
Unterschrift des Betreuers



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN
Vienna University of Technology

DIPLOMARBEIT

„Epigenetische Untersuchung von Genen mit Relevanz für Familiäre Hypercholesterinämie“

Ausgeführt am Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische
Biowissenschaften

der Technischen Universität Wien

unter der Anleitung von

Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Kurt Herkner

durch

Anna Maria Mitterhauser Bakk.rer.nat.

Mumbgasse 7/8

1020 Wien

Datum

Unterschrift

Abstract:

Background: Familial Hypercholesterolemia (FH) is a severe congenital disorder of the fat metabolism. Mutations in genes involved in the clearance of LDL-cholesterol from the blood, mainly the LDL-Receptor gene, result in very high plasma levels of the lipoprotein. Although these mechanisms have long been understood, there still exists a diagnostic gap due to variations in LDL-levels between patients with the same mutation causing the disease. Epigenetic mechanisms, which are strongly influenced by environmental factors, might provide an explanation for this unsolved matter. **Aim:** The Aim of the work was the detection of variations in DNA-methylation in regulatory regions of the LDL-receptor gene and LDL-receptor adapter protein 1 in children with FH. Further it was asked if there exist differences in methylation profiles of children and adults in the analyzed regions. **Study design:** DNA-methylation levels of 7 children with FH were compared to a control group consisting of 5 children with morbid obesity and 2 healthy children. **Method:** DNA extracted from dried blood spots underwent Bisulfite treatment, which enables differentiation between methylated and unmethylated samples in High Resolution Melting Analysis by means of their melting point. **Results:** The study did not detect any variations in DNA-methylation in all of the analyzed samples and regions. **Conclusions:** The results do not link DNA-methylation to the diagnostic gap in phenotypes of familial hypercholesterolemia. Further analysis of genes involved in lipoprotein metabolism and other possible responsible epigenetic mechanisms is needed to answer the open questions.

Zusammenfassung:

Hintergrund: Familiäre Hypercholesterinämie (FH) ist eine erblich bedingte Störung des Fettstoffwechsels. Mutationen von Genen, welche für die Aufnahme des LDL-Cholesterins in die Zellen notwendig sind, vorrangig der LDL Rezeptor, führen schon während der Kindheit zu extrem hohen Cholesterinspiegeln. Obwohl die genetische Basis der Krankheit bekannt ist, gibt es Lücken in der Erklärung von Schwankungen des LDL-Cholesterinspiegels bei Patienten, die dieselbe Mutation als Grund für FH tragen. Epigenetische Mechanismen, die stark durch Umweltfaktoren geprägt sind, könnten eine Erklärung für diese Varianzen im Phänotyp liefern. **Ziel:** Ziel der Arbeit war die Suche nach Differenzen der DNA-Methylierung innerhalb regulatorischer Abschnitte der Gene des LDL Rezeptors und des LDL Rezeptor Adapter Protein 1 bei Kindern mit Familiärer Hypercholesterinämie. Eine weitere Frage war, ob in diesen Regionen Unterschiede im Methylierungsstatus von Erwachsenen und Kindern vorkommen. **Studiendesign:** Die Studie vergleicht den DNA-Methylierungsstatus von 7 Kindern mit Familiärer Hypercholesterinämie mit einer Kontrollgruppe bestehend aus 5 Kindern mit morbidem Adipositas und 2 gesunden Kindern sowie mit wissenschaftlicher Literatur. **Methodik:** Die aus Trockenblutkarten extrahierte DNA wurde einer Bisulfitbehandlung unterzogen, wodurch unterschiedlich methylierte und unmethylierte Proben anhand ihres Schmelzpunktes durch High Resolution Melting Analysis differenziert werden konnten. **Ergebnisse:** Die Untersuchung konnte keine Varianzen im Methylierungsstatus aller analysierten Proben und Regionen feststellen. **Fazit:** Die Ergebnisse der Untersuchung können keine Erklärung für die diagnostische Lücke bei Familiärer Hypercholesterinämie liefern, sondern weisen eher auf eine hohe Bandbreite an Gründen für unspezifische FH hin.

Danksagung:

Die Erarbeitung jeder Diplomarbeit beinhaltet ihre Höhen und Tiefen. In menschlicher Hinsicht habe ich nur Höhen erlebt.

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Prof. Kurt Herkner, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an einem so spannenden und interessanten Thema zu arbeiten. Durch die blitzschnelle Beantwortung aller meiner E-Mails kam mir die ausgezeichnetste Betreuung zu Gute, nicht einmal sein Wohnsitz auf einem anderen Kontinent hat daran etwas geändert.

Weiters möchte ich mich bei Frau Prof. Susanne Greber-Platzer für die Unterstützung und Finanzierung meiner Arbeit bedanken.

Vielen Dank an Dr. Kristina Tendl für die freundliche Hilfe und die viele Zeit, die sie sich für mich genommen hat.

Herzlichen Dank an Alexander Dangl, sowohl für die technische Unterstützung als auch dafür, dass ich mich durch die freundliche Atmosphäre jeden Tag darauf gefreut habe, ins Labor zu kommen.

Danke auch an Stefan Schulz für die technische Einschulung und für die Insider Tipps bei der Durchführung.

Zum Schluss noch vielen Dank an meine Eltern, sowohl für die finanzielle als auch liebevolle Unterstützung während meiner gesamten Studienzzeit.

Danke an meinen Bruder Matthias für das pedantische Durchlesen meiner Arbeit und an meinen Bruder/Mitbewohner Jakob für die Duldung meines in stressigen Zeiten leider öfters auftretenden Chaos.

Danke an alle meine Freunde, die meine Jammerei so tapfer ertragen haben!

Eine besondere Liebeserklärung geht hiermit an Claudia, Daniela, Isa, Lisi, Maggy, Nici, Onna, Sebastian und Sophia.

Inhaltsverzeichnis:

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:	1
1. EINLEITUNG:	3
2. THEORIE:	4
2.1. EPIGENETIK:	4
<i>Bedeutung der Epigenetik:</i>	5
<i>DNA Methylierung:</i>	6
<i>CpG Inseln:</i>	7
<i>Regulatorische Effekte der DNA-Methylierung:</i>	8
2.2. FAMILIÄRE HYPERCHOLESTERINÄMIE:.....	9
<i>Krankheitsbild:</i>	9
<i>Ursachen für Familiäre Hypercholesterinämie:</i>	11
2.3. FETTSTOFFWECHSEL:.....	12
<i>Low-Density-Lipoprotein:</i>	12
<i>Lipoprotein Metabolsimus:</i>	13
2.4. KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN:.....	14
<i>Risikofaktoren:</i>	14
<i>Ausbildung von Arteriosklerose:</i>	15
2.5. LDL REZPTOR:.....	16
<i>Aufnahme des LDL-Cholesterins in die Zelle:</i>	16
<i>Aufbau des LDL Rezeptors:</i>	17
2.6. REGULATION DES LDL REZEPTORS:	19
<i>SREBPs:</i>	19
<i>Der Einfluss bestimmter Schilddrüsenhormone:</i>	20
<i>IDOL:</i>	20
2.7. LDL REZEPTOR ADAPTER PROTEIN 1:	20
<i>Aufbau des LDLRAP1:</i>	21
2.8. ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN EPIGENETIK UND DEM AUFTRETEN VON KARDIOVASKULÄREN ERKRANKUNGEN:.....	22
<i>Epigenetik und kardiovaskuläre Erkrankungen:</i>	22
<i>Epigenetik und Blut Lipid Parameter:</i>	23
<i>DNA-Methylierung des LDL Rezeptors:</i>	25
3. DURCHFÜHRUNG:	26
3.1. STUDIENDESIGN:	26
3.2. PATIENTINNENKOLLEKTIV:.....	26
3.3. GENETIK:	27
3.4. UNTERSUCHTE STELLEN:.....	29
<i>Am LDL Rezeptor:</i>	29
<i>Locus LDLR P1 R1:</i>	31
<i>Locus LDLR P1 L1:</i>	31
<i>Locus LDLR P2:</i>	32

<i>Locus LDLR P3:</i>	33
<i>Am LDL Rezeptor Adapter Protein 1:</i>	33
<i>Locus LDLRAP1:</i>	34
3.5. METHODIK:	35
<i>DNA Extraktion:</i>	35
<i>Bisulfitbehandlung:</i>	35
<i>Touchdown PCR und High Resolution Melting Analysis:</i>	36
<i>Methylation Independent Primer (MIP):</i>	38
<i>Methylation Specific Primer (MSP):</i>	38
<i>Agarose-Gelelektrophorese:</i>	38
<i>Sequenzierung:</i>	39
4. ERGEBNISSE:	39
4.1. Locus LDLR P1 R1:.....	39
4.2. Locus LDLR P1 L1:	41
4.3. Locus LDLR P2:.....	42
4.4. Locus LDLR P3:.....	44
4.5. Locus LDLRAP1:	45
5. DISKUSSION:	49
6. LITERATURVERZEICHNIS:	53
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS:	68
8. TABELLENVERZEICHNIS:	69
9. ANHANG:	70
9.1. SEQUENZIERUNGEN:.....	70
9.2. LISTE DER VERWENDETEN KITS UND CHEMIKALIEN:	75

Abkürzungsverzeichnis:

°C	Grad Celsius
ABCA1	ATP-binding membrane cassette transporter A1
Apo	Apolipoprotein
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
CETP	Cholesterylester Transfer Protein
Dab2	Disabled Homolog 2 Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA Methyltransferase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Faktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et altera
FH	Familiäre Hypercholesterinämie
G	Guanin
Glu	Glutamin
H ₂ O	Wasser
HDL	High Density Lipoprotein
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HRM	High Resolution Melting Analysis
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IDOL	Inducibel Degradierender der LDLR
IGF2	Insulin-like Growth Faktor 2
KHK	koronare Herzkrankheiten
LCAT	Lecitin Cholesterin Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	Low Density Lipoprotein Rezeptor
LDLRAP1	Low Density Lipoprotein-Rezeptor Adapter Protein 1

LPL	Lipoprotein Lipase
MIP	Methylation Independent Primer
MO	Morbid Obesity / morbide Adipositas
MSP	Methylation Sensitive/Specific Primer
NOS	Stickstoff Monoxid Synthase
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PCSK9	Proprotein Konvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 Serin Protease
Pro	Prolin
PTB	Phosphotyrosin Binde Domäne
RRE	LDLR Related Protein
SAM	S-Adenosylmethionin
Sp1	Transskriptionsfaktor Specificity Protein 1
SREBPs	Sterol Regulatory Binding Elements
T3	Triiodthyronin
TAE	Tris Acetat EDTA-Puffer
TG	Triglyceride
TNNT1	Troponin T
TRE	Thyroid Responsive Element
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRL	Triglycerid-rich Lipoprotein
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

1. Einleitung:

Familiäre Hypercholesterinämie ist eine erblich bedingte Stoffwechselstörung, die durch schon im Kindesalter extrem erhöhtes LDL-Cholesterin im Plasma, die Ausbildung kardiovaskulärer Erkrankungen mit sich trägt [Goldstein et al. 2001].

Obwohl die genetische Basis von Familiärer Hypercholesterinämie gut verstanden ist, existiert immer noch Unklarheit über die teilweise auftretenden hohen Varianzen im LDL Cholesterinspiegel zwischen Trägern ein und derselben Mutation, welche für das Auftreten von Familiärer Hypercholesterinämie verantwortlich scheint [Rader et al. 2003]. Auch das Risiko, ob und wann eine kardiovaskuläre Erkrankung auftritt, variiert damit stark. Gründe für diese diagnostische Lücke könnten neben Mutationen in Genen, deren Beteiligung an Familiärer Hypercholesterinämie bis jetzt unbekannt ist [Soufi et al. 2013], auch epigenetische Mechanismen sein.

Derzeit gibt es jedoch im Bereich der epigenetischen Regulation der Blutlipidparameter nur sehr wenig Forschung. Speziell bei Kindern existiert keine einzige Studie, obwohl schon in der Kindheit die Grundsteine für die später einsetzenden kardiovaskulären Erkrankungen gelegt werden [Berenson et al. 1998].

In dieser Arbeit soll die mögliche Rolle der Epigenetik in Form der DNA-Methylierung an den Genen des LDL Rezeptors und des LDL Rezeptor Adapter Protein 1 bei Kindern mit Familiärer Hypercholesterinämie geklärt werden. Es soll festgestellt werden, ob es Unterschiede in der DNA Methylierung innerhalb des PatientInnenkollektivs gibt und ,ob Kinder in ihrem Methylierungsstatus von Erwachsenen differenzieren.

Dazu werden regulatorische Regionen der Gene durch High Resolution Melting Analysis auf Varianzen in der DNA-Methylierung der unterschiedlichen Proben verglichen.

2. Theorie:

2.1. Epigenetik:

Die Epigenetik definiert sich durch alle meiotisch und mitotisch vererbaren Veränderungen, welche nicht durch die DNA Sequenz selbst kodiert sind [Egger et al. 2004].

Epigenetische Mechanismen sind flexible genomische Faktoren. Diese verändern, durch exogene Einflüsse ausgelöst, die Funktion des Genoms sowohl kurzfristig als auch langfristig. Im letzteren Fall können sie stabile Veränderungen hervorrufen, welche von Zelle zu Zelle weitergegeben werden. [Baccarelli et al. 2010].

Die Sequenzierung ist zwar seit 2001 abgeschlossen [Lander et al. 2001, McPherson et al. 2001], aber die Primärsequenz ist nur ein erster Schritt zum Verständnis der Funktion des menschlichen Genoms. Das Wissen über die regulatorischen Einflüsse der Epigenetik leistet dazu einen essentiellen Beitrag [Bernstein et al. 2007]. Dies zeigt sich auch in der schnell ansteigenden Zahl an Publikationen in diesem Bereich [Baccarelli et al. 2010].

Praktisch beschäftigt sich die Epigenetik hauptsächlich mit den Proteinen des Chromatins, der Interaktion von microRNA mit dem Genom und den Proteinen und DNA Modifizierungen, die den biologischen Status der Chromosomen-Regionen bestimmen [Wade und Archer 2006].

Diese zusammenwirkenden Faktoren und deren Verteilungsmuster sind es auch, die die Informationen enthalten, welche die ausschlaggebenden Enzyme des Zellkerns anleiten, deren Vorhandensein und Anzahl bestimmen, und die Zugänglichkeit der DNA regulieren [Strahl und Allis 2000, Jaenisch und Bird 2003].

Trotz der Dynamik der Chromosomen können die epigenetischen Informationen stabil sein und nicht nur mehrere Zellteilungen und die Meiose [Cavalli und Paro 1998] überleben, sondern auch von Generation zu Generation weitergegeben werden [Grewal et al. 1996, Chong et al. 2004, Liu et al. 2008].

Die ersten Studien im Feld der Epigenetik beschäftigten sich mit Veränderungen des Phänotyps, beispielsweise mit der Augenfarbe von *Drosophila* [Müller 1930, Schultz 1950] oder dem Silencing der X-Chromosomen bei Säugetieren [Lyon 1961]. Diese frühen Studien resultierten in der Etablierung funktioneller Beziehungen zwischen verschiedenen Regulatoren der Genexpression. Die biochemische Identifizierung und die Charakterisierung der dahinterstehenden enzymatischen Maschine folgten ab den 1980er Jahren parallel zur Entwicklung der dafür notwendigen Techniken [Wade und Archer 2006]. Siehe dazu auch Abbildung 1.

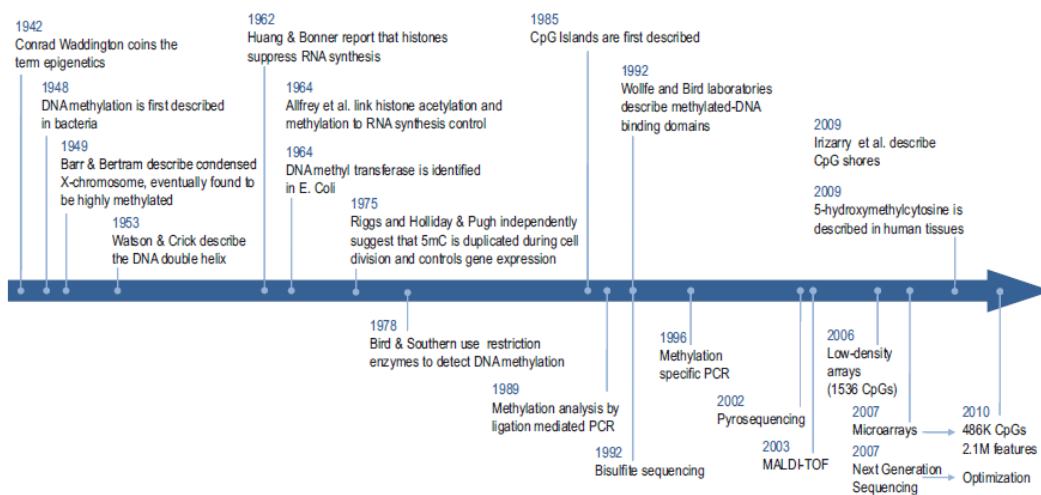


Abbildung 1: Meilensteine der Epigenetik [Baccarelli et al. 2010]

Bedeutung der Epigenetik:

Die Epigenetik ist der Motor hinter der Bildung verschiedener Zelltypen während der Entwicklung eines mehrzelligen Organismus [Wade und Archer 2006]. Sie ist aber auch in noch unzählige andere physiologische Prozesse involviert. Beispiele dafür sind neben der Zelldifferenzierung auch Schutz gegen Viren und Anpassung an die Umwelt [Feinberg et al. 2007, Jaenisch und Bird 2003]. In Anbetracht der Bedeutung der epigenetischen Regulation in Hinblick auf die normale nukleare Funktion, stellt sich die Frage des Einflusses der Epigenetik auf Krankheiten. Unter anderem ist die Epigenetik eingebunden in die veränderte DNA Methylierung bei der Entstehung von Krebs [Laird 2003, Jones

et al. 2004, Feinberg et al. 2004]. Weiters sind epigenetische Veränderungen beobachtet bei Diabetes [Villeneuve et al. 2010], Lupus [Javierre et al. 2010], Asthma [Adcock et al. 2005] und vielen neurologische Krankheiten [Fouse et al. 2009, Egger et al. 2004, Urdingiuo et al. 2009, Feng et al. 2009].

Das Wissen über epigenetische Mechanismen und deren regulatorischer Einfluss leistet einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung von Therapien gegen diverse Krankheiten, da durch die epigenetischen Mechanismen bestimmt wird, welche Gene und damit welche Signalwege aktiv sind. Hinzu kommt die Reversibilität der epigenetischen Modifikationen, was es einfacher macht, diese zu verändern bzw. zu behandeln, als Defekte in der Gensequenz selbst [Kelly et al. 2010]. Neben Krebs ist die Wundheilung [Mann und Mann 2013] nur ein Beispiel für die derzeitigen Zielgebiete der epigenetischen Therapie.

Epigenetische Mechanismen können phänotypischen Effekten, ausgelöst durch Umwelteinflüsse während kritischer Phasen der Entwicklung, zugeordnet werden [Anway et al. 2005].

Diese Umwelteinflüsse sind beispielsweise die DNA schädigende Chemikalien, Krankheit, Stress aber auch Ernährung und Lebensstil, deren Einfluss direkt während der Schwangerschaft, oder während des späteren Lebens zu tragen kommt [Barker et al. 1990].

Eineiige Zwillinge sind beispielsweise am Anfang ihres Lebens epigenetisch nicht zu unterscheiden, entwickeln aber mit der Zeit wesentliche Unterschiede in ihren epigenetischen Markern. Dies zeigt den wichtigen Einfluss der Umwelt auf das Epigenom [Fraga et al. 2005].

DNA Methylierung:

In Säugetieren und anderen Vertebraten kommt die DNA Methylierung an der C5 Position des Cytosins, hauptsächlich innerhalb von CpG Dinukleotiden vor. Dort binden die sogenannten DNA-Methyltransferasen an die DNA und verwenden einen konservierten Mechanismus zur Übertragung der Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf das Cytosin [Cheng et al. 2001].

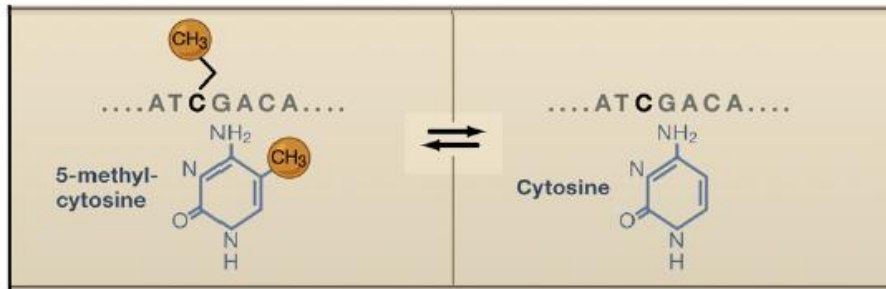


Abbildung 2: DNA-Methylierung [Bernstein et al. 2007]

Diese Methylierung spielt gemeinsam mit der Histon-Modifikation eine wichtige Rolle bei der Modulierung der Chromatinstruktur und kommt verteilt über das gesamte Genom, vor allem innerhalb der Gene vor [Eckhardt et al. 2006, Weber et al. 2005, Bird et al. 2002].

Bei Säugetieren gibt es zwei verschiedene Gruppen an DNA-Methyltransferasen. Zur DNMT3 Familie gehören die DNMT3a und DNMT3b, sowie das DNMT3-like Protein (DNMT3L), welches jedoch keine Methyltransferase-Aktivität besitzt, sondern als regulatorischer Faktor wirkt [Jia et al. 2007]. 3a und 3b sind de novo Methyltransferasen, die neue Methylgruppen in CpG-sites einfügen. Die DNMT1 hat die Funktion das Methylierungsmuster beispielsweise während der Chromosomenreplikation [Chen et al. 2006] aufrecht zu erhalten und zu reparieren [Mortusewicz et al. 2005].

CpG Inseln:

Ein interessantes Detail der DNA-Methylierung ist die Anwesenheit sogenannter CpG Inseln. Diese ca. ein kb langen Sequenzen [Bird et al. 1985, Lander et al. 2001, Larsen et al. 1992, Weber et al. 2007] kommen typisch unmethyliert in den Promotorregionen der meisten menschlichen Gene vor [Bird 2002]. Bis zu zwei kb große Abschnitte an den Rändern der CpG Inseln, sogenannte CpG-Island shores, haben stark variable Methylierungsmuster und sind mit funktionellen CpG-sites angereichert. [Irrizarri et al. 2009].

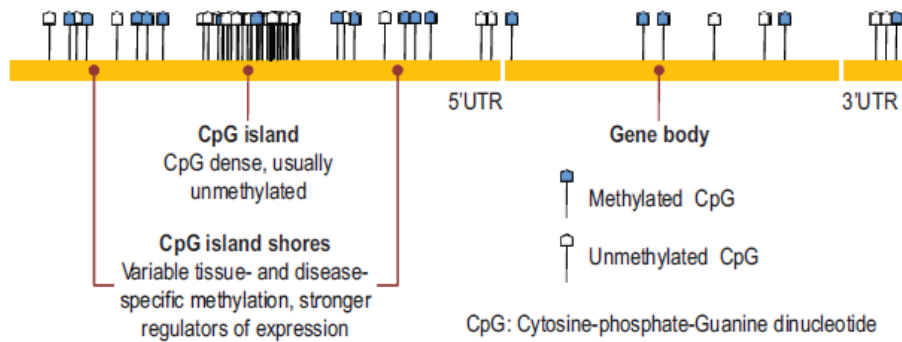


Abbildung 3: Aufbau von CpG Inseln [Baccarelli et al. 2010]

CpG Inseln kolokalisieren mit den Promotoren fast aller Haushaltsgene und mit ca. 40% der Promotoren von gewebsspezifischen Genen [Larsen et al. 1992, Zhu et al. 2008].

