

Magdalena Chmara

Mutacje genów *LDLR* i *APOB*  
w hipercholesterolemii rodzinnej

(rozprawa doktorska)

Praca wykonana  
w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki AMG  
kierownik i promotor: prof. dr hab. n. med. Janusz Limon

**Gdańsk 2005**

Praca została w całości sfinansowana przez Ministerstwo Nauki  
i Informatyzacji, grant nr **3P05A 021 23**

**SPIS TREŚCI**

1. WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....	5
1.1. Wielkości fizyczne .....	5
1.2. Substancje chemiczne, roztwory, bufory .....	5
1.3. Geny i białka.....	6
1.4. Aminokwasy .....	6
1.5. Skrótory .....	6
2. STRESZCZENIE.....	8
2.1 Abstract.....	10
3. WSTĘP .....	12
3.1. Rola i regulacja syntezy cholesterolu w organizmie .....	12
3.2. Receptor LDL .....	13
3.2.1. Gen .....	13
3.2.2. Budowa receptora.....	15
3.2.3. Funkcja w organizmie .....	17
3.3. Apolipoproteina B-100.....	19
3.4. PCSK 9.....	20
3.5. Hipercholesterolemia rodzinna .....	21
3.5.1. Fenotyp hipercholesterolemii rodzinnej.....	21
3.5.2. Podłoże molekularne hipercholesterolemii rodzinnej .....	23
3.5.2.1. Mutacje genu <i>LDLR</i> .....	24
3.5.2.2. Mutacje genu <i>APOB</i> .....	27
3.5.2.3. Mutacje genu <i>PCSK9</i> .....	28
3.5.3. Zależność pomiędzy fenotypem a genotypem u pacjentów z hipercholesterolemią dziedziczną w sposób autosomalny dominujący.....	29
3.6. Kryteria rozpoznawania hipercholesterolemii rodzinnej.....	31
4. CELE PRACY .....	34

5. MATERIAŁY I METODY .....	35
5.1. Materiał.....	35
5.2. Metody.....	38
5.2.1. Aparatura .....	38
5.2.2. Odczynniki .....	39
5.2.3. Roztwory .....	41
5.2.4. Izolacja DNA z limfocytów krwi obwodowej .....	42
5.2.5. Ocena ilościowa i jakościowa wyizolowanego DNA.....	43
5.2.5. Badanie mutacji genów <i>LDLR</i> i <i>APOB</i> .....	43
5.2.5.1. Amplifikacja genów <i>LDLR</i> i <i>APOB</i> .....	43
5.2.5.2. Bezpośrednie sekwencjonowanie produktów PCR .....	47
5.2.6. Nomenklatura mutacji genu <i>LDLR</i> .....	48
5.2.7. Analiza statystyczna .....	49
6. WYNIKI .....	50
6.1. Wyniki analizy sekwencji genów <i>LDLR</i> i <i>APOB</i> .....	50
6.2. Porównanie rodzajów mutacji z poziomami poszczególnych frakcji cholesterolu w surowicy .....	59
7. DYSKUSJA.....	65
8. WNIOSKI .....	77
9. PIŚMIENNICTWO.....	78
10. ZAŁĄCZNIKI .....	93

## 1. WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

### 1.1. Wielkości fizyczne

kDa	tysiąc atomowych jednostek masy (ang. <i>kilo Dalton</i> )
U/ml	liczba jednostek międzynarodowych w mililitrze
M	mol
mM	milimol
ng	nanogram

### 1.2. Substancje chemiczne, roztwory, bufony

A	adenina
C	cytozyna
dATP	2'-deoksyadenozyno-5'-trójfosforan
dCTP	2'-deoksycytozyno-5'-trójfosforan
dGTP	2'-deoksyguanozyno-5'-trójfosforan
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
dNTP	deoksynukleotyd
ddNTP	dideoksynukleotyd
EDTA	kwask etylenodwuaminoczeroctowy
G	guanina
RBC	bufor lizujący erytrocyty
SDS	dodecylosiarczan sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
T	tymina
TBE	bufor Tris/kwask borny/EDTA
Tris	trójhydroksymetyloaminometan
U	uracyl

