

*Az apolipoproteinek szerepe a lipidanyagcserében
és Alzheimer betegségben*

KANDIDÁTUSI ÉRTEKEZÉS

Szerző: Dr. Németh Attila

Témavezető: Dr. Császár Albert

az Orvostudomány Kandidátusa

Semmelweis Orvostudományi Egyetem

III. számú Belgyógyászati Klinika

Budapest, 1997.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:

Először is szeretnék köszönetet mondani szüleimnek, családtagjaimnak, barátaimnak, munkatársaimnak, hogy szeretetükkel e munkámban is segítettek.

Hálával tartozom Prof. Dr. Romics Lászlónak, az orvostudomány doktorának, az MTA levelező tagjának, a SOTE III. Belklinika igazgatójának, a SOTE rektorának, hogy tudományos munkámat lehetővé tette és támogatta.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Császár Albertnek, az orvostudomány kandidátusának, aki szakmai irányításával és segítségével járult hozzá előmenetelemhez.

Megköszönöm Dr. Pados Gyulának, az orvostudomány kandidátusának, a Szent Imre Kórház IV. belosztálya osztályvezető főorvosának, hogy külföldi útjaimat adminisztratív támogatással, és orvosi munkámban szakmailag segített.

Kutatói pályám fejlődése, ismeretanyagom bővülése szempontjából elengedhetetlen segítséget nyújtottak:

Univ.Doz.Dr. Manfred Hüttinger, Prof. Dr. M. Scott Grundy, Prof. Dr. Helen Hobbs, Prof. Dr. Michel Brown, Prof. Dr. Joseph Goldstein, Dr. Joachim Herz, Dr. Shaliendra Patel és Prof. Dr. Lona Vega, ezért őket is a tiszteletteljes köszönetem illet.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

ABL: abétalipoproteinémia

APOAI: ApoAI gén

APOB: ApoB gén

APOE: ApoE gén

ApoE-R2: ApoE receptor-2

APOLP1: Apolipoprotein 1 génlókusz (ApoAI/CIII/AIV-et kódolja)

APP: amyloid prekursor protein

BMSC: bone marrow stem cell, csontvelői őssejt

CE: koleszterin-észter

CETP: koleszterin-észter transzfer protein

CHY: kilomikron

ER: endoplazmatikus retikulum

FAD: familial Alzheimer's disease, familiáris Alzheimer betegség

FFA: free fatty acid, szabad zsírsavak

FHBL: familiáris hipobetalipoproteinaemia

HEPR: human mRNA editing protein

HLP: hyperlipoproteinaemia

HTGL: hepatikus triglicerid lipáz

IEF: izoelektromos fókuszálás

LCAT: lechitin-koleszterin-acil-transzferáz

LPL: lipoprotein lipáz

LRP: LDL-receptor related protein

MTP: mikroszomalis triglicerid transzfer protein

PCR: polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció

RCT: reverz cholesterin transzport

REPR: rat mRNA editing protein, patkány mRNS "editáló" fehérje

RFLP: restriction fragment length polymorphism, restrikciós fragmens polimorfizmus

TARTALOMJEGYZÉK:

I. Az ApoE izoformák és mutánsok jellemzői a lipidanyagcserében	1. oldal
I.1. Bevezetés	1. oldal
I.2. Az ApoE szintézise és struktúrája	1. oldal
I.3. Az ApoE és a TG-gazdag lipoproteinek metabolizmusa	2. oldal
I.4. Az ApoE és a reverz koleszterin transzport	3. oldal
I.5. Az ApoE molekula szekvenciális polimorfizmusa	4. oldal
I.6. Az ApoE polimorfizmus és a lipoprotein metabolizmus	5. oldal
I.7. Az ApoE polimorfizmus és az ISZB kapcsolata	6. oldal
I.8. Az ApoE polimorfizmusban rejlik a hosszú élet titka ?	7. oldal
I.9. Az ApoE4 és a Fredrickson V-ös típusú hiperlipidémia	8. oldal
I.10. Az ApoE polimorfizmus és a III-as típusú hiperlipoproteinémia	8. oldal
I.11. Az ApoE hiány egérben és emberben	11. oldal
I.12. Az ApoE extrahepatikus szintézise	13. oldal
II. Az ApoE és az Alzheimer betegség	14. oldal
III. Az ApoAI mutációk szerepe az izolált alacsony HDL-koleszterin és ApoAI szintekkel járó állapotokban	19. oldal
III.1. Az ApoAI molekula felépítése és szerepe a lipidanyagcserében	19. oldal
III.2. Az APOAI mutációk és ezek szerepe a HDL-C-re és a lipidanyagcserére	20. oldal
IV. Az ApoB mutációk szerepe az abétalipoproteinémia és a hipobétalipoproteinémia etiopatogenezisében	25. oldal
IV.1. Az ApoB100 és ApoB48 funkciója a lipidanyagcserében, és az ApoB100 mRNS "editing"	25. oldal
IV.2. Az ApoB mutációk és a hipobétalipoproteinémia	26. oldal
IV.3. Az abétalipoproteinémia molekuláris alapjai	29. oldal
V. Az ApoE izoformák és a komplement allotípusok hatásának vizsgálata fibrát terápiaiban és zsírszegény diétában részesülő, különböző Fredrickson fenotípusú betegekben	31. oldal
V.1. Vizsgálati célkitűzések	31. oldal
V.2. Beteganyag, vizsgálati módszerek	32. oldal
V.3. Vizsgálati eredmények, következtetések	32. oldal
VI. Az Alzheimer betegség potenciális molekuláris genetika markereinek vizsgálata	33. oldal

TARTALOMJEGYZÉK:

VI.1. Vizsgálati célkitűzések	33. oldal
VI.2. Beteganyag, vizsgálati módszerek	34. oldal
VI.3. Vizsgálati eredmények, következtetések	35. oldal
VII. Az APOAI lókuszt mutációanalízise 5-10 percentil alatti ApoAI és HDL-C-szintű probandokban	36. oldal
VII.1. Vizsgálati célkitűzések	36. oldal
VII.2. Beteganyag, vizsgálati módszerek	37. oldal
VII.3. Vizsgálati eredmények, következtetések	37. oldal
VIII. A humán plazmában eddig leírt legkisebb APOB gén mutáció (ApoB27.6) klonáris analízise és heterológ expressziója COS 7 sejt kultúrában	38. oldal
VIII.1. Vizsgálati célkitűzések	38. oldal
VIII.2. Vizsgálati módszerek	39. oldal
VIII.3. Vizsgálati eredmények, következtetések	40. oldal
IX. Irodalom	42. oldal

Az ApoE, ApoAI, apolipoprotein allotípusok és mutációk, valamint az ApoB apolipoprotein mutációk szerepe a különböző etiopatogenezisű lipidanyagcsere zavarokban, és az ApoE izoformák jelentősége Alzheimer betegségben.

I. Az ApoE izoformák és mutánsok jellemzői a lipidanyagcserében.

1. Bevezetés:

Az apolipoprotein E (ApoE) az. un. "arginin-gazdag apoprotein", amelyet 1973-ban fedeztek fel, egy 34 kD glikoprotein, amely fontos szerepet játszik a szövetek és a sejtek közti lipid transzportban (1). Az ApoE-t számos sejt termeli és a plazmában a lipoproteinek fő alkotórészeként kering. Azoknál, akiknél az ApoE-gazdag lipoproteinek szintje magas, mind ISZB-re, mind obliteratív érbetegségekre hajlamosabbak. Napjainkban, új felfedezés erejével hatott, hogy az ApoE egyik izoformája szoros kapcsolatban áll az Alzheimer betegséggel. Az ApoE kapcsolata e neurodegeneratív betegséggel a lipidológusok és a neurológusok előtt új területeket nyitott meg.

2. Az ApoE szintézise és struktúrája:

Normál egyéneknél az ApoE szérumszintje 2.5-6 mg/dL (2). A keringő ApoE 90%-át a máj termeli (3). Az ApoE poszttranszlációs modifikáció részeként az N-terminális 18 aminosav (AA) az endoplazmatikus retikulumba (ER) történő belépéskor lehasad. Az ER-ban a 299 AA polipeptidhez egyetlen oxigénhez kötött cukorlánc kapcsolódik. A Golgi-komplexben ehhez a cukor részhez változó számú szialinsav molekula (2,4, vagy 6) kötődik (4). Az ApoE ezután a plazmába szekretálódik, ahol gyorsan a triglicerid (TG)-gazdag lipoproteinekhez kapcsolódik. A plazmában cirkuláló ApoE parciálisan vagy teljesen deszializált (4).

Trombin emésztéssel az ApoE két, funkcionálisan különböző fragmensre disszociál. A 22 kD rész az N-terminális régióból tartalmazza azokat a szekvenciákat, amelyekkel az ApoE a sejt felszíni receptorokhoz és heparinhoz köt (5). A C-terminális 10 kD fragmens a lipoprotein-kötődéshez elengedhetetlen (6).

3. Az ApoE és a TG-gazdag lipoproteinek metabolizmusa:

A TG-gazdag lipoproteinek két fő úton jutnak a plazmába: endogén és exogén módon. A hepatocytákban a TG-ek, koleszterin-észterek (CE), foszfolipidek (PLP), és a szabad koleszterin összekapcsolódva egyetlen ApoB100 molekulával "very low density lipoprotein" (VLDL)-ként szekretálódik a plazmába. Itt a VLDL számos ApoE molekulát, valamint különböző apoC molekulát vesz fel. Exogén úton a táplálékból kerülnek a lipid molekulák a véráramba az intestinalis epithelsejtek által. Az enterocytan belül a lipidek ApoB48, ApoAI, és ApoAIV-hez kapcsolódnak és kilomikron (CHY) partikulumokként szecernálódnak a limfatikus rendszerbe. Amint a plazmába kerültek, a CHY-ok a HDL molekuláktól számos ApoE-t vesznek fel. Az ApoE az ApoB-vel ellentétben könnyedén cserél gazdát az egyes lipoprotein molekulák között. A VLDL és CHY fő alkotórésze a TG; a VLDL-ben a TG/Chol = 5, a CHY-ban 20. Mindkét TG-gazdag molekula bőven tartalmaz ApoC-t (ApoCI, ApoCII, ApoCIII). Az ApoC-k két fontos szerepet játszanak a TG-gazdag molekulák metabolizmusában. Egyrészt gátolják a TG-gazdag partikulumok lipoprotein receptor (LR) mediált felvételét a májba (7). Általánosságban, inverz összefüggés van az ApoC és ApoE molekulák száma között a lipoprotein molekulák felszínén. Azok a molekulák, melyek sok ApoC-t, de kevés ApoE-t tartalmaznak kisebb LR affinitást mutatnak a hepatocytákon (8). Így az ApoC-gazdag TG molekulák először a periférián metabolizálódnak, mielőtt a májon keresztül eliminálódnának. Az ApoC-k második fő szerepe a lipoprotein lipáz (LPL) aktiválása és a TG-gazdag partikulumok hidrolízise. A LPL az adipocytákban és a miocytákban termelődik, majd a kapilláris endothel proteoglikánjaihoz kötődik. A VLDL és CHY az ApoCII-n keresztül a LPL-hoz köt, így e molekulák magjában elhelyezkedő TG-ek hidrolízise következhet be. A szabad zsírsavak (FFA) vagy re-észterifikálódnak és tárolódnak TG formájában vagy a β -oxidációban égnak el. A hidrolízist követően a CHY és a VLDL molekulák CE és ApoE gazdagabbakká válnak. A VLDL, CHY "remnant"-okban a CE/TG = 1. Denzitásuk < 1.006 g/mL, β -lipoproteinként vándorolnak agaróz-gél elektroforézissel, ezért együttes nevük β -VLDL. A fenti folyamatokkal párhuzamosan az ApoC és ApoE-k a HDL-molekulákra kerülnek. Ráadásul az ApoE konformációja a LP-ek felszínén úgy változik meg, hogy képes legyen LP-receptorokhoz kötődni (9).

Ahogy a CHY-"remnant"-ok kialakultak, szinte azonnal megindul "clearance"-szük ApoE-mediált felvétellel az LDL és LRP receptorokon keresztül (10). A periférián keletkezett VLDL-"remnant"-ok kétféle úton távoznak a plazmából: kb. 50%-uk a hepatikus LDL-R-n keresztül eliminálódik (11) a maradék VLDL-"remnant" LDL-é alakul a hepatikus triglicerid lipáz (HTGL) által. Az ApoE-gazdag LP-k egyébként nagyobb affinitással kötődnek az LDL-R-hoz, mint maga az LDL (12).

Állatkísérletek bizonyítják, hogy a plazma ApoE tartalma ún. "rate-limiting" lehet a LP-ek receptorális eliminációjában. ApoE infúziója koleszterin-teret nyulaknak a LP-ek drámai csökkenését eredményezte (13). Az ún. "overexpresszált" patkány ApoE "transgenic" egerben a ^{125}I -VLDL "clearance"-szét megháromszorozta, ráadásul ez védemelt jelentett a magas koleszterin-tartamú diétával szemben is (14).

Immuncitokémiai vizsgálatok bizonyítják, hogy a hepatocyták mikrovillusainak felszínét ApoE molekulák borítják proteoglikánokhoz kötve (15). Így a Disse-térbe került "remnant" partikulumok szinte egy "ApoE-fürdőbe" kerülnek, ezáltal az ApoE-k csapdájába jutnak és a megfelelő receptoron keresztül eliminálódnak

4. Az ApoE és a reverz koleszterin-transzport:

Más apolipoproteinektől eltérően az ApoE a májon kívül egyéb sejtekben is termelődik; a makrofágokban, asztrocitákban, Leydig sejtekben, mellékvese kéregben, vese proximális tubulusaiban, a Bowman-tok epitheliális sejtjeiben és a keratinocytákban (16-21). A makrofágok fagocitálják az előregedett és elhalt sejteket, ezáltal nagymennyiségű CE-t akkumulálnak a cytoplazmájukban. Ha az eger peritoneális makrofágjai koleszterinnel teltek *in vitro* az ApoE szintézise és szekréciója drámaian nő (22). Ezekben a zsírgazdag sejtekben az ApoE a teljes protein szintézis 2%-át teszi ki. Az ApoE az extracelluláris térbe szecernálódik, függetlenül a koleszterintől, és gyorsan a HDL molekulákhoz kapcsolódik (23). A koleszterin és ApoE gazdag HDL molekulákat a máj LDL, ill. HDL-R-ai veszik fel.

5. Az ApoE molekula szekvenciális polimorfizmusa:

Az ApoE glikoprotein kettős értelemben is polimorf. A plazma ApoE változó számú szialinsav molekulát (1-3) tartalmaz az egyetlen oxigénhez kötött cukorlánchoz kapcsolódva (4). Az aminosav szekvenciája is polimorf e polipeptid láncnak. Három gyakori izoforma fordul elő az átlagpopulációban, amelyeket ApoE2, E3, és E4-nek jelölnek, attól függően, hogy milyen migrációs mintát mutatnak kétdimenziós izoelektromos fókuszáló gélen (IEF). A gélmigráció eltérésének oka a szekvencia különbözősége két aminosav pozícióban - 112 és 158. Az ApoE2-nek és az ApoE4-nek két Cys vagy két Arg molekula helyezkedik itt el külön-külön. Az ApoE3, amely a leggyakoribb izoforma a populációban felépítése: 112Cys és 158Arg.

1. Táblázat. A homozigóta ApoE izoformák töltésviszonyai IEF-al.

	E ₂ /2	E ₃ /3	E ₄ /4
Relatív Töltés	0	+ 1	+ 2
Aminosav 112	Cys	Cys	Arg
Aminosav 158	Cys	Arg	Arg

A különböző ApoE fenotípusok identifikálása homozigóta egyének VLDL-jének IEF-al történő szeparálásával is lehetséges.

Az aminosav polimorfizmus hátterében egy bázispár csere áll az APOE gén szekvenciájában, amely gén a 19-es kromoszóma 19q13.1-es pozíciójában helyezkedik el, szoros un. " linkage "-ben az APOCI és APOCII-vel. Az egyes APOE allél (ϵ_2, ϵ_3 és ϵ_4) frekvenciái az európai és az Észak-Amerikai populációban ~ 0.10 (ϵ_2), 0.75 (ϵ_3) és 0.15 (ϵ_4) (24), kivéve a finn és az amerikai fekete populációt, ahol az (ϵ_4) frekvenciája szignifikánsan magasabb ~ 0.22 (25). A lehetséges hat genotípus frekvenciája szignifikánsan különbözik az eltérő népcsoportok között.

2. Táblázat Az apoε allélfrekvenciák átlagértékei négy populációban (25).

	ε ₂	ε ₃	ε ₄
Európaiak	0.08	0.77	0.15
Japánok	0.035	0.85	0.112
Kínaiak	0.08	0.82	0.06
Amerindiánok	0.00	0.82	0.184

6. Az ApoE polimorfizmus és a lipoprotein metabolizmus:

Az egyes ApoE izoformák relatív eloszlása eltér a plazma lipoproteinek között. Az ApoE3 és ApoE2 egyenlő mértékben oszlik meg az ApoB-tartalmú lipoproteinek és a HDL között. Mind az ApoE2, mind az ApoE3 rendelkezik szabad reaktív SH-csoporttal, amely kevert diszulfid kötést hozhat létre az ApoAII-vel. Az ApoE-AII komplexek a HDL-hez kapcsolódnak, ami hozzájárul az ApoE4-hez képest relatíve magasabb ApoE2 és ApoE3 koncentrációhoz a HDL frakcióban (26). Az ApoE4 a VLDL/IDL-hez kötődik, részben a heterodimer képződés hiánya miatt. Egy pozitív töltésű aminosav jelenléte a 112-es pozícióban (Cys⇒Arg) hozzájárul ahhoz, hogy az ApoE4 főként a TG-gazdag lipidmolekulákhoz kötődjön (27).