Im Gegensatz zu anderen Genregionen haben CpG Inseln einen erhöhten Prozentsatz an Guanin und Cytosin, da Methylcytosin spontan zu Thymin desaminiert, was mit 21% des im humanen Genom erwarteten Wertes zu Unterrepräsentation von CpGs führt [Lander et al. 2001].

Regulatorische Effekte der DNA-Methylierung:

Diese Faktoren führen zu der Vermutung, dass die CpG Inseln den Transkriptionsapparat auf die Promotorregionen hinweisen, und diese von den transkriptionell irrelevanten Chromatinbereichen innerhalb der Gene abgrenzen. Die Anzahl an Bindungsstellen in der Promotorregion eines Genes ist zwar leicht erhöht, diese kommen jedoch auch innerhalb eines Gens oft vor. Dies macht die Identifikation eines Promotors alleine durch die Anwesenheit von Bindungsstellen nicht möglich [Prestridge et al. 1993].

CpG Inseln dienen als weitere Hinweise auf Transkriptionsstartstellen, und ihre genaue Analyse führte zur Entdeckung einiger unerwarteter Promotoren [Gardiner-Garden und Frommer 1994, Macleod et al. 1998, Kleinjan et al. 2004].

Sind diese Regionen methyliert, ist die allererste Folge eine Veränderung der Zugänglichkeit der DNA. Es ist nicht mit Sicherheit zu sagen, ob die DNA

Hypermethylierung und die Histon-Hypoacetylierung der Grund für Hemmung der Transkription, oder deren Folge sind. Es gibt aber eine eindeutige Korrelation zwischen DNA-Methylierungsstatus, Histon-Acetylierung und dem Silencing der Transkription [Vaissière et al. 2008].

Es ist anzunehmen, dass die Veränderung der Zugänglichkeit der DNA Einfluss auf das Transkriptions-Potential, und damit Kontrolle über die Genexpression und viele andere Chromatin-abhängige Prozesse hat [Ceder und Bergman 2009, Kouzarides 2007]. Grund für die unterdrückte Transkription, könnte möglicherweise die Behinderung der Anbindung von Transkriptionsfaktoren sein [Iguchi-Arigo et al. 1989]. Die DNA-Methylierung und Histonmodifikation sind eng miteinander verknüpft. [Vaissière et al. 2008] Beispiel dafür ist die weitere Möglichkeit der Unterdrückung der Transkription durch indirekte Mechanismen, wie die Anbindung von Proteinen mit einer Methyl-CpG-Binde-Domäne [Nan et al. 1993, Jones et al. 1998, Bird 2002], welche die Repression der Transkription über eine Veränderung der Acetylierung der Histonproteine einleiten [Bird 2002]. Aber auch die Inhibition der Elongation der RNA-Polymerase [Rountree und Selker 1997], deren Loading [Kass et al 1997] und Initiation [Schubeler et al. 2000] werden als Mechanismen diskutiert.

2.2. Familiäre Hypercholesterinämie:

Krankheitsbild:

Familiäre Hypercholesterinämie (FH) (MIM 143890) ist ein vererbbarer Defekt des Lipoprotein Metabolismus, welcher klinisch durch von Geburt an erhöhte Level von Gesamtcholesterin und Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin (LDL) im Blutkreislauf geprägt ist [Soufi et al. 2013]. Hinzu kommt die Ablagerung des nicht aufgenommenen Cholesterins als Xanthomen, beispielsweise sichtbar an den Sehnen, Fetteinlagerung in der Cornea des Auges (arcus corneae), aber auch verfrühte Arteriosklerose und daraus folgende koronare Herzkrankheiten,

welche bei heterozygoter FH um das 40. bis 50. Lebensjahr auftreten [Hobbs et al. 1992].

Die schwerste Form von FH ist die homozygote, welche nur einen in einer Million Menschen betrifft [Goldstein et al. 2001], und meist im Kindesalter entdeckt wird. Neben aggressiver Medikamentierung zur Senkung der Blutlipide wird auch LDL-Apherese eingesetzt. Diese kann, die bei homozygoter FH, schon in den ersten beiden Jahrzehnten des Lebens einsetzenden, koronaren Herzkrankheiten verhindern. [Raal und Santos 2012]. Heterozygote FH ist mit einer Prävalenz von 1:500 um einiges häufiger und wird aufgrund ihrer Symptom-Losigkeit oft nicht erkannt [Brown und Goldstein 2001].

Wird sie jedoch nicht behandelt, entwickeln sich bei 50% der Männer und 30% der Frauen im Alter vor 55 Jahren koronare Herzkrankheiten [Slack 1969].

Die Konzentration des Gesamtcholesterins/LDL-Cholesterin im Serum beträgt bei gesunden, homozygot von FH nicht betroffenen PatientInnen 150-250mg/dl /75-175 mg/dl. PatientInnen mit homozygoter Familiärer Hypercholesterinämie haben einen Gesamtcholesterinspiegel von über 500mg/dl und LDL-Cholesterinspiegel von über 450 mg/dl. Heterozygot mit FH betroffene PatientInnen haben eine Konzentration von 350-450 mg/dl Gesamtcholesterin und 200-400 mg/dl LDL-Cholesterin. [Khachadurian 1964, Kwiterovich et al. 1974].

Neben Anpassung des Lebensstils in Form von fettarmer Ernährung, Sport und Vermeidung des Rauchens sind Statine die Standardtherapie für Familiäre Hypercholesterinämie [Goldberg 2010]. Diese Medikamente senken den LDL-Cholesterinspiegel, indem sie als kompetitive Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) wirken [Betteridge et al. 1978, Goldstein und Brown 1987, Hoeg und Brewer 1987]. Der Vergleich der Mortalität in der Zeit vor und nach Einführung der Statine zeigt eine 80%ige Reduktion des Risikos an KHK zu erkranken, besonders bei PatientInnen, bei denen die Therapie frühzeitig begonnen wird [Vermissen et al. 2008]. Auch Kindern mit FH wird die Therapie mit Statinen empfohlen, da die

Bildung von Arteriosklerose schon ab dem Alter von ca. zehn Jahren stark zuzunehmen beginnt [Wiegmann et al. 2004, Braamskamp et al. 2012].

Ursachen für Familiäre Hypercholesterinämie

Bis jetzt sind weltweit über 1200 Mutationen [Futema et al. 2012, Usifo et al. 2012] in vier verschiedenen Genen als Quelle für die Familiäre Hypercholesterinämie bekannt [Soufi et al. 2013].

Das als Ursache für FH mit über 90 % am häufigsten betroffene Gen [Talmud et al. 2013], ist das LDL Rezeptor Gen.

Die fundamentale Arbeit von Brown und Goldstein legte dar, dass die hauptsächliche Aufnahme des LDL-Cholesterins über den Stoffwechselweg des LDL Rezeptors stattfindet, und dass ein Defekt des LDLR zu fehlenden bzw. nicht funktionierenden LDL Rezeptoren in der Leber, und damit zu Familiärer Hypercholesterinämie führt [Brown und Goldstein 1986].

Der zweite genetische Grund für FH sind Mutationen im Apolipoprotein B-100 (ApoB MIM 144010), welche eine defekte Bindung des ApoB an den LDLR zur Folge hat und so zu einer gesenkten Aufnahme des LDL Cholesterins aus dem Blut in die Körperzelle führt [Innerarity et al. 1990].

FH kann aber auch durch Mutationen im Gen PCSK9, der Proprotein Konvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 Serin Protease, ausgelöst werden [Abifadel et al. 2009]. Diese Serin Protease bindet an den LDL Rezeptor und unterstützt den Abbau des LDL-Cholesterins in den Lysosomen [Cohen et al. 2005].

Die vierte Ursache für FH sind Mutationen im LDL Rezeptor-Adapter-Protein1, LDLRAP1. Im Gegensatz zu den drei anderen betroffenen Genen führen Mutationen im LDLRAP1 nicht zu autosomal dominanter, sondern zu autosomal rezessiver Familiärer Hypercholesterinämie [Eden et al. 2001]. LDLRAP1 bindet an den cytoplasmatischen Teil des LDL Rezeptors und unterstützt die Einbettung des LDL Rezeptors in die Clathrin-coated pits und ist somit für die Aufnahme des LDLR/LDL Komplexes notwendig [Cohen et al. 2003].

2.3. Fettstoffwechsel:

Das Cholesterin ist eine essentielle Komponente von Zellmembranen von Säugetieren [Brown und Goldstein 1975] und Substrat für die Synthese der Steroid Hormone, von Vitamin D und Gallensäuren [Faust et al. 1979, Kovanen et al. 1977]. Es spielt eine wichtige Rolle im Membrantransport, bei Signalwegen und bei der Zellproliferation [Fernandez et al. 2004, Fernandez et al. 2005].

Tierische Zellen produzieren Cholesterin endogen ausgehend von Acetyl-Coenzym A [Bloch et al. 1992, Ponticorvo et al. 1949] und nehmen es exogen über die Lipoproteine auf. [Brown und Goldstein 1976, Brown und Goldstein 1986].

In westlichen Ländern wird etwa 300-500mg Cholesterin über die Nahrung aufgenommen. Das über die Gallensäure aufgenommene Cholesterin wird auf ca. 800-1200 mg geschätzt [Grundy und Metzger 1972].

Low-Density-Lipoprotein:

Low-Density-Lipoproteine sind sphärische Partikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 22 nm. Ihr Kern besteht aus ca. 170 Triglyceriden und ca. 1600 Cholesterinester-Molekülen [Esterbauer et al. 1992]. Zusätzlich enthält das Lipoprotein ca. 600 Moleküle unverestertes Cholesterin, von dem ein Drittel im Kern und zwei Drittel auf der Oberfläche zu finden ist. [Lund-Katz und Phillips 1986]. Die Oberfläche von LDL besteht aus einer Monolayer aus Phospholipiden und einer einzigen Kopie von Apolipoprotein B100. Die Hauptkomponenten der Phospholipide sind Phosphatidylcholin und Sphingomyelin. Außer den Lipiden trägt LDL auch lipophile Antioxidantien, wie beispielsweise Tocopherole, Carotinoide und Ubiquinol [Esterbauer et al. 1992]. LDL ist flexibel; ihre Struktur und physikalischen Eigenschaften hängen stark von der Zusammensetzung ihrer Komponenten und von der Konformation des ApoB100 ab [T. Hevonoja et al. 2000].

Lipoprotein Metabolismus:

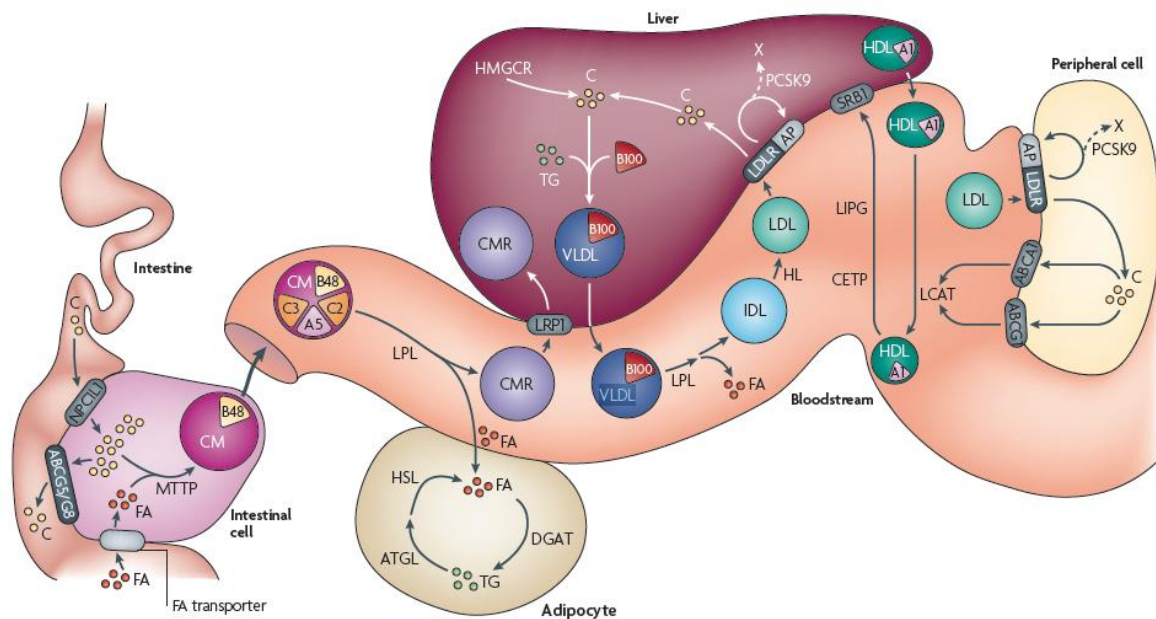


Abbildung 4: Übersicht des Lipoprotein Metabolismus [Hegele et al. 2009]

Die Hauptkomponenten der Lipoproteine sind freies und verestertes Cholesterin und Triglyceride. In den Enterocyten werden die im Dünndarm aufgenommenen und hydrolysierten Fette als wiederhergestellte TG und die Cholesterinester gemeinsam mit dem Apolipoprotein B48 in Chylomicronen verpackt. Des Weiteren sitzen die Apolipoproteine ApoA5, ApoC2 und ApoC3 in den Chylomicronen. Diese gelangen über das Lymphatische System in die Vena Cava und zirkulieren im Blutkreislauf bis sie auf die Lipoprotein-Lipase (LPL) treffen. Das Protein ist im Endothel durch Proteoglykane und das Glykosylphosphatylinositol verankerte HDL Binding Protein fixiert und baut die Chylomicronen ab. Die Chylomicronen Remnants werden durch den hepatischen LDL Rezeptor in der Leber aufgenommen. Hier werden die Triglyceride mit Cholesterin und ApoB100 zum Lipoprotein VLDL (Very Low Density Lipoprotein) verpackt. Das VLDL gelangt in den Blutkreislauf und wird dort durch die LPL zu IDL (Intermediate Density Lipoprotein) und weiter durch die HL (Hepatic Lipase) zu LDL abgebaut. Das LDL transportiert Cholesterin von der Leber in die Peripherie und in die steroidogenen Organe inklusive der Leber, wo es über den LDL Rezeptor aufgenommen wird. [Hegele 2009].

Der intrazelluläre Transport von Cholesterin funktioniert über vesikulären Transport oder über lösliche Carrierproteine, welche das hydrophobe Cholesterin binden [Soccio und Breslow 2004, Maxfield und Wustner 2002]. Da Cholesterin durch die Zellen nicht abgebaut werden kann, muss überschüssiges Cholesterin abtransportiert werden, um dessen Akkumulation in der Zelle zu verhindern. Dieser Transport hin zur Leber, wo es ausgeschieden oder wiederverwertet wird, nennt sich Reverse Cholesterol Transport [Glomset und Norum 1973]. Dabei wirkt HDL-Cholesterin als Hauptakzeptor des zellulären Cholesterin [Cuchel und Rader]. Das Enzym Lecitin Cholesterin Acyltransferase (LCAT) befindet sich an der Oberfläche von HDL und konvertiert freies Cholesterin in Cholesterinester [Jonas 2000]. HDL transportiert diese in seinem Kern in die Leber und steroidogenen Gewebe, wo dieses über den Scavenger Rezeptor Typ B aufgenommen werden [Ji et al. 1997] oder durch das Cholesterylester Transfer Protein (CETP) über das Triglycerid-rich Lipoprotein (TRL) in LDL umgewandelt werden, um in der Leber als Gallensäure ausgeschieden zu werden [Linsel-Nitschke et al. 2005].

2.4. Kardiovaskuläre Erkrankungen:

Risikofaktoren:

Die Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen äußern sich bereits in der Kindheit und werden ins Erwachsenenalter mitgetragen [McGill et al. 2008]. Das Ausmaß der arteriosklerotischen Läsionen im späteren Leben korreliert mit diesen Risikofaktoren [Berenson et al. 1998, McMahan et al. 2006], zu denen erhöhtes LDL-Cholesterin, erniedrigtes HDL-Cholesterin und Übergewicht gehören [McGill et al. 2008].

Erhöhte Konzentrationen an zirkulierendem LDL fördern Arteriosklerose und kardiovaskuläre Krankheiten [Hansson und Hermansson 2012]. Das Risiko einen Herzinfarkt zu erleiden, liegt bei einem Mann unter 60 Jahren mit Familiärer Hypercholesterinämie bei 75%, ohne FH bei 10 %. [Slack J 1969, Simon Broome Register Group 1991].

Gerade bei PatientInnen mit Familiärer Hypercholesterinämie spielen Risikofaktoren für die Ausbildung von kardiovaskulären Erkrankungen aufgrund des hohen LDL-Cholesterins eine große Rolle [Smilde et al. 1998]. Erhöhte Cholesterinwerte sind auch in Abwesenheit anderer Risikofaktoren ausreichend, die Entwicklung von Arteriosklerose zu fördern [Glass und Witztum 2001].

Ausbildung von Arteriosklerose:

Die zu Grunde liegende Pathologie ist durch chronische Entzündungsprozesse der Arterienwand gekennzeichnet, die oft an Stellen mit unruhiger laminarer Strömung auftreten [Moore und Tabas 2011]. Die Atherogenese beginnt mit endothelialer Dysfunktion und strukturellen Veränderungen, was die Akkumulation von LDL Partikeln zur Folge hat [Kwon et al. 2008]. Das eingelagerte LDL ist oxidativen Prozessen ausgesetzt, möglicherweise durch Enzyme wie die Myeloperoxidase, Lipoxygenase oder Stickstoff-Monoxid Synthasen (NOS) [Glass und Witztum 2001]. Durch den Einfluss der atherogenen und proinflammatorischen Stimuli werden Adhäsionsmoleküle exprimiert, welche Komponenten des Blutes, wie beispielsweise Monozyten und T-Zellen rekrutieren [Lippy 2002, Hansson 2005]. Neben anderen Chemokinen bewirkt das oxidierte LDL die Wanderung der Blutkörperchen in die Läsion der Gefäße [Libby 2002]. Innerhalb der Intima differenzieren die Monozyten in Macrophagen und nehmen die atherogenen Lipoproteine über den Scavenger Rezeptor auf. Diese Schaumzellen nehmen das oxidierte LDL auf, bis sie absterben, da im Gegensatz zum LDL Rezeptor der Scavenger Rezeptor durch die intrazelluläre Akkumulation von LDL nicht herunter reguliert wird. Dadurch entsteht ein weicher, Lipid-reicher Kern innerhalb des Plaques. [Lewis und Radar 2005].

Fortschreitend kommt es neben der immunoinflammatorischen Antwort auch zu einer Reparatur des Gewebes durch die glatte Muskulatur der Intima. Das führt zu Verlust des Lumenvolumens, Reduktion des Blutstrom und Ischämie [Kragel et al. 1989].

Das Wachstum des Lipid-reichen, nekrotischen Kern des Plaques kann aber auch die überdeckende Schicht glatter Muskulatur schwächen. An diesen besonders dünnen Stellen kommt es zu erhöhter proteolytischer Aktivität, und im schlimmsten Fall zu einem Brechen des Plaques, wobei Teile des Kerns in den Blutkreislauf freigesetzt werden. Dieser sogenannte atherothrombotische Prozess führt zur Bildung von Thromben in den Arterien und führt schließlich zum Akuten Koronarsyndrom [Badimon et al. 2002, Badimon et al. 2008].

2.5. Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor:

Aufnahme des LDL-Cholesterins in die Zelle:

Beim LDL Rezeptor handelt es sich um einen Membranrezeptor, welcher eine wichtige Rolle bei der Regulation des Cholesterinhaushalts im menschlichen Körper spielt. Er ist für die Aufnahme des LDL-Cholesterins aus dem Blutkreislauf in die Zellen zuständig.

Die Aufnahme des LDL-C in die Zelle beginnt mit der Bindung des Apolipoprotein B100 des LDL an den LDL Rezeptor. [Boren et al. 1998]. Der LDL Rezeptor erkennt neben Apo B100 aber auch Lipoproteine mit mehreren Kopien von Apolipoprotein E, wie beispielsweise β -VLDL, IDL und Chylomykronen-Remnants. [Jeon und Blacklow 2005, Hobbs et al. 1992].

LDL Rezeptoren befinden sich in sogenannten Clathrin-coated pits, speziellen Regionen der Zellmembran, welche das Protein Clathrin enthalten [Hobbs et al. 1992, Brown und Goldstein 1979]. Nach der Bindung der Liganden wird der Rezeptor durch Einstülpung und Abschnürung der Membran in die Zelle aufgenommen. Diese fusionieren mit Lysosomen und es folgt ein Abbau des Lipoproteins zu Aminosäuren und Cholesterinestern [Brown und Goldstein 1979].

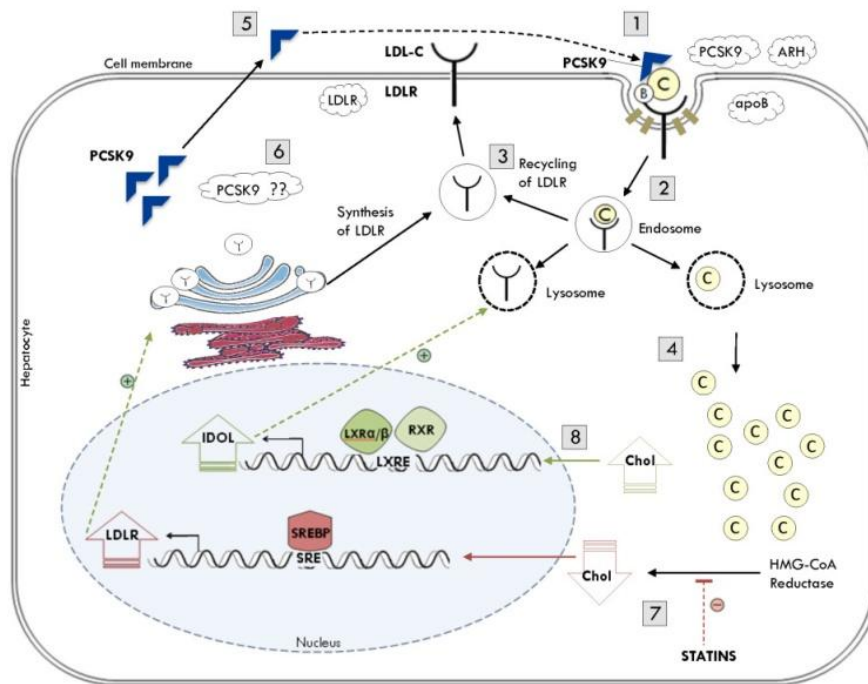


Abbildung 5: Überblick der Aufnahme von LDL-Cholesterin in die Zelle [Fahed und Nemer 2011]

Aufbau des LDL Rezeptors:

Der LDL Rezeptor besteht aus 839 Aminosäuren und kann grob in fünf Domänen eingeteilt werden.

Die LDLR Typ A repeat Domäne ist für die Ligandenbindung verantwortlich [Shireman et al. 1977, Mahley et al. 1977] und besteht aus etwa 40 Aminosäuren [Yamamoto et al. 1984].

