

MOLEKULINĖS BIOLOGIJOS METODŲ TAIKYMAS TIRIANT APOLIPOPROTEINO E GENO POLIMORFIZMĄ

Natalija Vansevičienė¹, Algimantas Paulauskas²

¹ *Vytauto Didžiojo universitetas, Vileikos g. 8, LT-44404 Kaunas; tel. (8-650) 11 504;*

el. paštas: natali22@freemail.lt

² *Vytauto Didžiojo universitetas Vileikos g. 8, LT-44404 Kaunas; tel. (8-687) 58 420;*

el. paštas: algis_paulauskas@fc.vdu.lt

Santrauka. Pasaulyje vyksta atskirų širdies ir kraujagyslių ligų genetinių žymenų paieška. Nustatyti 35 bialelinės žmogaus genomo vietos su 15 genų, dalyvaujančių aterosklerozės formavimesi ir vystymesi: lipidų, homocisteino metabolizme, reguliuojant kraujo spaudimą, trombozės procese, leukocitų adhezijoje (Cheng et al., 1999). Ištirtas apolipoproteino E, angiotenzinogeno, angiotenziną konvertuojančio fermento, smegenų natriuretino peptido ir kitų genų polimorfizmas bei jo koreliacija su širdies ir kraujagyslių ligomis. Per paskutinįjį dešimtmetį ypač susidomėta apolipoproteino E (apoE) – baltymo, dalyvaujančio pernešant cholesterolį, geno tyrimais. Išaiškintos trys pagrindinės apoE izoformos - apoE2, apoE3 ir apoE4 – trijų alelių ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) viename geno lokuse produktai. Mutantinės apolipoproteino E formos negali jungtis arba silpniau jungiasi su mažo tankio lipoproteinų receptoriais, rišančiais cholesterolį. Šiame straipsnyje apibūdinami pagrindiniai molekulinės biologijos metodai, pritaikyti žmonių, sergančiųjų širdies ir kraujagyslių ligomis, apolipoproteino E geno polimorfizmo tyrimams vykdyti ir eksperimentiniai duomenys, patvirtinantys šių metodų efektyvumą.

Raktažodžiai: polimorfizmas, apolipoproteinas E, polimerazinė grandininė reakcija, restrikcija.

USING OF MOLECULAR BIOLOGY METHODS FOR DETECTION OF APOLIPOPROTEIN E GENE POLYMORPHISM

Summary. Apolipoprotein E (apo E) is a protein that plays an essential role in lipid metabolism and distribution. The apo E gene is polymorphic, and has three alleles code for isoforms $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, and $\epsilon 4$, which differ by single-amino-acid substitutions. In the common apo $\epsilon 3$ polymorphism, TGC encodes for Cys¹¹², and CGC encodes for Arg¹⁵⁸. In the apo $\epsilon 2$ another TGC codon results in Cys¹⁵⁸, whereas in the apo $\epsilon 4$ a different CGC codon gives rise to Arg¹¹². The three apo E alleles determine six genotypes, i.e., three homozygotes designated $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, and $\epsilon 2/\epsilon 2$ and three heterozygotes designated $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, and $\epsilon 2/\epsilon 4$. Early methods for detection of apo E isoforms were based on protein isoelectrofocusing. After the identification of the apo E gene molecular methods based on PCR amplification and *HhaI* digestion were introduced and later somewhat improved. However, all PCR-based assays are difficult to interpret because the *HhaI* enzyme yields several small fragments, not all of which are specific for the apo E genotypes. In this study we used two restriction enzymes, i.e., *AflIII* and *HaeII*, that recognize the allele-specific nucleotide substitutions at codons 112 and 158, respectively, and do not recognize additional sites.

As expected, simultaneous digestion of the 218-bp amplified product yielded on 3% agarose gel electrophoresis 145-bp, 168-bp, and 195-bp fragments that were specific for apo $\epsilon 3$, $\epsilon 2$, and $\epsilon 4$, respectively. All six possible genotypes for apo E, i.e., $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, and $\epsilon 2/\epsilon 2$, were clearly discernible. In our study of patients with cardiovascular and heart diseases the allele frequencies were 0,096, 0,692 and 0,212 for apoE $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ir $\epsilon 4$, respectively. The gene frequencies were: $\epsilon 2/\epsilon 2$ (0,038), $\epsilon 2/\epsilon 3$ (0,096), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (0,019), $\epsilon 3/\epsilon 3$ (0,52), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (0,25), $\epsilon 4/\epsilon 4$ (0,077).

Keywords: polymorphism, PCR, apolipoproteinE, restriction.

Įvadas. Širdies ir kraujagyslių ligos ŠKL (arterinė hipertenzija, koronarinė širdies liga, aterosklerozė, kardiomiopatijos) yra viena svarbiausių ne tik medicinos, bet ir socialinių nūdienos problemų. 5,2 milijonai žmonių (14% visų mirčių pasaulyje arba trečdalis – industrijos šalyse) miršta dėl išeminės širdies ligos ŠKL, 4,6 mln. – dėl smegenų kraujagyslių ligų. Pasaulinės sveikatos organizacijos duomenimis, sergamumas ir mirtingumas dėl širdies ir kraujagyslių ligų Baltijos šalyse yra vienas didžiausių: vyrų mirtingumas yra beveik 2 kartus didesnis negu Skandinavijos šalyse. Širdies ir kraujagyslių ligos sudaro apie pusę visų mirčių Lietuvoje (1997 metais – net 55,3%), 1/3 invalidumo bei nulemia 15–20% apsilankymų sveikatos priežiūros įstaigose (Petruilionienė, 1999). Lietuvos sveikatos informacijos centro duomenimis, 2001 metais gyventojų proporcinis mirtingumas nuo kraujo apytakos ligų šalyje sudarė 44,9% tarp vyrų ir 64,8% tarp moterų, o 2002 metais

