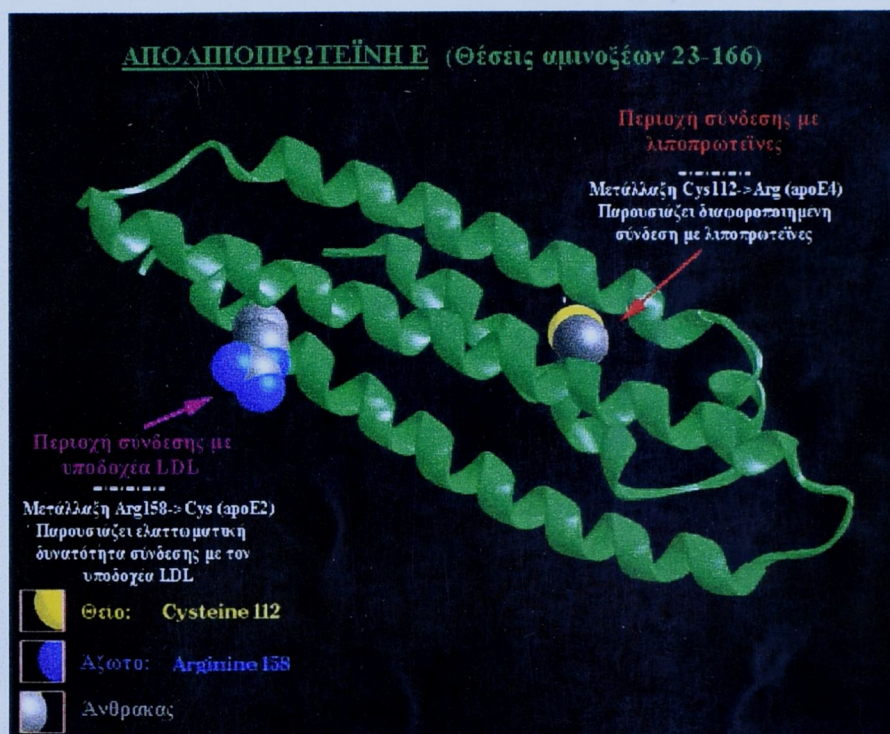


ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ-ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΗΣ
ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Ε ΜΕ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ
ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΣΕ ΝΕΑΡΟΥΣ ΕΛΛΗΝΕΣ



Υπεύθυνος μελέτης: Μελίστας Λάμπρος

Υπεύθυνοι καθηγητές: Ν. Γιαννακούρης

Α. Ζαμπέλας

Α. Ματάλα

Αθήνα, 1999

Για την απάντηση στα αιτήματά μου, ιδιαίτερα στην περίπτωση που απαιτείται η βοήθεια από άλλα άτομα, ευχαριστώ θερμά και ευγενικά τα άτομα που ανταποκρίθηκαν. Για τον καθένα από αυτούς, η βοήθεια που μου προσέφερε ήταν πολύτιμη. Για τον καθένα από αυτούς, η βοήθεια που μου προσέφερε ήταν πολύτιμη. Για τον καθένα από αυτούς, η βοήθεια που μου προσέφερε ήταν πολύτιμη.

Στους φίλους μου που γνώρισα
στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

Χαίρομαι, η ευχαρίστησή μου να μην μπορεί να περιγράψει την αγάπη, την κατανόηση και την αλληλεγγύη που μεσολάβησε για την ολοκλήρωση της διατριβής μου. Η βοήθεια που μου προσέφερε ήταν πολύτιμη. Για τον καθένα από αυτούς, η βοήθεια που μου προσέφερε ήταν πολύτιμη. Για τον καθένα από αυτούς, η βοήθεια που μου προσέφερε ήταν πολύτιμη.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τη συνάδελφό μου Παναγιώτα Κούρα, η οποία με βοήθησε να ολοκληρώσω την διατριβή μου. Η βοήθεια που μου προσέφερε ήταν πολύτιμη. Για τον καθένα από αυτούς, η βοήθεια που μου προσέφερε ήταν πολύτιμη. Για τον καθένα από αυτούς, η βοήθεια που μου προσέφερε ήταν πολύτιμη.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τους φίλους μου που με βοήθησαν να ολοκληρώσω την διατριβή μου. Η βοήθεια που μου προσέφερε ήταν πολύτιμη. Για τον καθένα από αυτούς, η βοήθεια που μου προσέφερε ήταν πολύτιμη. Για τον καθένα από αυτούς, η βοήθεια που μου προσέφερε ήταν πολύτιμη.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση οποιασδήποτε επιστημονικής εργασίας απαιτείται, πέρα από την προσπάθεια και εργατικότητα της ομάδας εργασίας, η βοήθεια από άλλα άτομα, σχετικά ή μη με το αντικείμενο, για τα εκάστοτε προβλήματα και δυσκολίες που παρουσιάζονται. Στη συγκεκριμένη πτυχιακή μελέτη, για την οποία απαιτήθηκε πολύς χρόνος ερευνητικής εργασίας σε συνδυασμό με τη βιβλιογραφική μελέτη, οι ανάγκες για βοήθεια, μικρή ή μεγάλη, ήταν δεδομένες.

Καταρχήν, η παρούσα μελέτη δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την οργανωμένη και πληρέστατη προετοιμασία εκ μέρους του υπεύθυνου καθηγητή κ. Νικόλαου Γιαννακούρη ο οποίος με τη μεταδοτικότητα και το ενδιαφέρον του μετέτρεψε την επίπονη και πολύπλοκη εργαστηριακή έρευνα σε μια ευχάριστη ενασχόληση. Καθ' όλη τη συγγραφή, παράλληλα, παρείχε χρήσιμες συμβουλές για την ολοκλήρωσή της. Από εκεί και πέρα, ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει στη βοήθεια που παρείχε ο κ. Α. Ζαμπέλας, Επίκουρος Καθηγητής του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου, χωρίς τη βοήθεια του οποίου οι βιοχημικές αναλύσεις θα αποτελούσαν άλυτο πρόβλημα. Η κα Μ. Σιταρά, εξάλλου, επίσης μέλος του εκπαιδευτικού προσωπικού του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου βοήθησε τα μέγιστα για την πραγματοποίηση της στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων μας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη συνάδελφό μου Πλουμίδου Κάτια με την οποία περάσαμε πολλές ώρες μαζί στο εργαστήριο και συνέβαλε με την εργατικότητά της στην έγκαιρη και επιτυχή διεκπεραίωση των αναλύσεων. Στο σημείο αυτό, θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω όλους τους φίλους και συμφοιτητές μου που με διευκόλυναν όπου χρειάστηκε και κυρίως το Γρηγόρη Ρίσβα, με τον οποίο μοιραστήκαμε ατέλειωτες, αλλά ευχάριστες ώρες μπροστά από τους υπολογιστές γράφοντας παράλληλα τις διπλωματικές μας εργασίες.

Πολλά ευχαριστώ ανήκουν, ακόμη, στους γονείς και στον αδελφό μου για την υλική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου αλλά και κατά την εργασία αυτή.

Τέλος, θεωρώ χρέος μου να ευχαριστήσω όλο το εκπαιδευτικό προσωπικό του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου που με προσανατόλισε στην επιστημονική σκέψη και παρείχε τα εφόδια για να αντεπεξέλθω στις απαιτήσεις της επιστήμης μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η απολιποπρωτεΐνη E (apoE) αποτελεί συστατικό πολλών λιποπρωτεϊνών και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στο μεταβολισμό τους. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την apoE είναι πολυμορφικό. Έχουν βρεθεί τρία κοινά αλληλόμορφα ε2, ε3 και ε4 που κωδικοποιούν για τις ισομορφές apoE2, apoE3 και apoE4. Η συχνότητα εμφάνισης των αλληλόμορφων ποικίλει στους διάφορους πληθυσμούς. Ο πολυμορφισμός της apoE έχει βρεθεί ότι μπορεί να δικαιολογήσει τουλάχιστον το 5-15% της διακύμανσης των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Ειδικότερα, από διάφορες επιδημιολογικές μελέτες, έχει βρεθεί ότι το ε2 αλληλόμορφο σχετίζεται με μείωση των επιπέδων ολικής και LDL χοληστερόλης ενώ στους φορείς του ε4 αλληλόμορφου τα επίπεδα αυτά είναι αυξημένα.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διευκρινιστεί κατά πόσο ο πολυμορφισμός της apoE επηρεάζει το λιπιδαιμικό προφίλ των Ελλήνων. Για το λόγο αυτό έγινε ταυτοποίηση του πολυμορφισμού της apoE σε δείγμα 121 νεαρών Ελλήνων και εξετάστηκε η σχέση πολυμορφισμού-λιπιδίων. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι και στον ελληνικό πληθυσμό η παρουσία του ε2 αλληλόμορφου σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης. Δε βρέθηκε, ωστόσο, θετική συσχέτιση του ε4 αλληλόμορφου με τα λιπίδια αυτά. Τόσο οι φορείς του ε2 όσο και του ε4 αλληλόμορφου είχαν αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων. Αν και το ε4 αλληλόμορφο δε σχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης υπάρχει η τάση μείωσης της HDL και αύξησης του λόγου ολικής προς HDL χοληστερόλη που δείχνει ότι η παρουσία του ε4 αλληλόμορφου και στον ελληνικό πληθυσμό σχετίζεται με καρδιαγγειακά νοσήματα.

Η έλλειψη της συσχέτισης του ε4 αλληλόμορφου με την ολική και την LDL χοληστερόλη μπορεί να οφείλεται σε άλλους γενετικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες. Θα ήταν ενδιαφέρον να επεκταθεί η έρευνα σε μεγαλύτερη κλίμακα στον ελληνικό πληθυσμό και να γίνει συσχέτιση με άλλους παράγοντες όπως η διαίτα, η άσκηση κ.λ.π.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. ΓΕΝΙΚΑ	1
1.2.ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Ε.....	3
1.2.1. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΙ Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΗΣ ΑΡΟΕ.....	3
1.2.2. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΡΟΕ.....	3
1.2.3. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Ε	4
1.2.4. ΤΟΠΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ.....	11
1.3. ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΟΔΟΙ ΣΤΙΣ ΟΠΟΙΕΣ ΣΥΜΜΕΤΕΧΕΙ Η ΑΡΟΕ.....	14
1.3.1. Η ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Ε ΣΤΗΝ ΑΝΑΚΑΤΑΝΟΜΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ.....	15
1.3.2. Η ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Ε ΣΤΗΝ ΑΝΑΚΑΤΑΝΟΜΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΣΑ ΣΕ ΕΝΑ ΟΡΓΑΝΟ Ή ΙΣΤΟ.....	20
1.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ.....	23
1.4.1. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΚΑΙ ΕΘΝΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΔΙΑΙΤΑ ΚΑΙ ΦΥΛΟ.....	27
1.4.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩ-ΤΕΪΝΗΣ Ε ΣΤΙΣ ΟΔΟΥΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	30
1.5. ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ.....	36
1.5.1. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΚΑΙ ΥΠΕΡΛΙΠΙΔΑΙΜΙΕΣ.....	36
1.5.2. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ	39
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	42
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	43
3.1. ΤΟ ΔΕΙΓΜΑ.....	43
3.2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	43

3.3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟ- ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Ε.	43
3.3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA.	43
3.3.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ DNA.	45
3.3.3. DNA ΑΝΑΛΥΣΗ.	45
3.3.3.1. Μέθοδος του PCR.	45
3.3.3.1. RFLP analysis.	46
3.4. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ	49
3.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	51
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	52
4.1. ΛΙΠΙΔΙΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΔΕΙΓΜΑ.	52
4.2. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΚΑΙ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ.	53
4.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ. 55	
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	60
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ

Η **απολιποπρωτεΐνη E (apoE)** είναι ένα από τα περίπου δώδεκα πρωτεϊνικά συστατικά των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος που χρησιμοποιούνται για διάφορους ρόλους, συμπεριλαμβανομένων της διατήρησης της δομής των μορίων των λιποπρωτεϊνών και της ρύθμισης του μεταβολισμού διαφόρων διαφορετικών λιποπρωτεϊνών. Η απολιποπρωτεΐνη E είναι ένα συστατικό των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL) που συντίθενται στο ήπαρ, οι οποίες δρουν κυρίως στη μεταφορά τριγλυκεριδίων από το ήπαρ στους περιφερικούς ιστούς, και μιας υποκατηγορίας λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL), που συμμετέχουν στην ανακατανομή της χοληστερόλης μεταξύ των κυττάρων. Επιπλέον, η apoE είναι κύριο πρωτεϊνικό συστατικό των χυλομικρών που συντίθενται στο έντερο, τα οποία μεταφέρουν τα τριγλυκερίδια και τη χοληστερόλη της δίαιτας. Ένας σημαντικός φυσιολογικός ρόλος για την apoE στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών είναι ότι μεσολαβεί για την υψηλής συγγένειας σύνδεση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν apoE με τους υποδοχείς των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL-υποδοχείς), που αναφέρονται επίσης και ως apoB/E υποδοχείς(1,2,3). Η σύνδεση των λιποπρωτεϊνών στους υποδοχείς σημαίνει την έναρξη της κυτταρικής πρόσληψης και αποδόμησης των λιποπρωτεϊνών, που οδηγεί στη χρήση της χοληστερόλης των λιποπρωτεϊνών στη ρύθμιση του ενδοκυτταρικού μεταβολισμού χοληστερόλης. Η apoE μοιράζεται τη λειτουργία αυτή με την απολιποπρωτεΐνη B, το πρωτεϊνικό συστατικό των LDL του πλάσματος. Επίσης, η apoE μεσολαβεί για τη σύνδεση των υπολειμμάτων χυλομικρών σε ένα δεύτερο ηπατικό υποδοχέα, τον αποκαλούμενο υποδοχέα υπολειμμάτων χυλομικρών ή υποδοχέα apoE. Ο ακριβής μηχανισμός που αναφέρεται στην αλληλεπίδραση της apoE με τους υποδοχείς λιποπρωτεϊνών και στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών (και άλλων μεταβολικών ρόλων) θα συζητηθεί αργότερα.

Η απολιποπρωτεΐνη E, που αρχικά ορίστηκε ως «αποπρωτεΐνη πλούσια σε αργινίνη» εντοπίστηκε αρχικά ως λιποπρωτεϊνικό συστατικό των VLDL το 1973 από

τους Shore και Shore. Χαρακτηρίστηκε εκτεταμένα σε διάφορα είδη ζώων αφού έγινε αντιληπτό ότι η χοληστερόλη της διαίτας σχετίζεται με την κατανομή της στο πλάσμα(1). Η apoE είναι ένα σημαντικό πρωτεϊνικό συστατικό διαφόρων εμπλουτισμένων σε χοληστερόλη λιποπρωτεϊνών που συσσωρεύονται στο πλάσμα πολλών θηλαστικών (λαγών, σκύλων, χοίρων, αρουραίων, μαϊμούδων) που έχουν τραφεί με υψηλά επίπεδα λιπών και χοληστερόλης. Είναι, πλέον, γνωστό ότι αυτές οι εμπλουτισμένες σε χοληστερόλη λιποπρωτεΐνες που περιέχουν apoE είναι υπολείμματα χυλομικρών και VLDL (που συγκεντρωτικά αναφέρονται ως β-VLDL) καθώς και μια υποκατηγορία των HDL (που αναφέρεται ως HDL₁, HDL_c, ή απλά HDL με apoE). Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η apoE είναι επίσης παρούσα στα χυλομικρά, τις VLDL, και τις HDL σε άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων και κατανέμεται περίπου ισάξια μεταξύ των VLDL και των HDL στο πλάσμα που στερείται χυλομικρών. Η φυσιολογική συγκέντρωση της πρωτεΐνης αυτής είναι 5mg/dl(1).

Σημαντική ώθηση για την κατανόηση του ρόλου της apoE στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών δόθηκε από τις παρατηρήσεις των Havel και Kane(5) ότι οι εμπλουτισμένες σε apoE β-VLDL συσσωρεύονται στο πλάσμα ασθενών με υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III, μια γενετική διαταραχή. Η παρατήρηση αυτή, σε συνδυασμό με αυτές που έγιναν από τα ζώα που τράφηκαν με χοληστερόλη, έδειξαν ότι η apoE έχει ένα ρόλο κλειδί στο μεταβολισμό της χοληστερόλης και συγκεκριμένα στο μεταβολισμό των χυλομικρών και των VLDL. Φυσιολογικά, όταν η διαίτα είναι πλούσια σε χοληστερόλη, παρατηρείται υπερχοληστερολαιμία ως αποτέλεσμα υπερπαραγωγής και μη σωστής απομάκρυνσής τους από το πλάσμα. Αντίθετα, στην υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III είναι δευτερογενές μεταβολικό ελάττωμα λόγω της παρουσίας μιας μη φυσιολογικής ισομορφής της apoE που σχετίζεται με μειωμένη ικανότητα σύνδεσης των λιποπρωτεϊνών με τους υποδοχείς τους (θα συζητηθούν λεπτομερειακά στη συνέχεια)(1).

1.2.ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Ε.

1.2.1. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΙ Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΗΣ ΑΡΟΕ.

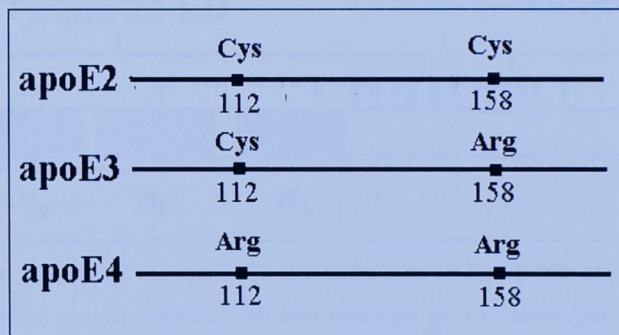
Το γονίδιο της apoE εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 και είναι στενά συνδεδεμένο με το γονίδιο που κωδικοποιεί την apoC-I. Τα γονίδια για τον υποδοχέα των LDL και την apoC-II έχουν επίσης χαρτογραφηθεί στο ίδιο χρωμόσωμα, αλλά δε σχετίζονται στενά μεταξύ τους ή με την apoE. Το γονίδιο της apoE έχει μήκος 3.7kb (kb=1000 βάσεις) και περιέχει τέσσερα exons(1). Το πρώτο intron διακόπτει τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA που αντιστοιχεί στην 5' μη κωδικοποιούσα περιοχή του mRNA της apoE, το δεύτερο intron διακόπτει την αλληλουχία του DNA που αντιστοιχεί στο mRNA που κωδικοποιεί για το αμινοξύ -4 του σινιάλου αναγνώρισης (signal peptide) της apoE, ενώ το τρίτο intron διακόπτει την αλληλουχία του DNA που αντιστοιχεί στο mRNA που κωδικοποιεί για το αμινοξύ 61 της ώριμης πρωτεΐνης. Ο λόγος του μη κωδικογόνου (intronic) DNA προς το κωδικογόνο (exonic) DNA είναι περίπου 2:1(2). Η ακολουθία TATAATT του προμóτορα βρίσκεται περίπου 30 ζεύγη βάσεων (bp) πριν από το σημείο εκκίνησης της μεταγραφής(1). Ακόμη, έχουν εντοπιστεί και άλλα σημεία σημαντικά στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης της apoE. Το mRNA της apoE έχει μήκος 1163 νουκλεοτιδίων. Το αρχικό προϊόν της μετάφρασης του mRNA αυτού είναι μια πρωτεΐνη 317 αμινοξέων, με τα 18 αμινοτελικά αμινοξέα να λειτουργούν ως σινιάλου αναγνώρισης. Η ώριμη apoE εκκρίνεται ως πρωτεΐνη 299 αμινοξέων με μοριακό βάρος MB=34,200(1).

1.2.2. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΡΟΕ.

Η πολυμορφική φύση της apoE ανακαλύφθηκε από τον Utermann και τους συνεργάτες του (1982), χρησιμοποιώντας ισοηλεκτρική εστίαση, ενώ διαλευκάνθηκε περαιτέρω από τους Zannis και Breslow (1981), μετά από ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων. Οι τρεις κύριες ισομορφές της apoE, που αναφέρονται ως apoE2, E3, E4, αποτελούν προϊόντα τριών κοινών αλληλομόρφων (E2, E3 και E4) του γενετικού τόπου της apoE στο χρωμόσωμα 19. Τρεις ομόζυγοι φαινότυποι (apoE2/2, E3/3 και

E4/4) και τρεις ετερόζυγοι (apoE2/3, E3/4 και E2/4) προκύπτουν από την έκφραση οποιωνδήποτε δύο από τα παραπάνω τρία αλληλόμορφα. Ο πιο συχνός φαινότυπος είναι ο apoE3/3 και το πιο συχνό αλληλόμορφο το E3. Για το λόγο αυτό η apoE3 θεωρείται ότι είναι η αρχική μορφή της πρωτεΐνης, ενώ η apoE2 και E4 ισομορφές προήλθαν από σημειακές μεταλλάξεις του ε3 γονιδίου.

Η μοριακή βάση του πολυμορφισμού της apoE διασαφηνίστηκε από την ανάλυση των αλληλουχιών των αμινοξέων των τριών ισομορφών. Οι διαφορές μεταξύ των apoE2, E3 και E4 οφείλονται σε αντικαταστάσεις αμινοξέων. Η απολιποπρωτεΐνη E4 διαφέρει από την apoE3 στο ότι στην apoE4 η αργινίνη έχει αντικαταστήσει τη φυσιολογικά υπάρχουσα κυστεΐνη στη θέση 112 της αμινοξικής αλληλουχίας (βλ. Σχήμα 1.1). Επίσης, η πιο συνήθης μορφή της apoE2 διαφέρει από την apoE3 στη θέση 158, όπου η κυστεΐνη έχει αντικαταστήσει τη φυσιολογικά υπάρχουσα αργινίνη. Οι διαφορές της φόρτισης μεταξύ των τριών ισομορφών που ανιχνεύτηκαν με ισοηλεκτρική εστίαση εξηγείται από αυτές τις μονές αντικαταστάσεις αμινοξέων(1).



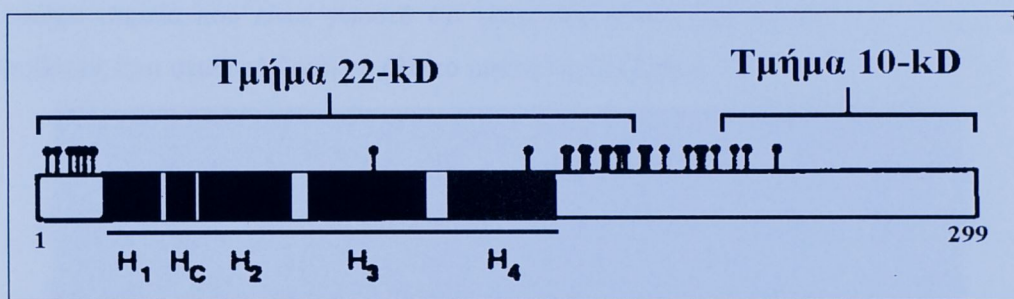
Σχήμα 1.1. Διαφορές στην αλληλουχία των αμινοξέων μεταξύ των ισομορφών της apoE

1.2.3. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Ε

Πέψη της apoE με θρομβίνη δημιουργεί δύο θραύσματα: ένα θραύσμα 22-kD (10-191ο αμινοξύ) που αντιστοιχεί στο αμινο(NH₂)-τελικό τμήμα και ένα θραύσμα 10-kD που αντιστοιχεί στο καρβοξύ(COOH)-τελικό τμήμα της πρωτεΐνης (Σχήμα 1.2). Ο εκτενής χαρακτηρισμός της apoE φανέρωσε ότι τα δομικά τμήματα της πρωτεΐνης ορίζουν επίσης τα λειτουργικά της τμήματα. Ενώ η αμινοτελική περιοχή είναι

υπεύθυνη για τη σύνδεση της apoE στον υποδοχέα LDL και συνδέεται με τα λιπίδια ασθενώς μόνο, η καρβοξυτελική περιοχή μεσολαβεί για τη σύνδεση της apoE με την επιφάνεια των λιποπρωτεϊνών, αλλά δε συνδέεται με τον υποδοχέα LDL.

