

Apolipoprotein E (ApoE)-Genotypisierung bei Hyperlipoproteinämie und Morbus Alzheimer

Biochemie

Apolipoprotein E ist ein 34,2 kDa großes Glykoprotein (299 Aminosäuren) und integraler Bestandteil sämtlicher triglyzeridreicher Lipoproteine (Chylomikronen, Chylomikronen-Remnants, VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*), IDL (*Intermediate Density Lipoproteins*)) sowie der HDL (*High Density Lipoproteins*). Es wird hauptsächlich von Hepatozyten, aber auch von zahlreichen anderen Zelltypen wie Monozyten, Makrophagen, Astrozyten und Gliazellen des ZNS sowie Schwann-Scheidenzellen des peripheren Nervensystems synthetisiert. Als Ligand für die HSPG (*Heparan Sulfate Proteoglycans*) auf Zelloberflächen und für verschiedene Lipoproteinrezeptoren (LDL (*Low Density Lipoproteins*)-Rezeptor, LRP (*LDL-Receptor related Protein*)) ermöglicht das ApoE die Bindung, Internalisierung und den Abbau der Chylomikronen-Remnants sowie der IDL hauptsächlich durch die Leberparenchymzellen. Darüber hinaus trägt es durch Mobilisierung von freiem Cholesterin aus nichthepatischen Zellen (Makrophagen) zum HDL vermittelten Rücktransport des Cholesterins zur Leber bei und schützt die peripheren Zellen vor einer Überladung mit Cholesterin. Das ApoE spielt somit eine zentrale Rolle für die Regulation der Homöostase von Triglyzeriden und Cholesterin. Neben seiner ursprünglich als Lipidtransportprotein entdeckten Bedeutung für den Lipoproteinstoffwechsel und die Pathogenese der Atherosklerose wurden jüngst andere wichtige Funktionen des ApoE beschrieben, die im Zusammenhang mit der Modulation der zellulären Immunantwort, der Beeinflussung des Wachstums und der Differenzierung von Neuronen sowie der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung stehen.

Pathobiochemie

Das auf Chromosom 19 (19q13.2) lokalisierte ApoE-Gen kommt in drei allelen Formen (e2, e3, e4) vor. Aus diesem genetischen Polymorphismus ergeben sich drei homozygote (E2/E2, E3/E3, E4/E4) und drei heterozygote (E2/E3, E2/E4, E3/E4) Phänotypen, wobei durch posttranslationale Beladung des ApoE mit einer unterschiedlichen Zahl an Neuraminsäureresten eine zusätzliche Variabilität entsteht. In Westeuropa wird das e3-Allel bei 72%, das e4-Allel bei 17% und das e2-Allel bei 11% der Bevölkerung vorgefunden. Der dominierende Phänotyp ist deshalb ApoE3/E3 (60%), gefolgt von den Phänotypen ApoE3/E4 (23%), ApoE2/E3 (12%), ApoE2/E4 (2%), ApoE4/E4 (2%) und ApoE2/E2 (1%).

Das normal funktionierende ApoE3 (Cystein₁₁₂, Arginin₁₅₈) unterscheidet sich von den beiden anderen dysfunktionellen Formen ApoE2 (Cystein₁₁₂, Cystein₁₅₈) und ApoE4 (Arginin₁₁₂, Arginin₁₅₈) jeweils nur in einer Aminosäure, was jedoch erhebliche pathobiochemische Konsequenzen hat.

ApoE2 hat verglichen mit dem ApoE3 eine deutlich geringere Affinität zum LDL-Rezeptor. Die dadurch verringerte hepatische Cholesterolaufnahme über Chylomikronen-Remnants und IDL führt zur Hochregulation der hepatischen LDL-Rezeptoren. Zusätzlich ist eine verringerte lipolytische Umwandlung von VLDL/IDL in LDL zu beobachten. Diese Konstellation führt bei ApoE2/E2-Homozygoten zu einer normolipidämischen Dyslipoproteinämie mit niedrigen Serumcholesterolspiegeln (< 130 mg/dl), deutlich erniedrigtem LDL-Cholesterol, relativ hohem VLDL/IDL-Cholesterol und grenzwertig hohen Serumtriglyzerid-Konzentrationen. Unter diesen Umständen ist dem ApoE2 also eher ein kardioprotektiver Effekt zuzuschreiben. Kommen allerdings weitere Hyperlipämie verursachende Faktoren (Gene für andere Hyperlipoproteinämieformen, Diabetes mellitus, Schilddrüsenunterfunktion, Fehlernährung) hinzu, kann auf der Basis der ApoE2/E2-Homozygotie eine Hyperlipoproteinämie vom Typ III nach Fredrickson entstehen (bei 2-5% aller ApoE2/E2-Homozygoten), die durch eine massive Erhöhung des VLDL- und IDL-Cholesterols charakterisiert ist (elektrophoretisch als β -VLDL erkennbar = breite β -Bande = „broad-beta-disease“). Die cholesterolreichen β -VLDL sind extrem atherogen, was frühzeitig zu Koronarinfarkten und zur peripheren arteriellen Verschlusskrankheit führt. Als pathognomisch für diese Erkrankung gelten gelbliche Handlinienxanthome und Xanthome über den Strecksehnen der oberen und unteren Extremitäten. Da die Typ III Hyperlipoproteinämie diätetisch und medikamentös gut zu beherrschen ist, kommt ihrer rechtzeitigen und richtigen Diagnostik eine besondere Bedeutung zu. Zur kompletten Diagnostik einer Typ III Hyperlipoproteinämie ist die ApoE-Typisierung absolut indiziert. Das Vorhandensein von ApoE2/E2 im Zusammenhang mit dem klinischen Bild und den entsprechenden Lipoproteinwerten gilt als beweisend für diese Erkrankung.

