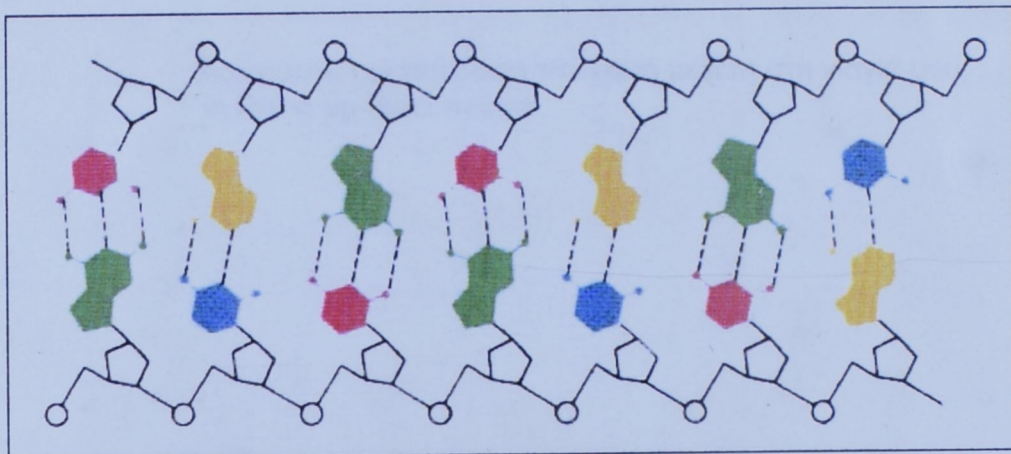


ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
της
ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗΣ ΠΛΟΥΜΙΔΟΥ

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Ε
ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΓΙΑΝΝΑΚΟΥΡΗΣ, Ν. ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:
ΜΑΤΑΛΑ, Α. ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΖΑΜΠΕΛΑΣ, Α. ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΓΙΑΝΝΑΚΟΥΡΗΣ, Ν. ΛΕΚΤΟΡΑΣ

Αθήνα 1999

ΠΤΥ
ΠΛΟ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αφιερώνω την παρούσα πτυχιακή μελέτη στη γιαγιά μου,
τη Ράνια με πολύ αγάπη.

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη δεν θα ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί χωρίς την υλική υποστήριξη, την επιστημονική επίβλεψη και ηθική συμπαράσταση κατά κύριο λόγο εκ μέρους του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου, των μελών του διοικητικού προσωπικού και του επιστημονικού. Ευχαριστώ θερμότατα το Χαροκόπειο ΑΕΙ για την κάλυψη των εξόδων του πειράματος. Ευχαριστώ εγκάρδια τον κ. Γιαννακούρη Ν. Λέκτορα του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου ως επιβλέποντα αυτής της εργασίας για την πολύτιμη βοήθεια, την αμέριστη συμπαράσταση και το γεγονός ότι μου έδωσε την δυνατότητα να κατακτήσω νέους πνευματικούς ορίζοντες. Ευχαριστώ θερμότατα τον αγαπητό συνάδελφο Λάμπρο Μελίστα για την εποικοδομητική και άριστη συμβολή του στην παρούσα πτυχιακή μελέτη. Ευχαριστώ επιπλέον την κ. Ματάλα και τον κ. Ζαμπέλα για τις παρατηρήσεις και συμβουλές επί της παρούσας πτυχιακής μελέτης καθώς και το προσωπικό του εργαστηρίου. Ευχαριστώ, τέλος, την οικογένειά μου, που με στήριξε ηθικά και για το γεγονός ότι, ό,τι έχω γίνει, το οφείλω σ' αυτούς.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

A.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ – ABSTRACT.....	6
B.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.	Η φυσιολογία και βιοχημεία της Απολιποπρωτεΐνης Ε.....	9
1.1	Ρόλος της ΑποΕ στον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών.....	9
1.2	Η πρωτεΐνη και το γονίδιο της ΑποΕ.....	14
2.	Η παθοφυσιολογία της ΑποΕ.....	16
2.1	Επίδραση του πολυμορφισμού της ΑποΕ στο στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών.....	16
2.2	Ο πολυμορφισμός της ΑποΕ με την αρτηριοσκλήρυνση και με άλλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις.....	17
Γ.	ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	19
Δ.	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	20
1.	Το δείγμα	20
2.	Συλλογή αίματος.....	20
3.	Ταυτοποίηση του πολυμορφισμού της ΑποΕ.....	21
3.1.	Απομόνωση του DNA.....	21
3.2.	Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA.....	22
3.3.	DNA ανάλυση.....	22
	α) Μέθοδος του PCR.....	22
	β) RFLP analysis.....	22

Ε.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	26
-----------	--------------------------	-----------

ΣΤ.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	30
------------	----------------------	-----------

Ζ.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	35
-----------	--------------------------	-----------

Η.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	40
-----------	-------------------------	-----------

	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α'.....	41
--	-------------------	----

	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β'.....	42
--	-------------------	----

A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η απολιποπρωτεΐνη Ε (ΑpoE) διαδραματίζει έναν κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών επειδή αποτελεί τη πρωτεΐνη εκείνη με την οποία συνδέονται οι λιποπρωτεΐνες με τους ηπατικούς υποδοχείς της LDL και της ΑpoE. Στους περισσότερους πληθυσμούς απαντούνται τρεις κοινές ισομορφές της ΑpoE που κωδικοποιούνται από τρία αλληλόμορφα (ε2, ε3, ε4) του γονιδίου της ΑpoE στο χρωμόσωμα 19. Οι τρεις ισομορφές διαφέρουν ή μια από την άλλη σε μία ή και σε δύο θέσεις της πρωτεϊνικής αλυσίδας που αποτελείται από 299 αμινοξέα. Αυτές οι αλλαγές προκαλούν σημαντικές διαφοροποιήσεις στη δομή και στις φυσικές ιδιότητες της πρωτεΐνης και είναι υπεύθυνες για τις διαφορετικές επιδράσεις στο μεταβολισμό της χοληστερόλης και ακολούθως στον κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα. Έχει εκτιμηθεί ότι ο πολυμορφισμός της ΑpoE ευθύνεται για τη διακύμανση της χοληστερόλης του πλάσματος από 7-16% σε πληθυσμούς που ακολουθούν τη κανονική κατανομή. Η ΑpoE2 και ΑpoE4 έχουν την ιδιότητα να αυξάνουν και να μειώνουν τη χοληστερόλη του πλάσματος αντίστοιχα. Η παρουσία του ε4 αλληλομόρφου έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο για αρτηριοσκλήρυνση, για καρδιαγγειακά, την νόσο του Alzheimer, και με αυξημένη ολική θνησιμότητα. Για το λόγο αυτό η συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων της ΑpoE έχει μελετηθεί σε πολλούς πληθυσμούς και εθνικότητες. Έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές στις συχνότητες εμφάνισης των τριών αλληλομόρφων μεταξύ των Ευρωπαίων καθώς και ανάμεσα σε εθνικότητες και φυλές.

Ο σκοπός της μελέτης αυτής είναι να προσδιοριστεί (μέσω ανάλυσης του DNA) η συχνότητα εμφάνισης των τριών κοινών αλληλομόρφων της ΑpoE στον Ελληνικό πληθυσμό.

Το δείγμα αποτελείται από 242 υγιείς Έλληνες εθελοντές που έχουν μέσο όρο ηλικίας 24,65 ($\pm 12,64$). Οι συμμετέχοντες (95 άντρες/147 γυναίκες) ήταν κυρίως μαθητές λυκείου και φοιτητές του Πανεπιστημίου από την περιοχή της Αθήνας. Τα

αποτελέσματα έδειξαν ότι η συχνότητα εμφάνισης των τριών αλληλομόρφων της ApoE στο δείγμα μας είναι : $\epsilon_2 = 0,0805$, $\epsilon_3 = 0,8162$, $\epsilon_4 = 0,1033$.

Το ϵ_3 αλληλόμορφο βρέθηκε να είναι το αλληλόμορφο εκείνο που εμφανίζεται με τη μεγαλύτερη συχνότητα, όπως άλλωστε συμβαίνει και με άλλους πληθυσμούς που έχουν μελετηθεί ως τώρα. Η συχνότητα εμφάνισης του ϵ_4 αλληλόμορφου που βρέθηκε στην μελέτη μας είναι χαμηλότερη από τη μέση τιμή συχνότητας εμφάνισης του ϵ_4 αλληλομόρφου στους Καυκάσιους (15%) και παρόμοια μ' εκείνη που αναφέρεται για τους Νοτιο-Ευρωπαίους. Στην Ευρώπη παρατηρείται μια συγκεκριμένη τάση μείωσης της συχνότητας εμφάνισης του ϵ_4 αλληλομόρφου καθώς πηγαίνουμε από τις βορειότερες χώρες της Ευρώπης προς τις νοτιότερες η οποία συμβαδίζει και με την ανάλογη τάση μείωσης της θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα. Ο Ελληνικός πληθυσμός εμφανίζει χαμηλό ποσοστό εμφάνισης του ϵ_4 αλληλομόρφου (10,33%) το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με τα ποσοστά που έχουν βρεθεί για άλλες χώρες της νότιας Ευρώπης, ακολουθώντας τη γενικότερη τάση μείωσης του ϵ_4 αλληλομόρφου από το βορρά προς το νότο της Ευρώπης.

ABSTRACT

Apolipoprotein E (ApoE) plays a central role in the clearance of lipoprotein remnants by serving as a ligand for LDL (Low-Density Lipoproteins) and ApoE receptors. Three common genetic forms of ApoE exist in most human populations which are encoded by three alleles ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) at the ApoE locus on chromosome 19. The three isoforms differ by single aminoacid substitutions at one of two positions of the 299 residue protein. These changes cause significant differences in the structure and physical properties of the protein and are responsible for the effects of allelic variation at the ApoE gene locus on cholesterol metabolism and for the risk of atherosclerotic vascular disease. It has been estimated that ApoE polymorphism may account for up to 7% of the genetic variance and 16% of total serum cholesterol in the normal population. Apo E2 and Apo E4 have cholesterol lowering and cholesterol raising effects respectively. Therefore, $\epsilon 4$ allele has been associated with increased risk for atherosclerosis and cardiovascular disease, as well as with, Alzheimer's disease and decreased longevity. For these reasons the distribution of ApoE alleles in the general population has been studied in several countries. Significant differences have been observed in ApoE allele frequencies among European populations and between different ethnic groups and tribes.

The purpose of this study was to estimate (by DNA analysis) the distribution of the Apo E alleles in the Greek population. The material consisted of 242 voluntary healthy Greeks with a mean age of 24,65 ($\pm 12,64$). The participants (95 males/147 females) were mostly high school and University students from the region of Athens. The results showed that the Apo E frequency in our population sample is:

$$\epsilon 2 = 0,0805, \epsilon 3 = 0,862, \epsilon 4 = 0,1033.$$

The $\epsilon 3$ allele was found to be the most common allele in Greeks as it is for all other populations studied so far. The $\epsilon 4$ allele frequency found in our study of the Greek population is lower than the average Caucasian value (15%) and is similar to that reported for other Southern European populations. This reveals that the Greek population follows the north to south decreasing gradient trend of the $\epsilon 4$ allele which seems to follow the gradient trend of coronary heart disease mortality from a high risk in the Northern Europeans to a lower susceptibility in Southern European populations.

B. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Φυσιολογία και βιοχημεία της Απολιποπρωτεΐνης E (ApoE).

Η απολιποπρωτεΐνη E (ApoE) διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. Προκειμένου να κατανοηθεί η λειτουργία και ο ρόλος της ApoE γίνεται παρακάτω μία σύντομη αναφορά στο λιποπρωτεϊνικό μεταβολισμό.

1.1. Ρόλος της ApoE στο λιποπρωτεϊνικό μεταβολισμό.

Η χοληστερόλη είναι δομικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών, των χολικών αλάτων και στεροϊδών ορμονών. Από την άλλη, τα λιπαρά οξέα είναι κύρια πηγή ενέργειας για τον οργανισμό και δομικό συστατικό των τριγλυκεριδίων, των εστέρων της χοληστερόλης. Ορισμένα λιπαρά οξέα αποτελούν πρόδρομη ουσία των εικοσανοειδών. Λόγω των υδροφοβικών τους ιδιοτήτων, τα τριγλυκερίδια και οι εστέρες της χοληστερόλης κυκλοφορούν στο αίμα υπό τη μορφή ενός συμπλέγματος λιπών και πρωτεϊνών ονομαζόμενων λιποπρωτεϊνών.

