

## Nachweis von Mutationen im Apolipoprotein B (ApoB)-Gen bei Hypercholesterolämie

### Biochemie

Das in den Leberparenchymzellen synthetisierte ApoB-100 (*Apolipoprotein B-100*) ist als wichtigstes Strukturprotein der VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*) essentiell für den Abtransport der Triglyzeride aus der Leber in das Blutplasma. Die als VLDL sezernierten Triglyzeride werden dann im Blutplasma durch die endothelständige Lipoproteinlipase lipolytisch abgebaut, was zu Bildung der IDL (*Intermediate Density Lipoproteins*) führt. Aus den IDL entstehen durch weitere Lipolyse über die Hepatische Lipase die LDL (*Low Density Lipoproteins*), die nur noch das ApoB-100 sowie den überwiegenden Teil des Cholesterols der VLDL-Muttermizelle enthalten. Die LDL sind die Hauptträger des Cholesterols und des ApoB-100 im menschlichen Blutplasma und einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose. Nach einer relativ langen Verweildauer im Blutplasma (2-5 Tage) wird der Großteil der LDL durch Bindung des ApoB-100 an den LDL-Rezeptor mit anschließender Internalisierung in der Leber katabolisiert.

### Pathobiochemie

Ein gestörter rezeptorvermittelter LDL-Abbau führt zu einer Erhöhung der LDL-Serumkonzentration und folglich zu einer Hypercholesterolämie (Hyperlipoproteinämie Typ IIa nach Fredrickson) mit Ausbildung von Xanthomen und frühzeitigen Koronarfarkten. Dies kann durch Mutationen sowohl im LDL-Rezeptor-Gen als auch im ApoB-Gen bedingt sein.

Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen, von denen mittlerweile mehr als 200 beschrieben wurden, sind die Ursache der **Familiären Hypercholesterolämie** (FH). Bei heterozygoten Merkmalsträgern (Prävalenz = 1:500) sind die LDL-Cholesterolkonzentrationen um das 2-3fache (200-500 mg/dl), bei Homozygoten (Prävalenz = 1:1.000.000) um das 5-6fache (bis mehr als 1.000 mg/dl) erhöht.

Mutationen im ApoB-Gen, die zu Strukturdefekten im Bereich der LDL-Rezeptorbindungsstelle des ApoB-100 führen, sind weit weniger vielfältig und werden unter dem Begriff **Familiär defektes Apolipoprotein B-100** (FDB) zusammengefasst. Die häufigste, autosomal-dominant vererbte Mutation ist eine Substitution (Transition) von G (Guanin) gegen A (Adenin) an der Position 10708 im Exon 26 des Apolipoprotein B-Gens (Chromosom 2p23-p24). Diese Punktmutation ist häufiger als alle LDL-Rezeptormutationen zusammen (Prävalenz für Heterozygote = 1:450) und wahrscheinlich eine der häufigsten Punktmutationen mit metabolischen Konsequenzen überhaupt. Sie führt im ApoB-100-Protein zum Austausch von Arginin (R) -> Glutamin (Q) an der Aminosäureposition 3500 (FDB<sub>R3500Q</sub>). LDL mit dem FDB<sub>R3500Q</sub> haben weniger als 10 % der Bindungsaffinität zum LDL-Rezeptor als LDL mit dem Wildtyp ApoB-100.

Weit weniger oft wird ein Austausch von Arginin (R) -> Cystein (C) an der Aminosäureposition 3531 (FDB<sub>R3531C</sub>; Prävalenz für Heterozygote = 1:3.000) gefunden. Die Aminosäuresubstitution resultiert aus einem Austausch (Transition) von C (Cytosin) gegen T (Thymin) an der Position 10800 im Exon 26 des Apolipoprotein B-Gens. Die FDB bedingte Hypercholesterolämie fällt moderater aus als die durch LDL-Rezeptordefekte hervorgerufene. Beim FDB kommt es aber zum verstärkten Auftreten der besonders atherogenen kleinen, dichten LDL. Statistischen Berechnungen zufolge haben wahrscheinlich 2-5% der als FH-heterozygot diagnostizierten Patienten normale LDL-Rezeptoren und sind tatsächlich Träger einer FDB-Mutation.

Klinisch und anhand der Lipid- und Lipoproteinanalyse kann ein LDL-Rezeptordefekt nicht von einem familiär defekten ApoB-100 unterschieden werden. Die Diagnosestellung ist nur mit Hilfe molekularbiologischer Methoden möglich. Die Therapie beider Hypercholesterolämie-Formen ist identisch und fordert im allgemeinen den Einsatz von Statinen (HMG-CoA-Reduktasehemmern). Bei extremen Hypercholesterolämien ist der Einsatz der LDL-Aphärese indiziert.

Nachweis des FDB<sub>R3500Q</sub> und des FDB<sub>R3531C</sub>

Nach der Isolation genomischer DNA aus einer Blutprobe wird mittels der PCR (*Polymerase-Kettenreaktion*) ein Fragment des Apolipoprotein B-Gens amplifiziert, das die zu unterscheidenden Basen enthält. Die anschließende Untersuchung auf das Vorliegen der Mutationen R3500Q bzw. R3531C sowie die Charakterisierung der Allelsituation erfolgt durch Behandlung der PCR-Produkte mit geeigneten Restriktionsenzymen und nachfolgender Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen-Analyse durch Gelelektrophorese. Die Kontrolle der vollständigen DNA-Restriktion ist durch eine zusätzlich eingeführte interne Schnittstelle im Amplifikat gewährleistet.

Der molekularbiologische Nachweis von LDL-Rezeptordefekten ist wenigen Spezialinstituten mit Schwerpunkt Lipidstoffwechsel vorbehalten.

### **Indikationen zum Nachweis des FDB<sub>R3500Q</sub> und FDB<sub>R3531C</sub>**

- ✍ Verdacht auf familiäre Hypercholesterolämie
- ✍ Hypercholesterolämien unklarer Genese
- ✍ familiäre Häufung von arteriellen Gefäßerkrankungen (Herzinfarkt, Schlaganfall)
- ✍ Untersuchung der Familienmitglieder von Patienten mit nachgewiesenem FDB

## Untersuchungsmaterial

4 ml EDTA-Blut

## Literatur

1. Hansen PS (1998): **Familial defective apolipoprotein -100.**  
*Dan Med Bull* 45, 370-382.
2. Ozturk IC, Killeen AA (1999): **An overview of genetic factors influencing plasma lipid levels and coronary artery disease risk.**  
*Arch Pathol Lab Med* 123, 1219-1222.
3. 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.
4. Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ (1989): **Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 587-591.

## Verfasser

Dr. med. habil. Dietmar Plonné  
Facharzt für Laboratoriumsmedizin

Dr. hum. biol. Reinhard Frodl  
Diplom-Biologe