

16. Kuypers AWHM, Linssen PCM, Mensink EJBM. Automatisering van de moleculaire diagnostiek met behulp van capillaire elektroforese. *Ned Tijdsch Klin Chem* 1996; 21: 235-238.
17. Smit ML, Giesendorf BAJ, Trijbels JMF, Vet JAM, Blom HJ. Automatisering van mutatie-analyse. *Ned Tijdsch Klin Chem* 1999; 24: 341-343.
18. Righetti PG, Gelfi C. Capillary electrophoresis of DNA for molecular diagnostics. *Electrophoresis* 1997; 18: 1709-1714.
19. Nay L, Sinclair R, Wang H, Xiong Y, Swerdlow H. Advances in multi-capillary DNA sequencing technology. *HPCE '97, Anaheim USA, 1997*.
20. Tan HD, Yeung ES. Integrated online system for DNA-sequencing by capillary electrophoresis – from template to called bases. *Anal Chem* 1997; 69: 664-674.
21. Slater GW, Kist TBL, Ren H, Drouin G. Recent developments in DNA electrophoretic separations. *Electrophoresis* 1998; 19: 1525-1541.
22. Mathies RA, Huang XC. Capillary array electrophoresis – An approach to high-speed, high-throughput DNA sequencing. *Nature* 1992; 359: 167-169.
23. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time Quantitative PCR. *Genome Methods: Genome Research* 1996; 986-994: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
24. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler – a microvolume multi-sample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997; 22: 176-181.

Summary

DNA and PCR fragment analysis by Capillary Electrophoresis. Smit ML, Linssen PCM, Giesendorf BAJ, Trijbels JMF, Blom HJ and Kuypers AWHM. Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 239-243.

Capillary Electrophoresis (CE) has obtained a respectable position in molecular diagnostics as analysis method for DNA and PCR fragments. Specific aspects, important for the separation of DNA fragments using CE, are the choice of capillary coating, the sieving matrix in the capillary and the method of detection. In this paper the possibilities and combinations are described.

Key-words: Capillary Electrophoresis; DNA; detection; automation

Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 243-250

ApoE-genotypering met capillaire gelelektroforese ApoE-isotype, meer dan alleen een risicofactor

J.E. de VRIES, P.A.H.M. WIJNEN, M.P. van DIEIJEN-VISSER en O. BEKERS

Binnen de moleculair biologische diagnostiek neemt het gebruik van capillaire gel elektroforese (CGE*) sterk toe. In dit artikel wordt ingegaan op de meerwaarde van capillaire gel elektroforese ten opzichte van de conventionele agarose slab gel elektroforese bij de genotypering van apoE. Het blijkt dat de resolutie en de detectie van DNA-fragmenten, verkregen na PCR en HhaI-digestie, beter is met capillaire gel elektroforese dan met agarose slab gel elektroforese. Tevens is het onderscheid tussen apoE2/E2 en apoE2/E3 genotypen met capillaire gelelektroforese aanmerkelijk betrouwbaarder dan met agarose slabgelelektroforese bij een lage opbrengst van de PCR. De fysiologische context waarin apoE zijn rol speelt wordt steeds duidelijker, en hiermee ook de effecten van de verschillende isovormen van apoE in diverse ziektebeelden. De twee belangrijkste voorbeelden hiervan zijn familiale dysbètalipoproteïnemie en de ziekte van Alzheimer. Gaandeweg kan hierdoor de

bepaling van het apoE-genotype evolueren van risicofactor tot voorspeller van een eventuele respons op therapie.

Trefwoorden: capillaire gelelektroforese; apoE; PCR; familiale dysbètalipoproteïnemie; ziekte van Alzheimer; hormoonvervangende therapie

Het apolipoproteïne E (apoE) eiwit speelt een belangrijke rol in het lipidenmetabolisme door zijn bijdrage aan het cholesterol- en triglyceridentransport in het lichaam (1). Ontregelingen in het transport van lipiden zijn een belangrijke oorzaak van afwijkingen in de serumconcentraties van totaal - en LDL-cholesterol, welke weer gerelateerd zijn aan het risico op de ontwikkeling van hart- en vaatziekten (2). Samenhangend met hun rol in het lipidenmetabolisme hebben de verschillende isovormen van apoE een invloed op de grootte van de kans op de ontwikkeling van hart- en vaatziekten (3). Eveneens zijn apoE-isotypen in verband gebracht met de leeftijd waarop de ziekte van Alzheimer zich kan manifesteren (4). Recent onderzoek heeft meer inzicht verschaft in de manier waarop de verschillende isovormen van apoE hiertoe bijdragen. ApoE-isotypebepaling op eiwitniveau is gebaseerd op de ladingsverschillen tussen de apoE-isovormen. Ladingsverschillen kunnen ook ontstaan door variaties in de glyceringsgraad, wat de interpretatie van het eiwitpatroon na elektroforese soms bemoeilijkt. Genotypering van het apoE-isotype heeft

Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch ziekenhuis Maastricht

Correspondentie: Dr. J.E. de Vries, Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Maastricht, Prof. Debyelaan 25, 6229 HX Maastricht.
E-mail: JDVR@klinchem.azM.NL

*: Voetnoot: Afkortingen: CGE: capillaire gelelektroforese; AGE: agarose slabgelelektroforese; PAGE: polyacrylamide gelelektroforese; bp: base paren

hier geen last van (5, 6). Door de opkomst van de "polymerase chain" reactie (PCR) gebeurt de bepaling van het apoE-isotype tegenwoordig veelal niet meer op eiwit- maar op genniveau. PCR is een techniek die specifieke gedeelten van genomisch DNA vermenigvuldigt. Bij apoE gaat het om een fragment van 244 baseparen (bp), coderend voor de aminozuurresiduen 91-165 (7). Het restrictie enzym *HhaI* splitst DNA bij de nucleotidevolgorde 5'-GCG↓C-3'. Het onderscheid tussen de verschillende apoE-genotypen berust op basepaar-substituties die knipplaatsen voor *HhaI* laten verdwijnen of laten ontstaan. Het patroon van DNA-fragmenten na digestie met *HhaI* en gel elektroforese is karakteristiek voor het betreffende apoE-genotype. Standaard worden DNA-fragmenten zichtbaar gemaakt door UV-bestraling van ethidiumbromide-DNA-complexen in agarose slab gels. De bereiding van deze slab gels is echter bewerkelijk en veel DNA is vereist voor een duidelijk waarneembaar patroon. Tevens is het onderscheid tussen bepaalde apoE-isovormen moeilijk, doordat het scheidend vermogen van agarose slab gel elektroforese (AGE) of polyacrylamide gel elektroforese (PAGE) rond de 40 bp en kleiner beperkt is (8). Capillaire gel elektroforese (CGE) ondervangt deze tekortkomingen. Het is een relatief nieuwe techniek die zowel kenmerken vertoont van de conventionele AGE of PAGE als van HPLC. Een hoog scheidend vermogen wordt gegenereerd door gel elektroforese bij hoge voltages uit te voeren in een nauw capillair met interne diameters variërend van 20 tot 200 µm. In eerste instantie is capillair elektroforese met name toegepast voor scheiding van eiwitten (9, 10), maar scheiding van DNA-fragmenten is ook zeer goed mogelijk (11, 12). De voordelen van een klein samplevolume, hoge resolutie en hoge gevoeligheid, waren voor ons de aanleiding om CGE als detectiemethode te vergelijken met AGE. Dit artikel beoogt een korte impressie te geven van het gebruik van CGE ten opzichte van AGE bij apoE-genotypering. In de discussie is tevens aandacht besteed aan de fysiologie van de apoE-isovormen wat betreft hun effect op het lipidenmetabolisme en hieruit voortvloeiend, het belang van apoE-genotypering voor diagnostiek en patiëntgerichte therapie.

