

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΛΑΡΙΣΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΘΕΜΑ: ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΣΗΜΕΙΑΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ
ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ Β/Ε LDL ΥΠΟΔΟΧΕΑ
ΚΑΙ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ApoB ΣΕ ΜΕΛΗ
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΜΕ ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΑ**

Επιβλέπων Καθηγητής: Κουκούλης Γεώργιος

**Επιτροπή Αξιολόγησης: Κουκούλης Γεώργιος
Μπονάνου Σοφία
Μανιάτης Αντώνιος**

Εκπόνηση: Στακιάς Νικόλαος

ΛΑΡΙΣΑ ΙΟΥΛΙΟΣ 2002





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 620/1

Ημερ. Εισ.: 1-2-2003

Δωρεά: _____

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ

2002

ΣΤΑ

Αριθ. Πρωτ.
Ημερομ.
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Ημερομ. 31/7/2002
Αριθ. Πρωτ. 2396

sp. no. 7/2002

Περιεχόμενα

	<i>Σελίδα</i>
Πρόλογος	1
Εισαγωγή	3
1. Γενικά περί λιπιδίων	4
1.1. Εισαγωγή	4
1.2. Στοιχεία φυσιολογίας των λιποπρωτεϊνών	6
• Χοληστερόλη	6
• Τριγλυκερίδια	7
• Φωσφολιπίδια	7
• Αποπρωτεΐνες	7
• Αποπρωτεΐνες της ομάδας Β	8
• Αποπρωτεΐνες της ομάδας C	9
• Αποπρωτεΐνες της ομάδας A	10
• Αποπρωτεΐνες της ομάδας E	10
• Αποπρωτεΐνες της ομάδας D	10
• Αποπρωτεΐνη (α)	10
1.3. Ένζυμα	11
• Λιποπρωτεϊνική λιπάση	11
• Ηπατική λιπάση	12
• Ακυλοτρανσφεράση της λεκιθίνη – χοληστερόλης (LCAT)	12
1.4. Ενδοκυτταρική σύνθεση χοληστερόλης	12
1.5. Υποδοχείς καταβολισμού λιποπρωτεϊνών	13
1.6. Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών	15
1.7. Οικονομία χοληστερόλης στον οργανισμό	17
1.8. Μέθοδοι προσδιορισμού λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών	18
1.9. Μεταβολισμός LDL λιποπρωτεϊνών	19
1.9.1 ApoB100	20
1.9.2 Υποδοχέας B/E LDL	22
1.9.3 Μεταλλάξεις του B/E LDL υποδοχέα	24

1.9.4 Μεταλλάξεις του B/E LDL υποδοχέα στον ελληνικό πληθυσμό	28
1.10. Πρωτοπαθείς διαταραχές του μεταβολισμού της χοληστερόλης	30
1.10.1 Γενικά	30
1.10.2 Οικογενής υπερχοληστερολαιμία	32
1.10.3 Οικογενής λειτουργική ανεπάρκεια της ApoB100	33
1.10.4 Οικογενής μικτή υπερλιπιδαιμία	35
1.10.5 Πολυγονιδιακή υπερχοληστερολαιμία	36
1.10.6 Οικογενής υπερ αποβήτα λιποπρωτεΐναιμία	37
2. Ειδικό Μέρος	38
2.1. Σκοπός	38
2.2. Ασθενείς	38
2.3. Γενεαλογικό δέντρο	39
2.4. Μεθοδολογία	41
2.4.1 Γενικά	41
2.4.2 Τεχνικές	42
• Απομόνωση γενομικού DNA	42
• Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	43
• Κατάτμηση του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού	44
• Ανάδειξη των προϊόντων της PCR και της πέψης	45
2.4.3 Αναζήτηση σημειακών μεταλλάξεων στα εξόνια 2, 4 και 9 του B/E LDL υποδοχέα	46
2.4.4 Αναζήτηση σημειακής μετάλλαξης στο εξόνιο 11 του B/E LDL υποδοχέα	49
2.4.5 Αναζήτηση της σημειακής μετάλλαξης R3500Q στο γονίδιο της ApoB100	51
2.4.6 Προσδιορισμός των λιπιδίων στο αίμα.	53
Αποτελέσματα	54
Συζήτηση	60
Abstract	61
Βιβλιογραφία	62

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η αύξηση των επιπέδων των λιπιδίων του πλάσματος είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης αρτηριοσκλήρυνσης που αποτελεί συστηματικό νόσημα φθοράς υπεύθυνο για αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα στις ανεπτυγμένες χώρες. Στην υπερλιπιδαιμία καθοριστικό ρόλο παίζουν οι συνθήκες διατροφής και διαβίωσης αλλά δεν είναι λιγότερο σημαντικό το γονιδιακό μας υπόστρωμα για το οποίο γνωρίζουμε πολύ λίγα παρά την αλματώδη πρόοδο των τελευταίων 10ετιών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα γενετικά καθορισμένης διαταραχής των λιπιδίων αποτελεί η οικογενής υπερχοληστερολαιμία. Οφείλεται, συνήθως, σε μετάλλαξη του υποδοχέα των LDL λιποπρωτεϊνών που ελαττώνει την ικανότητα του να τις καταβολίζει και οδηγεί σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της χοληστερόλης πλάσματος. Οι συνέπειες είναι οδυνηρές αφού η στεφανιαία νόσος και το έμφραγμα εκδηλώνονται νωρίς στη ζωή. Είναι προφανές ότι η έγκαιρη διάγνωση και λήψη των αναγκαίων θεραπευτικών μέτρων αποτελεί το μοναδικό τρόπο ανάσχεσης των συνεπειών της κληρονομικής αυτής διαταραχής.

Η παρουσία αυξημένων επιπέδων χοληστερόλης και η πρώιμη εκδήλωση στεφανιαίας νόσου σε αρκετά μέλη μίας πολυμελούς Θεσσαλικής οικογένειας έθεσαν την διάγνωση της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας. Η αναζήτηση της μοριακής βλάβης στο γονίδιο της αποπρωτεΐνης Β και σε ορισμένα εξόνια του Β/Ε LDL υποδοχέα αποτέλεσαν το αντικείμενο της παρούσας μελέτης.

Η εργασία εκπονήθηκε με την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Ενδοκρινολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γ. Κουκούλη, στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Π.Π.Γ.Ν. Λάρισας (Μοριακή Βιολογία) υπό τον Δ/ντη Αναπλ. Καθηγητή κ. Α. Μανιάτη, και στο Εργαστήριο Γενετικής και Μοριακής Γενετικής του Π.Π.Γ.Ν. Λάρισας, Τους ανωτέρω καθηγητές ευχαριστώ.

Στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας συνέβαλλαν ουσιαστικά και υπήρξαν πραγματικοί βοηθοί και υποστηρικτές οι :

κ. Π. Κόλλια, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που με τις παρεμβάσεις και συμβουλές της έδωσε λύσεις σε πολλά μεθοδολογικά και άλλα προβλήματα,

κ. Φ. Κόντος, Βιολόγος στο Μικροβιολογικό Τμήμα του Π.Π.Γ.Ν.Λάρισας, που με καθοδήγηση και με παρακολουθούσε ενεργά,

κ. Π. Παπαγγελή, Βιολόγος Ε.ΤΕ.Π. στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας που με βοήθησε ουσιαστικά καθόλη την εκπόνηση της εργασίας καθώς και στη συγγραφή του κειμένου.

Όλη η δαπάνη της εργασίας καλύφθηκε από τον προϋπολογισμό του Π.Σ.Ε. Ιατρικής Βιοχημείας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους καθηγητές που με δίδαξαν αυτά τα τέσσερα χρόνια και μου παρείχαν αφθονία γνώσης. Ιδιαίτερώς την πρώην πρόεδρο του τμήματος Π.Σ.Ε. Ιατρικής Βιοχημείας, Αναπλ. καθηγήτρια κ. Σ. Μπονάνου που είχε τη δύναμη και το κουράγιο να αναλάβει τέτοιες ευθύνες και να φέρει σε πέρας ένα πάρα πολύ δύσκολο έργο, δίνοντας την ευκαιρία, για πρώτη φορά στα Ελληνικά δεδομένα, σε άτομα άνω των 25 ετών να λάβουν πανεπιστημιακή εκπαίδευση.

Λάρισα, Ιούλιος 2002

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

1.1. Εισαγωγή

Τα λιπίδια, όπως η χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια, είναι υδρόφοβα μόρια και συνεπώς μη διαλυτά στο πλάσμα¹. Ως αποτέλεσμα τα κυκλοφορούντα λιπίδια συνδέονται με λιποπρωτεϊνικά μόρια και με αυτά μεταφέρονται στους ιστούς όπου αποθηκεύονται, χρησιμοποιούνται ως ενεργειακά υποστρώματα ή χρησιμεύουν για τη σύνθεση στεροειδών ορμονών και χολικών αλάτων¹. Η αύξηση των λιπιδίων στην κυκλοφορία, **υπερλιπιδαιμία ή υπερλιποπρωτεϊναιμία**, έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία γιατί ευθύνεται σε σημαντικό βαθμό για την ανάπτυξη αθηρωμάτωσης^{2,3}. Η στεφανιαία νόσος αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου και στα δύο φύλλα στον Δυτικό κόσμο. Σε άτομα ηλικίας μεγαλύτερης των 65 ετών κυρία αιτία θανάτου είναι η στεφανιαία νόσος ευθυνόμενη για το 50 % των περιπτώσεων ενώ ο καρκίνος ευθύνεται για το 25% των θανάτων και οι λοιμώξεις μόνο για το 2%⁴.

Η υπερλιπιδαιμία ορίζεται ως η αύξηση της ολικής ή της LDL χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων ή της Lp(α) πάνω από το 90^ο εκατοστημόριο ή η ελάττωση της HDL χοληστερόλης ή της αποπρωτεΐνης A-1 κάτω από το 10^ο εκατοστημόριο των τιμών κατανομής των ανωτέρω λιπιδίων στο γενικό πληθυσμό.⁵ Στον πληθυσμό τα επίπεδα των λιπιδίων στο πλάσμα παρουσιάζουν μια συνεχή κατανομή σε ευρέα όρια.⁶ Ως εκ τούτου είναι απαραίτητο να ορισθούν αυθαίρετα ορισμένα φυσιολογικά όρια βάση των οποίων θα ορίζεται η λιπιδαιμική διαταραχή. Επιδημιολογικές μελέτες σε Ευρώπη και Αμερική έδειξαν ότι υπάρχει μια προοδευτική αύξηση του κινδύνου στεφανιαίας νόσου καθώς αυξάνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης πλάσματος. Τα επίπεδα της χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων και της HDL χοληστερόλης που αντιστοιχούν στα ανωτέρω εκατοστημόρια φαίνονται στον **πίνακα 1**. Κλινικά σημαντικά θεωρούνται τα επίπεδα LDL χοληστερόλης >130mg/dl, αλλά όταν υπάρχει αθηροσκληρυνση επίπεδα πάνω από τα 100 mg/dl πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Επειδή η HDL σχεδόν ποτέ δεν συμμετέχει στη δεξαμενή της χοληστερόλης με περισσότερο από 120mg/dl, επίπεδα χοληστερόλης >260mg/dl πάντοτε υποδηλώνουν σημαντική υπερλιπιδαιμία.

Το δεύτερο βήμα στη μελέτη της υπερλιπιδαιμίας στοχεύει στον εντοπισμό των λιποπρωτεϊνικών μορίων που ευθύνονται για την αύξηση των λιπιδίων στο αίμα. Πάντα πρέπει να αποκλείεται το ενδεχόμενο υποκείμενης νόσου η οποία μπορεί να είναι

αποκλειστικά υπεύθυνη για τη λιπιδαιμική διαταραχή ή να επιδεινώνει συνυπάρχουσα πρωτοπαθή διαταραχή.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Επίπεδα των λιπιδίων ορού αίματος σε συνάρτηση με τον κίνδυνο αγγειοπάθειας

Προσδιορισμός	Επίπεδα ορού αίματος	Κίνδυνος αγγειοπάθειας
Ολική Χοληστερόλη (Ο.Χ.)	<200 (<5.2) αποδεκτά 201 – 240 (5,2 – 6,2) >240 (>6.2) >300 (>7.8)	Μέτρια αυξημένος Σημαντικά αυξημένος Λίαν σημαντικά αυξημένος
LDL Χοληστερόλη (LDL-X)	<130 (<3.4) αποδεκτά 131 – 160 (3,4 – 4,1) >160 (>4.1) >190 (>4.9)	Μέτρια αυξημένος Σημαντικά αυξημένος Λίαν σημαντικά αυξημένος
HDL Χοληστερόλη (HDL-X)	>40 (>1.0) αποδεκτά <35 (<0.9)	Αυξημένος
Σχέση ΟΧ/HDL-X	<4.5 αποδεκτά >5	Αυξημένος
Σχέση LDL-X/HDL-X	<3.0 αποδεκτά >3.5	Αυξημένος
Τριγλυκερίδια	<150 (<1.7) αποδεκτά >200 (>2.3) >1000 (11.3)	Αυξημένος Σημαντικά αυξημένος (κίνδυνος παγκρεατίτιδας)

* Όλες οι τιμές είναι σε mg/dl (mol/L)

Σήμερα προτιμάται ο όρος **δυσλιπιδαιμία** γιατί εκφράζει ποιοτικές πέρα από τις ποσοτικές διαταραχές των λιποπρωτεϊνικών μορίων.⁷

1.2. Στοιχεία φυσιολογίας των λιποπρωτεϊνών

Οι λιποπρωτεΐνες είναι μεγάλα σφαιρικά μόρια που αποτελούνται από **λιπίδια** και μια ομάδα πρωτεϊνών που ονομάζονται **αποπρωτεΐνες** (ή απολιποπρωτεΐνες)¹. Στην ομάδα των λιπιδίων περιλαμβάνονται: **α)** η ελεύθερη χοληστερόλη, **β)** η εστεροποιημένη χοληστερόλη, **γ)** τα τριγλυκερίδια και **δ)** τα φωσφολιπίδια. Η διάταξη των λιπιδίων και των αποπρωτεϊνών στο μόριο των λιποπρωτεϊνών εξαρτάται από τον λιπόφιλο ή υδρόφιλο χαρακτήρα τους. Τα τριγλυκερίδια και οι εστέρες της χοληστερόλης είναι υδρόφοβα μόρια και καταλαμβάνουν τον πυρήνα του μορίου των λιποπρωτεϊνών ενώ τα φωσφολιπίδια και οι αποπρωτεΐνες αποτελούν τον μανδύα του μορίου όντας κατά ένα τμήμα του μορίου τους υδρόφοβα και κατά το υπόλοιπο υδρόφιλα. Το λιπόφιλο τμήμα των φωσφολιπιδίων και των αποπρωτεϊνών έρχεται σε επαφή με τον υδρόφοβο πυρήνα ενώ το υδρόφιλο τμήμα έρχεται σε επαφή με το πλάσμα.

Ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών γίνεται με βάση τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά⁸ (πίνακας 2), σύμφωνα με τα οποία τις διακρίνουμε σε: **α)** χυλομικρά, **β)** λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), **γ)** λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας (IDL), **δ)** λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) και **ε)** λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL).

Πίνακας 2: Ταξινόμηση των λιποπρωτεϊνών με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα.

Ομάδα	Ηλεκτροφορητική κινητικότητα	Κυριώτερο συστατικό (%)
Χυλομικρά	Σημείο εκκίνησης	Τριγλυκερίδια (85-95)
VLDL	Προβήτα	Τριγλυκερίδια (50-65)
LDL	Βήτα	Χοληστερίνη (50-60)
HDL	Αλφα	Πρωτεΐνη (45-55)

• Χοληστερόλη

Είναι το κυριώτερο λιπίδιο στις λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας (IDL) και σημαντικό συστατικό στις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL)⁹. Η χοληστερόλη είναι βασικό δομικό μόριο για: **α)** την κατασκευή των κυτταρικών μεμβρανών, **β)** τη σύνθεση των χολικών αλάτων και **γ)** τη σύνθεση των στεροειδών ορμονών των

επιπεφριδίων και των γονάδων. Η χοληστερόλη βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα των μορίων των λιποπρωτεϊνών με τη μορφή εστέρα ενώ μικρό ποσοστό της βρίσκεται στην επιφάνεια τους με ελεύθερη μορφή. Το μεγαλύτερο ποσοστό της εστεροποιημένης χοληστερόλης αποτελούν οι εστέρες του λινολεϊκού οξέος. Στην κυκλοφορία τα μόρια της ελεύθερης χοληστερόλης, στην επιφάνεια των λιποπρωτεϊνικών μορίων, υφίστανται εστεροποίηση με τη βοήθεια του ενζύμου: ακυλ-τρανφεράση της λεκιθίνης-χοληστερόλης (LCAT, Lecithin Cholesterol Acyl Transferase). Η χοληστερόλη, όπως και τα τριγλυκερίδια, μεταφέρεται από το μόριο μιάς λιποπρωτεΐνης σε άλλο με μια ειδική πρωτεΐνη (την πρωτεΐνη που μεταφέρει τους εστέρες της χοληστερόλης, Cholesterol Ester Transfer Protein (CETP)).

- **Τριγλυκερίδια**

Τα τριγλυκερίδια είναι το αφθονότερο συστατικό των χυλομικρών και VLDL και αποτελούν σημαντική πηγή ενέργειας για το ήπαρ και τους περιφερικούς ιστούς ειδικότερα δε για τους μύες. Τα τριγλυκερίδια, και γενικότερα τα λιπίδια, μεταφέρονται, όπως ήδη αναφέρθηκε, από το μόριο μιας λιποπρωτεΐνης σε μόριο άλλης λιποπρωτεΐνης με ειδικές πρωτεΐνες-φορείς.

- **Φωσφολιπίδια**

Τα φωσφολιπίδια είναι το αφθονότερο συστατικό της επιφάνειας των λιποπρωτεϊνικών μορίων, όπου σχηματίζουν δύο στιβάδες από τις οποίες η εσωτερική – υδρόφοβος – έρχεται σε επαφή με τα λιπίδια του πυρήνα ενώ η εξωτερική – υδρόφιλος – έρχεται σε επαφή με τα μόρια του πλάσματος. Το σημαντικότερο φωσφολιπίδιο είναι η λεκιθίνη ή φωσφατιδιλοχολίνη, πηγή του λινολεϊκού οξέως για την εστεροποίηση της χοληστερόλης.

- **Αποπρωτεΐνες**

Είναι πρωτεϊνικά μόρια που βρίσκονται στην επιφάνεια των λιποπρωτεϊνών. Μερικές από τις αποπρωτεΐνες ρυθμίζουν τη δομική σταθερότητα ενώ άλλες καθορίζουν τη μεταβολική τύχη των λιποπρωτεϊνικών μορίων, ενεργώντας ως συνένζυμα. Οι κυριότερες αποπρωτεΐνες παρατίθενται στον **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3: Εντόπιση και λειτουργίες των αποπρωτεϊνών (ΗΛ= ηπατική λιπάση, ΛΛ= λιποπρωτεϊνική λιπάση)

Αποπρωτεΐνη	Ομάδες λιποπρωτεϊνών όπου εντοπίζονται	Λειτουργία
A-I	Χυλομικρά, HDL	Δομικό συστατικό των HDL, Συνένζυμο της LCAT
A-II	Χυλομικρά, HDL	Δομικό συστατικό των HDL, Συνένζυμο της ΗΛ
A-IV	Χυλομικρά	
B-48	Χυλομικρά	Δομικό συστατικό
B-100	VLDL, LDL	Δομικό συστατικό Συνδέτης B/E LDL υποδοχέα
Lp(a)	LDL, HDL	Δομικό συστατικό
C-I	Χυλομικρά, VLDL, HDL	Συνένζυμο της LCAT
C-II	Χυλομικρά, VLDL, HDL	Συνένζυμο της ΛΛ
C-III	Χυλομικρά, VLDL, HDL	Αναστολέας της ΛΛ
D	HDL	
E-2, 3, 4	Χυλομικρά, VLDL, HDL	Συνδεεται με τον B/E LDL υποδοχέα
F	HDL	
G	HDL	
H	Χυλομικρά	Συνένζυμο της ΛΛ

- **Αποπρωτεΐνες της ομάδας Β (ΑποΒ)**

Η Β-48 και η Β-100 είναι οι δύο κύριες αποπρωτεΐνες της ομάδας Β.⁹ Κωδικοποιούνται από το ίδιο γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2. Η αποπρωτεΐνη Β-48 (αποΒ-48) έχει μικρότερο αγγελιοφόρο RNA που οφείλεται στο κωδικόνιο 253 το οποίο εντέλλεται τη διακοπή της μεταγραφής. (mRNA editing). Είναι κύριο συστατικό των χυλομικρών ενώ η Β-100 (αποΒ-100) είναι η κύρια αποπρωτεΐνη των VLDL, IDL

και LDL, όπου αντιπροσωπεύει αντίστοιχα το 30, 60 και 95% των πρωτεϊνικών μορίων. Και οι δύο αποπρωτεΐνες έχουν στο μόριο τους περιοχή που συνδέεται με την ΛΛ.