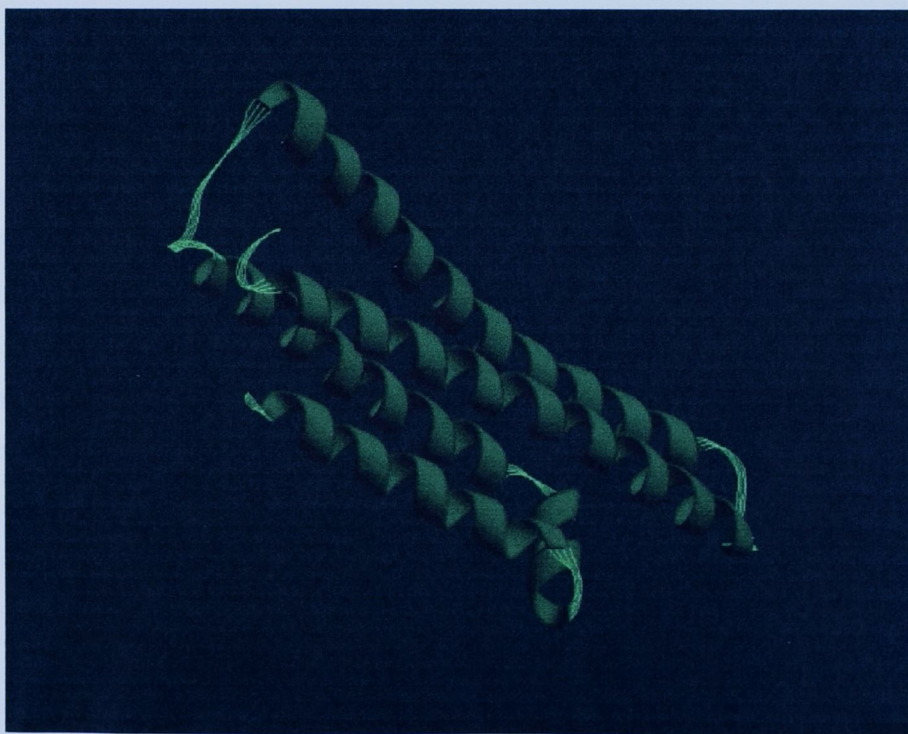
Αν και το αμινοτελικό τμήμα της apoE έχει ομολογία με αυτό άλλων μελών της οικογένειας των απολιποπρωτεϊνών (apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII και apoCIII), είναι θεμελιωδώς διαφορετικό από κάποιες απόψεις. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες περιλαμβάνουν εσωτερικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες προβλεπόμενες να σχηματίζουν αμφιπολικές α-έλικες, κάτι που δείχνει και η φασματοσκοπική ανάλυση. Ωστόσο, ενώ οι περισσότερες απολιποπρωτεΐνες είναι οριακά μόνο σταθερές και σχηματίζουν συσσωματώματα σε διαλύματα απουσία λιπιδίων, το αμινοτελικό τμήμα της apoE υπάρχει μόνο ως μονομέρες όταν διαλύεται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Αντιθέτως, το καρβοξυτελικό τμήμα της apoE παρουσιάζει ιδιότητες περισσότερο τυπικές των άλλων απολιποπρωτεϊνών σχηματίζοντας τετραμερή σε διάλυση(2).



Σχήμα 1.2. Δομή των τμημάτων της apoE. Τα αμινοξέα από το 1 έως 191 ορίζουν το αμινοτελικό τμήμα της apoE, γνωστό για τη σημασία του στη σύνδεση με τον υποδοχέα LDL. Οι συμπαγείς κύκλοι δείχνουν τα πρωτεολυτικώς ευαίσθητα σημεία. Η συμπαγής μπάρα δείχνει την περιοχή που συμπεριλαμβάνεται στη ραφιναρισμένη κρυσταλλική δομή του θραύσματος των 22-kD (αμινοξέα 24 έως 166). Οι έλικες (σκιασμένες περιοχές) που σχηματίζουν τη δέσμη των τεσσάρων ελίκων έχουν τα εξής νούμερα: H₁, αμινοξέα 24 με 42· H₂, 54 με 81· H₃, 87 με 122· και H₄, 130 με 164. Μια έλικα σύνδεσης (H_C, αμινοξέα 44 με 53) συνδέει τις έλικες 1 και 2. Η πλήρης ακολουθία της apoE περιλαμβάνει τρία επαναλαμβανόμενα τμήματα 11 αμινοξέων (29-39, 40-50, 51-61) και οκτώ επαναλαμβανόμενα τμήματα 22 αμινοξέων (62-83, 84-105, 106-127, 128-149, 150-171, 172-193, 194-215, 216-237)(2).

ΑpoE: Μια δέσμη τεσσάρων ελίκων ασυνήθιστα επιμηκυσμένη.

Το αμινοτελικό τμήμα της apoE περιλαμβάνει πέντε έλικες. Τέσσερις από αυτές, που περιλαμβάνουν 19, 28, 36 και 35 αμινοξέα αντίστοιχα σχηματίζουν μια δέσμη 2 επί 2. Οι δέσμες τεσσάρων ελίκων είναι η πιο συνήθης τριτοβάθμια πτύχωση στις πρωτεΐνες με α-έλικα και βρίσκεται σε τουλάχιστον 18 άλλες πρωτεϊνικές κρυσταλλικές δομές. Το μέσο μήκος για τις δέσμες ελίκων στις δομές αυτές είναι 18 αμινοξέα, σχεδόν το μισό μήκος από αυτό της apoE. Κάθε έλικα στη δέσμη της apoE είναι αντιπαράλληλη στις παρακείμενες σε αυτή έλικες. Η σύνδεση μεταξύ των δύο πρώτων ελίκων της δέσμης (αμινοξέα 24 με 42 και 54 με 81) είναι μια μικρή έλικα (αμινοξέα 44 με 53). Η στροφή μεταξύ των ελίκων 2 και 3 της δέσμης (αμινοξέα από 82 έως 86) μόλις που ορίζεται στον ηλεκτρονικό χάρτη πυκνότητας. Η έλικα 3 (αμινοξέα 87 με 122) «στρίβει» στο σημείο 105(Gly) αλλά διατηρεί μέχρι το σημείο αυτό σταθερή δομή με δεσμούς υδρογόνου. Η έλικα 4 (αμινοξέα 130 με 164), που περιέχει σημεία που είναι γνωστό ότι είναι σημαντικά στη σύνδεση με τους LDL υποδοχείς έχει σταθερή δομή σε όλο το μήκος της(2)(Σχήμα 1.3).



Σχήμα 1.3. Δομή του αμινοτελικού τμήματος της apoE (1-191 αμινοξέα).

Εσωτερικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες της apoE.

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η apoE έχει κοινή γονιδιακή δομή με τις περισσότερες άλλες απολιποπρωτεΐνες. Σε όλες αυτές τις πρωτεΐνες, η περιοχή κωδικοποίησης του ώριμου πεπτιδίου μοιράζεται μεταξύ των exon 3 και 4. Το exon 3 περιλαμβάνει τρεις διαδοχικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (repeats) 11 αμινοξέων ενώ το exon 4 περιέχει 1-12 αντίγραφα επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών 22 αμινοξέων (Σχήμα 1.2, 1.3).

Όπως προέκυψε από την ανάλυση των ακολουθιών της απολιποπρωτεΐνης, οι έλικες της apoE είναι ισχυρά αμφιπολικές. Οι τέσσερις μακριές έλικες της δέσμης είναι έτσι κατανεμημένες ώστε τα υδροφοβικά τους μέρη να είναι πλήρως απομονωμένα μέσα στην πρωτεΐνη ενώ τα υδροφιλικά τους να είναι εκτεθειμένα(2). Εξέταση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του exon 4, που κωδικοποιεί για τα αμινοξέα 61-299, φανέρωσε την ύπαρξη οκτώ επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών μήκους 66 b.p. Στο Σχήμα 1.4, οι επαναλαμβανόμενες αυτές αλληλουχίες DNA, που αντιστοιχούν στο mRNA που κωδικοποιεί για τα αμινοξέα 62-237 τοποθετήθηκαν η μία κάτω από την άλλη και διαμορφώθηκε κατόπιν μια αλληλουχία «συγχώνευσης» των οκτώ αλληλουχιών(2). Η ομολογία των οκτώ αλληλουχιών με την αλληλουχία «συγχώνευσης» κυμαίνεται από 51 μέχρι 75%. Η αλληλουχία «συγχώνευσης» όταν μεταφραστεί προσδιορίζει μια ακολουθία αμινοξέων που ξεκινά με μια προλίνη (Pro) και διαθέτει αμινοξέα με την ακόλουθη σειρά φόρτισης που επαναλαμβάνεται δύο φορές: 0, -, -, 0, +, -, +, 0 (Σχήμα 1.4). Σε μια διαμόρφωση α-έλικας όπως αυτές που παρατηρούνται στην apoE, η διευθέτηση των αμινοξέων κατά την παραπάνω σειρά προσδίδει αμφιπολικά χαρακτηριστικά στις έλικες, γεγονός που θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση με τα λιπίδια(4).

Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες apoE DNA

HOMOLLOGY
(%)

#1 (062) - GCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCATGAAATCGGAAC TGGACGAACTGACC---56
 #2 (084) - CCGCTGGCGGACGAGACGCGCGGCACGGCTGTCTCAAGGAGCTGCAGGCGGCGGACGCGCGCGCTGGCG---73
 #3 (106) - CCGGACA TGGAGCAGCTGTGCGGCGCGCTGCTGCAGTACCGCGGCGAGCTGCAGGCGCATGCTCGGC---75
 #4 (128) - CAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGGCGCTCGCTCCAGCTGCGCAAGCTGCGCTAAGCGGCTCTC---71
 #5 (150) - CCGGATGCGGATGACCTGCAGAGCGCTGCGAGTGTACAGGCGCGGCGCGCGCGGCGCGCGCGAG---60
 #6 (172) - CCGCGCGCTCAGCGGCAATCGCGGAGCGGCTGCGGCGCGCTGCTGCAACAGGCGCGCGCTGCGGCGCGCG---62
 #7 (194) - ACTGTGGCGTCTGCGCGCGCGCAGCGGCTACAGGAGCGGCGCGCGCGCTGCGGCGGAGCGGCTGCGCG---51
 #8 (216) - CCGCGGATGCGAGCAGATGCGGCGCGGACCGCGGACCGGCTGGACGAGCTGAAGGAGCAGGTGCGCG---73

CCGCGGATGCGAGCAGATGCGGCGGCGGCTGCGGAGGAGCTGGACGAGGTGCGGCGAGCGGCTGCGC

C C C A C

Pro---MetGluGluMetArgGluArgLeu---GluHisLeuAspGluValArgGluArgLeu---
Ile

0 0 - - 0 - - 0 - - 0 - - 0 - - 0 - - 0

Σχήμα 1.4. Παράταξη των οκτώ ομόλογων επαναλαμβανόμενων ακολουθιών DNA στο γονίδιο της apoE. Φαίνεται η αλληλουχία «συγχώνευσης» και η % ομολογία αυτής με κάθε μία από τις άλλες. Φαίνεται επίσης η αλληλουχία των αμινοξέων που ορίζεται από την ακολουθία του DNA και η φόρτιση αυτών(4).

Σύνδεση της apoE με τον LDL υποδοχέα και τα λιπίδια.

Μία από τις βασικές λειτουργίες της apoE είναι η μεσολάβηση για την ηπατική πρόσληψη των λιποπρωτεϊνών. Οι λιποπρωτεΐνες μέσω της apoE συνδέονται με υψηλή συγγένεια με τους LDL υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων. Η σύνδεση της απολιποπρωτεΐνης με τους LDL υποδοχείς που βρίσκονται συγκεντρωμένοι σε συγκεκριμένες θέσεις της πλασματικής μεμβράνης (καλυμμένες εσοχές), οδηγούν σε εγκόλπωση και ενδοκύττωση του συμπλόκου λιποπρωτεΐνη-LDL υποδοχέας. Η διαδικασία αυτή οδηγεί τελικά στην αποδόμηση των μορίων των απολιποπρωτεϊνών και την απελευθέρωση των λιπιδίων τους για κυτταρική χρήση. Η apoE λειτουργεί επίσης για την πρόσληψη των υπολειμμάτων χυλομικρών από τα ηπατικά κύτταρα μέσω ενός ειδικού για την apoE υποδοχέα(2) (βλ. παρακάτω).

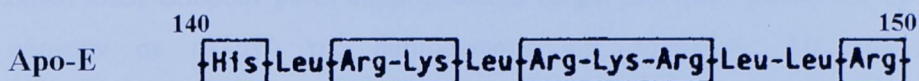
Το τμήμα της πρωτεΐνης μέσω του οποίου η apoE συνδέεται στον LDL υποδοχέα εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της apoE. Η γενετική ανάλυση σημειακών μεταλλάξεων της apoE, σε συνδυασμό με έρευνες όπου προκλήθηκαν μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα σημεία, έχουν δείξει ότι η περιοχή της πρωτεΐνης που εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 136-160(3,1) είναι απαραίτητη για τη λειτουργία αυτή. Η περιοχή αυτή είναι πλούσια σε βασικά αμινοξέα. Μεταλλαγμένοι τύποι της apoE όπου τα βασικά

αμινοξέα έχουν αντικατασταθεί από ουδέτερα όξινα αμινοξέα παρουσιάζουν ελαττωματική σύνδεση στον LDL υποδοχέα (2 με 40% της φυσιολογικής σύνδεσης)(2).

Το γεγονός ότι καμία αντικατάσταση ενός μόνο αμινοξέος δεν οδηγεί σε πλήρη κατάργηση της δυνατότητας σύνδεσης δείχνει ότι υπάρχουν πολλαπλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της apoE και του υποδοχέα και ότι τα βασικά αμινοξέα μπορεί να συνεργάζονται στη λειτουργία της σύνδεσης.

Ο LDL υποδοχέας αναγνωρίζει τόσο την apoE όσο και την apoB, και μάλιστα με ανάλογη συγγένεια. Αν και δεν υπάρχει καμία ομοιότητα στις ακολουθίες μεταξύ των δύο αυτών απολιποπρωτεϊνών, η apoB περιέχει μια περιοχή πλούσια σε βασικά αμινοξέα που έχει ένα σχέδιο φορτισμένων και ουδέτερων αμινοξέων παρόμοιο με αυτό της έλικας σύνδεσης της apoE με τον υποδοχέα. Διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι η περιοχή αυτή μπορεί να παίζει σπουδαίο ρόλο στη σύνδεση με τον υποδοχέα(3). Το τμήμα σύνδεσης του apoB/E υποδοχέα διαθέτει επτά επαναλαμβανόμενα τμήματα πολύ πλούσια σε όξινα αμινοξέα. Τα τμήματα αυτά θεωρείται ότι είναι πιθανά σημεία αλληλεπίδρασης με την apoE, όπως επίσης και με την apoB. Είναι πιθανό ότι **ιοντικές** αλληλεπιδράσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνδεση της apoE στον υποδοχέα LDL. Υποστήριξη για την ιοντική φύση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του συνδέσμου (apoE) και του υποδοχέα παρέχεται από πειράματα που δείχνουν ότι πολυανιοντικοί παράγοντες, όπως τα πολυφωσφατίδια και η ηπαρίνη, αναστέλλουν τη σύνδεση αυτή. Για το λόγο αυτό η σύνδεση μεταξύ της apoE και του υποδοχέα LDL μπορεί να σχετίζεται με την άμεση ιοντική αλληλεπίδραση ενός πεδίου αντίθετα φορτισμένων αμινοξέων της apoE (αργινίνη, λυσίνη και πιθανά ιστιδίνη) με τα αμινοξέα ασπαρτικό και γλουταμικό οξύ του υποδοχέα (Σχήμα 1.5)(3).

**Υποδοχέας LDL -Cys-Asp-X-X-X-Asp-Cys-X-Asp-Gly-Ser-Asp-Glu-
(consensus)**



Σχήμα 1.5. Αλληλουχίες που θεωρείται ότι μεσολαβούν για την αλληλεπίδραση υποδοχέα-αποΕ. Τα βασικά αμινοξέα της apoE που μπορεί να συμμετέχουν στη μεσολάβηση της σύνδεσης στον υποδοχέα είναι μέσα σε κουτιά. Μια ιοντική αλληλεπίδραση μεταξύ των βασικών αμινοξέων της apoE και των όξινων (ασπαρτικό και γλουταμικό οξύ) του υποδοχέα θεωρείται πολύ πιθανή. Consensus του LDL υποδοχέα: η ακολουθία των αμινοξέων του LDL υποδοχέα, όπως προκύπτει από την ανάλυση των επαναλαμβανόμενων ακολουθιών του υποδοχέα, που αποτελεί το τμήμα σύνδεσης με τις απολιποπρωτεΐνες(1).

Παρότι η σύνδεση της apoE με τα μόρια των λιποπρωτεϊνών φαίνεται ότι γίνεται μέσω του καρβοξυτελικού τμήματος της πρωτεΐνης (αμινοξέα 216 με 299), το αμινοτελικό τμήμα φαίνεται ότι είναι και αυτό απαραίτητο για τη σύνδεση αυτή. Έχει βρεθεί ότι *in vitro* το τμήμα αυτό συνεργάζεται με φωσφολιπίδια για το σχηματισμό δισκοειδικών μορίων. Στη συνδεδεμένη με λιπίδια μορφή η apoE είναι σε θέση να συνδεθεί με πολύ υψηλή συγγένεια με τον LDL υποδοχέα. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι η συγγένεια σύνδεσης πρωτεΐνης χωρίς τα λιπίδια είναι περίπου 500 φορές μικρότερη από αυτή των συμπλεγμάτων λιπιδίων-πρωτεΐνης. Αρκετές έρευνες έδειξαν ότι οι έλικες στο αμινοτελικό τμήμα (ειδικά η έλικα 4) μπορεί να εισέρχονται στις φωσφολιπιδικές μεμβράνες. Από την άλλη, η κρυσταλλική δομή δε δείχνει κάποιον ειδικό ρόλο σύνδεσης με τα λιπίδια για την έλικα 4 ή για οποιαδήποτε άλλη έλικα.

Η έλλειψη υδροφοβικών τμημάτων στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και η σταθερότητα της σφαιροειδούς δομής υποδεικνύουν άλλες πιθανές εξηγήσεις για τη σύνδεση με τα λιπίδια. Για παράδειγμα, η σύνδεση με τα λιπίδια μπορεί να περιλαμβάνει σημαντική αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης, όπου το υδροφοβικό τμήμα μίας η περισσότερων ελίκων θα γινόταν προσβάσιμο για αλληλεπίδραση με τις μη πολικές φωσφολιπιδικές ουρές. Εναλλακτικά, η σύνδεση με τα λιπίδια θα μπορούσε

να είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης φορτισμένων επιφανειακών αμινοξέων και κεφαλών φωσφολιπιδικών ομάδων. Είναι πάλι πιθανό, ότι τα αμινοξέα που βρίσκονται σε «αταξία» (1 με 22 και 167 με 191) αποκτούν δομή με την παρουσία λιπιδίων και μεσολαβούν για τη σύνδεση με αυτά. Διάφορες μελέτες στηρίζουν το μοντέλο στο οποίο τα λιπίδια αλληλεπιδρούν με το καρβοξυτελικό τμήμα του θραύσματος των 22-kD και οδηγούν σε αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης. Περαιτέρω κρυσταλλογραφικές και φασματοσκοπικές έρευνες χρειάζονται ωστόσο προκειμένου να διασαφηνιστεί ο μηχανισμός της σύνδεσης με τα λιπίδια και ο ρόλος της στην ενεργοποίηση της σύνδεσης της apoE με τον LDL υποδοχέα (2).

1.2.4. ΤΟΠΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

Η απολιποπρωτεΐνη E παράγεται στα περισσότερα όργανα. Σημαντικές ποσότητες από apoE mRNA ανιχνεύονται στο ήπαρ, τον εγκέφαλο, το σπλήν, τον πνεύμονα, τα επινεφρίδια, τις ωοθήκες, τα νεφρά και τους μύες σε διάφορα είδη του ζωικού βασιλείου. Μια αξιοσημείωτη εξαίρεση είναι το επιθήλιο του εντέρου, το οποίο δε φαίνεται να συμμετέχει στην παραγωγή της apoE. Η μεγαλύτερη ποσότητα του apoE mRNA βρίσκεται στο ήπαρ, που είναι η κύρια πηγή της apoE και που είναι πιθανότατα υπεύθυνο για τα δύο τρίτα με τρία τέταρτα της apoE του πλάσματος. Η δεύτερη μεγαλύτερη συγκέντρωση του apoE mRNA βρίσκεται στον εγκέφαλο (περίπου το ένα τρίτο των επιπέδων στο ήπαρ). Διάφοροι τύποι κυττάρων μέσα στα όργανα παράγουν την apoE και έτσι είναι πιθανώς υπεύθυνα για το αντίστοιχο mRNA που εντοπίζεται σ' αυτά τα όργανα. Η συμμετοχή διαφόρων τύπων κυττάρων στην ευρύτατη παραγωγή της apoE είναι ενδεικτική της σημασίας της apoE στη μεταφορά των λιπών και πιθανόν σε ρόλους που δε συνδέονται με τη μεταφορά αυτή.

Τα ηπατικά παρεγχυματικά κύτταρα είναι πρωταρχικώς υπεύθυνα για την παραγωγή της apoE στο ήπαρ. Φαίνεται ότι η apoE εκκρίνεται αρχικά από τα ηπατοκύτταρα ως συστατικό των VLDL. Ωστόσο, είναι πιθανό ότι η apoE που συντίθεται στο ήπαρ απελευθερώνεται ανεξάρτητα από τις VLDL ως λιποπρωτεΐνες με δισκοειδή μορφή που περιέχουν κυρίως φωσφολιπίδια. Το ηπατικό καρκίνωμα HepG2 έχει επίσης δειχθεί ότι συνθέτει και εκκρίνει apoE.

Τα μακροφάγα που προέρχονται από την περιτοναϊκή κοιλότητα ποντικών ή από μονοκύτταρα ανθρώπινου αίματος επίσης παράγουν μεγάλες ποσότητες apoE. Η σύνθεση και η έκκριση της απολιποπρωτεΐνης E μπορεί να οδηγηθεί σε πολύ ψηλά επίπεδα γεμίζοντας με χοληστερόλη τα περιτοναϊκά μακροφάγα ποντικών. Για την ακρίβεια, σε συνθήκες καλλιέργειας *in vitro*, η apoE αντιπροσωπεύει το 5-10% των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών που παράγονται από τα πλούσια σε χοληστερόλη μακροφάγα. Η apoE απελευθερώνεται από τα κύτταρα σε συνδυασμό με φωσφολιπίδια και είναι σε μορφή apoE-φωσφολιπιδικών δίσκων που επιπλέουν σε πυκνότητα περίπου 1,08g/ml. Η χοληστερόλη μπορεί επίσης να απελευθερωθεί από τα μακροφάγα χωρίς ωστόσο η απελευθέρωσή της να εξαρτάται από την έκκριση της apoE. Η χοληστερόλη απελευθερώνεται σε αποδέκτες, όπως οι HDL, στο εξωκυττάριο υγρό, και η apoE συνδέεται με αυτές τις HDL για τη δημιουργία συσσωματωμάτων HDL-apoE.

Η παραγωγή της apoE μπορεί να ρυθμιστεί από την κατάσταση ενεργοποίησης των μακροφάγων. Για παράδειγμα, η διέγερση από ενδοτοξίνες μειώνει αξιοσημείωτα την παραγωγή της apoE. Παράλληλα με το ρόλο της στη μεταφορά λιπιδίων, η apoE που συντίθεται και εκκρίνεται από μακροφάγα μπορεί να μεταδίδει την κατάσταση ενεργοποίησης ή απενεργοποίησης των μακροφάγων σε άλλα κύτταρα στο κοντινό περιβάλλον. Η αντίληψη αυτή θα μπορούσε να επεκταθεί ακόμα λαμβάνοντας υπ' όψιν πιθανούς ανοσορρυθμιστικούς ρόλους για την apoE. Είναι πιθανό ότι τα μακροφάγα είναι υπεύθυνα για το apoE mRNA που εντοπίζεται στο σπλήνα και στους πνεύμονες. Ωστόσο, η συμμετοχή άλλων τύπων κυττάρων στη σύνθεση της apoE δεν έχει αποκλειστεί.

Στον εγκέφαλο, τα αστροκύτταρα είναι ο τύπος κυττάρων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της apoE. Τα κύτταρα αυτά πραγματοποιούν διάφορες λειτουργίες στον εγκέφαλο, από την παροχή δομικού σκελετού μέχρι τη ρύθμιση της συγκέντρωσης των ιόντων και των μεταβολιτών. Επιπρόσθετα, τα αστροκύτταρα σε καλλιέργεια συνθέτουν και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες apoE ενώ άλλα γλοιοκύτταρα και νευρώνες δεν παράγουν καθόλου. Είναι αξιοσημείωτο ότι η apoE είναι μια από τις κύριες απολιποπρωτεΐνες του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) στον άνθρωπο και το σκύλο. Η apoE υπάρχει στο ENY ως μικρή, σφαιρική και σε

δισκοειδική μορφή λιποπρωτεΐνη που μεταφέρει χοληστερόλη και φωσφολιπίδια. Αντίθετα από το πλάσμα, όπου η LDL που περιέχει apoB αποτελεί σημαντική λιποπρωτεΐνη για τη μεταφορά χοληστερόλης, το ENY δεν έχει apoB και LDL. Ίσως, λοιπόν, η apoE να παίζει τον κύριο ρόλο στη μεταφορά λιπιδίων στο ENY.

Τα λεία μυϊκά κύτταρα που απομονώθηκαν από αορτή αρουραίου ή πιθήκου και αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια παράγουν επίσης apoE. Η apoE αντιπροσώπευε το 5% της συνολικής πρωτεΐνης που εκκρίθηκε από τα κύτταρα αυτά. Εξάλλου, αρκετά στοιχεία δείχνουν ότι η apoE μπορεί να συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των λείων μυϊκών κυττάρων(1).

1.3. ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΟΔΟΙ ΣΤΙΣ ΟΠΟΙΕΣ ΣΥΜΜΕΤΕΧΕΙ Η ΑΡΟΕ.

Οι διάφορες μεταβολικές οδοί στις οποίες συμμετέχει η αροΕ μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες. Δύο από αυτές περιλαμβάνουν λειτουργίες της αροΕ που αφορούν τη μεταφορά λιπιδίων, ενώ η τρίτη είναι περισσότερο θεωρητική και αφορά διαφορετικούς μηχανισμούς σε συνδυασμό ή μη με τις λειτουργίες μεταφοράς λιπιδίων.