MATERIAAL en METHODEN

Isolatie van genomisch DNA

EDTA-bloed werd 15 minuten afgedraaid bij 1500 g bij 20°C. De buffy coat werd overgebracht met behulp van een wegwerp plastic pipet naar een 1,5 ml plastic schroefdop buis en opgeslagen bij -20°C of meteen verwerkt. Genomisch DNA werd uit de buffy coat geïsoleerd met de High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Molecular Biochemicals, 1 796 828) volgens de instructies van de firma.

ApoE, PCR en *HhaI*-digestie

De gebruikte primers waren identiek aan de primers F6/ F4 zoals beschreven door Hixson en Vernier (7). De reactiemix bevatte 1 µl genomisch DNA; 67 mM Tris-HCl; pH 8,4; 17 mM (NH₄)₂SO₄; 6,7 mM MgCl₂; 0,01% gelatine; 0,1% Triton-X-100; 0,4 µM primer

F6 en 0,4 µM primer F4 (beide Amersham/ Pharmacia Biotech Inc.); 80 µM dNTP's PCR-grade (Roche Molecular Biochemicals) en 2 µl DMSO (Merck). De PCR werd uitgevoerd met de PTC-200 DNA Engine (MJ Research) met het volgende programma: Denaturatie van genomisch DNA gedurende 5 minuten bij 96°C, vervolgens werd 0,7 U Taq polymerase (Amersham/ Pharmacia Biotech Inc.) toegevoegd bij 72°C. Het eindvolume van de PCR-mix is dan 25 µl. Daarna een korte denaturatiestap van 1 minuut bij 92°C, gevolgd door 30 cycli bestaande uit de volgende stappen: 1 minuut bij 65°C; 1,5 minuut bij 72°C en 1 minuut bij 92°C. Als laatste vond een synthese stap plaats gedurende 5 minuten bij 72°C, afgesloten met een snelle afkoeling naar 20°C. Aan 9,5 µl PCR-mix werden 5 Units *HhaI* (Amersham/Pharmacia Biotech Inc.) toegevoegd en 1,5 uur bij 37°C geïncubeerd. De negatieve controle bij iedere PCR-serie was 1 µl water in plaats van genomisch DNA en werd behandeld als hierboven beschreven. DNA-fragmenten werden niet aangetoond in de negatieve controle na PCR.

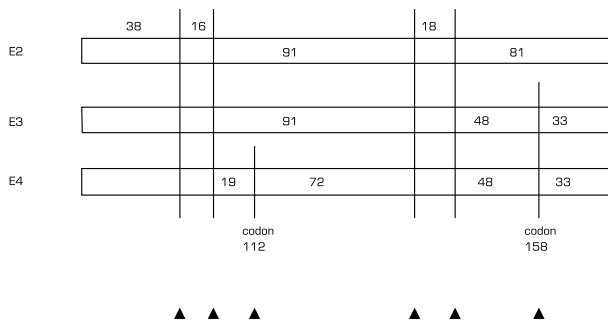
Analyse van gedigesteerde PCR-producten

AGE

Op een zelf bereide 3% MS agarose gel (Roche Molecular Biochemicals, 1 816 578) met ethidiumbromide (0,3 µg/ ml gel) werd 8 µl *HhaI*-gedigesteerd PCR-product met 2 µl loading buffer (40% sucrose + orange G) opgebracht. Scheiding van de *HhaI*-gedigesteerde PCR-producten gebeurde gedurende 15, 30 of 45 minuten bij een voltage van 10,7 V/cm met als running buffer 0,5xTBE-buffer (pH 8,3; 45 mM Tris; 45 mM boorzuur en 1,25 mM EDTA). Voor detectie van de DNA-fragmenten werd de gel blootgesteld aan UV-licht (Salm en Kip bv) en gefotografeerd met Polaroid polapan.

CGE

De analyse van de gedigesteerde PCR-producten met CGE vond plaats met een P/ACE 5500 systeem (Beckman Coulter Instruments Inc.) aangestuurd door een IBM 330-450-DX computer met P/ACE System Gold software. Een eCAP™ DNA capillary (Beckman Coulter Instruments Inc.) met een interne diameter van 100 µm en een lengte van 27 cm (20 cm tot de detector) werd geplaatst in een P/ACE LIF cartridge en 3 minuten voorgespoeld met gelbuffer (1,5 ml 4% polyacrylamide/1xTBE + 4,5 µl LIFluor™ dsDNA 1000 Enhance) onder hoge druk (20 psi). Vervolgens werd 12 seconden gespoeld met 1xTBE-buffer onder lage druk (0,5 psi), en werd het monster geladen. Van 1 µl gedigesteerd PCR-product in 300 µl milliQ werd een fractie opgezogen via elektrokinetische injectie bij de anode gedurende 20 seconden bij 10 kV. De scheiding van de DNA-fragmenten duurde 6 minuten bij 10 kV in gelbuffer. De detectie geschiedde bij de kathode via excitatie bij 488 nm door een Argon-ion laser en meting van de emissie bij 520 nm. Na elke run werd 30 seconden gespoeld met 1 M HCl en vervolgens 30 seconden met H₂O (Millipore). Data analyse werd uitgevoerd met System Gold Software (Beckman Coulter Instruments Inc.).



Figuur 1. *HhaI*-restrictie kaart van apoE. Cijfers duiden op de grootte van de DNA-fragmenten in baseparen van de verschillende apoE-isotypen na digestie met *HhaI*. Gesloten driehoeken geven de knipplaatsen aan van *HhaI*. Bij codon 112 en 158 alleen indien arginine aanwezig is. In afnemende volgorde van voorkomen zijn de volgende combinaties mogelijk: E3/E3 (62%); E3/E4 (19%); E2/E3 (15%); E2/E4 (2,3%); E4/E4 (1,5%); E2/E2 (0,5%) (uit referentie 8).