Az ApoE polimorfizmus azonkívül, hogy befolyásolja az ApoE eloszlását a különböző lipoproteineken, fontos funkcionális szereppel is bír. Az ApoE2-nek kifejezetten csökkent az LDL-R affinitása összehasonlítva az ApoE3 vagy ApoE4-el (28). Az ApoE2 LDL-R affinitása csak 2%-a az ApoE3-ApoE4-nek (28). Az ApoE2 kisebb mértékben kötődik az LRP-R-hoz, mint az ApoE3 vagy az ApoE4 (8). Ha az ApoE2-t ciszteaminnal kezeljük, ami Cys158⇒Lys 158-at hoz létre, a modifikált ApoE2 receptor affinitása hasonlóná válik az ApoE3/E4-hez. Így igazolható, hogy az ApoE2 gyenge LDL-R affinitásának hátterében egy bázikus aminosav⇒ neutrális aminosav szubsztitúciója áll a 158-as pozícióban (Arg⇒Cys).

Mi ennek a gyakorlati hatása a lipoprotein metabolizmusra ?

Normolipidaemiás egyének, akik ApoE2/ApoE2 genotípussal rendelkeznek mind a kilomikron, mind a VLDL partikulumokat csökkent sebességgel eliminálják a plazmából (29, 30). Következésképpen az ϵ_2 homozigóták esetében még 12 óras éhezést követően is kimutatható szinten van a β -VLDL. Az ApoE2 homozigótákat jellegzetes lipidprofiljukról diszbetalipoproteinémiásoknak nevezték el (30). Az ApoE4/E4 homozigótáknak viszont szignifikánsan magasabb a szérum össz-choleszterin (C) és LDL-C szintje, és alacsonyabb az ApoE szintjük, mint az ApoE3/E3 hordozóknak (31). A homozigóta ApoE2 hordozóknak szignifikánsan alacsonyabb az össz-C és LDL-C, és magasabb az ApoE szintjük. Ezek a trendek nem populáció függők, mivel a világon szinte minden népcsoportban hasonló eredményeket figyeltek meg (32). Ellentmondásosnak tűnhet, hogy a homozigóta ApoE2 hordozók (csökkent LDL-R affinitás) mégis alacsonyabb LDL-C-el rendelkeznek. Legalább két magyarázat létezik e paradoxon feloldására. Az exogén és endogén koleszterin lassabb hepatikus transzportja az ϵ_2 homozigótákban az LDL-R un. "up-regulációja" révén növeli a receptorok aktivitását, ami alacsonyabb LDL-C-t eredményez. Másrészt, még ismeretlen okból a VLDL \Rightarrow LDL konverzió gátolt az ϵ_2/ϵ_2 hordozókban (33,34). Megfordítva a kérdést, miért van az, hogy az ϵ_4/ϵ_4 homozigótáknak magasabb az LDL-C szintjük, annak ellenére, hogy LDL-R affinitásuk megegyezik az ApoE3 hordozókkal ? Ellentétben ezekkel az *in vitro* adatokkal, *in vivo* kimutatható, hogy az ApoE4-tartalmú lipoprotein partikulumok gyorsabban eliminálódnak a keringésből, mint az ApoE3 hordozók esetében (35). Az ApoE4 kifejezettebb asszociációja a TG-gazdag lipoproteinekhez hozzájárulhat a gyors metabolizmusukhoz az LDL-R-on keresztül. Ez a folyamat telíti a hepatocytákat koleszterin-észterrel, ami az LDL-R un. "down-regulációjához" vezet.

7. Az ApoE polimorfizmus és az ISZB kapcsolata:

Számos, bár nem minden vizsgálat alapján kimutatható volt az ϵ_4 frekvenciájának enyhe növekedése, az ϵ_2 frekvenciájának csökkenése ISZB-s betegeknél (36,37,38). Az ApoE izoformák eltérő eloszlása az egyes népcsoportok között hozzájárulhat az ISZB incidenciájának különbözőségéhez az egyes populációkon belül.

A finnek között az ApoE4 frekvenciája 50%-al magasabb, mint az átlagos európai populációban, ezzel együtt az ISZB incidenciája náluk az egyik legmagasabb a világon, ugyanakkor az ϵ_4 allél előfordulása alacsony a kínai és japán népességben, alacsony ISZB előfordulás mellett (25). Egyes megfigyelések szerint az ApoE4 és az ISZB kapcsolata független lenne a lipid szintektől. A "Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Study"-ban fiatal (15-34 éves) balesetben meghalt férfiak thorakális és abdominális aortáját és jobb coronáriáit vizsgálták. Az atherosclerosis kiterjedése és az ApoE genotípusok között kimutatható összefüggés volt: az ϵ_4/ϵ_4 egyéneknél több atherosclerotikus lézió volt, mint az ϵ_3/ϵ_3 hordozóknál, függetlenül az LDL-C szintjétől (39). Azonban, a két csoport között a léziók számában csak 6%-os volt a különbség. Ezidáig nem volt egyértelműen kimutatható az ApoE polimorfizmus biztos szerepe az ISZB előfordulásában. Ha van is hatása, az csekély, és legvalószínűbben a lipidszintek befolyásolása révén valósul meg.

8. Az ApoE polimorfizmusban rejlik a hosszú élet titka ?

Egy francia kutatócsoport szerint a százévesek között az ϵ_3 allélfrekvenciája magasabb volt, mint az ϵ_4 -é a kontroll-csoporthoz (20-70 év) viszonyítva (40).

3. Táblázat Az apoE allélfrekvencia eloszlása 325 százéves és 160 kontroll egyén között

ApoE allélek	Százévesek előfordulás/ Frekvencia	Kontroll populáció I. előfordulás/ Frekvencia	Kontroll populáció II. (Párizs) előfordulás/ Frekvencia
ϵ_2	83 (0.128)	22 (0.068)	39 (0.079)
ϵ_3	533 (0.820)	264 (0.820)	399 (0.801)
ϵ_4	34 (0.052)	36 (0.112)	60 (0.120)

Jelenleg nem ismert az apoE₄ alacsony frekvenciájának oka az idősök között. Talán többen halnak meg korán ISZB-ben az ϵ_4 allélhordozók közül a magas LDL-C szint miatt ?

Ezt a feltevést látszik alátámasztani az a tény is, hogy az ϵ_2 allél frekvenciája is szignifikánsan csökken idősokban. Másrészt több idős ϵ_4 hordozó szenved Alzheimer betegségben, akik legtöbbje intézetben kezelt, így a statisztikai mintaválasztáshoz kevesebb "egészséges" idős egyén áll rendelkezésre (41).

9. Az ApoE4 és az Fredrickson V-ös típusú hyperlipidaemia:

Egyes vizsgálatok alapján az ϵ_4 allél szoros kapcsolatban áll az V-ös típusú hyperlipoproteinaemiával (42). Ebben a hyperlipidaemiában mind a VLDL, mind a kilomikronok emelkedettek, viszont a remnant partikulumok nem. A betegség eredete multifaktoriális és autoszomális domináns öröklődést mutat. Nem minden V-ös típusú hyperlipoproteinaemiás rendelkezik ApoE4 izoformával, de az ApoE4 izoforma frekvenciája szignifikánsan magasabb volt 30, súlyos V-ös típusú betegben 37 kontroll egyénhez viszonyítva (33% vs 3% (ϵ_4/ϵ_4), 40% vs 21.6% (ϵ_4/ϵ_3 és ϵ_4/ϵ_2)) (42). Ezt az eredményt más kutatócsoport megkérdőjelezte, akik egyetlen ApoE4 izoformát sem találtak 20 V-ös típusú betegben (43). Az apo ϵ_4 allél társulása az V-ös típusú hyperlipoproteinaemiával jelenleg nem teljesen tisztázott. Lehet, hogy ennek semmi köze az ApoE4-hez, hanem az APOE locuszhoz szorosan kötött APOCI vagy APOCII játszik lényegi szerepet.

10. Az ApoE polimorfizmus és a III-as típusú hyperlipoproteinaemia:

Ezt a betegséget, amelyet más néven familiáris diszbetalipoproteinaemiának (FDB) is neveznek, eredetileg Gofman írta le 1952-ben, aki a "xanthoma tuberosum" és az emelkedett VLDL koncentrációra lett figyelmes (44). Az elváltozásra Fredrickson is felfigyelt, aki III-as típusú hyperlipoproteinaemiának (HLP) klasszifikálta annak alapján, hogy a VLDL partikulumokat agaróz-gél elektroforézissel vizsgálta. A VLDL (densitása <1.006 g/ml) a β -lipoprotein régióban vándorolt, a pre- β helyett, így egy vastag migrációs csík látszott, amely a pre- β pozíciótól a β -ig terjedt, ezért széles β -csík un. "broad band beta disease"-nek nevezte el (45). Havel és Kane 1973-ban kimutatta, hogy a III-as típusú HLP magasabb ApoE szintekkel jár (46). Utermann 1975-ben fontos megfigyelést tett a VLDL-proteinek IEF-val, miszerint III-as típusú HLP-ban az un. "normál" ApoE izoformák (ApoE3 és ApoE4) hiányoztak (47).

Három különböző típusú molekuláris defektust írtak le az APOE génen a III-as típusú HLP-vel kapcsolatban:

1. Az érintettek több, mint 95%-nál két ϵ_2 allél található. A homozigóta ϵ_2 állapot szükséges, de nem elegendő feltétel a betegség kialakulásához; a homozigótáknak csak 1-2%-ánál alakul ki a betegség.
2. A III-as típusú HLP betegek kevesebb, mint 5%-nál autoszomális domináns ApoE mutáns fordul elő, és e betegek heterozigóta hordozók.
3. Még ritkább az ApoE teljes hiánya a plazmából (ApoE deficiencia).

Ennél is ritkább eset, hogy egy női betegnél, aki eredetileg ApoE3/E4 genotípusú volt III-as típusú HLP alakult ki májtranszplantációt követően ApoE2/E2 donortól (57).

Molekuláris defektusok a klasszikus és az autoszomális domináns (AD) III-as típusú HLP-ban

A remnant partikulumok kémiai összetétele nem különbözik a recesszív és a domináns III-as típusú HLP-ben, azonban az AD variánsban a mutáns ApoE koncentrációja a normál ApoE-hez a β -VLDL frakcióban 7:1-hez (48). Ez eltér a normál ApoE2 heterozigóta állapottól, ahol a remnant frakcióban nincs diszproporcionálisan magasabb ApoE2 szint. A megfejtést, ahhoz, hogy az egyes ApoE defektusok miért dominánsak, mások miért recesszívek az ApoE molekuláris defektusok elemzése adta meg. A 22 kD trombin fragmenst, amely az ApoE első 191 aminosavát tartalmazza, krisztallizálták (49). Ez a domén 4 antiparalell α hélixet tartalmaz. A 4-es hélix tartalmazza az LDL-R-kötő régiót. Az LDL-R-kötődéshez szükséges szekvenciák a 140-160-as aminosavak között helyezkednek el (50). Ezek tandem elrendeződésű peptidok, amelyek tartalmazzák a 141-155-ös aminosavakat és nagy affinitással képesek az LDL-R-hoz kötődni (51). A 140-150-es aminosavak egy hat aminosavból álló bázikus "cluster"-t tartalmaznak (Lys, Arg, His), amelyek oldalláncai a krisztallográfiás elemzések szerint aktiváltak (49). Ezek a bázikus csoportok kapcsolódnak mind az LDL-R, mind az LRP-R Cys-gazdag, acidofil ligand-kötő régióihoz. A legtöbb természetesen előforduló, HLP III-at előidéző autoszomális domináns mutáció az LDL-R kötő doménen belül az egyik bázikus aminosavat neutrális aminosavval helyettesíti. Egyes mutációk, mint pl. az ApoE_{Leiden} (a 121-127 aminosav szakasz duplikációja) a kötő helyen kívül helyezkedik el, de indirekt módon befolyásolja e régió térbeli konformációját (52).

Meglepő, bár a legtöbb AD ApoE mutáció a ligand-kötő doménon belül helyezkedik el, de mégsem rontja annyira az LDL-R kötődést, mint az ApoE2. *In vitro* LDL-R kötődést vizsgáló fibroblaszt tenyészetben autoszomális domináns és recesszív HLP III betegek pre- β VLDL (kilomikron remnantok + naszcens VLDL) és β VLDL affinitását vizsgálták. A pre- β VLDL mindkét betegcsoportból defektíven kötődött az LDL-R-hoz. Várhatóan, a β VLDL az ϵ_2/ϵ_2 egyénekből hasonló affinitást mutatott, azonban meglepetésre a β VLDL az AD HLP III-as betegekből a normálisnál nagyobb LDL-R kötődést jelzett (53). Ezek a megfigyelések eltérnek az *in vivo* "turnover" vizsgálatoktól, amelyeket autosomális domináns HLP III-as betegeken végeztek, hiszen itt a "remnantok" "clearance"-sze csökkent mértékű volt (54). Az autosomális domináns és recesszív HLP III-ban a diszbetalipoproteinémia kialakulásáért felelős mechanizmusok különbözőek. Mindkét hiperlipoproteinémia formában a β VLDL termelése nő, mivel a pre- β VLDL partikulumok "clearance"-sze csökkent. Az recesszív formákban a HLP III akkor manifesztálódik, ha egyéb járulékos negatív fiziológiai folyamatok is aktiválódnak, amelyek a defektív LDL-R kötődést felszínre hozzák. A legtöbb domináns HLP III formában Arg112 helyezkedik el, ennek következtében a mutáns ApoE legnagyobb része a VLDL frakcióban helyezkedik el. A "remnant" frakción belül a mutáns ApoE:normál ApoE aránya 7:1-hez. Ráadásul az abnormis ApoE-k defektív heparin kötődést is mutatnak (55). Az ApoE LDL-R kötő régiója tartalmazza a heparin kötő helyet is (5). Az ApoE_{Leiden} expressziója hepatoma sejtvonalban bebizonyította, hogy sem a sejtfelszínhez nem tudott kötődni, sem a β VLDL felvételét nem tudta aktiválni (55). A nagy "remnant" partikulumok hepatocytákhoz kötődése, majd hepatikus felvétele ApoE és heparán szulfát proteoglikán mediált (56). Így érthetővé válik a domináns HLP III formák lassabb eliminációja nagyobb *in vitro* LDL-R affinitásuk ellenére. Az eddig leírt ApoE mutációkat a 4. táblázat foglalja össze.

4. Táblázat Az ApoE mutációk és polimorfizmusok (58).

ApoE fenotípus	Aminosav szubsztitúció	Relatív töltés	Relatív receptor-kötő aktivitás (% normál E3)
E7 Csúita	Glu ₂₄₄ →Lys	+ 4	
	Glu→Lys		
E5 Japan	Glu ₃ →Lys	+ 2	
E5 Canada	Glu ₁₃ →Lys	+ 2	
E4 (normál)	Cys ₁₁₂ →Arg	+ 1	100
E3 (normál)			100
E3	Ala ₉₉ →Thr		
E3	Arg ₁₄₂ →Cys		< 4*
E3 Leiden	121-127 duplikáció		25 *
E2 (normál)	Arg ₁₅₈ →Cys	- 1	< 2 *
E2	Arg ₁₄₅ →Cys	- 1	45 *
E2	Lys ₁₄₆ →Gln	- 1	40 *
E1	Gly ₁₂₇ →Asp	- 2	
E1 Bethesda	?	- 2	
E1 Harrisburg	Lys ₁₄₆ →Glu	- 2	
E1 Dunedin	Arg ₂₂₈ →Ser	- 1	
E1 Christchurch	Arg ₁₃₆ →Ser	- 1	40 *
E hiány	"splice" defektus intron 3-ban		
* III-as típusú HLP-vel járó mutáció			

11. Az ApoE hiány egérben és emberben:

Eddig 3 családot írtak le, ahol a probandoknál korai HLP III alakult ki, és a plazmában az ApoE szintje alig vagy nem volt detektálható (59,60,61). A probandok szüleinél, akik obligát heterozigóták voltak normál lipidszinteket mértek. Ezek alapján az ApoE deficiencia autosomális recesszív betegség. Mindegyik ApoE deficiens egyénnél kifejezetten emelkedett a plasma össz-koleszterin és a β VLDL szintje. Azonban, eltérően a HLP III többi formájától, itt a plazma triglicerid (TG) szintje normális vagy csak enyhén emelkedett, ezért a VLDL-C:plazma TG sokkal magasabb ($\cong 0.90$), mint a klasszikus vagy a domináns HLP III-ban.

Az érintettekénél masszív "tuberoeruptív xanthomata" (néha a fülcimpák is involváltak), és akcelerált atherosclerosis alakult ki (59). Érdekességképpen, egy betegnél, akit alacsony zsírtartalmú diéta mellett clofibráttal kezeltek a xanthomák teljesen visszafejlődtek, annak ellenére, hogy a plazma össz-koleszterin csak kismértékben csökkent (9.8 mM \Rightarrow 8.4 mM) és a TG szint emelkedett (59).

Két kutatócsoportnak sikerült inaktiválnia az APOE gént egérben (62,63). Mindkét törzs fenotipikusan hasonlított az ApoE deficiens humán mutációkhoz. A plazma össz-koleszterin drámaian nőtt (13 mM vs. 1.6 mM a kontroll egerekben), viszont a TG alig emelkedett. A normál TG szint mind az ApoE deficiens egerekben, és a humán mutációkban arra utal, hogy az ApoE valamilyen úton gátolja a lipoprotein partikulumok lipolízisét. Ha az egereket ún. "Western-type" diétán tartották a plazma össz-koleszterin szintje 48 mM-ra emelkedett szemben a normál egereknél észlelt 3.5 mM-ral. A teljes koleszterin növekedés a VLDL/IDL frakcióban történt. Az ApoE deficiens egerekben annak ellenére, hogy normál egértápot kaptak, 3-4 hónap alatt előrehaladott atherosclerotikus léziók alakultak ki diffúzan a proximális aortában és a coronáriákban (62,63,64). Ha normál egér csontvelőjét transzplantálják ún. "ApoE null" egérbe, a transzplantált makrofágok által expresszált ApoE kb. 10%-a jelenik meg a keringésben, de ez is elegendő a lipidszintek normalizálásához (68). Hasonlóan jó eredmények érhetők el humán ApoE makrofág-specifikus expressziójával (bárány visna vírus "long terminal repeat" -LTR kontrollja alatt) "ApoE null" egérben (69). Még érdekesebb az ApoE deficiens és az oszteopetrózis-mutációs egerekbe (op/ApoE null kettős mutáns) makrofág "colonia stimuláló factor" gént (M-CSF) transzfektálni. Az op-mutáció miatt a csontvelői őssejtekből (BMSC) nem képződik a monocita-makrofág vonal a M-CSF hiánya miatt, így az atherosclerotikus plakk fő sejtjei sincsenek jelen. A magasabb koleszterin szint ellenére e kettős mutánsokban atherosclerotikus lézió csak igen kis mértékben alakult ki. A vártól eltérően azonban, ha e kettős op/ApoE null mutánsokat M-CSF génnel transzfektáltak, az bizonyos védő szereppel bírt az atherogenezisben (93). Ennek magyarázata, hogy a M-CSF gén bevitele ApoE-t termelő makrofágokat indukált, amelyek védenek a szklerotikus plakk kialakulásával szemben (93).