1) Ανακατανομή των λιπιδίων μεταξύ των κυττάρων διαφορετικών οργάνων. Η απολιποπρωτεΐνη Ε έχει μια λειτουργία που μοιάζει με «**ενδοκρινική**» γιατί συντίθεται σε ένα ή περισσότερα σημεία και συμμετέχει στη μεταφορά της χοληστερόλης και άλλων λιπιδίων από σημεία σύνθεσης ή απορρόφησης σε κύτταρα άλλων οργάνων όπου τα λιπίδια χρησιμοποιούνται, αποθηκεύονται ή απεκκρίνονται. Παραδείγματα αυτού του τύπου λειτουργίας της αροΕ είναι ο μεταβολισμός των χυλομικρών και των υπολειμμάτων χυλομικρών (chylomicron remnants), των VLDL και των υπολειμμάτων VLDL (VLDL remnants) καθώς και μιας υποομάδας των HDL.

2) Ανακατανομή των λιπιδίων μεταξύ των κυττάρων μέσα στο ίδιο όργανο ή ιστό. Η απολιποπρωτεΐνη Ε έχει επίσης μια λειτουργία που μοιάζει με «**παρακρινική**», αφού παράγεται από διάφορα κύτταρα σε έναν ιστό και συμμετέχει στη μεταφορά χοληστερόλης και άλλων λιπιδίων μεταξύ των κυττάρων του ίδιου ιστού. Ο γενικός μηχανισμός είναι ότι τα μακροφάγα ή άλλα κύτταρα ικανά να αποθηκεύσουν και να απελευθερώσουν λιπίδια σε αποδέκτες στο διάμεσο υγρό (συμπλέγματα αροΕ-λιπιδίων ή HDL) έχουν ένα ρόλο κλειδί σ' αυτήν την ανακατανομή. Η αροΕ, εξαιτίας της ικανότητάς της να συνδέεται με υψηλή συγγένεια σε υποδοχείς LDL, οδηγεί τα συμπλέγματα λιπιδίων ή της HDL με την αροΕ στην πρόσληψη από τα κύτταρα του τοπικού περιβάλλοντος. Η χοληστερόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα κύτταρα για βιοσυνθετικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένου της επισκευής μεμβρανών ή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Στα μακροφάγα που συνθέτουν και εκκρίνουν αροΕ, η αροΕ μπορεί να έχει «**αυτοκρινική**» λειτουργία. Η εκκριθείσα αροΕ παγιδεύει τα λιπίδια από το περιβάλλον και τα παραδίδει πίσω στο μακροφάγο, όπου και αποθηκεύονται. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της συμμετοχής της αροΕ σε «αυτοκρινικές» και «παρακρινικές» λειτουργίες είναι ο τραυματισμός και η

αναγέννηση περιφερικών νεύρων. Ωστόσο, είναι πιθανό ότι ο μηχανισμός αυτός είναι εφαρμόσιμος γενικά σε περιοχές τοπικού τραυματισμού και επιδιόρθωσης ιστών και μπορεί επίσης να συμμετέχει στην πρόοδο και την παλινδρόμηση των αθηροσκληρωτικών κακώσεων (που περιγράφεται κλασσικά ως απάντηση τραυματισμού-επιδιόρθωσης στο αρτηριακό τοίχωμα).

3) Λειτουργίες της απολιποπρωτεΐνης E που δε συνδέονται με τη μεταφορά των λιπών. Η apoE αναστέλλει τη μιτογόνα διέγερση των λεμφοκυττάρων συνδεόμενη σε συγκεκριμένα σημεία στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων. Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι η apoE θα μπορούσε να έχει έναν ευρύτερο ρόλο στην ανοσολογία από ότι είναι κατανοητό μέχρι σήμερα. Παράλληλα, η apoE που παράγεται από τα λεία μυϊκά κύτταρα μπορεί να συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων όπως αναφέρθηκε νωρίτερα(1).

1.3.1. Η ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ E ΣΤΗΝ ΑΝΑΚΑΤΑΝΟΜΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ.

1) Μεταφορά των λιπιδίων της διαίτας από το έντερο στο ήπαρ και τους περιφερικούς ιστούς. Τα χυλομικρά, που συντίθενται στο έντερο ως απάντηση στο διαιτητικό λίπος και τη χοληστερόλη, εισέρχονται στο μεσεντερικό και θωρακικό αγωγό του λεμφικού συστήματος, όπου αποκτούν την apoE (Σχήμα 1.6). Η λιποπρωτεϊνική λιπάση του ενδοθηλίου των αγγείων καταλύει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων των χυλομικρών και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που δημιουργούνται προσλαμβάνονται πρωταρχικά από τα λιποκύτταρα, όπου αποθηκεύονται ως σταγονόμορφα συσσωματώματα τριγλυκεριδίων (droplets). Μετά την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων, τα χυλομικρά γίνονται μικρότερα και πιο εμπλουτισμένα σε χοληστερόλη και αναφέρονται ως **υπολείμματα χυλομικρών**. Τα υπολείμματα των χυλομικρών απομακρύνονται γρήγορα από το πλάσμα καθώς περνούν από το ήπαρ, όπου η χοληστερόλη χρησιμοποιείται ή στις μεμβράνες ή στη βιοσύνθεση λιποπρωτεϊνών ή εκκρίνεται ως ελεύθερη χοληστερόλη ή ως χολικά οξέα.

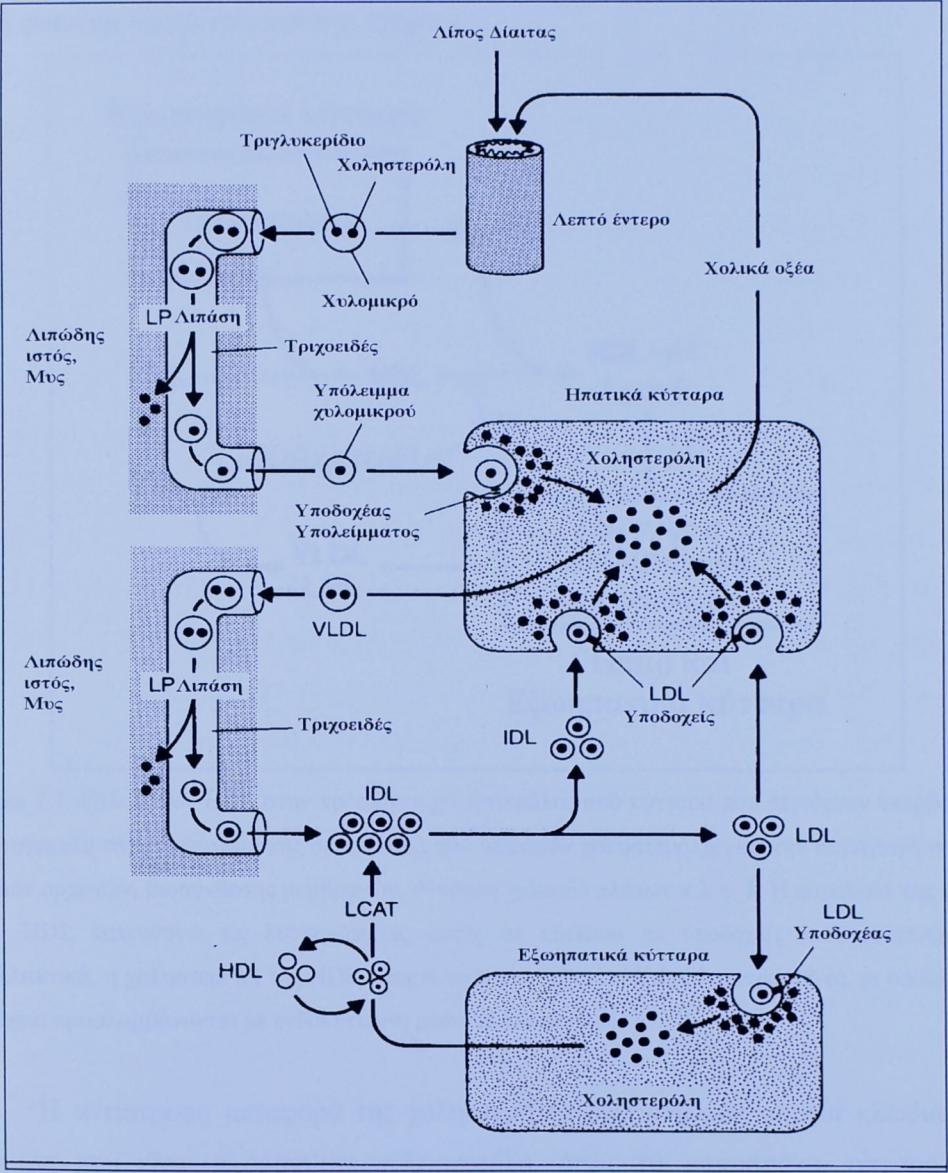
Η απολιποπρωτεΐνη E μεσολαβεί για την ηπατική πρόσληψη των υπολειμμάτων των χυλομικρών. Φαίνεται ότι υπάρχει ένας μοναδικός υποδοχέας στα ηπατοκύτταρα

[διαφορετικός από τον LDL υποδοχέα ή apoB/E υποδοχέα] που έχει ως ρόλο τη μεσολάβηση για την πρόσληψη των υπολειμμάτων χυλομικρών. Αυτός ο υποτιθέμενος υποδοχέας αναφέρεται ως υποδοχέας υπολειμμάτων χυλομικρών ή υποδοχέας apoE(1). Υπάρχουν διάφοροι λόγοι για να θεωρήσουμε ως δεδομένη την ύπαρξη του υποδοχέα αυτού· ένας λόγος είναι ότι τα άτομα με οικογενή υπερχοληστερολαιμία - δηλαδή άτομα με ελαττωματικούς ή απόντες υποδοχείς LDL - είναι ικανά να «καθαρίσουν» το πλάσμα τους από υπολείμματα χυλομικρών. Αυτό δε σημαίνει ότι οι υποδοχείς των LDL δεν διαδραματίζουν φυσιολογικό ρόλο στην πρόσληψη των υπολειμμάτων χυλομικρών. Τα υπολείμματα χυλομικρών συνδέονται όντως με υψηλή συγγένεια με τους υποδοχείς LDL in vitro. Ωστόσο, οι μεμβράνες του ήπατος έχουν ξεχωριστές πρωτεΐνες συνδεόμενες με apoE (ανεξάρτητα από τους υποδοχείς LDL). Αυτό που παραμένει να καθοριστεί είναι κατά πόσο αυτές αποτελούν σημαντικές πρωτεΐνες για τη μεσολάβηση της σύνδεσης των υπολειμμάτων, την πρόσληψή τους, ή και τα δύο, από το ήπαρ in vivo.

Η πρόσληψη χυλομικρών από το ήπαρ μπορεί να είναι μια διαδικασία με πολλά βήματα που περιλαμβάνει τη σύνδεσή τους και την ακόλουθη πρόσληψή τους από τα ηπατοκύτταρα. Όπως είναι προφανές από τη συζήτηση αυτή, ο ακριβής μηχανισμός της πρόσληψης των υπολειμμάτων χυλομικρών πρέπει να διασαφηνιστεί. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι για την πρόσληψη των υπολειμμάτων χυλομικρών μεσολαβεί η apoE(1).

2) Μεταφορά λιπιδίων από το ήπαρ στους περιφερικούς ιστούς. Οι **πολύ χαμύλης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες** (VLDL) είναι μόρια πλούσια σε τριγλυκερίδια που περιέχουν apoE και apoB-100 που συντίθενται και εκκρίνονται από τα ηπατοκύτταρα (Σχήμα 1.6). Στο πλάσμα βρίσκονται υπό την επίδραση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, που καταλύει την απελευθέρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Όπως τα χυλομικρά, οι VLDL γίνονται προοδευτικά μικρότερες και πιο πλούσιες σε χοληστερόλη. Αυτά είναι τα υπολείμματα VLDL που εξελίσσονται μέσω μιας διαδικασίας μετατροπής σε **ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες** (IDL) και τελικά σε **LDL**, το τελικό βήμα της διαδικασίας. Ωστόσο, κατά τη λιπολυτική διαδικασία, ένα τμήμα των υπολειμμάτων των VLDL απομακρύνονται από το πλάσμα μέσω των υποδοχέων LDL. Η ηπατική πρόσληψη των υπολειμμάτων VLDL και των

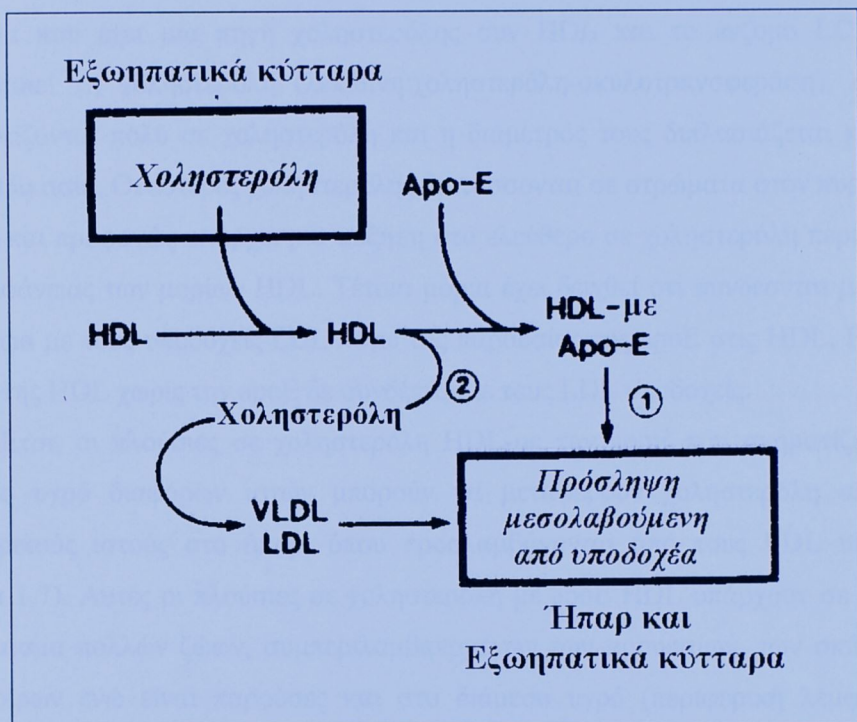
IDL γίνεται πρωτίστως με τη μεσολάβηση της apoE. Καθώς τα μόρια καταλήγουν στην τελική μορφή της LDL (σταδιακά μικρότερα και πιο πλούσια σε χοληστερόλη), χάνουν την apoE τους, και η apoB-100 γίνεται ο σύνδεσμος που είναι υπεύθυνος για τη δέσμευση της LDL στους υποδοχείς LDL(1).



Σχήμα 1.6. Γενικό σχήμα που περιγράφει περιληπτικά το μεταβολισμό των χυλομικρών, VLDL, IDL, LDL, και υπολειμμάτων χυλομικρών(43).

3) Μεταφορά της χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ. Η απομάκρυνση της χοληστερόλης από το σώμα συμβαίνει κυρίως μέσω του ήπατος με

τη δημιουργία χολής. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητο η χοληστερόλη από τους περιφερικούς ιστούς να μεταφερθεί πίσω στο ήπαρ. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται ως αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης (reverse cholesterol transport), και περιλαμβάνει τις HDL (υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες) ως μέσο μεταφοράς(1). Η διαδικασία αυτή φαίνεται διαγραμματικά στο Σχήμα 1.7.



Σχήμα 1.7. Ρόλος των HDL στην πρόσληψη χοληστερόλης από κύτταρα που περιέχουν υπερβολική ποσότητα και στην κατανομή της σε κύτταρα που απαιτούν χοληστερόλη για την παραγωγή στεροειδικών ορμονών, βιοσύνθεσης μεμβρανών, σύνθεση χολικών αλάτων κ.λ.π. **1.** Η παρουσία της apoE στην HDL κατευθύνει τις λιποπρωτεΐνες αυτές σε κύτταρα με υποδοχείς λιποπρωτεϊνών. **2.** Εναλλακτικά, η χοληστερόλη της HDL μπορεί να μεταφερθεί σε άλλες λιποπρωτεΐνες, οι οποίες στη συνέχεια προσλαμβάνονται με ενδοκύτωση μέσω υποδοχέων(1).

Η αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης έχει διάφορα σημεία κλειδιά. Τα κύτταρα που είναι πλούσια σε χοληστερόλη, όπως τα μακροφάγα, μπορούν να απελευθερώσουν τη χοληστερόλη τους σε αποδέκτες στο διάμεσο υγρό. Κύριος αποδέκτης χοληστερόλης είναι η HDL (HDL χωρίς apoE). Καθώς οι HDL εμπλουτίζονται σε χοληστερόλη, αποκτούν την apoE. Όπως σημειώθηκε προηγουμένως, η apoE είναι διαθέσιμη στο διάμεσο υγρό ως προϊόν που εκκρίνεται

από διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, των λείων μυϊκών κυττάρων και άλλων, και εμφανίζει μεγάλη ικανότητα σύνδεσης με τις HDL λιποπρωτεΐνες καθώς αυτές εμπλουτίζονται με χοληστερόλη. Όπως έχειδειχθεί από έρευνες in vitro, η παρουσία της apoE διευκολύνει την πρόσληψη της χοληστερόλης από τις HDL. Για την ακρίβεια, όταν περίσσεια apoE προστίθεται in vitro σε ένα σύστημα που έχει μια πηγή χοληστερόλης συν HDL και το ένζυμο LCAT που εστεροποιεί τη χοληστερόλη (λεκιθίνη:χοληστερόλη-ακυλοτρανσφεράση), οι HDL εμπλουτίζονται πολύ σε χοληστερόλη και η διάμετρός τους διπλασιάζεται κατά την όλη διαδικασία. Οι εστέρες χοληστερόλης διατάσσονται σε στρώματα στον πυρήνα του μορίου και προφανώς υπάρχει μια αύξηση στο ελεύθερο σε χοληστερόλη περιεχόμενο της επιφάνειας των μορίων HDL. Τέτοια μόρια έχειδειχθεί ότι συνδέονται με υψηλή συγγένεια με τους υποδοχείς LDL λόγω της παρουσίας της apoE στις HDL. Η τυπική μορφή της HDL χωρίς την apoE δε συνδέεται με τους LDL υποδοχείς.

Έτσι, οι πλούσιες σε χοληστερόλη HDL-με την apoE που σχηματίζεται στο διάμεσο υγρό διαφόρων ιστών μπορούν να μεταφέρουν χοληστερόλη από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ, όπου προσλαμβάνονται από τους LDL υποδοχείς (Σχήμα 1.7). Αυτές οι πλούσιες σε χοληστερόλη με apoE HDL υπάρχουν σε αφθονία στο πλάσμα πολλών ζώων, συμπεριλαμβανομένων των αρουραίων, των σκύλων και των χοίρων ενώ είναι παρούσες και στο διάμεσο υγρό (περιφερική λέμφος) των σκύλων. Στους ανθρώπους, οι HDL με apoE υπάρχουν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και η αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης φαίνεται να περιλαμβάνει και μια πρόσθετη διαδικασία. Οι άνθρωποι και μερικά ζώα, όπως οι λαγοί, έχουν τη μεταφέρουσα πρωτεΐνη εστέρων χοληστερόλης (CETP, Cholesterol Ester Transfer Protein), που μεταφέρει τη χοληστερόλη από τη μια λιποπρωτεΐνη στην άλλη. Θεωρείται ότι οι HDL εστέρες χοληστερόλης μεταφέρονται σε χαμηλότερης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες, όπως οι VLDL, IDL ή LDL, που προσλαμβάνονται από το ήπαρ. Ωστόσο, είναι πιθανό ότι ακόμα και στον άνθρωπο κάποιο ποσοστό της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης γίνεται μέσω των HDL-με την άμεση μεταφορά της χοληστερόλης στο ήπαρ από την apoE(1).

1.3.2. Η ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Ε ΣΤΗΝ ΑΝΑΚΑΤΑΝΟΜΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΣΑ ΣΕ ΕΝΑ ΟΡΓΑΝΟ Ή ΙΣΤΟ.

Είναι εύκολο να φανταστεί κανείς πως τα συμπλέγματα HDL -με ή χωρίς apoE- θα μπορούσαν να λειτουργήσουν στην παράδοση χοληστερόλης στο τοπικό περιβάλλον στο οποίο σχηματίζονται. Έτσι, η apoE θα μπορούσε να συμμετέχει στην ανακατανομή χοληστερόλης από κύτταρα με περίσσεια χοληστερόλης σε κύτταρα που χρειάζονται χοληστερόλη. Τα κύτταρα που χρειάζονται χοληστερόλη μπορούν να συνθέσουν υψηλά επίπεδα LDL υποδοχέων και να προσλάβουν τα μόρια που περιέχουν apoE.

Ένα ενδιαφέρον μοντέλο που αναφέρεται στη συντονισμένη αποθήκευση και ανακατανομή της χοληστερόλης έχει περιγραφεί μεταξύ των τραυματισμένων κυττάρων σε αναγεννόμενα περιφερικά νεύρα. Ο ρόλος της apoE στη διαδικασία αυτή φαίνεται διαγραμματικά στο Σχήμα 1.8. Μετά από τραυματισμό σύνθλιψης ή κόψιμου στο ισχιακό νεύρο αρουραίου, η apoE παράγεται και συσσωρεύεται σε επίπεδα 100-200 φορές μεγαλύτερα από αυτά σε μη τραυματισμένο νεύρο. Η εξωκυτταρική apoE μπορεί να προσλάβει επίπεδα που αντιπροσωπεύουν το 5% της ολικής διαλυτής πρωτεΐνης στο τμήμα του αναγενώμενου νεύρου. Η παραγωγή της apoE κορυφώνεται 7 με 10 ημέρες μετά τον τραυματισμό και επιστρέφει αργά στα συνήθη επίπεδα σε 8 εβδομάδες, όταν η αναγένεση του ισχιακού νεύρου του αρουραίου έχει ολοκληρωθεί.

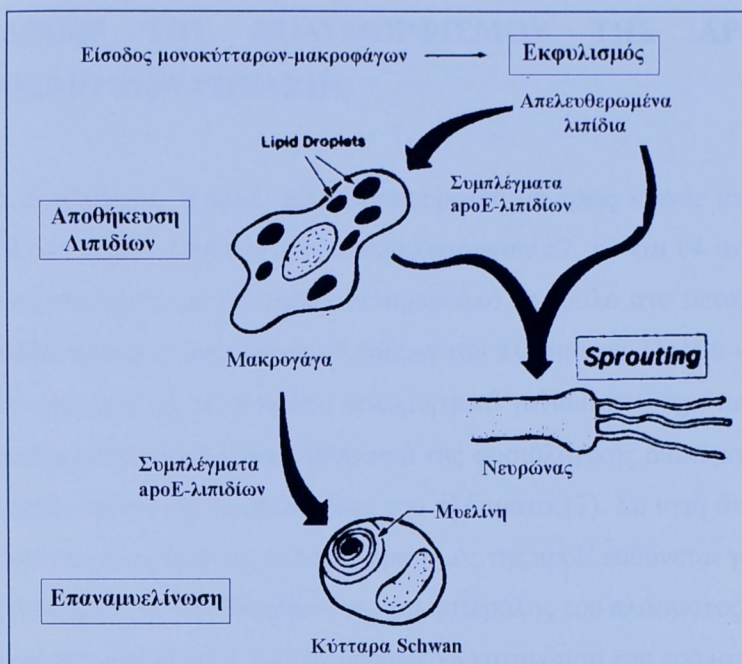
Ο τύπος κυττάρου που είναι υπεύθυνος για την παραγωγή της apoE στην περίπτωση αυτή είναι τα μακροφάγα. Αμέσως μετά τον τραυματισμό, τα μακροφάγα που διαμένουν στο ισχιακό νεύρο αρχίζουν να εκκρίνουν apoE. Επιπρόσθετα, ως μέρος της φλεγμονώδους αντίδρασης, τα μονοκύτταρα εισέρχονται γρήγορα στο σημείο του τραυματισμού, γίνονται μακροφάγα, και αρχίζουν να παράγουν apoE. Ο εκφυλισμός του νευρώνα και η καταστροφή της μυελίνης προχωράνε γρήγορα. Η περισσότερη χοληστερόλη, και πιθανόν και άλλα λιπίδια, συγκεντρώνονται στην περιοχή του εκφυλισμού και συγκεντρώνονται μέσα στα κύτταρα Schwann και στα μακροφάγα. Είναι πιθανό ότι η apoE που παράγεται μέσα στην κάκωση απομακρύνει τη χοληστερόλη από τα κυτταρικά και μυελινικά υπολείμματα και παραδίδει τα λιπίδια στα μακροφάγα, όπου και αποθηκεύονται.

Μέσα σε 1 ή 2 ημέρες, η αναγέννηση ξεκινά με το υπόλειμμα του νεύρου που εμφανίζει προς τα έξω πολυάριθμους νευρίτες. Συνήθως, μόνο ένας θα επιβιώσει και θα γίνει ο αναγεννημένος νευρώνας. Τα άκρα των νευριτών εμφανίζουν υψηλά επίπεδα υποδοχέων LDL. Πιθανότατα, οι υποδοχείς συμμετέχουν στην πρόσληψη χοληστερόλης για τη χρησιμοποίησή της στη βιοσύνθεση μεμβρανών. Η χοληστερόλη παρέχεται από τα τοπικά μακροφάγα που είναι «φορτωμένα» με λιπίδια ή από κυτταρικά συντρίμια.

