

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**



**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
& ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ
ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΧΑΜΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ
(LDL-R) ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΗ ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΑ (FH)**

ΦΑΚΙΟΛΑΣ ΣΤΕΦΑΝΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2010

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ:

**Κ. ΜΠΑΪΡΑΚΤΑΡΗ ΕΛΕΝΗ
Κ. ΚΟΝΤΟΥ ΜΑΡΙΑ
Κ. ΚΟΛΙΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**

Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας περιεχομένων.....	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
'Α Μέρος.....	7
Θεωρητικό υπόβαθρο.....	7
2. ΔΥΣΛΙΠΙΔΑΙΜΙΕΣ.....	7
2.1 ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΑ.....	9
3. ΟΙ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....	10
3.1 ΟΙ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....	13
3.1.1 Apo-A.....	14
3.1.2 Apo-B.....	14
3.1.3 Apo-C.....	14
3.1.4 Apo-E.....	14
3.1.5 Apo (a).....	14
3.2 ΛΙΠΙΔΙΑ.....	15
3.2.1 Χοληστερόλη.....	15
3.2.2 Λιπαρά οξέα.....	15
3.2.3 Τριγλυκερίδια.....	16
4. Η ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ LDL.....	16
5. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	18
5.1 Εξωγενής οδός.....	18
5.2 Ενδογενής οδός.....	18
5.3 Η αντίστροφη οδός της HDL.....	18
6. Το μονοπάτι της LDL.....	20
7. Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΗΣ LDL.....	23
7.1 Η δομή του υποδοχέα.....	23

8.	ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ LDL.....	25
8.1	Ο προαγωγέας.....	25
8.2	Τα εξόνια	26
8.3	Το μετάγραφο.....	26
8.4	Ρύθμιση του γονιδίου.....	26
8.5	Οικογένεια γονιδίων LDLR	28
9.	ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	28
9.1	Ποιοτικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των μεταλλάξεων .	30
10.	ΣΚΟΠΟΣ.....	32
	Β' Μέρος	32
11.	Υλικά και μέθοδοι	32
11.1	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ & ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA.....	32
11.1.1	Πρωτόκολλο απομόνωσης.....	33
11.1.2	Εκχύλιση DNA από ολικό αίμα με τη χρήση εμπορικού σκευάσματος.....	35
11.2	Έλεγχος προϊόντος εκχύλισης DNA.....	35
11.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR.....	35
11.4	Έλεγχος προϊόντος PCR σε πήκτωμα αγαρόζης και απομόνωσή του.....	36
11.5	Αλληλούχιση κατά SANGER.....	37
11.5.1	Αρχή της μεθόδου	37
11.5.2	Προετοιμασία για αλληλούχιση κατά SANGER.....	38
	Γ' Μέρος	41
	Αποτελέσματα-Συζήτηση	41
12.	Προτυποποίηση της μεθοδολογίας.....	41
13.	Αποτελέσματα	42
	Συζήτηση.....	46

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Όλο και περισσότερο στην εποχή μας γίνεται λόγος για τις συνέπειες του σύγχρονου τρόπου ζωής, ειδικά στον Δυτικό κόσμο, όπως νοείται η καθιστική ζωή με ταυτόχρονη έλλειψη άσκησης, η πρόσληψη πολλών θερμίδων με αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των υπέρβαρων ανθρώπων και τέλος η μόνιμη παρουσία άγχους στην καθημερινότητα. Αποτέλεσμα των προηγούμενων είναι η διαταραχή της υγείας των με συχνό φαινόμενο τις καρδιοπάθειες, τα εγκεφαλικά επεισόδια, την υπέρταση, το σακχαρώδη διαβήτη, κ.α.

Όσα περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο είναι αναστρέψιμα με την αλλαγή στάσης ζωής. Σε ένα ποσοστό όμως του πληθυσμού, η ύπαρξη επιβαρυντικού γενετικού υπόβαθρου δεν επιτρέπει την ανατροπή της διαφαινόμενης πορείας, αν και η φαρμακευτική υποστήριξη επιβραδύνει σημαντικά την εκδήλωση νόσου. Ένα από αυτά τα γενετικά νοσήματα είναι η οικογενής υπερχοληστερολαιμία (familial hypercholesterolaemia FH) που οφείλεται σε ατελή δράση του κυτταρικού υποδοχέα, όπως έδειξαν οι Goldstein και Brown, τον υποδοχέα της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL-Receptor). Η οικογενής υπερχοληστερολαιμία είναι μία από τις γενετικές νόσους τις *δυσλιπιδαιμίες*, που έχουν ως φαινότυπο την διαταραχή των επιπέδων των λιπιδίων στον ορό του αίματος. Η συχνότητά της στο γενικό πληθυσμό (εάν δεν είναι απομονωμένος) κυμαίνεται 1:500 και χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα LDL χοληστερόλης στον ορό του αίματος και διάφορα κλινικά συμπτώματα που φθάνουν έως το έμφραγμα μυοκαρδίου των πασχόντων σχετικά σε νεαρή ηλικία.

Ο υποδοχέας της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL-R) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη στη κυτταρική μεμβράνη που κωδικοποιείται από ένα σχετικά μεγάλο γονίδιο με 18 εξόνια, το οποίο εδράζει στο χρωμόσωμα 19. Ο ρόλος του είναι να συλλέγει την LDL από την εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων. Ο υποδοχέας μαζί με το πρόσδεμά του (LDL) ενδοκυτταρώνονται. Στο σχηματιζόμενο ενδόσωμα ελευθερώνεται ο υποδοχέας από την LDL εξαιτίας της πτώσης του pH από τη δράση αντλιών H^+ , οπότε ο υποδοχέας μπορεί να επιστρέψει στην κυτταρική μεμβράνη ή να αποδομηθεί. Ο υποδοχέας συντίθεται *de novo* σε ισορροπία με την ανακύκλωση ανάλογα με τις κυτταρικές ανάγκες.

Οι μεταλλάξεις που παρατηρούνται στο γονίδιο του LDLR ξεπερνούν τις 1700 – λόγω του μεγέθους του γονιδίου. Στην παρούσα εργασία εστιάζουμε στην μελέτη δύο εξονίων, των 11 και 12. Η επιλογή τους έγινε μετά από την μελέτη δημοσιεύσεων που αφορούσαν τη διερεύνηση της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας είτε στην περιοχή της Ηπείρου, είτε ευρύτερα που περιελάμβαναν όμως οικογένειες με καταγωγή την Ήπειρο

Στους 26 ασθενείς που εξετάσθηκαν στους 18 εντοπίστηκε αντικατάσταση βάσης (SNP). Οι 14 από αυτούς είχαν σιωπηρή μετάλλαξη (C1773T). Δύο ασθενείς εμφάνισαν την αντικατάσταση G1646A που οδηγεί σε μεταλλαγμένη πρωτεΐνη με ενεργότητα υποδοχέα 5% του άγριου τύπου. Ένας ασθενής παρουσίασε την μετάλλαξη G1775A που επίσης έχει ως

αποτέλεσμα ενεργότητα υποδοχέα 5% του άγριου τύπου. Τέλος ένας ασθενής παρουσίασε τρεις ταυτόχρονα μεταλλάξεις τις: G1646A, A1658G, C1773T.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ελένη Μπαϊρακτάρη διευθύντρια του Βιοχημικού εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων που με δέχτηκε στο εργαστήριο της, τον κ. Γιώργο Κολιό ο οποίος ήταν ο ιθύνων νους και λειτούργησε ως μέντοράς μου, την κ Βάσω Ψωφάκη η οποία ήταν τα πάντα στο εργαστήριο, διαρκώς στο πλάι μου, την κ Χρυσούλα Καλογερά για τις χρήσιμες υποδείξεις της και το λοιπό προσωπικό του εργαστηρίου που ήταν συνεργάσιμο και έδειξε υπομονή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μωσή Ελισάφ διευθυντή του Εξωτερικού Ιατρείου Λιπιδίων και τους συνεργάτες του, για την αμέριστη υποστήριξη.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω την κ Χριστιάνα Παππά και τον κ. Ε. Χονδρέλη που μεσολάβησαν για να γίνει αυτή η εργασία, καθώς και τους συναδέλφους μου στο νοσοκομείο Πρέβεζας για τις διευκολύνσεις που μου παρείχαν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ Μαρία Κοντού που με δέχτηκε για την εκπόνηση της πτυχιακής και όλους τους καθηγητές μου στο πανεπιστήμιο για τα εφόδια που μου έδωσαν απλόχερα.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τη Ρούλα που με υπομονή, με στήριξε. Δε θέλω να παραλείψω και τους φίλους που ήταν πάντα δίπλα μου.

Τέλος, οι ευχαριστίες μου απευθύνονται στην αρχή του παντός της δικής μου ύπαρξης: την οικογένεια μου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2010

Ά Μέροσ

Θεωρητικό υπόβαθρο

2. ΔΥΣΛΙΠΙΔΑΙΜΙΕΣ

Δυσλιπιδαιμία είναι η διαταραχή στα επίπεδα των λιπών και λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Επικράτησε ως όρος έναντι της «υπερλιπιδαιμίας» (υψηλά ποσοστά λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών) γιατί καλύπτει και την περίπτωση των χαμηλών επιπέδων της λιποπρωτεϊνης υψηλής πυκνότητας HDL (high density lipoprotein).

Διακρίνονται σε πρωτοπαθείσ, οι οποίεσ έχουν γονιδιακό υπόβαθρο και σε δευτεροπαθείσ ως απότοκεσ κακήσ διατροφήσ, αλκοόλ, λήψη φαρμάκων, νευρική ανορεξία, λιμόσ ή παθολογικών καταστάσεων (υποθυρεοειδισμόσ, νεφρική νόσοσ, σακχαρώδησ διαβήτησ κ.α.). Οι πρωτοπαθείσ εμφανίζονται σε ποσοστό 0,5% του γενικού πληθυσμού με οξύτερα προβλήματα και εκδηλώσεισ στους πάσχοντεσ από ότι οι δευτεροπαθείσ που εμφανίζονται στο 3-5% του πληθυσμού.

Στουσ πίνακεσ που ακολουθούν συνοψίζονται τα κύρια χαρακτηριστικά τουσ.

Πίνακασ 1 (ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΑΠΟ MERCK MANUAL PROFESSIONAL/ONLINE)

ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΙΜΩΝ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΑΙΜΑ				
(mmol/l)	ΟΛΙΚΗ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ	LDL	HDL	Τριγλυκερίδια
ΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΤΙΜΕΣ	<200	<100	<40: θεωρούνται χαμηλά επίπεδα	<150
ΣΧΕΔΟΝ ΚΑΛΕΣ		100-129		
ΟΡΙΑΚΑ ΥΨΗΛΕΣ	200-239	130-159	>60: θεωρούνται τα επιθυμητά	150-199
ΥΨΗΛΕΣ	>240	160-189	υψηλά επίπεδα	200-499
ΠΟΛΥ ΥΨΗΛΕΣ		>190		>500

Ταξινόμηση κατά Fredrickson				
Τύπος υπερλιποπρωτεϊναιμίας	Νοσήματα	Αίτιο	Αυξημένη λιποπρωτεΐνη	Όψη ορού
I (OMIM238600)	ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΥΠΕΡΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΑΙΜΙΑ, ΟΙΚ. ΥΠΕΡΧΥΛΟΜΙΚΡΟΝΑΙΜΙΑ, BUERGERGRUETZ SYNDROME	ΕΛΑΤΤΩΜΕΝΗ LPL Η' ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ApoC-II	ΧΥΛΟΜΙΚΡΑ	ΚΡΕΜΩΔΗΣ
IIa (OMIM144400)	ΠΟΛΥΓΕΝΗΣ ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΑ, ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΑ	ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ LDL	LDL	ΔΙΑΥΓΗΣ
IIb (OMIM144400)	ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΥΠΕΡΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑ	ΕΛΑΤΤΩΜΕΝΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ LDL-R ΚΑΙ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ApoB	LDL VLDL	ΔΙΑΥΓΗΣ
III (OMIM107741)	ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΔΥΣΒΗΤΑΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΑΙΜΙΑ	ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ApoE-II	IDL	ΘΟΛΟΣ
IV (OMIM144600)	ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΥΠΕΡΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ VLDL ΕΛΑΤΤΩΜΕΝΗ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ	VLDL	ΘΟΛΟΣ
V (OMIM144650)	ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΥΠΕΡΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΑΙΜΙΑ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ VLDL ΕΛΑΤΤΩΜΕΝΗ LPL	VLDL ΧΥΛΟΜΙΚΡΑ	ΚΡΕΜΩΔΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑ ΘΟΛΟΣ ΠΥΘΜΕΝΑΣ

2.1 ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΑ

Η οικογενής υπερχοληστερολαιμία (Familial Hypercholesterolemia FH) είναι μια αυτοσωμική επικρατής νόσος με συχνότητα εμφάνισης 1:500. Αυτή η κληρονομική νόσος έχει περιγραφεί από τους πρωτοπόρους, στο θέμα αυτό, ερευνητές Hobbs, Goldstein, Brown με σειρά δημοσιεύσεων που εισήγαγαν καινοτόμες προσεγγίσεις (*Goldstein and Brown(1973), Brown and Goldstein (1974)*). Τα επίπεδα χοληστερόλης (ειδικά της LDL) είναι αυξημένα κατά 2-3 φορές. Οι ομοζυγώτες εμφανίζονται με συχνότητα γεννήσεων 1:1.000.000 όπου τα επίπεδα χοληστερόλης είναι αυξημένα 3-6 φορές. Διευκρινίζεται ότι σε απομονωμένους πληθυσμούς όπως είναι οι λευκοί της Ν. Αφρικής (Afrikaners) οι προηγούμενες συχνότητες τροποποιούνται (ετεροζυγώτες σε συχνότητα 1:70). Επίσης όπως θα αναφερθεί σε επόμενο σημείο, επειδή ο αριθμός των μεταλλάξεων υπερβαίνει τις 1500, είναι πρακτικά αδύνατο οι ομοζυγώτες να έχουν ακριβώς τα ίδια αλληλόμορφα. Δηλαδή ως επί το πλείστον οι ομοζυγώτες είναι διπλοί (ή σύνθετοι) ετεροζυγώτες.



Εικόνα 1. Αριστερά: ξανθέλασμα (εναπόθεση χοληστερόλης πάνω από το βλέφαρο), δεξιά: ξανθώματα (οζίδια χοληστερόλης στους τένοντες). (ΑΠΟ WIKIPEDIA)

Οι μισοί περίπου πάσχοντες ετερόζυγοι εμφανίζουν εναποθέσεις χοληστερόλης στους τένοντες (ξανθώματα) και στα βλέφαρα (ξανθελάσματα) (εικόνα 1). Το σοβαρότερο αποτέλεσμα όμως, είναι η δημιουργία αθηρωματικών πλακών στα αγγεία. Στο Δυτικό κόσμο, το 5% των εμφραγμάτων σε ασθενείς κάτω των 60 ετών συμβαίνουν σε ετεροζυγώτες με το σύνδρομο FH. Η εμφάνιση καρδιαγγειακών νόσων είναι πολύ συχνή στους πάσχοντες και συχνά είναι το αίτιο κατάληξης. Οι ομόζυγοι ασθενείς αποθνήσκουν από στεφανιαία νόσο πολύ νωρίς, στη δεύτερη ή τρίτη δεκαετία της ζωής τους.

3. ΟΙ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι λιποπρωτεΐνες είναι μακρομοριακά συμπλέγματα λιπιδίων που συντίθενται στο ήπαρ ή προσλαμβάνονται έτοιμα από το λεπτό έντερο και πρωτεϊνών που ονομάζονται απολιπρωτεΐνες. Οι λιποπρωτεΐνες συντελούν στην μεταφορά των υδρόφοβων λιπιδίων διαμέσου των υδατικών διαμερισμάτων.