Statistiek

De F-toets werd gebruikt om na te gaan of de variatie tussen twee groepen van elkaar verschilden. De significantie van verschillen tussen de gemiddelden van twee groepen werd vastgesteld met Student's *t*-toets. Alle P-waarden zijn eenzijdig en waarden lager dan 0,05 werden beschouwd te duiden op een statistisch significante betekenis.

RESULTATEN

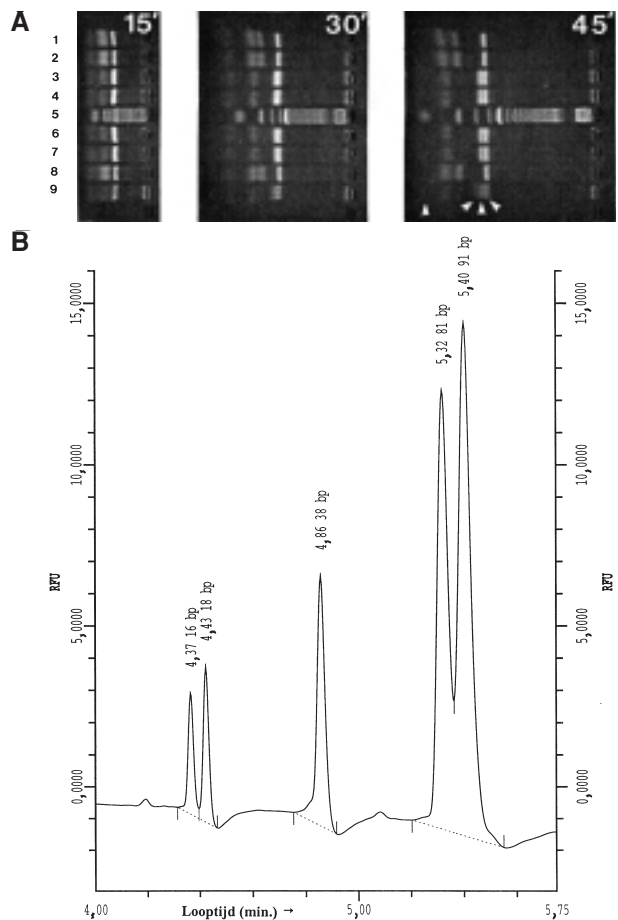
Bandenpatroon apoE-PCR-product na *HhaI* digestie

Algemeen

Na digestie van het apoE-PCR-product komt een complex patroon van DNA-fragmenten naar voren, uiteenvallend in twee groepen: 1. DNA-fragmenten die steeds terugkeren ongeacht het apoE-isotype (16, 18 en 38 bp) en; 2. DNA-fragmenten die specifiek zijn voor een bepaald apoE-isotype (Fig. 1). Hiervan zijn de grootste DNA-fragmenten (91, 81 en 72 bp) goed bruikbaar voor zowel AGE als voor CGE. Deze banden zijn namelijk met beide methodieken goed zichtbaar en goed van elkaar te onderscheiden (Fig. 2).

apoE-homozygotie

Relatief makkelijk is onderscheid te maken in het geval er sprake is van homozygotie. Dan is de combinatie van 91 en 81 bp DNA-fragment bevestigend voor apoE2/E2 (Fig. 2), alleen een 91 bp DNA-fragment is bevestigend voor apoE3/E3 en de aanwezigheid van alleen een 72 bp DNA-fragment is bevestigend voor apoE4/E4. Het 19 bp DNA-fragment is eveneens specifiek voor apoE4, maar is niet zichtbaar met AGE. Het is wel zichtbaar met CGE als een schouderpiek rechts van het 18 bp fragment bij apoE2/E4 en apoE3/E4 en als een discrete piek bij apoE4/E4. Het 19 bp DNA-fragment, evenals de 16- en de 18 bp DNA-fragmenten, zijn relatief kort, waardoor minder ethidiumbromide kan intercaleren en het complex maar zwak oplicht na bestraling met UV-licht. De 16- en de 18 bp DNA-fragmenten zijn wel afzonderlijk

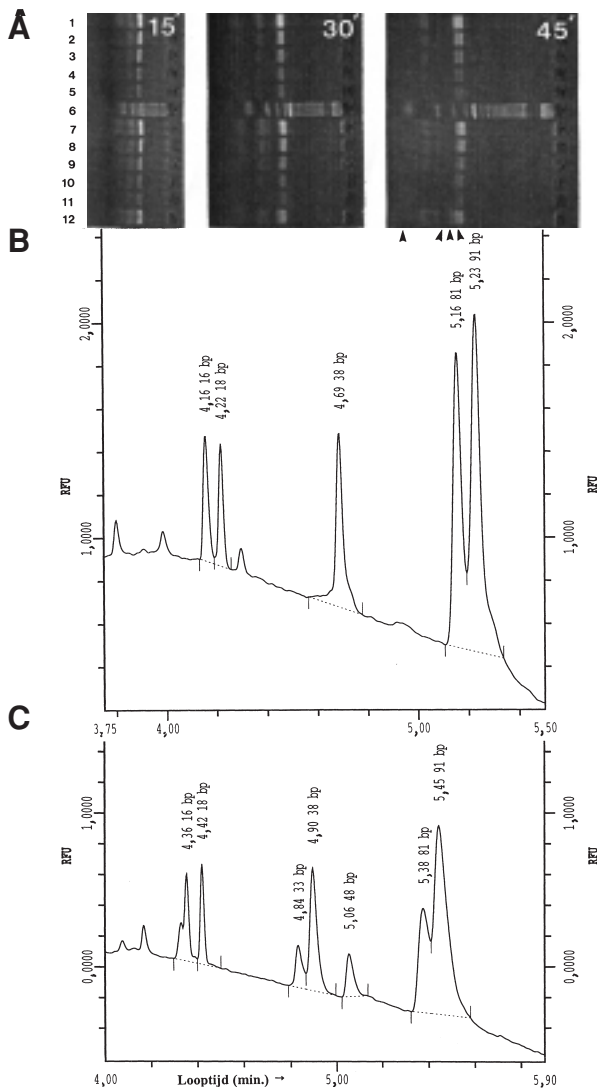


Figuur 2. Loopsnelheid en resolutie van AGE versus CGE. A: AGE na 15, 30 en 45 minuten looptijd. Alle lanen bevatten 8 μ l *HhaI*-gedigesteerd apoE-PCR-product, behalve laan 5 met 1 μ l 25-bp ladder. Materiaal is afkomstig van patiënten met genotype apoE3/E3 (laan 1, 2 en 8) en apoE2/E2 (laan 3, 4, 6 en 7). Laan 9 bevat de positieve controle met genotype apoE2/E4. De witte pijlpunten liggen van links naar rechts op één lijn met de 25, 72, 81 en 91 bp DNA-fragmenten. B: CGE van dezelfde batch *HhaI*-gedigesteerd apoE2/E2 PCR-product als opgebracht in laan 4. Na opname van 1 μ l in 300 μ l milliQ is de CGE uitgevoerd als beschreven in materiaal en methoden. Merk op dat de 16- en 18 bp DNA-fragmenten van elkaar gescheiden zijn onder deze condities. Looptijd is bijna 6 minuten. De grootte van de DNA-fragmenten in bp en de tijd van detectie in minuten zijn boven de pieken gezet.

