

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen entstehen durch komplexe multifaktorielle Vorgänge, bei denen vor allem genetische Prädispositionsfaktoren im Zusammenspiel mit umweltbedingten Einflüssen kausal beteiligt sind. So werden pathophysiologische Interaktionen zwischen Zellen der Gefäßwand wie Endothelzellen und glatten Muskelzellen und Immunzellen wie Makrophagen, T-Zellen, Granulozyten und Thrombozyten durch Störungen der Thrombose/Hämostase, des Glukosestoffwechsels, sowie durch Bluthochdruck und Veränderungen im Lipidstoffwechsel verursacht. Eine Reihe von weltweit durchgeführten epidemiologischen Studien weist als Hauptrisikofaktoren für Herz-Kreislauferkrankungen Hyperlipidämien, hauptsächlich Hypercholesterinämie verbunden mit niedrigen HDL-Spiegeln und Hypertriglyzeridämie aus. In der genetischen Diagnostik steht deshalb die Analyse der Gene für Lipoproteine (ApoB, ApoE), Lipoprotein Rezeptoren (LDL-Rezeptor, VLDL-Rezeptor), plasmatische Enzyme (LPL), Transferproteine (CETP, PLTP) und intrazelluläre Lipidtransportproteine (ABCA1, NPC1) im Vordergrund und neu identifizierte genetische Varianten (Polymorphismen) finden zunehmend Eingang in die Risikoabschätzung bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit.

Schlüsselwörter

Atherosklerose, Lipidstoffwechsel, Apolipoproteine, Molekulargenetik, Polymorphismen

Summary

Cardiovascular disease results from complex multi-factorial processes involving genetic predisposition and environmental influences. Likewise, pathophysiological interactions between the vessel wall such as endothelial cells and smooth muscle cells and immune cells including macrophages, T-cells, granulocytes and platelets are caused by disturbances of thrombosis/ hemostasis and glucose metabolism as well as hypertension and defects in lipid metabolism. A series of world-wide epidemiological studies have identified hyperlipidemia, mainly hypercholesterolemia associated with low HDL-levels and hypertriglyceridemia as major risk factors for coronary artery disease. Thus, genetic diagnosis mainly focuses on the analysis of apolipoproteins (ApoB, ApoE), lipoprotein receptors (LDL-receptor, VLDL-receptor), enzymes (LPL), transfer proteins (CETP, PLTP) and intracellular lipid transport proteins (ABCA1, NPC1) and newly identified genetic variations (polymorphisms) therefore are interesting candidates for a sophisticated risk assessment in patients with coronary artery disease.

Key words

Atherosclerosis, lipid metabolism, molecular genetics, apolipoproteins, polymorphisms

LDL-Rezeptor

Die deutlichste Korrelation zwischen Störungen des Lipidstoffwechsels und der Entstehung bzw. Progression von kardiovaskulären Erkrankungen findet man bei monogenetischen Defekten in Lipoproteinrezeptoren und Apolipoproteinen, die zur Entwicklung von Hyperlipidämien mit einer Erhöhung atherogener Lipoproteine (LDL und VLDL-Remnants) oder einer Abnahme des protektiven HDL-Cholesterins führen. Der LDL-Rezeptor als klassischer Rezeptor für ApoB-haltige Lipoproteine ist seit langem als zentraler Regulator des plasmatischen Cholesterinspiegels bekannt (Brown, 1986). Das LDL-Rezeptorgen besteht aus 18 Exons und kausale Mutationen, die zu Familiärer Hypercholesterinämie (FH) führen, sind über das komplette Gen verteilt, so dass in der genetischen Diagnostik das komplette Gen z.B. durch DNA-Sequenzierung oder alternative Verfahren (dHPLC, SSCP) untersucht werden muss. Die Familiäre Hypercholesterinämie tritt nach der Eisenspeichererkrankung und der Familiären Thromboseneigung als häufigste genetische Erkrankung bei Kaukasiern auf. Die Frequenz heterozygoter Formen wird mit 1:500 angegeben, während homozygote FH-Patienten mit einer Häufigkeit von 1:1000000 weitaus seltener sind. Weltweit sind bisher über 420 relevante Mutationen gefunden worden (Stenson, 2003), die abhängig von funktionellen biochemischen Konsequenzen in fünf Klassen eingeteilt werden: Klasse I Mutationen verhindern die Proteinbiosynthese, so dass keine funktionellen LDL-Rezep-