atitinkamai 45,7% ir 62,4% (Lietuvos sveikatos informacijos centro duomenys, 2001). Nustatyta, kad daugiau nei 5% visų ištirtų genų yra susiję su širdies veikla (Keating et Sanguinetti, 1996). Iki 50% pacientų, turinčių ypatingas mutacijas ir aiškius jas nulemiančius genetinius pokyčius, miršta nuo širdies ir kraujagyslių ligų net nesulaukę 40 metų (Fackelmann, 1994). Jau seniai žinoma, kad širdies ligų šeimos istorija laikoma ligos rizikos veiksnium: tikimybė susirgti yra didesnė, jei vienas iš paciento tėvų, brolių ar seserų anksti (vyrui iki 55, moterų iki 65 metų) susirgo panašiomis ligomis arba nuo jų mirė. Esant dabartiniams pasiekimams genetikos ir molekulinės biologijos srityse, galima atkreipti dėmesį į tam tikrus aktualius ir specifinius širdies ir kraujagyslių ligoms genus (bei jų baltyminius produktus), sužinoti daugiau apie minėtų ligų pasireiškimo bei molekulinį vystymosi mechanizmus ir taip palengvinti diagnozę bei gydymą (ypač jaunesnių pacientų) (Petruilionienė, 1999). Remian-

tis panašia struktūra ir funkcinėmis savybėmis galima ieškoti papildomų genų, susijusių su širdies ir kraujagyslių ligomis. Neretai tokie genai yra polimorfiški. Polimorfinės geninės sistemos biochemiškai ir patofiziologiškai susijusios su tam tikra liga, yra tarsi „genetinis fonas“, didinantis tam tikrų individų tikimybę ja susirgti. Tokių polimorfizmų analizė išryškina žymenų, darančių įtaką polinkiui į tam tikrą susirgimą, grupes (Kučinskas, 1998).

Jeigu tam tikro geno polimorfizmas yra širdies ir kraujagyslių ligų žymuo, tai laiku nustatytas genotipas (pvz., vaikystėje) gali apsaugoti individą nuo priešlaikinės mirties, jei asmuo ims kuo anksčiau rūpintis sveikata ir saugotis aplinkos rizikos veiksnių, turinčių įtakos širdies bei kraujagyslių ligų patogenezėi. Tokioms laboratorinės diagnostikos analizėms atlikti taikomi pažangūs molekulinės biologijos metodai.

Vienas tokių tyrimų objektų – apolipoproteinas E – plazmos baltymas, sintetinamas įvairiuose organuose, taip pat kepenyse, smegenyse, blužnyje bei inkstuose, ir gausiai aptinkamas vidaus skysčiuose, kur veikdamas kaip ligandas receptoriams, dalyvauja cholesterolio (CH) pernašoje tarp ląstelių, turinčių jo perteklių, ir ląstelių, kurioms jo trūksta (Mahley, 1988). Išaiškintos trys pagrindinės apoE izoformos – apoE2, apoE3 ir apoE4 – trijų alelių (ε2, ε3, ε4) viename geno lokuse produktai. Mutantinės apolipoproteino E formos negali jungtis arba silpniau jungiasi su MTL receptoriais.

Molekuliniai apoE polimorfizmo pagrindai buvo išaiškinti išanalizavus trijų pagrindinių izoformų aminorūgščių sekas, kurios tarp šių izoformų šiek tiek skiriasi (Smit et al., 1990). ApoE4 skiriasi nuo apoE3 tuo, kad apoE4 vietoj cisteino 112 AR pozicijoje yra argininas (Arg); apoE2 158 AR pozicijoje vietoj arginino kaip apoE3 yra cisteinas (Cys) (Utermann et al., 1980; Weisgraber et al., 1981; Rall et al., 1982). Pavyzdžiui, apoE2 atveju aprašytos 4 skirtingos mutacijos E2 (Arg158 → Cys), E2 (Lys 146 → Gln), E2 (Arg 145 → Cys) ir E2-Christchurch (Arg 136 → Ser).

Norint išsiaiškinti, ar apoE polimorfizmas tikrai tiesiogiai susijęs su širdies ir kraujagyslių ligomis (aterosklerozės bei ankstyvos miokardo išemijos tikimybė) (Davignon et al., 1988), ar apoE fenotipas turi įtakos CH bei kitų lipidų koncentracijos lygiui kraujo serume ir jų metabolizmo efektyvumui (Smith, 2000), imtasi išsamių apoE polimorfizmo tyrimų populiacijų lygiui.

Iš pradžių apoE izoformoms nustatyti daugiausia buvo taikomas fenotipavimas (Paik et al., 1985). Jis pagrįstas baltymų izoelektrinio skirstymo metodu, kuris paremtas baltymo izoformų krūvio skirtumais. Metodas yra gana jautrus bet kokiam krūvio pokyčiui, sukeliama potransliacinės modifikacijos (sialinimas, glikozilimas) ar bandinio saugojimo metu (Utermann et al., 1975; Menzel et Utermann, 1986). Tačiau retieji apoE variantai, turintys tapatų bendrąjį krūvį kaip ir trys pagrindinės izoformos, gali tapti klaidingos identifikacijos objektais. J. E. Hixon ir D. T. Vernier sukūrė greitą apoE genotipavimo metodiką (Hixon et Vernier, 1990), pagrįstą polimerazine grandinine reakcija (PGR) (literatūroje anglų kalba – *polymerase chain reaction*, PCR), kuri sukėlė tikrą revoliuciją, kai 1985 metais buvo pirmą kartą aprašyta R. K. Saiki ir bendraautorių (grupės vadovas K.Mullis) (Saiki et al., 1985). Pagausus apoE seką,

apimančią 112 ir 158 aminorūgščių pozicijas, gautas produktas paveikiamas restrikcijos enzimais. Kadangi nukleotidų pakaitalai, lemiantys arginino arba cisteino atsiradimą 112 ir 158 pozicijose, keičia ir restriktazės kirpimo vietas, tai kiekvienas genotipas gali būti nustatomas pagal unikalius restrikcijos fragmentų derinius. Tuo būdu genotipo analizė tapo greitesniu ir patikimesniu metodu apoE įvairovei nustatyti (Hixon et Vernier, 1990; Kontula et al., 1990; Wenham et al., 1991; Dallinga-Thie et al., 1995).

