

3.1 Genetische Ursachen der Hypercholesterinämie und ihre Verknüpfung mit Gefäßerkrankungen

HERBERT SCHUSTER

Inhaltsverzeichnis

3.1.1	Einführung und historischer Abriß	325	3.1.6.2	LDL-Rezeptor-Gen	332
3.1.2	Familiäre Hypercholesterinämie	326	3.1.6.3	Struktur-Funktions-Beziehung	332
3.1.3	Ätiologie und Pathogenese	327	3.1.6.3.1	Synthesestörung	332
3.1.4	Klinische Symptome	328	3.1.6.3.2	Transportstörung	333
3.1.4.1	Lipide und Lipoproteine	328	3.1.6.3.3	Bindungsstörung	333
3.1.4.2	Arcus lipoides und Xanthelasmen	329	3.1.6.3.4	Internalisierungsstörung	333
3.1.4.3	Xanthome	329	3.1.6.3.5	Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Mutationstypen	333
3.1.4.4	Vorzeitige Arteriosklerose	329	3.1.7	Diagnostik	333
3.1.5	Genetik	330	3.1.7.1	Molekulare Diagnostik	334
3.1.6	Molekularbiologische Grundlagen	331	3.1.7.1.1	Funktionelle molekulare Diagnostik . . .	334
3.1.6.1	LDL-Rezeptor-Protein	331	3.1.7.1.2	Molekulargenetische Diagnostik	335
3.1.6.1.1	Bindungsregion des LDL-Rezeptor-Proteins	331	3.1.7.1.2.1	Nachweis von Insertionen und Deletionen	335
3.1.6.1.2	Dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnliche Region des LDL-Rezeptors	331	3.1.7.1.2.2	Indirekte Diagnostik anhand von Kosegregationsanalysen . . .	336
3.1.6.1.3	An Kohlenhydrate gebundene Region des LDL-Rezeptors	331	3.1.7.1.2.3	Nachweis von Punktmutationen	338
3.1.6.1.4	Membranregion des LDL-Rezeptors	331	3.1.7.2	Klinische Bedeutung der DNA-Diagnostik	341
3.1.6.1.5	Zytoplasmatische Region des LDL-Rezeptors	332	3.1.8	Literatur	342

3.1.1 Einführung und historischer Abriß

Leonardo da Vinci hat im 15. Jahrhundert als erster makroskopische Veränderungen der Gefäßwand beschrieben, die wir heute als Arteriosklerose bezeichnen. Anhand autoptischer Untersuchungen stellte er die These auf, daß die Läsionen der Gefäßwand durch übermäßige Ernährung aus dem Blut entstehen. Der Begriff Arteriosklerose wurde erst im 19. Jahrhundert geprägt, um die pathologisch-anatomischen Befunde eines weichen Atheroms und harter Sklerose in der innersten Schicht der Aorta und anderer größerer Arterien zu beschreiben.

Die Erforschung der kardiovaskulären Erkrankungen konzentrierte sich zum damaligen Zeitpunkt ganz auf die Morphologie der arteriosklerotischen Läsion. Virchow [1856] stellte die Verletzungshypothese auf und gab die erste histologisch

begründete Erklärung der Entstehung von Arteriosklerose. Nach seiner Meinung entstanden die ersten Veränderungen durch einen vermehrten Einstrom „flüssiger Elemente aus dem Blutstrom in die bindegewebige Substanz unterhalb der Intima und verursachen eine Schwellung dieser Substanz“. Die anschwellenden bindegewebigen Zellen teilen sich und verursachen eine lokalisierte Auftreibung der Intima, die sich in eine arteriosklerotische Läsion umwandelt.

Virchows Theorie von der „Schwellung der Arterienwand“ setzte von Rokitsansky [1852] eine „thrombogenetische Theorie“ über die Entstehung der Arteriosklerose entgegen. Gemeinsam war beiden die Vorstellung von der Ansammlung von Blutbestandteilen, Zellen und flüssigen Bestandteilen in der Arterienwand. Cholesterin wurde bereits im 18. Jahrhundert aus Gallensteinen gewonnen und 1816 erstmals als Cholesterin bezeichnet. Obwohl Cholesterin bereits 1847 in arterioskleroti-

schen Läsionen der Gefäßwand nachgewiesen wurde, wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhten Serumcholesterinwerten und Atheromen erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts vermutet. 1913 beschrieben Bacmeister u. Henes erhöhte Serumcholesterinwerte bei verschiedenen Erkrankungen, z. B. bei Patienten mit chronischem Nierenversagen oder Diabetes mellitus. Bei der post mortem diagnostizierten Arteriosklerose waren sie aber nicht sicher, ob es sich um ein primäres oder sekundäres Phänomen handelte.

Anitschkow [1913], der Ernährungsversuche mit Cholesterin bei Kaninchen unternahm, wies die beschleunigte Infiltration von Cholesterin in die Wand größerer Arterien bei erhöhten Serumcholesterinwerten nach. Er schloß daraus, daß die experimentelle Arteriosklerose der Arterienwand ein primärer, infiltrativer Vorgang mit nachfolgenden sekundären Veränderungen der Gefäßwand sei. Die Bedeutung seines Tiermodells lag in der Ähnlichkeit der arteriosklerotischen Veränderungen in Morphologie und Histochemie im Modell mit denen beim Menschen. Indem Anitschkow [1913] eine Erhöhung von Cholesterinwerten als Ursache der Arteriosklerose postulierte, entwickelte er die „Lipid-Hypothese“. Eines der stärksten Argumente für die Lipidhypothese entstand aber aus klinischen Beobachtungen bei Patienten mit erblichen Störungen des Cholesterinstoffwechsels, insbesondere der Familiären Hypercholesterinämie.

3.1.2 Familiäre Hypercholesterinämie

Als eigenständiges Krankheitsbild wurde die Familiäre Hypercholesterinämie erstmals 1938 beschrieben. Thannhauser u. Magendantz [1938] erkannten anhand von Untersuchungen an 22 Patienten mit Xanthomen die Assoziation von Xanthomen, Hypercholesterinämie und vorzeitiger koronarer Herzerkrankung sowie die familiäre Häufung durch dominante Vererbung und definierten das klinische Erscheinungsbild als eine Erkrankung des intrazellulären Cholesterinstoffwechsels. Müller [1939] beschrieb zur selben Zeit Sehnenxanthome, Angina pectoris und Hypercholesterinämie bei 6 Patienten, davon 3 mit familiärer Belastung. Er hob hervor, daß einige Patienten in relativ jungem Alter plötzlich verstarben und die Mehrheit in späterem Lebensalter Angina pectoris entwickelte. Später stellte er fest, daß die vorzeitige koronare Herzerkrankung mit der Hypercholesterin-

ämie assoziiert ist. In den 40er und 50er Jahren untermauerten Familienuntersuchungen die Hypothese von der genetischen Grundlage der Hypercholesterinämie. Untersuchungen von Khachadurian [1964] an großen libanesischen Familien in den 60er Jahren zeigten erstmals eindeutig, daß die Familiäre Hypercholesterinämie durch ein Gen nach den Mendel-Gesetzen autosomal-dominant vererbt wird. Bei allen an der Hypercholesterinämie erkrankten Familienangehörigen war auch ein Elternteil betroffen, und ein Kranker hatte sowohl gesunde als auch erkrankte Kinder, während gesunde Kinder eines Betroffenen immer gesunde Kinder bekamen und Frauen wie Männer gleich häufig betroffen waren. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% waren Kinder eines Erkrankten ebenfalls betroffen. Anhand von sehr hohen Serumcholesterinwerten, ausgeprägten Xanthomen und fortgeschrittener koronarer Herzerkrankung bereits im Kindesalter konnten homozygote Patienten mit 2 defekten Genen von heterozygoten Patienten mit nur 1 defekten Gen unterschieden werden. Die Wahrscheinlichkeit, homozygoter Träger der Familiären Hypercholesterinämie zu sein, beträgt 25% und setzt voraus, daß beide Elternteile heterozygote Träger der Erkrankung sind.

Als die klinische Bedeutung der Hyperlipidämien offensichtlich wurde, wurde es notwendig, eine Klassifikation zu entwickeln, die im wesentlichen auf Frederickson et al. [1967] zurückgeht. Grundlage dieser Klassifikation waren Untersuchungen, die zeigen konnten, daß Cholesterin und Triglyzeride in Form von wasserlöslichen Komplexen mit Proteinen, den Lipoproteinen, im Plasma transportiert werden. Mit Hilfe neu entwickelter biochemischer Methoden, Elektrophorese und Ultrazentrifugation, konnte dann gezeigt werden, daß bei Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie die Erhöhung der Serumcholesterinwerte von einem selektiven Anstieg von Lipoproteinen niedriger Dichte (Low-density-Lipoprotein, LDL) herrührt und sowohl der Cholesterin- als auch der Proteinanteil dieses Lipoproteins erhöht sind.

Angeregt durch die offensichtliche Assoziation von Hypercholesterinämie und koronarer Herzerkrankung sowie deren Vererblichkeit begannen Goldstein et al. [1973] in Seattle, USA, eine detaillierte genetische Analyse von Familien mit Hyperlipidämien ausgehend von Patienten, die einen Herzinfarkt überlebt hatten. Es wurden Familienangehörige 1. und 2. Grads untersucht und der Erbgang der Hyperlipidämie analysiert. Die weitere biochemische Forschung von Brown u. Goldstein [1976] führte zur Entdeckung des LDL-Re-

zeptors und der Charakterisierung des molekularen Defekts der Familiären Hypercholesterinämie. Das Studium der Aufnahme von LDL-Cholesterin in die Zelle führte 1973 zu der Erkenntnis, „daß ein in der Zellwand befindliches Protein, der LDL-Rezeptor, den Übertritt von Cholesterin aus der Blutbahn in die Zelle ermöglicht.“

3.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Anhand zellbiochemischer und molekulargenetischer Untersuchungen existieren heute eine genaue ätiologische und pathogenetische Vorstellung von der Entstehung der Familiären Hypercholesterinämie. LDL-Rezeptoren lassen sich auf allen kultivierbaren humanen Zelllinien nachweisen, in denen sie die Aufnahme von LDL-Cholesterin aus dem Plasma vermitteln und die Zellen mit Cholesterin versorgen, das für das Zellwachstum und die Funktion der Zellen notwendig ist. Im Organismus bilden Leberzellen die meisten LDL-Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche. In diesen Zellen ist der Cholesterinbedarf besonders hoch, weil in der Leber Cholesterin als Ausgangsstoff der Gallensäurebildung und Synthese von Lipoproteinen benötigt wird. LDL-Rezeptoren finden sich weiterhin in hoher Konzentration in der Nebennierenrinde und im Ovar. In diesen Organen dient Cholesterin der Synthese von Steroidhormonen.

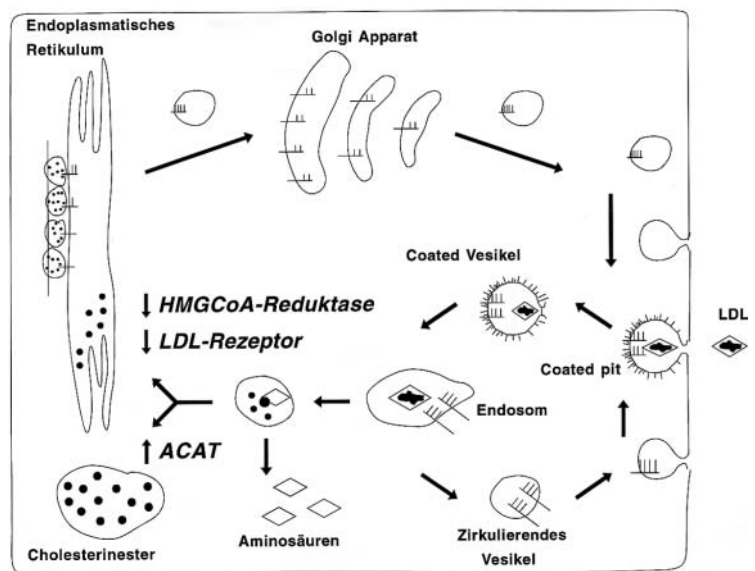
LDL-Rezeptoren werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und bereits während der

Translation an Kohlenhydratketten gebunden (Abb. 3.1.1). Innerhalb der ersten 30 min nach Synthesebeginn erhöht sich dadurch das Molekulargewicht um 30%. Nach 45 min erscheint der LDL-Rezeptor an der Zelloberfläche, wo er sich in kleinen Gruppen ansammelt. Diese sog. Coated pits, Stachel-saumgrübchen, sind für die Rezeptor-vermittelte Endozytose von LDL-Partikeln verantwortlich. Der LDL-Rezeptor bindet 2 verschiedene Proteine:

1. Apolipoprotein B-100 (Apo B), das in einfacher Kopie in jedem LDL-Partikel vorhanden ist, als Ligand dient und die Bindung von LDL-Partikeln am LDL-Rezeptor vermittelt;
2. Apolipoprotein E (Apo E), das in mehrfacher Kopie in Lipoproteinen niedriger Dichte (Very-low-density-Lipoprotein, VLDL), in Lipoproteinen mittlerer Dichte (Intermediate-density-Lipoprotein, IDL) und in einer Untergruppe von Lipoproteinen hoher Dichte (High-density-Lipoprotein, HDL) vorliegt. Lipoproteine, die mehrere Kopien des Apo E enthalten, binden im Vergleich zu LDL, das nur eine Kopie des Apo B enthält, mit 20facher Affinität an den LDL-Rezeptor. Für die Gesamtbilanz der zellularen Aufnahme von Cholesterin spielen Apo-E-haltige Lipoproteine jedoch nur eine untergeordnete Rolle, da diese im Plasma in LDL umgewandelt werden und deshalb nur in wesentlich geringerer Konzentration vorhanden sind.