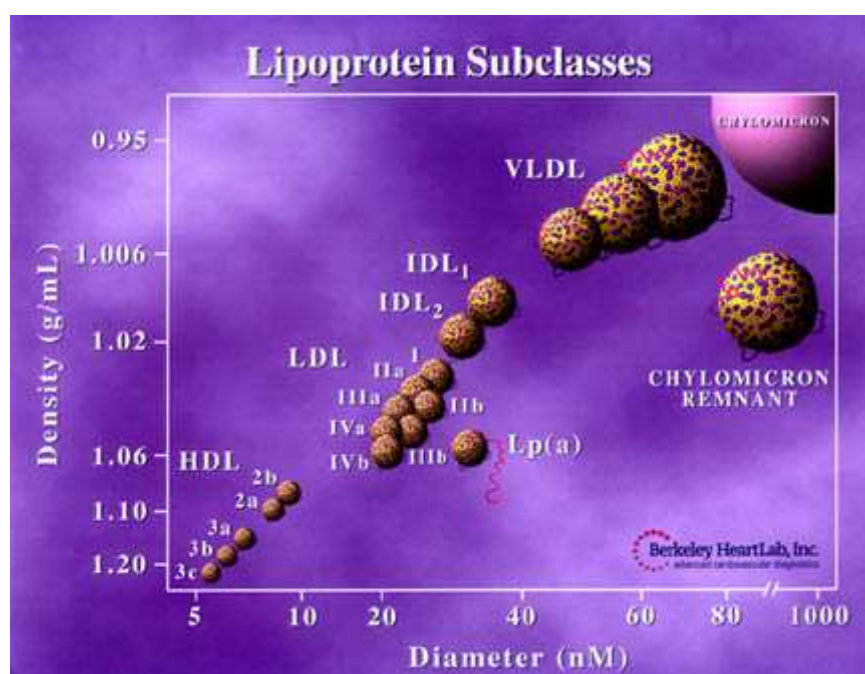
Οι λιποπρωτεΐνες είναι σφαιρικά σωματίδια με υδρόφοβο πυρήνα που συγκροτείται από τριγλυκερίδια και εστεροποιημένη χοληστερόλη. Εξωτερικά, στην περιφέρεια τοποθετούνται τα αμφιπαθή μόρια φωσφολιπιδίων, αποπρωτεϊνών και μόρια ελεύθερης χοληστερόλης. Στον πυρήνα εμφανίζονται δεσμοί υδρογόνου και δυνάμεις van der Waals. Η δομή των λιποπρωτεϊνών είναι αρκετά χαλαρή γεγονός που επιτρέπει την ανταλλαγή λιπιδίων μεταξύ λιποπρωτεϊνών και κυτταρικών μεμβρανών.

Οι λιποπρωτεΐνες έχουν διαφορετικές αναλογίες λιπιδίων (πίνακας 3) και αποπρωτεϊνών. Βάσει της πυκνότητας διακρίνονται σε χυλομικρά, VLDL (πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες), LDL (χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες), IDL (ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες), HDL (υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες), Lp(a) (λιποπρωτεΐνη α),(εικόνα 2). Στους πίνακες που ακολουθούν φαίνονται η ποσοστιαία αναλογία και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της κάθε τάξης λιποπρωτεϊνών. (*Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*).

(ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ:

- *VLDL: Very low density lipoprotein/ πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη*
- *IDL: Intermediated density lipoprotein/ ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνη*
- *LDL: low density lipoprotein/ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη*
- *HDL: high density lipoprotein/ υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη*
- *LP(a):lipoprotein a/ λιποπρωτεΐνη α)*

Σύσταση των λιποπρωτεϊνών						
% σύσταση των λιποπρωτεϊνών		Χυλο-μικρά	VLDL	IDL	LDL	HDL
Περιφέρεια	Χοληστερόλη	2	7	9	8	4-5
	Φωσfolιπίδια	7	18	19	22	25-33
	Απολιποπρωτεΐνες	2	8	19	22	40-55
πυρήνας	Τριγλυκερίδια	86	55	23	6	3-5
	Εστέρες χοληστερόλης	3	12	29	42	13-17



Εικόνα 2 Συγκριτική μεγέθους των λιποπρωτεϊνών.

Πίνακας 4 (Tietz: clinical chemistry & molecular diagnostic 4th ed. P916)

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποπρωτεϊνών						
	Χυλο- μικρά	VLDL	IDL	LDL	HDL	Lp(a)
Πυκνότητα (g/ml)	<0,95	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210	1,040-1,130
Ηλεκτροφορητική κινητικότητα	0	Προ-B	Προ-B/ B	B	A	Προ-β
Μοριακό βάρος Da	0.4-30 x10 ⁹	5-10 x10 ⁶	3.9-4.8 x10 ⁶	2.75 x10 ⁶	1.8-3.6 x10 ⁶	2.9-3.7 x10 ⁶
Διάμετρο (nm)	>70	26-70	22-24	19-23	4-10	26-30
Λίπη/ λιποπρωτεΐνες	99/1	90/10	85/15	80/20	55/50	75/26- 64/36
Κύρια λίπη	Εξω-γενή τριγλυκερίδια	Ενδο-γενή τριγλυκερίδια	Ενδο-γενή τριγλυκερίδια & Εστέρες χοληστερόλης	Εστέρες χοληστερόλης	Φωσφολιπίδια	Εστέρες χοληστερόλης
Κύριες πρωτεΐνες	A-I B-48 C-I C-II C-III	B-100 C-I C-II C-III E	B-100 E	B-100	A-I A-II	(a) B-100

3.1 ΟΙ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι απολιποπρωτεΐνες είναι τα πρωτεϊνικά συστατικά των λιποπρωτεϊνών.

Πίνακας 5 (Tietz: clinical chemistry & molecular diagnostic 4th ed. P916)

χαρακτηριστικά των λιποπρωτεϊνών			
Απολιπο- πρωτεΐνη	ΜΒ (Da)	Λειτουργία	Λιποπρωτεΐνη φορέας
ΑpoA-I	29.016	Συμπαράγοντας της LCAT (<u>L</u> ecithin <u>C</u> holesterol <u>A</u> cy <u>l</u> transferase)	Χυλομικρά, HDL
ΑpoA-II	17.414	Άγνωστη	HDL
ΑpoA-IV	44.465	Ενεργοποιεί την LCAT	Χυλομικρά, HDL
ΑpoB-100	512.723	Συμβάλλει στην μεταφορά τριγλυκεριδίων από τις δεσμευτικές πρωτεΐνες του ή- πατος στην LDL	VLDL, IDL, LDL
ΑpoB-48	240.800	Έκκριση τριγλυκεριδίων από το έντερο	Χυλομικρά
ΑpoC-I	6630	Ενεργοποιεί την LCAT	Χυλομικρά, VLDL, HDL
ΑpoC-II	8900	Συμπαράγοντας της LPL (Lipoprotein lipase)	Χυλομικρά, VLDL, HDL
ΑpoC-III	8800	Αναστέλλει την ενεργοποίηση της LPL από την ΑpoC-II	Χυλομικρά, VLDL, HDL
ΑpoE	34.145	Διευκολύνει την πρόσληψη των υπολειμμάτων των χυλομικρών και της IDL	Χυλομικρά, VLDL, HDL
Αpo(a)	187.000- 662.000	Άγνωστη	Lp(a)

Η λειτουργία των αποπρωτεϊνών συνοψίζεται στους παρακάτω ρόλους: α) αποτελούν το συστατικό των λιποπρωτεϊνών που αναγνωρίζεται και δεσμεύεται στους μεμβρανικούς υποδοχείς. β) ενεργοποιούν ένζυμα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων. γ) συμβάλλουν στη διατήρηση της δομής των λιποπρωτεϊνών. (*Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*).

3.1.1 Apo-A

Υπάρχουν τρία είδη Apo A: A-I, A-II, A-IV. Αποτελούν την κύρια αποπρωτεΐνη της HDL. Κύριος ρόλος τους είναι η ενεργοποίηση (και πιθανώς η απενεργοποίηση) του ενζύμου λεκίθινο-χολήστερο-ακέτυλο-τρανσφεράση (LCAT).

3.1.2 Apo-B

Η ApoB υπάρχει σε δύο μορφές: την ApoB100 και την ApoB48 που είναι προϊόντα του ίδιου γονιδίου. Μετα-μεταγραφική τροποποίηση δημιουργεί ένα πρώιμο κωδικόνιο τερματισμού που οδηγεί στην σύνθεση της ApoB48. Η ApoB100 είναι η μοναδική απολιποπρωτεΐνη της LDL. Περιέχει πάνω από 4500aa. Συντίθεται στο ήπαρ και εκκρίνεται στο πλάσμα ως μέρος της VLDL. Στην LDL προκύπτει (βασικά η LDL προκύπτει) από τον καταβολισμό της VLDL και όχι από μεταφορά της ApoB100 από λιποπρωτεΐνη σε λιποπρωτεΐνη.

Η ApoB48 είναι το N-τελικό άκρο της ApoB100, συντίθεται στο έντερο και είναι η κύρια αποπρωτεΐνη των χυλομικρών. (*Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*).

3.1.3 Apo-C

Υπάρχουν τρία είδη ApoC: C-I, C-II, C-III. Η πρώτη εξ αυτών ενεργοποιεί το ένζυμο LCAT, η δεύτερη το ένζυμο λιποπρωτεϊνική λιπάση LPL το οποίο όμως απενεργοποιείται από την ApoC-III.

3.1.4 Apo-E

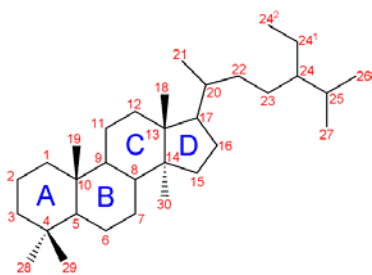
Η αποπρωτεΐνη E συνδέεται επίσης με τον υποδοχέα της LDL με μεγάλη συγγένεια. Φαίνεται ότι η επανάληψη 5 της β-έλικας του υποδοχέα είναι υπεύθυνη για τη δέσμευσή της (Russel et al. 1989).

3.1.5 Apo (a)

Η Apo-a αποτελεί συστατικό της λιποπρωτεΐνης Lp(a) σε αναλογία 35% κ.β.. Συντίθεται στο ήπαρ. Ο ρόλος της είναι υπό διερεύνηση.

3.2 ΛΙΠΙΔΙΑ

3.2.1 Χοληστερόλη



Η χοληστερόλη είναι μια στερόλη, δηλαδή μια αλκοόλη με 27 άτομα άνθρακα που έχει τον χαρακτηριστικό σκελετό που εμφανίζεται σε ένα πλήθος μορίων (που η βιοσύνθεσή τους έχει αφηγηρία την χοληστερόλη). Βρίσκεται στους ευκαρυώτες, σχεδόν αποκλειστικά στους ζωικούς οργανισμούς. Αποτελεί βασικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών (τις καθιστά εύπλαστες)

και πρόδρομο ουσία σημαντικών μορίων (βιταμίνη D, χολικά άλατα, στεροειδή: κορτιζόλη, αλδοστερόνη, οιστρογόνα, τεστοστερόνη, προγεστερόνη). Η χοληστερόλη συντίθεται κύρια στο ήπαρ, προσλαμβάνεται όμως και μέσω της διατροφής. Οι λιποπρωτεΐνες αποτελούν το κύριο όχημα μεταφοράς της στους ιστούς. Το 50% της χοληστερόλης που εκκρίνεται με τη χολή (χολικά άλατα) επαναπροσλαμβάνεται στο λεπτό έντερο.

Η βιοσύνθεση της χοληστερόλης (ενδογενής χοληστερόλη) γίνεται στο ήπαρ, το έντερο (συνολικά το 90% της βιοσύνθεσης γίνεται σε αυτά τα δύο), τα επινεφρίδια, τους όρχεις, τις ωοθήκες κ.α. Ξεκινά από το ακέτυλο συνένζυμο A που με διαδοχικά βήματα δίνει το 3-υδροξυ-3-μεθυλο-γλουταρυλο συνένζυμο A (HMG-CoA). Ακολουθώντας με ενδιάμεσο το μεβαλονικό προκύπτει τελικά το σκουαλένιο. Ένζυμο κλειδί στις προηγούμενες διαδικασίες είναι η αναγωγή του HMG-CoA. Τελικά, σε μια σειρά αντιδράσεων κυκλοποίησης το σκουαλένιο μετατρέπεται σε χοληστερόλη.

Η εξωγενής χοληστερόλη που προέρχεται από τις τροφές εισέρχεται στο μεταβολισμό με την εξής διαδικασία: χοληστερόλη, χολικά άλατα και διάφορα λιπίδια σχηματίζουν μικκύλια τα οποία περνάνε από τα εντερικά κύτταρα, διασπώνται και τελικά σχηματίζουν τα χυλομικρά που εισέρχονται στο λεμφικό σύστημα.

Ρύθμιση της βιοσύνθεσης: α) από τα επίπεδα της εξωγενούς προσλαμβανόμενης χοληστερόλης (αντιστρόφως ανάλογα) και β) με τη δράση του συστήματος της SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein). (*Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*).

3.2.2 Λιπαρά οξέα

Τα λιπαρά οξέα είναι μονοκαρβοξυλικά οξέα με μια αλειφατική αλυσίδα, η οποία μπορεί να είναι κορεσμένη, μονοακόρεστη ή πολυακόρεστη ανάλογα με τον αριθμό των διπλών δεσμών της αλυσίδας. Αποτελούν σημαντικές πηγές ενέργειας που με τη διαδικασία της β-οξειδωσης αποδίδουν ακετυλο-συνένζυμοA που εισέρχεται στον κύκλο του Krebs. Επίσης από το ακετυλο-συνένζυμοA ξεκινά η βιοσύνθεσή τους. (*Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*).

3.2.3 Τριγλυκερίδια

Πρόκειται για γλυκερόλη εστεροποιημένη με τρία λιπαρά οξέα. Αποτελούν το 95% του αποθηκευμένου λίπους στους ιστούς. Μεταφέρονται στον οργανισμό με τη μορφή VLDL και χυλομικρών (*Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*).

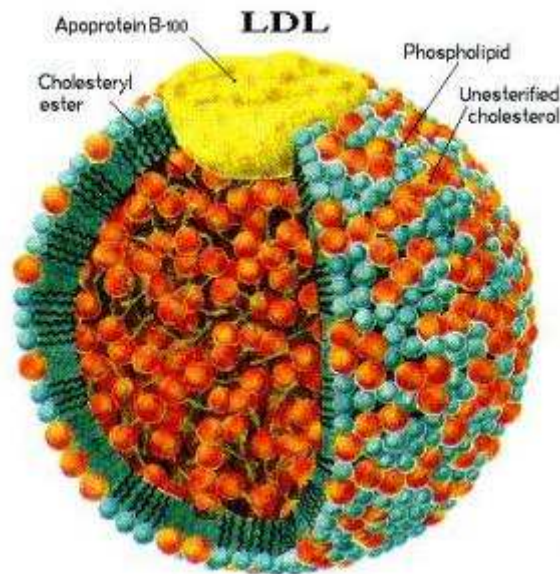
4. Η ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ LDL

Η LDL είναι μία από τις πέντε ή έξι κύριες λιποπρωτεΐνες στον ορό του ανθρώπου που με σειρά πυκνότητας είναι οι εξής: χυλομικρά, VLDL, LDL, IDL, HDL, LP(a).

Η LDL αποτελείται από 8% χοληστερόλη, 22% φωσφολιπίδια, 22% απολιποπρωτεΐνες, 6% τριγλυκερίδια, 42% εστέρες της χοληστερόλης. Τα συστατικά της LDL είναι διαταγμένα με συγκεκριμένο τρόπο στο σχηματισμό που εξασφαλίζουν στην λιποπρωτεΐνη την ικανότητα να μεταφέρεται στον ορό του αίματος και γενικότερα στα υδατικά διαμερίσματα του οργανισμού. Η διάταξη των συστατικών (εικόνα 3) που καθιστά την LDL υδατοδιαλυτή είναι η ακόλουθη: εσωτερικά είναι τα υδρόφοβα μόρια των τριγλυκεριδίων (με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στο μόριο τους-κύρια λινολεϊκό οξύ) και των εστέρων της χοληστερόλης (περίπου 1500 μόρια), ενώ εξωτερικά βρίσκονται μη εστεροποιημένη χοληστερόλη, τα αμφιπαθή μόρια των φωσφολιπιδίων και το μόριο της απολιποπρωτεΐνης (που είναι το πρωτεϊνικό μέρος της λιποπρωτεΐνης). Σε κάθε δομή LDL υπάρχει ένα μόριο αποπρωτεΐνης B-100 (apoB-100).

Η λιποπρωτεΐνη LDL είναι ο κύριος φορέας χοληστερόλης στον οργανισμό, δεδομένου ότι περιέχει το 70% περίπου της ολικής ποσότητας της χοληστερόλης που κυκλοφορεί στο πλάσμα.