12. Az ApoE extrahepatikus szintézise:

Az ApoE az egyes szövetekben a lipidtranszport és anyagcsere fontos alapeleme. A mellékvesében az ApoE expresszió ACTH szabályozott és befolyásolja a szteroid képzést, mivel gátolja a cAMP szignál transzdukciót mind eger mellékvese kéreg sejtekben, mind Y1 adrenális sejtvonalonban (19). Az ováriumokban az ApoE-gazdag HDL gátolja az ovarialis androgén szintézist (20). Az ApoE szerepet játszik az immun regulációban is, csökkentve az interleukin-2 termelését és gátolva a limfocyták proliferációját (65, 66). Számos közlemény szerint az ApoE képes gátolni néhány tumoros sejtvonalat: emlőrák sejtek, melanoma, Kaposi sarcoma sejtvonalak (67). Egyes szövetekben az ApoE szöveti expresszióját irányító génszakaszokat sikerült identifikálni. A hepatikus expressziót szabályozó szekvenciák az APOE gén 3' végénél helyezkednek el 18 kb nagyságban (70). A legmagasabb ApoE mRNS koncentrációt a májban mérték, a második leggazdagabb szövet az agyban található (16). Az ApoE és az ApoAI megtalálhatók a cerebrospinális fluidumban (CSF), ahol a két apolipoprotein különböző típusú kis "sphericalis particulumokon" helyezkednek el (71). Az ApoE-vel ellentétben az ApoAI nem termelődik az agyban, hanem a plazmából származik. Az agyszövetben az asztrocyták expresszálják és termelik legnagyobb mértékben az ApoE-t (72). A neuronok, oligodendroglia, ependimális és choroidális sejtek normálisan nem termelnek ApoE-t. Az ApoE az asztrocyták nyúlványaiban helyezkedik el, amelyek érintkezésben állnak az ereket körülfontó bazális membránokkal. A perifériás idegrendszerben az ApoE a glia sejtekben, szatellita sejtekben, és a nem-mielinizáló Schwann sejtekben található (72). Az ApoE nagyon fontos az idegsejtek regenerációjában (73,74,75,76,77,78). Az ApoE szintje 100-200x-ra emelkedik patkányban a n. ischiadicus sérülését követően, kiindulási szintre csak az ideg teljes regenerációja után tér vissza. Az ApoE az extracelluláris proteinek \cong 3%-át alkotja a sérült ideg környezetében (73). Az ApoE-t a makrofágok termelik és szekretálják, amelyek az idegsérülés helyére vándorolnak, hogy a szétesett idegszövetből felszabadult lipideket és koleszterint eltakarítsák. Az ApoE-lipid komplexek a regenerálódó idegsejtekhez és Schwann sejtekhez kerülnek. Mind az axonok, mind a Schwann sejtek LDL-R-i "upregulálódnak" az ideget ért károsodást követően. Az ApoE résztvesz a lipidek felvételében és tárolásában, majd ezek továbbításában a regenerálódó neuronokhoz újrafelvételre.

Az ApoE ezenkívül a neuronális növekedés modulációjában is szerepet játszik (78). Ellentétben a perifériás idegrendszerrel, az agyban az axonok sérülését követően az ApoE koncentrációja nem nő (73,74). Az ApoE nem az egyedüli apolipoprotein, amely az idegsérülés helyén akkumulálódik. Az ApoD koncentrációja 500x-ra, míg az ApoAI és ApoAIV koncentrációja 15-20x-ra nő (74). Az ApoD a HDL részeként található a plazmában, az α_2 -mikroglobulinokhoz tartozik, és kis, hidrofób molekulákat, mint pl. retinolt szállít. Az ApoD lokálisan termelődik az asztrocyták, kisebb mértékben az oligodendrocyták által.

Ezek alapján az ApoE szerepe az idegszövet regenerációjában és integritásának fenntartásában nyilvánvaló. Azonban, ez ellen szól az a nyomós érv, amely szerint sem az ApoE deficiens egerekben, sem az ApoE hiányos egyéneknél nem sikerült neurológiai deficitet vagy idegsejt regeneráció károsodást kimutatni (endokrin vagy immun deficienciát sem) (79). Valószínűleg az ApoAI és az ApoD képes az ApoE szerepét ebben az esetben átvenni.

II. Az ApoE és az Alzheimer betegség.

A demencia leggyakoribb oka az Alzheimer betegség (AB). Minden húsz, 65 év feletti egyénből legalább egy szenved e betegségekben. A betegek 5-12 év alatt teljesen ágyhoz kötötté válnak. Az Alzheimer betegség patológiai jellemzői a következők:

1. Szenilis plakkok, amelyek amyloid depozitumokból állnak, ezeket disztrófiás neuronok veszik körül
2. "Congophil" angiopátia, amely a leptomeningeális erek amyloid depozícióját jelenti
3. Intracelluláris neurofibrilláris fonatok ("paired helical filaments, PHF")
4. Neuronok és szinapszisok pusztulása

A szenilis plakk gerincét egy \cong 43 aminosavból álló peptid, a β A4 peptid alkotja, amely egy transzmembrán protein, az amyloid prekursor protein (APP) hasítási terméke. Az APP magas koncentrációban található a szinapszisokban. A protein tartalmaz egy internalizációs szignált, de a fiziológias ligandja még nem ismert. Az APP-nek számos izoformája létezik, amely az alternatív un. "splicing" eredménye, másrészt lizoszómális és sejtfelszíni enzimek degradációjának következménye (80). Normálisan az APP-t egy sejtfelszíni enzim, a szekretáz hasítja a β A4 peptid régió belül, aminek eredménye egy 10 kD fragmens. Ez egy igen különleges un. "processing", mivel a hasítás helye a transzmembrán szegmensten belül helyezkedik el.

A β A4 peptid képződése az APP-ből még tisztázásra vár, bár a β A4 nem specifikus Alzheimer betegségre, mivel a normál agyban is jelen van, csak nagyon alacsony koncentrációban.

A betegség 5 fő csoportra osztható, tekintettel az öröklődés módjára, a betegség kezdetére, és a molekuláris defektusokra.

1. Down-szindróma: A Down-szindrómás betegeknél kivétel nélkül kialakul az Alzheimer betegség, ha megérik az 50-60 éves kort. Az APP gén a 21-es kromoszómán helyezkedik el, ezeknél a betegeknél a génnek 3x-os kópiája van jelen, következményesen több β A4 peptidet szintetizálnak.
2. Korai kezdetű, un. "early-onset" (< 60 év), autoszomális domináns: A betegek kis részénél az APP gén mutációja fordul elő. Az eddig megfigyelt 6 mutációt molekulárisan meghatározták, és "koszegregációt" mutattak az Alzheimer betegség családi öröklődésével (80). Érdekes módon ezek a mutációk a β A4 peptid régió kívül helyezkednek el. Mégis interferálhatnak az APP normális hasításában, és a β A4 peptid szekrécióját serkenthetik. A két mutáció közül, amelyek a β A4 peptid régió belül találhatóak, az egyik (Glu₆₉₃⇒Gln) nem okoz tipikus Alzheimer betegséget, hanem az un. hereditér "haemorrhagias cerebralis amyloidosis" (un. "Dutch type") hozza létre (81). A másik un. "early-onset" AB formában a betegséget a 14-es kromoszómára lokalizálták, bár a felelős gén még identifikálásra vár (82).
3. Korai kezdetű, sporadikus forma: A pontos molekuláris defektus még nem ismert, szomatikus vagy "germline mutáció" lehet a háttérben.
4. Késői kezdetű, sporadikus forma: az APOE gén szerepet játszhat ebben a betegségben, bár valószínűleg csak egy a sok faktor közül.
5. Késői kezdetű, autoszomális domináns: 1991-ben kimutatták, hogy e betegség laza kapcsolatban áll a 19q13.1-q13.3 genomiális régióval, ami az APOE lókuszt is magába foglalja (83). Az un. "linkage" vizsgálatoktól függetlenül patológiai eredmények is az ApoE gén szerepére utaltak. Immunoreaktív ApoE-t lehetett kimutatni az erekben, neuronokban, neurofibrilláris fonatokban Alzheimer betegekben (84). Bár ez a jelenség nem volt specifikus Alzheimer betegségre, mert az ApoE jelen volt a "prion amyloid depositumokban" Creutzfeld-Jacob betegségben is. Mégnagyobb érdeklődést keltett, amikor sikerült kimutatni Down-szindrómás betegek pre-amyloid β A4 fibrillumában az ApoE molekulát (85). Feltételezték, hogy az ApoE egy patológiás molekuláris "chaperone"-ként hozza létre a β -amyloid fibrillumokat (85).

Kiderült, hogy az ApoE nagy affinitással kötődik a β A4 peptidhez (86). A filteren immobilizált β A4-et humán liquor-ral inkubálták. Az ApoE nagy affinitással kötődött a β A4-hez, amely se detergensnek, se denaturáló ágensek hatására nem disszociált. Mind az ApoE3, mind az ApoE4 izoforma szorosán kötődött a szolubilis β A4 peptidhez, de az ApoE4 sokkal gyorsabban lépett reakcióban, mint az ApoE2 (5min vs. 2 h) (87). ApoE trombin fragmenseket használva a β A4 peptid kötődést az ApoE C-terminális régiójára lokalizálták (244-272 aminosavak), amely az ApoE lipoprotein kötéséért is felelős.

A patológiai, biokémiai, "linkage" adatok mind az ApoE, főként az ApoE4 izoforma feltételezhető szerepére utaltak Alzheimer betegségben. A következőkben az asszociációs vizsgálatok erősítették meg ezt a kapcsolatot.

Az ϵ_4 allél szignifikánsan magasabb frekvenciáját találták 30 késői kezdetű Alzheimer betegségben szenvedő családban, mint 91 korban hasonló kontrollban (0.5 vs. 0.16) (86).

5. Táblázat Az apoE allél frekvenciák 83 beteg esetében 30 késői kezdetű, familiáris Alzheimer betegségben (FAB) szenvedő családból. n=kromoszómák száma (86).

Allélek	FAD	Kontroll csoport	
ϵ_2	0.04	0.10	0.08
ϵ_3	0.44	0.73	0.78
ϵ_4	0.52	0.16	0.14
	(n=166)	(n=182)	(n=2000)

A késői kezdetű, sporadikus Alzheimer betegségben is az ϵ_4 allél frekvenciája szignifikánsan magasabb volt (0.4 vs. 0.16) (88). Összevetve az eredményeket, kiderült, hogy a késői FAB \cong 80%-ában, a késői, sporadikus Alzheimer betegség 64%-ában mutatható ki legalább egy ϵ_4 allél, míg a kontroll csoportokban csak 31%-ban. Ez az összefüggés az Alzheimer demenciára specifikus, mivel egyéb amyloid betegségekben, ahol nem a β A4 peptid játszik szerepet nem tapasztaltak magasabb ϵ_4 frekvenciát (89). Korai kezdetű Alzheimer demenciában, Down-szindrómában, és az APP egyes mutációiban sem találtak ϵ_4 szaporulatot (90). Patológiai kvantitatív vizsgálatok a késői eredetű Alzheimer demenciában szenvedő betegek cortexében β A4 és ApoE festéssel sokkal több amyloid és ApoE depozitumot detektáltak az ϵ_4/ϵ_4 homozigóták esetében (90).

Azonban nem volt különbség a neurofibrilláris fonatok számában a két csoport között. Ez fontos, hiszen a jelenlegi nem publikált állítások szerint az ApoE3 protektív lehet a neurofibrilláris fonatok képződését tekintve. Az ϵ_4 allélnak gén-dózis hatása van az Alzheimer betegség expresszióját tekintve. Tudott ϵ_4 alléllal rendelkező 42 késői kezdetű Alzheimeres családot vizsgálva kiderült, hogy az ϵ_2/ϵ_3 vagy az ϵ_3/ϵ_3 hordozóknak csak 20%-a vált Alzheimer beteggé, míg az ϵ_2/ϵ_4 vagy az ϵ_3/ϵ_4 allélhordozók 47%-a, az ϵ_4/ϵ_4 homozigóták pedig 91%-ban mutatták a betegség tüneteit (90). Egy ϵ_4 allél 2.84-szeres, míg két ϵ_4 allél 8-szoros rizikót jelent az Alzheimer betegség kialakulásában.

6. Táblázat: Az apoE genotípusok frekvenciája 42 késői kezdetű Alzheimer betegségben szenvedő családban (90).

APOE genotípus	% Érintettség
2/2	-
2/3	18.8
3/3	20.8
2/4	20.0
3/4	47.8
4/4	91.3
Összes	40.6

Az ϵ_4/ϵ_4 homozigótáknál sokkal súlyosabb betegség alakult ki, mint az ϵ_4 heterozigótáknál, ami a korábbi betegségkezdetben is megnyilvánult. Az ϵ_4/ϵ_4 homozigótáknál a betegség indulása 68.4 éves korban kezdődött, míg az ϵ_4 heterozigótáknál 75.5 évesen. Mindkét esetben a betegség szignifikánsan hamarabb indult, mint a nem ϵ_4/ϵ_4 családtagoknál (84.4 év) (90). Az ϵ_4/ϵ_4 homozigótáknál nemcsak hamarabb kezdődik a betegség, hanem a várható élettartam is csökkent. Azoknál, akik egy vagy két ϵ_4 allélt hordoznak a várható élettartam 78 év, míg az ϵ_4 allél nélküli egyének majdnem 11 évvel tovább élnek (84.3 év). Érdekes összehasonlítani az Alzheimer betegség prevalenciáját azokban a populációkban, ahol az ϵ_4 allél frekvenciája nagyon magas (Bushman - 0.36) vagy nagyon alacsony (Kínaiak - 0.05), hogy van-e korreláció az ϵ_4 allélfrekvencia és az Alzheimer betegség között ezekben a népcsoportokban (91). Annak ellenére, hogy jelentős az összefüggés az ϵ_4 allél és a késői kezdetű Alzheimer betegség között, néhány fontos kivétel előfordul. Az egyik vizsgálatban 95 családtag közül, akiknek jól dokumentált késői AB-e volt, 19 egyetlen ϵ_4 alléllal sem rendelkezett (86).

Egy másik családvizsgálatban 42 késői AB családból 12-nél egyetlen érintett betegnek sem volt ϵ_4 allélje (90). Ezek alapján bizonyosnak látszik, hogy az APOE génen kívül más gének, és eddig még nem identifikált etiológiai faktorok is szerepet játszhatnak az AB patogenezisében.

Miért magasabb az ϵ_4 allélfrekvenciája Alzheimer betegségben ?

Az AB és az ϵ_4 allél közötti kapcsolat lehet un. "linkage disequilibrium" eredménye egy eddig még nem identifikált génnel, ami ténylegesen felelős az AB-ért. Azonban ez az elképzelés egyre valószínűtlenebbnek látszik, tekintettel arra, hogy e kapcsolat nemcsak egyes családokra vonatkozik, hanem kiterjed különböző populációkra is (91). A két jelenleg érvényben lévő hipotézis, amely az ϵ_4 allél és az AB oki kapcsolatát magyarázza a következő:

1. Az ApoE4 izoforma elősegíti a β A4-amyloid depozíciót.

2. Nem is az ApoE4 jelenléte, hanem inkább az ApoE3 hiánya a perdöntő (92).

Mind a biokémiai, mind a patológiai adatok az utóbbit támogatják. Az ApoE4 szorosan kötődik a β A4-hez, és elősegíti e peptid fokozott depozícióját a cortexben. Az a megfigyelés, amely szerint az ApoE a szolubilis β A4 fibrillumokkal is képes összekapcsolódni, nemcsak az amyloid depozitumokkal, arra enged következtetni, hogy az ApoE4 kötődés egy nukleációs folyamatot indít el, ami az amyloid precipitációjához vezet. Az ApoE3 képes stabilizálni az intraaxonális τ -proteint, ezzel gátolva a neurofibrilláris fonatok kialakulását. A "túlfoszforilált" τ -protein a neurofibrilláris fonatok (NFT), és az un. "paired helical filaments (PHF)"-ek fő alkotója. Az ApoE3 nagyobb affinitással kötődik a τ -proteinhez, mint az ApoE4. Azzal, hogy az ApoE3 a τ -proteinhez kötődik megvédi a foszforilációtól, így a NFT-ok képződése gátolt.

A fő probléma ezzel a hipotézissel az, hogy az ApoE egy szekretált protein és a normál sejtek cytoplazmájában nem található meg. Ezért nehéz elképzelni, hogy az ApoE3-nak fontos fiziológiai szerepe lenne a celluláris kompartmenten belül, ahol nem lehet kimutatni.

Konklúziók:

1. Az ApoE molekula felfedezése óta egyre nagyobb szerepet kap a lipidanyagcserében, számos receptor ligandja (LDL-R, VLDL-R, LRP-R, ApoE-R2), természetes polimorfizmusa és számos mutációja révén fontos szerepet tölt be a lipidanyagcsere szinte minden fázisában.
2. Extrahepatikus szintézise (agy, makrofágok) révén a sejtszintű szabályozás (immunmoduláció, tumorképződés), valamint az Alzheimer betegség patogenetikai tényezőjeként is egyre nagyobb szerepet kap.

