



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
Δ/ντής Καθηγητής Ε. Τσιάνος**

**ΙΑΤΡΕΙΟ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ  
Δ/ντής Καθηγητής Μ. Ελισάφ**

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ  
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΥΠΟΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΗΣ ΑΓΩΓΗΣ**

**ΜΙΛΤΙΑΔΟΥ ΓΕΩΡΓΙΟΣ  
ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2003**



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000336964



AQ. EIO:.....11050/2003.





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
Δ/ντής Καθηγητής Ε. Τσιάνος**

**ΙΑΤΡΕΙΟ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ  
Δ/ντής Καθηγητής Μ. Ελισάφ**

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ  
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΥΠΟΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΗΣ ΑΓΩΓΗΣ**

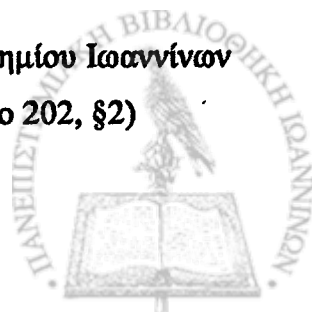
**ΜΙΑΤΙΑΔΟΥ ΓΕΩΡΓΙΟΣ  
ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2003**



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Νόμος 5343/32, άρθρο 202, §2)



ΑΙΤΗΣΗ: 01/12/1997

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 24/02/1998

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

**Μωυσής Ελισάφ**

Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΜΕΛΗ

**Αλέξανδρος Τσελέπης**

Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ιωάννης Γουδέβενος**

Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ: 06/03/1998

ΚΑΤΑΘΕΣΗ: 17/06/2003

ΟΝΟΜΑ ΠΡΟΕΔΡΟΥ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ: **Νίκη Αγνάντη**

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Μωυσής Ελισάφ**

Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Αλέξανδρος Τσελέπης**

Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ιωάννης Γουδέβενος**

Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Επαμεινώντας Τσιάνος**

Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Δημήτριος Σιδερής**

Καθηγητής Καρδιολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Αγαθοκλής Τσατσούλης**

Καθηγητής Ενδοκρινολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Μπαϊρακτάρη Ελένη**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: Άριστα**

**Η Γραμματεία της Σχολής**

**Ευαγγελία Τσαγγαλά**



Στους γονείς μου Ανδρέα και Αγάθη

Στο δάσκαλο μου Μωυσή



## Πρόλογος

Η εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής έγινε μετά την εκπαίδευση μου στη διάγνωση και αντιμετώπιση ασθενών με υπερλιπιδαιμία, καθώς και στις σύγχρονες μεθόδους γενετικής ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων.

Η καθοδήγηση μου από τον κ. Μωυσή Ελισάφ, Καθηγητή Παθολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και υπεύθυνο του Ιατρείου Διαταραχών του Μεταβολισμού των Λιπιδίων, αποτέλεσε τον ακρογωνιαίο λίθο για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής. Τον ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση αυτού του έργου, για τη διδασκαλία του στην κατανόηση και αντιμετώπιση των διαταραχών του μεταβολισμού των λιπιδίων, για τη διαμόρφωση του πρωτοκόλου της μελέτης, για τις υποδείξεις του όσον αφορά την ανάλυση των αποτελεσμάτων και τέλος για τη διόρθωση του κειμένου.

Η εκπαίδευση μου στις σύγχρονες μεθόδους ανάλυσης των βιολογικών δειγμάτων έγινε στο Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής της Κύπρου στο τμήμα ταυτοποίησης βιολογικών δειγμάτων. Ευχαριστώ θερμά το διευθυντή του τμήματος Δρ Μάριο Καριόλου που μου επέτρεψε να εργασθώ στο εργαστήριο του και με δίδαξε την εργαστηριακή μεθοδολογία που ήταν απαραίτητη για την ολοκλήρωση της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Αλέξανδρο Τσελέπη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Καρδιολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Ιωάννη Γουδέβενο για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και την κριτική επεξεργασία των δεδομένων της διατριβής μου.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του τμήματος ταυτοποίησης βιολογικών δειγμάτων του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου για την άριστη φιλοξενία και για την πολύτιμη βοήθεια τους σε θέματα της εργαστηριακής μεθοδολογίας. Η βοήθεια της κα Πανωραίας Ντόντη, υπεύθυνης νοσηλεύτριας του Ιατρείου Διαταραχών του Μεταβολισμού των Λιπιδίων του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων ήταν επίσης ανεκτίμητη και για αυτό το λόγο την ευχαριστώ θερμά.

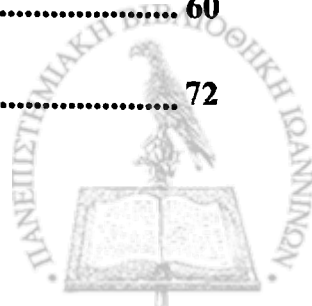
Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου Ανδρέα και Αγάθη, τον αδελφό μου Παναγιώτη και τη σύζυγο μου Αγνή για την ηθική στήριξη τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.





# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	15
<b>1.1 Εισαγωγή</b> .....	17
<b>1.2 Οικογενής Υπερχοληστερολαιμία</b> .....	18
1.2.1 Ιστορική διαδρομή .....	18
1.2.2 Παθοφυσιολογία .....	19
1.2.3 Μοριακή γενετική .....	20
1.2.4 Κλινική εικόνα .....	25
1.2.5 Διάγνωση .....	29
1.2.6 Αντιμετώπιση.....	31
<b>1.3 Απολιποπρωτεΐνη Ε</b> .....	33
1.3.1 Περιγραφή και λειτουργία .....	33
1.3.2 Σημασία των κοινών πολυμορφισμών της apo E.....	39
<b>1.4 Απολιποπρωτεΐνη AIV</b> .....	43
1.4.1 Περιγραφή και λειτουργία .....	43
1.4.2 Σημασία των πολυμορφισμών της apo AIV .....	48
<b>1.5 Ένζυμο μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CETP)</b> .....	50
1.5.1 Περιγραφή και λειτουργία .....	50
1.5.2 Σημασία των πολυμορφισμών της CETP .....	51
<b>1.6 Λιποπρωτεΐνη (a) και οικογενής υπερχοληστερολαιμία</b> .....	52
<b>1.7 HDL-C και οικογενής υπερχοληστερολαιμία</b> .....	53
<b>1.8 Μηχανισμός δράσης των στατινών</b> .....	54
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	57
<b>2.1 Υλικό της μελέτης</b> .....	59
<b>2.2 Μεθοδολογία</b> .....	60
<b>2.3 Στατιστική Ανάλυση</b> .....	72



<b><u>2.4 Αποτελέσματα</u></b> .....	<b>74</b>
<b><u>2.5 Συζήτηση</u></b> .....	<b>90</b>
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u></b> .....	<b>98</b>
<b><u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u></b> .....	<b>99</b>
<b><u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ</u></b> .....	<b>99</b>
<b><u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u></b> .....	<b>99</b>
<b><u>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ</u></b> .....	<b>99</b>
<b><u>ΒΡΑΒΕΙΑ/ΕΠΑΙΝΟΙ</u></b> .....	<b>99</b>



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## 1.1 Εισαγωγή

Η οικογενής υπερχοληστερολαιμία (FH) είναι η πιο συχνή γενετική διαταραχή του μεταβολισμού και χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης και από πρόωμη εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Η νόσος κληρονομείται με αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα και η συχνότητα των ετεροζυγωτών στο γενικό πληθυσμό είναι 1:500, ενώ η συχνότητα των ομοζυγωτών είναι πολύ πό σπάνια ( $\approx 1:1,000,000$ ). Η FH οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDLR) με αποτέλεσμα την ανεπαρκή παραγωγή υποδοχέων ή την παραγωγή υποδοχέων με μειωμένη λειτουργικότητα. Έχουν περιγραφεί περισσότερες από 700 μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR. Η έγκαιρη διάγνωση της νόσου και η γρήγορη έναρξη θεραπείας έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της επίπτωσης της στεφανιαίας νόσου σε ασθενείς με FH. Υπάρχουν πολύ λίγα δεδομένα όσον αφορά τις υπεύθυνες μεταλλάξεις του υποδοχέα που προκαλούν FH σε Έλληνες ασθενείς. Σκοπός της διδακτορικής μου διατριβής ήταν η ανίχνευση των μεταλλάξεων που προκαλούν FH σε Έλληνες ασθενείς που κατάγονται από την περιοχή της Βορειοδυτικής Ελλάδας, η μελέτη του λιπιδαιμικού προφίλ αυτών των ασθενών σε σχέση με γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες και η συσχέτιση των μεταβολών των λιπιδαιμικών παραμέτρων που παρατηρούνται μετά τη χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής με στατίνες με γενετικούς παράγοντες και κυρίως με το είδος των μεταλλάξεων του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR.

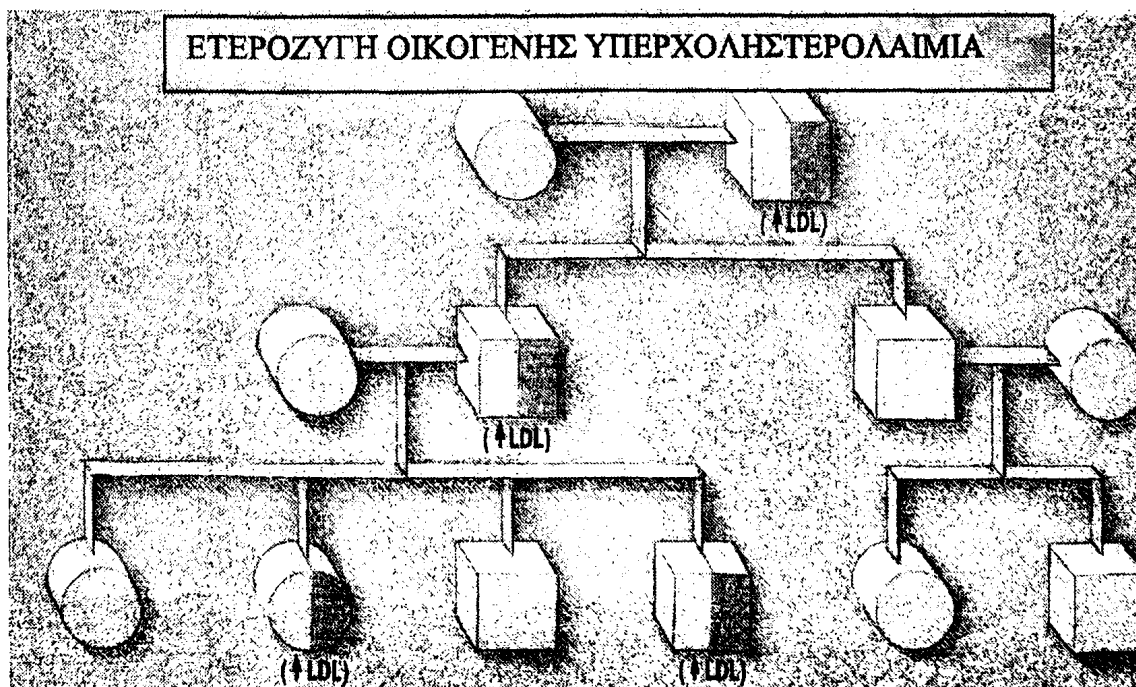


## 1.2 Οικογενής Υπερχοληστερολαιμία

### 1.2.1 Ιστορική διαδρομή

Στα τέλη της δεκαετίας του 1930 οι Muller και Thannhauser και συνεργάτες περιέγραψαν για πρώτη φορά οικογένειες με υψηλά επίπεδα ολικής χοληστερόλης (TCHOL) στο πλάσμα, που εμφάνιζαν συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης στους τένοντες και αυξημένη επίπτωση στεφανιαίας νόσου σε σχετικά μικρότερες ηλικίες σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό (Muller 1938, 1939, Thannhauser et al. 1938). Αργότερα, το 1954 οι Gofman και συνεργάτες έδειξαν ότι η υπερχοληστερολαιμία σε αυτές τις οικογένειες οφείλονταν σε αύξηση της συγκέντρωσης των πολύ χαμηλής πυκνότητας (LDL) σωματιδίων στο πλάσμα (Gofman et al. 1954a). Στην συνέχεια αποδείχθηκε ότι η νόσος συσχετίζεται με διαταραχές του μεταβολισμού των LDL (Fredrickson et al. 1967). Οι εργασίες του Khadchadurian τη δεκαετία του 1960 επιβεβαίωσαν ότι το σύνδρομο της FH κληρονομείται με τον αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα (Khadchadurian et al. 1964) (σχήμα 1).

*Σχήμα 1: Ετερόζυγη οικογενής υπερχοληστερολαιμία: κληρονομείται με τον αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα*



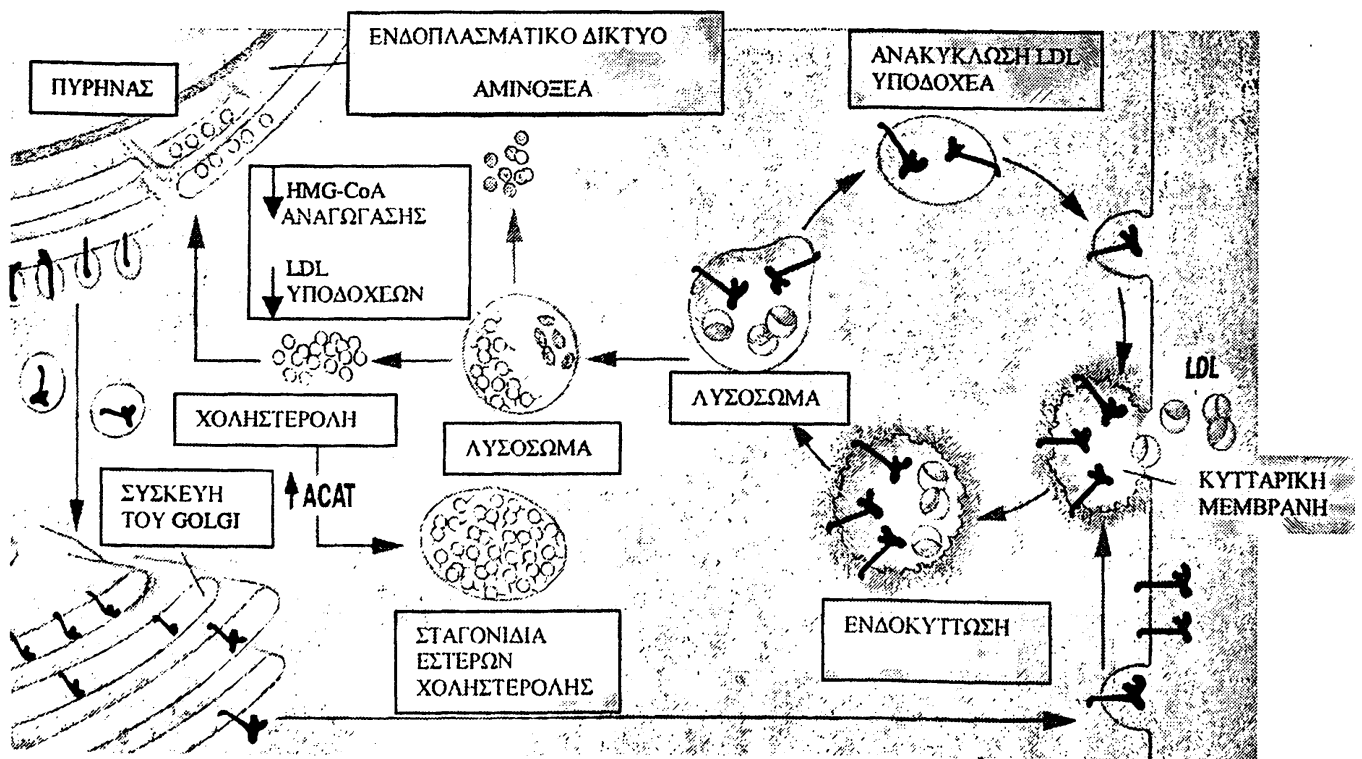
Η ανακάλυψη του LDLR από τους Goldstein και συνεργάτες (1974) σηματοδότησε την έναρξη της κατανόησης αυτής της νοσολογικής οντότητας (Goldstein et al. 1974).



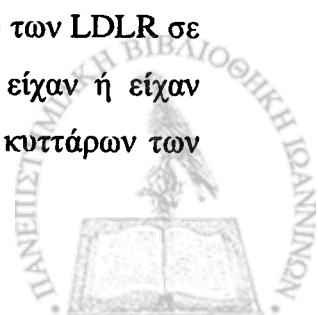
### 1.2.2 Παθοφυσιολογία

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η ανακάλυψη του LDLR αποτέλεσε το σημαντικότερο βήμα για την κατανόηση της FH. Ο LDLR παράγεται αρχικά στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων και στη συνέχεια μεταφέρεται στη συσκευή του Golgi. Η γλυκοζυλίωση του υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή του δραστικού μορίου (μοριακό βάρος 160 kDa), το οποίο στη συνέχεια μεταφέρεται σε ειδικές θέσεις της κυτταρικής μεμβράνης (coated pits). Ο υποδοχέας εμφανίζει χημική συγγένεια με την απολιποπρωτεΐνη (apo) B100, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια των LDL. Στη συνέχεια το σύμπλεγμα υποδοχέα-LDL σωματιδίου ενδοκυττάνεται. Ο LDLR διαχωρίζεται από την LDL από ένζυμα στα λυσοσώματα του κυττάρου και επιστρέφει στην κυτταρική μεμβράνη όπου και επαναχρησιμοποιείται. Αντίθετα, οι LDL παραμένουν στα λυσοσώματα όπου και μεταβολίζονται (σχήμα 2).

Σχήμα 2: Ο ενδοκυττάριος μεταβολικός κύκλος του LDLR

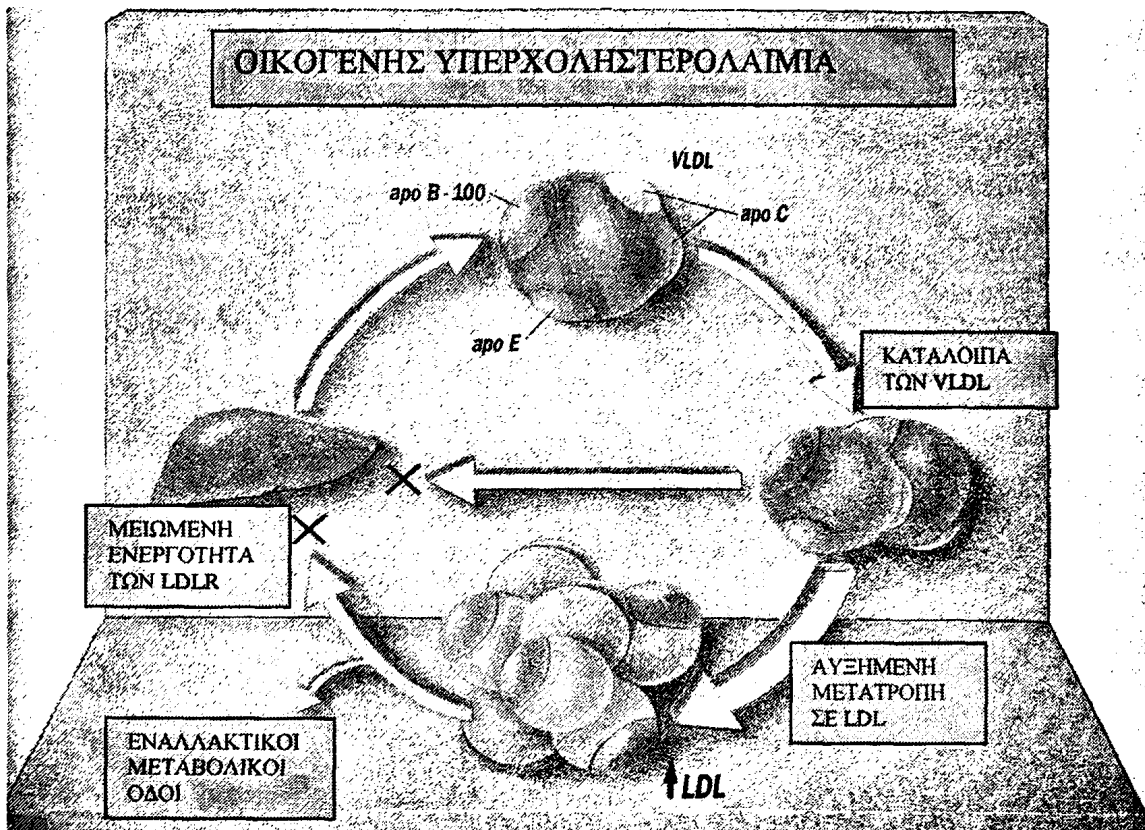


Τα πειράματα των Goldstein και Brown στη δεκαετία του 1970 έγιναν σε ινοβλάστες που απομονώθηκαν από δέρμα ασθενών με FH. Αυτοί οι ερευνητές έδειξαν ότι οι ασθενείς με ετερόζυγη FH εξέφραζαν στην επιφάνεια των ινοβλαστών το 50% του αριθμού των LDLR σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα, ενώ οι ασθενείς με ομόζυγη FH δεν είχαν ή είχαν ελάχιστους υποδοχείς. Ο μειωμένος αριθμός των LDLR στην επιφάνεια των κυττάρων των



ασθενών με FH είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη είσοδο των LDL στο εσωτερικό του κυττάρου και την αύξηση της LDL χοληστερόλης (LDL-C) στο πλάσμα αυτών των ασθενών (Goldestein et al. 1974, Brown et al. 1976, 1981) (σχήμα 3).

Σχήμα 3: Παθοφυσιολογία της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας



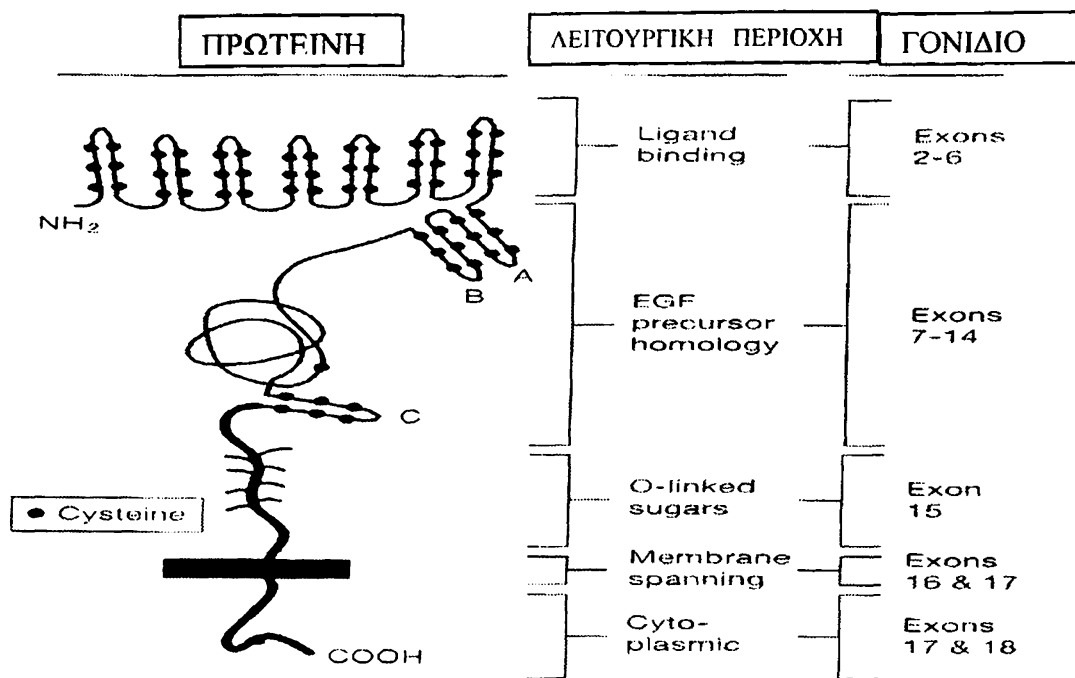
Οι ίδιοι ερευνητές στη συνέχεια ανακάλυψαν μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR, οι οποίες είναι υπεύθυνες για διαταραχές σε διάφορα στάδια του ενδοκυττάρου κύκλου του υποδοχέα (Tolleshaug et al. 1982, 1983). Για αυτή την ανακάλυψη οι ερευνητές βραβεύθηκαν με βραβείο Nobel το 1985.

### 1.2.3 Μοριακή γενετική

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον LDLR βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 19, έχει μέγεθος 45 kb και αποτελείται από 18 εξόνια και 17 ιντρόνια (Hobbs et al. 1990). Η συσχέτιση της δομής του υποδοχέα με τη δομή του γονιδίου έγινε από τους Sudhof και συνεργάτες το 1985 (Sudhof et al. 1985) (σχήμα 4).



Σχήμα 4: Συσχέτιση της δομής του υποδοχέα και του γονιδίου του LDLR

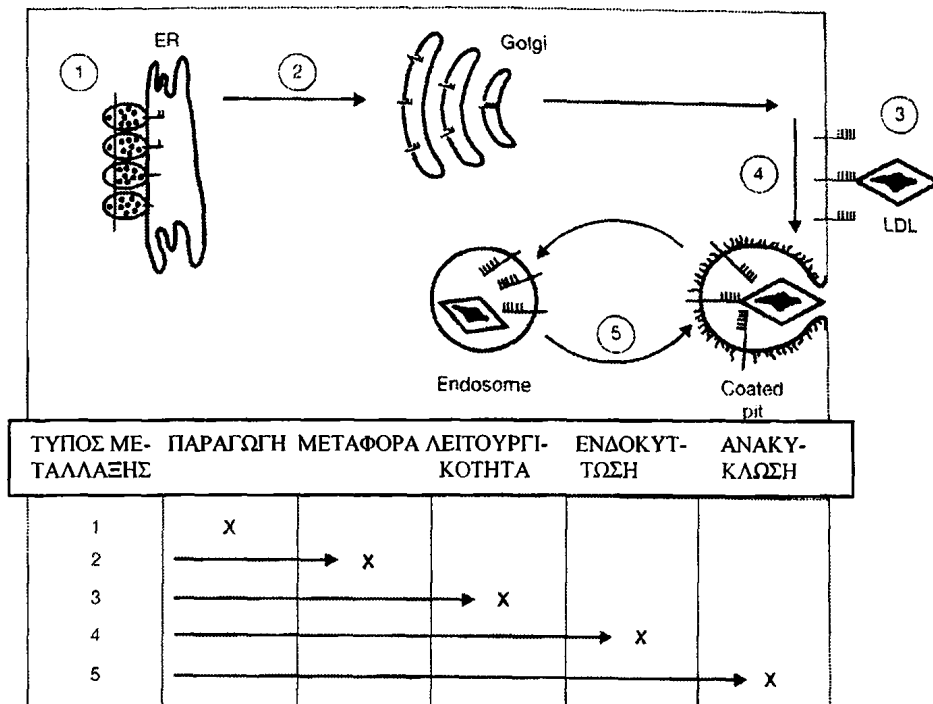


Το εξόνιο 1 του γονιδίου δεν μεταφράζεται σε τμήμα της τελικής πρωτεΐνης, αλλά κωδικοποιεί μια αλληλουχία 25 υδρόφοβων αμινοξέων που αποκόπτονται από την πρόδρομη μόρφη της πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα εξόνια 2-6 κωδικοποιούν το τμήμα της πρωτεΐνης που περιέχει τις θέσεις που εμφανίζουν χημική συγγένεια με την apo B100 των LDL. Το τμήμα αυτό του υποδοχέα αποτελείται από 292 αμινοξέα. Τα εξόνια 7-14 κωδικοποιούν μια αλληλουχία περίπου 400 αμινοξέων, η οποία είναι υπεύθυνη για το διαχωρισμό του υποδοχέα από την LDL στα λυσοσώματα και την επιστροφή του υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη (Davis et al. 1987). Επίσης αυτή η αλληλουχία των αμινοξέων χρησιμεύει για τη σταθεροποίηση του υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη. Ο ρόλος της αλληλουχίας 58 αμινοξέων που κωδικοποιούνται από το εξόνιο 15 δεν έχει ακόμη διευκρινισθεί. Το εξόνιο 16 κωδικοποιεί 22 υδρόφοβα αμινοξέα που χρησιμεύουν (μαζί με μια αλληλουχία αμινοξέων που κωδικοποιούνται από το εξόνιο 17) για την είσοδο του υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη. Το υπόλοιπο τμήμα του εξονίου 17 και το εξόνιο 18 παράγουν το τμήμα του υποδοχέα που είναι υπεύθυνο για την συσσώρευση του υποδοχέα σε θέσεις πλούσιες σε κλαρυθίνη (clathrin-coated pits) και για τη σταθεροποίηση του υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη. Οι πλούσιες σε κλαρυθίνη περιοχές του κυτταροπλάσματος έχουν τεράστια σημασία για την ενδοκύττωση του συμπλέγματος υποδοχέα-LDL (Bos et al. 1995). Η FH οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR. Έχουν περιγραφεί 5 τύποι μεταλλάξεων (Hobbs et al. 1990) (σχήμα 5).





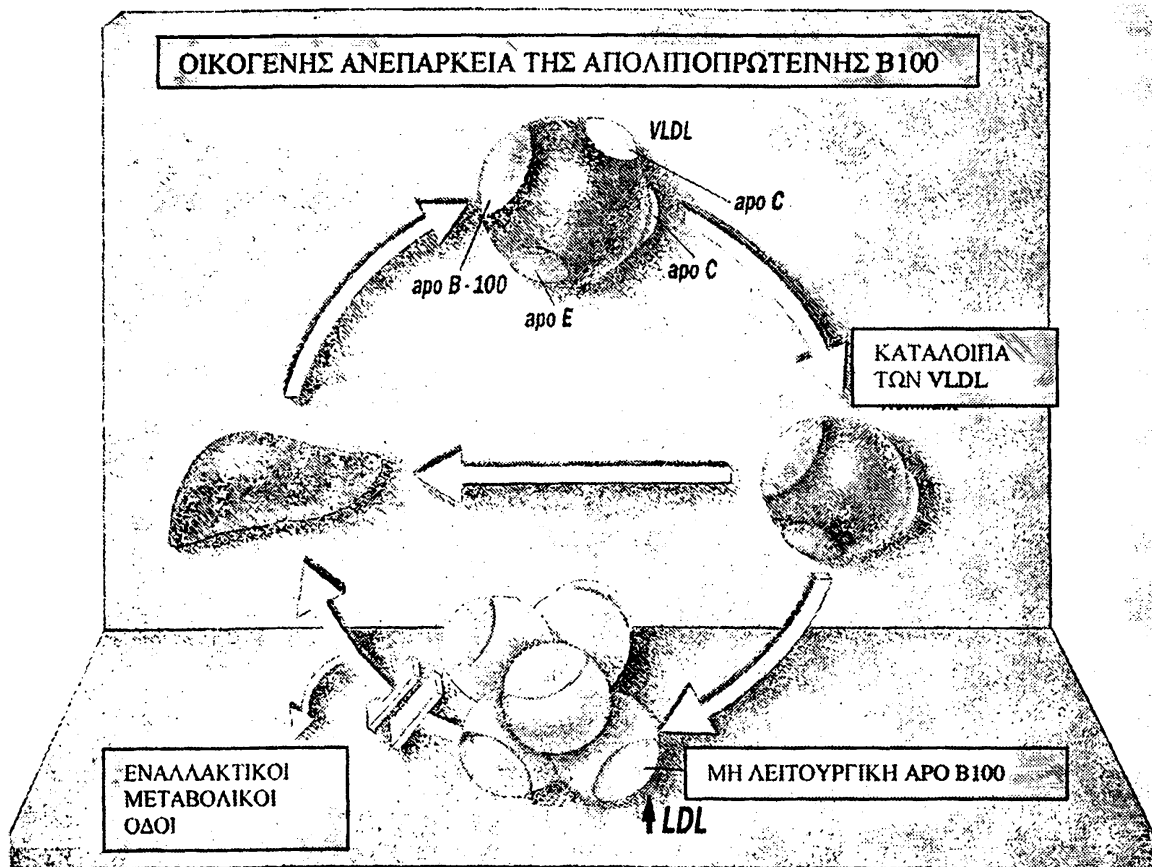
Σχήμα 5: Τύποι μεταλλάξεων του γονιδίου του LDLR



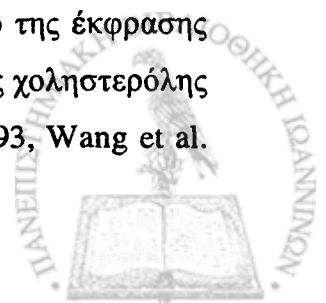
Οι μεταλλάξεις τύπου I χαρακτηρίζονται από αδυναμία σύνθεσης του υποδοχέα. Οφείλονται σε μεταλλάξεις του εναρκτού του γονιδίου, σε σημειακές μεταλλάξεις που δημιουργούν κωδικόνια που κωδικοποιούν τη λήξη της μεταγραφής του γενετικού υλικού (stop codons) (nonsense mutations), σε μεγάλα ελλείματα του γενετικού υλικού (deletions) ή σε διαταραχή της δημιουργίας του mRNA (splicing defects) (null alleles). Στις μεταλλάξεις τύπου II-V η γενετική διαταραχή οφείλεται σε σημειακή μετάλλαξη, η οποία όμως δεν προκαλεί λήξη της μεταγραφής του γονιδίου του LDLR (missense mutation). Οι μεταλλάξεις τύπου II είναι οι συχνότερες (50% των γνωστών μεταλλάξεων ανήκουν σε αυτή την κατηγορία). Σε αυτές τις περιπτώσεις ο υποδοχέας παράγεται, αλλά δεν μεταφέρεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο στη συσκευή Golgi (transport-defective alleles). Στις μεταλλάξεις τύπου III ο υποδοχέας παράγεται και μεταφέρεται στην επιφάνεια του κυττάρου. Ωστόσο, παρατηρείται μείωση της χημικής συγγένειας του υποδοχέα με την apo B100 (binding-defective alleles). Οι μεταλλάξεις τύπου IV κωδικοποιούν υποδοχείς που ανιχνεύονται στην επιφάνεια του κυττάρου, αναγνωρίζουν την apo B100, υπάρχει όμως αδυναμία ενδοκύττωσης του συμπλέγματος υποδοχέα-LDL (internalization-defective alleles). Τέλος, στις μεταλλάξεις τύπου V ο υποδοχέας αποτυγχάνει να απελευθερώσει την LDL στο κυτταρόπλασμα και έτσι ο υποδοχέας δεν ανακυκλώνεται στην επιφάνεια του κυττάρου (recycling-defective alleles).

Μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί την apo B100 προκαλούν το σύνδρομο της οικογενούς ανεπάρκειας της απολιποπρωτεΐνης B100 [(Familial defective apolipoprotein B100) (FDB)], το οποίο τόσο κλινικά όσο και εργαστηριακά μιμείται την FH (Innegerity et al. 1990). Στις περιπτώσεις αυτές, η υπεύθυνη διαταραχή είναι η παρουσία ελαττωματικής apo B100 ως προς την ικανότητα σύνδεσής της με τον LDLR. Η διαταραχή αυτή οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί την apo B100 στη θέση 3500 (αντικατάσταση της γουανίνης από αδενίνη) (Soria et al. 1989) (σχήμα 6).

Σχήμα 6: Παθοφυσιολογία της οικογενούς ανεπάρκειας της απολιποπρωτεΐνης B100



Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR είναι περίπλοκη. Έχει περιγραφεί μια αλληλουχία 177 βάσεων κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου, η οποία θεωρείται ότι ασκεί ρυθμιστική δράση στην έκφραση του γονιδίου (Sudhof et al. 1987, Dawson et al. 1988). Οι Sanchez και συνεργάτες, οι Yokoyama και συνεργάτες και οι Wang και συνεργάτες έδειξαν ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη και της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης χοληστερόλης στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου (Sanchez et al. 1995, Yokoyama et al. 1993, Wang et al.



1993, 1994). Επίσης έχουν περιγραφεί και άλλοι ρυθμιστές της έκφρασης του γονιδίου, όπως ορμόνες (π.χ η θυροξίνη), αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες [tumor necrosis factor (TNF), ιντερλευκίνη 6] (Rudling et al. 1992, Stopeck et al. 1993, Pak et al. 1996, Streicher et al. 1996).

Έχουν περιγραφεί περισσότερες από 700 μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR και προκαλούν FH (LDLR Locus <http://www.ucl.ac.uk/fh/genebook.html>). Οι περισσότερες μεταλλάξεις εμφανίζουν σαφή γεωγραφική κατανομή. Ορισμένες μεταλλάξεις ανευρίσκονται σε μεγάλη συχνότητα σε ορισμένους (συνήθως απομονωμένους) πληθυσμούς και είναι γνωστές ως θεμελιώδεις μεταλλάξεις (founder effect) (Meiner et al. 1991, Leitersdorf et al. 1993, Simard et al. 1994, Lehrman et al. 1987, Landsberger et al. 1992, Gudnason et al. 1997, Koivisto et al. 1995, Reshef et al. 1996). Υπάρχουν πολύ λίγα δεδομένα για τις μεταλλάξεις που προκαλούν τη νόσο σε Έλληνες ασθενείς. Οι Traeger-Synodinos και συνεργάτες περιέγραψαν 6 μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR και προκαλούν FH σε παιδιά που κατάγονται από διάφορες περιοχές της Ελλάδας (Traeger-Synodinos et al. 1998).

Δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά τη συσχέτιση των διαφόρων τύπων (I-V) των μεταλλάξεων του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR με την κλινική εμφάνιση της νόσου, με τα επίπεδα της LDL-C, καθώς και με την εμφάνιση πρώιμης στεφανιαίας νόσου. Οι μελέτες που έγιναν στο παρελθόν αφορούσαν τη σύγκριση μεταξύ 2 μεγάλων ομάδων μεταλλάξεων του LDLR. Τη μια ομάδα αποτελούσαν οι μεταλλάξεις τύπου I και II στις οποίες οι υποδοχείς δεν ανευρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων (null alleles ή transport-defective mutations) και την άλλη ομάδα αποτελούσαν οι μεταλλάξεις τύπου III-V στις οποίες οι υποδοχείς διατηρούσαν κάποιου βαθμού λειτουργικότητα (binding-defective alleles ή internalization-defective alleles ή recycle-defective alleles). Η πλειοψηφία αυτών των μελετών έδειξε ότι οι ασθενείς που έχουν μεταλλάξεις που δεν παράγουν LDLR έχουν υψηλότερα επίπεδα LDL-C και ότι η ανταπόκριση των λιπιδίων στη χορήγηση στατινών σε αυτούς τους ασθενείς είναι μικρότερη σε σύγκριση με τους ασθενείς που έχουν τις μεταλλάξεις που παράγουν λειτουργικούς LDLR (Hobbs et al. 1990, Torres et al. 1996, Bertolini et al. 2000, Karen et al. 1999, Chaves et al. 2001, Jeenah et al. 1993). Αντίθετα, σε άλλες μελέτες δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων των LDLR και της ανταπόκρισης στη χορήγηση των στατινών (Sun et al. 1998, Sijbrands et al. 1998) ή τεκμηριώνεται η άποψη ότι οι ασθενείς με ετερόζυγη FH που έχουν μεταλλάξεις τύπου I-II



εμφανίζουν καλύτερη ανταπόκριση στη χορήγηση στατινών σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν μεταλλάξεις τύπου III-V (Couture et al. 1998, Leitersdorf et al. 1993).

