bis einige Kb 5' vom Transkriptionsstartpunkt des jeweiligen Gens befinden, spezifische Sequenzen erkennen und an diese binden. Durch die Rekrutierung weiterer Proteine wird so die Bindung der RNA-Polymerase begünstigt oder gehemmt, was zu einer Steigerung bzw. Repression der Genexpression führt. Die Aktivität eines Gens bzw. seines Promotors hängt dem zufolge von der DNA-Sequenz der

Promotorregion im 5'-Bereich eines Gens ab. Durch den Vergleich der Nukleotidsequenzen vieler verschiedener Promotorregionen zeigte sich, dass bestimmte Sequenzmotive in dieser Region immer wieder nachzuweisen sind, z.B. die TATA-Box, die oft etwa 30-80 Bp in 5'-Richtung vor dem Transkriptionsstart liegt und an die ein stabiler Multiproteinkomplex, TFIID, bindet (Dymlacht et al., 1991, Weinzierl et al., 1993). Die TATA-Box und der Transkriptionsstartpunkt stellen den Grundpromotor einiger Gene dar und bilden mit anderen Transkriptionsfaktoren einen stabilen Präinitiationskomplex mit der RNA-Polymerase II (Hori et al., 1994, Saltzman et al., 1989). Die Aktivität des Grundpromotors kann durch weitere Bindungssequenzen, die 5' gelegen sein können, gesteigert werden, wie die CCAAT-Box und die SP1-Box (*specificity protein 1*), eine GC-reiche Sequenz, die in vielen Genen mit oder ohne TATA-Box gefunden wird (Dymlacht et al., 1985, McKnight et al., 1986). Neben den Transkriptionsfaktoren bzw. deren Bindungsstellen im konstitutiven Promotorbereich können des Weiteren teilweise weit entfernte, stromauf- oder abwärts gelegene cis-regulatorische Elemente, die Erkennungssequenzen für DNA-bindende Proteine enthalten, in verstärkender (Enhancer) oder hemmender (Silencer) Weise die Promotoraktivität beeinflussen (Dymlacht, 1989, Shore et al., 1987, Voss et al., 1986). Ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen Bindungsstellen für miRNAs, die in der 3'UTR eines Gens enthalten sein können. Werden nun Transkripte von diesem Gen gebildet, die miRNA Bindungsstellen enthalten, so können miRNAs an diese binden und die Translation der RNA hemmen oder zu ihrem Abbau führen und so die Aktivität des entsprechenden Gens regulieren. Eine weitere Ebene der Genregulation in eukaryotischen Zellen, die nicht unmittelbar von der DNA-Sequenz abhängig ist, ist eine epigenetische Regulation der Genexpression. Die beiden wichtigsten Mechanismen sind dabei die DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung. Circa 70 % aller menschlichen Gene weisen CpG-Inseln im Promotorbereich auf, die durch Methylierung modifiziert werden können (Weber et al., 2007). Die Methylierung in der Promotorregion führt meist zu einer Verringerung der transkriptionellen Aktivität (Doerflinger, 1983, Razin et al., 1991). Zum einen gehen die Änderungen des Methylierungsstatus mit einer Veränderung der Chromatinstruktur bzw. der Topologie des Promotors einher, wodurch die Zugänglichkeit des Promotors für regulatorische Proteine verändert wird (Muiznieks et al., 1994). Zum anderen wird der Zugang über die DNA-Sequenz selbst bestimmt. Transkriptionsfaktoren wie AP-2, cMyc/Myn, NF- κ B oder E2F erkennen bestimmte Sequenzen, die 5'-CG-3' Dinukleotide enthalten. Die Methylierung der Cytosinreste in diesen Sequenzen verhindert die Bindung der Transkriptionsfaktoren an den Promotor und verringert die Transkription des entsprechenden

Gens (Tate et al., 1993). Eine andere Gruppe von Transkriptionsfaktoren hingegen bindet nur an Sequenzen, die methylierte Cytosinreste enthalten. Diese können mit Komplexen interagieren, die Histondeacetylasen und andere Chromatin-modifizierende Komplexe enthalten und reprimieren dann, z.B. über die Deacetylierung der Lysinreste in den Histonen, die Transkription von Genen (Nan et al., 1998, Ng et al., 1999).

Für viele Gene des menschlichen Genoms konnten bisher die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im konstitutiven Promotorbereich sowie cis-regulatorische Elemente, denen eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Genexpression zukommt, noch nicht identifiziert werden. Die Promotorregion von *LDLR* ist hingegen sehr gut charakterisiert. 5' vom Transkriptionsstartpunkt innerhalb einer Region von 250 Bp sind neben einer TATA-Box drei GC-reiche Wiederholungen aus jeweils 16 Bp (*repeat 1-3*) lokalisiert. Während *repeat 1* und *3* Bindungsstellen für die ubiquitären Transkriptionsfaktoren SP1 und SP3 aufweisen, beinhaltet *repeat 2* als Bindungsstelle ein *sterol regulatory element* (SRE), an welches die Transkriptionsfaktoren SREBP1 und SREBP2 binden (Sudhof et al., 1987). Die Bindung von SP1 an die *repeats 1* und *3* ist essentiell, um eine Grundaktivität des Promotors zu gewährleisten, während die maximale Promotoraktivität erst durch die zusätzliche Bindung von SREBPs an die SREs erreicht wird (Dawson et al., 1988). Im Rahmen der molekulargenetischen Untersuchung der Patienten der LIANCO Studie wurde bei dem Patienten HC39 in der konservierten GC-reichen SP1-Bindungsstelle im *repeat 1* die bekannte heterozygote Nukleotidsubstitution c.-188C>T identifiziert. Etwa 25 verschiedene Mutationen konnten bisher im *LDLR*-Promotor bei FH-Patienten gefunden werden. Diese wurden allerdings nur zum Teil funktionell analysiert (Francova et al., 2004, Mozas et al., 2002, Smith et al., 2007). Da der tatsächliche pathophysiologische Effekt der c.-188C>T Mutation noch nicht aufgeklärt wurde, erfolgte eine funktionelle Charakterisierung. Mittels *Luciferase Reporter Assay* konnte *in vitro* eine signifikante Reduktion der Effizienz des mutanten *LDLR*-Promotors um etwa 80 % nachgewiesen werden. Im Jahre 2007 identifizierten Smith et al. im *repeat 3* des *LDLR*-Promotors die Mutation c.-139C>G und zeigten, dass es infolge einer verminderten Bindungsfähigkeit von SP1 an den Promotor zu einer Reduktion der Promotoreffizienz um 74 % kommt (Smith et al., 2007). Des Weiteren wiesen Peeters et al. zuvor bereits mit einem *DNase I footprint* für mehrere krankheitsrelevante Nukleotidsubstitutionen im *repeat 1* eine gestörte Bindung von SP1 nach (Peeters et al., 1998). Dies lässt die Vermutung zu, dass die beeinträchtigte Funktion des Promotors durch die Mutation c.-188C>T im *repeat 1* wahrscheinlich ebenfalls auf eine verminderte Bindungsfähigkeit von SP1 zurückzuführen ist. Der Transkriptionsfaktor SP1

spielt bei der Aktivierung vieler eukaryotischer und auch viraler Promotoren eine Rolle. Er gehört zu den Zinkfingerproteinen, die für ihre korrekte Funktion die Anwesenheit von Zink benötigen (Briggs et al., 1986, Dynan et al., 1983). Die DNA-bindende Domäne des Proteins weist drei tandemartige, sich wiederholende, Zinkfinger-Motive auf und kann sowohl an methylierte und nicht-methylierte Sequenzen binden (Kadonaga et al., 1987). Durch die funktionelle Charakterisierung wurde die Kausalität der identifizierten Mutation c.-188C>T im *LDLR*-Promotor nachgewiesen. Die Ergebnisse bestätigten die Notwendigkeit der SP1-Bindung an den Promotor für dessen Aktivität und zeigten, dass SRE alleine als positives Transkriptionselement nicht ausreichend ist. SREBPs und SP1 aktivieren synergistisch die Transkription, indem SREBPs die Bindung von SP1 an den Promotor begünstigen (Yieh et al., 1995). Die Beeinträchtigung der transkriptionellen Aktivität führte zu einer Reduktion des Expressionslevels von *LDLR* und somit zu einer Rezeptordefizienz an der Zelloberfläche, die eine Erklärung für die erhöhte LDL-Konzentration im Serum des Patienten bietet. Des Weiteren betonen die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung der Promotor-Mutation die Wichtigkeit nicht nur kodierende Bereiche eines Gens, sondern auch regulatorische Elemente molekulargenetisch zu untersuchen.

Die Expression des LDL-Rezeptors und somit die zelluläre Aufnahme von Cholesterin (und die Cholesterinbiosynthese) wird außer durch den Cholesteringehalt in der Zelle auch noch durch das Steroid 25-Hydroxycholesterol reguliert (Kandutsch et al., 1974). Die Bildung des Oxysterols findet vor allem dann statt, wenn der Cholesterinspiegel in der Zelle sehr hoch ist. Bei hohen intrazellulären Cholesterinkonzentrationen wird die Prozessierung der Vorläuferproteine der beiden Transkriptionsfaktoren SREBP1 und SREBP2, die unter anderem an das SRE im *LDLR*-Promotor binden, infolge einer Induktion der Interaktion von SCAP mit INSIG verhindert und somit die Transkription von Zielgenen inhibiert. Als interne Kontrolle des physiologischen Systems wurde der *Luciferase Reporter Assay*, der der funktionellen Charakterisierung der Mutation c.-188C>T diente, sowohl unter induzierenden (ohne Zugabe von Sterolen) als auch unter supprimierenden Bedingungen (mit Zugabe von Sterolen) durchgeführt. Durch Behandlung der verwendeten HEK-293-Zellen mit Cholesterin und 25-Hydroxycholesterol konnte die Interaktion von SCAP mit INSIG erfolgreich induziert werden, was zu einer signifikanten Inhibition der transkriptionellen Aktivierung des wildtypischen und mutanten *LDLR*-Promotors führte. Dieser Effekt wurde auch durch die alleinige Behandlung der Zellen mit 25-Hydroxycholesterol erreicht. Erstaunlicherweise führte die alleinige Zugabe von Cholesterin zu einer Steigerung der Aktivität des wildtypischen und mutanten *LDLR*-Promotors. 25-Hydroxycholesterol hat einen

nachgewiesenen mehr als fünfzigmal so starken Effekt auf die Inhibierung der *LDLR*-Expression als Cholesterol, wodurch sich die signifikante Reduktion der Promotoraktivität bei alleiniger Behandlung der HEK-293-Zellen mit 25-Hydroxycholesterol erklären lässt (Adams et al., 2004). Man geht davon aus, dass 25-Hydroxycholesterol, anders als Cholesterol, nicht direkt an SCAP bindet und somit nicht direkt dessen Konformation ändert. Wahrscheinlich gibt es ein weiteres, bisher noch nicht identifiziertes 25-Hydroxycholesterol bindendes Protein, welches die Interaktion mit INSIG vermittelt. Bei der Behandlung der HEK-293-Zellen mit Cholesterol war nur eine sehr schwache oder sogar keine Inhibierung der Aktivität des wildtypischen und mutanten Promotors zu erwarten. Warum es zu einer Steigerung kam, lässt sich nicht erklären und wurde im Rahmen dieser Arbeit auch nicht weiter untersucht, da es nicht zielführend war. In sämtlichen Publikationen wurden bei *LDLR*-Promotoraktivitätstests transfizierte HEK-293-Zellen immer nur gleichzeitig mit Cholesterol und 25-Hydroxycholesterol inkubiert, um die Prozessierung der Transkriptionsfaktoren SREBP1 und SREBP2 zu verhindern und somit die Promotoraktivität zu inhibieren. Prinzipiell würde eine Behandlung der Zellen nur mit 25-Hydroxycholesterol vollkommen ausreichen, um das System zu inhibieren, jedoch sterben die Zellen ohne die Zugabe von Cholesterol relativ schnell. Der Grund hierfür ist, dass es aufgrund der inhibierten Cholesterinbiosynthese durch 25-Hydroxycholesterol zu einem intrazellulären Mangel an Cholesterin kommt und 25-Hydroxycholesterol wegen der Hydroxyl-Gruppe nicht in der Lage ist Cholesterin, welches für die Lebensfähigkeit von Zellen notwendig ist, beispielsweise in der Plasmamembran, zu ersetzen (Yabe et al., 2002).

5.1.3 Genotypisierung von Nonsense-SNPs in Patienten mit *LDLR*-Mutation

Neben den monogenen Erkrankungsformen der Dyslipidämien gibt es auch multifaktorielle bzw. komplexe Formen, die in der Regel wesentlich häufiger als die monogenen Formen auftreten und deren Ursache bisher nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Dazu zählt auch die komplexe Form der Hypercholesterinämie, die häufiger als die monogene FH auftritt, ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für die koronare Herzerkrankung einhergeht, jedoch meist asymptomatisch verläuft (keine Xanthome, keine Auffälligkeiten bis zum Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen). Bei vielen Patienten der LIANCO Kohorte ohne kausale Mutation in den bekannten FH-Genen liegt möglicherweise eine komplexe Hypercholesterinämie vor. Im Gegensatz zu monogenen werden komplexe Erkrankungsformen gegebenenfalls durch Veränderungen in mehreren Genen und durch das Zusammenwirken mit Umweltfaktoren verursacht, wobei sich genetische und nicht-

genetische Faktoren gegenseitig verstärken, abschwächen oder ergänzen können. Oft müssen zu einer genetischen Krankheitsneigung ungünstige Umweltfaktoren hinzutreten, damit sich die Krankheit überhaupt manifestieren kann. Bei den monogenen Erkrankungsformen kommt es häufig, sogar beim Vorliegen gleicher Mutationen oder Mutationstypen im selben Gen, zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen der Erkrankung. Zusätzlich zu einem obligaten Defekt in dem krankheitsverursachenden Gen spielen dabei neben Umweltfaktoren weitere genetische Faktoren eine positiv oder negativ modifizierende Rolle. Solche modifizierenden genetischen Faktoren bestimmen die klinische Erscheinungsform einer Erkrankung mit. Mit Dyslipidämien assoziierte SNPs, die im Rahmen von GWAS identifiziert wurden, sind potentiell sehr gute Kandidaten für modifizierende Faktoren bei monogenen Erkrankungsformen von Dyslipidämien. Die Identifizierung von modifizierenden Faktoren bei monogenen Erkrankungsformen spielt in Zukunft wissenschaftlich eine immer größer werdende Rolle, um die komplexe Pathophysiologie einer Erkrankung und deren Verlauf zu verstehen und um gegebenenfalls therapeutische Strategien anzupassen.

Im Jahre 2009 haben Yngvadottir et al. im Rahmen einer großen Studie die Häufigkeit von Nonsense-SNPs in der Gesamtpopulation analysiert (Yngvadottir et al., 2009). Dabei wurden in über 1000 gesunden Individuen in 169 Genen, unter anderem auch in *ABCA10* (rs10491178), *APOL3* (rs11089781) und *LPL* (rs328), die eine Rolle im Lipidstoffwechsel spielen bzw. zu spielen scheinen, 805 Nonsense-SNPs identifiziert, die keine funktionellen und phänotypischen Auswirkungen aufweisen. Da Nonsense-Veränderungen jedoch prinzipiell einen pathogenen Charakter haben könnten, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass den detektierten Nonsense-SNPs in *ABCA10*, *APOL3* und *LPL* bei Hypercholesterinämie-Patienten der LIANCO Studie, möglicherweise (nur) in Kombination mit einer kausalen Mutation in *LDLR*, eine modulierende Funktion zukommt. Um diese Hypothese zu testen, wurden die entsprechenden Patienten für die Nonsense-SNPs in *ABCA10*, *APOL3* und *LPL* genotypisiert und eine Assoziation mit der Erkrankung überprüft. Bei keinem Patienten konnte eine offensichtliche Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp nachgewiesen werden. Träger der getesteten Nonsense-SNPs zeigten keine auffälligen Lipid-Werte oder BMIs. Die Nonsense-SNPs scheinen bei Patienten der LIANCO Studie mit *LDLR*-Mutation nicht modifizierend zu wirken, dennoch kann eine Assoziation mit der Erkrankung grundsätzlich nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da hier nur eine sehr kleine Kohorte getestet wurde, was zu keinem signifikanten Ergebnis führt. Die Durchführung einer Assoziationsstudie bei einer wesentlich größeren Kohorte mit einer kausalen Mutation in einem der bekannten krankheitsverursachenden Gene für die monogene

Form ist notwendig, würde ein signifikanteres Ergebnis liefern können und könnte nachträglich eine Assoziation zeigen und das Verständnis der Pathophysiologie erweitern. Im Rahmen von GWAS konnte für die drei getesteten Nonsense-SNPs in *ABCA10*, *APOL3* und *LPL* bisher keine Assoziation mit erhöhten Lipid-Werten im Plasma identifiziert werden. Allerdings gibt es in *LPL* einen SNP (rs1267819) für den eine Assoziation mit erhöhten Triglyzerid-Werten und erniedrigten HDL-Werten nachgewiesen wurde (Teslovich et al., 2010). Ein Vergleich der SNP-Häufigkeiten, die bei den Patienten der LIANCO Studie detektiert wurden mit denen die von Yngvadottir et al. beschrieben wurden, zeigten keine sehr großen Unterschiede. Bei keinem Patienten der LIANCO Studie konnte der Nonsense-SNP in *APOL3* gefunden werden. Dieser SNP zeigt generell eine niedrige Frequenz in der Gesamtpopulation. Während die Häufigkeit des Nonsense-SNPs in *ABCA10* in etwa der beschriebenen Häufigkeit von Yngvadottir et al. entsprach, war die Häufigkeit für den Nonsense-SNP in *LPL* etwas erhöht. Mutationen in *LPL*, die mit einer Reduktion der Proteinfunktion bzw. mit einem vollständigen Funktionsverlust einhergehen, resultieren aufgrund eines beeinträchtigten hydrolytischen Abbaus und einer Ansammlung von triglyzeridreichen Lipoproteinen (VLDL, Chylomikronen) in einer schwerwiegenden Hypertriglyzeridämie und erniedrigten HDL-Werten. Betroffene zeigen eruptive Xanthome, Lipemia retinalis sowie frühzeitig eine Pankreatitis (Wang et al., 2009). Der Nonsense-SNP in *LPL* scheint die Aktivität des Enzyms nicht großartig zu beeinträchtigen, da heterozygote und homozygote Träger der LIANCO Studie keine entsprechende phänotypische Assoziation zeigten. Diese Tatsache lässt sich möglicherweise mit der Lokalisation des SNPs erklären. Dieser befindet sich in der mRNA weniger als 50 Nukleotide 5' von der letzten Exon-Exon-Grenze entfernt, so dass der NMD ausbleibt und ein um 0,42 % trunkiertes Protein synthetisiert wird, welches eventuell keinen signifikanten pathogenen Charakter besitzt. Die Nonsense-SNPs in *ABCA10* und *APOL3* haben eine Aktivierung des NMD zur Folge und führen zu einem Funktionsverlust. Die physiologische Relevanz und Rolle der Proteine im Lipidstoffwechsel müsste noch geklärt werden.

5.1.4 Therapeutische und diagnostische Strategien

Die Diagnose einer Hypercholesterinämie beruht oft nur auf der klinischen Präsentation. Diese ist jedoch sehr variabel und klinische Symptome der Erkrankung sind nicht immer offensichtlich, vor allem nicht bei jungen Erwachsenen und Kindern. Sowohl Umweltfaktoren, als auch genetische Faktoren haben Einfluss auf die Entstehung, Ausprägung und den Verlauf einer Hypercholesterinämie. Eine molekulargenetische Testung

von bekannten, krankheitsverursachenden Genen ist besonders wichtig, um bei Patienten zunächst das Vorliegen einer erblich bedingten Hypercholesterinämie zu bestätigen. Patienten, bei denen die Hypercholesterinämie beispielsweise auf eine falsche, vor allem fetthaltige Ernährung zurückzuführen ist, müssen im Gegensatz zu Patienten mit einem genetischen Defekt nicht zwangsläufig medikamentös behandelt werden. Eine Ernährungsumstellung reicht in der Regel aus. Des Weiteren ist die Kenntnis der molekularen Ursache essentiell, um für jeden Patienten eine individuelle Risikoabschätzung treffen zu können und um eine angepasste therapeutische Strategie zu entwickeln. Mutationen in verschiedenen Genen sowie verschiedene Mutationen und Mutationstypen im selben Gen haben bei Hypercholesterinämie-Patienten einen unterschiedlichen Einfluss sowohl auf die Lipid-Werte als auch auf das Manifestationsalter für eine koronare Herzerkrankung (Gudnason et al., 1994, Hill et al., 1991, Kotze et al., 1993). Besonders nennenswert ist, dass phänotypische Variationen teilweise auf verschiedene Klassen-Mutationen/Defekte im *LDLR*-Gen zurückzuführen sind. Außerdem können auch zusätzliche genetische modifizierende Faktoren eine Rolle spielen und die klinische Erscheinungsform mitbestimmen. Patienten mit einer homozygoten *LDLR*-Mutation oder einer Klasse-1-*LDLR*-Mutation, die mit einem vollständigen Funktionsverlust des LDL-Rezeptors einhergeht, sind schwerer betroffen und haben ein wesentlich höheres Risiko für eine koronare Herzerkrankung als Patienten mit einer anderen heterozygoten *LDLR*-Mutation und benötigen eine intensivere lipidsenkende und generell anti-atherosklerotische Behandlungsstrategie. Bei Patienten mit homozygoten *LDLR*-Mutationen ist eine reine medikamentöse Therapie meist nicht so effizient wie bei heterozygoten Patienten, so dass zusätzlich alle 1-2 Wochen eine LDL-Apherese erfolgen muss. Teilweise stellt auch nur eine Lebertransplantation eine hilfreiche Therapie dar (Burnett et al., 2008). Die Identifizierung einer segregierenden Mutation innerhalb einer Familie trägt außerdem noch dazu bei, asymptotische Familienmitglieder (keine Xanthome, keine Auffälligkeiten bis zum Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen), die auch Träger der Mutation sind, rechtzeitig zu therapieren. Die Aufklärung der molekularen Ursache der Hypercholesterinämie bei vielen der bisher nur klinisch charakterisierten Patienten der LIANCO Studie hat entscheidend dazu beigetragen, die Therapie für die vorliegende Erkrankung anzupassen und somit gegebenenfalls die Lebensqualität der Betroffenen zu verbessern.

Die durchgeführten Analysen in der LIANCO Kohorte haben erstmalig gezeigt, dass bei Patienten alleine die Höhe des LDL-Wertes im Plasma relevant und ausschlaggebend für eine molekulargenetische Testung von *LDLR* ist. Eine diagnostizierte positive Familienanamnese

für FH ist nicht essentiell. Das identifizierte Mutationsspektrum sowie die Verteilung der Mutationen im *LDLR*-Gen stimmen mit den Ergebnissen vorheriger deutscher Studien überein (Dedoussis et al., 2004, Ebhardt et al., 1999, Nauck et al., 2001, Weiss et al., 2000). Aufgrund der Tatsache, dass die meisten *LDLR*-Mutationen (hier 26,83 %) im Exon 4 lokalisiert waren und es sich bei etwa 10 % der Mutationen um größere Deletionen handelte, die mittels MLPA detektiert werden können, bietet es sich zukünftig an, eine genetische Testung von Patienten in zwei Schritten durchzuführen. Dabei wird zunächst Exon 4 auf Mutationen untersucht und parallel eine MLPA-Analyse durchgeführt. Nach Ausschluss von größeren Deletionen und Duplikationen und kausalen Veränderungen in Exon 4 folgt eine molekulargenetische Untersuchung der restlichen kodierenden Regionen und des Promotors. Diese Strategie kann kostengünstiger und effizienter sein.