III. Az ApoAI mutációk szerepe az izolált alacsony HDL-koleszterin és ApoAI szintekkel járó állapotokban.

1. Az ApoAI molekula felépítése és szerepe a lipidanyagcserében:

A humán apolipoprotein AI (ApoAI) a májban és a belekben szintetizálódik egy 267 aminosav (AA) hosszú "preproapolipoprotein" formájában (94). Egy kotranszlacionális 18-AA prészegmens lehasítása után a proapoAI a plazmába és a limfatikus rendszerbe szekretálódik, ahol a tényleges, érett 243-AA formát nyeri el (95). Az ApoAI kétharmada normális esetekben a HDL partikulumokhoz kötött. Az ApoAI volt az első apoprotein, amely esetében igazolták, hogy ko-és poszt-transzlacionális un. "processing"-en megy keresztül, mint aciláció és foszforiláció/defoszforiláció (96). Az ApoAI az egyik legfontosabb aktivátora a lecitin:koleszterin aciltransferáz (LCAT) enzimnek és gátolja a lizoszómális koleszterin-észter hidrolázt (97). Mint ligandja a perifériás, specifikus HDL-receptoroknak (98), a dózis dependens koleszterin efflux mediátora a sejtekből (99). Ezzel a reverz koleszterin transzport (RCT) kulcsfontosságú apolipoproteinje. Az ApoAI-nek fontos szerepe van a komplement rendszer gátlásában, ami klinikailag az endoteliális károsodás protekciójában fontos (100). Továbbá a HDL-nek, ill. az izolált ApoAI-nek *in vivo* és *in vitro* fokozott fibrinolitikus aktivitása van (101), ráadásul az ApoAI azonos a szérum prosztaciklin stabilizáló faktorról is (102). Az APOLP1 locus a 11-es kromoszóma (chr) hosszú karján helyezkedik el, és három gént kódol: APOAI, APOCIII, és APOAIV. Maga az ApoAI-gén (APOAI) a chr 11q13-as pozíciójában foglal helyet, 2 kilobázis (kB) nagyságú, 4 exont, 3 intront tartalmaz (103).

Az ApoAI protein struktúráját az exon 3-4 kódolja. A 4. exon hat 66-bázispár (bp) tandem ismétlődő homológ szekvenciát tartalmaz (kódon 99-230), amely hat, 22-AA-ból álló amfipatikus hélixet kódol, amelyek az ApoAI biológiai funkcióiért felelősek (103). Az ApoAI ún. "overexpressziója" transzgénikus egérben növeli a HDL-C-t, anélkül, hogy a TG-szint emelkedne (104). Klinikailag inverz korreláció áll fenn a plazma ApoAI szintje és az atherosclerosis rizikója között (105). A plazma HDL-C szintjét mind környezeti, mint genetikus faktorok befolyásolják, 50%-50% arányban (106). Az APOAI locus befolyása az ApoAI protein szintekre és a diétás lipidcsökkentés hatásossága főemlősökben 33%-os, míg emberben csak 6% (107). Azonban myocardialis infarktus túlélői között a megfigyelt HDL-hiányos állapotok (apoAI és HDL-C szintek az 5-ös percentil alatt) 35%-ban mutatnak vertikális transzmissziót (108).

2. Az APOAI mutációk és ezek szerepe a HDL-C-re és a lipidanyagcserére:

Az APOLP1 locus és az APOAI gén mutációi a következőképpen csoportosíthatók:

- A. ApoAI pontmutációk és struktúrális variánsok
- B. Teljes ApoAI hiány
- C. ApoAI/CIII hiány
- D. ApoAI/CIII/AIV hiány
- E. Az APOAI promoter variánsai

ad A. Izoelektromos fókuszálással és "polymerase chain reaction" (PCR)-alapú szűréssel eddig 22 különböző ritka ApoAI izoformát lehetett elkülöníteni, amelyek csak egy aminosavban különböznek egymástól (109). Ezeket a pontmutációkat a 7. táblázat foglalja össze.

Táblázat 7. A humán ApoAI ismert pontmutációs izoformái (109).

Szubsztitúció	Ismert családok száma	Funkcionális következmények
3:Pro-> Arg	1	csökkent pro-ApoAI konverzió
3:Pro-> His	1	csökkent pro-ApoAI konverzió
4:Pro-> Arg	2	---
10:Arg-> Leu	1	---
13:Asp-> Tyr	1	---
26:Gly-> Arg	1	familiáris amyloid neuropátia
89:Asp-> Glu	1	---
103:Asp-> Asn	1	---
107:Lys-> 0	9	csökkent LCAT kofaktor aktivitás és lipid kötés
107:Lys-> Met	2	---
110:Glu-> Lys	1	alacsony HDL-C
136:Glu-> Lys	1	---
139:Glu-> Gly	2	---
143:Pro-> Arg	1	csökkent LCAT kofaktor aktivitás; a mutáns izoforma relatív hiánya
147:Glu-> Val	1	---
158:Ala-> Glu	1	---
165:Pro-> Arg	4	HDL-C hiány, a mutáns izoforma relatív hiánya
169:Glu-> Gln	1	---
173:Arg-> Cys	1	HDL-C hiány, csökkent cholesterin észterifikáció, abnormis HDL partikulumok és lipid kötés
177:Arg-> His	1	---
198:Glu-> Lys	4	---
213:Asp-> Gly	1	---

Az ApoAI pontmutációk becsült frekvenciája 1:1000 a populációban. Ezek legtöbbször ritka, csak egyszer fordult elő, és egy kivétellel (ApoAI 136:Glu > Lys) csak heterozigóta hordozókat lehetett detektálni (108). Az ApoAI 165:Pro > Arg és 173:Arg > Cys igen alacsony (5-ös percentil alatti) HDL-C szintekkel járnak (109). Az ApoAI_{Milano} (173:Arg > Cys) heterozigóta hordozók HDL-C és ApoAI szintjei 33% és 60%-a a normál értékeknek, ennek ellenére korai ISZB nem alakul ki. A hordozók egy részénél hipertrigliceridémia és a HDL₃ partikulumok dominanciája figyelhető meg, ami a csökkent LCAT aktivitás jele. E mutáció az ApoAI α -helikális doménjainak számát csökkenti, amely az ApoAI gyors katabolizmusához vezet (110). Az ApoAI (165:Pro > Arg)-t 4 családban detektálták 32 000 minta szűréséből (109).

A HDL-C 55%-al, az ApoAI szintje 60%-al csökkent, a mutáns protein azonban csak 30%-ban volt jelen a várt 50% helyett a heterozigóta hordozókban, így a HDL-C hiánya a mutáns ApoAI direkt következményeként értelmezhető. A másik ApoAI (143:Pro > Arg) mutáns szintén csökkenti az α -helix repetitív szekvenciák számát és alacsony HDL-C-el jár. Az ApoAI (26:Gly > Arg)_{Iowa} "familiáris amyloid polyneuropathiás" esetekben fordul elő, de a HDL-C szintje normális (111, 112). Az egyik leggyakoribb ApoAI mutáns -ApoAI_{Helsinki} (107:Lys > 0) - háttérben három egymást követő nukleotid un. "in-frame" deléciója áll, ami a 106-os és a 107-es pozícióban lévő egyik Lys hiányát okozza. Ez a mutáció is alacsony HDL-C-el jár, igaz, hogy csak férfiakban (113). Az APOAI gén 4. exonján egy 45-bp deléció az oka az ApoAI_{Seattle} mutáns formának, ahol a hordozók ApoAI és HDL-C szintje a normális 15%-a (103). Az ApoAI_{Milano}, az ApoAI_{Iowa}, az ApoAI_{Seattle}, és az ApoAI (165:Pro > Arg) esetében mind az ApoAI, mind a HDL partikulumok hiperkatabolizmusa figyelhető meg, ami a "familiáris hypoalphalipoproteinaemiát" magyarázhatja (103).

ad B.: Az APOAI gén deléciói vagy mutációi, amelyek megakadályozzák az ApoAI bioszintézisét az ApoAI teljes hiányához, és extrém alacsony HDL-C szintekhez vezetnek. Az ApoAI_{Komatsushima} esetében az exon 4, kódon 84-nél un. "nonsense mutation" (CAG→TAG, Gln→stop), valamint az exon 3, kódon 37-nél un. "missense mutation" (GCC→ACC, Ala→Thr) detektálható (114). A kódon 37-es "missense mutation" más, kontroll esetekben is kimutatható, és nem jár ApoAI vagy HDL-C hiánnyal, tehát természetes polimorfizmusként értelmezhető (114), így az ApoAI deficienciáért a kódon 84-en található "nonsense mutáció" felelős. Az ApoAI biológiai funkcióiért az APOAI gén exon 4-en elhelyezkedő hat 66-bp un. "tandem repeat" homológ szekvencia (kódon 99-230) felel, amely hat, 22-aminosavból álló amfipatikus hélixet kódol (115). Az ApoAI_{Tsukuba} egy teljesen defektív APOAI gén terméke, a 243 aminosav helyett csak az N-terminális 33-at tartalmazza, és ebből is 29 abnormis szekvenciájú (115). A mutáció háttérben egy C inszercio áll a kódon 3 és 5 között elhelyezkedő 7 C (mutációs "hot spot" az APOAI génen) valamelyikében. A heterozigóta hordozók ApoAI, ill. HDL-C szintje 50%-a a normál értékeknek, tehát autoszomális domináns "hypoalphalipoproteinaemia" klinikai képében jelenik meg (115). Az ApoAI_{202:fs} mutáció klinikailag teljes HDL-C és ApoAI hiányban, corneális opacitásban, "arcus lipoidesben" jelentkezik. Az APOAI gén mutáció háttérben az exon 4-en, a kódon 202-nél a G deléciója áll mindkét allélben (116).

Ennek eredményeként az ún. "reading frame" eltolódása jön létre. A mutáns ApoAI csak 229 aminosavat tartalmaz, ezek közül is a 203-229 közöttiek eltérnek a normál sorrendtől. A variáns protein 3 Cys-t tartalmaz, ilyen aminosav normálisan nincs az ApoAI-ben, a töltésviszonya pedig + 7-re változik (116). Az ApoAI_{Münster} esetében az exon 3-on, kódon 32-nél C→T homozigóta tranzíció jön létre, ami "nonsense" mutációhoz, korai STOP-hoz vezet (ApoAI:Gln32End). A mutáns protein tartalmazza a teljes ApoAI N-terminális 55 aminosavát, klinikailag familiáris "hypopalhalipoproteinaemia" képében jelentkezik (117). A legújabb ApoAI deficienciák esetében "nonsense" mutációkat detektáltak az APOA1 gén kódon -2-nél (118), 8-nál (119) és ún. "single base insertion"-t a kódon 5-nél (120).

ad C.: Az ApoAI/ApoCIII hiány hátterében az APOLP1 gén ApoAI-et és ApoCIII-at kódoló szakaszán egy \cong 5.5 kb génszakasz inverziója áll, amely mindkét gén ún. "reading frame shift"-jét okozza (121). A plazmában sem ApoAI sem ApoCIII nem detektálható, a HDL-C teljes hiánya áll fenn, súlyos, korai ISZB-vel, xanthomákkal, azonban koleszterin-észter (CE) a retikuloendotheliális rendszerben (RES) nem halmozódik fel. Itt az egyéb ApoAI pontmutációkkal ellentétben inkább alacsonyabb szérumszintű TG-szintek detektálhatók (122).

ad D.: Az APOLP1 gén teljes ApoAI/ApoCIII/ApoAIV lókuszának hiányát írták le egy családban (121). Az ISZB a homozigóta nő hordozóban 45 éves korban alakult ki. A klinikai kép teljesen hasonló a C-pontban ismertetettekhez. Azaz planaris xanthomák, HDL-C virtuális hiánya figyelhető meg corneális opacitás vagy hepatosplenomegalia nélkül (121).

ad E.: Humán ApoAI metabolizmus vizsgálatok megállapították, hogy az ApoAI szintje elsődlegesen az ApoAI katabolizmus-rátájától és nem az ApoAI szintézistől függ (123). Az APOAI gén promoter polimorf a -75 bp-nál (G→A). E polimorfizmus hatása a lipidszintekre a jelenlegi vizsgálatok szerint ellentmondásos. Egyes populáció szintű vizsgálatok szerint az A szubsztitúció (becsült frekvenciája az európai populációban 20%) magasabb HDL-C és ApoAI szintekkel jár (124). Az A szubsztitúció egy 6-bp repetitív szekvenciát hoz létre, amely az ún. "nuclear-protein binding site"-hoz hasonló. Az A variáns - amellett, hogy ún. "linkage disequilibrium"-ban van az XmnI "restriction fragment length polymorphism" (RFLP)-vel az APOAI 5' végén, ami a familiáris kombinált hyperlipidaemia markere - HepG2 sejtekben vizsgálva alacsonyabb promoter

aktivitást mutatott (107). Ezt humán *in vivo* vizsgálatok is alátámasztották alacsonyabb ApoAI produkciós rátát igazolva a G allélt hordozókkal szemben (107). A promoter aktivitás azonban nem befolyásolja az individuális ApoAI és HDL-C értékeket (125). Viszont a heterozigóta G/A promoter genotípusú egyének a magas zsírtartalmú diétára nagyobb LDL-C emelkedéssel reagálnak, mint a G/G homozigóták. Ez azt jelentheti, hogy az európai populáció 20%-ban, akik A allél hordozók, a zsírszegény diéta igen hatékony LDL-C csökkentő beavatkozás lehet (107). Számos további populáció szintű és intervenciós vizsgálat próbálta egyértelműen tisztázni az APOAI promoter G/A variabilitás szerepét a HDL-C és ApoAI-szintek meghatározásában, de ellentmondó eredmények születtek (126,127,128). A két legutóbbi vizsgálatban - Montreálban, francia kanadaiak, és Sapporoban japánok körében - az exogén, HDL-C-t befolyásoló tényezőket (dohányzás, alkohol, gyógyszerek) minimalizálták. Mindkét vizsgálat igazolta, hogy az APOAI -75 G/A polimorfizmusnak nincs direkt hatása sem a HDL-C-re, sem az ApoAI-szintekre, sőt un. "gene dosage" effektust sem tudtak kimutatni (129,130).

Konklúziók:

1. Az apolipoprotein AI - a HDL molekula 2/3-át alkotó struktúrális protein, valamint az LCAT enzim fő aktivátora - az individuális HDL-C szintek genetikai meghatározásában fontos szerepet tölt be.
2. Az LCAT, CETP, HTGL, LPL enzimek mutációi mellett az APOLP1 gén APOAI lókusának struktúrális és promoteriális variánsai és/vagy mutációi, részben a RCT-on keresztül az egyéni HDL-C és az ApoAI-szinteket nagymértékben befolyásolják. Ezért ezek genetikai vizsgálata, ill. populáció szintű szűrése a magas ISZB rizikójú, alacsony HDL-C szintű esetekben indokolt.

IV. Az ApoB mutációk szerepe az abetalipoproteinémia és a hipobetalipoproteinémia etiopatogenezisében.

1. Az ApoB100 és ApoB48 funkciója a lipidanyagcserében, és az ApoB100 mRNS "editing".

Az ApoB100 a fő apolipoproteinje a VLDL, IDL, LDL és az Lp(a) partikulumoknak. Az ApoB100 egyike az eddig ismert legnagyobb fehérjéknek, 4536 aminosavat tartalmaz (131). Az ApoB100 a májban szintetizálódik és a VLDL-hez kapcsolatosan szekretálódik. A VLDL→IDL→LDL átalakulás során az ApoB100 az egyetlen lipoprotein, amelyik nem transzportálódik egyéb lipid részecskékre, hanem az LDL egyedüli protein komponensét alkotja. A másik egyedülálló tulajdonsága, hogy delipidálást követően hidrofób tulajdonságú. A másik ApoB molekula, az ApoB48 (egyébként mind az ApoB100, mind az ApoB48 azonos gén terméke) a vékonybélben termelődik, 2152 aminosavat tartalmaz és az alimentáris lipoproteineken, az kilomikronokon és a kilomikron "remnant"-okon található. Normolipidaemiás egyének plazmájában preprandialisan nem detektálható, postprandialisan pedig szintje sokkal alacsonyabb az ApoB100 szintjénél (131). Az összes plazmában lévő ApoB100 lipoproteinekhez kötött, és az LDL teljes hemiszfériális részére terjed ki (131). Az ApoB100 termelés gén transzkripció, mRNS "editing", protein transzláció és transzlokáció, és intracelluláris degradáció szintjén szabályozott. A humán ApoB gén 29 exont és 28 intront tartalmaz, 43 kb nagyságú, a 2-es kromoszómán helyezkedik el (132). Az ApoB gén-expressziójának három fontos jellegzetessége van: 1. az ApoB mRNS szintje sejtkultúrában (primer hepatocytá vagy transzformált hepatoma sejtvonalak) stabil, eltérő metabolikus kondíciók ellenére, ami az ApoB gén transzkripció szoros szabályozottságára utal; 2. az ApoB expressziója szövetspecifikus, a hepatocytákra és az abszorptív enterocytákra korlátozódik; 3. az ApoB mRNS egyedülálló post-transzkripcionális "editing" mechanizmuson megy keresztül, amelynek során a 7.5 kb exon 26-on C→U szubsztitúció jön létre a nukleotid 6666-nál (kódon CAA ⇒Gln-2153), aminek következtében "in-frame" UAA-STOP alakul ki, létrehozva az ApoB48-at, ami az ApoB100 N-terminális 48%-val azonos (131,132). Azonban az ApoB48 nem rendelkezik az LDL-R kötő domén-nal, és nem képez komplexet az Lp(a)-val sem (133). Maga az "editing" egyértelműen posttranszkripcionális folyamat, az érett mRNS-en ("spliced", poliadenilált) zajlik, mielőtt elhagyná a nukleuszt (131).