Die zweite extrazelluläre Domäne des Rezeptors ist die EGF-Domäne (epidermal growth factor receptor homology domain), welche aus drei sich wiederholenden Sequenzen mit Ähnlichkeit zum Epidermal Growth Faktor besteht [Russel et al. 1984]. Die ersten beiden EGF-Domänen sind mit der dritten über einen β -Propeller verbunden [Jeon et al. 2001]. Dieser wirkt möglicherweise mit der Ligandenbindungsdomäne zusammen, sodass sich die Liganden bei sinkendem pH in den bei der Endocytose gebildeten Endosomen vom Rezeptor lösen [Rudenko et al. 2002].

Die nächste Domäne setzt sich aus 58 AS zusammen. Es wird angenommen, dass die Serin-reiche Sequenz als Spacer Region zwischen der EGF-Domäne und der Plasma Membran wirkt [Russel et al. 1984]. Die mit ihr O-glykosidisch verbundenen Zucker könnten die proteolytische Spaltung von dem extrazellulären Abschnitt des Rezeptors verhindern [Kozarsky et al. 1988]. Mutationen oder Deletionen dieser Region haben keinerlei Einfluss auf die Ligandenbindung des Rezeptors [Davis et al. 1986].

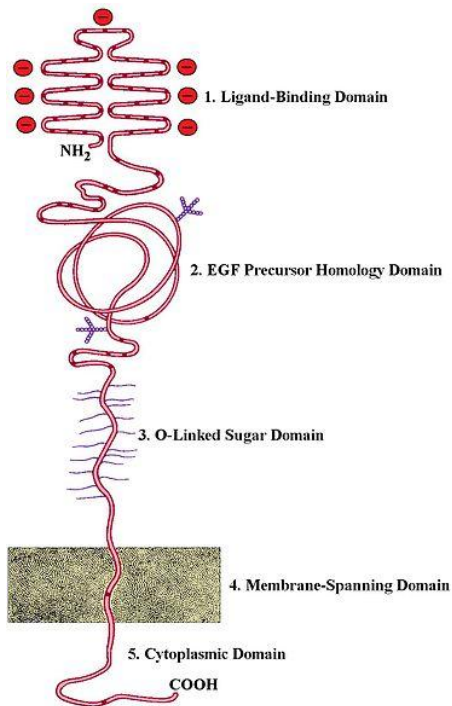


Abbildung 6: Der LDL Rezeptor [http://upload.wikimedia.org/wikiversity/en/c/c1/LDL_receptor.jpg Stand: 11.01.2014]

Die Transmembrandomäne besteht aus ca. 25 AS und enthält einen großen Teil an hydrophoben AS, welche den LDL Rezeptor in der Plasmamembran verankern [Brown und Goldstein 1997].

Die cytoplasmatische Untereinheit des LDL Rezeptors besteht aus 56 AS und enthält die Sequenz Asn-Pro-Val-Tyr welche an das LDLRAP1 Protein [Garcia et al. 2001] bindet und den Rezeptor zu den clathrin coated pits dirigiert [Chen et al. 1990]. Des Weiteren enthält sie ein Glycin an der Position 823, welches für die richtige Positionierung des Rezeptors in der Membran benötigt wird [Koivisto et al. 2001].

PCSK9 ist eine Protease, welche spezifisch an die extrazelluläre EGF-Domäne des LDL Rezeptors bindet und nach dessen Aufnahme in die Zelle zu seinem Abbau führt [Zhang et al. 2007]. Gain-of-function Mutationen in diesem Gen führen zu erhöhten Konzentrationen an LDL im Blut [Abifadel et al. 2003], Loss-of-function Mutationen zu stark erniedrigten LDL-C Level [Cohen et al. 2005]. PCSK9 reduziert die Anzahl der LDL Rezeptoren, welche zur Aufnahme des LDL aus dem Blut in die Zelle bereit stehen, ist jedoch nicht unbedingt für die Funktion des Ablaufes notwendig [Horten et al. 2007, Li et al. 2007].

Der Rezeptor dissoziiert während der Endozytose von seinen Liganden und kann danach recycelt werden, wenn PCSK9 nicht anwesend ist. Dieser Zyklus kann innerhalb der 20 Stunden Lebensspanne des Rezeptors einige hundert Male wiederholt werden [Brown et al. 1983].

2.6. Regulation des LDL Rezeptors:

SREBPs:

Die Regulation des LDL Rezeptors funktioniert über sogenannte Sterol Regulatory Binding Elements (SREBPs). Diese Membran-gebundenen Proteine werden im Endoplasmatischen Reticulum als inaktive Vorstufen produziert und bei niedrigen Konzentrationen an Sterolen in den Golgi-Apparat transportiert, wo dessen N-Terminus freigesetzt wird [Brown und Goldstein 1997].

Bei genügend hohen Konzentrationen an Sterolen in der Membran des ER wird das verhindert [Radhakrishnan et al. 2007]. Dieser Mechanismus ist ein schneller und direkter Weg der Zelle sich an das Angebot an Cholesterin anzupassen [Lagor und Millar 2010].

SREBPs sind Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren, die die jeweiligen Gene durch Bindung an die DNA im Zellkern aktivieren [Sato et al.1994].

Die Isoformen der SREBPs aktivieren verschiedene Gene des Fettstoffwechsels [Horton et al. 2003], wobei die Transkription des LDLR bevorzugt durch die Isoform SREBP-2 aktiviert wird [Shimano 2001]. Diese bindet an ein spezifisches Sterol Binding Element (SRE) in der Promotorregion

des LDLR Gens [Hua et al.1993]. Für diese Aktivierung notwendig ist das gleichzeitige Binden des Transkriptionsfaktors Sp1 an eine benachbarte Bindungsstelle. In Abwesenheit des SREBP-2 kann der Faktor KLF13 ein Silencing des LDLR-Promotors bewirken [Natesampillai et al. 2006].

Auch das Protein PCSK9 besitzt ein SRE in seiner Promotorregion und wird über SREBP-2 aktiviert, was sich in Experimenten an Mäusen gezeigt hat [Shimano et al.1997, Maxwell 2003].

Der Einfluss bestimmter Schilddrüsenhormone:

Das Schilddrüsenhormon T3 kann den menschlichen LDLR-Promotor aktivieren [Ness et al. 1995], höchstwahrscheinlich über das TRE (Thyroid Responsive Element) -678 bis -160 Basenpaare vor dem Transskriptionsstartpunkt des LDLR Gens [Bakker et al. 1998].

Auch SREBP-2 wird über Schilddrüsenhormone reguliert, besitzt es doch eine Bindungsstelle für den Thyroidhormon-Rezeptor in seiner Promotorregion [Shin et al. 2003]. Dies stimmt mit den Beobachtungen niedriger LDL Konzentrationen im Plasma von PatientInnen mit Hypothyreose [Thompson et al. 1981] und erhöhter Aufnahme und Abbau von LDL in Fibroblasten nach der Zugabe von T3 [Chait et al. 1979] überein.

IDOL:

Ein weiteres regulatorisches Element ist IDOL (Inducible degrader of the LDLR). Dieses Protein scheint den Abbau des LDL Rezeptors nach der Translation im ER [Zelcer et al. 2009] durch Ubiquitinierung zu bewirken [Olsson et al. 1999].

2.7. LDL Rezeptor Adapter Protein 1:

Das LDLRAP1 (Low Density Lipoprotein Rezeptor Adapter Protein 1) ist ein Adapter Protein, welches an den cytoplasmatischen Teil des LDL Rezeptors

bindet und für dessen effiziente Aufnahme in die Leber notwendig ist [Cohen et al. 2003].

PatientInnen mit homozygotem Defekt im LDLRAP1 zeigen die gleichen Symptome wie PatientInnen mit autosomal dominanter Familiärer Hypercholesterinämie. Im Gegensatz dazu steht, dass Fibroblastenkulturen von PatientInnen mit rezessiver FH kaum gesenkte Aufnahme von LDL zeigen [Arca et al. 2002], da hier das Protein Dab2, welches ebenfalls eine PTB-Domäne besitzt, und ein anderes mit Clathrin assoziiertes Protein in der Abwesenheit von LDLRAP1 dessen Aufgabe übernehmen [Maurer et al. 2006, Keyel et al. 2006]. In Leberzellen, wo hohe Konzentrationen an LDLRAP1 vorkommen, [Garcia et al. 2001], Lymphozyten und Macrophagen ist LDLRAP1 jedoch nicht ersetzbar [Lehtonen et al. 2008].

Aufbau des LDLRAP1:

Das LDLRAP1 besteht aus 308 Aminosäuren. Nach seinem aus 40 Aminosäuren bestehenden N-Terminus folgt eine Phosphotyrosin-bindende Domäne (PTB-Domäne) [Garcia et al. 2001] Die PTB-Domäne bindet an das konservierte Asn-Pro-X-Tyr Motiv im cytoplasmatischen Teil des LDL Rezeptors [Guy et al. 2002], aber auch Megalin [Nagai et al. 2003] und an das LDL Rezeptor related Protein RRE [Jones et al. 2003].

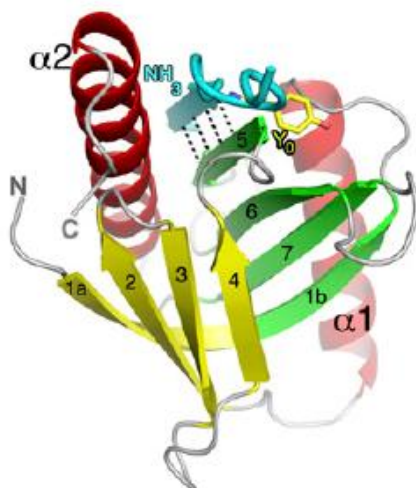


Abbildung 7: PDB-Domäne des LDLRAP1 [Dvira et al. 2012]

Abbildung 7 zeigt die PDB-Domäne des LDLRAP1 assoziiert mit dem cytoplasmatischen Schwanz des LDL Rezeptors. Die β -Faltblätter des LDLRAP1 sind als gelbe und grüne Pfeile dargestellt, die α -Helices in rot. Der Teil des LDL Rezeptors ist in Cyanblau dargestellt, das Tyrosin des Bindemotivs in Gelb. Die aufgebauten Wasserstoffbrücken zwischen LDLR und LDRAP sind als gepunktete Linien sichtbar. [Dvira et al. 2012]

Des Weiteren enthält LDLRAP1 eine Clathrin-Box Konsensus Sequenz. Die hohe Affinität zu Clathrin ergibt sich durch die Pentapeptid-Sequenz Leu-Leu-Asp-Leu-Glu [Dell'Angelica 2002, Guocheng et al. 2002].

Diese Funktionen des LDLRAP1 weisen stark darauf hin, dass das LDLRAP1 das Verbindungsglied zwischen dem LDL Rezeptor und der Endocytotischen Maschinerie darstellt. [Guocheng et al. 2002].

2.8. Zusammenhänge zwischen Epigenetik und dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen:

Epigenetik und kardiovaskuläre Erkrankungen:

Experimentelle Tiermodelle haben gezeigt, dass die DNA-Methylierung eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Arteriosklerose und kardiovaskulärer Erkrankungen spielt. Mäuse mit Defekten in Genen, welche für die methylierenden Enzyme codieren, wie beispielsweise DNMTs, zeigen Hypomethylierung ihrer DNA und erhöhte Expression der inflammatorischen Mediatoren in Leukocyten [Makar und Wilson 2004]. Mäuse ohne funktionierende Methylentetrahydrofolat-Reduktase zeigen nachfolgend der Hypomethylierung eine Ausbildung von Schaumzellen [Chen et al. 2001]. Knockout von ApoE führt zu Anfälligkeit für Arteriosklerose und typischen DNA-Methylierungsmustern, bevor sich vaskuläre Läsionen ausbilden. Diese scheinen zur Deregulation der inflammatorischen Antwort bei der Ausbildung von Arteriosklerose beizutragen [Lund et al. 2004].

Bei Menschen findet man hypomethylierte Abschnitte von Genen zuständig für die Proliferation der Glatten Muskulatur in fortgeschrittenen arteriosklerotischen Plaques [Hiltunen et al. 2002].

Auch Bluthochdruck, ein entscheidender Faktor bei der Entstehung von Arteriosklerose, steht mit DNA-Methylierung in Zusammenhang. So zeigt sich bei PatientInnen mit Hypertension ein Verlust der DNA-Methylierung in Leukozyten [Smolarek et al. 2010] und Hypermethylierung im HSK11B2 Gen [Friso et al. 2008]. Weiters konnte die DNA-Methylierung mit einigen Biomarkern für kardiovaskuläre Erkrankungen in Verbindung gebracht werden, beispielsweise mit Homocystein [Ingrosso et al. 2007] und dem C-reaktiven Protein [Fu et al. 2003].

Epigenetik und Blut Lipid Parameter:

Auch die Blut-Lipid-Level konnten kürzlich mit DNA-Methylierung in Zusammenhang gebracht werden.

IGF2, eine der am besten charakterisierten epigenetischen Stellen, ist ein Gen, welches für einen Wachstumsfaktor kodiert, der essentiell für das Wachstum der Plazenta [Sibley et al. 2004] und die embryonale Entwicklung [Reik et al. 2003] ist. IGF2 scheint aber auch bei der Regulation der fötalen Glykogensynthese eine Rolle zu spielen [Liang et al. 2010]. Ein niedrigerer Methylierungsgrad des IGF2 konnte mit einem besseren metabolischen Profil, welches sich in gesenktem Triglycerid-Level und TG/HDL-Ratio zeigt, assoziiert werden [Deodati et al. 2013].

Ein weiteres durch DNA-Methylierung reguliertes Gen ist ABCA1, welches für das Protein ATP-binding membrane cassette transporter A1 kodiert. ABCA1 ist ein wichtiger Modulator der HDL-Cholesterin Konzentration und katalysiert den limitierenden Schritt des Transfers von Lipiden aus diversen Geweben und Zellen auf das Apolipoprotein A-I [Joice et al. 2003]. Erwachsene, die pränatal der 1944-1945 herrschenden Hungersnot in Dänemark ausgesetzt waren, zeigen langfristige Veränderungen im Methylierungsstatus. Im Gegensatz zu ihren, von der Hungersnot nicht betroffenen Geschwistern, kann bei ihnen in

der Promoterregion von ABCA1 ein erhöhter Grad an Methylierung festgestellt werden [Tobi et al. 2009].

Diese Ergebnisse wurden bestätigt, indem der erhöhte Methylierungsgrad in dieser Region mit einer verkleinerten HDL-Partikelgröße und niedrigeren HDL-Cholesterin in Zusammenhang gebracht werden konnte. Die Resultate lassen auf eine Repression der Regulierung durch die DNA-Methylierung in der Promotorregion schließen [Guay et al. 2012].

Auch das Gen TNNT1 zeigte positive Korrelationen mit der durchschnittlichen HDL-Partikelgröße, und den Expressionslevel an HDL-Phospholipid, Apo A-I, HDL-Cholesterin und TNNT1. Diese Ergebnisse weisen auf Epigenom-weite Varianzen als Ursache für individuelle Schwankungen des HDL-Metabolismus hin [Talens et al. 2012].

Eine weitere Studie der Gruppe Guay et al. beschäftigte sich ebenfalls mit dem Zusammenhang zwischen Blutlipidleveln und DNA-Methylierung der jeweiligen Gene. Es wurden Auffälligkeiten in den Genen CETP und LPL festgestellt. [Guay et al. 2013]

Das Cholesterylester Transferprotein ist im Austausch von Triglyceriden und Cholesterinestern zwischen VLDL und HDL beteiligt. Dabei entsteht Triglyceridreiches und Cholesterinester armes HDL [Kuivenhoven et al. 1998]. Niedrige Konzentrationen an CETP werden mit langsamen Voranschreiten von kardiovaskulären Erkrankungen, hohen HDL-C Spiegeln [Inazu et al. 1994], niedrigen Triglyceridkonzentrationen in HDL [Kuivenhoven et al. 1998] und großen HDL-Partikeln assoziiert [Arai et al. 2003].

LPL katalysiert die Hydrolyse der Triglyceride von VLDL und Chylomicronen, wodurch Phospholipid-reiche Remnants entstehen, deren Lipide für die Bildung des HDL verwendet werden [Eisenberg 1984]. Erniedrigtes LPL kommt zusammen mit niedrigen Konzentrationen an HDL-Cholesterin, Hypertriglycerinämie [Julien et al. 1998] und einem hohen Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen vor [van Bockxmeer et al. 2001].

Die Studie stellte eine Korrelation des Methylierungsgrades der Promotorregion von CETP und LPL mit den obigen HDL-Phänotypen fest.

Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen an LDL-Cholesterin mit der Konzentration an CETP im Plasma und dem Methylierungsstatus der Promotorregion von CETP gefunden werden [Guay et al. 2013].

Dies passt zu Ergebnissen anderer Studien die eine positive Korrelation zwischen dem Vorkommen an CETP und der LDL Konzentration im Blut nicht nur bei gesunden Patienten [Krauss et al. 2012], sondern auch bei Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie, herstellen [de Grooth et al. 2004, Hogue et al. 2004]. Daraus kann geschlossen werden, dass CETP nicht nur das Profil der HDL Partikel, sondern auch den LDL-Metabolismus beeinflusst [Guay et al. 2013].

DNA-Methylierung des LDL Rezeptors:

Im Rahmen der Studie von Guay et al. 2013 wurde auch der LDL Rezeptor untersucht. Ziel war es, festzustellen, ob eine, in der Promotorregion des LDL Rezeptors vorkommende, Variabilität der DNA-Methylierung existiert, und ob diese Epipolymorphismen die Unterschiede der Blutlipidwerte von Patienten mit der gleichen FH-auslösenden Mutation erklären könnten [Guay et al. 2013].

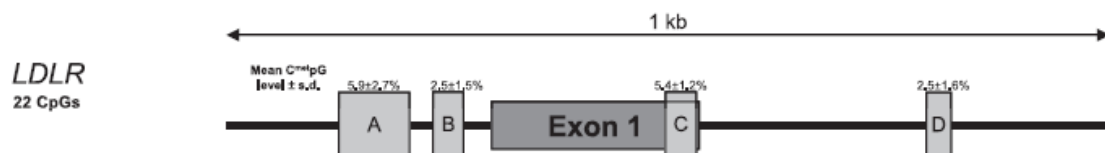


Abbildung 8: Schematische Darstellung der von Guay et al. 2013 untersuchten Abschnitte des LDL Rezeptors [Guay et al. 2013]

Zur Untersuchung der DNA-Methylierung mittels Pyrosequencing-Methode wurde DNA aus Leucozyten von 28 Männern mit Familiärer Hypercholesterinämie verwendet.

Wie in Abbildung 8 sichtbar, wurden in der Promotorregion des LDL Rezeptors 22 CpG Inseln in vier Abschnitten vor und nach dem ersten Exon untersucht. Alle Abschnitte wurden hypomethyliert vorgefunden, mit einer sehr kleinen Variabilität an DNA-Methylierung [Guay et al. 2013].

Der Vollständigkeit halber sollte auch die Studie von Zhi et al. 2007 erwähnt werden, welche den Methylierungsstatus von 12 CpG Inseln in der Promotorregion des LDL Rezeptor Gens untersuchte. Dazu wurden Blutproben von Patienten mit Arteriosklerose mit einer denen einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. In der Gruppe der Patienten mit Arteriosklerose waren durchschnittlich ca. 25% der CpG Inseln methyliert, bei der Kontrollgruppe etwa 4 % [Zhi et al. 2007]. Die Arbeitsgruppe Guay et al. sieht die kleine Probenanzahl, unterschiedlichen Methoden und mögliche Unterschiede in der Auswahl der zu analysierenden CpG Inseln als Gründe für diese gegensätzlichen Ergebnisse. Die fehlenden Varianzen der Methylierung des LDLR Promotors bei Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie könnten auch durch deren Notwendigkeit, die extremen LDL-Cholesterinspiegel auszugleichen, erklärt werden [Guay et al. 2013].

3. Durchführung:

3.1. Studiendesign:

Die Studie wurde durchgeführt mit Proben von insgesamt 14 PatientInnen, wobei diese zum Zeitpunkt der Blutabnahme zwischen 3 und 17 Jahren alt waren. Es wurde die gleiche Zahl an Proben von weiblichen und männlichen PatientInnen verwendet.

Als Probenmaterial wurde Restblut verwendet, welches den PatientInnen für klinisch notwendige Standard Bluttests abgenommen wurde. Die sogenannten Guthrie-Karten sind eine günstige Alternative zu gefrorenem Blut, da die Methylierungsmuster von aus Trockenblutkarten extrahierter DNA mit denen gefrorener Buffy-Coats hochgradig vergleichbar sind [Joo et al. 2013]

3.2. PatientInnenkollektiv:

Das PatientInnenkollektiv setzte sich aus zwei Gruppen zusammen. Neben der Kontrollgruppe, bestehend aus zwei gesunden PatientInnen und 5 PatientInnen

mit morbider Adipositas (BMI über der 99,5. Perzentile) [KiGGS, Kromeyer-Hauschild et al. 2001] wurde Proben von 7 PatientInnen mit Familiärer Hypercholesterinämie untersucht.

In der Gruppe der PatientInnen mit Familiärer Hypercholesterinämie wurde zwischen PatientInnen mit diagnostizierter und bereits behandelter Familiärer Hypercholesterinämie und Erstvorstellungen unterschieden.

Diese beiden Subgruppen differenzieren sich vor allem in Bezug auf Medikamentierung und folgedessen in ihren Blutparametern. Es ist jedoch auch anzunehmen, dass PatientInnen, welche bereits eine Beratung im Umgang mit Familiärer Hypercholesterinämie erhalten hatten, diese Tipps auch in ihrem Lebensstil umgesetzt haben.

3.3. Genetik

Nachdem alleine auf dem LDL Rezeptor Gen derzeit über 1100 Mutationen bekannt sind, welche Familiäre Hypercholesterinämie auslösen [Leigh et al. 2008], wurde, wenn möglich, auch Augenmerk auf die Genetik der PatientInnen gelegt, um eventuelle Einflüsse der veränderten Gensequenz auf die Polymerasekettenreaktion und die Schmelztemperatur des Amplikons ausschließen zu können.

Patientennummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Gruppe	FH	FH	FH	FH	FH	FH	FH	K	K	K	K	K	K	K
Geschlecht	w	m	m	w	m	w	m	w	w	w	m	w	w	m
Alter [Jahre]	6	5	13	10	10	17	3	17	3	8	8	5	6	10
BMI [kg/m2]	16,0	15,6	19,7	21,9	19,3	22,1	16,4	49,9	27,1	24,3	25,1	23,2	14,7	17,3
Perzentile [%]	>P50	>P25	>P50	>P90	>P75	>P50	>P50	>P99,5	>P99,5	>P99,5	>P99,5	>P99,5	>P25	>P50
Gesamtcholesterin [mg/dl]	246	224	231	239	212	269	287	196	158	183	197	134	104	131
Triglyceride [mg/dl]	91	65	97	256	n.v.	92	87	43	114	120	221	79	84	124
HDL [mg/dl]	50	56	55	34	66	77	60	66	33	41	41	38	n.v.	n.v.
LDL [mg/dl]	178	155	157	154	130	174	210	121	102	118	111	80	n.v.	n.v.
Mutation	LDLR Exon 17	LDLR Exon 10 (2483 A>G)	n.v.	LDLR Exon 9	LDLR	n.v.	LDLR							
Medikamentierung	Simvastatin 5 mg 1x1	Krestor 5 mg 1x1	-	Simvastatin 5 mg 1x1	Ecetrol 10 mg 1x1 Simvastatin 10 mg 1x1	-	Simvastatin 5 mg 1x1							
Erstvorstellung	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein

Tabelle 1: PatientInnen Parameter

3.4. Untersuchte Stellen:

Untersucht wurden Abschnitte in den Genen des LDL Rezeptors (LDLR MIM# 606945) und des LDL Rezeptor Adapter Protein 1 (LDLRAP1 MIM# 605747). Grund für die Auswahl des LDLR Gens ist die essentielle Rolle des LDL Rezeptors bei der Aufnahme von LDL-Cholesterin in die Zelle. Weiters handelt es sich beim LDLR auf Grund seiner Rolle in der Familiären Hypercholesterinämie um ein außergewöhnlich gut untersuchtes Gen/Protein mit weitgehend bekannten molekularen Abläufen [Goldstein et al. 2001].