Είναι πιθανό ότι τα συμπλέγματα apoE-λιπιδίων που είναι παρόντα στο διάμεσο υγρό παραδίδουν τη χοληστερόλη στους νευρίτες μέσω της διαδικασίας μεσολάβησης υποδοχέα. Τα συμπλέγματα apoE-λιπιδίων έχουν απομονωθεί από το τραυματισμένο τμήμα νεύρου και είναι ικανά να αλληλεπιδράσουν με τους LDL υποδοχείς νευριτών σε PC12 κύτταρα (φαιοχρωμοκύττωματική σειρά κυττάρων) που διατηρούνται σε καλλιέργεια. Τα αναπτυσσόμενα άκρα των PC12 κυττάρων έχουν υποδοχείς LDL που συνδέονται και εσωτερικεύουν τα συμπλέγματα HDL-apoE-λιπιδίων.

Μέσα σε 1 με 2 εβδομάδες, ξεκινά η επαναμυελίνωση των νευρώνων από τα κύτταρα Schwann. Τα λιπίδια που αποθηκεύονται στα κύτταρα Schwann εξαντλούνται και τότε τα κύτταρα Schwann αρχίζουν να εμφανίζουν υποδοχείς LDL, πιθανότατα για να διευκολύνουν την πρόσληψη της χοληστερόλης για το σχηματισμό μυελίνης. Είναι πιθανό ότι η χοληστερόλη των μακροφάγων απελευθερώνεται στα συμπλέγματα apoE-λιπιδίων ή στην HDL στο διάμεσο υγρό και ότι η apoE μεσολαβεί για την πρόσληψη της χοληστερόλης μέσω των υποδοχέων LDL των κυττάρων Schwann.

Το μοντέλο των νεύρων μπορεί να περιγράφει μια πιο γενική διαδικασία που λαμβάνει χώρα σε μεγαλύτερο ή μικρότερο εύρος σε διάφορους ιστούς ως απάντηση στον τραυματισμό και την επιδιόρθωση. Από τεχνολογική άποψη, φαίνεται ότι η φύση έχει κάνει το παν για την ανάπτυξη ενός συστήματος για την παγίδευση και αποθήκευση της χοληστερόλης (και πιθανώς άλλων λιπιδίων) και για την ανακατανομή της στα κύτταρα που απαιτούν χοληστερόλη για βιοσύνθεση. Η απολιποπρωτεΐνη E και ο LDL υποδοχέας διαδραματίζουν κεντρικούς ρόλους σ' αυτή τη διαδικασία(1).



Σχήμα 1.8. Σχήμα που δείχνει το ρόλο της apoE στην ανακατανομή λιπιδίων μεταξύ των κυττάρων μέσα στο τραυματισμένο ισχιακό νεύρο. Μετά τον τραυματισμό (σύνθλιψη ή κόψιμο) τα μονοκύτταρα-μακροφάγα εισέρχονται στο νεύρο και ο εκφυλισμός ξεκινά. Τα λιπίδια (κυρίως η χοληστερόλη) αποθηκεύονται μέσα στα μακροφάγα. Μερική από τη χοληστερόλη αυτή προέρχεται από τον εκφυλιζόμενο ιστό και μπορεί να μεταφερθεί στα μακροφάγα μέσω πρόσληψης στην οποία μεσολαβεί η apoE. Γρήγορα αρχίζουν να εμφανίζονται εκβλαστήσεις νέων νευριτών (sprouts) που εμφανίζουν LDL υποδοχείς στις άκρες τους που μεγαλώνουν (πιθανόν με σκοπό την πρόσληψη χοληστερόλης για τη βιοσύνθεση μεμβρανών). Αργότερα, συμβαίνει η επαναμυελίνωση του αναγενώμενου νευρώνα από τα κύτταρα Schwann. Τα κύτταρα Schwann εμφανίζουν υποδοχείς LDL κατά τη φάση αυτή της αναγέννησης. Τα συμπλέγματα της απολιποπρωτεΐνης E με τα λιπίδια ή της HDL με την apoE φαίνεται τι συμμετέχουν στην ανακατανομή της χοληστερόλης στα κύτταρα Schwann και τους αναπτυσσόμενους νευρίτες(1).

1.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ.

Όπως αναφέρθηκε, η αροΕ είναι πολυμορφική με τρεις κοινές ισομορφές, τις αροΕ2, αροΕ3 και αροΕ4 (προϊόντα των αλληλομόρφων ε2, ε3 και ε4 αντίστοιχα). Ο πολυμορφισμός της αροΕ, με δεδομένο το σημαντικό της ρόλο στο μεταβολισμό των λιπών, επηρεάζει άμεσα τα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος. Πρέπει να τονίσουμε ότι το γονίδιο της αροΕ είναι το πρώτο πολυμορφικό γονίδιο που έχει περιγραφεί, το οποίο εμπλέκεται μεταβολικά στον καθορισμό της φυσιολογικής διακύμανσης μεταξύ των ατόμων όσον αφορά τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος(7). Σε υγιή άτομα, λοιπόν, σύμφωνα με εκτεταμένες έρευνες, ο πολυμορφισμός της αροΕ ευθύνεται για το 5 μέχρι και 15% της διακύμανσης των επιπέδων της χοληστερόλης του πλάσματος γεγονός που καθιστά απαραίτητη την έρευνα για την περαιτέρω κατανόηση του τρόπου λειτουργίας των ισομορφών της (8). Και οι δύο συνήθεις ισομορφές, αροΕ2(Arg¹⁵⁸→Cys) και αροΕ4(Cys¹¹²→Arg) διαφέρουν λειτουργικά από την πιο συχνή ισομορφή αροΕ3. Ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έχουν δείξει ότι η αροΕ2 έχει σημαντικά μειωμένη ικανότητα σύνδεσης με τους LDL υποδοχείς (<2% της αροΕ3 γεγονός που σχετίζεται με μείωση του in vivo καταβολισμού της αροΕ2. Αν και η in vitro ικανότητα σύνδεσης της αροΕ4 με τους LDL υποδοχείς δε διαφέρει σημαντικά από αυτή της αροΕ3, εντούτοις ο in vivo καταβολισμός της αροΕ4 είναι αυξημένος (6). Ως αποτέλεσμα των λειτουργικών διαφορών των τριών κοινών ισομορφών, παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος. Εκτεταμένες έρευνες έχουν δείξει ότι στους φορείς του ε2 αλληλομόρφου τα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης είναι χαμηλότερα από τους ομοζυγώτες Ε3/3, ενώ οι φορείς του ε4 αλληλομόρφου χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα(6-8, 10-18). Σημαντικές επιδράσεις έχουν αναφερθεί και για τα επίπεδα HDL και τριγλυκεριδίων όπως θα δούμε και παρακάτω.

Η μειωμένη ικανότητα σύνδεσης της αροΕ2 στους LDL υποδοχείς είναι αναμενόμενο να έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση των λιποπρωτεϊνών αυτών στο πλάσμα (δηλαδή συσσώρευση υπολειμμάτων χυλομικρών και VLDL, IDL, και HDL_C).

Στην πραγματικότητα, ωστόσο, η συσσώρευση των λιποπρωτεϊνών αυτών είναι μόνο μέτρια στους περισσότερους E2 ομοζυγώτες, που αντίθετα παρουσιάζουν μεγάλη μείωση της συγκέντρωσης των LDL. Συνολικά, αυτή είναι η εικόνα μιας μορφής δυσλιποπρωτεϊναιμίας(αυτοσωμική υπολειπόμενη) που χαρακτηρίζεται από ολική χοληστερόλη κάτω του φυσιολογικού και την παρουσία υπολειμμάτων λιποπρωτεϊνών που μπορούν να φανούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ως κλάσματα β-VLDL. Έχει βρεθεί ότι το 10% των ατόμων με πρωτοπαθή υποχοληστερολαιμία είναι E2/2 ομοζυγώτες και παρουσιάζουν αυτό που αποκαλείται πρωτοπαθής δυσβηταλιποπρωτεϊναιμία. Η σημαντική επίδραση της ομοζυγότητας της apoE2 στη χοληστερόλη του πλάσματος και τις συγκεντρώσεις λιποπρωτεϊνών έδωσε ώθηση στην έρευνα πάνω στην πιθανή in vivo επίδραση της ετεροζυγότητας του ε2 αλληλόμορφου στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Οι apoE2 ετεροζυγώτες συνιστούν ένα σημαντικό ποσοστό σε όλους τους πληθυσμούς κυμαινόμενοι από 5.4% στους Φινλανδούς στο 21.3% στον πληθυσμό της Σιγκαπούρης. Για την ακρίβεια, παλιότερες έρευνες στο γερμανικό πληθυσμό φανέρωσαν σημαντικές επιδράσεις του ε2 αλληλομόρφου (το αλληλόμορφο που κωδικοποιεί για την apoE2) στην ολική χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια, τη VLDL χοληστερόλη και τα VLDL τριγλυκερίδια του πλάσματος. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι η παρουσία του ε2 σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης. Επιπρόσθετα, φανέρωσαν ότι υπάρχει σχέση του αλληλομόρφου E4 με υψηλή χοληστερόλη. Μάλιστα, τα επίπεδα της χοληστερόλης αυξάνονται κατά την ακόλουθη σειρά: 2/2, 2/3, 3/3, 4/3 και 4/4. Ο πληθυσμός της Φινλανδίας, με την υψηλή συχνότητα του αλληλομόρφου ε4, παρείχε μια εξαιρετική ευκαιρία να εξεταστεί η υπόθεση αλλά και να επεκταθούν περαιτέρω τα στοιχεία σχετικά με τις επιδράσεις του πολυμορφισμού της apoE. Έτσι, κατέστη δυνατό ναδειχθεί ότι οι ομοζυγώτες apoE4/4 και οι E3/4 ετεροζυγώτες όντως έχουν αξιοσημείωτα υψηλότερη μέση ολική και LDL χοληστερόλη σε σχέση με τα E3/3 άτομα. Η ίδια τάση των επιδράσεων του apoE γονιδίου στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος παρατηρήθηκε σε πάρα πολλές άλλες έρευνες ανά τον κόσμο.

Συνολικά, λοιπόν, το συμπέρασμα ήταν ότι σε σχέση με το πιο συχνό γονίδιο E3, τα δύο άλλα συνήθη αλληλόμορφα (E2 και E4) επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις των

λιπιδίων και των απολιποπρωτεϊνών του πλάσματος αλλά με αντίθετο τρόπο, καθορίζοντας έτσι τη διακύμανση στους πληθυσμούς κατά ένα σημαντικό ποσοστό(6).

Σε μια μεγάλη έρευνα, εξετάστηκε ο πολυμορφισμός της apoE και η επίδρασή του στα λιπίδια του πλάσματος σε εννιά πληθυσμοί διαφορετικής εθνικότητας και από διάφορα μέρη του κόσμου. Παρά τις διαφορές στη συχνότητα των τριών αλληλομόρφων, η ανάλυση της διακύμανσης των επιδράσεων του πληθυσμού και του τύπου της apoE στα επίπεδα της χοληστερόλης δεν έδειξε κάποια αξιοσημείωτη επίδραση μεταξύ των πληθυσμών. Όλοι οι πληθυσμοί έδειξαν ότι η δράση του αλληλομόρφου E2 οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης του πλάσματος, ενώ όλοι εκτός από τον πληθυσμό της Μαλαισίας παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης παρουσία του γονιδίου E4. Η έλλειψη της επίδρασης αυτής στους Μαλαισιανούς δεν ήταν επαρκούς μεγέθους για να δημιουργήσει μια στατιστικά σημαντική διαφορά στις επιδράσεις των αλληλομόρφων μεταξύ των διαφόρων ομάδων. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι τα αλληλόμορφα της apoE δρουν με ένα σχετικά μοναδικό τρόπο σε διαφορετικούς πληθυσμούς παρά τις διαφορές σε γενετικό υπόβαθρο και περιβάλλον(10).

Σε μία άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα στοιχεία από 3485 λευκούς και Αφρικανοαμερικάνους, άντρες και γυναίκες, μεταξύ 25 και 37 ετών στα πλαίσια της έρευνας CARDIA Study (1992-1993). Παρά τις διαφορές στη συχνότητα των αλληλόμορφων, ο φαινότυπος της apoE έδειξε ότι έχει αξιοσημείωτα ίδιες επιδράσεις στις λιποπρωτεΐνες στις δύο φυλετικές ομάδες. Και στους λευκούς και στους Αφρικανοαμερικάνους, οι φορείς του ε4 αλληλόμορφου είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικής και LDL χοληστερόλης ενώ οι φορείς του ε2 είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις πάντα σε σχέση με τους ομοζυγώτες E3/3. Οι διαφορές στις συγκεντρώσεις ήταν ίδιες και στα δύο φύλα όπως και στις φυλές. Επίσης, φάνηκε ότι η apoE συνδέεται με την HDL καθώς τα άτομα με την apoE2 είχαν τις υψηλότερες και τα άτομα με την apoE4 τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Τέλος, όσον αφορά τα τριγλυκερίδια τα άτομα που είχαν ένα τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο ε2 ή ε4 παρουσίασαν αυξημένες συγκεντρώσεις σε σχέση με τους E3/3(11).

Η επίδραση του πολυμορφισμού της apoE στον καθορισμό της διακύμανσης της ολικής και LDL χοληστερόλης μελετήθηκε, επίσης, σε λευκό πληθυσμό του

Κολοράντο(Η.Π.Α.).Και στην έρευνα αυτή, σε σύγκριση με τον φαινότυπο E3/3, η μέση ολική χοληστερόλη και η LDL ήταν χαμηλότερες στον φαινότυπο E2/3 και υψηλότερες στον E4/3 και στα δύο φύλα. Αν και υπήρχαν μόνο δύο άτομα με φαινότυπο E2/2 οι συγκεντρώσεις της ολικής και LDL χοληστερόλης ήταν οι χαμηλότερες από όλες τις κατηγορίες φαινοτύπων. Παρομοίως, το μοναδικό αρσενικό άτομο με φαινότυπο E4/4 είχε τις υψηλότερες τιμές μέσης ολικής και LDL χοληστερόλης. Συνολικά, σε άνδρες και γυναίκες, το γονίδιο της apoE ήταν υπεύθυνο για το 9.2% και 12.4% αντίστοιχα της διακύμανσης της ολικής χοληστερόλης και για το 15.1% και 6.6% αντίστοιχα της διακύμανσης της LDL. Τέλος, η HDL χοληστερόλη είχε κατά μέσο όρο υψηλότερες συγκεντρώσεις στους άντρες και χαμηλότερες στις γυναίκες σε σχέση με τους μέσους όρους στους φαινότυπους E3/3 και E3/4(12).

Επιπρόσθετα, η επίδραση του πολυμορφισμού της apoE στα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, της HDL και της LDL αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας σε 546 Κινέζους της Ταϊβάν. Τα χαμηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και LDL βρέθηκαν στην ομάδα των ατόμων E2/3 για άντρες και γυναίκες και υπήρχαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα των E3/4. Παρουσιάστηκε, επίσης, η τάση οι φορείς του E2 αλληλομόρφου να έχουν τα υψηλότερα επίπεδα HDL. Στις έξι γυναίκες και στον μοναδικό άντρα με φαινότυπο E2/2 η ολική χοληστερόλη και η LDL είχαν τα χαμηλότερα επίπεδα από όλα τα άτομα του δείγματος. Το αντίθετο ίσχυε για το μοναδικό άντρα με φαινότυπο E4/4(13).

Η έρευνα για τη μέση επίδραση του αλληλόμορφου e4 στα λιπίδια Ισπανικού πληθυσμού έδειξε την αύξηση των επιπέδων της ολικής και LDL χοληστερόλης των φορέων του αλληλόμορφου αυτού. Αντίστοιχα, το μέσο αποτέλεσμα του αλληλομόρφου e2 στα επίπεδα των λιπιδίων ήταν η ελάττωση της ολικής και LDL χοληστερόλης του ορού. Βρέθηκαν, επίσης, σημαντικά υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων σε φορείς του E4 αλληλομόρφου. Τα στοιχεία της συγκεκριμένης έρευνας επιβεβαιώνουν προηγούμενες έρευνες σχετικά με το πλεονεκτικότερο λιπιδαιμικό προφίλ και τους αντίστοιχα χαμηλότερους δείκτες καρδιαγγειακών παθήσεων σε πληθυσμούς με χαμηλή έκφραση του αλληλομόρφου e4. Ένας τέτοιος πληθυσμός είναι και ο Ισπανικός(14).

Τέλος, στα πλαίσια έρευνας σε νεαρούς Φινλανδούς (εξαετής follow-up study) προσδιορίστηκε ο φαινότυπος της apoE και τα λιπίδια του πλάσματος σε 1577 άτομα ηλικίας 3 έως 18 χρόνια. Η συγκέντρωση της ολικής χοληστερόλης και της LDL αυξάνονταν ανάλογα με το φαινότυπο της apoE κατά την σειρά E2/2, E2/3, E4/2, E3/3, E4/3, E4/4. Το αξιοσημείωτο είναι ότι η αύξηση αυτή ήταν ήδη εμφανής στα παιδιά τριών χρονών. Γενικότερα, παρατηρήθηκε και στα δύο φύλα, αλλά ήταν περισσότερο σαφής στα αρσενικά παρά στα θηλυκά άτομα(15).

1.4.1. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΚΑΙ ΕΘΝΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΔΙΑΙΤΑ ΚΑΙ ΦΥΛΟ.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 1.1 του παραρτήματος υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές στη συχνότητα των συνήθων αλληλομόρφων της apoE μεταξύ των διαφόρων ανθρώπινων πληθυσμών(16). Το αλληλόμορφο apoE2 συζητείται τελευταία ότι έχει Καυκάσια προέλευση, καθώς είναι απόν από αυτόχθονες πληθυσμούς (ιθαγενείς Αυστραλοί και Ινδιάνοι) ή βρίσκεται με χαμηλή συχνότητα σε πληθυσμούς που τελευταία μόνο έχουν εκτεθεί σε ροή Καυκασιανών γονιδίων (κάτοικοι νησιών Ειρηνικού, Νιγηριανοί Μαύροι). Η μόνη εξαίρεση στην υπόθεση αυτή είναι το εύρημα ότι οι Παπούα της Νέας Γουινέας παρουσιάζουν την υψηλότερη συχνότητα apoE2 από οποιονδήποτε άλλο πληθυσμό για τον οποίο υπάρχουν αναφορές. Δεν είναι βέβαια γνωστό αν η apoE2 που παρατηρείται στον απομονωμένο αυτό πληθυσμό έχει την ίδια μοριακή βάση με τη συνήθη apoE2(16).

Εύλογη απορία είναι αν οι επιδράσεις του γονιδίου της apoE είναι ανεξάρτητες από το εθνικό και πολιτιστικό υπόβαθρο. Καταρχήν, πλήρης έλλειψη της επίδρασης της apoE στα επίπεδα των λιπιδίων έχει αναφερθεί(8) για τους πληθυσμούς των Ινουιτών της Γροιλανδίας και των Khoi San της Νότιας Αφρικής, ενώ μικρές μόνο επιδράσεις του πολυμορφισμού της apoE στα επίπεδα χοληστερόλης αναφέρθηκαν μεταξύ των περισσότερων από 8000 συμμετέχοντες της Turkish Heart Study, στους Orang Asili της Μαλαισίας και στους Κινέζους της Ταϊβάν.

Σε έρευνα που έγινε σε πληθυσμούς Γερμανών, Φινλανδών, Ιαπώνων και κατοίκων της Σιγκαπούρης προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα. Η επίδραση του

αλληλομόρφου ε2 ήταν της ίδιας έκτασης σε όλους τους πληθυσμούς που εξετάστηκαν. Η ολική χοληστερόλη του πλάσματος στους ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες E2 ήταν περίπου 40mg/dl και 15mg/dl χαμηλότερη από αυτή στους E3/3 ομοζυγώτες ανεξάρτητα από το εθνικό και πολιτιστικό υπόβαθρο του πληθυσμού. Αντίθετα, η σχέση του αλληλομόρφου ε4 με υψηλή χοληστερόλη ήταν πολύ σημαντική μόνο στους Φινλανδούς, μέτρια στους Γερμανούς, αλλά λιγότερη σημαντική ή απύσχα στους πληθυσμούς της Ιαπωνίας και της Σιγκαπούρης. Για το λόγο αυτό, συμπεραίνουμε ότι η επίδραση του ε4 στη χοληστερόλη του πλάσματος δεν είναι ανεξάρτητη από πολιτιστικό και/ή εθνικό υπόβαθρο. Προς το παρόν δεν είναι γνωστό γιατί οι Φινλανδοί παρουσιάζουν ισχυρή συσχέτιση του ε4 αλληλομόρφου με υψηλές συγκεντρώσεις χοληστερόλης, ενώ το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρείται στον πληθυσμό της Σιγκαπούρης (6).

Οι εξηγήσεις για τις διαφορές μεταξύ των πληθυσμών, όσον αφορά την επίδραση του πολυμορφισμού της apoE στα επίπεδα της χοληστερόλης του πλάσματος, είναι άγνωστες, αν και το φύλο, η εθνική προέλευση, ο τρόπος ζωής και η διαίτα θεωρούνται ως οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν(8). Στην έρευνα που αναφέρθηκε πριν έγινε η υπόθεση ότι οι πληθυσμοί των Φινλανδών, Γερμανών, Ιαπώνων και κατοίκων της Σιγκαπούρης διαφέρουν σημαντικά ως προς τις διατροφικές τους συνήθειες (π.χ., πρόσληψη λίπους) και ότι τα άτομα με το ε4 αλληλομόρφο μπορεί να αποκτούν υψηλά επίπεδα χοληστερόλης μόνο όταν καταναλώνουν δίαιτες με υψηλό λίπος. Η πρόσληψη λίπους είναι υψηλή στους Φινλανδούς, όχι τόσο υψηλή στους Γερμανούς και χαμηλή στους Ιάπωνες και στον πληθυσμό της Σιγκαπούρης. Έτσι, η σχέση του ε4 αλληλομόρφου με την υψηλή χοληστερόλη στους Φινλανδούς μπορεί να είναι ένα παράδειγμα αλληλεπίδρασης γονιδίων-περιβάλλοντος(6).

Από την άλλη, η αλληλεπίδραση του φύλου με την επίδραση του πολυμορφισμού της apoE στη χοληστερόλη του πλάσματος έχει προταθεί στο παρελθόν. Τελευταία, η αλληλεπίδραση αυτή αναφέρθηκε από δύο ανεξάρτητες έρευνες(8). Αποδείχτηκε ότι στους Ισπανούς από την κοιλιάδα San Luis Colorado, μόνο οι γυναίκες έδειξαν την αύξηση της LDL χοληστερόλης που προκαλεί η apoE4, ενώ την αύξηση αυτή έδειξαν οι μη Ισπανοί της ίδιας περιοχής, άντρες και γυναίκες(17).

Επίσης, στην έρευνα Framingham Offspring η αυξητική επίδραση της apoE4 στην LDL χοληστερόλη ήταν αξιόλογα υψηλότερη στις γυναίκες(18).

Τα ευρήματα αυτά δείχνουν όχι μόνο ότι τα επίπεδα ενός χαρακτηριστικού (π.χ. χοληστερόλη πλάσματος) μπορεί να επηρεάζονται από τον πολυμορφισμό της apoE αλλά και ότι το λιπιδικό προφίλ κινδύνου ενός ατόμου (π.χ. υψηλά επίπεδα LDL χοληστερόλης μαζί με χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης) μπορεί να επηρεάζεται από παράγοντες που αλληλεπιδρούν: φύλο και πολυμορφισμός της apoE ή διαίτα και πολυμορφισμός της apoE(8).

Μια άλλη πολύ ενδιαφέρουσα έρευνα μελέτησε το αν επηρεάζει η διακύμανση του περιβάλλοντος την επίδραση του φαινοτύπου της apoE στα λιπίδια του πλάσματος. Η έρευνα έγινε σε μονοζυγωτικά δίδυμα στη Δανία. Ερευνήθηκε, λοιπόν, η επίδραση του πολυμορφισμού της apoE στις διαφορές μεταξύ των επιπέδων της χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων πλάσματος καθώς και των LDL στα δίδυμα, και εξετάστηκε αν υπήρχε αλληλεπίδραση μεταξύ του πολυμορφισμού της apoE και περιβαλλοντικών παραγόντων. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν ότι τα επίπεδα των λιπιδίων μεταξύ των διδύμων σε όλα τα ζεύγη του δείγματος δεν είχαν σημαντική διαφορά σε καμία από τις κύριες φαινοτυπικές ομάδες της apoE (E2/3, E3/3, E4/3). Το αποτέλεσμα αυτό έδειξε ότι η επίδραση του γονιδίου της apoE στα λιπίδια του πλάσματος δεν επηρεάζεται από τη διακύμανση του περιβάλλοντος. Το γεγονός αυτό ταυτοποιεί το γονίδιο της apoE ως γονίδιο με άμεση επίδραση στα λιπίδια του πλάσματος, που υποστηρίζει περαιτέρω την υπόθεση ότι ο πολυμορφισμός της apoE παίζει ένα σημαντικό και ανεξάρτητο ρόλο στον καθορισμό των επιπέδων των λιπιδίων του πλάσματος(19).

1.4.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Ε ΣΤΙΣ ΟΔΟΥΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.