Οι λιποπρωτεΐνες έχουν ένα πυρήνα πλούσιο σε εστέρες της χοληστερόλης και τριγλυκερίδια και μια επιφάνεια πλούσια σε χοληστερόλη και φωσφολιπίδια στην οποία περιέχονται απολιποπρωτεΐνες. Οι λιποπρωτεΐνες ορού χωρίζονται σε 5 υποομάδες ή τάξεις με βάση τη πυκνότητά τους και κατατάσσονται σε χυλομικρά, πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL), μεσαίας πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL), χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) και υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL). Τα χυλομικρά δημιουργούνται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, οι VLDL στο ήπαρ, οι HDL στο ήπαρ και στα εντεροκύτταρα. Τα χυλομικρά μεταβολίζονται σε υπολείμματα χυλομικρών ενώ οι VLDL μεταβολίζονται σε IDL, οι οποίοι ακολούθως μεταβολίζονται σε LDL. Οι LDL είναι το τελικό προϊόν καταβολισμού των VLDL.

Ως συστατικά των λιποπρωτεϊνών οι απολιποπρωτεΐνες είναι εκείνες που συνδέονται με τους υποδοχείς των ιστών, έτσι ώστε να γίνεται η επιλεκτική πρόσληψη της χοληστερόλης. Άλλες είναι δομικά συστατικά των λιποπρωτεϊνών ,

άλλες αλληλοεπιδρούν με ένζυμα. Μερικές από αυτές είναι η Apo AI, AII και AIV (εντοπίζονται κυρίως στα χυλομικρά, VLDL, και HDL), η ApoB 100 (εντοπίζεται στα VLDL, IDL, LDL), η ApoB48 (εντοπίζεται στα χυλομικρά) η ApoCI, CII, CIII (στα χυλομικρά, VLDL, HDL), η ApoE (στα χυλομικρά, στα υπολείμματα χυλομικρών και VLDL, IDL, LDL και HDL).

Κατά τη διάρκεια της πέψης τα λιπαρά οξέα και η χοληστερόλη της τροφής, απορροφούνται από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου όπου και εστεροποιούνται προς τριγλυκερίδια και εστέρες της χοληστερόλης αντίστοιχα. Μαζί με τα φωσφολιπίδια και τις απολιποπρωτεΐνες B48, CII και E (της οποίας πηγή είναι οι HDL), οι εστέρες της χοληστερόλης και τα τριγλυκερίδια συναθροίζονται σε χυλομικρά και εκκρίνονται στη λεμφική οδό από τα εντεροκύτταρα. Όταν τα χυλομικρά εισέλθουν στη κυκλοφορία του αίματος, τα τριγλυκερίδια τους υδrolύονται από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση, που βρίσκεται στην επιφάνεια του ενδοθηλίου των αιμοφόρων αγγείων του λιπώδους ιστού. Τότε σχηματίζονται τα υπολείμματα των χυλομικρών τα οποία μεταφέρουν την ApoCII και τη πλεονάζουσα χοληστερόλη από την επιφάνειά τους στις HDL (Αντίστοιχα οι HDL μεταφέρουν την ApoE και την ApoCII στα νεοσυντεθιμένα χυλομικρά) (βλ. σχήμα B1). Στη συνέχεια, τα πλούσια σε ApoE υπολείμματα χυλομικρών προσλαμβάνονται από το ήπαρ με ενδοκύτωση μέσω υποδοχέων που αναγνωρίζουν την ApoE. Ο υποδοχέας αυτός αναφέρεται και ως υποδοχέας υπολειμμάτων. (Brouwer et al. 1996, Champe –Harvey).

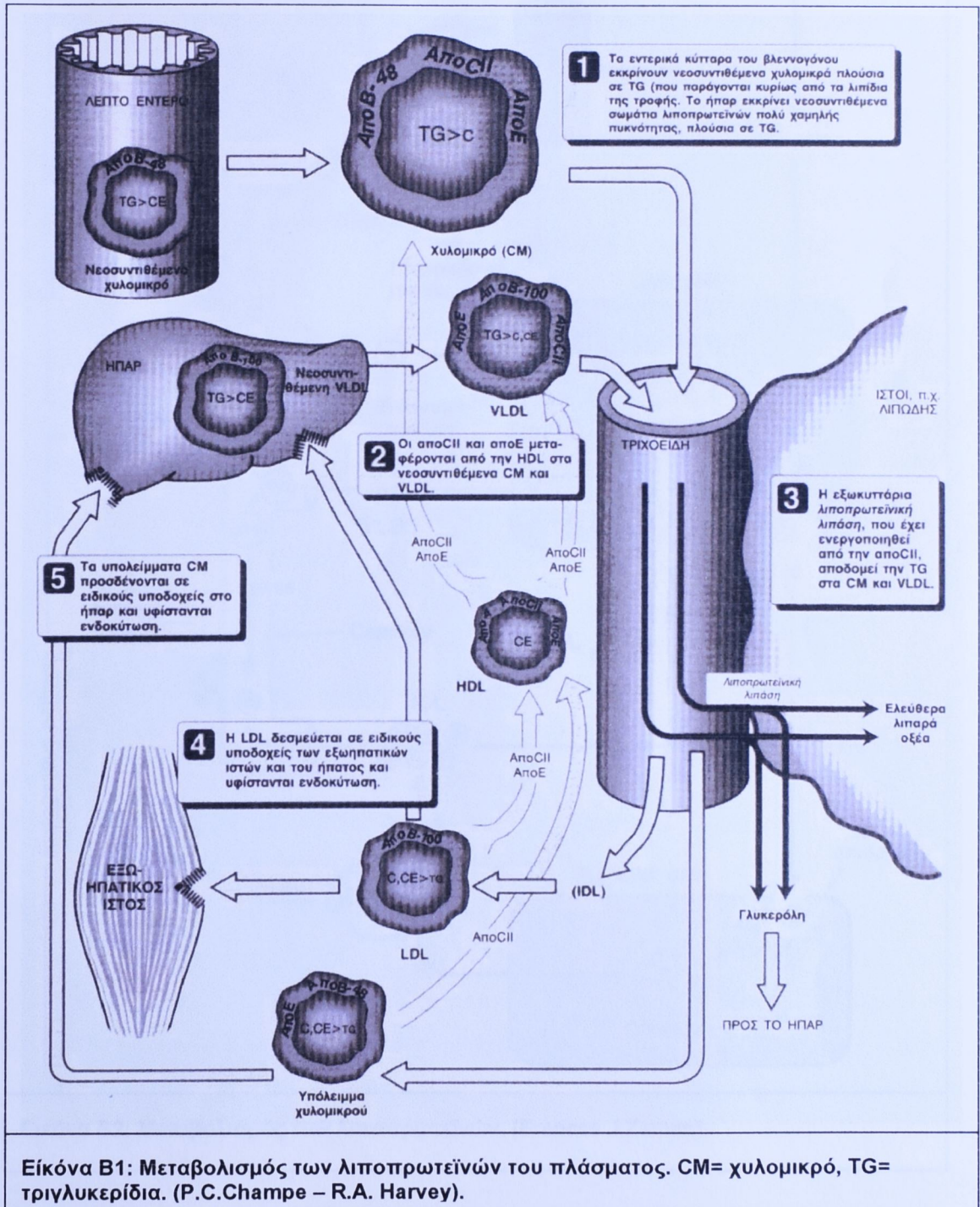
Το ήπαρ μετατρέπει τα ελεύθερα οξέα (που προέρχονται από το λιπώδη ιστό) τους υδατάνθρακες και τα αμινοξέα σε τριγλυκερίδια, ανάλογα με τις ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού. (Champe-Harvey). Μαζί με τη χοληστερόλη, τα φωσφολιπίδια, την ApoE (πηγή της οποίας είναι οι HDL) και τις άλλες απολιποπρωτεΐνες (B100, CII), τα τριγλυκερίδια συναθροίζονται σε VLDL και εκκρίνονται από το ήπαρ. Όπως στα χυλομικρά, έτσι και τα τριγλυκερίδια των VLDL υδrolύονται από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση σχηματίζοντας τα υπολείμματα των VLDL. Εκείνα αλληλοεπιδρούν με τις HDL μέσω της πρωτεϊνής μεταφοράς των εστέρων της χοληστερόλης (CETP). Έτσι οι HDL λαμβάνουν από τα υπολείμματα των VLDL τριγλυκερίδια και φωσφολιπίδια ενώ τα υπολείμματα των VLDL λαμβάνουν εστέρες της χοληστερόλης από τις HDL. Συνεπώς τα υπολείμματα των VLDL γίνονται πλούσια σε εστέρες της χοληστερόλης και μπορούν να μεταβολιστούν μέσω τριών μονοπατιών: να γίνει η πρόσληψή τους από τον υποδοχέα των LDL (που αναγνωρίζουν την ApoB και την ApoE), να γίνει η πρόσληψή τους από τον υποδοχέα

της ApoE (που αναγνωρίζει μόνο την ApoE) ή να μεταβολιστούν περαιτέρω σε LDL. Οι LDL προτού προσληφθούν από τους υποδοχείς του ήπατος μεταφέρουν την ApoE και την ApoCII στις HDL, οπότε και γίνονται πλούσια σε απολιποπρωτεΐνη B100. Ακολούθως οι LDL προσλαμβάνονται από τον LDL υποδοχέα, ο οποίος αναγνωρίζει την B100. Η τροποποίηση της LDL λόγω οξειδωσης αποτρέπει την αναγνώρισή της από τον υποδοχέα με συνέπεια μεγάλες ποσότητες τροποποιημένης LDL να εισβάλλουν στο αγγειακό ενδοθήλιο. Αποτέλεσμα αυτού είναι η αύξηση της συγκέντρωσης των μακροφάγων στην περιοχή αυτή. Η πρόσληψη της τροποποιημένης LDL από τα μακροφάγα με τη βοήθεια των υποδοχέων «καθαριστών» (scavenger receptors) έχει ως συνέπεια τη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα, πλούσια σε εστέρες της χοληστερόλης. Αυτή είναι και η αρχή της αθηρογένεσης (Brouwer et al .1996).

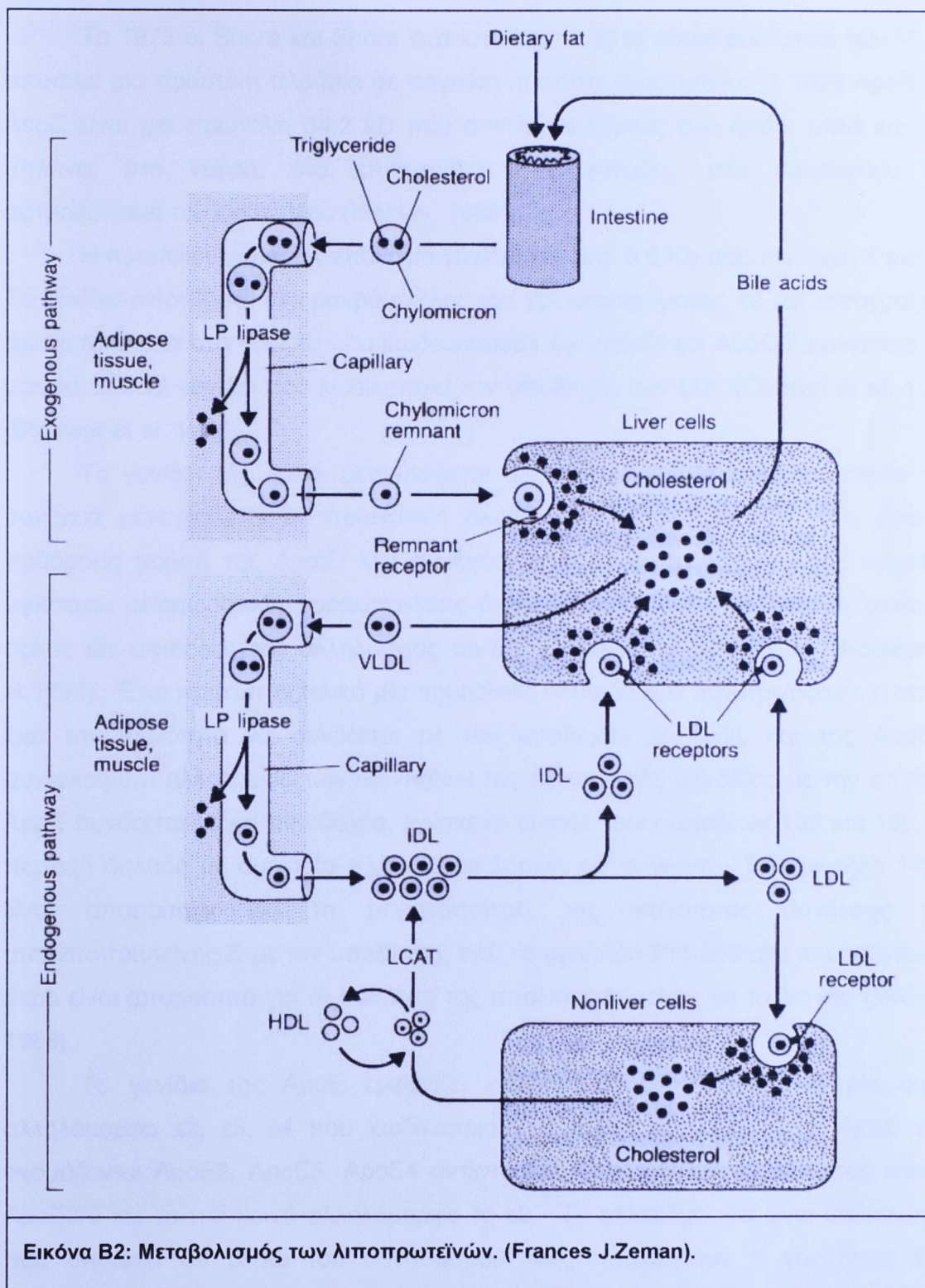
Οι HDL από την άλλη απομακρύνουν την ελεύθερη (μη εστεροποιημένη χοληστερόλη) από τους εξωηπατικούς ιστούς, την εστεροποιούν χρησιμοποιώντας το ένζυμο του πλάσματος λεκιθίνο-χοληστερίνο ακυλοτρανσφεράση (LCAT). Οι HDL στη συνέχεια ακολουθούν δύο μεταβολικούς οδούς: ή μεταφέρουν τους εστέρες της χοληστερόλης στις VLDL και τα υπολείμματα των VLDL μέσω CETP ή προσλαμβάνονται από τους υποδοχείς των LDL (μέσω της ApoE). (Champe-Harvey).