Daugumos epidemiologinių–populiacinių studijų duomenimis, apoE ε4 alelis susijęs su didesnėmis, o ε2 alelis – su mažesnėmis bendro ir mažo tankio lipoproteinų, cholesterolio (MTL-CH) bei apoB koncentracijomis plazmoje palyginti su ε3 aleliu (Utermann et al., 1979; Ehnholm et al., 1986; Schaefer et al., 1987; Davignon et al., 1988; Hallman et al., 1991; Dallongeville et al., 1992). Nors žymaus reliatyvaus apoE alelių dažnio skirtumo tarp vyrų ir moterų nepastebėta, apoE alelių įtaka moterų lipidų kintamumui yra didesnė (Schaefer et al., 1994). Teigiama, kad apoE ε4 alelio bendro CH koncentracijos padidėjimo efektas sustiprėja tuomet, kai vartojama daug sočiųjų riebalų rūgščių bei cholesterolio (CH) turinčio maisto (Lewis et al., 1990; Lehtimäki et al., 1995a). Neseniai Švedijos specialistų tyrimai parodė, kad apoE4 izoforma nepalankiai veikia lipidų apykaitą tik tada, kai asmuo yra fiziškai neaktyvus. Nuolat judančių ir sportuojančių žmonių tarpe lipidų profilis nuo apoE genotipo nepriklauso (Schaefer et al., 1994).

9 populiacijų lyginamojoje analizėje nustatyta, kad turinčių ε2 alelių asmenų plazmos CH ir MTL-CH kiekis buvo mažesnis nei neturinčių šio alelio (Hallman et al., 1991). Pirmasis miokardo infarktas (MI) asmenims, turintiems apoE2/E3 fenotipą, išsivystė vėliau nei turintiems kitus apoE fenotipus. Jaunų vyrų, turinčių ε2 alelį ir mirusių ne dėl ligos, ateroskleroziniai aortos pažeidimai buvo mažesni. Tačiau vienam iš penkiasdešimties homozigotų apoE2/E2 išsivysto III tipo hiperlipoproteinemija. Sergant šia liga, plazmoje randamas labai didelis CH (dėl sutrikusios lipolizės proceso) kiekis. III tipo hiperlipoproteinemija yra ankstyvosios IŠL priežastis, sudaranti apie 5% visų ligos atvejų.

ApoE4 izoforma paprastai siejama su hipercholesterolemija. ApoE4 gali normaliai jungtis su receptoriumi, tačiau yra susijęs su aukštais plazmos CH bei MTL kiekiais, nes apoE4 turintys lipoproteinai greičiau katabolizuojami kepenyse per MTL receptorius nei E3. CH perteklius ląstelėje slopina MTL receptorių ekspresiją, todėl plazmoje ima kauptis MTL (Hallman et al., et al., 1991; Chappel et al., 1994). Moksliniai darbai patvirtina, kad ε4 alelis yra susijęs su santykinai didesne rizika anksti susirgti IŠL (Eto et al., 1989).

2000 metais Rusijoje atliktas atvejų kontrolės tyrimas rusų ir totorių populiacijose. Jo metu ε2/3 genotipo dažnis buvo sąlyginai didesnis žmonių, vyresnių nei 45 metai, kontrolinėje grupėje. Iki 45 metų amžiaus žmonių, išgyvenusių po MI, atvejų grupėje ε3/3 genotipo dažnis (50% palyginti su 75,47% sveikųjų to paties amžiaus asmenų kontroline grupe, OR = 0,33; p = 0,013) ir ε3 alelio dažnis (72,12% vs. 85,85%, OR = 0,43; p = 0,020) buvo mažesnis, o ε4 alelio dažnis buvo atitinkamai didesnis (22,12% vs. 10,38%, OR = 2,45; p = 0,030). Asmenų, kurie patyrė sunkesnės formos MI (lydimą

kardiogeninio šoko), patikimai – padidėjęs $\epsilon 3/4$ genotipo dažnis ir atitinkamai sumažėjęs $\epsilon 3/3$ bei $\epsilon 3$ alelio dažnis palyginti su asmenimis, kurie patyrė MI be minėtos komplikacijos. Totorių populiacijoje ligonių po MI iki 45 metų genotipas $\epsilon 4/4$ aptiktas 14,29% dažnumu, o sveikųjų totorių imtyje šis genotipas išvis neaptiktas (OR = 17,85; $p = 0,024$). Padaryta išvada, kad apoE polimorfizmas reikšmingas MI rizikai (Доборджгинидзе и др., 2000).

Laiku nustatytas polipoproteino E geno polimorfizmas (pvz., vaikystėje) gali apsaugoti individą nuo priešlaikinės mirties, jei asmuo ims kuo anksčiau rūpintis sveikata ir saugotis aplinkos rizikos veiksnių, turinčių įtakos širdies bei kraujagyslių ligų patogenezėi. Lietuvoje apoE genotipo nustatymo tyrimai Žmogaus genetikos centre atliekami tik pavieniais atvejais, o duomenų apie apoE alelių dažnius ir genotipų paplitimą tiek visoje Lietuvos populiacijoje, tiek atskirose žmonių grupėse nesama. Žinant, kad šalyje 2001 metais mirtingumas nuo kraujo apytakos ligų sudarė 54,1% (Lietuvos sveikatos informacijos centro duomenys), apoE geno polimorfizmo tyrimai yra labai aktualūs.

Dėl šių priežasčių mūsų **darbo tikslas** buvo perprasti, pritaikyti ir įvertinti genotipo nustatymo metodikos efektyvumą apoE geno įvairovei, tirti ir iširti širdies ir kraujagyslių ligomis sergančiųjų asmenų apoE polimorfizmą. Tyrimo subjektai – Kauno medicinos universiteto Kardiologijos klinikos pacientai, kuriems buvo imamas kraujas DNR tyrimams. Buvo iširti 52 pacientai (bendras amžiaus vidurkis $51,31 \pm 5,86$, intervalas 41–60 m.) – 26 vyrai, kurių amžiaus vidurkis $49,61 \pm 5,75$ metai; 26 moterys, kurių amžiaus vidurkis $53 \pm 5,58$ metai.

Metodai.