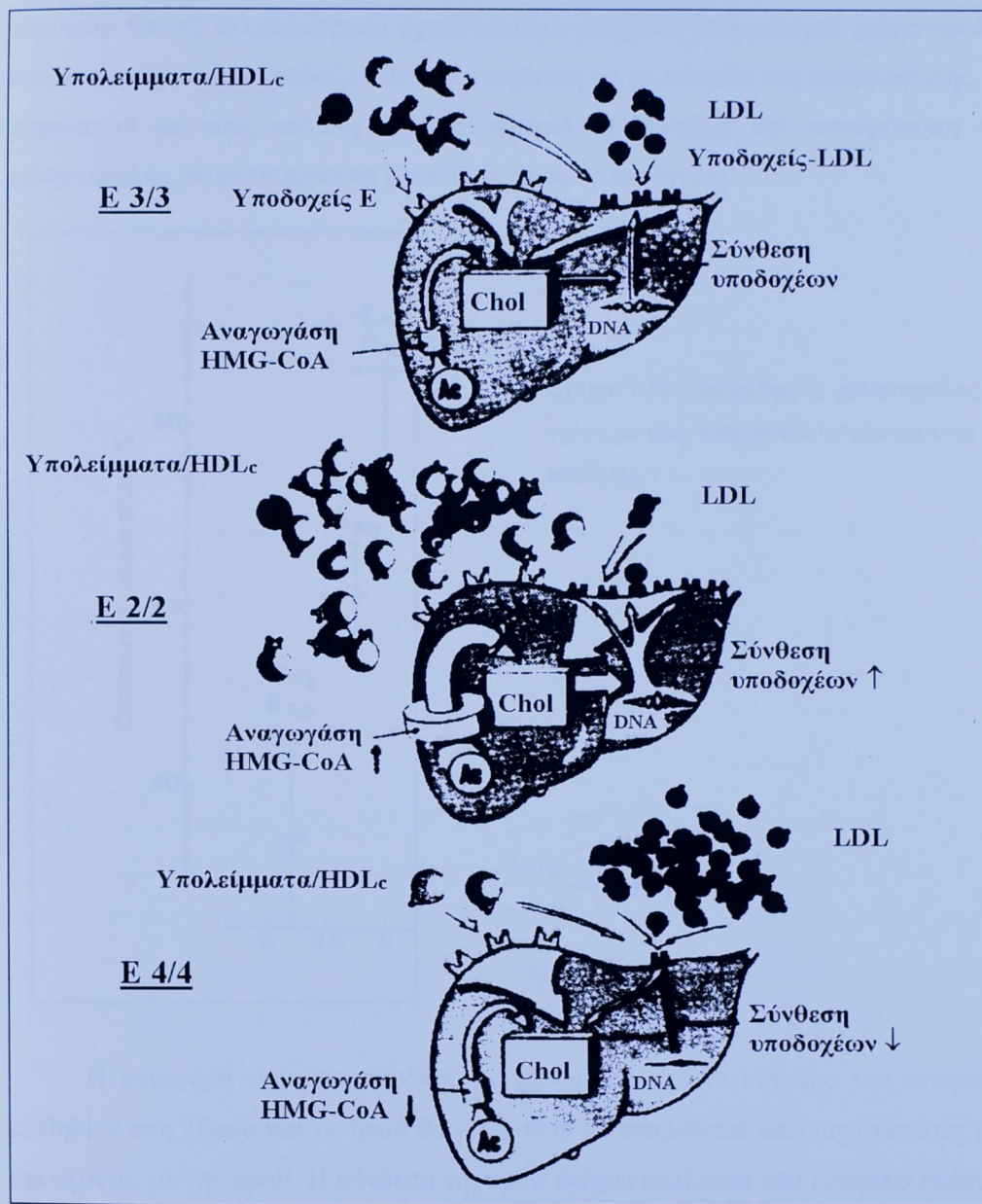
Η ομοιοστάση της χοληστερόλης στο ανθρώπινο σώμα ρυθμίζεται από μια σειρά πολύπλοκων μηχανισμών. Το ήπαρ παίζει ένα κεντρικό ρόλο στις διαδικασίες αυτές. Όπως περιγράφηκε νωρίτερα, δύο διαφορετικοί υποδοχείς υψηλής συγγένειας, για τις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν apoE, υπάρχουν στις μεμβράνες των ηπατικών κυττάρων, οι LDL υποδοχείς και οι υποδοχείς apoE (υποδοχείς υπολειμμάτων). Αν και η συγκέντρωση των LDL υποδοχέων στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων υπόκειται σε παλίνδρομη ρύθμιση (up και down regulation), δε συμβαίνει το ίδιο για τους υποδοχείς apoE. Η δυαδικότητα των υποδοχέων αυτών είναι ιδιαίτερα σημαντική για το περιεχόμενο της συζήτησής μας. Η χοληστερόλη που μεταφέρεται στα κύτταρα με ενδοκύτωση μέσω υποδοχέων θεωρείται ότι ρυθμίζει δύο σημαντικά βήματα που συμμετέχουν στην ενδοκυτταρική ομοιοστάση της χοληστερόλης. Όπως έδειξαν οι Brown και Goldstein, αυξημένη πρόσληψη χοληστερόλης από τα κύτταρα οδηγεί σε αναστολή της 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλο συνένζυμοΑ (HMG-CoA) αναγωγάσης, του ενζύμου δηλαδή που είναι υπεύθυνο για την ενδογενή σύνθεση χοληστερόλης, και οδηγεί έμμεσα σε μείωση του αριθμού (down-regulation) των LDL υποδοχέων που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Να σημειώσουμε εδώ, ότι οι υποδοχείς apoE που μεταφέρουν χοληστερόλη εξωγενούς προέλευσης στο ήπαρ δεν υπόκεινται σε ρύθμιση από την εισροή της χοληστερόλης. Από τα παραπάνω είναι δυνατόν να εξηγηθούν οι επιδράσεις του πολυμορφισμού της apoE στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος (Σχήμα 1.9). Η κατάσταση στους E2/2 ομοζυγώτες δείχνει παράδοξη εκ πρώτης όψεως. Λόγω της μειωμένης ικανότητας της apoE2 να συνδεθεί με τους LDL υποδοχείς και τους υποδοχείς apoE (εξήγηση της μειωμένης ικανότητας σύνδεσης παρακάτω), αυτό που είναι αναμενόμενο είναι μια συσσώρευση των υπολειμμάτων λιποπρωτεϊνών και κατ' επέκταση υπερλιπιδαιμία. Ωστόσο, οι περισσότεροι E2/2 ομοζυγώτες έχουν μικρότερα του φυσιολογικού παρά αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης και χαμηλή LDL. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι λόγω του καθυστερούμενου καταβολισμού των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν apoE2, λιγότερη χοληστερόλη εξωγενούς προέλευσης (υπολείμματα) αλλά και από την

περιφέρεια (apoE-HDL) εισέρχεται στο ήπαρ μέσω πρόσληψης που μεσολαβείται από την apoE. Ως απάντηση στο γεγονός αυτό, οι υποδοχείς LDL πιθανότατα ενεργοποιούνται σε μεγαλύτερο βαθμό (up-regulation) από το φυσιολογικό, με αποτέλεσμα την αυξημένη πρόσληψη των LDL και έτσι την ελάττωση της LDL χοληστερόλης του πλάσματος. Παράλληλα, μια καθυστέρηση στην ενδομετατροπή της IDL σε LDL μπορεί επίσης να συνεισφέρει στη χαμηλή LDL στο πλάσμα των E2/2 ομοζυγωτών. Η υπόθεση αυτή εξηγεί ικανοποιητικά την δυσλιποπρωτεϊναιμία στους ομοζυγώτες E2/2 και με το ίδιο σκεπτικό τη μέτρια ελάττωση της LDL χοληστερόλης στο πλάσμα των ετεροζυγωτών του ε2. Ωστόσο, η εύθραυστη ισορροπία στους E2/2 ομοζυγώτες και σε μικρότερο βαθμό στους ετεροζυγώτες μπορεί εύκολα να διαταραχθεί, οδηγώντας στην παράδοση κατάσταση όπου το αλληλόμορφο ε2 συνδέεται με χαμηλές συγκεντρώσεις χοληστερόλης και υπερλιπιδαιμία.

Ένας παρόμοιος, αν και αντίθετος, μηχανισμός μπορεί να ευθύνεται για τη σχέση του αλληλομόρφου ε4 με υπερχοληστερολαιμία. Έρευνες από τους Greg et al. έχουν δείξει ότι η apoE4 καταβολίζεται πιο γρήγορα από την apoE3. Αυτό βρίσκεται σε ταύτιση με τις παρατηρήσεις ότι οι μέσες συγκεντρώσεις της apoE στους ομοζυγώτες E4/4 είναι σημαντικά χαμηλότερες σε σχέση με άλλους φαινότυπους.

Λόγω του αυξημένου καταβολισμού των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν apoE4, περισσότερη χοληστερόλη μεταφέρεται στα ηπατικά κύτταρα στα άτομα που διαθέτουν αλληλόμορφο ε4. Αυτό θα μπορούσε θεωρητικά να οδηγήσει σε μείωση του αριθμού των υποδοχέων LDL (down-regulation) στους E4/4 ομοζυγώτες και πιθανά στα άτομα E4/3 και στην ακόλουθη αύξηση των LDL στο πλάσμα τους (Σχήμα 1.9). Μια συνέπεια του μοντέλου αυτού είναι ότι οι ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες του ε4 θα έπρεπε να είναι πιο ευαίσθητοι στην ανάπτυξη υπερχοληστερολαιμίας ως απάντηση στη διαιτητική πρόσληψη χοληστερόλης. Το αλληλόμορφο ε4 μπορεί να είναι ένας παράγοντας που εμπλέκεται στην παθογένεση πολυγονιδιακών ή πολυπαραγοντικών μορφών υπερχοληστερολαιμίας. Αυτό συμφωνεί με την παρατήρηση ότι το αλληλόμορφο ε4 συνδέεται με υπερχοληστερολαιμία σε υπερλιπιδαιμικά άτομα. Επιπλέον, το μοντέλο μπορεί να εξηγεί τα αποτελέσματα από γενετικές έρευνες σε πληθυσμούς, όπου μια ισχυρή συσχέτιση του αλληλομόρφου ε4 με υψηλές συγκεντρώσεις χοληστερόλης παρατηρήθηκε σε πληθυσμούς με υψηλή πρόσληψη

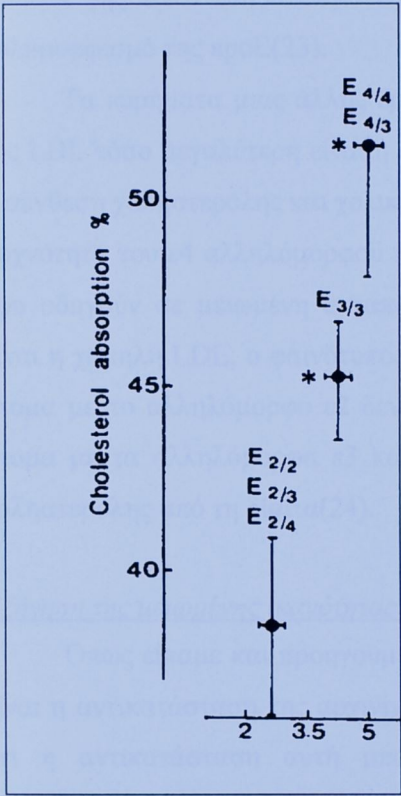
λίπους (Φινλανδοί και Γερμανοί) αλλά όχι σε αυτούς με χαμηλή πρόσληψη λίπους (Ιάπωνες και κάτοικοι Σιγκαπούρης)(6).



Σχήμα 1.9. Επίδραση του πολυμορφισμού της apoE στην πρόσληψη των λιποπρωτεϊνών από το ήπαρ(6).

Από την άλλη, έχει παρατηρηθεί σε έρευνες ότι υπάρχει σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού της apoE και της απορρόφησης χοληστερόλης. Η σχέση μεταξύ της απορρόφησης χοληστερόλης και του φαινότυπου της apoE ερευνήθηκε σε Φινλανδούς

μεσήλικες άντρες. Η έρευνα έδειξε ότι οι διάφορες μορφές της apoE μπορεί να επηρεάζουν την εντερική απορρόφηση χοληστερόλης (Σχήμα 1.10). Συγκεκριμένα, η παρουσία του ε2 αλληλόμορφου σχετίστηκε με μειωμένη απορρόφηση χοληστερόλης ενώ οι φορείς του ε4 επέδειξαν θετική συσχέτιση με τα επίπεδα της απορρόφησης. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η apoE μπορεί να ρυθμίζει την απορρόφηση της χοληστερόλης μπορούν μόνο να υποτεθούν προς το παρόν(23).



Σχήμα 1.10. Απορρόφηση χοληστερόλης σε σχέση με τους διαφορετικούς φαινότυπους της apoE(23).

Η μεταφορά της χοληστερόλης ως χυλομικρά από τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου στη λέμφο και το ήπαρ θα μπορούσε να επηρεαστεί από μηχανισμούς που σχετίζονται με την apoE. Η σύνθεση της apoE δείχνει αμελητέα στο εντερικό επιθήλιο του αρουραίου. Αν αυτό ισχύει και στον άνθρωπο, είναι δύσκολο να σχετιστούν τα ευρήματα της προαναφερθείσας έρευνας με μια άμεση δράση της apoE σε επίπεδο εντερικού επιθηλίου. Αν η κυκλοφορούσα apoE μπορούσε να συμμετέχει, η εμπλοκή θα μπορούσε να λαμβάνει χώρα στις μεσεντερικές λάχνες καθώς και στα λεμφαγγεία, αφού η apoE είναι επίσης παρούσα στη λέμφο. Η ρυθμιστική επίδραση της apoE στην

επάρκεια της απορρόφησης της χοληστερόλης θα μπορούσε να μεσολαβείται από κάποιον άγνωστο δευτερεύοντα αγγελιοφόρο, π.χ., μέσω ενός χολικού σήματος από το ήπαρ στο εντερικό επιθήλιο.

Όποιοι και να είναι ο μηχανισμός που μεσολαβεί για την σχέση του πολυμορφισμού της apoE και της απορρόφησης χοληστερόλης, πρέπει να σημειωθεί ότι η επί τις εκατό απορρόφηση χοληστερόλης δείχνει να αυξάνεται παράλληλα με τα επίπεδα της LDL του πλάσματος, τα οποία με τη σειρά τους σχετίζονται με τον πολυμορφισμό της apoE(23).

Τα ευρήματα μιας άλλης έρευνας έδειξαν ότι όσο πιο υψηλά είναι τα επίπεδα της LDL τόσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση της χοληστερόλης και τόσο μικρότερη η σύνθεση χοληστερόλης και χολικών οξέων. Το σημαντικό ήταν ότι στα άτομα αυτά η συχνότητα του ε4 αλληλόμορφου ήταν μεγαλύτερη. Παρατηρήθηκε ότι οι παράγοντες που οδηγούν σε μειωμένη ανταπόκριση στην πρόσληψη χοληστερόλης της δίαιτας είναι η χαμηλή LDL, ο φαινότυπος apoE2 και η επαρκής σύνθεση χολικών οξέων. Τα άτομα με το αλληλόμορφο ε2 δεν παρουσίαζαν ικανοποιητική ανταπόκριση, ενώ τα άτομα με τα αλληλόμορφα ε3 και ε4 ήταν ευαίσθητα στην αυξανόμενη πρόσληψη χοληστερόλης από τη διαίτα(24).

Εξήγηση της μειωμένης ικανότητας σύνδεσης της apoE2 στον LDL υποδοχέα.

Όπως είπαμε και προηγουμένως, η διαφορά της apoE2 σε σχέση με την apoE3 είναι η αντικατάσταση της αργινίνης με κυστεΐνη στη θέση 158. Θεωρήθηκε, λοιπόν, ότι η αντικατάσταση αυτή μπορεί να είναι υπεύθυνη για την ελαττωματική αλληλεπίδραση της apoE2 με τον υποδοχέα LDL της επιφάνειας των κυττάρων. Σημαντική προσοχή δόθηκε στην πιθανότητα ότι ένα θετικά φορτισμένο αμινοξύ στη θέση 158, όπως δηλαδή συμβαίνει στην apoE3 και E4, είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική δυνατότητα σύνδεσης. Για την εξερεύνηση της πιθανότητας αυτής, σε αντίστοιχη έρευνα(9), η κυστεΐνη της apoE2 μετατράπηκε με ειδική διαδικασία (επίδραση κυστεαμίνης) σε ένα θετικά φορτισμένο ανάλογο λυσίνης. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα μια αξιοσημείωτη αύξηση της ικανότητας σύνδεσης της apoE2 (σχεδόν οκταπλάσια ικανότητα). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η ελαττωματική σύνδεση της

αποΕ2 οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην αλλαγή της αργινίνης από κυστεΐνη στη θέση 158.

Αν και η επίδραση της κυστεαμίνης μετέτρεψε την κυστεΐνη σε ένα ανάλογο λυσίνης εισαγάγοντας μια θετική φόρτιση, ήταν προφανές ότι το ανάλογο αυτό δεν ήταν ισοδύναμο με την εισαγωγή αργινίνης όπως υπάρχει στις αποΕ3 και Ε4. Παρά την αναμφισβήτητη αύξηση της ικανότητας σύνδεσης της αποΕ2 μετά την επίδραση της κυστεαμίνης, η ετερογένεια της ικανότητας αυτής σε σχέση με την αντίστοιχη ικανότητα των Ε3 και Ε4 ήταν εμφανής. Είναι πολύ πιθανό ότι υπάρχουν επιπρόσθετες διαφορές μεταξύ της αποΕ2 και αποΕ3. Οι διαφορές αυτές μπορεί να έγκεινται στην πρωτογενή δομή της πρωτεΐνης ή στο μη αζωτούχο τμήμα της(9).

1.5. ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ.

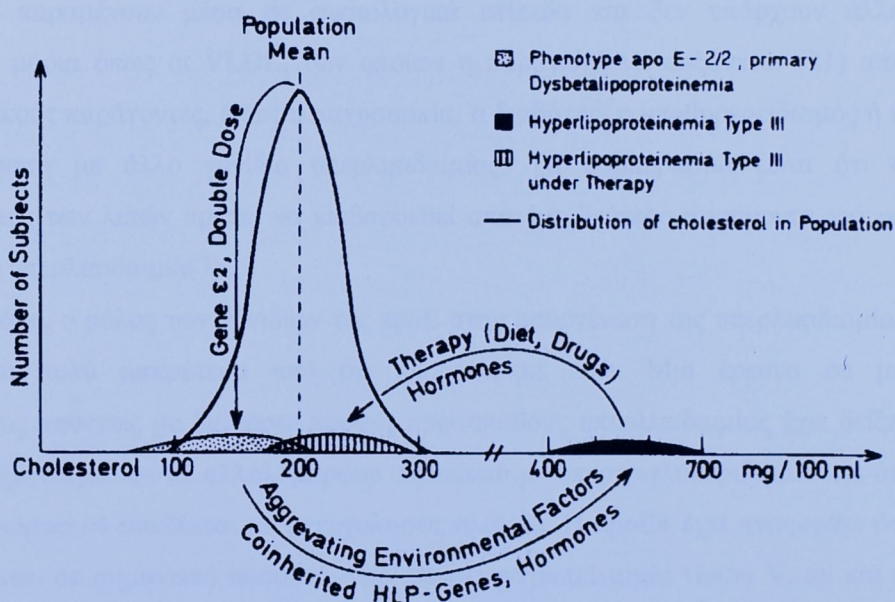
Η επίδραση του πολυμορφισμού της apoE στο μεταβολισμό των λιπιδίων σχετίζεται με την εκδήλωση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, όπως οι υπερλιπιδαιμίες, η αθηροσκλήρωση και η νόσος Alzheimer.

1.5.1. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΚΑΙ ΥΠΕΡΛΙΠΙΔΑΙΜΙΕΣ.

Ο γενετικός πολυμορφισμός της apoE αρχικά ανακαλύφθηκε σε μια έρευνα με ασθενείς που είχαν υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III(6). Πρόκειται για μια γενετική διαταραχή του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών που προδιαθέτει τα άτομα που την παρουσιάζουν για την ανάπτυξη πρόωρης αθηροσκλήρωσης. Δεν αποτελεί μια σχετικά σπάνια διαταραχή. Η συχνότητα της είναι 1-10 περιπτώσεις ανά 10.000 άτομα. Τα κλινικά της χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν αθηρωματικές αλλοιώσεις των στεφανιαίων αρτηριών και κυρίως των περιφερικών αρτηριών των κάτω άκρων(20). Η ταυτότητα της οικογενούς αυτής λιπιδικής διαταραχής είναι η παρουσία μεγάλων ποσοτήτων χυλομικρών και υπολειμμάτων VLDL στο πλάσμα, που οδηγούν σε σημαντική αύξηση της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων. Οι συγκεντρώσεις της LDL είναι συνήθως χαμηλότερες του φυσιολογικού στα άτομα τύπου III. Η δυσλιποπρωτεϊναιμία που εμφανίζεται στους ασθενείς αυτούς θυμίζει πολύ αυτή που περιγράφηκε παραπάνω για τους ομοζυγώτες E2/2. Η διαφορά έγκειται στα ποσοτικά χαρακτηριστικά των υπολειμμάτων που συσσωρεύονται στο πλάσμα και στην εμφάνιση των κλινικών εκδηλώσεων. Για την ακρίβεια, περισσότεροι από το 90% των τύπου III ασθενών που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία είναι ομοζυγώτες apoE2/2. Ωστόσο, μόνο το 1-10% των ατόμων αυτών εμφανίζουν υπερλιπιδαιμία τύπου III. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι πρόσθετοι παράγοντες (γενετικοί/περιβαλλοντικοί) λειτουργούν στους E2 ομοζυγώτες που αναπτύσσουν υπερλιπιδαιμία και ασθένεια κλινικού τύπου III. Η ανασκόπηση των συνδυασμένων στοιχείων από εκτεταμένες γενετικές, επιδημιολογικές, βιοχημικές και διατροφικές έρευνες έχει οδηγήσει στην ανάδειξη ενός μοντέλου που εξηγεί την ασθένεια τύπου III ως μία πολυπαραγοντική διαταραχή (Σχήμα 1.11). Οι ομοζυγώτες apoE2 που συμβαίνει να κληρονομούν

ανεξάρτητα άλλα γονίδια, τα οποία από μόνα τους μπορεί να οδηγούν σε υπερλιπιδαιμία (όχι τύπου III), θα εκφράσουν τελικά την υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III. Τα άλλα αυτά γονίδια πιθανώς θα είναι εκείνα που προκαλούν μορφές υπερλιπιδαιμίας, οι οποίες είναι συνήθεις στους πληθυσμούς (π.χ., οικογενής συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία ή πολυγενής υπερλιπιδαιμία). Άλλοι εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, η ορμονική κατάσταση, η διατροφή και η κατανάλωση αλκοόλ θα επιδράσουν στο γενετικό αυτό υπόβαθρο και μπορεί να επιδεινώσουν ή να μετριάσουν το βαθμό της υπερλιπιδαιμίας και το κλινικό αίτιο της ασθένειας. Το μοντέλο αυτό εξηγεί ικανοποιητικά πολλά χαρακτηριστικά της ασθένειας, για παράδειγμα τη σχέση μεταξύ του διαβήτη και της παχυσαρκίας και την αλλαγή της υπερλιπιδαιμίας τύπου III σε τύπου V ως απάντηση στη δίαιτα(6).

Υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III: Μοντέλο μιας πολυπαραγοντικής διαταραχής



Σχήμα 1.11. Μοντέλο που δείχνει περιληπτικά την αλληλεπίδραση διαφόρων παραγόντων* που συμμετέχουν στην παθογένεση και τη φαινοτυπική έκφραση της πολυπαραγοντικής υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου III(6). *Aggravating environmental gactors: περιβαλλοντικοί παράγοντες επιδείνωσης, coinherited HLP genes, hormones: συγκληρονομούμενα γονίδια υπερλιποπρωτεϊναιμίας, ορμόνες, Diet, drugs: διαίτα, φάρμακα.

Το γεγονός, λοιπόν, ότι παρατηρούμε τις ίδιες επιδράσεις του $\epsilon 2$ αλληλομόρφου στην ολική χοληστερόλη και την LDL ανεξάρτητα από το αν λαμβάνουμε υπ' όψιν τα υπερλιπιδαιμικά άτομα ή όχι δείχνει ότι υπάρχει η αλληλεπίδραση ενός δεύτερου παράγοντα, γενετικού ή περιβαλλοντικού, που οδηγεί τους ευάλωτους φορείς του $\epsilon 2$ αλληλόμορφου στην ανάπτυξη υπερλιπιδαιμίας. Το καθαρό συμπέρασμα είναι ότι το $\epsilon 2$ αλληλόμορφο μπορεί να έχει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα σε κάποια άτομα και ένα μειονέκτημα σε άλλα. Καθώς η επίπτωση της στεφανιαίας νόσου και οι άλλες εκδηλώσεις της αθηροσκλήρωσης εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της χοληστερόλης του πλάσματος, θα μπορούσε κάποιος να συμπεράνει ότι τα άτομα με το αλληλόμορφο $\epsilon 2$, που παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα της αθηρογόνας αυτής λιποπρωτεΐνης, κερδίζουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα σε σχέση με τους φορείς του αλληλομόρφου $\epsilon 3$. Αυτό θα μπορούσε να συνεισφέρει μια σχετική προστασία ενάντια στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης μόνο όταν τα λιπίδια του πλάσματος παραμένουν μέσα σε φυσιολογικά επίπεδα και δεν υπάρχουν άλλα αθηρογόνα μόρια όπως οι VLDL, των οποίων η παραγωγή να αυξάνεται (21) από προδιαθεσικούς παράγοντες, όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης, ο υποθυρεοειδισμός ή η αλληλεπίδραση με άλλο γονίδιο υπερλιπιδαιμίας. Το συμπέρασμα είναι ότι ο μεταβολισμός των λιπών πρέπει να επιβαρυνθεί από ένα δεύτερο παράγοντα για να αναπτυχθεί υπερλιπιδαιμία(7).