Η αποB-48 συντίθεται αποκλειστικά στο έντερο και είναι απαραίτητη για το σχηματισμό και την μεταφορά των χυλομικρών από το έντερο στην κυκλοφορία. Η αποB-100 είναι η μεγαλύτερη, σε μέγεθος, αποπρωτεΐνη και συντίθεται αποκλειστικά στο ήπαρ. Είναι απαραίτητη για τον αρχικό σχηματισμό των μορίων των VLDL στο ηπατικό κύτταρο και την έκκρισή τους από αυτό. Άτομα που αδυνατούν να συνθέσουν αποB-100 δεν εκκρίνουν στην κυκλοφορία VLDL. Το μόριο της έχει αρκετές υδρόφοβες περιοχές που εξυπηρετούν τη στερεή σύνδεση της με τα λιπίδια γεγονός που ερμηνεύει την μή μεταφορά της από τη μια ομάδα λιποπρωτεϊνών στην άλλη. Επίσης, ορισμένες περιοχές του μορίου της λειτουργούν ως θέσεις δέσμησης μορίων που μοιάζουν με την ηπαρίνη και αυτό πιστεύεται ότι ευθύνεται για μερικές από τις αλληλεπιδράσεις της επιφάνειας των κυττάρων και των λιποπρωτεϊνικών μορίων που φέρουν την αποB-100. Ιδιαίτερα σημαντικό από πλευράς φυσιολογίας είναι ότι το τμήμα του μορίου της αποB-100, στη θέση των αμινοξέων 3100-3500, αναγνωρίζει και συνδέεται με τον B/E LDL υποδοχέα μέσω του οποίου καταβολίζονται οι IDL και κυρίως οι LDL λιποπρωτεΐνες

- **Αποπρωτεΐνες της ομάδας C**

Η ομάδα C περιλαμβάνει τρία μέλη που συντίθενται στο ήπαρ⁹. Τα γονίδια της αποC-I και αποC-II βρίσκονται στο χρωμόσωμα 19 ενώ το γονίδιο της αποC-III βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11. Η αποC-I ενεργεί ως συνένζυμο της LCAT. Η αποC-II είναι σημαντικό λειτουργικό συστατικό των VLDL, και είναι επίσης παρούσα στην επιφάνεια των χυλομικρών και HDL. Η αποC-II είναι αναγκαίος ενεργοποιητής του ενζύμου λιποπρωτεϊνική λιπάση (ΛΛ), το οποίο υδρολύει τα τριγλυκερίδια. Άτομα με ανεπάρκεια της αποC-II παρουσιάζουν έντονη υπερτριγλυκεριδαιμία. Η αποC-III έχει ανασταλτική λειτουργία ανταγωνιζόμενη: α) τη δράση της αποC-II πάνω στην ΛΛ και β) την ηπατική πρόσληψη και καταβολισμό των χυλομικρών και των υπολειμμάτων (remnants) των VLDL.

- **Αποπρωτεΐνες της ομάδας A**

Οι αποπρωτεΐνες της ομάδας A είναι πρωτεΐνες των HDL λιποπρωτεϊνών⁹. Συντίθενται στο ήπαρ και το έντερο. Από αυτές, η αποA-I αποτελεί το 70-80% της πρωτεϊνικής μάζας και επηρεάζει τη δομική ακεραιότητα των HDL μορίων επιμηκώνοντας την παραμονή τους στην κυκλοφορία. Η απουσία της αποA-I συνεπάγεται την απουσία των HDL λιποπρωτεϊνών. Η αποA-I είναι ενεργοποιητής του ενζύμου LCAT το οποίο μετατρέπει σε εστεροποιημένη την ελεύθερη χοληστερόλη των HDL3 (υποομάδα των HDL) λιποπρωτεϊνών. Η αντίδραση αυτή επιτρέπει τη μετακίνηση της ελεύθερης χοληστερόλης από την επιφάνεια προς το κέντρο του λιποπρωτεϊνικού μορίου και με τον τρόπο αυτό το μόριο HDL3 αλλάζει σύσταση και μέγεθος και μετατρέπεται σε HDL2. Η αποA-II είναι διμερής πρωτεΐνη πλούσια σε κυστεΐνη που επιτρέπει την δημιουργία δυσουλφιδικών γεφυρών με την αποE.

- **Αποπρωτεΐνη E**

Η αποE είναι από τις περισσότερο μελετηθείσες⁹. Συντίθεται σχεδόν από όλους τους ιστούς αλλά κυρίως στο ήπαρ και βρίσκεται σε όλες τις κατηγορίες των λιποπρωτεϊνικών μορίων. Υπάρχουν τρεις ισομορφές (E2,E3,E4) που είναι αποτέλεσμα πολυμορφισμού του γονιδίου. Η αποE ρυθμίζει την απόσυρση από το πλάσμα των υπολειμμάτων των χυλομικρών και VLDL χάρη στην ιδιότητά της να συνδέεται με τον B/E LDL υποδοχέα. Η αποE, όπως και η αποB-100, έχει στο μόριο της περιοχές που δεσμεύουν μόρια που μοιάζουν με την ηπαρίνη. Στο γονίδιο της αποE έχουν περιγραφεί αρκετές μεταλλάξεις που μειώνουν την ικανότητα σύνδεσης της αποE με τον B/E LDL υποδοχέα. Σε ασθενείς με έλλειψη της αποE παρατηρείται αύξηση των υπολειμμάτων των χυλομικρών και των VLDL.

- **Αποπρωτεΐνη D**

Η από D βρίσκεται σε όλα τα λιποπρωτεϊνικά μόρια.⁹ Παρουσιάζει έντονη γλυκοζυλίωση και συμμετέχει με την LCAT στη μεταφορά της εστεροποιημένης χοληστερόλης από τις HDL στις VLDL λιποπρωτεΐνες.

- **Αποπρωτεΐνη (α)**

Η απο (α) είναι παρούσα στις LDL λιποπρωτεΐνες.⁹ Ένα μόριο αυτής της αποπρωτεΐνης συνδέεται, με δυσουλφιδικό δεσμό, με ένα μόριο αποB-100 και το σύμπλοκο

αυτό ονομάζεται Lp(a). Στο πλάσμα υπάρχουν μόρια απο(α) με διαφορετικό μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 40-80 Kd. Η συγκέντρωση της Lp(a) στο πλάσμα καθορίζεται γενετικά και εξαρτάται ευθέως από την πυκνότητα της απο(α). Η παρουσία της απο(α) μειώνει την ικανότητα σύνδεσης της αποB-100 του μορίου της Lp(a) με τον B/E LDL υποδοχέα. Η αυξημένη συγκέντρωση της Lp(a) στο πλάσμα αποτελεί ανεξάρτητο ισχυρό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου. Η λειτουργία της απο(α) είναι άγνωστη. Επειδή το μόριο της παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με το πλασμινογόνο θεωρείται ότι παρεμβαίνει στον ινοδωλυτικό μηχανισμό.

1.3. Ένζυμα

Ο ενδοαγγειακός μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών περιλαμβάνει: **α)** τη δράση λιπολυτικών ενζύμων και **β)** την μη ενζυμική ανταλλαγή λιπιδίων και αποπρωτεϊνών ανάμεσα στα διαφορετικά μόρια των λιποπρωτεϊνών. Τα λιπολυτικά ένζυμα υδρολύουν τους εστερικούς δεσμούς των λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων. Τρία, κυρίως, λιπολυτικά ένζυμα συμμετέχουν στον ενδοαγγειακό μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών: **α)** η λιποπρωτεϊνική λιπάση (ΛΛ), **β)** η ηπατική λιπάση (ΗΛ) και **γ)** η ακυλοτρανφεράση της λεκιθίνης-χοληστερόλης (LCAT)

• Λιποπρωτεϊνική λιπάση

Η ΛΛ βρίσκεται στους ιστούς που αποθηκεύουν ελεύθερα λιπαρά οξέα ή τα χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας όπως ο λιπώδης ιστός, οι σκελετικοί μύες, ο καρδιακός μυς, το δίκτυο των πνευμονικών τριχοειδών και ο μαστός στη γαλουχία.^{9,10} Το ένζυμο συντίθεται στα κύτταρα των ανώτερων ιστών και στη συνέχεια μετακινείται στο ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων. Η "ουρά" του ενζυμικού μορίου αγκυροβολεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα ενώ το υπόλοιπο τμήμα επιπλέει στον ενδοαγγειακό χώρο, όπου αντιδρά με τα λιποπρωτεϊνικά μόρια. Η ΛΛ ενεργοποιείται από την αποπρωτεΐνη C-II, που βρίσκεται στην επιφάνεια των χυλομικρών και των VLDL, και προκαλεί υδρόλυση των τριγλυκεριδίων τους. Το σύστημα της ΛΛ κορέννυται όταν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα είναι μεταξύ 800 και 1000 mg/dl.

Η σύνθεση, μεταφορά δια των κυττάρων και δραστηριότητα της ΛΛ επηρεάζονται σημαντικά από τις ορμόνες του πλάσματος και ιδιαίτερα από την ινσουλίνη. Η αύξηση της ινσουλίνης μετά από γεύμα ή η εξωγενής χορήγηση ινσουλίνης αυξάνουν τη σύνθεση και δραστηριότητα της ΛΛ, ενώ τα οιστρογόνα και η προλακτίνη καθώς και οι

β-αδρενεργικοί αναστολείς την ελαττώνουν. Η ηπαρίνη αυξάνει τη δραστηριότητα της ΛΛ απελευθερώνοντάς την από το ενδοθήλιο στην κυκλοφορία.

- **Ηπατική λιπάση**

Η ΗΛ συντίθεται αποκλειστικά στο ήπαρ και παραμένει στην περιοχή του ενδοθηλίου των φλεβωδών κόλπων.¹¹ Η ΗΛ υδρολύει τους εστερικούς δεσμούς των τριγλυκεριδίων και, σε αντίθεση με τη ΛΛ, εστερικούς δεσμούς φωσφολιπιδίων απουσία αποπρωτεΐνης C-II. Η ακριβής λειτουργία της ΗΛ δεν είναι γνωστή. Φαίνεται όμως ότι συμμετέχει ουσιαστικά στον ηπατικό καταβολισμό των χυλομικρών και VLDL και τον περιφερικό μεταβολισμό των HDL. Έχει παρατηρηθεί αντίστροφη συσχέτιση των επιπέδων της ΗΛ και των HDL λιποπρωτεϊνών. Η σύνθεση και η δραστηριότητα της ΗΛ διαγείρονται από τις θυρεοειδικές ορμόνες, τα ανδρογόνα και τα προγεσταγόνα ενώ αναστέλονται δραματικά από τα οιστρογόνα και την αυξητική ορμόνη.

- **Ακυλο-Τρανσφεράση της λεκιθίνης - χοληστερόλης (LCAT)**

Συντίθεται στο ήπαρ και εκκρίνεται στην κυκλοφορία.¹² Η δράση του ενζύμου αυτού αποτελεί τον μοναδικό μηχανισμό για την ενδοαγγειακή εστεροποίηση της χοληστερόλης. Η LCAT ενεργεί στην επιφάνεια των HDL3 μορίων και καταλύει τη μεταφορά ενός λιπαρού οξέος από το μόριο ενός φωσφολιπιδίου (της λεκιθίνης) στο μόριο της χοληστερόλης. Ο δημιουργούμενος εστέρας της χοληστερόλης, ως υδρόφοβη ένωση, μετακινείται στο κέντρο του HDL3 μορίου προκαλώντας αύξηση του μεγέθους του και ελάττωση της πυκνότητας του μεταπίπτοντας σε HDL2 μόριο. Οι εστέρες της χοληστερόλης, που δημιουργούνται με τον τρόπο αυτό, μεταφέρονται στη συνέχεια με πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων (CETP) στις VLDL και LDL λιποπρωτεΐνες.

1.4. Ενδοκυτταρική σύνθεση της χοληστερόλης

Όλα τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να συνθέτουν χοληστερόλη. Ο μηχανισμός αυτός είναι ιδιαίτερα σημαντικός στα στεροειδοπαραγωγά κύτταρα. Τα κύτταρα συνθέτουν χοληστερόλη από το ακετυλο-συνένζυμο Α.¹ Σημαντικός ρυθμιστής του μεταβολικού μονοπατιού σύνθεσης της χοληστερόλης είναι το ένζυμο αναγωγή του υδροξυ-μεθυλ-γλουταρυλ-συνέζυμου Α (HMG-CoA).

Η δραστηριότητα του ενζύμου HMG-CoA καθορίζει το βαθμό σύνθεσης της χοληστερόλης και επηρεάζει αρνητικά τη σύνθεση και έκφραση των LDL υποδοχέων,

στην επιφάνεια του κυττάρου. Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της χοληστερόλης παρουσιάζουν αντιστρόφως ανάλογη σχέση με την πυκνότητα των LDL υποδοχέων.¹⁴ Ο μηχανισμός αρνητικής αλληλεπίδρασης της ενδοκυτταρικής σύνθεσης χοληστερόλης και της σύνθεσης και έκφρασης των LDL υποδοχέων υπάρχει σε όλα τα κύτταρα αλλά έχει ιδιαίτερη μεταβολική σημασία στο αγγειακό ενδοθήλιο, τα ηπατικά κύτταρα, τα κύτταρα του φλοιού των επινεφριδίων και τα κύτταρα των γονάδων. Τα ηπατικά κύτταρα, ως κύριος τύπος σύνθεσης και έκκρισης των VLDL λιποπρωτεϊνών, ενδιαφέρουν ιδιαίτερα αφού καταστάσεις αυξημένης παραγωγής ευνοούν την υπερλιπιδαιμία.

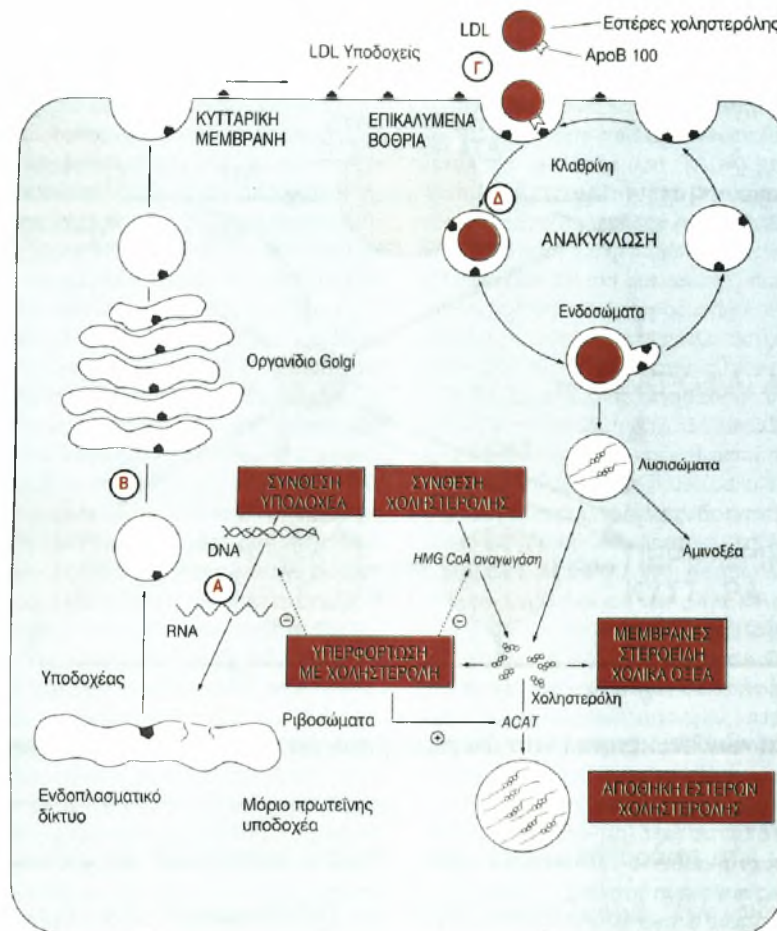
1.5. Υποδοχείς καταβολισμού των λιποπρωτεϊνών

Οι λιποπρωτεΐνες εισέρχονται εντός των κυττάρων για να καταβολιστούν με ειδικό μηχανισμό που προϋποθέτει την σύνδεσή τους με ειδικό υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου^{1,15} (Σχήμα 1). Η σύνδεση της λιποπρωτεΐνης με τον υποδοχέα της ακολουθείται από τη μετακίνηση του συμπλόκου υποδοχέα-λιποπρωτεΐνης στο εσωτερικό του κυττάρου όπου γίνεται η αποδόμηση του λιποπρωτεϊνικού μορίου. Η φυσιολογική λειτουργία των υποδοχέων είναι σημαντική παράμετρος για την απόσυρση των λιποπρωτεϊνών από την κυκλοφορία.

Από τους υποδοχείς σημαντικότερος είναι ο B/E LDL υποδοχέας¹, που υπάρχει σε όλα τα κύτταρα και ιδιαίτερα στα ηπατικά. Οι B/E LDL υποδοχείς αναγνωρίζουν και συνδέονται με την αποB των LDL και αποE των VLDL και IDL λιποπρωτεϊνών. Ο αριθμός των B/E LDL υποδοχέων στην επιφάνεια του κυττάρου είναι αντιστρόφως ανάλογος προς την ενδοκυτταρική συγκέντρωση χοληστερόλης. Η ελάττωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων χοληστερόλης συνοδεύεται από ενεργοποίηση του γονιδίου και αύξηση της σύνθεσης και έκφρασης των B/E LDL υποδοχέων και αντίστροφα.

Τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων εκφράζουν στην επιφάνεια τους και ένα άλλο είδος υποδοχέα, τον ακετυλ-LDL υποδοχέα.¹⁶ Ο υποδοχέας αυτός είναι σημαντικός γιατί ενέχεται στην εναπόθεση των λιπιδίων στο τοίχωμα των αγγείων. Αυτό οφείλεται στο ότι οι ακετυλ-LDL υποδοχείς : **α)** δεν επηρεάζονται θετικά ή αρνητικά, όσον αφορά τη συγκέντρωσή τους, από τα ενδοκυτταρικά επίπεδα χοληστερόλης και **β)** αναγνωρίζουν μόρια διαφορετικά μεταξύ τους, όπως το ευρύ φάσμα των οξειδωμένων μορίων των LDL λιποπρωτεϊνών. Οι υποδοχείς αυτοί ενεργούν ως «συλλέκτες υπολειμμάτων» (scavenges) των λιποπρωτεϊνικών μορίων.

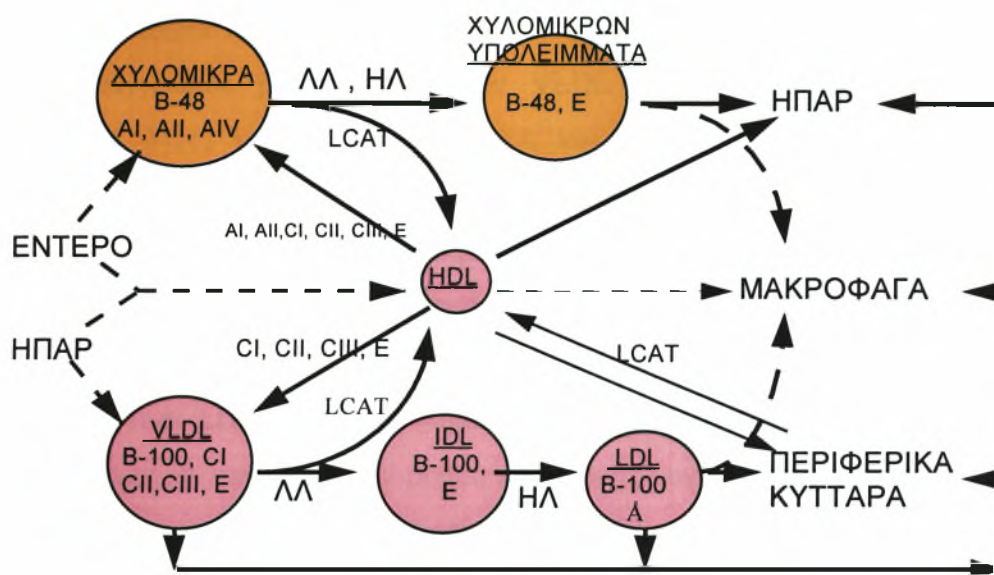
Στην επιφάνεια των κυττάρων βρέθηκε και ένας άλλος υποδοχέας που αναγνωρίζει και συνδέει τις HDL λιποπρωτείνες. Η σύνδεση των HDL3 λιποπρωτεϊνικών μορίων με τον ανωτέρω υποδοχέα είναι αναγκαία προϋπόθεση για την πρόσληψη της χοληστερόλης από την κυτταρική μεμβράνη και τη μεταφορά της σε άλλα λιποπρωτεϊνικά μόρια ή το ήπαρ.¹⁷ Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα χοληστερόλης επηρεάζουν, επίσης, την πυκνότητα των HDL υποδοχέων όπως και των B/E LDL υποδοχέων. Εδώ συμβαίνει το αντίθετο αφού η αύξηση της ενδοκυτταρικής χοληστερόλης αυξάνει την έκφραση των HDL υποδοχέων ενώ η ελάττωσή της τη μειώνει.



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση της κυτταρικής πρόσληψης των LDL μορίων και της έκφρασης των B/E LDL υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη.

1.6. Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών

Κύριες πηγές των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος είναι το έντερο και το ήπαρ. Στο έντερο τα τριγλυκερίδια της τροφής υδρολύονται σε λιπαρά οξέα και β-μονογλυκερίδια από την παγκρεατική λιπάση, η οποία ενεργοποιείται από τα χολικά άλατα. Τα προϊόντα της υδρόλυσης εισέρχονται στο λεμφικό δύκτιο με τη μορφή **χυλομικρών** και από εκεί στην κυκλοφορία. Στο λεμφικό χώρο τα χυλομικρά αρχίζουν να ανταλλάσσουν συστατικά της επιφάνειάς τους με τις HDL λιποπρωτεΐνες δίνοντας φωσφολιπίδια και παίρνοντας αποC και αποE. Στο μόριο των χυλομικρών υπάρχουν αρκετές αποπρωτεΐνες αλλά οι σημαντικότερες είναι: η αποB-48, η αποE και η αποC-II (Σχήμα 2).