### 1.3. Geny i białka

APOB-100	apolipoproteina B-100
<i>APOB</i>	gen apolipoproteiny B
ACAT	acylotransferaza acylo-CoA
EGF	naskórkowy czynnik wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor</i> )
LDLR	receptor LDL
<i>LDLR</i>	gen receptora LDL
<i>PCSK9</i>	gen <i>proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>
NARC1	białko kodowane przez gen <i>PCSK9</i> (ang. <i>neural apoptosis-regulated convertase</i> )

### 1.4. Aminokwasy

Ala (A) – alanina	Arg (R) – arginina	Asn (N) – asparagina
Asp (D) – kwas asparaginowy	Cys (C) – cysterna	Gln (Q) – glutamina
Glu (E) – kwas glutaminowy	Gly (G) – glicyna	His (H) – histydyna
Ile (I) – izoleucyna	Leu (L) – Lucyna	Lys (K) – lizyna
Met (M) – metionina	Phe (F) – fenyloalanina	Pro (P) – pralina
Ser (S) – seryna	Thr (T) – treonina	Trp (W) – tryptofan
Tyr (Y) – tyrozyna	Val (V) – walina	

### 1.5. Skróty

bp	para zasad (ang. <i>base pair</i> )
kb	tysiąc par zasad (ang. <i>kilo base</i> )
ACAT	acylotransferaza acylo-CoA
AD	autosomalny dominujący sposób dziedziczenia
AR	autosomalny recesywny sposób dziedziczenia
CAD	choroba wieńcowa serca (ang. <i>coronary artery disease</i> )
CVD	choroby układu sercowo-naczyniowego (ang. <i>cardiovascular disease</i> )
del	delecja
F	starter sensowny (ang. <i>forward</i> )

FDB	rodzinny defekt apolipoproteiny B-100 (ang. <i>familial defective APOB</i> )
FH	hipercholesterolemia rodzinna (ang. <i>familial hipercholesterolemia</i> )
Fs	przesunięcie ramki odczytu (ang. <i>frameshift</i> )
HDL	lipoproteiny wysokiej gęstości; frakcja wysokocząstkowa cholesterolu (ang. <i>high density lipoproteins</i> )
HMG-CoA	3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA
ins	insercja
LDL	lipoproteiny niskiej gęstości; frakcja niskocząstkowa cholesterolu (ang. <i>low density lipoproteins</i> )
MLPA	ang. <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>polimerase chain reaction</i> )
R	starter antysensowny (ang. <i>reverse</i> )
SNP	polimorfizm (ang. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
UTR	region nie ulegający translacji (ang. <i>untranslated region</i> )
WT	brak mutacji (ang. <i>wild type</i> )
VLDL	lipoproteiny o bardzo małej gęstości (ang. <i>very low density lipoproteins</i> )
X	kodon <i>stop</i> (UGA, UAG, UAA)

## 2. STRESZCZENIE

Pacjenci z hipercholesterolemią rodzinną (FH) dziedziczną w sposób autosomalny dominujący (AD) charakteryzują się podwyższonym poziomem cholesterolu całkowitego oraz frakcji lipoprotein LDL w surowicy krwi, które współistnieją z prawidłowymi poziomami HDL, VLDL i trójglicerydów. Nadmiar cholesterolu gromadzi się w śródbłonku naczyń krwionośnych, co w konsekwencji prowadzi do przedwczesnej miażdżycy i choroby wieńcowej serca, a także innych chorób związanych z odkładaniem się złogów cholesterolu w tkankach. Dlatego też pacjenci z FH AD znajdują się w grupie o podwyższonym ryzyku związanym z chorobą wieńcową (CAD).

Na obecnym poziomie wiedzy można stwierdzić, że podłożem molekularnym FH AD (OMIM #143890) są mutacje genu receptora LDL (hipercholesterolemia, AD, typ IIA / FH), genu apolipoproteiny B-100 (hipercholesterolemia, AD, typ IIB / FDB) oraz genu *PCSK9* (hipercholesterolemia, AD, 3 / FH3). Częstość występowania heterozygot FH i FDB w większości populacji europejskich waha się od 1/500 – 1/1000 żywych urodzeń.