Abb. 3.1.1 illustriert den weiteren Weg von Apo-B- und Apo-E-haltigen Lipoproteinen, nachdem sie an den LDL-Rezeptor gebunden wurden. Innerhalb von 3–5 min nach ihrer Formation in Coated pits

Abb. 3.1.1. Schematische Darstellung der LDL-Rezeptor-Funktion in menschlichen Zellen. Nach Beendigung der Synthese im endoplasmatischen Retikulum wandert das LDL-Rezeptor-Protein zum Golgi-Komplex, von dort zur Zelloberfläche und sammelt sich in Coated pits. *HMGCoA-Reduktase* 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase, *ACAT* Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase, vertikale Pfeile regulatorische Wirkung der LDL-Rezeptorfunktion, nach Brown u. Goldstein [1976]



lösen sich die gruppierten Rezeptoren in Form kleiner Vesikel von der Zellmembran ab und bewegen sich in das Zytosol der Zellen. Mehrere solcher Vesikel formieren sich anschließend zu Endosomen, in denen die LDL-Partikel vom LDL-Rezeptor-Protein freigesetzt werden. Die LDL-Rezeptoren kehren an die Zelloberfläche zurück und bilden erneut kleine Vesikel, die gebundenes LDL in das Zytosol der Zellen transportieren. Alle 10 min durchlaufen LDL-Rezeptoren diesen Zyklus, unabhängig von der Menge an gebundenem LDL.

LDL-Partikel werden, vom Rezeptor losgelöst, durch Hydrolasen gespalten, nachdem sich die Endosomen mit Lysosomen verbunden haben. Der Apoproteinanteil wird durch Proteasen in Aminosäuren und Cholesterinester, durch Lipasen in unverestertes Cholesterin hydrolysiert, das in das Zytosol übertritt und an der Regulation des zellularen Cholesterinstoffwechsels mitwirkt. Die wichtigste regulatorische Wirkung kommt dadurch zustande, daß die Erhöhung von intrazellularem freiem Cholesterin die Aktivität des Schlüsselenzyms der zellularen Cholesterinsynthese, die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase, hemmt und gleichzeitig die Synthese von LDL-Rezeptoren unterdrückt. Zusätzlich aktiviert freies Cholesterin ein Cholesterin veresterndes Enzym, die Acyl-Cholesterin-Acyl-Transferase (ACAT), wodurch Cholesterin als Ester in den Zellen gespeichert werden kann. Durch diesen Rückkopplungsmechanismus kontrollieren die Zellen ihren Gehalt an freiem Cholesterin entsprechend dem Bedarf und vermeiden eine Überladung mit Cholesterin. Im Wachstum befindliche Zellen synthetisieren eine maximale Anzahl von LDL-Rezeptoren. Zellen im Wachstumsstillstand mit niedrigem Cholesterinbedarf reduzieren die Produktion von LDL-Rezeptoren um 90% des Maximums.

Mit Hilfe dieses Rückkopplungssystems ist die Homöostase der intrazellulären Cholesterinkonzentration gewährleistet, und die Zellen können die Neusynthese von Cholesterin ihren Bedürfnissen entsprechend reduzieren. Bei gestörter LDL-Rezeptor-Funktion, die bewirkt, daß die zelluläre Aufnahme von LDL-haltigen Lipoproteinen vermindert ist, wird weniger Cholesterin in die Zellen eingeschleust, das Schlüsselenzym der Neusynthese nicht supprimiert und intrazellulär vermehrt Cholesterin synthetisiert. Bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie kann deshalb die Serumcholesterinerhöhung auf eine Anhäufung von LDL durch verminderten Abbau und Steigerung der Neusynthese erklärt werden. Der Anteil von Plasma-LDL, der bei Patienten mit familiärer Hy-

percholesterinämie nicht via LDL-Rezeptor, sondern durch LDL-Rezeptor-unabhängige Wege aus dem Plasma entfernt wird, ist dabei umgekehrt proportional der Anzahl funktionierender LDL-Rezeptoren. Bei Homozygoten ohne nachweisbare LDL-Rezeptoren wird das gesamte LDL durch Rezeptor-unabhängige Wege aus dem Plasma entfernt. Bei Heterozygoten mit einem defekten LDL-Rezeptor-Gen und 50% normalen LDL-Rezeptoren wird etwa die Hälfte von LDL über LDL-Rezeptor-unabhängige Wege entfernt. Demgegenüber wird bei Gesunden nur 1/3 über andere Wege entfernt, weil der LDL-Rezeptor-unabhängige Abbau weniger effektiv ist als der Rezeptor-vermittelte. Bei homozygoten Patienten verweilt LDL durchschnittlich 6 Tage im Plasma, verglichen mit 2,5 Tagen bei Gesunden. Leider ist bislang nur wenig über den LDL-Rezeptor-unabhängigen Abbau von LDL bekannt. Ein Teil des LDL wird über Makrophagen und Histiocyten des retikuloendothelialen Systems vermittelt, die zusammengefaßt als „scavenger cells“ bezeichnet werden.

In kultivierten Fibroblasten von Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie ist zusätzlich zum LDL-Rezeptor-Defekt mit verminderter zellulärer Aufnahme von LDL-Cholesterin eine gesteigerte Cholesterinsynthese nachweisbar. In-vivo-Untersuchungen der Syntheserate von Cholesterin haben jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt: Patienten im Kleinkindesalter scheinen generell eine gesteigerte Cholesterinsyntheserate aufzuweisen, die 3- bis 4mal über der gesunder Individuen liegt. Bei Patienten >10 Jahren liegt die Syntheserate jedoch an der oberen Grenze der Norm. Nach der derzeitigen Lehrmeinung sind etwa 1 von 500 Personen der allgemeinen Bevölkerung heterozygoter Träger eines defekten LDL-Rezeptor-Gens, 1 von 1.000.000 homozygoter Träger 2er defekter LDL-Rezeptor-Gene.

3.1.4 Klinische Symptome

3.1.4.1 Lipide und Lipoproteine

Heterozygote Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie zeigen weltweit eine ähnliche durchschnittliche Erhöhung der Serumcholesterinwerte von 358 mg/dl. Ungeachtet der Gleichheit zwischen verschiedenen Populationen variieren die Cholesterinwerte heterozygoter Patienten sogar innerhalb derselben Familie um das 2fache, zwi-

schen 350 und 550 mg/dl. Homozygote Patienten zeigen generell höhere Cholesterinwerte, die sich zwischen 650 und 1.000 mg/dl bewegen. In 90% der Fälle von heterozygoter Familiärer Hypercholesterinämie sind ausschließlich die Cholesterinwerte erhöht und die Triglyzeride im Normbereich. Nur in 10% der Fälle kommt es zu einer leichten Erhöhung letzterer. Homozygote Patienten zeigen demgegenüber eine auffällige Erhöhung der Triglyzeride im Vergleich zu Gesunden, die aber nur selten 250 mg/dl überschreitet. Die Ursache dieser Erhöhung ist bislang unbekannt, könnte aber mit der LDL-Rezeptor-Funktion, Apo-E-haltige Lipoproteine aus dem Plasma zu entfernen, in Zusammenhang stehen.

Die Hypercholesterinämie sowohl bei heterozygoten als auch homozygoten Patienten kommt durch eine Erhöhung der Lipoproteinfraktion niedriger Dichte (LDL) zustande. Die mittlere LDL-Cholesterinkonzentration beträgt bei Heterozygoten das 2- bis 3fache der Norm, bei Homozygoten das 2- bis 3fache von Heterozygoten und das 6fache der Norm. Die Erhöhung der Cholesterinwerte kommt dabei durch die Vermehrung von LDL-Partikeln zustande, die in ihrer Zusammensetzung von Lipid- und Proteingehalt, Dichte und immunologischen Eigenschaften nicht verändert sind. Geringfügige Änderungen der chemischen Eigenschaften von LDL-Partikeln homozygoter Patienten resultieren vermutlich aus der längeren Verweildauer im Plasma, führen aber zu keiner Störung der Interaktion mit normalen LDL-Rezeptoren gesunder Individuen. Cholesterin in Lipoproteinen hoher Dichte (HDL-Cholesterin) ist bei Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie gering erniedrigt, verglichen mit Durchschnittswerten gesunder Individuen. Diese Beobachtung betrifft sowohl heterozygote als auch homozygote Patienten. Eine Erklärung hierfür ist derzeit nicht bekannt.

3.1.4.2 Arcus lipoides und Xanthelasmen

Bei der Hypercholesterinämie wird Cholesterin in die Hornhaut des Auges eingelagert und bildet dort einen sichtbaren Kornealring, der auch Arcus lipoides genannt wird. Bei Homozygoten tritt der Arcus lipoides gewöhnlich auf, bevor diese 10 Jahre alt sind. Bei Heterozygoten ist ein Arcus lipoides nur in 50% der Fälle zu finden. Cholesterinansammlungen kommen auch in Form kleiner, nasal im oberen und unteren Lidbereich gelegener, scharf begrenzter beetartiger erhabener Plaques

vor, die mit der Haut verschieblich sind und Xanthelasmen genannt werden. Xanthelasmen finden sich häufig bei Heterozygoten, aber nur selten bei Homozygoten. Sowohl der Arcus lipoides als auch Xanthelasmen kommen auch bei gesunden normocholesterinämischen Individuen vor. Der Arcus lipoides wird bei diesen Personen als Arcus senilis bezeichnet.

3.1.4.3 Xanthome

Cholesterinablagerungen in Haut und Sehnen heißen Xanthome. Die Menge an abgelagertem Cholesterin ist dabei proportional zum Ausmaß der Hypercholesterinämie, aber auch von unbekanntem Faktoren abhängig. Nach der anatomischen Lage lassen sich die Xanthome einteilen in Sehnenxanthome, subkutane tuberöse Xanthome, subperiostale Xanthome sowie plane Hautxanthome. Sehnenxanthome finden sich bei homozygoten und heterozygoten Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie und treten häufig entlang der Achilles-, Patellar- und Trizepssehnen sowie an den Strecksehnen und Sehnencheiden der Finger auf. Sie sind derbe, unregelmäßige und langsam wachsende Knoten, die mit den Sehnen verwoben und mit diesen verschieblich sind. Subkutane tuberöse Xanthome finden sich bevorzugt an den Streckseiten der Gelenke, besonders an den Ellenbogen und Fersen. Subperiostale Xanthome betreffen am häufigsten die Sehnenansätze der Tuberositas tibiae sowie das Olekranon. Leicht erhabene, flache, gelblich-orange gefärbte plane Xanthome sind häufig flächenhaft an den Extremitäten, am Gesäß und an den Händen speziell interdigital lokalisiert. Im Gegensatz zu Xanthelasmen und Arcus lipoides sind Xanthome spezifisch für die Familiäre Hypercholesterinämie. Die Häufigkeit von Xanthomen bei Heterozygoten zeigt eine deutliche Altersabhängigkeit. Bei 30jährigen Heterozygoten sind sie in 50%, bei deren Tod in 80% der Fälle vorhanden. Bei Homozygoten sind Xanthome von Kindheit an obligatorisch.