Σχήμα 2: Σχηματική παράσταση του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών πλάσματος

Στην κυκλοφορία, τα χυλομικρά δέχονται την ενζυμική δράση της ΛΛ η οποία ενεργοποιείται από την αποπρωτεΐνη C-II με αποτέλεσμα την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων της επιφάνειάς τους και ελάττωση του μεγέθους τους.¹³ Τα μικρότερα πλέον μόρια, (**υπολείμματα των χυλομικρών, remnants**) συνεχίζουν να υφίστανται υδρόλυση στα ηπατικά κύτταρα από τη δράση της ΗΛ η οποία υποβοηθείται σημαντικά από την αποE. Κατά την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων και την επακόλουθη συρρίκνωση του μορίου των χυλομικρών, αποπρωτεΐνες της επιφάνειάς τους μετακινούνται στις HDL λιποπρωτεΐνες. Όταν τα χυλομικρά χάσουν το μεγαλύτερο μέρος του φορτίου των τριγλυκεριδίων τους αποσύρονται από την κυκλοφορία μέσω

του ήπατος. Η ηπατική πρόσληψη των υπολειμμάτων των χυλομικρών γίνεται μέσω των B/E LDL και LRP-υποδοχέων που αναγνωρίζουν την από E.⁹

Το ήπαρ είναι το κύριο όργανο της ενδογενούς παραγωγής VLDL HDL και λιποπρωτεϊνών.¹ Οι VLDL λιποπρωτεΐνες παράγονται αποκλειστικά στο ήπαρ. Το ήπαρ προμηθεύει τριγλυκερίδια τους περιφερικούς ιστούς πακεταρισμένα στον πυρήνα των VLDL μορίων. Τα τριγλυκερίδια συντίθενται στο ήπαρ από ελεύθερα λιπαρά οξέα που προσλαμβάνονται από την κυκλοφορία ή παράγονται στα ηπατικά κύτταρα. Η αυξημένη προσφορά ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ, από οποιαδήποτε αιτία, συνοδεύεται από αυξημένη παραγωγή VLDL εφόσον δεν συνυπάρχει αυξημένη κετογένεση. Η αυξημένη πρόσληψη τροφής, η λήψη οινοπνεύματος και η χορήγηση οιστρογόνων ακολουθούνται από αυξημένη έκκριση VLDL μορίων από το ήπαρ.

Ο ενδοαγγειακός μεταβολισμός των VLDL είναι παρόμοιος με εκείνο των χυλομικρών. Μετά την επίδραση της ΛΛ και την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων προκύπτουν μικρότερα μόρια τα οποία, σε αντιστοιχία με τα υπολείμματα των χυλομικρών, αποτελούν τις IDL λιποπρωτεΐνες. Μέρος των IDL μορίων καταβολίζεται μέσω του ήπατος ενώ τα υπόλοιπα υφίστανται στην κυκλοφορία τη δράση της ΗΛ και μετατρέπονται σε LDL μόρια. Τα IDL μόρια που διαφεύγουν την πρόσληψη του ήπατος μετατρέπονται σε LDL μόρια. Ο ρυθμός απόσυρσης των IDL από τα ηπατικά κύτταρα ασκεί καθοριστική επίδραση στον ρυθμό παραγωγής των LDL μορίων. Τα LDL μόρια περιέχουν στον πυρήνα τους κυρίως εστέρες της χοληστερόλης και στην επιφάνεια τους σχεδόν αποκλειστικά αποB-100. Σε φυσιολογικά άτομα το μεγαλύτερο μέρος των VLDL μετατρέπεται σε LDL και το σύνολο της αποB-100 των τελευταίων προέρχεται από τις πρώτες. Σε αρκετές καταστάσεις υπερτριγλυκεριδαιμίας η μετατροπή των VLDL σε LDL είναι ελαττωμένη. Το γεγονός ότι οι LDL προέρχονται από τον καταβολισμό των VLDL σημαίνει ότι η αύξηση των LDL μπορεί να είναι αποτέλεσμα: **α)** αυξημένης ηπατικής παραγωγής VLDL, **β)** μειωμένου καταβολισμού των LDL ή **γ)** συνδιασμού των ανωτέρω.

Καθοριστικός παράγοντας για το μεταβολισμό των λιπιδίων είναι οι HDL λιποπρωτεΐνες.⁹ Παράγονται στο ήπαρ και το λεπτό έντερο και εκκρίνονται με τη μορφή δίστιβων πρωτεϊνικών δίσκων και προσκτούν τα λιπίδια του μορίου τους στη λέμφο και το πλάσμα. Οι HDL λιποπρωτεΐνες έχουν δύο κύριες λειτουργίες: **α)** συμμετέχουν στη διαδικασία μεταφοράς της χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ και **β)** ενεργούν ως δότες και δέκτες όλων των αποπρωτεϊνών πλύν των B.

Μόρια ελεύθερης χοληστερόλης και φωσφολιπίδια που απελευθερώνονται κατά την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων από την επιφάνεια των χυλομικρών και VLDL μεταφέρονται στα HDL μόρια με την πρωτεΐνη που μεταφέρει φωσφολιπίδια (PLTP, Phospholipid transfer protein). Επίσης, η HDL προσλαμβάνει και απομακρύνει την περίσσεια ελεύθερης χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς. Στο HDL μόριο η ελεύθερη χοληστερόλη εστεροποιείται με τη δράση της LCAT. Το ένζυμο αυτό μεταφέρει ένα λιπαρό οξύ από την λεκιθίνη στην χοληστερόλη και την εστεροποιεί. Η λυσολεκιθίνη που προκύπτει από την αφαίρεση του λιπαρού οξέος εγκαταλείπει τη λιποπρωτεΐνη, συνδέεται με την αλβουμίνη και μεταφέρεται στους ιστούς για επαναχρησιμοποίηση. Η εστεροποίηση της χοληστερόλης συνεπάγεται τη μετακίνησή της στο εσωτερικό του μορίου (HDL3), αύξηση του όγκου του και μετάπτωσή του σε HDL2. Η εστεροποιημένη χοληστερόλη (κυρίως εστέρες του λινολεϊκού οξέος) μεταφέρεται από τις HDL2 λιποπρωτεΐνες σε άλλα λιποπρωτεϊνικά μόρια (LDL, IDL και υπολείμματα χυλομικρών) με μη ειδικό τρόπο ή με την ειδική πρωτεΐνη μεταφοράς (CETP). Επιπρόσθετα, προμηθεύουν με χοληστερόλη τα επινεφρίδια και τις γονάδες για τον σχηματισμό των στεροειδών ορμονών. Οι HDL λιποπρωτεΐνες λειτουργούν επίσης ως φορείς των αποπρωτεϊνών C προς τα χυλομικρά και τις νεοσχηματιζόμενες VLDL.

Τα οιστρογόνα διεγείρουν την ηπατική σύνθεση HDL ενώ τα ανδρογόνα και τα προγεσταγόνα την αναστέλλουν. Ανάλογα με τη μέθοδο διαχωρισμού, οι HDL διακρίνονται σε τρεις ή περισσότερες ομάδες οι οποίες αριθμούνται ως HDL2, HDL3, κτλ. Η αποΑ-I είναι το σημαντικότερο πρωτεϊνικό στοιχείο των HDL και βρίσκεται σε όλα τα μόρια. Αποτελεί απαραίτητη αποπρωτεΐνη για τη σύνθεση και σταθερότητα των HDL μορίων και ακόμα ενεργεί ως συνένζυμο της LCAT.

1.7. Η οικονομία της χοληστερόλης στον οργανισμό

Η χοληστερόλη είναι ένα πολύτιμο δομικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών και της μυελίνης και πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση των ορμονών του φλοιού των επινεφριδίων και των γονάδων καθώς και των χολικών αλάτων.¹⁸ Όλα τα εμπύρνα κύτταρα έχουν την ικανότητα να συνθέτουν χοληστερόλη από το ακετυλο-συνένζυμο Α με τη βοήθεια του ενζύμου HMG-CoA. Η δραστηριότητα της μεταβολικής οδού σύνθεσης της χοληστερόλης ρυθμίζεται από τα επίπεδα της χοληστερόλης ή κάποιου μεταβολίτη της που καταστέλλουν τη δραστηριότητα του ενζύμου. Έτσι τα κύτταρα

συνθέτουν χοληστερόλη στο βαθμό που η προμήθεια της από τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος δεν καλύπτει τις ανάγκες τους. Οι εστεροποιημένη χοληστερόλη στα κύτταρα λειτουργεί ως αποθήκη άμεσης χρήσης. Οι ανάγκες σε χοληστερόλη είναι αυξημένες σε περιπτώσεις πολλαπλασιασμού των κυττάρων όταν νέες κυτταρικές μεμβράνες κατασκευάζονται. Τα ηπατοκύτταρα και το εντερικό επιθήλιο απαιτεί επίσης μεγάλες ποσότητες χοληστερόλης για τη σύνθεση των λιποπρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, τα κύτταρα συνεχώς μεταφέρουν μικρά ποσά χοληστερόλης προς τις HDL λιποπρωτεΐνες. Από το σύνολο της χοληστερόλης του οργανισμού ένα μικρό ποσό χάνεται με τα κύτταρα του δέρματος και του εντερικού επιθηλίου που αποπίπτουν. Η χοληστερόλη μετατρέπεται στο ήπαρ σε χολικά άλατα μέσω 7^α-υδροξυλίωσης. Περίπου 2% από τα χολικά άλατα στο έντερο χάνονται με τα κόπρανα. Η δραστηριότητα του ενζύμου 7^α-υδροξυλάση ελαττώνεται στον υποθυρεοειδισμό όπως επίσης της ηπατικής λιπάσης καθώς και ο αριθμός των B/E LDL-υποδοχέων.^{12,19}

1.8. Μέθοδοι προσδιορισμού των λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών

Τα επίπεδα των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα πρέπει να προσδιορίζονται μετά από 12-14 ώρες νηστείας. Σημαντικές πληροφορίες μπορούν να συλλεγούν από την παρατήρηση του ορού μετά από παραμονή στους 4⁰C για ένα 24ωρο.^{8,9} Η παρουσία στην επιφάνεια του ορού λευκάζουσας στιβάδας είναι ενδεικτική υπερτριγλυκεριδαιμίας (>200mg/dl). Επίσης σημαντική είναι η παρατήρηση λευκού ιζήματος που κατακρημνίζεται καθώς ο ορός ψύχεται το οποίο οφείλεται σε σύνδεση των λιποπρωτεϊνών με ανοσοσφαιρίνες. Στην σπάνια αυτή περίπτωση είναι ανάγκη η αιμοληψία και ο διαχωρισμός του ορού να γίνουν σε θερμοκρασία 37⁰C.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων αίματος γίνεται με πολλές διαφορετικές τεχνικές. Οι συνηθισμένες μέθοδοι προσδιορίζουν μαζί την εστεροποιημένη και μη εστεροποιημένη χοληστερόλη που συνιστούν την ολική χοληστερόλη του ορού. Στις περισσότερες περιπτώσεις η ηλεκτροφόρηση των λιποπρωτεϊνών προσφέρει ελάχιστες πρόσθετες πληροφορίες γεγονός που την απομακρύνει από τις εξετάσεις ρουτίνας. Εξάιρεση αποτελεί η περίπτωση της οικογενούς δυσβήτα-λιποπρωτεϊναιμίας. Ο πλέον αξιόπιστος χαρακτηρισμός των λιποπρωτεϊνών αίματος επιτυγχάνεται με τη μέτρηση της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων καθώς και τον προσδιορισμό της ηλεκτροφορετικής συμπεριφοράς κλασμάτων των λιποπρωτεϊνών που λαμβάνονται με υπερφυγοκέντρωση, τεχνική



εφαρμοζόμενη μόνο για ερευνητικούς λόγους. Τα επίπεδα των HDL μορίων μπορούν να μετρηθούν μετά από κατακρήμνυση όλων των άλλων λιποπρωτεϊνικών μορίων με ηπαρίνη και μαγκάνιο. Τα αποτελέσματα αυτής της τεχνικής είναι αξιόπιστα εφόσον ασκείται έντονος ποιοτικός έλεγχος.

Σημαντικός παράγοντας για την εκτίμηση του ποσού των εστέρων της χοληστερόλης στην HDL είναι η ποσοτική παρουσία λιποπρωτεϊνών που είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια. Τα τριγλυκερίδια από αυτές τις λιποπρωτεΐνες μετακινούνται στον πυρήνα των HDL μορίων εκτοπίζοντας εστέρες της χοληστερόλης γεγονός που ευθύνεται για την αρνητική λογαριθμική σχέση της HDL χοληστερόλης με τα τριγλυκερίδια πλάσματος. Συνεπώς, τα επίπεδα της HDL αξιολογούνται πάντα σε συνδιασμό με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων. Τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης υπολογίζονται με βάση τις τιμές των τριγλυκεριδίων και της HDL ως ακολούθως: $LDL = \text{Ολική χοληστερόλη} - (\text{τριγλυκερίδια}/5 + HDL)$. Ο ανωτέρω υπολογισμός ισχύει μόνο για επίπεδα τριγλυκεριδίων μέχρι 400mg/dl.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων της αποB-100, της αποA-1 και της Lp(a) είναι σήμερα εφικτός με ανοσολογικές μεθόδους και συμβάλλουν στη διαφορική διάγνωση των δυσλιπιδαιμιών. Περισσότερο σύνθετοι μέθοδοι που στοχεύουν στον προσδιορισμό των ισομορφών της αποE, τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των λιπασών ή των χαρακτηρισμό του μεγέθους των LDL μορίων εφαρμόζονται μόνο σε εξειδικευμένα εργαστήρια.

1.9. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ LDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι LDL λιποπρωτεΐνες αποτελούν τελικά προϊόντα του ενδοαγγειακού μεταβολισμού των ηπατικής προέλευσης VLDL λιποπρωτεϊνών. Κύρια αποπρωτεΐνη του μορίου τους είναι η αποB-100. Η απόσυρση των των LDL από την κυκλοφορία φαίνεται ότι γίνεται με πολλούς μηχανισμούς. Ο κυριότερος δρόμος καταβολισμού τους είναι μέσω των B/E LDL διαμεμβρανικών υποδοχέων των ηπατικών και περιφερικών κυττάρων οι οποίοι αναγνωρίζουν την αποπρωτεΐνη B-100. Το 70% των LDL μορίων αποσύρεται και μεταβολίζεται στα ηπατικά κύτταρα ενώ το υπόλοιπο 30% μεταβολίζεται στους άλλους ιστούς. Η χοληστερόλη που προέρχεται από τα υπολείμματα των χυλομικρών είναι ο κυριώτερος παράγοντας αμφίδρομης ρύθμισης της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης στα ηπατικά κύτταρα. Η αποB-100 και ο B/E LDL υποδοχέας είναι βασικοί παράγοντες του φυσιολογικού μεταβολισμού των LDL λιποπρωτεϊνών.

1.9.1 Αποπρωτεΐνη B-100 (ΑποB-100)

Η έναρξη του καταβολισμού των LDL λιποπρωτεϊνών προϋποθέτει την παρουσία της αποB-100 στο LDL μόριο και την φυσιολογική σύνδεσή της με τον B/E LDL υποδοχέα. Η αποB-100 είναι η μοναδική αποπρωτεΐνη των LDL σωματιδίων. Το γονίδιο της ευρίσκεται στο χρωμόσωμα 2. Είναι γλυκοπρωτεΐνη μιάς αλυσίδας αποτελούμενη από 4536 αμινοξέα με μοριακό βάρος 514 kd.¹ Η βιοσύνθεση της αποB-100 ρυθμίζεται από μεταβολικούς διαιτητικούς και ορμονικούς παράγοντες. Η ρύθμιση της βιοσύνθεσης της στα ηπατικά κύτταρα ασκείται κυρίως σε μεταμεταγραφικό επίπεδο. Η ινσουλίνη, η αυξητική ορμόνη και οι ορμόνες του θυροειδούς αυξάνουν την παραγωγή της ενώ η γλυκαγόνη και οι προσταγλανδίνες, PGE2 και PGD2 αναστέλλουν την έκκριση της μεταβάλλοντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του Ca²⁺.⁹ Η μεταγευματική υψηλή συγκέντρωση της ινσουλίνης παρεμποδίζει την έκκρισή της γιατί επιταχύνει την ενδοκυττάρια αποικοδόμηση της αποB-100 οδηγώντας σε ενδοκυττάρια συγκέντρωση των VLDL στο ήπαρ. Η έκκριση της αποB-100 από το ήπαρ επηρεάζεται θετικά από την πρόσληψη κεκορεσμένων λιπαρών οξέων και χοληστερόλης. Αντιθέτως τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αναστέλλουν την έκκρισή της.

Μετά την μεταγραφή η αποB-100 παραμένει στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η ενώνεται με λιπίδια. Η μεταφορά λιπιδίων στο μόριο της αποB-100 γίνεται με μια ειδική πρωτεΐνη την πρωτεΐνη μεταφοράς τρυγλικεριδίων (MTP) η οποία βρίσκεται στα μικροσώματα.²⁰ Η πρωτεΐνη αυτή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και έκκριση των VLDL λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων. Η δυσλειτουργία της MTP οδηγεί σε μη έκκριση αποB-100 από τα ηπατικά κύτταρα και ευθύνεται για την κλινική οντότητα της αβητα-λιποπρωτεϊναιμίας. Η έκκρισή της εξαρτάται από την ενδοηπατική διαθεσιμότητα τριγλυκεριδίων, εστέρων χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων. Ενσωματώνεται και εκκρίνεται ως μέρος των VLDL μορίων. Η αυξημένη σύνθεση VLDL λιποπρωτεϊνών συνοδεύεται από ανάλογη έκκριση αποB-100. Η αποB-100 αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της ενδοηπατικής σύνθεσης VLDL μορίων.

Η περιοχή του μορίου της αποB-100 στις θέσεις των αμινοξέων 3100-3500 είναι σημαντική για την σύνδεση της με τον B/E LDL υποδοχέα.²¹ Το μόριο της αποB-100 περιβάλλει τοξοειδώς τα σωματίδια LDL και στη θέση 3500 της αμινοξικής αλληλουχίας δημιουργείται μια διασταύρωση του κυρίως τμήματος του μορίου της με το COOH-τελικό του άκρο (Σχήμα 3) λόγω αλληλεπίδρασης της

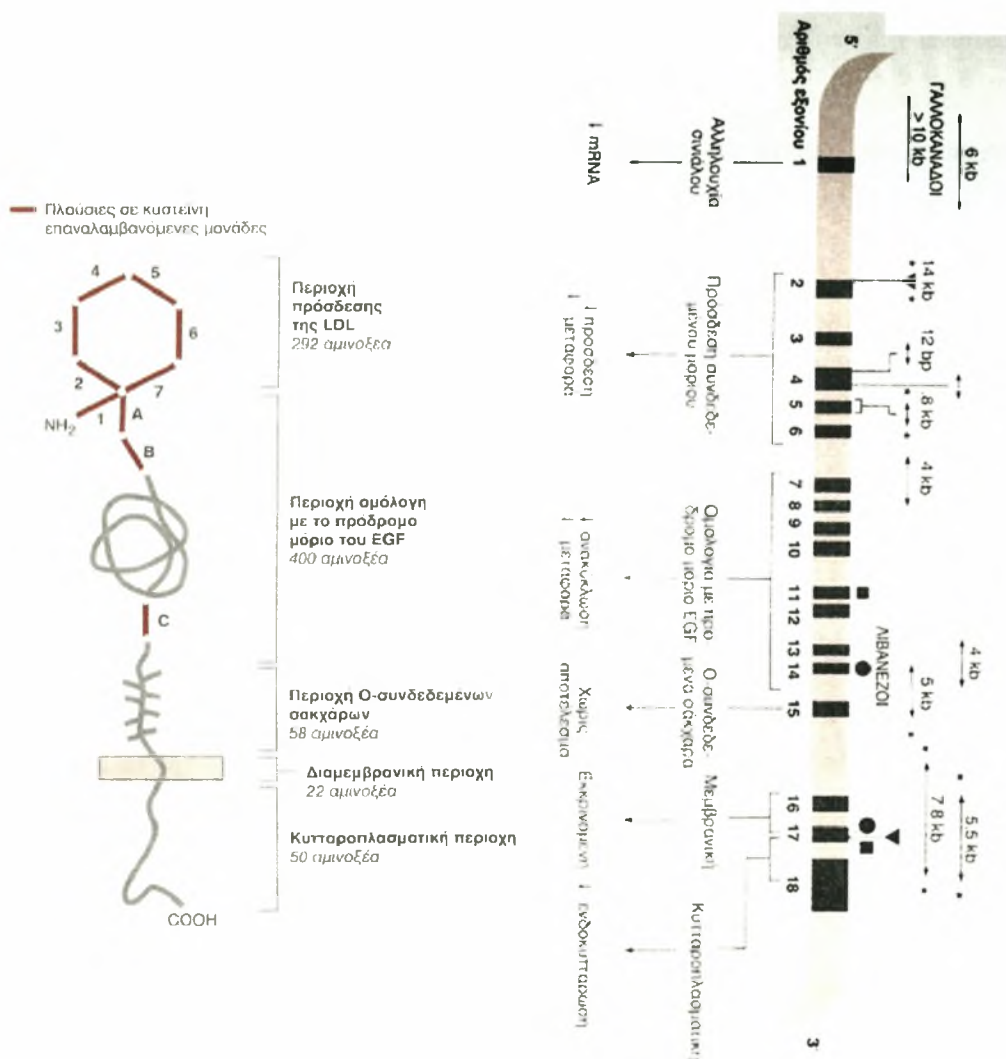
1.9.2 Υποδοχέας B/E LDL

Ο B/E LDL υποδοχέας είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 160 kD. Η απομόνωση του και η κλωνοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα έδειξαν ότι ο υποδοχέας συντίθεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), γλυκοζυλιώνεται καθώς διέρχεται μέσα από τη συσκευή Golgi και τελικά ενσωματώνεται στην κυτταρική μεμβράνη.²²

Η δομή των περιοχών του υποδοχέα αποκαλύφθηκε με ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας. Το N-τελικό άκρο του μορίου, όπου και η περιοχή που προσδέεται η αποB-100, έχει αρνητικό φορτίο και αποτελείται από 7 επαναλαμβανόμενες μονάδες των 40 αμινοξέων κάθε μία από τις οποίες περιέχει 6 κυστεΐνες. Ακολουθεί μία περιοχή η οποία είναι παρόμοια με το πρόδρομο μόριο του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) και στη συνέχεια μια άλλη περιοχή όπου συνδέονται σάκχαρα. Το διαμεμβρανικό τμήμα του υποδοχέα ακολουθεί το καρβοξυτελικό άκρο το οποίο απολήγει ενδοκυτταροπλασματικά με 50 αμινοξέα. Το διαμεμβρανικό και ενδοκυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα είναι σημαντικές περιοχές για τη σωστή τοποθέτηση του μορίου στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Το γονίδιο του B/E LDL υποδοχέα βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 19. Αποτελείται από 18 εξόνια και 17 ιντρόνια και έχει μέγεθος 45Kbp. (Σχήμα 4). Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί την αλληλουχία "σινιάλο" του γονιδίου. Τα εξόνια 2-6 κωδικοποιούν την περιοχή πρόσδεσης των LDL σωματιδίων. Η περιοχή του B/E LDL υποδοχέα που συνδέεται με τα LDL μόρια αποτελείται από επτά επαναλήψεις των 40 αμινοξέων η κάθε μια. Μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή έχουν διαφορετική επίπτωση στην ικανότητα σύνδεσης του υποδοχέα με τον συνδέτη. Η πρώτη επανάληψη δεν είναι απαραίτητη για τη σύνδεση του υποδοχέα με την αποB-100 ή την αποE. Οι επαναλήψεις 2 και 3 είναι απαραίτητες για τη δέσμευση της αποB-100. Η επανάληψη 5 είναι απαραίτητη για τη δέσμευση της αποB-100 ή της αποE ενώ οι επαναλήψεις 6 και 7 δεν απαιτούνται για τη δέσμευση των VLDL μέσω της αποE.²³ Τα εξόνια 7-14 κωδικοποιούν την περιοχή που έχει ομοιότητα με το πρόδρομο μόριο του EGF. Αυτή η περιοχή περιέχει τρεις επαναλήψεις των 40 αμινοξέων πλούσιες σε κυστεΐνη (A, B και C). Οι υποπεριοχές A και B κωδικοποιούνται από τα εξόνια 7 και 8 ενώ η υποπεριοχή C ξεχωρίζει από τις δύο προηγούμενες με την παρεμβολή 5 επαναλήψεων των 40-50 αμινοξέων (κωδικοποιούνται από τα εξόνια 9-13) και περιέχουν το διατηρημένο μοτίβο Tyr-

Trp-Thr-Asp (YWTD). Το εξόνιο 15 κωδικοποιεί μία αλληλουχία 58 αμινοξέων όπου συνδέονται (ο-συνδεδεμένες) οι υδατανθρακικές αλυσίδες. Το εξόνιο 16 και το 5' άκρο του εξονίου 17 κωδικοποιούν την διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα η οποία αποτελείται από 22 υδρόφοβα αμινοξέα. Το υπόλοιπο του εξονίου 17 και το 5' άκρο του εξονίου 18 κωδικοποιούν την κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα. Αυτή η περιοχή εσωκλείει το σήμα που δίνει τη δυνατότητα στον υποδοχέα για ενδοκύττωση. Η μεταγραφή του γονιδίου του υποδοχέα ρυθμίζεται με αρνητική επανατροφοδότηση από τα ενδοκυτταρικά επίπεδα χοληστερόλης. Η πέραν του 5' άκρου περιοχή του DNA του γονιδίου που κωδικοποιεί τον B/E LDL υποδοχέα περιέχει τις αλληλουχίες που είναι υπεύθυνες για την έκφραση του γονιδίου στα κύτταρα.