Celem przeprowadzonych badań było określenie częstości i rodzaju mutacji genów *LDLR* i *APOB* w grupie 96 probantów z objawami FH AD. Pacjenci zostali zakwalifikowani do badań na podstawie kryteriów klinicznych FH (WHO). DNA został wyizolowany z krwi obwodowej a następnie zamplifikowany przy użyciu techniki PCR. Produkty reakcji PCR zostały bezpośrednio zsekwencjonowane.

Badanie sekwencji genu *LDLR* obejmowało wszystkie eksony wraz z przylegającymi fragmentami intronów oraz sekwencją promotorową. Natomiast w przypadku genu *APOB* przeprowadzono wyłącznie analizę fragmentu eksonu 26, albowiem wszystkie dotąd poznane mutacje genu *APOB* prowadzące do FDB znajdują się w obrębie tego fragmentu.

Mutacje genu *LDLR* wykryto u 53 spośród 96 chorych (55%), natomiast mutację R3500Q genu *APOB* u 10 probantów. Najczęstszą mutacją genu *LDLR* była mutacja punktowa G571E w eksonie 12, która została wykryta u 14 probantów (14.6%). Większość znalezionych



mutacji została już opisana w literaturze, natomiast 16 spośród nich wykryto po raz pierwszy: E10K, D36N, C176W, W422R, S426P, V485M, N494N, A591A, N619N, FsS704, FsN745, intron 8: 1186+97 C>G, intron 9: 1359-3 del C, intron 10: 1586+12 C>T, intron 12: 1846-2 A>C, intron 15: 2312-71 G>A.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań stwierdzono, że polska populacja chorych na FH AD jest heterogenna genetycznie i posiada odmienne spektrum mutacji genu *LDLR* w porównaniu do innych populacji. Częstość występowania mutacji punktowych genu *LDLR* oraz genu *APOB* u chorych na FH AD w Polsce jest wysoka. Dlatego też, u polskich pacjentów z FH AD zasadne jest przeprowadzenie analizy molekularnej tych genów.

Pacjenci z mutacją genu *LDLR* mają istotnie wyższe poziomy cholesterolu całkowitego oraz LDL w surowicy krwi w porównaniu do chorych z mutacją genu *APOB*. Ryzyko wystąpienia choroby wieńcowej, określane stosunkiem poziomu cholesterolu LDL do HDL w surowicy, jest wyższe u osób z mutacjami genu *LDLR* w porównaniu do osób z mutacjami genu *APOB*.

Diagnostyka mutacji genów *LDLR* i *APOB* umożliwia objęcie rodzin z FH AD poradnictwem genetycznym oraz wczesną profilaktyką, co w znacznym stopniu może uchronić członków tych rodzin przed klinicznymi konsekwencjami hipercholesterolemii rodzinnej.

## 2.1 Abstract

Familial hypercholesterolemia (FH) is a clinical definition for a remarkable increase of cholesterol serum concentration, presence of xanthomas and premature coronary artery disease (CAD).

Autosomal dominant hypercholesterolemia can be caused by mutation in the low density lipoprotein receptor gene - LDLR (hypercholesterolemia, AD, type IIA / FH). Other forms of this disorder include type B hypercholesterolemia caused by ligand-defective apolipoprotein B-100 – APOB-100 (hypercholesterolemia, AD, type IIB / FDB), and FH3 (hypercholesterolemia, AD, 3 / FH3), caused by mutation in the PCSK9 gene. In the most European population the frequency of heterozygous form of FH and FDB disorders is about 1 in 500 to 1 in 1000 individuals.

The purpose of this study was to perform mutational analysis of LDLR and APOB genes in 96 unrelated FH patients. All patients were clinically diagnosed with definite or possible FH using a uniform protocol and internationally accepted WHO criteria. In this study, DNA was obtained from peripheral blood. Mutational analysis included all exons and the promoter sequence of the LDLR. Moreover, the fragment of APOB exon 26 was analyzed. All mentioned fragments were amplified by PCR and directly sequenced using ABI Prism 310 sequencer.