waarneembaar met CGE (Fig. 2 en 3). Aangezien deze DNA-fragmenten, net als het 38 bp DNA-fragment, in elk apoE-genotype voorkomen, zijn ze niet bruikbaar om de verschillende apoE-varianten van elkaar te onderscheiden.

apoE-heterozygotie

Het patroon wordt complexer indien er sprake is van heterozygotie. Het gaat dan om combinaties van banden die aangeven welke apoE-isotypen aanwezig zijn. De combinatie van 91 bp en 72 bp DNA-fragmenten is alleen mogelijk bij de samenstelling apoE3/E4 (Fig. 1). Zijn de drie grootste DNA-fragmenten aanwezig dan kan er alleen maar sprake zijn van een samenstelling apoE2/E4 (Fig. 1). Bij de combinatie 91 bp en 81 bp DNA-fragmenten moet er gekeken worden naar de aan- of afwezigheid van het 48 bp DNA-



Figuur 3. Gevoeligheid van AGE versus CGE. A: AGE na 15, 30 en 45 minuten looptijd. Lanen 1-5 bevatten respectievelijk 8, 4, 2, 1 en 0.5 μ l HhaI-gedigesterd apoE2/E2 PCR-product; lanen 7-11 bevatten respectievelijk 8, 4, 2, 1 en 0.5 μ l HhaI-gedigesterd apoE2/E3 PCR-product. Laan 12 bevat de positieve controle met genotype apoE2/E4. Laan 6 bevat 1 μ l 25-bp ladder. De zwarte pijlpunten liggen van links naar rechts op één lijn met de 25, 72, 81 en 91 bp DNA-fragmenten. Merk op dat het 48 bp DNA-fragment van apoE2/E3 niet detecteerbaar is in laan 10 en 11. B: CGE van dezelfde batch HhaI-gedigesterd apoE2/E2 PCR-product opgebracht in de lanen 1-5. Na opname van 1 μ l in 300 μ l milliQ is het sample 64 maal verdund voor CGE. Merk op dat de 33 en 48 bp DNA-fragmenten ontbreken. De RFU is een factor 10 lager dan in figuur 2B. C: CGE van dezelfde batch HhaI-gedigesterd apoE2/E3 PCR-product opgebracht in de lanen 7-11. Na opname van 1 μ l in 300 μ l milliQ is het sample 64 maal verdund voor CGE. Merk op dat de 33 en 48 bp DNA-fragmenten als discrete pieken aanwezig zijn. De RFU is een factor 10 lager dan in figuur 2B.

fragment. Is dit niet aanwezig, dan is er sprake van een homozygote samenstelling apoE2/E2 (Fig. 1 en 2). Is het 48 bp DNA-fragment wel aanwezig, dan is er sprake van een heterozygote samenstelling apoE2/E3 (Fig. 3).

Resumerend zijn de karakteristieke DNA-fragmenten bij een homozygote samenstelling als volgt: apoE2/E2 \rightarrow 91 en 81; apoE3/E3 \rightarrow 91; apoE4/E4 \rightarrow 72. Bij een heterozygote samenstelling: apoE2/E3 \rightarrow 91, 81 en 48; apoE2/E4 \rightarrow 91, 81 en 72; apoE3/E4 \rightarrow 91 en 72.

Loopsnelheid en resolutie van AGE versus CGE

De scheiding van PCR-producten vindt aanmerkelijk sneller plaats met CGE dan met AGE. Na minimaal 15 of 30 minuten is met AGE geen interpretatie te geven. Dit kan pas na 45 minuten, terwijl dat al na 6 minuten kan met CGE (Fig. 2 en 3). Het voltage verhogen bij AGE is een mogelijkheid om de migratiesnelheid van de DNA-fragmenten te verhogen, maar dit gaat ten koste van de resolutie. Bij CGE kunnen de injectiecondities en de gelbereiding de resolutie van DNA-fragmenten verhogen. Zelf bereide polyacrylamide gel in TBE (receptuur afkomstig van P. Linssen, AZN, Nijmegen en Y. Henskens, SSDZ Delft: persoonlijke mededelingen) geeft bij een percentage van 4% een optimale scheiding voor CGE bij de apoE-genotypering, die de resolutie van DNA-fragmenten rond de 40 bp behaald bij AGE verre overtreft (Fig. 2). Piekresolutie bij CGE, net als bij AGE, is minder naarmate de gel sterker wordt overladen. Gezien de wisselende opbrengsten van een PCR is het verstandig om bij een mindere piekresolutie hiermee rekening te houden. Een tweede CGE-run met minder DNA kan dan de scheiding van de DNA-fragmenten verbeteren. Minder DNA opbrengen kan bij CGE eenvoudig door de duur van de elektrokinetische injectie te verkorten of het monster op de gel injecteren bij een lager voltage. Verder lijkt het zo te zijn dat de kwaliteit van het capillair door gebruik vermindert. Momenteel wordt bijgehouden hoeveel runs met een capillair kunnen worden uitgevoerd. Het blijkt dat het capillair na 150 runs nog goed voldoet, maar na 200 runs wordt de resolutie van de DNA-fragmenten minder ($n=1$).