Σχήμα 4. Δομή και χαρακτηριστικά του γονιδίου και της πρωτεΐνης του B/E LDL υποδοχέα.

1.9.3. Μεταλλάξεις του B/E LDL υποδοχέα

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περισσότερες από 700 μεταλλάξεις του γονιδίου συμπεριλαμβανομένων των μη νοηματικών (nonsense) των παρανοηματικών (missense) των απαλειφών, και των ενθέσεων.^{21,26} Λειτουργικά, οι μεταλλάξεις του B/E LDL υποδοχέα έχουν ταξινομηθεί σε κατηγορίες. Η διαταραχή (μετάλλαξη) κληρονομείται με τον αυτόσωμο υπολλειπόμενο χαρακτήρα. Η παρουσία μετάλλαξης στο ένα αλληλόμορφο του γονιδίου ευθύνεται για την ετερόζυγη μορφή ενώ η παρουσία μετάλλαξης και στο δύο αλληλόμορφα προκαλεί την ομόζυγη μορφή. Μερικοί ομοζυγώτες ασθενείς κληρονομούν δύο ίδιες μεταλλάξεις του υποδοχέα (αληθινοί ομόζυγώτες) ενώ άλλοι κληρονομούν δύο διαφορετικές μεταλλάξεις (σύνθετοι ομοζυγώτες). Για χάρη απλοποίησης και οι δύο ανωτέρω κατηγορίες αποκαλούνται ομοζυγώτες.

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο του B/E LDL υποδοχέα προκαλούν οικογενή υπερχοληστερολαιμία (Familial Hypercholesterolemia, FH). Η ετεροζυγωτία παρατηρείται με συχνότητα ενός στα 500 άτομα. Ενώ η συχνότητα των ομοζυγωτών είναι μικρότερη (ένα άτομο ανά εκατομμύριο του γενικού πληθυσμού). Η έλλειψη ή η λειτουργική ανεπάρκεια του υποδοχέα (λόγω μετάλλαξης) εμποδίζει τον καταβολισμό της LDL χοληστερόλης, αυξάνει τα επίπεδά της στο πλάσμα και προάγει την εναπόθεση της στους ιστούς (υποδόρια στους τένοντες και στα τοιχώματα των αρτηριών). Στους ετεροζυγώτες οι συγκεντρώσεις της ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα είναι 2πλάσιες –3πλάσιες του φυσιολογικού και η στεφανιαία νόσος ή το έμφραγμα εκδηλώνεται μετά την ηλικία των 35 ετών. Το 5% των ασθενών με στεφανιαία νόσο στην Αμερική και τη Δυτική Ευρώπη με ηλικία μικρότερη των 60 ετών είναι ετεροζυγώτες με οικογενή υπερχοληστερολαιμία. Στους ομοζυγώτες τα επίπεδα χοληστερόλης πλάσματος είναι 4πλάσια έως 6πλάσια του φυσιολογικού και η στεφανιαία νόσος εκδηλώνεται κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων δεκαετιών της ζωής τους.^{24,27}

Όπως προαναφέρθηκε οι μεταλλάξεις του B/E LDL υποδοχέα ταξινομούνται σε κατηγορίες οι οποίες είναι:

1. Μετάλλαξη κατηγορίας I (μη λειτουργικά αλληλόμορφα).

Το κύτταρο αποτυγχάνει να παράγει φυσιολογικό LDL υποδοχέα (**Σχήμα 5**). Οι πιο συχνοί τύποι των μεταλλάξεων τύπου I είναι οι μη νοηματικές (nonsense) και η «μετατόπιση» του πλαισίου ανάγνωσης. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι τυχαία

κατανεμημένες ανάμεσα στα εξόνια και δίνουν mRNA που είναι κανονικό σε μέγεθος αλλά μειωμένης συγκέντρωσης. Επίσης η απουσία του υποδοχέα σε αυτά τα κύτταρα μπορεί να οφείλεται και σε αστάθεια του mRNA όπως π.χ. οι μη νοσηματικές μεταλλάξεις στη β-σφαιρίνη.

2. Μετάλλαξη κατηγορίας II (ελαττωματική μεταφορά).

Είναι οι πιο συχνές. Το κύτταρο συνθέτει τον υποδοχέα αλλά αδυνατεί να τον μεταφέρει στην επιφάνεια του κυττάρου (**Σχήμα 5**). Ο υποδοχέας βρίσκεται μερικώς ή πλήρως μπλοκαρισμένος ανάμεσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τη συσκευή Golgi. Τα 2/3 αυτών των μεταλλάξεων εντοπίζονται στην περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα και το 1/3 στην ομόλογη περιοχή με το πρόδρομο μόριο EGF. Επίσης απαλειφές και ενθέσεις εντός της περιοχής πρόσδεσης μπορούν να καταλήξουν σε μεταλλάξεις κατηγορίας II, πιθανόν επειδή εμποδίζουν τη σωστή πτύχωση του υποδοχέα κατά την διάρκεια του ελέγχου ποιότητας που υφίσταται μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις της κατηγορίας II εντοπίζονται στην περιοχή με ομολογία προς το πρόδρομο μόριο του EGF.

3. Μετάλλαξη κατηγορίας III (ελαττωματική σύνθεση).

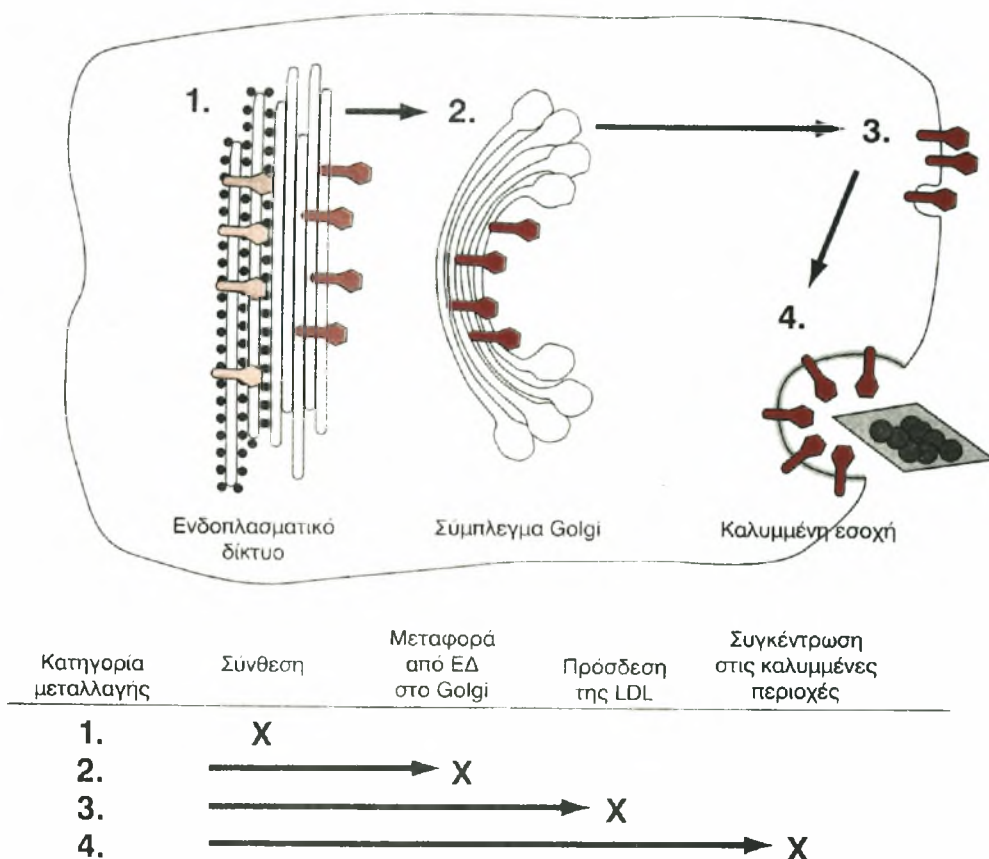
Ο φυσιολογικός B/E LDL υποδοχέας στην εξωκυττάρια περιοχή πρόσδεσης έχει δύο σημεία. Το ένα σημείο συνδέει την ApoB-100 και το άλλο σημείο συνδέει την ApoE. Οι μεταλλάξεις της κατηγορίας III κωδικοποιούν πρωτεΐνες (υποδοχείς) που εκφράζονται στην επιφάνεια του κυττάρου, αλλά δεν έχουν την απαιτούμενη ικανότητα σύνδεσης των LDL λιποπρωτεϊνών (**Σχήμα 5**). Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες διατηρούν την ικανότητα να συνδέονται με β-VLDL.

4. Μετάλλαξη κατηγορίας IV (μη δυνατή ενδοκυττάρωση).

Αυτές οι μεταλλάξεις κωδικοποιούν υποδοχείς οι οποίοι εκφράζονται φυσιολογικά στην επιφάνεια των κυττάρων, έχουν φυσιολογική ικανότητα σύνδεσης με τις LDL λιποπρωτεΐνες αλλά το σύμπλοκο υποδοχέα-λιποπρωτεΐνης δεν μπορεί να μετακινηθεί στο εσωτερικό του κυττάρου (ενδοκυττάρωση) (**Σχήμα 5**). Οι μεταλλάξεις της ταξέως IV έχουν διακριθεί σε δύο ομάδες: α) μεταλλάξεις που αφορούν στην κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα και β) μεταλλάξεις που αφορούν στην κυτταροπλασματική και τη διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα.

Στην πρώτη υποκατηγορία ανήκει η αντικατάσταση στην κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα ενός αρωματικού αμινοξέος (Tyr-Phe) από μία κυστεΐνη που εμποδίζει την ενδοκυττάρωση του συμπλόκου υποδοχέα-λιποπρωτεΐνης (οικογενής

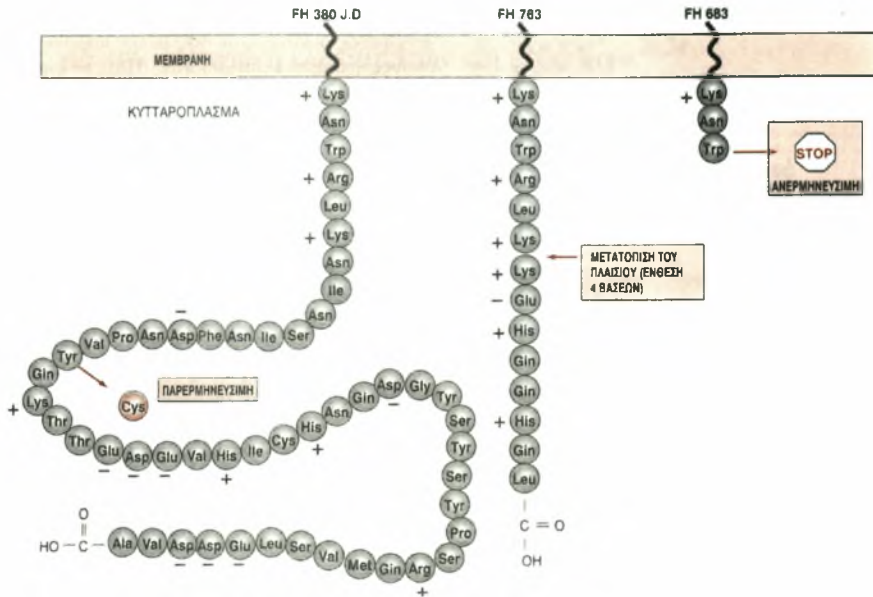
υπερχοληστερολαιμία Bari allele). Στη δεύτερη υποκατηγορία ανήκουν υποδοχείς με έλλειμα στη διαμεμβρανική και κυτταροπλασματική περιοχή. Μόνο 10% αυτών των υποδοχέων εκφράζονται στην επιφάνεια του κυττάρου. Μεταλλάξεις της διαμεμβρανικής περιοχής του υποδοχέα (14 υδρόφοβα αμινοξέα) δεν επηρεάζουν την έκφραση του στην επιφάνεια του κυττάρου αλλά δυσχεραίνουν την ενδοκυττάρωση του.



Σχήμα 5. Σχηματική απεικόνιση των τεσσάρων από τις πέντε κατηγορίες μεταλλάξεων του B/E LDL υποδοχέα.

5. Μετάλλαξη κατηγορίας V (ανακύκλωση).

Οι μεταλλάξεις αυτές κωδικοποιούν υποδοχείς που εκφράζονται στην επιφάνεια του κυττάρου, συνδέουν LDL λιποπρωτεΐνες και ενδοκυτταρώνονται αλλά δεν απελευθερώνονται από το πρόσδεμα τους (LDL σωματίδια) (Σχήμα 6) στο ενδόσωμα του κυττάρου με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ανακύκλωσή τους. Οι μεταλλάξεις αυτές συμβαίνουν στην περιοχή που είναι ομόλογη με το πρόδρομο μόριο του EGF η οποία παρεμβαίνει στο διαχωρισμό του υποδοχέα από την LDL



Σχήμα 6. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν την κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα LDL και εκφράζονται με διαταραχή του μηχανισμού της ενδοκυττάρωσης.

6. Μεταλλάξεις εκκινητού.

Μόνο τρεις μεταλλάξεις έχουν προσδιορισθεί μέχρι σήμερα όσον αφορά στην περιοχή του εκκινητή του γονιδίου. Δύο παρανοηματικές (missense) μεταλλάξεις και μία έλλειψη που αφορούν μία από τις δύο SP1 περιοχές (περιοχές δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων). Η χαμηλή συχνότητα αυτών των μεταλλάξεων οφείλεται στο μικρό μέγεθος του DNA στόχου (200bp) που είναι απαραίτητο για την μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου.

Η ανακάλυψη των μεταλλάξεων ένθεσης και ελλείματος στο γονίδιο του B/E LDL υποδοχέα έδωσε ενδιαφέρουσες πληροφορίες σχετικά με τον πιθανό μηχανισμό τέτοιων μεταλλάξεων και την διαχρονική εξέλιξη του γονιδίου. Η μοριακή ανάλυση αποκάλυψε την παρουσία αλληλουχιών Alu εκατέρωθεν των εξονίων 2 και 7 αντίστοιχα στα ιντρόνια 1 και 8. Λόγω του υψηλού βαθμού ομολογίας των αλληλουχιών αυτών έχει υποστηριχθεί ότι φαινόμενα άνισου επιχιασμού μπορεί να συμβούν ανάμεσά τους. Ένας παρόμοιος μηχανισμός μπορεί να εξηγήσει την εξέλιξη των εξονίων που κωδικοποιούν τις επαναλήψεις των 40 αμινοξέων που περιλαμβάνουν την περιοχή του μορίου που προσδένει τις LDL λιποπρωτεΐνες. Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ότι πολλά ελλείμματα έχουν αλληλουχίες Alu σε ένα ή και

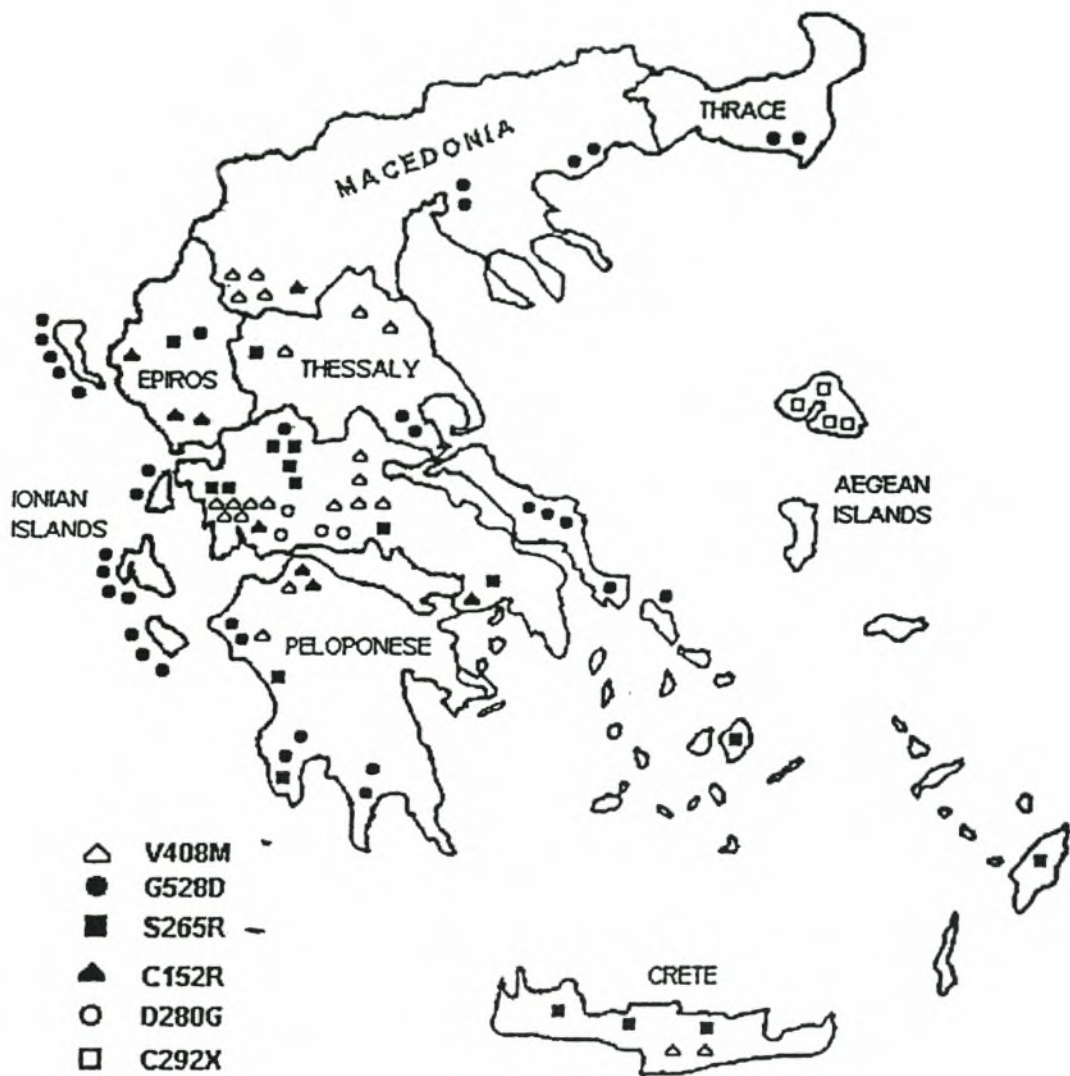
στα δύο άκρα τους υποδεικνύοντας ότι αυτός θα μπορούσε να είναι ένας κοινός μηχανισμός για την παραγωγή ελλειμμάτων και ενθέσεων.^{22,24}

1.9.4 Μεταλλάξεις του B/E LDL υποδοχέα στον Ελληνικό πληθυσμό

Η οικογενής υπερχοληστερολαιμία ενδημεί και στον Ελληνικό πληθυσμό. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί σημειακές μεταλλάξεις που φαίνονται στον **πίνακα 4** και **Σχήμα 7** και αφορούν στα εξόνια 2, 4, 6, 9 και 11 του B/E LDL υποδοχέα.²⁵ Οι πλέον συχνές μεταλλάξεις εντοπίζονται στο εξόνιο 11 και ακολουθούν τα εξόνια 6 και 9. Οι μεταλλάξεις των εξονίων 2, 4, 9, 11 αντιπροσωπεύουν περίπου το 45% αυτών που ενδημούν στον ελληνικό πληθυσμό.