1. *Bandinio paruošimas.* Kraujas iš pacientų ir sveikų asmenų buvo paimtas į EDTA (etilendiamintetraacetatas) antikoaguliantu apdorotą mėgintuvėlį, kad nekrešėtų ir DNR būtų apsaugota nuo degradavimo. Kraujo pavyzdžiai buvo išdalinti į atskirus mėgintuvėlius po 200 μ l ir saugojami – 20°C temperatūroje ne ilgiau nei 2 mėnesius.

2. *Genominės DNR skyrimas iš kraujo.* DNR skyrimui buvo naudojamas genominės DNR valymo rinkinys (Genomic DNA Purification Kit #K0512, AB „Fermentas“, Lietuva). Paprastai iš 200 μ l šviežio kraujo po 20–25 minučių gaunama 2–10 μ g vidutiniškai 50kb DNR. Kiek DNR išgaunama, priklauso nuo leukocitų kiekio kraujo bandinyje (Paulauskas ir Tubelytė-Kirdienė, 2002). Skyrimo metu vadovautasi AB „Fermentas“ rekomenduojamu protokolu.

3. *DNR švarumo ir koncentracijos nustatymas.* DNR koncentracija ir švarumas vertinamas spektrofotometriškai. DNR tirpalai sugeria 260 nm ultravioletinius spindulius. Nustatyta, kad kai tirpalo sluoksnio storis yra 1 cm (kiuvetės storis), o optinis tankis $A = 1$, dvigrandės DNR koncentracija tirpale atitinka 50 μ l/ml. Optinių tankių 260nm/280nm santykis rodo DNR tirpalų švarumą. Jis turi būti lygus arba didesnis už 1,8. Jei tirpale yra baltymų ar fenolio priemaišų, šis santykis bus mažesnis nei nurodyta. Baltymų koncentracija neturi viršyti 0,5 mg/ml. Jei tirpale priemaišų yra daugiau, atliekamas pakartotinis genominės DNR valymas. Spektrofotometras iš karto nustato ir apskaičiuoja DNR koncentraciją tirpale.

4. *Apolipoproteino E geno amplifikacija.* Amplifikuojamas žmogaus apolipoproteino E geno 4 egzono 218 bp fragmentas, apimantis abi polimorfines apoE sritis. PGR procedūrą sudaro PGR mėginių bei PGR reakcijos mišinio paruošimas, amplifikacija ir PGR reakcijos produktų detekcija bei analizė. Pagrindiniai PGR komponentai: DNR, PGR buferis, deoksiribonukleozidtrifosfatai (dNTP), pradmenys, DNR *Taq* polimerazė. PGR buvo atliekama tokiais ciklais: 94°C*4 min. – 1 ciklas, 94°C*30s, 55°C*30s, 72°C*1 min. 30s – kartojama po 38 ciklus, 72°C*5min. – 1 ciklas, 4°C – laikymas.

5. *PGR produkto karpymas restrikcijos endonukleazėmis – restrikcija.* Daugeliu atvejų apoE genotipuoti naudojamas restrikcijos enzimas – *HhaI*. Tačiau daugelis mokslininkų skundžiasi, kad tokias PGR pagrįstas analizes sunku interpretuoti, kadangi *HhaI* restrikcijos enzimas duoda kelių smulkių fragmentų, kurie ne visuomet yra specifiški apoE genotipams, išiega. Taigi dalinis karpymas *HhaI* gali sąlygoti dviprasmiškus ir neapibrėžtus rezultatus. Mūsų laboratorijoje apoE geno polimorfizmo eksperimentiniuose tyrimuose, pagausinus apoE seką, apimančią 112 ir 158 aminorūgščių pozicijas, gautas produktas paveikiamas dviem restrikcijos enzimais, kurie atpažįsta aleliams specifinių nukleotidų pakeitimus atitinkamai 112 bei 158 kodonuose ir neatpažįsta papildomų DNR fragmento vietų.

Optimalios karpymo reakcijos sąlygos kiekvienam fermentui labai skiriasi, todėl DNR karpoma laikantis restrikcijos endonukleazių gamintojo pateiktų rekomendacijų. Naudojant 10x NEBuffer 2 (#B7002S, NEBuffer 2, MEDINOVA Scientific A/S, Vokietija), pritaikytą sudėtiniam kirpimui, pasirinktos restriktažės *HaeII* aktyvumas yra 100%, o *AflIII* – 75%. *HaeII* kirpimo atpažinimo seka ir specifinė kirpimo vieta (R – purinai; Y – pirimidinai).

6. *Pagausinto DNR fragmento elektroforezinis frakcionavimas ir vizualizavimas.* ApoE amplifikuotų 208bp fragmentų analizė vyksta 3% agarozės gelyje (fragmentų atskyrimo ribos 40–1600 bp), naudojant ϕ X174 DNR-*Hae III* Digest, kuris išryškina 11 fragmentų, tinkamų naudoti kaip molekulinės masės žymenis elektroforezės agarozės gelyje metu).

Kadangi DNR fragmentų masė yra mažesnė, jie frakcionuojami didesnės koncentracijos agarozės gelyje.