Τέλος, δεν υπάρχουν δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά τη συσχέτιση των μεταλλάξεων του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR σε Έλληνες ασθενείς με το λιπιδαιμικό προφίλ αυτών των ασθενών. Επίσης, δεν έχει μελετηθεί η σημασία των μεταλλάξεων του LDLR στην ανταπόκριση αυτών των ασθενών στη χορήγηση υπολιπιδαιμικής αγωγής.

#### 1.2.4 Κλινική εικόνα

##### A. Ετεροζυγώτες

Η διάγνωση μπορεί να γίνει ήδη κατά τη στιγμή της γέννησης με την μέτρηση της TCHOL στο αίμα του ομφάλιου λώρου, η οποία ανευρίσκεται 2 ως 3 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με τη συγκέντρωση της TCHOL των φυσιολογικών νεογνών. Τα επίπεδα της ολικής και LDL χοληστερόλης παραμένουν αυξημένα σε όλη τη διάρκεια της ζωής, αλλά τα συμπτώματα και οι επιπλοκές της νόσου παρατηρούνται συνήθως κατά την τρίτη και τέταρτη δεκαετία της ζωής.

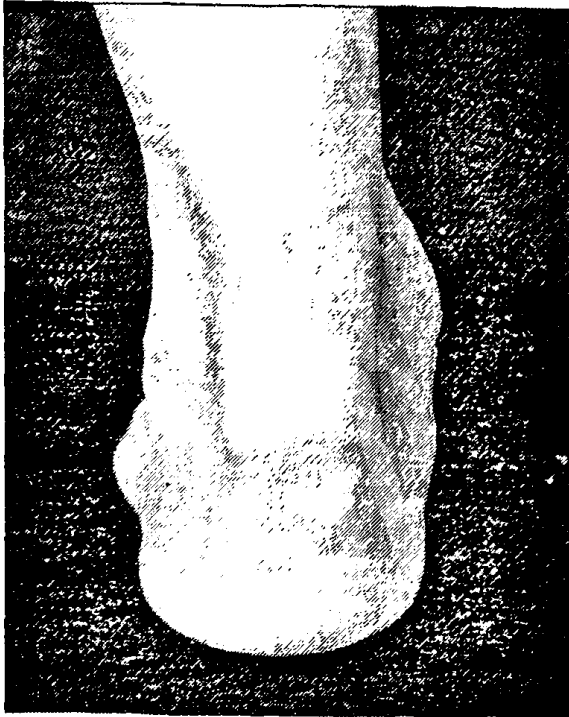
Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό αυτών των ασθενών είναι η αυξημένη επίπτωση πρώιμης και επιταχυνόμενης αθηρωματικής νόσου (Goldstein 1989). Η στεφανιαία νόσος και το έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι συνήθεις επιπλοκές και εμφανίζονται στους άνδρες κατά την τέταρτη και πέμπτη δεκαετία της ζωής, ενώ στις γυναίκες συνήθως καθυστερούν κατά μια δεκαετία. Στην ηλικία των 60 χρόνων το 85% των ανδρών με FH έχει υποστεί οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ενώ το 5% των ασθενών με οξέα στεφανιαία σύνδρομα πάσχει από ετερόζυγη FH (Goldstein et al. 1973). Επιπρόσθετα, παρατηρούνται εναποθέσεις λιπιδίων στη ρίζα της αορτής και στην αορτική βαλβίδα, που ανευρίσκονται υπερηχοκαρδιογραφικά στο 30% των ασθενών (Ribiero et al. 1983). Πρέπει να αναφερθεί ότι αυτοί οι ασθενείς σπάνια εμφανίζουν αθηρωμάτωση σε άλλες θέσεις, όπως στις αρτηρίες των άνω και κάτω άκρων ή στις εγκεφαλικές αρτηρίες. Ο λόγος για την εκλεκτική επινέμεση των στεφανιαίων αρτηριών είναι ακόμη άγνωστος.

Το παθολογικό γνώρισμα της νόσου είναι η παρουσία των τενόντιων ξανθωμάτων. Πρόκειται για λευκωπές οζώδεις διογκώσεις, που τυπικά αφορούν τον αχίλλειο τένοντα, καθώς και τους τένοντες του αγκώνα και της ραχιαίας επιφάνειας των άκρων χειρών (σχήμα 7).

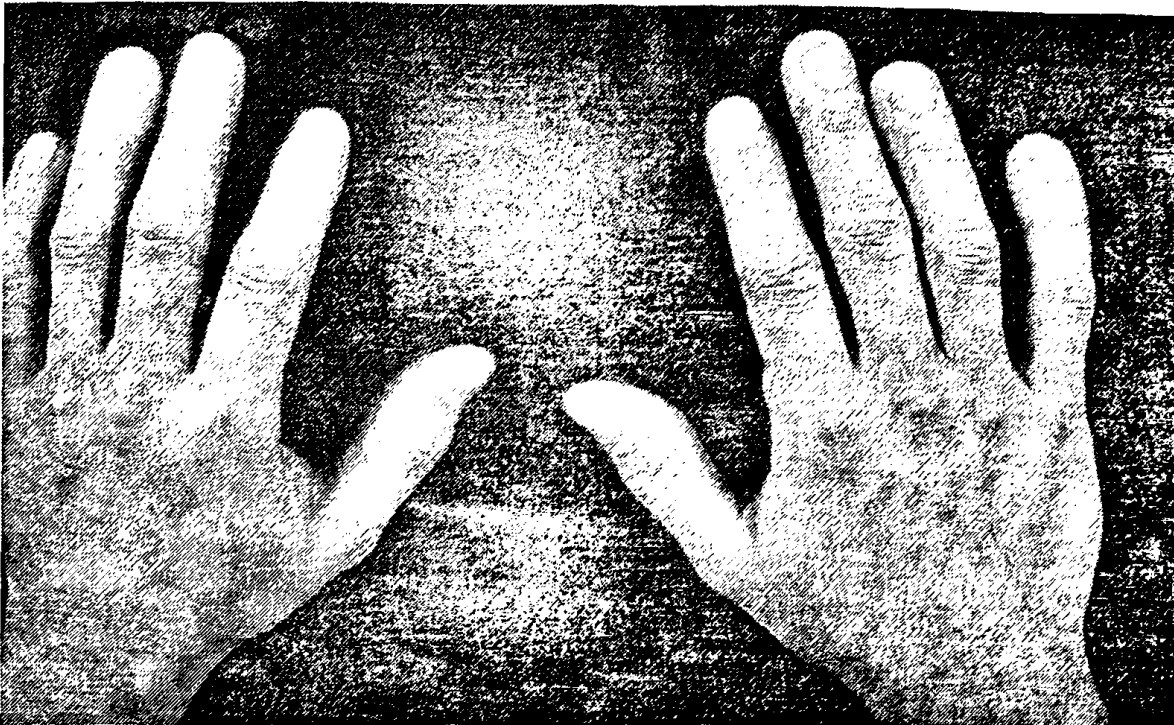


7

*έντια ξανθώματα στον αχίλλειο τένοντα σε ασθενή με ετερόζυγη FH*



*έντια ξανθώματα στη ραχιαία επιφάνεια των άκρων χειρών σε ασθενή με ετερόζυγη*



ονται στη συσσώρευση ινών κολλαγόνου και μακροφάγων πλούσιων σε ετερόλης (foam cell) (Takahashi et al. 1983). Τα τενόντια ξανθώματα παρατηρούνται συχνότερα στην παιδική ηλικία, ενώ στους ετεροζυγώτες εμφανίζονται στην ενήλικη ηλικία (Myant et al. 1973). Η συχνότητά τους αυξάνει με την πάροδο του χρόνου. Το 75% των ασθενών εμφανίζει αυτό το κλινικό σημείο. Συχνά τα ξανθώματα βρίσκονται, ιδίως τα ξανθώματα του αχίλλειου τένοντα, και οι ασθενείς εμφα



συμπτώματα τενοντοελυτρίτιδας. Τα τενόντια ξανθώματα πρέπει να διαφοροδιαγιγνώσκονται από τους τενόντιους όγκους, τους ουρικούς τόφους και τα ρευματοειδή οζίδια. Δύο άλλες καταστάσεις μπορούν επίσης να δημιουργήσουν τέτοια ξανθώματα: 1) η εγκεφαλονωτιαία ξανθωμάτωση (εναποθέσεις χολεστανόλης) και 2) η β-σιτοστερολαιμία (Salen 1983, Bhattacharyya et al. 1974). Σε ασθενείς με τενόντια ξανθώματα και φυσιολογικά επίπεδα TCHOL πρέπει πρώτα να αποκλεισθεί η πιθανότητα εργαστηριακού λάθους ή άλλης νόσου που ελαττώνει τα επίπεδα των λιπιδίων και μετά να εξετασθεί η πιθανότητα ύπαρξης αυτών των εξαιρετικά σπάνιων καταστάσεων. Σε ορισμένους ασθενείς με την έναρξη της υπολιπιδαιμικής θεραπείας παρατηρείται αίσθημα δυσανεξίας στους τένοντες ή και τενοντοελυτρίτιδα, φαινόμενο παρόμοιο με τις κρίσεις ουρικής αρθρίτιδας που ενίοτε συμβαίνουν κατά την έναρξη της αγωγής με αλλοπουρινόλη σε ασθενείς με υπερουριχαιμία. Άλλα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της νόσου είναι η εναπόθεση χοληστερόλης στα βλέφαρα και στον κερατοειδή, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ξανθελασμάτων και γεροντότοξου, αντίστοιχα (σχήμα 8).

#### Σχήμα 8

*A: Ξανθελάσματα σε ασθενή με ετερόζυγη FH*



### 3: Γεροντότοξο σε ασθενή με ετερόζυγη FH



Τα ξανθελάσματα και το γεροντότοξο δεν αποτελούν ειδικά γνωρίσματα της FH, αλλά παρατηρούνται και σε δυσλιπιδαιμίες άλλης αιτιολογίας ή ακόμη και σε νορμολιπιδαιμικά άτομα. Μεγαλύτερη αξία έχει η ανεύρεση γεροντότοξου σε νεαρά άτομα, αφού στις περισσότερες περιπτώσεις οφείλεται σε FH.

### B. Ομοζυγώτες

Κατά τη στιγμή της γέννησης η TCHOL είναι 6 έως 8 φορές πιο αυξημένη σε σύγκριση με τα φυσιολογικά νεογνά. Η στεφανιαία νόσος εμφανίζεται ήδη από την ηλικία των 10 ετών, ενώ έχει περιγραφεί οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου σε ηλικία μόλις 18 μηνών. Ο θάνατος επέρχεται στην πλειοψηφία των ασθενών πριν από την ηλικία των 30 ετών από τις επιπλοκές της στεφανιαίας αθηρωμάτωσης. Στους ομοζυγώτες εκτός από τα τενόντια ξανθώματα παρατηρείται ένας άλλος μοναδικός τύπος ξανθώματων. Πρόκειται για τα υποδερματικά επίπεδα ή οζώδη ξανθώματα (σχήμα 9).



Σχήμα 9: Οζώδη ξανθώματα στον αγκώνα σε ασθενή με ομόζυγη FH



Είναι υπερυψωμένες κιτρινωπές πλάκες, που απαντούν στα γόνατα, στους αγκώνες, στους γλουτούς και στις μεσοδακτύλιες επιφάνειες των δακτύλων των χεριών. Η εναπόθεση λιπιδίων στην αορτική βαλβίδα συχνά οδηγεί σε συμπτωματική στένωσή της. Τέλος, σε ασθενείς με ομόζυγη FH είναι δυνατόν να παρατηρηθεί αρθρίτιδα των γονάτων, των αγκώνων, των καρπών και των εγγύς μεσοφαλαγγικών αρθρώσεων. Στο αρθρικό υγρό συχνά ανευρίσκονται κρύσταλλοι χοληστερόλης.

### 1.2.5 Διάγνωση

Πρέπει να υποψιαζόμαστε την FH σε κάθε ασθενή με μεμονωμένη αύξηση της ολικής και LDL χοληστερόλης και φυσιολογική συγκέντρωση τριγλυκεριδίων (TRG) νηστείας. Εντούτοις, οι περισσότεροι υπερχοληστερολαιμικοί ασθενείς έχουν πολυγονική ή οικογενή συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία ή νοσήματα που συνδυάζονται με αύξηση των επιπέδων της LDL-C, όπως ο υποθυρεοειδισμός, η αποφρακτική ηπατική νόσος και το νεφρωσικό σύνδρομο. Αφού αποκλεισθούν τα δευτεροπαθή αίτια υπερχοληστερολαιμίας με τον κατάλληλο εργαστηριακό έλεγχο, η διαφορική διάγνωση μεταξύ της FH και των άλλων αιτιών πρωτοπαθούς υπερχοληστερολαιμίας βασίζεται στα ακόλουθα:





1. Στις υψηλές τιμές TCHOL (350-400 mg/dl) και LDL-C, οι οποίες καθιστούν πιο πιθανή τη διάγνωση της FH, ενώ μέτρια αυξημένες τιμές (TCHOL 280-350 mg/dl) δεν μπορούν να αποκλείσουν τις άλλες πρωτοπαθείς διαταραχές.
  2. Στην παρουσία τενόντιων ξανθωμάτων, η οποία είναι σχεδόν παθολογική για την FH.
  3. Στον έλεγχο των λιπιδίων των πρώτου βαθμού συγγενών. Στην FH οι μισοί πρώτου βαθμού συγγενείς εμφανίζουν επίσης αυξημένη TCHOL. Η διάγνωση της FH καθίσταται ακόμη πιο πιθανή με την ανεύρεση στο συγγενικό περιβάλλον του ασθενή ενός παιδιού με υπερχοληστερολαιμία.
  4. Στην ηλικία έναρξης της υπερχοληστερολαιμίας. Οι ασθενείς με FH αναφέρουν μακροχρόνιο ιστορικό υπερλιπιδαιμίας ήδη από την παιδική ηλικία, ενώ οι υπόλοιπες διαταραχές συνήθως κάνουν την εμφάνισή τους κατά την 3<sup>η</sup> ή 4<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής.
- Τα κριτήρια για τη διάγνωση της νόσου φαίνονται στο πίνακα 1.

*Πίνακας 1: Κριτήρια για τη διάγνωση της FH*

Οριστική διάγνωση (1+2)
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. TCHOL &gt; 260 mg/dl σε παιδιά (&lt;16 ετών) ή &gt; 290 mg/dl σε ενήλικα ή LDL-C &gt; 190 mg/dl σε ενήλικα.</li> <li>2. Τενόντια ξανθώματα στον ασθενή ή σε 1<sup>ου</sup> ή 2<sup>ου</sup> βαθμού συγγενή.</li> </ol>
Πιθανή διάγνωση (1 +2 ή 1+3)
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. TCHOL &gt; 260 mg/dl σε παιδί (&lt;16 ετών) ή &gt; 290 mg/dl σε ενήλικα ή LDL-C &gt; 190 mg/dl σε ενήλικα.</li> <li>2. Οικογενειακό ιστορικό πρώιμης στεφανιαίας νόσου.</li> <li>3. Οικογενειακό ιστορικό αυξημένης TCHOL (&gt; 290 mg/dl)</li> </ol>

Η διάγνωση της ομόζυγης FH συνήθως δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη δυσκολία. Πολύ συχνά τα παιδιά αυτά εξετάζονται από δερματολόγο εξαιτίας των δερματικών ξανθωμάτων. Αργότερα, η διάγνωση γίνεται όταν εμφανισθεί στηθάγχη ή συγκοπτικό επεισόδιο που οφείλεται σε αορτική στένωση. Οι ασθενείς έχουν πολύ υψηλά επίπεδα TCHOL (>600 mg/dl), ενώ τα επίπεδα των TRG είναι φυσιολογικά.



Σε εξειδικευμένα εργαστήρια η χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) αποκαλύπτει την υπεύθυνη μετάλλαξη του LDLR, ενώ η διάγνωση μπορεί επίσης να στηριχθεί στην άμεση μέτρηση του αριθμού των LDLR σε καλλιέργειες ινοβλαστών δέρματος ή λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος.

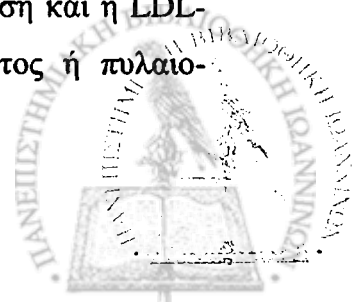
### 1.2.6 Αντιμετώπιση

Ο στόχος της θεραπείας της FH είναι η μείωση των επιπέδων της LDL-C, με σκοπό την επιβράδυνση της εξέλιξης της αθηρωματικής νόσου. Όλοι οι ασθενείς πρέπει να τίθενται σε δίαιτα πτωχή σε χοληστερόλη και κεκορεσμένα λίπη και πλούσια σε μονοακόρεστα λίπη και τροφές με υπόλειμμα. Επιπρόσθετα, όλοι οι παράγοντες κινδύνου για στεφανιαία νόσο (κάπνισμα, σακχαρώδης διαβήτης, υπέρταση) απαιτούν επιθετική αντιμετώπιση.

Σε όλους πρακτικά τους ασθενείς με FH πρέπει να χορηγείται υπολιπιδαιμική φαρμακοθεραπεία με σκοπό τη μείωση των επιπέδων της ολικής και της LDL χοληστερόλης. Τα φάρμακα πρώτης επιλογής είναι οι αναστολείς της HMG-CoA αναγωγής (στατίνες). Η χορήγηση συνδυασμού στατινών και ρητινών δέσμευσης των χολικών οξέων είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και προκαλεί σημαντική μείωση των επιπέδων της LDL-C. Σπάνια συνιστάται η προσθήκη ενός τρίτου φαρμάκου (νικοτινικού οξέος ή φιβρατών).

Ιδιαίτερη προσπάθεια απαιτείται για την αντιμετώπιση της FH σε παιδιά. Δεν συνιστάται η διαιτητική παρέμβαση σε παιδιά ηλικίας έως 2 ετών που εμφανίζουν ταχεία ανάπτυξη και επομένως απαιτούν αυξημένη πρόσληψη λίπους. Η διαιτητική παρέμβαση είναι ιδιαίτερα σημαντική σε παιδιά ηλικίας 2-10 ετών. Μετά την ηλικία των 10 ετών συνιστάται η έναρξη φαρμακοθεραπείας, ιδίως όταν τα επίπεδα της LDL-C είναι μεγαλύτερα από 160 mg/dl. Τα μόνα υπολιπιδαιμικά φάρμακα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε παιδιά είναι οι ρητίνες δέσμευσης χολικών οξέων (χολεστουραμίνη και κολεστιπόλη). Πρόσφατα οι στατίνες έχουν δοκιμαστεί με επιτυχία και σε παιδιά με FH (Stein EA, 2001, Black DM, 2001). Στα παιδιά με FH πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην υιοθέτηση ενός υγιεινοδιαιτητικού τρόπου ζωής που περιλαμβάνει τακτική άσκηση, αποφυγή του καπνίσματος και αυστηρό περιορισμό των προσλαμβανόμενων ζωικών λιπών.

Σε ασθενείς με ομόζυγη FH η φαρμακοθεραπεία είναι γενικά αναποτελεσματική, εξαιτίας της αδυναμίας αύξησης του αριθμού των LDLR (εξαιρέση αποτελεί η χορήγηση υψηλών δόσεων ατορβαστατίνης ή σιμβαστατίνης). Η θεραπεία εκλογής είναι η πλασμαφαίρεση και η LDL-αφαίρεση, ενώ σε λίγες περιπτώσεις έχει επιχειρηθεί μεταμόσχευση ήπατος ή πύλαιο-συστηματική αναστόμωση.



Η FH είναι πιθανά μια από τις πρώτες γενετικές διαταραχές που θα αντιμετωπιστεί με γονιδιακή θεραπεία.



## 1.3 Απολιποπρωτεΐνη Ε

### 1.3.1 Περιγραφή και λειτουργία

Η apo E είναι κύριο συστατικό των λιποπρωτεϊνών [κύρια των χυλομικρών, των πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (VLDL), των καταλοίπων των χυλομικρών και των VLDL (IDL) και των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (HDL)] και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό τους (Mahley 1988, Mahley et al. 1999, Beisiegel et al. 1989, Hussain et al. 1991).

Η apo E είναι μια πρωτεΐνη του πλάσματος που παράγεται σε πολλά όργανα και κυρίως στο ήπαρ, στον εγκέφαλο, στο σπλήνα, στα επινεφρίδια, στις ωθήκες, στους νεφρούς και στους μύες (Mahley 1988, Linton et al. 1991). Αξίζει να σημειωθεί ότι η apo E δεν παράγεται στο ενδοθήλιο του εντέρου. Η ηπατική παραγωγή της ευθύνεται για περίπου τα 2/3 ή τα 3/4 της ποσότητας της apo E στο πλάσμα. Η apo E βρίσκεται επίσης σε μεγάλες ποσότητες στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, αφού παράγεται τοπικά από τα αστροκύτταρα. Μελέτες σε ασθενείς με μεταμόσχευση ήπατος έδειξαν ότι η apo E του πλάσματος δεν διέρχεται τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό, αφού οι ασθενείς αυτοί είχαν διαφορετικούς γονότυπους της apo E στο πλάσμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Συγκεκριμένα, στο πλάσμα επικρατούσε ο γονότυπος του δότη, ενώ στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ο γονότυπος του δέκτη (Linton et al. 1991, Boyles et al. 1985). Τέλος, η apo E παράγεται και από τα μακροφάγα.

Η apo E έχει μοριακό βάρος 34,200 daltons και αποτελείται από 299 αμινοξέα. Η διάσπαση της πρωτεΐνης με το πρωτεολυτικό ένζυμο θρομβίνη έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δύο τελικών τμημάτων: το αμινοτελικό και το καρβοξυλικό άκρο. Το αμινοτελικό άκρο αποτελείται από τα αμινοξέα 1 έως 191 (MB 22KD) και το καρβοξυλικό άκρο περιέχει τα αμινοξέα 216 έως 299 (MB 10KD). Αυτά τα δύο δομικά τμήματα της apo E αποτελούν και λειτουργικές περιοχές. Το αμινοτελικό άκρο είναι υπεύθυνο για την ένωση της apo E με τους LDLR, ενώ το καρβοξυλικό άκρο χρησιμεύει για τη σύνδεση της απολιποπρωτεΐνης με το μόριο των λιποπρωτεϊνών (Mahley 1988, Wilson et al. 1991). Με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έχει βρεθεί ότι το τμήμα του αμινοτελικού άκρου που περιέχει τα αμινοξέα 140 έως 150 αποτελεί το τμήμα της απολιποπρωτεΐνης που ενώνεται με τον LDLR (Weisgraber et al. 1983). Η περιοχή αυτή είναι πλούσια σε αμινοξέα με θετικό φορτίο (κύρια αργινίνη και λυσίνη). Τα αμινοξέα αυτά δεν συμμετέχουν στο σχηματισμό ενδομοριακών ενώσεων, αλλά προβάλλουν στο εξωτερικό του μορίου και συνδέονται με τον αρνητικά φορτισμένο LDLR. Η αντικατάσταση ενός αμινοξέος της περιοχής αυτής δεν οδηγεί σε πλήρη κατάρρευση της σύνδεσης της απολιποπρωτεΐνης με τον υποδοχέα. Έτσι, φαίνεται ότι υπάρχουν πολλαπλές



θέσεις σύνδεσης της απολιποπρωτεΐνης με τον υποδοχέα (Wilson et al. 1991). Η δευτερογενής δομή του μορίου της απολιποπρωτεΐνης είναι επίσης σημαντική για τη χημική συγγένεια του μορίου με τον υποδοχέα. Αντικαταστάσεις αμινοξέων εκτός της συγκεκριμένης περιοχής (140 έως 150), οι οποίες επηρεάζουν τη δευτερογενή δομή του μορίου μειώνουν τη χημική συγγένεια του μορίου με τον υποδοχέα (Lalazar et al. 1988). Παράδειγμα αποτελεί η αντικατάσταση της αργινίνης στη θέση 158 του μορίου με κυστεΐνη. Η κατάργηση του ενδομοριακού δεσμού μεταξύ της αργινίνης στη θέση 158 και της ασπαργίνης στη θέση 154 και η δημιουργία ενός νέου ενδομοριακού δεσμού μεταξύ της αργινίνης στη θέση 150 και της ασπαργίνης στη θέση 154 έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας νέας δομής της πρωτεΐνης. Η νέα αυτή ισομορφή της apo E, γνωστή ως apo E2, εμφανίζει μειωμένη χημική συγγένεια με τον LDLR (Innerarity et al. 1983). Τα ίδια φαίνεται ότι ισχύουν και για τη χημική συγγένεια του καρβοξυλικού άκρου με τις λιποπρωτεΐνες. Η αντικατάσταση της κυστεΐνης στη θέση 112 του αμινοτελικού άκρου του μορίου με αργινίνη έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της δομής του μορίου. Η νέα αυτή ισομορφή, γνωστή ως apo E4, εμφανίζει μεγάλη ικανότητα σύνδεσης με τις VLDL σε σύγκριση HDL (Gregg et al. 1986). Επίσης, φαίνεται να υπάρχει αυξημένη χημική συγγένεια αυτής της ισομορφής με τον LDLR σε σύγκριση με τις άλλες ισομορφές της apo E (Weisgraber et al. 1982).

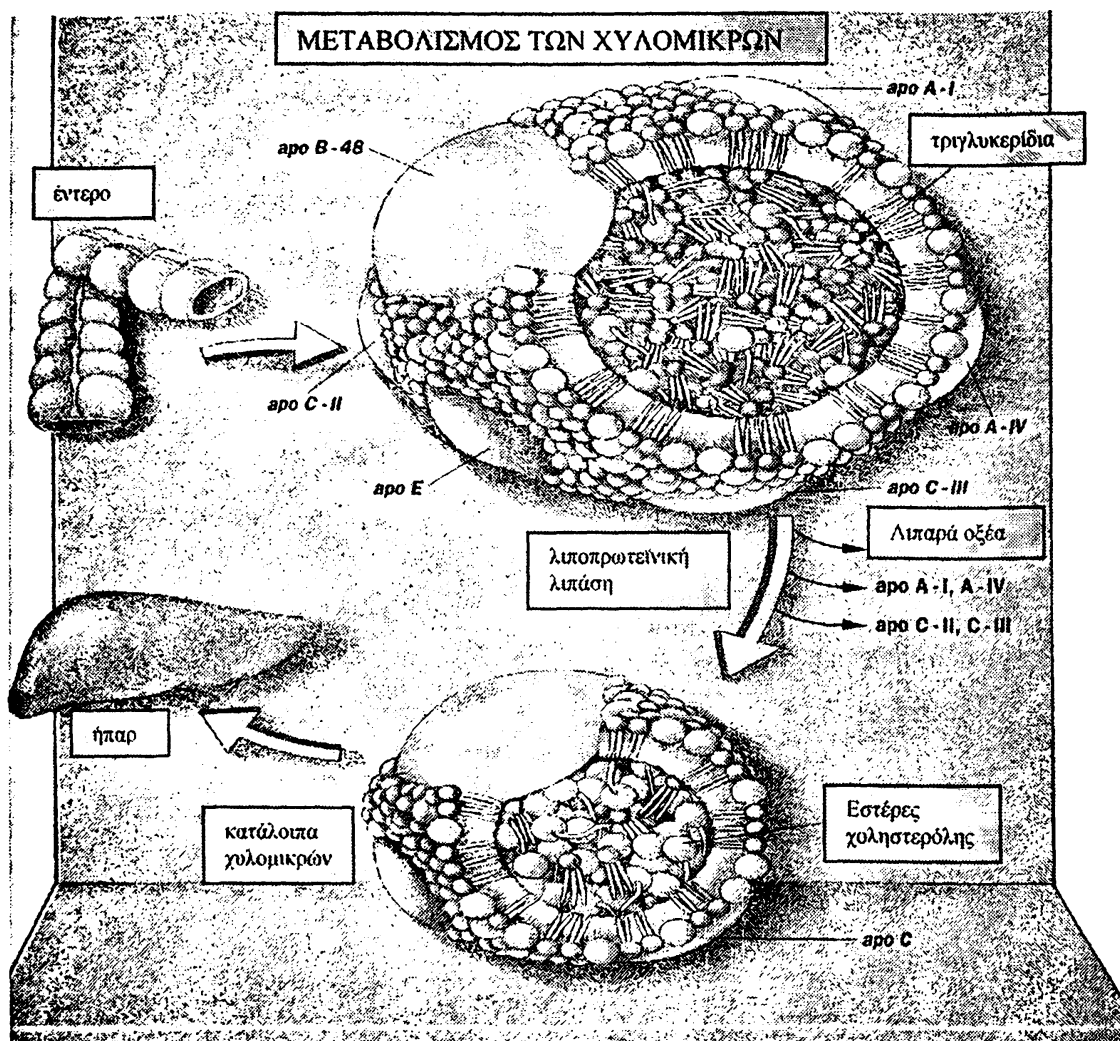
Το γονίδιο που κωδικοποιεί την apo E βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19, κοντά στα γονίδια που κωδικοποιούν τις apo CII και CIII (Das et al. 1985, Smit et al. 1988). Στο ίδιο χρωμόσωμα βρίσκεται και το γονίδιο που κωδικοποιεί τον LDLR. Αποτελείται από 3.7 kb και συγκροτείται από τον εναρκτή, 4 εξόνια και 3 ιντρόνια (Das et al. 1985, Paik et al. 1985). Δύο σημειακές μεταλλάξεις στο εξόνιο 4 είναι υπεύθυνες για τα 3 κοινά αλληλία του γονιδίου που κωδικοποιεί την apo E (αλληλία E2, E3 και E4) (Das et al. 1985). Οι αντίστοιχες ισομορφές της apo E είναι οι E2, E3 και E4. Η apo E3 έχει κυστεΐνη στη θέση 112 και αργινίνη στη θέση 158. Στην apo E2 στη θέση 158, η αργινίνη αντικαθίσταται από κυστεΐνη, ενώ στην apo E4 στη θέση 112, η κυστεΐνη αντικαθίσταται από αργινίνη. Τα αλληλία E2, E3 και E4 καθορίζουν 6 γονότυπους: 3 ομόζυγους E2/E2, E3/E3 και E4/E4 και 3 ετερόζυγους E2/E3, E2/E4 και E3/E4. Οι συχνότητες των E2, E3 και E4 είναι σχετικά σταθερές στη λευκή φυλή (8%, 78% και 14% αντίστοιχα) (Menzel et al. 1983).

Η apo E είναι δομικό και λειτουργικό μόριο των λιποπρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, συμβάλλει στην ανακατανομή του λίπους μεταξύ των διαφόρων οργάνων, καθώς και μεταξύ των κυττάρων ενός οργάνου.



1. Μεταφορά διαιτητικού λίπους από το λεπτό έντερο στους περιφερικούς ιστούς και στο ήπαρ (σχήμα 10):

Σχήμα 10: Μεταβολισμός των χυλομικρών

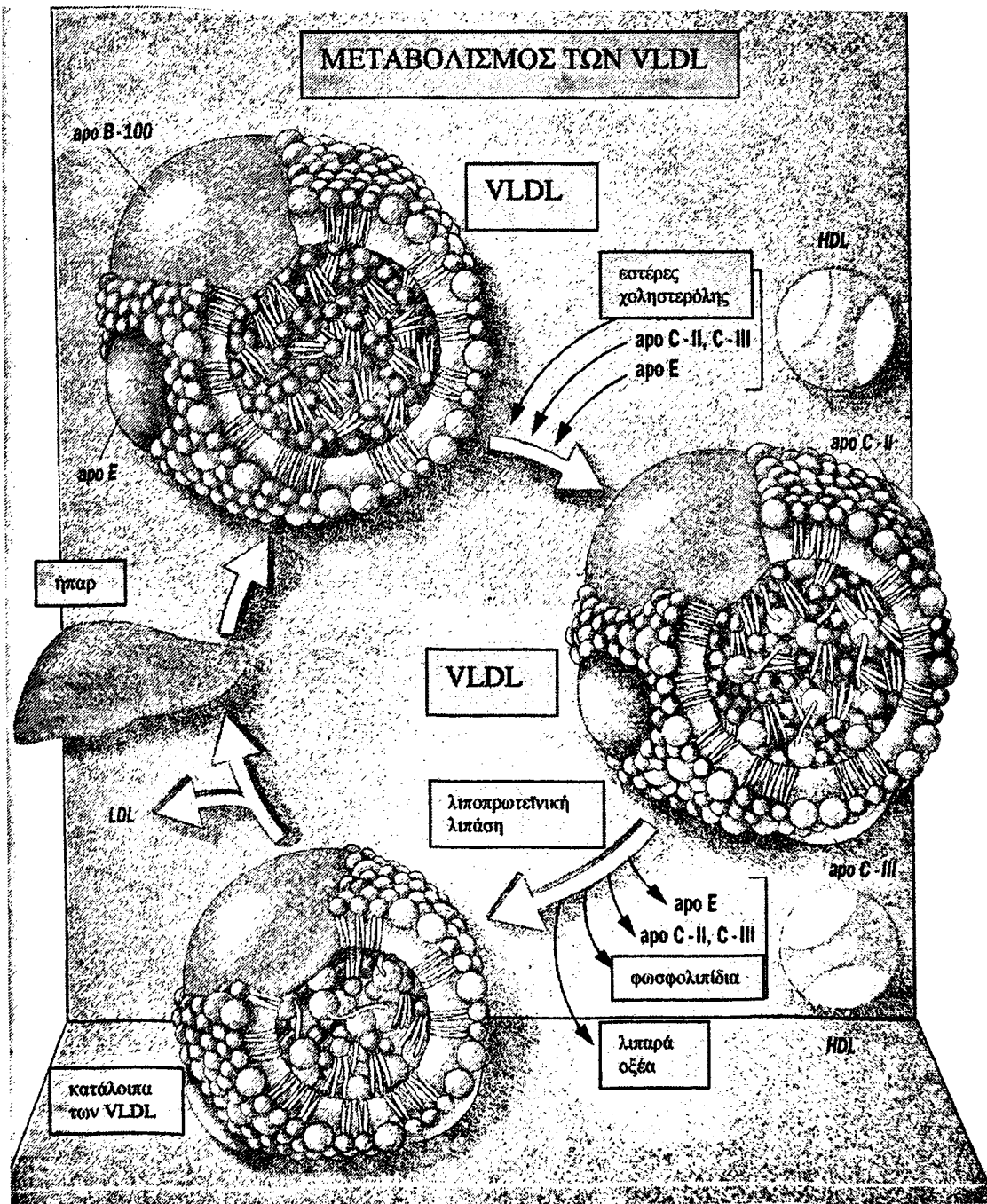


Τα χυλομικρά συντίθενται στο λεπτό έντερο και περιέχουν το διαιτητικό λίπος (κυρίως τριγλυκερίδια και χοληστερόλη). Η ενσωμάτωση της apo E στα χυλομικρά γίνεται μετά την έκκριση τους στη λεμφική κυκλοφορία. Στα τριχοειδή των μυών και του λιπώδους ιστού, όπου υπάρχει το ένζυμο λιποπρωτεϊνική λιπάση, υδρολύονται τα τριγλυκερίδια των χυλομικρών και μετατρέπονται σε λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα είτε χρησιμοποιούνται τοπικά στους μύες για την παραγωγή ενέργειας, είτε αποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό υπό τη μορφή τριγλυκεριδίων, είτε μεταφέρονται στο ήπαρ. Μετά την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων τα χυλομικρά γίνονται μικρότερα, έχουν μεγαλύτερη ποσότητα χοληστερόλης και αποτελούν τα κατάλοιπα (remnant) των χυλομικρών. Αυτά τα κατάλοιπα

ρχονται στα ηπατοκύτταρα, αφού η apo E που υπάρχει στην επιφάνεια τους συνδέεται με τους LDLR. Πιο συγκεκριμένα, η apo E συνδέεται με τον LDLR, καθώς και με τους υποδοχείς των καταλοίπων που ονομάζονται και apo E υποδοχείς. Σε αντίθεση με τον LDLR, ο apo E υποδοχείς δεν έχει απομονωθεί και μελετηθεί επαρκώς (Mahley et al. 1991).