LDLR gene mutations were found in 53 cases (55%). The G571E mutation was the most frequent and was found in 14 cases (14.6%). Sixteen alterations of LDLR gene were not previously described. Ten cases (10.4%) demonstrated the R3500Q mutation of APOB gene.

According to performed studies it can be concluded that polish population is genetically heterogenic and spectrum of the LDLR mutations differs from other populations. Despite of the high frequency of LDLR point mutations in group of FH AD patients and possible coexistence of two different mutations in one patient the molecular analysis of the whole LDLR sequence is required. Additionally, APOB mutational analysis should be

performed because of high percentage of patients with alterations within this gene.

Patients with LDLR mutations have higher blood levels of total and LDL cholesterol compare to patients with APOB alterations. Moreover, risk of CAD incidents, described as a LDL/HDL ratio, is higher in group of the patients with LDLR mutations to those with APOB.

DNA-testing of FH and FDB enable to offer to the families with hypercholesterolemia a genetic consulting as well as adequate treatment, resulting in substantial reduction of the risk of the premature atherosclerotic complications.

## 3. WSTĘP

### 3.1. Rola i regulacja syntezy cholesterolu w organizmie

Cholesterol należy do związków tłuszczowych. Jego hydrofobowa cząsteczka stanowi ważny składnik błon komórkowych. Ponadto cholesterol jest prekursorem innych steroidów w organizmie człowieka (kortykosteroidy, hormony płciowe, kwasy żółciowe i witamina D) [81, 96]. W **tabeli nr 1** przedstawiono poziomy poszczególnych frakcji cholesterolu oznaczanych w surowicy. W rozdziale **Załączniki** znajduje się tabela przedstawiająca prawidłowe wartości poziomów frakcji cholesterolu w zależności od wieku i płci człowieka [www.jojogenetics.nl].

Ponad połowa znajdującego się w organizmie człowieka cholesterolu pochodzi z biosyntezy. Głównym miejscem syntezy jest wątroba, w znacznie mniejszym stopniu jelita i skóra. Natomiast pozostały cholesterol dostarczany jest wraz z pokarmami [81].

Regulacja syntezy cholesterolu zachodzi na początkowych etapach jego produkcji, poprzez mechanizm sprzężenia zwrotnego. Końcowy produkt szlaku metabolicznego – cholesterol, hamuje w wątrobie reduktazę HMG-CoA. Synteza cholesterolu kontrolowana jest także przez cholesterol LDL, który dostarczany jest do komórki poprzez receptory LDL.

Nadmiar cholesterolu komórkowego podlega estryfikacji. Powstające estry cholesterolu stanowią postać zapasową cholesterolu i są gromadzone w postaci kropeł tłuszczu w komórkach lub łącząc się z apolipoproteinami tworzą w wątrobie frakcje VLDL albo chylomikrony w jelicie.

Struktura cholesterolu nie pozwala na jego swobodne krążenie we krwi dlatego też jest transportowany w specjalnych cząsteczkach - lipoproteinach. Typowa lipoproteina składa się z rdzenia lipidowego (triacyloglicerole i estry cholesterolu), który otoczony jest pojedynczą warstwą powierzchniową złożoną z amfipatycznych cząsteczek fosfolipidów i cholesterolu. Białkową część lipoprotein stanowią apolipoproteiny, np.: APOB-100 lub APOE. Dwoma głównymi lipoproteinami w organizmie człowieka są LDL i HDL, z czego około 70% krążącego we krwi cholesterolu stanowi frakcja LDL [96].

**Tabela 1** Prawidłowe poziomy lipoprotein we krwi.

Lipoproteina	Wartość
Cholesterol całkowity	< 200 mg/dl
HDL dla mężczyzn	> 35 mg/dl
HDL dla kobiet	> 50 mg/dl
LDL	< 100 mg/dl
Trójglicerydy	< 200 mg/dl

### 3.2. Receptor LDL

#### 3.2.1. Gen

W 1970 roku, Brown i Goldstein odkryli fizjologiczne znaczenie receptora LDL na powierzchni hodowanych *in vitro* fibroblastów [12, 36]. W 1982 roku oczyszczono białko receptora, a w roku następnym sklonowano cDNA tego receptora [40].