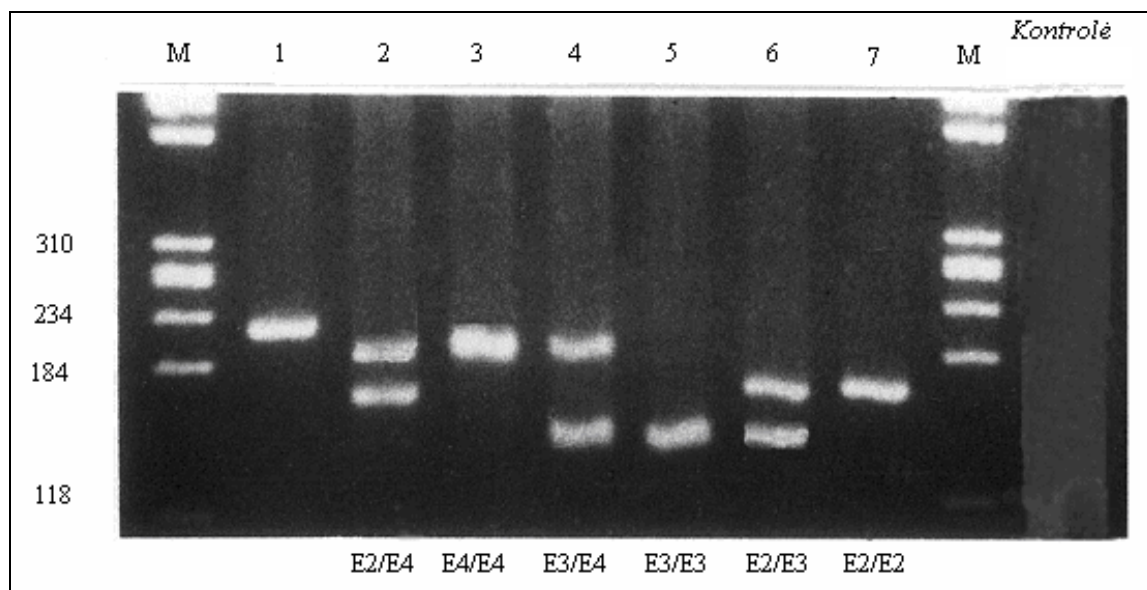
7. *Matematinė analizė.* Matematinė duomenų analizė buvo atlikta statistinėmis programomis Epi Info 6.04d (stratifikacija; santykinė rizika; etiologinė populiacijos frakcija, Pearson'o χ^2 kriterijaus (*goodness-to-fit*) testas; tikslusis Fišerio testas, Stjudento t-kriterijaus testas) versija (2001 metai) ir Statistica 5.0 versija (dispersinė analizė/Fišerio testas (Anova); koreliacinė analizė).

Rezultatai. *ApoE genotipo nustatymo efektyvumas.* Kaip ir tikėtasi, po viena laiko 218 bp amplifikuoto produkto karpymo dvejomis restriktažėmis ir po elektroforezės 3% agarozės gelyje išryškėja 145 bp, 168 bp ir 195 bp fragmentai, specifiški apoE3, E2 ir E4 izoformoms (1 pav.).

1-ame takelyje matomas nekirptas 218bp fragmentas. 2-ame takelyje matome dėl *AflIII* kirpimo atsiradusį bei išryškėjusį 168bp fragmentą ir dėl *HaeII* kirpimo atsiradusį bei išryškėjusį 195bp fragmentą. Taigi galima teigti, kad individo genotipas yra $\epsilon 2/\epsilon 4$, lemiantis E2/E4 apoE izoformą. 3, 5 ir 7 takeliuose matomi tik dvigubi

195bp, 145bp ir 168bp fragmentai, atitinkamai specifiški $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$ ir $\epsilon 2/\epsilon 2$ genotipams (baltymo E4/E4, E3/E3 ir E2/E2 izoformoms). 4 takelyje matome 145bp ir 195bp fragmentus – tai $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotipas (E3/E4 izoforma), o 6

takelyje išryškėję 145bp ir 168bp fragmentai – $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotipas (E2/E3 izoforma). Po 7 takelio už markerio ribos yra kontrolė – vietoj DNR piltas distiliuotas vanduo (1 pav.)

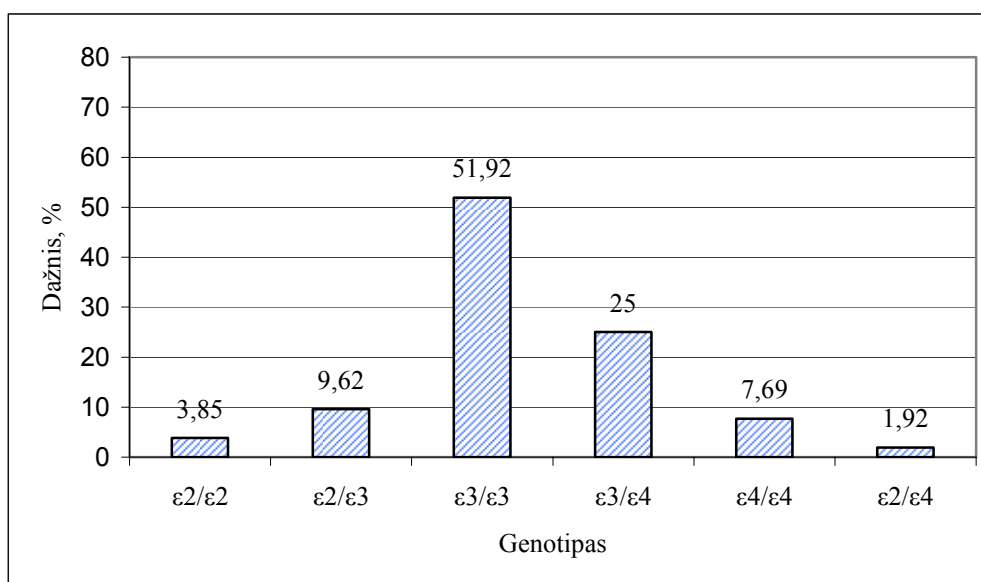


1 pav. Bendra apoE elektroforegrama, vaizduojanti visus 6 galimus skirtingų pacientų apolipoproteino E genotipus

ApoE genotipų ir alelių dažniai. Tiriamosioje populiacijoje (n = 52) buvo nustatyti visi šeši iš šešių galimų apolipoproteino E genotipai: $\epsilon 2/\epsilon 2$ (3,846 %, n = 2), $\epsilon 2/\epsilon 3$ (9,615 %, n = 5), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (1,923 %, n = 1), $\epsilon 3/\epsilon 3$ (51,923 %, n = 27), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (25 %, n = 13), $\epsilon 4/\epsilon 4$ (7,692 %, n = 4) (1 grafikas).