Μεταφορά λιπιδίων από το ήπαρ στους περιφερικούς ιστούς (σχήμα 11):

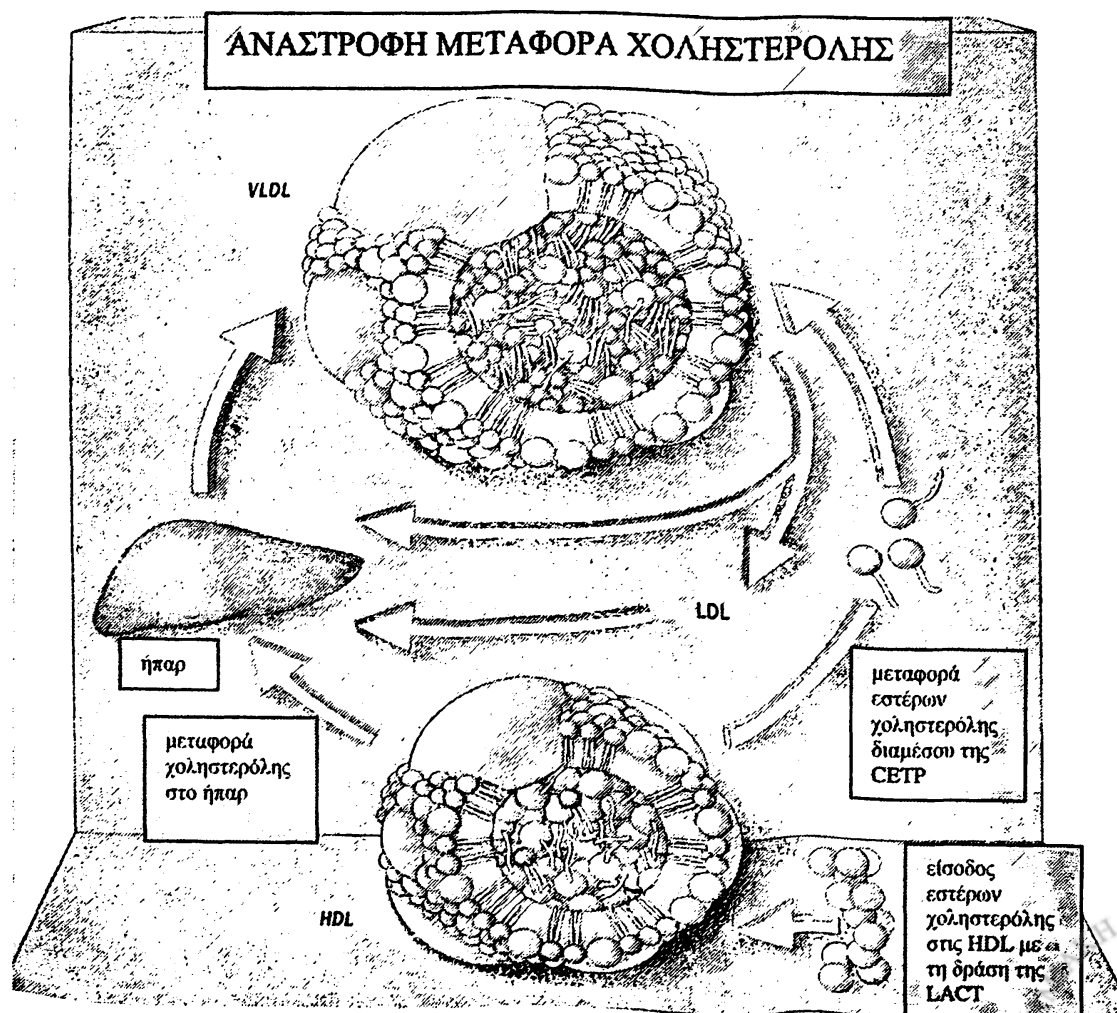
Σχήμα 11: Μεταβολισμός των VLDL



Τα ηπατοκύτταρα συνθέτουν και εκκρίνουν VLDL. Οι VLDL είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια και περιέχουν στο μόριο τους τις apo B100 και E. Οι VLDL ακολουθούν τον ίδιο μεταβολικό δρόμο, όπως τα χυλομικρά. Αξίζει να σημειωθεί ότι η δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης μειώνεται όταν τα επίπεδα της apo E στο πλάσμα είναι αυξημένα. Η apo CII βρίσκεται στο μόριο των VLDL και αποτελεί συνέζυμο για τη λιποπρωτεϊνική λιπάση. Όταν τα επίπεδα της apo E στο πλάσμα αυξάνουν, η apo CII αντικαθίσταται από την apo E με αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (Huang et al. 1998). Τα κατάλοιπα των VLDL (IDL) είτε εισέρχονται στα ηπατοκύτταρα διαμέσου της σύνδεσης της apo E με αυτούς τους δύο υποδοχείς που αναφέρθηκαν, είτε υφίστανται την επίδραση της ηπατικής λιπάσης με αποτέλεσμα την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων τους στο χώρο του Disse, με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό των πλούσιων σε χοληστερόλη LDL (Brown et al. 1986).

### 3. Μεταφορά χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ (σχήμα 12):

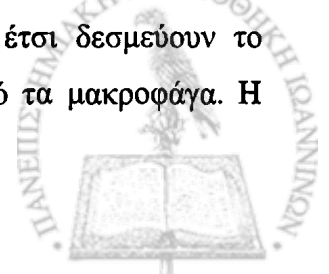
Σχήμα 12: Μεταφορά χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ





Η μεταφορά της περίσσειας χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ έχει τεράστια σημασία στη διαδικασία της αθηρογένεσης. Κύτταρα που συσσωρεύουν χοληστερόλη στο κυτταρόπλασμα τους (π.χ τα μακροφάγα) ελευθερώνουν χοληστερόλη στο διάμεσο χώρο. Η χοληστερόλη αυτή δεσμεύεται από τις HDL που είναι πλούσιες σε φωσφολιπίδια. Στο διάμεσο χώρο υπάρχει επίσης apo E, η οποία όπως αναφέρθηκε, παράγεται τοπικά σε διάφορους ιστούς. Η συσσώρευση χοληστερόλης στις HDL αυξάνει την συγγένεια της με την apo E, η οποία στη συνέχεια ενσωματώνεται στις HDL (Mahley et al. 1988). Στη συνέχεια, οι apo E που βρίσκονται στην επιφάνεια των HDL συνδέονται με τους LDLR στα ηπατοκύτταρα με τελικό αποτέλεσμα τη μεταφορά χοληστερόλης στα ηπατοκύτταρα (Koo et al. 1985). Ενώ σε μερικά ζώα (ποντίκια και σκυλιά) αυτός ο μεταβολικός δρόμος θεωρείται ότι είναι η κύρια οδός μεταφοράς της περίσσειας χοληστερόλης στα ηπατοκύτταρα, στον άνθρωπο πιστεύεται ότι αυτός ο μηχανισμός είναι επικουρικός. Πράγματι, η χοληστερόλη μεταφέρεται από τις HDL στις VLDL και LDL με τη βοήθεια του ενζύμου που μεταφέρει εστέρες χοληστερόλης (CETP), το οποίο υπάρχει στο πλάσμα. Στη συνέχεια, η χοληστερόλη διαμέσου αυτών των σωματιδίων μεταφέρεται τελικά στα ηπατοκύτταρα (Stein et al, 1999). Επίσης, πρόσφατα ανακαλύφθηκε ο SR-BI υποδοχέας (scavenger receptor BI) που εκφράζεται στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων και των κυττάρων της στεροειδογένεσης και διαμέσου του οποίου οι εστέρες χοληστερόλης που υπάρχουν στις HDL εισέρχονται στα κύτταρα (Acton et al. 1996). Ο υποδοχέας αυτός φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά της περίσσειας χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ (Kozarsky et al. 1997).

**4. Ανακατανομή χοληστερόλης στα κύτταρα ενός οργάνου ή ιστού:** Η apo E φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανακατανομή της χοληστερόλης ανάμεσα στα κύτταρα ανάλογα με τις ανάγκες των κυττάρων σε χοληστερόλη. Παράδειγμα αποτελεί το μοντέλο που παρατηρείται μετά από τραυματισμό ενός περιφερικού νεύρου. Αμέσως μετά τον τραυματισμό, τα μακροφάγα της περιοχής της βλάβης παράγουν μεγάλες ποσότητες apo E, έτσι ώστε η συγκέντρωσή της τοπικά να είναι 100 έως 200 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωσή της στα υγιή νεύρα που βρίσκονται κοντά στο σημείο της βλάβης. Η χοληστερόλη που απελευθερώνεται στην περιοχή εξαιτίας της καταστροφής των κυττάρων συνδέεται με την apo E και το σύμπλεγμα που δημιουργείται φαγοκυτταρώνεται από τα μακροφάγα. Στη φάση της επούλωσης, οι νευρίτες που ξεκινούν από το κεντρικό κολόβωμα του τραυματισμένου νεύρου εκφράζουν LDLR στην επιφάνειά τους και έτσι δεσμεύουν το σύμπλεγμα χοληστερόλης-apo E που απελευθερώνεται ταυτόχρονα από τα μακροφάγα. Η

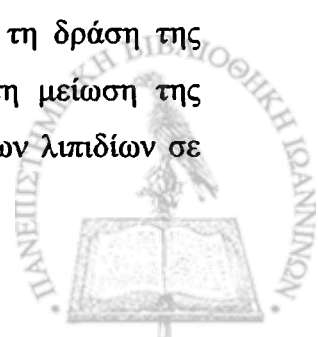


χοληστερόλη είναι απαραίτητο δομικό υλικό για την επούλωση του κολοβώματος (Ignatius et al. 1986).

### 1.3.2 Σημασία των κοινών πολυμορφισμών της apo E

Η υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III είναι μια γενετική διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων πλούσιων σε χοληστερόλη στο πλάσμα και πρόωμη αθηρωμάτωση. Η διαταραχή αυτή οφείλεται σε μειωμένη συγγένεια ορισμένων ισομορφών της apo E με τους LDLR και τους apo E υποδοχείς. Η apo E2, όπως ήδη αναφέρθηκε, παρουσιάζει μειωμένη συγγένεια με τους LDLR, εξαιτίας αντικατάστασης του αμινοξέος αργινίνης στη θέση 158 του μορίου της πρωτεΐνης από κυστεΐνη. Ένα ποσοστό περίπου 10% των ατόμων με γονότυπο apo E2/2 εμφανίζουν υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III. Αντίθετα, τα περισσότερα άτομα που έχουν τον πιο πάνω γονότυπο εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα λιπιδίων (ολικής και LDL χοληστερόλης) στο πλάσμα. Είναι φανερό ότι χρειάζεται ένας επιπλέον παράγοντας (γενετικός ή περιβαλλοντικός) για την εκδήλωση της νόσου σε ομόζυγα E2/2 άτομα. Οι καταστάσεις που ευοδώνουν την εμφάνιση αυτής της δυσλιποπρωτεϊναιμίας είτε αυξάνουν την παραγωγή των λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων είτε μειώνουν τον καταβολισμό τους (Mahley et al. 1999).

Η apo E2 συσχετίζεται με μειωμένα, ενώ η apo E4 με αυξημένα επίπεδα apo B, καθώς και ολικής και LDL χοληστερόλης στο πλάσμα. Αντίθετα, η apo E2 συσχετίζεται με αυξημένα, ενώ η apo E4 με μειωμένα επίπεδα apo E και TRG στο πλάσμα (Ehnholm et al. 1986, Davignon et al. 1988, Xhignesse et al. 1991, Smit et al. 1988). Επίσης, το αλληλίο E4 έχει συσχετισθεί με μειωμένα επίπεδα HDL-χοληστερόλης (HDL-C) σε ασθενείς με υπερλιπιδαιμία (James et al. 1993). Έχει υπολογισθεί ότι οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί της apo E ευθύνονται για το 7% περίπου της μεταβλητότητας των τιμών των λιπιδίων στο πλάσμα διαφορετικών ατόμων (Davignon et al. 1988, Mahley 1988). Η μείωση της LDL-C στα άτομα με apo E2 οφείλεται: α) σε μειωμένη υδρόλυση των VLDL από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση εξαιτίας της αντικατάστασης της apo CII στο μόριο των VLDL από τα αυξημένα επίπεδα της apo E στο πλάσμα (όπως ήδη αναφέρθηκε το αλληλίο E2 συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα apo E σε σύγκριση με τα αλληλία E3 και E4), με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής των καταλοίπων των VLDL τα οποία είναι πρόδρομα μόρια των LDL (Huang et al. 1998a and 1998b) και β) στο γεγονός ότι η apo E2 επάγει τη δράση της ηπατικής λιπάσης σε μικρότερο βαθμό από την apo E4 με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής των LDL (Thuren et al, 1992 and 1991). Η αύξηση των τιμών των λιπιδίων σε



άτομα με το αλληλίο E4 οφείλεται στην αυξημένη είσοδο των λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων στα ηπατοκύτταρα, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης της ενδοκυττάριας χοληστερόλης και επομένως τη μείωση της έκφρασης των LDLR των ηπατοκυττάρων. Η μείωση του καταβολισμού των LDL έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της LDL-C (Gregg et al. 1986 and 1988).

Τα αυξημένα επίπεδα της LDL-C στο πλάσμα αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Έτσι, το αλληλίο E4 θεωρείται παράγοντας κινδύνου για στεφανιαία νόσο, αφού συσχετίζεται με υψηλότερες τιμές LDL-C (Wilson et al. 1996). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο σχετικός κίνδυνος για την εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου είναι διπλάσιος σε άτομα που έχουν το αλληλίο E4 σε σύγκριση με άτομα που έχουν το αλληλίο E3 (Stengard et al. 1995). Ο αυξημένος κίνδυνος παραμένει και μετά από διόρθωση για τα επίπεδα της LDL-C, ένα εύρημα που υποδηλώνει ότι το αλληλίο E4 μπορεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για στεφανιαία νόσο ανεξάρτητα από την επίδραση του στα επίπεδα της LDL-C. Το αλληλίο E4 μπορεί επίσης να επηρεάσει και την έκταση της στεφανιαίας νόσου. Μελέτες παρασκευασμάτων θωρακικής και κοιλιακής αορτής καθώς και στεφανιαίων αγγείων έδειξαν την παρουσία περισσότερο εκτεταμένων αθηρωματικών πλακών σε άτομα που είχαν το αλληλίο E4 σε σύγκριση με άτομα που είχαν τα αλληλία E2 και E3 (Hixson 1991, Wang et al. 1995). Επιπλέον, η επαναστένωση των στεφανιαίων αγγείων 6 μήνες μετά από αγγειοπλαστική ήταν συχνότερη σε άτομα με το αλληλίο E4 σε σύγκριση με ασθενείς με τα αλληλία E3 και E3 (van Bockxmeer et al. 1994).

Οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί της apo E πιθανά επηρεάζουν την ανταπόκριση των λιπιδίων μετά τη χορήγηση υπολιπιδαιμικών φαρμακευτικών ουσιών (π.χ στατινών ή φιβρατών) σε ασθενείς με υπερλιπιδαιμία. Έτσι, οι Pedro-Botet και συνεργάτες έδειξαν ότι η χορήγηση ατορβαστατίνης σε ασθενείς με πρωτοπαθή υπερχοληστερολαιμία είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη μείωση των TRG, της ολικής και LDL χοληστερόλης σε ασθενείς που είχαν το αλληλίο E2 σε σύγκριση με ασθενείς που είχαν τα αλληλία E3 και E4 (Pedro et al. 2001). Παρόμοια αποτελέσματα έδειξαν και οι Ordovas και συνεργάτες (Ordovas et al. 1995). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση σιμβαστατίνης ή γεμφιπροζίλης σε ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία που είχαν το αλληλίο E2 είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη μείωση της ολικής και LDL χοληστερόλης ή των TRG σε σύγκριση με ασθενείς που είχαν τα αλληλία E3 και E4 (Nestel et al. 1997). Αντίθετα, άλλες μελέτες έδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ανταπόκρισης των λιπιδαιμικών παραμέτρων μετά τη χορήγηση στατινών και των



πολυμορφισμών του γονιδίου που κωδικοποιεί την apo E (Sanllehy et al. 1998, Gerdes et al. 2000).

Τα δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά το ρόλο των πολυμορφισμών της apo E στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων σε ασθενείς με FH είναι αντικρουόμενα. Οι Lambert και συνεργάτες και οι Ferrieres και συνεργάτες έδειξαν ότι ο apo E 2/2 γονότυπος συσχετιζόταν με χαμηλότερα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης σε παιδιά με FH (Lambert et al. 2001, Ferrieres et al. 1994). Παρόμοια αποτελέσματα έδειξαν και άλλες μελέτες που έγιναν σε ασθενείς με FH (Friedland et al. 1996, Dallongeville et al. 1991). Αντίθετα, οι Tonstad και συνεργάτες δεν παρατήρησαν διαφορές στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων των παιδιών με FH σε σχέση με το γονότυπο της apo E (Tonstad et al. 1995). Αντικρουόμενα είναι επίσης και τα αποτελέσματα ερευνών σε ενήλικες ασθενείς με FH όσον αφορά την επίδραση των πολυμορφισμών της apo E στο λιπιδαιμικό προφίλ αυτών των ασθενών. Μερικές μελέτες έδειξαν ότι η παρουσία του αλληλίου E2 συσχετιζόταν με χαμηλότερα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης (Leitersdorf et al. 1993, Bertolini et al. 2000), ενώ άλλες μελέτες δεν έδειξαν συσχέτιση μεταξύ του λιπιδαιμικού προφίλ των ασθενών και των πολυμορφισμών της apo E (Berglund et al. 1993, Pruss et al. 1990). Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι η παρουσία του αλληλίου E4 σε ασθενείς με ετερόζυγη FH συσχετιζόταν με χαμηλότερα επίπεδα HDL-C σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν έχουν το πιο πάνω αλληλίο (Betard et al. 1996, James et al. 1993). Τέλος, ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι η επίδραση των πολυμορφισμών της apo E στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων σε ασθενείς με FH είναι συνάρτηση του φύλου. Συγκεκριμένα, γυναίκες με το αλληλίο E2 είχαν χαμηλότερα επίπεδα LDL-C, ενώ άνδρες με το αλληλίο E4 είχαν χαμηλότερα επίπεδα TRG (Ferrieres et al. 1994).

Τα δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά το ρόλο των πολυμορφισμών της apo E στην ανταπόκριση των λιπιδαιμικών παραμέτρων μετά τη χορήγηση στατινών σε ασθενείς με FH είναι επίσης αντικρουόμενα. Οι περισσότερες μελέτες έδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ανταπόκρισης στη χορήγηση στατινών και των πολυμορφισμών της apo E (Pruss et al. 1990, Berglund et al. 1993, Heath et al. 1999, Chaves et al. 2001). Αντίθετα, 3 μελέτες έδειξαν ότι οι ασθενείς με ετερόζυγη FH που έχουν το αλληλίο E4 εμφανίζουν μικρότερη μείωση της LDL-C μετά τη χορήγηση στατινών σε σύγκριση με τους ασθενείς που έχουν τα αλληλία E2 και E3 της apo E (Pedro-Botet et al. 2001, Couture et al. 1998, O'Neill et al. 2001). Τέλος, οι Leitersdorf και συνεργάτες έδειξαν ότι η παρουσία του αλληλίου E4



συσχετίζονταν με μεγαλύτερη μείωση της LDL-C μετά τη χορήγηση στατινών σε ασθενείς με ετερόζυγη FH (Leitersdorf et al. 1993).

Δεν υπάρχουν δεδομένα για την επίδραση των πολυμορφισμών της apo E στο λιπιδαιμικό προφίλ Ελλήνων ασθενών με FH καθώς και για τη σημασία αυτών των πολυμορφισμών όσον αφορά την ανταπόκριση αυτών των ασθενών στη θεραπεία με στατίνες.



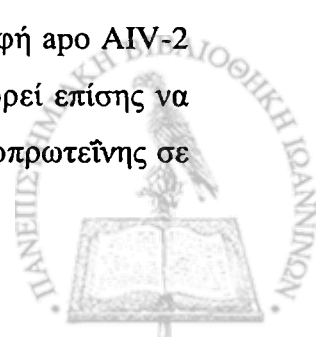
## 1.4 Απολιποπρωτεΐνη AIV

### 1.4.1 Περιγραφή και λειτουργία

Η apo AIV δεν παρουσιάζει, σε αντίθεση με τις άλλες απολιποπρωτεΐνες, υψηλή χημική συγγένεια με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Έτσι, το μεγαλύτερο ποσοστό της (98%) βρίσκεται ελεύθερο στο πλάσμα νηστείας και ένα μικρό ποσοστό είναι ενσωματωμένο στις HDL. Η συγκέντρωση της apo AIV στο πλάσμα αυξάνει (περίπου κατά 16%) 2 ώρες μετά από λιπαρά γεύματα και περίπου το 10% της πρωτεΐνης είναι ενσωματωμένο στο μόριο των χυλομικρών (Green et al. 1980). Ο ρόλος της apo AIV στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί.

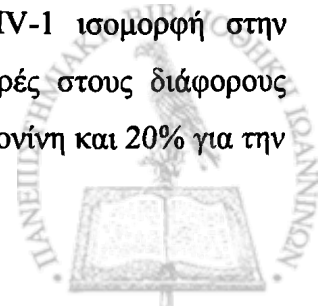
Η apo AIV παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου κατά τη διάρκεια της απορρόφησης του διαιτητικού λίπους και εκκρίνεται στη λεμφική κυκλοφορία ενσωματωμένη στο μόριο των χυλομικρών. Στη συνέχεια, τα χυλομικρά ανταλλάσσουν την apo AIV με τις apo E και CII των HDL. Εξαιτίας της χαμηλής χημικής συγγένειας της apo AIV με τις λιποπρωτεΐνες, το μεγαλύτερο ποσοστό της απολιποπρωτεΐνης διαχωρίζεται από τις HDL και βρίσκεται ελεύθερο στο πλάσμα νηστείας.

Η apo AIV έχει μοριακό βάρος 45,150 daltons και αποτελείται από 376 αμινοξέα. Η πρωτεΐνη εμφανίζει μεγάλη ευκαμψία (flexibility) και αποτελείται από πολλαπλά επαναλαμβανόμενα τμήματα 22 αμινοξέων. Τα τμήματα αυτά σχηματίζουν α-έλικες και είναι αμφιπαθητικά (εμφανίζουν υδρόφοβες και υδρόφιλες περιοχές) (Weinberg 1987). Η πιο πάνω δομή θα μπορούσε να προδιαθέσει σε υψηλή χημική συγγένεια με τις λιποπρωτεΐνες. Οι αμφιπαθητικές α-έλικες που βρίσκονται στο αμινοτελικό και καρβοξυλικό άκρο της πρωτεΐνης είναι περισσότερο υδρόφοβες συγκριτικά με το υπόλοιπο τμήμα της πρωτεΐνης και πιθανά ευθύνονται για το σχηματισμό διμερών. Η δημιουργία διμερών μπορεί να ευθύνεται για το παράδοξο της χαμηλής χημικής συγγένειας της apo AIV με τις λιποπρωτεΐνες (Weinberg et al. 1985 και 1986). Η αντικατάσταση του αμινοξέος γλουταμίνη στη θέση 360 της πρωτεΐνης από το αμινοξύ ιστιδίνη (ισομορφή apo AIV-2) εμποδίζει το σχηματισμό διμερών και έτσι αυξάνει τη συγγένεια αυτής της ισομορφής με τις λιποπρωτεΐνες. Η ισομορφή αυτή περιέχει περισσότερες α-έλικες (75% σε σχέση με 56%), είναι περισσότερο λιπόφιλη και εμφανίζει μικρότερη ευκαμψία και έτσι σχηματίζει ένα πιο σταθερό μόριο (Weinberg et al. 1990). Στις ιδιότητες αυτές αποδίδονται οι διαφορές στην λειτουργικότητα της ισομορφής apo AIV-1 (που έχει γλουταμίνη στη θέση 360) από την ισομορφή apo AIV-2 (βλέπε πιο κάτω). Η χαμηλή συγγένεια της apo AIV με τις λιποπρωτεΐνες μπορεί επίσης να εξηγηθεί και από την χαμηλή ενέργεια επιφανείας (suface activity) της απολιποπρωτεΐνης σε



σύγκριση με τις άλλες απολιποπρωτεΐνες (πχ apo AI) (Weinberg et al. 1992). Ο όρος ενέργεια επιφανείας μιας πρωτεΐνης είναι μια ποσοτική παράμετρος που υπολογίζει την ικανότητα ενσωμάτωσης της πρωτεΐνης σε βιολογικές μεμβράνες και συσχετίζεται με την τριτογενή διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Η ενσωμάτωση μιας απολιποπρωτεΐνης στο μόριο των λιποπρωτεϊνών είναι ανάλογη της ενέργειας επιφανείας αυτής της απολιποπρωτεΐνης. Ο όρος επιφανειακή πίεση εξώθησης μιας λιποπρωτεΐνης είναι μια ποσοτική παράμετρος που υπολογίζει τη δυνατότητα της λιποπρωτεΐνης να δεσμεύει απολιποπρωτεΐνες στο μόριο της και εξαρτάται από τη δομή της λιποπρωτεΐνης και το χημικό περιβάλλον στο οποίο αυτή βρίσκεται. Η δράση του ενζύμου λεκιθινο-χοληστερόλη ακετυλοτρανσφεράση (LCAT) στην επιφάνεια της HDL3 (το αρχικό μόριο των HDL) μειώνει την επιφανειακή πίεση εξώθησης της λιποπρωτεΐνης με αποτέλεσμα η ενέργεια επιφανείας της apo AIV να είναι μεγαλύτερη από την επιφανειακή πίεση εξώθησης της HDL3 και έτσι η apo AIV ενσωματώνεται στο μόριο των HDL3, με αποτέλεσμα την παραγωγή των HDL. Αντίθετα, η δράση της πρωτεΐνης που μεταφέρει εστέρες χοληστερόλης (CETP) αυξάνει την επιφανειακή πίεση εξώθησης της HDL και οδηγεί στο διαχωρισμό της apo AIV από τις HDL. Έτσι, υπάρχει μια δυναμική κατάσταση μεταξύ του ελεύθερου κλάσματος της apo AIV στο πλάσμα και του κλάσματος της apo AIV που είναι ενσωματωμένο στις HDL (Weinberg et al. 1992). Αυτό εξηγεί και τις διαφορές στα ποσοστά αυτών των δύο κλασμάτων που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την apo AIV βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 σε γειτνίαση με τα γονίδια που κωδικοποιούν τις apo AI και CIII. Αποτελείται από 3 εξόνια 162, 127 και 1180 νουκλεοτιδίων αντίστοιχα, ανάμεσα στα οποία παρεμβάλλονται 2 ιντρόνια 357 και 777 νουκλεοτιδίων, αντίστοιχα (Karathanasis 1985, Elshourbagy et al. 1987). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την apo AIV είναι πολυμορφικό (Menzel et al. 1982 και 1990, Kamboh et al. 1987, de Knijff et al. 1988, Lukka et al. 1988, Lohse et al. 1991, Hanis et al. 1991, Kamboh et al. 1991 και 1992). Το apo AIV-1 αλληλίο θεωρείται το πατρικό αλληλίο εξαιτίας της μεγαλύτερης συχνότητας σε όλους τους πληθυσμούς που έχουν μελετηθεί (88% έως 95%). Η αντικατάσταση του αμινοξέος θρεονίνη (διαδοχή νουκλεοτιδίων στο γενετικό υλικό ACT) στη θέση 347 της apo AIV-1 ισομορφής από το αμινοξύ σερίνη (διαδοχή νουκλεοτιδίων στο γενετικό υλικό TCT) έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός νέου πολυμορφισμού, η πρωτεϊνική ισομορφή του οποίου δεν ξεχωρίζει από την apo AIV-1 ισομορφή στην ηλεκτροφόρηση. Οι συχνότητες των αλληλίων είναι περίπου σταθερές στους διάφορους πληθυσμούς και είναι περίπου 80% για την ισομορφή apo AIV-347 θρεονίνη και 20% για την



ισομορφή από AIV-347 σερίνη. Η από AIV-2 ισομορφή χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση του αμινοξέος γλουταμίνη (διαδοχή νουκλεοτιδίων στο γενετικό υλικό CAG) στη θέση 360 της από AIV-1 ισομορφής από το αμινοξύ ιστιδίνη (διαδοχή νουκλεοτιδίων στο γενετικό υλικό CAT). Η συχνότητα του από AIV-2 αλληλίου κυμαίνεται από 0.7% έως 0.9%. Η υπεύθυνη μετάλλαξη στο γονίδιο της από AIV που προκαλεί την αντικατάσταση του αμινοξέος θρεονίνη στην θέση 347 από το αμινοξύ σερίνη δεν έχει περιγραφεί στο από AIV-2 αλληλίο.

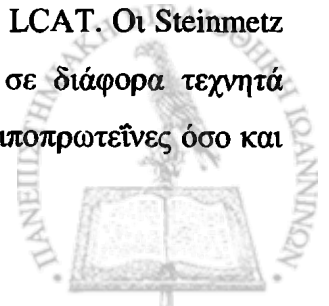
Ο ρόλος της από AIV στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί.

1. **Ρόλος της από AIV στην υδρόλυση των TRG των χυλομικρών από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση (Goldberg et al. 1985):** Η από CII είναι συνένζυμο για τη λιποπρωτεϊνική λιπάση. Η λιποπρωτεϊνική λιπάση συντίθεται στο λιπώδη ιστό, στους μύες και σε διάφορους άλλους ιστούς και μεταφέρεται στο ενδοθήλιο των τριχοειδών. Η λιποπρωτεϊνική λιπάση υδρολύει τα τριγλυκερίδια των λιποπρωτεϊνών (κυρίως των χυλομικρών και των VLDL). Η συγγενής έλλειψη της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης είναι υπεύθυνη για την υπερλιπιδαιμία τύπου I (οικογενής χυλομικροναϊμία) που χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλές τιμές TRG στο πλάσμα νηστείας εξαιτίας της συσσώρευσης των χυλομικρών. Η από CII είναι συνένζυμο για τη λιποπρωτεϊνική λιπάση και κληρονομικές διαταραχές που ευθύνονται για την έλλειψη ή τη δυσλειτουργία αυτής της απολιποπρωτεϊνης προκαλούν επίσης τα ίδια κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα με τη συγγενή έλλειψη της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης. Τα χυλομικρά προέρχονται από το διαιτητικό λίπος και εκκρίνονται στη λεμφική κυκλοφορία. Περιέχουν κυρίως τριγλυκερίδια και μικρή ποσότητα χοληστερόλης καθώς και διάφορες απολιποπρωτεΐνες (από B48 και από AIV). Αντίθετα, δεν περιέχουν από CII και από E, τις οποίες αποκτούν μετά την είσοδο τους στη συστηματική κυκλοφορία από τις HDL. Η από AIV φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσληψη της από CII από τα χυλομικρά. Η από AIV παράγεται στο λεπτό έντερο και εκκρίνεται στη λεμφική κυκλοφορία ενσωματωμένη με τα χυλομικρά. Στη συνέχεια εξαιτίας της χαμηλής χημικής συγγένειας της από AIV με τις λιποπρωτεΐνες, η από AIV ελευθερώνεται στο πλάσμα, έρχεται σε επαφή με τις HDL και ένα μικρό ποσοστό της ενσωματώνεται στις HDL. Η ενσωμάτωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση της από CII από τις HDL και τη μεταφορά της στα χυλομικρά. Η ανταλλαγή των από AIV και από CII μεταξύ των χυλομικρών και των HDL εφοδιάζει τα χυλομικρά με την από CII, η οποία όπως ήδη αναφέρθηκε είναι απαραίτητη για τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (Goldberg et al. 1990). Μετά την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων των χυλομικρών από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση, η από CII επιστρέφει στο μόριο των HDL.





2. **Ο ρόλος της apo AIV στην απομάκρυνση της χοληστερόλης από τα κύτταρα** (Steinmetz et al. 1985): η apo AIV, σε αντίθεση με την apo AI, βρίσκεται σε σχετικά υψηλή συγκέντρωση στον εξωκυττάριο διάμεσο χώρο. Έχει αποδειχθεί η ικανότητα της apo AIV να συνδέεται με κυτταρικούς υποδοχείς και να επάγει την έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα (λιπώδη κύτταρα, μακροφάγα, ινοβλάστες). Η *in vitro* συγκέντρωση της apo AIV που απαιτείται για την έξοδο της χοληστερόλης από τα λιπώδη κύτταρα είναι περίπου ίδια με τη συγκέντρωση της apo AIV στον εξωκυττάριο διάμεσο χώρο. Η ικανότητα της apo AIV να επάγει την έξοδο της χοληστερόλης από τα μακροφάγα φαίνεται ότι συσχετίζεται με την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του c-AMP. Η αύξηση του ενδοκυττάριου c-AMP πιθανά επάγει την παραγωγή και μεταφορά αυτού του υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου. Επιπλέον, διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν την apo AIV και στα οποία χορηγήθηκε δίαιτα πλούσια σε χοληστερόλη εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα HDL-C και μείωση των αθηρωματικών βλαβών κατά περίπου 30% σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ποντίκια. Έτσι, η apo AIV βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στον ενδοκυττάριο χώρο (9 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της apo AI σε πειραματόζωα που λάμβαναν τροφή πλούσια σε χοληστερόλη), ενώνεται με τους κυτταρικούς υποδοχείς και επάγει την έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα. Όπως είναι γνωστό, τα μακροφάγα που έχουν μεγάλη ποσότητα χοληστερόλης μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα και πυροδοτούν την έναρξη της αθηρωματικής διαδικασίας. Η apo AIV επάγει την έξοδο της χοληστερόλης από τα μακροφάγα και έτσι περιορίζει την εξέλιξη της αθηρωματικής εξεργασίας.
3. **Η apo AIV ως ενεργοποιητής (συνένζυμο) του ενζύμου λεκιθινο-χοληστερόλη ακετυλοτρανσφεράση (LCAT)** (Steinmetz et al. 1985) (βλέπε σχήμα 11, σελίδα 36): Το ένζυμο LCAT θεωρείται κλειδί για τη μεταφορά της περίσσειας χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στα ηπατοκύτταρα. Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μεταφορά μιας οξικής ομάδας από την φωσφατυδυλοχολίνη στην υδροξυλική ομάδα της χοληστερόλης με αποτέλεσμα το σχηματισμό εστέρων χοληστερόλης και λυσολεκιθίνης. Η εστεροποίηση του μορίου της χοληστερόλης είναι σημαντική για την είσοδο της χοληστερόλης στο εσωτερικό των HDL. Η μείωση της χοληστερόλης στην επιφάνεια του μορίου οδηγεί σε μείωση της επιφανειακής πίεσης εξώθησης των HDL και έτσι περισσότερα μόρια apo AI ή AIV συνδέονται με την HDL, με αποτέλεσμα τη μεταφορά της περίσσειας χοληστερόλης από τους ιστούς στην HDL. Οι apo AI και AIV είναι ενεργοποιητές του ενζύμου LCAT. Οι Steinmetz και συνεργάτες μελέτησαν την *in vitro* δραστηριότητα του ενζύμου σε διάφορα τεχνητά λιπιδαιμικά υποστρώματα και διατύπωσαν την άποψη ότι τόσο οι απολιποπρωτεΐνες όσο και



το λιπιδαιμικό προφίλ των υποστρωμάτων επηρεάζουν τη δραστικότητα του ενζύμου (Steinmetz et al. 1985). Έτσι, όταν τα φωσφολιπίδια του υποστρώματος περιείχαν κεκορεσμένα λιπαρά οξέα, η apo AIV ήταν ισχυρότερος ενεργοποιητής της LCAT σε σύγκριση με την apo AI. Αντίθετα, όταν τα φωσφολιπίδια του υποστρώματος περιείχαν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ή ένα πολυακόρεστο και ένα κεκορεσμένο λιπαρό οξύ η apo AI ήταν ισχυρότερος ενεργοποιητής του ενζύμου. Ωστόσο, και σε αυτές τις περιπτώσεις η apo AIV προκαλούσε σημαντικό βαθμό ενεργοποίηση του ενζύμου. Τόσο η apo AIV όσο και η apo AI έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν αμφιπαθητικές α-έλικες και έτσι έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τα λιπίδια και να αποτελούν συνένζυμα για την LCAT. Ωστόσο, άλλες απολιποπρωτεΐνες που περιέχουν στα μόρια τους αμφιπαθητική δομή (όπως οι apo CII, apo CIII και apo AII) δεν αποτελούν συνένζυμα για την LCAT. Έτσι, πέρα από την ικανότητα σύνδεσης των απολιποπρωτεϊνών με τα λιπίδια, ιδιαίτερη σημασία για την ενεργοποίηση της LCAT έχει και η διαμόρφωση της απολιποπρωτεΐνης στο λιπιδαιμικό περίβλημα των λιποπρωτεϊνών. Η apo AIV-2 ισομορφή χαρακτηρίζεται από αυξημένη α-ελίκωση και υδροφοβικότητα στην περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 350 έως 370 της πρωτεΐνης και αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει τη μεγαλύτερη προσκόλληση αυτής της ισομορφής στο λιπιδαιμικό περίβλημα των λιποπρωτεϊνών σε σύγκριση με την apo AIV-1 ισομορφή. Τέλος, η πιο πάνω παρατήρηση θα μπορούσε να εξηγήσει την αυξημένη ικανότητα ενεργοποίησης της LCAT από την apo AIV-2 ισομορφή σε σύγκριση με την apo AIV-1 ισομορφή.

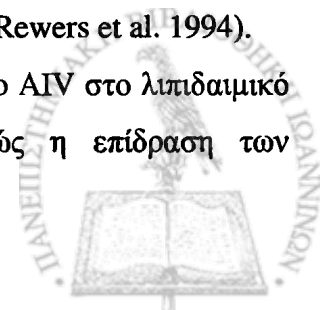
4. **Ο ρόλος της apo AIV στην είσοδο της HDL στα κύτταρα** (Dvorin et al. 1986): πειράματα σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων από αρουραίους (Sprague-Dawley rat) έδειξαν την ύπαρξη ενός υποδοχέα στην επιφάνεια των κυττάρων που είναι υπεύθυνος για την είσοδο των HDL στα ηπατοκύτταρα. Ο υποδοχέας αυτός ήταν ανεξάρτητος από τους LDLR και τους apo E υποδοχείς. Στην ίδια μελέτη αποδείχθηκε ότι η apo AIV και λιγότερο η apo AI αποτελούν το υπόστρωμα αυτού του πιθανού υποδοχέα. Επίσης, η σύσταση των HDL φαίνεται ότι επηρεάζει την είσοδο των HDL στα ηπατοκύτταρα, αφού μεταβάλλει τη διαμόρφωση της απολιποπρωτεΐνης και διευκολύνει την έκφραση του αντίστοιχου τμήματος της στον υποδοχέα. Ωστόσο, η απομόνωση αυτού του υποδοχέα δεν έχει γίνει ακόμη στον άνθρωπο, αν και υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για την ύπαρξη του.
5. **Ο ρόλος της apo AIV ως νευροδιαβιβαστικής ουσίας που καταστέλλει τη λήψη τροφής μετά από γεύμα** (Fujimito et al. 1993): η apo AIV παράγεται στο λεπτό έντερο μετά την πρόσληψη λιπαρού γεύματος και εκκρίνεται στη λεμφική κυκλοφορία ενσωματωμένη στα



χυλομικρά. Έτσι, 100-300 μg apo AIV ελευθερώνονται στη κυκλοφορία μεταγευματικά. Επίσης, τα επίπεδα της apo AIV στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό αυξάνονται μεταγευματικά, εξαιτίας της αυξημένης διαβατότητας της απολιποπρωτεΐνης διαμέσου του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού και εξαιτίας τοπικής παραγωγής της απολιποπρωτεΐνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η ενδοφλέβια χορήγηση 200 μg apo AIV σε πειραματόζωα είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της πρόσληψης τροφής κατά 75%. Έτσι, διατυπώθηκε η άποψη ότι η apo AIV καταστέλλει την πρόσληψη τροφής. Οι ίδιοι ερευνητές διατύπωσαν την άποψη ότι η καταστολή αυτή γίνεται στο επίπεδο του κεντρικού νευρικού συστήματος (Fujimoto et al. 1993). Η χορήγηση apo AIV ενδοκοιλιακά στο κεντρικό νευρικό σύστημα σε νηστικά για 24 ώρες ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη πρόσληψη τροφής από τα ποντίκια για περίπου 30 λεπτά από την επανέναρξη της σίτισης τους. Έτσι, διατύπωσαν την άποψη ότι υπάρχουν υποδοχείς της apo AIV στο κεντρικό νευρικό σύστημα που προκαλούν ανορεξία. Οι υποδοχείς αυτοί είναι ειδικοί για την apo AIV, αφού παρόμοια πειράματα στα οποία μελετήθηκε η δράση της apo AI ήταν αρνητικά.