Bei immerhin 20 % der Patienten der LIANCO Studie konnte eine kausale Mutation in den bekannten FH-Genen gefunden werden. Bei den restlichen Patienten der Kohorte und auch bei vielen anderen Patienten und Familien mit diagnostizierter Hypercholesterinämie ist die genetische Ursache noch unklar. Die konventionelle Sanger-Sequenzierung stellt zwar eine gut etablierte Methode zur Identifizierung einer kausalen Mutation in einem bekannten Gen für eine bestimmte monogene Erkrankung dar, um jedoch eine Mutation in einem neuen krankheitsverursachenden Gen zu finden, erweist sich derzeit die neuartige *Next Generation* Sequenzierung (NGS) als äußerst effizient. Sie ist vor allem dann erfolgsversprechend, wenn nur einzelne sporadische Patienten oder kleinere Familien vorliegen, bei denen eine positionelle Klonierung nicht zielführend ist. Patienten der LIANCO Kohorte ohne kausale Mutation in den bekannten FH-Genen können ideal genutzt werden, um zum Beispiel mittels Exom-Sequenzierung neue Hypercholesterinämie-Gene zu identifizieren und so weitere Einblicke in die Pathophysiologie der Erkrankung zu erhalten. Im vergangenen Jahr war die Anwendung der NGS zur Identifizierung der molekularen Ursache von Dyslipidämien bereits erfolgreich. Rios et al. sequenzierten bei einem Patienten mit Hypercholesterinämie das gesamte Genom mittels NGS und detektierten zwei *compound* heterozygote kausale Nonsense-Mutation in *ABCG5*, dem bekannten Gen für Sitosterolämie (Rios et al., 2010). Damit gelang es ihnen zwar nicht ein neues Gen zu identifizieren, was auf eine initial falsche Diagnose beim Patienten zurückzuführen ist (klinisch wurde initial eine Sitosterolämie aufgrund einer atypischen Präsentation ausgeschlossen), jedoch demonstrierten sie trotzdem die Effizienz der Methode. Musunuru et al. deckten mittels Exom-Sequenzierung die genetische Ursache einer kombinierten Hypolipidämie auf (Musunuru et al., 2010). Sie identifizierten bei zwei betroffenen Patienten *compound* heterozygote Nonsense-Mutationen

im *ANGPTL3*-Gen, welches für einen Inhibitor der Lipoproteinlipase und der endothelialen Lipase kodiert.

5.1.5 Identifizierung von zwei neuen Hypercholesterinämie-Genen - *SREBP1* und *SREBP2* - und Pathomechanismus der detektierten Mutationen

In etwa 80 % der Patienten der LIANCO Studie konnte keine kausale Mutation in den bekannten FH-Genen *LDLR*, *APOB* und *PCSK9* identifiziert werden. Um neue bisher nicht beschriebene Hypercholesterinämie-Gene zu identifizieren wurden Kandidatengene aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften ausgewählt und anschließend molekulargenetisch untersucht. Unter anderem wurden Mutationsanalysen in den Genen *SREBP1* und *SREBP2* durchgeführt. SREBPs sind Transkriptionsfaktoren und stellen zentrale Regulatoren der Cholesterinhomöostase dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass Mutationen in SREBPs, die mit einer beeinträchtigten Funktion bzw. einem Funktionsverlust der Transkriptionsfaktoren einhergehen, zu einer LDL-Rezeptordefizienz an der Zelloberfläche und somit zu einer Akkumulation von cholesterinreichen Lipoproteinen im Plasma führen könnten. Die funktionelle Analyse der c.-188C>T Promotor-Mutation hatte bereits gezeigt, dass es zur Identifizierung der molekularen Ursache einer Hypercholesterinämie wichtig ist, nicht nur nach Mutationen zu suchen, die direkte Auswirkungen auf die Funktion von LDLR haben, sondern auch dessen Expression beeinflussen. Aus diesem Grund schienen *SREBP1* und *SREBP2* potentiell sehr gute Kandidatengene für Hypercholesterinämie zu sein.

Bei den molekulargenetischen Untersuchungen konnte bei einem Patienten der LIANCO Studie die heterozygote Nukleotidsubstitution c.G2435A in Exon 13 von *SREBP1* identifiziert werden (p.R812Q). Bei einem weiteren Patienten wurde in Exon 14 von *SREBP2* die heterozygote Nukleotidsubstitution c.G2554A gefunden (p.G852R). Auf genetischer Ebene sprachen mehrere Faktoren für die Kausalität der identifizierten Veränderungen. Zum einen waren die Veränderungen in keiner der verwendeten Datenbanken, vor allem nicht in *1000 Genomes*, als SNP verzeichnet, wodurch ein erster Hinweis auf die Assoziation der Hypercholesterinämie mit den gefundenen Mutationen geliefert wurde. Zum anderen wurde die Kausalität der Veränderungen weiter durch die Abwesenheit der Nukleotidsubstitutionen in insgesamt 100 Kontroll-DNAs von gesunden Individuen vergleichbarer ethnischer Abstammung unterstützt. Die LDL-Werte der beiden Patienten mit SREBP-Mutation lagen bei etwa 300 mg/dl.

In dieser Arbeit wurde die Kausalität dieser beiden Mutationen auch auf Proteinebene gezeigt. Das *SREBP1*-Gen kodiert für die beiden Isoformen SREBP1a und SREBP1c und die

detektierte Mutation kann die Funktion beider Isoformen beeinträchtigen. Da die Isoform SREBP1c, im Gegensatz zur Isoform SREBP1a, jedoch nicht die Expression von *LDLR* und Genen der Cholesterinbiosynthese reguliert, sondern eher bei der Fettsäure-Synthese eine Rolle spielt, wurde nur die mutante SREBP1a Isoform funktionell charakterisiert. Des Weiteren wurde bei den Analysen zusätzlich die von Muller und Miserez bei einem Hypercholesterinämie-Patienten identifizierte Veränderung p.R645Q in SREBP2 miteinbezogen, um deren pathogene Signifikanz zu bestimmen (Muller et al., 2002).

Mittels *Luciferase Reporter Assay* wurde gezeigt, dass durch Überexpression sowohl der wildtypischen als auch der mutanten SREBP1- und SREBP2-Proteine die Effizienz des *LDLR*-Promotors signifikant erhöht wurde, wobei der Effekt der SREBP2-Proteine höher war als der der SREBP1-Proteine. Dies bestätigte die Notwendigkeit der SREBP-Bindung an das SRE im *LDLR*-Promotor, um eine maximale Aktivität zu erreichen (Dawson et al., 1988). Um eine Grundaktivität des Promotors zu gewährleisten ist nur die Bindung des ubiquitären Transkriptionsfaktors SP1 essentiell. SREBPs und SP1 aktivieren synergistisch die Transkription, indem SREBPs die Bindung von SP1 an den Promotor begünstigen (Yieh et al., 1995). Der größere Effekt der SREBP2-Proteine auf die Aktivität im Vergleich zu den SREBP1-Proteinen ist auf eine höhere Spezifität für den *LDLR*-Promotor und höhere funktionelle Relevanz für die Expression des LDL-Rezeptors und Proteinen der Cholesterinbiosynthese zurückzuführen (Horton et al., 2002). Des Weiteren konnte für alle drei Mutationen gezeigt werden, dass sie *in vitro* die Funktion der Transkriptionsfaktoren beeinträchtigen und zu einer reduzierten Expression des Zielgens *LDLR* führen. Die p.G852R Mutation in SREBP2 und die p.R812Q Mutation in SREBP1 führten zu einer Reduktion der Proteinfunktion um 50 %, während das mutante SREBP2-Protein mit der Mutation p.R645Q eine um 20 % verminderte Funktion aufwies. Dieses Ergebnis war reproduzierbar und zeigt die Funktionseinschränkung und wahrscheinliche Kausalität der Mutationen. Als interne Kontrolle des physiologischen Systems wurde der *Luciferase Reporter Assay* für die SREBP2-Proteine unter induzierenden und supprimierenden Bedingungen durchgeführt. Durch Behandlung der verwendeten HEK-293-Zellen mit Cholesterol und 25-Hydroxycholesterol konnte die Interaktion von SCAP mit INSIG erfolgreich induziert werden, was zu einer signifikanten Inhibition der transkriptionellen Aktivierung des *LDLR*-Promotors führte. Die Prozessierung der wildtypischen und mutanten SREBP2-Proteine und der endogenen SREBP-Proteine wurde unterbunden und das System vollständig inhibiert. Der *Luciferase Reporter Assay* soll für die SREBP1-Proteine ebenfalls unter supprimierenden Bedingungen noch erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit war eine Analyse nicht möglich, da es

nicht gelungen ist, die kodierende Sequenz von *SREBP1* in den Vektor pTK-HSV zu klonieren. Es wurden verschiedene Klonierungsstrategien ausprobiert, die jedoch alle nicht zum Erfolg führten. Anhand von Patienten-Zellen, die für Analysen nicht zur Verfügung standen, könnte der funktionelle Effekt der Mutationen *in vivo* untersucht werden. Beispielsweise könnte mittels quantitativer RT-PCR die Transkriptmenge von *LDLR* bestimmt und die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse so zusätzlich gestützt werden. Die identifizierten Mutationen in *SREBP1* und *SREBP2* führen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht nur zu einer verminderten Expression des LDL-Rezeptors, sondern auch zu einer verminderten Expression anderer Zielgene. Für die Entstehung einer Hypercholesterinämie sind jedoch primär die Auswirkungen auf die Expression des LDL-Rezeptors essentiell. Eine verminderte Expression des Rezeptors geht mit einer Rezeptordefizienz an der Zelloberfläche einher und es sind mittlerweile zahlreiche kausale Mutationen für Hypercholesterinämie im *LDLR*-Gen und dessen Promotor beschrieben worden, die ebenfalls in einer Rezeptordefizienz resultieren.

Weiterhin stellte sich nun die Frage, über welchen pathophysiologischen Mechanismus die Mutationen zu einer reduzierten Expression des *LDLR*-Gens führen. Aufgrund der Lokalisation aller Mutationen in der cytoplasmatischen regulatorischen C-terminalen Domäne konnte eine beeinträchtigte Bindung der reifen Transkriptionsfaktoren an das SRE in der Promotorregion von *LDLR* ausgeschlossen werden. Es lag die Hypothese nahe, dass die Mutationen in *SREBP1* und *SREBP2* am ehesten zu einer verminderten Interaktion dieser Proteine mit der cytoplasmatischen WD-Domäne von SCAP in der Membran des endoplasmatischen Retikulums führen. Mit Hilfe einer *in vitro*-Interaktionsstudie konnte die aufgestellte Hypothese reproduzierbar bestätigt werden. Infolge der beeinträchtigten konstitutiven Wechselwirkung zwischen den mutanten SREBP-Proteinen und SCAP gelangen wahrscheinlich weniger SREBP-SCAP Komplexe über COPII-Vesikel in den Golgi-Apparat wodurch dort vermutlich eine geringere Menge an Vorläuferproteinen für die Prozessierung durch zwei spezifische Proteasen zur Verfügung steht. Es würde zu einer reduzierten Freisetzung des N-terminalen transkriptionell aktiven cytoplasmatischen Teils von SREBPs kommen, was letztendlich zu einer reduzierten Expression des Zielgens *LDLR* und somit zu einer Rezeptordefizienz an der Zelloberfläche und einer Akkumulation vor allem von LDL-Partikeln, aber auch VLDL- und IDL-Partikeln, im Plasma der Patienten führen würde. Für die mutanten *SREBP2*-Proteine wurde ein weiterer Mechanismus aufgedeckt, der mit einer geringeren Menge an Vorläuferprotein im Golgi-Apparat einhergeht. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutationen in *SREBP2* die Stabilität der Vorläuferproteine im Vergleich

zum wildtypischen Vorläuferprotein beeinträchtigen und eine verkürzte Lebensdauer bedingen. Die Inhibierung des Proteasom-Ubiquitin-Systems resultierte in keiner Stabilisierung der Proteine was zur Annahme führt, dass Ubiquitin-unabhängige Abbauegreifen und die Degradation der Vorläuferproteine bewirken.

Die funktionellen Analysen zeigten eine deutliche funktionelle Wirkung der Mutationen auf die Funktion von SREBP1 und SREBP2 und somit konnte die Kausalität der Mutationen nachgewiesen werden. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass *SREBP1* und *SREBP2* zwei neue Hypercholesterinämie-Gene sind.

Die Ergebnisse der funktionellen Analysen lassen die Schlussfolgerung zu, dass eine Reduktion der SREBP-Proteinfunktion, bzw. der *LDLR*-Expression, um 20 % bereits ausreichen scheint, um eine Hypercholesterinämie hervorzurufen. Die *in vitro*-erhaltenen Ergebnisse spiegeln aber nicht immer 1:1 die physiologische Situation wieder. SREBPs regulieren normalerweise ihre eigene Transkription durch Bindung an das SRE im eigenen Promotor. Für die funktionellen Analysen wurden im Rahmen dieser Arbeit Expressionskonstrukte verwendet, die nicht den natürlichen Promotor der *SREBP*-Gene und somit kein SRE enthielten. Im physiologischen System ist es somit wahrscheinlich, dass infolge der Mutationen die eigene Expression der SREBPs inhibiert wird, was einem dominant-negativen Effekt ähnelt. Generell könnten die identifizierten Mutationen im physiologischen System einen dominant-negativen Effekt besitzen. Es ist grundsätzlich schwer einzuschätzen, welche Auswirkungen Mutationen auf physiologische Proteinkomplexe haben. Dominant-negative Effekte sind vor allem bei dimeren und multimeren Proteinen bekannt, hauptsächlich bei Ionenkanälen. Ein Beispiel stellt das *KCNQ1*-Gen dar, welches für eine Untereinheit eines spannungsabhängigen K^+ -Kanals kodiert. Mutationen in dieser Untereinheit verursachen das lange-QT-Syndrom, eine bestimmte Form der Herzrhythmusstörung. Der gesamte Kanalkomplex besteht aus 4 alpha-Untereinheiten sowie regulatorischen beta-Untereinheiten. Somit ist es möglich, dass ein dominant-negativer Effekt einer in den Kanalkomplex eingebauten mutanten Untereinheit auf die anderen Untereinheiten ausgeübt wird. Dieser Effekt äußert sich in einer merklich reduzierten Amplitude des K^+ -Stroms durch den Kanalkomplex (Herbert et al., 2002). Des Weiteren sind außerhalb von Ionenkanälen dominant-negative Mutationen im *FBNI*-Gen bekannt, die ursächlich sind für das Marfan-Syndrom. Das Gen kodiert für Fibrillin-1, welches als Glykoprotein ein Hauptbestandteil der freien Mikrofibrillen und der mit den elastischen Fasern assoziierten Mikrofibrillen des Bindegewebes, die in den Zonulafasern des Auges, in der Arterienwand, in der Haut sowie im hyalinen Knorpel und im Periost

vorkommen, ist. Missense-Mutationen, die intra- oder intermolekulare Disulfidbrücken betreffen, Sequenzveränderungen konservierter Bindungsregionen oder auch zusätzliche Cysteinreste, beeinträchtigen vor allem die Proteinkonformation. Die Interaktion eines solchermaßen mutierten Monomers mit einem wildtypischen Protein bewirkt eine strukturelle Störung der Mikrofibrillen. Infolgedessen kommt es zu einer Beeinträchtigung des Aufbaus der betroffenen Gewebe. Neben diesem dominant-negativen Effekt von Mutationen auf den Aufbau von hochpolymorphen Mikrofibrillen spielt eine vermehrte Proteaseempfindlichkeit des Fibrillins eine Rolle in der Pathogenese des Marfan Syndroms (Robinson et al., 2000).

5.2 Mutationsanalysen in Familien mit autosomal-dominanter familiärer Hypercholesterinämie

Die Analysen in der türkischen Familie FH1 mit diagnostizierter autosomal-dominanter FH haben gezeigt, welchen Einfluss Phänokopien in einem Stammbaum auf experimentelle Analysen haben können. Eine Verkettung von ungünstigen Umständen führte dazu, dass die kausale Mutation in *LDLR* initial nicht gefunden werden konnte: 1. Für die molekulargenetische Testung der bekannten FH-Gene wurde der Indexpatient III:5 ausgewählt, der, wie sich später herausstellte, einer der beiden Individuen mit Phänokopie darstellte. 2. Die Kopplungs- und Haplotypanalyse mit polymorphen Mikrosatelliten-Markern führte zum Ausschluss einer Kopplung des *LDLR*-Locus mit der Erkrankung in der Familie, da die beiden Phänokopien III:5 und II:8 den identifizierten gemeinsamen Haplotyp, den die restlichen sieben betroffenen Familienmitglieder aufwiesen, eben nicht trugen. 3. Bei der parametrischen Analyse der genomweiten Kopplungsdaten unter Berücksichtigung eines autosomal-dominanten Erbgangs, einer reduzierten Penetranz von 0,99 und einer Frequenz des Krankheitsallels von 0,0001 fanden sich keine gekoppelten Regionen mit einem statistisch signifikanten LOD-Score, da dieses angenommene Modell aufgrund der vorhandenen Phänokopien in der Familie beeinträchtigt wurde. Eine Lösung des Problems bot die modellfreie, nicht-parametrische Analyse. Hierbei wurden signifikante NPL-Scores zum einen für die *LDLR*-Region und zum anderen für eine Region auf Chromosom 9q31.1 festgestellt. Eine wiederholte Mutationsanalyse in *LDLR*, diesmal bei allen betroffenen und nicht-betroffenen Familienmitgliedern, führte letztendlich zur Identifizierung der bekannten, kausalen, heterozygoten p.C222R Mutation, die alle Betroffenen mit Ausnahme der Phänokopien trugen. Dieses Beispiel zeigt, dass bei Erkrankungen, die in der Gesamtbevölkerung häufig vorkommen, Vorsicht im Stammbaum hinsichtlich Phänokopien geboten ist. Aufgrund des vorliegenden autosomal-dominanten Vererbungsmodus in der

Familie FH1 wurde davon ausgegangen, dass bei allen Betroffenen ein bestimmter Defekt in einem Gen ursächlich für die Erkrankung ist. Jedoch war die molekulare Ursache der Hypercholesterinämie bei zwei Betroffenen nicht auf denselben monogenen Defekt zurückzuführen, sondern hatte einen anderen Hintergrund. Es ist somit bei größeren Familien ratsam immer mindestens zwei Patienten, molekulargenetisch zu untersuchen, um kausale Mutationen nicht zu übersehen. Die p.C222R Mutation ist im *repeat 5* der Ligandenbindungsdomäne des LDL-Rezeptors lokalisiert, welcher zusammen mit dem *repeat 4* eine hydrophobe Tasche ausbildet mit der die positiven amphiphatischen Helices in Apolipoprotein B-100 und Apolipoprotein E in Wechselwirkung treten können. Bei dem Cystein an Position 222 handelt es sich um eines der sechs Cysteine im *repeat 5*, welche über die Ausbildung von Disulfidbrücken die Faltung der Domäne in eine rigide Tertiärstruktur bewirken (Boren et al., 2001). Durch den Austausch des hochkonservierten polaren, neutralen Cysteins gegen das basische Arginin kommt es wahrscheinlich zu einer beeinträchtigten Bindung von LDL an den LDL-Rezeptor (Klasse-3-Defekt) (Hobbs et al., 1986). Das Problem der Phänokopien tritt vor allem bei häufigen komplexen Erkrankungen auf. Phänokopien sind umweltbedingte, nicht-erbliche Nachahmungen von genetisch bedingten Phänotypen, die aber alternativ auch durch bestimmte erbliche Konstitutionen hervorgerufen werden können. Die Familienmitglieder III:5 und II:8 in der Familie FH1 sind phänotypisch von den Betroffenen mit kausaler *LDLR*-Mutation nicht zu unterscheiden. Bei ihnen ist die Hypercholesterinämie möglicherweise auf einen oder mehrere andere genetische Faktoren und durch das Zusammenwirken mit ungünstigen Umweltfaktoren zurückzuführen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass einer Veränderung im *ABCA1*-Gen, welches in der zweiten mittels nicht-parametrischen Kopplungsanalyse detektierten Region auf Chromosom 9q31.1 liegt und im Kontext dieser Arbeit als besonders relevantes Kandidatengen erschien, eine negativ modifizierende Rolle zukommt und das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung in der Familie FH1 mitbestimmt und für die Phänokopien eine Erklärung darstellt. Diese Hypothese konnte jedoch nicht bestätigt werden. Die festgestellte Co-Segregation des Locus mit der Erkrankung ist somit entweder zufällig oder ein modifizierender Faktor liegt in einem anderen Bereich der gekoppelten chromosomalen Region. Die Durchführung einer Exom-Sequenzierung bei den beiden Phänokopien bietet sich an, um einen kausalen genetischen modifizierenden Faktor zu identifizieren. Interessant wäre eine Exom-Sequenzierung zur Identifizierung von neuen Hypercholesterinämie-Genen auch bei Betroffenen der anderen analysierten Familien (FH2-5), bei denen keine kausale Mutation in einem der bekannten FH-Gene gefunden wurde und die sich aufgrund ihrer Familienstruktur nicht unbedingt für eine

klassische positionelle Klonierungs- und Kandidatengenstrategie eignen. In der Familie FH2 müsste zuvor allerdings noch die Kausalität und Pathogenität der identifizierten, als SNP annotierten Veränderung c.1060+10G>C untersucht werden.

5.3 Identifizierung der molekularen Ursache von Woodhouse-Sakati-ähnlichen Syndromen

Die Identifizierung der molekularen Ursache des Woodhouse-Sakati-ähnlichen Syndroms in der Familie HYPO1 wurde vor allem dadurch erschwert, dass über das Protein C2orf37 zum Zeitpunkt der Analyse nichts bekannt war. Bei der genomweiten Kopplungsanalyse wurde für sieben Regionen ein theoretisch maximaler parametrischer LOD-Score von 2,06 erreicht. Mittels Marker- und Haplotypanalyse konnte für zwei der sieben Regionen eine Kopplung mit der Erkrankung und Homozygotie bestätigt werden. Aufgrund der Tatsache, dass eine anschließende Analyse der positionellen Kandidatengene zunächst auf der Überlegung beruhte, ob die bekannten funktionellen Eigenschaften der Gene mit den Symptomen in der Familie vereinbar waren, gehörte *C2orf37* nicht zu den ersten systematisch untersuchten Kandidatengenen. Erst nach der Veröffentlichung von Alazami et al., die *C2orf37* als kausales Gen für das Woodhouse-Sakati Syndrom identifizierten (Alazami et al., 2008), wurde *C2orf37* wegen der phänotypischen Überlappung des Woodhouse-Sakati Syndroms mit den vorhandenen klinischen Ausprägungen in den Familien HYPO1-7 als relevantes Kandidatengen in Betracht gezogen. Eine anschließende Mutationsanalyse in *C2orf37* führte in Familie HYPO1 zur Identifizierung der neuen homozygoten Spleißmutation c.1091+1G>A. Des Weiteren konnten in Familie HYPO2 und HYPO3 ebenfalls *loss-of-function* Mutationen als kausale Ursache für die Erkrankung gefunden werden (c.436delC, p.Q146LfsX204; c.54delC, p.G18AfsX59). Bei der c.436delC Mutation handelt es sich um eine bereits beschriebene Gründermutation in der saudi-arabischen Population (Alazami et al., 2008). Die Anzahl aller bisher identifizierten kausalen *C2orf37*-Mutationen konnte durch die durchgeführten Analysen von insgesamt acht auf zehn erhöht werden. Bei allen Mutationen handelt es sich entweder um eine Nonsense-Mutation, *frameshift* Deletion oder Spleißmutation, die zu einer Trunkierung des Proteins führt. Der Schweregrad des assoziierten Phänotyps korreliert dabei nicht mit der resultierenden Proteinlänge, was darauf hindeutet, dass ein intaktes *full-length* Protein für die Funktion notwendig ist. Möglicherweise werden alle mutanten mRNAs selektiv über den *nonsense-mediated mRNA decay* abgebaut. Alle Mutationen haben einen homoallelischen Hintergrund und wurden ausschließlich in konsanguinen Familien gefunden. Des Weiteren segregieren in Familien gleicher Ethnizität

dieselben Mutationen, was vermuten lässt, dass in jeder Ethnizität nur ein begrenztes Repertoire an Mutationen existiert (Alazami et al., 2008, Alazami et al., 2010, Rachmiel et al., 2011).

Bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Familien (HYPO1-HYPO7) wurde kein klassisches Woodhouse-Sakati Syndrom diagnostiziert und beschrieben, sondern es wurden jeweils überlappende Phänotypen festgestellt, weshalb die Bezeichnung Woodhouse-Sakati-ähnliches Syndrom erfolgte (Devriendt et al., 1996, Devriendt et al., 1996, Megarbane et al., 2003, Tatar et al., 2009). Die phänotypischen Unterschiede sind nicht markant, was zur Annahme führt, dass die klinischen Merkmale in den Familien HYPO1-7 zum Spektrum des Woodhouse-Sakati Syndroms gehören. Bei den Erkrankungen handelt es sich möglicherweise um ein und dasselbe Syndrom mit variabler klinischer Ausprägung. Die Syndrome in den Familien HYPO1-7 wären somit eine klinische Ausprägung des Woodhouse-Sakati Syndroms, hervorgerufen durch gleiche *C2orf37*-Mutationsmechanismen (*loss-of-function* Mutationen). Die Familien HYPO1 und HYPO2, bei denen eine kausale Mutation gefunden wurde, weisen mit Hypogonadismus, mentaler Retardierung und Alopezie drei der fünf Hauptcharakteristika des Woodhouse-Sakati Syndroms auf (Devriendt et al., 1996, Tatar et al., 2009). Zusätzlich wurde bei ihnen eine Schwerhörigkeit diagnostiziert, die sehr häufig mit dem Woodhouse-Sakati Syndrom assoziiert auftritt. Diabetes und extrapyramidale Störungen wurden nicht festgestellt. Grundsätzlich sind bei Patienten mit Woodhouse-Sakati Syndrom die IGF-1-Serumwerte reduziert und gelten somit als Marker für die Erkrankung. Auch bei den Familien HYPO1 und HYPO2 lagen reduzierte IGF-1-Werte vor. Bei Familie HYPO3 wurden mit Hypogonadismus, Alopezie und extrapyramidalen Störungen ebenfalls drei Hauptcharakteristika des Woodhouse-Sakati Syndroms diagnostiziert. Größere phänotypische Unterschiede zwischen den Familien und einem klassischen Woodhouse-Sakati Syndrom würden eher auf allelisch überlappende Erkrankungen hinweisen.

Das Woodhouse-Sakati Syndrom weist generell eine große klinische Heterogenität auf. Die phänotypische Ausprägung und der Schweregrad der Erkrankung variiert sowohl inter- als auch intrafamiliär (Alazami et al., 2010, Tatar et al., 2009). Trotz der Heterogenität stellten Alazami et al. bereits fest, dass bei allen Patienten mit kausaler *C2orf37*-Mutation immer Hypogonadismus und Alopezie vorlagen und spekulierten, dass das alleinige Vorhandensein dieser beiden Charakteristika bezeichnend ist für *C2orf37*-Mutationen (Alazami et al., 2010). Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies bestätigt werden, denn auch in den Familien HYPO1-3 liegen Hypogonadismus und Alopezie vor, während sich die Familien in anderen phänotypischen Ausprägungen unterscheiden. Es stellt die sich Frage, welche zusätzlichen

genetischen oder auch nicht-genetischen Faktoren für die sehr unterschiedliche klinische Ausprägung von *C2orf37-loss-of-function*-Mutationen verantwortlich sind. Es ist höchst interessant, dass unterschiedliche Ausprägungsspektren familiär gehäuft vorkommen, so dass zusätzliche genetische Faktoren, die eine positiv oder negativ modifizierende Rolle spielen, wahrscheinlich sind. Solche modifizierenden genetischen Faktoren könnten sogenannte *modifier*-Gene sein, die zusätzlich zu einem obligaten Defekt in dem krankheitsverursachenden Gen die klinische Erscheinungsform mitbestimmen. Sie prägen sich unabhängig vom Hauptgen aus, wirken mit diesem zusammen und bestimmen so unterschiedliche phänotypische Ausprägungen. Prinzipiell ist für genetische modifizierende Faktoren sowohl eine an das Krankheitsgen gekoppelte als auch unabhängige Vererbung denkbar. Eine mögliche Kandidatenregion für einen genetischen modifizierenden Faktor wäre bei Familie HYPO1 die Region auf Chromosom 5q31.3-5q33.1, welche auch mit der Erkrankung in der Familie co-segregiert. Alazami et al. vermuteten bereits, dass *modifier* eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Woodhouse-Sakati Syndroms spielen (Alazami et al., 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass das C2orf37-Protein in Nucleoli vorkommt und hauptsächlich im Gehirn, der Leber und der Haut exprimiert wird (Alazami et al., 2008). Dieses Expressionsmuster steht im Einklang mit den neurologischen Manifestationen, der Alopezie und den erniedrigten IGF-1-Werten (Leberhormon) bei Woodhouse-Sakati Patienten. Über die Funktion des Proteins in den Nucleoli ist noch nichts bekannt. In den Nucleoli findet die Synthese von rRNAs sowie die Assemblierung dieser rRNAs mit eingeschleusten ribosomalen Proteinen statt, so dass Ribosomenuntereinheiten synthetisiert werden. Weitere nucleoläre Funktionen schließen die Regulation des Zellzyklus, zelluläre Alterung, Biosynthese von Signalerkennungspartikeln, Prozessierung von sRNA, Transport von mRNA und Apoptose ein (Dousset et al., 2000, Kerr et al., 2007). Ob eine defekte Ribosomenbiogenese der zugrundeliegende Mechanismus der Pathogenese des Woodhouse-Sakati Syndroms ist oder ob die Beeinträchtigung anderer nucleolärer Funktionen ursächlich ist, bleibt aufzuklären. Mittlerweile ist eine weitere multisystemische Erkrankung bekannt, die durch Mutationen in einem nucleolären Protein hervorgerufen wird. Nousbeck et al. identifizierten 2008 eine *loss-of-function* Mutation in *RBM28*, einem nucleolären Protein, welches in die Ribosomenbiogenese involviert ist, als kausale Ursache für ein Syndrom, das charakterisiert ist durch Alopezie, neurologische Defekte und Endokrinopathien (Nousbeck et al., 2008).

Das Woodhouse-Sakati Syndrom kombiniert mit Diabetes, kognitiven Beeinträchtigungen und Hypogonadismus einige der meist erforschten klinischen Phänotypen und bietet aufgrund seines extrem seltenen Vorkommens eine einmalige Möglichkeit, die Biologie dieser Phänotypen zu untersuchen und neue pathologische Mechanismen aufzudecken. Eine Expression von *C2orf37* in Langerhans-Inseln konnte nicht nachgewiesen werden (Alazami et al., 2008), hätte aber möglicherweise die Pathogenese von Diabetes bei einigen Woodhouse-Sakati-Patienten erklären können. Langerhans-Inseln sind Zellagglomerate im Pankreas, die die Höhe des Blutzuckers registrieren und durch die Produktion von Glukagon und Insulin den Blutzuckerspiegel beim Menschen regulieren. Beschädigungen oder Fehlfunktion dieser Zellen sowie ihr kompletter Ausfall sind die direkten Ursachen für Diabetes mellitus. Die Aufklärung der *C2orf37*-Proteinfunktion wird dazu beitragen, sowohl die Pathogenese von Diabetes als auch von Hypercholesterinämie und Hypertriglyzeridämie, die ebenfalls häufig mit dem Woodhouse-Sakati Syndrom assoziiert sind, zu verstehen. All diese Störungen stellen für kardiovaskuläre Ereignisse und die Progression der Atherosklerose beachtenswerte Risikofaktoren dar.

Bei den Familien HYPO4-7 konnten in *C2orf37* keine kausalen Mutationen gefunden werden, was darauf hindeutet, dass weitere Gene eine Rolle bei der Pathogenese des Woodhouse-Sakati Syndroms und seiner variablen klinischen Ausprägung spielen. Nachdem bei Familie HYPO7 bereits eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt wurde, soll das kausale Gen nun mittels *targeted sequencing* der fünf gekoppelten Regionen identifiziert werden. Bei rezessiv-vererbten Erkrankungen ist es sehr effizient, gewonnene Exom-Daten bereits mit einer minimalen Menge an Kopplungsdaten zu filtern. Am ehesten erwartet man bei rezessiven Erkrankungen (vor allem in konsanguinen Familien) homozygote Mutationen, so dass zunächst nur die mittels Exom-Sequenzierung detektierten Varianten als möglicherweise kausal erachtet werden, die bei den betroffenen Individuen in größeren homozygoten Regionen lokalisiert sind. Diese vielversprechende Strategie soll nun bei den restlichen Familien ohne *C2orf37*-Mutation, die sich aufgrund der Familienstruktur für eine klassische positionelle Klonierungs- und Kandidatengenstrategie nicht eignen, angewendet werden.

5.4 Identifizierung einer molekularen Ursache des Wiedemann-Rautenstrauch Syndroms

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen mittels neuester Technologie, der Exom-Sequenzierung, ein kausales Gen für das sehr seltene rezessive Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom, einem neonatalen Progerie Syndrom, zu identifizieren. Bei einem türkischen

Patienten einer konsanguinen Familie (WR1) konnte die homozygote Nukleotidsubstitution c.G616A im *PYCR1*-Gen gefunden werden, die auf Proteinebene in der konservierten funktionellen katalytischen Domäne des Proteins zu einem Austausch der hochkonservierten Aminosäure Glycin an Position 206 gegen die Aminosäure Arginin führt (p.G206R). Hierbei kommt es zu einer Substitution eines polaren und neutralen Aminosäurerestes gegen einen basischen Aminosäurerest, was dafür spricht, dass die Mutation eine Konformations- oder Funktionsänderung in der Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat Reduktase bewirkt. Mittels Re-Sequenzierung nach der Sanger-Methode konnte die durch Exom-Sequenzierung detektierte Mutation in *PYCR1* bestätigt werden. Die Segregationsanalyse in der Familie ergab, dass beide gesunden Elternteile heterozygot für die Mutation waren. Krankheitsverursachende Mutationen in *PYCR1*, unter anderem auch die p.G206R Mutation, wurden bereits für verschiedene Syndrome beschrieben, die sich vor allem durch einen progeroiden Aspekt auszeichnen und phänotypische Überlappungen zum Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom aufweisen. Weiter wurde die Kausalität der Veränderung durch die Abwesenheit der Mutation in insgesamt 130 Kontroll-DNAs von gesunden Individuen gleicher ethnischer Abstammung unterstützt. Außerdem war die Veränderung in keiner der verwendeten Datenbanken als SNP annotiert.

Die Exom-Sequenzierung ist eine exzellente neuartige Methode zur Gen-Identifizierung, unter anderem bei monogenen Erkrankungen, vor allem in kleinen Familien und einzelnen Patienten, die sich für Kopplungsanalysen und nachfolgende positionelle Klonierung nicht eignen. Dies wurde durch die Identifizierung der molekularen Ursache des Wiedemann-Rautenstrauch Syndroms im Rahmen dieser Arbeit bestätigt. Mit der massiven Parallelsequenzierung kann in kürzester Zeit eine enorme Menge an Sequenzdaten generiert werden. Eine Schwierigkeit der Exom-Sequenzierung ist jedoch, unter den bei einem Patienten detektierten 5000-10000 nicht beschriebenen Varianten, die mit einer veränderten Proteinsequenz oder einem fehlerhaften Spleißen einhergehen und nicht in einer der Datenbanken als SNP annotiert sind, die kausale Veränderung zu finden. Durch eine geeignete Filterstrategie ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, die Anzahl der mittels Exom-Sequenzierung detektierten Varianten beim Wiedemann-Rautenstrauch Patienten von insgesamt 563363 auf 12 potentiell pathogene Veränderungen zu reduzieren. Dabei konnte vor allem die Stärke und Nützlichkeit einer konsanguinen Familie demonstriert werden, um die Zahl der Varianten zu minimieren. Bei rezessiven Erkrankungen mit elterlicher Konsanguinität erwartet man höchst wahrscheinlich am ehesten homozygote Mutationen. Die betroffenen Kinder haben im Krankheitslocus dann zwei Haplotypen gemeinsam, die von

einem einzelnen gemeinsamen Vorfahren abstammen. Mittels SNP-basierter Kopplungsanalyse wurden bei dem Wiedemann-Rautenstrauch Patienten homozygote Regionen identifiziert und nur die detektierten Varianten als kausal erachtet, die in diesen Regionen lokalisiert waren. Die Konsanguinität der Familie hat dazu beigetragen die Anzahl der Varianten um den Faktor 17 zu vermindern. Die Bestimmung der homozygoten Regionen hätte auch im Vorfeld durch Homozygotie-Kartierung mit Hilfe von SNP-Chips und der Verwendung von DNA sowohl des Patienten und der beiden Elternteile erfolgen können. Die äußerst effiziente Strategie, Konsanguinität als genomweiten Filter für Exom-Daten zu nutzen, wurde bisher in der Literatur erst zwei Mal beschrieben. Mittels Exom-Sequenzierung in Kombination mit homozygoten chromosomalen Regionen gelang es Tekin et al. *MASPI* als kausales Gen für das 3MC-Syndrom zu identifizieren (Sirmaci et al., 2010). Sie führten eine Exom-Sequenzierung bei einem türkischen Patienten einer konsanguinen Familie und parallel dazu eine Homozygotie-Kartierung in derselben Familie und einer weiteren türkischen Familie durch. Bei der Homozygotie-Kartierung kam eine autozygote Region auf Chromosom 3q27 raus. In dieser Region wurden im Rahmen der Exom-Sequenzierung nur vier seltene, potentiell kausale Varianten detektiert, unter anderem eine in *MASPI*. Bei dem Patienten der zweiten Familie wurde anschließend mittels Sanger-Sequenzierung ebenfalls eine Mutation in *MASPI* gefunden. Des Weiteren zeigte unsere Arbeitsgruppe bereits, dass die beschriebene Strategie sehr effizient und vielversprechend ist. Exom-Sequenzierung bei einem französischen Patienten türkischer Herkunft mit Seckel-Syndrom und konsanguinen Eltern und eine anschließende Filterung ausschließlich nach Varianten in einer großen homozygoten Region, führten zur Identifizierung einer pathogenen Mutation in *CEP152* (Kalay et al., 2011).

Eine weitere Schwierigkeit der Exom-Sequenzierung stellt immer noch die oft nicht ausreichende *coverage* dar, was im Zuge dieser Arbeit gezeigt wurde. Es ergab sich die Problematik, dass bei der ersten Analyse nach dem ersten *single read* Lauf mit zwei Spuren auf dem Illumina Genome Analyzer Iix die kausale Mutation in *PYCR1* nicht gefunden werden konnte, da die entsprechende Zielregion, in der die Mutation lokalisiert war nicht ausreichend angereichert wurde. Eine gute Anreicherung und damit verbunden eine hohe *coverage* ist zwingend notwendig zur vollständigen Analyse und ausschlaggebend für den Erfolg einer Exom-Sequenzierung. Für die Anreicherung definierter genomischer Regionen beim Wiedemann-Rautenstrauch Patienten wurde das SureSelect Target Enrichment System von *Agilent Technologies* verwendet. Dieses System beruht auf einem Verfahren, bei dem die Hybridisierung in Lösung durchgeführt wird. Nach Fragmentierung und Prozessierung der

genomischen DNA wird diese zur Anreicherung zusammen mit biotinylierten RNA-Fragmenten (*baits*), welche das gesamte Exom abbilden, für 24 h hybridisiert. Im Anschluss werden die gebildeten DNA-RNA-Hybride mithilfe von Streptavidin beschichteten Magnetpartikeln sowie eines starken Magneten aus der Hybridisierungslösung herausgefischt. Nach mehreren Waschschritten, die dazu dienen unspezifisch gebundene DNA zu entfernen, werden die RNA-*baits* verdaut. Somit verbleiben nur noch die daran gebundenen DNA-Fragmente in der Lösung. Die so angereicherten DNA-Fragmente werden mit wenigen PCR-Zyklen amplifiziert und stehen für die Sequenzierung zur Verfügung. Es kann aus verschiedenen Gründen zu einer schlechten Anreicherung der Zielregion kommen. Im ungünstigsten Fall liegt die kausale Mutation in einer genomischen Region, die man einfach nicht anreichern kann. Beispielsweise sind in der Regel für repetitive Sequenzen keine RNA-Sonden im Kit vorhanden, da solche Regionen nicht angereichert werden können und ein späteres *alignment* mit einer Referenzsequenz und entsprechende Sequenz-Zuordnung nicht möglich sind und diese deswegen nicht berücksichtigt werden. Liegt die kausale Veränderung tatsächlich in einem Bereich, für den keine Sonden existieren, ist die Anwendung der Exom-Sequenzierung nicht zielführend. Weiterhin kann die Effizienz von RNA-Sonden unzureichend sein. Manche RNA-Sonden weisen gegenüber bestimmten genomischen Zielregionen, aufgrund deren spezifischer Sequenz und Sekundärstruktur und der damit verbundenen schweren Zugänglichkeit, nur eine schwache Bindungskapazität auf. Zu diesen Zielregionen zählen beispielsweise GC-reiche Regionen. Das Anreicherungssystem sollte die Fähigkeit haben eine hohe Toleranz gegenüber SNPs und auch gegenüber Insertionen und Deletionen aufzuweisen, da dies zur homogenen Detektion von unterschiedlichen Allelen notwendig ist, jedoch stellen gerade Deletionen ab 5 Bp in der Zielsequenz immer noch ein Problem dar. Besitzen RNA-DNA-Hybride nur eine niedrige Affinität kann es zudem passieren, dass bei den Waschschritten nach der Hybridisierung nicht nur unspezifisch gebundene DNA entfernt wird, sondern auch spezifisch gebundene DNA. Die kausale Mutation im *PYCR1*-Gen beim Patienten mit Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom konnte erst nach einem zweiten *single read* Lauf mit einer dritten Spur auf dem Illumina Genome Analyzer Iix, der zur Erhöhung der *coverage* durchgeführt wurde, detektiert werden. Die durchschnittliche *coverage* betrug nach zwei *single read* Läufen mit insgesamt drei Spuren 126. Die Auswertung der Exom-Daten verdeutlichte jedoch nochmal die Schwierigkeit eine homogene *coverage* zu erhalten. Diese variierte für die einzelnen Varianten zwischen 0 und maximal 2211. Im Falle der kausalen Mutation in *PYCR1* wurde die *coverage* durch den zweiten Lauf von 0 auf 5 erhöht. Dies zeigte, dass der Effekt von einer einzigen zusätzlichen

Spur nicht sehr effizient war, jedoch hat die geringfügige Verbesserung in diesem Zusammenhang zur Identifizierung der *PYCR1*-Mutation ausgereicht. Es ist zu empfehlen, wenn initial keine krankheitsverursachende Veränderung gefunden werden kann, mehrere Sequenzier-Läufe durchzuführen, beziehungsweise die angereicherte DNA auf mehrere Spuren zu laden, um per se mit der *coverage* hochzugehen. Je besser die *coverage* ist, desto niedriger ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den detektierten Varianten um falsch-positive Varianten handelt. Prinzipiell besteht bei konsanguinen Familien die Möglichkeit vor der Exom-Sequenzierung eine Homozygotie-Kartierung durchzuführen und anschließend nur die größeren homozygoten Regionen anzureichern und mittels *targeted* Exom-Sequenzierung zu sequenzieren. Durch die Anreicherung von deutlich weniger Regionen würde man von vornerein eine höhere *coverage* erreichen. Trotzdem ist es bei konsanguinen Familien sinnvoller die *coverage* durch zusätzliche Sequenzier-Läufe zu erhöhen, da es vorkommen kann, dass die Konsanguinität in einer Familie nur zufällig ist und nichts mit der Erkrankung zu tun hat. Bei einer *targeted* Exom-Sequenzierung könnte es somit passieren die Mutation zu übersehen.

Pathogene Missense-, Spleiß- und *frameshift*-Mutationen in *PYCR1* wurden bereits im Jahre 2009 von unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer von Reversade et al. durchgeführten Studie bei Patienten mit Gerodermia Osteodysplastika, Wrinkly Skin Syndrom und de Barsy Syndrom beschrieben (Reversade et al., 2009). Diese drei syndromalen Erkrankungen weisen klinisch überlappende Phänotypen auf, so dass eine eindeutige Diagnose häufig schwierig ist. Gekennzeichnet sind die Erkrankungen hauptsächlich durch einen progeroiden Aspekt, laxe und faltige Haut sowie Osteopenie. Zusätzlich zur typischen Cutis laxa fanden sich bei den meisten der 35 Patienten aus 22 Familien mit *PYCR1*-Mutation eine intrauterine Wachstumsverzögerung, mentale Retardierung, eine generalisierte Bindegewebsschwäche, Hernien sowie eine typische Facies. Einige Patienten die schwerwiegender betroffen waren, wiesen zusätzlich eine Agenesie oder Hypoplasie des Corpus callosum und eine Katarakt auf. Auf molekularer Ebene wurde durch die Identifizierung der bekannten p.G206R Mutation gezeigt, dass das Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom zum selben klinischen Spektrum gehört. Bei einem Patienten mit diagnostizierter Gerodermia Osteodysplastika aus Katar wurde von Reversade et al. dieselbe *PYCR1*-Mutation identifiziert. Die daraufhin durchgeführte klinische Re-Evaluierung des Wiedemann-Rautenstrauch Patienten zeigte, dass das Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom eindeutige klinische Überlappungen mit den drei anderen syndromalen Erkrankungen mit progeroiden Phänotypen hat. Vor allem aufgrund einer deutlich schwerwiegenderen Symptomatik ist es aber von den anderen Syndromen zu

unterscheiden. Zu den überlappenden phänotypischen Ausprägungen beim Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom zählen eine progeroide Erscheinung, intrauterine Wachstumshemmung, charakteristische faziale Kennzeichen, mentale Retardierung sowie Veränderungen der Ossifikation. Hauptsächlich unterscheidet sich das Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom dadurch, dass ein frühzeitiger Alterungsprozess bereits neonatal auftritt. Außerdem ist das Syndrom mit frühzeitig auftretenden endokrinen und metabolischen Störungen, unter anderem Dyslipidämien, assoziiert. Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Wiedemann-Rautenstrauch Patient wies eine leichte laxe und faltige Haut sowie eine generalisierte Bindegewebsschwäche auf. Zuvor wurde dies noch bei keinem Wiedemann-Rautenstrauch Patienten beschrieben. Festgestellt wurde in mehreren Fällen nur ein mangelhaft ausgebildetes subkutanes Fettgewebe. Bei den vier überlappenden klinischen Entitäten Gerodermia Osteodysplastika, Wrinkly Skin Syndrom, de Barsy Syndrom und Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom handelt es sich um allelische Erkrankungen, die durch gleiche *PYCR1*-Mutationen und -Mutationsmechanismen hervorgerufen werden. Die Symptome des Wiedemann-Rautenstrauch Syndroms passen zum schweren Ende des klinischen Spektrums. Das Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom demonstriert, zu welchen schwerwiegenden funktionellen Beeinträchtigungen des Systems es kommen kann. Es stellt sich nun vor allem die Frage, aus welchem Grund es zu einer Beeinträchtigung der vielen zusätzlichen Organsysteme und dem deutlich schwerwiegenderen Phänotyp beim Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom kommt und warum alle vier Syndrome unterschiedliche klinische Erscheinungsbilder aufweisen. Zusätzlich zu dem obligaten Defekt im *PYCR1*-Gen spielen wahrscheinlich weitere genetische Faktoren eine positiv oder negativ modifizierende Rolle und sind für die sehr unterschiedliche klinische Ausprägung von *PYCR1*-Mutationen verantwortlich. Solche modifizierenden genetischen Faktoren könnten sogenannte *modifier*-Gene sein. Sie prägen sich unabhängig vom Hauptgen aus, wirken mit diesem zusammen und bestimmen so die unterschiedliche phänotypische Ausprägung. Im Jahre 2009 haben Yngvadottir et al. im Rahmen einer großen Studie die Häufigkeit von Nonsense-SNPs in der Gesamtpopulation analysiert und gezeigt, dass solche gar nicht so selten vorkommen (Yngvadottir et al., 2009). Dieses Ergebnis wurde durch die Pilotstudie des *1000 Genomes Project* bestätigt (Durbin et al., 2010). Nonsense-SNPs haben prinzipiell einen pathogenen Charakter und aus diesem Grund sind sie potentiell sehr gute Kandidaten für modifizierende Faktoren, die zusätzlich das funktionelle System betreffen. Möglicherweise kommt ihnen nur in Kombination mit einer kausalen Mutation in *PYCR1* eine modulierende Funktion zu. Wahrscheinlich bestimmt die Addition von mehreren Faktoren den Phänotyp der

Erkrankungen und führt zu spezifischen Veränderungen des Systems. Die Identifizierung von modifizierenden Faktoren ist von großem Interesse, um den Verlauf und die Entstehung der Erkrankung zu verstehen.