Labai reikšmingas ir statistiškai patikimas skirtumas

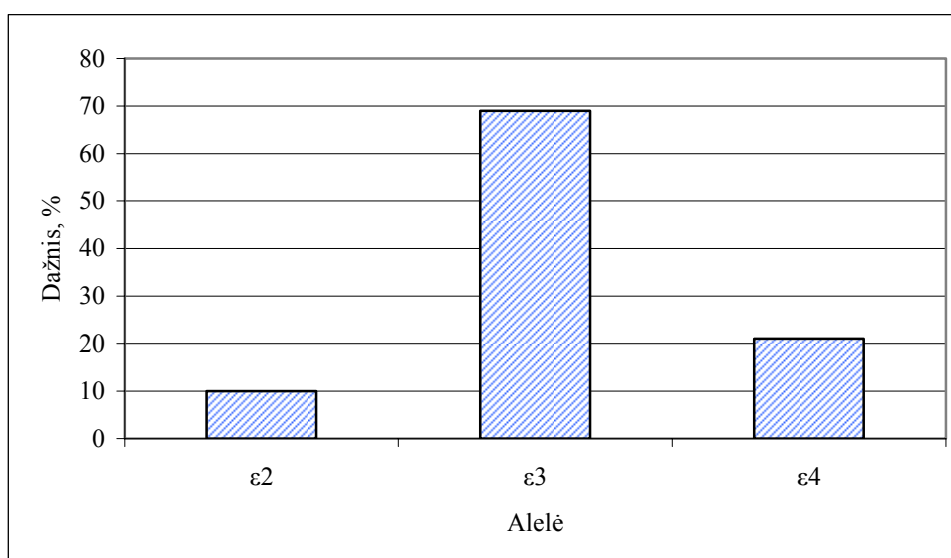
tarp dažniau pasitaikančių genotipų tiriamoje populiacijoje yra tarp $\epsilon 2/\epsilon 3$ ir $\epsilon 3/\epsilon 3$ ($\chi^2 = 21,85$, $p < 0,001$), $\epsilon 2/\epsilon 4$ ir $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($\chi^2 = 11,89$; $p < 0,001$), $\epsilon 3/\epsilon 3$ ir $\epsilon 4/\epsilon 4$ ($\chi^2 = 24,31$; $p < 0,001$), gana reikšmingas – $\epsilon 3/\epsilon 3$ ir $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($\chi^2 = 7,96$; $p < 0,01$), reikšmingas – tarp $\epsilon 2/\epsilon 3$ ir $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($\chi^2 = 4,30$; $p < 0,05$) ir tarp $\epsilon 3/\epsilon 4$ bei $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipų ($\chi^2 = 5,70$, $p < 0,05$) (1 grafikas).



1 grafikas. Apolipoproteino E genotipų dažnis tiriamoje populiacijoje (Kauno m. vyrai ir moterys, n = 52)

Visų ištirtų individų alelių dažnių reikšmės (%) pateiktos 2 grafike. Skirtumas tarp alelių dažnių pasiskirstymo statistiškai labai patikimas tarp $\epsilon 2$ ir $\epsilon 3$ bei $\epsilon 4$ ir $\epsilon 3$ ($p < 0,001$) ir šiek tiek mažesnis tarp $\epsilon 2$ ir $\epsilon 4$ ($p < 0,05$).

Alelio $\epsilon 2$ pasiskirstymas tirtoje populiacijoje sudarė 10%, $\epsilon 4$ – 21%, o didžiausias populiacijoje buvo $\epsilon 3$ alelio dažnis – 69%.



2 grafikas. Apolipoproteino E alelių dažnis tiriamoje populiacijoje (Kauno m., vyrai ir moterys, n = 52)

ApoE genotipas ir lytis. Tarp pacientų buvo 26 vyrai ir 26 moterys. Nors esama nemažai tyrimų, kur stratifikacija pagal lytis nėra atliekama, žinoma, kad širdies ir kraujagyslių ligos progresuoja sulig amžiumi, tačiau šis procesas tarp lyčių skiriasi. Dauguma autorių, tirdami apoE polimorfizmą, pateikia bendrus ir atskirai lyčių rezultatus.

Moterys dažniau serga po 45 metų, tuo tarpu vyrams senėjimas nėra toks reikšmingas ligos progresavimui: A amžiaus grupėje yra tik 8 moterys ($45,87 \pm 2,9$), o B grupėje – 18 ($56,16 \pm 2,79$) – 32%; vs. $\approx 66,67\%$; tuo tarpu A grupėje yra 17 ($45,94 \pm 2,7$), o B grupėje – 9 vyrai ($55,66 \pm 2,4$) – 33,33% vs. 68% ($\chi^2 = 6,24$; $df = 1$; $p = 0,012$).

Skirtumai tarp lyčių kaip alelių nešiotjų buvo minimalūs: 57,7% moterų ε3 alelio nešiotjų palyginti su 46,15% vyrų ($p = 0,405$); 15,38% vyrų ε2 alelio nešiotjų palyginti su 11,53% moterų populiacijos ($p = 1,00$) ir pagaliau 34,61% vyrų ε4 alelio nešiotjų palyginti su 30,77% moterų ($p = 0,76$). Tačiau moterų – ε4 alelio nešiotjų santykinis pasiskirstymo dažnis amžiaus grupėje iki 50 metų buvo 2,25 karto didesnis negu moterų, kurios nebuvo šio alelio nešiotjos (RR = 2,25; 95% PI [1,59–3,19]; $p = 0,003$), o tiriamos vyrų populiacijos santykinis dažnis buvo mažesnis ir tesudarė 1,42 (RR = 1,42; 95% PI [1,20–1,68]; $p = 0,007$).

Rezultatų aptarimas. Analizuojant alelių ir genotipų dažnio, susijusio su apolipoproteino E polimorfizmu, rezultatus, reikia atminti, kad šie dydžiai priklauso nuo tiriamos populiacijos ir net imties (pvz., vienoks pasiskirstymo dažnis gali būti žemaičių, kitoks – aukštaičių). Daugelis apžvalginių straipsnių mini, kad apoE alelių dažniai yra ypač kintami: turimas omenyje ε4 alelio dažnis (Mahley, 1988; Curtiss, 2000). Europoje šis genas turi gradientinį pasiskirstymą: ε4 alelis dažnesnis šiaurės regionuose ir retesnis pietų (Lucotte et al., 1997).