3.1.4.4 Vorzeitige Arteriosklerose

Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie leiden an vorzeitiger koronarer Herzerkrankung. Bei homozygoten Patienten tritt die Koronarsklerose als Angina pectoris, Herzinfarkt oder plötzlicher Herztod im Alter zwischen 5 und 30 Jahren in Erscheinung. In Einzelfällen ist ein akuter Myokard-

infarkt bereits im Alter von 18 Monaten, ein letaler Herzinfarkt im Alter von 3 Jahren aufgetreten. Nur wenige Homozygote überleben das 30. Lebensjahr. Cholesterin wird auch in der Aortenklappe eingelagert, was sich symptomatisch als Aortenstenose oder Aortenklappeninsuffizienz äußert. Eine schwere Arteriosklerose entwickelt sich aber auch in der thorakalen und abdominalen Aorta und in den größeren Pulmonalgefäßen. An der Mitralklappe werden solche Einlagerungen seltener beobachtet. Die Prävalenz der koronaren Herzerkrankung unter Homozygoten verhält sich umgekehrt proportional zur Anzahl der LDL-Rezeptoren in kultivierten Fibroblasten dieser Patienten. Es können 2 Gruppen gebildet werden: Patienten mit und ohne Rest-LDL-Rezeptor-Aktivität. Die koronare Herzerkrankung tritt bei Homozygoten mit einer LDL-Rezeptor-Aktivität von weniger als 2% der normalen Aktivität deutlich eher in Erscheinung als bei Homozygoten mit einer Restaktivität des LDL-Rezeptors von 2–30% der normalen Aktivität. Auch die LDL-Cholesterin-Konzentration im Serum ist bei den Patienten höher, deren kultivierte Fibroblasten keine LDL-Rezeptoren ausbilden. Bei Heterozygoten ist die Ausbildung der koronaren Herzerkrankung wesentlich variabler als bei Homozygoten. Frauen entwickeln Symptome später als Männer. Bei Heterozygoten beginnt die koronare Herzkrankheit bei Männern mit durchschnittlich 43 und bei Frauen mit 53 Jahren. Bei unter 30jährigen heterozygoten Männern beträgt das Infarkttrisiko 5%, bei unter 50jährigen 51% und bei unter 60jährigen 85%, bei Frauen 0, 12 und 58%.

Stone et al. [1974] ermittelten in den USA die kumulative Prävalenz der koronaren Herzerkrankung unter männlichen Heterozygoten auf 16% im Alter von 40 und 52% im Alter von 60 Jahren. Unter weiblichen Heterozygoten betrug die kumulative Prävalenz bis zum Alter von 60 Jahren 32,8% verglichen mit 9,1% unter gesunden Frauen. Heterozygote Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie leiden 25mal häufiger an koronarer Herzkrankheit als deren Verwandte ohne LDL-Rezeptor-Defekt. Interessanterweise findet sich der geschlechtsspezifische Unterschied im Manifestationsalter der koronaren Herzerkrankung nicht bei Homozygoten.

Zerebrovaskuläre Erkrankungen treten bei Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie im Gegensatz zur koronaren Herzerkrankung nicht häufiger auf als in der Normalbevölkerung. Mit Hilfe der Duplexsonographie lassen sich jedoch arteriosklerotische Veränderungen an den Karotiden nachweisen. Bei Heterozygoten sind dabei die Ausprägung und die Progredienz arteriosklerotischer

Veränderungen weniger ausgeprägt als bei Homozygoten. Die Arterielle Verschlusskrankheit peripherer Gefäße ist bei Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie häufiger als bei gesunden Kontrollpersonen, aber im Vergleich mit der koronaren Herzerkrankung nur von untergeordneter klinischer Bedeutung.

3.1.5 Genetik

Die Familiäre Hypercholesterinämie wird autosomal-dominant vererbt und zählt mit einer Häufigkeit von 1:500 in der allgemeinen Bevölkerung zu den häufigsten angeborenen Stoffwechselkrankheiten. Ihr Vorkommen ist in den meisten Ländern der Erde bereits gesichert [Frederickson et al. 1983]. Die Prävalenz der Erkrankung wurde zuerst durch Familienanalysen an Patienten mit koronarer Herzerkrankung nach Herzinfarkt bestimmt. Berechnungen nach der Hardy-Weinberg-Formel konnten diese Angaben über das Gengleichgewicht an Homozygoten bestätigen. Eine wesentlich höhere Prävalenz wurde bislang in 2 Populationen beobachtet. Im Libanon beträgt die Prävalenz für Heterozygote 1:171, für Homozygote 1:10.000 und wird auf einen Gründereffekt sowie einen hohen Anteil von Blutsverwandtschaft zurückgeführt [Davis et al. 1986]. Unter weißen Südafrikanern holländischen Ursprungs beträgt die Prävalenz für Heterozygote 1:100, für Homozygote 1:30.000 und wird ebenfalls auf einen Gründereffekt zurückgeführt [Leitersdorf et al. 1989].

Verwendet man die Hypercholesterinämie als genetischen Marker der Erkrankung, zeigt die familiäre Hypercholesterinämie eine fast vollständige Penetranz in allen Altersgruppen. Heterozygote Patienten mit 1 defekten und 1 normalen LDL-Rezeptor-Gen zeigen dementsprechend eine weniger ausgeprägte klinische Symptomatik als homozygote Patienten, bei denen beide Gene defekt sind und die mit einer Häufigkeit von 1:1.000.000 auftreten [Khachadurian 1964]. In einigen Populationen mit einem hohen Anteil an Blutsverwandtschaft sind homozygote Patienten deutlich häufiger. Diese Patienten sind in der Regel „echte“ homozygote Patienten, weil sich dasselbe defekte Gen von beiden Elternteilen auf die homozygoten Kinder weitervererbt. Da die Symptome der heterozygoten Form der Familiären Hypercholesterinämie in der Regel erst nach Beginn des reproduktionsfähigen Alters klinische Relevanz erhalten, beein-

trächtig ein defektes LDL-Rezeptor-Gen die Fortpflanzungsfähigkeit nicht. Im Gegensatz dazu vermehren sich homozygote Patienten nur selten. Der älteste derzeit bekannte homozygote Patient ist ein 56 Jahre alter Japaner.

3.1.6 Molekularbiologische Grundlagen

3.1.6.1 LDL-Rezeptor-Protein

Der humane LDL-Rezeptor ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 514.000 und besteht aus 839 Aminosäuren [Yamamoto et al. 1984]. Die Vorstufe des reifen LDL-Rezeptors besitzt eine Signalregion mit 21 meist hydrophoben Aminosäuren, die abgespalten werden, bevor das Molekül die Zelloberfläche erreicht. Nach Abspaltung der Signalregion lassen sich, beginnend am aminoterminalen Ende, 5 Regionen unterscheiden:

1. die Bindungsregion des Liganden,
2. eine der Vorstufe des epidermalen Wachstumsfaktors ähnliche Region,
3. eine an Kohlenhydratketten gebundene Region,
4. eine Membranbindungsregion und
5. eine kurze zytoplasmatische Region.

Eine Zusammenfassung des bekannten strukturellen Aufbaus des LDL-Rezeptors zeigt Abb. 3.1.2.

3.1.6.1.1 Bindungsregion des LDL-Rezeptor-Proteins

Die Bindungsregion vermittelt die Interaktion zwischen Rezeptor und Apolipoprotein-B- und -E-haltigen Lipoproteinen. Dieser Bereich ist im aminoterminalen Ende des Rezeptormoleküls lokalisiert und besteht aus 292 Aminosäuren, die ihrerseits aus 7 Gruppen von etwa 40 Aminosäuren aufgebaut sind. Der hohe Anteil der Aminosäure Cystein führt vermutlich zu einer besonders stabilen Faltung des Moleküls in diesem Bereich und zur Entstehung einer negativ geladenen Oberfläche. Die negativ geladenen Aminosäuren finden sich dabei jeweils am karboxyterminalen Ende der 6 Gruppen und vermitteln die Rezeptor-Liganden-Bindung mit positiv geladenen Bereichen im Apolipoprotein B und E.

3.1.6.1.2 Dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnliche Region des LDL-Rezeptors

Die dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnliche Region besteht aus 400 Aminosäuren. Die Se-

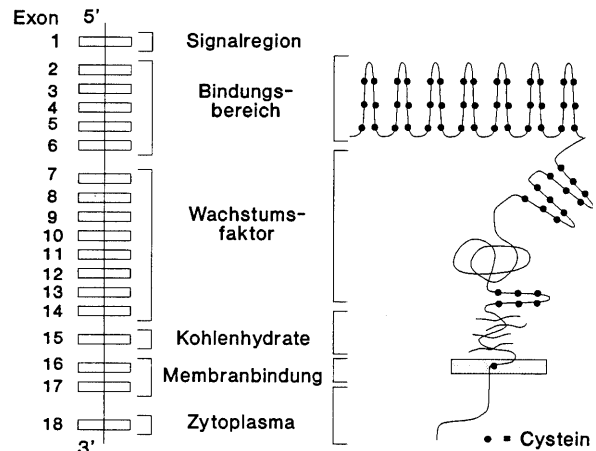


Abb. 3.1.2. Schematische Darstellung der Struktur des LDL-Rezeptor-Proteins mit 5 Domänen sowie Korrelation der Exon-Intron-Struktur des LDL-Rezeptorgens mit den Domänen des Proteins, nach Südhof et al. [1985 a,b]

quenzhomologie mit diesem Protein, das seinerseits ein Membranprotein darstellt, beträgt 35%. Dieser Bereich ist für die pH-abhängige Dissoziation des Liganden vom Rezeptor verantwortlich.

3.1.6.1.3 An Kohlenhydrate gebundene Region des LDL-Rezeptors

Die an Kohlenhydrate gebundene Region besteht aus 58 Aminosäuren, ist besonders reich an Serin und Threonin und ragt aus der Zelloberfläche heraus. Die Funktion der O-ständigen Kohlenhydratketten ist derzeit nicht bekannt. Dieser Bereich des Proteins kann auch fehlen, ohne daß die LDL-Rezeptor-Funktion wesentlich gestört wird. Möglicherweise dient dieser Bereich als Stiel für die Bindungsregion des Rezeptors, um mit den großen Lipoproteinpartikeln in sterische Beziehung zu kommen.

3.1.6.1.4 Membranregion des LDL-Rezeptors

Die Membranregion schließt sich karboxyterminal der an Kohlenhydrate gebundenen Region an und besteht aus 22 hydrophoben Aminosäuren, die das Rezeptormolekül in der Zellmembran verankern. Das Fehlen dieser Region verursacht ebenfalls keine wesentliche Funktionseinschränkung des Rezeptors, führt aber dazu, daß LDL-Rezeptor-Protein in das Kulturmedium sezerniert wird. Ein Teil der Rezeptoren verbleibt jedoch an der Zelloberfläche und kann LDL regelrecht binden.

3.1.6.1.5 Zytoplasmatische Region des LDL-Rezeptors

Die zytoplasmatische Region besteht aus 50 Aminosäuren und beinhaltet das karboxyterminale Ende des Rezeptors. Diese Region ist für die Ausbildung von Coated pits – eine der Oberfläche von Stachelbeeren ähnliche gruppierte Ansammlung von Rezeptoren – in der Zellmembran verantwortlich, bevor diese internalisiert werden.

3.1.6.2 LDL-Rezeptor-Gen

Das LDL-Rezeptor-Gen umspannt einen 45 kb langen Bereich der DNA und konnte mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung am distalen kurzen Arm des Chromosoms 19 zwischen der Bande 13.1 und 13.3 lokalisiert werden [Lindgren et al. 1985]. Das Gen besteht aus 18 Exons, die durch 17 Introns getrennt werden [Südhof et al. 1985 a]. In Abb. 3.1.2 ist der schematische Aufbau des LDL-Rezeptor-Gens dargestellt. Die Organisation der Exons des Gens korreliert mit der strukturellen Organisation des LDL-Rezeptor-Proteins [Südhof et al. 1985 b].

Exon 1 kodiert für die Signalsequenz, die nach der Translation entfernt wird. Exon 2 kodiert die erste der 7 sich wiederholenden cysteinreichen Gruppen der Bindungsregion, Exon 3 die Gruppe 2, Exon 4 die Gruppen 3–5, Exon 5 die Gruppe 6 und Exon 6 die Gruppe 7. Exons 7–14 kodieren für die dem Wachstumshormon ähnliche Region. Exon 15 kodiert für die O-ständige an Kohlenhydratketten gebundene Region. Exons 16 und 17 kodieren für 2 Regionen, die Membranbindungsregion und die zytoplasmatische Region. Exon 18 enthält die Information des karboxyterminalen Endes des Rezeptors, bestehend aus 12 Aminosäuren, sowie einen 2,5 kb langen Bereich der mRNA, der repetitive Sequenzen enthält und nicht in die Proteinstruktur übersetzt wird.