Η περαιτέρω διάκριση των σωματιδίων LDL βάσει πυκνότητας και μεγέθους δίνει τις LDL-B, LDL-A και LDL-I (intermediate). Η LDL B είναι χαμηλότερης πυκνότητας αλλά μεγαλύτερης επικινδυνότητας όσον αφορά την πρόκληση στεφανιαίας νόσου συγκριτικά με την LDL A. Η επικινδυνότητα οφείλεται στην ευκολία που έχουν τα μικρότερα σωματίδια να διεισδύουν στο ενδοθήλιο. Η LDL I έχει ενδιάμεσα χαρακτηριστικά των A, B με μέγεθος σωματιδίων συγκρίσιμο (26nm) των φυσιολογικών κενών του ενδοθηλίου (σχεδόν ισομεγέθους) (*Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*).



Εικόνα 3 Η δομή της LDL Περιφερειακά της λιποπρωτεΐνης βρίσκονται τα αμφιπαθή μόρια μη εστεροποιημένης χοληστερόλης, φωσφολιπιδίων και του μορίου της αποπρωτεΐνης B100. Στον πυρήνα βρίσκονται τα υδρόφοβα μόρια των εστέρων της χοληστερόλης. Η διάταξη αυτή των μορίων καθιστά δυνατή τη μεταφορά υδρόφοβων μορίων διαμέσου υδατικών διαμερισμάτων (<http://foodspace.wordpress.com/2008/05/27/>).

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της LDL παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 6 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της LDL

Πυκνότητα	1,019-1,063 g/dl
Μοριακό βάρος	2.75×10^6 Da
Διάμετρο σωματιδίων	19-23 nm
Αναλογία λιπιδίων/απολιποπρωτεϊνών	80:20
Κατά την ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη, οξική κυτταρίνη, πολυακρυλαμίδιο και σε pH 8,6 η LDL εμφανίζει το πρότυπο ηλεκτροφόρηση των β-σφαιρινών	

Η LDL προέρχεται από την VLDL. Η τελευταία περιέχει μεγάλο αριθμό τριγλυκεριδίων τα οποία με τη δράση ενός ενζύμου που βρίσκεται στο ενδοθήλιο των αγγείων, της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, χάνουν δύο λιπαρά οξέα. Σταδιακά η VLDL με την απώλεια τριγλυκεριδίων μεταπίπτει σε LDL.

5. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών διακρίνεται σε ενδογενή στον οποίο συμβαίνει βιοσύνθεση και στον εξωγενή στον οποίο τα συστατικά προσλαμβάνονται με τη διατροφή. Συνοπτικά αναφέρονται τα βασικά σημεία κάθε οδού.

5.1 Εξωγενής οδός

Στα εντεροκύτταρα, τριγλυκερίδια και χοληστερόλη αθροίζονται στα υπάρχοντα χυλομικρά. Συσσωματώνονται στο σύμπλεγμα Golgi, εξωκυττάρωνονται και εισέρχονται στην κυκλοφορία. Αποκτούν από την HDL τις ApoC & E και με την ενεργοποίηση της LPL (λιποπρωτεϊνική λιπάση) υδρολύονται τα τριγλυκερίδια. Τα λιπαρά οξέα που ελευθερώνονται δεσμεύονται από την αλβουμίνη που τα αποδίδει στα μυϊκά κύτταρα ή στα λιποκύτταρα. Αντίθετη πορεία, προς την HDL ακολουθούν τα φωσφολιπίδια και η ApoA. Το κατάλοιπο των χυλομικρών αναγνωρίζεται από τα ηπατοκύτταρα, ενδοκυττάρωνεται και ακολούθως υδρολύεται στα λυσοσωμάτα. Η χοληστερόλη που ελευθερώνεται μπορεί να δώσει χολικά άλατα, να μετατραπεί σε εστέρα και να αποθηκευθεί ή τέλος να ενσωματωθεί σε μια λιποπρωτεΐνη.

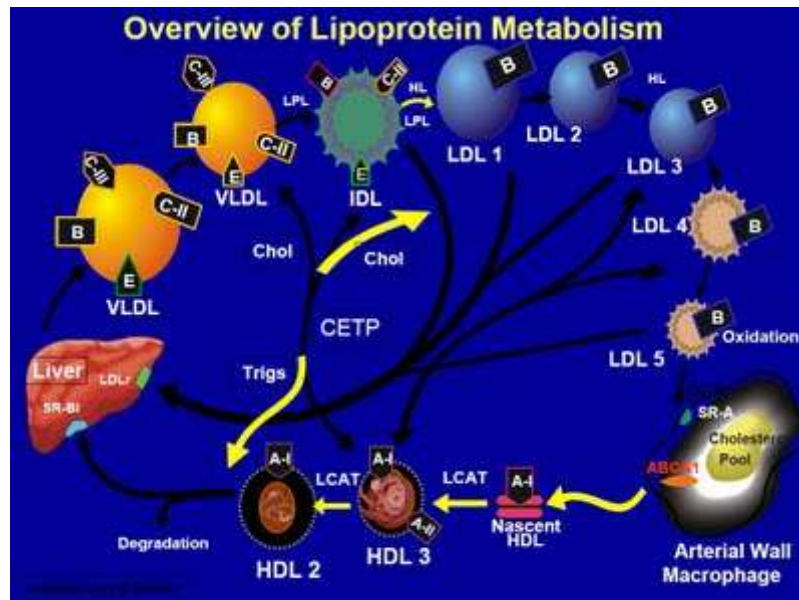
5.2 Ενδογενής οδός

Στην ενδογενή οδό, τα συντιθέμενα τριγλυκερίδια και χοληστερόλη συσσωματώνονται στο σύμπλεγμα Golgi, σχηματίζουν VLDL και βγαίνουν στην κυκλοφορία. Από την HDL λαμβάνει την ApoC, ενεργοποιείται η LPL και υδρολύονται τα τριγλυκερίδια όπως αναφέρθηκε προηγουμένως αλλά με βραδύτερο ρυθμό. Το παράδοξο είναι ότι η ApoC επιστρέφει στην HDL, οπότε, σχηματίζονται τα κατάλοιπα της VLDL που είτε προσλαμβάνονται από το ήπαρ, είτε σχηματίζουν τις πυκνότερες IDL που και αυτές προσλαμβάνονται από τα ηπατοκύτταρα (το 50%). Φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και αποπρωτεΐνες από τις IDL μεταφέρονται στις HDL, μπορούν, όμως, να σχηματίσουν και de novo HDL. Εστέρες χοληστερόλης μεταφέρονται από την HDL στην LDL. Το καθαρό αποτέλεσμα από το συνδυασμό της λιπόλυσης και ανταλλαγής των εστέρων της χοληστερόλης είναι η αντικατάσταση τριγλυκεριδίων του πυρήνα της VLDL με εστέρες χοληστερόλης. Η IDL υπόκειται σε περαιτέρω υδρόλυση και οι αποπρωτεΐνες (εκτός της B-100) μεταφέρονται σε άλλες λιποπρωτεΐνες. Τέλος, σχηματίζεται η LDL.

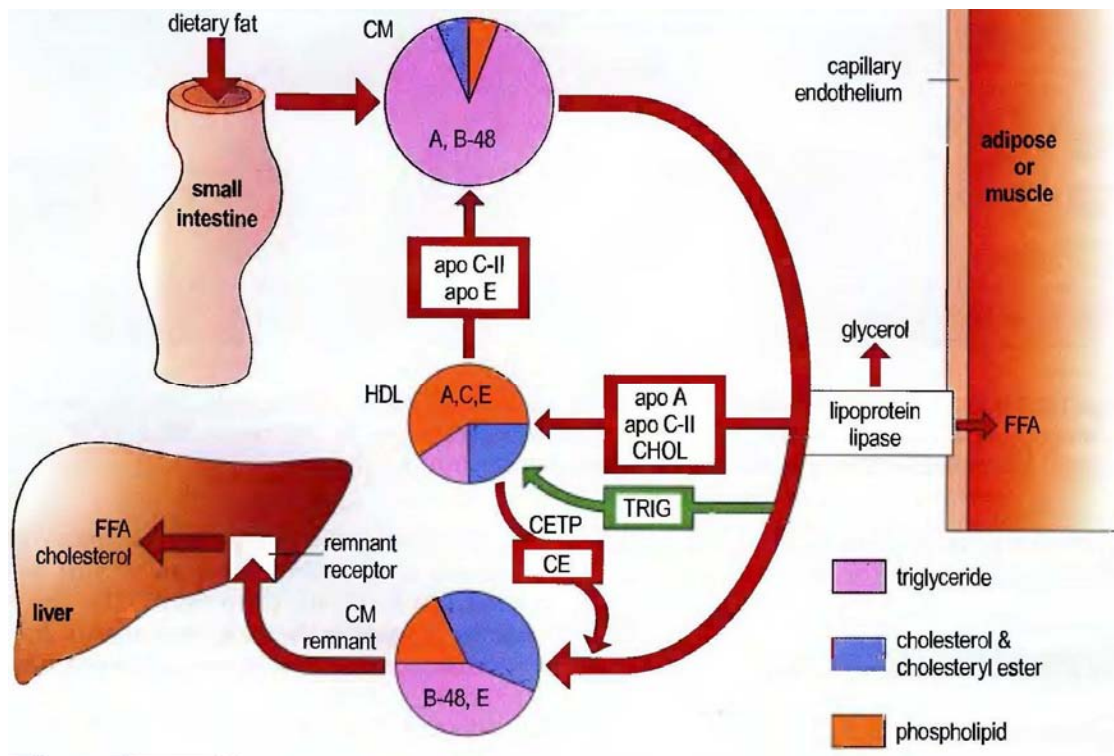
5.3 Η αντίστροφη οδός της HDL

Οι λιποπρωτεΐνες HDL εκκρίνονται από το ήπαρ και το έντερο σε δισκοειδή μορφή με βασική σύσταση φωσφολιπίδια και Apo A-I. Κατά την εξωκυττάρωσή τους εμπλουτίζονται με τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και αποπρωτεΐνες και αποκτούν σφαιρικό σχήμα. Η προσλαμβανόμενη συνεχώς από τις μεμβράνες χοληστερόλη εστεροποιείται με τη δράση της LCAT (ακυλοτρανσφεράση της λεκιθίνης-χοληστερόλης). Η τύχη της HDL μπορεί να είναι η ακόλουθη: α) αποδίδει εκλεκτικά τους εστέρες χοληστερόλης στα ηπατοκύτταρα και επιστρέφει στην κυκλοφορία για να συνεχίσει την μεταφορά, β) αποδίδει τους εστέρες της χοληστερόλης στις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν την ApoB-100 (VLDL, IDL, LDL) με τη βοήθεια της τρανσφεράσης των εστέρων της χοληστερόλης CETP (Cholesteryl ester

transfer protein), οι οποίες στη συνέχεια προσλαμβάνονται από το ήπαρ, γ) η ApoE της HDL αναγνωρίζεται από ηπατικούς υποδοχείς και προσλαμβάνεται όπου αποδίδει τα λιπίδια που μεταφέρει (*Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*).



Εικόνα 4. Επισκόπηση του μεταβολισμού. Στο ήπαρ «πακετάρονται» συντιθέμενα λιπίδια ή λιπίδια που προέρχονται από το μεταβολισμό με αποπρωτεΐνες. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός της VLDL η οποία αποδίδεται στην κυκλοφορία. Όσο βρίσκεται στην κυκλοφορία προσλαμβάνει χοληστερόλη ενώ αντιθέτως τα τριγλυκερίδια που φέρει υδρολύονται από την ενεργοποίηση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης. Η λιποπρωτεϊνική λιπάση LPL είναι ένζυμο που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων και ενεργοποιείται από την Apo C η οποία αρχικά μεταφέρεται από την HDL στην VLDL και κατόπιν επιστρέφει στην HDL. Αποτέλεσμα των προηγούμενων διεργασιών είναι ο σχηματισμός των IDL που και αυτή με περαιτέρω λιπόλυση των τριγλυκεριδίων μεταπίπτει στην LDL. Η οξειδωμένη μορφή της LDL σε καταστάσεις φλεγμονής των αγγείων έχει ως επακόλουθο τη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας. Ο προστατευτικός ρόλος της HDL έγκειται στο γεγονός ότι συγκεντρώνει χοληστερόλη και άλλα λιπίδια από την κυκλοφορία του αίματος και τα αποδίδει στο ήπαρ όπου διασπώνται ή ανακυκλώνονται (<http://drbganimalpharm.blogspot.com/2009/09/death-band-sddl-on-lipoprotein.html>).



Εικόνα 5 Επισκόπηση της εξωγενούς οδού του μεταβολισμού. Τα προσλαμβανόμενα με τη διατροφή λίπη μετά την απορρόφησή τους από το λεπτό έντερο σχηματίζουν τα χυλομικρά που εισέρχονται στην κυκλοφορία. Τα χυλομικρά είναι πλούσια σε τριγλυκερίδια και περιέχουν σε μικρότερο ποσοστό φωσφολιπίδια και χοληστερόλη με εστέρες της. Οι αποπρωτεΐνες που περιέχει είναι οι Apo- A και B-48. Όσο βρίσκεται στην κυκλοφορία προσλαμβάνει από την HDL τις Apo C-II και E. Από την Apo C-II ενεργοποιείται η λιπάση LPL που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια του ενδοθηλίου των τριχοειδών με αποτέλεσμα την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων. Ελεύθερα λιπαρά οξέα αποδίδονται για χρήση στα μυϊκά κύτταρα ή για αποθήκευση στον λιπώδη ιστό. Παράλληλα η Apo C-II επιστρέφει στην HDL, μαζί με την Apo-A, χοληστερόλη και τριγλυκερίδια. Αντίθετα εστέρες χοληστερόλης μεταφέρονται προς τα χυλομικρά με τη βοήθεια του ενζύμου τρανσφεράση των εστέρων χοληστερόλης (CETP). Τα χυλομικρά μετά από τις προηγούμενες διεργασίες έχουν χάσει σημαντικό μέρος των λιπιδίων που μετέφεραν με αποτέλεσμα να ονομάζονται πλέον υπολείμματα χυλομικρών. Οι αποπρωτεΐνες που περιέχονται στα υπολείμματα είναι οι Apo B-48, Apo E ενώ στα λιπίδια έχει ελαττωθεί σημαντικά το ποσοστό των τριγλυκεριδίων και έχει αυξηθεί σημαντικά των εστέρων χοληστερόλης, της χοληστερόλης και των φωσφολιπιδίων. Τα υπολείμματα χυλομικρών αναγνωρίζονται από κατάλληλους υποδοχείς στο ήπαρ έτσι ώστε καθίσταται δυνατή η χρήση των μεταφερόμενων συστατικών των υπολειμμάτων από το ήπαρ <http://cardiologydatabase.blogspot.com/2009/04/lipoprotein-metabolism.html>

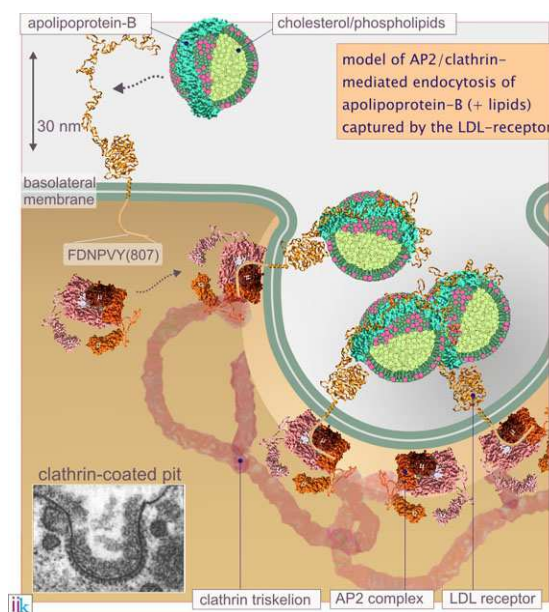
6. Το μονοπάτι της LDL

Η LDL αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και ενδοκυτταρώνεται (εικόνες 6,7). Βασικά η apoB100 είναι αυτή που αναγνωρίζεται και δεσμεύεται στον υποδοχέα. Οι υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη είναι οργανωμένοι σε εσοχές οι οποίες περιέχουν κλαθρίνη. Υπάρχουν σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού με εξαίρεση των

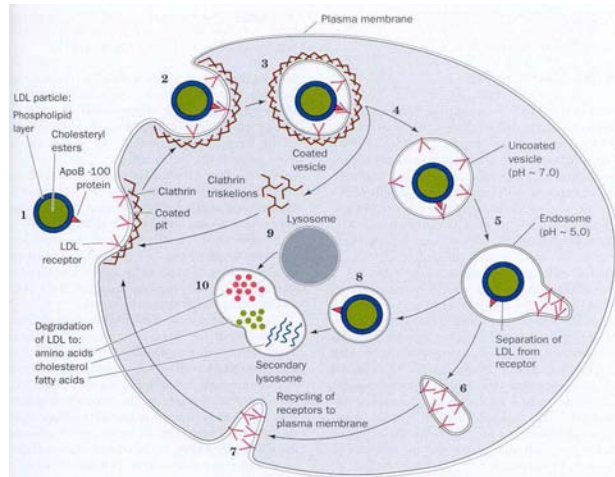
ερυθροκύτταρα. Παρ' όλα αυτά το 70% της πρόσληψης της LDL περίπου γίνεται στα ηπατοκύτταρα. Η διάταξη αυτή των υποδοχέων συμβάλλει στην ευκολότερη ενδοκύττωση των σωματιδίων της LDL που οδηγεί σε σχηματισμό ενδοσωμάτων. Στα ενδοσώματα, ο υποδοχέας υφίσταται αλλαγές στη διαμόρφωση και αποσυνδέει την LDL εξαιτίας του χαμηλού pH που επικρατεί στο ενδόσωμα. Ο υποδοχέας επιστρέφει στην μεμβράνη ή πρωτεολύεται, ενώ η LDL οδεύει στα λυσοσώματα. Ακολουθεί πρωτεόλυση της Apo B100 και υδρόλυση των εστέρων χοληστερόλης. Ο υποδοχέας, όταν οδηγείται στην μεμβράνη που έχει ουδέτερο pH, επανακτά τη λειτουργική διαμόρφωση του.