Πίνακας 4. Μεταλλάξεις B/E LDL υποδοχέα στον ελληνικό πληθυσμό

Εξόνιο	Μετάλλαξη	Ποσοστό %
2	S35P	2,7
4	C152R (FH-Greece 1)	5,3
6	S265R (FH-Greece 2)	11,3
	D280G (FH-Greece 3)	3,3
	C292X (FH-Cyprus 1)	2,7
9	V408M (FH Africane 2)	14,7
11	D528G (FH Genoa)	22,7



Σχήμα 7. Χάρτης Ελλάδος – Μεταλλάξεις

Περιοχές της Ελλάδος όπου ενδημούν οι μεταλλάξεις V408M, G528D, S265R, C152R, C280G, C292X

1.10. ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

1.10.1 Γενικά

Η αύξηση της χοληστερόλης ή και των τριγλυκεριδίων αποτελεί σοβαρή μεταβολική διαταραχή γιατί αυξάνει τον κίνδυνο φθοράς του τοιχώματος των αρτηριών. Οι συνέπειες των δυσλιπιδαιμιών στις αναπτυγμένες χώρες είναι σοβαρές γι' αυτό και καταβάλλεται συστηματική προσπάθεια για την πρόληψη ή/και τη θεραπεία τους. Η συχνότερη εικόνα διαταραχής των λιπιδίων αφορά στην αύξηση της χοληστερόλης μόνης της ή σε συνδυασμό με αύξηση των τριγλυκεριδίων ενώ η αμιγής αύξηση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων αίματος είναι σπανιότερη.

Η καθιστική ζωή σε συνδυασμό με την πρόσληψη άφθονης τροφής, πλούσιας σε λίπη, αποτελούν τον σημαντικότερο παράγοντα αύξησης των δισλιπιδαιμιών τις τελευταίες δεκαετίες. Όμως, δεν πρέπει να παραγνωρίζεται η σημασία της κληρονομικότητας (πολυγονιδιακή). Σε μικρότερο βαθμό η διαταραχή των λιπιδίων οφείλεται σε άλλη υποκείμενη νόσο που επηρεάζει τον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών (δευτεροπαθής διαταραχή) ενώ σπανιότερα για την εμφάνιση της δισλιπιδαιμίας υπεύθυνη είναι γονιδιακή βλάβη η οποία παρουσιάζει οικογενή κατανομή (Πρωτοπαθής διαταραχή). Στο παρόν κεφάλαιο θα αναλυθούν οι οικογενείς μορφές (πίνακας 5) που οδηγούν σε διαταραχή του μεταβολισμού της χοληστερόλης και αύξηση της στο πλάσμα.

Οι πρωτοπαθείς διαταραχές των λιπιδίων χαρακτηρίζονται από υπερπαραγωγή και/ή ελαττωματικό καταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. Ο ελαττωματικός καταβολισμός προκαλείται συνήθως, από κάποια ανωμαλία στην ίδια την λιποπρωτεΐνη ή στον υποδοχέα μέσω του οποίου η λιποπρωτεΐνη καταβολίζεται. Η συχνότητα των πρωτοπαθών δισλιπιδαιμιών εξαρτάται από τον πληθυσμό και είναι πάντα υψηλότερη σε ασθενείς με πρώιμη στεφανιαία νόσο (πριν την ηλικία των 60 ετών στους άνδρες και των 65 ετών στις γυναίκες). Στους ασθενείς αυτούς η συχνότητα της πρωτοπαθούς δισλιπιδαιμίας ανέρχονταν στο 75-85% έναντι του 40-45% σε συνομιλήκους χωρίς στεφανιαία νόσο.²⁸ Η λιποπρωτεϊνική διαταραχή είναι συνήθως οικογενής. Στην παραπάνω μελέτη, για παράδειγμα, το 54% όλων των ασθενών και το 70% αυτών με δισλιπιδαιμία είχαν οικογενή διαταραχή. Η πιο συχνή οικογενής διαταραχή ήταν η αύξηση της Lp(a), η υπερτριγλυκεριδαιμία με ελαττωμένη HDL χοληστερόλη και η συνδιασμένη υπερλιπιδαιμία. Η συχνότητα των

οικογενών μορφών της δισλιπιδαιμίας και οι δυσμενείς συνέπειες τους επιβάλλουν την αναζήτηση της διαταραχής στους 1^{ου} βαθμού συγγενείς ατόμων με έμφραγμα του μυοκαρδίου, ιδιαίτερα όταν είναι πρωίμο. Η διαφορική διάγνωση των αιτιών πρωτοπαθούς υπερχοληστερολαιμίας στηρίζεται σε κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα, στην οικογενή κατανομή της νόσου και την κατάδειξη της γενετικής βλάβης, στις περιπτώσεις που αυτό είναι εφικτό (Πίνακας 5)

Πίνακας 5: Συνοπτική απεικόνιση των διαγνωστικών κριτηρίων για τη διάκριση των αιτιών πρωτοπαθούς διαταραχής του μεταβολισμού της χοληστερόλης

ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ	ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ	ΚΛΙΝΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ
<p>Οικογενής υπερχοληστερολαιμία</p> <p>Οικογενής ελαττωματική λειτουργία της αποB-100</p>	Αυξημένη χοληστερόλη. Τριγλυκερίδια συνήθως φυσιολογικά	<p>Αποκάλυψη του ελαττώματος του B/E LDL-υποδοχέα με μοριακές τεχνικές</p> <p>Αποκάλυψη του ελαττώματος της αποB-100 με μοριακές τεχνικές</p>	Τενόντια ξανθώματα στον ασθενή ή σε ένα συγγενή 1 ^{ου} ή 2 ^{ου} βαθμού
Πολυγονιδιακή υπερχοληστερολαιμία	Αυξημένη χοληστερόλη. Φυσιολογικά τριγλυκερίδια		Κριτήριο αποκλεισμού: τενόντια ξανθώματα στον ασθενή ή σε συγγενείς
Οικογενής μικτή υπερλιπιδαιμία	Αυξημένη χοληστερόλη και τριγλυκερίδια στον ασθενή και σε έναν συγγενή 1 ^{ου} ή 2 ^{ου} βαθμού Αυξημένη αποB	LDL χοληστ/αποB-100<1,2	Ξανθοελάσματα , Γεροντότοξο
Οικογενής υπεραποβήτα λιποπρωτεΐναιμία	Ελαφρά αυξημένη χοληστερόλη Αυξημένη αποB στον ασθενή και τουλάχιστον σε ένα συγγενή 1 ^{ου} ή 2 ^{ου} βαθμού	LDL χοληστ/αποB-100<1,2	Ξανθελάσματα

1.10.2 Οικογενής υπερχοληστερολαιμία

Η οικογενής υπερχοληστερολαιμία προσβάλλει το 0,2% του πληθυσμού και οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί τον B/E LDL-υποδοχέα^{24,28,30} που μεταδίδεται με το σωματικό υπολλειπόμενο χαρακτήρα.. Οι βλάβες του γονιδίου είναι αποτέλεσμα σημειακών μεταλλάξεων, ενθέσεων ή απαλειφών τμημάτων του. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου του B/E LDL υποδοχέα έχουν ταξινομηθεί σε κατηγορίες ανάλογα με την φαινοτυπική συμπεριφορά της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης.²⁹ Η προκαλούμενη διαταραχή της λειτουργίας αυτών των υποδοχέων οδηγεί σε ελαττωμένη κάθαρση των LDL λιποπρωτεϊνών από την κυκλοφορία και αύξηση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης πλάσματος (Σχήμα 8).

Ο βαθμός αύξησης της χοληστερόλης στο αίμα εξαρτάται από τη φύση της μετάλλαξης. Στους ετεροζυγώτες είναι μικρότερος και στους ομοζυγώτες μεγαλύτερος. Σε μία μελέτη, για παράδειγμα, η κάθαρση της LDL χοληστερόλης ελαττώθηκε κατά 27% στους ετεροζυγώτες και 53% στους ομοζυγώτες.³⁰ Μέρος της αυξημένης LDL χοληστερόλης εναποτίθεται στο τοίχωμα των αρτηριών δημιουργώντας το αθήρωμα ή στο δέρμα και τους τένοντες δημιουργώντας ξανθελάσματα και τενόντια ξανθώματα. Η συχνότητα των ξανθωμάτων αυξάνει με την ηλικία εμφανιζόμενη τελικά στο 75% των ετεροζυγωτών. Παράλληλα αυξάνει η πρόσληψη LDL μορίων από τα μακροφάγα μέσω του υποδοχέα «ρακοσυλλογής» τα οποία οξειδώνονται και γίνονται περισσότερο αθηρογόνα.³¹ Ιδιαίτερα συχνή στην ομόζυγη διαταραχή είναι η στένωση της αορτής (66% έναντι 4% στους ετεροζυγώτες) που οφείλεται σε ανάπτυξη αθηρωμάτων.³² Τα τενόντια ξανθώματα εμφανίζονται συνήθως στην αρχή της ενήλικης ζωής στους αχίλλειους, τους επιγονάτιους και τους εκτείνοντες τένοντες των χεριών αλλά μπορούν να εντοπίζονται σε κάθε τένοντα. Μια άλλη κλινική εκδήλωση είναι το γεροντότοξο που μπορεί να είναι παρούσα στη τρίτη δεκαετία της ζωής. Η παρουσία ξανθελασμάτων δεν υποδηλώνει υποχρεωτικά υπερλιπιδαιμία.

Η στεφανιαία νόσος τείνει να εκδηλώνεται πρώιμα στους ετεροζυγώτες. Είναι ιδιαίτερα συχνή σε άτομα με σχετική ανεπάρκεια της HDL. Είναι πιθανό ότι στις περιπτώσεις αυτές συνυπάρχουν δύο διαταραχές. Στους ομοζυγώτες η νόσος παρουσιάζει πολύ γρήγορα τις κλινικές της εκδηλώσεις. Η ξανθωμάτωση παρουσιάζει ταχεία εξέλιξη και οι ασθενείς εκτός των άλλων παρουσιάζουν οζόμορφα ξανθώματα

στους αγκώνες, τα δάκτυλα, τους μηρούς και τους γλουτούς. Είναι δυνατό να εκδηλωθεί στεφανιαία νόσος την πρώτη δεκαετία της ζωής.

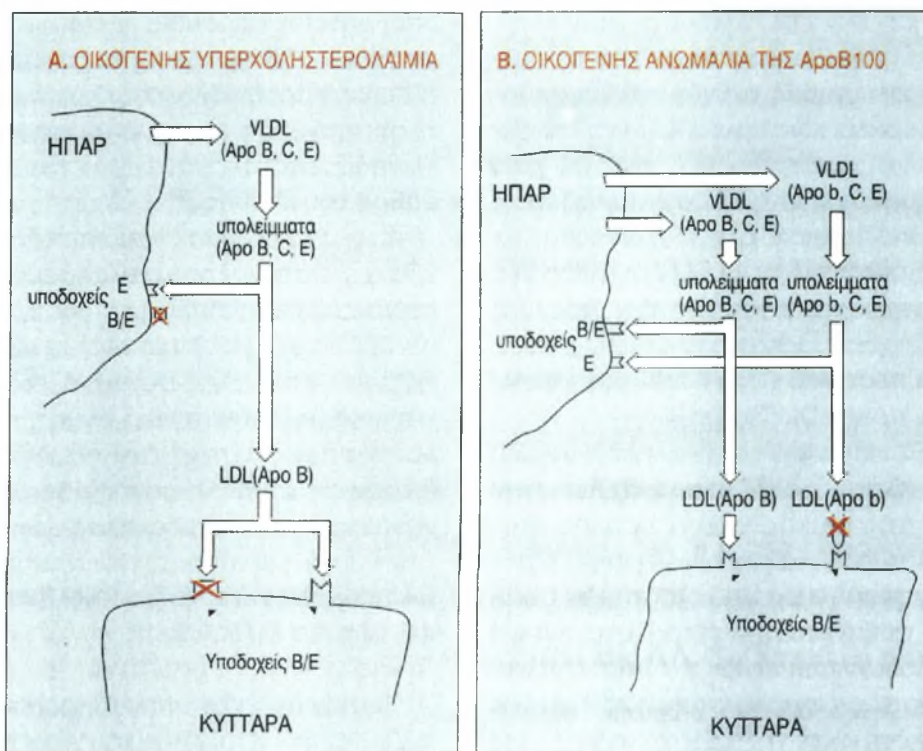
Τα διαγνωστικά κριτήρια για την ετερόζυγο οικογενή υπερχοληστερολαιμία διακρίνονται σε βέβαια και πιθανά.³³ Στα βέβαια ανήκει η αποκάλυψη της γενετικής διαταραχής. Η παρουσία τενόντιων ξανθωμάτων στον ασθενή ή στους συγγενείς 1ου βαθμού έχουν θεωρηθεί παθογνωμονικά της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας αλλά μπορεί να είναι παρόντα και στην οικογενή διαταραχή που χαρακτηρίζεται από ελαττωματική αποB-100.³⁴ Υποστηρικτικά της διάγνωσης είναι τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης αίματος ή το πρώιμο έμφραγμα σε ένα συγγενή 1^{ου} βαθμού ή δύο συγγενείς 2^{ου} βαθμού. Επίπεδα χοληστερόλης αίματος πάνω από 350mg/dl χωρίς σημαντική αύξηση των τριγλυκεριδίων κάνουν ιδιαίτερα πιθανή τη διάγνωση της ετερόζυγης οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας. Χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης, στην ετερόζυγη μορφή, έχουν περιγραφεί και αποδίδονται στη συνύπαρξη άλλων γονιδίων με υπολιπιδαιμική δράση. Στα νεογνά με οικογενή υπερχοληστερολαιμία, η χοληστερόλη είναι αυξημένη στο αίμα του ομφάλιου λώρου αλλά η διάγνωση τεκμηριώνεται ευκολότερα με τον προσδιορισμό της χοληστερόλης αίματος μετά τον πρώτο χρόνο της ζωής.

Η οικογενής υπερχοληστερολαιμία πρέπει, επίσης, να διαφοροδιαγνωσθεί από τις δύο άλλες αιτίες αυξημένης χοληστερόλης αίματος την οικογενή συνδιασμένη υπερλιπιδαιμία και την πολυγονιδιακή υπερχοληστερολαιμία. Το ιστορικό του ασθενούς και το λιπιδαιμικό προφίλ βοηθούν στην ορθή διάγνωση. Η πρωτοπαθής διαταραχή υποδηλώνεται από την απουσία δευτεροπαθών αιτιών. Ειδικότερα: α) το λιπιδαιμικό προφίλ της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας είναι παρόμοιο με εκείνο της πολυγονιδιακής υπερχοληστερολαιμίας αλλά στην τελευταία απουσιάζουν τα ξανθώματα. β) στην οικογενή συνδιασμένη υπερλιπιδαιμία παρατηρείται ελαττωμένη σχέση της LDL χοληστερόλης προς την αποB (<1,2 έναντι >1,4 στους φυσιολογικούς) και τα τριγλυκερίδια είναι αυξημένα (Πίνακας 5).

1.10.3 Οικογενής λειτουργική ανεπάρκεια της αποB-100

Πρόκειται για κληρονομική διαταραχή που μεταδίδεται με το σωματικό επικρατούντα χαρακτήρα και χαρακτηρίζεται από ελαττωμένη ικανότητα σύνδεσης των LDL λιποπρωτεϊνικών μορίων στον B/E LDL υποδοχέα. Η διαταραχή αυτή διαφέρει από την οικογενή υπερχοληστερολαιμία στο ότι το ελάττωμα εντοπίζεται

στο μόριο της αποB-100 (σημειακή μετάλλαξη στη θέση 3500 του μορίου). Αποτέλεσμα της διαταραχής είναι η ελαττωμένη κάθαρση των LDL μορίων και η αύξηση (2πλάσια έως 3πλάσια) των επιπέδων χοληστερόλης αίματος (**Σχήμα 8**). Η συχνότητα της ελαττωματικής αποB-100 στο σύνολο των περιπτώσεων ετερόζυγης οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας ανέρχεται στο 3%.^{34,35} και στο 0.08% του γενικού πληθυσμού.³⁶ Η κλινική εικόνα της οικογενούς ελαττωματικής αποB-100 είναι παρόμοια με εκείνη της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας. Η διάκριση τους γίνεται μόνο με πιστοποίηση της μετάλλαξης με μοριακές τεχνικές.³⁷



Σχήμα 8. Παραγωγή και καταβολισμός των LDL στην ετερόζυγο μορφή της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας (FH) και στην ετερόζυγο οικογενή ανωμαλία της Apo B100 (FDB).

A. Ετερόζυγος μορφή FH: Το ήπαρ εκκρίνει VLDL. Από τα υπολείμματα των VLDL που σχηματίζονται στο πλάσμα (επίδραση λιποπρωτεϊνικής λιτάσης) μικρό ποσοστό αποσύρεται από το ήπαρ μέσω των Apo E-υποδοχέων (E). Επειδή η λειτουργία των B/E LDL υποδοχέων υπολείπεται, το μεγαλύτερο ποσοστό των VLDL-υπολειμμάτων μετατρέπεται σε LDL και η παραγωγή των LDL αυξάνει. Η πλασματοκάθαρση των LDL από τους ηπατικούς και εξωηπατικούς B/E LDL υποδοχείς είναι μειωμένη λόγω της ελαττωμένης δραστηριότητας των υποδοχέων. Αυξημένη παραγωγή και ελαττωμένη πλασματοκάθαρση των LDL συντελούν στην αύξηση της συγκεντρώσεως των LDL στο πλάσμα. B. Ετερόζυγος μορφή FDB: Από το ήπαρ εκκρίνονται VLDL που περιέχουν Apo B ή παραλλαγή αυτής (Apo b). Από τα υπολείμματα των VLDL που σχηματίζονται στο πλάσμα σημαντικό ποσοστό αποσύρεται από τους ηπατικούς υποδοχείς γιατί η σύνδεση γίνεται μέσω της Apo E οπότε η παραγωγή της LDL στο πλάσμα δεν αυξάνει. Η πλασματοκάθαρση όμως μειώνεται γιατί οι LDL που προέρχονται από VLDL - Apo b δεν παραλαμβάνονται από τους B/E LDL υποδοχείς.

1.10.4 Οικογενής μικτή υπερλιπιδαιμία

Είναι σχετικά συχνή διαταραχή των λιπιδίων αφού προσβάλλει το 1-2% του γενικού πληθυσμού και ευθύνεται για το 30-50% των οικογενών περιπτώσεων στεφανιαίας νόσου³⁸ και το 10% όλων των περιπτώσεων πρώιμης στεφανιαίας νόσου.³⁹ Το 50% των συγγενών των ατόμων με οικογενή μεικτή υπερλιπιδαιμία παρουσιάζει, επίσης, υπερλιπιδαιμία.

Η οικογενής μικτή υπερλιπιδαιμία (OMY) είναι μια αυτόσωμη διαταραχή που χαρακτηρίζεται από αυξημένη ηπατική παραγωγή αποB-100 που εκκρίνεται με τις VLDL λιποπρωτεΐνες.⁴⁰ Τα επίπεδα της αποB-100 παρουσιάζουν ισχυρή θετική συσχέτιση με την παρουσία μικρών και πυκνών LDL μορίων (φαινότυπος B) και συνδιάζονται συχνά με αύξηση των τριγλυκεριδίων και ελάττωση της HDL. Η παρουσία φαινοτύπου B τριπλασιάζει τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου.

Η οικογενής μεικτή υπερλιπιδαιμία μπορεί να εκδηλώνεται με ένα από τους τρεις φαινότυπους της ταξινόμησης κατά Fredrickson: α) το φαινότυπο IIβ που χαρακτηρίζεται υπερτριγλυκεριδαιμία και υπερχοληστερολαιμία λόγω αύξησης των VLDL και LDL λιποπρωτεϊνών, β) το φαινότυπο IIα που χαρακτηρίζεται από υπερχοληστερολαιμία λόγω αύξησης των LDL λιποπρωτεϊνών και γ) τον τύπο IV που χαρακτηρίζεται από υπερτριγλυκεριδαιμία λόγω αύξησης των VLDL λιποπρωτεϊνών. Κάθε ένας από τους τρεις φαινότυπους καλύπτει το 1/3 των περιπτώσεων. Η φαινοτυπική ετερογένεια οφείλεται σε διαφορές στις LDL υποομάδες και, στο 30% των περιπτώσεων, σε διαφορές στη δραστηριότητα της ΛΛ. Τα άτομα με ελαττωμένη δραστηριότητα ΛΛ παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων (λόγω μειωμένης κάθαρσης τους) και χαμηλότερα επίπεδα HDL (λόγω μειωμένης παραγωγής υπολειμάτων των VLDL). Επειδή η λιπιδαιμική διαταραχή της οικογενούς μεικτής υπερλιπιδαιμίας είναι ετερογενής, η διάγνωση της και η διάκρισή της από την υπεραποβήτα λιποπρωτεΐναιμία απαιτεί τον εντοπισμό της βλάβης και σε άλλα μέλη της οικογένειας. Η παρουσία των ανωτέρω διαταραχών υποδηλώνεται από την ελαττωμένη σχέση LDL χοληστερόλης/αποB-100. Σε αντίθεση με την οικογενή υπερχοληστερολαιμία τα επίπεδα χοληστερόλης αίματος είναι μικρότερα από 350mg/dl και δεν υπάρχουν ξανθώματα.

Η διαταραχή είναι χωρίς αμφιβολία οικογενής και σχετικά συνηθισμένη αφού αφορά στο 1-2% του πληθυσμού. Για τον τρόπο που κληρονομείται η διαταραχή υπάρχουν διαφωνίες. Ορισμένοι δέχονται τη μονογονιδιακή διαταραχή ενώ άλλοι δέχονται την

πολυγονιδιακή κληρονομικότητα. Η φύση της ανωμαλίας είναι άγνωστη. Μία μελέτη σε 31 οικογένειες Φιλανδών με ΟΜΥ εστίασε τη διαταραχή σε μια θέση του χρωμοσώματος 1 (1q21-q23) αλλά το γονίδιο και η λειτουργία δεν έχουν ακόμα εντοπισθεί.⁴¹ Σε μερικές τουλάχιστον περιπτώσεις οικογενούς μεικτής υπερλιπιδαιμίας πιθανολογείται ως παθογενετικός μηχανισμός η υπερέκκριση της αποC-III σε συνδιασμό με ελαττωματική λειτουργία του B/E LDL-υποδοχέα.