Κάνοντας μια μικρή ανασκόπηση του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών (βλ. εικόνα B1 και B2) διαπιστώνει κανείς πως η ApoE αποτελεί μέρος ενός κύκλου. Από το ήπαρ (που είναι ο κύριος τόπος παραγωγής της) η ApoE μεταφέρεται στις HDL και στα νεοσυντεθμένα χυλομικρά και VLDL. Τα VLDL μεταβολίζονται σε υπολείμματα και οι LDL που περιέχουν ακόμα την ApoE τη μεταφέρουν στις HDL. Ακολούθως οι HDL μεταφέρουν την ApoE στις νεοσυντεθμένες VLDL και συνεχίζει η επανάληψη της διαδικασίας. Η απολιποπρωτεΐνη E επομένως διαδραματίζει τον κεντρικότατο ρόλο στο μεταβολισμό των HDL (λόγω σύνδεσης της ApoE με τον υποδοχέα LDL) των χυλομικρών και των VLDL. Παράλληλα έχουν διαπιστωθεί πειραματικά πολλαπλές αλληλεπιδράσεις της λιποπρωτεϊνικής και της ηπατικής λιπάσης με την ApoE. Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί πως η ApoE in vitro ενεργοποιεί άμεσα την ηπατική λιπάση (Brouwer et al.1996), ενώ η λιποπρωτεϊνική λιπάση βοηθά τη δέσμευση της ApoE με τον υποδοχέα της, με έμμεσο τρόπο με το να συμβάλλει στη πέψη των τριγλυκεριδίων, των χυλομικρών και VLDL και ν' αυξάνει την έκθεση της ApoE στον υποδοχέα της (Brouwer et al .1996).

Η ApoE πιστεύεται επιπλέον πως διαδραματίζει έναν ρόλο στην ανοσορύθμιση, στην αναγέννηση των νευρικών ινών, στην ενδοκυτταρική χρησιμοποίηση της χοληστερόλης και στην στεροϊδογένεση που γίνεται στα επινεφρίδια (Mahley 1988, Brouwer et al .1996).



Εικόνα Β1: Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. CM= χυλομικρό, TG= τριγλυκερίδια. (P.C.Champe – R.A. Harvey).



1.2. Η πρωτεΐνη και το γονίδιο της ApoE.

Το 1973 οι Shore και Shore διαπίστωσαν πως το κύριο συστατικό των VLDL αποτελεί μια πρωτεΐνη πλούσια σε αργινίνη, η οποία ονομάστηκε το 1975 ApoE. Η ApoE είναι μια πρωτεΐνη 34,2 kD που συντίθεται κυρίως στο ήπαρ, αλλά και στο σπλήν, στα νεφρά, στα επινεφρίδια, στις γονάδες, στα μακροφάγα και αστροκύτταρα του εγκεφάλου (Mahley, 1988).

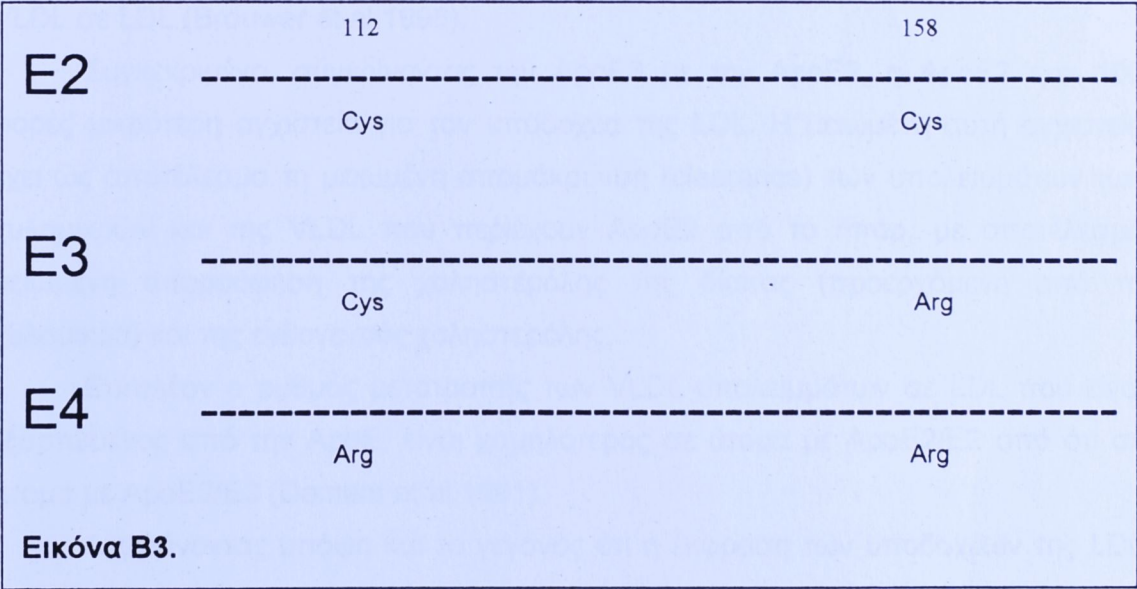
Η πρωτεΐνη κωδικοποιείται από γονίδιο μήκους 3,6 Kb που περιέχει 4 exons. Το γονίδιο εντοπίζεται στο μακρύ σκέλος του χρωματοσώματος 19 και τοπογραφικά βρίσκεται δίπλα στα γονίδια που κωδικοποιούν την ApoCI και ApoCII αντίστοιχα και μακριά από το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα των LDL (Olaisen et al. 1982, Brouwer et al. 1996)

Το γονίδιο της ApoE μεταγράφεται σε RNA μήκους 1,2 Kb, το οποίο στη συνέχεια μεταφράζεται σε πρωτεϊνική αλυσίδα των 317 αμινοξέων που είναι η πρόδρομη μορφή της ApoE. Στη συνέχεια, προτού η πρόδρομη ApoE εκκριθεί, υφίσταται μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως γλυκοζυλίωση, προσθήκη σιαλικού οξέως και αφαίρεση της αλληλουχίας σινιάλου μήκους 18 αμινοξέων (Brouwer et al. 1996). Έτσι προκύπτει τελικά μια πρωτεϊνική αλυσίδα των 299 αμινοξέων, η οποία έχει την ικανότητα να συνδέεται με τον υποδοχέα της LDL και της ApoE. Η συγκεκριμένη αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεϊνικής αλυσίδας με την οποία η ApoE συνδέεται με τον υποδοχέα, βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 130 και 150, σε περιοχή δηλαδή με αμινοξέα πλούσια σε λυσίνη και αργινίνη. Τα αμινοξέα 1-183 είναι απαραίτητα για τη μεγιστοποίηση της ικανότητας σύνδεσης της απολιποπρωτεΐνης E με τον υποδοχέα, ενώ τα αμινοξέα 216-299 στο καρβοξυτελικό άκρο είναι απαραίτητα για τη σύνδεση της απολιποπρωτεΐνης με τα λιπίδια (Mahley, 1988).

Το γονίδιο της ApoE εμφανίζει πολυμορφισμό. Υπάρχουν τρία κοινά αλληλόμορφα ε2, ε3, ε4 που κωδικοποιούν 3 κύριες ισομορφές της ApoE που ονομάζονται ApoE2, ApoE3, ApoE4 αντίστοιχα. Ο πιο κοινός φαινότυπος είναι ο ApoE3/3 και το πιο κοινό αλληλόμορφο το ε3. Τα αλληλόμορφα είναι ισοεπικρατή που σημαίνει ότι μέσω του συνδυασμού τους προκύπτουν 6 γονότυποι που αντιστοιχούν σε 6 φαινότυπους: E2/E2, E3/E3, E4/E4 (ομοζυγώτες) E2/E4, E2/E3, E3/E4 (ετεροζυγώτες). Οι συχνότητες εμφάνισης των διαφόρων αλληλόμορφων

διαφέρουν από λαό σε λαό. Για παράδειγμα η συχνότητα της ApoE αλληλόμορφων στην Ιαπωνία (βλ. πίνακα E3) είναι ε2: 4%, ε3: 86%, ε4: 9,3% ενώ στους Φιλανδούς είναι ε2: 6,2%, ε3: 69,5%, ε4: 24,4%.

Οι τρεις κύριες ισομορφές της ApoE διαφέρουν στο εχον 4 στις θέσεις 112 και 158 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας εκεί όπου καθορίζεται η μέγιστη δράση της σύνδεσης της ApoE με τον υποδοχέα. Συγκεκριμένα πιστεύεται πως η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία των αμινοξέων ιστιδίνης, αργινίνης και λυσίνης στην πρωτεϊνική αλυσίδα της ApoE στην περιοχή 140-160 είναι εκείνη που δημιουργεί τις κατάλληλες προϋποθέσεις για τη σύνδεση της ApoE με τον LDL υποδοχέα (Mahley, 1988). Η ApoE3 έχει το αμινοξύ κυστεΐνη στη θέση 112 και αργινίνη στη θέση 158. Η ApoE2 έχει κυστεΐνη στη θέση 112 και κυστεΐνη στη θέση 158. Η ApoE4 έχει αργινίνη και στις δύο θέσεις.(βλ εικόνα B3).Οι διαφορές που παρατηρούνται στις ισομορφές λόγω των αμινοξέων οφείλονται στις αντίστοιχες διαφορές στις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων. Ο κωδικός για τη κυστεΐνη είναι TGC και ο κωδικός για την αργινίνη είναι CGC (Brouwer et al. 1996).



2. Παθοφυσιολογία της ApoE.

Λόγω του πολυμορφισμού που παρατηρείται στο γονίδιο της ApoE οι διάφορες λιποπρωτείνες (εκείνες δηλαδή που περιέχουν ApoE) μεταβολίζονται με διαφορετικό τρόπο, όπως εξηγείται στη συνέχεια.

2.1. Επίδραση του πολυμορφισμού της ApoE στο μεταβολισμό των λιποπρωτείνων.

Οι τρεις ισομορφές της ApoE κατανέμονται στις κυκλοφορούσες λιποπρωτείνες. Λόγω των διαφορών τους που παρατηρούνται στη πεπτιδική αλυσίδα, έχουν διαφορετική ειδίκευση για τον υποδοχέα της LDL και της ApoE αντίστοιχα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχουν διαφορές στο ρυθμό απορρόφησης της χοληστερόλης της δίαιτας καθώς και στο ρυθμό μετατροπής των VLDL σε LDL (Brouwer et al.1996).

Συγκεκριμένα, συγκρίνοντας την ApoE3 με την ApoE2, η ApoE2 έχει 100 φορές μικρότερη αχιστεία για τον υποδοχέα της LDL. Η μειωμένη αυτή αχιστεία έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη απομάκρυνση (clearance) των υπολειμμάτων των χυλομικρών και της VLDL που περιέχουν ApoE2 από το ήπαρ, με αποτέλεσμα μειωμένη απορρόφηση της χοληστερόλης της δίαιτας (προερχόμενη από τα χυλομικρά) και της ενδογενούς χοληστερόλης.

Επιπλέον ο ρυθμός μετατροπής των VLDL υπολειμμάτων σε LDL που είναι εξαρτώμενος από την ApoE, είναι χαμηλότερος σε άτομα με ApoE2/E2 από ότι σε άτομα με ApoE3/E3 (Demant et al.1991).

Λαμβάνοντας υπόψη και το γεγονός ότι η έκφραση των υποδοχέων της LDL ρυθμίζεται από το περιεχόμενο των κυττάρων του ήπατος σε χοληστερόλη, η καθυστερημένη ηπατική πρόσληψη της χοληστερόλης της δίαιτας και της ενδογενούς χοληστερόλης, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των υποδοχέων της LDL στα ηπατικά κύτταρα (up-regulation). Συνεπώς άτομα με ApoE2/E2 χαρακτηρίζονται από υψηλότερα επίπεδα ApoE και υπολειμμάτων στο αίμα και από χαμηλότερα επίπεδα LDL σε σχέση με άτομα που είναι Apo E3/E3 (Brouwer et al.1996).