Bei drei weiteren Patienten mit diagnostiziertem Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom konnten keine weiteren Mutationen in *PYCR1* identifiziert werden, was für eine weitere genetische Heterogenität der Erkrankung spricht. Exzellente Kandidatengene, die sich für Mutationsanalysen bei den Patienten anbieten sind *SCYL1BP1* (*soluble protein SCY1-like 1 binding protein 1*) und *ATP6V0A2* (*V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 2*). *Loss-of-function* Mutationen in *SCYL1BP1* sind die kausale Ursache für Gerodermia Osteodysplastika (Hennies et al., 2008). Das Gen wird vor allem in der Haut und Osteoblasten exprimiert. Bei dem Protein handelt es sich um ein Golgin, welches im Golgi-Apparat lokalisiert ist und dort mit Rab6 interagiert. *ATP6V0A2* kodiert für eine Untereinheit der V-ATPase, einer Protonenpumpe, die in Endosomen und im Golgi-Apparat lokalisiert ist und eine wichtige Rolle im sekretorischen Signalweg spielt. Mutationen in *ATP6V0A2* sind ursächlich für das Wrinkly Skin Syndrom.

Das mitochondrial lokalisierte Enzym Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat Reduktase katalysiert den letzten Schritt der *de novo* Synthese von Prolin. Reversade et al. zeigten, dass kultivierte Fibroblasten von Patienten mit einer *PYCR1*-Mutation eine veränderte mitochondriale Morphologie sowie ein verändertes mitochondriales Membranpotential aufwiesen (Reversade et al., 2009). Nach Induktion von oxidativem Stress durch Behandlung der Fibroblasten mit H_2O_2 kam es zu deutlich ausgeprägteren mitochondrialen Veränderungen und einer erhöhten Apoptoserate. Ein *knockdown* von orthologen Genen in *Xenopus* und Zebrafisch führte zu einer epidermalen Hypoplasie und Bläschenbildung, was von einer massiv erhöhten Apoptose begleitet wurde. Die Ergebnisse legen nahe, dass *PYCR1* zur Aufrechterhaltung der normalen mitochondrialen Morphologie beiträgt und gleichzeitig eine protektive Funktion gegen oxidativen Stress ausübt, möglicherweise durch Inhibition von Apoptose. Neben der Energieproduktion erfüllen die Mitochondrien noch weitere Aufgaben, unter anderem sind sie an der Generierung von potentiell schädlichen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt (Wallace, 2005). ROS wurden initial nur als toxische Nebenprodukte der oxidativen Phosphorylierung betrachtet, mittlerweile ist jedoch auch bekannt, dass sie bedeutend sind für redox-abhängige Signalprozesse (Balaban et al., 2005, D'Autreaux et al., 2007). Normale Zellen im Organismus halten die Fähigkeit, reduzierende und oxidierende Stoffe zu neutralisieren, aufrecht, indem sie Vorräte mit oxidierenden, beziehungsweise reduzierenden Stoffen bevorraten. Ein Ungleichgewicht zwischen diesen Pools, das die normale Reparatur-

und Entgiftungsfunktion einer Zelle überfordert und folglich zu einer Schädigung aller zellulären und extrazellulären Makromoleküle führt, wird als oxidativer Stress bezeichnet. Beim oxidativen Stress ist eine das physiologische Ausmaß überschreitende Menge an reaktiven Sauerstoffspezies vorhanden. Zu den Folgen des durch ROS induzierten oxidativen Stresses gehören die Lipidperoxidation, die letztendlich dazu führt, dass Zellen mehr Energie aufwenden müssen, um ihr Membranpotential zu stabilisieren, ferner kommt es zur Proteinoxidation und zur Schädigung der DNA. Diese drei Vorgänge rufen apoptotische Prozesse hervor und sind somit mitverantwortlich für den Alterungsprozess (Balaban et al., 2005). Zu den zellulären Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress zählen enzymatische und nicht-enzymatische Radikalfänger und Antioxidantien sowie Reparaturmechanismen der DNA und der geregelte Abbau von Proteinen. Prolin zählt zu den nicht-enzymatischen Radikalfängern. ROS können den Aminosäurerest von Prolin oxidieren. Da Mutationen in PYCR1 die Synthese von Prolin beeinträchtigen, könnte somit die Anfälligkeit der Patienten-Fibroblasten gegenüber oxidativem Stress und die erhöhte Apoptoserate erklärt werden. Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit kommen PYCR1 aber noch andere, bisher nicht beschriebene Funktionen zu. Die exakte Rolle von PYCR1 in der mitochondrialen Funktion und Integrität sowie die genauen pathophysiologischen Mechanismen, die zu den Erkrankungen führen, müssen in zukünftigen Untersuchungen erforscht werden.

6 Zusammenfassung

Metabolische Erkrankungen sind ein Hauptfaktor für die Entstehung von Atherosklerose und das damit einhergehende Risiko für das Auftreten von akuten Myokardinfarkten. Sie stellen somit einen der wichtigsten Faktoren für die erhöhte Morbidität und Mortalität in der westlichen Population dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten neue genetische Faktoren und molekulare Mechanismen identifiziert werden, die zu einer Hypercholesterinämie sowie zwei ausgewählten, angeborenen Syndromen führen, die bekanntermaßen mit metabolischen Störungen assoziiert sind.

Wir initiierten molekulargenetische Untersuchungen bei 200 Patienten der deutschen LIANCO Kohorte mit diagnostizierter Hypercholesterinämie. Die Bestimmung des Mutationsspektrums in den bekannten Genen für familiäre Hypercholesterinämie (FH) führte zur Identifizierung von insgesamt 30 unterschiedlichen, heterozygoten *LDLR*-Mutationen bei 20 % der Patienten und zeigt die hohe Prävalenz von *LDLR*-Mutationen in Patientenkohorten ohne beschriebene positive Familienanamnese für Hypercholesterinämie. Die europäische *APOB*-Gründermutation p.R3500Q konnte nur bei einem Patienten detektiert werden. In *PCSK9* wurde keine Mutation gefunden. Bei etwa 50 % der nachgewiesenen *LDLR*-Mutationen handelte es sich um Missense-Mutationen, die anderen 50 % umfassten Nonsense-Mutationen, Spleißmutationen, kleinere Deletionen und Duplikationen sowie größere Deletionen, die mittels MLPA detektiert wurden. Untersuchungen möglicher modifizierender genetischer Faktoren der Cholesterin-Konzentration bei Patienten mit *LDLR* Mutation, zeigten keine statistisch signifikanten Ergebnisse für eine Assoziation von Nonsense-SNPs in *ABCA10*, *APOL3* und *LPL*. Bei einem Patienten konnten wir die heterozygote Nukleotidsubstitution c.-188C>T in der konservierten, GC-reichen SP1-Bindungsstelle im *repeat 1* der *LDLR*-Promotorregion identifizieren. Ein *Luciferase Reporter Assay* zeigte, dass es infolge einer verminderten SP1-Bindungsfähigkeit an den Promotor *in vitro* zu einer signifikanten Reduktion der transkriptionellen Aktivität des mutanten Promotors um 80 % kommt. Diese Ergebnisse wiesen auf die große Bedeutung von transkriptionellen Veränderungen der *LDLR*-Expression in der Pathogenese der Hypercholesterinämie hin.

Basierend auf dieser Erkenntnis führten wir bei Mutations-negativen Patienten der LIANCO Kohorte Mutationsanalysen in *SREBP1* und *SREBP2* durch, zwei Transkriptionsfaktoren, die eine zentrale Rolle in der Cholesterinhomöostase spielen, indem sie unter anderem die Regulation der *LDLR*-Expression kontrollieren. Wir konnten bei einem Patienten die

heterozygote Missense-Mutation p.R812Q im *SREBP1*-Gen identifizieren und bei einem zweiten Patienten die heterozygote Missense-Mutation p.G852R in *SREBP2*. Nach genetischer Bestätigung der kausalen Rolle dieser Mutationen konnten wir mittels einer *in vitro*-Interaktionsstudie zeigen, dass beide Mutationen die konstitutive Wechselwirkung zwischen der regulatorischen, C-terminalen Domäne der SREBP-Vorläuferproteine und der cytoplasmatischen WD-Domäne von SCAP in der Membran des endoplasmatischen Retikulums beeinträchtigen. Infolgedessen kommt es zu einer verminderten Freisetzung des N-terminalen, transkriptionell aktiven Teils von SREBPs und dadurch zu einer reduzierten Expression von *LDLR*, was mittels *Luciferase Reporter Assay* nachgewiesen wurde. Die resultierende LDL-Rezeptordefizienz an der Zelloberfläche bietet eine Erklärung für die Akkumulation von LDL-Partikeln im Plasma der Patienten, die Diagnose Hypercholesterinämie und identifiziert zwei neue ursächliche Gene für Hypercholesterinämie. Mittels eines zweiten Ansatzes, bei dem große Familien mit diagnostizierter FH für Kopplungsanalysen verwendet wurden, ließen sich keine neuen FH-Gene identifizieren. In einer großen türkischen Familie mit neun betroffenen Individuen stellten wir fest, dass das Auftreten von Phänokopien bei häufigen Erkrankungen die experimentellen Daten sehr beeinflussen kann und konnten zeigen, wie sich das Problem durch die Verwendung einer nicht Modell-basierten, nicht-parametrischen Kopplungsanalyse bewältigen lässt. Nachfolgend wurde die p.C222R *LDLR*-Mutation bei sieben von neun betroffenen Familienmitgliedern gefunden.

Die Identifizierung von neuen genetischen Faktoren und molekularen Mechanismen der Hypercholesterinämie bei Patienten der LIANCO Kohorte kann entscheidend dazu beitragen, künftig eine präzisere genetische Beratung anzubieten, individuelle Risikoabschätzungen zu treffen und hoffentlich neue therapeutische Strategien zu entwickeln.

Des Weiteren führten Studien über zwei angeborene, autosomal-rezessiv vererbte Syndrome, die mit metabolischen Störungen assoziiert sind, zur Identifizierung von neuen krankheitsverursachenden Mutationen und zur Aufklärung der molekularen Pathogenese dieser Erkrankungen. Nach genomweiter Kopplungsanalyse in einer Familie, die klinisch durch Hypogonadismus, Diabetes, Alopezie und mentale Retardierung charakterisiert ist, fanden wir eine krankheitsverursachende Mutation, c.1091+1G>A, im *C2orf37*-Gen, welches in einer großen homozygoten Region auf Chromosom 2q31.1 lokalisiert war. Während unserer Analysen wurde *C2orf37* als kausales Gen für das autosomal-rezessive Woodhouse-Sakati Syndrom beschrieben, das überlappende Symptome mit unseren Familien aufweist. Zusätzlich identifizierten wir *loss-of-function* Mutationen in *C2orf37* in zwei weiteren

Familien mit diagnostizierten Syndromen, die überlappende Phänotypen zeigen, was die Vermutung nahelegte, dass diese zum Spektrum von Woodhouse-Sakati-ähnlichen Phänotypen gehören. Modifizierende genetische Faktoren sind vermutlich verantwortlich für die inter- und intrafamiliäre klinische Variabilität.

Letztendlich ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, mittels Exom-Sequenzierung, einer neuen *High-End-Technologie*, bei einem Patienten mit diagnostiziertem Wiedemann-Rautenstrauch Syndrom (WRS) die kausale homozygote Missense-Mutation p.G206R im *PYCR1*-Gen zu identifizieren. WRS ist ein seltenes, rezessives, neonatales Progerie Syndrom mit frühzeitig auftretenden endokrinen und metabolischen Störungen. Aufgrund der rezessiven Vererbung und der elterlichen Konsanguinität erwies es sich als äußerst effizient, die gewonnenen Exom-Daten mittels Analyse auf homozygote Bereiche zu filtern und so die Anzahl der detektierten potentiell pathogenen Varianten zu minimieren. *PYCR1*-Mutationen wurden bereits für ein Spektrum an Erkrankungen beschrieben, zu dem die Gerodermia Osteodysplastika, das Wrinkly Skin Syndrom und das de Barsy Syndrom gehören. Die klinische Re-Evaluierung unseres Patienten ergab Überlappungen mit diesen Erkrankungen und zeigte, dass der Phänotyp unseres Patienten eine schwere Form am Ende des Spektrums darstellt. Die gestörte *PYCR1*-Funktion beeinflusst den Prolin-Metabolismus und könnte sowohl die mitochondriale Funktion als auch die Produktionsmenge von freien Radikalen beeinträchtigen. Der pathogene Mechanismus muss in Zukunft zwar erst noch aufgeklärt werden, eine mitochondriale Fehlfunktion liefert jedoch bereits jetzt eine höchst schlüssige Arbeitshypothese für die bei unserem Patienten beobachtete beschleunigte Alterung und die aufgetretenen endokrinen und metabolischen Störungen.

7 Summary

Metabolic diseases are a main risk factor for the development of atherosclerosis and, subsequently, acute myocardial infarctions, thereby representing one of the most important factors for increased morbidity and mortality in Western populations. The present thesis was aimed at identifying novel genetic factors and molecular mechanisms involved in the development of hypercholesterolemia as well as genetic factors underlying two selected congenital syndromes associated with metabolic disorders.

We initiated a molecular study of 200 patients of the German LIANCO cohort diagnosed with hypercholesterolemia. Determination of the spectrum of mutations in known genes for familial hypercholesterolemia (FH) revealed a total of 30 different heterozygous *LDLR* mutations in 20 % of the patients and thus clearly indicated a high prevalence of *LDLR* mutations also in patient cohorts without a family history of hypercholesterolemia. The European *APOB* founder mutation p.R3500Q could only be detected in a single patient and no mutation was found in *PSCK9*. About 50 % of the identified *LDLR* mutations were missense mutations and another 50 % comprised nonsense and splice alterations as well as small deletions and duplications and also larger deletions detected by MLPA. We tested for genetic modifiers of cholesterol levels, but could not obtain any statistically significant results for an association of nonsense SNPs in *ABCA10*, *APOL3* and *LPL* in *LDLR* mutation-positive patients. In one patient, we identified the heterozygous nucleotide substitution c.-188C>T in the highly conserved, GC-rich SP1 binding domain in *repeat 1* within the *LDLR* promoter region. As clearly demonstrated by a luciferase reporter assay, the decreased SP1 binding ability resulted in a significant reduction in transcriptional activity by 80 % of the mutant promoter *in vitro*. These results showed the importance of transcriptional alteration of *LDLR* expression in the pathogenesis of hypercholesterolemia.

Based on this finding, we tested mutation-negative patients of the LIANCO cohort for mutations in *SREBP1* and *SREBP2*, two transcription factors that play a central role in cholesterol homeostasis by, among other functions, controlling *LDLR* expression. We found the heterozygous missense mutation p.R812Q in the *SREBP1* gene in one patient and the heterozygous missense mutation p.G852R in *SREBP2* in a second patient. After genetic validation of their causative roles, we were able to demonstrate by *in vitro* interaction studies that both mutations affect the constitutive interplay between the regulatory C-terminal domain of the SREBP precursor proteins and the cytoplasmatic WD domain of SCAP in the membrane of the endoplasmatic reticulum. Consequently, the release of the N-terminal,

transcriptionally active part of SREBPs is reduced, leading to a decreased expression of *LDLR*, which was confirmed by luciferase reporter assays. The resulting LDL receptor deficiency on the cell surface thus explains the accumulation of LDL particles in the plasma of the patients, the diagnosis of hypercholesterolemia, and identifies two novel genes causing hypercholesterolemia.

A second approach using large families with FH for linkage analysis could not identify any novel FH genes. In our analysis of a large Turkish family with nine affected individuals we learned how the occurrence of phenocopies of a common disease can influence experimental data and how this problem may be overcome by the use of non-model based, non-parametric linkage analysis. Subsequently, the p.C222R *LDLR* mutation was identified in seven of nine affected family members.

Our findings of novel genetic and molecular mechanisms of hypercholesterolemia in the patients of the LIANCO cohort will be helpful in the future to offer more accurate genetic counseling, to establish individual risk profiles and, hopefully, to develop new therapeutic strategies.

Moreover, also the studies on two congenital, autosomal recessively inherited syndromes associated with metabolic diseases could successfully identify novel disease-causing mutations and elucidate the molecular pathogenesis of these disorders. After genome-wide linkage analysis in one family clinically characterized by hypogonadism, diabetes, alopecia, and mental retardation, we found a disease-causing mutation, c.1091+1G>A, in the *C2orf37* gene, located within a large homozygous stretch on chromosome 2q31.1. *C2orf37* had been described during our analysis as a causative gene for autosomal recessive Woodhouse-Sakati syndrome, which shows overlapping symptoms with our families. Additionally, we identified loss-of-function mutations in *C2orf37* in two further families diagnosed with syndromes showing an overlapping phenotype, therefore considered to belong to the spectrum of Woodhouse-Sakati-like phenotypes. Modifying genetic factors are supposed to be responsible for the observed inter- and intrafamilial clinical variability.

Finally, using whole-exome sequencing, a novel and high-end technology, we were able to identify the causative homozygous missense mutation p.G206R in the *PYCR1* gene in a patient diagnosed with Wiedemann-Rautenstrauch syndrome (WRS). WRS is a rare recessive, neonatal progeria syndrome with premature appearance of endocrine and metabolic deficiencies. Recessive inheritance and parental consanguinity allowed us to analyze the obtained exome data with increased efficiency by filtering only for variants in homozygous chromosomal regions and therefore considerably minimizing the number of potentially

pathogenic false variants. *PYCR1* mutations have already been described for a spectrum of disorders which includes geroderma osteodystrophia, wrinkly skin syndrome, and de Barsy syndrome. Clinical re-evaluation of our patient indicated some overlapping features with this spectrum of disorders and showed that the phenotype in our patient belongs to the severe end of this spectrum. Disturbed *PYCR1* function influences prolin metabolism and might affect mitochondrial function as well as levels of free radical production. The pathogenic mechanism needs to be elucidated in the future, but mitochondrial dysfunction represents a highly relevant working hypothesis underlying accelerated ageing and the occurrence of endocrine and metabolic diseases as seen in our patient.

8 Literaturverzeichnis

Abecasis, G.R., Cherny, S.S., Cookson, W.O. and Cardon, L.R. (2002) Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet*, **30**, 97-101.

Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J.P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D. *et al.* (2003) Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*, **34**, 154-156.

Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H. and Krieger, M. (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, **271**, 518-520.

Adams, C.M., Reitz, J., De Brabander, J.K., Feramisco, J.D., Li, L., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (2004) Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. *J Biol Chem*, **279**, 52772-52780.

Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S. and Sunyaev, S.R. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, **7**, 248-249.

Al-Semari, A. and Bohlega, S. (2007) Autosomal-recessive syndrome with alopecia, hypogonadism, progressive extra-pyramidal disorder, white matter disease, sensory neural deafness, diabetes mellitus, and low IGF1. *Am J Med Genet A*, **143**, 149-160.

Alaupovic, P., Lee, D.M. and McConathy, W.J. (1972) Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*, **260**, 689-707.

Alazami, A.M., Al-Saif, A., Al-Semari, A., Bohlega, S., Zlitni, S., Alzahrani, F., Bavi, P., Kaya, N., Colak, D., Khalak, H. *et al.* (2008) Mutations in C2orf37, encoding a nucleolar protein, cause hypogonadism, alopecia, diabetes mellitus, mental retardation, and extrapyramidal syndrome. *Am J Hum Genet*, **83**, 684-691.

Alazami, A.M., Schneider, S.A., Bonneau, D., Pasquier, L., Carecchio, M., Kojovic, M., Steindl, K., de Kerdanet, M., Nezarati, M.M., Bhatia, K.P. *et al.* (2010) C2orf37 mutational spectrum in Woodhouse-Sakati syndrome patients. *Clin Genet*, **78**, 585-590.

Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Hasty, A.H., Yahagi, N., Yoshikawa, T., Matsuzaka, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K. *et al.* (2002) Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J Lipid Res*, **43**, 1220-1235.

Amsellem, S., Briffaut, D., Carrie, A., Rabes, J.P., Girardet, J.P., Fredenrich, A., Moulin, P., Krempf, M., Reznik, Y., Vialettes, B. *et al.* (2002) Intronic mutations outside of Alu-repeat-rich domains of the LDL receptor gene are a cause of familial hypercholesterolemia. *Hum Genet*, **111**, 501-510.

Anderson, E.D., Molloy, S.S., Jean, F., Fei, H., Shimamura, S. and Thomas, G. (2002) The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J Biol Chem*, **277**, 12879-12890.

- Anderson, R.G., Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (1977) Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell*, **10**, 351-364.
- Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C. and Zenke, M.** (1987) Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, **15**, 4593-4602.
- Arboleda, G., Ramirez, N. and Arboleda, H.** (2007) The neonatal progeroid syndrome (Wiedemann-Rautenstrauch): a model for the study of human aging? *Exp Gerontol*, **42**, 939-943.
- Arboleda, H. and Arboleda, G.** (2005) Follow-up study of Wiedemann-Rautenstrauch syndrome: long-term survival and comparison with Rautenstrauch's patient "G". *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, **73**, 562-568.
- Arboleda, H., Quintero, L. and Yunis, E.** (1997) Wiedemann-Rautenstrauch neonatal progeroid syndrome: report of three new patients. *J Med Genet*, **34**, 433-437.
- Austin, M.A., Hutter, C.M., Zimmern, R.L. and Humphries, S.E.** (2004) Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. *Am J Epidemiol*, **160**, 407-420.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. and Finkel, T.** (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, **120**, 483-495.
- Barter, P.J., Hopkins, G.J. and Calvert, G.D.** (1982) Pathways for the incorporation of esterified cholesterol into very low density and low density lipoproteins in plasma incubated in vitro. *Biochim Biophys Acta*, **713**, 136-148.
- Beisiegel, U.** (1995) Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*, **6**, 117-122.
- Beisiegel, U. and Heeren, J.** (1997) Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) targeting of lipoproteins to receptors. *Proc Nutr Soc*, **56**, 731-737.
- Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J. and Stanley, K.K.** (1989) The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature*, **341**, 162-164.
- Benjannet, S., Rhainds, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M.C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D. et al.** (2004) NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem*, **279**, 48865-48875.
- Berneis, K.K. and Krauss, R.M.** (2002) Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res*, **43**, 1363-1379.
- Bertolini, S., Garuti, R., Lelli, W., Rolleri, M., Tiozzo, R.M., Ghisellini, M., Simone, M.L., Masturzo, P., Elicio, N.C., Stefanutti, C. et al.** (1995) Four novel partial deletions of LDL-receptor gene in Italian patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **15**, 81-88.

- Bitoun, P., Lachassine, E., Sellier, N., Sauvion, S. and Gaudelus, J.** (1995) The Wiedemann-Rautenstrauch neonatal progeroid syndrome: a case report and review of the literature. *Clin Dysmorphol*, **4**, 239-245.
- Bohr, V.A.** (2008) Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance. *Trends Biochem Sci*, **33**, 609-620.
- Boren, J., Ekstrom, U., Agren, B., Nilsson-Ehle, P. and Innerarity, T.L.** (2001) The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100. *J Biol Chem*, **276**, 9214-9218.
- Boren, J., Lee, I., Zhu, W., Arnold, K., Taylor, S. and Innerarity, T.L.** (1998) Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *J Clin Invest*, **101**, 1084-1093.
- Briggs, M.R., Kadonaga, J.T., Bell, S.P. and Tjian, R.** (1986) Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science*, **234**, 47-52.
- Brown, A.J., Sun, L., Feramisco, J.D., Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (2002) Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol Cell*, **10**, 237-245.
- Brown, M.S., Dana, S.E. and Goldstein, J.L.** (1973) Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **70**, 2162-2166.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (1974) Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. *Science*, **185**, 61-63.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, **232**, 34-47.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, **89**, 331-340.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (1974) Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J Biol Chem*, **249**, 7306-7314.
- Brown, M.S., Herz, J. and Goldstein, J.L.** (1997) LDL-receptor structure. Calcium cages, acid baths and recycling receptors. *Nature*, **388**, 629-630.
- Burnett, J.R. and Hooper, A.J.** (2008) Common and rare gene variants affecting plasma LDL cholesterol. *Clin Biochem Rev*, **29**, 11-26.
- Burtner, C.R. and Kennedy, B.K.** (2010) Progeria syndromes and ageing: what is the connection? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**, 567-578.