Der LDL-Rezeptor ist eine Mischung aus Sequenzen, die in mehreren Proteinen enthalten sind. Teile der dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnlichen Region finden sich ebenso in den Gerinnungsfaktoren IX und X sowie im Protein C. Der 40 Aminosäuren umfassende cysteinreiche Bereich ist auch im Komplement C9 nachweisbar. Alle diese Proteine teilen die Übereinstimmung von Exon-Protein-Bereich. Aus diesen Beobachtungen entstand die Vermutung, daß der LDL-Rezeptor Mitglied einer Genfamilie ist.

3.1.6.3 Struktur-Funktions-Beziehung

Die Beobachtung, daß die phänotypische Ausprägung der Familiären Hypercholesterinämie stark von einer Familie zur anderen variiert, weist auf die genetische Heterogenität dieser Erkrankung hin. Wie bei den meisten erblichen Stoffwechselanomalien können bei der Familiären Hypercholesterinämie ähnliche klinische Erscheinungsbilder von verschiedenen Mutationen an einem Genort herrühren. Durch Untersuchungen an Fibroblastenkulturen von Patienten mit homozygoter familiärer Hypercholesterinämie konnten Goldstein u. Brown [1984] verschiedene Mutationen des LDL-Rezeptors beschreiben und diese in 4 Mutationsklassen einteilen, welche die Synthese des Rezeptors, seinen Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat, seine Fähigkeit, LDL zu binden, und die Einschleusung von gebundenem LDL betreffen [Goldstein u. Brown 1984, Tolleshaug et al. 1983] (Abb. 3.1.3).

3.1.6.3.1 Synthesestörung

Bei der häufigsten dieser Mutationsklassen ist mit immunologischen Methoden kein LDL-Rezeptor-Protein nachweisbar. In diese Rezeptor-negativen Zellen wird kein LDL via LDL-Rezeptor aufgenommen, und der Cholesterinbedarf der Zellen wird durch intrazelluläre Cholesterinsynthese gedeckt. Diese Gruppe mit defekten LDL-Rezeptoren repräsentiert die häufigste Mutationsart.

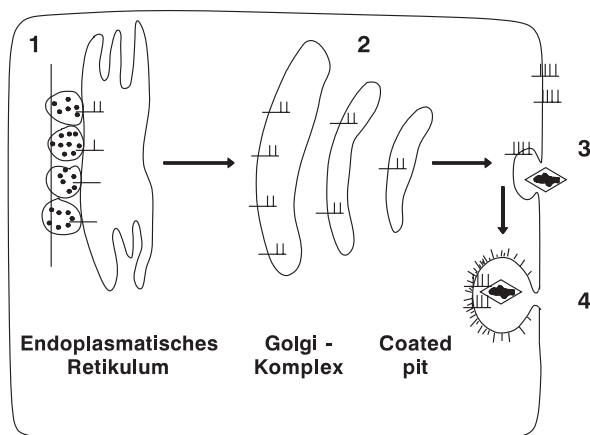


Abb. 3.1.3. Schematische Darstellung von 4 Mutationsklassen des LDL-Rezeptors. Mutationen betreffen 1 Synthese, 2 Transport, 3 LDL-Bindung und 4 Anordnung in Coated pits, nach Goldstein u. Brown [1984]

3.1.6.3.2 Transportstörung

Bei der 2. Klasse von Mutationen wird zwar ein Rezeptor im rauhen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, aber der Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat ist gestört. Daher erreichen diese Rezeptoren die Zelloberfläche nicht und können ihre Funktion nicht erfüllen. Im Funktionstest ist bei beiden Mutationsklassen – Synthese- und Transportstörung – keine Bindung von LDL an der Zelloberfläche nachweisbar. Die Unterscheidung ist demnach nur immunologisch möglich. Die beiden Klassen werden unter dem Begriff Nullallel zusammengefaßt.

3.1.6.3.3 Bindungsstörung

Die 3. Klasse von Mutationen ist ähnlich häufig wie die Nullallelklasse. In ihr ist die Anzahl der funktionsfähigen LDL-Rezeptoren pro Zelle um 75% oder mehr verringert. LDL-Rezeptor-Protein wird zwar synthetisiert und an die Zelloberfläche transportiert, die Bindungsfähigkeit für LDL ist jedoch gestört. Diese Klasse von Mutationen besteht aus einer besonders heterogenen Gruppe defekter LDL-Rezeptoren. Die Bindungsaktivität schwankt dabei zwischen 2 und 30% zwischen verschiedenen Allelen.

3.1.6.3.4 Internalisierungsstörung

Bei dieser Klasse von Mutationen kann LDL zwar normal an LDL-Rezeptoren gebunden werden, dieser Komplex aber nicht in die Zellen eingeschleust werden. Im Gegensatz zu normalen Zellen, bei denen sich die Rezeptoren in den Coated pits sammeln, sind die Rezeptoren wahllos über die Zelloberfläche verteilt. Die „Stachelsaumgrübchen“ sind zwar in normaler Anzahl vorhanden, da aber die Rezeptoren darin nicht gesammelt werden können, kann kein LDL eingeschleust werden. Vermutlich besitzt der LDL-Rezeptor neben der LDL-Bindungsstelle an der zytoplasmatischen Seite der Membran einen Einschleusungsbereich, durch den der Rezeptor als Teil des „Stachelsaumgrübchens“ erkannt wird. Eine Mutation in diesem Bereich verhindert, daß der LDL-Rezeptor mit den Proteinen der „Stachelsaumgrübchen“ in Verbindung treten kann. Da gebundenes LDL nicht internalisiert wird, hat diese Gruppe von Mutationen dieselben Auswirkungen auf die Regulation des Cholesterinstoffwechsels wie die Rezeptor-negative Klasse. Klinische Untersuchungen zeigen, daß homozygote Patienten mit Familiärer Hypercholeste-

rinämie und LDL-Rezeptoren mit verminderter Bindungsaktivität erst später koronare Herzerkrankung entwickeln und seltener tödliche Herzinfarkte erleiden als Homozygote mit LDL-Rezeptoren ohne nachweisbare Bindungsaktivität, wie Nullallel oder Einschleusungsdefekt.

3.1.6.3.5 Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Mutationstypen

Ein Vergleich von homozygoten Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie aus Amerika, Europa und Japan ergab unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen für die einzelnen Mutationsklassen [Frederickson et al. 1983]. Die Häufigkeit der Nullallele ist bei Amerikanern, Italienern, Japanern und Arabern annähernd gleich. Bei Franzosen, Frankokanadiern französischer Abstammung sowie bei Belgiern treten Allele der Nullallelklasse häufiger auf, bei Engländern Allele der Klasse mit verminderter Bindungsaktivität. Allele mit gestörter Einschleusung von gebundenem LDL wurden im Vergleich zu den anderen Mutationsklassen selten nachgewiesen.

3.1.7 Diagnostik

Die klinische Diagnose der Familiären Hypercholesterinämie bereitet in homozygoten Fällen kein Problem. Die klinischen Bilder von planen und Hautxanthomen, ausgeprägter Hypercholesterinämie mit Gesamtcholesterinwerten zwischen 650 und 1.000 mg/dl und Symptomen der koronaren Herzerkrankung im Kindesalter sind nahezu pathognomonisch. Differentialdiagnostisch abzugrenzen sind lediglich seltene Fälle von Pseudohomozygotie [Keller et al. 1981]. Diese Patienten fallen aber bei der Familienuntersuchung auf, weil nur ein Elternteil an Hypercholesterinämie erkrankt ist.

In der heterozygoten Form der Familiären Hypercholesterinämie führt die Erkrankung zu einer Erhöhung der Serumcholesterinwerte zwischen 285 und 450 mg/dl, die ausschließlich durch die Erhöhung der LDL-Fraktion der Lipoproteine verursacht wird und in der Einteilung nach Fredrickson et al. [1967] als Typ-IIa-Hyperlipoproteinämie bezeichnet wird. In 10% der Fälle sind zusätzlich die Triglyzeride erhöht, entsprechend einer Hyperlipoproteinämie Typ IIb. Die Bestimmung der Cholesterinwerte reicht nicht immer aus, um die

Diagnose der Hypercholesterinämie zu bestätigen oder auszuschließen, da sich sowohl Gesamtcholesterinwerte als auch LDL-Cholesterinwerte von Angehörigen mit und ohne LDL-Rezeptor-Defekt überlappen. Bei manchen Kindern mit LDL-Rezeptor-Defekt steigen die Cholesterinwerte erst nach der Pubertät an, so daß der Phänotyp der Erkrankung erst dann voll zur Ausprägung kommt. Systematische Nachuntersuchungen von Neugeborenen haben dies bestätigt.

Bei Patienten mit deutlich ausgebildeten Xanthomen kann die Diagnose der Hypercholesterinämie bei entsprechender Anamnese vermutet werden. Die Erhebung der Familienanamnese erweckt die Verdachtsdiagnose, wenn bei mehreren Verwandten 1. Grads eine Hypercholesterinämie bereits bekannt ist oder eine vorzeitige Arteriosklerose zu einer auffälligen Häufung von koronarer Herzerkrankung innerhalb der Familie führt. Gelegentlich berichten Patienten über das familiäre Auftreten von Xanthomen, ohne daß die Hypercholesterinämie bekannt ist.

Die Verdachtsdiagnose der Familiären Hypercholesterinämie, wie sie sich in vielen Fällen anhand körperlicher Untersuchungsbefunde oder durch ausgeprägte Hypercholesterinämie mit vorzeitiger Arteriosklerose sowie bei der Familienuntersuchung stellen läßt, muß durch weitere Untersuchungen bestätigt und von anderen Erkrankungen differentialdiagnostisch abgegrenzt werden. Die Hypercholesterinämie allein reicht zur Diagnostikstellung nicht aus. Außer dem LDL-Rezeptor-Defekt gibt es mindestens 2 weitere monogene Erkrankungen, die zur Hypercholesterinämie führen: die gemischte Familiäre Hyperlipidämie und der familiäre Apolipoprotein-B-100-Defekt. Die gemischte Familiäre Hyperlipidämie manifestiert sich innerhalb der Familie sowohl als reine Hypercholesterinämie, reine Hypertriglyzeridämie und gemischte Hyperlipidämie und kann deshalb durch die Familienuntersuchung abgegrenzt werden. Das klinische Erscheinungsbild des familiären Apolipoprotein-B-100-Defekts ist dem der Familiären Hypercholesterinämie mit LDL-Rezeptor-Defekt gleich [Schuster et al. 1990]. Bei normalen LDL-Rezeptoren entsteht die Hypercholesterinämie durch ein defektes Apolipoprotein B-100, dem Liganden von LDL am LDL-Rezeptor, so daß der normale Rezeptor seinen Liganden nicht mehr erkennen, binden und internalisieren kann [Innerrarity et al. 1987]. Bei der Mehrzahl der Patienten mit milder Hypercholesterinämie sind jedoch mehrere Faktoren an der Entstehung beteiligt, und die Ursache liegt in einem derzeit wenig erforsch-

ten Zusammenspiel verschiedener Gene und Umweltfaktoren. Diese Form der Hypercholesterinämie ohne monogenen Erbgang wird deshalb auch polygene Hypercholesterinämie genannt.

Anhand klinischer Zeichen kann die Verdachtsdiagnose der Familiären Hypercholesterinämie gestellt werden, wenn ein hypercholesterinämischer Patient Xanthome aufweist oder wenn in der Familie ein Elternteil hypercholesterinämisch ist und etwa die Hälfte der Nachkommenschaft 1. Grads an einer Hypercholesterinämie leidet, die mit Xanthomen einhergeht. Ohne Familienuntersuchung kann die Diagnose nur mit unzureichender Sicherheit gestellt werden. Eine Reihe von nicht genetischen Erkrankungen kann ebenfalls zur Hypercholesterinämie führen. Zu den wichtigsten Ursachen dieser sekundären Formen zählen Hypothyreose, nephrotisches Syndrom, Hepatom, Morbus Cushing-Syndrom, akute intermittierende Porphyrrie, Anorexia nervosa und Werner-Syndrom.