Ωστόσο, ο ρόλος των γονιδίων της apoE στην παθογένεση της υπερλιπιδαιμίας επεκτείνεται πολύ μακρύτερα από ότι περιγράφηκε εδώ. Μια έρευνα σε μη επιλεγμένους ασθενείς με διάφορες μορφές πρωτοπαθούς υπερλιπιδαιμίας έχει δείξει ότι η ετεροζυγότητα του $\epsilon 2$ αλληλόμορφου σχετίζεται με υπερτριγλυκεριδαιμία και ότι το αλληλόμορφο $\epsilon 4$ συνδέεται με υπερχοληστερολαιμία. Η apoE4 έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζεται σε σημαντικό ποσοστό στην υπερλιποπρωτεΐναιμία τύπου V, αν και η γενικότητα του φαινομένου αυτού είναι αμφίβολη. Ανεξάρτητα από αυτό, δεν έχει αποδειχτεί μια βέβαιη σύνδεση μεταξύ της apoE4 και της διαταραχής αυτής. Δεν έχουν αναφερθεί εξάλλου εξηγήσεις για σχετικούς μηχανισμούς, αν και είναι δελεαστικό να συσχετισθεί η προτίμηση της σύνδεσης της apoE4 με λιποπρωτεΐνες πλούσιες σε

τριγλυκερίδια με το γεγονός ότι η υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου V χαρακτηρίζεται από μεγάλες ποσότητες VLDL στο πλάσμα των ατόμων που την παρουσιάζουν(20).

Μια άλλη έρευνα έδειξε ότι ο πολυμορφισμός της apoE συνεισφέρει σημαντικά στις συγκεντρώσεις των λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών ατόμων με οικογενή συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία (Τύπος I, FCH). Είναι πιθανό ότι σε πληθυσμούς με FCH το αλληλόμορφο ε4 παρουσιάζεται ελαφρώς περισσότερο(22).

Πάντως, τα αλληλόμορφα ε2 και ε4 είναι και τα δύο σε σημαντικό βαθμό πιο συχνά παρόντα σε ασθενείς με συνδυασμένες μορφές υπερλιπιδαιμίας. Περίπου το 20% των ασθενών αυτών έχουν έναν από τους σπάνιους φαινότυπους 4/4, 2/4 ή 2/2 σε σχέση με το ποσοστό 5.3% στον πληθυσμό. Συμπερασματικά, λοιπόν, θα λέγαμε ότι τα αλληλόμορφα ε2 και ε4 συνεισφέρουν και τα δύο στην ευαισθησία και/ή στη φαινοτυπική έκφραση της υπερλιπιδαιμίας και ασκούν άμεσες επιδράσεις στις οδούς των λιποπρωτεϊνών που είναι διαφορετικές από αυτές του ε3 αλληλομόρφου(6).

1.5.2. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

Η σύνθετη σχέση του πολυμορφισμού της apoE με τα επίπεδα των λιπιδίων και την υπερλιπιδαιμία δείχνουν ότι τα αλληλόμορφα της apoE συνεισφέρουν στο γενετικό κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκληρωτικής αγγειακής νόσου. Όπως είναι εύκολο να προβλεφθεί, δεν υπάρχει απλή σχέση μεταξύ των φαινοτύπων της apoE και του κινδύνου αθηροσκλήρωσης. Τα αποτελέσματα όσον αφορά τη σχέση των φαινοτύπων της apoE με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου είναι αντιφατικά προς το παρόν(6).

Η επίδραση των φαινοτύπων της apoE στα κυκλοφορούντα επίπεδα των λιπιδίων θεωρείται ως μια έμμεση απόδειξη ότι ο πολυμορφισμός της apoE επηρεάζει τον κίνδυνο για στεφανιαία νόσο (CHD), όπως έδειξε πρόσφατα η έρευνα Etude Cas-Témoins sur l' Infarctus, du Myocarde(25). Αυξάνοντας τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και μειώνοντας της HDL, η apoE4 συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο αθηροσκλήρωσης(8). Έτσι, οι περιοχές με υψηλή συχνότητα apoE4 θα έπρεπε να εμφανίζονται με αυξημένη επίπτωση CHD και ακριβώς αυτό έδειξε η έρευνα European Atherosclerosis Research(26). Περισσότερο άμεση απόδειξη για τη θεωρία αυτή αναφέρθηκε από την έρευνα Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in

Youth, παρέχοντας ισχυρά στοιχεία ότι σε υγιείς νεαρούς ενήλικες που πέθαναν από αίτια που δεν είχαν σχέση με τις καρδιαγγειακές παθήσεις, αυτοί με φαινότυπο apoE4 φανέρωσαν στην αυτοψία περισσότερο έντονες αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις στις θωρακικές και κοιλιακές αρτηρίες από αυτούς χωρίς apoE4. Ωστόσο, αναφέρθηκαν, παράλληλα, αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση της apoE4 στην CHD(27). Επίσης αξιολόγησε στοιχεία έδωσε άλλη μελέτη που έδειξε ότι ετερόζυγοι E4/E3 άντρες ήταν νεότεροι στο πρώτο επεισόδιο εμφράγματος του μυοκαρδίου σε σχέση με ασθενείς που είχαν άλλους φαινοτύπους. Όπως παρουσιάστηκε στη μελέτη, ο γενετικός πολυμορφισμός της apoE επηρέασε αξιοσημείωτα την κλινική εκδήλωση της καρδιαγγειακής νόσου(28). Ακόμη, αξίζουν να αναφερθούν τα αποτελέσματα της εξέτασης της σχέσης του πολυμορφισμού της apoE με τους πολλαπλούς κινδύνους για CHD σε παιδιά, στα πλαίσια της Bogalusa Heart study. Η έρευνα έδειξε ότι η παρουσία οικογενειακού ιστορικού καρδιακής προσβολής και διαβήτη μεταξύ των τριών ομάδων φαινοτύπων μπορεί να αποτελεί έναν εναλλακτικό δείκτη μελλοντικού κινδύνου θνησιμότητας στα παιδιά. Αν και οι έρευνες σε απογόνους έχουν μειωμένη ικανότητα να εξετάζουν τη σχέση γονότυπου-ασθένειας, ο προσδιορισμός της apoE στα παιδιά σε σχέση με το οικογενειακό ιστορικό CHD έδειξε ότι το αλληλόμορφο ε4 ήταν πιο συχνό ενώ το ε2 λιγότερο συχνό μεταξύ των απογόνων με ασθενείς γονείς παρά μεταξύ υγιών γονέων(29). Οι Ιάπωνες και οι Κινέζοι, δύο πληθυσμοί που έχουν παραδοσιακά χαμηλούς δείκτες CHD, παρουσιάζουν χαμηλή συχνότητα του αλληλομόρφου ε4, ενώ αντίθετα η υψηλή συχνότητα του ε4 στους Φιλανδούς έχει οδηγήσει στην υποψία ότι το αλληλόμορφο αυτό συνεισφέρει στην αυξημένη εμφάνιση CHD στον πληθυσμό αυτό. Ωστόσο, οι Σουδανοί έχουν ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα του ε4 και, αν και δεν υπάρχουν επιδημιολογικές έρευνες στο Σουδάν, είναι γνωστό ότι η CHD δεν είναι συχνή σε άλλους μαύρους Αφρικανικούς πληθυσμούς. Ωστόσο, δεν υπάρχουν σαφείς αποδείξεις ότι για τη σχέση μεταξύ CHD και του αλληλομόρφου ε2. Τα στοιχεία δε δείχνουν μια τάση μεταξύ αυξημένης συχνότητας του ε2 και ελαττωμένης εμφάνισης CHD(10).

Η αντιφατικότητα σχετικά με την επίδραση του πολυμορφισμού της apoE στον κίνδυνο για CHD έχει αναφερθεί τουλάχιστον 15 χρόνια πριν όταν και παρατηρήθηκε χαμηλότερη και υψηλότερη συχνότητα του αλληλομόρφου ε4 μεταξύ επιζώντων

εμφράγματος του μυοκαρδίου και υγιών ατόμων αντίστοιχα. Από τότε, οι συζητήσεις πάνω στο συγκεκριμένο θέμα είναι συνεχείς.

Στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι διάφορες παραλλαγές ενός γονιδίου επηρεάζουν την ανάπτυξη μιας ασθένειας παρέχονται συνήθως από μακροχρόνιες επιδημιολογικές έρευνες που δείχνουν ότι μεταξύ των προσυμπτωματικών ατόμων, μόνο εκείνοι με μία συγκεκριμένη παραλλαγή του γονιδίου έχουν υψηλότερο κίνδυνο για ανάπτυξη της ασθένειας(8). Τελευταία, δύο τέτοιες έρευνες έχουν ολοκληρωθεί όσον αφορά την αμφισβητούμενη σχέση μεταξύ της apoE και της CHD. Οι Wilson et al.(30) παρείχαν πειστικές αποδείξεις ότι ο συγκεκριμένος κίνδυνος των φαινοτύπων apoE για την ανάπτυξη CHD είναι εξαρτώμενος από το γενικότερο πλαίσιο συνθηκών με μια συγκεκριμένη σχέση μεταξύ της apoE4 και του κινδύνου για CHD στις γυναίκες αλλά όχι στους άντρες. Ακόμα πιο πειστικά στοιχεία ότι φέροντας ένα αλληλόμορφο apoE4 αποτελεί έναν πρόσθετο ατομικό κίνδυνο για τη μελλοντική ανάπτυξη θανάσιμου εμφράγματος του μυοκαρδίου δημοσιεύτηκαν από τον Stengard et al.(31). Μετά από πεντάχρονη (follow-up) έρευνα σε προσυμπτωματικούς ηλικιωμένους Φινλανδούς άντρες, η συχνότητα της apoE4 ήταν σημαντικά υψηλότερη στους άντρες που πέθαναν λόγω θανάσιμου εμφράγματος του μυοκαρδίου σε σύγκριση με τους επιζώντες. Πολύ ενδιαφέρον είχε το γεγονός ότι οι συγγραφείς παρατήρησαν μια αξιοσημείωτη διαφορά κατά περιοχές μέσα στη Φινλανδία. Αυτό υποστηρίζει ακόμα περισσότερο την υπόθεση ότι υπάρχει εξάρτηση μεταξύ της επίδρασης του πολυμορφισμού της apoE στον κίνδυνο για CHD και των γενικότερων παραγόντων που χαρακτηρίζουν ένα πληθυσμό(8).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η απολιποπρωτεΐνη Ε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και θεωρείται ότι καθορίζει σε σημαντικό ποσοστό τη διακύμανση των επιπέδων των λιπιδίων πλάσματος. 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 της επίδρασης του πολυμορφισμού στα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος στον ελληνικό πληθυσμό. Ο σκοπός, λοιπόν, της παρούσας μελέτης ήταν να διευκρινιστεί κατά πόσον ο πολυμορφισμός της apoE επηρεάζει το λιπιδαιμικό προφίλ των Ελλήνων. Κάτι τέτοιο έχει πραγματοποιηθεί από πληθώρα αντίστοιχων ερευνών για πολλούς πληθυσμούς ανά τον κόσμο χωρίς αντίστοιχα δεδομένα για τους Έλληνες. Έτσι, έγινε ταυτοποίηση του πολυμορφισμού της apoE σε δείγμα 121 νεαρών Ελλήνων, ανάλυση των λιπιδίων του πλάσματος και εξέταση της σχέσης πολυμορφισμού-λιπιδίων.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1. ΤΟ ΔΕΙΓΜΑ.

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε 121 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) και από το "Χαροκόπειο" Πανεπιστήμιο ($n = 3$). Αποτελείται από άτομα 14 έως 26 χρόνων, 57 άντρες (17.9 ± 1.8 χρ.) και 64 γυναίκες (17.7 ± 1.9 χρ.).

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

3.2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΙΜΑΤΟΣ.

Από κάθε εθελοντή συλλέχθηκαν 10 ml φλεβικού αίματος σε ειδικούς σωλήνες με αντιπηκτικό EDTA-K₃. Η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε (8-10π.μ.) τις πρωινές ώρες 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.

3.3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟ-ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Ε.

3.3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ 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 έχει διάρκεια 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 (EL Buffer, El : 150 mM NH_4Cl , 10mM KHCO_3 , 1mM EDTA, pH 7,4). Το αιώρημα των κυττάρων παρέμεινε στον πάγο για 20min και αναδεύονταν τακτικά προκειμένου να επέλθει λύση των ερυθροκυττάρων. Στη συνέχεια το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 2000 rpm X 10min και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για 1-2 φορές έως ότου το ίζημα πυρήνων να ήταν κατά το δυνατόν απηλλαγμένο από προσμίξεις ερυθρών αιμοσφαιρίων. Το ίζημα των πυρήνων αιωρήθηκε ακολούθως σε 3 ml διαλύματος λύσης των πυρήνων (Nucleus lysis Buffer NL : 10 mM Tris/ HCl, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,4). Στο εναιώρημα προστέθηκε 50 μl πρωτεϊνάση K (20 mg/ dl) και 150 μl 20% SDS και τα δείγματα επώαστηκαν 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, επανααιωρήθηκαν με βίαιη ανάδευση για 15-20 sec και ξαναφυγοκεντρήθηκαν όπως και προηγουμένως προκειμένου να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες. Το καθαρό διανυγές υπερκείμενο κάθε δείγματος που περιέχει το DNA μεταφέρθηκε με γυάλινη Pasteur σε καθαρό σωλήνα Falcon των 50 ml. Στη συνέχεια προστέθηκε 2,5 φορές ο όγκος του διαλύματος απόλυτη αιθανόλη. Το DNA που σκοιινιάζει αμέσως μετά τη προσθήκη της αιθανόλης "ψαρεύτηκε" με πεπέτα Pasteur. Το DNA ξεπλήθηκε αρκετές φορές με εμβάπτιση του σε διάλυμα 70% αιθανόλης και αφέθηκε να ξεραθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως αιωρήθηκε σε μικρό όγκο (300 – 500 μl) διαλύματος TE (Tris/ HCl 10 mM, 0,1 mM EDTA, pH 7,4). Τα δείγματα του καθαρού DNA φυλάχθηκαν στους 4°C αφού προηγουμένως έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσής τους.

3.3.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ DNA.

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

3.3.3. DNA ΑΝΑΛΥΣΗ.

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 Polymorfism, RFLP analysis).

3.3.3.1. 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 primer (Reymer et al, 1995).

Primer ApoE Right : 5' – T.A.A. –GCT – TGG – CAC – GGC – TGT – CCA – AGG – A – 3'

Primer ApoE Left: 5' –ATA–AAT–ATA–AAA–TAT–AAA–TAA–CAG–AAT–TCG–
–CCC–CGG–CCT–GGT–ACA–C–3'

Με τη χρήση των 2 αυτών primer που προκύπτει μετά από αντιγραφή, αντιγράφεται τμήμα του γονιδίου μήκους 267 bp (βλ. εικόνα 3.2). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25 μl σε ρυθμιστικό διάλυμα (PCR buffer : 20 mmol Tris/HCl pH 8,4, 50 mmol KCl, 2 mmol MgCl_2)

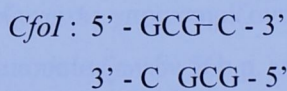
που περιείχε 0,2 gr/L αλβουμίνη ορού (BSA), 200 $\mu\text{mol/L}$ από κάθε ένα από τα dNTPs, 100 ml/L DMSO και $\pm 600 \text{ ngr}$ καθαρού DNA. Το τελικό μείγμα επικαλύφθηκε με Mineral Oil. Η αντιγραφή του τμήματος του γονιδίου της *apoE* έγινε σε θερμικό κυκλοποιητή (PTC – 100, MJ Research) μετά από προσθήκη 0,9 U *Taq* DNA πολυμεράνης 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.

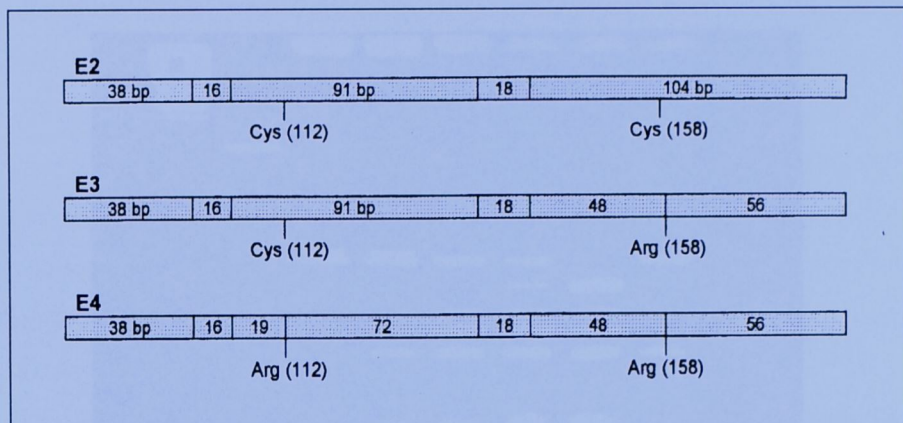
3.3.3.1. RFLP analysis

Μετά τη διαδικασία PCR τα δείγματα υπέστησαν πέψη με την ενδονουκλεάση *CfoI*. 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 ml) με 10 ml διαλύματος πέψης που περιέχει 4 U *CfoI*.

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.



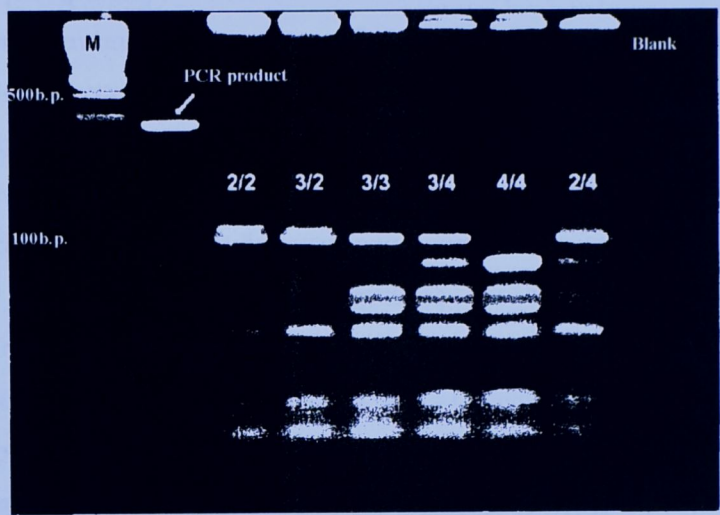
Εικόνα 3.1. Σημεία πέψης του ενζύμου και παραγόμενα θραύσματα.

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

Όπως φαίνεται από την παρακάτω εικόνα συγκριτικά με τους E3/3 ομοζυγωτές οι E2/2 ομοζυγωτές χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση μιας ζώνης μήκους 104b.p. και από την απουσία ζωνών 56b.p. και 48b.p. (βλ. εικόνα 3.2 και 3.3).

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] είναι χαρακτηριστικές οι ζώνες που είναι χαρακτηριστικές της παρουσίας των επιμέρους δύο αλληλόμορφων (βλ. εικόνα 3.3).

Στην εικόνα 3.2 απεικονίζονται τα χαρακτηριστικά ηλεκτροφορητικά προφίλ των έξι διαφορετικών γονότυπων της ΑροΕ. Τα προφίλ αυτά παρουσιάζονται διαγραμματικά στην εικόνα 3.3.



Εικόνα 3.2. Φωτογραφία των ηλεκτροφορητικών προφίλ των έξι διαφορετικών γονότυπων της αροΕ.

b.p.	E 2/2	E 3/2	E 3/3	E 3/4	E 4/4	E 2/4
104	==	==	—	—		==
91						
72				—	—	—
56		==	==	==	==	==
48		==	==	==	==	==
38	—	—	—	—	—	—
19,18,16	—	—	—	—	—	—

Εικόνα 3.3. Διαγραμματική απεικόνιση των ηλεκτροφορητικών προφίλ των έξι διαφορετικών γονότυπων.

3.4. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Οι συγκεντρώσεις των λιπιδίων του πλάσματος μετρήθηκαν στα εργαστήρια του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου με τη βοήθεια του βιοχημικού αναλυτή ACE, Schiapparelli Biosystems, Inc. Ο αναλυτής αυτός είναι σε θέση να διεξάγει πολλές διαφορετικές αναλύσεις ταυτόχρονα και επιτρέπει την αντικατάσταση των χειροκίνητων μεθόδων από μια σειρά αυτόματων λειτουργιών. Κάθε δείγμα περιέχεται σε ξεχωριστό δοχείο κατά την διάρκεια των χημικών αντιδράσεων. Τα δείγματα, σε συνδυασμό με τα κατάλληλα αντιδραστήρια για τις απαιτούμενες μετρήσεις, αναλύονται σε ειδικά σχεδιασμένες κυβέττες.

Οι μέθοδοι για τον προσδιορισμό των λιπιδίων, που πραγματοποιούνται με αντιδραστήρια της ίδιας με τον αναλυτή εταιρίας, είναι οι εξής:

Ολική χοληστερόλη πλάσματος: Η διαδικασία μέτρησης της χοληστερόλης γίνεται με υπολογισμό του συνόλου της ελεύθερης χοληστερόλης και των εστέρων της. Χρησιμοποιείται μια εξειδικευμένη ενζυμική μέθοδος σε ουδέτερο pH. Η χρήση των ενζύμων σε μέθοδο μέτρησης χοληστερόλης έχει περιγραφεί από τους Allain et al., και Roeschlau et al. Η μέθοδος περιλαμβάνει την αρχική υδρόλυση των εστέρων της χοληστερόλης και στη συνέχεια, μετά από μια σειρά χημικών αντιδράσεων, παράγεται η ένωση quinoneimine η οποία απορροφάει στα 500nm. Η αλλαγή στην απορρόφηση μετράται διχρωματικά στα 505nm/692nm και αναλογεί άμεσα στην ποσότητα της χοληστερόλης που υπάρχει στο δείγμα¹.

HDL χοληστερόλη πλάσματος: Η HDL χοληστερόλη του πλάσματος προσδιορίζεται με συνδυασμό μιας ανοσολογικής και ενζυμικής μεθόδου. Κατά το πρώτο στάδιο της διαδικασίας χρησιμοποιείται ειδικό αντίσωμα που συνδέεται σε όλες τις λιποπρωτεΐνες εκτός της HDL. Τα συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος που δημιουργούνται αναστέλλουν τις ενζυμικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά το δεύτερο στάδιο. Κατά το στάδιο αυτό χρησιμοποιούνται ειδικά ένζυμα που αντιδρώντας με τη

¹ ACE™ CHOLESTEROL Reagent. Package Insert/Procedure Sheet Reorder No. AE2-12.

χοληστερόλη οδηγούν σε παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Επομένως, μόνο η HDL χοληστερόλη συμμετέχει στη διαδικασία αυτή. Το παραγόμενο υπεροξείδιο του υδρογόνου οδηγεί σε σχηματισμό ενός συμπλόκου που απορροφά σε μήκος κύματος 593nm. Με βάση την απορρόφηση αυτή υπολογίζεται η συγκέντρωση της HDL χοληστερόλης στο δείγμα².

Τριγλυκερίδια πλάσματος: Η μέθοδος μέτρησης των τριγλυκεριδίων είναι μια πλήρης ενζυμική διαδικασία στην οποία τα τριγλυκερίδια του πλάσματος αρχικά υδρολύονται από μικροβιακή λιπάση για το σχηματισμό γλυκερόλης. Η κινάση της γλυκερόλης που υπάρχει στο αντιδραστήριο προκαλεί την έναρξη μιας ακολουθίας ενζυμικών αντιδράσεων. Οι αντιδράσεις αυτές καταλήγουν στην παραγωγή της ένωσης quinoneimine. Η απορρόφηση της ένωσης αυτής μετράται διχρωματικά στα 505nm/692nm και αναλογεί άμεσα στη συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων².

LDL χοληστερόλη πλάσματος: Ο υπολογισμός της LDL χοληστερόλης πραγματοποιείται έμμεσα χρησιμοποιώντας την εξίσωση των Friedewald et al.(32), σύμφωνα με την οποία είναι:

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

Κανένα από τα άτομα του δείγματος δεν είχε τριγλυκερίδια υψηλότερα από 400mg/dl καθιστώντας δυνατό για όλα τον υπολογισμό της LDL χοληστερόλης.

Πριν και μετά την πραγματοποίηση των αναλύσεων έγινε βαθμολόγηση (calibration) και ποιοτικός έλεγχος (quality control). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται:

GEMCAL SERUM CALIBRATOR: Χρησιμοποιείται για την βαθμολόγηση του οργάνου μέτρησης για τις περισσότερες αναλύσεις κλινικής χημείας².

CHEMISTRY CONTROL LEVEL I ΚΑΙ LEVELII: Τα δύο αυτά διαλύματα, των οποίων οι συγκεντρώσεις σε λιπίδια είναι γνωστές, μετρώνται ως άγνωστα δείγματα με σκοπό να εξεταστεί η ακρίβεια και η πιστότητα των ποσοτικών μετρήσεων που

² HDL-C L-Type, Liquid stable reagent-immunihhibition method for the quantitative determination of HDL-Cholesterol in serum.

ACETM TRIGLYCERIDES Reagent. Package Insert/Procedure Sheet Reorder No. AE2-24.

GEMCAL SERUM CALIBRATOR. Package Insert Reorder No. ES1-20.