Αντίθετα, συγκρίνοντας την ApoE3 με την ApoE4, η ApoE4 έχει μεγαλύτερη αγχιστεία για τον υποδοχέα της LDL. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα υπολείμματα χυλομικρών και VLDL να προσλαμβάνονται γρηγορότερα από τα ηπατικά κύτταρα. Η γρήγορη απορρόφηση των υπολειμμάτων από το ήπαρ, η αυξημένη απορρόφηση της χοληστερόλης της δίαιτας σε άτομα με E4/E4 μειώνει την έκφραση των υποδοχέων της LDL. Συνεπώς άτομα με E4/E4 έχουν χαμηλά επίπεδα ApoE και υπολειμμάτων στο αίμα και υψηλά επίπεδα LDL (Brouwer et al. 1996).

2.2. Ο πολυμορφισμός της ApoE σχετίζεται με την αρτηριοσκλήρυνση και με άλλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις.

Έχει εκτιμηθεί ότι ο πολυμορφισμός της ApoE ευθύνεται από 7-16% για τη διακύμανση της τιμής της ολικής χοληστερόλης πλάσματος (Davignon et al. 1988, De Knijff & Havekes 1996). Μια και το αντικανονικό προφίλ των λιποπρωτεϊνών πλάσματος προδιαθέτει σε αρτηριοσκλήρυνση, είναι λογικό να συμπεραίνουμε πως ο πολυμορφισμός της ApoE που προκαλεί αλλαγές στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών αίματος να εμπλέκεται στην ανάπτυξη και παθοφυσιολογία των καρδιαγγειακών παθήσεων (Brouwer et al. 1996).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, άτομα με φαινότυπο E2/2 έχουν υψηλές συγκεντρώσεις τριγλυκεριδίων (λόγω καθυστερημένου μεταβολισμού των υπολειμμάτων των χυλομικρών και VLDL) ενώ άτομα με φαινότυπο E4/4 έχουν υψηλά επίπεδα LDL. Και οι δύο αυτοί φαινότυποι έχουν αυξημένη πιθανότητα να εμφανίσουν αρτηριοσκλήρυνση.

Σαν παράδειγμα, αναφέρεται η οικογενής δισβηταλιποπρωτεϊναιμία ή Νόσος του Fredrickson (FD). Η Νόσος FD χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση και διείσδυση στο αγγειακό ενδοθήλιο υπολειμμάτων χυλομικρών και VLDL με αποτέλεσμα την ανάπτυξη περιφερικής εγκεφαλικής και στεφανιαίας αρτηριοσκλήρυνσης (Davignon et al. 1988). Η καθυστερημένη μετατροπή των VLDL υπολειμμάτων σε LDL συμβάλλει στην αύξηση της χοληστερόλης πλάσματος και των τριγλυκεριδίων και στη μείωση αντίστοιχα της LDL. Πάνω από το 90% των ασθενών που πάσχουν από την νόσο Fredrickson είναι ομόζυγοι για το ε2 αλληλόμορφο. Παρ' όλα αυτά μόνο το 1-10% των ατόμων με E2/2 ασθενούν και αυτό γιατί η παρουσία

του ε2 αλληλομόρφου είναι απαραίτητη αλλά ανεπαρκής προϋπόθεση για την ανάπτυξη της νόσου (Davignon et al. 1988).

Από την άλλη, η εμφάνιση του ε4 αλληλόμορφου (λόγω αυξημένου ρυθμού πρόσληψης των υπολειμμάτων των χυλομικρών από τα ηπατικά κύτταρα) έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των LDL λιποπρωτεϊνών που σημαίνει ότι συμμετέχει και εκείνο στην εκδήλωση καρδιαγγειακών παθήσεων (Cumming & Robertson 1984). Αυτό εξάλλου επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι πληθυσμοί με υψηλή συχνότητα εμφάνισης του ε4 αλληλομόρφου έχουν και υψηλό ποσοστό θανάτων από καρδιαγγειακές παθήσεις όπως συμβαίνει π.χ. στο πληθυσμό των Φιλανδών (Ehnholm et al. 1988).

Το αλληλόμορφο ε4 πιστεύεται επομένως ότι μειώνει την επιβίωση και τη διάρκεια της ζωής, πιθανόν λόγω της επίδρασής του στα επίπεδα των LDL (Eggertsen et al. 1993).

Άλλες μελέτες συσχετίζουν την παρουσία του ε4 με τη νόσο του Alzheimer (Saunders et al. 1993). Επειδή η νόσος χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση β-αμυλοειδικών πλακών στα εγκεφαλικά αγγεία και επειδή η ApoE4 εμφανίζει υψηλή ειδίκευση και συγγένεια για το β-αμυλοειδές πεπτίδιο in vitro (Sanan et al. 1994) και in vivo πιστεύεται πως η ApoE4 συμμετέχει ενεργά στη παθοφυσιολογία της νόσου του Alzheimer (Brouwer et al. 1996). Επιπλέον το ε4 έχει συσχετισθεί με τη νόσο Creutzfeldt-Jakob (Amouyel et al. 1994).

Δεδομένου ότι ο πολυμορφισμός της ApoE συμμετέχει στην εκδήλωση των παραπάνω παθοφυσιολογικών καταστάσεων θα ήταν εύλογο να εύχεται κανείς η ταυτοποίηση του γονότυπου να γίνει υπόθεση ρουτίνας. Συνεπώς το άτομο θα γνωρίζει αν θα βρίσκεται σε αυξημένο κίνδυνο (λόγω γενετικής προδιάθεσης) και θα μπορεί να τροποποιεί τη δίαιτά του.

Γ. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η Απολιποπρωτεΐνη Ε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και θεωρείται ότι ο πολυμορφισμός της αποτελεί κύριο γενετικό παράγοντα που σχετίζεται με την εκδήλωση χρόνιων νοσημάτων, όπως τα καρδιαγγειακά και η νόσος του Alzheimer.

Για το λόγο αυτό, κρίθηκε ιδιαίτερα σημαντική η μελέτη του πολυμορφισμού της ApoE στον Ελληνικό πληθυσμό. Σκοπός λοιπόν της πτυχιακής αυτής μελέτης ήταν να προσδιοριστούν οι συχνότητες εμφάνισης των τριών κοινών αλληλόμορφων της Απολιποπρωτεΐνης Ε (ε2, ε3, ε4) στους Έλληνες και να γίνει σύγκριση με τις αντίστοιχες συχνότητες σε άλλους πληθυσμούς.

Δ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Το δείγμα

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε 242 υγιείς Έλληνες εθελοντές που κατοικούν στην Αθήνα. Το δείγμα συλλέχθηκε από δύο λύκεια της Αθήνας (n = 118) (από 1^ο και 2^ο ΤΕΛ Καλλιθέας), από το “Χαροκόπειο” Πανεπιστήμιο (n = 78), και από το νοσοκομείο “Αλεξάνδρα” (n = 22). Τα ηλικιακά χαρακτηριστικά του δείγματος φαίνονται στον πίνακα Δ1.

Πίνακας Δ1

	Ολικό δείγμα n = 242	Άνδρες n = 95	Γυναίκες n = 147
Μέσος όρος ηλικίας	24,65 (± 12,64)	27,87 (± 16,71)	22,57 (± 8,54)
Εύρος ηλικίας	14 - 68	15 – 68	14 – 61

Η ταυτοποίηση του πολυμορφισμού της ApoE έγινε για κάθε ένα από τα παραπάνω άτομα με ανάλυση του DNA που απομονώθηκε από δείγματα αίματος.

2. Συλλογή αίματος

Από κάθε εθελοντή συλλέχθηκαν 10 ml φλεβικού αίματος σε ειδικούς σωλήνες με αντιπηκτικό EDTA-K₃. Η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε τις πρωινές ώρες (8-10 π.μ) μετά από 12ωρη νηστεία. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους 4° C και ακολούθως σε διάστημα λιγότερο των 2 ωρών φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm X 10min σε κλινική φυγόκεντρο , προκειμένου να διαχωριστούν τα κύτταρα από τα πλάσμα. Δείγματα πλάσματος φυλλάχθηκαν σε σωληνάρια Eppendorf στους -80° C για μελλοντικές βιοχημικές αναλύσεις. Τα κύτταρα του αίματος παρέμειναν στους 4° C έως την απομόνωση του DNA.

3. Ταυτοποίηση του πολυμορφισμού της Απολιποπρωτεΐνης E.

3.1 Απομόνωση του DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε από τα λευκά κύτταρα του αίματος (που σχηματίζουν μία επιφανειακή στοιβάδα πάνω από τα ερυθροκύτταρα) σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Miller et al. Η όλη διαδικασία απομόνωσης διαρκεί 2 ημέρες.

1η ημέρα

Λευκά κύτταρα που αντιστοιχούν σε 10 ml ολικού αίματος μεταφέρθηκαν σε πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα Falcon των 50 ml. Στα κύτταρα προστέθηκε μέχρι τα 50 ml ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Erythrolysis Buffer : 150 mM NH_4Cl , 10mM KHCO_3 , 1mM EDTA, pH 7,4). Το αιώρημα των κυττάρων παρέμεινε στον πάγο για 20 min και αναδευόταν τακτικά προκειμένου να επέλθει λύση των ερυθροκυττάρων. Το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 2000 rpm X 10min και στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για 1-2 φορές έως ότου απομονωθούν πυρήνες (το ίζημα) που να ήταν κατά το δυνατόν απηλλαγμένοι από προσμίξεις ερυθρών αιμοσφαιρίων. Το ίζημα των πυρήνων αιωρήθηκε ακολούθως σε 3 ml διαλύματος λύσης των πυρήνων (Nucleus lysis Buffer : 10 mM Tris/ HCl, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA , pH 8,4). Στο εναιώρημα προστέθηκαν 50 μl πρωτεΐνάση K (20 mg/ dl) και 150 μl 20% SDS και τα δείγματα επωάστηκαν ολονύκτια σε υδατόλουτρο στους 56° C.

2η ημέρα

Τα δείγματα απομακρύνθηκαν από το υδατόλουτρο και μεταφέρθηκαν σε πλαστικό σωλήνα Falcon των 15ml. Σε κάθε δείγμα, προστέθηκε στη συνέχεια 1 ml NaCl 6 M και τα δείγματα αναδεύτηκαν βίαια για 15-20 sec. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 3000 rpm, επαναιωρήθηκαν με βίαιη ανάδευση για 15-20 sec και ξαναφυγοκεντρήθηκαν όπως και προηγουμένως προκειμένου να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες. Το καθαρό διαυγές υπερκείμενο κάθε δείγματος που περιέχει το DNA μεταφέρθηκε με γυάλινη πιπέτα Pasteur σε

καθαρό σωλήνα Falcon των 50 ml. Στη συνέχεια προστέθηκε 2,5 φορές ο όγκος του διαλύματος απόλυτη αιθανόλη. Το DNA που σκοινιάζει αμέσως μετά την προσθήκη της αιθανόλης "ψαρεύτηκε" με πιπέτα Pasteur. Το DNA ξεπλύθηκε αρκετές φορές με εμβάπτιση του σε διάλυμα 70% αιθανόλης και αφέθηκε να ξεραθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθώς αιωρήθηκε σε μικρό όγκο (300 – 500 μ l) διαλύματος TE (Tris/ HCl 10 mM, 0,1 mM EDTA, pH 7,4). Τα δείγματα του καθαρού DNA φυλάχθηκαν στους 4°C αφού προηγουμένος έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσής του DNA.

3.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA

Η συγκέντρωση του DNA στα άγνωστα δείγματα προσδιορίστηκε φωτομετρικά. Μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα (OD) στα 260 και στα 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε με βάση το γεγονός ότι 50 μ g/ml δίκλωνου DNA έχει $OD_{260} = 1$. Ο λόγος της OD_{260} / OD_{280} σε όλα τα δείγματα ήταν μεταξύ 1.8-1.95, γεγονός που αποδεικνύει ότι το DNA που απομονώθηκε ήταν μεγάλης καθαρότητας.

3.3 DNA ανάλυση

Η DNA ανάλυση κάθε δείγματος έγινε μετά από αντιγραφή τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί την ApoE με τη μέθοδο του PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) και ακόλουθη ανάλυση των θραυσμάτων που προκύπτουν μετά από πέψη του αντιγραφέντος προϊόντος με ενδονουκλεάση περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP analysis).

α) Μέθοδος του PCR

Προκειμένου να ταυτοποιηθεί ο πολυμορφισμός της ApoE έγινε αντιγραφή ενός τμήματος του γονιδίου της ApoE στο 4ο exon. Στο τμήμα αυτό εμπεριέχονται οι βάσεις που κωδικοποιούν για το 112° και το 158° αμινοξύ της ώριμης πρωτεϊνικής αλυσίδας της ApoE, τα οποία και αλλάζουν στις τρεις κοινές τις ισομορφές (βλ. εισαγωγή). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι 2 παρακάτω primers (Reymer et al. 1995).