Bendru atveju apoE genotipų bei alelių dažniai, nustatyti šio eksperimento metu, iš dalies atitinka kitų mokslininkų rezultatus. ε3/ε3 genotipas daugumoje tirtų populiacijų yra dažniausias (40–90 %), po jo seka ε3/ε4 (26%) (Rall et Mahley, 1992; Siest et al., 1995), o štai

pasaulyje ε4/ε4 ir ε2/ε2 genotipai yra reti (atitinkamai 1–3% ir 2% kiekvienos populiacijos) (Corbo ir Scacchi, 1999). Mūsų atveju ε3/ε3 genotipo tiriamos imties dažnis sudarė beveik 52%, ε3/ε4 – 25%, ε2/ε2 – 3,85%, o ε4/ε4 – 7,7%. Nors imtis buvo nedidelė, dažniai tenkino Kastlo–Hardy–Weinbergo dėsnį.

Manoma, kad ε3 alelio dažnis populiacijose sudaro 77–78%, ε2 – 7–8% ir ε4 – 14–16% (Weisgraber et al., 1981; Zannis et al., 1982; Mahley et Rall, 1999; Fullerton et al., 2000). Mūsų atveju ε3 dažnis buvo 69,23%, ε4 – 21,15%, o ε2 – 9,61%. Tačiau reikia turėti omenyje, kad buvo tiriama specifinė žmonių grupė (širdies ir kraujagyslių ligoniniai), kurioje tikėtinas didesnis apoE ε4 alelio dažnis. Deja, turime labai nedaug informacijos apie kaimyninių šalių atliktas populiacines-pjūvio studijas širdies ir kraujagyslių ligomis sergančiųjų, norint iširti apoE polimorfizmą. Artimiausi kaimynai, kurių darbuose minima apoE polimorfizmo ir kraujo plazmos lipidų sąveika, yra čekai. Jų duomenimis, apoE alelių dažniai buvo ε3 – 82% , ε4 – 10,9%, o ε2 – 7,1% (populiacijos n = 287; vyrai n = 136; moterys = 151) ir reikšmėmis yra panašūs į kitas Vidurio Europos populiacijas (Hubáček et al., 2003).

Mūsų eksperimento atveju tik ε4 alelio dažnis patikimai skiriasi tarp amžiaus grupių ($\chi^2 = 6,79$; $p = 0,015$), kiti dažniai buvo maždaug vienodi. Individų, kurių genotipas ε4/4, amžiaus vidurkis yra patikimai didesnis nei kitų, o tarp vyresnių nei 50 metų pacientų neaptikta ε4/ε4 genotipo, kai tuo tarpu 40–50 metų amžiaus grupėje jo pasiskirstymo dažnis siekia net 16%. Faktas, jog vyresnių negu 50 metų žmonių apoE ε4 alelio dažnis sudarė tik 11% (ir nė vienos homozigotos) o iki 50 m. amžiaus grupėje – 32% rodo, kad apoE ε4 alelis susijęs su ankstyvesne ligos patologija ir galbūt ankstyvu mirtingumu – tokią hipotezę kelia daugelis gerontologijos studijų (Robine et al., 1999).

Kai kurie tyrimai teigė, kad moteris nuo KŠL saugo ε2/ε3 genotipas (Hixson, 1991). Iš tikrųjų sergančios ε2/ε3 genotipo moterys (50 ir 59 metų) sudarė 7,7% visų populiacijos moterų.

Nustatyta, kad $\epsilon 4$ alelis padidina koronarinės širdies ligos riziką 26% (OR = 1,26, 95% PI [1,13–1,41]) palyginti su $\epsilon 3$ aleliu (Wilson et al., 1996). Deja, mes neatlikome atvejo–kontrolės studijos, todėl negalime pasakyti, kiek kartų $\epsilon 4$ alelis didina tikimybę susirgti KŠL ja nesirgus. Tačiau eksperimente pabrėžta, kad individų širdies ir kraujagyslių ligų sergamumas pagal amžių ir apoE polimorfizmas susiję ($p = 0,015$). Mūsų išvada – santykinė rizika iki 50 metų susirgti KŠL apoE $\epsilon 4$ alelio nešiotojams buvo beveik dukart didesnė nei kitiems alelių nešiotojams: atitinkamai 1,61 karto didesnė negu apoE $\epsilon 3$ alelio nešiotojų ir 2,30 karto didesnė negu $\epsilon 2$ alelio nešiotojų, paremia ankstesnį teiginį ir neprieštarauja daugumos kitų tyrėjų rezultatams (Dallongeville, 1994; Wilson, 1996).

Išvados.

1. Metodas, kai PGR metu pagausintas apolipoproteino E geno segmentas, apimantis polimorfinę 112–158 AR sritį, karpomas AflIII ir HaeII restrikcijos endonukleazėmis ir frakcionuojamas 3% agarozės gelyje, yra tinkamas visiems apoE genotipams nustatyti, lengvai atliekamas ir gali būti naudojamas didelio kiekio pavyzdžių analizei atlikti per trumpą laiką.

2. Nustatyti tiriamos populiacijos apoE $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ir $\epsilon 4$ alelių dažniai atitinkamai yra 0,096, 0,692 ir 0,212, o genotipų dažniai – $\epsilon 2/\epsilon 2$ (0,038), $\epsilon 2/\epsilon 3$ (0,096), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (0,019), $\epsilon 3/\epsilon 3$ (0,52), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (0,25), $\epsilon 4/\epsilon 4$ (0,077).