#### 1.4.2 Σημασία των πολυμορφισμών της apo AIV

Τα δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά την επίδραση των πολυμορφισμών του γονιδίου που κωδικοποιεί την apo AIV στο λιπιδαιμικό προφίλ είναι αντικρουόμενα. Πρόσφατες εργασίες έδειξαν ότι οι πολυμορφισμοί της apo AIV συσχετίζονται με τα επίπεδα της HDL-C, της LDL-C, των TRG, της λιποπρωτεΐνης (a) [Lp(a)], και των apo AI και B (Menzel et al. 1988 και 1990, Eichner et al. 1989, de Knijff et al. 1988, Hanis et al 1991, von Eckardstein et al 1992, Pepe et al 1998, Zhongyan et al. 1997, Saha et al. 1997, Fisher et al. 1999). Συγκεκριμένα, το αλληλίο 2 έχει συσχετισθεί με αυξημένα επίπεδα HDL-C και μειωμένα επίπεδα TRG, ενώ το αλληλίο T έχει συσχετισθεί με αυξημένα επίπεδα HDL-C και μειωμένα επίπεδα LDL-C. Στον Ελληνικό πληθυσμό η παρουσία του αλληλίου 2 έχει συσχετισθεί με μειωμένα επίπεδα TRG στο πλάσμα νορμολιπιδαιμικών ατόμων, ενώ δεν ασκούσε καμιά επίδραση στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών με υπερλιπιδαιμία (Miltiados et al. 2002). Αντίθετα, άλλες μελέτες έδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών της apo AIV και των λιπιδαιμικών παραμέτρων (Zaiou et al. 1994, Ehnholm et al. 1994, Menzel et al. 1995). Τέλος, το αλληλίο 2 έχει συσχετισθεί με αυξημένη επίπτωση εμφραγμάτων του μυοκαρδίου σε παχύσαρκους διαβητικούς ασθενείς (Rewers et al. 1994). Δεν υπάρχουν δεδομένα για την επίδραση των πολυμορφισμών της apo AIV στο λιπιδαιμικό προφίλ ασθενών με FH. Επιπλέον, δεν έχει μελετηθεί επαρκώς η επίδραση των



πολυμορφισμών του γονιδίου που κωδικοποιεί την apo AIV στην ανταπόκριση των λιπιδαιμικών παραμέτρων μετά τη χορήγηση στατινών σε ασθενείς με FH. Οι Ordovas και συνεργάτες έδειξαν ότι οι πολυμορφισμοί της apo AIV δεν συσχετίζονται με τα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων και με τη μεταβολή των λιπιδαιμικών παραμέτρων που παρατηρείται μετά τη χορήγηση στατινών σε ασθενείς με FH (Ordovas et al. 1995).

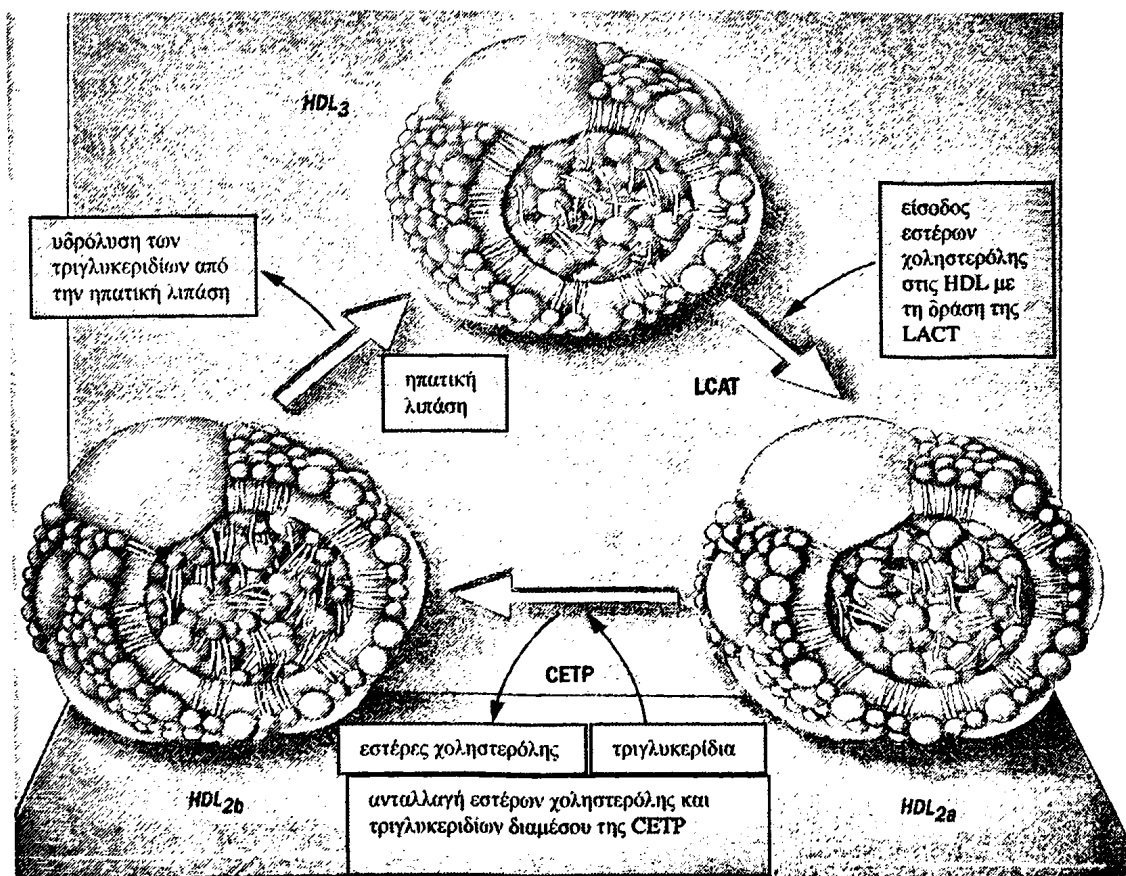


## 1.5 Ένζυμο μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CETP)

### 1.5.1 Περιγραφή και λειτουργία

Το ένζυμο μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CETP) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στα ηπατοκύτταρα και έτσι θεωρείται ότι ασκεί αντιαθηρογόνο δράση. Είναι γνωστό ότι υπάρχει μία δυναμική ισοροπία μεταξύ των λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα. Οι HDL είναι λιποπρωτεΐνες πλούσιες σε εστέρες χοληστερόλης και φωσφολιπίδια, ενώ οι VLDL είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια. Έτσι, εστέρες χοληστερόλης και φωσφολιπίδια μετακινούνται από τις HDL προς τις VLDL, ενώ η μετακίνηση των τριγλυκεριδίων έχει αντίθετη φορά. Το ένζυμο κλειδί για αυτή τη μεταφορά λιπιδίων είναι η CETP (Barter et al. 1982, Tall 1993). Αυτή η μετακίνηση εστέρων χοληστερόλης από τις HDL στις VLDL αποτελεί μέρος της διαδικασίας της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης (reverse cholesterol transfer) από τους περιφερικούς ιστούς στα ηπατοκύτταρα (σχήμα 14).

Σχήμα 14: Ρόλος της CETP στην ανάστροφη μεταφορά χοληστερόλης



### 1.5.2 Σημασία των πολυμορφισμών της CETP

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την CETP έχει αναλυθεί από τους Agellon και συνεργάτες το 1990 (Agellon et al. 1990). Βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 16. Έχει μέγεθος περίπου 25 kb και αποτελείται από 16 εξόνια και 15 ιντρόνια. Έχουν περιγραφεί αρκετοί πολυμορφισμοί του γονιδίου που κωδικοποιεί την CETP, οι οποίοι επηρεάζουν την ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα (Drayna et al. 1987, Freeman et al. 1989, Zuliani et al. 1990). Ο πολυμορφισμός που έχει μελετηθεί καλύτερα είναι ο Ταq 1B που οφείλεται σε αλλαγή της βάσης αδενοσίνης από γουανίνη στη θέση 277 του πρώτου ιντρονίου του γονιδίου της CETP (Drayna et al. 1987). Μελέτες έδειξαν ότι η παρουσία του αλληλίου B2 αυτού του πολυμορφισμού συσχετίζεται με μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα και αυξημένα επίπεδα HDL-C σε σύγκριση με την παρουσία του αλληλίου B1 (Kondo et al. 1989, Freeman et al. 1994, Hannuksela et al. 1994). Οι Corella και συνεργάτες έδειξαν ότι ο Ταq 1B πολυμορφισμός του γονιδίου που κωδικοποιεί την CETP ευθύνεται για ένα ποσοστό 5.8% της μεταβλητότητας των επιπέδων της HDL-C στο γενικό πληθυσμό (Corella et al. 2000). Ο Ταq 1B πολυμορφισμός του γονιδίου που κωδικοποιεί την CETP έχει επίσης συσχετισθεί με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Πράγματι, οι Kuivenhoven και συνεργάτες έδειξαν ότι η παρουσία του αλληλίου B1 συσχετίζονταν με επιτάχυνση της αθηρωμάτωσης των στεφανιαίων αγγείων σε σύγκριση με παρουσία του αλληλίου B2 (Kuivenhoven et al. 1998). Παρόμοια αποτελέσματα έδειξαν και οι Radeau και συνεργάτες σε νεφροπαθείς (Radeau et al. 2000).

Αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου έχει παρατηρηθεί σε ορισμένες καταστάσεις που συσχετίζονται με πρώιμη αθηρωμάτωση, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπερτριγλυκεριδαιμία, η υπερχοληστερολαιμία, καθώς και σε καπνιστές (Ritter et al. 1996, Bagdade et al. 1993, Elchebly et al. 1996, Dullaart et al. 1994, Mann et al. 1991, Bagdade et al. 1991).

Δεν υπάρχουν δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά την επίδραση του Ταq 1B πολυμορφισμού του γονιδίου που κωδικοποιεί την CETP στο λιπιδαιμικό προφίλ ασθενών με FH. Επίσης, δεν έχει μελετηθεί η επίδραση αυτών των πολυμορφισμών στη μεταβολή των τιμών των λιπιδαιμικών παραμέτρων που παρατηρείται μετά τη χορήγηση στατινών σε ασθενείς με FH.



## 1.6 Λιποπρωτεΐνη (a) και οικογενής υπερχοληστερολαιμία

Το μόριο της λιποπρωτεΐνης (a) [Lp(a)] αποτελείται από την apo (a), η οποία είναι ενσωματωμένη σε ένα μόριο LDL. Έτσι, πιθανά η Lp(a) καταβολίζεται διαμέσου των LDLR. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι ασθενείς με ετερόζυγη FH εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα Lp(a) στο πλάσμα σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό και με ασθενείς με πρωτοπαθή υπερχοληστερολαιμία (Seed et al. 1990, Leitersdorf et al. 1991, Mbewu et al 1991, Real et al. 1999, Lingenhel et al. 1998 ). Οι Ελισάφ και συνεργάτες έδειξαν ότι Έλληνες ασθενείς με FH είχαν υψηλότερα επίπεδα Lp(a) σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό (Elisaf et al. 1996). Αντίθετα, άλλες μελέτες δεν έδειξαν υψηλότερα επίπεδα Lp(a) στο πλάσμα ασθενών με ετερόζυγη FH σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες (Soutar et al. 1991, Defesche et al. 1992, Real et al. 1999, Ochoa et al. 1994). Αντικρουόμενα είναι επίσης και τα δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τη σημασία της Lp(a) ως παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου σε ασθενείς με FH. Οι Ochoa και συνεργάτες έδειξαν ότι ασθενείς με ετερόζυγη FH και στεφανιαία νόσο είχαν υψηλότερα επίπεδα Lp(a) σε σύγκριση με ασθενείς που δεν είχαν στεφανιαία νόσο (Ochoa et al. 1994). Αντίθετα αποτελέσματα έδειξε η μελέτη των Real JT και συνεργατών το 1999 (Real et al. 1999). Πρέπει να αναφερθεί ότι οι Kraft και συνεργάτες έδειξαν ότι οι ασθενείς με ομόζυγη FH εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα Lp(a) στο πλάσμα σε σύγκριση με ασθενείς με ετερόζυγη FH (ενδιάμεση τιμή 36.6 vs 14.4 mg/dl, αντίστοιχα) (Kraft et al. 2000). Επίσης, οι Guo και συνεργάτες έδειξαν ότι οι ασθενείς με ομόζυγη FH εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα Lp(a) στο πλάσμα σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες (Guo et al. 1991).

Δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά τη συσχέτιση των τύπων των μεταλλάξεων του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR με τα επίπεδα της Lp(a) σε ασθενείς με FH. Οι Sun και συνεργάτες έδειξαν ότι ο τύπος των μεταλλάξεων του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR δεν συσχετιζόνταν με τα επίπεδα της Lp(a) στο πλάσμα ασθενών με ετερόζυγη FH (Sun et al. 1998). Επίσης δεν έχει μελετηθεί η επίδραση των διαφόρων μεταλλάξεων του γονιδίου του LDLR στα επίπεδα της Lp(a) σε Έλληνες ασθενείς με FH.



### 1.7 HDL-C και οικογενής υπερχοληστερολαιμία

Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα επίπεδα της HDL-C αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου σε ασθενείς με ετερόζυγη FH (Real et al. 2001). Η ίδια μελέτη έδειξε ότι ο τύπος των μεταλλάξεων του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR συσχετίζονταν με τα επίπεδα της HDL-C. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με μεταλλάξεις τύπου I και II είχαν χαμηλότερα επίπεδα HDL-C σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν άλλου τύπου μεταλλάξεις. Οι Betard και συνεργάτες έδειξαν ότι οι πολυμορφισμοί του γονιδίου που κωδικοποιεί την apo E επηρεάζουν τα επίπεδα της HDL-C σε ασθενείς με ετερόζυγη FH (Betard et al. 1996). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς που είχαν το αλληλίο E4 της apo E είχαν χαμηλότερα επίπεδα HDL-C σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν τα αλληλία E2 και E3 (Betard et al. 1996). Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί ότι οι περισσότερες μελέτες σε ασθενείς με FH έδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων του γονιδίου που κωδικοποιεί τους LDLR και των επιπέδων της HDL-C (Bertolini et al. 2000, Couture et al. 1998, Vuorio et al. 1997, Torres et al. 1996, Leitersdorf et al. 1993).

Πρέπει να επισημανθεί ότι δεν έχει μελετηθεί στον Ελληνικό πληθυσμό η επίδραση του τύπου των μεταλλάξεων του γονιδίου που κωδικοποιεί τους LDLR και των πολυμορφισμών της apo E στα επίπεδα της HDL-C σε ασθενείς με FH.

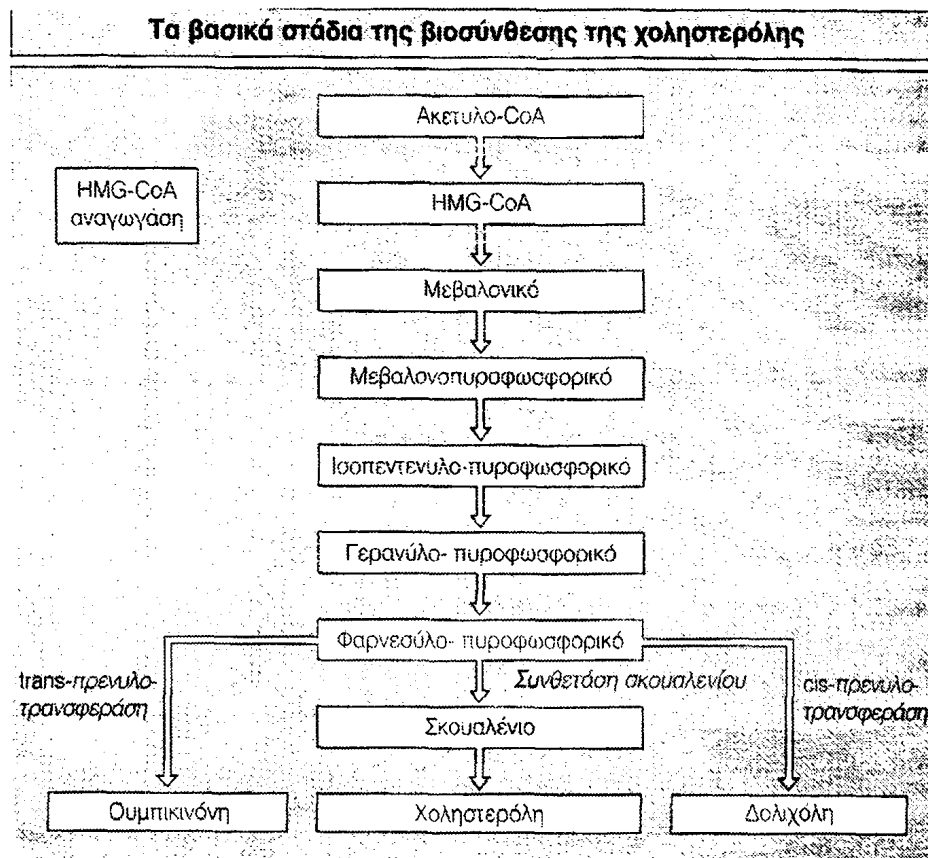




## 1.8 Μηχανισμός δράσης των στατινών

Οι στατίνες αναστέλλουν συναγωνιστικά τη δράση του ενζύμου HMG- CoA αναγωγάση, το οποίο καταλύει την αντίδραση μετατροπής του HMG-CoA σε μεβαλονικό (σχήμα 15).

Σχήμα 15: Απεικόνιση των βασικών σταδίων της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης



Τα φάρμακα αυτά είναι πολύ ισχυρά, καθώς οι τιμές του  $K_j$  κυμαίνονται μεταξύ  $0.2 \times 10^{-9}$  M σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή ( $K_m$ ) του φυσικού υποστρώματος που είναι  $4 \times 10^{-6}$  M. Η δράση των στατινών έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της ενδοκυττάριας χοληστερόλης, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αντιρροπιστική αύξηση του αριθμού των LDLR. Η μείωση της συγκέντρωσης της ενδοκυττάριας χοληστερόλης προάγει την απελευθέρωση των κυτταροπλασματικών παραγόντων SREBPs. Οι παράγοντες αυτοί είναι ρυθμιστές της έκφρασης των γονιδίων της HMG-CoA αναγωγάσης και του LDLR (Brown et al. 1993, Wang et al. 1994). Από την οικογένεια των παραγόντων μεταγραφής SREBPs κύριο ρόλο στην παραπάνω διαδικασία φαίνεται ότι διαδραματίζει ο παράγοντας SREBP-1, ενώ αντίθετα η δράση του παράγοντα SREBP-2 δεν είναι ακόμη γνωστή.



Το ήπαρ είναι το βασικό όργανο στο οποίο επιτελείται η σύνθεση της χοληστερόλης και ο καταβολισμός των LDL. Η συγκέντρωση της LDL-C στο πλάσμα καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τον αριθμό και τη δραστηριότητα των LDLR των ηπατοκυττάρων. Η αναστολή της HMG-CoA αναγωγάσης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού και της δραστηριότητάς των LDLR με συνέπεια τη μείωση των επιπέδων της LDL-C του πλάσματος. Επιπρόσθετα, η αύξηση της δραστηριότητας των LDLR αυξάνει την πρόσληψη των καταλοίπων των VLDL (remnants) από το ήπαρ και επομένως μειώνει τη μετατροπή τους σε LDL.

Οι στατίνες αναστέλλουν επίσης τη σύνθεση και των άλλων παραγώγων του μεταβολισμού του μεβαλονικού οξέος, όπως είναι οι ουμπικινόνες, οι πρωτεΐνες του ισοπρενυλίου και οι δολιχόλες. Ωστόσο, το γεγονός αυτό δεν φαίνεται να έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία. Τα επίπεδα των στεροειδών ορμονών, οι οποίες παράγονται από τη χοληστερόλη, δεν μειώνονται μετά τη χορήγηση των στατινών, διότι για τη βιοσύνθεσή τους χρησιμοποιείται κυρίως η χοληστερόλη των λιποπρωτεϊνών που κυκλοφορούν στο πλάσμα.

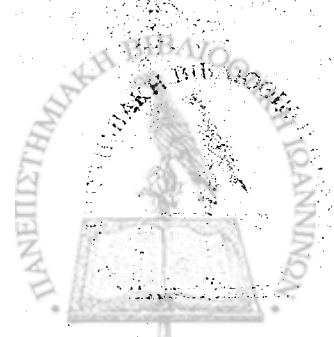


ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΑ ΣΧΗΜΑΤΑ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## 2.1 Υλικό της μελέτης

Στην μελέτη μας συμμετείχαν 104 ασθενείς από διαφορετικές οικογένειες που παρακολουθούνται στο ιατρείο Διαταραχών του Μεταβολισμού των λιπιδίων του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων στους οποίους τέθηκε η κλινική διάγνωση της ετερόζυγης FH. Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διάγνωση φαίνονται στον πίνακα 1 (βλέπε σελίδα 30).

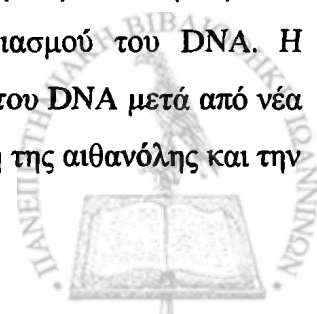


## 2.2 Μεθοδολογία

Σε όλους τους ασθενείς ελήφθη αίμα για τον προσδιορισμό των λιπιδαιμικών παραμέτρων και την ανίχνευση των μεταλλάξεων του LDLR και των πολυμορφισμών της apo E, της apo AIV και της CETP. Η αιμοληψία έγινε μετά από 14 ώρες νηστεία και ύστερα από γραπτή συγκατάθεση του ασθενή. Μετά από φυγοκέντρηση για 30 λεπτά (3000g) έγινε διαχωρισμός του πλάσματος από τα έμμορφα συστατικά. Τόσο το πλάσμα όσο και τα έμμορφα συστατικά τοποθετήθηκαν στους 4<sup>0</sup>C, ενώ πλάσμα για τον προσδιορισμό της Lp(a) καταψύχθηκε στους -70<sup>0</sup>C.

Πρέπει να αναφερθεί ότι κανένας ασθενής δεν έπαιρνε υπολιπιδαιμική αγωγή ή φάρμακα που επηρεάζουν τα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων. Για την εκτίμηση της επίδρασης γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στη μεταβολή των τιμών των λιπιδαιμικών παραμέτρων που παρατηρείται μετά τη χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής μελετήθηκαν 32 ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε ατορβαστατίνη 20 mg/ημέρα. Στους ασθενείς αυτούς έγινε προσδιορισμός των λιπιδαιμικών παραμέτρων πριν και 12 εβδομάδες μετά την έναρξη της θεραπείας.

Το γενετικό υλικό (DNA) απομονώθηκε από λευκά αιμοσφαίρια (Miller et al. 1988). Μετά το διαχωρισμό των έμμορφων συστατικών από το πλάσμα, προστέθηκε υπέρτονο διάλυμα λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (ammonium chloride + ammonium hydrogen carbonate) για 20 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση για 5 λεπτά (3,500 rpm) και αφαίρεση του υπερκείμενου απομονώθηκαν τα λευκά αιμοσφαίρια στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα. Η λύση των λευκοκυττάρων και η διάσπαση των κυτταρικών πρωτεϊνών έγινε με την προσθήκη πρωτεάσης και διαλύματος σαπονοποίησης των μεμβρανών (NaCl, Tris pH8, EDTA και SDS), μετά από ανάμιξη και επώαση στους 37<sup>0</sup>C για 24 ώρες. Ακολούθως, η προσθήκη του αντιδραστήριου SEVAC (phenol/chloroform/iso-amyl alcohol 25:24:1) στα ήδη σπασμένα λευκοκύτταρα και η φυγοκέντρηση του μίγματος για 5 λεπτά (3,500 rpm) οδήγησε στην καθίζηση των προϊόντων διάσπασης των πρωτεϊνών και των μεμβρανών. Η αναρρόφηση του υπερκείμενου είχε ως αποτέλεσμα την απομόνωση του DNA. Η προσθήκη διαλύματος chloroform/iso-amyl alcohol 24:1, η ανάμιξη και η εκ νέου φυγοκέντρηση για 5 λεπτά (13,000 rpm) συνέβαλε στη δέσμευση μικρής ποσότητας φαινόλης που πιθανώς να παρέμεινε στο διάλυμα από το προηγούμενο στάδιο και η παραμονή της στο υπερκείμενο θα μπορούσε να αναστείλει τη DNA πολυμεράση στο στάδιο του πολλαπλασιασμού του DNA. Η προσθήκη κρύας αιθανόλης 99.7% είχε ως αποτέλεσμα την καθίζηση του DNA μετά από νέα φυγοκέντρηση για 15 λεπτά (13,000 rpm). Το DNA μετά την αφαίρεση της αιθανόλης και την



αποξήρανση του διαλύθηκε σε απεσταγμένο νερό και φυλάχθηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$  έτοιμο για τη γενετική ανάλυση. Στην συνέχεια, με τη χρήση της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) έγινε πολλαπλασιασμός του εναρκτή (promotor) και όλων των εξονίων (exons) του γονιδίου του LDLR (Hobbs et al. 1992). Το μίγμα πριν την PCR αποτελούνταν από 50 ng του DNA, 100 mM από κάθε νουκλεοτίδιο (dNTP), 0.1 μl (1 unit) του ενζύμου της DNA πολυμεράσης (Taq polymerase), 2.5 μl του 10X ρυθμιστικού διαλύματος της DNA πολυμεράσης (10X Taq Buffer) και 5 pmole για κάθε εκκινητή (δεξιός και αριστερός εκκινητής) ειδικού για κάθε εξόνιο του γονιδίου του LDLR. Τα ζεύγη των εκκινητών για κάθε εξόνιο απεικονίζονται στο πίνακα 2.

*Πίνακας 2: Τα ζεύγη των εκκινητών (ολιγονουκλεοτίδια) για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον εναρκτή και όλα τα εξόνια (1-18) του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR*

	Ολιγονουκλεοτίδια (δεξιός και αριστερός εκκινητής)	Μέγεθος (bp)
Εναρκτής	FH1 GAG TGG GAA TCA GAG CTT CAC GGG T FH20 CCA CGT CAT TTA CAG CAT TTC AAT G	155
Εξόνιο 1	FH2 ACT CCT CCC CCT GCT AGA AAC CTC A FH21 TTC TGG CGC CTG GAG CAA GCC TTA C	234
Εξόνιο 2	FH3 CCT TTC TCC TTT TCC TCT CTC TCA G FH22 AAA ATA AAT GCA TAT CAT GCC CAA A	172
Εξόνιο 3	FH4 TGA CAG TTC AAT CCT GTC TCT TCT G FH23 ATA GCA AAG GCA GGG CCA CAC TTA C	176
Εξόνιο 4A	4AF GTT GGG AGA CTT CAC ACG GTG ATG G 4AR ACT TAG GCA GTG GAA CTC GAA GGC C	355

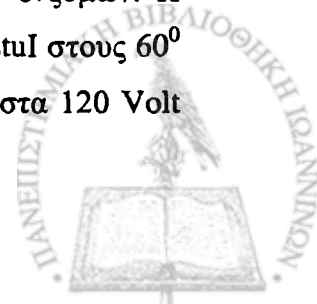


Εξόνιο 4B	4BF CCC CAG CTG TGG GCC TGC GAC AAC G 4BR GGG GGA GCC CAG GGA CAG GTG ATA G	267
Εξόνιο 5	FH5 CAA CAC ACT CTG TCC TGT TTT CCA G FH24 GGA AAA CCA GAT GGC CAG CGC TCA C	173
Εξόνιο 6	FH6 TCC TTC CTC TCT CTG GCT CTC ACA G FH25 GCA AGC CGC CTG CAC CGA GAC TCA C	174
Εξόνιο 7	FH7 AGT CTG CAT CCC TGG CCC TGC GCA G FH26 AGG GCT CAG TCC ACC GGG GAA TCA C	169
Εξόνιο 8	FH8 CCA AGC CTC TTT CTC TCT CTT CCA G FH27 CCA CCC GCC GCC TTC CCG TGC TCA C	175
Εξόνιο 9	FH9 TCC ATC GAC GGG TCC CCT CTG ACC C FH28 AGC CCT CAT CTC ACC TGC GGG CCA A	271
Εξόνιο 10A	FH10 AGA TGA GGG CTC CTG GTG CGA TGC C FH29 GCC CTT GGT ATC CGC AAC AGA GAC A	202
Εξόνιο 10B	FH11 GAT CCA CAG CAA CAT CTA CTG GAC C FH30 AGC CCT CAG CGT CGT GGA TAC GCA C	162
Εξόνιο 11	FH12 CAG CTA TTC TCT GTC CTC CCA CCA G FH31 TGG GAC GGC TGT CCT GCG AAC ATA C	168
Εξόνιο 12	FH13 GCA CGT GAC CTC TCC TTA TCC ACT T FH32 CAC CTA AGT GCT TCG ATC TCG TAC G	209



Εξόνιο 13	FH14 GTC ATC TTC CTT GCT GCC TGT TTA G FH33 GTT TCC ACA AGG AGG TTT CAA GGT T	217
Εξόνιο 14	FH15 CCT GAC TCC GCT TCT TCT GCC CCA G FH34 CGC AGA AAC AAG GCG TGT GCC ACA C	202
Εξόνιο 15	FH16 GAA GGG CCT GCA GGC ACG TGG CAC T FH35 GTG TGG TGG CGG GCC CAG TCT TTA C	246
Εξόνιο 16	FH17 CCT CAC TCT TGC TTC TCT CCT GCA G FH36 CGC TGG GGG ACC GGC CCG CGC TTA C	127
Εξόνιο 17	FH18 TGA CAG AGC GTG CCT CTC CCT ACA G FH37 GCT TTC TAG AGA GGG TCA CAC TCA C	207
Εξόνιο 18	FH19 TCC GCT GTT TAC CAT TTG TTG GCA G FH37 AAT AAA ACA AGG CCG GCG AGG TCT C	135

Η PCR έγινε σε 30 κύκλους. Ο κάθε κύκλος αποτελούνταν από 3 στάδια (φάσεις): στάδιο αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA (denaturation phase) στους 96<sup>0</sup> C για 1 λεπτό, στάδιο σύνδεσης των εκκινητών με το πρότυπο DNA (annealing phase) στους 68<sup>0</sup> C για 1 λεπτό και στάδιο επιμήκυνσης (elongation phase) στους 72<sup>0</sup> C για 1 λεπτό. Χρησιμοποιήθηκε ο ανακυκλωτής θερμοκρασίας MJR PTC-100 Programmable Thermal Cycler. Η ανάλυση των μεταλλάξεων έγινε είτε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μετά τη δράση περιοριστικών ενζύμων [για μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί προηγούμενα σε Έλληνες ασθενείς (Traeger-Synodinos et al. 1998)] είτε με την ανεύρεση της αλληλουχίας των βάσεων του γενετικού κώδικα με τη χρησιμοποίηση του γενετικού αναλυτή ABI PRISM 310. Οι μεταλλάξεις T517C και G1285A ανιχνεύθηκαν με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων. Η μετάλλαξη T517C ανιχνεύθηκε μετά από επώαση με το περιοριστικό ένζυμο Bst<sup>u</sup>I στους 60<sup>0</sup> C για 3 ώρες και στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% στα 120 Volt



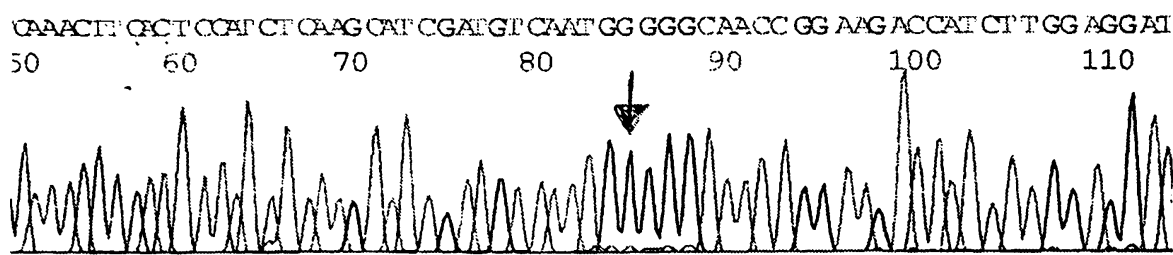


για 1 ώρα και βαφή με βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide) σε τελική συγκέντρωση 0.005%. Μετά από τη φωτογράφιση των ηλεκτροφορητικών ζωνών σε υπεριώδη ακτινοβολία, η παρουσία της μετάλλαξης αντιστοιχούσε σε 3 ζώνες μεγέθους 357, 256 και 100 βάσεων, αντίστοιχα. Αντίθετα, η απουσία της μετάλλαξης αντιστοιχούσε σε 1 ζώνη 357 βάσεων. Η μετάλλαξη G1285A ανιχνεύθηκε μετά από επώαση με το περιοριστικό ένζυμο NlaIII στους 37<sup>0</sup> C για 3 ώρες και στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2.5% στα 120 Volt για 1 ώρα και βαφή με βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.005%. Μετά από τη φωτογράφιση των ηλεκτροφορητικών ζωνών σε υπεριώδη ακτινοβολία, η παρουσία της μετάλλαξης αντιστοιχούσε σε 3 ζώνες μεγέθους 273, 151 και 122 βάσεων, αντίστοιχα. Αντίθετα, η απουσία της μετάλλαξης αντιστοιχούσε σε 1 ζώνη 273 βάσεων. Η ανεύρεση της αλληλουχίας των βάσεων του γενετικού κώδικα έγινε με τη χρησιμοποίηση του γενετικού αναλυτή ABI PRISM 310. Τα προϊόντα μετά την πρώτη PCR μεταφέρονταν σε ειδικά φίλτρα που περιείχαν μεμβράνη πολυσουλφαμίνης (Ultrafree-MC centrifugal filter- MILLIPORE) για την απομάκρυνση της περίσσειας εκκινητών, νουκλεοτιδίων και ιόντων που δεν χρησιμοποιήθηκαν. Στην συνέχεια έγινε δεύτερη PCR με το εξής μίγμα: 30-90 ng από το απεσταγμένο προϊόν της πρώτης PCR, 4 μl από έτοιμο διάλυμα που περιείχε σεσημασμένα νουκλεοτίδια με φθορίζουσες ουσίες και DNA πολυμεράση ('Terminator Ready Reaction Mix' της εταιρίας PE Applied Biosystems) και 5 pmole του ενός μόνο εκκινητή (δεξιός εκκινητής) που ήταν ειδικός για το υπό μελέτη εξόνιο. Η PCR έγινε σε 25 κύκλους. Ο κάθε κύκλος αποτελούνταν από 3 στάδια (φάσεις): στάδιο αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA στους 96<sup>0</sup> C για 30 δευτερόλεπτα, στάδιο σύνδεσης των εκκινητών με το πρότυπο DNA στους 52<sup>0</sup> C για 15 δευτερόλεπτα και στάδιο επιμήκυνσης στους 60<sup>0</sup> C για 4 λεπτά. Στη συνέχεια η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων στο γενετικό αναλυτή ABI PRISM 310 (χρήση φωτός Laser) είχε ως αποτέλεσμα την ανεύρεση της αλληλουχίας των βάσεων του κάθε εξονίου του LDLR (σχήμα 16).