3.1.7.1 Molekulare Diagnostik

3.1.7.1.1 Funktionelle molekulare Diagnostik

Die definitive Diagnose der Familiären Hypercholesterinämie setzt den zellbiochemischen Nachweis der verminderten LDL-Rezeptor-Aktivität voraus. Hierzu werden an kultivierten Hautfibroblasten von Patienten die Bindung und intrazelluläre Aufnahme von ^{125}I -markiertem LDL oder der proteolytische Abbau von ^{125}I -markiertem LDL gemessen [Brown u. Goldstein 1976]. Eine indirekte Messung der LDL-Rezeptor-Aktivität kann auch über die LDL-vermittelte Hemmung der Cholesterinsynthese aus ^{14}C -markiertem Azetat oder der LDL-vermittelten Steigerung des Einbaus von ^{14}C -markiertem Oleat in Cholesterinester gemessen werden [Spengel et al. 1982]. An der Zelloberfläche kann die Zahl der LDL-Rezeptoren mit Hilfe von Antikörpern immunologisch nachgewiesen werden [Beisiegel et al. 1981].

Neuerdings ist die Messung der LDL-Rezeptor-Aktivität auch an kultivierten Lymphozyten und Makrophagen des Bluts durchführbar [Cuthbert et al. 1989]. Dabei nutzt man die Notwendigkeit proliferierender Zellen aus, entweder Cholesterin durch LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose aus dem Nährmedium aufzunehmen oder Cholesterin neu zu synthetisieren. Werden Lymphozyten aus der Blutbahn isoliert und in einem cholesterinarmen Nährmedium kultiviert und zugleich die Cholesterinsynthese mit einem HMG-CoA-Reduktase-

Inhibitor gehemmt, ist die Mitogen-stimulierte Proliferation der Zellen auf die Aufnahme von Cholesterin mittels LDL-Rezeptor angewiesen und von der LDL-Konzentration im Nährmedium abhängig. In der Regel ist mit Hilfe zellbiochemischer Methoden eine Unterscheidung von heterozygoten und homozygoten Patienten möglich. Gelegentlich treten aber auch hier diagnostische Probleme auf, wenn in seltenen Fällen diskrepante klinische und zellbiochemische Befunde vorliegen [Keller et al. 1981].

Seit der Identifizierung und Klonierung des LDL-Rezeptor-Gens [Südhoff et al. 1985a] ist es möglich, mit Hilfe rekombinierender DNA-Technologien die dem LDL-Rezeptor-Defekt zugrundeliegende Mutation im LDL-Rezeptor-Gen nachzuweisen [Hobbs et al. 1987, 1992, Humphries et al. 1985, 1989, Schuster et al. 1989]. Mit diesen Methoden kann in vielen Fällen das Vorliegen eines LDL-Rezeptor-Defekts bereits pränatal an fetalen Zellen oder bei der Geburt aus Nabelschnurblut nachgewiesen oder ausgeschlossen werden. Ein Träger eines LDL-Rezeptor-Defekts kann damit vor dem Auftreten klinischer Symptome erkannt und einer präventiven Therapie zugeführt werden.

3.1.7.1.2 Molekulargenetische Diagnostik

Die molekulargenetische Diagnostik der familiären Hypercholesterinämie ruht auf 3 Säulen:

- Nachweis größerer struktureller Änderungen wie Deletionen und Insertionen,
- Nachweis von Punktmutationen sowie in Fällen, in denen der genetische Defekt nicht bekannt ist, auf
- Kopplungsanalysen in Familienuntersuchungen.

3.1.7.1.2.1 Nachweis von Insertionen und Deletionen

Größere strukturelle Änderungen im Gen als Ursache des LDL-Rezeptor-Defekts können durch Southern-Blot direkt nachgewiesen werden [Horsthemke et al. 1987]. Dazu wird genomische DNA von Patienten mit Restriktionsenzymen verdaut, und die Fragmentlängen werden mit der Genkarte verglichen (Abb. 3.1.4). Die Auswahl der Enzyme wird dabei auf solche beschränkt, die keine bekannten variablen Enzymschnittstellen aufweisen. Insertionen und Deletionen fallen dann auf dem Autoradiogramm durch abnorme Bandenmuster im Vergleich zur Genkarte oder Normalpersonen auf. Abb. 3.1.5 zeigt in einer Familie mit familiärer Hypercholesterinämie bei Patient Nr. 4 in der Restriktionsanalyse mit BglII eine zusätzliche Bande. Bei der Familienuntersuchung ergab

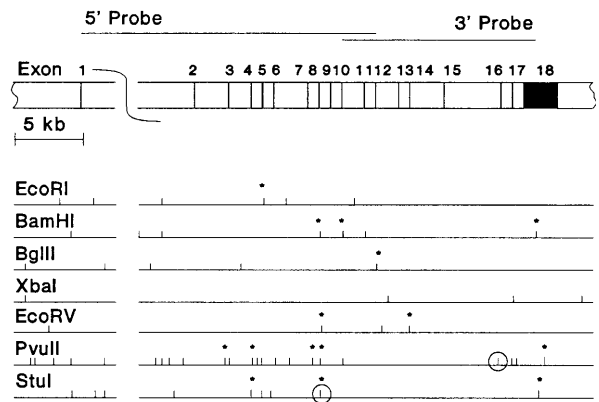


Abb. 3.1.4. Restriktionsenzymkarte des LDL-Rezeptor-Gens für Restriktionsenzyme, die zur Deletionsuche verwendet wurden. Die mit Stern (*) gekennzeichneten Restriktionschnittstellen sind in Exons lokalisiert, die Kreise bezeichnen variable Schnittstellen, nach Südhof et al. [1985 a]

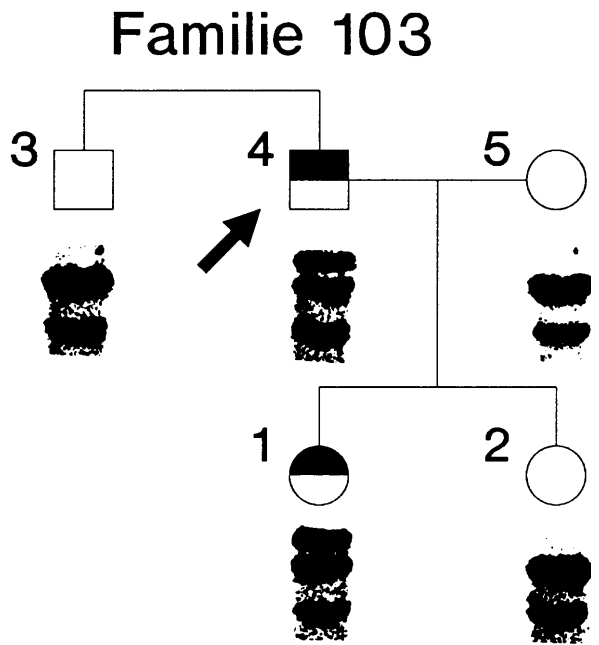


Abb. 3.1.5. Stammbaum einer Familie mit struktureller Änderung im LDL-Rezeptor-Gen als Ursache der familiären Hypercholesterinämie. Die Hypercholesterinämie ist an das abnorme Bandenmuster der BglII-Verdauung gekoppelt

sich, daß auch die ältere Tochter (Nr. 1), die ebenfalls an einer Hypercholesterinämie leidet, das gleiche, von der Norm abweichende Bandenmuster des Vaters aufweist, während die jüngere Tochter (Nr. 2) mit normalen Lipidwerten ein unauffälliges Bandenmuster zeigte. Für die gesunde Ehefrau (Nr. 5) sowie den gesunden Bruder (Nr. 3) des Patienten wurden ebenfalls normale Bandenmuster

gefunden. Anhand der Restriktionskarte kann vermutet werden, daß die zusätzliche, 17 kb große Bande durch Insertion eines 4 kb großen Fragments aus dem 13 kb großen Fragment entstanden ist. Erst durch die Untersuchung mit weiteren Enzymen, bei denen sich dann ebenfalls abnorme Bandenmuster finden müssen, ist die strukturelle Änderung des Gens bewiesen. Abweichende Bandenmuster für lediglich ein Enzym sind immer ein Hinweis auf den Verlust oder die Neuentstehung einer seltenen variablen Restriktionsschnittstelle. Mit Hilfe mehrerer Enzyme kann dann aber die genaue Lokalisation einer strukturellen Änderung festgelegt werden.

3.1.7.1.2.2 Indirekte Diagnostik anhand von Kosegregationsanalysen

Die Diagnostik der Familiären Hypercholesterinämie mit Hilfe von Kosegregationsanalysen beruht auf dem Prinzip, daß polymorphe genetische Marker an eine pathogenetisch bedeutsame Mutation gekoppelt sind und mit dieser gemeinsam weitervererbt werden. Die Irrtumswahrscheinlichkeit der Methode ist von der Wahrscheinlichkeit einer Rekombination zwischen Marker und Mutation abhängig. Die Häufigkeit von Rekombinationen ist dabei von der Entfernung zwischen Marker und Mutation sowie von weiteren, z. T. unbekanntem Faktoren abhängig. Werden in Familienuntersuchungen mehrere Polymorphismen kombiniert, vermindert sich das Fehlerrisiko aufgrund von Rekombinationen, weil zumindest ein Teil der möglichen Rekombinationen bei der Familienuntersuchung auffällig wird, wenn Erbgang und Eltern-

schaft nicht übereinstimmen. Im LDL-Rezeptor-Gen sind derzeit mindestens 15 verschiedene RFLP bekannt. Rekombinationen innerhalb eines Gens sind jedoch prinzipiell seltene Ereignisse und im LDL-Rezeptor-Gen bislang nicht beschrieben. Vier RFLP im LDL-Rezeptor-Gen, die Lage der variablen Schnittstellen, die Größe der Restriktionsfragmente im Autoradiogramm sowie die verwendete 3'-cDNA-Probe sind in Abb. 3.1.6 dargestellt.

Da der menschliche Chromosomensatz diploid angelegt ist, je ein Allel eines Gens ist väterlichen, eines mütterlichen Ursprungs, und für die 4 verschiedenen Enzyme je 2 Allele des LDL-Rezeptor-Gens unterschieden werden können, finden sich auf dem Autoradiogramm für jeden dieser Polymorphismen 3 verschiedene Bandenmuster. Zwei Allele mit variabler Restriktionsschnittstelle führen zu einem Bandenmuster aus konstanten Banden sowie einer großen Bande, 2 Allele ohne variable Restriktionsschnittstelle führen zu einem Bandenmuster aus konstanten Banden sowie einer kleinen Bande. Analog dazu führt die Kombination eines Allels mit und eines Alleles ohne variable Restriktionsschnittstelle zu einem Bandenmuster aus konstanten Banden sowie beiden variablen Banden. Abb. 3.1.7 erläutert anhand des StuI-Polymorphismus das Zustandekommen der verschiedenen Bandenmuster, die sich nach der Restriktionsanalyse der genomischen DNA und Southern-Blot mit der LDL-Rezeptor-Genprobe darstellen lassen. Individuen können für jeden dieser Polymorphismen wie folgt genotypisiert werden: Individuen mit 2 Allelen ohne variable Restriktionsschnittstelle und einer großen Bande im Autoradiogramm werden

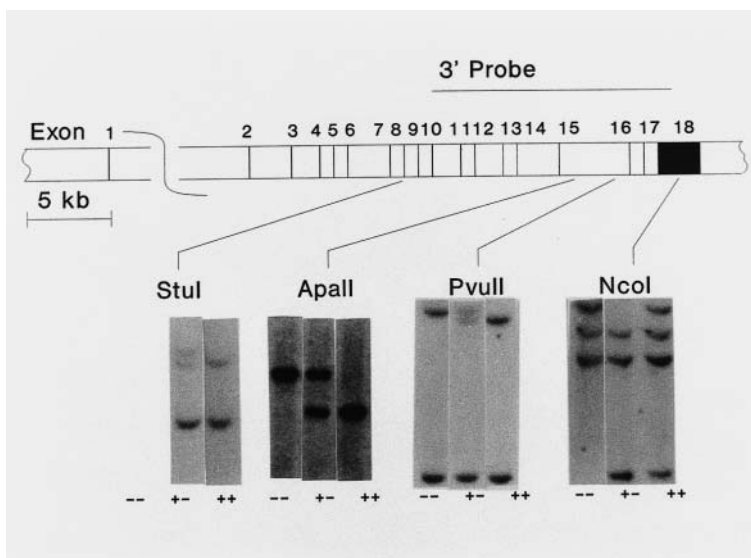


Abb. 3.1.6. Lage und Bandenmuster von 4 verwendeten RFLPs im LDL-Rezeptor-Gen. Das Pluszeichen (+) bezeichnet die Anwesenheit, das Minuszeichen (-) die Abwesenheit der variablen Restriktionsschnittstellen

als „--“, Personen mit 2 Allelen mit variabler Restriktionsschnittstelle und einer kleinen Bande im Autoradiogramm als „++“ und Individuen mit je einem Allele als „+-“ genotypisiert. Individuen mit 2 gleichen Allelen, mit oder ohne variable Restriktionsschnittstelle, werden ebenfalls als homozygot oder, wenn sie je eines der beiden Allele besitzen, als heterozygot bezüglich eines Polymorphismus bezeichnet.