Literatūra

- Chang D. J., Paik Y. K., Leren T. P., Walker D. W., Howlett G. J., Taylor J. M. 1990. Characterization of a human apolipoprotein E gene enhancer element and its associated protein factors. *J. Biol. Chem.*, 265: 9496–9504.
- Chappel D. A., Medh J. D. 1998. Receptor-mediated mechanisms of lipoprotein remnant catabolism. *Prog. Lipid Res.*, 37: 393–422.
- Corbo R. M., Scacchi, R. 1999. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world: is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann. Hum. Genet.*, 63: 301–310.
- Dallinga-Thie G. M., Trip M. V. L. S., Kock L. A. W., De Bruin T. W. A. 1995. Apolipoprotein E2/E3/E4 genotyping with agarose gels. *Clinical Chemistry* 41: 73–75.
- Dallongeville J. 1994. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis risk. In: *Genetic Factors in Coronary Heart Disease*. U GOLDBOURT, U DE FAIRE, K BERG (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, P. 289–298.
- Davignon J., Gregg R. E., Sing C. F. 1988. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 8: 1–21.
- Ehnholm C., Lukka M., Kuusi T., Nikkilä E., Utermann G. 1986. Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations. *J. Lipid Res.*, 27: 227–235.
- Fackelmann, K. A. 1994. Teams Hunt for Vascular and Heart Genes. *Science News* 145: 374–375.
- Fullerton S. M., Clark A. G., Weiss K. M., Nickerson D. A., Taylor S. L. et al. 2000. Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.*, 67: 881–900.
- Hallman D. M., Boerwinkle E., Saha N., Sandholzer C., Menzel H. J., Csazar A., Utermann G. 1991. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am. J. Hum. Genet.*, 49: 338–349.
- Hixon J. E., Vernier D. T. 1990. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *HhaI*. *Journal of Lipid Research* 31: 545–548.
- Hubáček J. A., Piňha J., Adámková V., Kodová Z., Lánská V., Poledne R. 2003. Apolipoprotein E and apolipoprotein CI polymorphisms in the Czech population: almost complete linkage disequilibrium of the less frequent alleles of both polymorphism. *Physiol. Res.*, 52: 195–200.
- Keating M. T., Sanguinetti M. C. 1996. Molecular Genetic Insight into Cardiovascular Disease. *Science* 272: 681–686.
- Kontula K., Aalto-Setälä K., Kuusi T., Hamalainen L., Syvanen A. C. 1990. Apolipoprotein E polymorphism determined by restriction enzyme analysis of DNA amplified by polymerase chain reaction: convenient alternative to phenotyping by isoelectric focusing. *Clinical Chemistry* 36: 2087–2092.
- Kučinskas V. 1998. Tu ir tavo genai. Kaunas: *Šviesa*, 49–50; 61 p.
- Lehtimäki T., Moilanen T., Viikari J., Åkerblom H. K., Ehnholm C., Rönnemaa T., Mamiemi J., Dahlen G., Nikkari T. 1990. Apolipoprotein E phenotypes in Finnish youths: a cross-sectional and 6-year follow-up study. *J. Lipid Res.*, 31: 487–495.
- Lewis B., Assman G., Tikkanen M., Baggio G. et al. 1992. Prevention of Coronary Heart disease scientific background and new clinical guidelines. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, 2: 113–156.
- Lucotte G., Loirat F., Hazout S. 1997. Pattern of gradient of apolipoprotein E allele*4 frequencies in western Europe. *Hum. Biol.*, 69: 253–262.
- Mahley R. W. 1988. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240: 622–630.
- Mahley R. W., Rall S. C. Jr. 1999. Is epsilon4 the ancestral human apoE allele? *Neurobiol. Aging* 20: 429–430.
- Menzel H. J., Utermann G. 1986. Apolipoprotein phenotyping from serum by Western Blotting. *Electrophoresis* 7: 492–495.
- Paik Y. K., Chang D. J., Reardon C. A., Walker M. D., Taxman E., Taylor J. M. 1988. Identification and characterization of transcriptional regulatory regions associated with expression of the human apolipoprotein E gene. *J. Biol. Chem.*, 263: 13340–13349.
- Petruilionienė Ž. 1999. Mažinkime širdies ligų riziką. Vilnius: *Margi Raštai*, 143 p.
- Rall S. C. Jr., Weisgraber K. H., Mahley R. W. 1982. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.*, 257: 4171–4178.
- Robine J. M., Forette B., Franceschi C., Allard M. 1999. The Paradoxes of Longevity. Berlin: Springer-Verlag, – 73–80.
- Saiki R. K., Scharf S. J., Faloona F., Mullis K. B., Horn G., Erlich H. A., Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350–1354.
- Schaefer E. J., Lamon – Fava S., Johnson S., Ordovas J. M., Schaefer M. M., Castelli W. P., Wilson P. W. F. 1994. Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels: results from the Framingham Offspring study. *Arterioscler. Thromb.*, 14: 1105–1113.
- Siest G., Pillot T., Régis – Bailly A., et al. 1995. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem.*, 41: 1068–86.
- Smit M., de Knijff P., van der Kooij-Meijis E., Groenendijk C., van den Maagdenberg A. M. J.M., Gevers Leuven J. A., Stalenhoef A. F. H., Stuyt P. M. J., Frants R. R., Havekes L. M. 1990. Genetic heterogeneity in familial dysbetalipoproteinemia: the E2(lys146-to-gln) variant results in a dominant mode of inheritance. *J. Lipid Res.*, 31: 45–53.
- Smith J.D. 2000. Apolipoprotein E4: an allele associated with many diseases. *Ann. Med.*, 32: 118–127.
- Utermann G., Jaschke M., Menzel J. 1975. Familial hyperlipoproteinemia type III: deficiency of a specific apolipoprotein (ApoE-III) in the very-low-density lipoproteins. *FEBS Lett.*, 56: 352–355.
- Utermann G., Langenbeck U., Biesiegel U., Weber W. 1980. Genetics of the apolipoprotein E system in man. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 339–347.
- Utermann G., Pruin N., Steinmetz A. 1979. Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man. *Clinical Genetics* 15: 63–72.
- Weisgraber K. H., Rall S. C., Mahley R. W. 1981. Human apolipoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequences of apoE isoforms. *J. Biol. Chem.*, 256: 9077–9083.
- Weisgraber K. H., Rall S. C., Mahley R. W. 1981. Human apolipoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequences of apoE isoforms. *J. Biol. Chem.*, 256: 9077–9083.
- Wilson P. W., Schaefer E.J., Larson M.G., Ordovas J.M. 1996. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 16:1250–5.
- Zannis V. J., Breslow J. L., Utermann G., et al. 1982. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes and phenotypes. *Lipid Research* 23: 911–914.