Im Gegensatz zum LDLR sind die Funktionen des LDLRAP1 noch unklar und wenig untersucht, obwohl es eine wichtige Rolle bei der Entfernung des LDL-Cholesterins aus dem Blut spielt [Cohen et al. 2003]. Das Gen wurde trotzdem zur Untersuchung herangezogen, da es eine außergewöhnliche Dichte an CpG-sites in seiner Promotorregion aufweist [EPD, DBCAT].

Das wichtigste Kriterium bei der Auswahl der zu untersuchenden Stellen war das Vorhandensein von CpG Inseln in regulatorisch wichtigen Stellen der Gene, beispielsweise den Promotorregionen von LDLR und LDLRAP1. Zusätzlich wurden intragene Regionen des LDLR untersucht, welche strukturelle regulatorische Elemente besitzen, wie sie auch in Promotoren zu finden sind. CpG Inseln wurden in dieser Arbeit als Sequenzen mit einem GC-Gehalt von über 50% definiert.

Am LDL Rezeptor

Das LDLR Gen des Menschen ist ca. 44,45 kb groß und befindet auf der Position 11,200,036 - 11,244,505 des Plus Stranges des 19. Chromosoms [NCBI]. Der Transkriptionsstartpunkt des LDLR Gens befindet sich auf Position 11200139 [EPD].

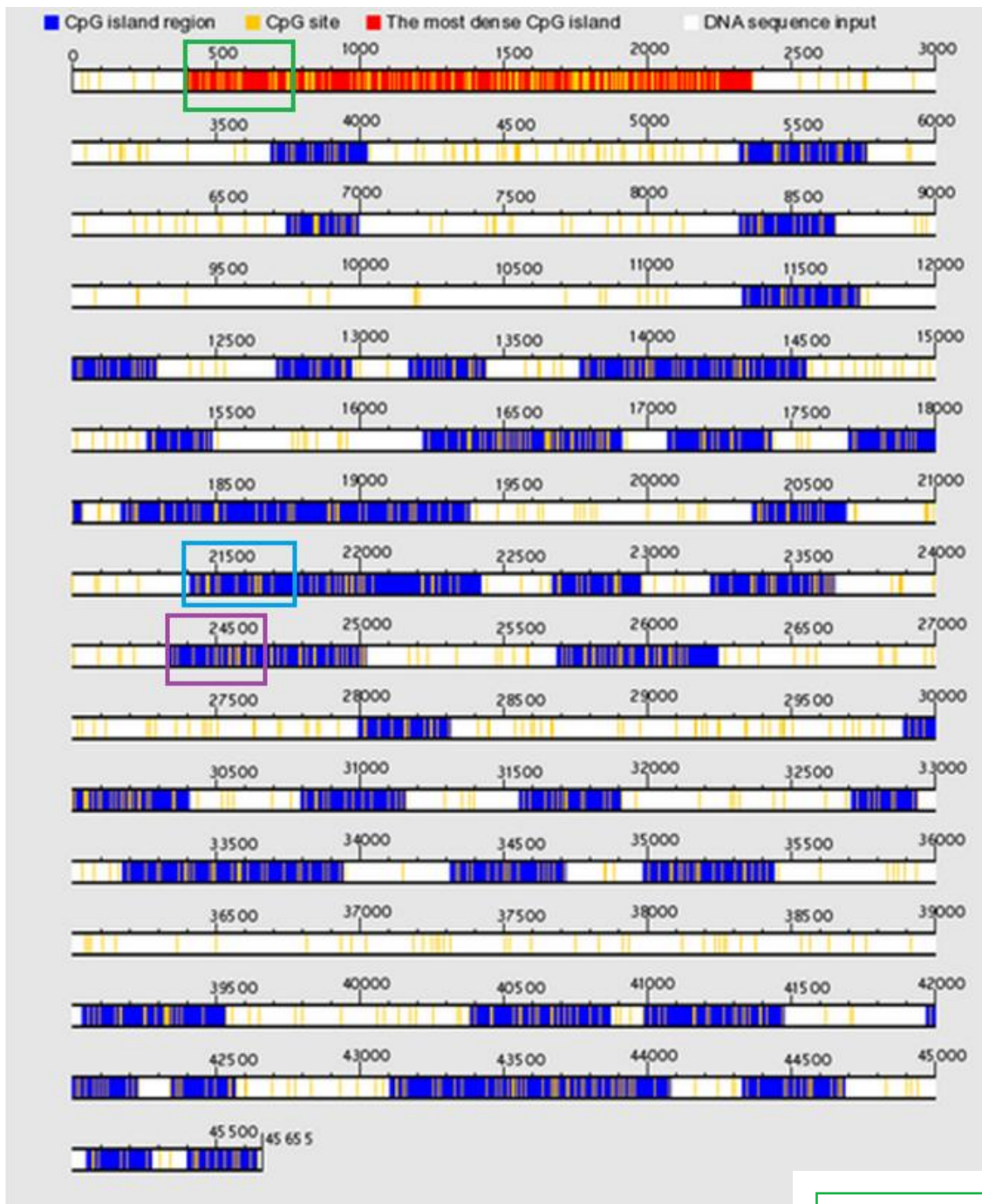


Abbildung 9: CpG Inseln des LDL-Rezeptors [erstellt in <http://dbcat.cgm.ntu.edu.tw/>]

LDLR P1

LDLR P2

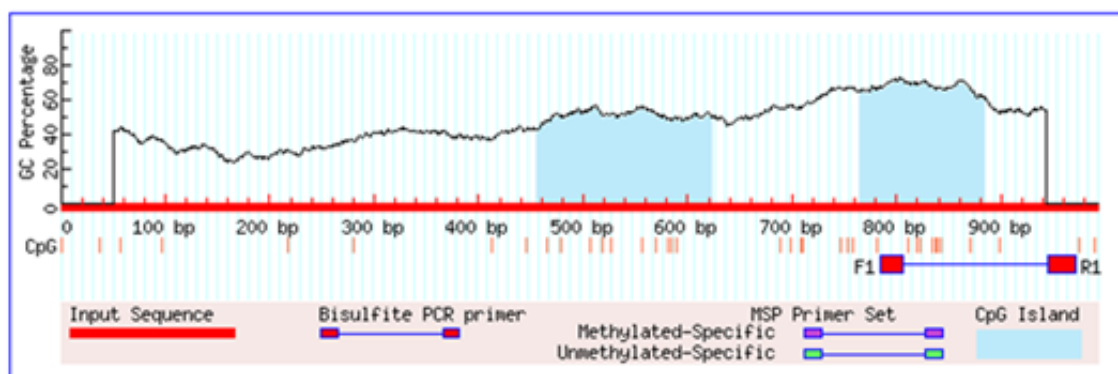
LDLR P3

Auf dem Gen finden sich 38 CpG Inseln, wobei die dichteste Insel (rot) direkt mit der Promotorregion des Gens überlappt. Die untersuchten Stellen LDLR P1 R1 und LDLR P1 L1 befinden sich innerhalb dieser ersten CpG Insel, rechts

und links des Transkriptionsstartpunktes. Die Stellen LDLR P2 und LDLR P3 sind jeweils Abschnitte in der 17. und 20. CpG Insel. Beide befinden sich in Regionen welche “Promotor-like-elements“, beispielsweise TATA-Boxen oder CAAT Elemente etc. aufweisen [EPD, DBCAT].

Locus LDLR P1 R1

Das Amplikon LDLR P1 R1 rechts des Transkriptionsstartpunktes, erstreckt sich von Position 11200221 bis zur Position 11200409. Es umfasst somit 183 bp und enthält insgesamt 9 CpG sites [EPD, DBCAT].



<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>

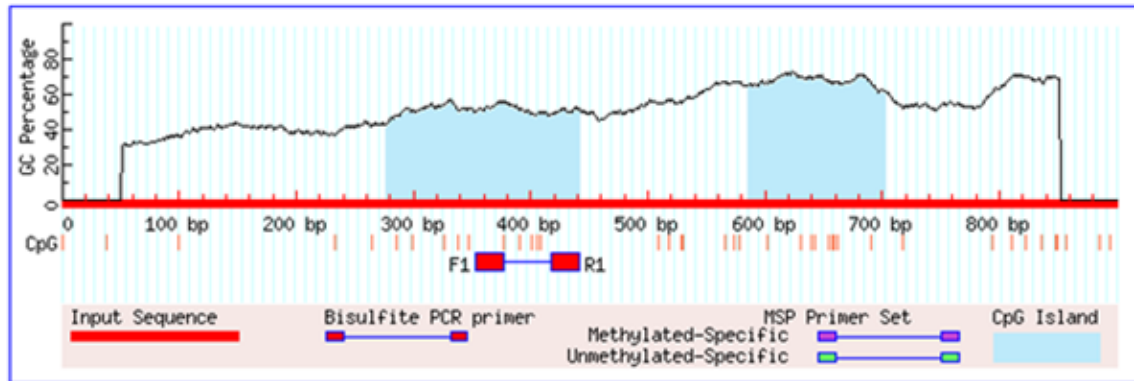
Abbildung 10: LDLR P1 R1

Primer	Oligosequenz (5'→3')	Tm (°C)
LDLR_P1_R1(fw)	GAGTATGGGGTTTTGGGGTTGG	65.56
LDLR_P1_R1(rv)	CATTACCCACAAATCTCCCAAAAATA	65.62

Tabelle 2: Primer LDLR P1 R1 [erstellt in Methprimer]

Locus LDLR P1 L1

Das Amplikon links des Transkriptionsstartpunktes erstreckt sich über 100 bp von Position 1199969 bis 11200069. Es enthält 5 CpG sites. Die Sequenz erfasst drei direct repeats/GC-Boxen die als SP1-Bindungsstelle fungieren [Südhof et al. 1987].



<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>

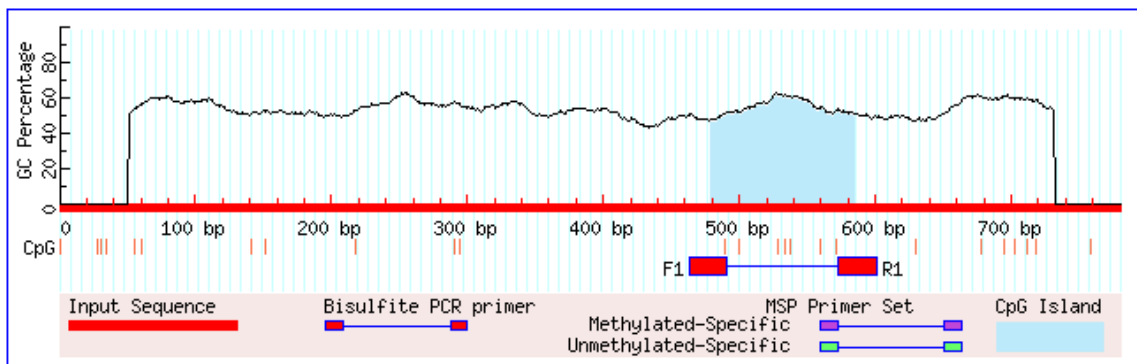
Abbildung 11: LDLR P1 L1

Primer	Oligosequenz (5'→3')	Tm (°C)
LDLR_P1_L1(fw)	AGGATTGGAGTGGGAATTAGAGTTTTA	62.55
LDLR_P1_L1(rv)	TTTTCAAATATCTTCACCTCACTACAAAAA	62.45

Tabelle 3: Primer LDLR P1 L1 [erstellt in Methprimer]

Locus LDLR P2

Das Amplikon erstreckt sich über 139 bp von Position 11220840 bis Position 11220978. Es umfasst sieben CpG sites, welche direkt vor einer TATA-Box liegen [EDP]. Es liegt innerhalb der 17. CpG Insel, welche sich vor dem 8. Exon des Gens befindet.



<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>

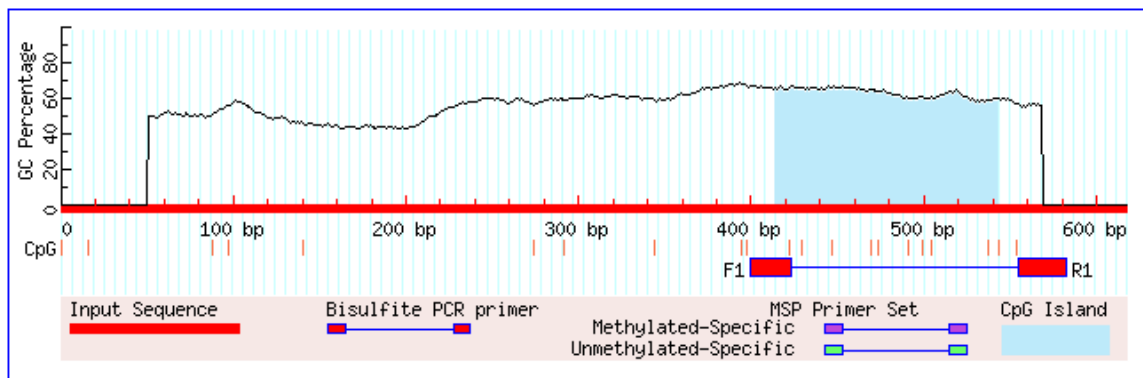
Abbildung 12: LDLR P2

Primer	Oligosequenz (5'→3')	Tm (°C)
LDLR_P2(fw)	TGATTGGTTTATTTTATTGAGTTAAGTG	58.30
LDLR_P2(rv)	ACTAAAATAAAATTTTCACCATATTAACC	57.17

Tabelle 4: Primer LDLR P2 [erstellt in Methprimer]

Locus LDLR P3

Das Amplikon erstreckt sich über 185 bp von Position 11223912 bis Position 11224097. Es umfasst 11 CpG sites [EPD, DBCAT] innerhalb der 20. CpG Insel des Gens, welche sich vor dem Exon 10 des LDLR Gens befindet.



<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>

Abbildung 13: LDLR P3

Primer	Oligosequenz (5'→3')	Tm (°C)
LDLR_P3(fw)	GGGTTTTTTTTTGATTTTTTGGATT	58.83
LDLR_P3(rv)	CCAATAAATTCTATTACTAACCACCTCC	59.86

Tabelle 5: Primer LDLR P3 [erstellt in Methprimer]

Am LDL Rezeptor Adapter Protein 1

Das menschliche LDLRAP1 liegt im Chromosom 1 und umfasst 25306 bp von Position 25870071 bis Position 25895377 [NCBI]. Das Gen enthält 11 CpG Inseln wobei sich die erste, die Promotorregion umfassende Insel, deutlich in Größe und Dichte von den restlichen abhebt [EPD, DBCAT].

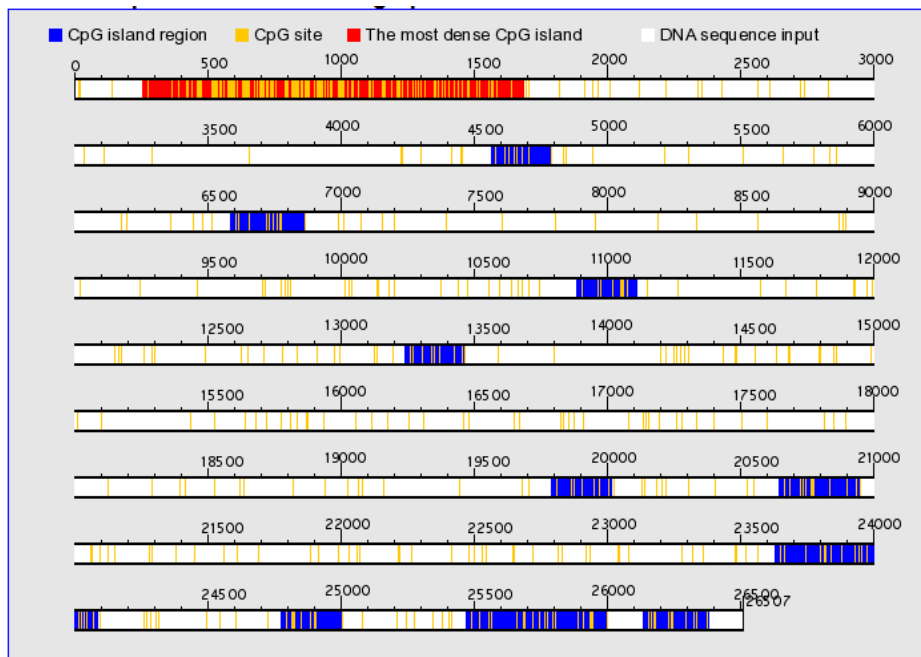


Abbildung 14: CpG Inseln des LDLRAP1 [erstellt in <http://dbcats.cgm.ntu.edu.tw/>]

Locus LDLRAP1

Das Amplikon liegt in der Promotorregion des LDLRAP1 und umfasst den Transkriptionsstartpunkt auf Position 25870098 sowie eine GC-Box. Es erstreckt sich über 194 bp von Position 25870041 bis Position 25870235 und enthält 32 CpG sites. [EPD, DBCAT].

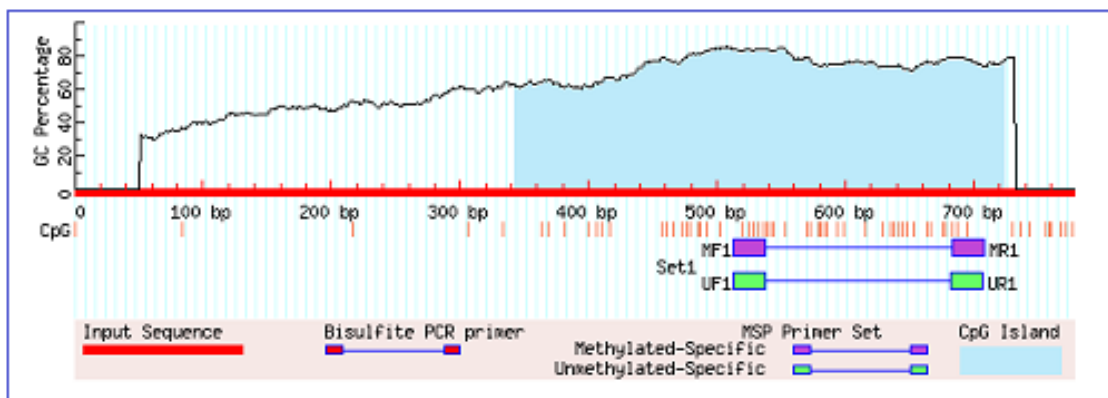


Abbildung 15: LDLRAP1

<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>

Primer	Oligosequenz (5'→3')	Tm [°C]
LDLRAP1_M(fw)	TTTTTTTCGTTTCGTTTCGTCGGAC	67.88
LDLRAP1_M (rv)	AACTAAACTCCGAATCAACGCCCG	68.80
LDLRAP1_U(fw)	TTTTTTTTGTTTTGTTTTGTTGGAT	60.05
LDLRAP1_U (rv)	CTAAAACTCCAATCAACACCCACC	63.89

Tabelle 6: Primer LDLRAP1 [erstellt in Methprimer]

3.5. Methodik:

DNA Extraktion

DNA Extraktion und Aufreinigung wurden mit dem „QIAamp® DNA Mini“ Kit von Qiagen laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Als Probenmaterial dienten 3 Stenzen einer zuvor mit EDTA-Blut betropften und getrockneten Filterpapierkarte. Nach Lyse mit Proteinase K wird die membrangebundene DNA in 2 Schritten aufgereinigt und im letzten Schritt eluiert.

Bisulfitbehandlung

Die Bisulfitbehandlung wurde mit dem „EpiTect® Bisulfite Kit“ von Qiagen laut Herstellerangaben mit der zuvor extrahierten DNA durchgeführt. Durch die Inkubation mit Bisulfit (Natriumhydrogensulfit) wird unmethyliertes Cytosin der DNA desaminiert und formt im sauren pH 5,6-Dihydrocytosin-6-sodiumsulfonat. Nach dem Wechsel in basisches Milieu entsteht Uracil. Methyliertes Cytosine ist davon nicht betroffen, da die Reaktion in diesem Fall um ein Vielfaches langsamer abläuft [Tanaka et al. 2007]. Nach dem Umwandlungsschritt, durchgeführt im „T100™ Thermal Cycler“ von BioRad, wird die membrangebundene DNA zur Entsalzung gewaschen und desulfoniert. Nach einem weiteren Waschschrift wird die bisulfitbehandelte DNA eluiert.

Touchdown PCR und High Resolution Melting Analysis:

Die Polymerase Kettenreaktion wurde mit dem Kit „EpiTect® HRM™ PCR“ von Qiagen anhand Angaben des Herstellers durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Touchdown PCR durchgeführt. Dabei wird die Temperatur der ersten 10 bis 15 Zyklen im Annealing Schritt, ausgehend von einigen Grad Celsius über der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer, pro Zyklus um 0,5 Grad Celsius gesenkt. Dies erhöht die Spezifität der Amplifikation [Don et al. 1991].

Die HRM Analyse wird ebenfalls im „Rotagen 6000“ direkt im Anschluss an die Amplifikation durchgeführt, wobei die Temperatur wie vom Hersteller angegeben von 65 auf 95 Grad Celsius in Schritten von 0,1 Grad Celsius erhöht wird. Durch die Bisulfitbehandlung unterscheiden sich Proben mit unterschiedlichem Methylierungsstatus in ihrer DNA Sequenz, und damit auch in ihrem Schmelzpunkt.

Der im Kit verwendete Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen interagiert nicht mit einzelsträngiger DNA, bindet jedoch an doppelsträngige DNA und fluoresziert im gebundenen Zustand bei 530nm. Dadurch ist es einerseits möglich die Steigerung der DNA Konzentration während der Amplifikation zu messen, andererseits lässt sich auch der Zeitpunkt des Übergangs von doppel- zu einzelsträngiger DNA während der HRM beobachten.

Durch Verwendung einer HotStart Polymerase (HotStarTaq Plus DNA Polymerase) wird wiederum die Spezifität der PCR erhöht [Qiagen EpiTect® HRM™ PCR Handbook].

Neben den Proben wurden pro Lauf je eine Negativkontrolle (H₂O statt Template) und 3 Positivkontrollen durchgeführt. Als Positivkontrolle fungierte synthetisierte genomische DNA. Die Positivkontrollen mit bisulfitbehandelter methylierter DNA und bisulfitbehandelter unmethylierter DNA dienen zum Abgleich des Schmelzpunktes der Proben und dadurch zum Rückschluss auf deren Methylierungsstatus. Durch die Kontrolle mit unmethylierter, nicht

bisulfitbehandelter DNA kann die Vollständigkeit der Bisulfitbehandlung überprüft werden.