Gevoeligheid van AGE versus CGE

Bij weinig PCR-product is de aan- of afwezigheid van het 48 bp DNA-fragment met AGE lastig vast te stellen, terwijl het 48 bp DNA-fragment met CGE nog goed aantoonbaar is en ongeveer 5% beslaat van het totaal oppervlak van alle pieken tezamen (Fig. 3 en tabel 1). Opbrengen van afnemende volumina HhaI-gedigesterd PCR-product van een goed verlopen PCR laat zien dat minimaal 2 μ l van de 10 μ l HhaI-digestie mix nodig is bij AGE om het 48 bp DNA-fragment te detecteren. Standaard wordt voor CGE 1 μ l van de 10 μ l HhaI-digestie verdund in 300 μ l milliQ en een fractie hiervan wordt op de gel in de capillair gezogen na elektrokinetische injectie. Het blijkt dat deze verdunning nogmaals 64 maal verdund kan worden, zonder de discrete piek te verliezen van het 48 bp DNA-fragment (Fig. 3). Tevens is het 33 bp DNA-fragment te zien bij elke verdunning (Fig. 3). Ook een 128-voudige verdunning geeft nog discrete 33 en 48 bp pieken, maar dan alleen door verlenging van de elektrokinetische injectieduur met een factor 3 tot 60 seconden, zodat meer DNA wordt opgebracht. Meer DNA opbrengen bij AGE kent een bovengrens die gelijk is aan het maximale volume van de opbrengplaats.

Onderscheid tussen apoE2/E2 en apoE2/E3 met CGE

Naast de aan- of afwezigheid van het 48 bp DNA-fragment is een tweede bruikbaar criterium voor het

Tabel 1. Piek karakteristieken van apoE2/E2 en apoE2/E3 genotypen PCR en CGE van apoE2/E2 materiaal is uitgevoerd in duplo op twee verschillende dagen. De within-run variatie coëfficiënt was minder dan 5%. PCR en CGE van apoE2/E3 materiaal is in enkelvoud uitgevoerd. De verschillen tussen apoE2/E2 en apoE2/E3 zijn statistisch significant volgens de Student's *t*-toets bij eenzijdig toetsen met $P < 0,01$.

genotype	n	48 bp percentage (sd)	81 bp percentage (sd)	81/91 ratio (sd)
apo E2/E2	4	0 (0,00)	33 (0,88)	0,89 (0,11)
apo E2/E3	7	5,2 (0,98)	21 (3,8)	0,61 (0,08)

onderscheid tussen apoE2/E2 en apoE2/E3 de verhouding tussen de piekoppervlakten van de 81 en 91 bp DNA-fragmenten. Voor alle samples die tot dusverre als apoE2/E2 en apoE2/E3 zijn gekarakteriseerd is dit bepaald (Tabel 1). De verhouding van de 81 bp/91 bp piekoppervlakte is voor apoE2/E3 statistisch significant kleiner ($P < 0,01$) dan voor apoE2/E2 (Fig. 3, tabel 1). Een derde optie is de bepaling van het piekoppervlakte percentage van het 81 bp DNA-fragment. Dit is voor apoE2/E2 statistisch significant groter ($P < 0,01$) als voor apoE2/E3 (tabel 1).

DISCUSSIE

AGE versus CGE

De belangrijkste voordelen van CGE ten opzichte van AGE zijn de hogere gevoeligheid voor en de betere resolutie van DNA-fragmenten. Verder is de looptijd voor individuele samples korter voor CGE dan voor AGE. De eventuele tijdswinst hier valt echter weg tegen het feit dat AGE batchgewijs ingezet kan worden. Ontwikkelingen zijn echter gaande om meerdere capillairen tegelijk te kunnen gebruiken (array CGE), waardoor CGE, net als AGE, ook batchgewijs ingezet kan worden (13). Nadelig is de CGE voor wat betreft de kosten en de expertise die nodig is om de techniek goed uit te voeren. De kosten zijn nog niet inzichtelijk, zolang het aantal elektroforeses dat gemiddeld met een capillair kan worden gedraaid niet bekend is. Naarmate de capillair langer in gebruik is, vermindert de resolutie. Dit berust misschien op "slijtage" van de coating. Als dat zo is, dan wordt het effect van de elektro-osmotische flow (zie elders in dit tijdschrift) op de migratie van DNA-fragmenten groter. Dit kan mogelijk een rol spelen bij de afname van het scheidend vermogen van de capillair bij langdurig gebruik. Het onderscheid tussen apoE2/E2 en apoE2/E3 berust bij AGE op de aanwezigheid van het 48 bp DNA-fragment. Bij weinig materiaal is het lastig om deze band met AGE aan te tonen. Dat dit tot misclassificatie kan leiden blijkt uit een studie van Schlenck et al (8). Ongeveer 1/3 van AGE-geclassificeerde apoE2/E2 genotypen bleek met CGE apoE2/E3 te zijn. Ook meldt deze studie dat ongeveer 1% van AGE-geclassificeerde apoE2/E3 genotypen, met CGE geen apoE2/E3- maar apoE2/E2-genotypen bleken te zijn (8). In ons onderzoek lijkt bevestigd dat piekratio's of piekpercentages bruikbare criteria zijn voor de cor-

recte classificatie van apoE-genotypen. Dit is met name van klinisch belang bij de classificatie apoE2/E2 omdat dit label diagnostisch gezien zeer relevant is (zie onder). Gegeven het bovenstaande en indachtig de lage frequentie waarmee apoE2-allelen in de bevolking voorkomen is AGE bruikbaar als eerste keus bij een goede PCR-productopbrengst. Is er sprake van een mogelijke apoE2/E2-of apoE2/E3-classificatie, dan is het aan te bevelen dit te bevestigen middels CGE. De duidelijke meerwaarde van CGE ligt in het feit dat er geen risico is op een misclassificatie, mits bovengenoemde criteria in acht worden genomen. De (81/91) piekratio bij de apoE-genotypering geeft in feite aan of er één (apoE2/E3) dan wel twee (apoE2/E2) apoE2-allelen aanwezig zijn. De verhouding tussen de twee piekoppervlakten is hier van meer belang dan de absolute hoeveelheid van het PCR-product dat de oppervlakte van de piek bepaalt. Dit is goed meetbaar met CGE maar niet met AGE. Hier heeft CGE een meerwaarde ten opzichte van AGE. Een verdere toepassing van CGE binnen moleculair biologische diagnostiek kan dus liggen bij diagnostiek waarin verhoudingen belangrijk zijn. Een voorbeeld hiervan is amplificatie van een oncogen in tumoren. De verhouding tussen het piekoppervlak van een geamplificeerd oncogen en een huishoudgen is bruikbaar om een schatting te kunnen geven over de mate van amplificatie. Momenteel wordt door ons een studie verricht naar de bruikbaarheid van een primerset waarmee het mogelijk is om amplificatie vast te kunnen stellen van het c-Myc-gen met CGE na PCR (14, 15).