toren auf der Zelloberfläche zu finden sind. *Klasse II Mutationen* (am häufigsten) betreffen vor allem den vesikulären Transport des Rezeptors vom Endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran. Partiiell funktionelle Rezeptoren mit Liganden-Bindungs-mutationen entstehen durch Defekte in der Formation von Coated Pits (*Klasse III Mutationen*) und *Klasse IV Mutationen* (am seltensten) führen zu einem inkorrektem Einbau in Plasmamembranvesikel. Defekte der *Klasse V* verursachen eine Störung der Dissoziation des LDL-Rezeptor-LDL-Komplexes und verhindert das Rezeptor-Recycling. Wesentlich seltener als diese kodominant vererbte Form der Hypercholesterinämie ist eine autosomal-rezessiv vererbte Phäno-kopie der Familiären Hypercholesterinämie. Hierbei führen Mutationen in dem Adaptorprotein ARH (autosomal recessive hypercholesterolemia) zu einer gestörten Internalisierung von LDL-Rezeptoren in der Leber, nicht aber in anderen Körperzellen wie Fibroblasten, und damit zu einem vermindertem Abbau von LDL-Partikeln (Cohen, 2003).

Aufgrund der Heterogenität der Mutationen und der erheblichen Kosten der molekularbiologischen Analytik des kompletten LDL-Rezeptorgens, sollte eine solche Untersuchung nur bei einem Gesamtcholesterin oberhalb der 95. Perzentile und beim Vorliegen von erhöhten LDL-Werten eines Verwandten ersten Grades bzw. von Geschwistern erfolgen.

Apolipoprotein B

Etwa 2–5% der Fälle der Familiären Hypercholesterinämie wird durch Mutationen im ApoB-Gen verursacht, dass 29 Exons umfasst. Diese als Familiäre Apolipoprotein B-Defizienz (Familial Defective Apo B, FDB) bezeichnete Störung geht mit einer geringergradigen Hypercholesterinämie einher, erhöht jedoch das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen um ein Vielfaches. Die Häufigkeit der heterozygoten Familiären Apolipoprotein B-Defizienz liegt zwischen 1:700 und 1:1000 und ist somit vergleichbar mit der Prävalenz der heterozygoten FH. Die beiden häufigsten Punktmutationen im ApoB-Gen führen zu Amino-

säureaustauschen und weisen eine Prävalenz von 1:500 (ApoB 3500 Arg/Gln bzw. Arg/Trp) und 1:3000 (ApoB 3531 Arg/Cys) auf. Aufgrund der Mutationen weist das ApoB-Protein eine verminderte LDL-Rezeptor-Affinität auf und verursacht eine Erhöhung des Gesamtcholesterinspiegels um etwa 40%. Etwa die Hälfte aller heterozygoten Träger von ApoB-3500 Mutationen entwickeln eine koronare Herzerkrankung. Homozygote Defekte treten allerdings nur sehr selten auf (Pullinger, 1995). Eine erst kürzlich beschriebene neue Mutation (ApoB 3543 His/Tyr) konnte in einem KHK-Kollektiv mit mehr als 850 Individuen identifiziert werden (Soufi, 2004). Dieser Defekt scheint mit einer Heterozygoten-Prävalenz von 1:200 die häufigste ApoB-Mutation in Deutschland zu sein.