Primers :ApoE Right : 5' – TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA – 3'

ApoE Left : 5' – ATAAATATAAAATATAAATAACAGAATTGCCCCGGCCTGGTACAC – 3'

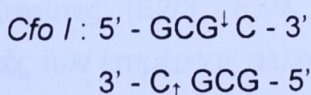
Με τη χρήση των 2 αυτών primer, αντιγράφεται τμήμα του γονιδίου μήκους 267 bp (βλ. εικόνα Δ2). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl σε ρυθμιστικό διάλυμα (PCR buffer : 20 mmol Tris/HCl pH 8,4, 50 mmol KCl, 2 mmol MgCl₂) που περιείχε 0,2 gr/L αλβουμίνη ορού (BSA), 200 μmol/L από κάθε ένα από τα dNTPs, 100 ml/L DMSO και ± 600 ngr καθαρού DNA. Το τελικό μείγμα επικαλύφθηκε με mineral oil. Η αντιγραφή του τμήματος του γονιδίου της ApoE έγινε σε θερμικό κυκλοποιητή (PTC – 100, MJ Research) μετά από προσθήκη 0,9 U Taq DNA πολυμεράσης σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο :

Αποδιάταξη	4 min στους 94° C	1 κύκλος
Αποδιάταξη	30 sec στους 94° C	→ 34 κύκλοι
Υβριδοποίηση	45 sec στους 62° C	
Πολυμερισμός	1 min στους 72° C	
Πολυμερισμός	4 min στους 72° C	1 κύκλος
Παραμονή	4° C	

Το προϊόν αντιγραφής ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε 1,5% αγαρόζη.

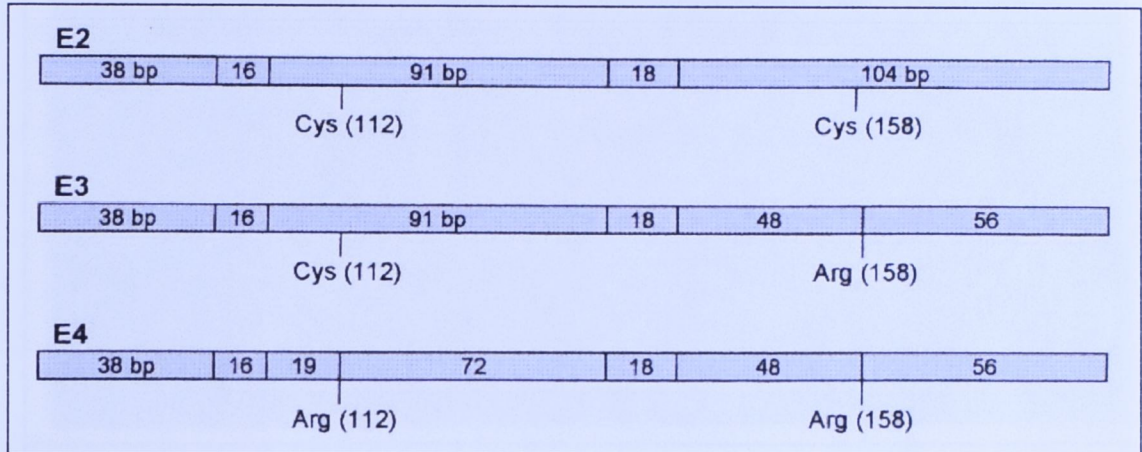
β) RFLP analysis

Μετά τη διαδικασία PCR τα δείγματα υπέστησαν πέψη με την ενδονουκλεάση *Cfo* I. Το ένζυμο αυτό κόβει το δίκλωνο DNA σε σημεία όπου υπάρχει η ακολουθία βάσεων GCGC κατά το ακόλουθο σχήμα :



Η πέψη πραγματοποιήθηκε στους 37°C για τουλάχιστον 3 ώρες μετά από ανάμιξη του προϊόντος του PCR (25 μ l) με 10 μ l διαλύματος πέψης που περιείχει 4 U *Cfo*I.

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα σημεία πέψης του ενζύμου στο προϊόν του PCR (μήκους 267 bp) και τα θραύσματα που προκύπτουν από την πέψη αυτή.

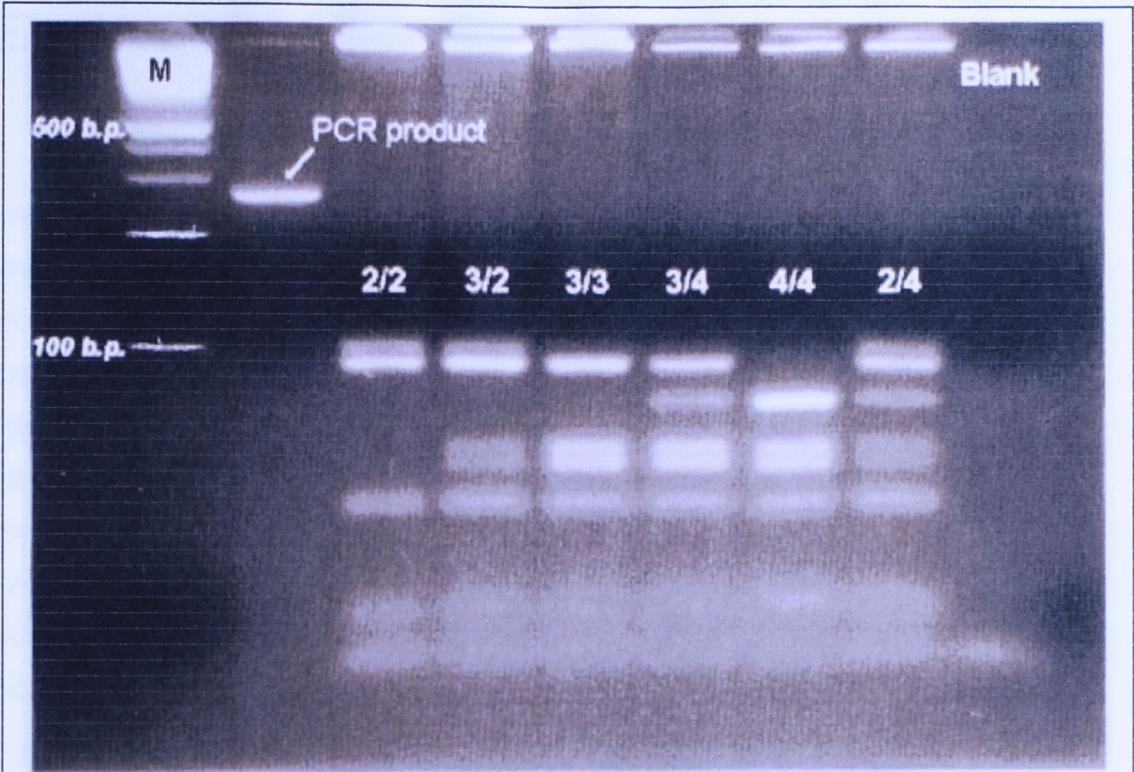


Στην συνέχεια έγινε διαχωρισμός των θραυσμάτων κάθε δείγματος, αφού προστέθηκε loading buffer (βλ. παράρτημα Α') με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 5% αгарόζης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου σε TBE buffer (90 mmol/L Tris – boric acid, 2 mmol/L EDTA pH 8) για 1,5 ώρα στα 110 Volt. Η ανάγνωση των διαφόρων ζωνών DNA στο πήκτωμα της αгарόζης έγινε κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία, αφού προηγουμένως το gel βάφτηκε με βρωμιούχο αιθίδιο.

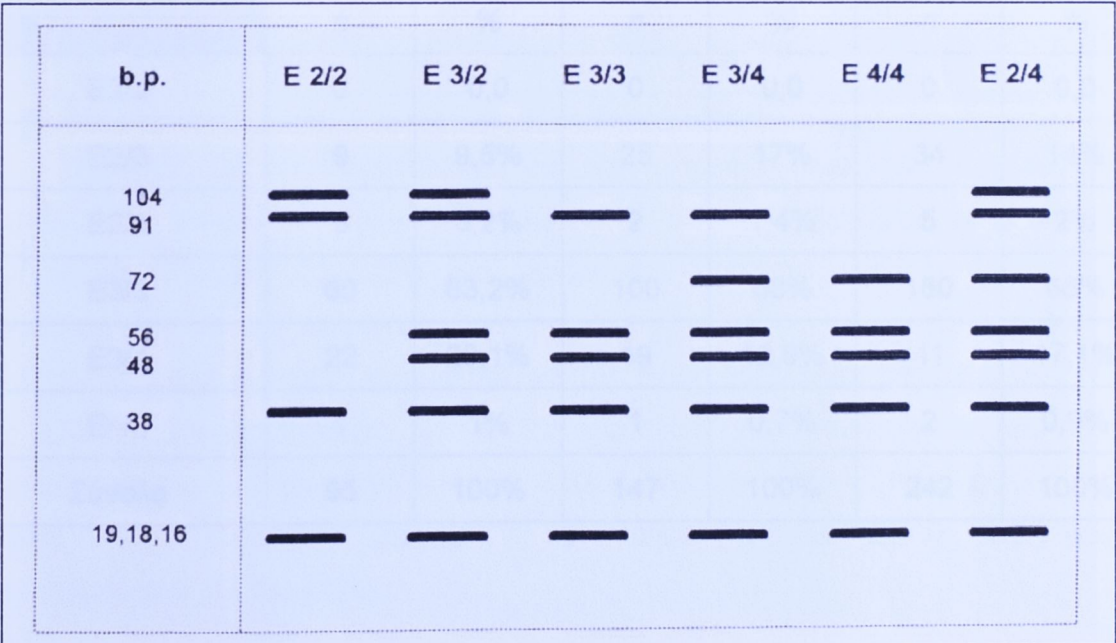
Όπως φαίνεται από την παρακάτω εικόνα, συγκριτικά με τους E3/3 ομοζυγώτες οι E2/2 ομοζυγώτες χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση μιας ζώνης μήκους 104b.p. και από την απουσία ζωνών 56b.p. και 48b.p. (βλ. εικόνα Δ2 και Δ3).

Αντίθετα, χαρακτηριστική των E4/4 ομοζυγωτών είναι η παρουσία μιας ζώνης μήκους 72b.p. και η απουσία των ζωνών 104b.p. και 91b.p. Είναι προφανές ότι στους ετεροζυγώτες [E2/3, E3/4, E2/4] εμφανίζονται οι ζωνώσεις που είναι χαρακτηριστικές των επιμέρους αλληλόμορφων (βλ. εικόνα Δ3).

Στην εικόνα Δ2 απεικονίζονται τα χαρακτηριστικά ηλεκτροφορητικά προφίλ των έξι διαφορετικών γονότυπων της AroE. Τα προφίλ αυτά παρουσιάζονται διαγραμματικά στην εικόνα Δ3.



Εικόνα Δ2: Ηλεκτροφορητικό προφίλ των έξι γονότυπων της ApoE. Στην εικόνα φαίνεται επίσης το προϊόν του PCR συνολικού μήκους 267 b.p. M=Marker (100 bp DNA),B=Blank.



Εικόνα Δ3: Διαγραμματική απεικόνιση των ηλεκτοφορητικών προφίλ των έξι διαφορετικών γονότυπων της ApoE.

E. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον πίνακα Δ1 παρουσιάζεται η κατανομή των 6 διαφορετικών γονότυπων της ΑροΕ στους Έλληνες εθελοντές της παρούσας μελέτης. Όλοι οι γονότυποι εμφανίζονται στον πληθυσμό εκτός του E2/2. Στο σύνολο των ατόμων (n = 242) οι ομοζυγώτες ως προς το 3 αλληλόμορφο (γονότυπος E3/3) εμφανίζονται με τη μεγαλύτερη συχνότητα (66%). Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στη συχνότητα εμφάνισης του γονότυπου αυτού μεταξύ ανδρών και γυναικών (Πίνακας E1). Στο σύνολο των ατόμων οι ετεροζυγώτες με γονότυπο E3/4 και E2/4 εμφανίζονται με συχνότητες 17,1% και 14% αντίστοιχα. Μόνο δύο άτομα βρέθηκαν να είναι ομοζυγώτες ως προς το 4 αλληλόμορφο (0,9%) , ενώ σε πολύ μικρό ποσοστό (2%) εμφανίζονται και οι ετεροζυγώτες E2/4.

ΠΙΝΑΚΑΣ E1 : Κατανομή των γονοτύπων της ΑροΕ στον Ελληνικό πληθυσμό

Γονότυπος	Άνδρες		Γυναίκες		Σύνολο ατόμων	
	n	%	n	%	n	%
E2/2	0	0,0	0	0,0	0	0,0
E2/3	9	9,5%	25	17%	34	14%
E2/4	3	3,2%	2	1,4%	5	2%
E3/3	60	63,2%	100	68%	160	66%
E3/4	22	23,1%	19	12,9%	41	17,1%
E4/4	1	1%	1	0,7%	2	0,9%
Σύνολο	95	100%	147	100%	242	100%

Οι συχνότητες των αλληλόμορφων της ΑροΕ στο δείγμα μας παρουσιάζεται στον Πίνακα Ε2. Όπως φαίνεται από τον Πίνακα αυτό , στον Ελληνικό πληθυσμό το ε3 αλληλόμορφο εμφανίζεται με τη μεγαλύτερη συχνότητα (81,62%). Ακολουθεί το αλληλόμορφο ε4 με συχνότητα 10,33%, ενώ με τη μικρότερη συχνότητα εμφανίζεται το ε2 αλληλόμορφο (8,05%). Η συχνότητα εμφάνισης των 3 αλληλόμορφων όπως προσδιορίζεται από τη μελέτη αυτή βρίσκεται σε ισορροπία Hardy – Weinberg (βλ. παράρτημα Β’).