Gen *LDLR* zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 19 (19p13.1-p13.3) [78]. Gen ten obejmuje ok. 45 kb i składa się z 18 eksonów. Transkrypt o długości 5.3 kb koduje białko składające się z 860 aminokwasów [108, 126].

Gen receptora LDL określanym jest jako tzw. *housekeeping gene*. W większości tkanek ulega on ciągłej ekspresji, a z jego transkryptów powstaje białko receptora. Transkrypcja regulowana jest na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego przez niektóre sterole. Elementy regulujące transkrypcję zlokalizowane są w regionie promotorowym genu. W przypadku genu *LDLR* sekwencja promotorowa obejmuje 177 par zasad (od -58 do -234) [110].

Ekson 1 genu *LDLR* koduje krótki fragment 5'UTR oraz sekwencję sygnałową składającą się z 21 hydrofobowych aminokwasów. Kolejne eksony, od 2 do 6, kodują siedem powtórzeń w domenie wiążącej ligand. Eksony, od 7 do 14, kodują domenę homologiczną do prekursora EGF. Sposób organizacji tych ośmiu eksonów jest nieomal identyczny do ułożenia eksonów w genie kodującym prekursor EGF [98]. Ekson 15 koduje domenę zawierającą cukry związane z białkiem wiązaniem O-glikozydowym. Ekson

16 oraz 5' fragment eksonu 17 kodują domenę transbłonową receptora, natomiast pozostała część eksonu 17 i 5' fragment eksonu 18 kodują domenę cytoplazmatyczną. Cechą charakterystyczną dla genu *LDLR* jest fakt, że duży fragment 3' eksonu 18 przepisany jest na mRNA (2.6 kb), ale nie ulega on translacji. Fragment ten zawiera dwie i pół kopii powtórzeń z rodziny *Alu* [126].

Wiele z eksonów genu receptora LDL wykazuje ewolucyjne podobieństwo do eksonów innych genów. Kodujące części genu wykazują wysoką homologię nie tylko do sekwencji genu prekursora EGF, ale również do genów kodujących czynniki krzepnięcia krwi, białka układu dopełniacza oraz wielu innych [90]. Niewątpliwie duże fragmenty genu *LDLR* powstały na drodze wymiany eksonów kodujących niekoniecznie związane ze sobą białka (tzw. *exon shuffling*). Te wspólne sekwencje możemy podzielić na trzy rodzaje.

- (I) – to sekwencja 40-aminokwasowych powtórzeń bogatych w cysteinę, znajdujących się zarówno w domenie wiążącej ligand receptora LDL, jak i w białkach układu dopełniacza.
- (II) – to powtórzenia ludzkiego czynnika wzrostu, które możemy znaleźć w domenie receptora LDL homologicznej do prekursora EGF, jak również w osoczowych czynnikach krzepnięcia krwi (np.: czynnik IX, czynnik X).
- (III) – to sześć 40-aminokwasowych powtórzeń typu YWTD. Tworzą one strukturę  $\beta$ -harmonijki. Powtórzenia YWTD można znaleźć w podobnych miejscach zarówno w receptorze LDL jak i w prekursorze EGF.

Wiele genów pełniących różne funkcje może zawierać jeden lub dwa rodzaje spośród trzech opisanych powyżej rodzajów sekwencji. Jednak tylko geny należące do rodziny receptora LDL (ang. *LDL receptor gene family*) posiadają wszystkie powyższe rodzaje sekwencji. Do chwili obecnej, opisano siedem głównych genów należących do rodziny LDL receptora: *LDLR* – gen receptora LDL, *VLDLR* – gen receptora VLDL, *APOER2* – gen receptora APOE typ 2, *MEGF7* – gen kodujący *multiple epidermal growth factor-like domains 7*, *LRP* – gen kodujący białko zbliżone do receptora LDL, *LRP1B* – gen kodujący białko zbliżone do receptora typ 2 oraz gen kodujący

megalinę. Wszystkie te geny kodują białka znajdujące się na powierzchni komórki, wiążące ligand i transportujące go do wnętrza komórki na drodze endocytozy zależnej od receptora (endocytoza adsorbcyjna).