- Cao, G., Garcia, C.K., Wyne, K.L., Schultz, R.A., Parker, K.L. and Hobbs, H.H.** (1997) Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. *J Biol Chem*, **272**, 33068-33076.
- Cartegni, L., Chew, S.L. and Krainer, A.R.** (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*, **3**, 285-298.
- Chang, T.Y., Li, B.L., Chang, C.C. and Urano, Y.** (2009) Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **297**, E1-9.
- Chatterton, J.E., Phillips, M.L., Curtiss, L.K., Milne, R., Fruchart, J.C. and Schumaker, V.N.** (1995) Immunoelectron microscopy of low density lipoproteins yields a ribbon and bow model for the conformation of apolipoprotein B on the lipoprotein surface. *J Lipid Res*, **36**, 2027-2037.
- Choong, M.L., Koay, E.S., Khoo, K.L., Khaw, M.C. and Sethi, S.K.** (1997) Denaturing gradient-gel electrophoresis screening of familial defective apolipoprotein B-100 in a mixed Asian cohort: two cases of arginine3500-->tryptophan mutation associated with a unique haplotype. *Clin Chem*, **43**, 916-923.
- Cladaras, C., Hadzopoulou-Cladaras, M., Nolte, R.T., Atkinson, D. and Zannis, V.I.** (1986) The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms. *EMBO J*, **5**, 3495-3507.
- Cohen, J., Pertsemlidis, A., Kotowski, I.K., Graham, R., Garcia, C.K. and Hobbs, H.H.** (2005) Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet*, **37**, 161-165.
- Cohen, J.C., Boerwinkle, E., Mosley, T.H., Jr. and Hobbs, H.H.** (2006) Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*, **354**, 1264-1272.
- Cohen, J.C., Kimmel, M., Polanski, A. and Hobbs, H.H.** (2003) Molecular mechanisms of autosomal recessive hypercholesterolemia. *Curr Opin Lipidol*, **14**, 121-127.
- Collins, F.S.** (1995) Positional cloning moves from perdditional to traditional. *Nat Genet*, **9**, 347-350.
- Cummings, R.D., Kornfeld, S., Schneider, W.J., Hobgood, K.K., Tolleshaug, H., Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (1983) Biosynthesis of N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*, **258**, 15261-15273.
- D'Autreaux, B. and Toledano, M.B.** (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 813-824.
- Davidson, M.H.** (2010) Update on CETP inhibition. *J Clin Lipidol*, **4**, 394-398.
- Davis, C.G., Goldstein, J.L., Sudhof, T.C., Anderson, R.G., Russell, D.W. and Brown, M.S.** (1987) Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature*, **326**, 760-765.

- Davis, R.A., Prewett, A.B., Chan, D.C., Thompson, J.J., Borchardt, R.A. and Gallaher, W.R.** (1989) 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**, 1185-1196.
- Dawson, P.A., Hofmann, S.L., van der Westhuyzen, D.R., Sudhof, T.C., Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (1988) Sterol-dependent repression of low density lipoprotein receptor promoter mediated by 16-base pair sequence adjacent to binding site for transcription factor Sp1. *J Biol Chem*, **263**, 3372-3379.
- De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C.L., Munnich, A., Le Merrer, M. et al.** (2003) Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science*, **300**, 2055.
- Dedoussis, G.V., Genschel, J., Bochow, B., Pitsavos, C., Skoumas, J., Prassa, M., Lkhagvasuren, S., Toutouzas, P., Vogt, A., Kassner, U. et al.** (2004) Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in German and Greek patients. *Hum Mutat*, **23**, 285-286.
- Defesche, J.C., van Diermen, D.E., Lansberg, P.J., Lamping, R.J., Reymer, P.W., Hayden, M.R. and Kastelein, J.J.** (1993) South African founder mutations in the low-density lipoprotein receptor gene causing familial hypercholesterolemia in the Dutch population. *Hum Genet*, **92**, 567-570.
- Dell'Angelica, E.C.** (2001) Clathrin-binding proteins: got a motif? Join the network! *Trends Cell Biol*, **11**, 315-318.
- Devriendt, K., Legius, E. and Fryns, J.P.** (1996) Progressive extrapyramidal disorder with primary hypogonadism and alopecia in sibs: a new syndrome? *Am J Med Genet*, **62**, 54-57.
- Devriendt, K., Van den Berghe, H. and Fryns, J.P.** (1996) Alopecia-mental retardation syndrome associated with convulsions and hypergonadotropic hypogonadism. *Clin Genet*, **49**, 6-9.
- Doerfler, W.** (1983) DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem*, **52**, 93-124.
- Dousset, T., Wang, C., Verheggen, C., Chen, D., Hernandez-Verdun, D. and Huang, S.** (2000) Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription. *Mol Biol Cell*, **11**, 2705-2717.
- Duncan, E.A., Brown, M.S., Goldstein, J.L. and Sakai, J.** (1997) Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem*, **272**, 12778-12785.
- Durbin, R.M., Abecasis, G.R., Altshuler, D.L., Auton, A., Brooks, L.D., Gibbs, R.A., Hurles, M.E. and McVean, G.A.** (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, **467**, 1061-1073.

- Durst, R., Colombo, R., Shpitzen, S., Avi, L.B., Friedlander, Y., Wexler, R., Raal, F.J., Marais, D.A., Defesche, J.C., Mandelshtam, M.Y. et al.** (2001) Recent origin and spread of a common Lithuanian mutation, G197del LDLR, causing familial hypercholesterolemia: positive selection is not always necessary to account for disease incidence among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet*, **68**, 1172-1188.
- Dynan, W.S.** (1989) Modularity in promoters and enhancers. *Cell*, **58**, 1-4.
- Dynan, W.S., Saffer, J.D., Lee, W.S. and Tjian, R.** (1985) Transcription factor Sp1 recognizes promoter sequences from the monkey genome that are simian virus 40 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 4915-4919.
- Dynan, W.S. and Tjian, R.** (1983) The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*, **35**, 79-87.
- Dynlacht, B.D., Hoey, T. and Tjian, R.** (1991) Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell*, **66**, 563-576.
- Ebhardt, M., Schmidt, H., Doerk, T., Tietge, U., Haas, R., Manns, M.P., Schmidtke, J. and Stuhmann, M.** (1999) Mutation analysis in 46 German families with familial hypercholesterolemia: identification of 8 new mutations. Mutations in brief no. 226. Online. *Hum Mutat*, **13**, 257.
- Epstein, C.J., Martin, G.M., Schultz, A.L. and Motulsky, A.G.** (1966) Werner's syndrome a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine (Baltimore)*, **45**, 177-221.
- Eriksson, M., Brown, W.T., Gordon, L.B., Glynn, M.W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M.R., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Berglund, P. et al.** (2003) Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, **423**, 293-298.
- Espenshade, P.J., Li, W.P. and Yabe, D.** (2002) Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11694-11699.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. and Danielsen, M.** (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7413-7417.
- Fitzgerald, M.L., Mujawar, Z. and Tamehiro, N.** (2010) ABC transporters, atherosclerosis and inflammation. *Atherosclerosis*, **211**, 361-370.
- Fouchier, S.W., Kastelein, J.J. and Defesche, J.C.** (2005) Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands. *Hum Mutat*, **26**, 550-556.
- Francova, H., Trbusek, M., Zapletalova, P. and Kuhrova, V.** (2004) New promoter mutations in the low-density lipoprotein receptor gene which induce familial hypercholesterolaemia phenotype: molecular and functional analysis. *J Inherit Metab Dis*, **27**, 523-528.
- Fredenrich, A. and Bayer, P.** (2003) Reverse cholesterol transport, high density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data. *Diabetes Metab*, **29**, 201-205.

- Fredrickson, D.S.** (1993) Phenotyping. On reaching base camp (1950-1975). *Circulation*, **87**, III1-15.
- Freeman, M.W.** (1994) Macrophage scavenger receptors. *Curr Opin Lipidol*, **5**, 143-148.
- Gallagher, J.J. and Myant, N.B.** (1995) The affinity of low-density lipoproteins and of very-low-density lipoprotein remnants for the low-density lipoprotein receptor in homozygous familial defective apolipoprotein B-100. *Atherosclerosis*, **115**, 263-272.
- Garcia, C.K., Wilund, K., Arca, M., Zuliani, G., Fellin, R., Maioli, M., Calandra, S., Bertolini, S., Cossu, F., Grishin, N. et al.** (2001) Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science*, **292**, 1394-1398.
- Garg, A. and Simha, V.** (2007) Update on dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**, 1581-1589.
- Garuti, R., Jones, C., Li, W.P., Michaely, P., Herz, J., Gerard, R.D., Cohen, J.C. and Hobbs, H.H.** (2005) The modular adaptor protein autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) promotes low density lipoprotein receptor clustering into clathrin-coated pits. *J Biol Chem*, **280**, 40996-41004.
- Ge, L., Qi, W., Wang, L.J., Miao, H.H., Qu, Y.X., Li, B.L. and Song, B.L.** (2010) Flotillins play an essential role in Niemann-Pick C1-like 1-mediated cholesterol uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 551-556.
- Glomset, J.A.** (1968) The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*, **9**, 155-167.
- Goldberg, I.J. and Merkel, M.** (2001) Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front Biosci*, **6**, D388-405.
- Goldmann, R., Tichy, L., Freiburger, T., Zapletalova, P., Letocha, O., Soska, V., Fajkus, J. and Fajkusova, L.** (2010) Genomic characterization of large rearrangements of the LDLR gene in Czech patients with familial hypercholesterolemia. *BMC Med Genet*, **11**, 115.
- Goldstein, J.L. and Brown, M.S.** (1974) 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**, 5153-5162.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G., Russell, D.W. and Schneider, W.J.** (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol*, **1**, 1-39.
- Gouni-Berthold, I., Giannakidou, E., Faust, M., Berthold, H.K. and Krone, W.** (2005) The peroxisome proliferator-activated receptor delta +294T/C polymorphism in relation to lipoprotein metabolism in patients with diabetes mellitus type 2 and in non-diabetic controls. *Atherosclerosis*, **183**, 336-341.

- Gouni-Berthold, I., Giannakidou, E., Muller-Wieland, D., Faust, M., Kotzka, J., Berthold, H.K. and Krone, W.** (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala and endothelial nitric oxide synthase-4a/b gene polymorphisms are not associated with hypertension in diabetes mellitus type 2. *J Hypertens*, **23**, 301-308.
- Graf, G.A., Connell, P.M., van der Westhuyzen, D.R. and Smart, E.J.** (1999) The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol esters into caveolae. *J Biol Chem*, **274**, 12043-12048.
- Graf, G.A., Yu, L., Li, W.P., Gerard, R., Tuma, P.L., Cohen, J.C. and Hobbs, H.H.** (2003) ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem*, **278**, 48275-48282.
- Gudbjartsson, D.F., Jonasson, K., Frigge, M.L. and Kong, A.** (2000) Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis. *Nat Genet*, **25**, 12-13.
- Gudnason, V., Day, I.N. and Humphries, S.E.** (1994) Effect on plasma lipid levels of different classes of mutations in the low-density lipoprotein receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb*, **14**, 1717-1722.
- Gul, D., Ozata, M., Mergen, H., Odabasi, Z. and Mergen, M.** (2000) Woodhouse and Sakati syndrome (MIM 241080): report of a new patient. *Clin Dysmorphol*, **9**, 123-125.
- Hachem, S.B. and Mooradian, A.D.** (2006) Familial dyslipidaemias: an overview of genetics, pathophysiology and management. *Drugs*, **66**, 1949-1969.
- Hagadorn, J.I., Wilson, W.G., Hogge, W.A., Callicott, J.H. and Beale, E.F.** (1990) Neonatal progeroid syndrome: more than one disease? *Am J Med Genet*, **35**, 91-94.
- He, G., Gupta, S., Yi, M., Michaely, P., Hobbs, H.H. and Cohen, J.C.** (2002) ARH is a modular adaptor protein that interacts with the LDL receptor, clathrin, and AP-2. *J Biol Chem*, **277**, 44044-44049.
- Hennies, H.C., Kornak, U., Zhang, H., Egerer, J., Zhang, X., Seifert, W., Kuhnisch, J., Budde, B., Natebus, M., Brancati, F. et al.** (2008) Geroderma osteodysplastica is caused by mutations in SCYL1BP1, a Rab-6 interacting golgin. *Nat Genet*, **40**, 1410-1412.
- Henrich, S., Lindberg, I., Bode, W. and Than, M.E.** (2005) Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: explanation of their specificity. *J Mol Biol*, **345**, 211-227.
- Herbert, E., Trusz-Gluza, M., Moric, E., Smilowska-Dzielicka, E., Mazurek, U. and Wilczok, T.** (2002) KCNQ1 gene mutations and the respective genotype-phenotype correlations in the long QT syndrome. *Med Sci Monit*, **8**, RA240-248.
- Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H. and Stanley, K.K.** (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J*, **7**, 4119-4127.

- Hill, J.S., Hayden, M.R., Frohlich, J. and Pritchard, P.H.** (1991) Genetic and environmental factors affecting the incidence of coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb*, **11**, 290-297.
- Hirano, Y., Yoshida, M., Shimizu, M. and Sato, R.** (2001) Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, **276**, 36431-36437.
- Hobbs, H.H., Brown, M.S., Goldstein, J.L. and Russell, D.W.** (1986) Deletion of exon encoding cysteine-rich repeat of low density lipoprotein receptor alters its binding specificity in a subject with familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem*, **261**, 13114-13120.
- Hobbs, H.H., Russell, D.W., Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (1990) The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet*, **24**, 133-170.
- Hoischen, A., van Bon, B.W., Gilissen, C., Arts, P., van Lier, B., Steehouwer, M., de Vries, P., de Reuver, R., Wieskamp, N., Mortier, G. et al.** (2010) De novo mutations of SETBP1 cause Schinzel-Giedion syndrome. *Nat Genet*, **42**, 483-485.
- Hori, R. and Carey, M.** (1994) The role of activators in assembly of RNA polymerase II transcription complexes. *Curr Opin Genet Dev*, **4**, 236-244.
- Horton, J.D., Cohen, J.C. and Hobbs, H.H.** (2007) Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci*, **32**, 71-77.
- Horton, J.D., Goldstein, J.L. and Brown, M.S.** (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, **109**, 1125-1131.
- Hou, J.W. and Wang, T.R.** (1995) Clinical variability in neonatal progeroid syndrome. *Am J Med Genet*, **58**, 195-196.
- Hua, X., Sakai, J., Ho, Y.K., Goldstein, J.L. and Brown, M.S.** (1995) Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. *J Biol Chem*, **270**, 29422-29427.
- Hua, X., Wu, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S. and Hobbs, H.H.** (1995) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics*, **25**, 667-673.
- Humphries, S.E. and Talmud, P.J.** (1995) Hyperlipidaemia associated with genetic variation in the apolipoprotein B gene. *Curr Opin Lipidol*, **6**, 215-222.
- Humphries, S.E., Whittall, R.A., Hubbart, C.S., Maplebeck, S., Cooper, J.A., Soutar, A.K., Naoumova, R., Thompson, G.R., Seed, M., Durrington, P.N. et al.** (2006) Genetic causes of familial hypercholesterolaemia in patients in the UK: relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk. *J Med Genet*, **43**, 943-949.
- Hussain, M.M., Kancha, R.K., Zhou, Z., Luchoomun, J., Zu, H. and Bakillah, A.** (1996) Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochim Biophys Acta*, **1300**, 151-170.

- Innerarity, T.L.** (2002) Structural biology. LDL receptor's beta-propeller displaces LDL. *Science*, **298**, 2337-2339.
- Innerarity, T.L., Weisgraber, K.H., Rall, S.C., Jr. and Mahley, R.W.** (1987) Functional domains of apolipoprotein E and apolipoprotein B. *Acta Med Scand Suppl*, **715**, 51-59.
- Ishida, B.Y., Albee, D. and Paigen, B.** (1990) Interconversion of prebeta-migrating lipoproteins containing apolipoprotein A-I and HDL. *J Lipid Res*, **31**, 227-236.
- Jagiello, P., Gencik, M., Arning, L., Wieczorek, S., Kunstmann, E., Csernok, E., Gross, W.L. and Epplen, J.T.** (2004) New genomic region for Wegener's granulomatosis as revealed by an extended association screen with 202 apoptosis-related genes. *Hum Genet*, **114**, 468-477.
- Jensen, H.K., Jensen, T.G., Jensen, L.G., Hansen, P.S., Kjeldsen, M., Andresen, B.S., Nielsen, V., Meinertz, H., Hansen, A.B., Bolund, L. et al.** (1994) Characterization of a disease-causing Glu119-Lys mutation in the low-density lipoprotein receptor gene in two Danish families with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat*, **4**, 102-113.
- Jia, L., Betters, J.L. and Yu, L.** (2010) Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) Protein in Intestinal and Hepatic Cholesterol Transport. *Annu Rev Physiol*.
- Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R. and Tjian, R.** (1987) Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell*, **51**, 1079-1090.
- Kalay, E., Yigit, G., Aslan, Y., Brown, K.E., Pohl, E., Bicknell, L.S., Kayserili, H., Li, Y., Tuysuz, B., Nurnberg, G. et al.** (2011) CEP152 is a genome maintenance protein disrupted in Seckel syndrome. *Nat Genet*, **43**, 23-26.
- Kandutsch, A.A. and Chen, H.W.** (1974) Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by cholesterol derivatives oxygenated in the side chain. *J Biol Chem*, **249**, 6057-6061.
- Kerr, L.E., Birse-Archbold, J.L., Short, D.M., McGregor, A.L., Heron, I., Macdonald, D.C., Thompson, J., Carlson, G.J., Kelly, J.S., McCulloch, J. et al.** (2007) Nucleophosmin is a novel Bax chaperone that regulates apoptotic cell death. *Oncogene*, **26**, 2554-2562.
- Khachadurian, A.K. and Uthman, S.M.** (1973) Experiences with the homozygous cases of familial hypercholesterolemia. A report of 52 patients. *Nutr Metab*, **15**, 132-140.
- Kim, D.H., Iijima, H., Goto, K., Sakai, J., Ishii, H., Kim, H.J., Suzuki, H., Kondo, H., Saeki, S. and Yamamoto, T.** (1996) Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J Biol Chem*, **271**, 8373-8380.
- Kim, J.B., Spotts, G.D., Halvorsen, Y.D., Shih, H.M., Ellenberger, T., Towle, H.C. and Spiegelman, B.M.** (1995) Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol Cell Biol*, **15**, 2582-2588.

- Knott, T.J., Rall, S.C., Jr., Innerarity, T.L., Jacobson, S.F., Urdea, M.S., Levy-Wilson, B., Powell, L.M., Pease, R.J., Eddy, R., Nakai, H. et al.** (1985) Human apolipoprotein B: structure of carboxyl-terminal domains, sites of gene expression, and chromosomal localization. *Science*, **230**, 37-43.
- Koboldt, D.C., Ding, L., Mardis, E.R. and Wilson, R.K.** (2010) Challenges of sequencing human genomes. *Brief Bioinform*, **11**, 484-498.
- Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrecky, J., Matsudaira, P. and Krieger, M.** (1990) Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature*, **343**, 531-535.
- Korf, B.** (2008) Hutchinson-Gilford progeria syndrome, aging, and the nuclear lamina. *N Engl J Med*, **358**, 552-555.
- Korniszewski, L., Nowak, R., Okninska-Hoffmann, E., Skorka, A., Gieruszczak-Bialek, D. and Sawadro-Rochowska, M.** (2001) Wiedemann-Rautenstrauch (neonatal progeroid) syndrome: new case with normal telomere length in skin fibroblasts. *Am J Med Genet*, **103**, 144-148.
- Koshy, G., Danda, S., Thomas, N., Mathews, V. and Viswanathan, V.** (2008) Three siblings with Woodhouse-Sakati syndrome in an Indian family. *Clin Dysmorphol*, **17**, 57-60.
- Kotze, M.J., De Villiers, W.J., Steyn, K., Kriek, J.A., Marais, A.D., Langenhoven, E., Herbert, J.S., Graadt Van Roggen, J.F., Van der Westhuyzen, D.R. and Coetzee, G.A.** (1993) Phenotypic variation among familial hypercholesterolemics heterozygous for either one of two Afrikaner founder LDL receptor mutations. *Arterioscler Thromb*, **13**, 1460-1468.
- Kowal, R.C., Herz, J., Goldstein, J.L., Esser, V. and Brown, M.S.** (1989) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 5810-5814.
- Krieger, M.** (1999) Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem*, **68**, 523-558.
- Krieger, M. and Herz, J.** (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem*, **63**, 601-637.
- Kruglyak, L., Daly, M.J., Reeve-Daly, M.P. and Lander, E.S.** (1996) Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet*, **58**, 1347-1363.
- Kuhlenbaumer, G., Hullmann, J. and Appenzeller, S.** (2011) Novel genomic techniques open new avenues in the analysis of monogenic disorders. *Hum Mutat*, **32**, 144-151.
- Kwon, H.J., Lagace, T.A., McNutt, M.C., Horton, J.D. and Deisenhofer, J.** (2008) Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 1820-1825.

- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lagace, T.A., Curtis, D.E., Garuti, R., McNutt, M.C., Park, S.W., Prather, H.B., Anderson, N.N., Ho, Y.K., Hammer, R.E. and Horton, J.D.** (2006) Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest*, **116**, 2995-3005.
- Lagor, W.R. and Rader, D.J.** (2010) Phospholipidation of HDL--how much is too much? *Clin Chem*, **57**, 4-6.
- Landschulz, K.T., Pathak, R.K., Rigotti, A., Krieger, M. and Hobbs, H.H.** (1996) Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest*, **98**, 984-995.
- Lee, M.H., Lu, K., Hazard, S., Yu, H., Shulenin, S., Hidaka, H., Kojima, H., Allikmets, R., Sakuma, N., Pegoraro, R. et al.** (2001) Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet*, **27**, 79-83.
- Lelli, N., Ghisellini, M., Gualdi, R., Tiozzo, R., Calandra, S., Gaddi, A., Ciarrocchi, A., Arca, M., Fazio, S., Coviello, D.A. et al.** (1991) Characterization of three mutations of the low density lipoprotein receptor gene in Italian patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb*, **11**, 234-243.
- Li, H. and Durbin, R.** (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, **25**, 1754-1760.
- Linton, M.F. and Fazio, S.** (2001) Class A scavenger receptors, macrophages, and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, **12**, 489-495.
- Loux, N., Saint-Jore, B., Collod, G., Dairou, F., Benlian, P., Truffert, J., Dastugue, B., Douste-Blazy, P., de Gennes, J.L., Junien, C. et al.** (1992) Screening for new mutations in the LDL receptor gene in seven French familial hypercholesterolemia families by the single strand conformation polymorphism method. *Hum Mutat*, **1**, 325-332.
- Maquat, L.E.** (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 89-99.
- Mardis, E.R.** (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet*, **24**, 133-141.
- Marks, D., Thorogood, M., Neil, H.A. and Humphries, S.E.** (2003) A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*, **168**, 1-14.
- McKnight, S. and Tjian, R.** (1986) Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell*, **46**, 795-805.
- Medica, I., Sepcic, J. and Peterlin, B.** (2007) Woodhouse-Sakati syndrome: case report and symptoms review. *Genet Couns*, **18**, 227-231.