ΠΙΝΑΚΑΣ Ε2 : Συχνότητες εμφάνισης των αλληλόμορφων της ΑροΕ στον Ελληνικό πληθυσμό

Αλληλόμορφο	Ανδρες		Γυναίκες		Σύνολο ατόμων	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
ε2	12	6,3%	27	9,2%	39	8,05%
ε3	151	79,5%	244	83%	395	81,62%
ε4	27	14,2%	23	7,8%	50	10,33%
Σύνολο	190	100%	294	100%	484	100%

Αντίθετα με ότι παρατηρείται για την κατανομή των Ε3/3 ομοζυγωτών, καθώς και τη συχνότητα των ε3 αλληλόμορφου που δεν διαφέρει ανάμεσα στα δύο φύλα (Πίνακας Ε1 & Ε2) ένα μεγαλύτερο ποσοστό ανδρών βρέθηκε να είναι φορείς του ε4 αλληλόμορφου σε σύγκριση με το γυναικείο πληθυσμό, ενώ το αντίθετο ακριβώς παρατηρήθηκε ως προς τη συχνότητα εμφάνισης του ε2 αλληλόμορφου (πίνακας Ε1 & Ε2). Ωστόσο, η ανισοκατανομή αυτή θα πρέπει μάλλον να θεωρηθεί τυχαία, καθώς και σε άλλους πληθυσμούς που έχουν μέχρι σήμερα μελετηθεί δεν αναφέρεται συσχέτιση των ΑροΕ αλληλόμορφων και του φύλου.

Στον πίνακα Ε3 παρουσιάζονται οι συχνότητες εμφάνισης των 3 κοινών αλληλόμορφων της ApoE σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες, ή διαφορετικές εθνικότητες που έχουν μελετηθεί παγκοσμίως, προκειμένου να συγκριθούν με τη συχνότητα εμφάνισης των αλληλόμορφων αυτών στον Ελληνικό πληθυσμό. Στον Πίνακα αυτό, οι διάφορες πληθυσμιακές ομάδες κατατάσσονται ξεκινώντας από αυτή με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης του ε4 αλληλόμορφου (40,7% στους Πυγμαίους) και καταλήγοντας με τον πληθυσμό της Σαρδηνίας που μέχρι στιγμής αναφέρεται ότι έχει το μικρότερο ποσοστό εμφάνισης του ε4 αλληλόμορφο (5,2%). Η κατάταξη αυτή έγινε σκόπιμα επειδή το ε4 αλληλόμορφο έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα, τη νόσο του Alzheimer και γενικά με αυξημένη θνησιμότητα (βλ. εισαγωγή).

**ΠΙΝΑΚΑΣ Ε3 : Συχνότητες αλληλόμορφων της ΑροΕ σε διαφορετικές
πληθυσμιακές ομάδες και εθνικότητες**

Πληθυσμός προς μελέτη	E ₂ %	E ₃ %	E ₄ %	Αναφορά
Πυγμαίοι	5,7	53,6	40,7	Zekraoui et al .1997
Khoi San	7,7	55,3	37,0	Sandholzer et al .1995
Ιθαγενείς Νέας Γουϊνέας	14,6	48,6	36,8	Kamboh et al .1990
Νιγηριανοί	2,7	67,2	29,6	Sepehrnia et al .1988
Σουδανοί	8,1	61,9	29,1	Hallman et al .1997
Ινδιάνοι (Εκουαδόρ)	--	72	28	Scacchi et al .1997
Αφροαμερικανοί	3,4	70,6	26	Kamboh et al .1989
Τανζανοί	14	61	25	Sayi et al .1997
Φιλανδοί	6,2	69,5	24,4	Hallman et al .1991
Γροιλανδοί	--	77	23	Gerdes et al .1996
Σουηδοί	7,8	71,9	20,3	Eggertsen et al .1993
Αλάσκα (Ιθαγενείς)	2	78,7	19,3	Scheer et al .1995
Αμερινδιανοί	--	81,6	18,4	Asakawa et al .1985
Πληθυσμοί Σαχάρας	11,6	70,6	17,8	Zekraoui et al .1997
Ολλανδοί	8,2	75,1	16,8	Klasen et al .1987
Δανοί	8,5	74,1	17,4	Gerdes et al .1992
Ισλανδοί	6,8	76,8	16,5	Hallmann et al .1991
Εσθονοί	8,4	75,3	16,3	Lehtimäki et al .1998
Νεοζηλανδοί	12	72	16	Wardell et al .1982
Καναδοί	7,8	77	15,2	Davignon et al .1984
Γερμανοί	7,7	77,3	15	Utermann et al .1984
Σκοτσέζοι	8,3	77	14,5	Cumming et al .1984
Αμερικανοί	7,5	78,6	13,5	Ordovas et al .1987
Ουγγαρέζοι	6,4	80,7	12,9	Hallmann et al .1991
Ισπανοί	4,2	83,1	12,7	Gerdes et al .1992
Γάλλοι	7,9	80,1	12	Bailleul et al .1993
Αυστριακοί	9	78,9	11,7	Hallmann et al .1991
Νορβηγοί	9	79,5	11,5	Pedersen & Berg 1991
Ινδοί (Ν. Αφρική)	1,2	87,6	11,3	Gounden et al.1995
Ελβετοί	7,2	82,1	10,7	Gerdes et al .1992
Πολωνοί	5,5	83,9	10,6	Kowalska et al .1998
Σιγκαπουριανοί	12,2	78,2	9,6	Utermann G 1997
Ιταλοί	7,3	83,3	9,4	James et al .1993
Γιαπωνέζοι	4	86	9,3	Matsunaga et al .1995
Μάγια (Μεξικό)	--	91,1	8,9	Kamboh et al 1991
Κινέζοι	9,7	82,9	7,4	Hallmann et al .1991
Κύπριοι	5,4	87,6	7,0	Cariolou et al .1995
Τούρκοι (Γερμανίας)	4,8	88,5	6,7	Malle et al .1996
Σαρδηνοί	5	89,8	5,2	Corbo et al .1995
Έλληνες	8,05	81,62	10,33	Παρούσα μελέτη 1999

ΣΤ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη μελέτη αυτή έγινε ταυτοποίηση του πολυμορφισμού της Απολιποπρωτεΐνης Ε σε 242 Έλληνες εθελοντές με σκοπό να προσδιοριστεί η συχνότητα εμφάνισης των 3 κοινών αλληλομόρφων της ApoE (ε2, ε3, ε4) στον Ελληνικό πληθυσμό. Τα άτομα που συμμετείχαν στην μελέτη αυτή ήταν στην πλειοψηφία τους νεαροί άνδρες και γυναίκες που φοιτούσαν σε δύο Λύκεια της Αθήνας καθώς και στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Ένα μικρό ποσοστό του δείγματος αφορούσε υγιή άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Η μέση ηλικία του συνόλου των ατόμων ήταν 24,65 (SD±12,64).

Επειδή το αλληλόμορφο ε4 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο από καρδιαγγειακά (Cumming & Robertson 1984, De Knijff & Havekes 1996) με τη νόσο του Alzheimer (Saunders et al. 1993) και με αυξημένη θνησιμότητα (Stengard et al. 1995), στη συγκεκριμένη μελέτη αποκλείεται η πιθανότητα εσφαλμένης εκτίμησης του αλληλομόρφου αυτού, κάτι που θα υπήρχε κίνδυνος να συμβεί εάν ο μέσος όρος ηλικίας των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη ήταν πολύ μεγαλύτερος. Επομένως, παρότι το δείγμα μας δεν είναι αρκετά μεγάλο, ή αντιπροσωπευτικό σε εθνικό επίπεδο, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι επιτρέπει μια καλή εκτίμηση της εμφάνισης των αλληλομόρφων της ApoE στον Ελληνικό πληθυσμό.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η συχνότητα εμφάνισης των apoE αλληλομόρφων στον Ελληνικό πληθυσμό είναι : ε2 = 8,05%, ε3 = 81,62%, και ε4 = 10,33%. Η γονιδιακή συχνότητα των 3 αλληλομόρφων στον Ελληνικό πληθυσμό βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg.

Ο πολυμορφισμός της ApoE έχει εξετασθεί σε πάρα πολλούς διαφορετικούς πληθυσμούς και εθνικότητες (Davignon et al .1988, Hallmann et al .1991, Gerdes et al. 1992). Το ε3 αλληλόμορφο είναι το πιο κοινό αλληλόμορφο σε όλους τους πληθυσμούς που έχουν εξεταστεί μέχρι τώρα. Σημαντικές διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης των 3 κοινών αλληλομόρφων έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των Καυκάσιων, της κίτρινης και μαύρης φυλής (βλ. Πίνακα Ε3).

Για παράδειγμα, οι ιθαγενείς της Αλάσκας, οι Νιγηριανοί και οι Ιαπωνέζοι έχουν τη μικρότερη συχνότητα εμφάνισης του ε2 αλληλομόρφου (βλ. Πίνακα Ε3) ενώ οι Κινέζοι έχουν από τα χαμηλότερα ποσοστά εμφάνισης του ε4 αλληλομόρφου.

Και μεταξύ των Καυκάσιων έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισης των ApoE αλληλομόρφων (βλ. Πίνακα E3). Η μέση συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων αυτών στον πληθυσμό των Καυκάσιων έχει υπολογιστεί ότι είναι: $\epsilon_2 = 8\%$, $\epsilon_3 = 76.9\%$, $\epsilon_4 = 15\%$ (Davignon et al .1988).

Συγκρίνοντας τις συχνότητες αυτές με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης βλέπουμε ότι η συχνότητα εμφάνισης του ϵ_2 αλληλομόρφου στους Έλληνες ($\epsilon_2:8.05\%$) είναι όμοια με τη μέση συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου αυτού στους Καυκάσιους ενώ η συχνότητα του ϵ_4 αλληλομόρφου είναι αρκετά χαμηλότερη ($\epsilon_4:10,33\%$). Σε μια πρόσφατη μελέτη σχετικά με τον πολυμορφισμό της ApoE στον Ελληνικό πληθυσμό εκτιμάται ότι οι Έλληνες έχουν τη μικρότερη συχνότητα εμφάνισης του ϵ_4 αλληλομόρφου διεθνώς (6,5%) (Sklavounou et al .1997). Από τη δικιά μας μελέτη, παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης του αλληλομόρφου αυτού (10,33%) που ωστόσο είναι από τα χαμηλότερα που αναφέρονται για τους Καυκάσιους. Αξίζει πάντως να σημειωθεί ότι στο δείγμα μας λιγότερο από 1% των ατόμων ήταν ομοζυγώτες ως προς το ϵ_4 αλληλομόρφο (2 άτομα).

Το ποσοστό του ϵ_4 αλληλομόρφου που βρίσκουμε για τον Ελληνικό πληθυσμό είναι παρόμοιο μ' εκείνο που έχει βρεθεί για τους άλλους λαούς της Νότιας Ευρώπης όπως οι Ιταλοί (9,4%), οι Ισπανοί (12,7%) και οι Γάλλοι (12%) (βλ. Πίνακα E3). Η χαμηλή συχνότητα εμφάνισης του ϵ_4 αλληλομόρφου στον Ελληνικό πληθυσμό βρίσκεται σε συμφωνία με την ολοένα και χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης του γονιδίου αυτού καθώς πηγαίνουμε από το βορρά προς το νότο στους λαούς της Ευρώπης (Tiret et al. 1994). Συγκεκριμένα, η συχνότητα εμφάνισης του ϵ_4 αλληλομόρφου μειώνεται από 24,4-20,3% στους Σκανδιναβούς, σε 17,4% στους Δανούς, 15% στους Γερμανούς, 12,7% στους Ισπανούς και 5,2% στους Σαρδήνιους, οι οποίοι διεκδικούν μέχρι στιγμής τη χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης του ϵ_4 αλληλομόρφου παγκοσμίως.