1.10.5 Πολυγονιδιακή υπερχοληστερολαιμία

Η πολυγονιδιακή υπερχοληστερολαιμία χαρακτηρίζεται από οικογενή κατανομή μέτριας αύξησης της χοληστερόλης, με φυσιολογικά, συνήθως, τριγλυκερίδια και πρώιμη εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Το λιπιδαιμικό προφίλ μοιάζει με το αντίστοιχο της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας αλλά απουσιάζουν τα ξανθώματα. Η γενετική βάση της διαταραχής αυτής δεν είναι γνωστή αλλά πιθανολογείται ότι συντρέχουν πολλαπλές διαταραχές του μεταβολισμού της LDL όπως, ελαττωματική λειτουργία του B/E LDL-υποδοχέα ή/και της αποB-100, αυξημένη σύνθεση αποB-100 και φαινότυπος E4 της αποE.⁴² Ασθενείς με αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης, μη οφειλόμενα σε οικογενή υπερχοληστερολαιμία, έχουν το αλληλόμορφο γονίδιο E4 της αποE σε αυξημένη συχνότητα. Η E4 ισομορφή θεωρείται ότι συμβάλλει σημαντικά στη εκδήλωση της πολυγονιδιακής υπερχοληστερολαιμίας. Η αποE4 έχει μεγαλύτερη δύναμη σύνδεσης με τον B/E LDL-υποδοχέα σε σύγκριση με τις άλλες ισομορφές της αποE (E2 και E3) Η ισχυρότερη σύνδεση οδηγεί, μέσω αρνητικής παλλίνδρομης δράσης σε ελάττωση της σύνθεσης της πρωτεΐνης του B/E LDL-υποδοχέα με αποτέλεσμα μικρότερη κάθαρση και δευτεροπαθή αύξηση των LDL μορίων στο πλάσμα. Η πολυγονιδιακή υπερχοληστερολαιμία δεν έχει εμφανείς κλινικές εκδηλώσεις αλλά η μεταβολική διαταραχή συνοδεύεται από πρώιμη αθηροσκλήρυνση.

Η κληρονομική φύση της διαταραχής μπορεί να τεκμηριωθεί μόνο με τη μελέτη ατόμων της ίδιας οικογένειας. Η εκτίμηση της συχνότητας της πολυγονιδιακής υπερχοληστερολαιμίας εξαρτάται από τον αυθαίρετο ορισμό της ανώτερης φυσιολογικής τιμής της χοληστερόλης αίματος. Υπολογίζεται στο 15% των ατόμων που έχουν υποστεί έμφραγμα και έχουν επίπεδα χοληστερόλης πάνω από 300 mg/dl. Το αντίστοιχο ποσοστό για την οικογενή υπερχοληστερολαιμία είναι 10%.

1.10.6 Οικογενής υπερ-αποβήτα-λιποπρωτεΐναιμία

Ο όρος υπερ-αποβήτα-λιποπρωτεΐναιμία περιγράφει ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα της αποB-100 και φυσιολογικά επίπεδα χοληστερόλης. Τα LDL μόρια είναι πλούσια σε αποB-100. Οφείλεται σε αυξημένη ηπατική παραγωγή αποB-100 και VLDL και ενδεχομένως αποτελεί μια ιδιαίτερη μορφή της οικογενούς μκτής υπερλιπιδαιμίας.

Χαρακτηρίζεται από πρώιμη στεφανιαία νόσο, ιδιαίτερα όταν συνυπάρχει υπερτριγλυκεριδαιμία, ξανθελάσματα (στο 10% των περιπτώσεων) και παχυσαρκία ($BMI > 30 \text{Kg/m}^2$). Συχνή είναι η παρουσία ΣΔ ή διαταραχής της ανοχής γλυκόζης, ιδιαίτερα όταν συνυπάρχει υπερτριγλυκεριδαιμία. Στις περισσότερες περιπτώσεις η LDL χοληστερόλη είναι $< 160 \text{mg/dl}$, η αποB-100 $> 135 \text{mg/dl}$ και η σχέση ολικής χοληστερόλης/αποB-100 $< 1,2$.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αναζήτηση σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο του B/E LDL υποδοχέα και στο γονίδιο της ΑποB-100, στο πλαίσιο διερεύνησης της αιτίας των αυξημένων επιπέδων χοληστερόλης αίματος σε άτομα που παρουσίαζαν κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα συμβατά με οικογενή υπερχοληστερολαιμία.

Ειδικότερα, την αφορμή αυτής της μελέτης έδωσε η επίσκεψη στο εξωτερικό ιατρείο του Ενδοκρινολογικού τμήματος του Π.Π.Γ.Ν.Λαρίσης γυναίκας ηλικίας 37 ετών η οποία παραπέμφθηκε από το Ακτινολογικό Εργαστήριο του Γ.Ν.Ν.Λαρίσης «ΚΟΥΤΑΙΜΠΑΝΕΙΟ» στο οποίο, λόγω διόγκωσης, στους αχίλλειους τένοντες, είχε υποβληθεί σε μαγνητική τομογραφία. Η κλινική εικόνα και τα αποτελέσματα του ακτινολογικού ελέγχου επιβεβαίωσαν την παρουσία αχίλλειων ξανθωμάτων ενώ από το ιστορικό προέκυψε σημαντικού βαθμού υπερχοληστερολαιμία για την οποία υποβαλλόταν σε δίαιτα και φαρμακευτική αγωγή. Η λήψη του κληρονομικού αναμνηστικού έδειξε την παρουσία στεφανιαίας νόσου στους γονείς της και σε συγγενείς 1^{ου} και 2^{ου} βαθμού. Με βάση τα παραπάνω ετέθη η διάγνωση της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας. Η επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης με την εντόπιση της θέσης και του είδους της μοριακής διαταραχής αποτέλεσε το αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Ο περιορισμένος χρόνος δεν επέτρεπε την μελέτη όλων των εξονίων του B/E LDL υποδοχέα και για τον λόγο αυτό αποφασίστηκε να μελετηθούν μόνο τα εξόνια 2, 4, 9 και 11 στα οποία ήταν πιθανό να εντοπίζεται η βλάβη, με βάση τη συχνότητα εμφάνισης σημειακών μεταλλάξεων στον Ελληνικό πληθυσμό.

2.2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ

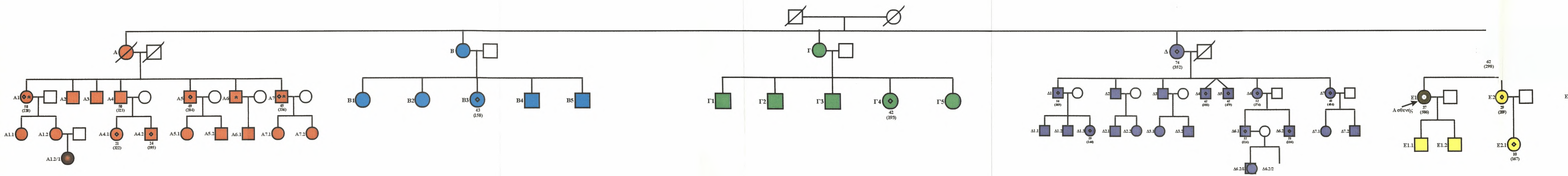
Τα άτομα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι μέλη της προαναφερθείσας οικογένειας με την οικογενή υπερχοληστερολαιμία ή την οικογενή ελαττωματική λειτουργία της αποB-100. Από 22 μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας, τα οποία παρουσιάζονται στο γενεαλογικό δένδρο που ακολουθεί, λήφθηκε μικρή ποσότητα αίματος από τη μεσοβασίλικη φλέβα. Ποσότητα ολικού αίματος χρησίμευσε για την απομόνωση γενομικού DNA ενώ στον ορό αίματος προσδιορίστηκαν τα επίπεδα χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και HDL χοληστερόλης.

2.3 ΓΕΝΕΑΛΟΓΙΚΟ ΔΕΝΔΡΟ

Η ασθενής μας είναι κόρη μιας εκ των πέντε θυγατέρων της υπό μελέτη οικογένειας, η οποία είχε επίσης και ένα αγόρι που απεβίωσε. Συγκεκριμένα είναι κόρη του έκτου παιδιού κατά σειρά ηλικίας. Το σύνολο των μελών της οικογένειας ανέρχεται σε 58 άτομα. Εικοσιοκτώ από τα μέλη είναι θήλεα και τα υπόλοιπα άρρενα.

Για λόγους πρακτικούς το γενεαλογικό δένδρο κάθε αδελφής παρατίθεται με διαφορετικό χρώμα. Κάθε μια οικογένεια χαρακτηρίζεται με ένα γράμμα της αλφαβήτου και κάθε μέλος από ένα κωδικό που συνδυάζει το αντίστοιχο γράμμα και αριθμούς. Η παρουσία αστερίσκου εντός του κύκλου ή του τετραγώνου υποδηλώνει ιστορικό εμφράγματος ή επέμβασης στα στεφανιαία αγγεία, ενώ η παρουσία ρόμβου υποδηλώνει λήψη αίματος από το συγκεκριμένο άτομο.

Κάτω από κάθε μέλος παρατίθεται η ηλικία και εντός παρενθέσεως στα άτομα που προσδιορίστηκε η τιμή της χοληστερόλης. Η παρουσία διαγώνιας γραμμής υποδηλώνει ότι το μέλος έχει αποβιώσει.



2.4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.4.1 Γενικά

Το πειραματικό μέρος της παρούσας μελέτης στόχευε διαδοχικά : α) στην απομόνωση γονομικού DNA από τα εμπύρνηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος, β) τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων περιοχών του DNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), γ) την πέψη των τμημάτων του DNA που προήλθαν από την προηγούμενη αντίδραση με ειδικά περιοριστικά ένζυμα και δ) την αναγνώριση μετά την πέψη των τμημάτων του DNA και την αξιολόγηση των ευρημάτων.

Η απομόνωση του γονομικού DNA έγινε με μια κλασσική τεχνική που περιγράφεται στη συνέχεια. Ακολούθως, τμήματα του DNA που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου του B/E LDL υποδοχέα και του γονιδίου της αποB-100 πολλαπλασιάστηκαν με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.⁴³ Η τεχνική αυτή χρησιμεύει για τον πολλαπλασιασμό τμήματος του DNA που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο περιοχές γνωστής αλληλουχίας με την χρήση των κατάλληλων ζευγών εκκινητών. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 19-26 βάσεων, συμπληρωματικά για συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων του DNA μεταξύ των οποίων βρίσκεται η αλληλουχία που θέλουμε να πολλαπλασιαστεί.

Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης υποβλήθηκαν στην επίδραση συγκεκριμένων ενδονουκλεασών περιορισμού.⁴³ Πρόκειται για ένζυμα βακτηριακής προελεύσης που αναγνωρίζουν και τέμνουν ειδικές αλληλουχίες δίκλωνου DNA με κατεύθυνση 5' προς 3' (5'→3') με εγκάρσια ή σιγμοειδή κατεύθυνση. Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού κατάτασσονται σε τρεις τύπους ανάλογα με τον τρόπο που ενεργούν α) *Ένζυμα τύπου I*. Αναγνωρίζουν μία ειδική αλληλουχία και τέμνουν τυχαία το DNA σε αρκετή απόσταση από τη θέση αναγνώρισης, β) *Ένζυμα τύπου II*. Αναγνωρίζουν μία ειδική αλληλουχία και τέμνουν το DNA μέσα σε αυτήν και γ) *Ένζυμα τύπου III*. Τέμνουν το DNA σε θέση 24-26 νουκλεοτίδια μετά τη θέση αναγνώρισης. Τα ένζυμα τύπου II, λόγω ειδικότητας αναγνώρισης, είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τη χαρτογράφηση και μελέτη του DNA. Η άριστη δράση κάθε ενδονουκλεάσης περιορισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία επώασης, τη μοριακή σχέση του ενζύμου με το υπόστρωμα και τη σύσταση του διαλύματος επώασης. Τα ρυθμιστικά διαλύματα μέσα στα οποία διενεργείται η αντίδραση περιέχουν συνήθως ιόντα Mg^{++} , τα οποία λειτουργούν ως συμπαραγόντας,

όπως επίσης και ένα μονοσθενές κατιόν (Na^+). Τα διαλύματα επώασης πρέπει να είναι απαλλαγμένα από νουκλεάσες. Η προσθήκη αλβουμίνης βοός (bovine serum albumin, BSA) προφυλάσσει τα ένζυμα από πρωτεάσες ή άλλους παράγοντες. Το DNA που χρησιμοποιείται πρέπει να μην έχει προσμείξεις χημικών ουσιών που μπορεί να αναστείλουν τη δραση των ενζύμων. Τα ένζυμα φυλάσσονται στους -20°C , σε διάλυμα 50% γλυκερόλης.

Η καθαρότητα και επάρκεια των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ή των προϊόντων πέψης με περιοριστικά ένζυμα ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.⁴³ Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ή ακρυλαμίδης επιτρέπει τον διαχωρισμό τμημάτων του DNA (προϊόντα PCR ή προϊόντα πέψης) με βάση το μέγεθός τους. Η ταχύτητα μετακίνησης τμήματος/ων του DNA στην πηκτή (απομάκρυνσης από την κάθοδο του ηλεκτρικού πεδίου μέσα στο οποίο διενεργείται η ηλεκτροφόρηση) εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των τμημάτων DNA, τη διαμόρφωση του DNA (κλειστό κυκλικό, ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό), την πυκνότητα της πηκτής και τη διαφορά τάσης του ηλεκτρικού πεδίου. Η αναγνώριση των τμημάτων του DNA μετά την ηλεκτροφόρηση προαπαιτεί την ανάδειξή τους που γίνεται με χρώση τους με βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι φθορίζουσα ουσία η οποία διεισδύει ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Η αναγνώριση και φωτογράφιση γίνεται μετά έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία.

2.4.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- **Απομόνωση γενομικού DNA**

Αντιδραστήρια

1. Διάλυμα θραύσης των πυρήνων: υδατικό διάλυμα 10mM Tris HCl/400mM NaCl/2mM EDTA pH 7,4.
2. Κορεσμένο διάλυμα 6M χλωριούχου νατρίου (NaCl).
3. Διάλυμα πρωτεΐνάσης K του μύκητα *Tritirachium album* (10mg/ml, Boehringer Mannheim).
4. Διάλυμα 10% w/v SDS (n-Sodium Dodecylsulfate salt, Merck).
5. Απόλυτη αιθανόλη.
6. Πηκτή αγαρόζης 0,8%

Η απομόνωση γενομικού DNA μεγάλου μοριακού βάρους έγινε από τα εμπύρρινα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια απομακρύνθηκαν μετά αιμόλυσή τους σε υπότονο δισαπεσταγμένο νερό (ddH₂O) και τα εμπύρρινα κύτταρα απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές/λεπτό επί 15 λεπτά. Η λήψη του DNA έγινε μετά από θραύση των πυρήνων των μονοπύρηνων κυττάρων (λευκοκυττάρων) με προσθήκη υδατικού διαλύματος θραύσης των πυρήνων. Οι πρωτεΐνες αποδομήθηκαν μετά από επώαση στους 37°C, επί 2 ώρες τουλάχιστον, παρουσία 300 μl πρωτεϊνάσης K (10 mg/ml) και 1ml SDS 10%. Ακολούθησε η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl 6M) και φυγοκέντρηση στους +4°C, (2500 στροφές επί 20 λεπτά). Το υπερκείμενο, στο οποίο βρισκόταν το DNA, φυγοκεντρήθηκε εκ νέου σε θερμοκρασία +4°C (2500 στροφές επί 20 λεπτά) και πάλι συλλέχθηκε το υπερκείμενο μέρος του διαλύματος. Το DNA καταβύθισθη με απόλυτη αιθανόλη και μετά την καταβύθιση διαλύθηκε σε 1 κ.εκ. δισαπεσταγμένο νερό (ddH₂O).

Η συγκέντρωση του DNA στο τελικό διάλυμα υπολογίστηκε μετά φωτομέτρηση στα μήκη κύματος 260 nm και 280 nm με τη χρήση του τύπου: Συγκέντρωση DNA = αραίωση x 50 x τιμή OD₂₆₀, με βάση το γεγονός ότι η συγκέντρωση DNA = 50 mg/ml δίνει οπτική πυκνότητα ίση με τη μονάδα. Η καθαρότητα του DNA αξιολογήθηκε με τον προσδιορισμό του λόγου OD_{260nm}/OD_{280nm} ο οποίος κρίνεται ικανοποιητικός όταν κυμαίνεται μεταξύ 1,7 και 1,9.

Ο λόγος OD_{260nm}/OD_{280nm} πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1,7 και 1,9. Τιμές μικρότερες από 1,7 υποδηλώνουν πρόσμειξη πρωτεϊνών, ενώ τιμές μεγαλύτερες από 1,9 πρόσμειξη RNA.

Η ακεραιότητα και καθαρότητα του DNA εκτιμήθηκε μετά ηλεκτροφόρησή του σε πηκτή αγαρόζης 0,8%.

• Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Αντιδραστήρια

1. DNA: 7 μl ή 1 μg
2. Ρυθμιστικό διάλυμα σε ποσότητα ίση με το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης (10 mM Tris-HCL pH 8,3/ 50 mM KCl/ 2,0 mM MgCl₂) (QIAGEN)
3. Ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (κυτοσίνης, γουανίνης, αδενίνης και θυμίνης): 200 mM από το καθένα. (QIAGEN)

4. Εκκινητής 1 (GENSET SA)
5. Εκκινητής 2 (οι εκκινητές 1 και 2 για κάθε αντίδραση δίνονται αναλυτικά στη συνέχεια)
6. Ενζυμο: 2,5 units Taq DNA polymerase του μύκητα *Thermus aquaticus* (QIAGEN)
7. Δις απεσταγμένο νερό (dd H₂O) μέχρι τελικού όγκου 100 μl.

Για τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένων τμημάτων του DNA χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Ο πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών των προεπιλεγμένων τμημάτων του DNA έγινε σε 30 κύκλους, σε θερμικό κυκλοποιητή (Perkin, Elmer). Κάθε κύκλος περιλάμβανε ένα στάδιο αποδιάταξης, ένα στάδιο σύζευξης των εκκινητών με τη μητρική αλυσίδα και ένα στάδιο επέκτασης των εκκινητών. Μετά το τέλος των 30 κύκλων, ακολούθησε στάδιο επέκτασης δέκα λεπτών στους 72 °C με στόχο τη σταθεροποίηση του προϊόντος της αντίδρασης. Οι ακριβείς συνθήκες PCR για κάθε εξόνιο που μελετήθηκε αναφέρονται αναλυτικά στη συνέχεια.

3. Κατάτμηση του DNA με ενδονουκλάσες περιορισμού

Ο συνδιασμός αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και η επώαση του προϊόντος με περιοριστικά ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των μεταλλάξεων C152R, V408M, S35P, και D528G του γονιδίου του B/E LDL υποδοχέα. Με την χρήση του λογισμικού Mac Vector 3.0 (Apple software), έχει βρεθεί ότι οι παραπάνω μεταλλάξεις δημιουργούν θέσεις κοπής στην αλληλουχία των βάσεων του γονιδίου του B/E LDL υποδοχέα για τα περιοριστικά ένζυμα BstI, Nla III, Hae III και MboI αντίστοιχα. (Πίνακας 6)

Με τη μέθοδο αυτή, τα εξόνια 2, 4, 9 και 11, στα οποία έχουν εντοπισθεί οι προαναφερθείσες μεταλλάξεις, πολλαπλασιάστηκαν με μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και τα προκύψαντα προϊόντα επώαστηκαν στη συνέχεια με το περιοριστικό ένζυμο που αναγνωρίζει την συγκεκριμένη θέση μετάλλαξης. Το αποτέλεσμα της δράσης κάθε περιοριστικού ενζύμου εξαρτάται από το αν η συγκεκριμένη μετάλλαξη κατήργησε προϋπάρχουσα θέση κοπής ή δημιούργησε νέα θέση κοπής για το ένζυμο. Ο αριθμός και τα μεγέθη των τμημάτων του DNA μετά τη δράση του περιοριστικού ενζύμου καθορίζουν, σε σύγκριση πάντα προς ένα φυσιολογικό μάρτυρα, την παρουσία ή όχι μετάλλαξης. Για την αναζήτηση σημειακής

μετάλλαξης του γονιδίου της αποB-100 χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο Sau961.

Πίνακας 6: Μεταλλάξεις που σχετίζονται με δημιουργία θέσης κοπής από περιοριστικό ένζυμο

Κωδ.	Ονομασία μετάλλαξης	εξόνιο	εκκλητές	Προϊόν PCR (bp)	Περιοριστικό ένζυμο	Προϊόντα Επώασης (ετεροζ.)
C152R	FH Greece -1	4	FH53/FH 169B	335	BstI	335, 105,230
V408M	FH Afrikaner -2	9	FH9/FH28B	273	Nia III	273, 151, 122
S35P		2	FH112/FH132B	183	Hae III	183, 131,52
G528D	FH Genoa	11	Genoa3/Genoa5	52	Mbo I	52, 23,27

- **Ανάδειξη των προϊόντων της PCR και προϊόντων αντιδράσεως πέψης**

Η ανάδειξη του τελικού προϊόντος της PCR έγινε με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,5% (Promega), ενώ η ανάδειξη των προϊόντων πέψης έγινε σε πηκτή αгарόζης 3% (Metafor(BMA)) ή πηκτή ακρυλαμίδης 12%, σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5xTBE (40mM Tris/2,5 M οξικό οξύ/1 mM EDTA, pH 7,7). Οι «ταινίες» του DNA στην πηκτή αгарόζης ή πολυακρυλαμίδης καταδείχθηκαν μετά από εμφάνιση σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml), για 20 λεπτά και έκθεση σε υπεριώδες φως. Η εικόνα αποτυπωνόταν ηλεκτρονικά με τη χρήση της συσκευής Gel Doc 2000 (BIO RAD).

Για την εκτίμηση του μεγέθους των λαμβανομένων προϊόντων γινόταν ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση DNA βακτηριοφάγων που είχε υποστεί κατάτμηση με ενδονουκλεάσες περιορισμού και απέδιδε τμήματα DNA με γνωστό μέγεθος. Οι μάρτυρες μεγέθους που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον **πίνακα 7**.