Primer Design:

Da die DNA nach der Bisulfitbehandlung nicht mehr komplementär ist, werden die Primer so erstellt, dass nur der für das Gen codierende Strang amplifiziert wird. Das wird erreicht, indem der linke Primer komplementär zum codierenden Strang ist. Der rechte Primer entspricht dem Abschnitt am codierenden Strang, das heißt er kann erst nach dem ersten Zyklus der PCR an den neu entstandenen Strang binden.

Die Primer für die HRM PCR wurden mit dem Programm „MethPrimer“ designt. „MethPrimer“ wurde eigens für das Design von Primern zur Untersuchung von DNA-Methylierung entwickelt [Li L.C. und Dahiya R. 2002]. Zur weiteren Kontrolle wurde das Programm „PrimerBLAST“ von NCBI verwendet. Um die Spezifität der Primer zu überprüfen wurde eine „MegaBLAST“-Suche in der NCBI Datenbank durchgeführt. Dies ist notwendig, da die Bisulfitbehandlung die Komplexität der DNA Sequenz stark verringert [Brandes et al. 2007]. Zum Ausschluss von Sekundärstrukturbildung wurde das Programm „OligoCalc“ verwendet [Kibbe 2007].

Parameter für die Erstellung von Primern mit „Methprimer“

- „CpG-Island Prediction“: Island size > 100; GC Percent > 50.0
- Product Size: 80-200 bp , Optimum: 100 bp
- Primer Tm: 58-68°C, Optimum: 62°C
- Primer Size: 20-30

[Biorad TechNote 2004; Qiagen EpiTect® HRM™ PCR Handbook]

Methylation Independent Primer (MIP):

Methylation Independent Primer werden so designt, dass die Amplifikation der bisulfitbehandelten DNA unabhängig von ihrem Methylierungsstatus stattfinden kann. Das bedeutet, dass die Primer an Regionen binden, welche möglichst keine CpG sites enthalten, aber eine gleichmäßig mit Cytosinen durchwachsen sind. Dies garantiert die Amplifikation von erfolgreich Bisulfit-behandelter DNA [Clark et al. 2007].

Methylation Specific Primer (MSP):

MSP Primer wurden für die Untersuchung der Promotorregion des LDLRAP1 designt, da es, aufgrund der hohen Dichte von CpG sites an dieser Stelle nicht möglich war, qualitativ hochwertige MIP einzusetzen.

Im Gegensatz zu MIP werden bei MSP zwei Paare Primer benutzt welche nach der Bisulfitbehandlung spezifisch an die methylierte bzw. unmethylierte DNA-Sequenz binden. Das wird erreicht, indem die Primer zu DNA Sequenzen passen, welche neben Cytosinen auch CpG sites enthalten, idealerweise am 3'Ende des Oligonucleotids. Durch den Erfolg des jeweiligen Primerpaars bei der Amplifikation kann auf den Methylierungsstatus rückgeschlossen werden [Herman et al. 1996].

Agarose-Gelelektrophorese:

Um die Ergebnisse der HRM Analyse zu validieren, wurde eine Gelelektrophorese und stichprobenartig Sequenzierungen einzelner Proben durchgeführt. Die Gelelektrophorese dient dem Größenabgleich der amplifizierten Produkte mit der erwünschten Region. Außerdem kann semiquantitativ auf die Produktivität der PCR rückgeschlossen werden.

Zur Auftrennung der DNA Fragmente wurde ein 2 % Agarosegel in TAE Puffer hergestellt. Für die Färbung eines Gels bestehend aus 1,6 g Agarose (Electrophoresis Grade, Invitrogen) und 80 ml 1x konzentriertem TAE Puffer

wurden 8 µl „GelRed Nucleic Acid Stain“ (Biotium) verwendet. Zur Färbung und Beschwerung von 10 µl der amplifizierten Proben-DNA wurden 2 µl 5 x konzentrierte Loading Dye (Qiagen) zugesetzt. Als Vergleich wurde die „100bp Ladder“ von Invitrogen eingesetzt (2µl Ladder+ 2µl loading dye + 6 µl RNase freies H₂O). Das Gel wurde mit 150 Volt ca. 50 Minuten gelaufen.

Nach der Kontrolle der Banden unter UV-Licht wurden diese ausgeschnitten und zur Validierung der Ergebnisse der HRM-Analyse sequenziert.

Sequenzierung:

Die Sequenzierung wurde von der Firma VBC Biotech (Standort Wien) durchgeführt und mit dem Programm Chromas (Technelysium Pty Ltd.) analysiert.

4. Ergebnisse:

4.1. Locus LDLR P1 R1

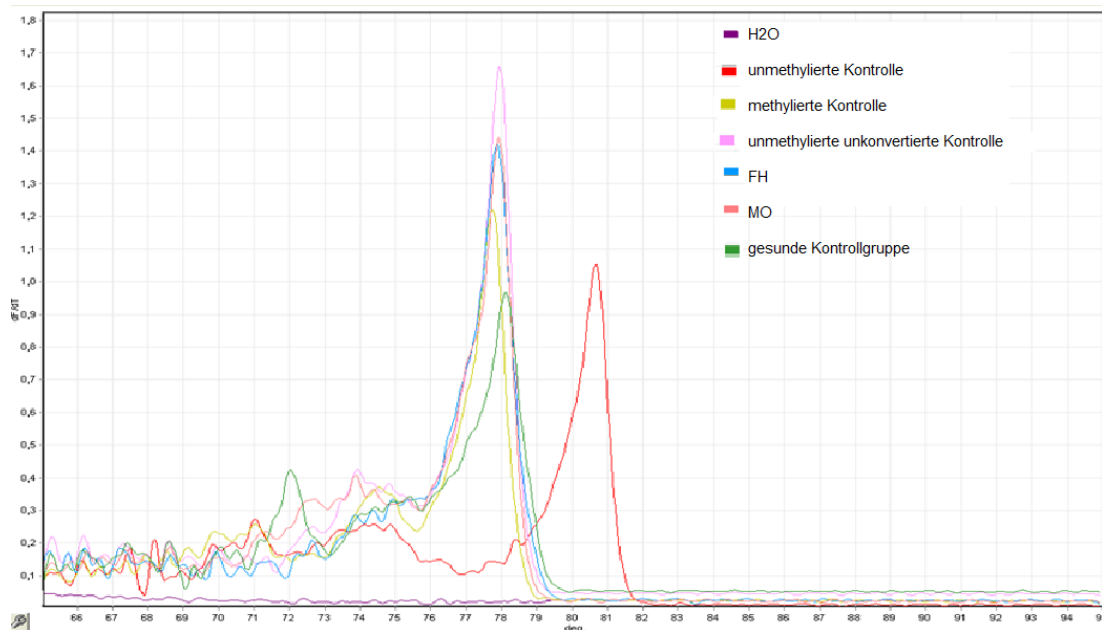


Abbildung 16: HRM Analyse des LDLR P1 R1

Die Proben aller untersuchten Proben an der Stelle LDLR P1 R1 zeigen einheitliche Schmelzkurven. Bei Proben und der komplett unmethylierten Kontroll-DNA liegt der Übergang von doppelsträngiger zu einzelsträngiger DNA bei ca. 79,2° Celsius. Der Schmelzpunkt der komplett methylierten Kontroll-DNA liegt bei ca. 81,8°Celsius.

.Agarose-Gelelektrophorese

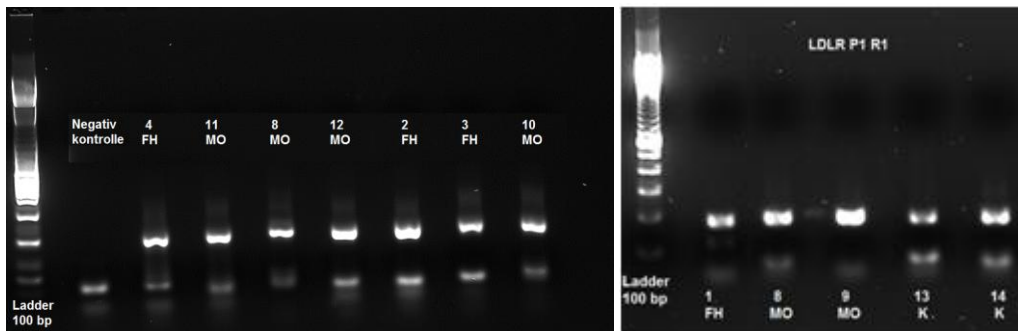


Abbildung 17: Agarose-Gelelektrophorese des LDLR P1 R1

Die durch die Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennten Amplikons liegen knapp unter der 200 bp Marke und stimmen somit mit den erwarteten 183 bp überein.

Sequenzierung:

Die Sequenzierung bestätigt die Ergebnisse der HRM Analyse. Alle analysierten Sequenzen zeigten keine Methylierung in den untersuchten CpG sites. Sequenzierung siehe Anhang.

Zusammenfassung:

Die Ergebnisse der Analysen weisen eindeutig darauf hin, dass alle im Abschnitt LDLR P1 R1 enthaltenen CpG sites unmethyliert sind. Es ist kein Unterschied zwischen Proben der Patienten mit Familiärer

Hypercholesterinämie, morbider Adipositas und der gesunden Kontrollgruppe zu sehen.

4.2. Locus LDLR P1 L1

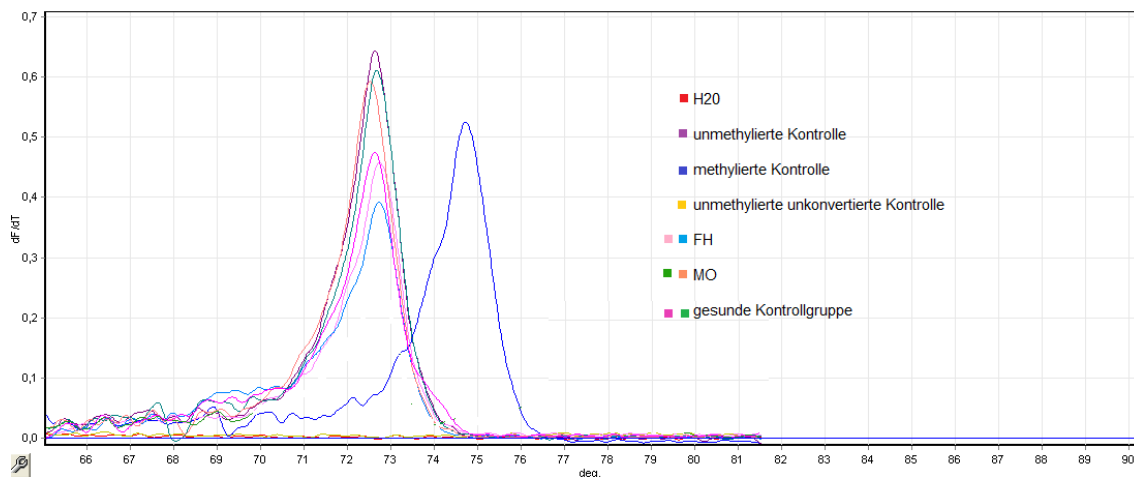


Abbildung 18: HRM Analyse des LDLR P1 L1

Die untersuchten Proben der Region LDLR P1 L1 zeigen das gleiche Schmelzverhalten wie die unmethylierte Kontroll-DNA. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 73,9°Celsius, wohingegen der Schmelzpunkt der vollmethylierten Kontroll-DNA bei ca. 76,2°C liegt. Es ist kein Unterschied zwischen Proben der verschiedenen Gruppen zu sehen.

Agarose-Gelelektrophorese:

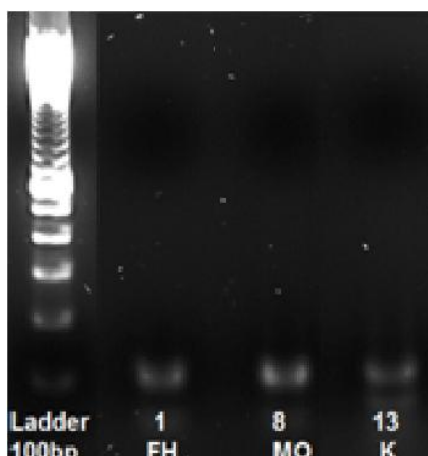


Abbildung 19: Agarose-Gelelektrophorese des LDLR P1 L1

Die Agarose-Gelelektrophorese zeigt eine spezifische, aber schwache Amplifikation. Die Position bei der 100 bp Marke entspricht der Länge des erwünschten Abschnittes.

Sequenzierung:

Auf Grund der schlechten Amplifikation konnte keine Sequenzierung durchgeführt werden.

Zusammenfassung:

Die Ergebnisse der HRM Analyse weisen darauf hin, dass alle im Abschnitt LDLR P1 L1 enthaltenen CpG sites unmethyliert sind. Aufgrund der nicht durchführbaren Sequenzierung sind diese Ergebnisse aber nicht validiert.

4.3. Locus LDLR P2

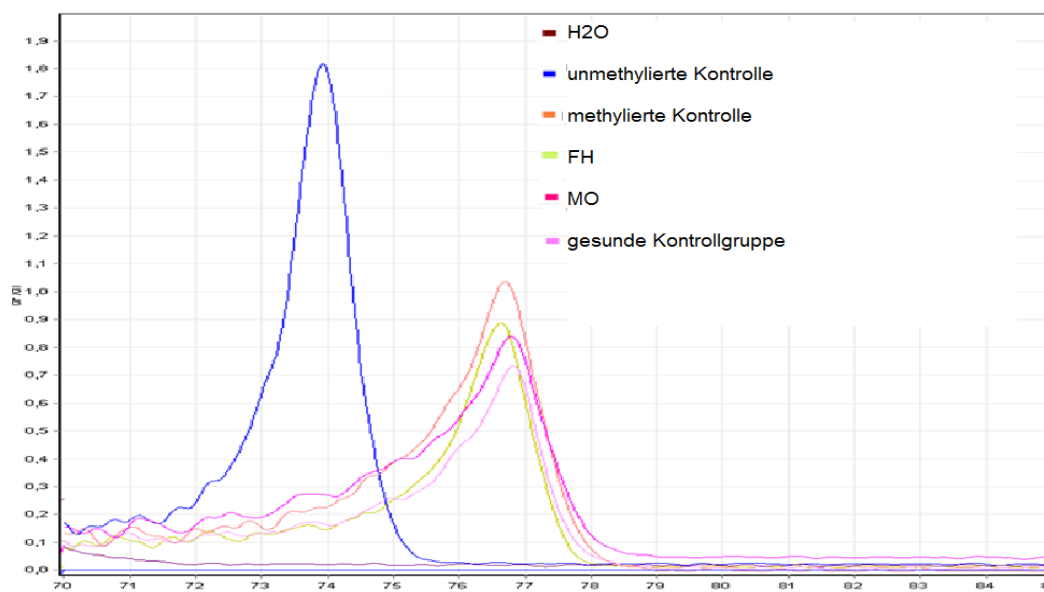


Abbildung 20: HRM Analyse des LDLR P2

Die Sequenz LDLR P2 zeigt bei allen Proben einheitliche Schmelzkurven. Während die unmethylierte Kontroll-DNA einen Schmelzpunkt von 76,1°Celsius

besitzt, liegt der Schmelzpunkt der methylierten Kontroll-DNA und aller Proben der verschiedenen Gruppen bei etwa 78,0°Celsius.

Agarose-Gelelektrophorese :

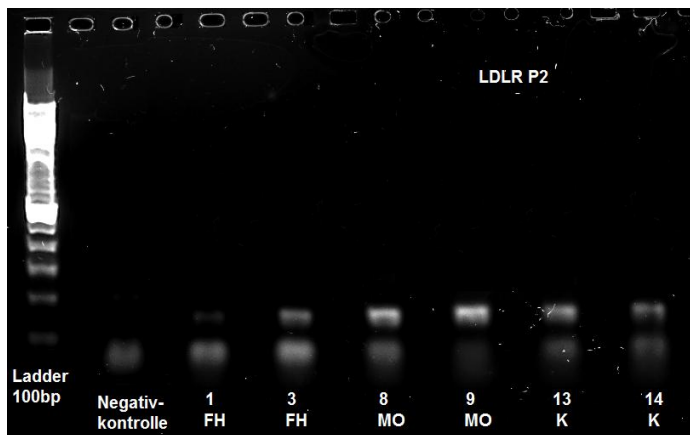


Abbildung 21: Agarose-Gelelektrophorese des LDLR P2

Das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese bestätigt die spezifische Amplifikation des erwünschten DNA-Abschnittes mit 139 bp.

Sequenzierung

Die Sequenzierung bestätigt die Ergebnisse der HRM Analyse. Alle 7 CpG sites des Abschnittes sind in allen eingeschickten Proben komplett methyliert. Sequenzierung siehe Anhang.

Zusammenfassung:

Die Ergebnisse der Analysen zeigen, dass alle im Abschnitt LDLR P2 enthaltenen CpG sites methyliert sind. Es ist kein Unterschied zwischen Proben der verschiedenen Gruppen zu sehen.

4.4. Locus LDLR P3

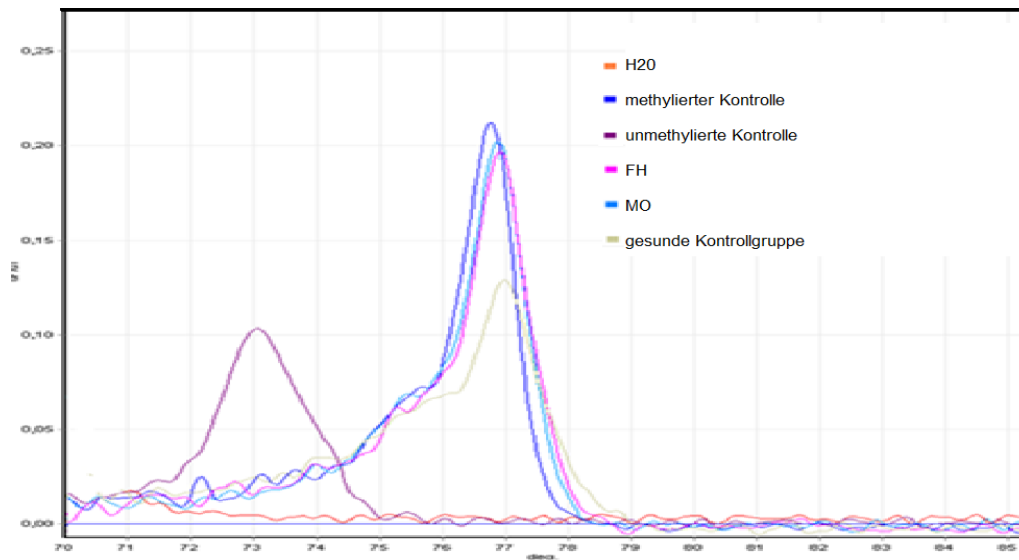


Abbildung 22: HRM Analyse des LDLR P3

Alle untersuchten Proben an der Position LDLR P3 zeigten einen gemeinsamen Schmelzpunkt mit der methylierten Kontroll-DNA bei etwa 78,1 °C. Der Schmelzpunkt der unmethylierten Kontroll-DNA liegt bei ca. 75°Celsius. Es ist kein Unterschied zwischen Schmelzkurven der verschiedenen Kontrollgruppen zu sehen.

Agarose-Gelelektrophorese:

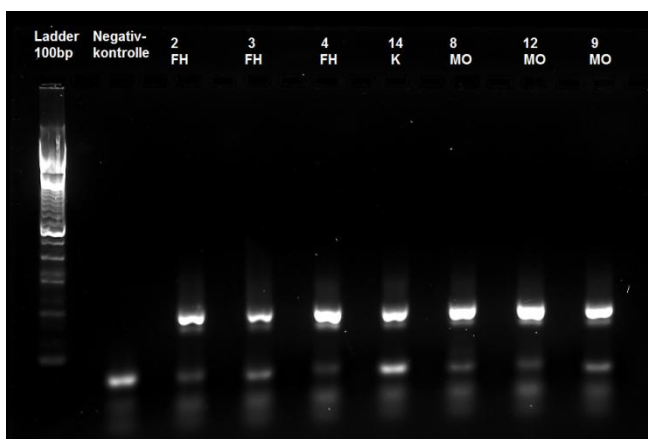


Abbildung 23: Agarose-Gelelektrophorese des LDLR P3

Die Amplifizierten Produkte liegen einheitlich etwas unter der 200bp Marke, was zur Länge des erwünschten Abschnittes von 184 bp passt.

Sequenzierung:

Die Sequenzierungen konnten die Ergebnisse der HRM bestätigen, alle 10 überprüften CpG sites des Abschnittes waren bei allen untersuchten Proben methyliert. Sequenzierung siehe Anhang.

Zusammenfassung:

Die Ergebnisse der Analysen zeigen, dass alle im Abschnitt LDLR P3 enthaltenen CpG sites methyliert sind. Es ist kein Unterschied zwischen Proben der verschiedenen Gruppen zu sehen.

4.5. Locus LDLRAP1:

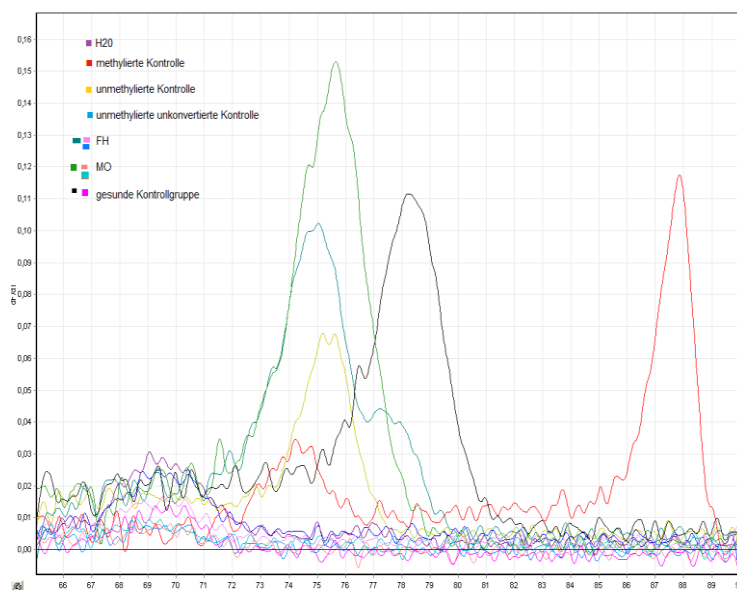


Abbildung 24: HRM Analyse des LDLRAP1 mit Primern für eine methylierte DNA-Sequenz

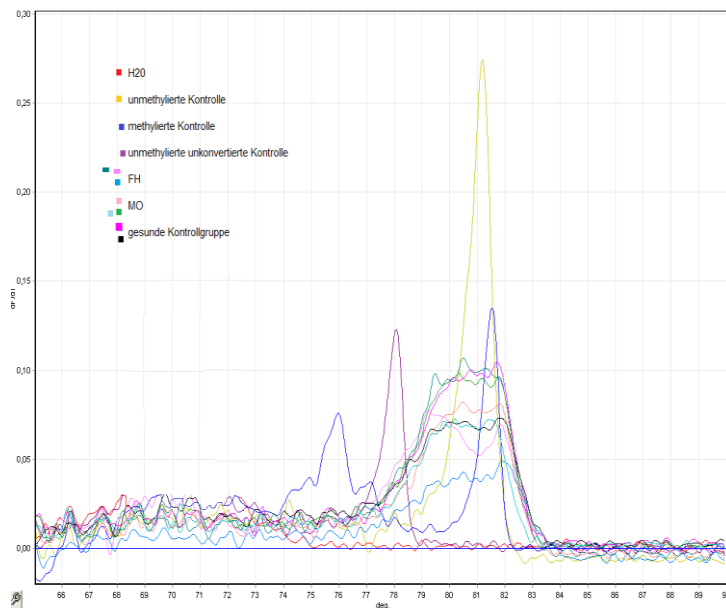


Abbildung 25: HRM Analyse des LDLRAP1 mit Primern für eine unmethylierte DNA-Sequenz

Wie in Abbildung 24 und Abbildung 25 ersichtlich, war die HRM Analyse sowohl mit den Primerpaaren mit spezifischen Primern für unmethylierte als auch methylierte DNA nicht erfolgreich.