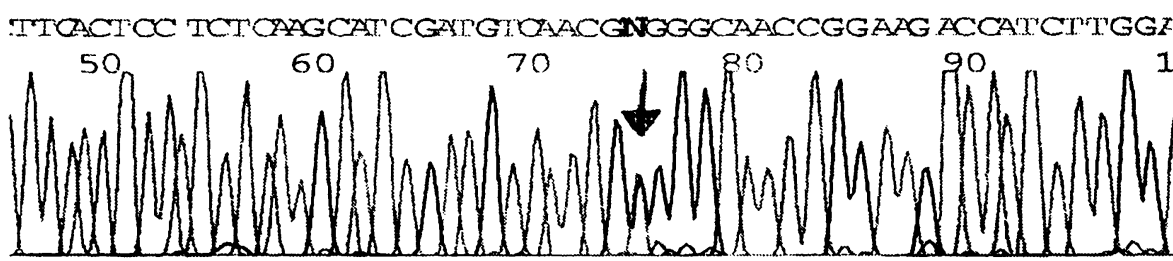


### Σχήμα 16: Ανίχνευση της μετάλλαξης G1775A

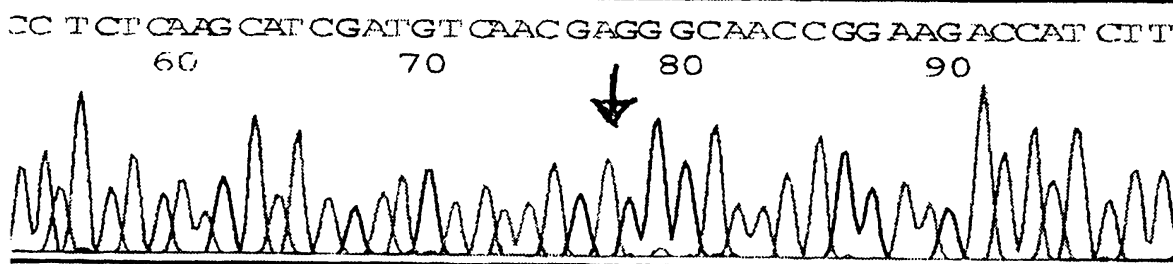
#### A. Φυσιολογική αλληλουχία των βάσεων του DNA



#### B. Ασθενής με ετερόζυγη FH (μετάλλαξη G1775A)



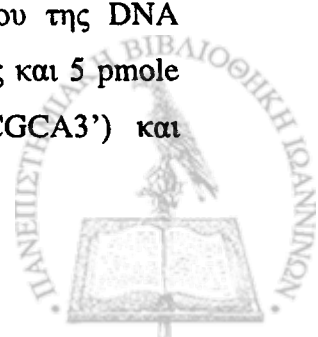
#### Γ. Ασθενής με ομόζυγη FH (μετάλλαξη G1775A)



Τα βέλη δείχνουν τη θέση της μετάλλαξης

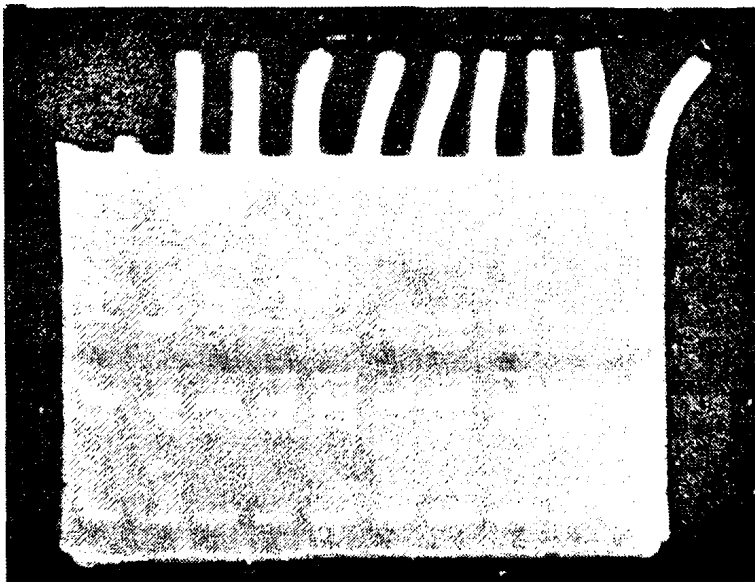
Η οικογενής ανεπάρκεια της apo B100 αποκλείστηκε με βάση το πρωτόκολλο των Tybjaerg-Hansen και συνεργατών 1998 (Tybjaerg-Hansen et al. 1998).

Για την ανεύρεση των πολυμορφισμών της apo E χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Hixson και συνεργατών (Hixson et al. 1990). Το μίγμα πριν την PCR αποτελούνταν από 50 ng του DNA, 100 mM από κάθε νουκλεοτίδιο, 0.1 μl (1 unit) του ενζύμου της DNA πολυμεράσης, 2.5 μl του 10X ρυθμιστικού διαλύματος της DNA πολυμεράσης και 5 pmole για κάθε εκκινητή [δεξιός εκκινητής (5'TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCA3') και



αριστερός εκκινητής (5'ACAGAATTTCGCCCCGGCCTGGTACACTGCCA3'). Μετά από μια φάση αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA στους 95<sup>0</sup> C για 5 λεπτά, η PCR έγινε σε 35 κύκλους. Ο κάθε κύκλος αποτελούνταν από 3 στάδια (φάσεις): στάδιο αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA στους 65<sup>0</sup> C για 30 δευτερόλεπτα, στάδιο σύνδεσης των εκκινητών με το πρότυπο DNA στους 72<sup>0</sup> C για 90 δευτερόλεπτα και στάδιο επιμήκυνσης στους 94<sup>0</sup> C για 30 δευτερόλεπτα. Τέλος ακολούθησε μια φάση επιμήκυνσης στους 72<sup>0</sup> C για 10 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε ο ανακυκλωτής θερμοκρασίας MJR PTC-100 Programmable Thermal Cycler. Η ανάλυση των γονοτύπων έγινε με ηλεκτροφόρηση για 120 λεπτά σε πήκτωμα ακριλαμίδης 12% μετά τη δράση 10u του περιοριστικού ενζύμου HhaI και βαφή με βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.005%. Μετά από τη φωτογράφιση των ηλεκτροφορητικών ζωνών σε υπεριώδη ακτινοβολία, η παρουσία του αλληλίου E2 αντιστοιχούσε σε 2 ζώνες μεγέθους 91 και 83 βάσεων. Η παρουσία των αλληλίων E3 και E4 αντιστοιχούσαν σε 3 ζώνες μεγέθους 91, 48, 35 βάσεων και 72, 48, 35 βάσεων, αντίστοιχα (σχήμα 17).

Σχήμα 17: Ανάλυση των γονοτύπων της apo E



Οι στήλες 1,3,4 αντιστοιχούν σε ασθενείς με apo E γονότυπο 3/3

Οι στήλες 2 και 10 αντιστοιχούν σε ασθενείς με apo E γονότυπο 2/3

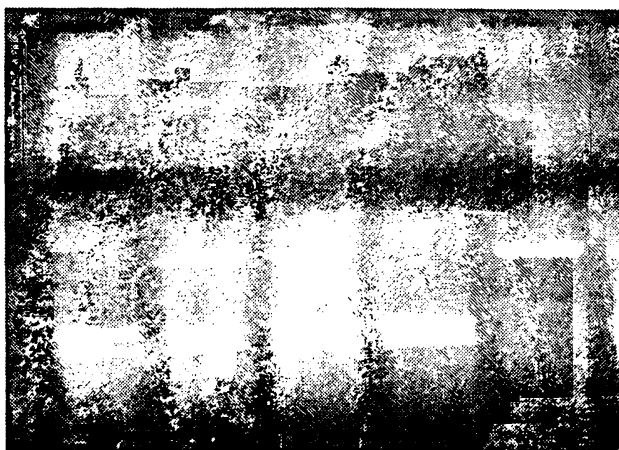
Η στήλη 5 αντιστοιχεί σε ασθενή με apo E γονότυπο 4/4

Οι στήλες 6-9 αντιστοιχούν σε ασθενείς με apo E γονότυπο 3/4



Για την ανεύρεση των πολυμορφισμών της CETP χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Kuivenhoven και συνεργατών (Kuivenhoven et al. 1997). Το μίγμα πριν την PCR αποτελούνταν από 50 ng του DNA, 100 mM από κάθε νουκλεοτίδιο, 0.1 μl (1unit) του ενζύμου της DNA πολυμεράσης, 2.5 μl του 10X ρυθμιστικού διαλύματος της DNA πολυμεράσης και 5 pmole για κάθε εκκινητή [δεξιός εκκινητής (5'ACATAATTAAGCAATTATCCAG3') και αριστερός εκκινητής (5'CACTTGTGCAACCCATACTTGACT3')]. Μετά από μια φάση αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA στους 95<sup>0</sup> C για 10 λεπτά, η PCR έγινε σε 30 κύκλους. Ο κάθε κύκλος αποτελούνταν από 3 στάδια (φάσεις): στάδιο αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA στους 95<sup>0</sup> C για 1 λεπτό, στάδιο σύνδεσης των εκκινητών με το πρότυπο DNA στους 60<sup>0</sup> C για 1 λεπτό, και στάδιο επιμήκυνσης στους 72<sup>0</sup> C για 90 δευτερόλεπτα. Τέλος ακολούθησε μια φάση επιμήκυνσης στους 72<sup>0</sup> C για 10 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε ο ανακυκλωτής θερμοκρασίας MJR PTC-100 Programmable Thermal Cycler. Η ανάλυση των γονοτύπων έγινε με ηλεκτροφόρηση για 120 λεπτά σε πήκτωμα αγαρόζης 2% μετά τη δράση 2u του περιοριστικού ενζύμου Taq 1B και βαφή με βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.005%. Μετά από τη φωτογράφιση των ηλεκτροφορητικών ζωνών σε υπεριώδη ακτινοβολία, η παρουσία του αλληλίου B1 αντιστοιχούσε σε 2 ζώνες μεγέθους 600 και 300 βάσεων, ενώ η παρουσία του αλληλίου B2 αντιστοιχούσε σε 1 ζώνη μεγέθους 900 βάσεων (σχήμα 18).

*Σχήμα 18: Ανάλυση των γονοτύπων της CETP*



Οι στήλες 1 και 4 αντιστοιχούν σε ασθενείς με CETP γονότυπο B1B1

Οι στήλες 2 και 3 αντιστοιχούν σε ασθενείς με CETP γονότυπο B1B2

Η στήλη 5 αντιστοιχεί σε ασθενή με CETP γονότυπο B2B2

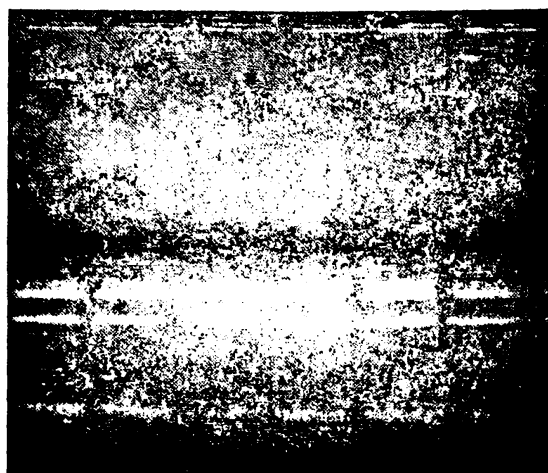


Για την ανεύρεση των γονοτύπων της απο ΑΙV στις θέσεις 347 και 360 περιγράφηκε μια νέα μέθοδος (Miltiadous et al. 2002). Το μίγμα πριν την PCR αποτελούνταν από 50 ng του DNA, 100 mM από κάθε νουκλεοτίδιο, 0.1 μl (1unit) του ενζύμου της DNA πολυμεράσης, 2.5 μl του 10X ρυθμιστικού διαλύματος της DNA πολυμεράσης και 4.8 pmole για κάθε εκκινητή (δεξιό και αριστερό) [δεξιός εκκινητής (5'CTTCCTGGAGAAGGACCTGAGGGAC3') και αριστερός εκκινητής (5'CTGCAAGGAGGATTCATCCGGCAAC3')]. Μετά από μια φάση αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA στους 95<sup>0</sup> C για 5 λεπτά, η PCR έγινε σε 30 κύκλους. Ο κάθε κύκλος αποτελούνταν από 3 στάδια (φάσεις): στάδιο αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA στους 95<sup>0</sup> C για 30 δευτερόλεπτα, στάδιο σύνδεσης των εκκινητών με το πρότυπο DNA στους 65<sup>0</sup> C για 30 δευτερόλεπτα, και στάδιο επιμήκυνσης (elongation phase) στους 72<sup>0</sup> C για 30 δευτερόλεπτα. Τέλος ακολούθησε μια φάση επιμήκυνσης στους 72<sup>0</sup> C για 5 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε ο ανακυκλωτής θερμοκρασίας MJR PTC-100 Programmable Thermal Cycler. Η ανάλυση των γονοτύπων στη θέση 360 έγινε με ηλεκτροφόρηση για 120 λεπτά σε πήκτωμα αγαρόζης (Nusieve) 3% μετά τη δράση 10u του περιοριστικού ενζύμου FnuaHI και βαφή με βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.005%. Μετά από τη φωτογράφιση των ηλεκτροφορητικών ζωνών σε υπεριώδη ακτινοβολία, η παρουσία του αλληλίου 1 αντιστοιχούσε σε 2 ζώνες μεγέθους 141 και 116 βάσεων, ενώ η παρουσία του αλληλίου 2 αντιστοιχούσε σε 2 ζώνες μεγέθους 141 και 125 βάσεων. Η ανάλυση των γονοτύπων στη θέση 347 έγινε με ηλεκτροφόρηση για 60 λεπτά σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% μετά τη δράση 10u του περιοριστικού ενζύμου HinfI και βαφή με βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.005%. Μετά από τη φωτογράφιση των ηλεκτροφορητικών ζωνών σε υπεριώδη ακτινοβολία, η παρουσία του αλληλίου A αντιστοιχούσε σε 2 ζώνες μεγέθους 246 και 73 βάσεων, ενώ η παρουσία του αλληλίου T αντιστοιχούσε σε 1 ζώνη μεγέθους 319 βάσεων (σχήμα 19).



Σχήμα 19: Ανάλυση των γονοτύπων της apo AIV

A. Apo IV-360



Οι στήλες 1,2, 4,5,6 αντιστοιχούν σε ασθενείς με γονότυπο 1/1

Η στήλη 3 αντιστοιχεί σε ασθενή με γονότυπο 1/2

B. Apo AIV-347



Οι στήλες 1 και 7 αντιστοιχούν σε ασθενείς με γονότυπο AA

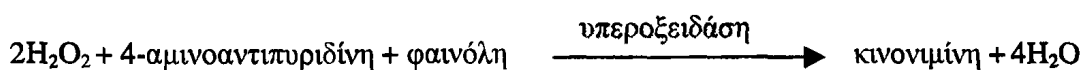
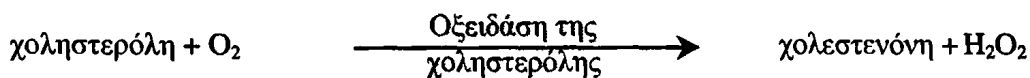
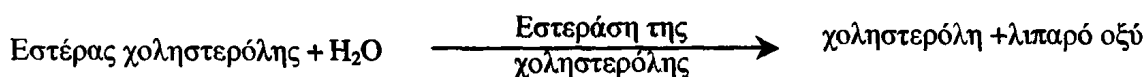
Οι στήλες 2, 3 και 6 αντιστοιχούν σε ασθενείς με γονότυπο AT

Οι στήλες 4 και 5 αντιστοιχούν σε ασθενείς με γονότυπο TT

Η TCHOL και τα TRG στο πλάσμα προσδιορίστηκαν με ενζυμικές μεθόδους σε αυτόματο αναλυτή OLYMPUS AU 580 (Olympus Diagnostica, Hamburg).

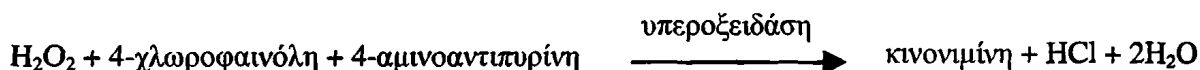
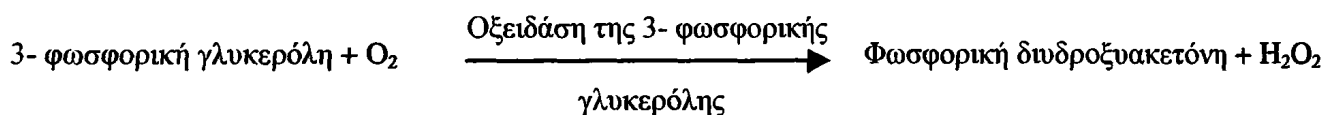
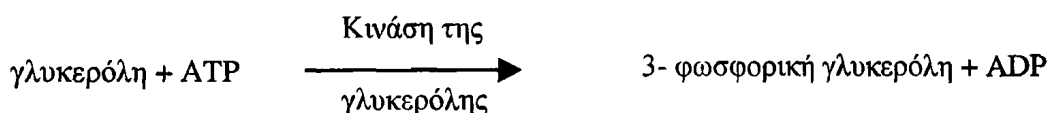
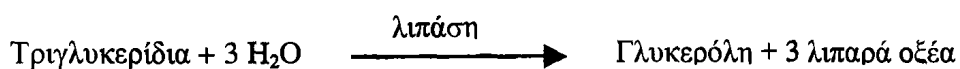
Για τον προσδιορισμό της TCHOL αρχικά το ποσοστό της χοληστερόλης που είναι εστεροποιημένο υδρολύεται σε ελεύθερη χοληστερόλη και λιπαρά οξέα και στη συνέχεια η ολική χοληστερόλη μετατρέπεται σε χολεστερόνη και υπεροξείδιο το οποίο μετράται ποσοτικά με το σχηματισμό χρωμογόνου (κινονιμίνη) στα 510 nm:





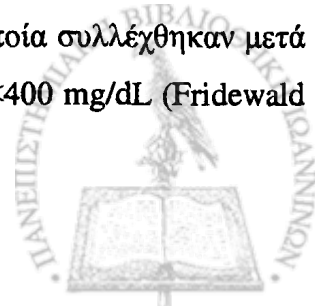
Χρησιμοποιήθηκε βαθμονομητής (calibrator) της Olympus και η καμπύλη βαθμονόμησης είχε ανώτερο όριο γραμμικότητας 700 mg/dL και κατώτερο όριο ανίχνευσης 25 mg/dL.

Για τη μέτρηση των TRG γίνεται αρχικά υδρόλυση των TRG σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα και στη συνέχεια ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκερόλης σε τρία στάδια:



Χρησιμοποιήθηκε βαθμονομητής της Olympus και η καμπύλη βαθμονόμησης είχε ανώτερο όριο γραμμικότητας 1000 mg/dL και κατώτερο όριο ανίχνευσης 10 mg/dL.

Ο προσδιορισμός της HDL-C έγινε ενζυμικά στο υπερκείμενο διάλυμα μετά από καταβύθιση όλων των άλλων λιποπρωτεϊνών με το αντιδραστήριο θειϊκής δεξτράνης-MgCl<sub>2</sub> (Warnick et al. 1982). Αναλυτικά, σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμίχθηκαν 500 μl ορού και 50 μl διαλύματος που περιείχε 500 mmol/L MgCl<sub>2</sub> και 10 g/L θειϊκής δεξτράνης (M<sub>r</sub> 50 000) (Sigma). Μετά την καταβύθιση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, το μίγμα της αντίδρασης φυγοκεντρήθηκε σε 1500 rpm για 5 λεπτά και το υπερκείμενο συλλέχθηκε για τον ενζυματικό προσδιορισμό της HDL-C. Η τιμή της LDL-C υπολογίστηκε από τον τύπο του Friedewald: LDL-C = TC - (HDL-C + TRG/5) σε δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν μετά από 14 ώρες νηστεία υπό την προϋπόθεση ότι η τιμή των TRG ήταν <400 mg/dL (Friedewald et al. 1972).



Για τον έλεγχο της ακρίβειας και της αξιοπιστίας των μεθόδων προσδιορισμού της TCHOL, των TRG και της HDL-C χρησιμοποιήθηκαν οι οροί ελέγχου Decision<sup>®</sup> (Levels 1,2,3) της Beckman (Fullerton, CA).

Οι συντελεστές διακύμανσης (CV) στο πρόγραμμα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου (Murex Clinical Chemistry Quality Assessment Programme) κυμαίνονταν μεταξύ 0.99 και 2.14% για τη TCHOL και μεταξύ 1.73 και 3.36% για τα TRG και τη HDL-C.

Ο προσδιορισμός των τιμών των απολιποπρωτεϊνών στο πλάσμα έγινε με ανοσονεφελομετρία σε νεφελόμετρο BN100 (Dade Behring, Liederbach, Germany) με τη χρησιμοποίηση ειδικών αντισωμάτων για κάθε απολιποπρωτεΐνη. Οι συντελεστές ενδοαναλυτικής διακύμανσης (intra-assay) και διαναλυτικής διακύμανσης (inter-assay) της μεθόδου είναι 2.2% και 5.7% αντίστοιχα για την apo A1 και 1.9% και 2.4% για την apo B.

Τέλος, η Lp(a) μετρήθηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο (sandwich-ELISA assay, Macra Lp(a), Temuro Medical Corporation Diagnostic Division, Elktron, MD) με τη χρήση ενός μονοκλωνικού και ενός πολυκλωνικού αντισώματος [anti-apo(a)]. Στο πρώτο στάδιο το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα (αντίσωμα επίστρωσης) το οποίο δεν εμφανίζει διασταυρούμενη αντίδραση με το πλασμινογόνο συνδέεται με την περιοχή klinge IV της apo (a) και στη συνέχεια το δεύτερο πολυκλωνικό αντίσωμα το οποίο δεν παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με την apo B-100 συνδέεται με την apo (a). Οι συντελεστές ενδοαναλυτικής διακύμανσης (intra-assay) και διαναλυτικής διακύμανσης (inter-assay) της μεθόδου είναι μικρότεροι από 6% και 10.3% αντίστοιχα.





## 2.3 Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα Statistica. Για τη σύγκριση ποσοστών μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία  $\chi^2$ . Η σύγκριση των μέσων τιμών των λιπιδαιμικών παραμέτρων (TCHOL, TRG, HDL-C, LDL-C, apo A1, apo B και apo E) έγινε με ανάλυση της μεταβλητότητας σε μια διεύθυνση (one-way ANOVA), ενώ για τη σύγκριση των ενδιάμεσων (median) τιμών της Lp(a) χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Kruskal-Wallis ANOVA. Η σύγκριση των μέσων τιμών των λιπιδαιμικών παραμέτρων (TCHOL, TRG, HDL-C, LDL-C, apo A1, apo B και apo E) μεταξύ των ομοζυγωτών και των ετεροζυγωτών για τη μεταλλάξη G1775A έγινε με τη δοκιμασία unpaired Student's t-test, ενώ για τη σύγκριση των ενδιάμεσων τιμών της Lp(a) χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Mann-Whitney U. Για τον υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης ( $r$ ) μεταξύ των διαφόρων παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση του Pearson

$$(r = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{[\sum(x - \bar{x})^2][\sum(y - \bar{y})^2]}})$$
 και ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας του

συντελεστή συσχέτισης έγινε με τη χρησιμοποίηση της t-κατανομής του Student με 2 βαθμούς ελευθερίας. Η επίδραση των κλινικών και γενετικών παραμέτρων στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών με ετερόζυγη FH εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία της πολλαπλής γραμμικής εξάρτησης (multiple linear regression analysis). Η μεταβολή των τιμών των λιπιδαιμικών παραμέτρων (TCHOL, TRG, HDL-C, LDL-C, apo A1, apo B και apo E) μετά τη χορήγηση του φαρμάκου έγινε με τη δοκιμασία paired Student's t-test, ενώ η μεταβολή της Lp(a) με τη δοκιμασία Wilcoxon's signed-rank test. Η σύγκριση των μέσων τιμών των λιπιδαιμικών παραμέτρων (TRG και LDL-C) πριν τη χορήγηση της ατορβαστατίνη μεταξύ των 2 ομάδων των ασθενών που έλαβαν φαρμακευτική αγωγή (ασθενείς με μετάλλαξη τύπου V vs ασθενείς με μετάλλαξη τύπου II) έγινε με τη δοκιμασία του unpaired Student's t-test. Η εκτίμηση της ποσοστιαίας μείωσης της LDL-C και των TRG μετά τη χορήγηση της ατορβαστατίνης σε σχέση με κλινικούς και γενετικούς παράγοντες έγινε με τη δοκιμασία ANCOVA μετά από διόρθωση για τα αρχικά επίπεδα της LDL-C και των TRG αντίστοιχα. Η επίδραση των κλινικών και γενετικών παραμέτρων στη μείωση της LDL-C και των TRG που παρατηρήθηκε μετά τη χορήγηση του φαρμάκου έγινε με τη δοκιμασία της πολλαπλής γραμμικής εξάρτησης (multiple linear regression analysis).



## 2.4 Αποτελέσματα

Σε 94 ασθενείς (ποσοστό 90%) η κλινική διάγνωση επιβεβαιώθηκε σε γενετικό επίπεδο. Ογδόντα-επτά ασθενείς ήταν ετεροζυγώτες και 7 ήταν ομοζυγώτες. Οι υπεύθυνες μεταλλάξεις που προκαλούν FH στη Βορειοδυτική Ελλάδα είναι 7. Οι μεταλλάξεις T517C (FH Greece-1) στο εξόνιο 4, C858A (FH Greece-2) στο εξόνιο 6, G1285A (FH Afrikaner-2) στο εξόνιο 9 και G1646A (FH Palermo-1) στο εξόνιο 11 έχουν προηγούμενα περιγραφεί σε Έλληνες ασθενείς (Traeger-Synodinos et al. 1998). Οι μεταλλάξεις T81G (FH San Francisco) στο εξόνιο 2 and G1775A (Sicily/Foggi/Naples4) στο εξόνιο 12 περιγράφονται για πρώτη φορά στον Ελληνικό πληθυσμό (Miltiadous et al. 2001). Η μετάλλαξη T1352C στο εξόνιο 9 περιγράφεται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία (Miltiadous et al. 2000). Οι υπεύθυνες μεταλλάξεις, η συχνότητα τους και ο τρόπος ανίχνευσης τους φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Μεταλλάξεις του γονιδίου του LDLR που προκαλούν FH στη Βορειοδυτική Ελλάδα (n=94)

ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΑΛΛΑΓΗ ΑΜΙΝΟΞΕΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ %	ΤΡΟΠΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ
T81G	C6W	9.1%	A	OXI
T517C	C152R	3.4%	B	NAI
C858A	S265R	12.5%	A	NAI
G1285A	V408M	13.6%	B	NAI
T1352C	I430T	2.3%	A,B	OXI
G1646A	G528V	26.1%	A	NAI
G1775A	G571E	33%	A	OXI

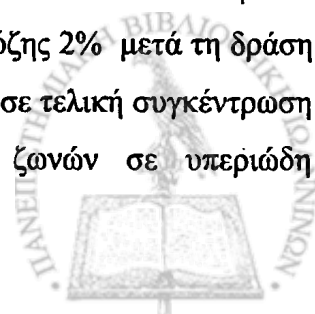
A ανεύρεση αλληλουχίας βάσεων

B χρησιμοποίηση περιοριστικού ενζύμου



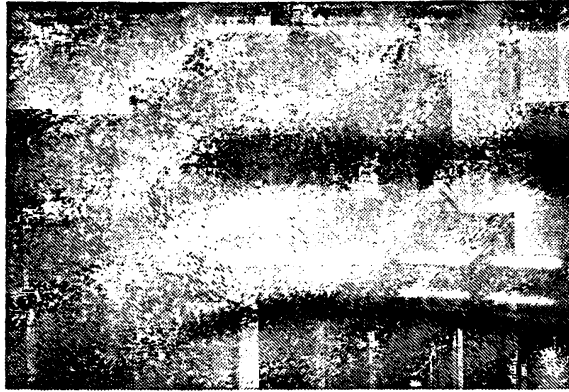
Η μετάλλαξη G1775A είναι η συχνότερη στην περιοχή μας με συχνότητα 33%. Η μετάλλαξη αυτή είναι υπεύθυνη για τους 7 ομοζυγώτες ασθενείς και ανιχνεύθηκε σε ασθενείς που κατάγονται από την περιοχή των Τζουμέρκων. Η ορεινή αυτή περιοχή εκτείνεται από τα Ιωάννινα μέχρι την πόλη της Άρτας, έχει πληθυσμό περίπου 3,000 κατοίκους και τουλάχιστον μέχρι πρόσφατα ήταν σχετικά απομονωμένη. Η υψηλή συχνότητα ομοζυγωτών σε αυτή την περιοχή, καθώς και το γεγονός ότι αυτή η μετάλλαξη δεν έχει ανιχνευθεί σε άλλα διαμερίσματα της χώρας υποδεικνύουν την παρουσία θεμελιώδους μετάλλαξης (founder effect) (Miltiadous et al. 2001). Πρέπει να αναφερθεί ότι αυτή η μετάλλαξη έχει επίσης περιγραφεί σε Ιταλούς και Γερμανούς ασθενείς με FH (Hobbs et al. 1992, <http://www.ucl.ac.uk/fh>).

Η μετάλλαξη T1352C στο εξόνιο 9 του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR περιγράφεται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία (Miltiadous et al. 2000). Αρχικά η μετάλλαξη αυτή απομονώθηκε σε γενετικό υλικό [μετά από ανεύρεση της αλληλουχίας των βάσεων όλων των εξονίων και του εναρκτή του γονιδίου του LDLR (Hobbs et al. 1992)] σε μια γυναίκα ηλικίας 42 ετών που πληρούσε τα κριτήρια για τη διάγνωση της νόσου. Στη συνέχεια, η μετάλλαξη απομονώθηκε σε μέλη της οικογένειάς της που είχαν υψηλά επίπεδα TCHOL, ενώ αντίθετα μέλη της ίδιας οικογένειας με φυσιολογικές τιμές TCHOL δεν είχαν τη μετάλλαξη στο γενετικό τους υλικό. Επιπρόσθετα, περιγράψαμε μέθοδο ανίχνευσης της μετάλλαξης με τη χρησιμοποίηση ενζύμου περιορισμού με αποτέλεσμα τη γρήγορη ανίχνευση αυτής της μετάλλαξης σε Έλληνες ασθενείς με την κλινική διάγνωση της FH (Miltiadous et al. 2000). Το μίγμα πριν την PCR αποτελούνταν από 50 ng του DNA, 100 mM από κάθε νουκλεοτίδιο, 0.1 μl (1u) του ενζύμου της DNA πολυμεράσης, 2.5 μl του 10X ρυθμιστικού διαλύματος της DNA πολυμεράσης και 5 pmole για κάθε εκκινητή (δεξιό και αριστερό) [δεξιός εκκινητής (5'TCCATCGACGGGTCCCCTCTGACCC3') και αριστερός εκκινητής (5'AGCCCTCATCTCACCTGCGGGCCAA3') (Hobbs et al. 1992)]. Μετά από μία φάση αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA στους 95<sup>0</sup> C για 5 λεπτά, η PCR έγινε σε 30 κύκλους. Ο κάθε κύκλος αποτελούνταν από 3 στάδια (φάσεις): στάδιο αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA στους 95<sup>0</sup> C για 1 λεπτό, στάδιο σύνδεσης των εκκινητών με το πρότυπο DNA στους 68<sup>0</sup> C για 1 λεπτό, και στάδιο επιμήκυνσης στους 72<sup>0</sup> C για 1 λεπτό. Τέλος ακολούθησε μια φάση επιμήκυνσης στους 72<sup>0</sup> C για 6 λεπτά. Η ανάλυση των γονοτύπων έγινε με ηλεκτροφόρηση για 120 λεπτά σε πήκτωμα αγαρόζης 2% μετά τη δράση 10u του περιοριστικού ενζύμου MboI και βαφή με βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.005%. Μετά από τη φωτογράφιση των ηλεκτροφορητικών ζωνών σε υπεριώδη



ακτινοβολία, η παρουσία της μετάλλαξης αντιστοιχούσε σε 2 ζώνες μεγέθους 201 και 59 βάσεων, ενώ η παρουσία του φυσιολογικού χρωμοσώματος αντιστοιχούσε σε 1 ζώνη μεγέθους 270 βάσεων (σχήμα 20).

Σχήμα 20: Ανίχνευση της μετάλλαξης T1352C



Οι στήλες 1 και 2 αντιστοιχούν σε φυσιολογικά άτομα

Οι στήλες 3 και 4 αντιστοιχούν σε άτομα με ετερόζυγη FH για τη μετάλλαξη T1352C

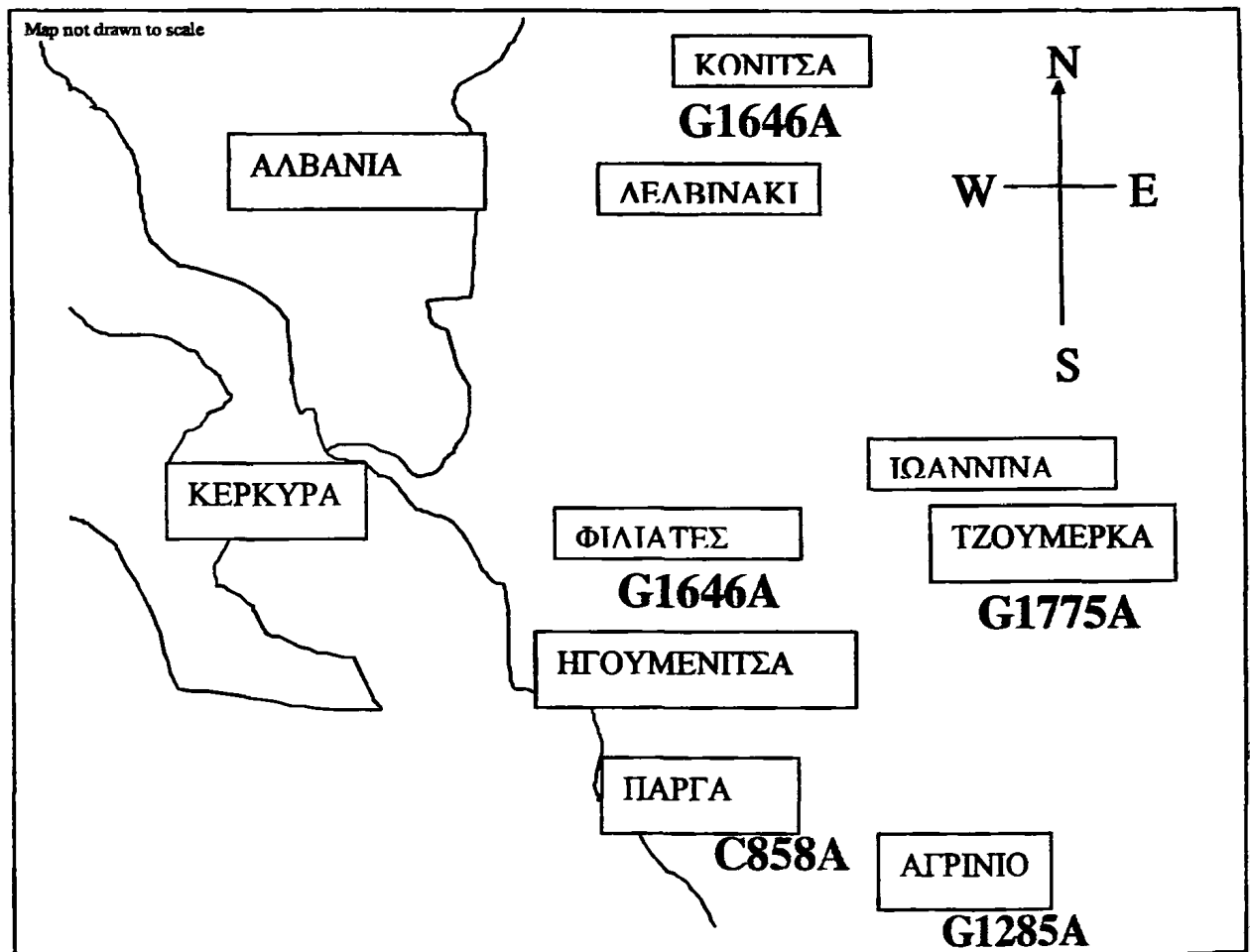
Η δεύτερη σε συχνότητα μετάλλαξη είναι η μετάλλαξη G1646A στο εξόνιο 11 του γονιδίου του LDLR (26.1%). Η μετάλλαξη αυτή έχει προηγουμένα απομονωθεί σε Ιταλούς και Έλληνες ασθενείς (Hobbs et al. 1990, Traeger-Synodinos et al. 1998, <http://www.ucl.ac.uk/fh>). Η μετάλλαξη G1285A στο εξόνιο 9 έχει συχνότητα 13.6% και έχει περιγραφεί σε πολλούς πληθυσμούς (Αφρική, Ολλανδία, Γερμανία και Ελλάδα) (Traeger-Synodinos et al. 1998, <http://www.ucl.ac.uk/fh>). Η μετάλλαξη C858A (12.5%) έχει προηγουμένα περιγραφεί σε Έλληνες, Αυστριακούς και Άγγλους ασθενείς (Hobbs et al. 1992, <http://www.ucl.ac.uk/fh>). Στη μελέτη μας για πρώτη φορά ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη T81G στο εξόνιο 2 σε Έλληνες ασθενείς με συχνότητα 9.1% (Miltiadous et al. 2001). Η μετάλλαξη αυτή έχει περιγραφεί στην Αμερική, Κροατία και Αγγλία (Hobbs et al. 1992, <http://www.ucl.ac.uk/fh>). Τέλος, η μετάλλαξη T517C στο εξόνιο 4 έχει απομονωθεί μόνο σε Έλληνες ασθενείς (Traeger-Synodinos et al. 1998) και η συχνότητα της στη Βορειοδυτική Ελλάδα είναι 3.4%.

Η γεωγραφική κατανομή των συχνότερων μεταλλάξεων φαίνεται στο σχήμα 21. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η μετάλλαξη G1775A απομονώθηκε σε ασθενείς που κατάγονται από την περιοχή των Τζουμέρκων. Ασθενείς που κατάγονται από τη Θεσπρωτία έχουν τη μετάλλαξη



G1646A, ενώ η μετάλλαξη C858A απομονώθηκε κυρίως σε ασθενείς που κατάγονται από το Νομό της Πρέβεζας. Τέλος, ασθενείς που κατάγονται από την Αιτωλοακαρνανία έχουν τη μετάλλαξη G1285A.

Σχήμα 21: Γεωγραφική κατανομή των συχνότερων μεταλλάξεων στη Βορειοδοτική Ελλάδα



Τα κλινικά, γενετικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών σε σχέση με τις υπεύθυνες μεταλλάξεις φαίνονται στον πίνακα 4.