Η ελεύθερη χοληστερόλη που συγκεντρώνεται στο κύτταρο ρυθμίζει αρνητικά α) τη βιοσύνθεση υποδοχέων, β) την βιοσύνθεση της χοληστερόλης δρώντας στην HMG-Co αναγωγή. Αντίθετα, αυξάνει την εστεροποίηση της χοληστερόλης δρώντας στο ένζυμο ACAT.

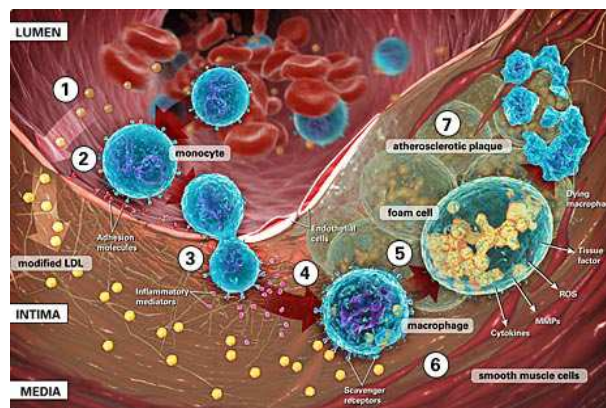
Η LDL στα διάφορα κύτταρα προσλαμβάνεται και από άλλους υποδοχείς (υποδοχείς υπολειμμάτων) καθώς και με πινοκύττωση. Ειδικά στα μακροφάγα η υπερβολική συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης αυξάνει των όγκο τους και καθώς αποτελούν συστατικό σε φλεγμονές των αγγείων, οδηγούν σε σχηματισμό αθηρωματικών πλακών (εικόνα 8) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*).



Εικόνα 6. Η εντόπιση του υποδοχέα και το πρόσδεμα. Οι υποδοχείς της LDL αθροίζονται σε καθορισμένες εσοχές της κυτταρικής μεμβράνης που καλύπτονται από κλαθρίνη. Η αποπρωτεΐνη B 100 είναι το τμήμα της LDL που αναγνωρίζεται και δεσμεύεται από τους υποδοχείς. Όταν η ομάδα των υποδοχέων που βρίσκεται σε κάποια από τις εσοχές προσδέσουν την LDL, ενδοκυτταρώνονται, διαδικασία που διευκολύνεται από την εντόπισή τους στις συγκεκριμένες περιοχές της μεμβράνης. Κάτω αριστερά φαίνεται εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που εμφανίζει εσοχή καλυμμένη με κλαθρίνη στην οποία εντοπίζονται οι υποδοχείς της LDL (European Institute of Chemistry and Biology (IECB), University of Bordeaux-1) <http://www.cellbiol.net/cbe/illustrations.php>.



Εικόνα 7. Ενδοκύττωση υποδοχέα-LDL και η ανακύκλωση του υποδοχέα. Η πρόσδεση της LDL μέσω της Apo B100, στον υποδοχέα, ακολουθείται από την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα μαζί με το πρόσδεμα. Η πτώση του pH (pH≈5) από τη δράση αντλιών H⁺ στο ενδόσωμα, προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση του υποδοχέα που οδηγεί στην απελευθέρωση του προσδέματος. Το πρόσδεμα κατόπιν υφίσταται αποδόμηση με τη δράση των ενζύμων του λυσοσώματος, ενώ οι υποδοχείς ανακυκλώνονται και μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη στις περιοχές που είναι καλυμμένες με κλαθρίνη (Henry Wormser on line lessons).



Εικόνα 8. Δημιουργία αθηρωματικής πλάκας σε φλεγμαίνουσα θέση αγγείου. Στις θέσεις των αγγείων που εκδηλώνεται φλεγμονή, χημειοτακτικές ουσίες προσελκύουν μονοκύτταρα και μακροφάγα όπου και αθροίζονται. Σε περιπτώσεις που υπάρχουν υψηλά επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα, υψηλές ποσότητες LDL διαπερνούν το ενδοθήλιο στα σημεία φλεγμονής (μη ειδική συσσώρευση). Στα σημεία φλεγμονής γενικά υπάρχει έντονη παραγωγή χημειοτακτικών και οξειδωτικών μορίων όπως οι ενεργές ρίζες του οξυγόνου – ROS. Οι έντονα οξειδωτικές συνθήκες συμβάλλουν στην οξείδωση των λιποπρωτεϊνών LDL. Η πρόσληψη των λιποπρωτεϊνών LDL από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα μέσω φαγοκυττάρωσης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του όγκου των κυττάρων και την μετάπτωσή τους σε κύτταρα που ονομάζονται αφρώδη. Τα αφρώδη κύτταρα που συνεχίζουν τη πρόκληση φλεγμονής και συμβάλλουν στη δημιουργία ενός φαύλου κύκλου άθροισης αφρωδών κυττάρων, εγκλωβίζονται στις συγκεκριμένες θέσεις των αγγείων και σχηματίζουν αθηρωματικές πλάκες.

7. Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΗΣ LDL

Η πρωτεΐνη που σχηματίζει τον υποδοχέα της LDL αποτελείται από 839 αμινοξέα (αα) και υφίσταται μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις στο σύμπλεγμα Golgi όπου σχηματίζεται η γλυκοπρωτεΐνη υποδοχέας. Το μοριακό βάρος της πρόδρομης πρωτεΐνης είναι 120 kDa που αυξάνεται σε 160 kDa στον ώριμο υποδοχέα.

Συνοπτικά η διαδικασία έχει ως εξής: μετά τη σύνθεσή της (120 kDa), περνά στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ) όπου χάνει την αλληλουχία οδηγό (21 αα). Μέσα σε 30 λεπτά της ώρας μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi όπου γλυκοζυλιώνεται. Συγκεκριμένα προστίθενται δύο ολιγοσακχαριδικές αλυσίδες σε δύο μονάδες ασπαραγίνης (Asn, N) (N- γλυκοζυλίωση), ενώ σε μονάδες σερίνης (Ser, S) συνδέονται 18 ολιγοσακχαριδικές αλυσίδες (O-γλυκοζυλίωση). Ακολούθως η πρωτεΐνη-υποδοχέας μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη, σε συγκεκριμένες περιοχές-εσοχές που είναι καλυμμένες με κλαθρίνη.

Ο υποδοχέας επιτελώντας τη λειτουργία του δεσμεύει το πρόσδεμά του, ενδοκυτταρώνεται, ακολούθως ελευθερώνει το πρόσδεμα και τελικά επανέρχεται στη μεμβράνη για να συνεχίσει τη λειτουργία του. Με άλλα λόγια ένας υποδοχέας μπορεί να έχει συντεθεί *de novo* ή να έχει ανακυκλωθεί (Hobbs et al.,1992), (*Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*).

7.1 Η δομή του υποδοχέα

Περιοχή πρόσδεσης λιποπρωτεϊνών: αποτελείται από επτά επαναλήψεις των σαράντα αμινοξέων (40αα) που είναι ομόλογες της πρωτεΐνης του συμπληρώματος C9. (Südhof et al.1985, *Science*228: 815-822) Κάθε επανάληψη περιέχει έξι ομάδες κυστεΐνης (Cys, C) που σχηματίζουν τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς (-S-S-). Το C-τελικό άκρο κάθε επανάληψης περιέχει την αρνητικά φορτισμένη τριπλέτα αμινοξέων SDE (Ser, Asp, Glu) που είναι σημαντική για τη δέσμευση του προσδέματος.

Οι επαναλήψεις 2-7 συνδέονται με το N-τελικό άκρο της απόπρωτεΐνης Aro-B, ενώ σε μικρότερο βαθμό συνδέεται μέσω της επανάληψης 5 με την Aro-E.

Περιοχή ομόλογη με το πρόδρομο EGF: αποτελείται από 400 αα που έχουν ομολογία κατά 33% με τον πρόδρομο ανθρώπινο επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF). (Südhof et al.1985, *Science*228: 815-822)

Συγκεκριμένα υπάρχουν τρεις περιοχές των 40αα έκαστη, ομόλογες με τον πρόδρομο hEGF. Αυτές οι περιοχές είναι πλούσιες σε ομάδες κυστεΐνης (Cys). Οι δύο πρώτες περιοχές είναι γειτονικές. Η τρίτη ομόλογη περιοχή χωρίζεται από τις άλλες δύο με την παρεμβολή μιας αλληλουχίας 280 ομάδων. Αυτή η αλληλουχία περιέχει πέντε αντίγραφα του συντηρημένου μοτίβου YWTD (Tyr, Trp, Thr, Asp). Το κάθε μοτίβο απέχει από το επόμενο 40-60 αα.

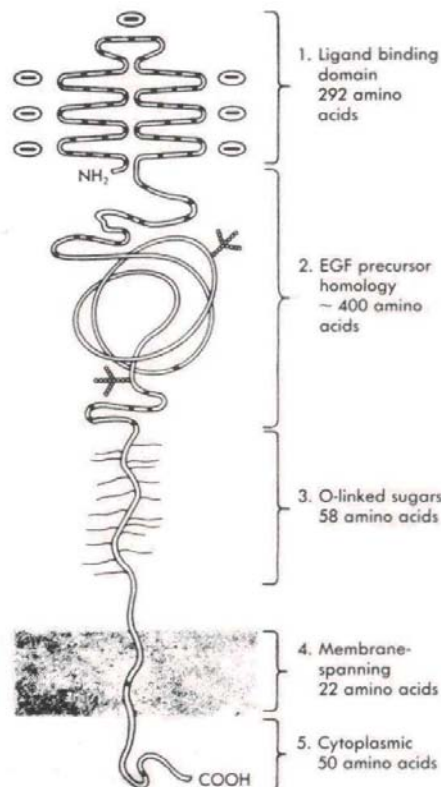
Το τμήμα αυτό του υποδοχέα παίζει ρόλο στην αποδέσμευση του προσδέματος στα ενδοσώματα κατά την ανακύκλωση του υποδοχέα.

Επίσης συμβάλλει στον κατάλληλο προσανατολισμό της περιοχής πρόσδεσης του υποδοχέα ώστε να δεχθεί το προσδέμα. (Davis et al. 1987, Nature 326: 760-765)

Η περιοχή γλυκοζυλίωσης: περιέχει 58 αα πλούσια σε κατάλοιπα σερίνης (Ser) και θρεονίνης (Thr) που προσφέρονται για σημεία Ο-γλυκοζυλίωσης. (Davis et al. 1986, J Biol Chem 261: 2828-2838).

Διαμεμβρανική περιοχή: αποτελείται από 22 υδρόφοβα αμινοξέα

Κυτταροπλασματική περιοχή: συγκροτείται από 50 αα και έχει σημαντικό ρόλο στην ενδοκύττωση του υποδοχέα και στην τοποθέτηση του σε συγκεκριμένες περιοχές στην κυτταρική μεμβράνη (καλυμμένες με κλαθρίνη). (Chen et al. 1990, J Biol Chem 265: 3116-3123)



Εικόνα 9 LDLR. Διάγραμμα του υποδοχέα της LDL. Η περιοχή 1 αντιστοιχεί στην περιοχή πρόσδεσης της LDL που αποτελείται από 292 αμινοξέα. Η περιοχή αυτή συγκροτείται από επτά επαναλήψεις των 40 αμινοξέων. Η κάθε επανάληψη έχει στο καρβοξυ-τελικό άκρο την αρνητικά φορτισμένη τριπλέτα αμινοξέων Ser, Asp, Glu, σημαντική για την πρόσληψη του προσδέματος (Apo B 100). Η Apo E μπορεί να δεσμευτεί μέσω της 5^{ης} επανάληψης. Η περιοχή 2 αποτελείται περίπου από 400 αμινοξέα και είναι ανάλογη με το πρόδρομο μόριο του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα - hEGF. Η περιοχή 2 περιέχει τρεις περιοχές ομόλογες του hEGF που παίζουν ρόλο στον προσανατολισμό του υποδοχέα ώστε η περιοχή 1 να μπορεί να επιτελέσει τη λειτουργία της. Επίσης παίζουν ρόλο στην αποδέσμευση του προσδέματος από τον υποδοχέα στα ενδοσώματα. Η περιοχή 3 αποτελείται από 58 αα πλούσια σε μονάδες σερίνης και θρεονίνης. Αποτελεί περιοχή Ο-γλυκοζυλίωσης. Η περιοχή 4 είναι η διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα σε α -έλικα που

αποτελείται από 22 αα. Η περιοχή 5 είναι το ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα μεγέθους 50 αα, που αποτελεί το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Παίζει ρόλο στην εντόπιση του υποδοχέα στις περιοχές που είναι καλυμμένες με κλαθρίνη και στην ενδοκύτωση του υποδοχέα (www.campbell.edu).

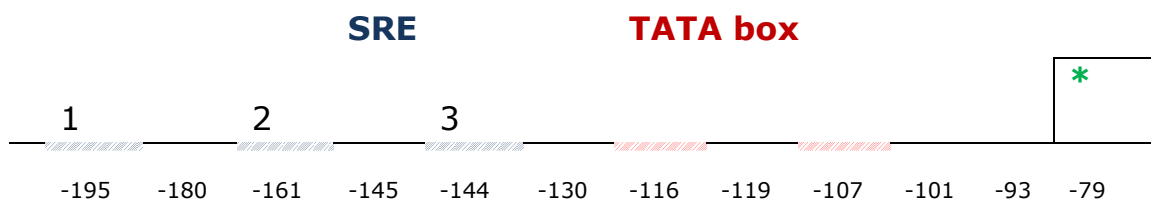
8. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ LDL

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (low density lipoprotein receptor, LDL-R) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 στον p βραχίονα (19p 13.1-13.3) και έχει μέγεθος 45kb. Περιέχει 18 εξόνια.

Εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα σε διαφορετικό όμως βαθμό. Σε χαμηλά επίπεδα εκφράζεται στο λεπτό και παχύ έντερο, στο ήπαρ. Σε μέτρια επίπεδα: στον οισοφάγο, πάγκρεας, προστάτη, πνεύμονες, λάρυγγα. Σε υψηλά επίπεδα εκφράζεται τέλος σε: στόμα, επινεφρίδια, τραχεία. (www.umd.be/LDLR)

8.1 Ο προαγωγέας

Ανοδικά του γονιδίου και σε απόσταση περίπου 250bp, βρίσκεται ο προαγωγέας του γονιδίου που αποτελείται από δύο περιοχές πλούσιες σε AT (TATA box), στις οποίες προσαρμόζεται η RNA πολυμεράση II, και τρεις επαναλήψεις μεγέθους 16 νουκλεοτιδίων (nt) εκ των οποίων η δεύτερη και η τρίτη σχηματίζουν το στοιχείο ρύθμισης του γονιδίου από τα επίπεδα στερολών (SRE/sterol regulatory element).