Πίνακας 7: Μάρτυρες μεγεθών DNA φάγων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

ΦX174-Hinf I(Kb)	Gene ruller
726	1031
713	900
553	800
500427/417/413	700
311	600
249	500
200	400
151	300
140	200
118	100
100	80
82	
66	
48/42/40	
24	

2.4.3 Αναζήτηση των σημειακών μεταλλάξεων στα εξόνια 2, 4 και 9 του B/E LDL υποδοχέα.

Συνθήκες PCR

Για κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε 1μg γενομικού DNA, 200 μM από κάθε ένα dNTP, (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 20 pmol από κάθε ένα από τα αντίστοιχα ζεύγη εκκινητών και 2,5 διεθνείς μονάδες Taq πολυμεράσης. σε διάλυμα συνολικού όγκου 100μl. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι :

Εξόνιο 2

FH112 : 5' -TTG AGA GAC CCT TTC TCC TTT TCC-3'

FH132B : -GCA TAT CAT GCC CAA AGG GG-

Εξόνιο 4

FH53 : 5'-AGACGAGGCCTCCTGCCCCGGT-3'

FH169B : -GGAGCCCACGGACAGGTGATAGGAC-

Εξόνιο 9

FH28B : 5'-AGC CCT CAT CTC ACC TGC GGG CCA A-3'

FH169B : -GGA GCC CAC GGA CAG GTG ATA GGA C-

Ο πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών των προεπιλεγμένων τμημάτων του DNA έγινε σε 30 κύκλους, σε θερμικό κυκλοποιητή όπως ακολουθεί :

Θερμοκρασία	Χρόνος (λεπτά)	Κύκλοι
94 °C	2	1
94 °C	1	30
57 °C	1	
72 °C	1	
72 °C	5	1

Ανάδειξη των προϊόντων της PCR

Σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% ηλεκτροφορήθηκαν 20 μl του προϊόντος της PCR υπο σταθερή τάση 120 V. Για σύγκριση του μεγέθους του προϊόντος που μας έδωσε η αντίδραση της PCR, ηλεκτροφορήθηκαν ταυτόχρονα 0,4ng DNA φάγου pME-80 που είχε καταταμηθεί με τα περιοριστικά ένζυμα Eco1471 και Pvu I (**Gene Ruller - Fermentas**). Ακολούθησε χρώση του πηκτώματος αγαρόζης σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου, φωτογράφιση και εμφάνιση της εικόνας της πηκτής. Τα προϊόντα της PCR ήταν τα αναμενόμενα : 183bp για το εξόνιο 2, 335bp για το εξόνιο 4 και 273bp για το εξόνιο 9 (**Εικόνα 1**).

Πέψη με ένζυμα περιορισμού

Το προϊόν της PCR κάθε εξονίου υπεβλήθηκε σε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα και στις συνθήκες που παρατίθενται στον **Πίνακα 8**. Το περιοριστικό ένζυμο Hae III αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'GG↓CC-3', το περιοριστικό ένζυμο BstI αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-CG↓CG-3 και το περιοριστικό ένζυμο Nla III αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-CAT↓G-3'.

Πίνακας 8: Συνθήκες επώασης των προϊόντων PCR με περιοριστικά ένζυμα.

Προϊόν εξονίου 2	Προϊόν εξονίου 4	Προϊόν εξονίου 9
10 μl ddH ₂ O	10 μl ddH ₂ O	10 μl ddH ₂ O
10 μl προϊόντος PCR	10 μl προϊόντος PCR	10 μl προϊόντος PCR
2.5 μl Hae III buffer	2.5 μl BstI buffer	2.5 μl Nla III buffer
2.5 μl Hae III ένζυμο	2.5 μl BstI ένζυμο	2.5 μl Nla III ένζυμο
-----	-----	-----
25 μl ολικής αντίδρασης	25 μl ολικής αντίδρασης	25 μl ολικής αντίδρασης
Επώαση στους 37°C επί 24 ώρες	Επώαση στους 37°C επί 24 ώρες	Επώαση στους 37°C επί 24 ώρες

Ανάδειξη των προϊόντων πέψης

Τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την επώαση με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης Metafor 3% η οποία ηλεκτροφορήθηκε υπο σταθερή τάση 80 V. Η συγκεκριμένη αγαρόζη χρησιμοποιήθηκε γιατί παρουσιάζει ικανότητα διαχωρισμού υψηλής ευκρίνειας. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 20 μl από το υλικό της επώασης. Για να συγκρίνουμε τα προϊόντα της αντίδρασης χρησιμοποιήσαμε ως μάρτυρα DNA του βακτηριοφάγου φX174, κατατημμένου με την ενδονουκλεάση περιορισμού Hinf I (φX174-Hinf I - Promega). Ακολούθησε χρώση της πηκτής με βρωμιούχο αιθίδιο και ανάγνωση των αποτελεσμάτων.

2.4.4 Αναζήτηση της σημειακής μετάλλαξης στο εξόνιο 11 του B/E LDL

υποδοχέα.

Αντίδραση PCR

Η ανίχνευση της μετάλλαξης FHGenoa στο εξόνιο 11, έγινε με ενσωμάτωση δεύτερης μετάλλαξης στο προϊόν PCR με κατάλληλα σχεδιασμένο εκκινητή που δημιουργεί θέση κοπής για περιοριστικό ένζυμο (US-PCR). Η μέθοδος αυτή, όπως και κάθε μέθοδος που σχετίζεται με την τεχνική εισαγωγή βάσης για τη δημιουργία τεχνητής μετάλλαξης, βασίζεται στο σχεδιασμό των εκκινητών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν σαν εκκινητές δύο ολιγονουκλεοτίδια μεγέθους 25 βάσεων με αλληλουχίες που είναι συμπληρωματικές στις περιοχές ένθεν και ένθεν (κατά μία βάση) της μετάλλαξης G528D, ούτως ώστε κατά την αντίδραση της PCR να πολλαπλασιάζεται ένα τμήμα μεγέθους 52 βάσεων. Και οι δύο εκκινητές είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να επικολλώνται δίπλα ακριβώς στην περιοχή στόχο G→A. Ο εκκινητής προς το 3' άκρο σχεδιάστηκε με μία διαφοροποίηση στην προτελευταία βάση στο 3' άκρο του ώστε μετά την αντίδραση της PCR, αν υπάρχει η αντικατάσταση G → A της μετάλλαξης G528D, να δημιουργείται η αλληλουχία GATC που αποτελεί θέση κοπής για τα περιοριστικά ένζυμα Dpn II και Mbo I με την εισαγωγή κυτοσίνης ακριβώς στο κωδικόνιο 528 με τη μετάλλαξη. Κατά την φάση της επικόλλησης (annealing) ο G3 εκκινητής εισάγει εσκεμμένα την μετάλλαξη. Η αλληλουχία του 5' εκκινητή (sense - G5) είναι: 5'-CAAGATCAAGAAAGGGGGCCTGAAT-3' και του 3' εκκινητή (anti-sense- G3) είναι: 5'-AGTCACCAGGGAGTAGATGTCCAGA-3' (με έντονα στοιχεία φαίνεται η διαφοροποίηση).

G→A: Μετάλλαξη G528D

↓

5'...C AAG ATC AAG AAA GGG GGC CTG AAT GATGTG GAC ATC TAC TCG CTG GTG ACT...3'

3'AGAC CTG TAG ATGAGCGACCAC TGA-5'

↑

ο G3 εκκινητής εισάγει τη μετάλλαξη GTG→CTG δημιουργώντας νέα θέση κοπής για τα ένζυμα MboI ή DpnII : [GATC (τυπική παλινδρομη θέση)]

5'- C AAG ATC AAG AAA GGG GGC CTG AAT-3'

3'. G TTC TAG TTC T T T CCC CCG GAC TTA CCA CAC CTG TAG ATG AGC GAC CAC TGA...3'

Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε 1μg γενομικού DNA, 200 μM από κάθε ένα dNTP, (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 20 pmol από κάθε εκκινητή και 2,5 διεθνείς μονάδες Taq πολυμεράσης σε διάλυμα συνολικού όγκου 100μl. Οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ήταν οι ακόλουθες:

Θερμοκρασία	Χρόνος (λεπτά)	Κύκλοι
94 °C	2	1
94 °C	1	30
65 °C	3	
72 °C	5	1

Ανάδειξη του προϊόντος της PCR

Σε πήκτωμα αγαρόζης Metafor 3%, ηλεκτροφορήθηκαν 20 μl του προϊόντος της PCR υπο σταθερή τάση 100V. Η συγκεκριμένη αγαρόζη χρησιμοποιήθηκε γιατί παρουσιάζει υψηλή διαχωριστική ικανότητα και αναμενόταν προϊόν μικρού μοριακού βάρους (52bp). Για σύγκριση του μεγέθους του προϊόντος που μας έδωσε η αντίδραση της PCR, ηλεκτροφορήθηκαν ταυτόχρονα 0,4ng DNA βακτηριοφάγου φX174, κατατημένο με την ενδονουκλεάση περιορισμού Hinf I (φX 174-Hinf I – Promega). Ακολούθησε χρώση του πηκτώματος αγαρόζης σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου, φωτογράφιση και εμφάνιση της εικόνας της πηκτής. Το προϊόν της PCR ήταν το αναμενόμεν (52 bp) (Εικόνα 1).

Πέψη με ένζυμο περιορισμού

Το προϊόν της PCR υποβλήθηκε σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο MboI, που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'- ↓GATC-3', στις παρακάτω συνθήκες :

10 μl ddH ₂ O
10 μl προϊόντος PCR
2.5 μl MboI buffer
2.5 μl MboI ένζυμο

25 μl ολικής αντίδρασης
Επώαση στους 37°C επι 24 ώρες

Ανάδειξη των προϊόντων της πέψης

Τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την επώαση με το ένζυμο περιορισμού MboI, διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης Metafor 3% που ηλεκτροφορήθηκε σε σταθερή τάση 80V όπως στην ανάδειξη των προϊόντων πέψης των προηγούμενων εξονίων σημειώνεται.

2.4.5 Αναζήτηση της σημειακής μετάλλαξης R3500Q στο γονίδιο της ApoB 100

Αντίδραση PCR

Ο συνδιασμός PCR και επώασης του προϊόντος με περιοριστικό ένζυμο χρησιμοποιήθηκε για τον αναζήτηση της προαναφερθείσας μετάλλαξης. Τμήμα του γονιδίου της ApoB-100 ένθεν και ένθεν της μετάλλαξης (R3500Q), μεγέθους 87 bp, πολλαπλασιάστηκε με PCR. Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε 1μg γενομικού DNA, 200 μM από κάθε ένα dNTP, (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 50 pmol από κάθε εκκινητή και 2,5 διεθνείς μονάδες Taq πολυμεράσης, σε διάλυμα συνολικού όγκου 100μl. Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές :

SM96 : 5'-TGCCCTGCAGCTTCACTGAGG-3'

SW96 : 5'-CTCGGGAATATTCAGGAACTA-3'

Οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ήταν οι ακόλουθες:

Θερμοκρασία	Χρόνος (λεπτά)	Κύκλοι
95 °C	5	1
94 °C	1	35
64 °C	1	
72 °C	1	
72 °C	10	1

Ανάδειξη προϊόντος PCR

Ακολουθήθηκε η ίδια μεθοδολογία που αναγράφεται στην ανάδειξη των προϊόντων PCR των εξονίων 2, 4 και 9 του B/E LDL υποδοχέα. Το προϊόν της PCR ήταν το αναμενόμενο (87 bp) (Εικόνα 2).

Πέψη με ένζυμο περιορισμού

Το προϊόν της PCR υποβλήθηκε σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Sau96 I που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'G↓GNCC-3', στις παρακάτω συνθήκες :

24 μl ddH ₂ O
20 μl προϊόντος PCR
5 μl Sau96 I buffer
1 μl Sau96 I ένζυμο

50 μl ολικής αντίδρασης
Επώαση στους 37°C επί 24 ώρες

Ανάδειξη των προϊόντων της πέψης

Τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την επώαση με το ένζυμο περιορισμού Sau96 I διαχωρίστηκαν με κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12% υπό σταθερή τάση 80V. Συγκεκριμένα ηλεκτροφορήθηκαν 20μl του προϊόντος της πέψης παράλληλα με DNA του βακτηριοφάγου φX174, κατατμημένο με την ενδονουκλεάση περιορισμού Hinf I (φX 174-Hinf I - Promega) που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ελέγχου. Ακολούθησε χρώση της πηκτής με βρωμιούχο αιθίδιο και ανάγνωση των αποτελεσμάτων.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκε γιατί παρουσιάζει μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα από ότι τα ανάλογα της αγαρόζης δυνάμενο να διαχωρίσει τμήματα DNA που διαφέρουν σε μήκος μέχρι 0,2% (μία βάση σε 500 βάσεις).⁴³ Για την παρασκευή του πηκτώματος ακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκε το οργανικό μόριο $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ (ακρυλαμίδα) και το N,N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο (αντιδραστήριο διασταύρωσης). Τα ανωτέρω μόρια πολυμερίζονται παρουσία του υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) που προκαλεί την δημιουργία ελεύθερων ριζών και του καταλύτη N,N τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), που επιταχύνει την διάδοση των ελευθέρων ριζών.

2.4.6 Προσδιορισμός των λιπιδίων στο αίμα

Ο προσδιορισμός της ολικής χοληστερόλης, της HDL χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων αίματος στα άτομα που μελετήθηκαν έγινε με συνήθεις εργαστηριακές μεθόδους. Τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης υπολογίστηκαν με τον τύπο του Friedewald:

$$\text{LDL χοληστερόλη} = \text{Ολική χοληστερόλη} - (\text{HDL χοληστερόλη} + \text{τριγλυκερίδια}/5)$$

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

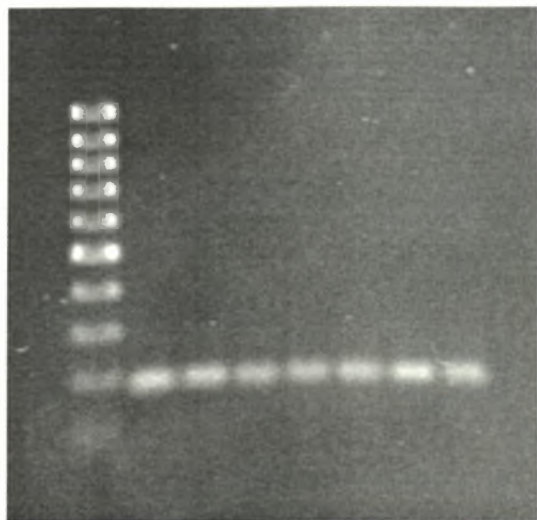
Τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων, της LDL και της HDL χοληστερόλης φαίνονται στον **πίνακα 9**. Στην πλειοψηφία των ατόμων τα επίπεδα της ολικής ή της LDL χοληστερόλης είναι σημαντικά αυξημένα γεγονός που υποδηλώνει την οικογενή φύση της διαταραχής. Ειδικότερα, δεκαέξι από τα 22 μελετηθέντα άτομα είχαν επίπεδα ολικής χοληστερόλης και LDL χοληστερόλης πάνω από τα φυσιολογικά επίπεδα και το 80% αυτών επίπεδα ολικής χοληστερόλης πάνω από 300 mg/dl και LDL χοληστερόλης πάνω από 190 mg/dl. Σημειώνεται ότι 3 από τα άτομα που μελετήσαμε παρουσίασαν σε σχετικά μικρή ηλικία στεφανιαία νόσο.

Η μελέτη των εξονίων 2, 4, 9 και 11 του γονιδίου του B/E LDL υποδοχέα ήταν αρνητική για παρουσία σημειακής μετάλλαξης όπως αντίστοιχα ήταν και η μελέτη του γονιδίου της αποπρωτεΐνης B. Ειδικότερα, η επώαση των PCR προϊόντων των εξονίων 2, 4, 9 και 11 με τα περιοριστικά ένζυμα που αναφέρθηκαν δεν επηρέασε τη δομική ακεραιότητά τους (**Εικόνα 3 και Εικόνα 4A, B**). Η παρουσία σημειακής μετάλλαξης δημιουργεί θέση δράσης του περιοριστικού ενζύμου το οποίο ασκώντας τη δράση του «τεμαχίζει» το αρχικό μόριο του DNA σε δύο μικρότερα κομμάτια (restriction fragments) διαφορετικού αριθμού βάσεων. Όπως φαίνεται στον **πίνακα 10**, η δράση του ενζύμου επί παρουσίας ετεροζυγού μετάλλαξης δίνει γένεση τριών κομματιών με διαφορετικό αριθμό βάσεων ενώ επί ομοζυγωτίας τα κομμάτια του DNA είναι δύο. Σε αντίθεση με τα ανωτέρω, η παρουσία σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο της αποB καταργεί τη θέση δράσης του περιοριστικού ενζύμου με αποτέλεσμα να μη προκύπτουν τα αναμενόμενα φυσιολογικά δύο τμήματα του DNA (67 και 20 bp) αλλά στους ετεροζυγώτες τρία τμήματα και τους ομοζυγώτες να μένει αμετάβλητο το προϊόν της PCR. Η παρουσία δύο ταινιών στην ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR του γονιδίου της αποB μετά τη δράση του περιοριστικού ενζύμου (**Εικόνα 4Γ**) αποκλείει την παρουσία σημειακής μετάλλαξης στα άτομα που μελετήσαμε.

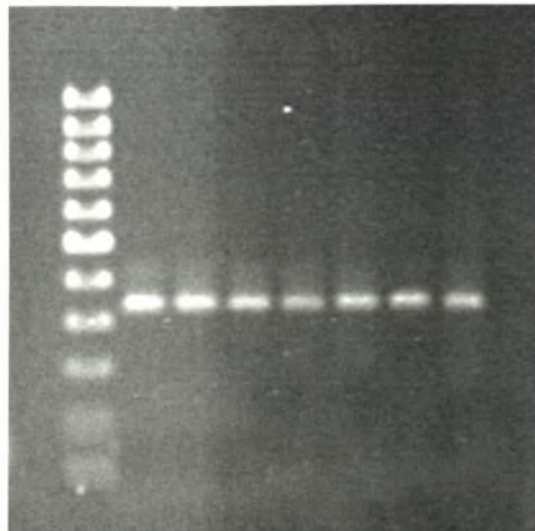
Πίνακας 9: Δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) και επίπεδα λιπιδίων στα άτομα που μελετήθηκαν

α/α	ΚΩΔ. ΓΕΝ. ΔΕΝΔΡΟΥ	ΔΜΣ	Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	Τριγλυκερίδια (mg/dl)	LDL-Χοληστερόλη (mg/dl)	HDL-Χοληστερόλη (mg/dl)
1	A1	29,2	220	57	136	73
2	A4	27,4	323	222	220	59
3	A4.1	20,8	322	73	251	56
4	A4.2	20,4	395	72	318	63
5	A5	20,5	204	111	134	48
6	A7	26,6	336	128	249	61
7	B3	20,7	158	135	53	78
8	Γ4	28,7	193	95	115	59
9	Δ	31,1	352	77	247	90
10	Δ1	26,9	369	221	270	55
11	Δ1.3	18,2	146	63	74	59
12	Δ4	23,3	308	56	237	60
13	Δ5	27,3	479	256	367	61
14	Δ6	28,4	274	110	183	69
15	Δ6.1	27,5	316	113	244	49
16	Δ6.2	26,8	186	84	113	56
17	Δ7	25	404	55	326	67
18	E	30	298	95	220	59
19	EA	27,4	330	125	232	73
20	E1	21,2	586	188	460	88
21	E2	20,0	209	97	125	65
22	E2.1	17,8	167	59	90	65