A szekvencia-specifikus "editing"-ért a 27 kD protein (p27), az eredetileg patkányból izolált ún. "rat ApoB mRNA editing protein" (REPR) felelős, ami nem más, mint egy Zn-tartalmú citidin-deamináz (133). A REPR "editing" szekvencia dependens, az editált C-nucleotid (nt)-tól 3'-irányban (ún. "downstream") elhelyezkedő 11-nt (6671-6681) szakasz, az ún. "mooring sequence" fontos abban, hogy a 27S makromolekuláris "editosome"-komplex a megfelelő citidin mRNA pozíciójához (6666) kapcsolódjon. Ezt a régiót körülölelő 55-nt (6649-6703) ún. "flanking" bázispárok a szpecies-és nem szpecies specifikus felismerő "recognition" szekvenciákat képviselik (133). Jelenleg a humán vékonybél ApoB mRNA editáló proteint is izolálták (HEPR). A fehérje 236 aminosavból áll, és 69%-ban identikus a REPR-el (133). A humán, felnőtt ApoB mRNA 81-97%-a editálódik a vékonybélben, ezért itt főként ApoB48 szekretálódik, ellentétben a májjal, ahol nincs HEPR, ezért ott csak ApoB100 termelődik. A 8. gesztációs héten az intestinalis ApoB mRNA 99%-a még nem editálódik, szemben a 15. és 20. héttel, amikor már az ApoB mRNA 50-85%-a ApoB48-ként íródik át (133). Bár a humán ApoB "mRNA editing" ontogenetikusan szabályozott, a patkány McArdleRH-7777 sejtvonallal ellentétben a humán CaCo-2 sejtek HEPR aktivitását az epcsavak, zsírsavak, koleszterin, 1,25-(OH)₂-D₃ vitamin, thyreoid hormonok, etinil-ösztadiol, magas zsír-és szénhidrát tartalmú diéta nem befolyásolja (133).

2. Az ApoB mutációk és a hipobetalipoproteinaemia:

A familiáris hipobetalipoproteinaemia (FHBL) autoszomális domináns öröklődést mutató betegség, amely alacsony ApoB, koleszterin és LDL-C értékekkel jár. A FHBL hátterében számos, az egész APOB génre kiterjedő mutációk rejlenek (134). A legtöbbje pontmutáció, egyetlen nukleotid szubsztitúcióval (gyakran G→C) vagy deléció, amelyet "frameshift" követ korai stop kódon kialakulásával. A "splice site defect" ritkábban fordul elő (135). Homozigóta FHBL-t is leírtak, a plazmában detektálhatatlan ApoB szinttel (null allél) és csökkent mRNA mennyiséggel (136). Az APOB gén FHBL-val járó mutációit a 8. táblázat foglalja össze (137).

Táblázat 8. Az APOB gén FHBL-val járó mutációi (137).

	Aminosavak száma	Mutáció	Mutáns ApoB a plazmában	LDL-C a heterozigótákban*	Klinikai jellemzők
licing defect"	---	G→T az intron 5 5'-végén C→T a kódon 412-nél	nem detektálható	0.75-1.21	A "compound heterozigóták" súlyos klinikai tünetekkel
ApoB ₉	411		hiányzik	0.41	
ApoB ₂₅	1085	694bp deléció	hiányzik	nincs adat (NA)	homozigóták klasszikus klinikai tünetekkel
ApoB ₂₉	1305	C→T 4125-nél	hiányzik	NA	heterozigótáknál
ApoB ₃₁	1425	4480-ik nt deléciója	HDL>1.21 g/ml	0.73	heterozigótáknál
ApoB ₃₇	1728	5391-5394 nt deléciója	HDL,VLDL,LDL	1.09	"compound heterozygotáknál"
ApoB ₃₉	1799	5591-ik nt deléciója	VLDL,LDL	NA	homozigóták zsírmalabszorpcióval
ApoB ₄₀	1829	5693-5694 nt deléciója	HDL,VLDL,LDL	1.27	"compound heterozigótáknál"
ApoB ₄₆	2057	C→T a 6381 nt-nál	VLDL-LDL,HDL	1.91	heterozigótáknál
ApoB ₅₀	2251	C→T a 6963 nt-nál	VLDL-LDL,HDL	NA	homozigóták klasszikus tünetek nélkül
ApoB _{54,8}	2485	C→T a 7665 nt-nál	VLDL-LDL	1.27	heterozigóták
ApoB ₅₅	2495	C→T a 7692 nt-nál	VLDL-LDL	1.27	retinitis pigmentosa
ApoB ₆₁	2784	8525-8561 nt deléciója	VLDL-LDL	NA	"compound heterozigóták"
ApoB ₆₇	3040	9327 nt deléciója	VLDL-LDL	1.09	heterozigóták magas HDL-C-el
ApoB ₇₅	3386	C deléció a 10366 nt-nál	VLDL-LDL	1.24	heterozigóták
ApoB ₈₃	3749	C→T a 11458 nt-nál	VLDL-LDL	1.34	heterozigóták
ApoB ₈₆	3896	11840 nt deléciója	VLDL-LDL	NA	"compound heterozigóták"
ApoB ₈₇	3978	12032 nt deléciója	VLDL-LDL	1.60	aszimptomatikus homozigóták
ApoB ₈₉	4039	12309 nt deléciója	VLDL-LDL	1.91	"compound heterozigóták"

* Átlag LDL-C szintek heterozigótákban (mM). Az 50-es LDL-C percentil 20-74 év között férfiakban és nőkben 3.52 mM.

A homozigóta FHBL klinikai tünetei változóak, annak megfelelően, hogy milyen hosszúságú ApoB mutáns van jelen a plazmában, ha egyáltalán jelen van. Malabszorpció, cerebellaris ataxia, acanthocytosis, retinitis pigmentosa jelentkezik ApoB₉ és ApoB₂₅ esetén (138). Zsír malabszorpció még mindig jelen van a homozigóta ApoB₃₉-es mutánsokban is (139). Az ApoB₅₀ homozigóták esetében azonban, ahol az ApoB₄₈ szintézise megőrzött, a FHBL klasszikus tünetei eltűnnek (140). Hasonló a helyzet az LDL-C szintekkel is, a legalacsonyabb értékek a legrövidebb ApoB mutánsok esetében mérhetők, míg a hosszabb ApoB mutánsoknál az LDL-C a normál érték 50%-át is elérheti (137). Az ApoB₃₁ a legrövidebb mutáns, amely megjelenik a plazmában a HDL-hez kötve (141), azonban az ApoB₃₇ sem képes még az LDL-el kapcsolódni (142). Jelenleg tisztázatlan a kérdés, valyon az ApoB₃₀₋₄₀ közötti mutánsok csak a májban vagy egyidejűleg a vékonybélben is termelődnek-e. Az megállapítható, hogy a mutánsok hosszának növekedésével azok mind nagyobb lipoprotein partikulumokhoz képesek kötődni (137). Az ApoB₄₈-nál nagyobb mutánsok már a VLDL-LDL vonalhoz asszociáltak, azonban az ApoB₅₀ főleg a VLDL-hez kötött, és gyakorlatilag az ApoB₅₀VLDL→ApoB₅₀LDL átalakulás nem megy végbe (143). A nagyobb ApoB mutáns formák, mint az ApoB₇₅₋₈₇₋₈₉ már tartalmazzák az ApoB₁₀₀ receptor-kötő doménjét. Mindkét variáns 1.6-2-szer nagyobb affinitást mutat az LDL-R-hoz, mint a normál ApoB₁₀₀, és ebben az ApoE kötésnek nincs szerepe (144). Összefoglalásul a FHBL-t okozó mutációs csoportokat a 9. táblázat szemlélteti (137).

Táblázat 9. A FHBL-t okozó különböző APOB lókuszt mutációk klasszifikációja (137).

Mutációs osztály	Metabolikus effektus	Klinikai tünetek homozigótákban
1. Osztály Null allél	tényleges ApoB szekréció nincs	súlyosak (zsír malabszorpció, cerebellaris ataxia, stb.)
2. Osztály Csak nagyon rövid ApoB mutánsok szekretálódnak	Defektív exogén (ApoB ₄₈) és endogén (ApoB ₁₀₀) út ↓ produkció és/vagy ↑ katabolizmus ?	változnak, aszerint, hogy milyen ApoB szekretálódik
3. Osztály Rövid ApoB mutánsok, de hosszabbak, mint az ApoB ₄₈ , de az LDL-R kötő domént nem tartalmazzák	Defektív endogén (ApoB ₁₀₀) út, a partikulumok az ApoE-n keresztül eliminálódnak ?	Igen enyhe tünetek
4. Osztály ApoB mutánsok, melyek tartalmazzák az LDL-R kötő régiót	gyorsult LDL elimináció	hipocholeszterinémia és acanthocytosis az egyedüli tünetek

3. Az abétalipoproteinaemia molekuláris alapjai:

Az abétalipoproteinaemia (ABL) a ritka humán mutációk diverz csoportját alkotja. A szérumban a koleszterin (1 mM) és triglicerid (< 0.1 mM) szintje extrém alacsony, a koleszterin HDL-C formájában van jelen, az ApoB és ApoB-tartalmú lipoproteinek nem detektálhatók (145). Az abétalipoproteinaemia tünetei közvetlen a születés után kezdődnek az anyatej táplálást követően. Zsír malabszorpció, steatorrhoea, a zsíroldékony vitaminok hiánya, hepatomegalia alakul ki (146). A hiányzó zsíroldékony vitaminok pótlása nélkül spinocerebellaris ataxia, retinitis pigmentosa, peripheriás neuropathia alakul ki (146). Az első recesszív ABL formát Bassen és Kornzweig írták le 1950-ben (147). Az ABL kodomináns, heterozigóta formáját 1973-ban közölték (Se-Chol 2-3 mM), amelyről később kiderült, hogy homozigóta FHBL-ről volt szó (148,149). Az 1980-as évek elején egy másik ABL variánst is leírtak: a betegeknél zsírtelhelés után a postprandiális TG-szint emelkedés elmaradt, ApoB₁₀₀-al rendelkeztek, de ApoB₄₈-al nem, alacsony lipid-szintek mellett. Ezt a szindrómát Anderson-betegségnek és/vagy kilomikron-retenciós betegségnek (CRB) nevezték el (150,151). A két entitást csak elektronmikroszkópos vizsgálattal lehet elkülöníteni: az Anderson-betegségben lipidcseppek nem mutathatók ki az endoplazmatikus retikulumban (ER) és a Golgi-ban, míg a CRB-ben ezek a szubcelluláris organellek túltelítettek lipidekkel (150,151). Fontos különbséget tenni a FHBL és az ABL között, hiszen a genetikai hátterük teljesen eltérő, bár klinikailag a homozigóta FHBL és az ABL differenciálása szinte lehetetlen. Molekulárgenetikai módszerekkel azonban teljesen egyértelmű, hogy a FHBL hátterében az APOB lókuszt mutációi állnak, míg az ABL az ún. "microsomal triglyceride transfer protein" (MTP) nagy alegysége mutációinak a következménye (145). A MTP az ER üregében helyezkedik és a membránok között TG > CE > PLP-ek transzportját facilitálja a májban és a vékonybélben (152). A MTP egy szolubilis heterodimér, amely a katalitikus, 97 kD nagy alegységből (NA), és az 55 kD-os multifunkcionális ún. "protein disulphide isomerase" (PDI) kis alegységből áll (153,154). A PDI aktivitása (diszulfid kötések létrehozása és izomerizációja) csak az alegységek szétválása után detektálható. A PDI az ER lumenén belül ún. molekuláris "chaperone"-ként funkcionál, ami a nagy makromolekuláris komplexek térbeli szerveződését, ún. "folding"-ját segíti (155).

A PDI elenghetetlen a MTP működéséhez, ráadásul a NA-t szolubilis formában is tartja, mivel a komplex disszociációja után a NA aggregációja következik be (155). A PDI másik funkciója, hogy a tetramer ($\alpha_2\beta_2$) prokollagén-prolin dioxigenáz enzim - a 4-OH-prolin láncokat hoz létre a kollagénen - β -alegységét alkotja (155). A NA génje a 4-es kromoszóma rövid karján, a 4q24-es pozícióban helyezkedik el, 55-60 kb hosszan, 18 exont és 17 intront tartalmaz (156). A NA aminosav szekvenciája extenzív homológ szakaszokat mutat a vitellogenin proteinnel, amely a lipovitellin prekursora (156). A vitellogenin, mint lipidtranszfer molekula a szárnyasok májában szintetizálódik és az ováriumokba transzportálódik tojásrakás idején. Szerepe kissé hasonló a humán VLDL-hez (156). A NA mutációja egyértelműen felelős az ABL-ért. E betegek intestinalis biopsziáiból az MTP mRNS-t izolálva a NA számos mutációját lehetett detektálni: $C^{215} \rightarrow \text{Del} \Rightarrow$ "frameshift mutáció", amelynek eredménye az eredeti 894 aminosavat (AS) tartalmazó MTP helyett egy 78 AS hosszú mutáns, funkcióképtelen fehérje lett (156). A másik esetben az exon-intron határon, az 1783 bp-nál $C \rightarrow T$ substitutio $\text{Arg} \Rightarrow \text{STOP}$ kódonhoz vezetett, ez a "nonsense" mutáció is un. "truncated" proteint eredményezett (156). Ezek a mutációk is jól bizonyítják, hogy a normális ApoB-tartalmú lipoproteinek képződéséhez a májban és a vékonybélben nemcsak ApoB-re, lipidekre van szükség, hanem megfelelő funkciójú MTP-re is.

Konklúziók:

1. Az ApoB molekula egyedülálló abban a tekintetben, hogy egy közös gén (APOB) két különböző helyen (vékonybél, máj), két különböző molekulát (ApoB48 és ApoB100) kódol a poszttranszlacionális mRNS "editing" révén a REPR/HEPR enzimek segítségével.
2. A FHBL genetikai hátterében az APOB gén számos mutációja "nonsense, missense, frameshift, exon/intron splice site junction" áll, amelyek detektálása, ill. sejtkultúrában un. "pulse-chase" technikával történő vizsgálata az intrahepatikus ApoB-VLDL "assembling" pontosabb megértéséhez vezet.
3. Az ABL genetikai háttere teljesen eltér a korábban azonosnak gondolt FHBL-től. A MTP és mutációinak felfedezése egyrészt magyarázatot ad e ritka genetikai betegségekre, másrészt rávilágít arra, hogy a szubcelluláris ApoB-VLDL szerveződésben, és a normális hepatikus ApoB₁₀₀VLDL "output"-ban a molekuláris "chaperone"-ok ugyanolyan fontosak, mint az APOB gén szekvenciális intaktsága.

V. Az ApoE izoformák és a komplement allotípusok hatásának vizsgálata fibrát terápiában és zsírszegény diétában részesülő, különböző Fredrickson fenotípusú betegekben.

1. Vizsgálati célkitűzések:

Az ApoE allélek (ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4) hatása az obes, hyperlipoproteinaemiás betegek diétás és antihyperlipidaemiás gyógyszeres kezelésére nem tisztázott. Az eddig elvégzett vizsgálatok ellentmondó eredményei az eltérő betegszámmal, a betegek eltérő etnikai hátterével, és a vizsgálati metodika különbözőségével (ApoE feno-vagy genotipizálás) magyarázhatóak (157). A komplement faktor C3 és C4 izoformáit a lipidanyagcserében ilyen aspektusban az irodalmi adatok alapján még nem vizsgálták, pedig a C3 és C4 faktorok a myocardialis infarktus (MI) genetikai predispozíciójának markerei. A C3 az APOE lókusztól közelében helyezkedik el a 19-es kromoszómán, a C4 viszont a 21-OH-áz génlókusztól mellett a 6-os kromoszómán. A C3 szintje independens MI rizikófaktorként szerepel az előzőleg ischaemias eseményt nem szenvedett populációban (158). A C4 ritka izoformája (C4B*Q0) gyakoribb MI-on átesett férfiakban (159). A C3 az ún. "adipsin/acylation stimulating protein (ASP) system" regulációjában is résztvesz, ami a TG eliminációt biztosítja a plazmában (160). Az ASP megegyezik a C3 egyik hasítási termékével, a "C3a-desArg"-el, amely a TG szintézist stimulálja a humán adipocytákban. Vizsgálatunkban a következő kérdéseket tettük fel:

1. Az elhízott (testsúly > 30%-al ideális felett), hyperlipoproteinaemiás (Fredrickson II/A, II/B, IV-V), diétával (NECP Step I) és gemfibrozillal (900 mg) kezelt magyar populációban az ApoE izoformáknak van-e a terápia hatásosságát befolyásoló prediktív szerepe ?
2. Az ApoE genotipizálás módszerét e speciális, hazai populáción elsőként alkalmazva találunk-e eltérő ApoE allélfrekvencia eloszlást a korábban egészséges magyar egyéneken fenotipizálással nyert értékekhez ?
3. Az eddigi irodalmi adatok alapján, hasonló klinikai vizsgálatokban elsőként arra kerestünk választ, hogy vajon a három komplement allotípusnak (C4B*Q0, C3 fast - F-, C3 slow -S) a lipidcsökkentő terápia effektivitást befolyásoló szerepe van-e ?

2. Beteganyag, vizsgálati módszerek:

A 6 hónapig tartó, nyílt, prospektív vizsgálatba 81 hyperlipoproteinaemiás (II/A=13, II/B=33, IV=15, V=20) beteget (27 nő - 34-66 év, 55 férfi - 26-72 év) vontunk be ambuláner módon. A betegeket diéta (NCEP Step I.) és 900 mg gemfibrozil kezelés mellett havonta kontrolláltuk (RR, P, BMI, lipidstátus). A vizsgálat kezdetén ApoAI, AII, B meghatározás (immunonefelometria), ApoE genotipizálás (un."restriction enzyme isoform genotyping"), komplement faktor C3, C4 allotípus vizsgálat ("high voltage electrophoresis") történt. A "run-in" és az "interim" periódusokban, valamint a vizsgálat végén rutin máj-és vesefunkciós laborvizsgálatokat végeztünk. A diétás kontrollt szakképzett dietetikusok felügyelték az egész vizsgálati periódus alatt. A statisztikai számításokat BMDP programmal végeztük, ANOVA-t, Wilcoxon-tesztet és un."multiple stepwise regression analysis"-t használva, $p < 0.05$ -öt tekintve szignifikánsnak. A technikai részleteket, ill. a részletes beválasztási és kizárási kritériumokat a ref. 161,162 tartalmazza.