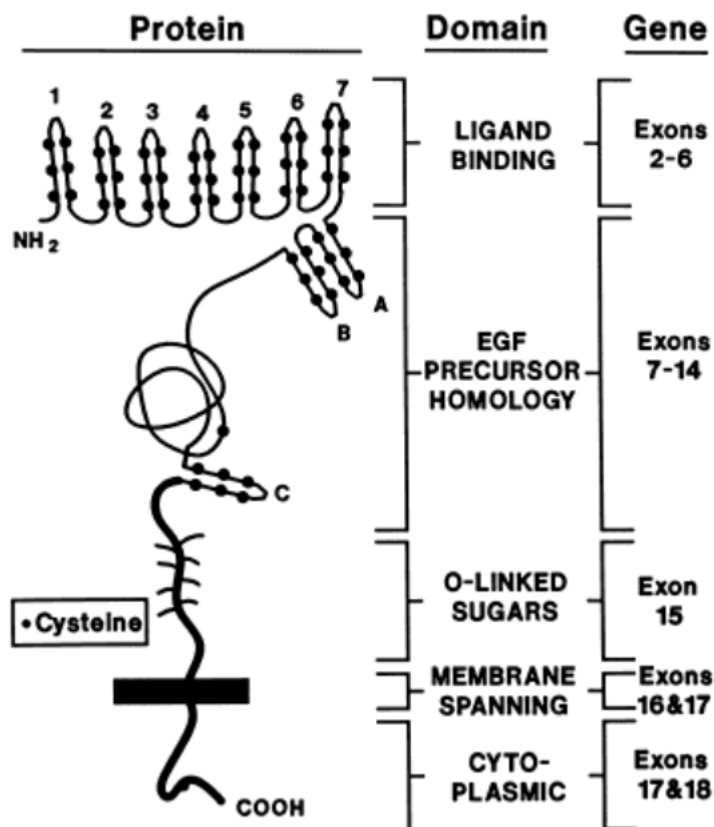
### 3.2.2. Budowa receptora

W dojrzałym białku receptora LDL (839 aminokwasów) wyróżnia się pięć domen: domenę wiążącą ligand, domenę homologiczną do prekursora EGF, domenę zawierającą cukry związane z białkiem wiązaniem O-glikozydowym, domenę transbłonową oraz cytoplazmatyczną.

Badania porównawcze receptora LDL pochodzącego z ośmiu gatunków (człowiek, krowa, królik, chomik, szczur, świnia, ropucha *Xenopus laevis* oraz rekin *Chiloscyllium plagiosum*) wykazały, że jest to białko wysoce konserwatywne. Obecna forma poszczególnych domen prawdopodobnie powstała ponad 450 milionów lat temu [40]. Najbardziej konserwatywnymi regionami receptora LDL są w kolejności: domena cytoplazmatyczna, homologiczna do prekursora EGF oraz wiążąca ligand. Natomiast regionami wykazującymi najmniejsze podobieństwo między badanymi gatunkami to sekwencja sygnałowa oraz domena zawierająca O-cukry [82, 83].

Związek pomiędzy poszczególnymi eksonami genu *LDLR* a funkcjonalnymi domenami dojrzałego białka przedstawia **rycina nr 1** [50].

**Rycina 1** Schemat budowy receptora LDL. Związek pomiędzy domenami białka a eksonami [50].



Sekwencja sygnałowa białka receptora LDL zbudowana jest z 21 hydrofobowych aminokwasów, które w trakcie procesu dojrzewania białka zostają odcięte w reticulum endoplazmatycznym.