- Megarbane, A., Gannage-Yared, M.H., Khalife, A.A. and Fabre, M.** (2003) Primary hypergonadotropic hypogonadism, partial alopecia, and Mullerian hypoplasia: report of a second family with additional findings. *Am J Med Genet A*, **119A**, 214-217.
- Metzker, M.L.** (2010) Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, **11**, 31-46.
- Michaely, P., Li, W.P., Anderson, R.G., Cohen, J.C. and Hobbs, H.H.** (2004) The modular adaptor protein ARH is required for low density lipoprotein (LDL) binding and internalization but not for LDL receptor clustering in coated pits. *J Biol Chem*, **279**, 34023-34031.
- Millar, J.S. and Packard, C.J.** (1998) Heterogeneity of apolipoprotein B-100-containing lipoproteins: what we have learnt from kinetic studies. *Curr Opin Lipidol*, **9**, 197-202.
- Miserez, A.R., Cao, G., Probst, L.C. and Hobbs, H.H.** (1997) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2). *Genomics*, **40**, 31-40.
- Miserez, A.R. and Keller, U.** (1995) Differences in the phenotypic characteristics of subjects with familial defective apolipoprotein B-100 and familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **15**, 1719-1729.
- Mishra, S.K., Watkins, S.C. and Traub, L.M.** (2002) The autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) protein interfaces directly with the clathrin-coat machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16099-16104.
- Miyake, Y., Tajima, S., Funahashi, T. and Yamamoto, A.** (1989) Analysis of a recycling-impaired mutant of low density lipoprotein receptor in familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem*, **264**, 16584-16590.
- Mozas, P., Galetto, R., Albajar, M., Ros, E., Pocovi, M. and Rodriguez-Rey, J.C.** (2002) A mutation (-49C>T) in the promoter of the low density lipoprotein receptor gene associated with familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res*, **43**, 13-18.
- Muiznieks, I. and Doerfler, W.** (1994) The topology of the promoter of RNA polymerase II- and III-transcribed genes is modified by the methylation of 5'-CG-3' dinucleotides. *Nucleic Acids Res*, **22**, 2568-2575.
- Muller, P.Y. and Miserez, A.R.** (2002) Identification of mutations in the gene encoding sterol regulatory element binding protein (SREBP)-2 in hypercholesterolaemic subjects. *J Med Genet*, **39**, 271-275.
- Musunuru, K., Pirruccello, J.P., Do, R., Peloso, G.M., Guiducci, C., Sougnez, C., Garimella, K.V., Fisher, S., Abreu, J., Barry, A.J. et al.** (2010) Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia. *N Engl J Med*, **363**, 2220-2227.
- Myant, N.B., Forbes, S.A., Day, I.N. and Gallagher, J.** (1997) Estimation of the age of the ancestral arginine3500->glutamine mutation in human apoB-100. *Genomics*, **45**, 78-87.
- Nagy, E. and Maquat, L.E.** (1998) A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci*, **23**, 198-199.

- Najjar, S.S., Salem, G.M. and Idriss, Z.H.** (1975) Congenital generalized lipodystrophy. *Acta Paediatr Scand*, **64**, 273-279.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N. and Bird, A.** (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, **393**, 386-389.
- Nauck, M.S., Koster, W., Dorfer, K., Eckes, J., Scharnagl, H., Gierens, H., Nissen, H., Nauck, M.A., Wieland, H. and Marz, W.** (2001) Identification of recurrent and novel mutations in the LDL receptor gene in German patients with familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat*, **18**, 165-166.
- Ng, H.H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Turner, B.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. and Bird, A.** (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet*, **23**, 58-61.
- Ng, S.B., Buckingham, K.J., Lee, C., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Dent, K.M., Huff, C.D., Shannon, P.T., Jabs, E.W., Nickerson, D.A. et al.** (2010) Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet*, **42**, 30-35.
- Niederstadt, C.** (1999) Koronare Herkrankheit. Klinikleitfaden Kardiologie. 2 ed. München - Jena: Urban & Fischer, 195-256.
- Nohturfft, A., Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (1998) Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *J Biol Chem*, **273**, 17243-17250.
- Nohturfft, A., Yabe, D., Goldstein, J.L., Brown, M.S. and Espenshade, P.J.** (2000) Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell*, **102**, 315-323.
- Nousbeck, J., Spiegel, R., Ishida-Yamamoto, A., Indelman, M., Shani-Adir, A., Adir, N., Lipkin, E., Bercovici, S., Geiger, D., van Steensel, M.A. et al.** (2008) Alopecia, neurological defects, and endocrinopathy syndrome caused by decreased expression of RBM28, a nucleolar protein associated with ribosome biogenesis. *Am J Hum Genet*, **82**, 1114-1121.
- Nowak, R., Sawadro-Rochowska, M., Siwicki, J.K. and Korniszewski, L.** (2006) Wiedemann-Rautenstrauch syndrome's fibroblasts display a normal in vitro lifespan. *Am J Med Genet A*, **140**, 661-662.
- O'Connell, J.R. and Weeks, D.E.** (1998) PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am J Hum Genet*, **63**, 259-266.
- Oka, K., Tzung, K.W., Sullivan, M., Lindsay, E., Baldini, A. and Chan, L.** (1994) Human very-low-density lipoprotein receptor complementary DNA and deduced amino acid sequence and localization of its gene (VLDLR) to chromosome band 9p24 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, **20**, 298-300.
- Ozgenç, A. and Loeb, L.A.** (2006) Werner Syndrome, aging and cancer. *Genome Dyn*, **1**, 206-217.

- Page, N.M., Butlin, D.J., Lomthaisong, K. and Lowry, P.J.** (2001) The human apolipoprotein L gene cluster: identification, classification, and sites of distribution. *Genomics*, **74**, 71-78.
- Peeters, A.V., Kotze, M.J., Scholtz, C.L., De Waal, L.F., Rubinsztein, D.C., Coetzee, G.A., Zuliani, G., Streiff, R., Liu, J. and van der Westhuyzen, D.R.** (1998) A 3-basepair deletion in repeat 1 of the LDL receptor promoter reduces transcriptional activity in a South African Pedi. *J Lipid Res*, **39**, 1021-1024.
- Pimstone, S.N., Sun, X.M., du Souich, C., Frohlich, J.J., Hayden, M.R. and Soutar, A.K.** (1998) Phenotypic variation in heterozygous familial hypercholesterolemia: a comparison of Chinese patients with the same or similar mutations in the LDL receptor gene in China or Canada. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 309-315.
- Pivnick, E.K., Angle, B., Kaufman, R.A., Hall, B.D., Pitukcheewanont, P., Hersh, J.H., Fowlkes, J.L., Sanders, L.P., O'Brien, J.M., Carroll, G.S. et al.** (2000) Neonatal progeroid (Wiedemann-Rautenstrauch) syndrome: report of five new cases and review. *Am J Med Genet*, **90**, 131-140.
- Pollex, R.L. and Hegele, R.A.** (2004) Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Clin Genet*, **66**, 375-381.
- Rachmiel, M., Bistritzer, T., Hershkoviz, E., Khahil, A., Epstein, O. and Parvari, R.** (2011) Woodhouse-Sakati Syndrome in an Israeli-Arab Family Presenting with Youth-Onset Diabetes Mellitus and Delayed Puberty. *Horm Res Paediatr*.
- Radhakrishnan, A., Sun, L.P., Kwon, H.J., Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (2004) Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell*, **15**, 259-268.
- Rautenstrauch, T. and Snigula, F.** (1977) Progeria: a cell culture study and clinical report of familial incidence. *Eur J Pediatr*, **124**, 101-111.
- Rautenstrauch, T., Snigula, F. and Wiedemann, H.R.** (1994) [Neonatal progeroid syndrome (Wiedemann-Rautenstrauch). A follow-up study]. *Klin Padiatr*, **206**, 440-443.
- Rawson, R.B.** (2003) The SREBP pathway--insights from Insigs and insects. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 631-640.
- Rawson, R.B., Zelenski, N.G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M.T., Chang, T.Y., Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (1997) Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol Cell*, **1**, 47-57.
- Raychowdhury, R., Niles, J.L., McCluskey, R.T. and Smith, J.A.** (1989) Autoimmune target in Heymann nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL receptor. *Science*, **244**, 1163-1165.
- Razin, A. and Cedar, H.** (1991) DNA methylation and gene expression. *Microbiol Rev*, **55**, 451-458.

- Reversade, B., Escande-Beillard, N., Dimopoulou, A., Fischer, B., Chng, S.C., Li, Y., Shboul, M., Tham, P.Y., Kayserili, H., Al-Gazali, L. et al.** (2009) Mutations in PYCR1 cause cutis laxa with progeroid features. *Nat Genet*, **41**, 1016-1021.
- Rigotti, A., Miettinen, H.E. and Krieger, M.** (2003) The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev*, **24**, 357-387.
- Rios, J., Stein, E., Shendure, J., Hobbs, H.H. and Cohen, J.C.** (2010) Identification by whole-genome resequencing of gene defect responsible for severe hypercholesterolemia. *Hum Mol Genet*, **19**, 4313-4318.
- Robinson, P.N. and Godfrey, M.** (2000) The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrillopathies. *J Med Genet*, **37**, 9-25.
- Ruschendorf, F. and Nurnberg, P.** (2005) ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10K SNP array data. *Bioinformatics*, **21**, 2123-2125.
- Russell, D.W., Lehrman, M.A., Sudhof, T.C., Yamamoto, T., Davis, C.G., Hobbs, H.H., Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (1986) The LDL receptor in familial hypercholesterolemia: use of human mutations to dissect a membrane protein. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 2**, 811-819.
- Russell, D.W., Schneider, W.J., Yamamoto, T., Luskey, K.L., Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (1984) Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell*, **37**, 577-585.
- Russo-Menna, I. and Arancibias, C.** (2010) The Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: a case report. *Minerva Anesthesiol*, **76**, 151-154.
- Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J.C., Deleuze, J.F., Brewer, H.B., Duverger, N., Deneffe, P. et al.** (1999) Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet*, **22**, 352-355.
- Sakai, J., Nohturfft, A., Cheng, D., Ho, Y.K., Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (1997) Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein. *J Biol Chem*, **272**, 20213-20221.
- Sakai, J., Nohturfft, A., Goldstein, J.L. and Brown, M.S.** (1998) Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *J Biol Chem*, **273**, 5785-5793.
- Sakai, J. and Rawson, R.B.** (2001) The sterol regulatory element-binding protein pathway: control of lipid homeostasis through regulated intracellular transport. *Curr Opin Lipidol*, **12**, 261-266.
- Sakai, J., Rawson, R.B., Espenshade, P.J., Cheng, D., Seegmiller, A.C., Goldstein, J.L. and Brown, M.S.** (1998) Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol Cell*, **2**, 505-514.

- Saltzman, A.G. and Weinmann, R.** (1989) Promoter specificity and modulation of RNA polymerase II transcription. *FASEB J*, **3**, 1723-1733.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sato, R., Inoue, J., Kawabe, Y., Kodama, T., Takano, T. and Maeda, M.** (1996) Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem*, **271**, 26461-26464.
- Schaefer, J.R.** (1998) Präventive Kardiologie - Prophylaxe der koronaren Herzkrankheit. *Schattauer Verlag, Stuttgart - New York*, 1-177.
- Schaefer, J.R., Scharnagl, H., Baumstark, M.W., Schweer, H., Zech, L.A., Seyberth, H., Winkler, K., Steinmetz, A. and Marz, W.** (1997) Homozygous familial defective apolipoprotein B-100. Enhanced removal of apolipoprotein E-containing VLDLs and decreased production of LDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 348-353.
- Schmitz, G., Langmann, T. and Heimerl, S.** (2001) Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J Lipid Res*, **42**, 1513-1520.
- Schneider, S.A. and Bhatia, K.P.** (2008) Dystonia in the Woodhouse Sakati syndrome: A new family and literature review. *Mov Disord*, **23**, 592-596.
- Schneider, W.J., Beisiegel, U., Goldstein, J.L. and Brown, M.S.** (1982) Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight. *J Biol Chem*, **257**, 2664-2673.
- Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F. and Pals, G.** (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, **30**, e57.
- Seidah, N.G., Mowla, S.J., Hamelin, J., Mamarbachi, A.M., Benjannet, S., Toure, B.B., Basak, A., Munzer, J.S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M. et al.** (1999) Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1321-1326.
- Shimano, H., Horton, J.D., Shimomura, I., Hammer, R.E., Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (1997) Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest*, **99**, 846-854.
- Shore, D. and Nasmyth, K.** (1987) Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell*, **51**, 721-732.
- Sirmaci, A., Walsh, T., Akay, H., Spiliopoulos, M., Sakalar, Y.B., Hasanefendioglu-Bayrak, A., Duman, D., Farooq, A., King, M.C. and Tekin, M.** (2010) MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels syndromes. *Am J Hum Genet*, **87**, 679-686.

Smith, A.J., Ahmed, F., Nair, D., Whittall, R., Wang, D., Taylor, A., Norbury, G. and Humphries, S.E. (2007) A functional mutation in the LDLR promoter (-139C>G) in a patient with familial hypercholesterolemia. *Eur J Hum Genet*, **15**, 1186-1189.

Soutar, A.K. (1992) Familial hypercholesterolaemia and LDL receptor mutations. *J Intern Med*, **231**, 633-641.

Soutar, A.K. (1998) Update on low density lipoprotein receptor mutations. *Curr Opin Lipidol*, **9**, 141-147.

Soutar, A.K. and Naoumova, R.P. (2004) Autosomal recessive hypercholesterolemia. *Semin Vasc Med*, **4**, 241-248.

Soutar, A.K., Naoumova, R.P. and Traub, L.M. (2003) Genetics, clinical phenotype, and molecular cell biology of autosomal recessive hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 1963-1970.

Springer, T.A. (1998) An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. *J Mol Biol*, **283**, 837-862.

Stenflo, J., Ohlin, A.K., Owen, W.G. and Schneider, W.J. (1988) beta-Hydroxyaspartic acid or beta-hydroxyasparagine in bovine low density lipoprotein receptor and in bovine thrombomodulin. *J Biol Chem*, **263**, 21-24.

Strauch, K., Fimmers, R., Kurz, T., Deichmann, K.A., Wienker, T.F. and Baur, M.P. (2000) Parametric and nonparametric multipoint linkage analysis with imprinting and two-locus-trait models: application to mite sensitization. *Am J Hum Genet*, **66**, 1945-1957.

Sudhof, T.C., Goldstein, J.L., Brown, M.S. and Russell, D.W. (1985) The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science*, **228**, 815-822.

Sudhof, T.C., Van der Westhuyzen, D.R., Goldstein, J.L., Brown, M.S. and Russell, D.W. (1987) Three direct repeats and a TATA-like sequence are required for regulated expression of the human low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem*, **262**, 10773-10779.

Tacken, P.J., Hofker, M.H., Havekes, L.M. and van Dijk, K.W. (2001) Living up to a name: the role of the VLDL receptor in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*, **12**, 275-279.

Takahashi, S., Kawarabayasi, Y., Nakai, T., Sakai, J. and Yamamoto, T. (1992) Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9252-9256.

Tatar, A., Ocak, Z., Yesilyurt, A., Borekci, B. and Oztas, S. (2009) Primary hypogonadism, partial alopecia, and Mullerian hypoplasia: report of a third family and review. *Am J Med Genet A*, **149A**, 501-504.

Tate, P.H. and Bird, A.P. (1993) Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*, **3**, 226-231.

- Taylor, A., Martin, B., Wang, D., Patel, K., Humphries, S.E. and Norbury, G.** (2009) Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis to screen for deletions and duplications of the LDLR gene in patients with familial hypercholesterolaemia. *Clin Genet*, **76**, 69-75.
- Teslovich, T.M., Musunuru, K., Smith, A.V., Edmondson, A.C., Stylianou, I.M., Koseki, M., Pirruccello, J.P., Ripatti, S., Chasman, D.I., Willer, C.J. et al.** (2010) Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*, **466**, 707-713.
- Thiele, H. and Nurnberg, P.** (2005) HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. *Bioinformatics*, **21**, 1730-1732.
- Thomas, J.O.** (2001) HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans*, **29**, 395-401.
- Thorey, F., Jager, M., Seller, K., Krauspe, R. and Wild, A.** (2003) [Kyphoscoliosis in Wiedemann-Rautenstrauch-syndrome (neonatal progeroid syndrome)]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, **141**, 341-344.
- Thuren, T.** (2000) Hepatic lipase and HDL metabolism. *Curr Opin Lipidol*, **11**, 277-283.
- Tolleshaug, H., Goldstein, J.L., Schneider, W.J. and Brown, M.S.** (1982) Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia. *Cell*, **30**, 715-724.
- Top, B., Koeleman, B.P., Gevers Leuven, J.A., Havekes, L.M. and Frants, R.R.** (1990) Rearrangements in the LDL receptor gene in Dutch familial hypercholesterolemic patients and the presence of a common 4 kb deletion. *Atherosclerosis*, **83**, 127-136.
- Tosi, I., Toledo-Leiva, P., Neuwirth, C., Naoumova, R.P. and Soutar, A.K.** (2007) Genetic defects causing familial hypercholesterolaemia: identification of deletions and duplications in the LDL-receptor gene and summary of all mutations found in patients attending the Hammersmith Hospital Lipid Clinic. *Atherosclerosis*, **194**, 102-111.
- Voelkerding, K.V., Dames, S.A. and Durtschi, J.D.** (2009) Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem*, **55**, 641-658.
- von Eckardstein, A., Nofer, J.R. and Assmann, G.** (2001) High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**, 13-27.
- Voss, D. and Pongs, O.** (1986) Upstream sequences modulate in vitro transcription from Drosophila yolk protein genes I and II. *Eur J Biochem*, **158**, 25-32.
- Wallace, D.C.** (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*, **39**, 359-407.
- Wang, H. and Eckel, R.H.** (2009) Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **297**, E271-288.

- Wang, J., Ban, M.R. and Hegele, R.A.** (2005) Multiplex ligation-dependent probe amplification of LDLR enhances molecular diagnosis of familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res*, **46**, 366-372.
- Wasan, K.M., Brocks, D.R., Lee, S.D., Sachs-Barrable, K. and Thornton, S.J.** (2008) Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, **7**, 84-99.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M. and Schubeler, D.** (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet*, **39**, 457-466.
- Weinzierl, R.O., Ruppert, S., Dynlacht, B.D., Tanese, N. and Tjian, R.** (1993) Cloning and expression of Drosophila TAFII60 and human TAFII70 reveal conserved interactions with other subunits of TFIID. *EMBO J*, **12**, 5303-5309.
- Weiss, N., Binder, G. and Keller, C.** (2000) Mutations in the low-density-lipoprotein receptor gene in German patients with familial hypercholesterolaemia. *J Inherit Metab Dis*, **23**, 778-790.
- Wenzel, J.J., Kaminski, W.E., Piehler, A., Heimerl, S., Langmann, T. and Schmitz, G.** (2003) ABCA10, a novel cholesterol-regulated ABCA6-like ABC transporter. *Biochem Biophys Res Commun*, **306**, 1089-1098.
- Wiedemann, H.R.** (1979) An unidentified neonatal progeroid syndrome: follow-up report. *Eur J Pediatr*, **130**, 65-70.
- Willnow, T.E., Goldstein, J.L., Orth, K., Brown, M.S. and Herz, J.** (1992) 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**, 26172-26180.
- Willnow, T.E., Orth, K. and Herz, J.** (1994) Molecular dissection of ligand binding sites on the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*, **269**, 15827-15832.
- Wilson, C., Wardell, M.R., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W. and Agard, D.A.** (1991) Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science*, **252**, 1817-1822.
- Wong, J., Quinn, C.M. and Brown, A.J.** (2006) SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1, by generating oxysterol ligands for LXR. *Biochem J*, **400**, 485-491.
- Woodhouse, N.J. and Sakati, N.A.** (1983) A syndrome of hypogonadism, alopecia, diabetes mellitus, mental retardation, deafness, and ECG abnormalities. *J Med Genet*, **20**, 216-219.
- Wright, C.S., Alden, R.A. and Kraut, J.** (1969) Structure of subtilisin BPN' at 2.5 angstrom resolution. *Nature*, **221**, 235-242.

- Yabe, D., Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (2002) Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12753-12758.
- Yabe, D., Xia, Z.P., Adams, C.M. and Rawson, R.B.** (2002) Three mutations in sterol-sensing domain of SCAP block interaction with insig and render SREBP cleavage insensitive to sterols. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16672-16677.
- Yamazaki, H., Bujo, H., Kusunoki, J., Seimiya, K., Kanaki, T., Morisaki, N., Schneider, W.J. and Saito, Y.** (1996) Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member. *J Biol Chem*, **271**, 24761-24768.
- Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L. and Brown, M.S.** (2002) Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell*, **110**, 489-500.
- Yasuda, T., Ishida, T. and Rader, D.J.** (2010) Update on the role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis. *Circ J*, **74**, 2263-2270.
- Yieh, L., Sanchez, H.B. and Osborne, T.F.** (1995) Domains of transcription factor Sp1 required for synergistic activation with sterol regulatory element binding protein 1 of low density lipoprotein receptor promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6102-6106.
- Yngvadottir, B., Xue, Y., Searle, S., Hunt, S., Delgado, M., Morrison, J., Whittaker, P., Deloukas, P. and Tyler-Smith, C.** (2009) A genome-wide survey of the prevalence and evolutionary forces acting on human nonsense SNPs. *Am J Hum Genet*, **84**, 224-234.
- Zelenski, N.G., Rawson, R.B., Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (1999) Membrane topology of S2P, a protein required for intramembranous cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem*, **274**, 21973-21980.

9 Anhang

Tabelle 39: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation des *LDLR*-Gens

Exon	F-Primer	R-Primer	Fragmentgröße [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
1	AAATGCTGTAAATGACGTGG	AGGGATGGAGTGATTATTTG	277	Taq	-	58	1
2	TGGAATCAACAACACTAGCC	CCTCCTAATTCATGATTGAATAC	608	Taq	-	58	1
3	GATTGGCAAGGCCAGTG	ACTATGTGTTTCAGCCTCACG	839	Taq	2,5 µl DMSO	58	1
4	GGCAGTGGTTCAGAGTCC	TCACCTGCATGTCCCACAC	611	Taq	2,5 µl DMSO	56	1
5	CTCAAGCAGTTGGAACCAC	TGAGGCTCTGAGAAGTCAAG	491	Taq	-	58	1
6	TTTCTTAATGAATCCATTTGC	ACAGGGTGGGCAGAGTG	347	Taq	-	64,6	1
7	GGCAACAAGAGTGAAACTCC	AGGTGGAATCTCATGAAACC	465	Taq	-	58,4	1
8	ATCTCCCAGAGGGCTGG	GTCTGTGCAAAGTTCAGAGG	343	Taq	2,5 µl DMSO	58	1
9+10	CTGCAGGATGACACAAGG	ATGCCAGCCCCTACTAAC	658	Taq	-	58	1
11	TTCTTCCAGAATTCGTTGC	AACCTTCAGGGAGCAGC	307	Taq	-	51,7	1
12	CTCACATGTGGTTGGAGC	AGACCTCCTCCTAGTCACAAC	399	Taq	-	58	1
13+14	AAACTAGTTGTGGAGAGAGGG	CCTTGAGGTACCCATTTGAC	604	Taq	-	58	1
15	TCCAAGGTCATTTGAGAC	GGACTCCATCTCGTGACC	355	Taq	-	58	1
16	AAGTTCTCCAAGTGTCCAGG	AAAGTGAACAGGCCCAAC	291	Taq	-	58	1
17	AGGAGTCAAGGTTATGGTACG	TCACCTAATGCTGTCCTCG	385	Long PCR Enzyme Mix	-	58	1
18	GACTGAATCCGGTACTCACC	AAACAAAGCTCTGGCAGG	312	Taq	-	58	1

Tabelle 40: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation des *APOB*-Gens

Exon	F-Primer	R-Primer	Fragmentgröße [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
26	GCATGCCTAGTTTCTCCATC	CCATCTGATCTTCTGGTTCTTAG	1064	Taq	-	58,4	2
29	AACTGACATATGAAAGATAAATCC	GAGTAACTCGTACCAAGCCATC	595	Taq	-	58	1

Tabelle 41: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation des *PCSK9*-Gens

Exon	F-Primer	R-Primer	Fragmentgröße [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
1	TGAACTTCAGCTCCTGCAC	ACCTGCACTCCACTTCCTC	434	Taq	2,5 µl DMSO	56	1
2	GGTCCGCATTTGGTAACTTC	TCAGCAATGGGCCTACTAAG	427	Taq	-	58	1
3	CAGGTTTGTATCAGGTAAGGC	AGAAGTGGAACCACCAGC	309	Taq	2,5 µl DMSO	56	1
4+5	ATTTAAGGCGCTTTCACCAG	CCACAGCATTCTTGGTTAGG	734	Taq	-	53,2	1
6	TAACCATCACTCTGTGCCTG	CACGTGCCACAAGAAGC	683	Taq	2,5 µl DMSO	56	1
7	GTATAGCAGTTGTCCAGCCC	AGAGCCTGGCACTGGAG	374	Taq	2,5 µl DMSO	56	1
8+9	TGTGCACGTGTGTTTGTG	AAGAGCTGGAGTCTGGAGG	853	Taq	-	61,8	1
10	AGGGTGCTTGAGTTGATCC	GTGAGGACCAAGCCTCG	348	Taq	2,5 µl DMSO	56	1
11	AAGAGAGAGGGTCTGATGGG	GTGGTGGCACAACTGACAC	347	Taq	-	58	1
12	CTCACAGAAGGATGTCGGAG	GTGAGTGAGTTCCAGGCAAG	494	Taq	-	58	1