Fysiologie van apoE-isotypen

Met uitzondering van LDL is ApoE een structurele eiwitcomponent van elke klasse van lipoproteïnen en met name van chylomicronen, VLDL en hun remnants. Lipoproteïnen vervoeren cholesterol en triglyceriden in de circulatie. Zij bestaan uit een kern van een mengsel van triglyceriden en cholesterolesters, omgeven door een schil van fosfolipiden, cholesterol, en verschillende apo-eiwitten. Opname door de lever van deze lipoproteïnen gaat via de LDL-receptor en het LDL-receptor-related proteïne (LRP) en is sterk afhankelijk van het apoE-isotype. Dit geldt ook voor de remnants van chylomicronen en VLDL. Remnants ontstaan doordat endotheliaal gebonden lipoproteïne-lipase (LPL) triglyceriden afsplitst van chylomicronen en VLDL. Door dit proces wordt in de circulatie VLDL omgezet naar LDL. De lipolytische activiteit in weefsel en dus de mate van omzetting, wordt ook gemoduleerd door het apoE-isotype (1). Kortom, verschillende allelen van het apoE-gen beïnvloeden dus het lipidmetabolisme elk op een specifieke wijze. De meest voorkomende apoE-allelen coderen voor de apoE-isotypen E2, E3, en E4. Van deze drie komt het apoE3-allel verreweg het meeste voor en wordt daarom beschouwd als het wild type (Fig. 1). Ten opzichte van E3 heeft E4 op de aminozuur positie 112 arginine in plaats van cysteine (Fig. 1). Door deze verandering heeft E4 ten opzichte van E3 en E2 een hogere affiniteit voor VLDL (Tabel 2). De opname van VLDL door de lever via de LDL-receptor

Tabel 2. Karakteristieken van apoE-isotypen. Informatie in de tabel is afkomstig van de referenties 1, 16 en 22.

apo	(LDL)	(tot. Chol.)	Affiniteit voor	Affiniteit LDL-rec.	Lipolyse	Aff. amyloid-beta	Ziekte associatie
E2	95%	95%	HDL>VLDL	1% -2%	Laag	100%	Type III hyp. lip. prot.
E3	100%	100%	HDL>VLDL	100%	Normaal	100%	Geen
E4	105%	105%	VLDL>HDL	100%	Normaal	> 100%	Ziekte v. Alzheimer

neemt toe en hierdoor stijgt de intracellulaire cholesterolconcentratie. De verhoging van de intracellulaire cholesterolconcentratie verlaagt de expressie van de LDL-receptor, wat de klaring van LDL door de lever vertraagt. Dit heeft als gevolg dat de LDL-spiegel in het bloed stijgt (5, 16). Vergeleken met apoE3 heeft apoE2 op de aminozuurpositie 158 een cysteine in plaats van een argininemolecuul (Fig. 1). Dit vermindert de affiniteit van apoE2 voor de LDL-receptor sterk. Ten opzichte van apoE3 is dit nog maar 1 - 2% (1). Eveneens is VLDL met apoE2 een minder goed substraat voor LPL dan VLDL met apoE3 of apoE4 (1). De toename van apoE2 in de schil van VLDL gaat ten koste van apoC-II, een essentiële co-factor voor LPL. De verdringing van apoC-II door apoE2 is dan een mogelijke verklaring voor de afname in de omzetting van VLDL naar LDL in de circulatie. Het betekent dat de LDL-spiegel in bloed hierdoor daalt (tabel 2). Een apoE2-homozygoot is dan ook vaak normolipemisch en soms zelfs hypolipemisch (1). Resumerend, de aanwezigheid van apoE2 leidt tot gemiddeld 5% minder LDL, terwijl de aanwezigheid van apoE4 tot 5% meer LDL leidt, beide ten opzichte van apoE3 (16, 17). Ook is het totaal cholesterol 5% hoger in de aanwezigheid van apoE4. De lipidenconcentratie bij apoE4, te weten hoog totaal cholesterol en hoog LDL-cholesterol predisponert dus voor de ontwikkeling van hart- en vaatziekten, maar het is tegelijk goed om te beseffen dat er méér belangrijke risicofactoren zijn, zoals leefstijl onder andere. Ook lijkt dragerschap van een apoE2 of apoE4 allel de herhaalkans te verhogen op een lobulaire intracerebrale bloeding. Deze bevindingen komen naar voren in epidemiologisch onderzoek (18, 19).

Pathofysiologie van apoE-isotypen

Familiaire dysbètalipoproteïnemie

Dit is een familiale vorm van hyperlipidemie gekenmerkt door een stapeling van chylomicronen- en VLDL-remnants. In het plasma is zowel een te hoge cholesterol- als een te hoge triglyceridenconcentratie aantoonbaar. Het gaat gepaard met een sterke neiging tot de ontwikkeling van atherosclerose op relatief jonge leeftijd (1). Familiaire dysbètalipoproteïnemie is in hoge mate geassocieerd met homozygotie van apoE2 (1, 20). Vandaar dat een ondubbelzinnige toekenning van een apoE2/E2 genotype klinisch van groot belang is, aangezien dit de diagnose bevestigt (1). Gezien de frequentie van apoE2-homozygotie (1:100) en de incidentie van familiale dysbètalipoproteïnemie (1:5000) is het aannemelijk om te veronderstellen dat het apoE2-isotype een predisponerende factor is voor familiale dysbètalipoproteïnemie. Het

komt pas tot uiting als er meer afwijkingen zijn in het lipidenmetabolisme, zoals een toename van de VLDL-productie. VLDL-klaring door de LDL-receptor in de lever is door de aanwezigheid van apoE2 vertraagd. Extra VLDL, maar met name remnants van zowel chylomicronen en VLDL, kunnen niet opgenomen worden en nemen daardoor toe in concentratie (1). Tevens verandert de samenstelling zodanig dat het VLDL een slecht substraat wordt voor LPL en de LDL-receptor. Een tweede mogelijkheid is verlaging van de LDL-receptorexpressie, waardoor minder chylomicronen, VLDL en hun remnants kunnen worden opgenomen. Ook nu stapelen deze lipoproteïnen zich in het bloed. Tenslotte kan een lage oestrogenspiegel een prikkel zijn tot het optreden van hyperlipidemie bij apoE2-homozygotie, want oestrogeen verhoogt zowel de LDL-receptoractiviteit als de lipolytische activiteit (21). Aangezien apoE2 een slecht substraat is voor de LDL-receptor en LPL, kan stimulatie van beiden door een hoge oestrogenspiegel compenseren voor de moeizame verwerking van apoE2 door de LDL-receptor en LPL. Dit wordt ondersteund door het gegeven dat vrouwen met een genotype apoE2/E2 familiale dysbètalipoproteïnemie pas ontwikkelen na de menopauze, als de oestrogeenconcentratie fors gedaald is. Mannen met het genotype apoE2/E2 daarentegen, zijn al ontvankelijk voor de ontwikkeling van familiale dysbètalipoproteïnemie meteen na adolescentie (1).