Σχέδιο 1. Ο προαγωγέας του LDLR (Südhof et coll, Science 1985 May 17;228(4701):815-22) *σημείο έναρξης της μεταγραφής

Πίνακας 7: Οι αλληλουχίες των εξαρτώμενων από στερόλες ρυθμιστικών επαναλήψεων

#1	AAACTCCTCCTCTTGC
#2	AAAATCACCCCACTGC
#3	AAACTCCTCCCCCTGC

Με μπλε χρώμα φαίνονται τα μη συντηρημένα νουκλεοτίδια

8.2 Τα εξόνια

Το γονίδιο αποτελείται από 18 εξόνια. Στις παρακάτω γραμμές ακολουθεί μια σύντομη περιγραφή των εξονίων. Επίσης γίνεται αντιστοίχιση με περιοχές της πρωτεΐνης. (www.umd.be/LDLR)

Εξόνιο 1:	Κωδικοποιεί μια αλληλουχία οδηγό μεγέθους 21 αμινοξέων, η οποία αποχωρίζεται από την υπόλοιπη πρωτεΐνη μόλις αυτή μεταφερθεί στο ενδοπλασματικό δίκτυο
Εξόνια 2-6:	Κωδικοποιούν την περιοχή πρόσδεσης του προσδέματος, η οποία αποτελείται από επτά επαναλήψεις των σαράντα αμινοξέων έκαστη. Η κάθε επαναλαμβανόμενη αλληλουχία είναι ανάλογη με την πρωτεΐνη C9 του συμπληρώματος (Südhof et coll, <i>Science</i> 1985 May 17;228(4701):815-22)
Εξόνια 7-14	Κωδικοποιούν αλληλουχία 400 αμινοξέων, ομόλογη, σε κάποιο βαθμό, με τον πρόδρομο ανθρώπινο αυξητικό παράγοντα (EGF)
Εξόνιο 15	Κωδικοποιεί 58 αμινοξέα στην περιοχή του υποδοχέα που συνδέεται με υδατάνθρακες με Ο-δεσμούς
Εξόνιο 16 και 5' του εξονίου 17	Μεταφράζει τα 22 αμινοξέα της διαμεμβρανικής περιοχής του υποδοχέα
3' του εξονίου 17 και εξόνιο 18	Κωδικοποιεί την κυτταροπλασματική περιοχή και την 3' μη μεταφραζόμενη τελική περιοχή (3'UTR)

8.3 Το μετάγραφο

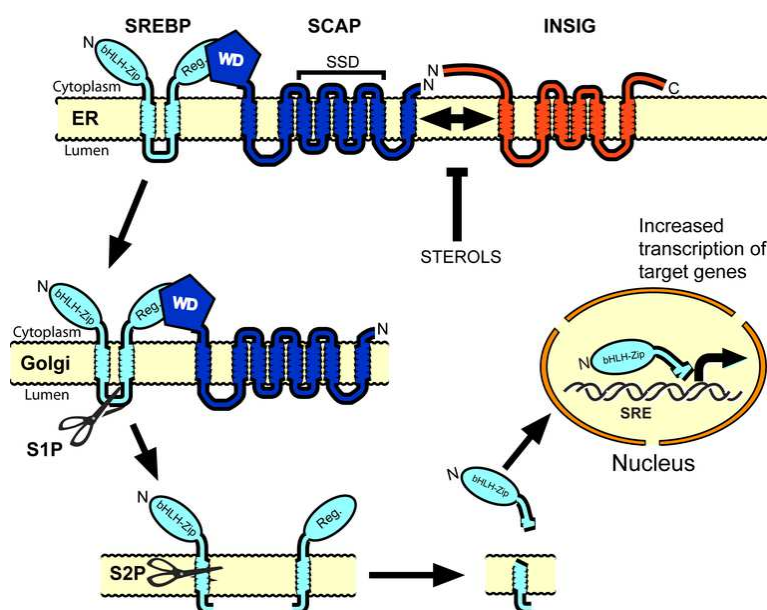
Το mRNA που προκύπτει έχει μέγεθος 5,3 kb με την κωδικοποιούσα περιοχή να είναι 2,6kb

8.4 Ρύθμιση του γονιδίου

Η μεταγραφή του γονιδίου ρυθμίζεται κύρια από τις στερόλες. Το σημείο κλειδί, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, είναι τα στοιχεία SRE στον προαγωγέα.

Απουσία στερολών, στα στοιχεία SRE προσδένεται ο μεταγραφικός παράγοντας SREBP (SRE Binding Protein). Ο μεταγραφικός παράγοντας αποτελεί το αμινοτελικό άκρο μιας πρόδρομης πρωτεΐνης, σχήματος φουρκέτας, που βρίσκεται στην πυρηνική μεμβράνη και τη μεμβράνη του ενδο-

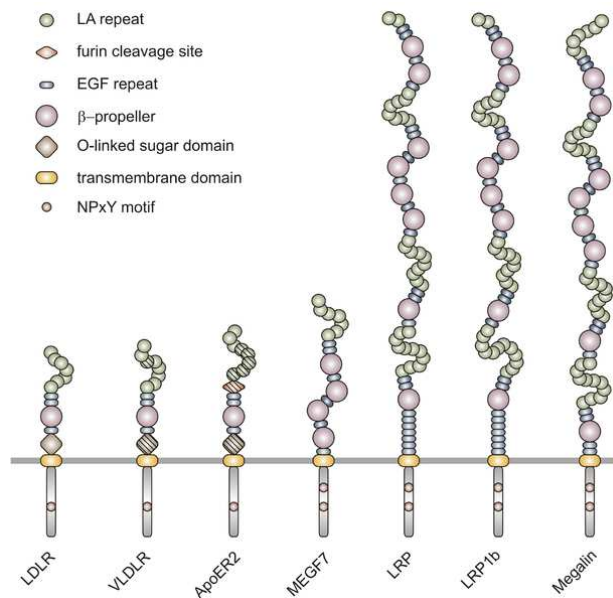
πλασματικού δικτύου. Τα δυο άκρα (N-,C-) βρίσκονται προς το κυτταρόπλασμα. Για να προκύψει ο μεταγραφικός παράγοντας δύο πράγματα χρειάζονται. Πρώτον, να πέσουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των στερολών κάτω από μια ουδό. Δεύτερον, δύο πρωτεάσες S1P, S2P (Site 1ή2 protease) να κόψουν το N-τελικό άκρο σε δύο διαφορετικά σημεία, ώστε να ελευθερωθεί το ενεργό αμινοτελικό άκρο (*Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*), (*Brown MS et al, 1997*).



Εικόνα 10 Ενεργοποίηση του SREBP. Η πρωτεΐνη SREBP-sterol regulatory element binding protein είναι ένας μεμβρανοσύνδετος μεταγραφικός παράγοντας. Βρίσκεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και στην πυρηνική μεμβράνη. Αποτελείται από μία αμινοτελική περιοχή (bHLH-zip) περίπου 480 αα, που αποτελεί το μεταγραφικό παράγοντα, μια υδρόφοβη περιοχή περίπου 80αα με δύο διαμεμβρανικές περιοχές και μια καρβοξυτελική περιοχή των 590 αα περίπου με ρυθμιστική δράση. Η SREBP με το C-τελικό άκρο συνδέεται με την SCAP-SREBP Activation Protein, η οποία είναι μια μεμβρανοσύνδετη πρωτεΐνη με δύο περιοχές. Το N-τελικό άκρο της αποτελείται από εναλλασσόμενες υδρόφοβες και υδροφιλές αλληλουχίες που διαπερνούν την μεμβράνη 8 φορές. Το C-τελικό άκρο συγκροτείται από 4 επαναλήψεις WD οι οποίες συνδέονται με την SREBP. Το αμινοτελικό άκρο της SCAP συσχετίζεται με μία άλλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη την INSIG (Insulin Induced Gene). Παρουσία στερολών η SCAP και η INSIG είναι συνδεδεμένες. Απουσία ή ένδεια στερολών αποσυνδέονται οι δύο πρωτεΐνες και πλέον η SREBP μαζί με την SCAP οδεύουν στο σύστημα Golgi. Εκεί συμβαίνει μια πρώτη πρωτεόλυση στο μέσο περίπου, της αγκύλης της πρωτεΐνης SREBP, στο σημείο 1 μεταξύ λευκίνης και σερίνης από μία πρωτεάση την S1P. Ακολουθεί σύντομα μια 2^η πρωτεόλυση από την πρωτεάση S2P στο σημείο 2 που εντοπίζεται στο μέσο της πρώτης διαμεμβρανικής περιοχής της SREBP. Αποτέλεσμα είναι η ελευθέρωση του τμήματος της SREBP που έχει δράση μεταγραφικού παράγοντα (από wikipedia).

8.5 Οικογένεια γονιδίων LDLR

Το γονίδιο LDLR έχει ομολογία 70-86% μεταξύ των θηλαστικών. Παράλληλα και στον άνθρωπο υπάρχουν γονίδια που κωδικοποιούν μεμβρανικούς υποδοχείς ανάλογους της LDL ως τα δομικά χαρακτηριστικά. Σε αυτήν την οικογένεια ανήκουν τα γονίδια που κωδικοποιούν τους υποδοχείς: VLDLR, ApoER2, LRP8, MEGF7, LDLR-related protein 1 & 1b, Megalin, gp330 (LRP2), LRP3-LRP6. Οι υποδοχείς αυτής της οικογένειας παίζουν ρόλο σε πολύ σημαντικές διαδικασίες του οργανισμού που περιλαμβάνουν την διακυτταρική σηματοδότηση κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, στη νευροδιαβίβαση μέσω υποδοχέων NMDA, στην πρόσληψη και ενεργοποίηση των στεροειδών ορμονών, την ενεργοποίηση της δράσης πρωτεάσης της κυτταρικής μεμβράνης και φυσικά στο μεταβολισμό των λιπιδίων (Herz J.,2001, 2003).



Εικόνα 11 Οικογένεια υποδοχέων LDLR. Παρατίθενται στη σειρά μέλη της οικογένειας των υποδοχέων. Στην εικόνα φαίνονται τα κοινά σημεία στη δομή τους (από wikipedia).

9. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Το γονίδιο του υποδοχέα της LDL είναι σχετικά μεγάλο γονίδιο. Ως αποτέλεσμα ο αριθμός των μεταλλάξεων ξεπερνά τις 1700. Στους πίνακες 8 και 9, που ακολουθούν, παρουσιάζονται συνοπτικά τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά των μεταλλάξεων που εμφανίζονται στο γονίδιο του υποδοχέα.

Πίνακας 8 ([http:// www.ucl.ac.uk/ldlr/LOVDv.1.1.0/](http://www.ucl.ac.uk/ldlr/LOVDv.1.1.0/))

Στατιστικά στοιχεία των παρατηρηθέντων τροποποιήσεων του γονιδίου του LDLR	
Απαλοιφές τμημάτων (>2nt)	336 (19,3%). Εκ των οποίων 241 (71,7%) μοναδικές.
Ενθέσεις	74 (4,3%). Εκ των οποίων 69 (93,2%) μοναδικές.
Διπλασιασμοί	64 (3,7%). Εκ των οποίων 52 (81,3%) μοναδικές.
Αναστροφές	1 μοναδική (0,1%)
Ένθεση απαλοιφή ταυτόχρονα με	14 (0,8%). Εκ των οποίων 13 (92,9%) μοναδικές.
Αντικαταστάσεις	1280 (73,6%) Εκ των οποίων: Παρερμηνεύσιμες: 933 (72,9%) Ανερμηνεύσιμες: 176 (13,8%) Λοιπές: 171 (13,4%) Από αυτές 774 (60,5%) μοναδικές.
Συνολικές μεταλλάξεις	1739

Πλήθος και συχνότητα πολυμορφισμών ανά εξόνιο			
Εξόνιο 1	79 (4,5%)	Εξόνιο 10	110 (6,3%)
Εξόνιο 2	82 (4,7%)	Εξόνιο 11	77 (4,4%)
Εξόνιο 3	124 (7,1%)	Εξόνιο 12	96 (5,5%)
Εξόνιο 4	338 (19,4%)	Εξόνιο 13	72 (4,1%)
Εξόνιο 5	71 (4,1%)	Εξόνιο 14	100 (5,8%)
Εξόνιο 6	91 (5,2%)	Εξόνιο 15	41 (2,4%)
Εξόνιο 7	105 (6%)	Εξόνιο 16	38 (2,2%)
Εξόνιο 8	106 (6,1%)	Εξόνιο 17	60 (3,5%)
Εξόνιο 9	145 (8,3%)	Εξόνιο 18	4 (0,2%)

9.1 Ποιοτικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των μεταλλάξεων

Τάξη 1: οι μεταλλαγές αυτής της κατηγορίας επιδρούν στην σύνθεση του υποδοχέα. Ουσιαστικά δεν παράγεται πρωτεΐνη. Πρόκειται για ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις, μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης ή προβλήματος στον υποκινητή.

Τάξη 2: εμποδίζουν την κανονική μεταφορά της πρωτεΐνης στο σύμπλεγμα Golgi. Αποτέλεσμα είναι η καταστροφή της πρωτεΐνης.

Τάξη 3: εμποδίζουν την πρόσληψη του προσδέματος (μη λειτουργική η περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα).

Τάξη 4: μεταλλαγές που εμποδίζουν την εσωτερίκευση του υποδοχέα με το πρόσδεμα –μη σωστή εντόπιση του υποδοχέα στις περιοχές με κλαθρίνη .

Τάξη 5: εμποδίζεται η κανονική ανακύκλωση του υποδοχέα (αποτέλεσμα είναι η διαρκής σύνθεση νέων) (Hobbs et al. 1992).

Πίνακας 10. Ποιοτικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Το διάγραμμα εμφανίζει με X το σημείο που επιδρά η μετάλλαξη. Με κίτρινο χρώμα επιτελούνται φυσιολογικά οι διεργασίες (προσαρμογή από Αρχές Ιατρικής Γενετικής εκδ. Πασχαλίδη σελ.163)

Τάξη μετάλλαξης	Σύνθεση	Μεταφορά από ΕΔ στο Golgi	Πρόσδεση της LDL	Συγκέντρωση στις καλυμμένες περιοχές	Ανακύκλωση
1.	X				
2.		X			
3.			X		
4.				X	
5.					X

10. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής είναι η προτυποποίηση σε κλινικό επίπεδο μιας μεθοδολογίας διερεύνησης μοριακών αλλαγών (μεταλλάξεων) στο γονίδιο του υποδοχέα της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας που ενοχοποιείται για την εμφάνιση οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας. Η μεθοδολογία επαληθεύτηκε με μοριακό έλεγχο σε ασθενείς με κλινικές ενδείξεις υπερχοληστερολαιμίας, ανευρίσκοντας τη συχνότητα μεταλλαγών σε δύο εξόνια του γονιδίου LDLR τα οποία όπως έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες- δημοσιεύσεις, εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό μεταλλαγών στον Ελληνικό πληθυσμό στην Βορειοδυτική Ελλάδα (*Miltiadous G. et al., 2001*).

Β' Μέρος

11. Υλικά και μέθοδοι

ΑΣΘΕΝΕΙΣ: Στην πτυχιακή αυτή εξετάσθηκαν 26 ασθενείς από την Ήπειρο που ήταν υπό παρακολούθηση στο εξωτερικό ιατρείο λιπιδίων του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του κ. Μωυσή Ελισάφ. Ως δείγματα αρνητικού ελέγχου επίσης εξετάσθηκαν 6 άτομα χωρίς εργαστηριακά ευρήματα δυσλιπιδαιμίας.

Οι τεχνικές και οι διεργασίες περιλαμβάνουν: απομόνωση και εκχύλιση DNA, ενίσχυση PCR, καθαρισμός των προϊόντων ενίσχυσης από πήκτωμα αгарόζης και αλληλούχιση κατά Sanger στον αναλυτή Li-COR 4200.

ΔΕΙΓΜΑ: χρησιμοποιήθηκε δείγμα ολικού αίματος με αντιπηκτικό (όχι ηπαρίνη) από φιαλίδιο γενικής αίματος (~2ml). Τα δείγματα φυλάσσονται μέχρι τη χρήση τους στους -40°C.

11.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ & ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA

Για την απομόνωση και έκλυση χρησιμοποιήθηκε μια μη τυποποιημένη διαδικασία. Παράλληλα στο 1/2 του πλήθους των δειγμάτων εφαρμόστηκε και τυποποιημένη διαδικασία με έτοιμα εμπορικά αντιδραστήρια (QiaAmp Blood DNA Mini Kit της Qiagen) ως τρόπος ελέγχου της αποτελεσματικότητας των μη τυποποιημένων διαδικασιών.