Tabelle 42: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die Genotypisierung der Nonsense-SNPs

Referenz SNP ID	F-Primer	R-Primer	Fragmentgröße [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
rs10491178	GTGTTACAAGGCAGCAGAGC	GGAGCTTAAGAGCTTCCACC	472	Taq	-	56	1
rs11089781	AACCCAGCTGAGCTGATTCTGC	CCACCTGCCTCCATACTTAG	552	Taq	-	58	1
rs328	CAGTCCTGACAGAACTGTACC	CCTTCAACCCAGGCACACATT	433	Taq	-	58	1

Tabelle 43: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation des *SCARBI*-Gens

Exon	F-Primer	R-Primer	Fragmentgröße [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
1	AAGGGAGCAAGAGGGTGAGG	GGACCTGCTGCTTGATGAGC	581	Taq	3 µl DMSO	55,5	1
2	ACCTCCTATCCCAAGCTCC	AAACTTCTCTGGGACTAGCAC	448	Taq	-	56	1
3	TGTAGATGGAGAGACGATGG	AGTACTTTGGCCAGGACTTC	626	Taq	-	56	1
4	GGTTCTGGTGTCCCAGATG	AGTCACTTACAACCCACAGC	493	Taq	-	56	1
5	ATTTGGCAGTGAACCAGATG	CTTCAAGAGTGTTCATCCTCC	375	Taq	-	56	1
6	CTGTGTGTCTACATAGCCTGC	TACTGAGTCAAATCCACGATG	387	Taq	-	56	1
7	GAGAAGTGGCTGGATCTGG	ACAGCAACTAATAGACCTGGC	464	Taq	-	56	1
8	TGCTGGTTATCTTGTCTATCG	TGAAGTAAGGAACFTTGGTGG	397	Taq	-	56	1
9	GATACAAGCAAGCTCCACTG	GAGAAGATCAGCAGGGACTG	363	Taq	-	56	1
10	GTTTATATTTGGTGGTGAGGG	CAGGGTGAAGTTTCTGATACG	342	Taq	-	56	1
11	GGGAATTGTAGTCTCACCTTG	CAGAACAGGCAGAGTAGTGG	551	Taq	-	58,4	1
12	CTTATGTGCCTTTCCTGTTC	TCAGTCTGTAGACTCCAGG	368	Taq	-	53,2	1

Tabelle 44: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation des *SREBPI*-Gens

Exon	F-Primer	R-Primer	Fragmentgröße [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
1	AAATGAATGACTGGAGGGC	ACACCGAGCTCAGAGACAC	593	Taq	3 µl DMSO	53,2	1
2	TTCTGGAGGAGTAAACGGAG	TGTAGAGAAGACCACCCTCTC	851	Taq	-	56	1
2	AACAAGGGTTGTGCAAATAAG	GACTGCTAGTAACAGGGCATC	683	Taq	-	56	1
3	CCAGGAGCACAGGAAGAAGC	ACGACCAGTGGGACTGTTGC	653	Taq	-	55,5	1
4+5	CTTCTGACAGCCATGAAGAC	ACTAAATAAACGAGGCTGGC	557	Taq	-	56	1
6	GGTTCAGGTAGAAGGAACAAG	TCTTTCAGGACCAGAGGTAAC	447	Taq	-	56	1
7	CAGCTCTAGTCCCTTGGTTAC	GAAATGGGAGGTAGGATCTG	515	Taq	-	56	1
8	ACCCTAACAGATCCTACCTCC	GGGACAGATTCATGGTGTG	772	Taq	-	58,4	1
9+10	TGCACACCATGAATCTGTC	GAGGGTACTGGGCTGTAC	835	Taq	-	55,5	1
11+12	GCTGCATTGAGAGTGAAGAC	CCAGAGACAGCCAGAGATTC	489	Taq	-	56	1
13	ACAATGGCATCTTCTCAAGTC	CACAGAACAAGGCTGAGTG	1065	Taq	-	58,1	2
14-16	CCTTTGTTCTGTGCAGGAGG	CTCTGGACAGAAGCCTTAGC	797	Taq	3 µl DMSO	50,5	1
17	GTGTGGTAGGATCCCTTTG	CAGGTAACCATCAAGAAGATG	912	Taq	-	55,5	1
18-19	TGACTGTCATTTGTGGGATAC	AGTCTCTTGCCTGCTTC	556	Taq	3 µl DMSO, 1,5 µl MgCl ₂	58	1

Tabelle 45: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation des *SREBP2*-Gens

Exon	F-Primer	R-Primer	Fragmentgröße [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
1	TCACTATGCAAATCTGAGCTG	GTCGGTCAATCCTGAGAAG	916	Taq	3 µl DMSO	55,5	1
2	TGGTCTTAGGAAAGTCATTGAG	CCATTCCTGAAGACGACAG	651	Taq	-	56	1
3	TCATTATGAGATACTCCATCCTC	GCTTTGTGTACTCTGGTTG	387	Taq	-	<i>Touch down 56</i>	1
4	TCATTTCTCATTCTTTCTTGG	TCCCATACCTACTCAGCATATAG	349	Taq	-	56	1
5	TTAACCCAGGAAGAGTCTCAG	TTGTATTCACTTACCTTGAGCC	466	Taq	-	56	1
6+7	CAGAGCCATGCTGTCATC	CAGGCTAGGCCCTCTAAC	596	Taq	-	56	1
8	GAATTTAAACCTCATAACCATTTTC	GGTAGCCAAGCCAAGAAG	387	Taq	-	56	1
9	GAGGTAGAAGACTCTTTCCTGTG	CTCTCACCACAAGCATCTATC	385	Taq	-	56	1
10	TGCACTAATTCCTCTGATAATTG	TAAAGGGACTTCAGCTAGGG	487	Taq	-	56	1
11	CCTGGTTCCTCTCTTACTTTG	ATGAATGCCTGCCTACCC	400	Taq	-	56	1
12	ATGAATGCCTGCCTACCC	AAGATTAAGAGACAACCCGTG	398	Taq	-	56	1
13	AAGGCATGGCTGTGTTTG	AGGCTTGTTCCCTCCAG	308	Taq	-	56	1
14	ATGGCCATTGGGTCTTAG	GCTGGCATCTACTCCTAAC	313	Taq	-	56	1
15	CAAAGATGTTACCCATCTCC	ATGCAGTCCTGACCCTTC	350	Taq	-	53,2	1
16	ATTGGAGTCAACAGATGCAC	GTCCTGGTTTCTCTGTCTTTC	414	Taq	-	56	1
17	AGCCTTGCTTTCTCACCTGC	CTGAACACAGGGACACATGG	614	Taq	-	56	1
18	GGAAGGGATGTCATGAGG	TTTCATTCTCAGAGAGGCG	353	Taq	-	56	1
19	GCGTTCAGTGAATGAGTCC	ACAGCTAAGAAGACAAGGCTC	415	Taq	-	51,7	1

Tabelle 46: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation des *ABCA1*-Gens

Exon	F-Primer	R-Primer	Fragmentgröße [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
1	GGGGCGGGGAGGAGGGAGA	AGGCCAAGGAGGCTTCGGG	381	Taq	-	<i>Touch down 56</i>	1
2	AATAACTGATGGCTGTTTCCC	ATTCCATCAATCCCTGTGTG	322	Taq	-	56	1
3	GAGAGTGGTGGGAGAGACTG	GATCCAAAGCATGTGTGATG	351	Taq	-	56	1
4	AGACAGGTCTCTGGGATGTG	TTCTGCAGACTCTATCACACAAG	410	Taq	-	56	1
5	CATGGTGATGAATGGAGCTG	GTTTCTTCACCAATGCCTCC	459	Taq	-	56	1
6	GCTCCCCTATCTCATTCCCTG	TCAAACACTCCCTCCCTCCCC	392	Taq	-	56	1
7	AGACCTGATGCATTGGACTG	TATCACAAACTCCCAGCCAG	447	Taq	-	56	1
8	AGGAGTCGGTTTCTTGTTTG	CTTTGAAAATTGATATTACATCCC	340	Taq	-	56	1
9	TCTGGGACATGGCTTTTG	AGGAAGAGCTCAGTCTGGTG	504	Taq	-	56	1
10+11	TTTACTTTTACAGAGGAGCCAAC	GTGGTGCCCTGTGACTTTAG	907	Taq	-	56	1
12	GGGACACTGTCATTTACCTCAG	AGGCTTGAGGGATAGTTTTG	466	Taq	-	56	1
13	CATTCTTGGTTGAAGGTTGG	TTCACCAAATCATGACACC	514	Taq	-	56	1
14	GGGCAATAAGAGTGAAACTCC	TTGACAACCTTACATCTGGCATC	463	Taq	-	56	1
15	AGAGGGCCTGTCCTTCTG	GGATGAAATTGCAGGAAATG	488	Taq	-	56	1
16	TTTTCTGCGTAGTTTTGGG	TCTAGAGCTAAGGTTTCATGTCC	554	Taq	-	<i>Touch down 56</i>	1
17	TCTGCACCTTATGATTGATCC	GCCTGTCCTTGGACTATCTG	472	Taq	-	56	1
18	TCTTTCCCCACATCCATTC	CATGTGATTTCTCTGCCCC	375	Taq	-	<i>Touch down 56</i>	1
19	ATTTATAGCCTCCTGCCTGC	CTCCTCATGTGCTCCTTCC	437	Taq	-	56	1
20	CTTTGTGTGGGTCTGGTAGG	TACAGTCCAGCCTGGCTAC	448	Taq	-	56	1
21+22	GTGGTTGCTCACTGTTGTTC	ACACAGCATCTCCTCTCAGG	836	Taq	-	56	1
23	TAGCCATACAGGGTGAAAGG	ACAGAGCAGGGAGATGGTG	482	Taq	-	56	1
24	CAGACAGGGTCTCTGAAGC	CCAGCAGCAAACCTTGAG	359	Taq	-	56	1
25	GGAATGACCTAAACACCTGG	CTTAAATGGCTCACTGGGG	494	Taq	-	56	1
26+27	AAGTGTTATTAAGAAATGTGGCTT	TTCTCTTTGGACTCTGTAGGG	623	Taq	-	56	1
28	TTCTGAGAACTTCTAGCTTCAGAC	TACAGATAAATCTGGCTCCG	396	Taq	-	56	1
29	TTGGTGCAGCACAGTCATAG	ATTCAGGGTTAGTTCGCTGC	455	Taq	-	56	1
30	TGTTCAATTTCTGTTTAAAGAGCC	AAAACATAATAAATTCAAAGGGC	362	Taq	-	56	1
31	TCCAAATGGTGAGGGAATAG	AGCAAGACTCCGCTCAG	463	Taq	-	56	1
32	GCAGTGTCTGGGACCTGTAG	CTTCCAATAGACAGAATCAGGC	348	Taq	-	56	1
33	CTAGCACAACCCTACAAGGC	CACAGTGAGATGGCACCC	302	Taq	-	56	1
34	TTTAGCCCTCTTTGAACAG	CAAATCGCTAAATGCCAAAG	374	Taq	-	56	1

35	TGAACAAGGTAGTGGCATTG	TACACCGTACTGCCTCACTG	344	Taq	-	56	1
36	CTGATCATAGTGTGTTTGCCTTG	TATCACTTCTGCCAGAGCC	459	Taq	-	56	1
37	CCTGAATAAAATGTGTCTGGTG	AAAGTGATCACCTGCCTCTG	495	Taq	-	56	1
38+39	TGTGGCTTCATTAATTCAGAG	AGACAGGACAAGGCAGTCAG	631	Taq	-	56	1
40	TCTGGTTTGTCCCTAGAGAATC	AGCTGTGTTGGCATGAGC	419	Taq	-	56	1
41+42	AAAAGTTTTCCCAAATCAGAC	AAAATAAAAATTGACAGAACCTTGG	848	Taq	-	56	1
43	GCACATCAAATATGCCTATGG	TGTATTGGATTCTCTGAAATCATT	399	Taq	-	56	1
44	TCTATACGATGTGTTAAAACCAAG	TGATTTTATGTGCTTCTTTACCC	398	Taq	-	56	1
45+46	AGGCTGTGCTTTCAAGTAGC	CAAGGTTGCTCTGCTGTCC	918	Taq	-	56	1
47+48	TGAGTTTCTGCATCAATAAG	AGAATTTGAATGCAGTTCGG	1053	Taq	-	56	2
49	AAACTTATTTCTGGGCTGC	GGAATAGTAGATCAGGAATTCAGC	495	Taq	-	56	1
50	GGGACAGAGCAAGACCCC	GCCCCTGTAATGGAATTTTG	554	Taq	-	56	1

Tabelle 47: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation des *C2orf37*-Gens

Exon	F-Primer	R-Primer	Fragmentgröße [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
1+2	GAAATTCGAAGGCAGCG	CTATTTACTAGGCACTAATGTAGG	800	Taq	-	56	1
3	TGCCTTGGTATTCACATCTC	TGATTGCTTTAAAGATGCAAG	324	Taq	-	56	1
4	TCTAGTTGGGCATTTAATCTTTC	TTTATTAATTGAGATCTGGTAATGG	399	Taq	-	56	1
5	GAATATGTTTCATGGAATGTGTG	GGTTGCCGTGAATCCTATC	558	Taq	-	56	1
6	TTGCCCTTCCATTTAAGTAAC	GGAGCATTCCAATCAAATATC	357	Taq	-	56	1
7+8	CAGTGGCTTACTGTTCACTCC	GCCTTTGGTTCAATGAATAA	895	Taq	-	56	1
9	TGCATGCAAAGAAAGGTTG	AAAGTAATTCTTAGGAATGTGGG	326	Taq	-	56	1
10	CCGTGTACCTTTGACCTACTG	GTATGCCAGTCTCTGAGGAAG	353	Taq	-	56	1
11	ATCAAGAGAACTACCTCAGTGTTA	TTTCTGCTACACTCAAAGGC	311	Taq	-	56	1
12	CAGTTGAGGAAAGAATTGTGG	GTTGAAATAGCATGCGCAAC	361	Taq	-	56	1
13	CCTATTATTCTTCCATTCATT	TCATTGGCATAGGTGAGTCTG	406	Taq	-	56	1
14	TGTATGTTTGAAGATCCCTAGC	GGAGAATGTGCCATGCAG	337	Taq	-	56	1

Tabelle 48: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation des *DLX1*-Gens

Exon	F-Primer	R-Primer	Fragmentgröße [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
1	TAAATTGGGTTTCCTTCCTGTC	TGATATTCGAAACCTCCACTG	570	Taq	2,5 µl DMSO	56	1
2	GAACGTTCTCTCCCTGGTG	AGCGAGCAACAAATGAAGAC	399	Taq	-	58	1
3	CTATCTCTGCTGTCTGCGG	CTGTTCCCTTCTCCCTCTGG	455	Taq	-	56	1

Tabelle 49: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation des *DLX2*-Gens

Exon	F-Primer	R-Primer	Fragmentgröße [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
1	TAATTACATTGGCTGCTGGAG	CCAAACACGTTTACCCATCC	570	Taq	2,5 µl DMSO	58	1
2	ACCCACCTCTTTGCTCAAG	CATTGTCCTAAACCCGCC	367	Taq	-	56	1
3	CCGTGATCCTCTTATCTCCC	GTGAGCAGGGCCTGAGAC	694	Taq	-	56	1

Tabelle 50: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation des *FGF1*-Gens

Exon	F-Primer	R-Primer	Fragmentgröße [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
2	GTGCCTTTGCTGGAAGAAC	AACCTTGGAGAAGCAAGTACC	355	Taq	2 µl Q-Lösung	58	1
3	TTTCCATGGCCAAGTCTGTC	GTTTGCCTCACTCCATGTAAC	272	Taq	-	58	1
4	GAGGCATGGAGAGCTTTAG	GCCAATGGTCAAGGGAAC	395	Taq	-	58	1

Tabelle 51: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation des *GPR155*-Gens

Exon	F-Primer	R-Primer	Fragmentgröße [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
2	TGTTGATGGCCATACTGAATC	CTTTCATATGTGCTTACCGGG	794	Taq	2,5 µl DMSO	55,5	1
3	TTTCCATGGATACCAATAAACAC	ACTGTCAAACCTGGGACATGAG	1072	Taq	-	56	2
4	TAGACATACCTTCTGGGCAGG	GCAGAAGGCAGGAGTTTG	439	Taq	-	<i>Touch down</i> 56	1
5	GAATGCTTTAGTGTGCCGTG	CAGGCTTTAGCTTTCTTTATTTTC	360	Taq	-	56	1
6	ATTGGAAATCTTTCCGAACC	AACTGTAATTGACTGCATTTGG	338	Taq	-	56	1
7	GAATATGGCTGGCTTAATTGG	TAGAAGCTCAGGGCTATTAGG	286	Taq	-	56	1
8+9	CACACTACTATGAAATAAGCTTGG	TTCTCCAGCACAGGAAACAC	646	Taq	-	56	1
10	TTCTCTCCAAGTAACTTACATTCC	TTCAAGGAAGTTTCCCATAAAC	1085	Taq	2,5 µl DMSO	60	2
11	GCTACATGGGAAGTGTGTGTG	CCCTATTAGCACTTCTTTGCTC	689	Taq	-	56	1
12	ACTGATTCTTAGCTGAATGTG	AAATTCAGGTGACCTAGCTACC	330	Taq	-	56	1
13	TTGTACTATGCTGTGGATGGAG	AGCTGGCAAACAACTAAATC	306	Taq	-	56	1
14	GGCCTACTTTGTGTGTTCCAC	GTTCAAGCAATCTGCCAC	354	Taq	-	56	1
15	GGGTGATAAGGCAGGAAG	GTCACAACCACCTCATTTAGC	307	Taq	-	56	1
16	CTTGCTTGTCCTCTATCATGC	AGGTTGCCTCTGTTAACCTGC	471	Taq	-	58	1

Tabelle 52: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation von miRNA-Bindungsstellen in der 3'UTR des *LDLR*-Gens

Position	F-Primer	R-Primer	Fragmentgröße [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
754-1075	TGAGACACCCGTTACCTTGG	GGGAAGTGAATGGCTTGGAGG	794	Taq	-	56	1
1507-1850	GGAGGATGGTTTGGAGCTCAGG	GGAGTGCAGTGGCTCGATCAT	1072	Taq	-	60	1
1825-2363	ATGATCGAGCCACTGCACTCC	TGCACACAGTCCAGTTCGTGC	439	Taq	-	58	1

Tabelle 53: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation des *PYCR1*-Gens

Exon	F-Primer	R-Primer	Fragmentgröße [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
1	GAACCTCCACCCCTCCAG	CTCCCCATTCCCAGGAAG	512	Taq	-	58	1
2	AGCCAAAGCTAGCCATGAAG	CAGGTCCAAGAGCAATCAG	596	Taq	-	58	1
3+4	CAGCATTCTCTGTGCCATTC	TTCTCCTCCTTCCCTTCTGG	830	Taq	-	58	1
5+6	GGTGGAAGAGGACCTGATTG	ATCTGCTGAGTGCCTGAATG	752	Taq	-	58	1
7	TGGTGATGCTGAGCTGATTC	TTCTCACACGGGAAGGAGAG	815	Taq	-	58	1

Tabelle 54: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation von Mikrosatelliten-Markern des bekannten FH-Locus auf Chromosom 5 (*LDLR*, physikalische Position: 11,2 Mb). Physikalische Position, bzw. Lokalisation angegeben nach UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009. Alle F-Primer besitzen am 5'-Ende einen Hex-Schwanz. Hex-Sequenz = CATCGCTGATTTCGCACAT.

Marker	Lokalistaion [Mb]	F-Primer	R-Primer	Länge [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
D19S535	10,2	ATTTCTGTGTGCCTGCCTG	AAATTTTGTGCTGGAATGAGG	139	Taq	-	58	1
D19S581	10,5	TCGAGACTACAGTGAGCTG	ATTATGGGTGTCTTCCTGAC	250-280	Taq	-	56	1
D19S906	11,7	AGATCGCACCCTGTACTCC	TTCCCGCCTAGTAACGGAC	158-182	Taq	-	56	1
D19S221	12,5	GCAAGACTCTGACTCAACAAAA	CATAGAGATCAATGGCATGAAA	191-211	Taq	-	56	1

Tabelle 55: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation von Mikrosatelliten-Markern des bekannten FH-Locus auf Chromosom 2 (*APOB*, physikalische Position: 22,2 Mb). Physikalische Position, bzw. Lokalisation angegeben nach UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009. Alle F-Primer besitzen am 5'-Ende einen Hex-Schwanz. Hex-Sequenz = CATCGCTGATTTCGCACAT.

Marker	Lokalistaion [Mb]	F-Primer	R-Primer	Länge [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
D2S220	20,9	TATATGTCTCTTGGTTGGCA	TAAGTGGTTCTCAGAGCCAG	157-177	Taq	-	56	1
D2S2373	20,9	AAAGGGTAGCACTCTTCTGTCT	GGGTCTTGTAGTAACTTGTCCA	223-237	Taq	-	58	1
D2S2201	21,4	GTGGGCACTTGGCAGATAAC	TACATCTCAGCCCCATCAGG	214-228	Taq	-	58	1

Tabelle 56: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation von Mikrosatelliten-Markern des bekannten FH-Locus auf Chromosom 1 (*PCSK9*, physikalische Position: 55,5 Mb). Physikalische Position, bzw. Lokalisation angegeben nach UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009. Alle F-Primer besitzen am 5'-Ende einen Hex-Schwanz. Hex-Sequenz = CATCGCTGATTCGCACAT.

Marker	Lokalistaion [Mb]	F-Primer	R-Primer	Länge [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
D1S417	55,0	CTTCCATGTTTCAGTGACATTGGC	ATCCTCGTTAAGGGATGTGTGC	189-195	Taq	2,5 µl DMSO	58	1
D1S2652	55,2	GCAGGTGTGATGCCAGG	TACGGCTGATTGGGAGAAC	94-106	Taq	-	58	1
D1S200	55,7	GTAAGTAACTGGGTAAGTAA	TGGCAGACCTGAACATCATA	154-178	Taq	-	58	1
D1S2661	54,1	AATCCAAGTCTGACTCCATGA	GCTAGTTCACTGTGTGTACATAG	184-190	Taq	-	56	1

Tabelle 57: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation von Mikrosatelliten-Markern eines putativen FH-Locus auf Chromosom 9 (*ABCA1*, physikalische Position: 107,5 Mb). Physikalische Position, bzw. Lokalisation angegeben nach UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009. Alle F-Primer besitzen am 5'-Ende einen Hex-Schwanz. Hex-Sequenz = CATCGCTGATTCGCACAT. *= intragenischer Mikrosatelliten-Marker.

Marker	Lokalistaion [Mb]	F-Primer	R-Primer	Länge [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
D9S53*	107,5	GCTGCATACTTTAAACTAGC	GGAATATGTTTTTATTAGCTTG	116-134	Taq	-	56	1
D9S306*	107,5	AGTCATCCTGGCTTTAAAC	GGTGGAAATATGTTTTTATTAGC	102-136	Taq	-	56	1
D9S1866	107,8	CGGCCTGGTACTCAATGTAT	GCCCTCACATCCATCCTATC	248-268	Taq	-	54	1
D9S1784	108,0	TGACAACCCTATTGTAAACTGC	TTAAGGGGACTAAACAGAGACA	174-198	Taq	-	56	1

Tabelle 58: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation von Mikrosatelliten-Markern des bekannten Woodhouse-Sakati-Locus auf Chromosom 1 (*C2orf37*, physikalische Position: 172,3 Mb). Physikalische Position, bzw. Lokalisation angegeben nach UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009. Alle F-Primer besitzen am 5'-Ende einen Hex-Schwanz. Hex-Sequenz = CATCGCTGATTCGCACAT.