Η σταδιακή αυτή μείωση της συχνότητας του ϵ_4 αλληλομόρφου συμβαδίζει με τη σταδιακή μείωση της θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα που παρατηρείται καθώς πηγαίνουμε από το βορρά προς το νότο της Ευρώπης (το υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας από καρδιαγγειακά το έχουν οι Φιλανδοί ενώ το μικρότερο οι Νοτιοευρωπαίοι)(Tiret et al. 1994). Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη ότι το αλληλομόρφο ϵ_4 σχετίζεται με αυξανόμενο κίνδυνο για εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η χαμηλή συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου

αυτού στον Ελληνικό πληθυσμό εξηγεί και τη χαμηλή συχνότητα θανάτων από καρδιαγγειακά σε σχέση με άλλους λαούς, όπως π.χ. οι Φιλανδοί.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η συχνότητα εμφάνισης των ΑροΕ αλληλομόρφων διαφέρει σημαντικά στους διάφορους πληθυσμούς. Ωστόσο, μετά από μια προσεκτική ματιά στον Πίνακα Ε3 διαπιστώνει κανείς ότι λαοί με τελείως διαφορετική γενετική καταγωγή έχουν παρόμοια ποσοστά εμφάνισης των ΑροΕ αλληλομόρφων. Για παράδειγμα οι Ινδοί, ανεξάρτητα από την ασιατική τους καταγωγή έχουν το ίδιο ποσοστό εμφάνισης του ε4 αλληλομόρφου (11.3%) σε σχέση με τους Νορβηγούς (11,5%) και τους Αυστριακούς (11,7%). Από την άλλη, παρατηρώντας τους Σιγκαπουριανούς, τους Ιάπωνες και τους Κινέζους διαπιστώνει κανείς πως έχουν παρόμοιο ποσοστό του αλληλόμορφου ε4, (9,6% ,9,3% και 7,4% αντίστοιχα) γεγονός που υποδηλώνει την κοινή γενετική τους καταγωγή. Η κοινή αυτή ομάδα έχει ένα από τα χαμηλότερα ποσοστά του ε4 αλληλομόρφου σε σχέση με άλλους πληθυσμούς και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τους Καυκάσιους Ευρωπαίους και από τη μαύρη φυλή (Matsunaga et al .1995).

Η μαύρη φυλή εμφανίζει διαφορετικές συχνότητες των τριών αλληλομόρφων συγκριτικά με τους άλλους λαούς. Χαρακτηρίζεται από τη σχετικά χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης του ε3 αλληλόμορφου (66-70%) και από υψηλή συχνότητα του ε4 αλληλομόρφου (Kamboh et al.1989). Από μελέτες που έχουν γίνει σε πληθυσμούς μαύρων διαφορετικής εθνικότητας διαπιστώνεται ότι αυτοί εμφανίζουν παρόμοια συχνότητα του ε4 αλληλομόρφου. Οι Νιγηριανοί έχουν ποσοστό 29,5%, οι Σουδανοί 29,1%, οι Τανζανοί 25% και οι Αφροαμερικανοί (μαύροι της Αμερικής) 26%. Το γεγονός ότι οι Αφροαμερικανοί έχουν σχεδόν παρόμοιο ποσοστό του ε4 αλληλομόρφου με εκείνο των υπόλοιπων δεν θα πρέπει να μας ξαφνιάζει μια και είναι απόγονοι σκλάβων που μεταφέρθηκαν από την Αφρική προς την Αμερική όταν οι Ευρωπαίοι κατακτητές αποικιοκρατούσαν την Αμερικάνικη Ήπειρο (σημειώνεται εδώ ότι η συχνότητα του αλληλομόρφου ε4 στους Αμερικανούς λευκούς δεν έχει μεγάλες διακυμάνσεις από εκείνη των Ευρωπαίων και αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι ο λαός της Αμερικανικής Ηπείρου προήλθε από τον αποικισμό των Ευρωπαϊκών λαών).

Οι Αφροαμερικανοί και οι Νιγηριανοί εμφανίζουν υψηλό ποσοστό ομοζυγωτίας ως προς το ε4 αλληλόμορφο (8 και 11% αντίστοιχα) σε σχέση με άλλους λαούς της Αμερικής, της Ασίας και της Ευρώπης (Kamboh et al .1989). Θα έπρεπε επομένως οι δύο αυτές πληθυσμιακές ομάδες να είχαν ίδιο ποσοστό θνησιμότητας από

καρδιαγγειακές παθήσεις. Ωστόσο, επειδή οι Αφροαμερικανοί προσαρμόστηκαν στο κοινωνικο-οικονομικό περιβάλλον των λευκών που χαρακτηρίζεται από πλουσιοπάροχη διάθεση τροφής και λιπαρών, εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά καρδιαγγειακών παθήσεων σε ολόκληρο τον κόσμο. Αντίθετα παρόλο που οι Νιγηριανοί εμφανίζουν ακόμη μεγαλύτερο ποσοστό ομοζυγωτίας ως προς το ε4 αλληλόμορφο, το κοινωνικο-οικονομικό περιβάλλον της φτώχειας και της ασυνεχούς παροχής τροφής φαίνεται να τους προστατεύει από τη θνησιμότητα των καρδιοπαθειών (Kamboh et al. 1989).

Από την άποψη αυτή προκειμένου να διευκρινιστεί η σχέση του πολυμορφισμού της ApoE και της συχνότητας καρδιαγγειακών νοσημάτων στον Ελληνικό πληθυσμό θα ήταν σκόπιμο να εξεταστεί η σχέση του πολυμορφισμού της ApoE και με άλλους παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση των ασθενειών αυτών, όπως τα λιπίδια του πλάσματος, των οποίων τα επίπεδα επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τον πολυμορφισμό της ApoE (Cumming & Robertson 1984). Επίσης είναι ενδιαφέρον να μελετηθούν η διαιτητική πρόσληψη και οι διατροφικές συνήθειες των Ελλήνων καθώς οι σύγχρονες μελέτες δείχνουν ότι ο πολυμορφισμός της ApoE επηρεάζει τη σχέση δίαιτας και λιπιδαιμικού προφίλ του ατόμου (Ordovas 1999).

Μελετώντας την ιστορία των γονιδίων, πολλές μελέτες συγκλίνουν στην άποψη ότι τα ε2 και ε4 αλληλόμορφα προήλθαν από σημειακές μεταλλάξεις του αρχέγονου ε3 αλληλόμορφου. Πρόσφατα όμως, μια έρευνα που αφορούσε την εύρεση του πολυμορφισμού της ApoE σε μη ανθρώπινα πρωτεύοντα, παρουσιάζει ότι το ε4 και όχι το ε3 είναι το αρχέγονο αλληλόμορφο (Hanlon & Rubinstein 1995). Πιστεύεται τώρα ότι το ε3 προήλθε από μια σημειακή μετάλλαξη στο exon 4 του ε4 αλληλόμορφου (στη θέση 112:CGC→TGC) και ότι το ε2 προήλθε από μια επιπλέον μετάλλαξη του ε4 στη θέση 158(CGC→TGC) (Hanlon & Rubinstein 1995). Οι μεταλλάξεις αυτές επήλθαν με το πέρασμα του χρόνου και κάτω από την πίεση της φυσικής επιλογής.

Το γεγονός ότι το ε3 αλληλόμορφο εμφανίζεται με τη μεγαλύτερη συχνότητα σε όλους τους πληθυσμούς φανερώνει ότι το αλληλόμορφο αυτό επικράτησε έναντι των άλλων κάτω από την πίεση των κοινωνικο-οικονομικών συνθηκών που επικράτησαν με το πέρασμα του χρόνου, και πιθανώς του κλίματος. Αντίθετα, οι άνθρωποι στο μακρινό παρελθόν ήταν κυνηγοί-συλλέκτες ή ακολουθούσαν νομαδική ζωή, οπότε η διαθεσιμότητα της τροφής ήταν ασταθής σε θρεπτικά συστατικά και περιορισμένη σε ποσότητα. Τότε ίσως ευνοήθηκε η επικράτηση του ε4

αλληλομόρφου μια και δεν υπήρχε κανένας κίνδυνος για την επιβίωση του ανθρώπινου είδους από καρδιαγγειακά. Όταν όμως με το πέρασμα του χρόνου ιδρύθηκαν οι πρώτες κοινωνίες και ο άνθρωπος ξεκίνησε την καλλιέργεια του εδάφους και την εκτροφή γαλακτοφόρων ζώων, οπότε και αυξήθηκε η διαθεσιμότητα της τροφής, τότε η φυσική επιλογή διαδραμάτισε έναν σπουδαίο ρόλο, με σκοπό την επιβίωση του ανθρώπινου είδους, επιβάλλοντας την επικράτηση του πιο «ακίνδυνου» ε3 αλληλομόρφου (Gerdes et al. 1992, Cavalli-Sforza et al. 1994). Γι' αυτό και σε φυλές όπως εκείνη των Πυγμαίων, των Khoi San της Νοτίου Αφρικής και των ιθαγενών της Νέας Γουινέας, όπου η διαθεσιμότητα της τροφής είναι ασταθής, τα ποσοστά εμφάνισης του ε4 είναι μέχρι στιγμής τα μεγαλύτερα σε όλο τον κόσμο (40,7%, 37%, 36,8% αντίστοιχα). (βλ Πίνακα Ε3).

Παρατηρώντας λοιπόν και φυλές που έχουν το ίδιο γενετικό υπόβαθρο, αλλά ζουν σε διαφορετικό περιβάλλον, δίδεται η ευκαιρία να μελετηθεί ο ρόλος του πολυμορφισμού της ApoE και να ξεκαθαριστεί κατά πόσο αυτός επηρεάζει το προφίλ των λιπιδίων στους συγκεκριμένους λαούς, ώστε να καθοριστούν με ακρίβεια συγκεκριμένες διαιτητικές παρεμβάσεις στα άτομα-φορείς των επιμέρους αλληλομόρφων. Στο άμεσο μέλλον πιθανόν η ταυτοποίηση του γονότυπου της Απολιποπρωτεΐνης Ε στο κάθε άτομο να αποτελέσει υπόθεση ρουτίνας. Το άτομο θα γνωρίζει αν θα βρίσκεται σε αυξημένο κίνδυνο από παθολογικές διαταραχές, και θα τροποποιεί με τη βοήθεια του κλινικού διαιτολόγου τη δίαιτά του, προκειμένου να έχει ένα μεγαλύτερο διάστημα επιβίωσης, να προλάβει τυχόν παθολογικές ασθένειες και να έχει μια καλύτερη ποιότητα ζωής.

Z. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amouyel, P., Vidal, O., Launay, J., Laplanche, J.L. (1994): The apolipoprotein E alleles as major susceptibility factors for Creutzfeldt-Jakob disease. Lancet 344: 1315-1318.
- Asakawa, J., Takahashi, N., Rosenblum, B.B., Neel, J.V. (1985): Two dimensional gel studies of genetic variation in the plasma proteins of Amerindians and Japanese. Hum. Genet. 50: 222-230
- Bailleul, S., Couderc, R., Landais, V., Lefèvre, G., Raichvarg, D., Etienne, J., (1993): Direct phenotyping of human apolipoprotein E in plasma : application to population frequency distribution in Paris (France). Hum. Hered. 43 : 159-165
- Brouwer, D.A. Janneke, Jasper J. van Doormal, Frits, A.J. Muskiet (1996): Clinical chemistry of common apolipoprotein E isoforms. J of Chrom. B. 678 : 23-41
- Cariolou, M.A., Kakkofitou, A., Manoli, P., Christou, S., Karagrigoriou, A., Middleton, L. (1995): Underexpression of the apolipoprotein E2 and E4 alleles in the Greek Cypriot population of Cyprus. Genet. Epidemiol 12 : 489-497.
- Cavalli-Sforza L.L., Menozzi, P., Piazza, A. (1994) : The history and geography of human genes. Princeton University Press, Princeton NJ.
- Champe P.C-Harvey, R.A. Βιοχημεία. Εκδόσεις Παρισιάνος. Εκδοση ελληνική 1η. Σελίδα : 215.
- Corbo, R.M., Scacchi R., Mureddu L., Mulas G. and Alfano G. (1995): Apolipoprotein E polymorphism in Italy investigated in native plasma by a simple polyacrylamide gel isoelectric focusing technique. Comparison with frequency data of other European populations. Ann Hum. Genet 59 : 197-209
- Cumming, AM Robertson, F.W. (1984) : Polymorphism at the apoprotein E locus in relation to risk of coronary disease Clin Genet: 25 : 310-313.

- Davignon, J., Sing C.G., Lussier-Cacan, S., Bouthillier, D. (1984): Xanthelasma, latent dyslipoproteinemia and atherosclerosis contribution of apoE polymorphism in De Gennes et al Latent Dyslipoproteinemias and atherosclerosis pp 213-223, Raven Press, New York.
- Davignon, J., Gregg RE, Sing CF. (1988): Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. Arteriosclerosis 8 : 1-21.
- De Knijff P, Havekes L.M :(1996) :Apolipoprotein E as a risk factor for coronary heart disease:a genetic and molecular biology approach.Curr. Opin.in Lipidol. 7:59-63.
- Demant T., Bedford, D., Packard C.J., Shepherd (1991):Influence of Apolipoprotein E polymorphism on Apolipoprotein B100 metabolism in normolipemic subjects J. Clin Invest. 8: 1490-1501.
- Eggertsen, Cösta, Regnar Tegelman, Sverker Ericsson, Bo Angelin and Lars Berglund. (1993): Apolipoprotein E Polymorphism in a Healthy Swedish population : Variation of Allele Frequency with Age and Relation to serum Lipid Concentrations. Clin. Chem. 39/10 : 2125-2129.
- Ehnholm C., Lukka M., Kuusi Timo, Nikkila, Utermann (1986): Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population : gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations.J Lipid Res: 27: 227-235.
- Gerdes, LU, Klausen, IC, Sihm, I., Faergeman, O., (1992): Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. Genet Epidemiol 9 : 155-167.
- Gerdes, Christian Gerdes, Peter Steen Hansen, Lb Cristian Klausen, Ole Faergeman, Jørn Dyerberg. (1996): The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective. Hum Genet 98 : 546-550.
- Gounden, N., Naidoo, J., Pegoraro, R.J., Berger, G.M. (1995): Apolipoprotein E allele frequencies in a South African Indian female population. Clin. Genet 48 (5) : 243-245.
- Hallman, D.M., Boerwinkle, E., Saha, N., Sandholzer, C., Menzel, H.J., Csasar, A., Utermann, G., (1991): The apolipoprotein E polymorphism : a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. Am J.Hum Genet 49 : 338-349.