11.1.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την απομόνωση του γενετικού υλικού από τα δείγματα, βασίζεται στο πρωτόκολλο από το 3RD IFCC CLINICAL MOLECULAR BIOLOGY COURSE, MILANO 7TH 2005, τροποποιημένο από το πρωτόκολλο που παρουσιάζεται στον εργαστηριακό οδηγό «Εφαρμογές Ανασυνδυασμένου DNA» του κ. Μαθιόπουλου, προσαρμοσμένα στις συνθήκες της ακόλουθης διαδικασίας.

A. ΕΞΑΓΩΓΗ ΑΠΟ ΤΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ

1. Συλλογή αίματος ασθενους σε φιαλίδιο γενικής αίματος. Από τα 2ml, χρησιμοποιείται το 1 ml ενώ το υπόλοιπο φυλάσσεται ως δείγμα ελέγχου (μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε αντιπηκτικό εκτός της ηπαρίνης).
2. Προσθήκη 5 ml παγωμένου $MgCl_2$ και 1% NP40, στο σωληνάριο που έχει το 1 ml αίματος. Επώαση στον πάγο 5-10min.
3. Φυγοκέντρηση στις 4000rpm x 20 min στους 4°C και απόρριψη του υπερκείμενου.
4. Επαναδιάλυση του ιζήματος με 1ml διαλύματος σουκρόζης 0,25M και κιτρικού οξέος 1,5%.
5. Σε σωληνάκι με στρογγυλό πυθμένα των 10 ml, τοποθετούνται 4ml διαλύματος σουκρόζης 0,88M και κιτρικού οξέος 1,5% με τη χρήση φίλτρου με πόρο 0,45μm. Στο πάνω μέρος του σωληναρίου τοποθετείται το μίγμα από το βήμα 4. Προσέχουμε να μη γίνει μίξη, ώστε να απομονωθούν μόνο οι πυρήνες.
6. Φυγοκέντρηση στις 4000rpm x 15 min στους 4°C (οι πρωτεΐνες και τα ερυθρά παραμένουν στην επιφάνεια) και απόρριψη του υπερκείμενου
7. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 3ml διαλύματος Na-EDTA (0,1M NaCl και 50Mm EDTA pH8)
8. Προσθήκη SDS σε τελική συγκέντρωση 1%
9. Προσεκτική ανάμιξη με σιφώνιο παστέρ και προσθήκη 40μl πρωτεΐνάσης K 4mg/ml stock (ή 15μl προνάση E 30 mg/ml)
10. Απαλή ανάμιξη (αυξάνει το ιξώδες) και επώαση στους 37°C ολονυχτίς.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ: οι γενικές αίματος μπορούν να φυλαχθούν σε κατάψυξη μέχρι τη χρήση τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις το διάλυμα σε Na-EDTA είχε υελώδη (gel) μορφή. Αντιμετωπίστηκε με αύξηση της πρωτεΐνάσης K στο διάλυμα (70μl). Οι χειρισμοί όλοι έγιναν με γυάλινα σιφώνια. Χρειάζεται όμως προσοχή για να μην καταστραφεί το DNA από το αιχμηρό άκρο του σιφωνίου.

B. ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA ΜΕ ΦΑΙΝΟΛΗ-ΧΛΩΡΟΦΟΡΜΙΟ ΚΑΙ ΚΑΘΙΖΗΣΗ ΜΕ ΑΙΘΑΝΟΛΗ

1. Προσθήκη στο μίγμα της ολονύχτιας επώασης ίσου όγκου μίγματος φαινόλης-χλωροφορμίου και ανάμιξη με απαλές περιστροφές.
2. Φυγοκέντρηση στις 4000rpm x 15 min σε θερμοκρασία δωματίου

3. Μεταφορά του υπερκείμενου (υδατική φάση) σε νέο σωληνάριο με προσοχή, δίχως να απομακρυνθεί η λευκή διεπιφάνεια
4. Προσθήκη ½ του όγκου μίγματος χλωροφορμίου-ισοαμυλλικής αλκοόλης. Ανάμιξη με απαλές περιστροφές.
5. Φυγοκέντρηση στις 4000rpm x 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο
6. Προσθήκη 2-3 όγκων αιθανόλης 95% v/v (ο όγκος τελικά που προστίθεται εξυπηρετεί το «ζύγισμα» για την φυγοκέντρηση που ακολουθεί). Φυγοκέντρηση στις 4000rpm x 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και προσεκτική απόχυση του υπερκείμενου.
7. Προσθήκη 200μl παγωμένης αιθανόλης 70% v/v. Ξέπλυμα του ιζήματος με απαλές κινήσεις.
8. Φυγοκέντρηση στις 4000rpm x 5 min θερμοκρασία δωματίου και προσεκτική απόχυση του υπερκείμενου.
9. Στέγνωμα του ιζήματος και επαναιώρηση σε 0,3-0,5 ml TE 1X (ή H₂O)

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

A. Υλικά

1. σωληνάρια φυγοκέντρησης και με στρογγυλό πυθμένα, ανθεκτικά στην φαινόλη
2. πιπέτες παστέρ γυάλινες και πλαστικές
3. φίλτρο με πόρο 0,45μm (Corning Sterile Syringe Filter 0.45μm, Γερμανία)
4. υδατόλουτρο (MEMMERT)
5. ψυχόμενη φυγόκεντρος (NUVE)

B. Αντιδραστήρια

1. Διάλυμα 5mM MgCl₂, 1%NP40
2. Διάλυμα 0,25M Sucrose 1,5% citric acid
3. Διάλυμα 0,88M Sucrose 1,5% citric acid
4. Διάλυμα Na-EDTA: 0,1M NaCl + 50mM EDTA pH8
5. Διάλυμα Πρωτεΐνάσης K 4mg/ml (ή προνάση E 3mg/ml)
6. Διάλυμα SDS 10% w/v
7. Ρυθμιστικό διάλυμα TE pH 8: 10mM Tris Cl, 0,1mM EDTA
8. Διάλυμα Φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλλική αλκοόλη (25:24:1)
9. Διάλυμα Χλωροφόρμιο-ισοαμυλλική αλκοόλη (24:1)
10. Αιθανόλη 70%, 90%, (100%)

Τα διαλύματα εργασίας και τα διαλύματα αποθήκευσης παρασκευάστηκαν όπως περιγράφονται στο εγχειρίδιο "Molecular Cloning, a laboratory manual" εκδόσεις Cold Spring Harbor Laboratory Press"

11.1.2 Εκχύλιση DNA από ολικό αίμα με τη χρήση εμπορικού σκευάσματος

Η εκχύλιση στα μισά περίπου δείγματα έγινε και με έτοιμα εμπορικά αντιδραστήρια (kit) της εταιρίας QIAGEN, σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στο εσωκλειστο εγχειρίδιο.

Πρόκειται για μια απλοποιημένη, γρήγορη διαδικασία για την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων από μια ευρεία ποικιλία κλινικών δειγμάτων, η οποία γίνεται με την χρήση στηλών. Δεν απαιτείται εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευκολότερα στα κλινικά εργαστήρια. Τα νουκλεϊκά οξέα δεσμεύονται εκλεκτικά στη μεμβράνη πυριτίου-πηκτωμάτων QIAamp, ενώ οι μολυσματικοί παράγοντες περνούν μέσω αυτής. Οι ανασταλτικοί παράγοντες για τις αντιδράσεις PCR όπως τα δισθενή κατιόντα και οι πρωτεΐνες, αφαιρούνται εντελώς σε δύο αποδοτικά βήματα πλύσης, αφήνοντας το καθαρό νουκλεϊκό οξύ, το οποίο συλλέγεται τελικά με έκλουση από την στήλη είτε με αποσταγμένο νερό είτε με ένα ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχεται από την εταιρία.

11.2 Έλεγχος προϊόντος εκχύλισης DNA

Τα προϊόντα του προηγούμενου σταδίου ελέγχονται ποιοτικά και ποσοτικά με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης 1,7% (στα 100ml TBE 1X προστίθεται 1,7gr αγαρόζη και 10ml βρωμιούχο αιθίδιο BrEt/MERCK). Η παρασκευή του πηκτώματος έγινε όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο "Molecular Cloning, a laboratory manual" εκδόσεις Cold Spring Harbor Laboratory Press

Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι οι εξής: 80V για 1 ώρα. Η ποσότητα κάθε δείγματος στο πήκτωμα είναι 10 μl που περιέχει επίσης χρωστική φόρτωσης (loading dye) Blue-Orange 6X (σε αναλογία 2μl/10μl δείγματος).

11.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση των εξονίων 11 και 12. Αυτά τα δύο εξόνια παρουσίαζαν υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων στην περιοχή της Ηπείρου, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες στον Ελλαδικό χώρο. Οι εκκινητές καθώς και συνθήκες πολυμερισμού έχουν ήδη περιγραφεί από τους Goldstein & Brown (Hobbs et al., 1992).

Τα ζεύγη των εκκινητών (primers) είναι τα εξής:

Εξόνιο 11

Μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος: 168 bp

Forward primer: 5'-CAGCTATTCTCTGTCCTCCCACCAG-3'

Reverse primer: 5'-TGGGACGGCTGTCCTGCGAACATAC-3'

Εξόνιο 12

Μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος: 209 bp

Forward primer: 5'-GCACGTGACCTCTCCTTATCCACTT-3'

Reverse primer: 5'-CACCTAAGTGCTTCGATCTCGTACG-3'

Συνοπτικά αναφέρονται:

Ta_{11εξονιο}=65°C

Ta_{12εξονιο}=63°C.

1. 95°C x 5 min
2. 94°C x 45 sec
3. Ta°C x 45 sec
4. 72°C x 45 sec
5. 72°C x 10 min
6. 4°C συντήρηση

} 30
κύκλοι

Το βήμα 6 είναι προαιρετικό, εάν δεν είναι εφικτή η άμεση τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο.

Το μίγμα της αντίδραση PCR που έτρεξε στον κυκλοποιητή (κυκλοποιητής PTC-100™, MJ Research Inc.(Αμερική)) είχε την ακόλουθη σύσταση:

Πίνακας 11 Σύσταση PCR μίγματος

dH ₂ O	27,5 μl
Buffer	5 μl
MgCl ₂ 1,5mM	3 μl
dNTPs 10mM	1 μl
Primer forward 10pM	1,5 μl
Primer reverse 10 pM	1,5 μl
DNA	10 μl
Taq gold polymerase	0,5 μl
V total	50 μl

11.4 Έλεγχος προϊόντος PCR σε πήκτωμα αγαρόζης και απομόνωσή του

Ο έλεγχος και ταυτόχρονα ο καθαρισμός του προϊόντος της αντίδρασης PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης 1%. Οι

συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν στα 60V για 60min χρόνος επαρκής για τον διαχωρισμό των διαφορετικά χρωματισμένων ζωνών του ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης [loading buffer (orange blue)]. Το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν φρέσκο διάλυμα TBE 1X.

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού πακέτου QIAquick GelExtraction Kit της QIAGEN και έγινε σύμφωνα με τις έντυπες οδηγίες που συνόδευαν το kit.

Συνοπτικά η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Αφού κοπούν από το πήκτωμα αγαρόζης οι ζώνες που περιέχουν το DNA, τοποθετούνται σε προζυγισμένα σωληνάρια erpendorf και υπολογίζεται το βάρος τους.
2. Σε κάθε σωληνάριο προστίθεται διάλυμα Buffer QG όγκου τριπλάσιου του βάρους του τεμαχίου πήγματος με DNA.
3. Τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά στους 50°C μέχρι της πλήρους διάλυσης του πήγματος εφαρμόζοντας ισχυρή ανάδευση κάθε 2-3 λεπτά.
4. Μετά την πλήρη διαλυτοποίηση του πήγματος, προστίθεται στο κάθε δείγμα ισοπροπανόλη σε ποσότητα ίση με το βάρος του κάθε τεμαχίου πήγματος και αναμιγνύονται.
5. Το κάθε δείγμα τοποθετείται σε στήλες (QIAquick column) εντός σωληναρίων συλλογής και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά, ώστε να δεσμευτεί το DNA στο υλικό της στήλης.
6. Απομακρύνεται το διάλυμα έκλουσης και προστίθενται ακόμη 500 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα QG και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά.
7. Απομακρύνεται και πάλι το διάλυμα έκλουσης και προστίθενται 750 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα PE. Μετά από 5 λεπτά επώασης τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 2 λεπτά.
8. Απομακρύνεται το διάλυμα έκλουσης και τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 2 ακόμη λεπτά.
9. Η κάθε στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο erpendorf και προστίθενται 30 μl απεσταγμένο νερό. Τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 2 λεπτά ώστε να εκλουστεί το καθαρό DNA στο σωληνάριο erpendorf όπου και συλλέγεται.

Αντιδραστήρια : Ισοπροπανόλη

Έτοιμα αντιδραστήρια της εμπορικής συσκευασίας QIAquick GelExtraction Kit της εταιρίας QIAGEN.

Συσκευές: Υδατόλουτρο: MEMMERT, Αναδευτήρας: Heidolph DREHZAHL, Φυγόκεντρος : ABBOTT

11.5 Αλληλούχιση κατά SANGER

Η αλληλούχιση έγινε στον αναλυτή Li-Cor, Long Readir 4200. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα ουρίας ακρυλαμιδίου. Οι ρυθμίσεις της συσκευής έγιναν βάσει των οδηγιών χρήσης που τη συνοδεύουν.

11.5.1 Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον ειδικό τερματισμό της ενίσχυσης τμήματος γενετικού υλικού όπου δρα η πολυμεράση με χρήση

διδεοξυνουκλεοτιδίων. Η αντίδραση πολυμερισμού (PCR) κάθε τμήματος DNA γίνεται σε τέσσερις διακριτές αντιδράσεις ενίσχυσης της μίας μόνο αλυσίδας κάθε δείγματος που τις διαφοροποιεί η ύπαρξη ενός ορισμένου ιχνηθετημένου διδέοξυ-νουκλεοτιδίου (ddNTP) σε κάθε μία. Όταν το ddNTP τυχαία ενσωματωθεί στο ενισχυόμενο μόριο, σταματά την περαιτέρω προσθήκη νουκλεοτιδίων από την πολυμεράση. Ο λόγος είναι ότι στην 3' θέση το διδέοξυ-νουκλεοτίδιο αντί για υδροξύλιο έχει υδρογόνο με αποτέλεσμα να μην μπορεί να σχηματισθεί ο φωσφοδιεστερικός δεσμός (5' → 3'). Τελικά, με το πέρας των προγραμματισμένων κύκλων ενίσχυσης του γενετικού υλικού, παράγεται ένα μίγμα θραυσμάτων διαφορετικού μεγέθους με συγκεκριμένο τελικό νουκλεοτίδιο (το ddNTP: ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP). Ηλεκτροφόρηση σε διαδοχικές ζώνες και των τεσσάρων αντιδράσεων ενίσχυσης κάθε δείγματος δίνει μια ακολουθία θραυσμάτων, βάσει μεγέθους, που το τελικό τροποποιημένο νουκλεοτίδιο φανερώνει τη θέση του στο αρχικό μόριο DNA. Τα διδέοξυ- νουκλεοτίδια είναι σημασμένα με χρωστική που φθορίζει στα 700 nm.

Η συσκευή Li-COR επιτρέπει την ηλεκτροφόρηση ιχνηθετημένων προϊόντων, καθώς και την ηλεκτρονική συλλογή δεδομένων, από την αλληλούχιση του DNA. Το όργανο αυτό χρησιμοποιεί μονοφασματική ανίχνευση, όπου χρωστικές ουσίες που εκπέμπουν στο υπέρυθρο διεγείρονται από ένα λέιζερ διόδων. Οι φθορίζουσες ουσίες είναι τα κατάλληλα ιχνηθετημένα διδέοξυ-νουκλεοτίδια (ddNTPs) που εκπέμπουν στα 700 ή 800 nm. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το όριο της ανίχνευσης στις μετρήσεις φθορισμού καθορίζεται πρώτιστα από το μέγεθος του υποβάθρου που παράγεται από τη διασπορά ή/και το φθορισμό των ακαθαρσιών. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα στη αλληλούχιση DNA δεδομένου ότι η ανίχνευση αφορά ουσίες μέσα στη μήτρα πηκτωμάτων, η οποία μπορεί να είναι σημαντική στην συνεισφορά των διασκορπιζομένων φωτονίων. Επιπλέον, η χρήση αποδιατακτικών παραγόντων στη μήτρα των πηγμάτων, όπως η ουρία (6 M), μπορούν να παράγουν μεγάλα ποσά φθορισμού του υποβάθρου.