Marker	Lokalistaion [Mb]	F-Primer	R-Primer	Länge [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
D2S378	171,3	TTGTTGTTGTTGTTATTATTGCTA	AAAACCTGCCTGGTGCTC	266-270	Taq	-	56	1
D2S2177	171,5	CCCACAGCAACCCTATAAG	GATTCCTAACCTCGTGGC	101-133	Taq	-	56	1
D2S333	172,3	AAGCACAGTAGTTCATTCAGTAT	TTGATTTAACCATTTNACGATG	184-202	Taq	-	58	1
D2S2302	172,5	ACTCCAGTCTCGGCCAC	GATGCCTGTTTCTTAAAAGCTC	170-212	Taq	-	56	1
D2S2381	172,6	AGTTGCTCAGTAAATATCTCTTAT	TCATTGTAAGTCGAGGAATATC	219-231	Taq	-	62	1
D2S2307	175,1	ACTGGCTTTATGGGTTGAG	GGAAGTCCAGAATTTCTAAATGT	146-158	Taq	-	56	1
D2S2188	175,3	GGAGTCAACCTAGTGCCTATT	CATCCAGCCAGGATTC	124-146	Taq	-	56	1
D2S2257	175,8	AACCACTGTCCTGTATGC	CTTTGTGAGAGTATGTGACTCAA	161-183	Taq	-	56	1
D2S2981	175,8	AAAATATGCAGGTAATGACTTGG	CAAGCAAACCTGACAGGTAGG	234-262	Taq	-	56	1

Tabelle 59: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation von Mikrosatelliten-Markern eines putativen Locus für ein Woodhouse-Sakati-ähnliches Syndrom auf Chromosom 2. Physikalische Position, bzw. Lokalisation angegeben nach UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009. Alle F-Primer besitzen am 5'-Ende einen Hex-Schwanz. Hex-Sequenz = CATCGCTGATTCGCACAT.

Marker	Lokalistaion [Mb]	F-Primer	R-Primer	Länge [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
D2S2374	35,5	TCCTATGATAATTGTTAAGGTTTG	AGAATGGCACCCCTA	235-293	Taq	-	58	1
D2S2259	42,8	CAGCCTGTTTGGGGACAC	GCAGAGCCATCGCCTTC	227-247	Taq	-	58	1
D2S123	51,2	AAACAGGATGCCTGCCTTTA	GGACTTTCACCTATGGGAC	197-227	Taq	2,5 µl DMSO	56	1
D2S2153	54,7	CCTCAGGGACTTGGTTTAAACAG	CCTTTGGGAAATGCTGATTG	146-170	Taq	-	58	1
D2S378	57,3	TGTGGGCTGGTCAGATATTC	CGCTAGGATCACTATGTTTTGC	202-217	Taq	-	56	1
D2S2206	62,3	CTGGGTGACAGAGCAAGAC	ATTAGCAAACAAAAGACTTTGG	191-225	Taq	-	60	1
D2S285	67,4	TGTAGAAATCACAGGGCAGG	CACCACTGCACATGGCTAAT	189-211	Taq	-	56	1

Tabelle 60: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation von Mikrosatelliten-Markern eines putativen Locus für ein Woodhouse-Sakati-ähnliches Syndrom auf Chromosom 5. Physikalische Position, bzw. Lokalisation angegeben nach UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009. Alle F-Primer besitzen am 5'-Ende einen Hex-Schwanz. Hex-Sequenz = CATCGCTGATTCGCACAT.

Marker	Lokalistaion [Mb]	F-Primer	R-Primer	Länge [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
D5S658	140,3	TTTGAAGGGCACTACGAAGATCC	ATTCTCTATTGGAGCCAAGCCAA	264-285	Taq	-	56	1
D5S1979	141,1	ATTATTTCCAGCCCAGGTG	CCTCACTCTCAAGGGTCC	157-179	Taq	-	58	1
D5S2859	143,3	CCACTTCTCCAAAATGATCG	GTTTAGACTTTGGTCCCATCC	232-258	Taq	-	58	1
D5S643	144,9	TGGGCGACAGAGCCATC	TGTGGTGTGCCATTTATTGACT	134-168	Taq	-	54	1
D5S413	148,3	AGTCACCTTCTCTGTCTCCA	AGGCCTCATTCAAAAATCTGT	264-278	Taq	-	56	1
D5S1051	149,5	TTGGCTAATGGGAGGCAACA	GCTACCTAAAGAACACAGTCATG	171-185	Taq	-	56	1
D5S470	150,0	GCAATCCACAAACGTCAAAA	CTTGCCAGACTCCAGACAGC	236-254	Taq	-	64	1

Tabelle 61: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation von Mikrosatelliten-Markern eines putativen Locus für ein Woodhouse-Sakati-ähnliches Syndrom auf Chromosom 6. Physikalische Position, bzw. Lokalisation angegeben nach UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009. Alle F-Primer besitzen am 5'-Ende einen Hex-Schwanz. Hex-Sequenz = CATCGCTGATTCGCACAT.

Marker	Lokalistaion [Mb]	F-Primer	R-Primer	Länge [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
D6S1639	125,1	TCTCAAGGAAGTCTGCCCC	AGAAACATTTAGACCATTGCAGT	157-194	Taq	-	56	1
D6S408	125,1	GCAGAAGCAGACTGAGG	TTACTGGATGTCATCTCTGTG	177-181	Taq	-	58	1

Tabelle 62: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation von Mikrosatelliten-Markern eines putativen Locus für ein Woodhouse-Sakati-ähnliches Syndrom auf Chromosom 11. Physikalische Position, bzw. Lokalisation angegeben nach UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009. Alle F-Primer besitzen am 5'-Ende einen Hex-Schwanz. Hex-Sequenz = CATCGCTGATTCGCACAT.

Marker	Lokalistaion [Mb]	F-Primer	R-Primer	Länge [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
D11S4174	45,2	GATTAAATGCCCACTATGTAGC	GATAGCTTTCCAGATGGTT	277-295	Taq	-	56	1
D11S4165	50,0	GATCAAAACTACATTTGCTTGAG	GGCTTGTCAGACATCTAGG	194-224	Taq	2,5µl DMSO	58	1
D11S2005	55,9	GACTGAGTGTGGGTGTGTGA	CAATGAGCATTACATGCAT	312-333	Taq	-	58	1
D11S1777	57,2	TGAGCCAAGATTGCACCATCAC	GAGTTCACGAATGCCAACAAATT	167-173	Taq	-	60	1
D11S4191	59,7	GCAAGATGGCCAATTAGAAG	TTTTGGTTGGAATGTAGTTGTTA	111-135	Taq	-	60	1

Tabelle 63: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation von Mikrosatelliten-Markern eines putativen Locus für ein Woodhouse-Sakati-ähnliches Syndrom auf Chromosom 10. Physikalische Position, bzw. Lokalisation angegeben nach UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009. Alle F-Primer besitzen am 5'-Ende einen Hex-Schwanz. Hex-Sequenz = CATCGCTGATTCGCACAT.

Marker	Lokalistaion [Mb]	F-Primer	R-Primer	Länge [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
D10S566	107,9	CTGAGGTAGGGGGATGGCTT	CTGTGAAAAATCACATATTGCTA	200-212	Taq	-	60	1
D10S1663	108,7	TATCAAGCAATTTACAATCTGTG	AGCCATACCATAGTCAAACCTG	205-229	Taq	-	62	1
D10S1741	109,1	GAGTAGTGTCATGGCTCCCT	AGATGTTCAGTTCCTTGGCT	210-254	Taq	2,5 µl DMSO	58	1
D10S1795	109,2	GTCCACAGGGCTCTATTG	GGCATTACTCTAGGTGGTGATTC	206-220	Taq	-	58	1
D10S1750	110,1	TTTTACAGGCCAAAAGTG	CGGCTTAACTTAATCATTCC	250-272	Taq	-	58	1
D10S1246	110,9	CTACGGACTCATTGAAGACTAGG	AGCGTTTTCTATAGCTCTGACG	213-245	Taq	-	56	1
D10S597	111,2	GAATGAAGACATCCAGAGG	GCAAGTATCAGAAACCCAA	206-222	Taq	-	58	1

Tabelle 64: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Amplifikation von Mikrosatelliten-Markern eines putativen Locus für ein Woodhouse-Sakati-ähnliches Syndrom auf Chromosom 18. Physikalische Position, bzw. Lokalisation angegeben nach UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009. Alle F-Primer besitzen am 5'-Ende einen Hex-Schwanz. Hex-Sequenz = CATCGCTGATTCGCACAT.

Marker	Lokalisation [Mb]	F-Primer	R-Primer	Länge [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
D18S1136	38,3	CCAAGTTAGTGGGTCTTGTC	CTTTTTGGTCTTAGGTAAATTGTC	239-255	Taq	2,5 µl DMSO	56	1
D18S1145	40,4	GGAACTAATGGCTACTGACGCCT	CTGGCTGCAAATGGAGAGACTT	221-247	Taq		58	1
D18S1159	42,8	GCATTCTAACTCCAGGGCAT	CTCACTGTCGGTAACGCCTA	206-218	Taq	2,5 µl DMSO	56	1
D18S472	46,2	GCCCAGCCAACCTTTTAAATA	GCCCAGCCAACCTTTTAAATA	149-163	Taq	-	56	1
D18S487	49,9	ACAATCAGAAACCCGCCA	CTGACTTAGGTAGATTTTCCTCG	115-127	Taq	-	56	1

Tabelle 65: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die Amplifikation der zu klonierenden Produkte. Die amplifizierten zu klonierenden Produkte wurden für die Herstellung der Konstrukte benötigt. In der ersten Spalte der Tabelle sind die entsprechenden Nummern der Konstrukte angegeben. Die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. ^ = Schnittstelle. Die Sequenzen für den FLAG- und HSV-tag werden durch kursive Kleinbuchstaben hervorgehoben.

Nr.	F-Primer	R-Primer	Fragmentgröße [Bp]	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (min)
1	<i>gc^ggccgatgcagcctgaactgctccagaggatccggaagatG</i> ACGAGCCACCTTCAGCGAG	t^ctagattactatcgtcgtcatccttgaatcGCTGGAAGTG ACAGTGGTCCC	3515	Pfu	-	56	8
3	<i>gc^ggccgatgcagcctgaactgctccagaggatccggaagatG</i> AGACCCTCACGGAGCTGGGC	t^ctagattactatcgtcgtcatccttgaatcGGAGGCGGCA ATGGCAGTGCC	3458	Pfu	-	56	8
4	ATGGACGACAGCGGCGAGCTGGGTGGTCTG GAGACCATGGAGACCCTCACGGAGCTGGGC	t^ctagattactatcgtcgtcatccttgaatcGGAGGCGGCA ATGGCAGTGCC	3456	Pfu	-	56	8
5	<i>gc^ggccgatgcagcctgaactgctccagaggatccggaagatG</i> ACGACAGCGGCGAGCTGGGT	t^ctagattactatcgtcgtcatccttgaatcGGAGGCGGCA ATGGCAGTGCC	3497	Pfu	-	56	8
8	at^cgatGACGACAGCGGCGAGCTGGGT	t^ctagattactatcgtcgtcatccttgaatcGGAGGCGGCA ATGGCAGTGCC	3459	Pfu	-	56	8
9	at^cgatGACGACAGCGGCGAGCTGGGT	t^ctagattactatcgtcgtcatccttgaatcGGAGGCGGCA ATGGCAGTGCC	3459	Pfu	-	56	8
10	at^cgatGACGACAGCGGCGAGCTGGGT	t^ctagattactatcgtcgtcatccttgaatcGGAGGCGGCA ATGGCAGTGCC	3459	Pfu	-	56	8
11	<i>g^tcgacTCCTTCTCTTTGTCTACGGTGAG</i>	<i>gc^ggccgcCTAGCTGGAAGTGACAGTGGT</i>	1772	Pfu	-	56	4
12	<i>g^tcgacTCCTTCTCTTTGTCTACGGTGAG</i>	<i>gc^ggccgcCTAGCTGGAAGTGACAGTGGT</i>	1772	Pfu	-	56	4
13	<i>g^tcgacTCCTGCTGGTTCATGGGGAGCCA</i>	<i>gc^ggccgcTCAGGAGGCGGCAATGGCAGT</i>	1775	Pfu	-	56	4
14	<i>g^tcgacTCCTGCTGGTTCATGGGGAGCCA</i>	<i>gc^ggccgcTCAGGAGGCGGCAATGGCAGT</i>	1775	Pfu	-	56	4
15	<i>g^tcgacTCCTGCTGGTTCATGGGGAGCCA</i>	<i>gc^ggccgcTCAGGAGGCGGCAATGGCAGT</i>	1775	Pfu	-	56	4
16	<i>c^tcgagTACTCAGCCAAAGGCGGGATC</i>	<i>a^agcttGCAGCCTCTGCCAGGCAGTGT</i>	704	Pfu	-	56	2
17	<i>c^tcgagTACTCAGCCAAAGGCGGGATC</i>	<i>a^agcttGCAGCCTCTGCCAGGCAGTGT</i>	704	Pfu	-	56	2

Tabelle 66: Verwendete Vektorprimer für die Kolonie-PCR und Sequenzierung der Konstrukte

Vektor	F-Primer	R-Primer
pCR2.1-TOPO	M13R CAGGAAACAGCTATGAC	M13F GTAAAACGACGGCCAG
pcDNA3.1 / V5-His-TOPO	<i>T7 promoter</i> TAATACGACTCACTATAGGG	<i>BGH reverse</i> TAGAAGGCACACGAGG
pTK-HSV	F AGCCATGCAGCCTGAACTCGC	R -
pGL4.10[<i>luc2</i>]	RVprimer3 TAGCAAAATAGGCTGTCCC	pGL4.10_R TTACCAACAGTACCGGATTGC

Tabelle 67: Verwendete in *SREBP1* lokalisierte Primer für die Kolonie-PCR und Sequenzierung der Konstrukte. F (vorwärts) und R (rückwärts) in der Bezeichnung geben die Richtung der Primer an.

Bezeichnung	Sequenz
SREBP1_Seq_F1	GGAGGCTTCTCTACAGGAAGC
SREBP1_Seq_F2	ATCTGGTGGTGGGCACTGAGG
SREBP1_Seq_F3	TCAATGGGCTGTTGGTGCTCG
SREBP1_Seq_F4	GAGATCTATGTGGCGGCTGC
SREBP1_Seq_F5	GTGACCTGCTTCTTGTGGTGC
SREBP1_Seq_R	CTGTCTTGTTGTTGATAAGC

Tabelle 68: Verwendete in *SREBP2* lokalisierte Primer für die Kolonie-PCR und Sequenzierung der Konstrukte. F (vorwärts) und R (rückwärts) in der Bezeichnung geben die Richtung der Primer an.

Bezeichnung	Sequenz
SREBP2_Seq_F1	TCACCATTTCAGCAGCAGGTGC
SREBP2_Seq_F2	AGAACATGGTGCTGAAGCTGG
SREBP2_Seq_F3	GCAACCTACAAACCTGCCTGG
SREBP2_Seq_F4	GAACCCAGCTGACCCCATTCG
SREBP2_Seq_F5	TGACCTGCTACTGTGCTACG
SREBP2_Seq_R	CTGACAAATTGCAGCATCTCG
SREBP2_Seq_R1	CGCAGCAACTGTCTGCACCG

Tabelle 69: Verwendete Primer für die *Megaprime*-PCR zur zielgerichteten Mutagenese. Alle Produkte wurden mit der Pfu DNA Polymerase bei 58°C amplifiziert. Die Extensionszeit betrug bei allen PCRs 2 min. Die ausgetauschte Base in den mutagenen Primern ist hervorgehoben.

Mutation	Primer	Sequenz
SREBP1a c.G2435A, p.R812Q	5'-Primer des 5'-Fragmentes	GCAAGCAGGCTGACCTGGACC
	3'-Primer des 3'-Fragmentes	GGAGCTGGTGTGTCCGTGTGG
	mutagener 3'-Primer des 5'-Fragmentes	GGGCTGGGT C ACACAGTTCAGTGCTTGCTCTAAGAGATGTTCCCGGAATAG
	mutagener 5'-Primer des 3'-Fragmentes	CTATTCCGGGAACATCTCTTAGAG C AAGCACTGAACTGTGTGACCCAGCCC
SREBP2 c.G1934A, p.R645Q	5'-Primer des 5'-Fragmentes	AGGTGGACCTGAAGATCGAGG
	3'-Primer des 3'-Fragmentes	CCACCGACAGATGATGTCTGG
	mutagener 3'-Primer des 5'-Fragmentes	TGCCTCAGTGGCTGGCGTGGCCCGCTGGCACTGGAAGACTTTCTTGAGCAG
	mutagener 5'-Primer des 3'-Fragmentes	CTGCTCAAGAAAGTCTTCCAGTGCCAGCGGGCCACGCCAGCCACTGAGGCA
SREBP2 c.G2554A, p.G852R	5'-Primer des 5'-Fragmentes	GAAGACGAAGCTAAGACCAGC
	3'-Primer des 3'-Fragmentes	CAGGAACACCTTGCGGTATGC
	mutagener 3'-Primer des 5'-Fragmentes	CTGGAGAGTGGGGGGCTCATAACCCTCACAGAGTCCACAAAAGAATGAAG
	mutagener 5'-Primer des 3'-Fragmentes	CTTCATTCTTTTGTGGACTCTGTGAGGGTTATGAGCCCCCACTCTCCAG

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Dr. Bernd Wollnik für die außerordentlich gute, fachliche und langjährige Betreuung dieser Doktorarbeit, sein Vertrauen, seine Geduld und Unterstützung, vielfältigen Anregungen, Ideen und konstruktive Kritik sowie die Überlassung dieses interessanten und spannenden Themas. Seine wertvollen Ratschläge, stete Diskussionsbereitschaft, Erfahrung, Hilfsbereitschaft und vor allem seine ansteckende Freude und Begeisterung an der Forschung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Humangenetik der Universität zu Köln durchführen zu können, danke ich unserer Institutsdirektorin Frau Prof. Dr. Brunhilde Wirth ganz herzlich.

Meinen Tutoren aus dem MD-/PhD-Programm, Frau Prof. Dr. Rita Schmutzler und Herrn Prof. Dr. Peter Nürnberg, danke ich für die Betreuung, die netten und aufschlussreichen Treffen und die Begutachtung meiner Arbeit.

Unseren Kooperationspartnern danke ich für die Bereitstellung von Patientenmaterial und die freundliche Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich mich herzlich bei allen meinen derzeitigen und ehemaligen Kollegen - Barbara, Edyta, Emi, Esther, Filippo, Gökhan, Martin, Kathi, und Yun - für den fachlichen und wissenschaftlichen Austausch, hilfreiche Anregungen und Ratschläge, arbeitsfördernde Diskussionen, ganz viel Geduld, Hilfsbereitschaft und Unterstützung sowie einen stets heiteren Laboralltag bedanken. Vor allem danke ich auch für die schönen Erlebnisse außerhalb unseres „Bunkers“ (Hey, was geht ab...).

Insbesondere danke ich Barbara für eine besondere Freundschaft!

Ganz lieben Dank an Emi und Gökhan für die gute Durchsicht meiner Doktorarbeit, die Unterstützung bei der Durchführung von Experimenten, Geduld, Motivation und Aufmunterung während der Endphase dieser Arbeit. Wer oder was zum Teufel ist eigentlich SREBP1? Zusätzlich danke ich ganz speziell Emi für ihre große Hilfe in den letzten Tagen und Wochen in jeder Hinsicht und ihr offenes Ohr für alle Probleme und Wehwehchen. Danke für den einzigartigen und leckersten SpongeBob Schwammkopf der Welt, für Kekse,

Frustschutz-Bärchen, Tee, Taschentücher, Formulierungshilfe, Synonyme und noch viele Sachen mehr. Ich bin sooo glücklich :-) Ohne dich wäre ich manchmal ganz schön verzweifelt! Du bist großartig!

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik, insbesondere der ZMMK-Gruppe, für tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft, ein freundliche, entspannte, angenehme, kooperative und kommunikative Arbeitsatmosphäre und gelegentliche Ablenkung.

Jommer noh Hus oder solle mer blieve? Ich bin in Köln geblieben für drei Monate und für diese großartige Möglichkeit und Erleichterung möchte ich mich ganz doll bei Christian bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meinen lieben Freunden sowie bei Agi und Gregor bedanken, die mich immer wieder aufgebaut haben. Ein großer Dank an Sebastian, der ein Teil des Korrekturlesens übernommen hat.

Von ganzem Herzen danke ich meinen liebevollen Eltern und meinem Bruder Christopher, die mich in allen meinen Taten uneingeschränkt unterstützt, an mich geglaubt und mir vertraut haben. Ohne euch hätte ich es bis hierhin nie geschafft!

Ein ganz besonderer Dank gilt zuletzt meinem Baby! Matthias hat mich stets liebevoll aufgebaut und mir den Rücken freigehalten. Ich danke für seine unendliche Liebe, Geduld, Fürsorge, sein Verständnis, aber auch Motivation und Unterstützung während der ganzen Zeit meiner Doktorarbeit. DANKE! Ich bin genau da wo ich sein will!!!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Plume
Vorname	Nadine
Geburtsdatum	08.01.1982
Geburtsort	Langenfeld
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Promotion

seit Januar 2008	Teilnahme am Interdisziplinären Promotionsstudiengang Molekulare Medizin der Universität zu Köln
seit Mai 2007	Promotion am Institut für Humangenetik der Uniklinik Köln unter der wissenschaftlichen Anleitung von Herrn Dr. med. Bernd Wollnik (Nachwuchsgruppe V des Zentrums für Molekulare Medizin Köln) Titel der Dissertation: „Molekulare Mechanismen isolierter und Syndrom-assoziiertes Lipidstoffwechselerkrankungen“

Hochschulstudium

März 2007	Erlangung des akademischen Grades Diplom-Biologin (Note: Sehr gut)
März 2006 – Februar 2007	Diplomarbeit am Institut für Humangenetik der Uniklinik Köln unter der wissenschaftlichen Anleitung von Herrn Dr. med. Bernd Wollnik (Nachwuchsgruppe V des Zentrums für Molekulare Medizin Köln) Titel der Diplomarbeit: „Pathophysiologische Mechanismen des Levy-Hollister-Syndroms verursacht durch <i>FGF10</i> -Mutationen“
Oktober 2001 - Februar 2006	Studium der Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln Hauptfach: Genetik Nebenfächer: Biochemie und organische Chemie

Schulausbildung

Juni 2001	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
August 1992 – Juni 2001	Besuch des staatlich anerkannten Gymnasiums des Erzbistums Köln Marienschule Opladen in Leverkusen
August 1988 – Juni 1992	Besuch der Gemeinschaftsgrundschule Heinrich-Lübke in Leverkusen

Publikationsverzeichnis

Teilpublikationen

Frenzel, L.P., Claus, R., **Plume, N.**, Schwamb, J., Konermann, C., Pallasch, C.P., Claasen, J., Brinker, R., Wollnik, B., Plass, C. *et al.* Sustained NF-kappaB activity in chronic lymphocytic leukemia is independent of genetic and epigenetic alterations in the TNFAIP3 (A20) locus. *Int J Cancer*.

Li, Y., Boegershausen, N., Alanay, Y., Simsek, P.Ö., **Plume, N.**, Keupp, K., Pohl, E., Pawlik, B., Rachwalski, M., Milz, E., Thoenes, M., Albrecht, B., Prött, E.C., Lehmkuhler, M., Demuth, S., Utine, G.E., Boduroglu, K., Borck, G., Gillessen-Kaesbach, G., Yigit, G., Wieczorek, D., Wollnik, B. A large mutation screen in patients with Kabuki syndrome. *Human Genet*.

Eingereichte Teilpublikationen

Sahin, S.E., Mir, A., **Plume, N.**, Boss, K., Nürnberg, G., Rauch, A., Nürnberg, P., Schenk, A., Li, Y., Wollnik, B. *RAB11FIP4* is a novel mental retardation gene located within the common NF-1 deleted region. *Am J Hum Genet*

Kongressbeiträge

20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2009 in Aachen

Poster: **Plume, N.**, Li, Y., Gräser, M., Rohmann, E., Schmutzler, R., Wollnik, B. Activating somatic mutations in FGFR2 identified in breast cancer patients.

60th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG) 2010 in Washington DC, USA

Poster: **Plume, N.**, Milz, E., Gouni-Berthold, I., Krone, W., Berthold, H., Wollnik, B. A large mutation screen in the German LIANCO cohort identified *SREBF1* and *SREBF2* as hypercholesterolemia-associated genes.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen-, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten abgegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Dr. med. Bernd Wollnik betreut worden.

Köln, 20. März 2011

Nadine Plume