3. Vizsgálati eredmények, következtetések:

A diéta és gemfibrozil terápia hatására az átlag koleszterin (chol) csökkenése 15%, a TG-é 48%, és az atherogen indexé (AI) 28% volt (nők/férfiak). A Fredrickson II/A típusban a diéta és gemfibrozil kezelés egyik apoE izoforma esetében sem hozott szignifikáns terápiás sikert. Ezzel ellentétben a Fredrickson IV+V típusban mindhárom ApoE allotípusnál szignifikáns csökkenés mutatkozott a lipidprofilban. A Fredrickson II/B-ben azonban csak az E3 allotípusok mutattak szignifikáns chol/TG csökkenést. Az ApoAI/II/B szintek nem különböztek szignifikánsan az egyes ApoE izoformák között. Az ApoE allélfrekvenciák a Hardy-Weinberg szabályt követték: $\epsilon_2=0.20$, $\epsilon_3=0.67$, $\epsilon_4=0.13$. Ebben a speciális populációban az ϵ_2 allélfrekvenciája 3-szorosa volt a normál magyar populációhoz képest (0.20 vs. 0.06). A kedvező terápiás hatás mértéke az egyes ApoE alléleket tekintve a következő nagyságrendi trendet adta: $\epsilon_3 > \epsilon_4 > \epsilon_2$, annak ellenére, hogy a "body mass index" (BMI) csak kismértékben csökkent.

A C3-S/C3-F allélfrequenciája 0.84/0.16 volt, hasonlóan a normál populációhoz, azonban szignifikáns AI csökkenés csak a C3-FS heterozigótákban volt kimutatható: 11.08 \Rightarrow 5.33 ($p < 0.01$) vs. C3-SS 9.40 \Rightarrow 7.01(NS).

A C4B*Q0 hordozók esetében a lipidparaméterek változásai nem voltak szignifikánsak.

Eredményeink alapján a következő megállapításokat tehetjük:

1. A magyar obes, hyperlipoproteinaemiás populációban ApoE genotipizálással az ϵ_2 allél gyakorisága 3-szoros a normál hazai populációhoz képest (0.20 vs.0.06).
2. Más, korábbi elhízott, hyperlipoproteinaemiás populációkban végzett vizsgálatokkal egyezően a hazai, hasonló népességben is az ϵ_2 allél gyakorisága figyelhető meg Fredrickson IV/V típusban.
3. A Fredrickson II/B típusban az ApoE genotipizálás fontos, hiszen csak az ϵ_3 allélhordozóknál várható terápiás siker a diéta + gemfibrozil kombinált kezeléstől (81 betegből 32 volt II/B, a 32-ből 22 volt ϵ_3 pozitív, itt a terápia szignifikánsan csökkentette a TG/chol értékeket).
4. A funkcionálisan sokkal aktívabb C3-FS allotípus-hordozók AI értékei szignifikánsan csökkentek, így e betegeknél hatékonyabb lipidcsökkentő terápiás eredmény várható (hatékonyabb ASP aktiváció, hatékonyabb TG elimináció).
5. A jelenleg egyre bővülő antihyperlipidémiás gyógyszerek piacán a leghatékonyabb gyógyszer kiválasztásában és a terápia sikerében a molekulárgenetikai módszerek (ApoE genotipizálás, C3-F/S tipizálás) értékes segítséget nyújthatnak.

VI. Az Alzheimer-betegség potenciális molekuláris genetikai markereinek vizsgálata.

1. Vizsgálati célkitűzések:

Az Alzheimer-betegség (AB) egyrészt sokarcú kórkép (un. "early onset - EOA, late onset - LOA", familiáris és sporadikus), másrészt pontos etiopatogenezise nem tisztázott. Ráadásul epidemiológiai fontosságát az adja, hogy a 65 év feletti demencia leggyakoribb formája, óriási terhet róva mind a beteg családjra, mind az egészségügyi hálózatra (163). Biztos diagnózisa csak post mortem hisztopatológiai ismérvek alapján lehetséges a részben patognosztikus lokalizációjú extracelluláris szenilis plakkok, intracelluláris un. "neurofibrillary tangles", és a "congophil angiopathia" alapján (80). A valószínűsítő klinikai vizsgálatok egyrészt a kognitív funkciók romlását bizonyító NINCDS-ADRDA tesztek, a cerebrális atrófiát detektáló CT, MRI, valamint az agyi anyagcsere csökkenését kimutató PET -ből állnak (164). Az ϵ_4 allél asszociációjáról a familiáris (FAB) és sporadikus (SAB) LOA-ben jelenleg már számos adat áll rendelkezésre (84→90). A késői FAD 80%-ban, a SAD 64%-ban kimutatható legalább egy ϵ_4 allél (89). Az ϵ_4 allélnek un. "gene dosage" hatása is van az AB kialakulása tekintetében: egy ϵ_4 allél megléte esetén a betegség 47%-ban, két ϵ_4 allélnél 91%-ban fejlődik ki (90). Ráadásul az ϵ_4/ϵ_4 homozigotáknál a betegség \cong 10 évvel korábban kezdődik, és a várható élettartam 11 évvel kevesebb (90). A molekulárgenetikai markerek epidemiológiai asszociációjának kutatása, ill. a már ismert markereknek a betegség prognózisában és mechanizmusában történő vizsgálata a betegség patomechanizmusának jobb megértését szolgálja.

Tanulmányunkban a következőkre kerestünk választ:

1. Magyarországon először, az ApoE genotipizálás módszerét használva a korai-és késői kezdetű AD-ban, hazai populációban az ϵ_4 allél előfordulását vizsgáltuk az eddig megfigyelt trendek tükrében.
2. Lehetséges, új markereket keresve, az irodalmi adatok alapján elsőként, az eddig még AB-ban nem vizsgált Lp(a) és komplement faktor C3, C4, Bf polimorfizmus epidemiológiai kapcsolatát elemeztük hazai beteganyagban.

2. Beteganyag, vizsgálati módszerek:

A NINCDS-ADRDA kritériumok szerint valószínű AB-ban szenvedő 35 beteget vizsgáltunk (26 nő, 9 férfi, 66.4+/-8.7 év). A familiáris (10) és sporadikus eseteket közösen értékeltük, az EOA és LOA csoportot külön vizsgálatuk. Az apo(a) és apoε allélek kontrolljait a kor/nem megoszlásnak megfelelő, korábban szűrt egészséges hazai populáció adatai szolgáltatták. A komplement faktorok esetében az adatokat 482 egészséges, 60 év feletti (194 férfi és 288 nő) egyén allotípus frekvenciáival vetettük össze. A lipid profil, az ApoE genotipizálás, az Lp(a) szintek, az apo(a) fenotipizálás, valamint a C3, C4, B fenotipizálás részleteit illetően a ref. 165-ben található részletes leírás. Az eredményeket BMDP programmal értékeltük, ANOVA-t, Kruskal-Wallis-tesztet, "odds ratio"-számítást alkalmazva, $p < 0.05$ -öt tekintve szignifikánsnak.

3. Vizsgálati eredmények, következtetések:

A vizsgált lókuszek (APOE, Lp(a), C3, C4, Bf) allélfrekvenciái a Hardy-Weinberg szabályt követték. Eredményeink szerint, mind a LO-AB-ben, mind az EO-AB-ban az ϵ_4 allél gyakorisága nagyobb volt a kontroll csoportokhoz viszonyítva (LO-AB 2.1x, LO-AB 3.7x), míg az un. védő ϵ_3 allél frekvenciája a LO-AB-ben 35%-al, az EO-AB-ben 15%-al csökkent. Számításaink szerint egyetlen ϵ_4 allél hordozása 3.2x-es relatív rizikót jelent az AB kialakulása tekintetében. A lipidstátusz értékeiben (chol, TG, HDL-C, AI) a kontroll vs. AB csoportban nem volt szignifikáns különbség, azonban az ϵ_2 és az ϵ_4 allélhordozók esetében a HDL-C 54%-al, ill. 72%-al volt magasabb, mint az ϵ_3 esetén, függetlenül attól, hogy a vizsgált személy AB-s volt-e vagy sem. Az Lp(a) szérumszintjei a kontroll vs. AB csoportban nem tértek el lényegesen (5.1 mg/dl vs. 8.6 mg/dl, NS). Az apo(a) allélek tekintetében sem volt szignifikáns differencia a kontroll vs. AB csoportban: az un. "high molecular weight" (HMW) - S4, S3, null/"low molecular weight"(LMW) - S2, S1, B izoformák megfelelő frekvencia értékei 0.85/0.91 vs. 0.15/0.09 voltak kontroll/AB relációban. A komplement faktorokat vizsgálva a C4A*Q0 2.2x, a Bf*F 1.2x volt gyakoribb LO-AB-ben.

Eredményeinkből a következők szűrhetők le:

1. Hazai AB beteganyagban, és az irodalmi adatok szerint elsőként az ApoE genotipizálást, a komplement C3, C4, Bf, és az apo(a) fenotipizálást együttesen alkalmazva, az apoE allélfrekvenciái hasonló növekedést mutattak az ϵ_4 irányában mind EO-AB, mind LO-AB-ben, mint más populációkban vizsgálva.
2. A lipidprofil, Lp(a)-szintek, és az apo(a) izoformái AB-re patognomikus jellegzetességet nem mutattak.
3. A komplement rendszer területén a C4A deficiencia (C4A*Q0), amely a HLA-DR3-mal együttesen általában autoimmun kórképekben jelentkezik szignifikánsan gyakrabban fordult elő.
4. A Bf*F hordozók szignifikánsan gyakrabban fordultak elő AB-ben, ami az alternatív komplement rendszer erősebb aktivációjára utalhat, mivel az F allél jelenléte magasabb B faktor szintekkel jár.

VII. Az APOAI lókuszt mutációanalízise 5-10 percentil alatti ApoAI és HDL-C-szintű probandokban

1. Vizsgálati célkitűzések:

A PROCAM és a Framingham-vizsgálatok alapján egyértelmű, hogy az 5-10 percentil alatti HDL-C és ApoAI értékei (nőknél < 0.9 mM és $< 106 - < 120$ mg/dl, férfiaknál < 0.8 mM és $< 104 - < 115$ mg/dl) fontos ISZB rizikófaktorok (166, 167). A HDL-C 0.03 mM-al történő emelése 2-3%-os ISZB kockázat-csökkenést eredményez (166). A plazma HDL-C szintjét genetikai és környezeti hatások szabályozzák 50-50% arányban (106). Az APOAI lókuszt befolyása az ApoAI szintekre és a lipidcsökkentő diéta hatékonyságára 6% (107). Azonban a MI túlélői között megfigyelt HDL-C és ApoAI hiány (mindkét érték az 5 percentil alatt) már 35%-ban mutat vertikális transzmissziót (108). Ezekben a HDL/ApoAI-deficiens családokban számos ApoAI mutációt detektáltak (ref. ApoAI fejezet A,B,C,D,E pontjai). Ezek egy részében bár a védőfaktorok szintje alacsony, mégsem járnak magasabb ISZB rizikóval (pl. ApoAI_{Milano}). Azok a mutációk, amelyek a HDL molekula katabolizmusát fokozzák nem járnak ISZB-vel, ellentétben azokkal, amelyek a szintézist gátolják.

Ennek fő oka lehet, hogy a HDL stabilitását biztosító fő protein-nek, az ApoAI-nek a szintje elsődlegesen az ApoAI katabolizmus rátájától (FCR), és nem a szintézisétől függnek, ellentétben az ApoAII-vel (123). Tehát az ApoAI zavara esetén az ApoAII bizonyos mértékig képes átvenni az ApoAI szerepét, de csak akkor, ha a szintézise zavartalan (123). Mivel az ApoAI FCR dependens, ezért a -75 G/A promoter polimorfizmusnak szerepe csekély a HDL-C/ApoAI szintekre (129).

Tekintve, hogy az alacsony HDL-C/kötelező ISZB rizikó kérdés összetett és javarészt megválaszolatlan, ezért arra kerestünk választ, vajon:

1. A hazai egészséges, de extrém alacsony HDL/ApoAI-szintekkel rendelkezők körében (40-49 éves korcsoport) klinikai szűrővizsgálatokra adaptálható módszerekkel találunk-e APOAI mutációkat.
2. Magyarországon először, a teljes APOAI gént 10 "primer"-párral végigszűrve nemcsak a cDNS un. "translated" régióiban, hanem a regulátor szekvenciákban találunk-e eltéréseket.

2. Beteganyag, vizsgálati módszerek:

Az vizsgálatban résztvevő 40 ambuláns, egészséges önkéntes (12 nő, 28 férfi, 40-49 éves korcsoport) kiválasztásában a HDL-C/ApoAI 5-10 percentil alatti értékei játszottak szerepet. A lipidprofil, ApoAI-szinteket kereskedelmi kitékkel, ill. EIA-val határoztuk meg. A teljes APOAI gént PCR-SSCP és DNS-szekvenálás módszerével vizsgáltuk. A részletes metodikai leírást a ref. 168. tartalmazza. A statisztikai analízisnél CLINFO/VAX 750 programot használtunk, $p < 0.05$ értéket tekintve szignifikánsnak.

3. Vizsgálati eredmények, következtetések:

A magyar lakosság HDL-C szintjét 1.2 mM-nak véve átlagul, a mi anyagunkban a HDL-C értéke (0.5+/-0.2 mM) ehhez képest 58%-al csökkent. Ez a PROCAM/Framingham vizsgálatok megfelelő adatait véve alapul ez az 5 percentil alatti tartománynak felel meg. Az ApoAI szintje az átlag 74/69%-a volt férfiaknál/nőknél az 5 percentilben. A 35-49 éves korosztály normálértékeinek 139-140 mg/dl/150-152 mg/dl-t fogadtuk el a férfiak/nők relációjában. Az apoE allélfrekvenciák a Hardy-Weinberg szabályt követték.

A vizsgált populáció és a kontrollcsoport allélfrekvenciája nem tért el szignifikánsan: ϵ_2 0.19 vs. 0.14, ϵ_3 0.77 vs. 0.80, ϵ_4 0.04 vs. 0.06. A nemek között a lipidparaméterek, ApoAI-szintek, APOE izoformák szignifikánsan nem különböztek. PCR-SSCP szűréssel 12 esetben találtunk mutációra, esetleg új polimorfizmusra gyanús szekventiákat (EXON3 1221bp - MspI RFLP helye -6 eset, PROMOTER-EXON1 438-443bp - 3 minta, ApoAI mRNS "initiation site" 469 bp - 3 minta), azonban DNS szekvenálás során új mutációt vagy polimorfizmust nem tudtunk igazolni. Egy korábbi, véradókon végzett, közel azonos korcsoportú tanulmányban a chol < 5.2 mM és a HDL-C < 5 percentil értékeket véve alapul a férfiak 1.4%-a, a nők 4.7%-a tartozott az általunk vizsgált populációban. Ennek alapján az n=40 mintaszám 2000 főnél nagyobb populációt jellemez.

Az ApoAI-mutációk/HDL-C/ISZB kapcsolata jelenleg tisztázatlan, bonyolult kérdés.

Három fő célcsoportot érdemes vizsgálni APOAI lókuszt mutációk tekintetében:

1. familiáris "hypoalphalipoproteinaemia", ahol az APOLP1 major mutációi (deléción, inverzió) fordulnak elő, egyéb súlyos klinikai tünetekkel és/vagy korai ISZB-vel (**168**);
2. ApoAI pontmutációk (ApoAI variánsok), ezek egy része jár csak alacsony HDL-C/ApoAI-szinttel vagy járulékos minor klinikai tünetekkel és ISZB-vel;
3. izolált alacsony HDL-C és ApoAI-szintekkel rendelkező probandok, klinikai tünetek és/vagy ISZB nélkül. Az utóbbi csoportban populáció-jellegű APOAI lókuszt mutáció-szűrés még vizsgálatunkig nem történt.

Eredményeink alapján a következő megállapításokat tehetjük:

1. Klinikai tünetek és/vagy ISZB nélküli, családi halmozódást nem mutató izolált alacsony HDL-C-el és ApoAI-el (5-10 percentil) rendelkező hazai populációban az APOAI lókuszt mutáció-analízise nem tartható indokoltnak.
2. Az alacsony HDL-C-szintre elméletileg jellemző ($\epsilon_4 > \epsilon_2$) APOE isoforma eloszlást nem találtunk.

VIII. A humán plazmában eddig leírt legkisebb APOB gén mutáció (ApoB27.6) klonális analízise és heterológ expressziója COS 7 sejt kultúrában.

1. Vizsgálati célkitűzések:

Az ApoB biogenezeise komplex folyamat, ennek részeként konstitutíve szintetizálódik a májban és a vékonybélben. Ráadásul a képződött ApoB nagyrésze intracellulárisan degradálódik, és csak egy kis frakciója szekretálódik (131-133). Továbbá az ApoB szekréciója egy másik gén, az MTP ko-expressziójának függvénye (145-146). Az ABL-ban az ApoB szintetizálódik, de nem szekretálódik az MTP mutációja miatt (156). Az un. "truncated", rövid ApoB mutánsok (a FHBL fő okai) azokban a sejtekben, amelyek nem rendelkeznek MTP-vel az ER-ban retineálódnak és degradálódnak (169). Az APOB mutációanalízise igen nehéz, hiszen maga a gén óriási terjedelmű, 43 kb, 29 exonnal, amelyek közül csak az egyik exon terjedelme 7572 bp (134). Azok a mutációk, amelyek az exonokat érintik, viszonylag könnyen detektálhatók, SDS-PAGE, coomassie-festés, un. "Western-blotting", majd DNS szekvenálással. Azonban azok a mutációk, amelyek az mRNS un. "processing"-et érintik, vagy az un. "splicing" vagy az RNS-polimeráz "stuttering" révén igen nehezen diagnosztizálhatók (149).