Abb. 3.1.8 erläutert das Prinzip der Kopplungsanalyse in der Familienuntersuchung. Die Genotypen für den StuI-Polymorphismus sind bei allen Familienangehörigen, die untersucht werden konnten, angegeben. In der Elterngeneration wird die Kopplung des StuI-Polymorphismus an den Phänotyp der Hypercholesterinämie ermittelt. Ist in dieser Familie ein LDL-Rezeptor-Defekt Ursache der Hypercholesterinämie, muß dieser an ein „+“ genotypisiertes Allel gekoppelt sein, weil nur dieses Allel allen Geschwistern der Elterngeneration gemeinsam ist. Damit läßt sich in der Kindergeneration der Nachweis eines defekten LDL-Rezeptor-Gens erbringen. Die Mutter hat ihr defektes „+“ Allel an den älteren Sohn (Nr. 1) weitervererbt, der damit von der Familiären Hypercholesterinämie betroffen ist. An den jüngeren Sohn (Nr. 2) wurde das normale „-“ Allel weitervererbt, der damit von der Erkrankung nicht betroffen ist. Analog läßt sich bei der Kusine (Nr. 3) das normale „-“ Allel der Mutter (Nr. 7) nachweisen. Am Beispiel dieser Familie lassen sich die Bedingungen aufzeigen, die für die Anwendbarkeit von Kopplungsanalysen gegeben sein müssen: Es müssen genügend Familienangehörige zur Untersuchung zur Verfügung stehen, erkrankte Angehörige müssen für den genetischen Marker heterozygot, der gesunde Ehepartner homozygot sein. Nur unter diesen Voraussetzungen ist bei allen Kindern der Erbgang der Allele eindeutig festzulegen. In der angeführten Familie sind diese Voraussetzungen für 2 Geschwister der Elterngeneration (Nr. 5, 7) gegeben. Beim Bruder der Geschwister (Nr. 6) wäre eine Aussage bei dessen Kindern jedoch nicht möglich, weil das normale „+“ genotypisierte Allel vom defekten „+“ genotypisierten Allel nicht zu unterscheiden ist.

Durch die Kombination mehrerer solcher Marker läßt sich jedoch die Anzahl der heterozygoten Personen erhöhen und damit in weiteren Fällen eine Aussage treffen [Botstein et al. 1980]. Mehrere Polymorphismen können aber nicht nur unabhängig voneinander verwendet werden. Durch Kombination der Kopplungsanalysen können die Lage der einzelnen Marker jeweils den beiden Allelen

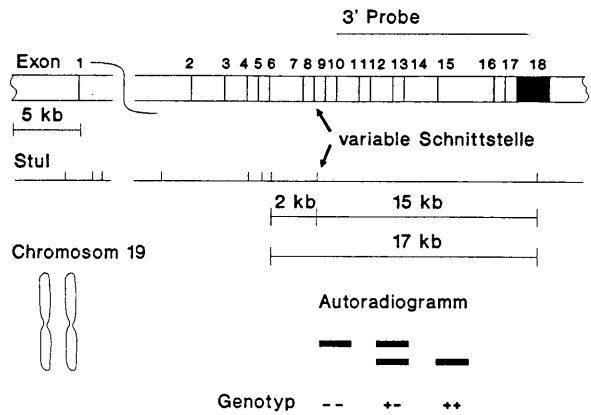


Abb. 3.1.7. Zusammenhang zwischen Fragmentgrößen variabler Restriktionsschnittstellen und Bandenmuster im Autoradiogramm, erläutert am Beispiel des StuI-RFLP. Die Diploidie des menschlichen Genoms führt zur Überlagerung 2er Restriktionsfragmente. Dadurch kommen 3 verschiedene Bandenmuster zustande

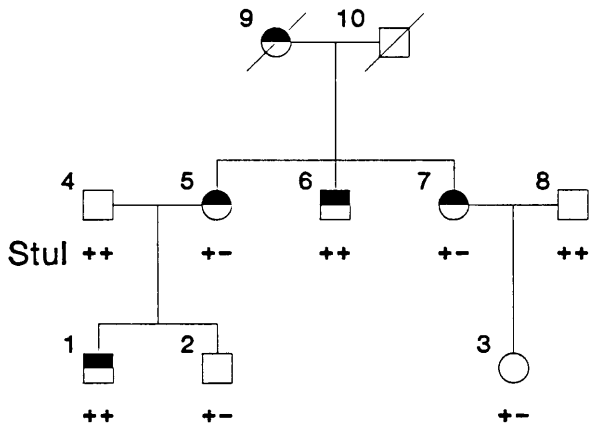


Abb. 3.1.8. Stammbaum einer Familie mit familiärer Hypercholesterinämie zur Erläuterung der Kopplungsanalyse. Die Hypercholesterinämie ist in dieser Familie an ein „+“ Allel gekoppelt. Alle Familienangehörigen, bei denen das „+“ Allel nachweisbar ist, leiden an der Hypercholesterinämie

zugeordnet und der sog. Haplotyp bestimmt werden. Ist eine Person für alle Polymorphismen homozygot, kann der Haplotyp ohne Kopplungsanalyse ermittelt werden, da eine Permutation einzelner Marker zwischen beiden Allelen immer zum selben Ergebnis führt. In der Beispielfamilie aus Abb. 3.1.9 trifft dies für die Person mit der Stammbaumnummer 4 zu: Die Lage der einzelnen Marker kann für beide Allele mit „+----“ festgelegt werden (gelesen von oben nach unten). Bei beiden Söhnen muß demnach ein „+----“ Allel nachweisbar sein. Daraus läßt sich der Haplotyp des jeweils anderen Allels mit „+--+“ beim älteren

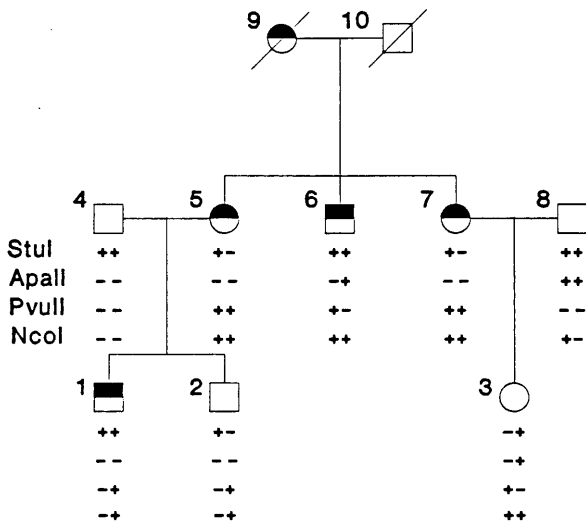


Abb. 3.1.9. Stammbaum einer Familie mit Familiärer Hypercholesterinämie zur Erläuterung der Haplotypisierung von Allelen. Links ist jeweils die Lage der PFLP des einen, rechts des andern Allels dargestellt. Der Haplotyp der Allele kann durch Segregationsanalyse konstruiert werden, indem man von Personen ausgeht, die für alle Polymorphismen homozygot sind

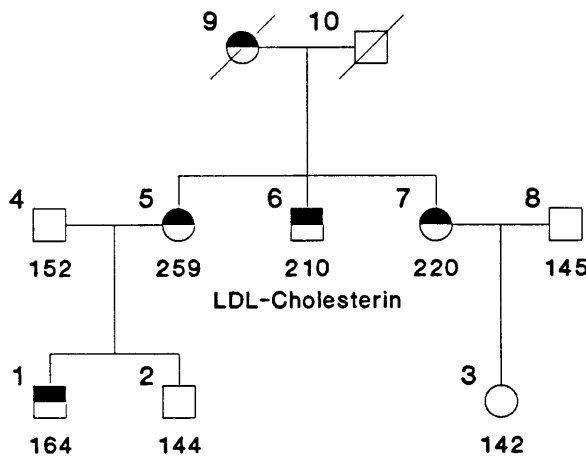


Abb. 3.1.10. Assoziation von Lipidwerten mit Genotypen des StuI-RFLP im Stammbaum einer Familie mit Familiärer Hypercholesterinämie. Die Diagnose läßt sich nicht immer eindeutig anhand der LDL-Cholesterin-Werte stellen, weil besonders bei jungen Individuen die Werte häufig grenzwertig sind

ren Sohn (Nr. 1) und „+--+“ beim jüngeren Sohn (Nr. 2) festlegen. Daraus kann wiederum geschlossen werden, daß die Mutter (Nr. 5) ein „+--+“ Allel an den älteren Sohn und ein „--++“ an den jüngeren Sohn vererbt haben muß. Das defekte Allel der Mutter besitzt damit den Haplotyp „+--+“.

Durch die Kombination von 4 Polymorphismen mit je 2 Ausprägungen (variable Schnittstelle nachweisbar +, nicht nachweisbar -) lassen sich $2^4=16$ Kombinationen erstellen. Die Kopplungsanalyse der Beispielfamilie mit 4 RFLP-Haplotypen (Abb. 3.1.10) des LDL-Rezeptor-Gens zeigt, daß nun auch bei Kindern der Person mit der Stammbaumnummer 6 sowie der Person mit der Stammbaumnummer 1 eine Aussage möglich wäre, weil beide Allele unterschieden werden können. Die Kopplungsanalyse in dieser Familie verdeutlicht auch den diagnostischen Wert der Methode: Während in der Eltern-generation die Cholesterinwerte eindeutig pathologisch erhöht sind und sich von den Werten der nicht betroffenen Familienangehörigen eindeutig unterscheiden, ist in der Kinder-generation der Unterschied zwischen betroffenen und gesunden Kindern wesentlich geringer ausgeprägt.

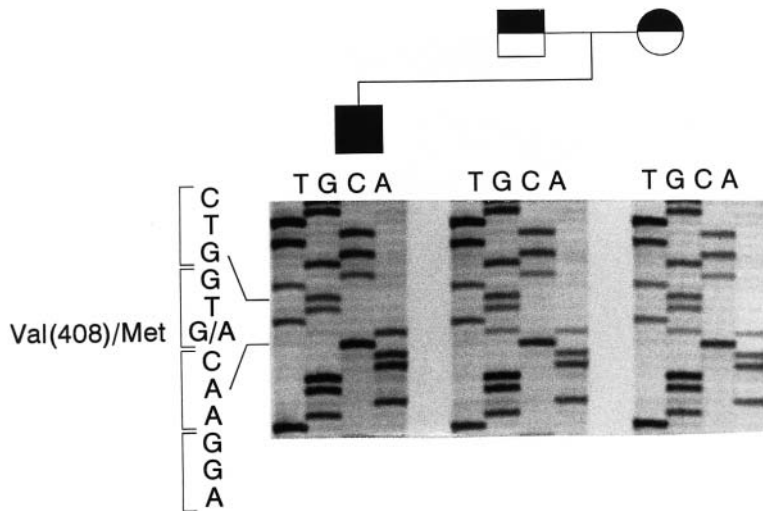
3.1.7.1.2.3 Nachweis von Punktmutationen

Neuerdings haben die Weiterentwicklung von DNA-Polymerasen zur Sequenzierung und die Anwendung modifizierter PCR-Reaktionen die direkte Sequenzanalyse genomischer DNA ermöglicht. Komplizierte Klonierungsverfahren sind damit nicht mehr Voraussetzung, weil hochgereinigte Einzelstrang-DNA, wie sie für die Sequenzierreaktion notwendig ist, mit Hilfe einer asymmetrischen PCR-Reaktion gewonnen werden kann. Damit ist die Sequenzierreaktion an die Grenze der klinischen Diagnostik gerückt [Schuster et al. 1991]. In Abb. 3.1.11 ist ein Ausschnitt eines Sequenziergels von Exon 9 des LDL-Rezeptor-Gens dargestellt. Die Sequenzanalyse hat in diesem Fall bewiesen, daß der Sohn der Familie an der homozygoten Form der Familiären Hypercholesterinämie leidet. Während bei beiden Eltern sowohl das Adenin des mutierten Allels als auch das Guanin des normalen Allels nachweisbar sind, ist beim Sohn nur Adenin für beide Allele gefunden worden.