11.5.2 Προετοιμασία για αλληλούχιση κατά SANGER

PCR: Το μίγμα της αντίδρασης PCR για την αλληλούχιση είχε την παρακάτω σύσταση. Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό πακέτο της GE Health.

Πίνακας 12 PCR μίγμα για αλληλούχιση

dH ₂ O	15.5 μl
Buffer	3.5 μl
DNA	10.0 μl
Primer fwd	0.5 μl
Sequenase	2 μl
Total	31.5 μl

7 μl από μίγμα + 1μl ddGTP	7 μl από μίγμα + 1μl ddATP	7 μl από μίγμα + 1μl ddTTP	7 μl από μίγμα + 1μl ddCTP
G	A	T	C

Η αντίδραση PCR προγραμματίζεται για 30 κύκλους όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 13 πρόγραμμα PCR για την αλληλούχιση.

1. 95°C x 5 min	} 30 κύκλοι
2. 95°C x 30 sec	
3. 60°C x 30 sec	
4. 72°C x 1 min	
5. 4°C συντήρηση	

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ: Το μίγμα της αντίδρασης PCR τοποθετείται στον πάγο μετά την προσθήκη του ενζύμου (Thermosequenase). Τα ddNTPs πρέπει να προστατεύονται από το φως.

Όταν τελειώσει η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού, τα προϊόντα τοποθετούνται και πάλι στον πάγο. Το βήμα 5 εφαρμόζεται, εάν δεν είναι εφικτή η άμεση τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο.

ΠΗΚΤΩΜΑ ΟΥΡΙΑΣ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ: Η αλληλούχιση πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου το οποίο έχει την σύσταση που φαίνεται στον πίνακα 14.

Πίνακας 14 σύσταση πηκτώματος ουρίας ακρυλαμιδίου

Μίγμα A	Urea (Merck)	25gr
	Rapid gel (ακρυλαμιδιο) (USB)	7ml
	TBE 5X	11ml
	dH ₂ O	22,5ml
	DMSO (MERCK)	500μl
Φιλτράρισμα με φίλτρο 0,45μm		

(Corning Sterile Syringe Filter 0.45µm)		
B	TEMET (τετρααιθυλδιαμίνη) (SIGMA)	50 µl
	10% APS fresh (ammonium persulfate) (SIGMA)	350µl

Τα συστατικά του μίγματος Α αναδεύονται με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα. Ακολούθως φιλτράρονται με φίλτρο που έχει πόρο 0,45µm το οποίο προσαρμόζεται σε σύριγγα. Ακολουθεί η προσθήκη του TEMET και του φρέσκου 10% APS. Το τελικό διάλυμα τοποθετείται στο εκμαγείο που σχηματίζουν οι κρυστάλλινες πλάκες με γρήγορες κινήσεις για την αποφυγή της πρώιμης πήξης του διαλύματος εκτός του εκμαγείου. Αφήνεται 1-2h να πήξει εντός του εκμαγείου.

ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ: Στα προϊόντα της αντίδρασης PCR, πριν φορτωθούν στο πήκτωμα, προστίθεται φορμαμίδιο σε ποσότητα ίση με ½ του όγκου του προϊόντος της αντίδρασης. Το φορμαμίδιο επιδρά στο ένζυμο πολυμερισμού (sequenase) σταματά την αντίδραση πολυμερισμού και βοηθά στη μη διαφυγή του προϊόντος από τα πηγαδάκια κατά την φόρτωση στο πήκτωμα ουρίας ακρυλαμιδίου. Τα δείγματα ακολουθώς υπόκεινται σε **αποδιάταξη**, στους 95°C για 5 λεπτά. Κατόπιν και μέχρι την φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα, τοποθετούνται στον πάγο όπου διατηρούνται οι αλυσίδες αποδιαταγμένες. Η ποσότητα του προϊόντος κάθε αντίδρασης πολυμερισμού που «φορτώθηκε» στην γέλη είναι 0,9µl.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης της συσκευής Li-COR:

3000 Volt/30 mA / σε 45°C

Scan speed: 3/ 75 W/ Signal filter: 3

Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 6 ώρες και τα αποτελέσματα που φαίνονται σαν αυτοραδιογραφία συλλέγονται σε ειδικό φάκελο στο αρχείο της συσκευής Li-COR.

Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα *Base ImagiR Analysis*.

Η περαιτέρω επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα VECTOR NTI Suite 10 και τη χρήση του EXPASY.

Γ' Μέρος

Αποτελέσματα-Συζήτηση

12. Προτυποποίηση της μεθοδολογίας

Η αρχική προσπάθεια εκχύλισης DNA από δείγματα ολικού αίματος έγινε με το πρωτόκολλο από το 3RD IFCC CLINICAL MOLECULAR BIOLOGY COURSE, MILANO 7TH 2005. Το αποτέλεσμα ήταν η λήψη εξαιρετικής ποιότητας και καθαρότητας DNA. Παρόλα αυτά σε αρκετά δείγματα δοκιμών το γενετικό υλικό ήταν κατατετμημένο που καθιστούσε τη συλλογή του δυσχερέστατη. Η φυγοκέντρηση δεν μπορούσε να καταβυθίσει τα τμήματα του γενετικού υλικού μες στο διάλυμα της απόλυτης αλκοόλης με το άλας χλωριούχου νατρίου.

Η τροποποίηση του πρωτοκόλλου με τη χρήση διαλυμάτων αλκοόλης 90% και 70% έναντι αλκοόλης 100% και διαλύματος NaCl, συντέλεσε στην λήψη του γενετικού υλικού μετά από φυγοκέντρηση. Αναμφίβολα η καθαρότητα του λαμβανόμενου DNA υστερεί έναντι του DNA που λαμβάνεται από την αρχική διαδικασία. Δεν αποτελεί όμως εμπόδιο στις επόμενες διεργασίες που υφίσταται το DNA. Πιο σημαντικό όμως είναι η αύξηση της απόδοσης της μεθόδου στη εκχύλιση DNA που προέκυψε από την αλλαγή του πρωτοκόλλου.

Ο έλεγχος των προϊόντων εκχύλισης και έκλουσης του DNA έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,7%. Ταυτόχρονα στο πήκτωμα φορτώθηκαν και τα προϊόντα που εκλούστηκαν με τη χρήση έτοιμων εμπορικών σκευασμάτων. Τα αποτελέσματα ήταν εντυπωσιακά. Η ζώνη του DNA που προέκυπτε από τα έτοιμα εμπορικά σκευάσματα ήταν πολύ λιγότερο έντονη από ότι με τη μέθοδο που γινόταν προσπάθεια προτυποποίησης. Μια άλλη διαφορά που παρουσιάστηκε ήταν ότι τα δείγματα που επεξεργαστήκαν με τα έτοιμα εμπορικά σκευάσματα έδωσαν όλα προϊόν ενώ δύο δείγματα από την δοκιμαζόμενη μεθοδολογία δεν έδωσαν προϊόν. Αυτό αποδίδεται σε λαθασμένους πειραματικούς χειρισμούς.

Στην αντίδραση ενίσχυσης των γενετικών τόπων πραγματοποιήθηκαν αρκετοί πειραματισμοί για να επιβεβαιωθεί η αναλογία των συστατικών του μίγματος αντίδρασης. Οι μεταβλητές που δοκιμάστηκαν ήταν η συγκέντρωση του MgCl₂ και η ποσότητα του DNA. Αυξάνοντας το MgCl₂, αρχικά δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο προϊόν (στην ένταση της ζώνης στο gel αγαρόζης), όταν όμως αυξήθηκε η παρουσία του MgCl₂ στα 6μl, τότε στο προϊόν υπήρχε μη ειδικός πολλαπλασιασμός όπως μαρτυρούσαν οι δύο ζώνες στο gel. Ακόμα και στα 5μl MgCl₂ υπήρχε μια διάχυτη ζώνη σαν ουρά της αναμενόμενης ζώνης στο πήκτωμα.

Η μεταβλητή DNA είχε μια ιδιαίτερη συμπεριφορά όσον αφορά το προϊόν της αντίδρασης PCR όπως φαινόταν κατά την ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα (αχνές και έντονες ζώνες ανεξάρτητες από την συγκέντρωση του ολικού DNA που είχε προστεθεί στο μίγμα). Αυτό εξηγείται γιατί τα διαφορετικά δείγματα αίματος έδωσαν διαφορετική ποιότητα DNA. Επιλέχθηκε η συγκεκριμένη ποσότητα γιατί κάλυπτε όλα τα δείγματα των ασθενών στην εφαρμογή PCR.

Εικόνα 12 Gel αγαρόζης 1%. Αριστερά φαίνονται παραπροϊόντα PCR. Η λήψη της φωτογραφίας έγινε με φορητή ψηφιακή μηχανή. Η πρώτη στήλη περιέχει προϊόν που το μίγμα αντίδρασης της PCR είχε 6μl MgCl₂ και φαίνεται καθαρά παραπροϊόν σε ανεξάρτητη ζώνη, η 2^η στήλη περιέχει προϊόν που το μίγμα αντίδρασης της PCR είχε 5μl MgCl₂. Και εδώ φαίνεται παραπροϊόν ως ουρά της ζώνης του κύριου προϊόντος. Στην 3^η στήλη δεν λειτούργησε η ενίσχυση από πειραματικό σφάλμα και στην 4η το μίγμα αντίδρασης είχε 3 μl MgCl₂.



Η επιλογή των 26 ασθενών έγινε, από τον κ. Ελισάφ και τους συνεργάτες του, βάσει των εργαστηριακών και κλινικών ευρημάτων που συνηγορούσαν για δυσλιπιδαιμία τύπου οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας.

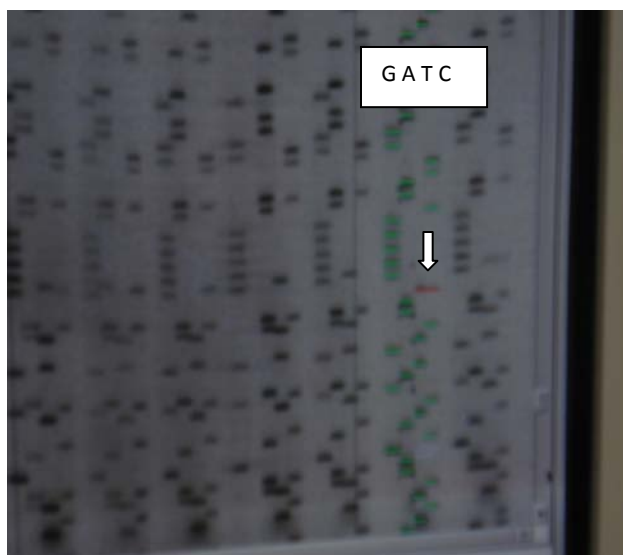
Ως ομάδα ελέγχου (αρνητικά controls) επιλέχθηκαν 6 άτομα που δεν είχαν εργαστηριακά ευρήματα και ιστορικό δυσλιπιδαιμίας. Η επιλογή έγινε από τους υπεύθυνους του βιοχημικού εργαστηρίου στο ίδιο νοσοκομείο. Ταυτόχρονα υπήρξε και μια δεύτερη ομάδα ελέγχου (θετικά controls) 2 ασθενών με οικογενή υπερχοληστερολαμία με γνωστές μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα της LDL (ο έλεγχος είχε γίνει στο εργαστήριο μοριακής γενετικής του ιδρύματος νευρολογίας και γενετικής Κύπρου, στη Λευκωσία). Ο ένας ασθενής είχε γνωστή μετάλλαξη στο εξόνιο 11, ενώ ο δεύτερος ασθενής στο εξόνιο 9.

13. Αποτελέσματα

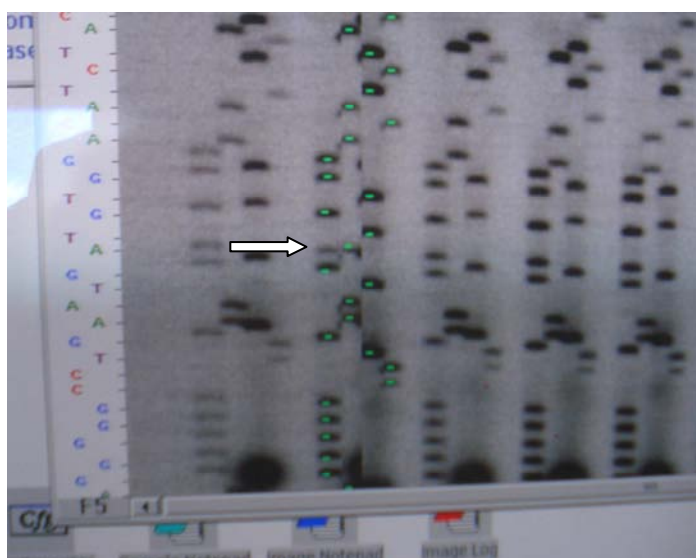
Μια χαρακτηριστική εικόνα της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων κατά την αλληλούχιση φαίνεται όπως η εικόνα 13.

Το πρόγραμμα *Base ImagiR Analysis* που συνοδεύει την συσκευή αλληλούχισης, έδωσε την αλληλουχία των δειγμάτων των ασθενών και του αρνητικού ελέγχου για δύο εξόνια που αναλύθηκαν. Η αλληλουχία αυτή τέθηκε σε ομοπαράθεση τόσο με την αλληλουχία των εξονίων (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_009060.1), όσο και με το ολικό mRNA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/215490050?itemid=2&report=-gbwithparts>). Η ομοπαράθεση έγινε με το πρόγραμμα VECTOR NTI Suite 10.

Η ομοπαράθεση με το DNA έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα: για το **εξόνιο 11** τα δείγματα που εμφάνισαν μετάλλαξη ήταν τρία. Το ένα από αυτά (ασθενής 11) ήταν το δείγμα θετικού ελέγχου (γνωστή μετάλλαξη από συμμετοχή σε προηγούμενη έρευνα: (*Miltiadous G. et al; 2001*)). Από τα άλλα δύο δείγματα, ο ασθενής 1 εμφάνισε μετάλλαξη σε δύο γενετικούς τόπους του εξονίου 11. Και τα τρία δείγματα εμφανίζουν την ίδια μετάλλαξη στον ίδιο γενετικό τόπο η οποία είναι σε ετερόζυγη κατάσταση με αντικατάσταση της βάσης G με A (G1646A). Επιπλέον το δείγμα με τις δύο μεταλλάξεις εμφανίζει στην δεύτερη μεταλλαγή ανάλογο πρότυπο (ετεροζυγωτία A -> G: A1658G).



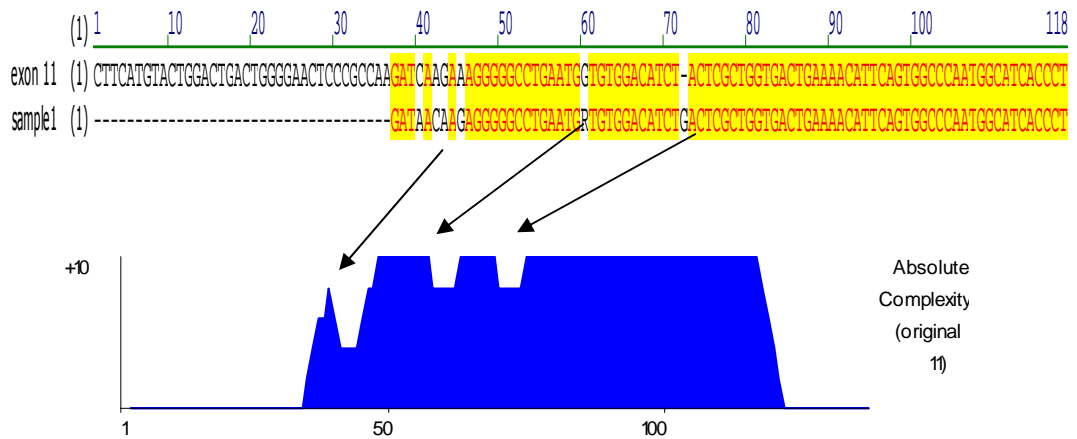
Εικόνα 13. Αποτελέσματα αλληλούχισης. Με το βέλος υποδεικνύεται μια συνύπαρξη ζώνης T και C (ετεροζυγωτία). Η πρώτη στήλη έχει τα προϊόντα ενίσχυσης με ddGTP, η δεύτερη αντίστοιχα με ddATP, η τρίτη με ddTTP και τέλος με ddCTP.