A betegek mRNS-ének direkt vizsgálata nem lehetséges; az ApoB mRNS a májban és a vékonybélben is expresszálódik, mindkét szövet nehezebben elérhető biopsziával, mint egy egyszerű vérvétel. Ráadásul az ApoB mRNS a vékonybélben "editálódik" is, ez az analízist tovább komplikálja (133).

A FHBL háttérében meghúzódó, az eddig ismert legkisebb ApoB-t, az ApoB27.6-ot eredményező "splice-site" mutációt (170) vizsgálva egy technikát fejlesztettünk ki, amely az ApoB mRNS "processing" mutációk gyors analízisét teszi lehetővé.

Ez a mutáció a T→C tranzíció miatt következett be az intron 24-ben, a +2-es pozícióban (170). A cikk szerzői három lehetséges mechanizmust vetettek fel, amelyek az mRNS "processing"-et befolyásolhatták:

1. az intron 24 "splicing" elmarad, az transláció folytatódik az intronon belül,
2. un. "cryptic site" aktiválódik az intron 24-en belül, korai translációs STOP-al,
3. un. "exon skipping" következik be, vagyis az exon 23 "splicing"-ja jön létre, úgy, hogy az exon 23 és 25 egymás mellé kerül, ennek következtében az exon 25-ben "frameshift", és korai translációs STOP alakul ki (170).

Egy minigént hoztunk létre, amely tartalmazta a mutáns intron 24-et és a normál "downstream" intron 25-öt. A mutáns minigén expressziója sejt kultúrában MTP hozzáadásával a rudimentális ApoB27.6 proteint eredményezte, amelynek utolsó 29 carboxi-terminális aminosava eltért az eredeti ApoB100 közölt aminosav összetételétől. Az mRNS analízise az ún. "cryptic splice site" aktivációt igazolta az intron 24-ben.

2. Vizsgálati módszerek:

Az ApoB41 cDNS-t tartalmazó pSV7D vektorba BamHI-XhoI hasítási helyre klónoztuk a normál kontroll, ill. a homozigóta (HMZ) proband PCR amplifikált intron 24-ét, létrehozva a pSV7D-B41i24 és a pSV7D-B41i24HMZ expressziós vektorokat. A normál intron 25-öt e vektorok XhoI-XbaI régióiban klónoztuk. A minigén konstrukciókat DNS-szekvenáltuk, hogy a klónozás és a PCR során az esetlegesen létrejött mutációkat kizárjuk. Az APOB GenBank által megadott szekvencia hibáját verifikáltuk mind a normál, mind a HMZ proband esetében: a GenBank által megadott +11 G az intron 24-ben nem létezik (170).

A COS 7 sejtekbe a minigént elektroporézissel juttattuk be, majd a sejteket 48 h múlva analizáltuk. A sejteket "pulse-labeled" ^{35}S -Met/Cys-el jelöltük 10 min-ig, majd a "chase-time" 1 - 5 h között változott. A sejtizlátumot immunprecipitáltuk és SDS-PAGE-n kvantitatív "phosphorimaging"-el vizsgáltuk. Az ApoB27.6 szekreciós vizsgálatához 0.8 mM oleát-dextrin komplexet és MTP expressziós cDNS vektort használtunk. Az immunfluoreszcens ApoB festéshez egér monoklonális C1.4 antitestet alkalmaztunk, amely az első 400 N-terminális ApoB aminosavhoz kötődik.

3. Vizsgálati eredmények, következtetések:

A "pulse-chase" során az ApoB41 2 h-nál még nem jelent meg a médiumban, azonban az ApoB27.6 igen, bár kis mennyiségben. A $\cong 80$ kD ko-precipitált fehérje valószínűleg intracelluláris degradációs termék lehetett. A transzfektált COS sejtek immunfluoreszcens festése a B41 és HMZ proteinek ER halmozódását jelezte, amely endoglikozidáz-H emésztés szenzitív maradt, megerősítve azt a megfigyelést, amely szerint a heterológ expresszált ApoB az ER-ban retineálódik és degradálódik. A COS sejtekből az RNS-t kivontuk, majd RT-PCR-val a "primer" A+B (intron 24), "primer" A+C (intron 24 +25) DNS szakaszokat elemeztük.

A HMZ esetében mindkét "primer"-rel nagyobb fragmenseket kaptunk (+ 60 bp), igazolva azt, hogy a "splicing" az intron 25-nél nem változik, másrészt az intron 24-nél "cryptic splice site" aktiváció történt. Az RT-PCR B41 és HMZ szakaszait re-klónoztuk pBluescript vektorba és szekvenáltuk (20 - 20 klón). A HMZ esetében az intron 24-nél a "cryptic donor splice site" helye a + 40 pozícióban volt. Ez azt jelentette, hogy a mutáns ApoB27.6 C-terminális 29 aminosava az eredeti szekvenciától eltér addig a helyig, ahol az "in-frame" STOP-transzlációs szignál az átírás folyamata el nem éri.

Kye-Doolittle analízissel megállapítható volt, hogy az így létrejött új peptid a normál, kifejezetten hidrofób ApoB-vel ellentétben inkább neutrális természetű.

Az ApoB27.6-ot ko-expresszáltuk MTP-vel COS sejtekben, mivel az ApoB26-nál nagyobb ApoB mutánsok szekréciója MTP-t igényel e sejt kultúrában.

A "pulse-chase" analízis azt mutatta, hogy az ApoB27.6 szekréciója $5 \pm 2\%$ vs. $26 \pm 5\%$ volt MTP nélkül, ill. MTP-vel. Az oleát az ApoB27.6 szekrécióját nem fokozta szignifikánsan.

Cézium-klorid denzitás centrifugát használva, az ApoB27.6 az 1.16 - 1.25 g/ml régióban (HDL) helyezkedett el.

Vizsgálati eredményeinket a következőkben összegezhetjük:

1. Az általunk ApoB mRNS "processing" mutációkra kifejlesztett módszerrel igazoltuk, hogy az eddig legkisebb, plazmában detektálható, homozigóta FHBL-t okozó ApoB27.6 mutáns létrejöttének hátterében az intron 24 + 40 pozícióban lévő "cryptic splice site" aktivációja áll, amelyet az intron 24 + 2 T→C tranzíció tesz lehetővé.
2. A mutáns és kontroll intron 24-25-öt tartalmazó ApoB41 minigénnel transfektált COS sejtek ApoB27.6, ill. B41 proteint szekretáltak, amit MTP ko-expressziója növelt, oleát hozzáadása azonban nem.
3. Az intron 24 "cryptic splice site" aktiváció az intronon belül az "in-frame" STOP-codon-ig átírást tesz lehetővé, ennek eredménye az ApoB27.6 C-terminális 29 új aminosav szekvenciája, amely az eredeti ApoB molekulával ellentétben nem hidrofób, hanem neutrális.

Irodalom:

1. Shore, V.G., Shore B.: Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry*. 1973;12:502-507.
2. Mahley, R.W., Rall, S.C. Jr.: Type III hyperlipoproteinemia (dyslipoproteinemia): the role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th ed. New York, McGraw-Hill. pp. 1195-1213.
3. Linton, M.F. Gish, R. et al.: Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation. *J Clin Invest*, 1991;88:270-281.
4. Zannis, V.I., VanderSpek, J. et al.: Intracellular modifications of human apolipoprotein E. *J Biol Chem*, 1986;261:13415-13421.
5. Weisgraber, K.H., Rall, S.C. et al.: Human apolipoprotein E - determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J Biol Chem*, 1986;261:2068-2076.
6. Westerlund, J.A., Weisgraber, K.H. Discrete carboxy-terminal segments of apolipoprotein E mediate lipoprotein association and protein oligomerization. *J. Biol Chem*, 1993;268:15745-15750.
7. Windler, E., Chao, Y.S. et al.: Regulation of the hepatic uptake of triglycerid-rich lipoproteins in the rat. *J Biol Chem*, 1980;255:8303-8307.
8. Kowal, R.C., Herz, J. et al.: Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor - related protein. *J Biol Chem*, 1990;265:10771-10779.
9. Sehayek, E., Lewin-Velvet, U. et al.: Lipolysis exposes unreactive endogenous apolipoprotein E-3 in human and rat plasma very low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 1991;88:553-560.
10. Kowal, R.C., Herz, J. et al.: Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Biochem J*, 1989;86:5810-5814.
11. Demant, T., Bedford, D. et al.: Influence of apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein B-100 metabolism in normolipidemic subjects. *J Clin Invest*, 1991;88:1490-1501.

12. Inneraty, T.L., Mahley, R.W. et al.: Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. *Biochem J*, 1978;17:1440-1447.
13. Mahley, R.W., Weisgraber, K.H. et al.: Intravenous infusion of apolipoprotein E accelerates clearance of plasma lipoproteins in rabbit. *J Clin Invest*, 1989;86:2125-2130.
14. Shimano, H., Yamada, N. et al.: Plasma lipoprotein metabolism in transgenic mice overexpressing apolipoprotein E. *J Clin Invest*, 1992;90:2084-2091.
15. Hamilton, R.L., Wong, J.S. et al.: Apoprotein E localization in rat hepatocytes by immunogold labeling of cryo-thin sections. *J Lip Res*, 1990;31:1589-1603.
16. Elshourbagy, N.A., Liao, W.S. et al.: Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985;82:203-207.
17. Fenjves, E.S., Gordon, D.A. et al.: Systemic distribution of apolipoprotein E secreted by grafts of epidermal keratinocytes: Implications for epidermal function and gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989;86:8803-8807.
18. Wyne, K.L., Schreiber, J.R. et al.: Rat granulosa cell apolipoprotein E secretion. *J Biol Chem*, 1989;264:16530-16536.
19. Reyland, M.E., Gwynne, J.T. et al.: Expression of the human apolipoprotein E gene suppresses steroidogenesis in mouse Y1 adrenal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991;88:2375-2379.
20. Dyer, C.A., Curtiss, L.K.: Apoprotein E-rich high density lipoproteins inhibit ovarian androgen synthesis. *J Biol Chem*, 1988;263:10965-10973.
21. Blue, M.L., Williams, D.L. et al.: Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland, and liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983;80:283-287.
22. Basu, S.K., Brown, M.S. et al.: Mouse macrophages synthesize and secrete a protein resembling apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981;78:7545-7549.
23. Basu, S.K., Goldstein, J.L. et al.: Independent pathways for secretion of cholesterol and apolipoprotein E by macrophages. *Science*, 1991;259:871-873.
24. Zannis, V.I., Just, P.W. et al.: Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet*, 1981;33:11-14.
25. Davignon, J., Gregg, R.E. et al.: Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1988;8:1-21.

26. Weisgraber, K.H., Mahley, R.W. Apoprotein (E-A-II) complex of human plasma lipoproteins. I. Characterization of this mixed disulfide and its identification in a high density lipoprotein subfraction. *J Biol Chem*, 1978;253:6281-6288.
27. Weisgraber, K.H. Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins:role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J Lipid Res*, 1990;31:1503-1511.
28. Weisgraber, K.H., Inneraty, T.L. et al.: Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem*, 1982;257:2518.
29. Havel, R.J., Yu-S, C. et al.: Isoprotein specificity in the hepatic uptake of apolipoprotein E and the pathogenesis of familial dysbetalipoproteinemia. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1980;77:4349-4345.
30. Gregg, R.E., Zech, L.A. et al.: Type III hyperlipoproteinemia: Defective metabolism of an abnormal apolipoprotein E. *Science*, 1981;211:584.
31. Boerwinkle, E., Utermann, G. Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B, and cholesterol metabolism. *Am J Hum Genet*, 1988;42:104-112.
32. Hallman, D.M., Boerwinkle, E. et al.: The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet*, 1991;49:338-349.
33. Ehnholm, C., Mahley, R.W. et al.: Role of apolipoprotein E in the lipolytic conversion of B-very low density lipoproteins to low density lipoproteins in type III hyperlipoproteinemia. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1984;81:5566-5570.
34. Chung, B.H., Segrest, J.P. Resistance of a very low density lipoprotein subpopulation from familial dysbetalipoproteinemia to in vitro lipolytic conversion to the low density lipoprotein density fraction. *J Lip Res*, 1983;24:1148-1159.
35. Gregg, R.E., Zech, L.A. et al.: Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans. *J Clin Invest*, 1986;78:815-821.
36. Utermann, G., Hardewig, A., et al.: Apolipoprotein E phenotypes in patients with myocardial infarction. *Hum Gen*, 1984;78:237-241.
37. Van Bockxmeer, F.M., Mamotte, C.S.S. Apolipoprotein ϵ 4 homozygosity in young men with coronary heart disease. *Lancet*, 1992;340:879-880.
38. Kuusi, T., Nieminen, M.S. et al.: Apoprotein E polymorphism and coronary artery diseases. *Arterioscler*, 1989;9:237-241.

39. Hixon, J.E. Apolipoprotein E polymorphisms affect atherosclerosis in young males. *Arterioscler Thromb*, 1991;11:1237-1244.
40. Schachter, F., Faure-Delanef, L. et al.: Genetic association with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nat Gen*, 1994;6:29-32.
41. Amouyel, P., Brousseau, T. et al.: Apolipoprotein E- ϵ 4 alleles and Alzheimer's disease. *Lancet*, 1993;342:1308-1309.
42. Ghiselli, G., Schaefer, E.J. et al.: Increased prevalence of apolipoprotein E4 in type V hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest*, 1992;70:474-477.
43. Stuyt, P.M.J., Stalenhoef, A.F.H., et al.: Hyperlipoproteinemia type V and apolipoprotein E4. *Lancet*, 1992;341:934.
44. Gofman, J.W., McGinley, R.L., et al.: Hyperlipoproteinemia. *Am J Med*, 1954;17:514-520.
45. Fredrickson, D.S., Levy, R.I. et al.: Fat transport in lipoproteins-an integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med*, 1967;267:34-44, 94-103, 148-156, 215-226, 273-281.
46. Havel, R.J., Kane, J.P. Primary dysbetalipoproteinemia: predominance of a specific apoprotein species in triglycerid-rich lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973;70:2015.
47. Utermann, G., Jaesch, M. et al.: Familial hyperlipoproteinemia type III: deficiency of apolipoprotein (apoE-III) in the very low-density lipoproteins. *FEBS Lett*, 1975;56:352-355.
48. Horie, Y., Fazio, S. et al.: The functional characteristics of a human apolipoprotein E variant (cysteine at residue 142) may explain its association with dominant expression of type III hyperlipoproteinemia. *J Biol Chem*, 1992;267:1962-1968.
49. Wilson, C., Wardell, M.A. et al.: Three-dimensional structure of the LDL-receptor binding domain of human apolipoprotein E. *Science*, 1991;252:1817-1822.
50. Mahley, R.W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 1988;240:622-630.
51. Dyer, C.A., Smith, R.S. et al.: Only multimers of a synthetic peptide of human apolipoprotein E are biologically active. *J Biol Chem*, 1991;266:15009-15015.
52. Fazio, S., Horie, Y. et al.: Preferential association of apolipoprotein E Leiden with very low density lipoproteins of human plasma. *J Lipid Res*, 1993;34:447-453.

53. Chappell, D.A. High receptor binding affinity of lipoproteins in atypical dysbetalipoproteinemia type III hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest*, 1989;84:1906-1915.
54. Stalenhoef, A.F.H., Malloy, M.J. et al.: Metabolism of apolipoproteins B-48 and B-100 of triglycerid-rich lipoproteins in patients with familial dysbetalipoproteinemia. *J Clin Invest*, 1986;78:722-728.
55. Ji Z.S., Fazio, S. et al.: Secretion-capture role for apolipoprotein E in remnant lipoprotein metabolism involving cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*, 1994;269:2764-2772.
56. Ji Z.S., Brecht, W.J. et al.: Role of heparin sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J Biol Chem*, 1993;268:10160-10167.
57. Marz, W., Peschke, B. et al.: Type III hyperlipoproteinemia acquired by liver transplantation. *Transplant*, 1993;55:284-288.
58. Bhatnagar, D., Durrington, P.N. Does measurement of apolipoproteins add to the clinical diagnosis and management of dyslipidaemias ? *Curr Opin Lipidol*, 1993;4:299-304.
59. Schaefer, E.J., Gregg, R.E. et al.: Familial apolipoprotein E deficiency. *J Clin Invest*, 1986;1206-1212.
60. Mabuchi, H., Itoh, H. et al.: A young type III hyperlipoproteinemic patient associated with apolipoprotein E deficiency. *Metabolism*, 1989;38:115-119.
61. Lohse, P., Brewer, III. et al.: Familial apolipoprotein E deficiency and type III hyperlipoproteinemia due to a premature stop codon in the apolipoprotein E gene. *J Lip Res*, 1992;33:1583-1590.
62. Plump, A.S., Smith, J.D. et al.: Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 1992;71:343-353.
63. Piedrahita, J.A., Zhang, S.H. et al.: Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992;89:4471-4475.
64. Nakashima, Y., Plump, A.S. et al.: ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*, 1994;14:133-140.