Auch wenn die Sequenzanalyse wegen des methodischen Aufwands für die Routinediagnostik nicht eingesetzt werden kann, können damit durch die systematische Analyse ausgewählter Patienten in Kollektiven, in denen Punktmutationen bislang nicht bekannt sind, diese identifiziert und dann mit einfacheren diagnostischen Methoden, wie allelspezifischer Hybridisierung, allelspezifischer PCR oder Restriktionsanalyse, nachgewiesen werden.

Die Familiäre Hypercholesterinämie ist eine heterogene Erkrankung, die differentialdiagnostisch von anderen Erkrankungen, die zu identischen klinischen Erscheinungsbildern führen, abgegrenzt werden muß. Die nosologische Einheit stellen De-

Abb. 3.1.11. Ausschnitt eines Sequenziergels von Exon 9 des LDL-Rezeptor-Gens von 3 Angehörigen einer Familie mit Familiärer Hypercholesterinämie. Bei beiden Eltern ist an einer Position sowohl die Base Guanin des normalen Allels als auch die Base Adenin des mutierten Allels nachweisbar. Beim Sohn ist ausschließlich die Mutation des defekten Allels nachweisbar. Damit ist die echte Homozygotie des Patienten bewiesen



Defekte im LDL-Rezeptor dar. Bislang sind jedoch mindestens 150 verschiedene genetische Defekte bekannt, die darüber hinaus nur mit unterschiedlichen molekulargenetischen Methoden identifiziert werden können. Eine diagnostische Methode setzt jedoch für die klinische Anwendung methodische Einfachheit sowie hohe Sensitivität voraus. In den meisten Fällen kann die Diagnose durch Kopplungsanalysen gestellt werden. Dies setzt jedoch voraus, daß eine genügend große Anzahl von Familienangehörigen zur Untersuchung zur Verfügung steht. Kopplungsanalysen identifizieren jedoch nicht den genetischen Defekt an sich und sind deshalb mit einer, wenn auch sehr geringen Fehlerquote behaftet. Die definitive molekulargenetische Diagnose des LDL-Rezeptor-Defekts kann durch den Nachweis größerer struktureller Veränderungen im LDL-Rezeptor-Gen wie Deletionen und Insertionen oder durch den Nachweis von Punktmutationen gestellt werden. Im Gegensatz zu Kopplungsuntersuchungen mit DNA-Polymorphismen können diese direkt durch Restriktionsenzymanalysen oder allelspezifische Nachweisverfahren identifiziert werden, ohne daß auf Familienuntersuchungen zurückgegriffen werden muß. Darauf gründet sich die prinzipielle Eignung dieser Methoden für die klinische Diagnostik.

Größere strukturelle Änderungen im LDL-Rezeptor-Gen sind jedoch eher selten Ursache der familiären Hypercholesterinämie. In England treten sie mit einer Häufigkeit von ca. 6% [Humphries et al. 1989], in Italien mit 10% [Lelli et al. 1991], in Holland mit 17% [Top et al. 1990], in Finnland mit 50% [Aalto-Setälä et al. 1989] sowie bei Frankokanadiern mit 63% [Hobbs et al. 1987] auf. Im

eigenen Patientengut an deutschen Patienten wurden größere strukturelle Änderungen nur in 1% der Fälle gefunden. Häufigkeiten von Punktmutationen sind bislang nur an wenigen Kollektiven untersucht. Bei Südafrikanern holländischer Abstammung konnten 2 Punktmutationen in 95% der Fälle nachgewiesen werden [Leitersdorf et al. 1989]. Eine weitere Punktmutation scheint in England mehrfach aufzutreten [Soutar et al. 1989]. Von einigen Subpopulationen abgesehen, bei denen das gehäufte Auftreten einzelner Mutationen auf Gründer- und Einwanderereffekte zurückzuführen ist, sind direkte Verfahren der DNA-Diagnostik bislang nur in wenigen Fällen einsetzbar und damit für die routinemäßige Diagnostik, z. B. in einer Lipidambulanz, nicht geeignet.

In jüngster Zeit hat die Entwicklung neuer automatisierbarer und multiplexfähiger Methoden die Entwicklung von Gentests erleichtert. Mit dem Oligonukleotid-Ligations-Assay (OLA) [Barany 1981, Grossman et al. 1994] steht eine Methode zur Verfügung, die es prinzipiell erlaubt, in kurzer Zeit simultan nach bis zu 200 bekannten Punktmutationen zu suchen. Die Anwendung dieser Methode für die molekulargenetische Diagnostik der familiären Hypercholesterinämie [Baron et al. 1996] trägt der genetischen Heterogenität dieser Erkrankung, wie sie wahrscheinlich in den meisten Bevölkerungen zu finden ist, Rechnung.

Der Oligonukleotidligationsassay (Abb. 3.1.12) beruht auf einer allelspezifischen Hybridisierung mit anschließender Ligationsreaktion. Für jede zu untersuchende Mutation werden 2 kurze einzelsträngige DNA-Moleküle eingesetzt (im folgenden als Sonden bezeichnet), von denen sich eines an

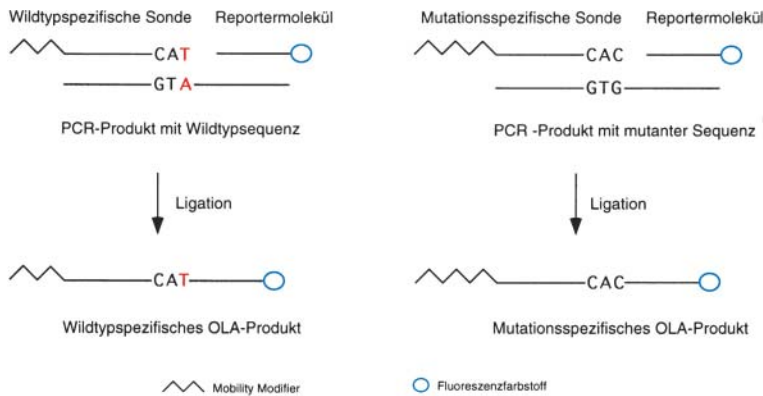


Abb. 3.1.12. Funktionsweise des Oligonukleotid-Ligation-Assays. Um das Vorhandensein einer bestimmten Mutation zu testen, werden 2 verschiedene DNA-Sonden benötigt, die sich an die Wildtypsequenz bzw. an die mutierte Sequenz anlagern. Bei spezifischer Anlagerung wird die jeweilige Sonde mit einem fluoreszenzmarkierten Reporter-molekül verknüpft und kann mit Hilfe eines Lasers detektiert werden

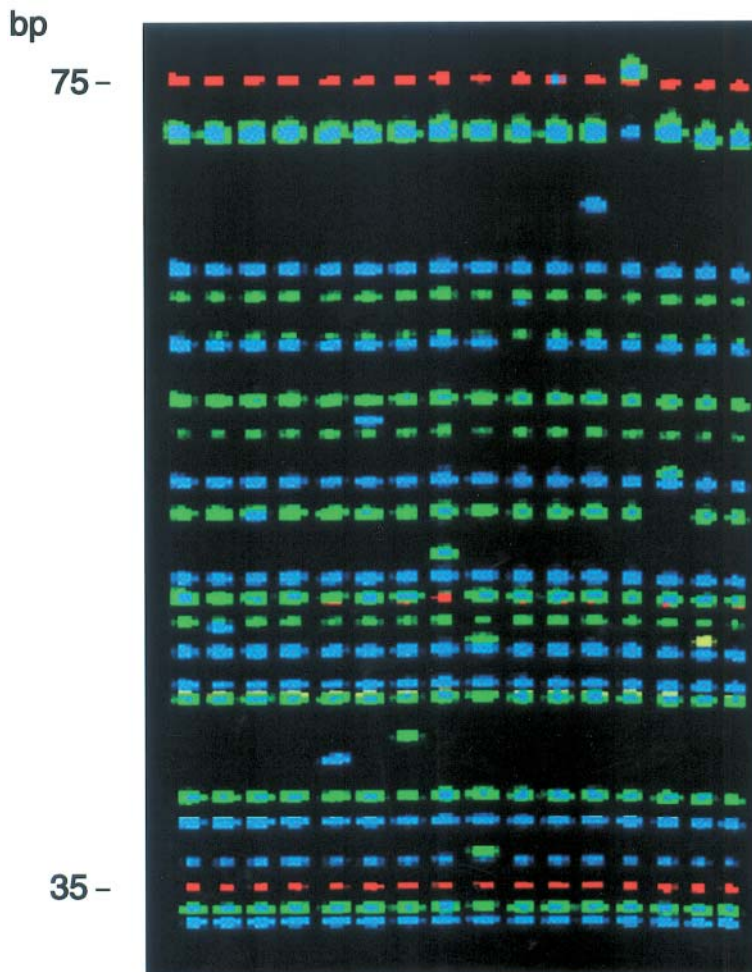


Abb. 3.1.13. Maximale Ausnutzung der Kapazität eines Polyacrylamidgels durch den kombinierten Einsatz von Mobility Modifiers und verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen. Extrabanden, die nur in einzelnen Gelspuren zu finden sind, zeigen an, daß bei den betreffenden Patienten Mutationen identifiziert wurden. Ein OLA-Test, mit dem man simultan nach 25 Mutationen suchen kann, benötigt nur den Auflösungsbereich zwischen 30 und 80 bp. Bei hochauflösenden Polyacrylamidgelen steht jedoch ein Auflösungsbereich bis zu 400 bp zur Verfügung, was bei entsprechender Ausnutzung theoretisch die gleichzeitige Untersuchung von 200 Mutationen ermöglicht

die Wildtypsequenz anlagern kann und das andere an die mutierte Sequenz. Ein 3. Oligonukleotid, das als Reporter-molekül fungiert, lagert sich direkt neben der variablen Position an. Eine DNA-Ligase, die der Reaktion ebenfalls zugesetzt wird, verknüpft die jeweilige Sonde mit dem Reporter-

molekül. Durch die hohe Spezifität der Ligase sind Kreuzreaktionen ausgeschlossen, und man erhält ausschließlich allelspezifische Ligationsprodukte. OLA-Reaktionen für eine Vielzahl verschiedener Mutationen können parallel in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden.

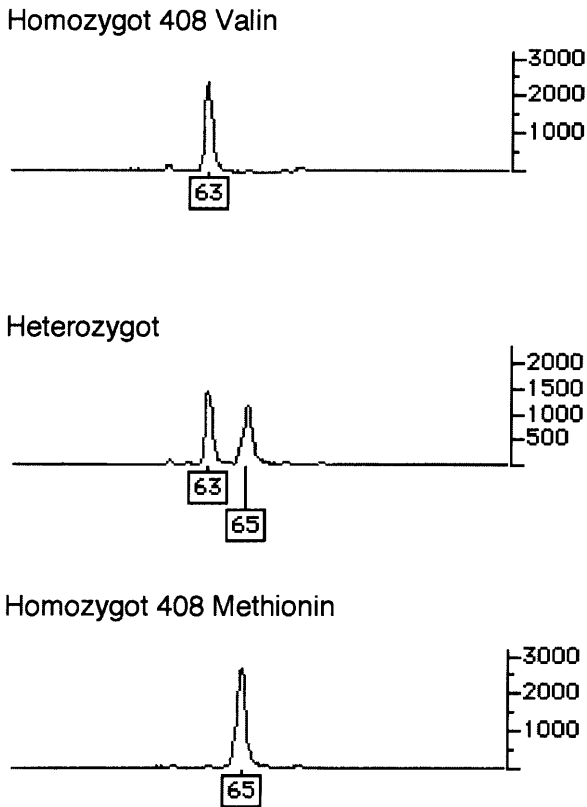


Abb. 3.1.14. Ausschnitt der ausgewerteten OLA-Elektrophoresedaten von 3 Patienten. Das mit einem blauen Farbstoff markierte Ligationsprodukt mit der Wanderungsgeschwindigkeit 65 bp zeigt an, daß bei den betreffenden Patienten die Mutation Val408:Met in Exon 9 des LDL-Rezeptor-Gens vorliegt. Das korrespondierende Ligationsprodukt, das das Vorliegen der Wildtypsequenz an dieser Position anzeigt, wandert mit der Geschwindigkeit 63 bp

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, die Ligationsprodukte zu detektieren und voneinander zu unterscheiden [Hansen et al. 1995, Kwok et al. 1992]. Die simultane Analyse von 200 verschiedenen Positionen im Gen und damit 400 Ligationsprodukten wird aber nur durch den kombinierten Einsatz von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen und sog. Mobility modifiers in einer Gelelektrophorese ermöglicht [Baron et al. 1996, Grossman et al. 1994]. Abb. 3.1.13 zeigt ein solches Elektrophoresegele. Bei den Mobility modifiers handelt es sich um organische Moleküle, welche an die allelspezifischen Sonden gekoppelt werden. Indem man verschiedene Sonden mit einer unterschiedlichen Anzahl von Mobility modifiers koppelt, erreicht man, daß jedes Ligationsprodukt auf dem Elektrophoresegele mit einer anderen Geschwindigkeit wandert und dadurch von den übrigen Ligationsprodukten unterschieden werden kann. Die De-

tektion erfolgt mit Hilfe eines Lasers über einen Fluoreszenzfarbstoff, der an das Reportermolekül gekoppelt ist. Der Einsatz von 3 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen verdreifacht die Anzahl der Produkte, die simultan analysiert werden können.