Aufgrund der ähnlichen klinischen Symptomatik der FH und der FDB und wegen der sehr geringen Zahl von Mutationen im ApoB-Gen bietet sich zur differenzialdiagnostischen Abklärung der FDB die Bestimmung der Punktmutationen der Codons 3500, 3531 und 3542 durch homogene PCR-Verfahren z.B. mittels LightCycler® an (Aslanidis, 1999).

Apolipoprotein E

Das aus 299 Aminosäuren bestehende ApoE ist das Hauptapolipoprotein für die hepatische Aufnahme triglyzeridreicher VLDL-Remnant Partikel. Die drei Isoformen von ApoE (E2, E3, E4) werdend durch drei verschiedene Allele ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) kodiert und unterscheiden sich an den beiden Aminosäurepositionen 112 und 158. Die E2- und E3-Formen besitzen an diesen Stellen zwei bzw. einen Cysteinrest, während das E2-Protein an beiden Positionen Argininreste trägt. Während homozygote E2-Formen Disulfidbrücken ausbilden, was zu einer verminderten Rezeptoraffinität führt, wird das E4-Protein wesentlich schneller metabolisiert. Die Frequenz des Wildtyp-ApoE3-Allels beträgt 72%, die Frequenz für E4 17% und für E2 11%. ApoE spielt eine zentrale Rolle im reversen Cholesterintransport von Chylomikronen, VLDL-Remnant-Partikeln und HDL. Die ApoE2-Variante bindet nur sehr schlecht an

Lipoproteinrezeptoren und kann in sehr seltenen Fällen (1–4% aller E2-Homozygoten) zur Typ III Hyperlipoproteinämie führen, die mit einer Verminderung des LDL-Cholesterins bei gleichzeitigem Anstieg von VLDL-Remnants im Plasma, einer Akkumulation von b-VLDL und Chylomikronen in Makrophagen und damit der schaumzelligen Transformation einhergeht. Typ III Hyperlipoproteinämie kann neben dem Nachweis einer erhöhten b-VLDL-Fraktion im Serum durch ein Vorliegen eines homozygoten E2-Genotyps praktisch bestätigt werden. Das Vorliegen von ApoE2 in Individuen ohne Typ III Hyperlipoproteinämie scheint hingegen protektive Effekte bezüglich Atherosklerose und KHK aufzuweisen. Die ApoE4-Isoform ist signifikant mit einer um 24 mg/dl erhöhten Gesamtcholesterinkonzentration (LDL und apoB) assoziiert und E4-Allelträger entwickeln um 3–4 Jahre früher Anzeichen fortgeschrittener Atherosklerose. Etwa 8% der Myokardinfarkte lassen sich auf ApoE-Polymorphismen zurückführen. Weiterhin wurde ein Zusammenhang des ApoE4-Allels mit dem Auftreten der sporadischen späten Form der Alzheimer Erkrankung festgestellt und durch biochemische Versuche in neuronalen Zellen bestätigt (Corder, 1993). Das ApoE4-Allel findet man bei Patienten mit Alzheimer etwa viermal häufiger als bei gesunden Probanden. Vergleichende Studien in 100-Jährigen konnten ein gehäuftes Vorliegen der ApoE2/3-Genotypen nachweisen, so dass diese Genvarianten offensichtlich einen Überlebensvorteil darstellen (Schachter, 1994). Der molekularbiologische Nachweis der polymorphen ApoE-Allele kann spezifisch durch homogene PCR-Verfahren wie LightCycler® oder TaqMan® erfolgen und zur Risikoabschätzung von KHK-Patienten dienen, besonders bei Patienten mit familiärer Belastung. Ein Screening-Verfahren der ApoE-Genotypen von Individuen ohne gezielten Verdacht auf eine Dyslipoproteinämie ist jedoch besonders im Hinblick auf die Alzheimer Erkrankung als problematisch anzusehen.