πραγματοποιούνται στο βιοχημικό αναλυτή. Το LevelII εξετάζει την ακρίβεια του αναλυτή σε συγκεντρώσεις που βρίσκονται σε φυσιολογικά όρια ενώ το LevelIII κάνει αντίστοιχες εξετάσεις για παθολογικές τιμές (μεγαλύτερες του φυσιολογικού)³.

Τα δείγματα μετρήθηκαν όλα μέσα στην ίδια ημέρα και ο έλεγχος ακρίβειας και πιστότητας που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των LEVELI και LEVELII έδειξε ότι η διακύμανση των τιμών ήταν σε αποδεκτά όρια.

3.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση του στατιστικού πακέτου MINITAB Software. Ο υπολογισμός της συχνότητας των αλληλομόρφων έγινε με τη μέτρηση των αλληλομόρφων. Τα στοιχεία για τις τιμές των λιπιδίων παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SD (Τυπική απόκλιση). Για την ανάλυση της επίδρασης των αλληλομόρφων στα επίπεδα των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος επιλέχτηκαν τρεις κατηγορίες γονοτύπων: 1) άτομα με γονότυπο E2/3 2) άτομα με γονότυπο E3/3 και 3) άτομα με γονότυπο E3/4 και E4/4. Η σημαντικότητα της διαφοράς στις τιμές των λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών μεταξύ των διαφορετικών ομάδων γονοτύπων εξετάστηκε με τη χρήση *t*-Test.

³ CHEMISTRY CONTROL LEVEL I. Package Insert Reorder No.EC10-1

CHEMISTRY CONTROL LEVEL II. Package Insert Reorder No. EC10-2

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΛΙΠΙΔΙΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΔΕΙΓΜΑ.

Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζονται τα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος στους νεαρούς άντρες και γυναίκες της παρούσας μελέτης.

Πίνακας 4.1. Λιπίδια πλάσματος σε νεαρούς Έλληνες, άντρες και γυναίκες. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ($\pm$ SD)¹.

	Άνδρες (n=57)	Γυναίκες (n=64)	Ολικό δείγμα(n=121)
Ηλικία	17.9 $\pm$ 1.8	17.7 $\pm$ 1.9	17.8 $\pm$ 1.86
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	156.8 $\pm$ 24.5	168.6 $\pm$ 31 [*]	163 $\pm$ 28.6
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	101.7 $\pm$ 22.2	107.9 $\pm$ 26.5	105 $\pm$ 24.7
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	39.3 $\pm$ 5.7	47.2 $\pm$ 8.1 [*]	43.5 $\pm$ 8.1
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	78.8 $\pm$ 31.1	67.8 $\pm$ 17 [*]	73 $\pm$ 25.2
Λόγος Ολ.χολ/HDL	4.04 $\pm$ 0.7	3.62 $\pm$ 0.6 [*]	3.82 $\pm$ 0.7

^{*}Στατιστικά σημαντική διαφορά ($P<0.05$) μεταξύ αντρών και γυναικών.

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι το λιπιδαιμικό προφίλ των νεαρών Ελλήνων της παρούσας μελέτης βρίσκεται μέσα σε αποδεκτά όρια τιμών. Συγκεκριμένα, η ολική χοληστερόλη και τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης παρουσιάζουν τιμές φυσιολογικές για την ηλικιακή αυτή ομάδα [ολική χοληστερόλη<170mg/dl, LDL χοληστερόλη<110mg/dl(42)]. Επομένως, οι Έλληνες αυτοί βρίσκονται σε χαμηλό κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων, όπως φαίνεται και στο λόγο ολικής προς HDL χοληστερόλη (3.82 $\pm$ 0.7mg/dl<4.5mg/dl που είναι το όριο).

⁴ SD=Τυπική απόκλιση

Όσον αφορά τους άντρες και τις γυναίκες, ο γυναικείος πληθυσμός έχει υψηλότερα επίπεδα ολικής και HDL χοληστερόλης σε σχέση με τους άντρες. Τα αυξημένα επίπεδα HDL αναμένονταν γι' αυτή την πληθυσμιακή ομάδα των γυναικών (προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες). Παρά την αυξημένη χοληστερόλη, ο λόγος ολικής προς HDL χοληστερόλη είναι μικρότερος στις γυναίκες, άρα οι άντρες παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου.

Αξίζει, επίσης, να αναφερθεί ότι οι άντρες παρουσιάζουν υψηλότερα τριγλυκερίδια από τις γυναίκες, ενώ τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης δεν προσδιορίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο φύλων.

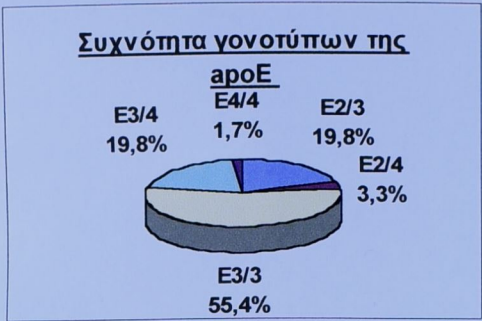
4.2. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΚΑΙ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ.

Στον Πίνακα 4.2 και στα Σχήματα 4.1 και 4.2 παρουσιάζεται η κατανομή των διαφόρων γονότυπων της apoE στο δείγμα μας καθώς και η συχνότητα εμφάνισης των τριών συχνών αλληλόμορφων. Από τους 6 διαφορετικούς γονότυπους συνολικά εντοπίστηκαν 5 (δε βρέθηκε κανένα άτομο με γονότυπο E2/2).

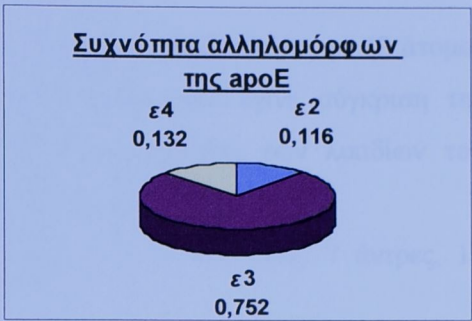
Πίνακας 4.2. Γονότυποι της apoE και συχνότητα αλληλόμορφων.

Γονότυπος	Άντρες		Γυναίκες		Συνολικά	
	N	%	N	%	N	%
E2/2	-	0	-	0	-	0
E2/3	7	12,3	17	26,6	24	19,8
E2/4	2	3,5	2	3,1	4	3,3
E3/3	32	56,1	35	54,7	67	55,4
E3/4	15	26,3	9	14,1	24	19,8
E4/4	1	1,8	1	1,5	2	1,7
Σύνολο	57	100	64	100	121	100
Συχνότητα αλληλόμορφων						
ε2	0,079		0,148		0,116	
ε3	0,754		0,750		0,752	
ε4	0,167		0,102		0,132	

Σχήμα 4.1



Σχήμα 4.2



Όπως αναμενόταν, και στον πληθυσμό αυτών των Ελλήνων, τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης είχε το ε3 αλληλόμορφο (0,752) και οι ομοζυγώτες ως προς αυτό εμφάνισαν το μεγαλύτερο ποσοστό (55.4%). Η συχνότητα του ε2 ήταν 11,6% και του ε4 13,2%. Η συχνότητα του ε4 αλληλόμορφου είναι αρκετά υψηλή σε σχέση με προηγούμενη μελέτη σε ελληνικό πληθυσμό(44) όπου το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 6.5%. Το γεγονός αυτό μπορεί να σχετίζεται με το ότι το δείγμα μας δεν είναι αρκετά μεγάλο, αν και οι δικές μας τιμές βρίσκονται μέσα στα πλαίσια που έχουν προταθεί για άλλους μεσογειακούς πληθυσμούς (Ισπανία:12,7%, Ιταλία:9,4%)(42,43). Ωστόσο, μόνο 2 άτομα βρέθηκαν ομοζυγώτες (1,7%) για το ε4.

Μεταξύ αντρών και γυναικών δεν παρουσιάστηκε διαφορά αναφορικά με τη συχνότητα του ε3 αλληλόμορφου. Διαφορές, ωστόσο, παρουσιάστηκαν όσον αφορά τη σχετική συχνότητα των αλληλομόρφων ε2 και ε4 που αναλογούσαν σε παρόμοιες διαφορές μεταξύ των γονοτύπων E2/3 και E3/4. Οι γυναίκες είχαν υψηλότερη συχνότητα ως προς το ε2 (14,8 προς 7,9%) και οι άντρες ως προς το ε4 αλληλόμορφο (16,7 προς 10,2%). Οι διαφορές αυτές είναι μάλλον τυχαίες καθώς δεν έχει αναφερθεί διαφορά συχνότητας αλληλομόρφων στα δύο φύλα.

4.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ.

Λόγω του μικρού αριθμού ομοζυγωτών ως προς το 4 αλληλόμορφο (2 άτομα) και της απουσίας ομοζυγωτών ως προς το 2 αλληλόμορφο, έγινε σύγκριση της επίδρασης του πολυμορφισμού της apoE στις συγκεντρώσεις των λιπιδίων του πλάσματος σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες (Πίνακας 4.3):

- α. Άτομα που είναι φορείς του ε2 αλληλόμορφου (E2/3 γονότυπος, 7 άντρες, 17 γυναίκες).
- β. Άτομα που είναι φορείς μόνο του ε3 αλληλόμορφου (ομοζυγώτες E3/3, 32 άντρες, 35 γυναίκες).
- γ. Άτομα που είναι φορείς τουλάχιστον ενός ε4 αλληλόμορφου (E3/4+E4/4 γονότυπος, 16 άντρες, 10 γυναίκες).

Πίνακας 4.3. Σχέση λιπιδίων πλάσματος και πολυμορφισμού της apoE στον πληθυσμό των νεαρών Ελλήνων. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο(±SD).

	ε2 αλληλόμορφο (E2/3) N=24	ε3 αλληλόμορφο (E3/3) N=67	ε4 αλληλόμορφο (E3/4 και E4/4) N=26
<u>Ολική χοληστερόλη</u> (mg/dl)	152.1±23 ^a	166.5±31.8	165.2±21.1
<u>LDL χοληστερόλη</u> (mg/dl)	91.3±19.1 ^b	109.2±27.1	107.5±16.9
<u>HDL χοληστερόλη</u> (mg/dl)	44.9±8.8	44.1±7.2	41.1±9.7
<u>Τριγλυκερίδια</u> (mg/dl)	79.1±28.5 ^c	66.6±20.8	83.2±29.9 ^a
<u>Ολική/HDL</u> <u>χοληστερόλη</u>	3.47±0.68 ^a	3.81±0.63	4.16±0.74 ^a

^{a,b}: Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με τους ομοζυγώτες E3/3.

^a: P<0.05, ^b: P<0.001

^c: P=0.058

Επειδή τα άτομα με γονότυπο E2/4 (2 άντρες, 2 γυναίκες) έχουν χαρακτηριστικά και των δύο αλληλόμορφων, εξαιρέθηκαν από την περαιτέρω ανάλυση.

Όπως παρατηρείται από τον Πίνακα 4.3 τα άτομα που είναι φορείς του αλληλόμορφου 2 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης σε σχέση με τους ομοζυγώτες E3/3 ($P<0.05$ και $P<0.001$ αντίστοιχα). Στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρείται και στο λόγο ολικής προς HDL χοληστερόλη στα άτομα με γονότυπο E2/3. Αντίθετα, καμία διαφορά δεν έχει εμφανιστεί μεταξύ των ομοζυγωτών E3/3 και των φορέων του αλληλόμορφου 4 ως προς τα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης. Ωστόσο, οι φορείς του ε4 δείχνουν να έχουν χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης αν και η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Είναι αξιοσημείωτο ότι αν και δεν είχαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης, οι φορείς του ε4 αλληλόμορφου είχαν σημαντικά υψηλότερο λόγο ολικής προς HDL χοληστερόλη από τους ομοζυγώτες E3/3.

Τόσο οι φορείς του ε2 όσο και του ε4 αλληλόμορφου παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων του πλάσματος από τους φορείς μόνο του ε3.

Από τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων βρέθηκε ότι οι παραπάνω διαφορές, που αφορούν τα χαμηλά επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης, καθώς και του λόγου ολικής προς HDL χοληστερόλη στους φορείς του ε2 αλληλόμορφου, αφορούν κυρίως το γυναικείο πληθυσμό (Πίνακας 4.4). Αντίθετα, στους άντρες η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική γεγονός το οποίο μπορεί να σχετίζεται με τον μικρό αριθμό του δείγματος ($n=7$, αντρικό φύλο-ε2 αλληλόμορφο). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης στον αντρικό πληθυσμό αυξάνουν σύμφωνα με την αναμενόμενη από τα βιβλιογραφικά δεδομένα σειρά ε2→ε3→ε4.

Αντίθετα με τα στοιχεία που προέκυψαν για το ολικό δείγμα, τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων που παρατηρούνται στους φορείς των ε2 και ε4 αλληλόμορφων (βλ. Πίνακα 4.3) χαρακτηρίζουν κυρίως τον αντρικό πληθυσμό. Ίσως, η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική στους άντρες και όχι στο γυναικείο

πληθυσμό, καθώς οι άντρες είχαν γενικότερα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων σε σχέση με τις γυναίκες (βλ. Πίνακας 4.1)

Τέλος, παρότι τα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών γονότυπων, εντούτοις οι άντρες φορείς του 4 αλληλόμορφου, φαίνεται ότι βρίσκονται σε αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο αν κρίνει κανείς τον αυξημένο λόγο ολικής προς HDL χοληστερόλη.

Πίνακας 4.4. Σχέση λιπιδίων πλάσματος και πολυμορφισμού της apoE στους νεαρούς Έλληνες, άντρες και γυναίκες. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο(±SD).

	ε2 αλληλόμορφο (E2/3) Άντρες(N=7) Γυναίκες(N=17)	ε3 αλληλόμορφο (E3/3) Άντρες(N=32) Γυναίκες(N=35)	ε4 αλληλόμορφο (E3/4 και E4/4) Άντρες(N=16) Γυναίκες(N=10)
<u>Ολική χοληστερόλη (mg/dl)</u>			
Άντρες	149.9±14.2	157.6±29.9	160.7±14.9
Γυναίκες	153.0±26 ^a	174.7±31.6	172.5±27.8
<u>LDL χοληστερόλη (mg/dl)</u>			
Άντρες	92.1±12.5	103.6±26.3	104.6±15.3
Γυναίκες	91.0±21.5 ^b	114.2±27.2	112.1±19.0
<u>HDL χοληστερόλη (mg/dl)</u>			
Άντρες	38.5±3.7	40.4±6.0	37.5±5.9
Γυναίκες	47.6±8.9	47.4±6.5	46.7±12
<u>Τριγλυκερίδια (mg/dl)</u>			
Άντρες	96.3±32.9 ^c	68.1±26.2	92.7±34.3 ^a
Γυναίκες	72.0±24.2	65.2±14.6	68.1±10.4
<u>Λόγος Ολικής/HDL χολ.</u>			
Άντρες	3.94±0.62	3.94±0.71	4.37±0.74 ^d
Γυναίκες	3.28±0.62 ^a	3.70±0.52	3.81±0.64

^{a,b} Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με τους ομοζυγώτες E3/3.

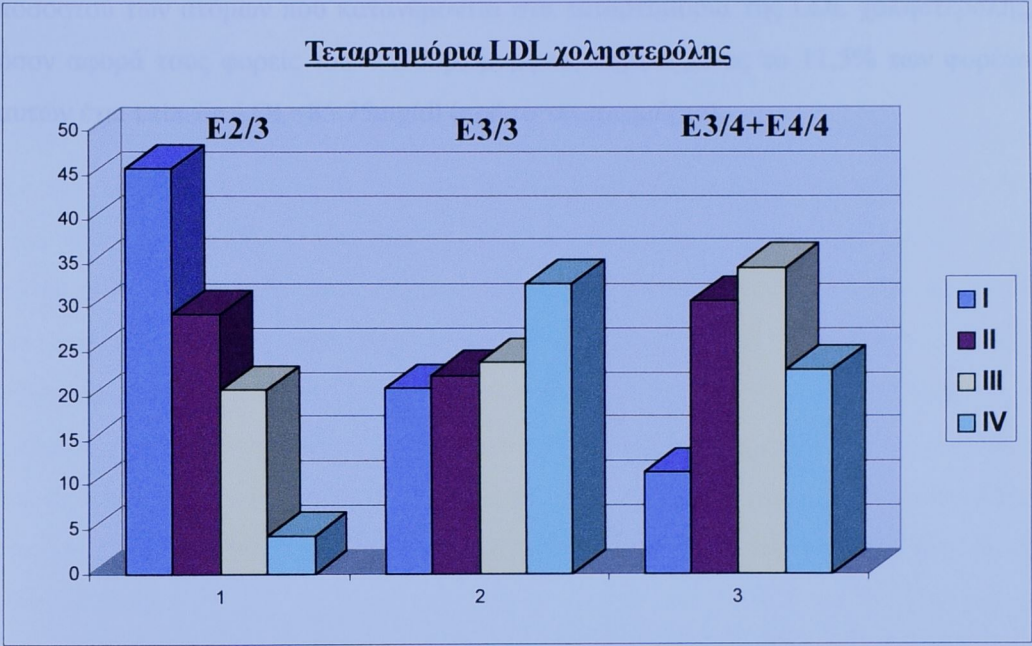
^a P<0.05, ^b P<0.005

^c P=0.07

^d P=0.06

επηρεάζονται από τον αριθμό των αλληλόμορφων. Η πιο χαρακτηριστική από παρατηρούμενη είναι η μεταβολή στατιστικής της LDL, όπως φαίνεται στην ακόλουθη μελέτη με τους [23].

Σε μια προσπάθεια να δούμε κατά πόσο οι φορείς του ε4 αλληλόμορφου σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα LDL χοληστερόλης στο πλάσμα, μελετήθηκε η ποσοστιαία κατανομή των ατόμων που ανήκουν στα τεταρτημόρια (quartiles) της LDL, όπως αυτή διαφοροποιείται στο συνολικό πληθυσμό για τις τρεις διαφορετικές κατηγορίες γονότυπων που εξετάζουμε (Διάγραμμα 4.1).



Διάγραμμα 4.1. Ποσοστιαία επί τις εκατό (%) κατανομή των ατόμων που ανήκουν στα τεταρτημόρια της LDL χοληστερόλης για τις ομάδες γονότυπου E2/3, E3/3 και E3/4-E4/4. Οι τιμές της LDL στα τεταρτημόρια που διαμορφώθηκαν σύμφωνα με το συνολικό πληθυσμό ήταν: $I \leq 85.75\text{mg/dl}$, $85.75\text{mg/dl} < II \leq 105.5\text{mg/dl}$, $105.5\text{mg/dl} < III \leq 116.85\text{mg/dl}$, $IV > 116.85\text{mg/dl}$.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, στους ομοζυγώτες E3/3 δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην κατανομή των ατόμων στα τεταρτημόρια, που ήταν άλλωστε αναμενόμενο καθώς το ε3 αλληλόμορφο θεωρείται ουδέτερο όσον αφορά την επίδραση στα λιπίδια του πλάσματος. Αντίθετα, είναι χαρακτηριστική η

ανισοκατανομή των φορέων του αλληλόμορφου 2 στα τεταρτημόρια που συμφωνεί με τα μειωμένα επίπεδα της LDL στους φορείς αυτούς σε σύγκριση με τους E3/3 ομοζυγώτες. Συγκεκριμένα, το 45,8% των ατόμων με γονότυπο E2/3 (n=11) ανήκουν στο χαμηλότερο τεταρτημόριο LDL χοληστερόλης (<85.75mg/dl), ενώ μόνο το 4,2% (n=1) βρίσκεται στο υψηλότερο (>116.85mg/dl). Η κατανομή των E2/3 στα τεταρτημόρια παρουσιάζει ανάγλυφα την επίδραση του ε2 αλληλόμορφου στον πληθυσμό η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλότερα επίπεδα LDL χοληστερόλης στα άτομα αυτά. Από την άλλη, δεν παρατηρείται κάποια σαφής ανοδική τάση του ποσοστού των ατόμων που κατανέμονται στα τεταρτημόρια της LDL χοληστερόλης, όσον αφορά τους φορείς του 4 αλληλόμορφου, παρότι μόλις το 11,5% των φορέων αυτών έχει επίπεδα LDL<85.75mg/dl (πρώτο τεταρτημόριο).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διευκρινιστεί κατά πόσον ο πολυμορφισμός της apoE επηρεάζει το λιπιδαιμικό προφίλ των Ελλήνων. Για το σκοπό αυτό έγινε ταυτοποίηση του πολυμορφισμού της apoE σε δείγμα 121 νεαρών Ελλήνων, ανάλυση των λιπιδίων του πλάσματος και εξέταση της σχέσης πολυμορφισμού-λιπιδίων.

Αν και οι έρευνες έχουν αποδείξει ότι το 50% της διακύμανσης μεταξύ των ατόμων, όσον αφορά τα φυσιολογικά επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος, συνδέεται με πολυγονιδιακές διαφορές, δεν έχει βρεθεί μέχρι τώρα καμία περίπτωση γονιδίου που να συνεισφέρει σε αξιόλογο μέγεθος στη διακύμανση που παρατηρείται στους πληθυσμούς, εκτός από αυτό που κωδικοποιεί την απολιποπρωτεΐνη E. Σε μια έρευνα με μεγάλο δείγμα (> από 9000 άτομα), οι Sing and Ott(33) εντόπισαν τέσσερις πολυμορφικούς γενετικούς δείκτες του αίματος που είχαν σημαντική επίδραση στα επίπεδα της χοληστερόλης. Ωστόσο, κανένας από τους παράγοντες αυτούς δεν έδειξε να εμπλέκεται φυσιολογικά στο μεταβολισμό της χοληστερόλης, ενώ στο σύνολό τους τα μη συνδεδεμένα αυτά γονίδια εξηγούσαν λιγότερο από το 1% της ολικής διακύμανσης.

Το γονίδιο της apoE στον άνθρωπο είναι το πρώτο πολυμορφικό γονίδιο που έχει περιγραφεί το οποίο εμπλέκεται μεταβολικά στον καθορισμό της φυσιολογικής διακύμανσης μεταξύ των ατόμων σχετικά με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και τα συστατικά τους(1,2,6,7,21). Η επίδραση του γονιδίου αυτού στη μεταβλητότητα του πληθυσμού είναι πολύ μεγαλύτερη από κάθε άλλο γενετικό παράγοντα. Οι γενετικές έρευνες για τη χοληστερόλη του πλάσματος, στο σύνολό τους, έχουν αρχίσει να αποκαλύπτουν μια γενετική αρχιτεκτονική που είναι υπεύθυνη για τη φαινοτυπική έκφραση των λιπιδικών και λιποπρωτεϊνικών προφίλ(7). Στην αρχιτεκτονική αυτή η απολιποπρωτεΐνη E δείχνει να έχει ηγετική θέση.

Το γονίδιο, λοιπόν, της apoE συμβάλλει στον καθορισμό της διακύμανσης των επιπέδων χοληστερόλης του πλάσματος υγιών και ασθενών ατόμων. Θεωρείται ότι η διακύμανση των αλληλομόρφων της apoE είναι υπεύθυνη για το 5-15% της διακύμανσης της ολικής και LDL χοληστερόλης στο γενικό πληθυσμό(7,34). Επηρεάζει, επίσης, την έκφραση της υπερλιπιδαιμίας και φαίνεται ότι ρυθμίζει την ευαισθησία στην αθηροσκλήρωση σε μια περίπλοκη πολυπαραγοντική αλληλεπίδραση(8,20,28,34). Υπάρχουν στοιχεία ότι η παρουσία της apoE2 είναι προστατευτική όταν δε συνδυάζεται με άλλους αρνητικούς παράγοντες, ενώ της apoE4 προδιαθέτει για στεφανιαία νόσο(20,34). Η έρευνα της βιολογικής σημαντικότητας του πολυμορφισμού της apoE στον άνθρωπο έχει τονίσει τη σημασία των αλληλεπιδράσεων γονιδίου-γονιδίου και γονιδίου-περιβάλλοντος στην παθογένεση της υπερλιπιδαιμίας και της αθηροσκλήρωσης(6,8,16).

Ο πολυμορφισμός της apoE περιλαμβάνει την περιοχή του γονιδίου της apoE που κωδικοποιεί την αντίστοιχη πρωτεΐνη και έχει ως αποτέλεσμα διαφοροποιήσεις στο προϊόν του γονιδίου, το οποίο με τη σειρά του, είτε άμεσα είτε δευτερευόντως επηρεάζει τη μεταβολική μοίρα των μορίων των λιποπρωτεϊνών. Η ταχύτατη αναβάθμιση των γνώσεών μας την τελευταία εικοσαετία παρείχε μια μεταβολική εξήγηση για την επισήμανση της αντίθετης επίδρασης του ε2 και ε4 αλληλόμορφου στα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών. Η apoE2 παρουσιάζει μικρότερη συγγένεια σύνδεσης με τους υποδοχείς που έχει ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της εκκαθάρισης από το πλάσμα των φορέων της apoE2 λιποπρωτεϊνικών μορίων(22,34). Η apoE4 κατανέμεται μεταξύ των VLDL και HDL διαφορετικά από την apoE3, αποδομείται ταχύτερα, και μπορεί να αυξήσει το μεταβολισμό των μορίων που τη φέρουν, οδηγώντας σε άλλες διαφοροποιήσεις του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών που επιφέρουν αυξημένα επίπεδα LDL χοληστερόλης(6,8,20,34).