65. Avila, E.M., Holdsworth, G. et al.: Apoprotein E suppresses phytohemagglutinin-activated phospholipid turnover in peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem*, 1982;257:5900-5909.
66. Kelly, M.E., Clay, M.A. et al.: Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cell Immunol*, 1994;159:124-139.
67. Vogel, T., Guo, N. et al.: Apolipoprotein E: a potent inhibitor of endothelial and tumor cell proliferation. *J Cell Biochem*, 1994;54:299-308.
68. Linton, M.F., Atkinson, J.B. et al.: Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *Science*, 1995;267:1034-1037.
69. Bellosta, S., Mahley, R.W. et al.: Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice. *J Clin Invest*, 1995;96:2170-2179.
70. Simone, W.S., Bucay, N. et al.: A far-downstream hepatocyte-specific control region directs expression of the linked human apolipoprotein E and C-I genes in transgenic mice. *J Biol Chem*, 1993;268:8221-8229.
71. Roheim, P.S., Carey, M. et al.: Apolipoproteins in human cerebrospinal fluid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979;76:4646-4649.
72. Boyles, J.K., Pitas, R.E. et al.: Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest*, 1985;76:1501-1513.
73. Skene, J.H.P., Shooter, E.M. Denervated sheath cells secrete a new protein after nerve injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983;80:4169-4173.
74. Muller, H.W., Gebicke-Harter, P.J. et al.: A specific 37,000-Dalton protein that accumulates in regenerating but not in nonregenerating mammalian nerves. *Science*, 1985;228:499-501.
75. Ignatius, M.J., Harter Gebicke, P.J. et al.: Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986;83:1125-1129.
76. Snipes, G.J., McGuire, C.B. et al.: Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1986;83:1130-1134.
77. Boyles, J.K., Notterpek, L.M. et al.: Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. *J Biol Chem*, 1990;265:17805-17815.

78. Handelman, G.E., Boyles, J.K. et al.: Effects of apolipoprotein E, β -very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Lip Res*, 1992;33:1677-1688.
79. Popko, B., Goodrum, J.F. et al.: Nerve regeneration occurs in the absence of apolipoprotein E in mice. *J of Neurochem*, 1993;60:1155-1158.
80. Ashall, F., Goate, A.M. Role of the β -amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *TIBS*, 1994;19:42-46.
81. Levy, E., Carman, M.D. et al.: Mutation of the Alzheimer's Disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*, 1990;248:1124-1125.
82. Schellenberg, G.D., Pericak-Vance, M.A. et al.: Linkage analysis of familial Alzheimer disease, using chromosome 21 markers. *Am J Hum Genet*, 1991;48:563-583.
83. Pericak-Vance, M.A., Bebout, J.L. et al.: Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet*, 1991;48:1034-1050.
84. Namba, Y., Tomonaga, M. et al.: ApoE immunoreactivity in cerebral deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and Kuru amyloid in Creutzfeld-Jacob disease. *Brain Res*, 1991;541:163-166.
85. Wisniewski, T., Frangione, B. Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett*, 1992;135:235-238.
86. Strittmatter, W.J., Saunders, A.M. et al.: Apolipoprotein E: high-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1993;90:1-5.
87. Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H. et al.: Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid B peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci*, 1993;90:8098-8102.
88. Saunders, A.M., Strittmatter, W.J. et al.: Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurol*, 1993;43:146-172.
89. Saunders, A.M., Schmeider, K. et al.: Apolipoprotein E ϵ 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming disease. *Lancet*, 1993;342:710-711.
90. Corder, E.H., Saunders, A.M. et al.: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 1993,261:921-922.

91. Utermann, G. The apolipoprotein E connection. One particular variant of the polymorphic protein, apolipoprotein E appears to be a risk factor for Alzheimer's disease, possibly because it directly promotes amyloid formation. *Current Bio*, 1994;4:362-365.
92. Weisgraber, K.H., Roses, A.D. et al.: The role of apolipoprotein E in the nervous system. *Curr Opin in Lipidol*, 1994;5:110-116.
93. Smith, J.D., Trogan, E. et al.: Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage-clony-stimulating factor (op) and apolipoprotein-E. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1995;92:8264-8268.
94. Karathanasis, S.K, Zannis, V.I. et al.: Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-I gene. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1983;84:6147-6151.
95. Zannis, V.I., Karathanasis, S.K. et al.: Intracellular and extracellular processing of apolipoprotein A-I: secreted apolipoprotein A-I isoprotein 2 is a propeptide. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1983;80:2574-2578.
96. Beg, Z.H., Stonik, J.A. et al.: Human apolipoproteins A-I. Post-translational modification by covalent phosphorylation. *J Biol Chem*, 1989;264:6913-6921.
97. Tanaka, M., Ito, T. et al.: Properties of an acid cholesteryl ester hydrolase inhibitor from rat serum. *Lipids*, 1990;25:775-778.
98. DeLamarte, J.G., Sarpic, T.G. et al.: Metabolism of apoE-free high density lipoproteins in rat hepatoma cells: evidence for a retroendocytic pathway. *J Lipid Res*, 1990;31:191-202.
99. Nowicka, G., Bruning, T. et al. The macrophage interaction of HDL subclasses separated by free flow isotachopheresis. *J Lipid Res*, 1990;31:1947-1963.
100. Seifert, P.S., Kazatchrine, M.D. The complement system in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1988;73:91-104.
101. Betteridge, D. High density lipoprotein and coronary heart disease. *Br Med J*, 1989;298:807-974.
102. Yui, Y., Aoyama, T. et al.: Serum prostacyclin stabilizing factor is identical to apolipoprotein A-I (Apo A-I). A novel function of Apo A-I. *J Clin Invest*, 1988;82:803-807.
103. Deeb, S.S., Cheung, M.C. et al.: A mutation in the human apolipoprotein A-I gene. *J Biol Chem*, 1991;25:13654-13660.

104. Walsh, A., Ito Y. et al.: High levels of human ApoA-I in transgenic mice result in increased plasma levels of small HDL particles comparable to human HDL₃. *J Biol Chem*, 1989;264:6466-6494.
105. Smitz, G., Williamson, E. High-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and membrane protection. *Curr Opin Lipidol*, 1991;2:177-189.
106. Hunt, S.C., Hasstedt, S.J. et al.: Genetic heritability and common environmental components of resting and stressed blood pressures, lipids, and body mass index in Utah pedigrees and twins. *Am J Epidemiol*, 1989;129:625-638.
107. Miranda, H.L., Ordovas, J.M. et al.: Influence of mutation in human apolipoprotein A-1 gene promoter on plasma LDL cholesterol response to dietary fat. *Lancet*, 1994;343:1246-1249.
108. Assmann, G., Schmitz, G. et al.: Apolipoprotein A-I and HDL deficiency. *Curr Opin Lipidol*, 1990;1:110-115.
109. von Eckardstein, A., Funke, H. et al.: Apolipoprotein A-I variants: naturally occurring substitutions of proline residues affect the plasma concentration of apolipoprotein A-I. *J Clin Invest*, 1989;84:1722-1730.
110. Roma, P., Gregg, R.E. et al.: In vivo metabolism of a mutant form of apolipoprotein A-I, apo A-I_{Milano}, associated with familial hypoalphalipoproteinemia. *J Clin Invest*, 1993;91:1445-1452.
111. Nichols, W.C., Dwulet, F. et al.: Variant apolipoprotein A-I as a major constituent of a human hereditary amyloid. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988;156:762-768.
112. Soutar, A.K., Hawkins, P.N. et al.: Apolipoprotein AI mutation Arg-60 causes autosomal dominant amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992;89:7389-7393.
113. Tilly-Kiesi, M., Zhang, Q. et al.: ApoAI_{Helsinki} (Lys107→0) associated with reduced HDL cholesterol and LpA-I:A-II deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995;15:1294-1306.
114. Matsunaga, T., Hiasa Y. et al.: Apolipoprotein A-I deficiency due to a codon 84 nonsense mutation of the apolipoprotein A-I gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991;88:2793-2797.
115. Nakata, K., Kobayasi, K. et al.: Autosomal dominant hypoalphalipoproteinemia due to a completely defective apolipoprotein A-I gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993;196:950-955.

116. Funke, H., von Eckardstein, A. et al.: A frameshift mutation in the human apolipoprotein A-I gene causes high density lipoprotein deficiency, partial lecithin:cholesterol-acyltransferase deficiency, and corneal opacities. *J Clin Invest*, 1991;87:371-376.
117. Römling, R., von Eckardstein A. et al.: A nonsense mutation in the apolipoprotein A-I gene is associated with high-density lipoprotein deficiency and periorbital xanthelasmas. *Arterioscler Thromb*, 1994;14:1915-1922.
118. Ng, D.S., Leiter, L.A. et al.: Apolipoprotein A-I Q(-2)X causing isolated apolipoprotein A-I deficiency in a family with analphalipoproteinemia. *J Clin Invest*, 1994;93:223-229.
119. Takata, K., Saku, K. et al.: A new case of apoA-I deficiency showing codon 8 nonsense mutation of the apoA-I gene without evidence of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995;15:1866-1874.
120. Lackner, K.J., Dieplinger, H. et al.: High density lipoprotein deficiency with xanthomas: a defect in reverse cholesterol transport caused by a point mutation in the apolipoprotein A-I gene. *J Clin Invest*, 1993;92:2262-2273.
121. Ordovas, J.M., Cassidy, D.K. et al.: Familial apolipoprotein A-I, C-III, and A-IV deficiency and premature atherosclerosis due to deletion of a gene complex on chromosome 11. *J Biol Chem*, 1989;264:16339-16342.
122. Forte, T.M., Nichols, A.V. et al.: Familial apolipoprotein AI and apolipoprotein CIII deficiency. Subclass distribution, composition, and morphology of lipoproteins in a disorder associated with premature atherosclerosis. *J Clin Invest*, 1984;74:1601-1613.
123. Fidge, N., Nestel, P. et al.: Turnover of apolipoproteins A-I and A-II of high density lipoprotein and the relationship to other lipoproteins in normal and hyperlipidemic individuals. *Metabolism*, 1980;29:643-653.
124. Peacock, R.E., Hamsten, A. et al.: Associations of genotypes at the apolipoprotein AI-CIII-AIV, apolipoprotein B and lipoprotein lipase gene loci with coronary atherosclerosis and high density lipoprotein subclasses. *Clin Genetics*, 1994;46:273-282.
125. Smith, J.D., Brinton, E.A. et al.: Polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene promoter region. Association of the minor allele with decreased production rate in vivo and promoter activity in vitro. *J Clin Invest*, 1992;89:1796-1800.

126. Talmud, P.J., Ye, S. et al.: Polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein AI gene associated with differences in apolipoprotein AI levels: the European Atherosclerosis Research Study. *Genet Epidemiol*, 1994;11:265-280.
127. Saha, N., Tay, J.S.H. et al.: Guanidine to adenine (G/A) substitution in the promoter region of the apolipoprotein AI gene is associated with elevated serum apolipoprotein AI levels in Chinese non-smokers. *Genet Epidemiol*, 1994;11:255-264.
128. Barre, D.E., Guerra, R. et al.: Genetic analysis of a polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene promoter: effect on plasma HDL-cholesterol levels. *J Lipid Res*, 1994;35:1292-1296.
129. Minnich, A., DeLangavant, G. et al.: G→A substitution at position -75 of the apolipoprotein A-I gene promoter. *Arterioscler Thrombosis Vasc Biol*, 1995;15:1740-1745.
130. Akita, H., Chiba, H. et al.: Evaluation of G-to-A substitution in the apolipoprotein A-I gene promoter as a determinant of high-density lipoprotein cholesterol level in subjects with and without cholesterol ester transfer protein deficiency. *Hum Genet*, 1995;96:521-526.
131. Chan, L. Apolipoprotein B, the major protein component of triglyceride-rich and low density lipoproteins. *J Biol Chem*, 1992;267:25621-25624.
132. Yao, Z., McLeod, R.S. Synthesis and secretion of hepatic apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Biochem Biophys Acta*, 1994;1212:152-166.
133. Field, F.J., Mathur, S.N. Intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *Prog Lipid Res*, 1995;34:185-198.
134. Young, S.G. Recent progress in understanding apolipoprotein B. *Circulation*, 1990;82:1574-1594.
135. Huang, L.S., Ripps, M.E. et al. Apo B gene nonsense and splicing mutations in a compound heterozygote for familial hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res*, 1991;32:1341-1348.
136. Ross, R.S., Hoeg, J.M. et al.: Homozygous hypobetalipoproteinemia: transcriptional regulation and 5'-flanking sequence analysis in a apolipoprotein B deficiency state. *Biochim Biophys Acta*, 1989;1004:29-35.
137. Gabelli, C. The lipoprotein metabolism of apolipoprotein B mutants. *Curr Opinion Lipidol*, 1992;3:208-214.

138. Huang, L.S., Ripps, M.E. et al.: Hypobetalipoproteinemia due to an apolipoprotein B gene exon 21 deletion derived by Alu-Alu recombination. *J Biol Chem*, 1989;264:11394-11400.
139. Collins, D.R., Knott, T.J. et al.: Truncated variants of apolipoprotein B cause hypobetalipoproteinemia. *Nucleic Acids Res*, 1988;16:8361-8375.
140. Malloy, M.J., Kane, J.P. et al.: Normotriglyceridemic abetalipoproteinemia: absence of the B-100 apolipoprotein. *J Clin Invest*, 1981;67:1441-1450.
141. Young, S.G., Hubl, S.T. et al.: Hypobetalipoproteinemia caused by a mutation in the apolipoprotein B gene that results in a truncated species of apolipoprotein B (B-31). *J Clin Invest*, 1990;85:933-942.
142. Young, S.G., Peralta F.P. et al.: Lipoprotein B37, a naturally occurring lipoprotein containing the amino-terminal portion of apolipoprotein B100, does not bind to the apolipoprotein B,E (low density lipoprotein) receptor. *J Biol Chem*, 1987;262:16604-16611.
143. Hardman, D.A., Pullinger, C.R. et al.: Molecular and metabolic basis for the metabolic disorder: normotriglyceridemic abetalipoproteinemia. *J Clin Invest*, 1991;88:1772-1729.
144. Gabelli, C., Baggio, G. et al.: Identification of a new ApoB variant associated with hypobetalipoproteinemia. *Circulation*, 1989;80:(Suppl II):276.
145. Gregg, R.E., Wetterau, J.R. The molecular basis of abetalipoproteinemia. *Curr Opinion Lipidol*, 1994;5:81-86.
146. Rader D.J., Brewer, H.B. Jr. Abetalipoproteinemia: new insights into lipoprotein assembly and vitamin E metabolism from a rare genetic disease. *JAMA*, 1993;270:865-869.
147. Bassen, F.A., Kornzweig, A.L. Malformation of erythrocytes in a case of atypical retinitis pigmentosa. *Blood*, 1950;5:381-387.
148. Siemer, J.J., McCammon, R.E. Abetalipoproteinemia and hypobetalipoproteinemia within the same family (abstract). *Ann Clin Lab Sci*, 1973;3:308.
149. Linton, M.F., Farese, R.V. Jr. et al.: Familial hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res*, 1993;34:521-541.
150. Anderson, C.M., Townley, R.R.W. et al.: Unusual causes of steatorrhea in infancy and childhood. *Med J Aust*, 1961;11:617-621.

151. Roy, C.C., Levy, E. et al.: Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology*, 1987;92:390-399.
152. Wetterau, J.R., Zilversmit, D.B. Purification and characterization of microsomal triglyceride and cholesteryl ester transfer protein from bovine liver microsomes. *Chem Phys Lipids*, 1985;38:205-222.
153. Wetterau, J.R., Aggerbeck, L.P. et al.: Structural properties of the microsomal triglyceride-transfer protein complex. *Biochemistry*, 1991;30:4406-4412.
154. Wetterau, J.R., Combs, K.A. et al.: Protein disulfide isomerase is a component of the microsomal triglyceride transfer protein complex. *J Biol Chem*, 1990;265:9800-9807.
155. Wetterau, J.R., Combs, K.A. et al.: Protein disulfide isomerase appears necessary to maintain the catalytically active structure of the microsomal triglyceride transfer protein. *Biochemistry*, 1991;30:9728-9735.
156. Sharp, D., Blinderman, L. et al.: Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinemia. *Nature*, 1993;365:65-69.
157. Miettinen, T.A., Gylling, H. et al.: Serum cholesterol response to dietary cholesterol and apoprotein E phenotype. *Lancet*, 1988;2:1261.
158. Muscari, A., Bozzoli, C. et al.: Association of serum C3 levels with the risk of myocardial infarction. *Am J Med*, 1995;98:357-364.
159. Kramer, J., Rajczy, K. et al.: C4B*Q0 allotype as a risk factor for myocardial infarction. *Brit Med J*, 1994;309:313-314.
160. Cianflone, K., Roncari D.A.K. et al.: Adipsin/acylation stimulating protein system in human adipocytes: regulation of triacylglycerol synthesis. *Biochemistry*, 1994;33:9489-9495.
161. Nemeth, A., Dinya, E. et al.: A Gevilon-terápia hatása az apolipoprotein E polimorfizmus függvényében. *Orv Hetil*, 1994;135:735-741.
162. Nemeth, A., Szakmary, K. et al.: Apolipoprotein E and complement C3 polymorphism and their role in the response to gemfibrozil and low fat low cholesterol therapy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1995;33:799-804.
163. Tariot, P.N. Alzheimer's disease - an overview. *Alz Dis Assoc Dis*, 1994;Suppl 2:S4.

164. McKhann, G.: Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 1984;34:939.
165. Németh, A., Urbanics, K. et al.: Az Alzheimer-dementia molekuláris genetikai markerei. *Orv Hetil*, 1995;136:1931-1935.
166. Assmann, G., Schulte, H. PROCAM Study, Monograph. Zürich: Panscientia Verlag, 1986:87.I.
167. Castelli, W.P., Garrison, R.J. et al.: Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Study. *JAMA*, 1986;256:2835.
168. Németh, A., Pados, Gy. et al.: Apolipoprotein AI-mutációk vizsgálata alacsony plazma-HDL-koleszterin és apolipoprotein AI-szint esetén. *LAM*, 1997;7:324-329.
169. Patel, S.B., Grundy, S.M. Heterologous expression of apolipoprotein B carboxyl-terminal truncates: a model for the study of lipoprotein biogenesis. *J Lipid Res*, 1995;36:2090.
170. Talmud, P.J., Krul, E.S. et al.: Donor splice mutation generates a lipid-associated apolipoprotein B-27.6 in a patient with homozygous hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res*, 1994;35:468.
171. Nemeth-Slany, A., Talmud, P. et al.: Activation of a cryptic splice-site in intron 24 leads to the formation of apolipoprotein B27.6. *Atherosclerosis*, 1997. (accepted).