Bei Verwendung der Primer für einen vollmethylierten DNA-Abschnitt zeigt wie erwartet die methylierte Kontroll-DNA einen klaren Peak bei ca. 89,2°C. Die Proben variieren unabhängig der Gruppe zwischen keinerlei Ausschlag oder ähnlich der Schmelzkurven und dem Schmelzpunkt der unmethylierten Kontroll-DNA und der unmethylierten unkonvertierten Kontroll-DNA, deren Mehrfachpeaks auf eine unspezifische Amplifikation schließen lassen.

Bei Verwendung der Primer für eine vollständig unmethylierte DNA Sequenz zeigt die unmethylierte Kontroll-DNA einen eindeutigen Peak mit Schmelzpunkt von etwa 82,1°C. Die methylierte Kontroll-DNA zeigt neben unspezifischer Schmelzkurven von 74 bis 77°Celsius auch einen eindeutigen Peak bei 82,1°Celsius. Die Proben zeigen unspezifische aber sehr einheitliche Schmelzkurven zwischen 79 und 82 °Celsius. Diese Ergebnisse lassen auf Grund des PCR-Designs für die nicht komplementäre DNA nach der Bisulfitbehandlung auf ein Funktionieren des linken Primer und auf eine partielle/unspezifische Bindung des rechten Primer an die erwünschten DNA Sequenzen schließen. Daher wurde die HRM PCR mit spezifischem Primer für

unmethylierte DNA auf der linken Seite und mit spezifischem Primer für methylierte DNA auf der rechten Seite der LDLR AP1 Sequenz wiederholt.

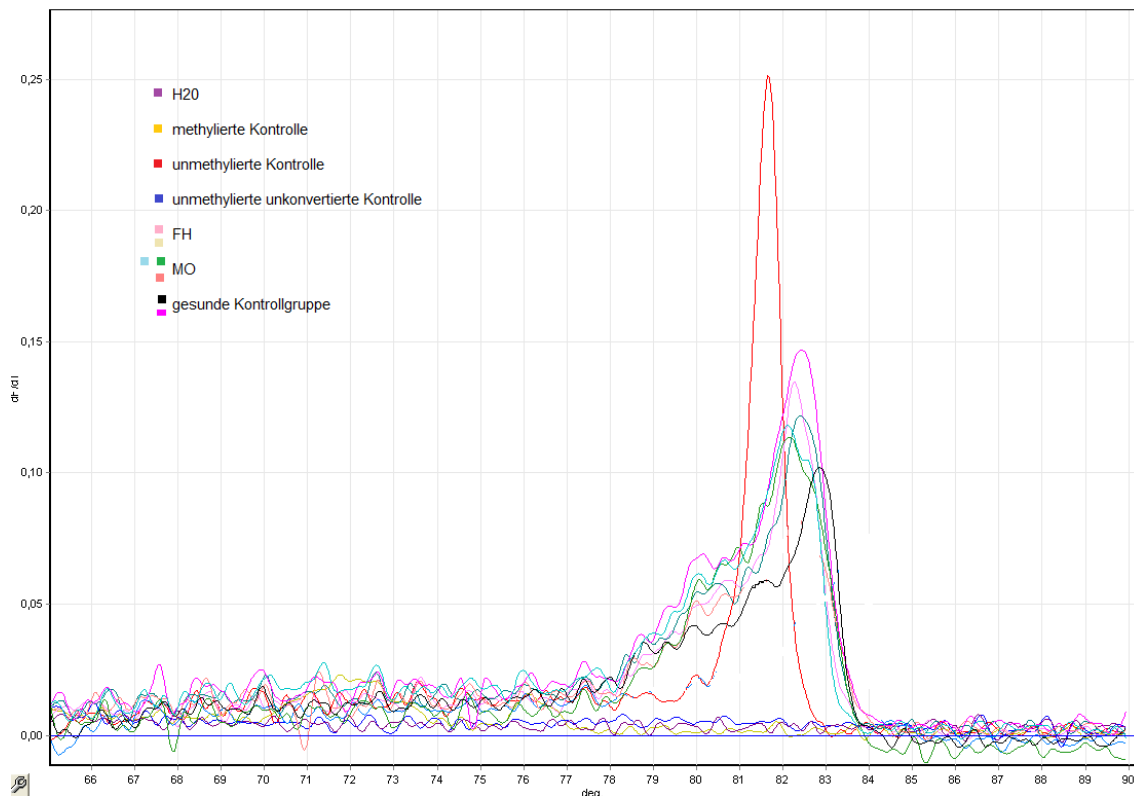


Abbildung 26: HRM Analyse des LDLRAP1 mit Primern für eine unmethylierte DNA Sequenz auf der linken und Primern für eine methylierte DNA Sequenz auf der rechten Seite des Amplikons

Bei Verwendung der Kombination von Primern für unmethylierte DNA am Beginn des Amplikons und methylierte DNA am Ende des Amplikons zeigt sich ebenfalls ein klarer Peak der unmethylierten Kontroll DNA mit einem Schmelzpunkt von 82,6°Celsius , was auf eine partielle Bindung des rechten Primers hindeutet. Die Proben zeigen einen einheitlichen Schmelzpunkt bei etwa 83,9°Celsius. Diese Verschiebung des Schmelzpunktes lässt darauf schließen, dass einige der 32 CpG sites in diesem Abschnitt methyliert sind.

Agarose Gelelektrophorese:



Abbildung 27: Agarose-Gelelektrophorese des LDLRAP1

Abbildung 27 zeigt das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese für die Sequenz LDLRAP1. Die Amplifikation des Produktes mit linken Primer spezifisch für unmethylierte DNA und rechtem Primer spezifisch für methylierte DNA zeigt in der Elektrophorese eine einheitliche Lage bei ca. 200 bp. Bei Primern für unmethylierte DNA zeigt sich ein leichter Unterschied in der Lage der Banden der verschiedenen Proben, was auf unterschiedlich lange Produkte hindeutet.

Sequenzierung:

Die Sequenzierung konnte nur 15 der insgesamt 32 CpG-sites des Abschnitts überprüfen. Diese 15 CpG-sites waren in allen Proben unmethyliert, jedoch bricht die Sequenzierung bei etwa der Hälfte des Abschnitts durch immer schwächer werdende Signale ab. Die Schwierigkeiten bei der Sequenzierung könnten eventuell aufgrund der schlechten Bindung des rechten Primer und der daraus folgenden ungleichen Verlängerungen während der Amplifikation entstanden sein, und könnten durch Neu-Design des Primers gelöst werden. Die Sequenzierung ist im Anhang zu finden.

Zusammenfassung:

Die Ergebnisse der HRM Analyse weisen darauf hin, dass die im Abschnitt LDLRAP1 P1 enthaltenen CpG-sites einen einheitlichen Methylierungsstatus aufweisen. Dieses Ergebnis konnte durch die Sequenzierung nicht vollständig bestätigt werden.

5. Diskussion:

Bei den untersuchten Genen konnten keine unterschiedlichen DNA-Methylierungen festgestellt werden. Sowohl innerhalb der beiden Abschnitte LDLR P1 L1 und LDLR P1 R1 der Promotorregion vor/am Beginn des Exon 1 des LDLR Gens, als auch in den intragenen Regionen LDLR P2 und LDLR P3 konnten keine Unterschiede in der Methylierung zwischen der Gruppe der FH PatientInnen und der Kontrollgruppe aufgedeckt werden. Auch innerhalb der Gruppen traten keinerlei Varianzen im Methylierungsmuster auf.

Die Regionen in der Promotorregion waren gänzlich unmethyliert, wohingegen die Loci im Zentrum des Gens in der Nähe des Exons 8 und 10 gänzlich methyliert vorgefunden wurden.

Auch im LDLRAP1 Gen konnten in den untersuchten Bereichen keinerlei Varianzen innerhalb und zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die Promotorregion liegt unmethyliert vor und geht dann kurz nach dem Beginn des Exon 1 des LDLRAP1 Gen in methylierten Zustand über.

Diese Muster entsprechen auch dem Stand der Forschung wonach CpG Inseln in inter- und intragenen Bereichen typisch methyliert und CpG Inseln in regulatorischen Regionen typisch unmethyliert vorkommen [Baccarelli et al. 2010].

Somit kann man anhand der Ergebnisse der Untersuchung der DNA-Methylierung annehmen, dass es sich bei den Loci LDLRP2 und LDLRP3, obwohl sie strukturell regulatorische Elemente besitzen, höchstwahrscheinlich

nicht um regulatorische Regionen handelt, bzw. dass diese bei Kindern nicht aktiv sind.

Die durch die Untersuchung erhaltenen Ergebnisse liefern keinen Hinweis auf die Ursache der bei Familiärer Hypercholesterinämie auffallenden diagnostischen Lücke. Andere epigenetische Mechanismen, die in diesen Genregionen wirken wie Histonmodifikationen oder die Regulation über nicht-kodierende RNA, können durch die Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden. Histonmodifikationen sind jedoch unwahrscheinlich, da diese eine starke Korrelation mit DNA-Modifikationen aufweisen [Vaissière et al. 2008].

Durch die in allen untersuchten Regionen und Proben nicht vorhandenen Varianzen im Methylierungsstatus können einige Rückschlüsse gezogen werden. Wie in Tabelle 1 (Seite 29) ersichtlich, variiert das PatientInnenkollektiv innerhalb der Gruppe der FH-Kinder in Blutlipidwerten, Behandlungsstatus, Geschlecht, Alter und Medikation. Alle diese Faktoren scheinen in den untersuchten Regionen keinen Einfluss auf den Methylierungsstatus der PatientInnen auszuüben.

Besonders interessant ist das bei dem Faktor der Medikamentierung, wurde doch erst kürzlich festgestellt, dass die Behandlung mit Statinen bei KrebspatientInnen Einfluss auf deren DNA-Methyltransferasen hat und diese inhibiert werden [Kodach et al. 2011]. Das Ergebnis scheint auf den zweiten Blick jedoch nicht weiter kontrovers, da die untersuchten regulatorischen Regionen auch bei unbehandelten FH-PatientInnen und bei der Kontrollgruppe unmethyliert vorliegen.

Auch die Kontrollgruppe, welche hauptsächlich aus PatientInnen mit morbidem Adipositas besteht, zeigt keinerlei Varianzen der DNA-Methylierung in allen untersuchten Stellen. Somit kann, der in der Arbeit Guay et al. 2013 gehegte Verdacht, der LDL-Rezeptor würde bei FH-PatientInnen aufgrund deren extremer LDL Spiegel keine Varianzen zeigen, abgeschwächt werden. Jedoch muss auch erwähnt werden, dass die Blutlipidwerte der PatientInnen mit morbidem Adipositas zwar im Normbereich liegen, ihr Gewicht aber einen ersten

Grundstein für das Metabolische Syndrom legt, welches mit erhöhten Blutlipidwerten und somit höherem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen einhergeht [Rohla und Weiss 2013]. Daher könnte die fehlenden Varianzen bei den morbid-adipösen PatientInnen der Kontrollgruppe ebenfalls dadurch erklärt werden, dass bereits epigenetische Mechanismen eingesetzt haben, welche gegen eine Erhöhung der LDL-Cholesterinspiegel ankämpfen. Dies trifft nicht auf die, ebenfalls in der Kontrollgruppe enthaltenen, beiden gesunden PatientInnen zu. Deren Kollektiv ist aber zu klein, um sinnvoll argumentieren zu können.

Ein weiterer Grund für die fehlenden Varianzen in allen Bereichen könnte das verwendete Probenmaterial sein. Obwohl Blut für diverse epigenetische Untersuchungen verwendet wird und auch als Surrogatmaterial für epigenetische Untersuchungen in manchen Genen vorgeschlagen wurde [Guay et al. 2013], können gewebsspezifische Unterschiede in der epigenetischen Regulation inklusive der DNA-Methylierung nicht ausgeschlossen werden, vor allem, da der LDL-Rezeptor hauptsächlich in der Leber vorkommt [Goldstein et al. 1987].

Die Ergebnisse in der Promotorregion des LDL-Rezeptor-Gens stimmen auch mit denen der Gruppe Guay et al. überein, welche eine überschneidende Region bei erwachsenen Männern mit Familiärer Hypercholesterinämie untersuchte und ebenfalls keinerlei Varianzen im Methylierungsstatus der unmethylierten Promotorregion feststellte. [Guay et al. 2013].

Somit ist in den untersuchten Regionen am LDLR Gen kein Unterschied in der DNA-Methylierung zwischen Kindern und Erwachsenen mit Familiärer Hypercholesterinämie festzustellen.

Vergleiche des DNA-Methylierungsstatus der anderen, in dieser Arbeit untersuchten Regionen des LDL-Rezeptors und des LDLRAP1 Gens, sind nicht möglich, da es im Moment noch keine Studien gibt, die sich mit diesen Regionen befassen - weder an Erwachsenen noch an Kindern.

Aufgrund der Ergebnisse am LDLR Promotor könnte jedoch spekuliert werden, dass die epigenetische Regulation durch DNA-Methylierung bei Kindern mit

Familiärer Hypercholesterinämie sich nicht von der von Erwachsenen unterscheidet.

Obwohl die kausalen Zusammenhänge der epigenetischen Regulation noch nicht vollständig geklärt sind, lassen die Ergebnisse der Untersuchung einen eindeutigen Schluss zu. Die Hypomethylierung der Promotorregionen der untersuchten Gene schließt ein Silencing bzw. eine Minderung der Expression durch DNA-Methylierung aus, da diese nicht vorhanden ist.

Auch wenn die Ergebnisse nicht auf eine Regulation durch DNA-Methylierung am LDLR und LDLRAP1 Gen hinweisen, schließt das keinesfalls eine Beteiligung der Epigenetik an den unerklärten Varianzen, was Lipoproteinlevel und Vorkommen von kardiovaskulären Erkrankungen bei Familiärer Hypercholesterinämie betrifft, aus.

Es wäre in Zukunft durchaus sinnvoll andere Gene, deren epigenetische Regulation möglicherweise Auslöser für diese diagnostische Lücke darstellt, zu untersuchen. Beispiele dafür wären die beiden anderen Key-Player der Familiären Hypercholesterinämie PCSK9 und ApoB100, aber auch das CETP Gen könnte aufgrund seiner Beteiligung im LDL Stoffwechsel eine Rolle spielen.

6. Literaturverzeichnis:

- Abifadel M, Varret M, Rabès JP. "Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia". *Nat Genet* . 2003;34(2):154–156
- Abifadel M, Rabès JP, Jambart S, Halaby G, Gannagé-Yared MH, Sarkis A, Beaino G, Varret M, Salem N, Corbani S, Aydénian H, Junien C, Munnich A, Boileau C. "The molecular basis of familial hypercholesterolemia in Lebanon: spectrum of LDLR mutations and role of PCSK9 as a modifier gene". *Hum Mutat*. 2009; 30(7): 682-691
- Adcock I M, Ito K, Barnes P J. "Histone deacetylation: an important mechanism in inflammatory lung diseases" *COPD*. 2005; 2:445–455
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. "Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility". *Science*. 2005; 308:1466–1469
- Arai T, Tsukada T, Murase T, Matsumoto K. "Particle size analysis of high density lipoproteins in patients with genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency". *Clin Chim Acta* 2000;301:103-117.
- Arca M, Zuliani G, Wilund K. "Autosomal recessive hypercholesterolaemia in Sardinia, Italy, and mutations in ARH: a clinical and molecular genetic analysis". *Lancet*. 2002;359(9309): 841–847
- Baccarelli A, Rienstra M, Benjamin E J. "Cardiovascular Epigenetics: Basic Concepts and Results From Animal and Human Studies". *Circ Cardiovasc Genet*. 2010; 3:567-573
- Badimon L, Badimon JJ, Vilahur G. "Pathogenesis of the acute coronary syndromes and therapeutic implications". *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32: 225–231
- Badimon L, Vilahur G. "Coronary atherothrombotic disease: progress in antiplatelet therapy". *Rev Esp Cardiol* 2008; 61: 501–513
- Bakker O, Hudig F, Meijssen S, Wiersinga WM. „Effects of triiodothyronine and amiodarone on the promoter of the human LDL receptor gene". *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 249(2):517–521
- Barker DJ. "The fetal and infant origins of adult disease". *BMJ*. 1990: 301-1111
- Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman W P, Tracy R E, Wattigney W A. "Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study." *N Engl JMed*. 1998;338:1650–1656
- Bernstein B E, Meissner A, Lander E S. „The Mammalian Epigenome". *Cell*. 2007; 128 : 669–681
- Betteridge D J, Reckless J P D, Krone W, Galton D J. "Compactin inhibits cholesterol synthesis in lymphocytes and intestinal mucosa from patients with familial hypercholesterolaemia". *Lancet*. 1978; 312:1342-1343

- Bird A. "DNA methylation patterns and epigenetic memory". *Genes Dev.* 2002; 16:6–21
- Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller O J, Macleod D. "A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA". *Cell* 1985; 40: 91–99
- Bloch K. "Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function". *Steroids.* 1992; 57(8):378–383
- Boren J, Lee I, Zhu W, Arnold K, Taylor S, Innerarity T L. "Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100". *J Clin Invest.* 1998; 101:1084-1093
- Braamskamp M J, Wijburg FA, Wiegman A. "Drug therapy of hypercholesterolaemia in children and adolescents". *Drugs* 2012; 72(6):759-772
- Brandes J C, Carraway H, Herman J G. "Optimal primer design using the novel primer design program: MSPprimer provides accurate methylation analysis of the ATM promoter". *Oncogene*, 2007; 26:6229-6237
- Brown M S, Goldstein J L. "Receptor-mediated endocytosis: Insights from the lipoprotein receptor system" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76:7:3330-3337
- Brown M S, Goldstein J L. „A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis". *Science* 1986; 232:34–47
- Brown MS, Anderson RGW, Goldstein JL. "Recycling receptors: The round-trip itinerary of migrant membrane proteins". *Cell.* 1983;32: 663–667
- Brown MS, Goldstein JL. "Receptor-mediated control of cholesterol metabolism". *Science.* 1976; 191(4223):150–154
- Brown MS, Goldstein JL. "The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor". *Cell.* 1997;89(3):331–340
- Brown MS, Goldstein JL. "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis". *Science.* 1986; 232(4746):34–47
- Brown MS, Herz J, Goldstein JL. LDL-receptor structure. "Calcium cages, acid baths and recycling receptors". *Nature.* 1997;388(6643): 629–630
- Cavalli G, Paro R. "The Drosophila Fab-7 chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis. *Cell.* 1998; 93:505–518
- Cedar H und Bergman Y. "Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms". *Nature Rev. Genet.* 2009;10: 295–304
- Chait A, Bierman EL, Albers JJ. "Regulatory role of triiodothyronine in the degradation of low density lipoprotein by cultured human skin fibroblasts". *J Clin Endocrinol Metab.* 1979;48(5):887–889

- Chen T, Li E. "Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals". *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 301:179–201
- Chen W-J, Goldstein JL, Brown MS. „NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor". *J Biol Chem*. 1990;265:3116 –3123
- Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, Chen MF, Pai A, John SW, Smith RS, Bottiglieri T, Bagley P, Selhub J, Rudnicki MA, James SJ, Rozen R. „Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition". *Hum Mol Genet*. 2001; 10:433– 443
- Cheng X, Roberts RJ. "AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping". *Nucleic Acids Res* 2001;29:3784–95
- Chong S, Whitelaw E. "Epigenetic germline inheritance". *Curr Opin Genet Dev*. 2004;14:692–6.
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. "High sensitivity mapping of methylated cytosines". *Nucleic Acids Research*, 1994; 22: 15: 2990-2997
- Cohen J C, Kimmel M, Polanski A, Hobbs, H H. "Molecular mechanisms of autosomal recessive hypercholesterolemia". *Curr. Opin. Lipidol.* , 2003; 14: 121–127
- Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski, I K, Graham, R, Garcia C K, Hobbs H H. "Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9". *Nat Genet*. 2005; 37:161–165
- Cuchel M, Rader D J. "Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis?". *Circulation* 2006;113(21):2548–2555
- Davis CG, Elhammer A, Russell DW. "Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts". *J Biol Chem*. 1986;261(6): 2828–2838
- de Grooth GJ, Smilde TJ, Van Wissen S. "The relationship between cholesterylester transfer protein levels and risk factor profile in patients with familial hypercholesterolemia". *Atherosclerosis* 2004;173:261-267
- Dell'Angelica E C "Clathrin-binding proteins: got a motif?" *Trends Cell Biol*. 2002;11, 315–318
- Deodati A, Inzaghi E, Liguori A, Puglianiello A, Germani D, Brufani C, Fintini C, Cappa M, Barbetti F, Cianfarani S. "IGF2 Methylation Is Associated with Lipid Profile in Obese Children" *Horm Res Paediatr* 2013;79:361–367
- Don R H, Cox P T, Wainwright BJ, Baker K, Mattick J S. "Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification". *Nucleic Acids Research*, 1991; Vol. 19, No. 14
- Dvira H, Shahc M, Girardia E, Guoa E, Farquharc M G, Zajonca D M. "Atomic structure of the autosomal recessive hypercholesterolemia

phosphotyrosine-binding domain in complex with the LDL-receptor tail". PNAS. 2012; 109:18: 6916–6921

- Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan V K, Attwood J, Burger M, Burton J, Cox T V, Davies R, Down T A, Haefliger C, Horton R, Howe K, Jackson D K, Kunde J, Koenig C, Liddle J, Niblett D, Otto T, Pettett R, Seemann S, Thompson C, West T, Rogers J, Olek A, Berlin K, Beck S. "DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22". Nat. Genet. 2006; 38: 1378–1385
- Eden E R, Naoumova R P, Burden J J, McCarthy M I, Soutar A K, "Use of homozygosity mapping to identify a region on chromosome 1 bearing a defective gene that causes autosomal recessive homozygous hypercholesterolemia in two unrelated families". Am J Hum Genet. 2001; 68: 653–660
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones P A. "Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy". Nature. 2004; 429: 457–463
- Eisenberg S. "High density lipoprotein metabolism". J Lipid Res 1984;25: 1017-1058
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Goergens J. "The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL". Free Radic Biol Med. 1992; 13:341-390
- Fahed A C und Nemer G M. "Familial Hypercholesterolemia: The Lipids or the Genes?". Nutrition & Metabolism 2011, 8:23
- Faust J R, Goldstein J L, Brown M S. "Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured mouse adrenal cells". J Biol Chem. 1977; 252(14):4861–4871
- Feinberg A P, Ohlsson R, Henikoff S, "The epigenetic progenitor origin of human cancer". Nat Rev Genet. 2007; 7: 21-33
- Feinberg A P, Tycko P. "The history of cancer epigenetics". Nat Rev Cancer. 2004; 4:143–153
- Feng, J., Fan G. "The role of DNA methylation in the central nervous system and neuropsychiatric disorders". Int Rev Neurobiol. 2009; 89: 67–84
- Fernandez C, Lobo M, Mdel V, Gomez-Coronado D, Lasuncion MA "Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation". Exp Cell Res. 2004; 300(1):109–120
- Fernandez C, Martin M, Gomez-Coronado D, Lasuncion MA. "Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression". J Lipid Res 2005; 46(5):920–929
- Fouse S D, Costello J F. "Epigenetics of neurological cancers". Future Oncol. 2009; 5:1615–1629
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML. "Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins". Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:10604–10609