Η ερευνητική προσπάθεια που κάναμε εμείς είχε σκοπό να εξετάσει κατά πόσον τα δεδομένα των πολυάριθμων ερευνών που έχουν γίνει ανά τον κόσμο ανταποκρίνονταν στο δικό μας ελληνικό δείγμα.

Τα αποτελέσματά για τη συχνότητα των αλληλομόρφων του γονιδίου της apoE (ε2:0,116, ε3:0,752, ε4:0,132) επιβεβαιώνουν τα γνωστά από άλλες έρευνες στοιχεία. Τα αλληλόμορφα, δηλαδή, ε2 και ε4 έχουν μικρότερη συχνότητα από το ε3 και τα

ποσοστά βρίσκονται μέσα στα πλαίσια των αντίστοιχων για Καυκάσιους πληθυσμούς, Davignon et al(ϵ_2 :0.08, ϵ_3 :0.77, ϵ_4 :0.15)(1988)(35), ενώ ειδικά για το ϵ_4 αλληλόμορφο υπάρχει αναλογία με άλλους μεσογειακούς πληθυσμούς (Ισπανοί:12,7%, Ιταλοί:9,4%)(36,37). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει τη χαμηλότερη εμφάνιση του ϵ_4 αλληλόμορφου στους πληθυσμούς της νότιας Ευρώπης(35,36,37). Οι συχνότητες των αλληλόμορφων ϵ_2 και ϵ_4 στην παρούσα μελέτη είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες που προέκυψαν από τη μόνη έρευνα στον ελληνικό πληθυσμό(38) (ϵ_2 :11,6 προς 5,3%, ϵ_4 :13,6 προς 6,5%). Σίγουρα, βέβαια, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για τον προσδιορισμό της κατανομής στους Έλληνες συμπεριλαμβάνοντας άτομα και από άλλες περιοχές της επικράτειας.

Και στο δείγμα μας (στους Έλληνες) αποδείχτηκε ότι στους φορείς του ϵ_2 αλληλόμορφου είχαμε μειωμένες συγκεντρώσεις ολικής και LDL χοληστερόλης σε σχέση με τους ομοζυγώτες ϵ_3/ϵ_3 και και τους φορείς του ϵ_4 αλληλόμορφου. Η διαφορά αυτή ήταν περισσότερο εμφανής στις γυναίκες καθώς στους άντρες, αν και η εν λόγω διαφορά υπήρχε, εντούτοις δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Τα στοιχεία αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με άλλες έρευνες (επίδραση του πολυμορφισμού σε σχέση με το φύλο και την κατάσταση των γυναικών)(8,11,12,14,18) που μαρτυρούν ότι η διαφορά είναι πιο έντονη στις γυναίκες παρά στους άντρες και ειδικότερα σε αυτές που έχουν περάσει την εμμηνόπαυση παρά σε αυτές που βρίσκονται σε προεμμηνόπαυσιακό στάδιο(18).

Οι φορείς του ϵ_4 αλληλόμορφου δεν είχαν αυξημένα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης σε σχέση με τους ομοζυγώτες ϵ_3/ϵ_3 ούτε στο ολικό ούτε στα επιμέρους φύλα. Αξίζει, εδώ, να αναφέρουμε ότι η σχέση του ϵ_4 αλληλόμορφου με τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης του πλάσματος είναι κυρίως εμφανής σε πληθυσμούς που καταναλώνουν δίαιτες πλούσιες σε κορεσμένα λίπη και χοληστερόλη. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι τα υψηλότερα επίπεδα LDL χοληστερόλης, που παρατηρούνται σε φορείς του ϵ_4 αλληλόμορφου, εκδηλώνονται κατά πρώτο λόγο παρουσία μιας αθηρογόνου δίαιτας που είναι χαρακτηριστικό ορισμένων κοινωνιών. Εξάλλου, έχει βρεθεί ότι άτομα με διαφορετικούς γονότυπους μπορεί να ανταποκρίνονται διαφορετικά στο κορεσμένο λίπος και τη χοληστερόλη της δίαιτας (35). Αυτό μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι η έλλειψη θετικής συσχέτισης του ϵ_4 αλληλόμορφου με

αυξημένα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης μπορεί να οφείλεται στις ιδιαίτερες διατροφικές συνήθειες των Ελλήνων (μεσογειακή διαίτα) που έχουν αποδειχτεί ευεργετικές για την εμφάνιση των καρδιαγγειακών παθήσεων. Για το λόγο αυτό θα ήταν χρήσιμα και άλλα στοιχεία, όπως οι διατροφικές συνήθειες των ατόμων του δείγματος, καθώς και στοιχεία που σχετίζονται με το λιπιδαιμικό προφίλ (BMI, φυσική κατάσταση κ.λ.π.).

Αξίζει, ακόμη, να αναφέρουμε ότι οι επιδράσεις του πολυμορφισμού της apoE στα λιπίδια του πλάσματος είναι περισσότερο εμφανείς σε μεγαλύτερες ηλικίες αν και υπάρχουν στοιχεία ότι και σε παιδιά τριών χρόνων είναι ήδη εμφανής η επίδραση αυτή(15).

Από άλλες έρευνες γνωρίζουμε ότι το ε2 αλληλόμορφο σχετίζεται, εκτός από αυξημένα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης, με αυξημένα επίπεδα HDL χοληστερόλης. Το αντίθετο θεωρείται ότι ισχύει για το ε4 αλληλόμορφο(11,15). Στο δείγμα μας το φαινόμενο αυτό δεν ήταν στατιστικά σημαντικό. Ωστόσο, μια τάση ήταν εμφανής. Άλλωστε, ο μηχανισμός της σχέσης μεταξύ του πολυμορφισμού της apoE και των συγκεντρώσεων της HDL παραμένει αδιευκρίνιστος. Πρόσφατες έρευνες in vivo και in vitro έχουν δείξει ότι η apoE παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταφορικής πρωτεΐνης των εστέρων χοληστερόλης (CETP, συστατικό των HDL). Έτσι, αν ο πολυμορφισμός της apoE επηρεάζει τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης αυτής, αυτό μπορεί να εξηγή τη σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού της apoE και των συγκεντρώσεων της HDL χοληστερόλης(11).

Τα αποτελέσματα της μελέτης για τα τριγλυκερίδια έδειξαν, σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο, ότι στους φορείς των ε2 και ε4 αλληλόμορφων υπάρχει αξιοσημείωτη αύξηση των τριγλυκεριδίων σε σχέση με τα άτομα E3/3. Στους άντρες ήταν περισσότερο εμφανής η τάση αυτή. Σε όλες τις προηγούμενες έρευνες έχει βρεθεί ότι τα τριγλυκερίδια ήταν υψηλότερα στα άτομα E2/2, E2/3 και E3/4 συγκριτικά με τα άτομα με γονότυπο E3/3. Τα στοιχεία που προέκυψαν από το συγκερασμό πολλών ερευνών (meta-analysis)(39) συμφωνούν ότι υπάρχει μια συνεπής σχέση μεταξύ του γονότυπου της apoE και των συγκεντρώσεων των τριγλυκεριδίων του πλάσματος.

Τα υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων που παρατηρούνται στους φορείς του ε2 αλληλόμορφου μπορούν να εξηγηθούν από την πιο αργή απομάκρυνση από το πλάσμα

των χυλομικρών και των υπολειμμάτων VLDL. Επιπρόσθετα, οι ομοζυγώτες E2/2 παρουσιάζουν μειωμένη λιπόλυση των VLDL, γεγονός που δείχνει ότι μια διαφοροποίηση στη λιπολυτική διαδικασία μπορεί επίσης να συνεισφέρει στη συνάθροιση των τριγλυκεριδίων του πλάσματος στους φορείς του ε2 αλληλόμορφου(21).

Είναι αξιοσημείωτο ότι, όπως έχει βρεθεί σε άλλες μελέτες, και στον ελληνικό πληθυσμό η παρουσία του ε4 αλληλόμορφου σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων. Η θετική συσχέτιση ε4-τριγλυκεριδίων είχε γίνει εμφανής από το ότι το ε4 μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεση της υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου V, μια παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται και από αυξημένα τριγλυκερίδια. Οι παρατηρήσεις άλλων ερευνών μας επιτρέπουν να υποθέσουμε ότι η apoE4, που συνδέεται κατά προτίμηση με την VLDL(39,40,41) παρεμβαίνει στη δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης του πλάσματος (LPL) ή/και στο σύστημα απομάκρυνσης των τριγλυκεριδίων, οδηγώντας σε πιο αργή λιπόλυση ή/και απομάκρυνση των τριγλυκεριδίων του πλάσματος. Μια τέτοια υπόθεση είναι αρκετά πιθανή καθώς έχει βρεθεί ότι η apoE επηρεάζει τη δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής και της ηπατικής λιπάσης(39).

Παρότι από τα αποτελέσματα δε βρέθηκε θετική συσχέτιση του ε4 αλληλόμορφου με την ολική και LDL χοληστερόλη παρά μόνο με τα τριγλυκερίδια, εντούτοις ο λόγος ολικής προς HDL χοληστερόλη βρέθηκε σημαντικά αυξημένος στους φορείς του ε4 αλληλόμορφου (αύξηση κατά την πορεία ε2→ε3→ε4). Με βάση αυτό το εύρημα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι και στον ελληνικό πληθυσμό το ε4 αλληλόμορφο σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων ενώ σε άλλους πληθυσμούς αυτό είναι εμφανές απλά από τη σχέση ε4-LDL χοληστερόλης. Πάντως, αξίζει να σημειώσουμε ότι η συχνότητα του ε4 αλληλόμορφου είναι μειωμένη στους Έλληνες, το οποίο πέρα από τις ιδιαιτερότητες της διαίτας μπορεί να αποτελεί εξήγηση γιατί οι θάνατοι από στεφανιαία νόσο είναι μειωμένοι στον ελληνικό πληθυσμό σε σχέση με τους Βορειοευρωπαίους.

Συμπερασματικά, βρήκαμε ότι το ε2 αλληλόμορφο σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης, καθώς και με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων. Αντίθετα, η παρουσία του ε4 αλληλόμορφου δε σχετίζεται με

σημαντικές αλλαγές του λιπιδαιμικού προφίλ εκτός από την αύξηση που προκαλεί στα τριγλυκερίδια. Ίσως, η έλλειψη των αλλαγών να σχετίζεται με άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. διαίτα, φυσική κατάσταση κ.λ.π.) γεγονός που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

1. Bailey K, Bailey A, Apolipoprotein E, Linkages and Genetic Factors with Coronary Risk. In: *Cell Biology*. Science 1989; 246:27-36.

2. Charles Wilson, Mark A. Weisfeld, Karl H. Weingarten, Robert W. Bailey, David A. Agard. Three-dimensional Structure of the LDL Receptor-binding Domain of Human Apolipoprotein E. Science 1991; 252:1817-1822.

3. Anthony Leone, Karl H. Weingarten, Bailey C. Roll Jr., Huixi Gao, Thomas L. Isenberger, Douglas A. Leinonen, Janet K. Boyles, Ross Anil, Martin Gonsky, Robert W. Bailey, and Tamas Varga. Site-specific Mutagenesis of Human Apolipoprotein E. The Journal of Biological Chemistry 1988; 263:3542-3545.

4. Bailey K, Liu, Joseph McPherson, Carl A. P. Bruns, Thomas K. Katsanovich, and Jan I. Bjorken. Isolation, Characterization, and Mapping to Chromosome 19 of the Human Apolipoprotein E Gene. The Journal of Biological Chemistry 1985; 260:6248-6257.

5. H.J. Havel and J.P. Kane. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1973; 70:3015.

6. Gust Eriksson, M.D. Innsbruck, Austria. Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. American Heart Journal 1987; 113:433-440.

7. Charles F. Sing. How Dangerous Role of the Apolipoprotein E Polymorphism in Determining Normal Plasma Lipid and Lipoprotein Variants. American Journal of Human Genetics 1987; 41:268-285.

8. Bruce A. Gold, L. Linda M. Havel. Apolipoprotein E as a risk factor for coronary artery disease: genetic and molecular biology approach. Canadian and American J. Med 1988; 7:26-33.

9. Karl H. Weingarten, Thomas L. Isenberger, and Robert W. Bailey. Apolipoprotein E-dependent Activity of the Human E Apolipoprotein is Cytochrome P-450 α 1. The Journal of Biological Chemistry 1991; 266:15154-15157.

10. H. Michael Waldman, Eric Boerwinkle, Michael S. Lu, Charles S. Foster, Hans Joseph Meisler, Allen Cunniff, and Gust Eriksson. The Apolipoprotein E Polymorphism: A Comparison of Allele Frequencies and Effects on Five Populations. American Journal of Human Genetics 1991; 49:116-128.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Robert W. Mahley. Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology. *Science* 1988; 240:622-629.
2. Charles Wilson, Mark R. Wardell, Karl H. Weisgraber, Robert W. Mahley, David A. Agard. Three-Dimensional Structure of the LDL Receptor-Binding Domain of Human Apolipoprotein E. *Science* 1991; 252:1817-1822.
3. Avraham Lalazar, Karl H. Weisgraber, Stanley C. Rall, Jr., Hilla Giladi, Thomas L. Innerarity, Avigdor Z. Levanon, Janet K. Boyles, Boaz Amit, Marian Gorecki, Robert W. Mahley, and Tikva Vogel. Site specific Mutagenesis of Human Apolipoprotein E. *The Journal of Biological Chemistry* 1988; 263:3542-3545.
4. Hriday K. Das, Joseph McPherson, Gail A. P. Bruns, Sotirios K. Karathanasis, and Jan L. Breslow. Isolation, Characterization, and Mapping to Chromosome 19 of the Human Apolipoprotein E Gene. *The Journal of Biological Chemistry* 1985; 260:6240-6247.
5. R.J. Havel and J.P. Kane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1973; 70:2015.
6. Gerd Utermann, M.D. Innsbruck, Austria. Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *American Heart Journal* 1987; 113:433-440.
7. Charles F.Sing, Jean Davignon. Role of the Apolipoprotein E Polymorphism in Determining Normal Plasma Lipid and Lipoprotein Variation. *American Journal of Human Genetics* 1985; 37:268-285.
8. Peter de Knijff, Louis M. Havekes. Apolipoprotein E as a risk factor for coronary heart disease:a genetic and molecular biology approach. *Genetics and molecular biology* 1996; 7:59-63.
9. Karl H. Weisgraber, Thomas L. Innerarity, and Robert W. Mahley. Apnormal Lipoprotein Receptor-binding Activity of the Human E Apoprotein due to Cysteine-Arginine Interchange at a Single Site. *The Journal of Biological Chemistry* 1982; 257(5):2518-2521.
10. D. Michael Hallman, Eric Boerwinkle, Nilmani Saha, Christoph Sandholzer, Hans Jurgen Menzel, Albert Csazar, and Gerd Utermann. The Apolipoprotein E Polymorphism: A Comparison of Allele Frequencies and Effects in Nine Populations. *American Journal of Human Genetics* 1991; 49:338-349.

11. Barbara V. Howard, Samuel S. Gidding, and Kiang Liu. Association of Apolipoprotein E Phenotype with Plasma Lipoproteins in African-American and White Young Adults, The CARDIA Study. *American Journal of Epidemiology* 1998; 148(9):859-868.
12. M. Ilyas Kamboh, Christopher E. Aston, Robert E. Ferrell, Richard F. Hamman. Impact of apolipoprotein E polymorphism in determining interindividual variation in total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in Hispanics and non-Hispanic whites. *Atherosclerosis* 1993; 98:201-211.
13. Jau-Tsuen Kao, Keh-Sung Tsai, Chih-Jen Chang, Po-Chao Huang. The effects of apolipoprotein E polymorphism on the distribution of lipids and lipoproteins in the Chinese population. *Atherosclerosis* 1995; 114:55-59.
14. Mercedes Muros, Carmen Rodriguez-Ferrer. Apolipoprotein E polymorphism influence on lipids, apolipoproteins and Lp(a) in a Spanish population underexpressing apo E4. *Atherosclerosis* 1996; 121:13-21.
15. T. Lehtimäki, T. Moilanen, J. Viikari, H. K. Akerblom, C. Ehnolm, T. Ronnema et al. Apolipoprotein E phenotypes in Finnish youths: a cross-sectional and 6-year follow-up study. *Journal of Lipid Research* 1990; 31:487-495.
16. Peter de Knijff, Arn M.J.M. van den Maagdenberg, Rune R. Frants, and Louis M. Havekes. Genetic Heterogeneity of Apolipoprotein E and Its Influence on Plasma Lipid and Lipoprotein on Plasma Lipid and Lipoprotein Levels. *Human Mutation* 1994; 4:178-194.
17. M. Ilyas Kamboh, Christopher E. Aston, Richard F. Hamman. The relationship of APOE polymorphism and cholesterol levels in normoglycemic and diabetic subjects in a biethnic population from the San Luis Valley, Colorado. *Atherosclerosis* 1995; 112:145-159.
18. Ernst J. Schaefer, Stefania Lamon-Fava, Steven Johnson, Jose M. Ordovas, Mary M. Schaefer, William P. Castelli, Peter W.F. Wilson. Effects of Gender and Menopausal Status on the Association of Apolipoprotein E Phenotype With Plasma Lipoprotein Levels. *Arteriosclerosis Thrombosis* 1994; 14:1103-1115.
19. Peter de Knijff, Dorret I. Boosma, Elly de Wit, Herman Jan M. Kempen, Jan A. Gevers Leuven, Rune R. Frants, Louis M. Havekes. The effect of apolipoprotein E phenotype on plasma lipids is not influenced by environmental variability: results of a Dutch twin study. *Human Genetics* 1993; 91:268-272.
20. S.C.Rall JR, R.W. Mahley. The role of apolipoprotein E genetic variants in lipoprotein disorders. *Journal of Internal Medicine* 1992; 231:653-659.

21. Bernard J. Brenninkmeijer, Paul M. Stuyt, Pierre N. M. Demacker, Anton F. H. Stalenhoef, and Albert van't Laar. Catabolism of chylomicron remnants in normolipidemic subjects in relation to the apoprotein E phenotype. *Journal of Lipid Research* 1987; 28:361-370.
22. S.J.H. Bredie, J.M. Vogelaar, P.N.M. Demacker, A.F.H. Stalenhoef. Apolipoprotein E polymorphism influences lipid phenotypic expression, but not the low density lipoprotein subfraction distribution in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1996; 126:319-327.
23. Y. Antero Kesaniemi, Christian Ehnholm, and Tatu A. Miettinen. Intestinal Cholesterol Absorption Efficiency in Man is Related to Apoprotein E Phenotype. *Journal of Clinical Investigation* 1987; 80(2):578-581.
24. Helena Gylling, Tatu A. Miettinen. Cholesterol absorption and synthesis related to low density lipoprotein metabolism during varying cholesterol intake in men with different apoE phenotypes. *Journal of Lipid Research* 1992; 33:1361-1371.
25. Luc G., Bard J-M, Arveiler D., Evans A., Cambou J-P, Bingham A., Amouyel P., Schaffer P., Ruidavets J-P, Cambien F. et al. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction. The ECTIM study. *Arteriosclerosis Thrombosis* 1994; 14:1412-1419.
26. Tirt L. De Knijff P., Menzel H-J, Ehnholm C., Nicaud V., Havekes LM., for the EARS group. ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS study. 1994; 14:1617-1624.
27. Hixson JE., and the pathobiological determinants of atherosclerosis in youth (PDAY) research group. Apolipoprotein E polymorphisms affect atherosclerosis in young males. *Arteriosclerosis Thrombosis* 1991; 11:1237-1244.
28. H. J. Lenzen, G. Assmann, R. Buchwalsky, and H. Schulte. Association of Apolipoprotein E Polymorphism, Low-Density Lipoprotein Cholesterol, and Coronary Artery Disease. *Clinical Chemistry* 1986; Vol.32, No 5:778-781.
29. Sathanur R. Srinivasan, Christian Ehnholm, Wendy A. Wattigney, Weihang Bao, Gerald S. Berenson. The relation of apolipoprotein E polymorphism to multiple cardiovascular risk in children: the Bogalusa Heart Study. *Atherosclerosis* 1996; 123:33-42.
30. Wilson PWF, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer E. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease. The Framingham offspring study. *JAMA* 1994; 272:1666-1671.

31. Stengard JH, Zerba KE, Pekkanen J, Ehnholm C, Nissinen A, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men. *Circulation* 1995; 91:265-269.
32. Friedewald, W. T., R. I. Levy, and D. S. Fredrickson. Estimation of the concentration of low-density-lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 1972; 18:499-502.
33. Sing CF, Orr JD. Analysis of genetic and environmental sources of variation in serum cholesterol in Tecumseh, Michigan. III. Identification of genetic effects using 12 polymorphic genetic blood marker systems. *American Journal of Human Genetics* 1976; 28:453-464.
34. Davignon J., Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8(1):1-21.
35. Jose M. Ordovas. The genetics of serum lipid responsiveness to dietary interventions. *Proceedings of the Nutrition Society* 1999; 58:171-180.
36. Gerdes LU, Klausen IC, Sihm I., Faergeman O. Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other studu populations around the world. *Genetic Epidemiology* 1996; 9:159-165.
37. James R.W., Boemi M.G., Giansanti R., Fumelli P., Pometta D. Underexpression of the apolipoprotein E4 isoform in an Italian population. *Arteriosclerosis Thrombosis* 1993; 13:1456-1463.
38. Sklavounou E., Economou-Petersen E., Karadima G., Panas M., Avramopoulos D., Varsou A., Vassilopoulos D., Petersen MB. Apolipoprotein E polymorphism in the Greek population. *Clinical Genetics* 1997; 52(4):216-218.
39. J. Dallongeville, S. Lussier-Cacan, and J. Davignon. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *Journal of Lipid Research* 1992; 33:447-454.
40. Gregg R.E., L.A. Zech, E.J. Schaefer, D. Stark, D. Wilson, H.B. Brewer, Jr. Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans. *Journal of Clinical Investigation* 1986; 78:815-821.
41. Steinmetz A., C. Jacobs, S. Motzny, H.Kaffarnik. Differential distribution of apolipoprotein E isoforms in human plasma lipoproteins. *Arteriosclerosis* 1989; 9:405-411.
42. The National Cholesterol Education Program. *Report of the Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescents*. Bethesda, Md, 1991, National Heart, Lung and Blood Institute.
43. Zeman F.J. *Clinical Nutrition and Dietetics*. 2/e 1991;369

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Συχνότητες αλληλόμορφων της apoE σε υγιείς ανθρώπινους πληθυσμούς(16).

Apolipoprotein E Allele Frequencies in Healthy Human Populations*

Population/subpopulation	Sample size	Apolipoprotein E alleles					
		APOE*2		APOE*3		APOE*4	
		Frequency	95% c.i.l.*	Frequency	95% c.i.l.	Frequency	95% c.i.l.
Australian aboriginals ^b	64	0.000	0.000-0.001	0.742	0.727-0.756	0.258	0.243-0.273
Papua New Guineans ^c	110	0.145	0.133-0.157	0.486	0.469-0.503	0.368	0.352-0.384
Pacific Islanders ^d	67	0.045	0.038-0.052	0.799	0.785-0.812	0.157	0.145-0.170
Southeast Asians ^e	910	0.110	0.100-0.121	0.814	0.800-0.827	0.077	0.068-0.086
Northeast Asians ^f	2,755	0.051	0.044-0.059	0.849	0.836-0.861	0.100	0.090-0.111
Inuit ^g	133	0.015	0.011-0.020	0.756	0.741-0.770	0.229	0.215-0.243
Amerindians ^h	326	0.000	0.000-0.001	0.864	0.852-0.875	0.136	0.125-0.148
American hispanics ⁱ	1,201	0.041	0.034-0.048	0.858	0.846-0.869	0.101	0.091-0.112
Caucasians							
European descent ^j							
American whites	5,027	0.066	0.058-0.075	0.796	0.782-0.809	0.137	0.126-0.149
Australian whites	598	0.103	0.093-0.114	0.760	0.745-0.774	0.137	0.126-0.149
British	844	0.082	0.073-0.092	0.769	0.754-0.783	0.149	0.137-0.161
North-east European	2,395	0.041	0.036-0.047	0.752	0.739-0.764	0.207	0.196-0.219
North European	1,325	0.090	0.081-0.100	0.743	0.728-0.757	0.167	0.154-0.180
Middle European	8,191	0.084	0.080-0.088	0.770	0.763-0.776	0.146	0.141-0.151
South European	2,737	0.089	0.080-0.099	0.795	0.781-0.808	0.116	0.105-0.127
Combined	21,117	0.076	0.067-0.085	0.776	0.761-0.790	0.148	0.136-0.160
Non-European descent ^k							
Indian	142	0.046	0.039-0.053	0.827	0.814-0.839	0.127	0.116-0.139
Africans ^l							
Afro-Americans	1,062	0.075	0.066-0.084	0.722	0.706-0.737	0.203	0.190-0.217
Sudanese blacks	103	0.083	0.074-0.093	0.626	0.609-0.642	0.291	0.276-0.306
Nigerian blacks	541	0.027	0.022-0.033	0.672	0.656-0.687	0.301	0.286-0.317
Combined	1,706	0.060	0.052-0.068	0.700	0.684-0.715	0.240	0.266-0.255
All populations	28,531	0.071	0.069-0.073	0.783	0.780-0.786	0.146	0.143-0.149

A large sheet of graph paper with a pink sticky note at the bottom. The sticky note contains the handwritten text: "LOW POLY - HIGH MEAN" and "BIG DISG".

A. M. 16729

4377

7112

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Υπηρ.Βιβλ/κης Χαροκόπειου Παν/μίου.957705

* 7 1 1 2 *



HU