ApoE4 hat im Vergleich zum ApoE3 eine ähnliche Affinität zum LDL-Rezeptor. Im Unterschied zu ApoE3, das stärker mit HDL als mit VLDL interagiert, ist ApoE4 vorzugsweise mit den triglyzeridreichen VLDL und weniger mit den HDL assoziiert. Diese Konstellation führt bei ApoE4/E4-Homozygoten zu teilweise massiven Hypertriglyzeridämien mit einer Verminderung des HDL-Cholesterols und einer Erhöhung des LDL-Cholesterols. ApoE4/E4-Homozygote haben demzufolge ein hohes kardiovaskuläres Risiko.

Darüber hinaus gibt es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der ApoE4-Isoform und dem Auftreten der nicht familiären „late-onset“ Alzheimer-Erkrankung. Gegenüber dem Durchschnitt der Bevölkerung haben ApoE4-Heterozygote ein 4fach und ApoE4/E4-Homozygote sogar ein 12fach höheres Risiko, an Morbus Alzheimer zu erkranken. Es wird geschätzt, dass ApoE4 an etwa 50% aller Alzheimerfälle beteiligt ist. Auch für den Zeitpunkt der Manifestation des Morbus Alzheimer scheint der ApoE-Phänotyp eine Bedeutung zu haben. Während bei ApoE4/E4-Homozygoten der Ausbruch bereits um das 60. Lebensjahr beobachtet wird, tritt er beim heterozygoten ApoE4/E3-Phänotyp erst zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr auf.

Allerdings erkranken nur etwa 50% der ApoE4/E4-Träger tatsächlich an Morbus Alzheimer, so dass neben der ApoE4-Isoform noch andere Faktoren eine Rolle spielen müssen. Die genaue Rolle, die ApoE4 in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung spielt, ist noch nicht bekannt. Diskutiert wird eine Beteiligung an der Amyloid-Plaques-Bildung, da die verschiedenen ApoE-Isoformen unterschiedliche Affinitäten zu Proteinen (β -Amyloid, Tau) haben, die an der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung beteiligt sind.

Obwohl gegenwärtig die ApoE-Typisierung als Screening-Methode nicht zu empfehlen ist, wird sie erfolgreich für die Differentialdiagnostik der Alzheimer-Erkrankung und der Altersdemenz eingesetzt.

Nachweis des ApoE-Genotyps

Von der aus einer Blutprobe isolierten genomischen DNA wird mittels der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) ein Fragment des ApoE-Gens amplifiziert, das die zu unterscheidenden Basen der drei Allele (e2/e3/e4) enthält. Nach Behandlung des amplifizierten Fragments mit geeigneten Restriktionsenzymen und anschließender elektrophoretischer Auftrennung entsteht für jedes Allel ein charakteristisches Bandenmuster, anhand dessen der ApoE-Genotyp identifiziert werden kann.

Alternativ ist auch eine Genotypisierung mittels PCR und nachfolgend reverser Hybridisierung möglich. Hierbei werden auf Nitrozellulosestreifen fixierte, sequenzspezifische Gensonden für alle drei Allele (e2/e3/e4) mit biotinmarkierten PCR-Amplifikaten der Patientenprobe hybridisiert. Nach intensiver Waschung bleiben nur die Hybride erhalten, deren Sequenz zu 100 % komplementär ist. Diese können anschließend über eine enzymatische Färbereaktion sichtbar gemacht werden. Das auf dem Streifen entstandene Bandenmuster ermöglicht die Identifizierung des ApoE-Genotyps.

Indikationen für eine ApoE-Typisierung

- ✍ diagnostische Absicherung der Hyperlipoproteinämie Typ III nach Fredrickson („broad beta disease“)
- ✍ erhöhte LDL-Cholesterolspiegel unklarer Genese
- ✍ Hypercholesterolämien mit familiärer Häufung
- ✍ Morbus Alzheimer
- ✍ Demenzen unklarer Ätiologie

Untersuchungsmaterial

4 ml EDTA-Blut

Literatur

1. 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.
2. Feussner G, Feussner V, Hoffmann MM, Lohrmann J, Wieland H, März W. (1998): **Molecular basis of type III hyperlipoproteinemia in Germany.**
HumMutat 11,417-423.
3. Lovestone S. (1999): **Early diagnosis and the clinical genetics of Alzheimer's disease.**
J Neurol 246, 69-72.
4. Mahley RW, Rall SC Jr. (2000): **Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein.**
Annu Rev Genomics Hum Genet 1, 507-537.

Verfasser

Dr. med. habil. Dietmar Plonné
Facharzt für Laboratoriumsmedizin

Dr. hum. biol. Reinhard Frodl
Diplom-Biologe