- Hanlon, C.S., Rubinsztein, D.C., (1995): Arginine residues at codon 112 and 158 in the apolipoprotein E gene correspond to the ancestral state in humans. Atherosclerosis 112 : 85-90.
- James, R.W., Boemi, M.G., Giansanti, R., Fumelli, P., Pometta, D. (1993): Underexpression of the apolipoprotein E4 isoform in an Italian population. Arterioscler Thromb 13 : 1456-1459.
- Kamboh, M.I., B. Sepehrnia and R.E. Fernel (1989): Genetic Studies of human apolipoproteins VI. Common polymorphism of apolipoprotein E in blacks. Disease Markers 7 : 49-55.
- Kamboh, M.I., K.M. Weiss and R.E. Ferrelli. (1991): Genetic Studies of human apolipoproteins XVI. ApoE polymorphism and Cholesterol levels in the Mayans of the Yucatan Peninsula, Mexico. Clin Genet 39 : 26-32.
- Klasen, E.C., M. Smit, P. de Knijff, J. Gevers Leuven, R. Kempen – Voodg L. Havekes (1987): Apolipoprotein E phenotype and Gene Distribution in the Netherlands Hum. Hered 37 : 340-344.
- Kowalska, A., Wiechmann, I., Walter, H. (1988): Genetic variability of apolipoprotein E in a Polish population. Hum. Biol 70 (6) : 1093-1099.
- Lehtimäki, T., T. Moilanen, J. Viikari, H.K. Akerblom, C. Ehnholm, T. Rönnemaa, J. Marniemi, G. Dahlen, and T. Nikkari (1990). Apolipoprotein E phenotypes in Finnish youths : a cross-sectional and 6-year follow-up Study. J of Lipid Res 31 : 487-495.
- Lehtimäki, T., T. Uibu, P. Roto, T. Koivula, H. Jokela, C. Ehnholm, N. Peltonen, T. Nikkari (1998): Apolipoprotein E and AIV polymorphisms in the Estonian population. Clin. Genet 54 : 106-107.
- Mahley R. W. (1988). Apolipoprotein E : Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell. Biology. Science 240 : 22-29.
- Malle, E., Pfeiffer K.P., Dugi, K., Pfeiffer C., Glaum M., Oezcueruemez M., Kloer H.U., Steinmetz A., (1996): Polymorphisms of apolipoprotein A-IV and E in a Turkish population living in Germany. Hum Genet 98 : 285-290.
- Matsunaga A., Sasaki J., Moriyama K., Arakawa F., Takad Y., Nishi K., Hidaka K., Arakawa K. (1995): Population frequency of apolipoprotein E5 (Glu 3-Lys) and E7 (Glu 244-Lys, Glu 245-Lys) variants in western Japan. Clin. Genet 48 : 93-99.

- Olaisen B., Teisberg & T. Gedde – Dahl Jr. (1982): The locus for Apolipoprotein E (ApoE) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man. *Hum Genet*: 62: 233-236.
- Miller, S.A., Dyker D.D. and Polesky H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acid Res.* 16: 1215.
- Ordovas J.M., L.L. Litwack-Klein, P.W.F. Wilson, M.M. Schaf and E.J. Schafer (1987): Apolipoprotein isoform phenotyping methodology and population frequency with identification of ApoE1 and ApoE5 isoforms. *J. Lipid Res.* 28 : 371-380.
- Ordovas M. (1999): The genetics of serum lipid responsiveness to dietary intervention proceedings. *Nutr Society* 58: 171-187.
- Pedersen J.C., Berg K., (1990): Gene-gene Interaction between the low density lipoprotein receptor and apolipoprotein E loci affects lipid levels *Clin. Genet* 38 : 287-294.
- Reymer Paul W.A., Björn E. Groenemeyer, Remco van de Burg & John, T.P. Kastelein (1995): Apolipoprotein E genotypes on Agarose Gel. *Clin. Chem* 41 (7) : 1046-1047.
- Sanan D.A., Weisgraber, K.H., Russell, S.J., Mahley, R.W., Huang, D. Saunders, A., Schmechel, D., Wisniewski, T., Frangione, B., Roses, A.D., Strittmatter, W.J (1994): Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils: isoform ApoE4 associates more efficiently than ApoE3. *J. Clin Invest* 94: 860-869.
- Sandholzer C., Delport R., Vermaak H., Utermann G., (1995): High frequency of the ApoE4 allele in Khoi San from South Africa. *Hum. Genetics* 95 : 46-48.
- Saunders, A.M., Schmechel K., Breitner, J., Benson M.D., Brown W.T., Goldfarb, L., Goldgaber, D. (1993): Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid forming diseases. *Lancet*: 342: 710-711.
- Sayi J.G., Patel N.B., Premkumar D.R., Adem A., Winblad B., Matuja W.B., Mtui E.P., Gatere S., Friedland R.P., Koss E., Kalaria R.N. (1997): Apolipoprotein E polymorphism in elderly east Africans. *East Afr. Med. J.* 74 (10) : 668-670.

- Scacchi R., Corbo R.M., Rickards O., Mantuano E., Guevara A., De Stefano G.F., (1997): Apolipoprotein B and E genetic polymorphisms in the Cayapa Indians of Ecuador. *Hum. Biology* 69 (3) : 375-382.
- Scheer W.D., Boudreau D.A., Malcom G.T., Muddaugh J.P. (1995): Apolipoprotein E and atherosclerosis in Alaska Natives. *Atherosclerosis* 114 (2) : 197-202.
- Sepehrnia B., M.I. Kamboh, L.L. Adams-Cambell, M. Nwankwo and R.E. Ferrel (1988): Genetic studies of human apolipoproteins AI, AII, A-IV, E CII and H in Nigeria. *Am. J. Hum. Genet.* 43 : 847-853.
- Shore B and Shore V. (1973): Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry* 12:502-507
- Sklavounou Ekaterini, Effrosini Economou-Petersen, Georgia Karadima, Marios Panas, Dimitris Avramopoulos, Angeliki Varsou, Dimitris Vassilopoulos and Michael B. Petersen (1997): *Clin. Genetics* 52 (4) : 216-218.
- Stengard, J.H., Zerba, K.E., Pekkanen, J., Ehnholm, C., Nissinen, A., Sing, C.F. (1995): Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men. *Circulation* 91:265-269
- Tiret L., de Knijff P., Menzel H-J, Ehnholm C., Nicand V., Harekes LM for the EARS group (1994): ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS study *Arterioscler Thromb* 14: 1617-1624.
- Utermann G., Kindermann I., Kaffarnik H., Steinmetz A. (1984): Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia. *Hum. Genet.* 65 : 232-236.
- Wardell M.R., Suckling P.A., Janus E.D. (1982): Genetic variation in human Apolipoprotein E. *J. Lipid. Res.* 23 : 1174-1182.
- Zekraoui L., Lagarde J.P., Raisonnier A., Gerard N., Aouizerate A., Lucotte G. (1997): High frequency of the apolipoprotein E₄ allele in African pygmies and most of the African populations in sub-Saharan Africa. *Human Biology* 69 (4) : 575-581.
- Zeman Francis. Clinical nutrition and dietetics. 2nd edition page 369.

Η.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α'

Αντιδραστήρια :

Taq DNA polymerase

από Gibco BRL – 500U (5U/μl) : Cat. No. 18038-042

Cfo I

από Gibco BRL – 2000U (10U/μl) : Cat. No. 15237-019

dNTPs (ultrapure)

από Pharmacia – 100M solution each in water : Cat. No. 27-2035-01

BSA (acetylated)

από Promega - 10 mg/ ml : Cat. No. R 3961

- 1 mg/ ml : Cat. No. R 9461

Markers (100 bp DNA ladder)

από Gibco BRL : Cat. No. 15628-019

Loading buffer (10X)

Για 10 ml : 2,5 gr Ficoll 40 (→ 25%)

0,42 gr Xylene Blue (→ 0,42%)

10 ml H₂O (sterile)

TBE electrophoresis buffer (5X)

Για 1 lit : 53,9 gr Tris base (→ 0,445 M)

27,5 gr boric acid (→ 0,445 M)

3,72 gr EDTA-2-Na (→ 10 Mm)

Agarose MP

από Boehringer Mannheim

Primers: από Εργαστήριο Μικροχημείας, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Κρήτης.

APOE-L: 5'-ATA AAT ATA AAA TAT AAA TAA CAG AAT TCG CCC CGG CCT GGT ACA C-3'

APOE-R: 5'-TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3'

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β'

Όταν σ' έναν πληθυσμό υπολογίζεται η γονιδιακή συχνότητα των αλληλόμορφων ενός γενετικού τόπου (στην περίπτωση της ΑροΕ έχουμε 3 κοινά αλληλόμορφα) είναι δυνατόν να ελεγχθεί κατά πόσο οι παρατηρούμενες στον πληθυσμό γονοτυπικές συχνότητες διαφέρουν ή βρίσκονται σε ισορροπία με τις θεωρητικά αναμενόμενες. Η γονοτυπική ισορροπία που βασίζεται πάνω σε σταθερές γονιδιακές συχνότητες και τυχαίες διασταυρώσεις είναι γνωστή ως Νόμος των Hardy – Weinberg.

Στη περίπτωση της ΑροΕ με τα 3 κοινά αλληλόμορφα (ε2, ε3, ε4) η συνθήκη ισορροπίας περιγράφεται από τους όρους του αναπτύγματος $(p+q+r)^2$ όπου :

p = γονιδιακή συχνότητα του ε2

q = γονιδιακή συχνότητα του ε3

r = γονιδιακή συχνότητα του ε4

και ισχύει ότι $p + q + r = 1$.

Δηλαδή σε συνθήκη ισορροπίας ισχύει : $p^2 + 2pq + q^2 + 2qr + r^2 + 2pr$ όπου :

p^2 = συχνότητα γονοτύπου Ε2/2

$2pq$ = συχνότητα γονοτύπου Ε2/3

q^2 = συχνότητα γονοτύπου Ε3/3

r^2 = συχνότητα γονοτύπου Ε4/4

$2pr$ = συχνότητα γονοτύπου Ε2/4

$2qr$ = συχνότητα γονοτύπου Ε3/4

Με βάση τις συχνότητες των αλληλόμορφων της ΑροΕ στο δείγμα (βλ. πίνακα Ε2) υπολογίζουμε τον αριθμό των ατόμων κάθε γονότυπου που αναμένονται θεωρητικά και τη διαφορά τους από τους αντίστοιχους παρατηρηθέντες.

Γονότυποι

	$E_{2/2}$	$E_{3/3}$	$E_{4/4}$	$E_{2/3}$	$E_{2/4}$	$E_{3/4}$
Παρατηρηθέντες (Π)	0	160	2	34	5	41
Αναμενόμενοι (Α)	1,57	161,2	2,58	31,8	4,025	40,808
Π - Α	- 1,57	- 1,2	- 0,58	2,2	0,975	0,192
$(Π - Α)^2$	2,4649	1,44	0,3364	4,84	0,95	0,036864
$\frac{(Π - Α)^2}{Α}$	1,57	0,0089	0,1314	0,152	0,2363	0,0009

Από την τιμή του χ^2 όπου : $\chi^2 = \sum \frac{(Π-Α)^2}{Α}$ υπολογίζουμε κατά πόσο ο πληθυσμός μας βρίσκεται σε ισορροπία ή όχι. Επειδή $\chi^2 = 2.1$ βρίσκουμε ότι για $df = 3$ (αριθμός γονότυπων μείον αριθμό αλληλομόρφων) $p > 0,05$, άρα δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ παρατηρούμενων και αναμενόμενων γονοτυπικών συχνοτήτων. Επομένως, η προσδιορισθείσα συχνότητα εμφάνισης των αλληλόμορφων της ΑροΕ στον Ελληνικό πληθυσμό βρίσκεται σε ισορροπία Hardy – Weinberg.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΠΙΣΤΡΟΦΗΣ

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΠΤΥΠΟ
ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΟΤΕΙΝΗΣ Ε ... 616.398

Αν. Πλουτίδου

7049

5206

**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Υπερ.Βιβ/κης Χαροκόπειου Παν/μίου.954916

* 7 0 4 9 *



HU