**Πίνακας 4: Λιπιδαιμικό προφίλ και χαρακτηριστικά των ασθενών με ετερόζυγη FH (n=85)**

**A. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών σε σχέση με τις υπεύθυνες μεταλλάξεις του LDLR**

ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	ΗΛΙΚΙΑ (ΕΤΗ)	ΦΥΛΟ (ΓΥΝΑΙΚΕΣ/ ΑΝΤΡΕΣ)	ΚΑΠΝΙΣΜΑ (ΟΧΙ/ΝΑΙ)	BMI (Kg/m <sup>2</sup> )
T81G	7	43±10	5/2	5/2	25±1
T517C	4	36±17	3/1	3/1	25±4
C858A	15	37±14	8/7	13/2	24±3
G1285A	15	40±15	10/5	14/1	23±4
G1646A	20	39±14	9/11	15/5	24±4
G1775A	24	43±12	14/10	17/7	25±3
p-value		0.20	0.29	0.42	0.73

**B. Γενετικά χαρακτηριστικά των ασθενών σε σχέση με τις υπεύθυνες μεταλλάξεις του LDLR**

ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	APOE (non E4/E4)	CETP (B1B1/B1B2/B2B2)	APOAIV-347 (AA-AT/TT)	APOAIV-360 (1-1/1-2)
T81G	7	6/1	2/2/3	5/2	5/2
T517C	4	4/0	2/0/2	3/1	4/0
C858A	15	14/1	4/2/9	13/3	14/1
G1285A	15	13/2	4/2/9	6/9	13/2
G1646A	20	19/1	9/4/7	14/6	19/1
G1775A	24	23/1	8/6/10	16/8	23/1
p-value		0.18	0.14	0.7	0.65



*Γ. Βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών σε σχέση με τις υπεύθυνες μεταλλάξεις του LDLR*

ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	TCHOL	TRG	HDL-C	LDL-C	apoA1	apoB	apoE	Lp(a)
T81G	370±55	116±34	52±18	290±43	142±45	187±29	51±13	7.65 (5-12.8)
T517C	365±43	140±89	45±11	291±31	114±20	203±19	54±16	13 (10-23.8)
C858A	346±50	140±72	51±13	267±39	139±15	182±19	51±6	8.4 (2.5-33.3)
G1285A	409±107	105±47	51±13	337±96	145±26	233±71	56±15	15.7 (5-32.4)
G1646A	379±68	168±130	46±15	289±53	133±16	183±23	52±12	11 (0.8-36)
G1775A	366±68	157±80	47±13	287±65	139±20	182±51	55±12	10.9 (1.7-30.7)
p-value	0.13	0.74	0.58	0.70	0.18	0.10	0.9	086

Οι τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων εκφράζονται ως μέση τιμή±σταθερή απόκλιση, ενώ οι τιμές της Lp(a) ως ενδιάμεση τιμή (εύρος τιμών), mg/dl

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την ηλικία, το φύλο, το δείκτη σωματικής μάζας (BMI) και τη συνήθεια του καπνίσματος μεταξύ των υπεύθυνων μεταλλάξεων του LDLR. Επίσης, οι συχνότητες των πολυμορφισμών των γονιδίων που μελετήθηκαν (apo E, apo AIV και CETP) δεν διέφεραν μεταξύ των μεταλλάξεων του LDLR που παρατηρήθηκαν στον πληθυσμό της μελέτης. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων μεταξύ των υπεύθυνων μεταλλάξεων του LDLR. Αντίθετα, οι ομοζυγώτες είχαν υψηλότερα επίπεδα TCHOL, LDL-C, apo B και Lp(a) σε σύγκριση με τους ετεροζυγώτες που έχουν την ίδια μετάλλαξη ( $p < 0.05$  για όλες τις συγκρίσεις) (πίνακας 5).



Πίνακας 5: Λιπιδαιμικό προφίλ ασθενών ομόζυγων για τη μετάλλαξη G1775A (n=7) σε σύγκριση με τους ετεροζυγώτες με την ίδια μετάλλαξη (n=24)

G1775A	TCHOL	TRG	HDL-C	LDL-C	apoA1	apoB	apoE	Lp(a)
Ετεροζυγώτες n=24	366±68	157±80	47±13	287±65	139±20	182±51	55±12	10.9 (1.7-30.7)
Ομόζυγώτες n=7	440±80	147±89	39±8	354±75	101±30	237±19	62±25	16.1(10.7-70)

Οι τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων εκφράζονται ως μέση τιμή±σταθερή απόκλιση, ενώ οι τιμές της Lp(a) ως ενδιάμεση τιμή (εύρος τιμών), mg/dl, p<0.05 για όλες τις παραμέτρους

Η επίδραση των κλινικών και γενετικών παραγόντων στο λιπιδαιμικό προφίλ [TCHOL,TRG, HDL-C, LDL-C και Lp(a)] των ασθενών με ετερόζυγη FH φαίνεται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6: Η επίδραση κλινικών και γενετικών παραγόντων στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών με ετερόζυγη FH

	TCHOL		TRG		HDL-C		LDL-C		Lp(a)	
	<sup>1</sup> b	<sup>2</sup> p	b	p	b	p	b	p	b	p
Ηλικία	.12	.33	.02	.83	.08	.45	.09	.43	.13	.40
ΒΜΙ	.13	.30	.32	.00	-.16	.19	.06	.61	.03	.84
Φύλο	-.08	.48	.07	.50	.07	.49	-.11	.32	-.13	.36
Κάπνισμα	-.03	.76	-.08	.41	-.04	.50	-.00	.99	.01	.93
LDLR	.02	.88	.06	.55	.10	.35	.02	.87	.15	.25
Απο E	-.10	.35	.19	.06	-.27	.01	-.17	.87	-.19	.16
Απο AIV 347	.21	.08	-.06	.55	-.14	.19	.21	.07	.22	.12
Απο AIV 360	.07	.50	-.01	.92	-.04	.72	.09	.43	.20	.09
CETP	.18	.13	.12	.24	.15	.16	.11	.33	.07	.61
TRG					-.26	.03				

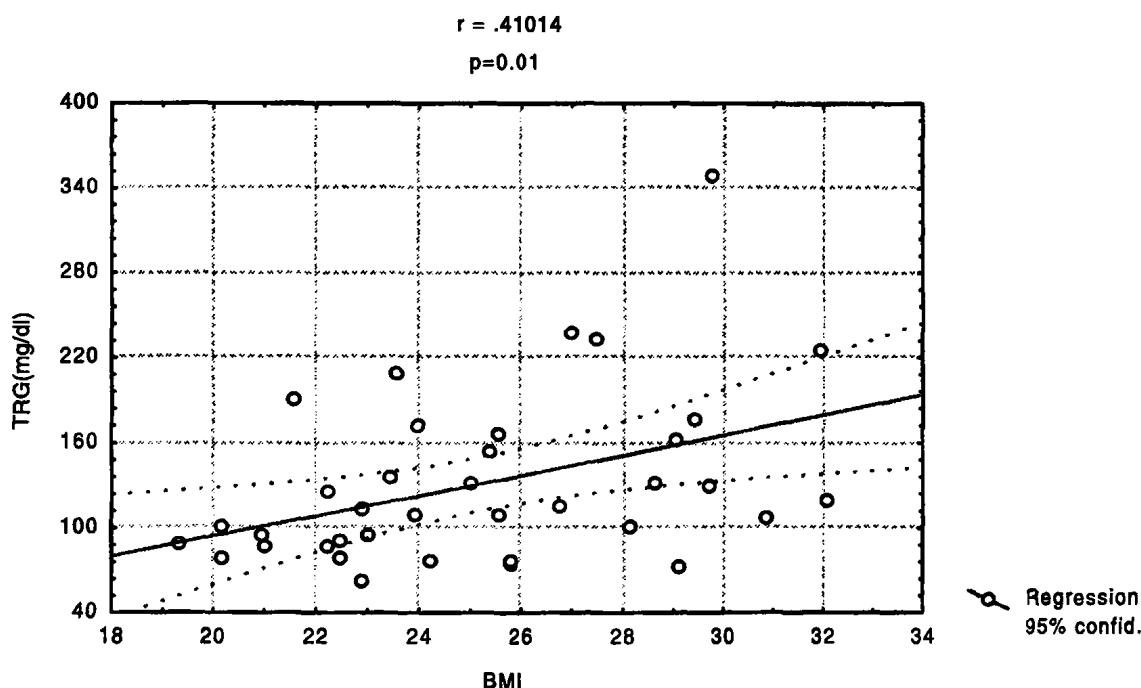
Multiple linear regression analysis: <sup>1</sup>beta, <sup>2</sup>p-value





Τα επίπεδα της TCHOL, της LDL-C και της Lp(a) σε πολυπαραγοντική ανάλυση δεν συσχετίζονταν με κανένα από τα κλινικά (την ηλικία, το BMI, το φύλο και το κάπνισμα) και γενετικά χαρακτηριστικά (πολυμορφισμοί της apo E, της apo AIV και της CETP και μεταλλάξεις του LDLR) που μελετήθηκαν ( $p$ -value  $>0.05$ , multiple linear regression analysis, πίνακας 6). Αντίθετα, τα TRG σε μονοπαραγοντική ανάλυση εμφάνισαν θετική συσχέτιση με το BMI στους ασθενείς με ετερόζυγη FH ( $r=0.41$ ,  $p=0.01$ ). (σχήμα 22).

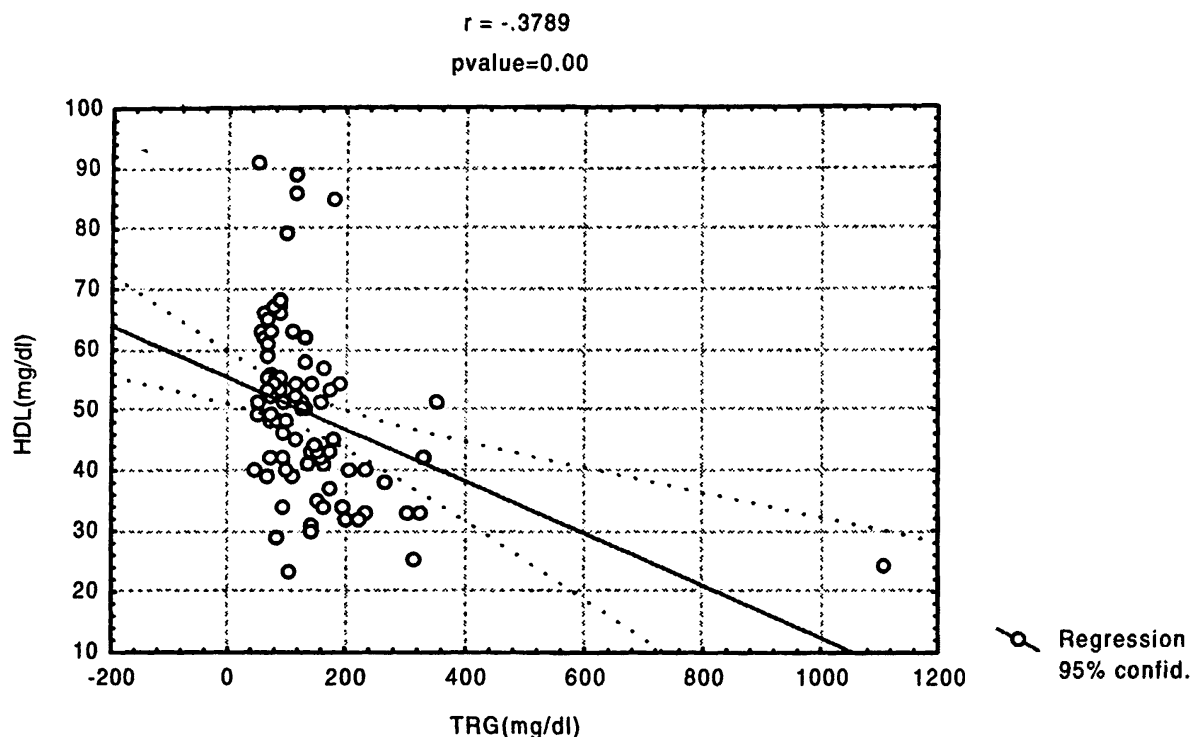
Σχήμα 22: Συσχέτιση του BMI( $kg/m^2$ ) με τα επίπεδα των TRG (mg/dl) σε ασθενείς με ετερόζυγη FH



Όπως φαίνεται στον πίνακα 6, η συσχέτιση αυτή παρέμεινε σημαντική στην πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων. Η ηλικία, το φύλο, η συνήθεια του καπνίσματος, οι μεταλλάξεις του LDLR και οι πολυμορφισμοί της apo E, της apo AIV και της CETP δεν επηρέαζαν τα επίπεδα των TRG των ασθενών με ετερόζυγη FH ( $p$ -value  $>0.05$ , multiple linear regression analysis, πίνακας 6). Όπως αναμένονταν τα επίπεδα της HDL-C εμφάνισαν αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα των TRG σε μονοπαραγοντική ( $r = -0.378$ ,  $p = 0.00$ ) (σχήμα 23) και πολυπαραγοντική ανάλυση (πίνακας 6).



Σχήμα 23: Συσχέτιση της HDL-C (mg/dl) με τα επίπεδα των TRG (mg/dl) σε ασθενείς με ετερόζυγη FH.



Επίσης, οι πολυμορφισμοί της apo E επηρέασαν τα επίπεδα της HDL-C των ασθενών με ετερόζυγη FH. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς που έχουν το αλληλίο E4 της apo E εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα HDL-C σε σύγκριση με τους ασθενείς που έχουν τα αλληλία E2 και E3 ( $39.9 \pm 8.6$  vs  $49.3 \pm 13$  mg/dl,  $p=0.03$ ) (Miltiadous et al. 2002). Όπως φαίνεται στον πίνακα 6, η συσχέτιση της HDL-C με τους πολυμορφισμούς της apo E παρέμεινε σημαντική και στην πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων. Τέλος, η ηλικία, το φύλο, η συνήθεια του καπνίσματος, οι μεταλλάξεις του LDLR και οι πολυμορφισμοί της apo AIV και της CETP δεν επηρέασαν τα επίπεδα της HDL-C των ασθενών με ετερόζυγη FH ( $p\text{-value} > 0.05$ , multiple linear regression analysis, πίνακας 6).

Η χορήγηση ατορβαστατίνης 20 mg ημερησίως σε 32 ασθενείς με ετερόζυγη FH είχε ως αποτέλεσμα μείωση της LDL-C κατά 37% και της apo B κατά 36%. Επίσης, η χορήγηση του φαρμάκου προκάλεσε μια μείωση των TRG κατά 15%, η οποία συνοδεύονταν από μια μείωση της apo E κατά 31%. Η επίδραση του φαρμάκου στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών φαίνεται στον πίνακα 7.



Πίνακας 7: Επίδραση της ατορβαστατίνης (20 mg/ημέρα) στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών με FH (n=32)

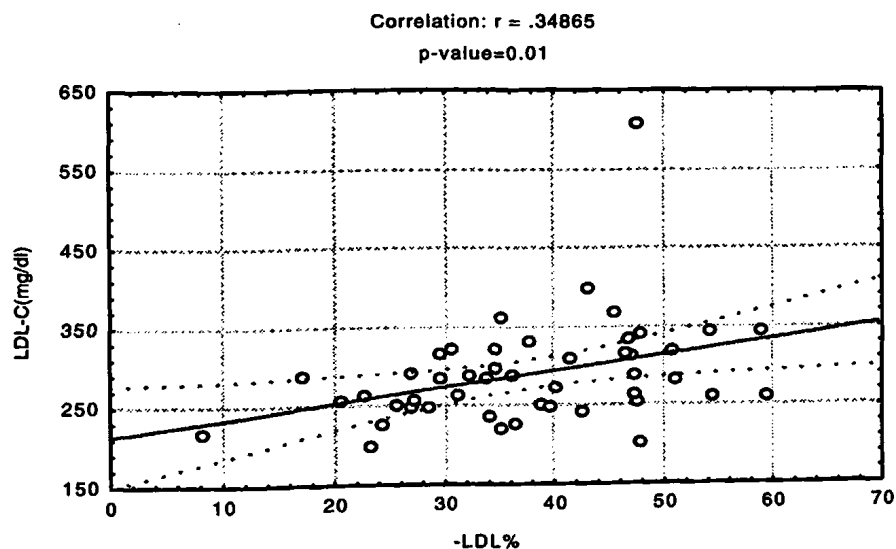
Παράμετρος	Αρχική τιμή (Μέση τιμή±SD)	Τελική τιμή (Μέση τιμή± SD)	% μείωση (Μέση τιμή± SD)	p-value
TCHOL (mg/dl)	362±74	245±43	32±10	0.00
TRG (mg/dl)	131±60	103±41	15±29	0.00
HDL-C (mg/dl)	48±11	46±11	2±20	NS
LDL-C (mg/dl)	287±70	178±38	37±11	0.00
APOA1 (mg/dl)	143±21	140±24	15±24	NS
APOB (mg/dl)	191±58	132±28	36±22	0.00
APOE (mg/dl)	54±11	43±9	31±20	0.00
Lp(a) (mg/dl)	15(2-45)	13(2-57)	2±54	NS

NS: όχι σημαντική διαφορά

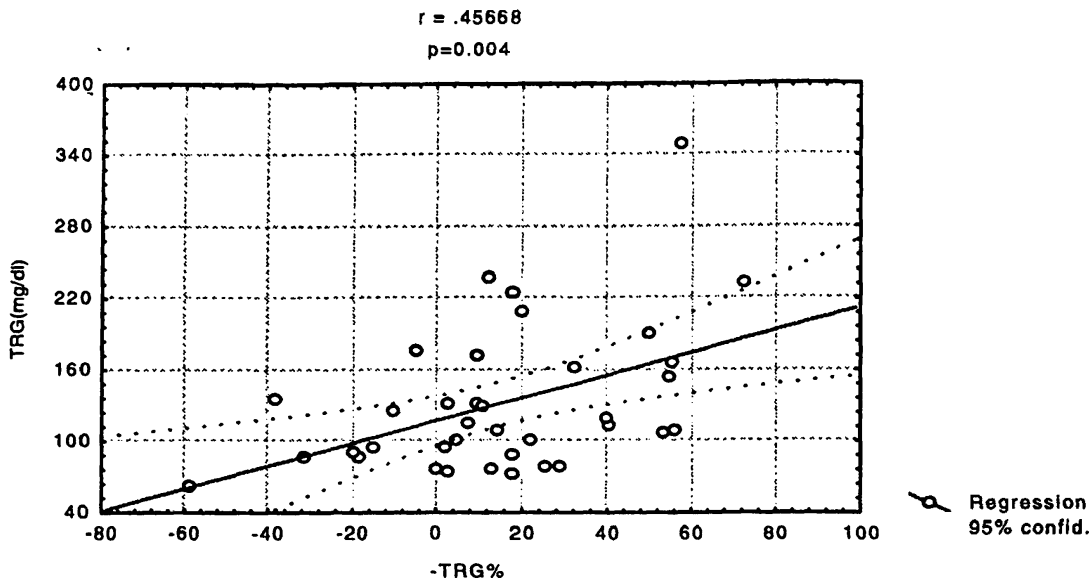
Η μείωση της LDL-C και των TRG συσχετίζονταν με τα αρχικά επίπεδα της LDL-C και των TRG αντίστοιχα ( $r=0.34$ ,  $p=0.01$  και  $r=0.45$ ,  $p=0.004$ , αντίστοιχα) (σχήμα 24).

Σχήμα 24

A. Συσχέτιση της ποσοστιαίας μείωσης της LDL-C (-LDL%) με τα αρχικά επίπεδα της LDL-C (mg/dl)



*B. Συσχέτιση της ποσοστιαίας μείωσης των TRG (-TRG%) με τα αρχικά επίπεδα των TRG (mg/dl)*



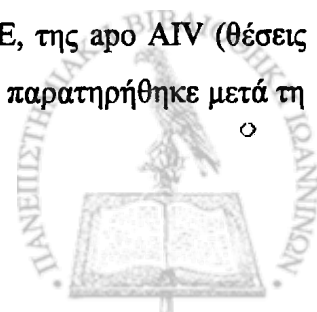
Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι ο τύπος των μεταλλάξεων του LDLR συσχετίζεται με την ποσοστιαία μείωση της LDL-C που παρατηρήθηκε μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις ήταν οι μεταλλάξεις G1775A, G1646A και C858A. Η μετάλλαξη G1775A είναι μία μετάλλαξη τύπου V, ενώ οι μεταλλάξεις G1646A και C858A είναι μεταλλάξεις τύπου II. Έτσι, οι 32 ασθενείς που έλαβαν ατορβαστατίνη χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: τη μια ομάδα αποτέλεσαν οι ασθενείς με τη μετάλλαξη G1775A (n=11) και την άλλη ομάδα αποτέλεσαν οι ασθενείς με τις μεταλλάξεις G1646A και C858A (n=21). Όπως φαίνεται στο πίνακα 8 δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τα κλινικά, βιοχημικά και γενετικά χαρακτηριστικά μεταξύ των δύο ομάδων των ασθενών που μελετήθηκαν. Ωστόσο, οι ασθενείς με τη μετάλλαξη G1775A είχαν χαμηλότερα επίπεδα LDL-C και TRG σε σύγκριση με τους ασθενείς με τις μεταλλάξεις G1646A και C858A (297±75 vs 254±33 και 116±46 vs 155±81 mg/dl, αντίστοιχα). Οι διαφορές αυτές όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Πίνακας 8: Κλινικά, βιοχημικά και γενετικά χαρακτηριστικά των ασθενών που εμφανίζουν τη μετάλλαξη G1775A (μετάλλαξη τύπου V) και τις μεταλλάξεις G1646A και C858A (μεταλλάξεις τύπου II).

Τύπος μετάλλαξης	II	V	p-value
Αριθμός ασθενών (n)	21	11	
Ηλικία (έτη)	40±11	47±13	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25±3	24±3	NS
Φύλο (Γ/Α)	13/8	8/3	NS
Κάπνισμα (OXI/NAI)	18/3	7/4	NS
APO E (nonE4/E4)	18/3	8/3	NS
APO AIV 347 (AA/AT-TT)	14/7	7/4	NS
APO AIV 360 (1-1/1-2)	18/3	10/1	NS
CETP (B1B1/B1B2/B2B2)	9/8/4	5/4/3	NS
LDL-C (mg/dl)	297±75	254±33	NS
TRG (mg/dl)	116±46	155±81	NS

NS: όχι σημαντική διαφορά

Οι ασθενείς με τη μετάλλαξη G1775A (μετάλλαξη τύπου V) εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων της LDL-C σε σύγκριση με τους ασθενείς που έχουν τις μεταλλάξεις G1646A και C858A (μεταλλάξεις τύπου II) (49±9 vs 34±9%, p=0.00). Η διαφορά αυτή της ανταπόκρισης που παρατηρήθηκε μετά τη χορήγηση της ατορβαστατίνης μεταξύ των πιο πάνω μεταλλάξεων παρέμεινε σημαντική και μετά από διόρθωση για τα αρχικά επίπεδα της LDL-C (πίνακας 9). Οι πολυμορφισμοί της apo E, της apo AIV (θέσεις 347 και 360) και της CETP δεν επηρέασαν τη μείωση της LDL-C που παρατηρήθηκε μετά τη



χορήγηση του φαρμάκου. Επίσης, η μείωση της LDL-C δεν συσχετίζονταν με το φύλο ή τις καρδιακές συνήθειες των ασθενών (πίνακας 9).

Πίνακας 9: Ποσοστιαία μείωση της LDL-C (-LDL-C%) μετά τη χορήγηση απορβαστατίνης 20 mg/ημέρα σε σχέση με γενετικούς και κλινικούς παράγοντες

	Αριθμός ασθενών (n)	-LDL-C% μέση τιμή±SD	Covariate LDL-C	<sup>1</sup> F-value	<sup>2</sup> p-value
II LDLR MUT V	21	34±9	297	28.8	0.00
	11	49±9	254		
NON E4 APO E E4	27	38±11	298	1.33	0.25
	5	45±13	266		
AA APO AIV 347 AT-TT	21	37±11	279	3.08	0.09
	11	44±11	320		
1/1 APO AIV 360 1/2	29	41±11	295	1.38	0.19
	3	37±7	271		
B1B1 CETP B1B2 B2B2	13	37±12	273	0.86	0.43
	11	39±11	315		
	8	44±8	296		
όχι κάπνισμα ναι	25	38±11	296	1.15	0.29
	7	43±12	283		
Γ φύλο Α	21	40±11	297	0.26	0.6
	11	38±11	285		

ANCOVA: <sup>1</sup>F-value, <sup>2</sup>p-value



Η πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων (multiple linear regression analysis) επιβεβαίωσε ότι η μείωση της LDL-C μετά τη χορήγηση ατορβαστατίνης 20 mg/ημέρα συσχετίζονταν με τον τύπο της μεταλλάξης του LDLR. Αντίθετα, δεν συσχετίζονταν με άλλους γενετικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες που εκτιμήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη (πίνακας 10).

*Πίνακας 10: Πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων όσον αφορά τη μείωση της LDL-C μετά τη χορήγηση του φαρμάκου*

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	<sup>1</sup> beta	<sup>2</sup> p-value
ΤΥΠΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΤΟΥ LDLR (ΤΥΠΟΣ II vs V)	0.60	0.00
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΡΟ Ε (NON E4 vs E4)	0.07	0.60
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΡΟ ΑΙΥ 347 (AA vs AT/TT)	0.38	0.09
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΡΟ ΑΙΥ 360 (1/1 vs 1/2)	-0.15	0.32
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ CETP (B1B1 vs B1B2 vs B2B2)	-0.15	0.41
ΦΥΛΟ (Γ vs Α)	-0.00	0.98
ΗΛΙΚΙΑ (ΕΤΗ)	0.06	0.66
ΚΑΠΝΙΣΜΑ (ΟΧΙ vs ΝΑΙ)	0.16	0.30
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.27	0.09

Multiple linear regression analysis: <sup>1</sup>beta, <sup>2</sup>p-value

Αντίθετα, η μείωση των TRG δεν συσχετίζονταν με γενετικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες (πίνακες 11 και 12).



Πίνακας 11: Ποσοστιαία μείωση των TRG (-TRG%) μετά τη χορήγηση ατορβαστατίνης 20 mg/ημέρα σε σχέση με γενετικούς και κλινικούς παράγοντες

	Αριθμός ασθενών (n)	-TRG% μέση τιμή±SD	Covariate TRG	<sup>1</sup> F-value	<sup>2</sup> p-value
II LDLR MUT V	21	10±28	116	0.10	0.74
	11	23±36	155		
NON E4 APOE E4	27	14±28	121	0.77	0.38
	5	17±45	178		
AA APOAIV 347 AT-TT	21	13±30	135	0.52	0.47
	11	17±30	120		
I/I APOAIV 360 I/2	29	15±30	132	0.2	0.9
	3	11±43	108		
B1B1 CETP B1B2 B2B2	13	7±34	120	0.35	0.71
	11	17±21	123		
	8	24±37	155		
όχι κάπνισμα ναι	25	11±32	119	0.32	0.57
	7	29±21	168		
Γ φύλο Α	21	10±32	114	0.14	0.70
	11	24±26	159		

ANCOVA: <sup>1</sup>F-value, <sup>2</sup>p-value





Πίνακας 12: Πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων όσον αφορά τη μείωση των TRG μετά τη χορήγηση του φαρμάκου

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	beta	p-value
ΤΥΠΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΤΟΥ LDLR (ΤΥΠΟΣ II vs IV)	0.21	0.27
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΡΟ Ε (NON Ε4 vs Ε4)	-0.17	0.38
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΡΟ ΑΙV 347 (ΑΑ vs ΑΤ/ΤΤ)	0.16	0.52
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΡΟ ΑΙV 360 (1/1 vs 1/2)	0.04	0.80
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ CΕΤΡ (B1B1 vs B1B2 vs B2B2)	-0.09	0.68
ΦΥΛΟ (Γ vs Α)	-0.01	0.94
ΗΛΙΚΙΑ (ΕΤΗ)	-0.36	0.08
ΚΑΠΝΙΣΜΑ ( ΟΧΙ vs ΝΑΙ)	0.10	0.58
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.30	0.15

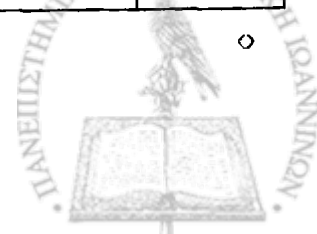
Multiple linear regression analysis: <sup>1</sup> beta, <sup>2</sup>p-value

Όπως ήδη αναφέρθηκε, 7 ασθενείς που πληρούσαν τα κριτήρια για τη διάγνωση της ετερόζυγης FH ήταν ομοζυγώτες για τη μετάλλαξη G1775A. Η χορήγηση της μέγιστης ημερήσιας δόσης της ατορβαστατίνης (80 mg) σε αυτούς τους ασθενείς είχε ως αποτέλεσμα μια σημαντική μείωση της LDL-C κατά 35% και των TRG κατά 31%. Η επίδραση του φαρμάκου στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών με ομόζυγη FH φαίνεται στον πίνακα 13.

Πίνακας 13: Επίδραση της ατορβαστατίνης (80 mg/ημέρα) στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών με ομόζυγη FH (n=7)

Παράμετρος	Αρχική τιμή (Μέση τιμή±SD)	Τελική τιμή (Μέση τιμή±SD)	% μείωση (Μέση τιμή±SD)	p-value
TCHOL (mg/dl)	440±80	282±63	32±12	0.00
TRG (mg/dl)	147±89	100±58	31±70	0.00
HDL-C (mg/dl)	39±8	38±9	1±19	NS
LDL-C (mg/dl)	354±75	228±59	35±12	0.00
Lp(a) (mg/dl)	16(11-70)	18(11-56)	2±60	NS

NS: όχι σημαντική διαφορά



## 2.5 Συζήτηση

Στη μελέτη αυτή περιγράφονται οι μεταλλάξεις του LDLR που προκαλούν FH στη Βορειοδυτική Ελλάδα και η γεωγραφική τους κατανομή.

Η συχνότερη μετάλλαξη που προκαλεί FH στη Βορειοδυτική Ελλάδα είναι η μετάλλαξη G1775A, η οποία χαρακτηρίζεται ως μετάλλαξη τύπου V. Στις μεταλλάξεις τύπου V συντίθενται LDLR που ανιχνεύονται στην επιφάνεια του κυττάρου, αναγνωρίζουν την apo B100, επιτυγχάνουν την ενδοκύττωση του συμπλέγματος υποδοχέα-LDL, αλλά αποτυγχάνουν να απελευθερώσουν την LDL στο κυτταρόπλασμα και έτσι οι υποδοχείς αυτοί δεν ανακυκλώνονται στην κυτταρική μεμβράνη. Υπάρχουν αρκετά δεδομένα τα οποία δείχνουν ότι οι ασθενείς που έχουν μεταλλάξεις τύπου V έχουν χαμηλότερα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης και επομένως ηπιότερη κλινική έκφραση της νόσου σε σύγκριση με ασθενείς που έχουν άλλου τύπου μεταλλάξεις (Hobbs et al. 1990, 1992). Πράγματι, οι ασθενείς με ετερόζυγη FH που έχουν τη μετάλλαξη G1775A είχαν χαμηλότερα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης σε σύγκριση με τους ασθενείς με άλλου τύπου μεταλλάξεις αν και δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 2 ομάδων (πίνακας 4Γ, σελίδα 78). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς με ομόζυγη FH που έχουν τη μετάλλαξη G1775A πληρούσαν τα κριτήρια για τη διάγνωση της ετερόζυγης FH. Πράγματι, οι ασθενείς αυτοί είχαν σχετικά χαμηλές τιμές ολικής και LDL χοληστερόλης σε σύγκριση με αυτές που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (πίνακας 14).

Πίνακας 14: Επίπεδα ολικής χοληστερόλης και Lp(a) (mg/dl) σε ασθενείς με ομόζυγη FH

	Ασθενείς με μετάλλαξη τύπου V (G1775A)	Τιμές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Guo et al, 1991)
Lp(a) Ενδιάμεση τιμή (εύρος τιμών)	16.15 (10.7-70)	39 (21-116)
T CHOL μέση τιμή ±σταθερή απόκλιση	440 ±80	799 ±205



Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι οι ασθενείς με FH έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις της Lp(a) σε σύγκριση με νορμολιπιδαιμικά άτομα της ίδιας ηλικίας και φύλου (Kraft et al. 2000, Guo et al. 1991). Πράγματι, σε μία παλαιότερη μελέτη της δικής μας ερευνητικής ομάδας οι ασθενείς με ετερόζυγη FH είχαν υψηλότερες τιμές της Lp(a) σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα (Elisaf et al. 1996). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας επιβεβαίωσαν αυτό το εύρημα, αφού η ενδιάμεση τιμή της Lp(a) στον ολικό πληθυσμό της μελέτης ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σύγκριση με τη συγκέντρωση της Lp(a) που παρατηρείται στο γενικό πληθυσμό [ενδιάμεση τιμή (εύρος τιμών): 11.5 (0.8-36.7) vs 6.9 (0.8-24) mg/dl,  $p < 0.01$ ]. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι σε ασθενείς με FH ο καταβολισμός της Lp(a) μειώνεται ενώ αυξάνεται η ηπατική παραγωγή της σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα (Hofmann et al. 1990, Elisaf et al. 1996). Όπως φαίνεται στον πίνακα 5 (σελίδα 79), οι ομοζυγώτες που έχουν τη μετάλλαξη G1775A είχαν υψηλότερες τιμές της Lp(a) σε σύγκριση με τους ετεροζυγώτες που έχουν την ίδια μετάλλαξη. Ωστόσο, οι ομοζυγώτες είχαν χαμηλότερες τιμές της Lp(a) σε σύγκριση με ομοζυγώτες που έχουν άλλου τύπου μεταλλάξεις (πίνακας 14, σελίδα 89) (Kraft et al. 2000, Guo et al. 1991). Έτσι, φαίνεται ότι ο τύπος της μετάλλαξης του γονιδίου του LDLR μπορεί να επηρεάσει όχι μόνο τις κλασσικές λιπιδαιμικές παραμέτρους, αλλά και τα επίπεδα της Lp(a) (Miltiadous et al. 2001).

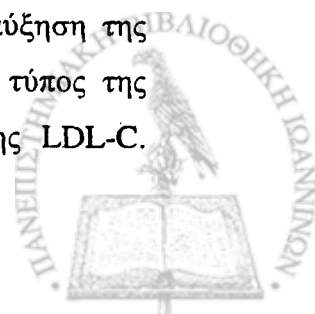
Ένα ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης μας ήταν η σαφής γεωγραφική κατανομή των συχνότερων μεταλλάξεων που προκαλούν τη νόσο στη Βορειοδυτική Ελλάδα (σχήμα 21, σελίδα 76). Αυτή η γεωγραφική κατανομή θα βοηθήσει σημαντικά στη δημιουργία προγραμμάτων ελέγχου του πληθυσμού σε άτομα υψηλού κινδύνου για την έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία της νόσου. Πράγματι, η γνώση της υπεύθυνης μετάλλαξης θα επιτρέψει τη γρήγορη γενετική διάγνωση νεότερων σε ηλικία μελών της οικογένειας και την έγκαιρη έναρξη επιθετικής υπολιπιδαιμικής αγωγής. Επιπλέον, η καταγωγή νέων ασθενών με την κλινική διάγνωση της FH καθιστά δυνατή την πιθανολόγηση της υπεύθυνης μετάλλαξης. Έτσι ο γενετικός έλεγχος μπορεί να γίνει πολύ γρήγορα και με μικρότερο κόστος (Miltiadous et al. 2001).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μεταλλάξεις A902G στο εξόνιο 6, C681G και G523A στο εξόνιο 4, το έλλειμμα 6 βάσεων στη θέση 137 στο εξόνιο 6, το έλλειμμα της βάσεως γουανίνης (G) στη θέση 6 στο εξόνιο 1 και το έλλειμμα της βάσεως θυμίνης (T) στη θέση 2092 στο εξόνιο 14 που έχουν προηγουμένα περιγραφεί σε Έλληνες ασθενείς (<http://www.ucl.ac.uk/fh>) δεν έχουν εντοπιστεί στο δικό μας πληθυσμό.

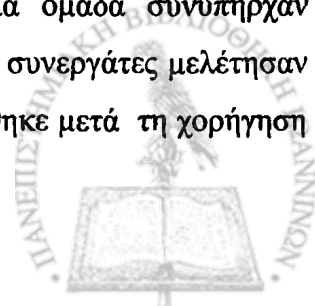


Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων των ασθενών με ετερόζυγη FH μεταξύ των διαφορετικών μεταλλάξεων του LDLR. Το εύρημα αυτό συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι το λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών με FH εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό και από άλλους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Πράγματι στη μελέτη μας παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση του BMI με τα επίπεδα των TRG. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της HDL-C συσχετίζονταν με τα TRG (αρνητική συσχέτιση) αλλά και με τους πολυμορφισμούς της apo E. Συγκεκριμένα, οι ετεροζυγώτες που είχαν το αλληλίο E4 της apo E είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα HDL-C σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν τα αλληλία E2 και E3 ( $39.9 \pm 8.6$  vs  $49.3 \pm 13$  mg/dl,  $p=0.03$ ) (Miltiadiou et al. 2002). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα σε ασθενείς με FH όσον αφορά τη συσχέτιση των πολυμορφισμών της apo E με τα επίπεδα της HDL-C (Betard et al. 1996, James et al. 1993). Έχει προηγούμενα διατυπωθεί η άποψη ότι σε ασθενείς με FH οι HDL περιέχουν μεγάλη ποσότητα apo E στο μόριο τους (Schaefer et al. 1992). Επίσης, οι Frenais και συνεργάτες και οι Schaefer και συνεργάτες έδειξαν ότι πιθανά οι πλούσιες σε apo E HDL μεταβολίζονται διαμέσου των apo E υποδοχέων ή των λειτουργικών LDLR σε ασθενείς με ετερόζυγη FH (Frenais et al. 1999, Schaefer et al. 1992). Η apo E4, όπως ήδη αναφέρθηκε, εμφανίζει αυξημένη χημική συγγένεια με τους κυτταρικούς υποδοχείς σε σύγκριση με τις apo E2 και apo E3. Έτσι, τα χαμηλότερα επίπεδα HDL-C στους ασθενείς που έχουν το αλληλίο E4 πιθανά οφείλονται σε αύξηση του καταβολισμού των πλούσιων σε apo E HDL διαμέσου των κυτταρικών υποδοχέων (LDLR και apo E υποδοχέων) σε σύγκριση με τους ασθενείς που έχουν τα αλληλία E2 και E3 (Miltiadiou et al. 2002).

Ο στόχος της υπολιπιδαιμικής αγωγής σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία είναι η μείωση των επιπέδων της LDL-C. Έτσι, μελετήσαμε την επίδραση περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων στη μείωση της LDL-C που παρατηρείται μετά τη χορήγηση υπολιπιδαιμικής αγωγής και συγκεκριμένα μετά τη χορήγηση ατορβαστατίνης 20 mg ημερησίως σε 32 ασθενείς με FH. Η ποσοστιαία μείωση των επιπέδων της LDL-C συσχετίζονταν με τα αρχικά επίπεδα της LDL-C. Πράγματι, οι ασθενείς με τα υψηλότερα επίπεδα LDL-C οφελούνται περισσότερο από τη χορήγηση του φαρμάκου. Το εύρημα αυτό μπορεί να οφείλεται στο φαινόμενο της τάσης παλινδρόμησης προς τη μέση τιμή (regression to the mean) ή και στο γεγονός ότι τα άτομα με τις υψηλότερες τιμές LDL-C έχουν κατά κανόνα μεγαλύτερη ανεπάρκεια των LDLR και επομένως μπορεί να εμφανίσουν και μεγαλύτερη αύξηση της ενεργότητας αυτών των υποδοχέων μετά τη χορήγηση στατινών. Επιπλέον, ο τύπος της μετάλλαξης του LDLR συσχετίζονταν επίσης με την ποσοστιαία μείωση της LDL-C.



Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με τη μετάλλαξη G1775A (μετάλλαξη τύπου V) εμφάνισαν μεγαλύτερη μείωση της LDL-C μετά από 12 εβδομάδες χορήγησης της ατορβαστατίνης σε σύγκριση με τους ασθενείς με τις μεταλλάξεις G1646A και C858A (μεταλλάξεις τύπου II) (49% vs 39%,  $p=0.00$ ), παρά το γεγονός ότι οι ασθενείς με τη μετάλλαξη G1775A είχαν σχετικά χαμηλότερα επίπεδα LDL-C πριν από την έναρξη της αγωγής ( $297\pm 75$  vs  $254\pm 33$  mg/dl). Τα δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά την επίδραση των μεταλλάξεων του LDLR στις μεταβολές των λιπιδαιμικών παραμέτρων που παρατηρούνται μετά τη χορήγηση στατινών είναι αντικρουόμενα. Οι μελέτες που έγιναν στο παρελθόν αφορούσαν τη σύγκριση μεταξύ 2 μεγάλων ομάδων μεταλλάξεων του LDLR. Τη μια ομάδα αποτελούσαν οι μεταλλάξεις τύπου I και II στις οποίες οι υποδοχείς δεν παράγονται ή δεν μεταφέρονται στην επιφάνεια των κυττάρων (null alleles ή transport-defective mutations) και την άλλη ομάδα αποτελούσαν οι μεταλλάξεις τύπου III-V, στις οποίες οι υποδοχείς διατηρούσαν κάποιου βαθμού λειτουργικότητα (binding-defective alleles, internalization-defective alleles και recycle-defective alleles). Παράδειγμα αποτελεί μία πρόσφατη μελέτη που έδειξε ότι οι ασθενείς που είχαν μεταλλάξεις τύπου I εμφάνισαν μικρότερη μείωση της LDL-C μετά τη χορήγηση 20 mg σιμβαστατίνης ημερησίως σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν μεταλλάξεις τύπου II-V (Chaves et al. 2001). Αντίθετα, οι Sijbrands και συνεργάτες δεν παρατήρησαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τη μείωση της LDL-C μετά τη χορήγηση σιμβαστατίνης μεταξύ ασθενών που είχαν μεταλλάξεις τύπου I και ασθενών με άλλου τύπου μεταλλάξεις (μεταλλάξεις τύπου II-V) σε ασθενείς με ετερόζυγη FH (Sijbrands et al. 1998). Οι Sun και συνεργάτες μελέτησαν την επίδραση των μεταλλάξεων του LDLR στην ανταπόκριση των λιπιδαιμικών παραμέτρων μετά τη χορήγηση συνδυασμού σιμβαστατίνης (40 mg/ημέρα) με κολεστιπόλη ή χολεστυραμίνη (20 g ή 16 g ημερησίως, αντίστοιχα) σε 23 ασθενείς με ετερόζυγη FH. Τη μια ομάδα αποτέλεσαν 12 ασθενείς με μεταλλάξεις που δεν παράγουν LDLR, τη δεύτερη ομάδα αποτέλεσαν 6 ασθενείς με μεταλλάξεις που παράγουν υποδοχείς με κάποιου βαθμού λειτουργικότητα, ενώ την τρίτη ομάδα αποτέλεσαν 5 ασθενείς με μεταλλάξεις στα εξόνια 7-14 του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR. Οι πιο πάνω συγγραφείς έδειξαν ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά όσον αφορά τη μείωση της LDL-C μετά τη χορήγηση αυτού του συνδυασμού υπολιπιδαιμικών φαρμάκων μεταξύ των 3 ομάδων. Πρέπει να αναφερθεί ότι οι ομάδες που μελετήθηκαν στην πιο πάνω μελέτη δεν αποτελούνταν από μεταλλάξεις του ίδιου τύπου, αφού στην ίδια ομάδα συνυπήρχαν διαφορετικού τύπου μεταλλάξεις (Sun et al. 1998). Οι Leitersdorf και συνεργάτες μελέτησαν τη μεταβολή των τιμών των λιπιδαιμικών παραμέτρων που παρατηρήθηκε μετά τη χορήγηση



φλουβαστατίνης (40 mg/ημέρα) σε ασθενείς με ετερόζυγη FH που είχαν 3 διαφορετικές μεταλλάξεις, οι οποίες όμως ανήκουν στον ίδιο τύπο μεταλλάξεων του LDLR (μεταλλάξεις τύπου II). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι ασθενείς που είχαν την μετάλλαξη C2043A εμφάνισαν μεγαλύτερη μείωση της LDL-C μετά τη χορήγηση του φαρμάκου σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν τη μετάλλαξη G502C και το έλλειμα τριών βάσεων (GGT) στη θέση 652 στο εξόνιο 4 του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR. Στην πιο πάνω μελέτη αναφέρεται ότι η μετάλλαξη C2043A, αν και κατατάσσεται στις μεταλλάξεις τύπου II, συμπεριφέρεται ως μετάλλαξη τύπου I. Οι συγγραφείς διατύπωσαν την άποψη ότι η παρουσία μη λειτουργικών LDLR στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων πιθανά να εμποδίζει τη μεταφορά και τη λειτουργία των φυσιολογικών υποδοχέων (υποδοχέων που παράγονται από το φυσιολογικό γονίδιο) σε ασθενείς με ετερόζυγη FH. Έτσι, στις μεταλλάξεις τύπου II η λειτουργία των φυσιολογικών υποδοχέων παρεμποδίζεται από την παρουσία των μη λειτουργικών υποδοχέων. Αντίθετα, στις μεταλλάξεις τύπου I οι LDLR δεν παράγονται με αποτέλεσμα να μην παρεμποδίζεται η λειτουργία των φυσιολογικών υποδοχέων. Έτσι, η μείωση της LDL-C μετά τη χορήγηση του φαρμάκου είναι μεγαλύτερη σε ασθενείς με μεταλλάξεις τύπου I, στους οποίους οι μισοί υποδοχείς είναι λειτουργικοί, σε σύγκριση με τους ασθενείς με μεταλλάξεις τύπου II, στους οποίους η παρουσία των παθολογικών υποδοχέων εμποδίζει τη μεταφορά στην κυτταρική μεμβράνη και τη λειτουργία των φυσιολογικών υποδοχέων. Αξίζει να αναφερθεί ότι στην πιο πάνω μελέτη δεν ελήφθησαν υπόψη άλλοι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανταπόκριση των λιπιδαιμικών παραγόντων μετά τη χορήγηση στατινών σε ασθενείς με FH (Leitersdorf et al. 1993).

Οι Couture και συνεργάτες έδειξαν ότι η χορήγηση σιμβαστατίνης 20 mg/ημέρα σε παιδιά με ετερόζυγη FH είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της LDL-C (Couture et al. 1998). Η μείωση της LDL-C ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στους ασθενείς που είχαν την μετάλλαξη C646Y (κατατάσσεται ως μετάλλαξη τύπου II αλλά συμπεριφέρεται ως μετάλλαξη τύπου I) και σε αυτούς που είχαν ένα έλλειμμα 15 βάσεων στον εναρκτή και στο εξόνιο 1 του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR (μετάλλαξη τύπου I) σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν τη μετάλλαξη W66G (μετάλλαξη τύπου III). Το εύρημα αυτό παρέμεινε σημαντικό μετά από διόρθωση και για άλλους παράγοντες που πιθανά επηρεάζουν την ανταπόκριση των λιπιδαιμικών παραγόντων μετά τη χορήγηση στατινών σε ασθενείς με FH (πολυμορφισμοί της apo E, BMI, αρχικά επίπεδα της LDL-C). Οι συγγραφείς ερμήνευσαν τα ευρήματα τους όπως ακριβώς και οι Leitersdorf και συνεργάτες, ότι δηλαδή η παρουσία των παθολογικών

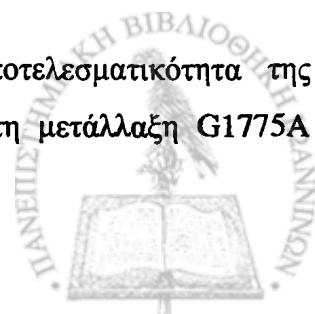


υποδοχέων που παρατηρείται στις μεταλλάξεις τύπου III παρεμποδίζει τη μεταφορά και τη λειτουργία των φυσιολογικών υποδοχέων. Τέλος, οι Jeenah και συνεργάτες έδειξαν ότι η μείωση της LDL-C που παρατηρήθηκε μετά τη χορήγηση σιμβαστατίνης 40 mg/ημέρα σε ασθενείς με ετερόζυγη FH ήταν μεγαλύτερη σε ασθενείς με τη μετάλλαξη G1285A (FH2) (μετάλλαξη τύπου V) σε σύγκριση με τους ασθενείς με τη μετάλλαξη C681G (FH1) (μετάλλαξη τύπου II). Οι πιο πάνω συγγραφείς δεν αναφέρονται στο διαφορετικό τύπο των 2 μεταλλάξεων (FH1 και FH2) για να εξηγήσουν τα αποτελέσματα της μελέτης τους. Αντίθετα, υποστήριξαν την άποψη ότι πολλαπλοί μηχανισμοί καθορίζουν την ανταπόκριση στη χορήγηση στατινών σε ασθενείς με ετερόζυγη FH. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, σε ασθενείς με FH η αλληλεπίδραση των φυσιολογικών και των παθολογικών υποδοχέων καθορίζει τη λειτουργικότητα των υποδοχέων και πιθανά το βαθμό μείωσης της LDL-C μετά τη χορήγηση της υπολιπιδαιμικής αγωγής (Jeenah et al. 1993).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι ο τύπος της μετάλλαξης του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR επηρεάζει τη μείωση της LDL-C σε ασθενείς με ετερόζυγη FH. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς που έχουν τη μετάλλαξη G1775A (μετάλλαξη τύπου V) εμφάνισαν μεγαλύτερη μείωση της LDL-C μετά τη χορήγηση ατορβαστατίνης 20 mg ημερησίως σε σύγκριση με τους ασθενείς που έχουν τις μεταλλάξεις G1646A και C858A (μεταλλάξεις τύπου II). Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι μεταλλάξεις τύπου V παράγουν λειτουργικούς υποδοχείς, οι οποίοι δεσμεύουν και μεταφέρουν τις LDL στο εσωτερικό των ηπατοκυττάρων αλλά αποτυγχάνουν να ανακυκλωθούν στη κυτταρική μεμβράνη. Αντίθετα, στις μεταλλάξεις τύπου II οι υποδοχείς δεν μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη. Έτσι, η μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της χοληστερόλης που παρατηρείται μετά τη χορήγηση στατινών σε ασθενείς που έχουν μεταλλάξεις τύπου V συνοδεύεται από τη μετακίνηση λειτουργικών υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη των ηπατοκυττάρων με αποτέλεσμα μεγαλύτερη μείωση της LDL-C σε σύγκριση με τους ασθενείς που έχουν μεταλλάξεις τύπου II.

Έτσι, τα αντικρουόμενα αποτελέσματα στη διεθνή βιβλιογραφία που αναφέρονται στις μεταβολές των τιμών των λιπιδαιμικών παραμέτρων μετά τη χορήγηση στατινών σε ασθενείς με ετερόζυγη FH σε σχέση με τον τύπο των μεταλλάξεων του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR μπορεί να οφείλονται στην ανομοιογένεια των πληθυσμών που μελετήθηκαν όσον αφορά τους τύπους των μεταλλάξεων του LDLR.

Ένα επίσης ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης μας ήταν η αποτελεσματικότητα της φαρμακευτικής αγωγής σε ασθενείς με ομόζυγη FH που έχουν τη μετάλλαξη G1775A



(μετάλλαξη τύπου V). Πράγματι, η χορήγηση υψηλών δόσεων ατορβαστατίνης (80 mg/ημέρα) στους ομοζυγώτες που έχουν την πιο πάνω μετάλλαξη είχε ως αποτέλεσμα μια σημαντική κατά 35% μείωση της LDL-C (πίνακας 13, σελίδα 88). Αντίθετα, τα δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία συγκλίνουν στην άποψη ότι η υπολιπιδαιμική αγωγή δεν είναι αποτελεσματική στους περισσότερους ασθενείς με ομόζυγη FH. Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη ότι ασθενείς με μεταλλάξεις τύπου V εμφανίζουν σημαντική μείωση της LDL-C, αφού αυτοί οι υποδοχείς, όπως ήδη αναφέρθηκε, δεσμεύουν και μεταφέρουν τις LDL στο εσωτερικό των ηπατοκυττάρων αλλά αποτυγχάνουν να ανακυκλωθούν στη κυτταρική μεμβράνη. Επίσης, η χορήγηση στατινών πιθανά αυξάνει την ανακύκλωση των LDLR στην κυτταρική μεμβράνη. Έτσι, η χορήγηση των στατινών προκαλεί σημαντική μείωση των επιπέδων της LDL-C σε ασθενείς με ετερόζυγη και ομόζυγη FH που έχουν μεταλλάξεις τύπου V (Tsimihodimos et al. 2000).





### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην μελέτη αυτή:

- 1) Περιγράφονται για πρώτη φορά οι μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDL υποδοχέα (LDLR), οι οποίες προκαλούν οικογενή υπερχοληστερολαιμία (FH) στη Βορειοδυτική Ελλάδα. Από τις 7 υπεύθυνες μεταλλάξεις, η μετάλλαξη T1352C περιγράφεται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία.
- 2) Περιγράφεται η γεωγραφική κατανομή των συχνότερων μεταλλάξεων στις διάφορες περιοχές της Βορειοδυτικής Ελλάδας. Η μετάλλαξη G1775A αποτελεί μια θεμελιώδη μετάλλαξη (founder effect) και ανιχνεύεται στην ορεινή περιοχή των Τζουμέρκων. Το γεγονός αυτό εξηγεί το σχετικά μεγάλο αριθμό ασθενών με ομόζυγη FH στη Βορειοδυτική Ελλάδα.
- 3) Συσχετίζεται το λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών με ετερόζυγη FH με τις υπεύθυνες μεταλλάξεις του LDLR, καθώς και με άλλους γενετικούς [πολυμορφισμοί της απολιποπρωτεΐνης (apo) E, της apo AIV και της CETP] και περιβαλλοντικούς παράγοντες (ηλικία, φύλο, δείκτης σωματικής μάζας και καπνιστικές συνήθειες). Πρέπει να επισημανθεί ότι δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων των ασθενών μεταξύ των διαφορετικών μεταλλάξεων του LDLR. Αντίθετα, οι ασθενείς που είχαν το αλληλίο E4 της apo E εμφάνιζαν χαμηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης (HDL-C) σε σύγκριση με τους ασθενείς που έχουν τα αλληλία E2 και E3. Επιπλέον, τα επίπεδα της HDL-C συσχετίζονταν αρνητικά με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων (TRG). Τέλος, ο δείκτης σωματικής μάζας (BMI) των ασθενών συσχετίζονταν αρνητικά με τα επίπεδα των TRG.
- 4) Οι ομοζυγώτες για τη μετάλλαξη G1775A (μετάλλαξη τύπου V) είχαν χαμηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης (TCHOL), LDL χοληστερόλης (LDL-C) και λιποπρωτεΐνης (a) [Lp(a)] σε σύγκριση με τις τιμές που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία. Έτσι, ο τύπος της μετάλλαξης του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDLR επηρεάζει τόσο τα επίπεδα των κλασσικών λιπιδαιμικών παραμέτρων, όσο και τα επίπεδα της Lp(a) σε ασθενείς με ομόζυγη FH. Επίσης, η χορήγηση υψηλών δόσεων στατινών (ατορβαστατίνη 80 mg/ημέρα) σε αυτούς τους ασθενείς έδειξε ότι η υπολιπιδαιμική αγωγή είναι αποτελεσματική σε ορισμένους ασθενείς με ομόζυγη FH και κυρίως σε αυτούς που έχουν μεταλλάξεις τύπου V.
- 5) Η μείωση της LDL-C σε ασθενείς με ετερόζυγη FH μετά τη χορήγηση στατινών εξαρτάται από τα αρχικά επίπεδα της LDL-C και από τον τύπο της μετάλλαξης του LDLR. Οι ασθενείς με τα υψηλότερα αρχικά επίπεδα LDL-C εμφάνισαν μεγαλύτερη ποσοστιαία μείωση της LDL-C μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Επιπλέον, οι ασθενείς που είχαν τη μετάλλαξη



G1775A (μετάλλαξη τύπου V) εμφάνισαν μεγαλύτερη ποσοστιαία μείωση της LDL-C σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν τις μεταλλάξεις G1646A και C858A (μεταλλάξεις τύπου II).



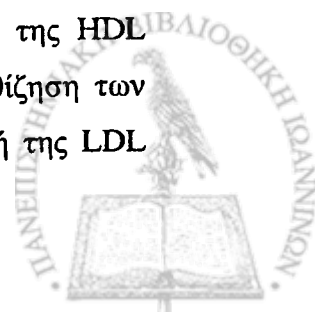
## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της διδακτορικής μου διατριβής ήταν η ανίχνευση των μεταλλάξεων που προκαλούν οικογενή υπερχοληστερολαιμία (FH) σε Έλληνες ασθενείς, η μελέτη του λιπιδαιμικού προφίλ αυτών των ασθενών σε σχέση με γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες και η συσχέτιση των μεταβολών των λιπιδαιμικών παραμέτρων που παρατηρούνται μετά τη χορήγηση ατορβαστατίνης με γενετικούς παράγοντες και κυρίως με τον τύπο των μεταλλάξεων του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDL υποδοχέα (LDLR).

Στη μελέτη συμμετείχαν 104 ασθενείς στους οποίους τέθηκε η κλινική διάγνωση της ετερόζυγης FH. Σε όλους τους ασθενείς ελήφθη αίμα μετά από 14 ώρες νηστεία για τον προσδιορισμό των λιπιδαιμικών παραμέτρων και την ανίχνευση των μεταλλάξεων του LDLR και των πολυμορφισμών της απολιποπρωτεΐνης (apo) E, της apo AIV και του ενζύμου μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CETP). Για την εκτίμηση της επίδρασης των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στη μεταβολή των τιμών των λιπιδαιμικών παραμέτρων που παρατηρείται μετά τη χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής μελετήθηκαν 32 ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε ατορβαστατίνη 20 mg/ημέρα. Στους ασθενείς αυτούς έγινε προσδιορισμός των λιπιδαιμικών παραμέτρων πριν και 12 εβδομάδες μετά την έναρξη της θεραπείας. Στους ασθενείς με ομόζυγη FH χορηγήθηκε η μέγιστη ημερήσια δόση ατορβαστατίνης (80mg).

Το γενετικό υλικό (DNA) απομονώθηκε από λευκά αιμοσφαίρια. Στη συνέχεια, με τη χρήση της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) έγινε πολλαπλασιασμός του εναρκτή (promotor) και όλων των εξονίων (exons) του γονιδίου του LDLR. Η ανάλυση των μεταλλάξεων έγινε είτε με ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης μετά τη δράση περιοριστικών ενζύμων είτε με την ανεύρεση της αλληλουχίας των βάσεων του γενετικού κώδικα με τη χρησιμοποίηση του γενετικού αναλυτή ABI PRISM 310. Η οικογενής ανεπάρκεια της apo B100 αποκλείστηκε με βάση το πρωτόκολλο των Tybjaerg- Hansen και συνεργατών. Για την ανεύρεση των πολυμορφισμών της apo E χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Tybjaerg και συνεργατών. Οι πολυμορφισμοί της CETP ανιχνεύθηκαν με βάση το πρωτόκολλο των Kuivenhoven και συνεργατών. Τέλος, για την ανεύρεση των πολυμορφισμών της apo AIV χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Μιλτιάδου και συνεργατών.

Η ολική χοληστερόλη (TCHOL) και τα τριγλυκερίδια (TRG) προσδιορίστηκαν με ενζυμικές μεθόδους με τη βοήθεια του αναλυτή OLYMPUS AU 580. Ο προσδιορισμός της HDL χοληστερόλης (HDL-C) έγινε ενζυμικά στο υπερκείμενο διάλυμα μετά από καθίζηση των άλλων λιποπρωτεϊνών με το αντιδραστήριο δεξτράνη θειϊκού μαγνησίου. Η τιμή της LDL



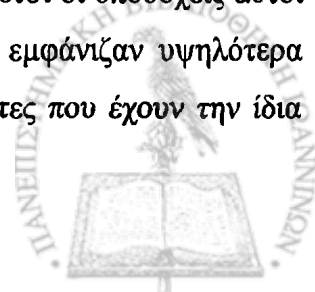
χοληστερόλης (LDL-C) υπολογίστηκε από τον τύπο του Friedewald. Ο προσδιορισμός των τιμών των απολιποπρωτεϊνών στο πλάσμα έγινε με ανοσονεφελομετρία σε νεφελόμετρο BN100. Τέλος, η λιποπρωτεΐνη (a) [Lp(a)] μετρήθηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο (sandwich-ELISA assay) με τη χρήση ενός μονοκλωνικού και ενός πολυκλωνικού αντισώματος.

Σε 94 ασθενείς (ποσοστό 90%) η κλινική διάγνωση επιβεβαιώθηκε σε γενετικό επίπεδο (87 ασθενείς ήταν ετεροζυγώτες και 7 ήταν ομοζυγώτες). Εκτός από τις μεταλλάξεις T517C, C858A, G1285A και G1646A που έχουν προηγούμενα περιγραφεί στην Ελλάδα, οι μεταλλάξεις T81G και G1775A περιγράφονται για πρώτη φορά σε Έλληνες ασθενείς. Επιπρόσθετα, η μετάλλαξη T1352C περιγράφεται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία. Η μετάλλαξη G1775A είναι η συχνότερη μετάλλαξη στην περιοχή της Βορειοδυτικής Ελλάδας με συχνότητα 33%. Όλοι οι ομοζυγώτες ασθενείς (n=7) έχουν τη μετάλλαξη G1775A, ένα εύρημα που συνηγορεί για την παρουσία θεμελιώδους μετάλλαξης (founder effect). Η δεύτερη σε συχνότητα μετάλλαξη είναι η μετάλλαξη G1646A στο εξόνιο 11 του γονιδίου του LDLR (26.1%). Η μετάλλαξη G1285A στο εξόνιο 9 και η μετάλλαξη C858A στο εξόνιο 6 έχουν συχνότητα 13.6% και 12.5%, αντίστοιχα.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν η σαφής γεωγραφική κατανομή των συχνότερων μεταλλάξεων, η οποία χρησιμεύει στην κατάρτιση προγραμμάτων ελέγχου του πληθυσμού της Βορειοδυτικής Ελλάδος που θα οδηγήσει στην έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία ασθενών με FH.

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων των ασθενών με ετερόζυγη FH μεταξύ των διαφορετικών μεταλλάξεων του LDLR. Αντίθετα, τα TRG συσχετιζόνταν με το δείκτη σωματικής μάζας (BMI). Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της HDL-C συσχετιζόνταν με τα TRG (αρνητική συσχέτιση), αλλά και με τους πολυμορφισμούς της apo E. Συγκεκριμένα, οι ετεροζυγώτες που είχαν το αλληλίο E4 της apo E είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα HDL-C σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν τα αλληλία E2 και E3 ( $39.9 \pm 8.6$  vs  $49.3 \pm 13$  mg/dl,  $p=0.03$ ).

Οι ασθενείς με ομόζυγη FH που έχουν τη μετάλλαξη G1775A (μετάλλαξη τύπου V) πληρούσαν τα κριτήρια για τη διάγνωση της ετερόζυγης FH. Στις μεταλλάξεις τύπου V συντίθενται LDLR που ανιχνεύονται στην επιφάνεια του κυττάρου, αναγνωρίζουν την apo B100, επιτυγχάνουν την ενδοκύττωση του συμπλέγματος υποδοχέα-LDL, αλλά αποτυγχάνουν να απελευθερώσουν την LDL στο κυτταρόπλασμα και έτσι οι υποδοχείς αυτοί δεν ανακυκλώνονται στην κυτταρική μεμβράνη. Οι ασθενείς αυτοί εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα TCHOL, LDL-C και Lp(a) σε σύγκριση με τους ετεροζυγώτες που έχουν την ίδια



μετάλλαξη ( $p < 0.05$  για όλες τις συγκρίσεις). Ωστόσο, οι ασθενείς αυτοί είχαν σχετικά χαμηλές τιμές TCHOL, LDL-C και Lp(a) σε σύγκριση με αυτές που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία σε ασθενείς με ομόζυγη FH. Έτσι, φαίνεται ότι ο τύπος της μετάλλαξης του γονιδίου του LDLR μπορεί να επηρεάσει όχι μόνο τις κλασσικές λιπιδαιμικές παραμέτρους, αλλά και τα επίπεδα της Lp(a).

Η χορήγηση ατορβαστατίνης 20 mg ημερησίως σε 32 ασθενείς με ετερόζυγη FH είχε ως αποτέλεσμα μείωση της LDL-C κατά 37%. Η μείωση αυτή συσχετιζόταν με τα αρχικά επίπεδα της LDL-C ( $r=0.34$ ,  $p=0.01$ ). Επιπλέον, οι ασθενείς που είχαν την μετάλλαξη G1775A (μετάλλαξη τύπου V) εμφάνισαν μεγαλύτερη ποσοστιαία μείωση της LDL-C σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν τις μεταλλάξεις G1646A και C858A (μεταλλάξεις τύπου II) ( $49 \pm 9$  vs  $34 \pm 9\%$ ,  $p=0.00$ ). Έτσι, η μείωση της LDL-C σε ασθενείς με ετερόζυγη FH μετά τη χορήγηση στατινών εξαρτάται από τα αρχικά επίπεδα της LDL-C και από τον τύπο της μετάλλαξης του LDLR.

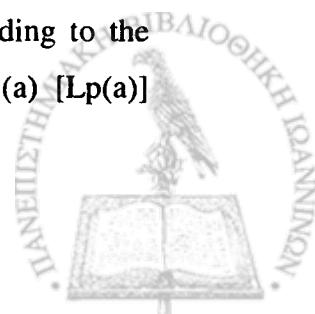
Η χορήγηση της μέγιστης ημερήσιας δόσης ατορβαστατίνης (80 mg) στους ασθενείς με ομόζυγη FH είχε ως αποτέλεσμα μία σημαντική μείωση της LDL-C κατά 35%. Έτσι φαίνεται ότι η υπολιπιδαιμική αγωγή είναι αποτελεσματική σε ορισμένους ασθενείς με ομόζυγη FH και κυρίως σε ασθενείς που έχουν μεταλλάξεις τύπου V.



**ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ****George Miltiadous M.D., Doctoral Thesis****‘Genetic and environmental factors affecting the response to statin therapy’****Summary**

The aim of this study was to identify and characterize the mutations of the LDL receptor (LDLR) gene causing familial hypercholesterolaemia (FH) in a group of patients originating from Northwestern Greece. In addition, we studied the effects of genetic and environmental factors on the patients' lipid profile and their response to statin therapy.

The study population consisted of 104 individuals from Northwestern Greece with a clinical diagnosis of heterozygous FH. In all cases blood samples were obtained after a 14-hour overnight fast for the genotyping analysis as well as for the determination of lipid parameters. DNA was extracted from the whole blood specimens and the polymerase chain reaction (PCR) was carried out using 50 ng DNA isolated from each individual specimen. Restriction isotyping was used for detecting previously described LDLR gene mutations. Automated sequencing was performed using the Applied Biosystems “Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” as instructed by the manufacturer (Applied Biosystems). The sequencing products were then separated by capillary electrophoresis using an ABI PRISM 310 Genetic Analyser. Sequencing Analysis and Sequencing Navigator software were used to analyse the collected data and compare with the published reference sequence of the LDLR gene. The Taq 1B polymorphism of the cholesterol ester transfer protein (CETP) gene and the apolipoprotein (apo) E polymorphisms were detected using previously reported protocols (Kuivenhoven et al. 1997, Hixson et al. 1990). The apo A-IV 360 and 347 genotyping were identified using a newly designed protocol (Miltiadous et al. 2002). Concentrations of total cholesterol (TCHOL) and triglycerides (TRG) were determined enzymatically on the Olympus AU 580 Clinical Chemistry Analyzer (Olympus Diagnostica, Hamburg, Germany). HDL cholesterol (HDL-C) was determined in the supernatant, after precipitation of the apo B-containing lipoproteins with dextran sulphate-Mg<sup>++</sup> (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA). LDL cholesterol (LDL-C) was calculated using the Friedewald formula. Apolipoproteins A1, B and E were measured with a Behring Nephelometer BN100, and reagents (antibodies and calibrators) from Date Behring Holding GmbH (Liederbach, Germany). The apo AI and B assays were calibrated according to the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) standards. Lipoprotein (a) [Lp(a)]



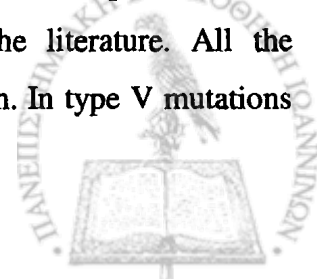
levels were determined by the enzyme immunoassay Macra Lp(a) (Trinity Biotech, Jamestown, NY, USA). The lower limit of detectability was 0.8 mg/dl.

Atorvastatin 20 mg/day was prescribed in a group of patients with molecularly defined heterozygous FH (n=32) and the lipid profile was re-examined after 12 weeks of therapy. Also, atorvastatin 80 mg/day was prescribed in the 7 homozygotes.

The clinical diagnosis was confirmed at DNA level in 94 patients (90%) (87 patients were heterozygotes and 7 homozygotes). In addition to the previously described LDLR gene mutations T517C, C858A, G1285A and G1646A, two known mutations (T81C, G1775A) were also detected in the Greek population for the first time. Furthermore, the mutation T1352C was described as a novel point mutation in a Greek family originating from Northwestern Greece. The G1775A mutation in exon 12 was the most frequent one (33%) and was responsible for all the homozygous patients in our area (n=7), indicating a founder effect. Twenty-six percent of the patients possessed the G1646A in exon 11. The frequencies of the G1285A (exon 9) and C858A (exon 6) mutations were 13.6% and 12.5%, respectively. Furthermore, a clear geographic distribution of the most common mutations was observed in our area. Thus, these data will favor the development of tailored information and screening programs in Northwestern Greece for the primary prevention of cardiovascular disease in FH patients.

The nature of the LDLR gene mutation did not significantly affect the lipid parameters among patients with molecularly defined FH. However, the apo E gene polymorphism significantly affected the HDL-C levels in patients with heterozygous FH. In fact, the presence of the allele E4 was associated with lower HDL-C levels compared with patients not carrying this allele ( $39.9 \pm 8.6$  vs  $49.3 \pm 13$  mg/dl,  $p=0.03$ ). Moreover, HDL-C levels were negatively associated with TRG levels in patients with heterozygous FH ( $r= -0.378$ ,  $p=0.00$ ). Finally, the body mass index (BMI) was positively associated with serum TRG levels ( $r=0.41$ ,  $p=0.01$ ). None of the other genetic (CETP and apo AIV 347 and 360 gene polymorphisms) or environmental (age, sex, smoking habit) factors affected the lipid profile in patients with molecularly defined heterozygous FH.

Homozygous FH patients showed significantly higher levels of total and LDL cholesterol, apo B and Lp(a) compared with heterozygous FH patients with the same mutation. However, total and LDL cholesterol as well as Lp(a) levels of our homozygous FH patients were substantially lower compared to those previously mentioned in the literature. All the homozygotes shared the G1775A mutation, which is a type V mutation. In type V mutations



the LDLR retains the ability to bind and internalise its ligand but fails to release it in the endosome and thus the receptor does not recycle to the cell surface. Patients with this type of mutation tend to have relatively low serum cholesterol levels and less severe clinical features compared to patients carrying other types of mutations, as it was the case in our patients. Our data suggest that the underlying genetic defect may affect not only the classic lipid profile of patients with homozygous FH but also Lp(a) levels. In addition, when atorvastatin (80 mg/day) was administered in these patients a pronounced decrease in LDL-C levels by 35% was observed. It is suggested that therapy with statins and especially with the most potent drugs of this type should be considered in patients with homozygous FH sharing a type V mutation of the LDLR gene.

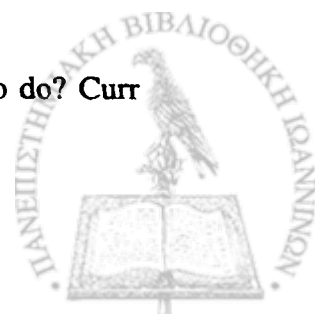
Moreover, our data point out that the type of the LDLR gene mutation also affects the response of heterozygous FH patients to statin therapy. In detail, heterozygotes sharing a type V mutation of the LDLR (G1775A) showed a higher percentage decrement in LDL-C after atorvastatin administration (20 mg/day) compared with patients sharing type II mutations (G1646A and C858A) ( $49\pm 9$  vs  $34\pm 9\%$ ,  $p=0.00$ ). None of the other gene polymorphisms or environmental factors affected the response to atorvastatin administration in patients with molecularly defined heterozygous FH.