Lipoproteinlipase und Apolipoprotein CII

Die LPL ist über Heparansulfate an die Oberfläche von Endothelzellen gebunden und vermittelt dort die Hydrolyse der in Chylomikronen transportierten Triglyzeride zusammen mit apoCII als stimulatorischem Kofaktor. Ein Defekt im LPL-Enzym oder apoCII-Protein führt zu Typ I-Hyperlipidämie bzw. Chylomikronämie, verbunden mit der Akkumulation von Schaumzellen in der Haut und der Ausbildung von Xanthomen. Die LPL- und die apoCII-Defizienz wird autosomal rezessiv vererbt und das homozygote Auftreten ist mit einer Häufigkeit von 1:100000 für LPL sehr selten, bzw. im Fall der apoCII-Defizienz bei insgesamt 12 identifizierten Familien extrem selten. Personen mit primärer LPL-Defizienz weisen interessanterweise kein erhöhtes Risiko für KHK auf. Allerdings scheinen heterozygote Mutationen und genetische Varianten im LPL-Gen, darunter ein mit einer Frequenz von 3% relativ häufiger Polymorphismus im Exon 6 (291 Asn/Ser) mit artherosklerotischer Prädisposition einherzugehen (Ordo vas, 2000). Bisher existiert keine gezielte Analytik für bestimmte Positionen aufgrund der Heterogenität von Defekten im LPL-Gen bzw. apoCII-Gen, die Mutationsdiagnostik im Screeningverfahren ist durch die Analyse aller 10 Exons des LPL-Gens bzw. der 4 apoCII-Exons jedoch relativ leicht möglich. Allerdings muss der Effekt von LPL-Polymorphismen in größeren prospektiven Studien noch weiter analysiert werden, bevor ein Screening bei KHK-Patienten indiziert ist.

CETP

Das Cholesterinester-Transferprotein vermittelt den Austausch von Cholesterinestern von HDL auf VLDL und LDL und regeneriert dabei die relativ cholesterinarmen HDL-Vorläuferpartikel. Eine erhöhte CETP-Aktivität führt jedoch auch zu einer Zunahme des Cholesteringehalts von LDL und zu einem ungünstigen LDL/HDL-Verhältnis, was mit einer Zunahme des kardiovaskulären Risikos assoziiert ist. Im Intron 1 des CETP-Gens befindet sich ein nicht-codierender Taq1B-Polymorphismus (B1/B2), der mit

HDL-Werten korreliert. In einer ausführlichen Metastudie wurde für B2/B2 homozygote Träger eine signifikante Erhöhung des HDL-Spiegels identifiziert und der Erfolg einer Statin-Therapie bei Patienten mit Hypercholesterinämie scheint ebenfalls vom CETP-Genotyp abhängig zu sein (Boekholdt, 2003). Bei Patienten mit angiographisch gesicherter KHK lag die Frequenz des B1-Allels bei 60%, die des B2-Allels bei 40% und der B1-Genotyp korreliert signifikant mit höheren CETP-Enzymaktivitäten und erniedrigten HDL-Werten. Die Ermittlung des CETP-B1/B2-Genotyps läßt sich über konventionelle PCR und anschließendem TaqI-Restriktionsverdau und durch sequenzspezifische homogene PCR-Verfahren wie Light-Cycler® schnell und kostengünstig durchführen. Diese Analyse könnte zukünftig einen gezielteren Einsatz von Statinen in der Sekundärprävention erlauben, da Träger des CETP-B1-Allels einer deutlich wirksameren Therapie mit Pravastatin zugänglich sind, als B2-Carrier.