De ziekte van Alzheimer

Het biologische kenmerk van de ziekte van Alzheimer is de aanwezigheid van neuritische plaques in de corticale hersengebieden. Waarschijnlijk zijn deze plaques betrokken bij de teloorgang van neuronale functies in de cortex leidend tot progressieve dementie. Deze plaques zijn een precipitaat van verschillende eiwitten, waaronder apoE en het amyloïd β peptide. De rol van apoE in het zenuwstelsel ligt waarschijnlijk in het transport van cholesterol, nodig voor de opbouw en het onderhoud van myeline en neurale membranen. ApoE wordt uitgescheiden door astrocyten en weer geïnternaliseerd door neuronen via de LDL-receptor. Het blijkt dat de aanwezigheid van een apoE4-allel het risico op de ziekte van Alzheimer met een factor 3 verhoogt en bij homozygotie van apoE4 is het risico verder tot een factor 8 verhoogd (4). Tevens manifesteert de ziekte van Alzheimer zich op een jongere leeftijd naarmate meer apoE4 allelen aanwezig zijn (4). Het is aannemelijk dat de invloed van apoE4 biologisch te herleiden is tot de *in vitro* bevinding dat apoE4 makkelijker met het amyloïd β peptide neerslagen vormt dan apoE3 of apoE2 (22). Diagnostisch is de winst van het toevoegen van een apoE-genotypering gecombineerd met

klinische parameters echter beperkt tot een verhoging van de specificiteit van 55% naar 84% ten koste gaand van de sensitiviteit die terugvalt van 93% naar 61% (23). Een mogelijk relevantere toepassing is het vaststellen van het apoE-isotype bij patiënten met de ziekte van Alzheimer om de respons te kunnen voorspellen op therapie met tacrine, een acetylcholinesterase remmer (24). Het werkingsmechanisme van deze therapie is gebaseerd op het feit dat de choline acetyltransferase activiteit sterk verlaagd is in de hippocampus van Alzheimer patiënten (24). De aanmaak van de second messenger acetylcholine is hierdoor verminderd. Stil leggen van de acetylcholinesterase activiteit zorgt er dan voor dat de afbraak van acetylcholine wordt geremd, waardoor de vermindering in aanmaak van acetylcholine opgeheven wordt door de afbraak te vertragen. Voor de synthese van acetylcholine moet choline eerst afgesplitst worden van fosfatidylcholine of fosfatidylethanolamine uit membranen van cholinergische neuronen door fosfolipase D. Aanvoer van deze fosfolipiden, en daarmee het normaal functioneren van cholinergische neuronen is sterk afhankelijk van een intact cholesterol en fosfolipid transport verzorgd door apoE-eiwitten. Kennelijk is het restant aan functioneel cholinergisch systeem in de hersenen van Alzheimer patiënten minder bij de aanwezigheid van apoE4 dan bij apoE2 of apoE3, want de respons op tacrine is beter in apoE2- en apoE3-patiënten dan bij patiënten met een apoE4-allel (24).

Hormoonvervangende therapie

De daling van oestrogenconcentraties in vrouwen na de menopauze gaat gepaard met een verhoogde kans op de ontwikkeling van hart- en vaatziekten (1). Supplementie van hormonen bij postmenopausale vrouwen verlaagt deze kans met een derde en heeft daarnaast een gunstig effect op de remming van osteoporose. Het blijkt dat het apoE-isotype van invloed is op het effect van de hormoonvervangende therapie (17). De aanwezigheid van een apoE2-allel kan leiden tot de ontwikkeling van een hypertriglyceridemie, terwijl bij personen met een apoE4-allel de ratio LDL-cholesterol/HDL-cholesterol kleiner wordt. Deze ratio verandering verlaagt de kans op hart- en vaatziekten. Vermoedelijk heeft de categorie postmenopausale vrouwen met een apoE3/E4- of apoE4/E4-genotype dan ook het meeste baat bij hormoonvervangende therapie (17).

CONCLUSIE

CGE heeft bij het bepalen van apoE2/E2 versus apoE2/E3 een duidelijke meerwaarde gezien het belang van het vaststellen van apoE2/E2 bij het diagnosticeren van familiale dysbètalipoproteïnemie. Met name het feit dat het risico op een onjuiste classificatie bij apoE2/E2- of apoE2/E3-genotypen nagenoeg nihil is bij CGE maar niet bij AGE, is een belangrijk gegeven. CGE is daarnaast ook uitermate gevoelig en zeer geschikt voor de analyse van DNA-fragmenten in extreem lage concentraties, waarbij de resolutie van DNA-fragmenten met een grootte van

50 bp of minder superieur is aan de resolutie met AGE. Binnen klinisch chemische settings zijn analyses van DNA-fragmenten met name toegespitst op hun bruikbaarheid als risicofactoren voor de ontwikkeling van ziektebeelden. Hiervan is de apoE-genotypering een duidelijk voorbeeld. Met het voortschrijdend inzicht over de fysiologie van apoE in het lipidenmetabolisme en de moleculair biologische mechanismen achter ziektebeelden verschuift het gebruik van apoE als risicofactor naar voorspeller van een eventuele respons op therapie. Dit is informatie waar de kliniek op termijn meer behoefte aan heeft dan aan de bepaling van risicofactoren, zoals ook naar voren komt in het rapport van de gezondheidsraad over DNA-diagnostiek (25).

Literatuur

1. Mahley RW, Huang Y, Rall SC, Jr. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res* 1999; 40: 1933-49.
2. Superko HR. The atherogenic lipoprotein profile. *Science and Medicine* 1997: 36-45.
3. Luc G, Bard JM, Arveiler D, Evans A, Cambou JP, Bingham A, et al. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1412-9.
4. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261: 921-3.
5. Prins J, Tilanus MGJ, Kortlandt W, de Sain-van der Velde MGM, van Rijn HJM. Enkele aspecten van apolipoproteïne E. *Tijdschr NVKC* 1994; 19: 325-9.
6. Prins J, Tilanus MGJ, Rijn HJM van. Apolipoproteïne E genotypering. *Tijdschr NVKC* 1994; 19: 308-12.
7. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; 31: 545-8.
8. Schlenck A, Bohnet K, Aguillon D, Lafaurie C, Siest G, Visvikis S. High sensitivity of laser-induced fluorescence detection in capillary gel electrophoresis for accurate apolipoprotein E genotyping. *Biotechniques* 1997; 22: 736-42.
9. Wijnen PA, van Diejen-Visser MP. Capillary electrophoresis of serum proteins. Reproducibility, comparison with agarose gel electrophoresis and a review of the literature. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 535-45.
10. Oda RP, Clark R, Katzmann JA, Landers JP. Capillary electrophoresis as a clinical tool for the analysis of protein in serum and other body fluids. *Electrophoresis* 1997; 18: 1715-23.
11. Righetti PG, Gelfi C. Capillary electrophoresis of DNA for molecular diagnostics. *Electrophoresis* 1997; 18: 1709-14.
12. Fortina P, Cheng J, Shoffner MA, Surrey S, Hitchcock WM, Kricka LJ, et al. Diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy and quantitative identification of carrier status by use of entangled solution capillary electrophoresis. *Clin Chem* 1997; 43: 745-51.
13. Huang XC, Quesada MA, Mathies RA. DNA sequencing using capillary array electrophoresis. *Anal Chem* 1992; 64: 2149-54.
14. Beckmann A, Vogt U, Huda N, Zanker KS, Brandt BH. Direct-double-differential PCR for gene dosage quantification of c-myc. *Clin Chem* 1999; 45: 141-3.
15. Vries JE de, Wijnen PAHM, Diejen-Visser MP van, Bekers O. Bepaling van het aantal kopieën van het c-Myc gen via PCR en capillair elektroforese. *Ned Tijdschr Klin Chem* 2000; 25: 82.