**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- 1) Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996; 271:518-520
- 2) Agellon LB, Quinet EM, Gillette TG, Drayna DT, Brown ML, Tall AR. Organization of the human cholesteryl ester transfer protein gene. *Biochemistry* 1990; 29:1372-1376
- 3) Bagdade JD, Lane JT, Subbaiah PV, Otto ME, Ritter MC. Accelerated cholesteryl ester transfer in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1993; 104:69-77
- 4) Bagdade JD, Subbaiah PV, Ritter MC. Accelerated cholesteryl ester transfer in patients with insulin dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 1991; 21:161-167
- 5) Barter PJ, Hopkins CJ, Calvert GD. Transfers and exchanges of esterified cholesterol between plasma lipoproteins. *Biochem J* 1982; 208:1-7
- 6) Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK. The LDL-receptor-related protein, LPR, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 1989; 341:162-164
- 7) Berglund L, Wiklund O, Eggertsen G, Olofsson SO, Eriksson M, Linden T, Bondjers G, Angelin B. Apolipoprotein E phenotypes in familial hypercholesterolaemia: importance for expression of disease and response to therapy. *J Intern Med* 1993; 233:173-178
- 8) Bertolini S, Cantafora A, Averna M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotta L, Rolleri M, Langheim S, Ghisellini M, Rabbone I, Calandra S. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:41-52
- 9) Betard C, Kessling AM, Roy M, Davignon J. Influence of genetic variability in the nondeletion LDL-receptor allele on phenotypic variation in French-Canadian familial hypercholesterolemia heterozygotes sharing a 'null' LDL-receptor gene defect. *Atherosclerosis* 1996; 119:43-55
- 10) Bhattacharyya AK, Conner WE. B-sitosterolaemia and xanthomatosis. *J Clin Invest* 1974; 53:1033-1043
- 11) Black DM. Statins in children: what do we know and what do we need to do? *Curr Atheroscler Rep* 2001; 3(1):29-34



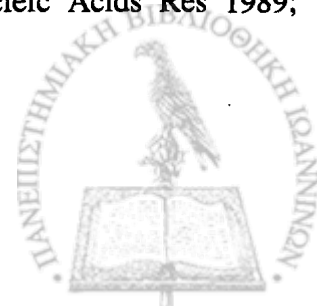
- 12) Bos CR, Shank SL, Snider. Role of clathrin-coated vesicles in glycoprotein transport from the cell surface to the golgi complex. *J Biol Chem* 1995; 270:665-671
- 13) Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest* 1985; 76(4):1501-1513
- 14) Brown BG, Zhao XQ, Sacco DE, Albers JJ. Lipid lowering and plaque regression: new insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation* 1993; 87:1781-1791
- 15) Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232:34-47
- 16) Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 1976; 191:150-154
- 17) Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 1981; 212:628-635
- 18) Chaves FJ, Real JT, Gargia-Gargia AB, Civera M, Armengod ME, Ascaso JF, Carmena R. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia in a South European outbreed population: influence of low density lipoprotein (LDL) receptor gene mutations on treatment response to simvastatin in total, LDL and high density lipoprotein cholesterol. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(10):4926-4932
- 19) Corella D, Saiz C, Guillen M, Portoles O, Mulet F, Gonzalez JL, Ordovas JM. Association of the TaqIB polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein gene with plasma lipid levels in a healthy Spanish population. *Atherosclerosis* 2000; 152:367-376
- 20) Couture P, Brun LD, Szots F, Lelievre M, Gaudet D, Despres JP, Simard J, Lupien PJ, Gagne C. Association of specific LDL receptor gene mutations with differential plasma lipoprotein response to simvastatin in young French Canadians with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1007-1012
- 21) Dallongeville J, Roy M, Leboeuf N, Xhignesse M, Davignon J, Lussier-Cacan S. Apolipoprotein E polymorphism association with lipoprotein profile in endogenous hypertriglyceridemia and familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 1991; 11(2):272-278



- 22) Das HK, McPherson J, Bruns GA, Karathanasis SK, Breslow JL. Isolation, characterization and mapping to chromosome 19 of human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem* 1985; 260(10):6240-6247
- 23) Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8:1-21
- 24) Davis CG, Goldstein JL, Sudhof TC, Anderson RGW, Russel DW, Brown MS. Acid-dependent ligand dissociation and recycling of the LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 1987; 326:760-765
- 25) Dawson PA, van der Westhuyzen DR, Sudhof TC, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-dependent repression of low density lipoprotein receptor promoter mediated by 16-base pair sequence adjacent to binding site for transcription factor Sp1. *J Biol Chem* 1988; 263:3372-3379
- 26) De Knijff P, Rosseneu M, Beisiegel U, de Keersgieter W, Frants RR, Havekes LM. Apolipoprotein A-IV polymorphism and its effect on plasma lipid and apolipoprotein concentrations. *J Lipid Res* 1988; 29:1621-1627
- 27) Defesche JC, van de Ree MA, Kastelein JJ, van Diermen DE, Janssens NW, van Doormaal JJ, Hayden MR. Detection of the  $pro_{347} \rightarrow leu$  mutation in the low density lipoprotein receptor and its relation to lipoprotein (a) levels in patients with familial hypercholesterolemia of Dutch ancestry from The Netherlands and Canada. *Clin Genet* 1992; 42:273-280
- 28) Drayna D, Lawn R. Multiple RFLPs at the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) locus. *Nucleic Acids Res* 1987; 11:4698
- 29) Dullaart RPF, Hoogenberg K, Dikkeschei BD, Van Tol A. Higher plasma lipids transfer protein activities and unfavorable lipoprotein changes in cigarette-smoking men. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1581-1585
- 30) Durrington PN. *Hyperlipidaemia: Diagnosis and treatment*, ed 2. Butterworth-Heinemann, Oxford, 1995, pp111-114
- 31) Dvorin E, Gorder NL, Benson DM, Gotto AM. Apolipoprotein A-IV, a determinant for binding and uptake of high density lipoproteins by rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1986; 261(33):15714-15718
- 32) Ehnholm C, Lukka M, Kuusi T, Nikkila E, Utermann G. Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations. *J Lipid Res* 1986; 27:227-235



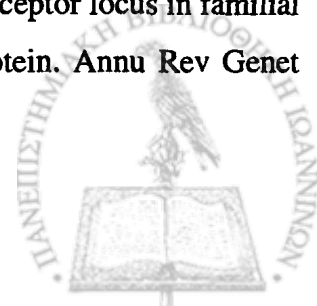
- 33) Ehnholm C, Tenkanen P, Knijff P, Havekes L, Rosseneu M, Menzel HJ, Tiret L. Genetic polymorphism of apolipoprotein A-IV in five different regions of Europe. Relations to plasma lipoproteins and to history of myocardial infarction: the EARS study. *Atherosclerosis* 1994; 107:229-238
- 34) Eichner JE, Kuller LH, Ferrel RE, Kamboh KI. Phenotypic effects of apolipoprotein structural variation on lipid profiles: apolipoprotein A-IV and quantitative lipid measures in the healthy woman study. *Genet Epidemiol* 1989; 6:493-499
- 35) Elchebly M, Porokhov B, Pulcini T, Berthezene F, Ponsin G. Alterations in composition and concentration of lipoproteins and elevated cholesteryl ester transfer in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Atherosclerosis* 1996; 123:93-101
- 36) Elisaf M, Bairaktari H, Siamopoulos CK. Lp(a) levels in Greek patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Intern J Cardiol* 1996; 53:314-316
- 37) Elshourbagy NA, Walker DW, Paik Y, Boguski MS, Freeman M, Gordon JI, Taylor JM. Structure and expression of the human apolipoprotein A-IV gene. *J Biol Chem* 1987; 262(17):7973-7981
- 38) Ferrieres J, Sing CF, Roy M, Davignon J, Lussier-Cacan S. Apolipoprotein E polymorphism and heterozygous familial hypercholesterolemia: sex-specific effects. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1553-1560
- 39) Fisher RM, Burke H, Nicaud V, Ehnholm C, Humphries SE. Effect of variation in the apo A-IV gene on body mass index and fasting and postprandial lipids in the European Atherosclerosis Research Study II. EARS Group. *J Lipid Res* 1999; 40(2):287-294
- 40) Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. Fat transport in lipoproteins-An integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med* 1967; 276:34-44, 94-103, 148-156, 215-226, 273-281
- 41) Freeman DJ, Griffin BA, Holmes AP, Lindsay GM, Gaffney D, Packard CJ, Shepherd J. Regulation of plasma HDL cholesterol and subfraction distribution by genetic and environmental factors: associations between the TaqI B RFLP in the CETP gene and smoking and obesity. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:336-344
- 42) Freeman DJ, Shepherd J, Packard CJ, Humphries SE, Gaffney D. A StuI RFLP at the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) locus. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:2880



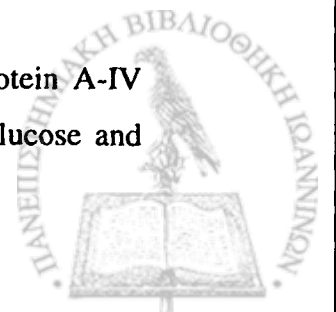
- 43) Frenais R, Ouguerram K, Maugeais C, Marchini JS, Benlian P, Bard JM, Magot T, Krempf M. Apolipoprotein A-I kinetics in heterozygous familial hypercholesterolemia: a stable isotope study. *J Lipid Res* 1999; 40:1506-1511
- 44) Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502
- 45) Friedlander Y, Leitersdorf E. Influence of apolipoprotein E genotypes on plasma lipid and lipoprotein concentrations: results from a segregation analysis in pedigrees with molecularly defined familial hypercholesterolemia. *Genet Epidemiol* 1996; 13(2):159-177
- 46) Fujimoto K, Fukagawa K, Sakata T, Tso Patrick. Suppression of food intake by apolipoprotein A-IV is mediated through the central nervous system in rats. *J Clin Invest* 1993; 91:1830-1833
- 47) Gerdes LU, Gerdes C, Kervinen K, Savolainen M, Klausen IC, Hansen PS, Kesaniemi YA, Faergeman O. The apolipoprotein epsilon 4 allele determines prognosis and the effect on prognosis of simvastatin in survivors of myocardial infraction: a substudy of the Scandinavian simvastatin survival study. *Circulation* 2000; 101:1366-1371
- 48) Gofman JW, Delalla O, Glazier F, Freeman NK, Lindgren FT, Nichols AV, Strisower B, Tamplin AR. The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary heart disease. *Plasma* 1954a; 2:413-484
- 49) Goldberg IJ, Mazlen RG, Rubenstein A, Gibson JC, Paterniti JR, Lindgren FT, Brown WV. Plasma lipoprotein abnormalities associated with acquired hepatic triglyceride lipase deficiency. *Metabolism* 1985; 34(9):832-835
- 50) Goldberg IJ, Scheraldi CA, Yacoub LK, Saxena U, Bisgaier CL. Lipoprotein Apo C-II activation of lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 1990; 265(8):4266-4272
- 51) Goldstein JL, Brown MS. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1974; 249:5153-5162
- 52) Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In: Sciver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *The metabolic basis of inherited disease*, ed 6. McGraw-Hill Book Co, New York, 1989, pp 1215-1250
- 53) Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. *J Clin Invest* 1973; 52:1533-1568



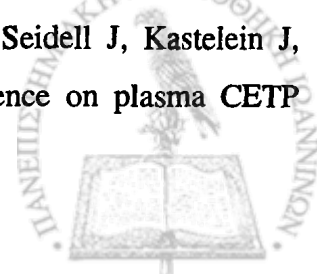
- 54) Green PHR, Glickman RM, Riley JW, Quinet E. Human Apolipoprotein A-IV. *J Clin Invest* 1980; 65:911-919
- 55) Gregg RE, Brewer HB. The role of apolipoprotein E and lipoprotein receptors in modulating the in vivo metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans. *Clin Chem* 1988; 34:28-32
- 56) Gregg RE, Zech LA, Schaefer EJ, Stark D, Wilson D, Brewer HB. Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans. *J Clin Invest* 1986; 78(3):815-821
- 57) Gudnason V, Sigurdsson G, Nissen H, Humphries SE. Common founder mutation in the LDL receptor gene causing familial hypercholesterolemia in the Icelandic population. *Hum Mutat* 1997; 10:36-44
- 58) Guo HC, Chapman MJ, Bruckert E, Farrioux JP, de Gennes JL. Lipoprotein Lp(a) in homozygous familial hypercholesterolemia: density profile, particle heterogeneity and apolipoprotein (a) phenotype. *Atherosclerosis* 1991; 86:69-83
- 59) Hanis CL, Douglas TC, Hewett-Emmet D. Apolipoprotein A-IV protein polymorphism: frequency and effects on lipids, lipoproteins and apolipoproteins among Mexican-Americans in Starr County, Texas. *Hum Genet* 1991; 86(3):359-362
- 60) Hannuksela ML, Liinamaa MJ, Kesaniemi YA, Savolainen MJ. Relation of polymorphisms in the cholesteryl ester transfer protein gene to transfer protein activity and plasma lipoprotein levels in alcohol drinkers. *Atherosclerosis* 1994; 110:35-44
- 61) Heath KE, Gudnason V, Humphries SE, Seed M. The type of mutation in the low density lipoprotein receptor gene influences the cholesterol-lowering response of the HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1999; 143:41-54
- 62) Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; 31:545-548
- 63) Hixson JE. Apolipoprotein E polymorphisms affect atherosclerosis in young males. Pathobiological determinants of atherosclerosis in young (PDAY) research group. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:1237-1244
- 64) Hobbs HH, Brown SM, Goldstein LJ. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mut* 1992; 1: 445-466
- 65) Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: Mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet* 1990; 24:133-170



- 66) Hofmann SL, Eaton D, Brown MS, McConathy WJH, Goldstein JL, Hammer RE. Overexpression of human low density lipoprotein receptors leads to accelerated catabolism of Lp(a) lipoprotein in transgenic mice. *J Clin Invest* 1990; 85:1542-1547
- 67) Huang Y, Liu XQ, Rall SC, Mahley RW. Apolipoprotein E2 reduces the low density lipoprotein level in transgenic mice by impairing lipoprotein lipase-mediated lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins. *J Biol Chem* 1998; 273:17483-17490
- 68) Huang Y, Liu XQ, Rall SC, Taylor JM, von Eckardstein A, Assmann G, Mahley RW. Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia. *J Biol Chem* 1998; 273:26388-26393
- 69) Hussain MM, Maxfield FR, Mas-Oliva J, Tabas I, Ji ZS, Innerarity TL, Mahley RW. Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2 macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 1991; 266:13936-13940
- 70) Ignatius MJ, Gebicke-Harter PJ, Skene JH, Schilling JW, Weisgraber KH, Mahley RW, Shooter EM. Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83(4):1125-1129
- 71) Innerarity TL, Friedlander EJ, Rall SC, Weisgraber KH, Mahley RW. The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Binding of apolipoprotein E fragments. *J Biol Chem* 1983; 258(20):12341-12347
- 72) Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, Bersot TP, Krauss RM, Vega GL, Grundy SM, Friedl W, Davignon J, McCarthy BJ. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 1990; 31:1337-1350
- 73) James RW, Boemi M, Giansanti R, Fumelli P, Pometta D. Underexpression of the apolipoprotein E4 isoform in an Italian population. *Arterioscler Thromb* 1993; 13(10):1456-1459
- 74) Jeenah M, September W, van Roggen FG, de Villiers W, Seftel H, Marais D. Influence of specific mutations at the LDL-receptor gene locus on the response to simvastatin therapy in Afrikaner patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1993; 98:51-58
- 75) Kamboh MI, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins: polymorphism of apolipoprotein A-IV. *Am J Hum Genet* 1987; 41(4):645-653
- 76) Kamboh MI, Hamman RF, Lyengar S, Aston CE, Ferrel RE. Apolipoprotein A-IV polymorphism and its role in determining variation in lipoprotein-lipid, glucose and

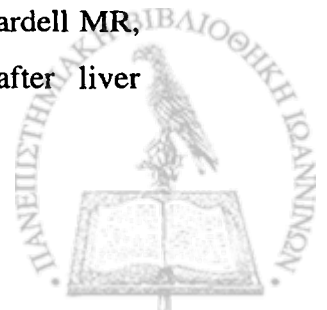


- insulin levels in normal and non-insulin-dependent individuals. *Atherosclerosis* 1991; 91:25-34
- 77) Kamboh MI, Williams ER, Law JC, Aston CE, Bunker CH, Ferrell RE, Pollitzer WS. Molecular basis of a unique African variant (A-IV 5) of human apolipoprotein A-IV and its significance in lipid metabolism. *Genet Epidemiol* 1992; 9(6):379-388
- 78) Karathanasis SK. Apolipoprotein multigene family: tandem organization of human apolipoprotein AI, CIII and AIV genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(19):6374-6378
- 79) Khachadurian AK. The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *Am J Med* 1964; 37:402-407
- 80) Koivisto UM, Viikari JS, Kontula K. Molecular characterization of minor gene rearrangements in Finnish patients with heterozygous familial hypercholesterolemia: Identification of two common missense mutations (Gly823→Asp and Leu380→His) and eight rare mutations of the LDL receptor gene. *Am J Hum Genet* 1995; 57:789-797
- 81) Kondo I, Berg K, Drayna D, Lawn R. DNA polymorphism at the locus for human cholesteryl ester transfer protein (CETP) is associated with high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein levels. *Clin Genet* 1989; 35:49-56
- 82) Koo C, Innerarity TL, Mahley RW. Obligatory role of cholesterol and apolipoprotein E in the formation of large cholesterol-enriched and receptor-active high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1985; 260(22):11934-11943
- 83) Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SH, Edelman ER, Krieger M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 1997; 387:414-417
- 84) Kraft HG, Lingenhel A, Raal FJ, Hohenegger M, Utermann G. Lipoprotein (a) in homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:522-528
- 85) Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH, de Knijff P, McPherson R, Bruschke AV, Lie KI, Kastelein JJ. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group. *N Engl J Med* 1998; 338(2):86-93
- 86) Kuivenhoven JA, Knijff P, Boer J, Smalheer H, Botma G, Seidell J, Kastelein J, Pritchard H. Heterogeneity at the CETP gene locus - Influence on plasma CETP

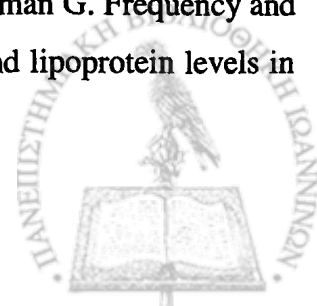




- concentration and HDL cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:560-568
- 87) Lalazar A, Weisgraber KH, Rall SC, Giladi H, Innerarity TL, Levanon AZ, Boyles JK, Amit B, Gorecki M, Mahley RW et al. Site-specific mutagenesis of human apolipoprotein E. Receptor binding activity of variants with single amino acid substitutions. *J Biol Chem* 1988; 263:3542-3545
- 88) Lambert M, Assouline L, Feoli-Fonseca JC, Brun N, Delvin EE, Levy E. Determinants of lipid levels variability in French-Canadian children with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:979-984
- 89) Landsberger D, Meiner V, Reshef A, Levy Y, van der Westhuyzen DR, Coetzee GA, Leitersdorf E. A nonsense mutation in the LDL receptor gene leads to familial hypercholesterolemia in the Druze sect. *Am J Hum Genet* 1992; 50:427-433
- 90) Lehrman MA, Schneider WJ, Brown MS, Davis CG, Elhammer A, Russell DW, Goldstein JL. The Lebanese allele at the low density lipoprotein receptor locus. *J Biol Chem* 1987; 262:401-410
- 91) Leitersdorf E, Eisenberg S, Eliav O, Friedlander Y, Berkman N, Dann FJ, Landsberger D, Sehayek E, Meiner V, Wurm M, Bard JM, Fruchart JC, Stein Y. Genetic determinants of responsiveness to the HMG-CoA reductase inhibitor in patients with molecularly defined heterozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1993; 87(suppl. III):35-44
- 92) Leitersdorf E, Friedlander Y, Bard JM, Fruchart JC, Eisenberg S, Stein Y. Diverse effect of ethnicity on plasma lipoprotein (a) levels in heterozygote patients with familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 1991; 32:1513-1519
- 93) Leitersdorf E, Reshef A, Meiner V, Dann EJ, Beigel Y, Graadt van Roggen F, van der Westhuyzen DR, Coetzee GA. A missense mutation in the low density lipoprotein receptor gene causes familial hypercholesterolemia in Sephardic Jews. *Hum Genet* 1993b; 91:141-147
- 94) Lingenhel A, Kraft HG, Kotze MJ, Peeters AV, Kronenberg F, Kruse R, Utermann G. Concentrations of the atherogenic Lp(a) are elevated in familial hypercholesterolaemia: a sibpair and family analysis. *Eur J Hum Genet* 1998; 6:50-60
- 95) Linton MF, Gish R, Hubl ST, Butler E, Esquivel C, Bry WI, Boyles JK, Wardell MR, Young SG. Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation. *J Clin Invest* 1991; 88:270-281



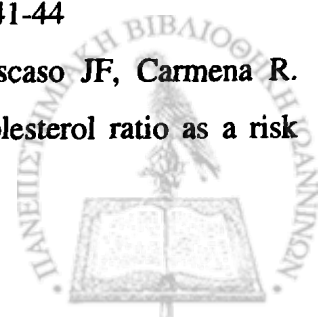
- 96) Lohse P, Kindt MR, Rader DJ, Brewer HBJ. Three genetic variants of human plasma apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem* 1991; 266:13513-13518
- 97) Lukka M, Metso J, Ehnholm C. Apolipoprotein A-IV polymorphism in the Finnish population: gene frequencies and description of a rare allele. *Hum Hered* 1988; 38(6):359-362
- 98) Mahley RW, Huang Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10:207-217
- 99) Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1984; 25(12):1277-1294
- 100) Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240:622-630
- 101) Mann CJ, Yen FT, Grant AM, Bihain BE. Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 1991; 88:2059-2066
- 102) Mbewu AD, Bhatnagar D, Durrington PN, Hunt L, Ishola M, Arrol S, Mackness M, Lockley P, Miller JP. Serum lipoprotein (a) in patients heterozygous for familial hypercholesterolemia, their relatives, and unrelated control populations. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:940-946
- 103) Meiner V, Landsberger D, Berkman N, Reshef A, Segal P, Seftel HC, van der Westhuyzen DR, Jeenash MS, Coetzee GA, Leitersdorf E. A common Lithuanian mutation causing familial hypercholesterolemia in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* 1991; 49:443-449
- 104) Menzel HJ, Boerwinkle E, Schrangl-Will S, Uterman G. Frequency and effects on lipid and lipoprotein levels. *Hum Genet* 1988; 79:368-372
- 105) Menzel HJ, Dieplinger H, Sandholzer C, Karadi I, Uterman G, Csaszar A. Apolipoprotein A-IV polymorphism in the Hungarian population: gene frequencies, effect on lipid levels and sequence of two new variants. *Hum Mut* 1995; 5:58-65
- 106) Menzel HJ, Kladetzky RG, Assmann G. Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1983; 3:310-315
- 107) Menzel HJ, Kovary PM, Assmann G. Apolipoprotein A-IV polymorphism in man. *Hum Genet* 1982; 62(4):349-352
- 108) Menzel HJ, Sigurdsson G, Boerwinkle E, Schrangl-Will S, Uterman G. Frequency and effect of human apolipoprotein A-IV polymorphism on lipid and lipoprotein levels in an Icelandic population. *Hum Genet* 1990; 84:563-567



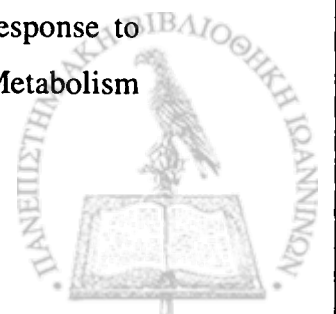
- 109) Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3):1215
- 110) Miltiadous G, Cariolou M, Elisaf M. Familial hypercholesterolaemia: Taking advantage of a founder effect for early diagnosis and treatment. *Community Genet* 2001; 4:123-124
- 111) Miltiadous G, Cariolou M, Elisaf M. HDL cholesterol levels in patients with molecularly defined familial hypercholesterolemia. *Ann Clin Lab Sci* 2002; 32(1):50-54
- 112) Miltiadous G, Elisaf M, Bairaktari E, Xenophontos S, Manoli P, Cariolou M. Characterization and geographic distribution of the low density lipoprotein receptor gene mutations in northwestern Greece. *Hum Mut* 2001; Mutation in Brief#411(Online)
- 113) Miltiadous G, Elisaf M, Xenophontos S, Manoli P, Cariolou AM. Segregation of a novel LDLR gene mutation (I430T) with familial hypercholesterolemia in a Greek pedigree. *Hum Mut* 2000; 16(3):277
- 114) Miltiadous G, Hatzivassiliou M, Bashiardes E, Bairaktari E, Cariolou MA, Elisaf M. Genetic polymorphisms of the apolipoprotein A-IV in a Greek population and their relation to plasma lipid and lipoprotein levels. *Clin Genet* 2002; 62(3):208-213
- 115) Miltiadous G, Tsimihodimos V, Bairaktari E, Elisaf M. Lipoprotein (a) levels in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 2001; 157:255-256
- 116) Muller C. Angina pectoris in hereditary xanthomatosis. *Arch Intern Med* 1939; 64:675-700
- 117) Muller C. Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris. *Acta Med Scand* 1938; 89(Suppl):75-84
- 118) Myant NB, Slack J. Type II hyperlipoproteinaemia. *Clin Endocrinol Metabol* 1973; 2:81-109
- 119) Nestel P, Simons L, Barter P, Clifton P, Colquhoun D, Hamilton-Craig I, Sikaris K, Sullivan D. A comparative study of the efficacy of simvastatin and gemfibrozil in combined hyperlipoproteinemia: prediction of response by baseline lipids, apoE genotype, lipoprotein (a) and insulin. *Atherosclerosis* 1997; 129:231-239
- 120) O'Neill FH, Patel DD, Knight BL, Neuwirth CKY, Bourbon M, Soutar AK, Taylor GW, Thompson GR, Naoumova RP. Determinants of variable response to statin



- treatment in patients with refractory familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:832-837
- 121) Ochoa SCA, Zamora GJ, Gonzalez HJA, Ize LI, Cardoso SG, Posadas RC. Lipoprotein (a) in heterozygote familial hypercholesterolemia. *Arch Inst Cardiol Mex* 1994; 64(6):549-555
- 122) Ordovas JM, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, Rodriguez C, Park J-S, Cole T, Schaefer EJ. Effect of apolipoprotein E and A-IV phenotypes on the low density lipoprotein response to HMG-CoA reductase inhibitor therapy. *Atherosclerosis* 1995; 113:157-166
- 123) Paik YK, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW, Taylor JM. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(10):3445-3449
- 124) Pak YK, Kanuck MP, Berrios D, Briggs MR, Cooper AD, Ellsworth JL. Activation of LDL receptor gene expression in HepG2 cells by hepatocyte growth factor. *J Lipid Res* 1996; 37:985-998
- 125) Pedro-Botet J, Schaefer EJ, Bakker-Arkema RG, Black DM, Stein EM, Corella D, Ordovas JM. Apolipoprotein E genotype affects plasma lipid response to atorvastatin in a gender specific manner. *Atherosclerosis* 2001; 158:183-193
- 126) Pepe G, Di Perna V, Resta F, Lovecchio M, Chimienti G, Colacicco AM, Capurso A. In search of a biological pattern for human longevity: Impact of apo A-IV genetic polymorphisms on lipoproteins and the hyper-Lp(a) in centenarians. *Atherosclerosis* 1998; 137:407-417
- 127) Pruss OJ, Illingworth DR. The influence of apolipoprotein E phenotype on the response to lovastatin therapy in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Metabolism* 1990; 39:150-154
- 128) Radeau T, Vohl MC, Houde I, Lachance JG, Noel R, Despres JP, Douville P, Bergeron J. HDL cholesterol and TaqIB cholesteryl ester transfer protein gene polymorphism in renal transplant recipients. *Nephron* 2000; 84(4):333-341
- 129) Real JT, Ascaso JF, Chaves FJ, Tenes S, Priego MA, Puig O, Armengod ME, Carmena R. Plasma Lp(a) values in familial hypercholesterolemia and its relation to coronary heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1999; 9(1):41-44
- 130) Real JT, Chaves FJ, Martinez-Uso I, Garcia-Garcia AB, Ascaso JF, Carmena R. Importance of HDL cholesterol levels and the total/HDL cholesterol ratio as a risk



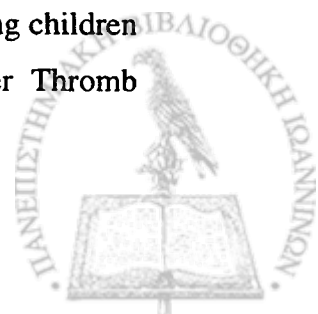
- factor for coronary heart disease in molecularly defined heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur Heart J* 2001; 22:465-71
- 131) Real JT, Romero G, Priego MA, Chaves FL, Ascaso JF, Carmena R. Familial hypercholesterolemia and plasma Lp(a) levels: 2 cardiovascular risk factors. *An Med Interna* 1999; 16(2):69-72
- 132) Reshef A, Nissen H, Triger L, Hansen TS, Eliav O, Schurr D, Safadi R, Gare M, Leitersdorf E. Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Israel. *Hum Genet* 1996; 98:581-586
- 133) Rewers M, Kamboh MI, Hoag S, Shetterly SM, Ferrell RE, Hamman RF. ApoA-IV polymorphism associated with myocardial infarction in obese NIDDM patients. The San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes* 1994; 43(12):1485-1489
- 134) Ribiero P, Shapiro LM, Conzalez A, Thompson GR, Oakley CM. Cross-sectional echocardiographic assessment of the aortic root and coronary ostial stenosis in familial hypercholesterolaemia. *Br Heart J* 1983; 50:432-437
- 135) Ritter MC, Bagdade JD. Contribution of glycaemic control, endogenous lipoproteins and cholesteryl ester transfer in IDDM. *Eur J Clin Invest* 1994; 24:607-614
- 136) Rudling M, Norstedt G, Olivecrona H, Reihner E, Gustafsson J, Angelin B. Importance of growth hormone for the induction of hepatic low density lipoprotein receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:6983-6987
- 137) Saha N, Wang G, Vasisht S, Kamboh MI. Influence of two apo AIV polymorphisms at codons 347 and 360 on non-fasting plasma lipoprotein-lipids and apolipoproteins in Asian Indians. *Atherosclerosis* 1997; 131:249-255
- 138) Salen G, Shekr S, Berginer VM. Familial diseases with storage of sterols other than cholesterol: cerebrotendinous anthomatosis and sitosterolaemia with xanthomatosis. In: Stanbury JB, Wyngaarden DS, Fredrickson JL, Goldstein L, Brown MS (eds). *The metabolic basis of inherited disease*, ed 5. McGraw-Hill, New York, 1983, pp713-730
- 139) Sanchez HB, Yieh L, Osborne TF. Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 1995; 270:1161-1169
- 140) Sanllehy C, Casals E, Rodriguez-Villar C, Zambon D, Ojuel J, Ballesta AM, Ros E. Lack of interaction of apolipoprotein E phenotype with the lipoprotein response to lovastatin or gemfibrozil in patients with primary hypercholesterolemia. *Metabolism* 1998; 47:560-565



- 141) Schaefer JR, Rader DJ, Ikewaki K, Fairwell T, Zech LA, Kindt MR, Davignon J, Gregg RE, Brewer HB. In vivo metabolism of apolipoprotein AI in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 1992; 12:843-848
- 142) Seed M, Hoppichler F, Reaveley D, McCarthy S, Thompson GR, Boerwinkle E, Utermann G. Relation of serum lipoprotein (a) concentration and apolipoprotein (a) phenotype to coronary heart disease in patients with familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1990; 322:1494-1499
- 143) Sijbrands EJJ, Lombardi MP, Westendorp RGJ, Leuven JA, Meinders AE, van der Laarse A, Frants RR, Havekes LM, Smelt AH. Similar response to simvastatin in patients heterozygous for familial hypercholesterolemia with mRNA negative and mRNA positive mutations. *Atherosclerosis* 1998; 136:247-254
- 144) Simard J, Moorjani S, Vohl MC, Couture P, Torres AL, Gagne C, Despres JP, Labrie F, Lupien PJ. Detection of a novel mutation (stop 468) in exon 10 of the low density lipoprotein receptor gene causing familial hypercholesterolemia among French Canadians. *Hum Mol Genet* 1994; 9:1689-1691
- 145) Smit M, de Knijff P, Rosseneu M, Bury J, Klasen E, Frants R, Havekes L. Apolipoprotein E polymorphism in the Netherlands and its effect on plasma lipid and apolipoprotein levels. *Hum Genet* 1988; 80:287-292
- 146) Soria LF, Ludwig EH, Clarke HRG, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:587-591
- 147) Soutar AK, McCarthy SN, Seed M, Knight BL. Relationship between apolipoprotein (a) phenotype, lipoprotein (a) concentration in plasma, and low density lipoprotein receptor function in a large kindred with familial hypercholesterolemia due to the pro<sub>347</sub> → leu mutation in the LDL receptor gene. *J Clin Invest* 1991; 88:483-492
- 148) Stein EA. Statins in children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001; 11(suppl. V):24-29
- 149) Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 1999; 144:285-301
- 150) Stengard JH, Zerba KE, Pekkanen J, Ehnholm C, Nissinen A, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men. *Circulation* 1995; 91:265-269



- 151) Streicher R, Kotzka J, Muller-Wieland D, Siemeister G, Munck M, Anci H, Krone W. SREBP-1 mediates activation of the low density lipoprotein receptor promoter by insulin and insulin-like growth factor-1. *J Biol Chem* 1996; 271:7128-7133
- 152) Sudhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russel DW. The LDL receptor gene: A mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 1985; 228:815-822
- 153) Sudhof TC, van der Westhuyzen DR, Goldstein JL, Brown MS, Russel DW. Three direct repeats and a TATA-like sequence are required for regulated expression of the human low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 1987; 262: 10773-10779
- 154) Sun XM, Patel DD, Knight BL, Soutar AK. The familial hypercholesterolaemia regression study group. Influence of genotype at the low density lipoprotein (LDL) receptor gene locus on the clinical phenotype and response to lipid-lowering drug therapy in heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1998; 136:175-185
- 155) Takahashi W, Naito M. Lipid storage disease: Ultrastructure of xanthomata cells in various xanthomatous diseases. *Acta Pathol Jpn* 1983; (33):959-977
- 156) Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res* 1993; 34:1255-1274
- 157) Thannhauser DJ, Magendantz H. The different clinical groups of xanthomatous diseases: A clinical physiological study of 22 cases. *Ann Intern Med* 1938; 11:1662-1746
- 158) Thuren T, Weisgraber KH, Sisson P, Waite M. Role of apolipoprotein E in hepatic lipase catalyzed hydrolysis of phospholipid in high density lipoproteins. *Biochemistry* 1992; 31:2332-2338
- 159) Thuren T, Wilcox RW, Sisson P, Waite M. Hepatic lipase hydrolysis of lipid monolayers. Regulation by apolipoproteins. *J Biol Chem* 1991; 266:4853-4861
- 160) Tolleshaug H, Goldstein JL, Schneider WJ, Brown MS. Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia. *Cell* 1982; 30:715-724
- 161) Tolleshaug H, Hobfood KK, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: multiple mutations disrupt transport and processing of a membrane receptor. *Cell* 1983; 32:941-951
- 162) Tonstad S, Leren TP, Sivertsen M, Ose L. Determinants of lipid levels among children with heterozygous familial hypercholesterolemia in Norway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1009-1014



- 163) Torres L, Moorjani S, Vohl MC, Gagne C, Lamarche B, Brun LD, Lupien PJ, Despres JP. Heterozygous familial hypercholesterolemia in children: low density lipoprotein receptor mutational analysis and variation in the expression of plasma lipoprotein-lipid concentrations. *Atherosclerosis* 1996; 126:163-171
- 164) Traeger-Synodinos J, Mavroidis N, Kanavakis E, Drogani E, Humphries SE, Day INM, Kattamis C, Matsaniotis N. Analysis of low density lipoprotein receptor gene mutations and microsatellite haplotypes in Greek FH heterozygous children: six independent ancestors account for 60% of probands. *Hum Genet* 1998; 102:343-347
- 165) Tsimihodimos V, Miltiados G, Elisaf M. Therapy with statins is effective in some patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2000; 153:527
- 166) Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Meinertz H, Schnohr R, Nordestgaard BG. Association of mutations in the apolipoprotein B gene with hypercholesterolemia and the risk of ischaemic heart disease. *N Engl J Med* 1998; 338:1577-1584
- 167) Van Bockxmeer FM, Mamotte CD, Gibbons FR, Taylor RR. Apolipoprotein epsilon 4 homozygosity - a determinant of restenosis after coronary angioplasty. *Atherosclerosis* 1994; 110:195-202
- 168) Von Eckardstein A, Funke H, Schulte M, Erren M, Schulte H, Assman G. Nonsynonymous polymorphic sites in the apolipoprotein (apo) A-IV gene are associated with changes in the concentration of apoB and apoA -I containing lipoproteins in a normal population. *Am J Hum Genet* 1992; 50:1115-1128
- 169) Vuorio AF, Turtola H, Piilhti KM, Repo P, Kanaden T, Kontula K. Familial hypercholesterolaemia in the Finnish North Karelia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 3127-3138
- 170) Wang X, Briggs MR, Hua X, Yokoyama C, Goldstein JL, Brown MS. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter - Purification and characterization. *J Biol Chem* 1993; 268:14497-14504
- 171) Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* 1994; 77(1):53-62
- 172) Wang XL, McCredie RM, Wilcken DE. Polymorphisms of the apolipoprotein E gene and severity of coronary artery disease defined by angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1030-1034





- 173) Warnick GR, Benderson J, Albers JJ. Dextran sulfate-Mg<sup>2+</sup> precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1982; 28:1379-88
- 174) Weinberg RB, Ibdah JA, Phillips MC. Absorption of apolipoprotein A-IV to phospholipid monolayers spread at the air/water interface. *J Biol Chem* 1992; 267(13):8977-8983
- 175) Weinberg RB, Jordan MK, Steinmetz A. Distinctive structure and function of human apolipoprotein variant apoA-IV-2. *J Biol Chem* 1992; 265(30):18372-18378
- 176) Weinberg RB, Spector MS. Lipoprotein affinity of human apolipoprotein A-IV during cholesterol esterification. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 135(3):756-763
- 177) Weinberg RB, Spector MS. Structural properties and lipid binding of human apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem* 1985; 260(8):4914-4921
- 178) Weinberg RB. Differences in the hydrophobic properties of discrete alpha-helical domains of rat and human apolipoprotein A-IV. *Biochim Biophys Acta* 1987; 918(3):299-303
- 179) Weisgraber KH, Innerarity TL, Harder KJ, Mahley RW, Marcel YL, Sparrow JT. The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Monoclonal antibody inhibition of binding. *J Biol Chem* 1983; 258(20):12348-12354
- 180) Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem* 1982; 257:2518-2521
- 181) Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science* 1991; 252:1817-1822
- 182) Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:1250-1255
- 183) Xhignesse M, Lussier-Cacan S, Sing CF, Kessling AM, Davignon J. Influences of common variants of apolipoprotein E on measures of lipid metabolism in a sample selected for health. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:1100-1110
- 184) Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 1993; 75:187-197



- 185) Zaiou M, Visvikis S, Gueguen R, Parra H-J, Fruchart JC, Siest G. DNA polymorphisms of human apolipoprotein A-IV gene: frequency and effects on lipid, lipoprotein and apolipoprotein levels in a French population. *Clin Genet* 1994; 46:248-254
- 186) Zhongyan W, Mingpeng S, Man X, Zongli W, Renyi X. A study of apolipoprotein A-IV genetic polymorphisms, serum lipids and lipoproteins in Beijing habitants. *Chin Med J* 1997; 110(4):264-268
- 187) Zuliani G, Hobbs H. EcoNI polymorphism in the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:2834



**ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**

- 1) Miltiadous G, Cariolou M, Elisaf M. Familial hypercholesterolaemia: Taking advantage of a founder effect for early diagnosis and treatment. *Community Genet* 2001; 4:123-124
- 2) Miltiadous G, Cariolou M, Elisaf M. HDL cholesterol levels in patients with molecularly defined familial hypercholesterolemia. *Ann Clin Lab Sci* 2002; 32(1):50-54
- 3) Miltiadous G, Elisaf M, Bairaktari E, Xenophontos S, Manoli P, Cariolou M. Characterization and geographic distribution of the low density lipoprotein receptor gene mutations in northwestern Greece. *Hum Mut* 2001; Mutation in Brief#411(Online)
- 4) Miltiadous G, Elisaf M, Xenophontos S, Manoli P, Cariolou AM. Segregation of a novel LDLR gene mutation (I430T) with familial hypercholesterolemia in a Greek pedigree. *Hum Mut* 2000; 16(3):277
- 5) Miltiadous G, Hatzivassiliou M, Bashiardes E, Bairaktari E, Cariolou MA, Elisaf M. Genetic polymorphisms of the apolipoprotein A-IV in a Greek population and their relation to plasma lipid and lipoprotein levels. *Clin Genet* 2002; 62(3):208-213
- 6) Miltiadous G, Tsimihodimos V, Bairaktari E, Elisaf M. Lipoprotein (a) levels in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 2001; 157:255-256
- 7) Tsimihodimos V, Miltiadous G, Elisaf M. Therapy with statins is effective in some patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2000; 153:527
- 8) Μιλτιάδου Γ, Μπαϊρακτάρη Ε, Ξενοφώντος Σ, Μανόλη Π, Καριόλου Μ, Ελισάφ Μ. Μεταλλάξεις του γονιδίου του LDL υποδοχέα που προκαλούν οικογενή υπερχοληστερολαιμία στη Βορειοδυτική Ελλάδα. *Ιατρική* 2002; 81(4):346-352



**ΒΡΑΒΕΙΑ/ΕΠΑΙΝΟΙ**

1. Έπαινος από την Ελληνική Καρδιολογική Εταιρία στα πλαίσια του 22<sup>ου</sup> Πανελληνίου Καρδιολογικού Συνεδρίου για την εργασία με τίτλο 'Η χρήση γενετικών δεικτών στη διάγνωση της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας'. Αθήνα, 22/11/2001
2. Βραβείο χρηματικής αξίας 1.500 € από το Διοικητικό Συμβούλιο της Καρδιολογικής Εταιρίας Βορείου Ελλάδας στα πλαίσια του 3<sup>ου</sup> Βορειοελλαδικού Καρδιολογικού Συνεδρίου για την εργασία με θέμα: 'Μεταλλάξεις του γονιδίου του LDL υποδοχέα που προκαλούν οικογενή υπερχοληστερολαιμία στη Βορειοδυτική Ελλάδα'. Θεσσαλονίκη, 16/5/2002
3. Πρώτο Βραβείο Επάθλου 'Οδυσσέα Καλλιγιάννη' στα πλαίσια του 11<sup>ου</sup> Παγκρήτιου Ιατρικού Συνεδρίου για την εργασία με τίτλο 'Οικογενής υπερχοληστερολαιμία: υπεύθυνες μεταλλάξεις του γονιδίου του LDL υποδοχέα και η γεωγραφική κατανομή τους'. Χανιά, 1/11/2002
4. Πρώτο Βραβείο Βασικής Έρευνας του 29<sup>ου</sup> Ετήσιου Πανελληνίου Ιατρικού Συνεδρίου για την εργασία με θέμα: 'Η συχνότητα και η επίδραση των γονιδιακών πολυμορφισμών της απολιποπρωτεΐνης AIV σε Ελληνικό πληθυσμό'. Αθήνα, 24/5/2003