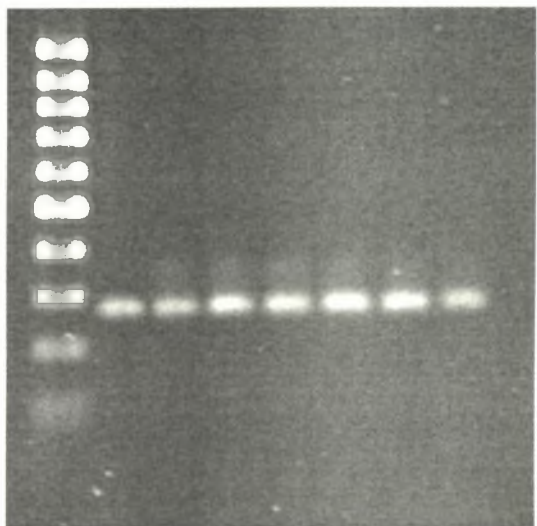
Εξόνιο 2



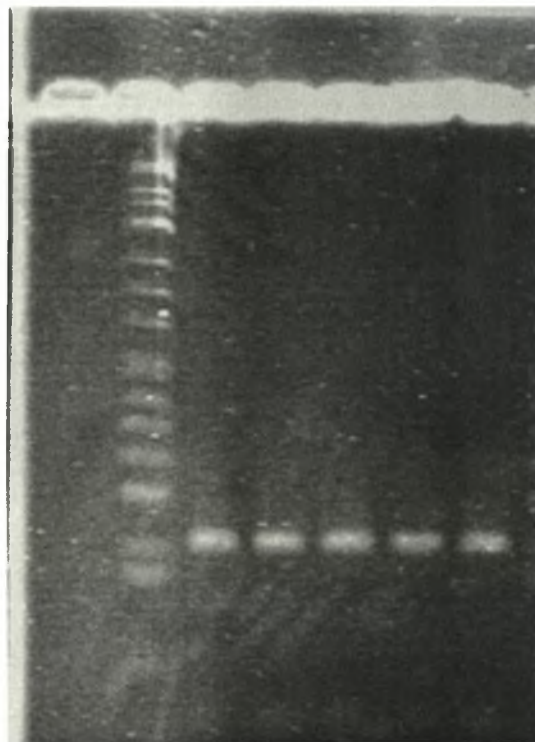
Εξόνιο 4



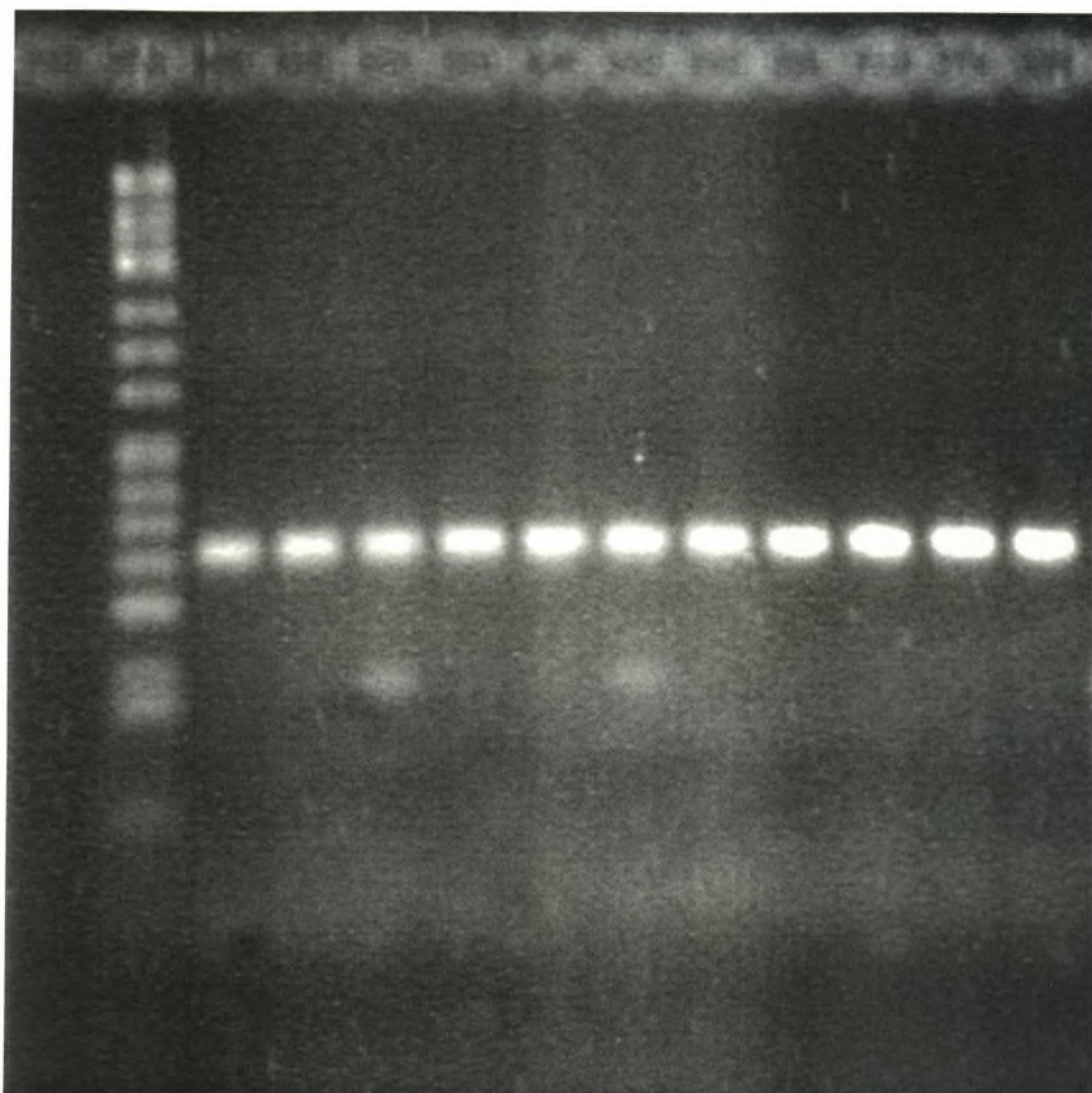
Εξόνιο 9



Εξόνιο 11



Εικόνα 1: PCR προϊόντα των εξονίων 2, 4, 9 και 11 του B/E LDL υποδοχέα.

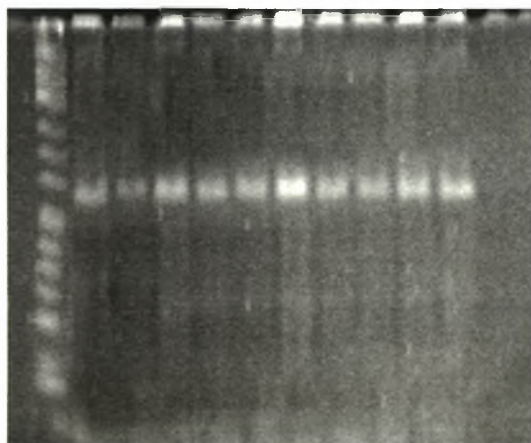


Εικόνα 2: PCR προϊόν του γονιδίου της apoB-100

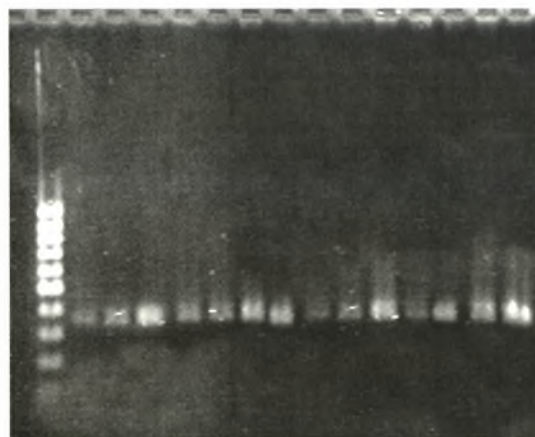
Πίνακας 10: Μέγεθος των προϊόντων PCR και των προϊόντων πέψης των μελετηθέντων εξονίων του γονιδίου του B/E LDL υποδοχέα και του γονιδίου της αποB-100.

	Προϊόν PCR	Ενζυμο Περιορισμού	Προϊόντα πέψης		
			Μελετηθέντων ατόμων	Ετεροζυγώτη	Ομοζυγώτη
Γονίδιο B/E LDL υποδοχέα					
Εξόνιο 2	183 bp	Hae III	183 bp	183, 131, 52 bp	131, 52 bp
Εξόνιο 4	335 bp	BstI	335 bp	335, 105, 230 bp	105, 230 bp
Εξόνιο 9	273 bp	Nia III	273 bp	273, 151, 122 bp	151, 122 bp
Εξόνιο 11	52 bp	MboI	52 bp	52, 23, 27 bp	23, 27 bp
Γονίδιο αποB-100	87 bp	Sau 96 I	67,20 bp	87, 67, 20 bp	87 bp

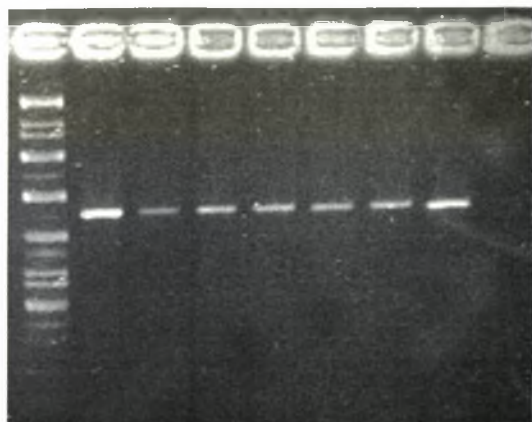
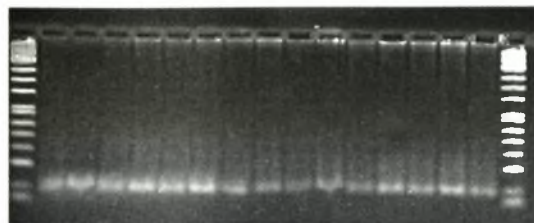
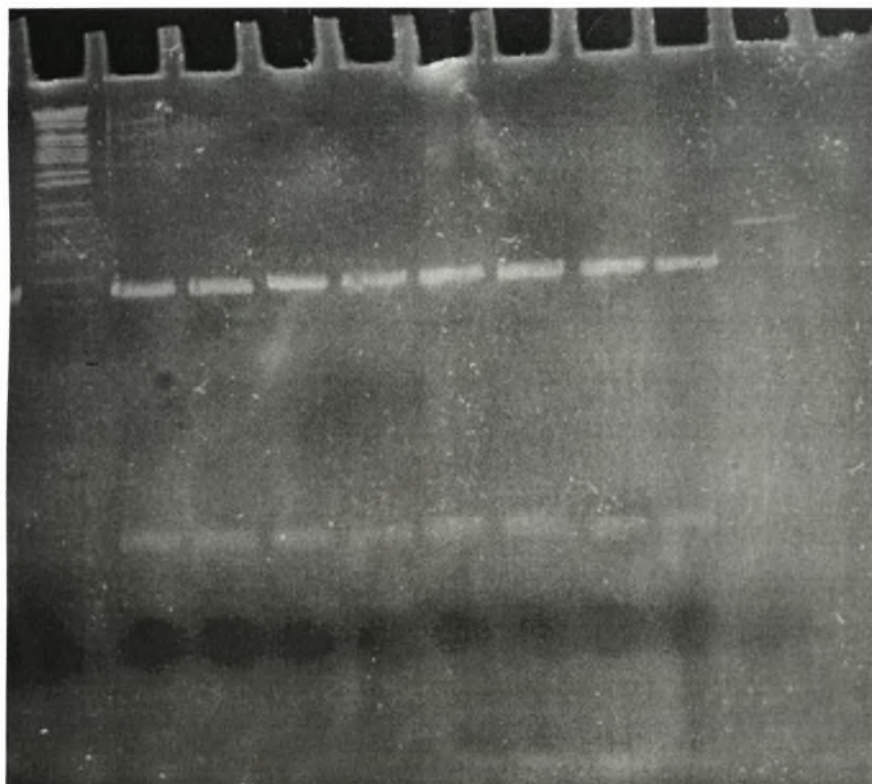
A



B



Εικόνα 3: Επίδραση των περιοριστικών ενζύμων HaeIII και BstI αντίστοιχα στα PCR προϊόντα του εξονίου 2 (A) και Η (B) του B/E LDL υποδοχέα.

A**B****Γ**

Εικόνα 4: Επίδραση των περιοριστικών ενζύμων NlaIII, M60I και Sau 96I αντίστοιχα στα PCR προϊόντα των εξονίων 9 (A) και 11 (B) του B/E LDL υποδοχέα και του γονιδίου της apoB100 (Γ).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αυξημένα επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα και η παρουσία αχίλλειων ξανθωμάτων σε συνδυασμό με την παρουσία υπερχοληστερολαιμίας σε άλλα μέλη της οικογένειας της ασθενούς κάνουν έντονα πιθανή την οικογενή εκλεκτική αύξηση της χοληστερόλης. Η παρουσία τενόντιων ξανθωμάτων στον ασθενή ή στους συγγενείς 1^{ου} βαθμού έχουν θεωρηθεί παθογνωμονικά της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας αλλά μπορεί να είναι παρόντα και στην οικογενή διαταραχή που χαρακτηρίζεται από ελαττωματική αποB-100³⁴.

Αρκετά μέλη της οικογένειας είχαν επίπεδα ολικής χοληστερόλης αίματος πάνω από 350 mg/dl και φυσιολογικά επίπεδα τριγλυκεριδίων ευρήματα που από μόνα τους κάνουν ιδιαίτερα πιθανή τη διάγνωση της ετερόζυγης οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας. Χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης, δεν αποκλείουν την ετερόζυγη μορφή και αποδίδονται στη συνύπαρξη άλλων γονιδίων με υπολιπιδαιμική δράση. Τα κλινικά διαγνωστικά κριτήρια της ετερόζυγης οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας έχουν σημαντική διαγνωστική ευαισθησία αλλά με κανένα τρόπο δεν κάνουν απόλυτη τη διάγνωση της διαταραχής. Στα βέβαια κριτήρια ανήκει μόνο η αποκάλυψη της γενετικής βλάβης³³ που αφορά στο γονίδιο του B/E LDL υποδοχέα. Όμως, κλινική εικόνα παρόμοια με αυτή της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας μπορεί να εμφανισθεί στην οικογενή ελαττωματική αποB-100, γεγονός που επιβάλλει την αναζήτηση μοριακής βλάβης και στο γονίδιο της αποB-100³⁷ έστω και αν αυτή αποτελεί μόνο το 3% του συνόλου των περιπτώσεων της ετερόζυγης οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας.^{34a,35}

Τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης λόγω ελαττωμένης μεταβολικής κάθαρσης³⁰ αποτελούν παράγοντα φθοράς των αγγείων με συνέπειες που είναι κλινικά έκδηλες νωρίς στη ζωή κυρίως από τα στεφανιαία αγγεία. Με δεδομένες την παρουσία της διαταραχής από την αρχή της ζωής και αξία της έγκαιρης έναρξης της θεραπείας επιβάλλεται η όσο το δυνατό νωρίτερα διάγνωση του γενετικού ελαττώματος.

Τα ευρήματα μας αποκλείουν την παρουσία σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο της αποB και στα εξόνια 2, 4, 9 και 11 του γονιδίου του B/E LDL υποδοχέα. Αυτό καλύπτει μόνο το 45% των πιθανοτήτων με βάση τις θέσεις και τη συχνότητα των μεταλλάξεων της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας στον Ελληνικό πληθυσμό²⁵. Σημαντική είναι η πιθανότητα (17%) η γενετική βλάβη να εντοπίζεται στο εξόνιο 6 αλλά αυτό αποτελεί ένα έργο του μέλλοντος αφού ο χρόνος υλοποίησης της μελέτης ήταν σχετικά περιορισμένος.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the genetical causes of hypercholesterolaemia in a family with clinical and laboratory finding indicating familial disorder. To achieve that we examined 22 members of the family in which cases of familial hypercholesterolaemia had been diagnosed. For this purpose we checked the gene of the LDL receptor for point mutations in exons 2,4,9 and 11 which have been observed in the Greek population, and the gene of apoB 100 for the point mutation R3500Q. The results showed that this specific family did not have the above mutations and in order to find the cause of their hypercholesterolaemia we should further investigate their genome for other mutations.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lubert stryer. «Βιοχημεία», 1977.
- 1α. Coronary heart disease motrality trends among whites and blacks –Appalachia and United States, 1980-83 MMWR Morb Mortal Wkly Rep 47:1005, 1998.
2. Leung W-H, Lau C-P, Wong C-K. Beneficial effect of cholesterol - lowering therapy on coronary eudothelimy - dependent relaxation in hypercholesterolaemic patients. Lancet. (1993) 341: 1496 - 150.
3. Grundy SM. Multifactorial etiology of hypercholesterolemia: Implications for prevention of coronary health disease. Arterioscler. Thromb. (1991) 11:1619 - 1635.
4. Bilheimer D.W. The role of lipid regulation in the prevention of coronary heart disease. European Heart Journal (1992) 13: 23 - 28.
5. European Atherosclerosis Society. Prevention of coronary heart disease: Scientific back grand and new clinical guidelines. Recommendations of the European Atherosclerosis Society prepared by the International Task Force for prevention of heart disease. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. (1992) 2:113 - 156.
6. Τζώτζας Θ. Μεταβολισμός Λιπιδίων.
7. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is the relationship between serum cholesterole and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). JAMA, 1986 256:2823.
8. Marshall W. Κλινική Βιοχημεία 1998.
9. Διονυσίου - Αστερίου Α. Αθηροσκλήρυνση - Βιοχημική Προσέγγιση 1997.
10. Brauy JEA, Severson DL. Regulation of the synthesis, processing and translocation of Ripoprotein lipase. Biochem. J. (1992). 287: 337 - 347.
11. Olivecrona T., Bengtsson - Olivecrona G. Lipoprotein lipase and hepatic lipase. Cur. Opin. Lipidol. (1993) 4: 187 - 196.
12. Kamin O., Hill JS, Wang X, Mcleod R., Pritchard PH Lecithin: Cholesterol acyltransferase: role of N - linked glycosylation in enzyme Function. Biochem. J. (1993) 294: 879 - 884.
13. Montgomery R., Conway TW, Spector AA. Lipoproteins. In: Biochemistry a case oriented approach 5th Edition Internation edition Mosby Co. (1990) pp 685 – 720.

14. Havekes LM, De Wit ECM, Princen HMG. Cellular Free cholesterol in Hep G2 cells is only partially available for down - regulation of low - density - Lipoprotein receptor activity. *Biochem. J.* (1987) 247: 739 - 746.
15. Schneider WJ, Nimp FJ. Lipoprotein receptoes: Old relatives and new arrivals. *Cur. Opin. Lipidol.* (1993) 4: 205 - 209.
16. Wiklund O, Mattson L, Bjornheden T., Camejo G. Bondjers G. Uptake and degradation of low density lipoproteins in atherosclerotic rabbit aorta: role of local LDL modification. *J. Lipid Res* (1991) 32: 55 - 62.
17. Talavera F., Menon KM Regulation of rat luteal cell high density lipoprotein receptors: up - regulation. In response to changes in intracellular cholesterol concentration. *Eudocrinology* (1989) 125: 2015 - 2021.
18. Ochoa B., Gee A., Jackson B., Suckling KE. Regulation of cholesteryl ester metabolism in the hamster liver. *Biochim. Biophys. Acta.* (1990) 1044: 133 - 138.
19. Hylemon PB, Gurley EC, Stravitz RT, Litz JS, Pandak WM, Chiang JVL, Vlahcevic ZR. Hormonal regulation of cholesterol 7a - Hydroxylase mRNA levels and transcriptional activity in primary rat hepatocyte cultures. *J. Biol. Chem.* (1992) 267: 16866 - 16871.
20. Ginsberg HN. Synthesis and secretion of apolipoprotein B from cultured liver cells. *Cur. Opin. Lipidol* (1995) 6: 275 - 280.
21. Boren J. Ekstrom U, Agren B, Nilsson - Ehle P, Inneratity TL. The Molecular Mechanism for the genetic disorder. Familial defective Apolipoprotein B100. *J. Biol. Chem.* (2001) 276: 9214 - 2218.
22. Thomas D., Gelehrter - Franciss, Collins. *Αρχές Ιατρικής Γενετικής* 1996.
23. Esser, V, Limbird, LE, Brown, MS, et al. Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* (1988); 263:13282.
24. Hobbs H., Russell D., Brown M., Goldstein J. The LDL receptor locus in familiar hypercholesterolemia: Mutational analysis of a membrane protein Aunu. *Rev. Genet.* (1990) 24: 133 - 170.
25. Synodinos J., Mavroidis N., Kanavakis E., Drogari E., Humphries S., Kattamis C, Matsaniotis N. Analysis of low density lipoprotein receptor genulations and microsatellite haplotypes in Greek FH heterozygons children: Six independent ancestors account for 60% of Probands. *Heum Genet* (1998) 102: 343 - 347.

26. Pisciotta L., Cantafora A., De Stefano F., Langheim S., Calanda S., Bertolini S., A «de novo» mutation of the LDL - receptor gene as the cause of familial hypercholesterolemia. *Bioch. Et Biophys. Acta* (2002) 1587: 7 - 11.
27. Hobbs H., Brown M., Goldstein J. Molecular genetics of the LDL receptor gene in Familial Hypercholesterolemia. *Humom Mutation*: (1992) 1: 445 - 466.
28. Genest, JJ, Martin-Munley, SS, McNamara, JR, et al. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation* (1992); 85:2025.
- 28 α . Ishibashi, S., Brown, MS, Goldstein, JL, et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* (1993) 92:883.
29. Hobbs, HH, Russell, DW, Brown, MS, Goldstein, JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolaemia: Mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet* (1990); 24:133.
30. Grossman, M, Rader, DJ, Muller, DW, et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Nat Med* (1995); 1:1148.
31. Steinberg, D, Parthasarathy, S, Carew, TE, et al. Beyond cholesterol: Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* (1989); 320:915.
32. Rallidis, L, Naoumova, RP, Thompson, GR, et al. Extent and severity of atherosclerotic involvement of the aortic valve and root in familial hypercholesterolemia. *Heart* (1998); 80:583.
33. Williams, R, Hunt, SC, Schumacher, C, et al. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol* (1993); 72:171.
34. Defesche, JC, Pricker, KL, Hayden, MR, et al. Familial defective apolipoprotein B-100 is clinically indistinguishable from familial hypercholesterolemia. *Arch Intern Med* (1993); 153:2349.
- 34 α . Defesche, JC, Pricker, KL, Hayden, MR, et al. Familial defective apolipoprotein B-100 is clinically indistinguishable from familial hypercholesterolemia. *Arch Intern Med* (1993); 153:2349.

35. Tybjaerg-Hansen, A, Gallagher, J, Vincent, J, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: detection in the United Kingdom and Scandinavia, and clinical characteristics of 10 cases. *Atherosclerosis* (1990); 80:235.
36. Tybjaerg-Hansen, A, Steffensen, R, Meinertz, H, et al. Association of mutations in the apolipoprotein B gene with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* (1998); 338:1577.
37. Motti, C, Funke, H, Rust, S, et al. Using mutagenic polymerase chain reaction to detect carriers of familial defective apolipoprotein B-100. *Clin Chem* (1991); 37:1762.
38. Williams, RR, Hopkins, PN, Hunt, SC, et al. Population based frequency of dyslipidemia syndromes in coronary-prone families in Utah. *Arch Intern Med* (1990); 150:582.
39. Goldstein, JL, Schrott, HG, Hazzard, WR, et al. Hyperlipidemia in coronary heart disease, II: Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* (1973); 52:1544.
40. Venkatesan, S, Cullen, P, Pacy, P, et al. Stable isotopes show a direct relation between VLDL apoB overproduction and serum triglyceride levels and indicate a metabolically and biochemically coherent basis for familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb* (1993); 13:1110.
41. Pajukanta, P, Nuotio, I, Terwilliger, JD, et al. Linkage of familial combined hyperlipidaemia to chromosome 1q21-q23. *Nat Genet* (1998); 18:369.
42. Grundy, SM. Multifactorial etiology of hypercholesterolemia: Implications for prevention of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb* (1991); 11:1619.
43. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular Cloning* second edition.

ΛΗΞΗ	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΔΑΝΕΙΖΟΜΕΝΟΥ

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ**

~~Τηλ.: 74.760-61~~ ΛΑΡΙΣΑ

2410-565077

565078



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057236