Abb. 3.1.14 zeigt einen Ausschnitt der ausgewerteten Elektrophoresedaten von 3 Patienten, bei denen mit einem OLA-Test nach verschiedenen Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen gesucht wurde. Der ausgewählte Ausschnitt zeigt die Ligationsprodukte, mit denen auf das Vorhandensein der Mutation Val408 zu Met in Exon 9 getestet wurde. Alle 3 möglichen Zustände – homozygotes und heterozygotes Auftreten der gesuchten Mutation sowie homozygotes Vorliegen der Wildtypsequenz an der untersuchten Position – werden eindeutig erfaßt.

Für die routinemäßige klinische Anwendung ist der OLA als Verfahren zur Diagnostik der familiären Hypercholesterinämie sehr geeignet, da er bei methodischer Einfachheit und gleichzeitig hoher Spezifität und Sensitivität eine große Zahl genetischer Defekte zu identifizieren vermag. Die Automatisierbarkeit dieser Methode ermöglicht eine schnelle Ausschlußdiagnose. Es ist vorstellbar, daß in Zukunft auch Defekte in anderen Genen, die an kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt sind, mit Hilfe des Oligonukleotidligationsassays diagnostiziert werden können.

3.1.7.2 Klinische Bedeutung der DNA-Diagnostik

Molekulargenetische Untersuchungen der familiären Hypercholesterinämie haben zu klinischen Konsequenzen geführt. Das pathogenetische und pathophysiologische Verständnis dieser Erkrankung hat zu einem neuen Therapieansatz geführt. Die Entwicklung und Einführung der Cholesterinsynthesehemmer, einer neuen cholesterinsenken Substanzgruppe, wäre ohne das molekulare Wissen nicht oder nur verzögert möglich gewesen. Cholesterinsynthesehemmer wirken durch ihre Strukturähnlichkeit mit dem Substrat kompetitiv auf das Schlüsselenzym der intrazellulären Cholesterinsynthese, der HMG-CoA-Reduktase (Abb. 3.1.1). Dadurch wird die Expression von normalen LDL-Rezeptoren stimuliert, was zu einer vermehrten zellulären Aufnahme von LDL und einer Senkung der Serumcholesterinkonzentration führt. Damit wird auch verständlich, warum Cholesterinsynthesehemmer bei homozygoten Patienten, die ausschließlich defekte LDL-Rezeptoren besitzen, keine Wirkung entfalten können.

Bisherige Untersuchungsergebnisse lassen auch vermuten, daß unterschiedliche klinische Verläufe der Familiären Hypercholesterinämie zumindest teilweise auf die genetische Heterogenität im LDL-Rezeptor-Gen zurückzuführen sind. Analog dazu zeigen verschiedene Defekte möglicherweise auch ein unterschiedliches Ansprechen auf differente Cholesterin-senkende Pharmaka mit unterschiedlichen Wirkmechanismen. Sind die häufigsten genetischen Defekte im LDL-Rezeptor-Gen molekular-genetisch charakterisiert, ist es möglich, durch die Anwendung einfacher genetischer Methoden, wie der enzymatischen Genamplifikation, die Diagnose der Familiären Hypercholesterinämie auch außerhalb spezialisierter Laboratorien ohne Familienuntersuchung an einfach zu gewinnendem Untersuchungsmaterial zu bestätigen. In einigen Populationen ist dies bereits erreicht.

3.1.8 Literatur

- Aalto-Setälä K, Helve E, Kovanen P, Kontula K (1989) Finnish type of low density lipoprotein receptor gene mutation (FH-Helsinki) deletes exons encoding the carboxy-terminal part of the receptor and creates an internalization-defective phenotype. *J Clin Invest* 84: 499–505
- Anitschkow N (1913) Über die Veränderungen der Kaninchen-aorta bei experimenteller Cholesterinsteatose. *Beitr Pathol Anat Allg Pathol* 56: 379–404
- Bacmeister, Henes (1913) Untersuchungen über den Cholesteringehalt des menschlichen Blutes bei verschiedenen inneren Erkrankungen. *Dtsch Med Wochenschr* 39: 544–546
- Barany F (1991) Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 189–193
- Baron H, Fung S, Aydin A, Bähring S, Luft FC, Schuster H (1996) Oligonucleotide ligation assay (OLA) for the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Nat Biotechnol* 14: 1.279–1.282
- Beisiegel U, Schneider WJ, Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS (1981) Monoclonal antibodies to the low density lipoprotein receptor as probes for study of receptor-mediated endocytosis and the genetics of familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 256: 11.923–11.931
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314–331
- Brown MS, Goldstein JL (1976) Analysis of mutation strain of human fibroblasts with a defect in the internalization of receptor-bound low density lipoprotein. *Cell* 9: 663–674
- Cuthbert JA, Russell DW, Lipsky PE (1989) Regulation of low density lipoprotein receptor gene expression in human lymphocytes. *J Biol Chem* 264: 1.298–1.304
- Davis CG, Lehrman MA, Russell LDW, Anderson RGW, Brown MS, Goldstein JL (1986) The J. D. mutation in familial hypercholesterolemia: substitution of cysteine for tyrosine in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptor. *Cell* 45: 15
- Frederickson DS, Levy RI, Lees RS (1967) Fat transport in lipoproteins – An integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med* 276: 32, 94, 148, 215, 273
- Frederickson DS, Goldstein JL, Brown MS (1983) The familial hyperlipoproteinaemias. In: Stanbury JB, Wynngarden JB, Frederickson DS (eds) *The metabolic basis of inherited disease*, 5th edn. McGraw-Hill, New York, pp 672–712
- Goldstein JL, Brown MS (1984) Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase. *J Lipid Res* 25: 1.450–1.461
- Goldstein JL, Hazzard WR, Schrott HC, Motulsky AG, Bierman EL (1973) Hyperlipidemia in coronary heart disease 2. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 52: 1.544–1.568
- Grossman PD, Bloch W, Brinson E, Chang CC, Eggerding FA, Fung S, Iovannisci DA, Woo S, Winn-Deen ES (1994) High-density multiplex detection of nucleic acid sequences: oligonucleotide ligation assay and sequence-coded separation. *Nucleic Acids Res* 22: 4.527–4.534
- Hansen TS, Petersen NE, Iitiä A, Hyltoft-Petersen P, Horder M (1995) Robust nonradioactive oligonucleotide ligation assay to detect a common point mutation in the cyp2d6 gene causing abnormal drug metabolism. *Clin Chem* 41: 413–418
- Hobbs HH, Brown MS, Russell DW, Davignon J, Goldstein JL (1987) Deletion in the gene for the LDL receptor in majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 317: 734–737
- Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL (1992) Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1: 445–466
- Horsthemke B, Dunning A, Humphries S (1987) Identification of deletions in the human LDL-receptor gene. *J Med Genet* 24: 144–147
- Humphries SE, Kessler AM, Horsthemke B et al. (1985) A common DNA polymorphism of the low-density lipoprotein (LDL) receptor gene and its use in diagnosis. *Lancet* 4: 1.003–1.005
- Humphries S, Taylor R, Jeenah M, Dunning A, Horsthemke B, Seed M, Schuster H, Wolfram G (1989) Gene probes in diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis [Suppl I]* 9: 59–65
- Innerarity T, Weisgraber K, Arnold K, Mahley R, Krauss R, Vega G, Grundy S (1987) Familial defective apolipoprotein b-100: low density lipoprotein with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6.919
- Keller C, Spengel E, Wiczorek A, Wolfram G, Zöllner N (1981) A family with divergence of clinical phenotype and biochemical genotype based on fibroblast studies. *Ann Nutr Metab* 25: 79–84
- Khachadurian AK (1964) The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *Am J Med* 37: 402
- Kwok PY, Gremaud MF, Nickerson DA, Hood L, Olson MV (1992) Automatable screening of yeast artificial-chromosome libraries based on the oligonucleotide ligation assay. *Genomics* 13: 935–941
- Leitersdorf E, Westhuysen DR van der, Coetzee GA, Hobbs HH (1989) Two common low density lipoprotein receptor gene mutations cause familial hypercholesterolemia in Afrikaners. *J Clin Invest* 84: 954–961

- Lelli N, Ghisellini M, Gualdi R, Tiozzo R, Calandra S, Gaddi A, Ciarrochi IA, Arca M, Fazio S, Coviello DA, Bertolini S (1991) Characterization of three mutations of the low density lipoprotein receptor gene in Italian patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 11(2): 234-243
- Lindgren V, Luskey KL, Russell LDW, Francke U (1985) Human genes involved in cholesterol metabolism: chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase with cDNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8.567-8.571
- Müller C (1939) Angina pectoris in hereditary xanthomatosis. *Arch Intern Med* 64: 675-700
- Rokitansky C von (1852) Über einige der wichtigsten Krankheiten der Arterien. *Denkschrift der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften Wien* 4: 1-72
- Schuster HM, Stiefenhofer B, Wolfram G, Keller C, Humphries S, Huber A, Zöllner N (1989) 4 DNA polymorphisms in the LDL-receptor gene and their use in diagnosis of FH. *Hum Genet* 82: 69-72
- Schuster H, Rauh G, Kormann B, Hepp T, Humphries S, Keller C, Wolfram G, Zöllner N (1990) Familial defective apolipoprotein B-100: comparison with familial hypercholesterolemia in 18 cases detected in Munich. *Atherosclerosis* 10(4): 577-581
- Schuster H, Richter S, Stratmann G, Keller C, Wolfram G, Zöllner N (1991) Identification of a silent point mutation in the LDL-receptor gene by direct DNA-sequencing. *Klin Wochschr* 69: 517-521
- Soutar A, Knight B, Patel D (1989) Identification of a point mutation in growth factor repeat C of the low density lipoprotein receptor gene in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia that affects ligand binding and intracellular movement of receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4.166-4.170
- Spengel F, Harders-Spengel K, Keller C, Wiecek A, Wolfram G, Zöllner N (1982) Use of fibroblast culture to diagnose and genotype FH. *Ann Nutr Metab* 26: 240-247
- Stone NJ, Levy RI, Frederickson DS, Verter J (1974) Coronary artery disease in 116 kindred with familial hyperlipoproteinemia. *Circulation* 49: 476
- Südhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW (1985 a) The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 228: 815-822
- Südhof TC, Russell DW, Goldstein JL, Brown MS, Sanchez-Pescar R, Bell GI (1985 b) Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EGF precursor. *Science* 228: 893
- Thannhauser SJ, Magendanz H (1938) The different clinical groups of xanthomatous diseases: a clinical physiological study of 22 cases. *Ann Intern Med* 11: 1.662
- Tolleshaug H, Hobgood KK, Brown MS, Goldstein JL (1983) The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia - multiple mutations disrupting transport and processing of a membrane receptor. *Cell* 32: 941-951
- Top B, Koeleman B, Leuven J, Havekes L, Frants R (1990) Rearrangement in the LDL receptor gene in Dutch familial hypercholesterolemic patients and the presence of a common 4 kb deletion. *Atherosclerosis* 83: 127-136
- Virchow R (1856) Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem. *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medizin*. Meidinger Sohn, Frankfurt, S 458
- Yamamoto T, Davies CG, Brown MS, Schneider WE, Casey ML, Goldstein JL, Russell DW (1984) The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple alu sequences in its mRNA. *Cell* 39: 27-38