16. Walden CC, Hegele RA. Apolipoprotein E in hyperlipidemia. *Ann Intern Med* 1994; 120: 1026-36.
17. Garry PJ, Baumgartner RN, Brodie SG, Montoya GD, Liang HC, Lindeman RD, et al. Estrogen replacement therapy, serum lipids, and polymorphism of the apolipoprotein E gene. *Clin Chem* 1999; 45: 1214-23.
18. Lambert JC, Brousseau T, Defosse V, Evans A, Arveiler D, Ruidavets JB, et al. Independent association of an APOE gene promoter polymorphism with increased risk of myocardial infarction and decreased APOE plasma concentrations: the ECTIM study. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 57-61.
19. O'Donnell HC, Rosand J, Knudsen KA, Furie KL, Segal AZ, Chiu RI, et al. Apolipoprotein E genotype and the risk of recurrent lobar intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 2000; 342: 240-5.
20. Knijff P de, Maagdenberg AM van den, Stalenhoef AF, Leuven JA, Demacker PN, Kuyt LP, et al. Familial dysbetalipoproteinemia associated with apolipoprotein E3-Leiden in an extended multigeneration pedigree. *J Clin Invest* 1991; 88: 643-55.
21. Huang Y, Schwendner SW, Rall SC, Jr., Sanan DA, Mahley RW. Apolipoprotein E2 transgenic rabbits. Modulation of the type III hyperlipoproteinemic phenotype by estrogen and occurrence of spontaneous atherosclerosis. *J Biol Chem* 1997; 272: 22685-94.
22. Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. *Faseb J* 1996; 10: 1485-94.
23. Mayeux R, Saunders AM, Shea S, Mirra S, Evans D, Roses AD, et al. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 1998; 338: 506-11.
24. Poirier J, Delisle MC, Quirion R, Aubert I, Farlow M, Lahiri D, et al. Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12260-4.
25. Gezondheidsraad: Commissie DNA-diagnostiek. DNA-diagnostiek. Rijswijk: Gezondheidsraad, 1998; publicatie nr 1998/11.

Summary

ApoE genotyping with capillary gel electrophoresis. ApoE isotype more than a risk factor. Vries JE de, Wijnen PAHM, Dieijen-Visser MP van and Bekers O. Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 243-250.

Capillary gel electrophoresis (CGE) has been added recently to the arsenal of molecular biological techniques. This article describes the application of CGE to analyse DNA fragments obtained after amplifying a part of the apoE gene with PCR. Compared to conventional slab gel electrophoresis (AGE) is CGE the method of choice with regard to the resolution of, and the sensitivity for, DNA fragments. Especially discrimination between the apoE2/E2 and apoE2/E3 genotypes is more reliable with CGE than with AGE. This is clinically very important to diagnose familial dysbetalipoproteinemia. With ongoing unraveling of the role that different apoE isotypes have in various syndromes, such as cardiovascular diseases and Alzheimer's disease, it is assumed that the use of apoE may shift from being merely "just another" risk factor to become a predictor of response to therapy.

Key-words: CGE; apoE; PCR; familial dysbetalipoproteinemia; Alzheimer's disease; hormone replacement therapy

Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 250-254

Ontwikkelingen in de capillaire elektroforese

H. A.M.VOORBIJ¹, P.G. MUIJSELAAR² en C.E. SÄNGER-van de GRIEND³

In dit artikel wordt aandacht besteed aan de ontwikkelingen binnen de capillaire elektroforese (CE). Ofschon de toepasbaarheid van CE in de klinische chemie beperkt is, zijn er ook recente ontwikkelingen die al gebruikt worden. Het vergroten van de detectiegevoeligheid is een belangrijk onderzoeksveld. Diverse strategieën zoals stacking en de verschillende detectoren worden besproken. De miniaturisering van CE-apparatuur tot de grootte van een chip is één van de meest fascinerende ontwikkelingen. Dergelijke chips worden gebruikt in combinatie met allerlei denkbare detectoren en scheidingssystemen waaronder biosensoren. De Micellaire Elektro-Kinetische Chromato-

grafie techniek combineert chromatografie met elektroforetische principes en biedt grote flexibiliteit. Chirale CE vindt zijn toepassing in o.a. farmaceutische analyse, stereoselectief metaboliseringsonderzoek en de forensische analyse.

In deze bijdrage over capillaire elektroforese (CE) willen we ingaan op een aantal ontwikkelingen en toekomstige mogelijkheden van de capillaire elektroforese. Omdat capillaire elektroforese een jonge loot is aan de tak van elektroforese (1,2) is het begrijpelijk, dat nieuwe ontwikkelingen met grote belangstelling geïntroduceerd worden in het veld van analytische technieken. Vanzelfsprekend duurt het dan nog een tijd, voordat deze ontwikkelingen zodanig uitontwikkeld zijn, dat ze bruikbaar zijn in de routine analyse van een laboratorium. Dit geldt ook voor de ontwikkelingen, die toepasbaar zouden kunnen zijn voor de diagnostiek van de klinische chemie. Een ontwikkeling die met enthousiasme werd ontvangen en veelbelovend leek voor de klinische chemie is de lipoproteïenscheiding met behulp van capillaire isotachografie door Schmitz e.a. beschreven in 1994 (3).

Department of Clinical Chemistry, UMC-Utrecht, Utrecht¹; Pharmaceutical Analysis Department, Solvay Pharmaceuticals, Weesp²; Analytical Development, AstraZeneca R&D Södertälje, Södertälje, Zweden³

Correspondentie: Dr. H.A.M. Voorbij, UMC Utrecht locatie AZU, huispostnr. G03.647, Heidelberglaan 100, 3584 CX Utrecht.
E-mail: rvoorbij@lab.azu.nl