- Friso S, Pizzolo F, Choi SW, Guarini P, Castagna A, Ravagnani V, Carletto A, Pattini P, Corrocher R, Olivieri O. "Epigenetic control of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene promoter is related to human hypertension". *Atherosclerosis*. 2008;199:323–327
- Fu LH, Cong B, Zhen YF, Li SJ, Ma CL, Ni ZY, Zhang GZ, Zuo M, Yao YX. Methylation status of the IL-10 gene promoter in the peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients". *Yi Chuan*. 2007; 29:1357–1361
- Futema M, Plagnol V, Whittall RA, Neil H A, Humphries S E. "Use of targeted exome sequencing as a diagnostic tool for familial hypercholesterolaemia". *J Med Genet*. 2012; 49(10):644- 649
- Garcia CK, Wilund K, Arca M "Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein". *Science*. 2001;292(5520):1394–1398
- Gardiner-Garden M. und Frommer M. "Transcripts and CpG islands associated with the pro-opiomelanocortin gene and other neurally expressed genes. *Mol. Endocrinol*. 1994; 12, 365–382
- Glass CK, Witztum JL. "Atherosclerosis. The road ahead". *Cell*. 2001; 104:503–516
- Glomset J A, Norum K R. "The metabolic role of lecithin: cholesterol acyltransferase: perspectives form pathology". *Adv Lipid Res*. 1973; 11:1–65
- Goldberg AC."Novel therapies and new targets of treatment for familial hypercholesterolemia". *J Clin Lipidol* 2010; 4(5):350-356
- Goldstein J L, Brown M S. "Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis". *Circulation*. 1987; 76: 504-507
- Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. "The metabolic and molecular basis of inherited disease. Familial hypercholesterolemia". New York: McGraw-Hill. ,2001; 2863–2913
- Grewal SI, Klar AJ. "Chromosomal inheritance of epigenetic states in fission yeast during mitosis and meiosis". *Cell*. 1996;86:95–101
- Grundy S M, Metzger A L. "A physiological method for estimation of hepatic secretion of biliary lipids in man". *Gastroenterology*. 1972; 62:1200–1217
- Guay S-P, Brisson D, Munger J, Lamarche B, Gaudet D, Bouchard L. "ABCA1 gene promoter DNA methylation is associated with HDL particle profile and coronary artery disease in familial hypercholesterolemia". *Epigenetics*.2012; 7:5, 464-472
- Guay S-P, Guay D, Brisson D, Lamarche B, Marceau P, Vohl MC, Gaudet D, Bouchard L. "DNA methylation variations at CETP and LPL gene promoter loci: New molecular biomarkers associated with blood lipid profile variability". *Atherosclerosis* 2013; 228,: 413-420

- Guocheng H, Gupta S, Yi M, Michaely C, Hobbs HH, Cohen JC. ARH is a Modular Adapter Protein that interacts with the LDL Receptor, Clathrin and AP2. *J Biol Chem.* 2002; 277:44044-44049
- Guy G R, Yusoff P, Bangarusamy D, Fong C W, Wong E S. Dockers at the crossroads. *Cell Signal.* 2002; 14:11–20
- Hansson G K, Hermansson A. “The immune system in atherosclerosis”. *Nat Immunol.* 2011; 12, 204–212
- Hansson G K. “Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease”. *N Engl J Med.* 2005; 352:1685–95
- Helgele R A. „Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications“. *Nature.* 2009; 10: 109-121
- Herman J G , Graff J R, Myohanen S, Nelkin B D, Baylin S B. “Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1996; 93:9821-9826
- Hevonoja T, Pentikainen M O, Hyvoenen M T, Kovanen P T, Ala-Korpela M. „Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL“. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2000; 1488:189-210
- Hiltunen M O, Turunen M P, Hakkinen T P, Rutanen J, Hedman M, Makinen M, Turunen A M, Salto-Setälä K, Ylä-Herttua S. “DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions”. *Vasc. Med.* 2002; 7:5
- Hobbs H H, Brown M S, Goldstein J L. “Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia”. *Hum Mutat.* 1992; 1: 445-466
- Hoeg J M, Brewer H B, “3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors in the treatment of hypercholesterolemia” *JAMA* 1987; 258: 3532-3536
- Hogue JC, Lamarche B, Gaudet D. “Relationship between cholesteryl ester transfer protein and LDL heterogeneity in familial hypercholesterolemia”. *J Lipid Res* 2004; 45:1077- 1083
- Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. “Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism”. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(2):71–77
- Horton JD, Shah NA, Warrington JA. “Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes”. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(21):12027–12032
- Hua X, Yokoyama C, Wu J. “SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element”. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(24):11603–11607
- Iguchi-Arigo S M, Schaffner W. “CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor

- binding as well as transcriptional activation". *Genes Dev.* 1989; 3: 612–619
- Inazu A, Jiang XC, Haraki T, „Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by two prevalent mutations as a major determinant of increased levels of high density lipoprotein cholesterol". *J Clin Invest* 1994; 94:1872-1882
- Ingresso D, Cimmino A, Perna AF, Masella L, De Santo NG, De Bonis ML, Vacca M, D'Esposito M, D'Urso M, Galletti P, Zappia V. Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia". *Lancet.* 2003;361:1693–1699
- Innerarity, T.L., Mahley R W, Weisgraber K H, Bersot T P, Krauss R M, Vega G L, Grundy S M, Friedl W, Davignon J, McCarthy B J. "Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia". *J. Lipid Res.* 1990; 31:1337–1349
- Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash JB, Sabunciyan S, Feinberg AP. "The human colon cancer methylome shows similar hypoand hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores". *Nat Genet.* 2009;41:178 –186
- Jaenisch R, Bird A. "Epigenetic regulation of gene expression: how the Genome integrates intrinsic and environmental signals". *Nat Genet .* 2003; 33(suppl):245–254
- Javierre B M, Fernandez AF, Richter J, Al-Shahrour F, Martin-Subero JI, Rodriguez-Ubrev J, Berdasco M, Fraga MF, O'Hanlon TP, Rider LG, Jacinto FV, Lopez-Longo FJ, Dopazo J, Forn M, Peinado MA, Carreño L, Sawalha AH, Harley JB, Siebert R, Esteller M, Miller FW, Ballestar E. "Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus". *Genome Res.* 2010; 20: 170–179
- Jeon H und Blacklow SC. "Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor". *Annu Rev Biochem.* 2005; 74:535-62.7
- Jeon H, Meng W, Takagi J, Eck MJ, Springer TA, Blacklow SC. "Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair". *Nat Struct Biol.* 2001;8(6):499–504
- Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR."Scavenger receptor BI promotes high-density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux". *J Biol Chem* 1997; 272(34):20982–20985
- Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A, Cheng X. "Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation". *Nature* 2007;449:248–51

- Jonas A. "Lecithin cholesterol acyltransferase". *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1529(1–3):245–256
- Jones C, Hammer R E, Li W P, Cohen J C, Hobbs H H, Herz J. "Normal sorting but defective endocytosis of the low density lipoprotein receptor in mice with autosomal recessive hypercholesterolemia". *J Biol Chem*. 2003; 278, 29024–29030
- Jones P A, Baylin S B. "The fundamental role of epigenetic events in cancer". *Nat Rev Genet*. 2004; 3: 415–428
- Jones P L, Veenstra G, Wade P A, Vermaak D, Kass S U, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe A P. "Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription". *Nat. Genet*. 1998 19:187–191
- Joo J E, Wong E M, Baglietto L, Jung C.-H, Tsimiklis H, Park D J, Wong NC, English D R, Hopper J L, Severi G, Giles G G, Southey M C. "The use of DNA from archival dried blood spots with the Infinium HumanMethylation450 array". *BMC Biotechnology*, 2013; 13:23.
- Joyce C, Freeman L, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S. "Study of ABCA1 function in transgenic mice". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:965-971
- Julien P, Gagne C, Murthy MR, "Dyslipidemias associated with heterozygous lipoprotein lipase mutations in the French-Canadian population". *Hum Mutat* 1998;1:S:148 153
- Kass S U, Landsberger N, Wolffe A P. "DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation". *Curr. Biol*. 1997; 7: 157–165
- Kelly T K, De Carvalho D, Jones P A. "Epigenetic modifications as therapeutic targets". *Nature Biotechnology*. 2010; 28:1069-1078
- Keyel PA, Mishra SK, Roth R, Heuser JE, Watkins SC, Traub LM "A single common portal for clathrin-mediated endocytosis of distinct cargo governed by cargo-selective adaptors". *Mol Biol Cell*. 2006; 17:4300–4317
- Khachadurian A K. "The inheritance of essential familial hypercholesterolemia". *Am. J. Med*. 1964; 37: 402-407
- Kibbe WA. "OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator". *Nucleic Acids Res.*, 2007; 35(webserver issue): May 25
- KiGGS. Robert Koch-Institut. "Public Use File KiGGS. Kinder- und Jugendgesundheitssurvey 2003-2006". Berlin 2008
- Kleinjan D A, Seawright A, Childs A J, van Heyningen V. "Conserved elements in Pax6 intron 7 involved in (auto)regulation and alternative transcription". *Dev. Biol*. 2004; 265: 462–477
- Koivisto UM, Hubbard AL, Mellman I. A novel cellular phenotype for familial hypercholesterolemia due to a defect in polarized targeting of LDL receptor. *Cell*. 2001;105(5):575–585

- Kouzarides T. "Chromatin modifications and their function". *Cell* 2007;128:693–705
- Kovanen P T, Faust J R, Brown M S, Goldstein J L. "Low density lipoprotein receptors in bovine adrenal cortex. I. Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured adrenocortical cells". *Endocrinology* 1979; 104, 599-609
- Kozarsky K, Kingsley D, Krieger M. "Use of a mutant cell line to study the kinetics and function of O-linked glycosylation of low density lipoprotein receptors". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(12):4335–4339
- Kragel A H, Reddy S G, Wittes J T, Roberts W C. "Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death". *Circulation* 1989; 80:1747–56
- Krauss RM, Wojnooski K, Orr J. "Changes in lipoprotein subfraction concentration and composition in healthy individuals treated with the CETP inhibitor anacetrapib". *J Lipid Res* 2012; 53:540- 547
- Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M, Geller F, Ziegler A, Geiß HC, Hesse V, v. Hippel, Jaeger U, Johnsen D, Kiess W, Korte W, Kunze D, Menner K, Müller M, Niemann-Pilatus A, Remer Th, Schaefer F, Wittchen HU, Zabransky S, Zellner K, Hebebrand J. „Perzentile für den Body Mass Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschrift Kinderheilkunde*“ 2001; 149(8): 807-818
- Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH. "The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary Atherosclerosis". *The N Engl J Med* 1998;338:86-93
- Kwiterovich P O, Fredrickson D S, Levy R I. "Familial hypercholesterolemia (one form of familial type II hyperlipoproteinemia): a study of its biochemical, genetic, and clinical presentation in childhood". *J. Clin. Invest.* 1974; 53:1237-1249, 1974
- Kwon G P, Schroeder J L, Amar M J, Remaley A T, Balaban R S. "Contribution of macromolecular structure to the retention of low-density lipoprotein at arterial branch points". *Circulation.* 2008; 117:2919–2927
- Lagor W R, Millar J S. "Overview of the LDL receptor: relevance to cholesterol metabolism and future approaches for the treatment of coronary heart disease". *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research* 2010;3 1–14
- Laird P W. "The power and the promise of DNAmethylation markers". *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 253–266.
- Lander E S, Linton L M , Birren B, Nusbaum C, Zody M C, Baldwin J, Devon, K , Dewar K, Doyle M, FitzHugh W" Initial sequencing and analysis of the human genome". *Nature.* 2001; 409, 860–921

- Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R. and Prydz, H. "CpG islands as gene markers in the human genome". *Genomics* 13, 1992: 1095–1107
- Lehtonen S., Shah M, Nielsen R, Iino N, Ryan J J, Zhou H, Farquhar M G. "The Endocytic Adaptor Protein ARH Associates with Motor and Centrosomal Proteins and Is Involved in Centrosome Assembly and Cytokinesis". *Molecular Biology of the Cell*. 2008; 19: 2949-2961
- Leigh SE, Foster AH, Whittall RA, Hubbart CS, Humphries SE.. "Update and analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database". *Ann Hum Genet.*, 2008, Jul; 72 (Pt 4):485-98
- Lewis G F, Rader D J. "New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport". *Circ Res* 2005; 96:1221–32
- Li J, Tumanut C, Gavigan JA. „Secreted PCSK9 promotes LDL receptor degradation independently of proteolytic activity". *Biochem J*. 2007;406(2):203–207
- Li LC, Dahiya R. "MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*" 2002; Nov;18(11):1427-31
- Libby P. „Inflammation in atherosclerosis". *Nature*. 2002;420:868 –74
- Linsel-Nitschke P, Tall AR. "HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease". *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4(3):193–205
- Liu L, Li Y, Tollefsbol TO. "Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases". *Curr Issues Mol Biol*. 2008;10:25–36
- Lund G, Andersson L, Lauria M, Lindholm M, Fraga MF, Villar-Garea A, Ballestar E, Esteller M, Zaina S. „DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein". *E J Biol Chem*. 2004; 279:29147–29154
- Lund-Katz S, Phillips M C. "Packing of cholesterol molecules in human low-density lipoprotein". *Biochemistry* 1986; 25:1562-1568
- Lyon MF. "Gene action in the X-chromosome of the mouse". *Nature*.1961; 190:372–373
- Macleod D, Ali R R, Bird A. "An alternative promoter in the mouse major histocompatibility complex class II I-Abeta gene: implications for the origin of CpG islands". *Mol. Cell Biol*. 1998; 18:4433–4443
- Mahley RW, Innerarity TL, Weisgraber KH, Fry DL. „Canine Hyperlipoproteinemia and atherosclerosis. Accumulation of lipid by aortic medial cells in vivo and in vitro". *Am J Pathol*. 1977; 87(1):205–226
- Makar KW, Wilson CB. "DNA methylation is a nonredundant repressor of the th2 effector program". *J Immunol*. 2004;173:4402– 4406
- Mann J, Mann DA. "Epigenetic regulation of wound healing and fibrosis". *Current opinion in Rheumatology*. 2013; 25:1:101-107

- Maurer ME, Cooper JA. "The adaptor protein Dab2 sorts LDL receptors into coated pits independently of AP-2 and ARH". *J Cell Sci.* 2006; 119:4235–4246
- Maxfield F R, Wustner D. "Intracellular cholesterol transport". *J Clin Invest.*2002; 110(7):891–898
- Maxwell KN, Soccio RE, Duncan EM, Sehayek E, Breslow JL. "Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice". *J Lipid Res.* 2003;44(11):2109–2119
- McGill HC Jr, McMahan CA, Gidding SS. "Preventing heart disease in the 21st century: implications of the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Study". *Circulation.* 2008; 117:1216–1227
- McMahan CA, Gidding SS, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP, McGill HC Jr. "Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth risk scores are associated with early and advanced atherosclerosis". *Pediatrics.* 2006;118:1447–1455
- McPherson J D, Marra M, Hillier L., Waterston R H, Chinwalla A, Wallis J, Sekhon M, Wylie K, Mardis E R, Wilson RK. "A physical map of the human genome". *Nature.* 2001; 409, 934–941
- Moore K J und Tabas I. "Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis". *Cell.* 2011;145, 341–355
- Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H. "Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites". *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:8905–9
- Muller HJ. 1930. "Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*". *J Genet.* 1930; 22:299–334
- Nagai M, Meerloo T, Takeda T, Farquhar M G. „The adaptor protein ARH escorts megalin to and through endosomes". *Mol Biol Cell.* 2003; 14:4984–4996
- Nan X, Meehan R R, Bird A. "Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2" *Nucleic Acids Res.* 1993; 21:4886–4892
- Natesampillai S, Fernandez-Zapico ME, Urrutia R, Veldhuis JD. "A novel functional interaction between the Sp1-like protein KLF13 and SREBP-Sp1 activation complex underlies regulation of low density lipoprotein receptor promoter function". *J Biol Chem.* 2006;281(6): 3040–3047
- Ness GC, Lopez D. "Transcriptional regulation of rat hepatic low-density lipoprotein receptor and cholesterol 7 alpha hydroxylase by thyroid hormone". *Arch Biochem Biophys.* 1995; 323(2):404–408
- Olsson PA, Korhonen L, Mercer EA, Lindholm D. "MIR is a novel ERM-like protein that interacts with myosin regulatory light chain and inhibits neurite outgrowth". *J Biol Chem.* 1999;274(51):36288–36292

- Ponticorvo L, Rittenberg D, Bloch K. "The utilization of acetate for the synthesis of fatty acids, cholesterol, and protoporphyrin". *J Biol Chem* 1949; 179(2):839–842
- Prestridge, D S, Burks C. "The density of transcriptional elements in promoter and non-promoter sequences". *Hum Mol Genet.*1993; 2:1449–1453
- Raal FJ, Santos RD. "Homozygous familial hypercholesterolemia: current perspectives on diagnosis and treatment". *Atherosclerosis.* 2012; 223:262- 268
- Rader D J, Cohen J, Hobbs H H. "Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment". *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 1795–1803
- Radhakrishnan A, Goldstein JL, McDonald JG, Brown MS. "Switchlike control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance". *Cell Metab.* 2008;8(6):512–521
- Reik W, Constancia M, Fowden A, Anderson N, Dean W, Ferguson-Smith A, Tycko B, Sibley C. "Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes". *J Physiol* 2003; 547: 35–44
- Rohla M, Weiss T W. „Metabolic syndrome, inflammation and atherothrombosis“. *Hämostaseologie* 2013; 33: 283–294
- Rountree M R, Selker E U. "DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *Neurospora crassa*". *Genes Dev.* 1997 11:2383–2395
- Rudenko G, Henry L, Henderson K „Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH". *Science* 2002; 298(5602):2353–2358
- Russell DW, Schneider WJ, Yamamoto T, et al. „Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor". *Cell.* 1984; 37(2):577–585
- Sato R, Yang J, Wang X, „Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of Sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1)". *J Biol Chem.*1994;269(25):17267–17273
- Schubeler D, Lorincz M C, Cimborá D M, Telling A, Feng Y Q, Bouhassira E E, Groudine M, "Genomic targeting of methylated DNA: influence of methylation on transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation". *Mol. Cell.Biol.* 2000; 20:9103–9112
- Schultz J. "Interrelations of factors affecting heterochromatin-induced variegation in *Drosophila*". *Genetics* 1950; 35:134
- Shimano H, Shimomura I, Hammer RE. "Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene". *J Clin Invest.*1997;100(8):2115–2124

- Shimano H. "Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes". *Prog Lipid Res.* 2001;40(6):439–452
- Shin DJ, Osborne TF. "Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are connected through Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2 (SREBP-2)". *J Biol Chem.* 2003;278(36):34114–34118
- Shireman R, Kilgore LL, Fisher WR. "Solubilization of apolipoprotein B and its specific binding by the cellular receptor for low density lipoprotein". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977; 74(11):5150–5154
- Sibley CP, Coan PM, Ferguson-Smith AC, Dean W, Hughes J, Smith P, Reik W, Burton GJ, Fowden AL, Constancia M. "Placental-specific insulin-like growth factor 2 (IGF2) regulates the diffusional exchange characteristics of the mouse placenta". *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 8204–8208
- Simon Broome Register Group. "Risk of fatal coronary artery disease in familial hypercholesterolemia". *Br Med J* 1991;303:893–6
- Slack J. "Risk of ischemic heart disease in familial hyperlipoproteinemic states". *Lancet* 1969;2:1380–2.
- Slack J. "Risks of ischaemic heart-disease in familial hyperlipoproteinaemic states". *Lancet* 1969; 2:1380-1382
- Smilde T J, van den Bergmortel F W P J, Boers G H J "Carotid and femoral artery wall thickness and stiffness in patients at risk for cardiovascular disease, with special emphasis on hyperhomocysteinemia". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1958–63
- Smolarek I, Wyszko E, Barciszewska AM, Nowak S, Gawronska I, Jablecka A, Barciszewska MZ. "Global DNA methylation changes in blood of patients with essential hypertension". *Med Sci Monit.* 2010; 16: CR149–CR155
- Soccio R E, Breslow J L. "Intracellular cholesterol transport". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(7):1150–1160
- Soufi M, Rust S, Walter M, Schaefer J R. "A combined LDL receptor/LDL receptor adaptor protein 1 mutation as the cause for severe familial hypercholesterolemia". *Gene* . 2013; 521: 200–203
- Strahl BD, Allis CD. "The language of covalent histone modifications". *Nature.* 2000; 403:41–45
- Talens RP, Jukema JW, Trompet S." Hypermethylation at loci sensitive to the prenatal environment is associated with increased incidence of myocardial infarction". *Int J Epidemiol* 2012; 41:106- 115
- Talmud PJ, Shah S, Whittall R, Futema M, Howard P, Cooper J A, Harrison S C, Li K, Drenos F, Karpe F, Neil HA, Descamps O S, Langenberg C, Lench N, Kivimaki M, Whittaker J, Hingorani AD, Kumari M, Humphries S E. "Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study". *Lancet.* 2013; 381:1293-1301

- Tanaka K, Okamoto A. "Degradation of DNA by bisulfite treatment". *Bioorg Med Chem Lett*, 2007; 17:1912-1915
- Thompson GR, Soutar AK, Spengel FA. "Defects of receptor-mediated low density lipoprotein catabolism in homozygous familial hypercholesterolemia and hypothyroidism in vivo". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(4):2591–2595
- Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, Kremer D, Putter H, Stein AD," DNA-methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing and sex-specific". *Hum Mol Genet* 2009; 18:4046-53
- Urduingio R G, Sanchez-Mut J V, Esteller M. "Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies". *Lancet Neurol*. 2009; 8:1056–1072
- Usifo E, Leigh SE, Whittall RA, Lench N, Taylor A, Yeats C, Orengo C A, Martin A C, Celli J, Humphries S E. "Low-density lipoprotein receptor gene familial hypercholesterolemia variant database: update and pathological assessment". *Ann Hum Genet*. 2012;76(5):387-401
- Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. "Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing". *Mutation Research* 2008; 659: 40–48
- van Bockxmeer FM, Liu Q, Mamotte C, Burke V, Taylor R. "Lipoprotein lipase D9N, N291S and S447X polymorphisms: their influence on premature coronary heart disease and plasma lipids". *Atherosclerosis* 2001;157:123-129
- Versmissen J, Oosterveer DM, Yazdanpanah M. "Efficacy of statins in familial hypercholesterolaemia: a long term cohort study". *BMJ* 2008;337:a2423
- Villeneuve LM, Natarajan R. "The role of epigenetics in the pathology of diabetic complications". *An J Physiol Renal Physiol*. 2010; 299: F14–F25
- Wade P A, Archer K T, "Epigenetics: Environmental Instructions for the Genome". *Environmental Health Perspectives*. 2006; 114: 3
- Weber M, Davies J J, Wittig D, Oakeley E J, Haase M, Lam W L, Schubeler D. "Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells". *Nat. Genet*. 2005; 37: 853–862.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M. and Schubeler, D. (2007) "Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome". *Nat. Genet*. 39, 457–466
- Wiegman A, De Groot E, Hutten BA. "Arterial intima-media thickness in children heterozygous for familial hypercholesterolaemia". *Lancet*. 2004; 363(9406):369-370
- Yamamoto T, Davis CG, Brown MS. "The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA". *Cell*. 1984;39(1):27–38

- Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P. "LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor". *Science*. 2009;325(5936):100–104
- Zhang DW, Lagace TA, Garuti R "Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation". *J Biol Chem*. 2007; 282(25):18602–18612
- Zhi YF, Huang YS, Li ZH, Zhang RM, Wang SR. „Hypermethylation in promoter area of LDLR gene in atherosclerosis patients". *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao* 2007; 40:419-427
- Zhu J, He F, Hu S, Yu J. "On the nature of human housekeeping genes". *Trends Genet*. 2008; 24: 481–484

Handbooks:

- Biorad Tech Note 6004. A Practical Guide to High Resolution Melting Analysis. Biorad, 2000
- EpiTect® HRM™ PCR Handbook. Qiagen, 2009
- EpiTect® Bisulfite Handbook. Qiagen, 2009
- QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. Qiagen, 2012

Internetseiten und Datenbanken: Stand: 11.01.2014

- NCBI: National Center of Biotechnology Information:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- PrimerBLAST: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome
- EPD : Eukaryotic Promotor Database :
<http://epd.vital-it.ch/>
- DBCAT: DataBase of CpG islands and Analytical Tool :
<http://dbcat.cgm.ntu.edu.tw/>

7. Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Meilensteine der Epigenetik [Baccarelli et al. 2010]	5
Abbildung 2: DNA-Methylierung [Bernstein et al. 2007]	7
Abbildung 3: Aufbau von CpG Inseln [Baccarelli et al. 2010]	8
Abbildung 4: Übersicht des Lipoprotein Metabolismus [Hegele et al. 2009].....	13
Abbildung 5: Überblick der Aufnahme von LDL-Cholesterin in die Zelle [Fahed und Nemer 2011].....	17
Abbildung 6: Der LDL-Rezeptor [http://upload.wikimedia.org/wikiversity/en/c/c1/LDL_receptor.jpg Stand: 11.01.2014]	18
Abbildung 7: PDB-Domäne des LDLRAP1 [Dvira et al. 2012].....	21
Abbildung 8: Schematische Darstellung der von Guay et al. 2013 untersuchten Abschnitte des LDL-Rezeptors [Guay et al. 2013].....	25
Abbildung 9: CpG Inseln des LDL-Rezeptors [erstellt in DBCAT]	30
Abbildung 10: LDLR P1 R1	31
Abbildung 11: LDLR P1 L1	32
Abbildung 12: LDLR P2	32
Abbildung 13: LDLR P3	33
Abbildung 14: CpG Inseln des LDLRAP1 [erstellt in DBCAT].....	34
Abbildung 15: LDLRAP1	34
Abbildung 16: HRM Analyse des LDLR P1 R1	39
Abbildung 17: Agarose-Gelelektrophorese des LDLR P1 R1	40
Abbildung 18: HRM Analyse des LDLR P1 L1	41
Abbildung 19: Agarose-Gelelektrophorese des LDLR P1 L1	41
Abbildung 20: HRM Analyse des LDLR P2	42
Abbildung 21: Agarose-Gelelektrophorese des LDLR P2	43
Abbildung 22: HRM Analyse des LDLR P3	44

Abbildung 23: Agarose-Gelelektrophorese des LDLR P3	44
Abbildung 24: HRM Analyse des LDLRAP1 mit Primern für eine methylierte DNA-Sequenz	45
Abbildung 25: HRM Analyse des LDLRAP1 mit Primern für eine unmethylierte DNA-Sequenz	46
Abbildung 26: HRM Analyse des LDLRAP1 mit Primern für eine unmethylierte DNA Sequenz auf der linken und Primern für eine methylierte DNA Sequenz auf der rechten Seite des Amplikons.....	47
Abbildung 27: Agarose-Gelelektrophorese des LDLRAP1	48

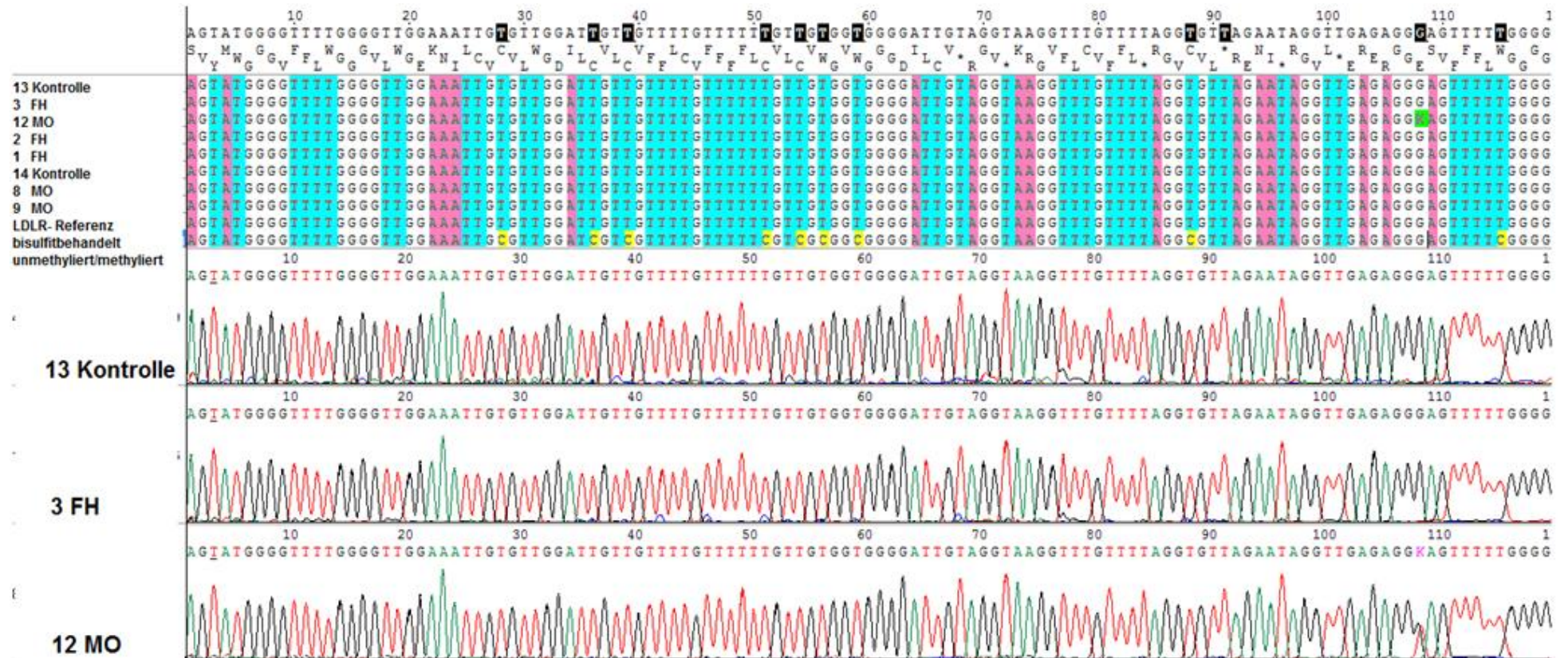
8. Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: PatientInnen Parameter.....	28
Tabelle 2: Primer LDLR P1 R1 [erstellt in Methprimer].....	31
Tabelle 3: Primer LDLR P1 L1 [erstellt in Methprimer]	32
Tabelle 4: Primer LDLR P2 [erstellt in Methprimer]	33
Tabelle 5: Primer LDLR P3 [erstellt in Methprimer]	33
Tabelle 6: Primer LDLRAP1 [erstellt in Methprimer].....	35

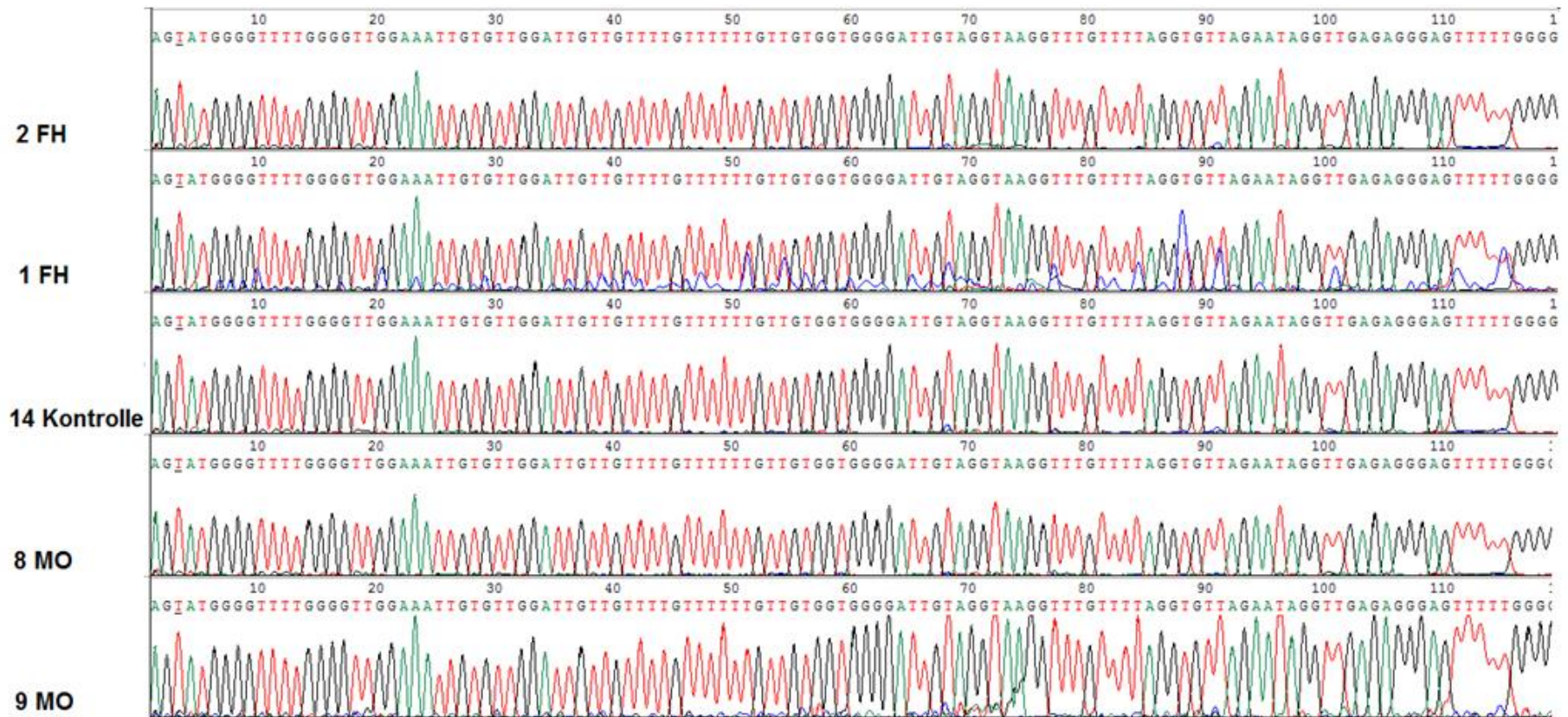
9. Anhang

9.1. Sequenzierungen

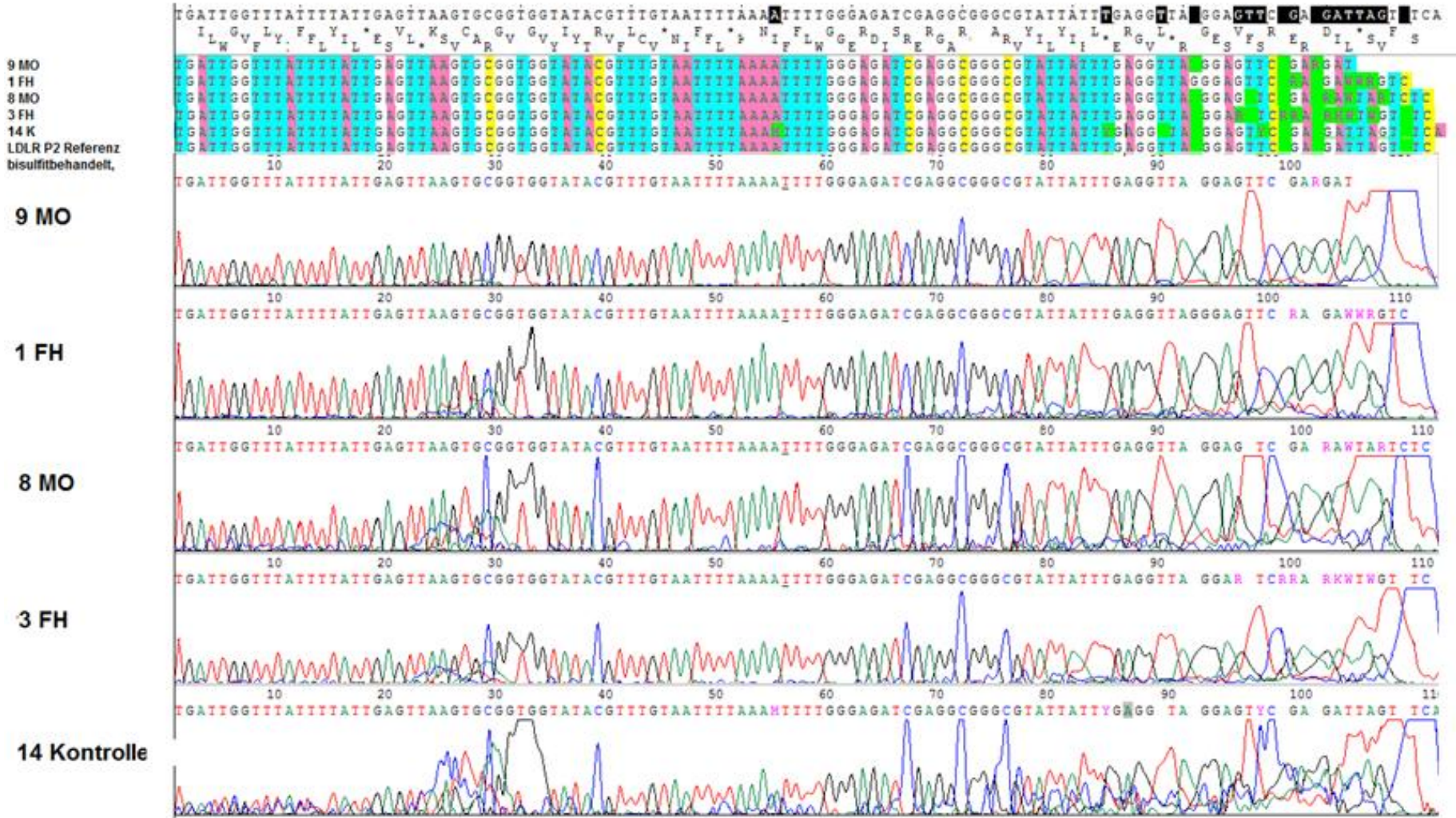
LDLR P1 R1: Sequenzierung- Teil 1



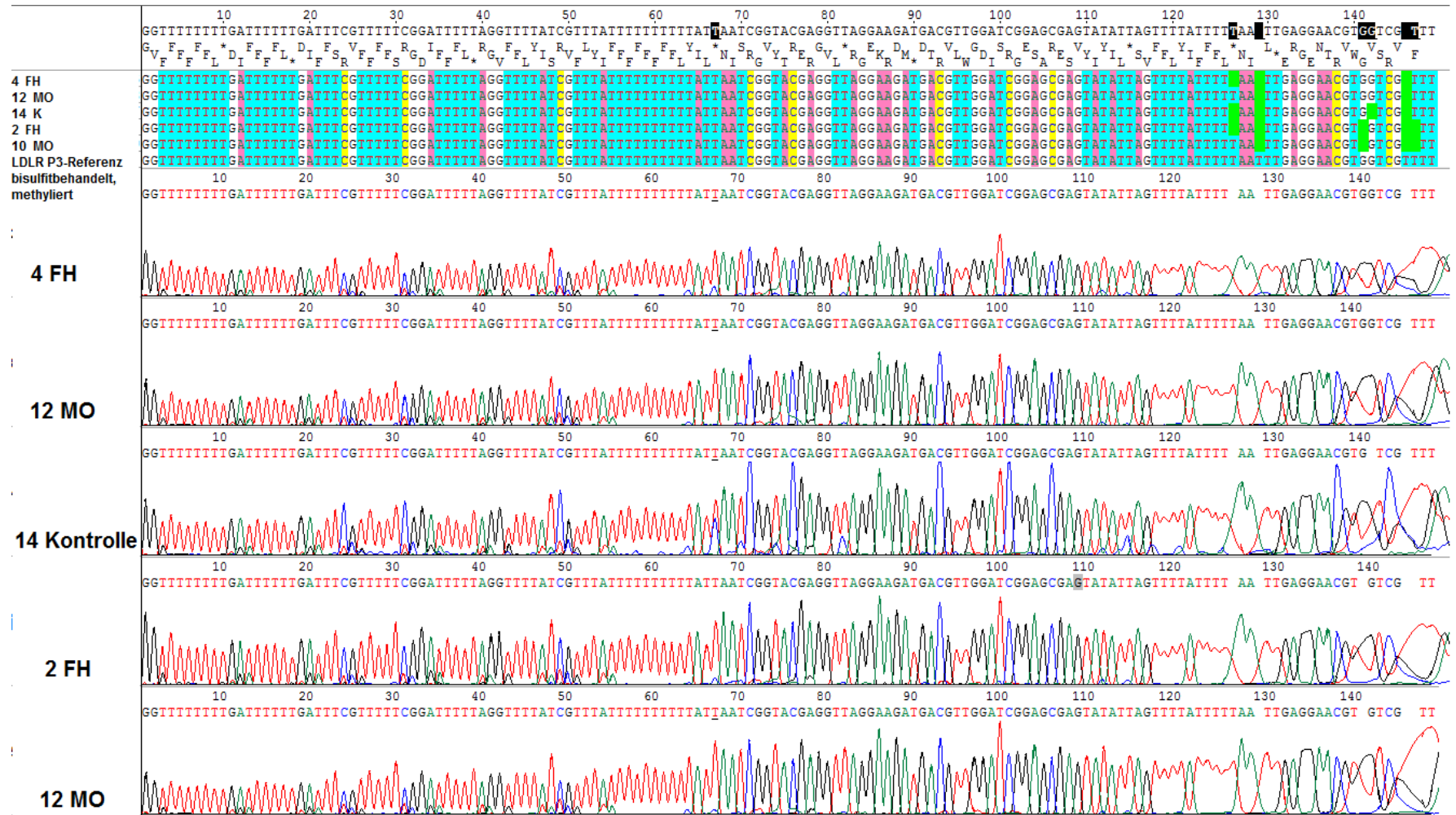
LDLR P1 R1- Sequenzierung: Teil 2



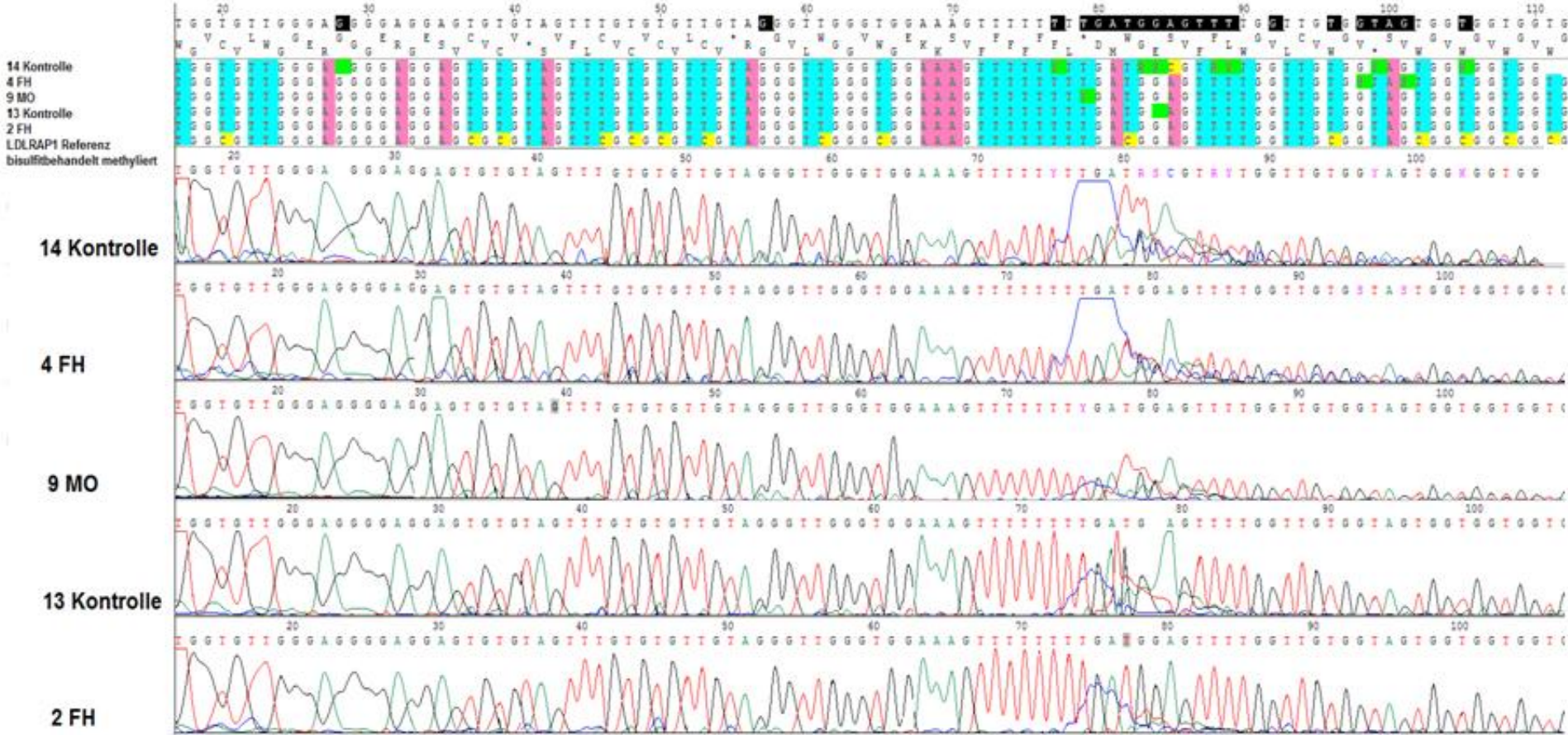
LDLR P2- Sequenzierung:



LDLR P3- Sequenzierung:



LDLRAP 1 P1 - Sequenzierung



9.2. Liste der verwendeten Kits und Chemikalien

Produkt	Firma
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen
EpiTect HRM P CR Kit	Qiagen
EpiTect PCR Control DNA Set (100)	Qiagen
5 x Loading Dye	Qiagen
RNase free water	Merck
Ethanol	Merck
Agarose, Electrophoresis Grade	Invitrogen TM life technologies USA
100bp DNA Ladder	Invitrogen TM life technologies USA
50xTAE, Tris/Acetic Acid/EDTA Buffer	Bio-Rad Laboratories Inc. Germany
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10000x in water	Biotium Inc. USA
Primer	VBC Genomics