ABCA1

Das 50 Exons umfassende ATP-binding-Cassette-(ABC)-Transporter-Gen ABCA1 ist ein Hauptmodulator des HDL-Pools im Plasma, indem durch dieses Enzym lipidarme apoAI-haltige Partikel mit Phospholipiden und Cholesterin aus peripheren Zellen und der Leber beladen werden (Schmitz, 2001). Mutationen im ABCA1-Gen führen zur Familiären HDL-Defizienz, auch als Tangier-Erkrankung bezeichnet und damit verbundene Störungen des reversen Cholesterintransports führen zur Bildung von Schaumzellen und Lipidablagerungen in Geweben wie der Leber, der Milz und der Retina. Neben der bisher beschriebenen sehr geringen Anzahl von kausalen Mutationen im ABCA1-Gen (ca. 60 weltweit) wurden eine Reihe von kodierenden SNPs identifiziert, die signifikant mit HDL-Cholesterinspiegeln und/oder atherosklerotischen Ereignissen assoziiert sind. So zählen zu den antiatherogenen ABCA1-Varianten Arg219Lys, Val711Met und Ile883Met, die mit hohen HDL-Werten und niedrigen Triglyzerid-Spiegeln korrelieren. Im Gegensatz dazu gehen die Varianten Glu1172Asp und Arg1587

Lys mit erniedrigten HDL-Werten einher. Fünf Promotor-Polymorphismen, darunter der Haplotyp -191C/-320C/-477T und die SNPs G-191C und A-1096G sind mit einer erhöhten Suszeptibilität für Atherosklerose assoziiert, ohne dass nennenswerte Veränderungen im Lipidprofil zu detektieren sind (Singaraja, 2003). Generell kann man jedoch sagen, dass diese Daten noch durch weitere größere Studien untermauert werden müssen, bevor ein gezieltes Screening der codierenden SNPs im ABCA1-Gen bei familiär gehäuftem Auftreten von atherosklerotischen Ereignissen sinnvoll ist. Beim Auftreten extrem niedriger HDL-Spiegel mit familiärer Häufung und dem Verdacht auf Familiäre HDL-Defizienz hingegen, kann eine Untersuchung aller 50 Exons des ABCA1-Gens mittels PCR-Amplifikation und anschließender dHPLC-Analyse bzw. Direktsequenzierung differentialdiagnostisch von Bedeutung sein.

Literatur

- Aslanidis C, Schmitz G (1999) High-speed apolipoprotein E genotyping and apolipoprotein B3500 mutation detection using real-time fluorescence PCR and melting curves. *Clin.Chem.* 45:1094-1097.
- Boekholdt SM, Thompson JF (2003) Natural genetic variation as a tool in understanding the role of CETP in lipid levels and disease. *J.Lipid Res.* 44:1080-1093.
- Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47.
- Cohen JC, Kimmel M, Polanski A, Hobbs HH (2003) Molecular mechanisms of autosomal recessive hypercholesterolemia. *Curr.Opin.Lipidol.* 14:121-127.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-923.
- Ordo vas JM (2000) Lipoprotein lipase genetic variation and gender-specific ischemic cerebrovascular disease risk. *Nutr.Rev.* 58:315-318.
- Pullinger CR, Hennessy LK, Chatterton JE, Liu W, Love JA, Mendel CM, Frost PH, Malloy MJ, Schumaker VN, Kane JP (1995) Familial ligand-defective apolipoprotein B. Identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. *J.Clin.Invest* 95:1225-1234.
- Schachter F, Faure-Delanef L, Guenet F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L, Cohen D (1994)

Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nat.Genet.* 6:29-32.

Schmitz G, Langmann T (2001) Structure, function and regulation of the ABC1 gene product. *Curr.Opin.Lipidol.* 12:129-140.

Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, Kastelein JJ, Hayden MR (2003) Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler.Thromb. Vasc.Biol.* 23:1322-1332.

Soufi M, Sattler AM, Maerz W, Starke A, Herzum M, Maisch B, Schaefer JR (2004) A new but frequent mutation of apoB-100-apoB His3543Tyr. *Atherosclerosis* 174:11-16.

Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN (2003) Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum.Mutat.* 21:577-581.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. Gerd Schmitz
PD Dr. rer. nat. Thomas Langmann
Institut für Klinische Chemie
und Laboratoriumsmedizin
Klinikum der Universität Regensburg
D-93042 Regensburg
Tel. +49 941 944 6201
Fax. + 49 941 944 6202
Gerd.Schmitz@klinik.uni-regensburg.de