

Martin Rexin  
Dr. med. Dr. rer. nat.

## **Kompetitive Reverse Transkription - Polymerase - Kettenreaktion (RT - PCR) zur Untersuchung der Apo $\epsilon$ - Genexpression**

Geboren am 22.03.1959 in Mannheim  
Reifeprüfung am 28.04.1978 in Ladenburg  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1993 bis SS 1998  
Physikum am 30.03.1994 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Pforzheim  
Staatsexamen am 13.05.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Herr Priv.-Doz. Dr. med. G. Feussner

Die klassische Methode zur Untersuchung der Expression von Genen besteht in der Analyse von deren mRNA mittels Gelelektrophorese, Blotting und anschließender Hybridisierung mit spezifisch markierten DNA - Sonden („Northern.Blot“). Diese Methode ist aufwendig und mit gewissen Nachteilen behaftet. Zum einen tendiert man immer mehr dazu, das Arbeiten mit Radioaktivität zu vermeiden, was zur Entwicklung fluoreszenzmarkierter DNA - Proben führte. Zum anderen werden für derartige Hybridisierungsexperimente große Mengen an mRNA benötigt, die bei der Untersuchung von nur wenigen Zellen einfach nicht zur Verfügung stehen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte ich daher eine hocheffiziente Methode auf der Basis einer Polymerase - Kettenreaktion (PCR), um die Expression eines Gens (Apo  $\epsilon$ ) in Makrophagen sowohl qualitativ als auch quantitativ nachzuweisen. Dabei wurde Gesamt - RNA zunächst mittels des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in die komplementäre DNA (cDNA) überführt. Anschließend wurden die cDNA - Kopien mithilfe einer hocheffizienten PCR zunächst qualitativ nachgewiesen. Zur Quantifizierung wurde dann ein spezifisches DNA - Standardfragment konstruiert, welches den einzelnen cDNA - Proben in definierter Konzentration zugegeben und in der PCR koamplifiziert wurde (interner Standard). Aufgrund identischer Primersequenzen kompetierte dieses Fragment die PCR - Amplifikation des Zielgens, wodurch die Quantifizierung desselben ermöglicht wurde (kompetitive PCR). Die Messungen konnten mit Gesamt - RNA - Mengen von nur 1 - 2  $\mu$ g durchgeführt werden.

Mittels der entwickelten Methode wurden die Apo  $\epsilon$  - mRNA - Konzentrationen in Makrophagen von Patienten mit Typ III - Hyperlipoproteinämie (HLP) gemessen und mit denen einer alters- und geschlechtsangeglichenen Kontrollgruppe verglichen. Patienten mit dieser familiären Fettstoffwechselstörung sind in aller Regel homozygot für ein Apo  $\epsilon$  - Allel ( $\epsilon$ 2), das für eine rezeptorbindungsdefekte Isoform des Apo E (E2) kodiert. Die Daten weisen darauf hin, daß dieses funktionell fehlerhafte Allel nahezu doppelt so stark exprimiert wird wie das des Wildtyps bei gesunden Probanden. Wir schließen, daß es sich dabei am ehesten um einen physiologischen Mechanismus zur Kompensation des defekten Genprodukts handelt.

Darüberhinaus wurde ein Patient mit klinisch schwerer Typ III - HLP und familiärem Apo E - Mangel hinsichtlich der Apo  $\epsilon$  - Genexpression untersucht. Bei diesem Patienten führt eine 10 bp - Deletion im vierten Exon des Apo  $\epsilon$  - Gens zur Bildung eines vorzeitigen Stop-Kodons, woraus die

Synthese eines verkürzten und offenbar sehr instabilen Apo E - Fragments resultiert. Da die DNA - Sequenz, die mittels der hier entwickelten PCR - Methode amplifiziert wird, in einem Bereich lokalisiert ist, der sich wesentlich weiter in 5'- Richtung („upstream“) dieser Deletion befindet, konnte ich zeigen, daß bei diesem Patienten dennoch eine normal hohe Apo ε - mRNA - Synthese vorlag. Hinsichtlich des molekularen Gendefekts unterscheidet sich dieser Patient somit von zwei anderen in der Literatur beschriebenen Fällen von familiärem Apo E - Mangel, bei denen kaum nachweisbare Mengen an Apo ε - mRNA gebildet werden.