Εικόνα 15. Αντικατάσταση G->A. Στο μέσο της εικόνας μια μπάντα G είναι αχνότερη από τις άλλες. Δίπλα της μαρκαρισμένη μια ζώνη A. (G1646A)

Στο **εξόνιο 12** η ομοπαράθεση των δειγμάτων με την πρότυπη αλληλουχία είχε τα εξής αποτελέσματα: δεκατέσσερα δείγματα εμφανίζουν μεταλλαγή σε συγκεκριμένο γενετικό τόπο με αντικατάσταση κυτοσίνης με θυμίνη (1773C->T). Από αυτά τα δείγματα τέσσερις μεταλλαγές είναι ομόζυγες. Σε έναν άλλο ασθενή, σε διαφορετικό γενετικό τόπο, εμφανίζεται μια αντικατάσταση (1775G->A) που υπάρχει σε ετεροζυγωτία.

Στα έξι άτομα αρνητικού ελέγχου δεν ανευρέθηκε ουδεμία μετάλλαξη στα δύο εξόνια.



Εικόνα 14. Ενδεικτικό δείγμα των αποτελεσμάτων της ομοπαράθεσης μεταξύ του άγριου τύπου και του μεταλλαγμένου γονιδίου στο εξόνιο 11 του ασθενή 1. Η δεύτερη και τρίτη εγκοπή υποδηλώνουν τα σημεία μεταλλαγής. Η πρώτη εγκοπή οφείλεται σε "θόρυβο". Το βάθος των εγκοπών 2 & 3 είναι σχετικά μικρό γιατί οι μεταλλάξεις (G->A) είναι σε ετεροζυγωτία.

Πίνακας 15. Αποτελέσματα ομοπαράθεσης των δειγμάτων με τις αλληλουχίες των δύο εξονίων

ΕΞΟΝΙΟ	11	12
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΖΟΥΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	1 (Διπλή μετάλλαξη) 11 (Δείγμα ελέγχου) 18	1, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26
ΠΛΗΘΟΣ	3	15

Η μετάφραση του τροποποιημένου mRNA των δειγμάτων με τη βοήθεια του δικτυακού τόπου EXPASY και κατόπιν ομοπαράθεση της τροποποιημένης πρωτεΐνης με την πρωτεΐνη του άγριου τύπου έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα: Η G1646A οδηγεί σε αντικατάσταση αμινοξέος γλυκίνης με ασπαραγινικό (Gly549Asp). Η A1658G οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος τυροσίνη με κυστεΐνη (Tyr553Cys). Η C1773T δεν οδηγεί σε αντικατάσταση αμινοξέος (ασπαραγίνη). Η G1775A οδηγεί σε αντικατάσταση γλυκίνης με γλουταμικό (Gly592Glu).

Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν ήδη αναφερθεί σε προηγούμενες δημοσιεύσεις (δεν είναι καινοφανείς). Η G1646A (όνομα αλληλίου: *FH Genoa*, *FH Palermo-1*) αναφέρεται σε τουλάχιστον 5 δημοσιεύσεις και έχει αναφερθεί ως χώρα προέλευσης η Ιταλία (πρώτη εντόπιση). Η A1658G έχει αναφερθεί μία φορά σε δημοσίευση και εντοπίστηκε αρχικά στην Ολλανδία. Η C1773T έχει αναφερθεί σε δημοσίευση μία φορά και πρώτη εντόπιση έγινε στην Ρωσία. Η G1775A γίνεται αναφορά σε πέντε δημοσιεύσεις με χώρα αρχική εντόπισης, της μετάλλαξης, την Ιταλία.

Πίνακας 16. Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων αλληλούχισης ανά δείγμα

α/α ασθενή	Μετάλλαξη στο εξόνιο 11	Μετάλλαξη στο εξόνιο 12	α/α ασθενή	Μετάλλαξη στο εξόνιο 11	Μετάλλαξη στο εξόνιο 12
1	G1646A, A1658G	C1773T	14		
2			15		
3			16		
4		C1773T	17		
5			18	G1646A	C1773T
6		C1773T	19		C1773T
7			20		C1773T
8		C1773T	21		G1775A
9			22		
10		C1773T	23		C1773T
11* δείγμα ελέγχου	G1646A		24		C1773T
12		C1773T	25		C1773T
13		C1773T	26		C1773T
<i>Τα έξι δείγματα αρνητικού ελέγχου (ΑΕ) δεν εμφάνισαν καμία μετάλλαξη</i>					
(ΑΕ) 27			(ΑΕ) 30		
(ΑΕ) 28			(ΑΕ) 31		
(ΑΕ) 29			(ΑΕ) 32		

Η επίπτωση των προηγούμενων μεταλλάξεων είναι η εξής: η μετάλλαξη G1646A σε ασθενή που την εμφανίζει σε ετεροζυγωτία έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της ενεργότητας του υποδοχέα, η οποία φθάνει στο 5% της αρχικής ενεργότητας του υποδοχέα άγριου τύπου. Σε ομοζυγωτία της ίδιας μετάλλαξης η ενεργότητα του υποδοχέα μειώνεται στο 2% του αγρίου τύπου. Στην μετάλλαξη A1658G υπάρχει μειωμένη ενεργότητα του υποδοχέα. Η C1773T αποτελεί πολυμορφισμό που δεν επιδρά στην λειτουργικότητα του υποδοχέα. Η G1775A έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της ενεργ-

γότητας του υποδοχέα στο 5%. Υπενθυμίζεται ότι τα συγκεκριμένα τμήματα της πρωτεΐνης βρίσκονται στην περιοχή με τις EGF επαναλήψεις.

Πίνακας 17. Ταξινόμηση και παρουσίαση των σημειακών αλλαγών στα δείγματα ανά είδος μετάλλαξης.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ				
ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	Σε ετεροζυγωτία	Σε ομοζυγωτία	Αποτέλεσμα στην πρωτεΐνη	% ποσοστό
G1646A	1, 11, 18		Gly549Asp	11,5%
A1658G	1		Tyr553Cys	3,8%
C1773T	1, 4, 6, 12, 13, 18, 19, 20, 25, 26	8, 10, 23, 24	-	57,7%
G1775A	21		Gly592Glu	3,8%

Συγκεντρωτική παρουσίαση πλήθους μεταλλάξεων		% ποσοστό
Συνολικός αριθμός δειγμάτων εξεταζομένων	26	100%
Αριθμός δειγμάτων με μοναδική μετάλλαξη που τροποποιεί την πρωτεΐνη	3	11,5%
Αριθμός δειγμάτων με σιωπηρή μετάλλαξη	14	53,85%
Αριθμός δειγμάτων με πάνω από μία μετάλλαξη	1	3,85%

Συζήτηση

Στην εργασία αυτή που αφορά τις πιο συχνές μεταλλάξεις του LDLR στην περιοχή της Βορειοδυτικής Ελλάδας βρέθηκαν οι αναμενόμενες μεταλλάξεις. Σε δημοσιεύσεις που μελετούσαν ανάλογες μεταλλάξεις τα ποσοστά εμφάνισης της G1646A ήταν: 22,7% (Traeger-Synodinos J et al., 1998) σε δείγμα 150 ασθενών από όλη την Ελλάδα.

Σε μια άλλη μελέτη από τους Miltiadous G et al (2001) σε 73 ασθενείς από τη Βορειοδυτική Ελλάδα (Ήπειρος και Αιτωλοακαρνανία) το ποσοστό εμφάνισης της G1646A είναι 23,3%. Βασιζόμενος στο σκαρίφημα της συγκεκριμένης εργασίας που συσχετίζει τη μετάλλαξη με την

Ηγουμενίτσα ως την κύρια περιοχή εμφάνισης της συγκεκριμένης αντικατάστασης, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το ποσοστό 11,5% που εμφανίζεται στη μελέτη των 26 ασθενών έχει πολλές πιθανότητες να είναι αληθές και αντιπροσωπευτικό της περιοχής των Ιωαννίνων.

Η μετάλλαξη που αφορά την αντικατάσταση A1658G δεν έχει αναφερθεί στις προηγούμενες μελέτες στην Ελλάδα. Το χαμηλό ποσοστό εμφάνισης (3,8%) δικαιολογεί την απουσία δεδομένων για την περιοχή της Ηπείρου και γενικότερα της Ελλάδος.

Η G1775A είχε θεωρηθεί από τον Miltiadous G et al (ποσοστό εμφάνισης 28,8%) ως ιδρυτική μετάλλαξη στην περιοχή των Τζουμέρκων (νομός Ιωαννίνων). Παρόλα αυτά στην παρούσα εργαστηριακή διερεύνηση το ποσοστό εμφάνισης ήταν μόλις 3,8% πιθανά ως αποτέλεσμα του μικρού αριθμού των ασθενών της μελέτης. Γενικά η συγκεκριμένη μετάλλαξη είναι τάξης 5 με δυσλειτουργία στην ανακύκλωση του υποδοχέα.

Η C1773T βασικά δεν επηρεάζει την πρωτεΐνη υποδοχέα. Από το ποσοστό εμφάνισης της 53,8% φαίνεται καθαρά ότι πρόκειται για πολυμορφισμό. Η αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων για αναφορά του συγκεκριμένου πολυμορφισμού δεν απέδωσε τα αναμενόμενα. Υπάρχει μόνο μια αναφορά που την μνημονεύει (Zakharova FM et al; 2001).

Η παρουσία της γενικά ήταν μη αναμενόμενη στα αποτελέσματά μας. Η υψηλή συχνότητά της σε συνδυασμό με την έλλειψη πληροφοριών- αναφορών οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανών είναι μια ιδρυτική μετάλλαξη στην περιοχή, μηδενικού κόστους, βέβαια, στην λειτουργία του υποδοχέα αφού δεν προκαλεί αλλαγή στη σειρά των αμινοξέων στην πρωτεΐνη και η υψηλή συχνότητά της οφείλεται στη μέθοδο προσέγγισης (πλήρης αλληλούχιση των συγκεκριμένων εξονίων).

Από το σύνολο των ασθενών, χρήζει προσοχής ο ασθενής 1 που εμφανίζει τρεις ταυτόχρονα μεταλλάξεις: G1646A, A1658G, C1773T. Ο συγκεκριμένος ασθενής το πιθανότερο είναι να έχει στην ίδια χρωματίδα τις G1646A και C1773T και στην άλλη χρωματίδα την αντικατάσταση A1658G. Προφανώς ο ασθενής αυτός θα παρουσιάζει φαινότυπο ομόζυγου (σύνθετος ετερόζυγος).

Αξιοσημείωτο επίσης είναι ότι ομοζυγωτία εντοπίστηκε μόνο στις μηδενικού κόστους αντικαταστάσεις C1773T που επιβεβαιώνει τον κανόνα για την ελαττωμένη φυσική επιλογή στη συγκεκριμένη περίπτωση σε αντίθεση με την αυξημένη φυσική επιλογή στις τρεις άλλες αντικαταστάσεις.

Ολοκληρώνοντας, η διπλωματική αυτή εργασία συνέβαλε μέσα από την προτυποποίηση της διαδικασίας απομόνωσης DNA στον πλήρη έλεγχο για πιθανές μεταλλάξεις στα εξόνια 11 και 12 του υποδοχέα της LDL (LDLR). Λόγω του μικρού αριθμού ασθενών, οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν, αλλού συμβαδίζουν και αλλού όχι με τις μέχρι σήμερα αναφορές. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σιωπηρή μετάλλαξη C1773T για την υψηλή συχνότητα εμφάνισης της και η A1658G για την οποία δεν υπάρχουν δεδομένα για την Ελλάδα. Είναι επίσης σημαντικό ότι παρά τον εξαιρετικά μεγάλο αριθμό μεταλλαγών του LDL-R που έχουν αναφερθεί διεθνώς, μόνο ένας μικρός και επαναλαμβανόμενος αριθμός μεταλλαγών ανευρίσκονται στον Ελληνικό πληθυσμό, γεγονός που διευκολύνει την εφαρμογή του γενετικού ελέγχου του LDL-R στην κλινική πράξη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΑ

11. ΑΡΧΕΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ. T.D. GELEHRTER, F. S. COLLINS, D.GINSBURG. ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ Φ. ΣΤΥΛΙΑΝΟΠΟΥΛΟΥ. ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΣΧΑΛΙΔΗ
12. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ 5^Η ΕΚΔΟΣΗ. J.M. BERG, J.L. ΤΥΜΟΤΣΚΟ, L.STRYER. ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ ΑΖ.ΚΑΡΑΜΑΝΛΙΔΗΣ Γ.Κ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ
13. MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL. SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS. 2ND EDITION CSH PRESS.
14. TIETZ TEXTBOOK OF CLINICAL CHEMISTRY AND MOLECULAR DIAGNOSIS. 4TH EDITION, ELSEVIER.

ΑΡΘΡΑ

1. Aulchenko Y et al (2009). Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. Nat Genet 41(1): 47-55
2. Bodamer O et al (2002). Use of denaturing HPLC to provide efficient detection of mutation causing familial hypercholesterolaemia. Clinical Chemistry 48:11 1913-1918
3. Brown M.S., Goldstein J.L. Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. Proc Nat. Acad. Sci. 71:788-792 (1974)
4. Brown MS et al (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232:34-47
5. Brown MS et al (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell, vol 89, 331-340
6. Chang JH et al (2003). Identification and characterization of LDL receptor gene mutation in hyperlipidemic Chinese. J of Lipid Research vol 44 1850-1858
7. Drenos F et al (2009). Integrated associations of genotypes with multiple blood biomarkers linked to coronary heart disease risk. Hum Molec Genet vol 18 no12 2305-2316
8. Dirlam-Schatz K et al (1998). Calcium induces a conformational change in the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. Journal of lipid research vol39:402-411
9. Franceschini N et al (2009). LDL Receptor polymorphism and the risk of coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities study. J Thromb Haemost.7(3) 497-498
10. Goldstein J.L., Brown M.S. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-

- methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. Proc Nat. Acad. Sci. 70:2804-2808 (1973).
11. Glynou K. et al. (2008). Development of a universal chemiluminometric genotyping method for high-throughput detection of 7 LDLR gene mutation in greek population. Clinical Biochemistry 41:335-342
 12. Herz J(2001). The LDL Receptor gene family: (un)expected signal transducers in the brain. Neuron vol29,571-581
 13. Herz J et al (2003). Coaxing the LDL Receptor family into the fold. Cell, vol 112:289-292
 14. Hobbs H et al (1990). The LDL receptor locus and Familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. Annu Rev Genet 24:133-170
 15. Hobbs H. et al. (1992). Molecular genetics of the LDL receptor gene in Familial Hypercholesterolemia. Human Mutation 1:445-466
 16. Humphries SE et al (2006). Genetic causes of familial hypercholesterolaemia in patients in the UK: relation to plasma lipids level and coronary heart disease risk. J Med Genet 2006,43:943-949
 17. Junit SM et al (2003). Ala519Thr mutation in exon 11 of LDL Receptor gene in members of a Malaysian family with hypercholesterolaemia. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology vol 11(2):77-82
 18. Kathiresan S et al (2008). Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in human. Nat Genet; 40(2): 189-197
 19. Miltiados G et al (2001). Characterization and geographic distribution of the low density lipoprotein receptor (LDLR) gene mutation in northwestern Greece. Human Mutation, mutation in brief#411
 20. Miltiados G et al (2005). Genetic and environmental factors affecting the response to statin therapy in patients with molecularly defined familial hypercholesterolaemia. Pharmacogenetics and Genomics 15:219-225
 21. Πανταζόπουλος Αγ. (2009). Δομή και λειτουργία λιποπρωτεϊνών- κλινική σημασία της λιποπρωτεΐνης Lp(a). Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική τ14(3) 150-159
 22. Russel et al. Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. J Biol Chem (1989);264:21682-21688)
 23. Thiart R et al (2000). Predominance of a 6 np deletion in exon 2 of the LDL receptor gene in Africans with familial hypercholesterolaemia. J Med Genet 37:514-519

24. Traeger-Synodinos J et al. (1998). 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 102:343-347
25. Xenophontos S et al (2000). Geographical clustering of low density lipoprotein receptor gene mutation (C292X; Q363X; D365E & C660X) in Cyprus. Human Mutation, mutation in brief#302
26. XIE Li et al (2007). Two novel mutation of the LDL receptor gene associated with familial hypercholesterolaemia in a Chinese family. Chin Med J 120(19): 1694-1699
27. Yamamoto T et al (2008). Molecular studies of pH dependent ligand interactions with the low-density lipoprotein receptor. Biochemistry 47(44):11647-11652

ΔΙΚΤΥΑΚΟΙ ΤΟΠΟΙ

1. www.ncbi.nlm.nih.gov
2. www.wikipedia.org
3. www.ucl.ac.uk/ldlr
4. www.merck.com
5. www.umd.be