Domena receptora odpowiedzialna za wiązanie liganda zbudowana jest z 292 aminokwasów. Ta N-końcowa część dojrzałego białka składa się z siedmiu powtórzeń, z których każde zawiera sekwencję bogatą w cysteinę (ok. 40 reszt). Powtórzenia te wykazują silne podobieństwo do sekwencji ponad 100 innych białek, w tym białek układu dopełniacza [50]. Każde ze wspomnianych siedmiu powtórzeń zawiera sześć cystein, które tworzą trzy mostki dwusiarczkowe. Na C-końcu każdego z powtórzeń znajdują się silnie konserwowane, ujemnie naładowane aminokwasy Asp-x-Ser-Asp-Glu (DxSDE). Poszczególne powtórzenia kodowane są przez pojedyncze



eksony. Wyjątek stanowią powtórzenia 3, 4 i 5 kodowane wspólnie przez ekson 4 [108].

Każdy z eksonów 2 – 6 kodujących te siedem powtórzeń, składa się z liczby nukleotydów będącą wielokrotnością liczby aminokwasów. Dlatego też gdy delecji ulegnie cała sekwencja jednego spośród eksonów 2 – 6, ramka odczytu nowopowstałego transkryptu pozostaje nienaruszona. Analiza delecji poprzez mutagenezę *in vitro* wykazała, że każde z siedmiu powtórzeń w domenie wiążącej ma niezależny wkład w wiązanie ligandu [29, 99].

Kolejna domena o długości 400 aminokwasów jest w 33% homologiczna do fragmentu ludzkiego prekursora czynnika wzrostu (EGF) [108, 109]. Domena ta zawiera trzy 40-aminokwasowe powtórzenia bogate w cysteinę, które odpowiadają sekwencji EGF. Różnią się one jednak od sekwencji bogatych w cysteinę obecnych w obrębie domeny wiążącej ligand brakiem sekwencji DxSDE [109]. Domena homologiczna do prekursora EGF potrzebna jest do odłączania lipoprotein od receptora LDL w kwaśnym środowisku endosomów oraz powrotu receptorów na powierzchnię komórki [22]. Ponadto, pomaga utrzymać domenę wiążącą ligand w odpowiedniej pozycji, tak aby N-końcowa część receptora była dostępna dla liganda [22].

Trzecia domena o długości 58 aminokwasów jest bogata w serynę i treoninę oraz zawiera cukry związane z białkiem wiązaniem O-glikozydowym. Funkcja tych cukrów nie jest do końca poznana, ale wydaje się, iż mogą one funkcjonować jako „podpórki” stabilizujące receptor [21, 68].

Czwarta domena zawiera 22 reszty hydrofobowe i tkwi w błonie komórkowej zakotwicząc w niej receptor [40].

Domena piąta jest zbudowana z 50 reszt aminokwasowych tworzących domenę cytoplazmatyczną receptora. Domena ta odgrywa ważną rolę w kierowaniu receptorów na powierzchni komórki w kierunku dołków opłaszczonych [25]. Ponadto, kontroluje interakcje receptora z dołkami opłaszczonymi, uczestniczącymi w endocytozie [127].

### 3.2.3. Funkcja w organizmie

Receptor LDL to glikoproteina przezbłonowa złożona z 839 aminokwasów połączonych z oligocukrami. Dwa łańcuchy oligocukrów

połączone są z białkiem wiązaniem N-glikozydowym a osiemnaście wiązaniem O-glikozydowym [20, 100]. Receptor LDL może wiązać się z dwoma ligandami: białkiem APOB-100 wchodzącym w skład cząsteczek LDL oraz białkiem APOE będącym częścią cząsteczek VLDL. Uważa się, że cząsteczki LDL transportują 75% cholesterolu. Około 70% tych cząsteczek wychwytywanych jest z osocza przez receptory LDL znajdujące się na powierzchni hepatocytów. Zatem wiązanie i transport cholesterolu poprzez receptory LDL odgrywa bardzo ważną rolę w metabolizmie lipoprotein [25].

Białko receptora LDL syntetyzowane jest w rybosomach zlokalizowanych na powierzchni błon reticulum endoplazmatycznego. Do prekursora receptora dołączane są niedojrzałe łańcuchy O-cukrów [20]. Na tym etapie masa receptora wynosi 120 kDa [49, 115]. Następnie, po przetransportowaniu białka z szorstkiego reticulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego, niedojrzałe łańcuchy O-cukrów wydłużane są do ich ostatecznej długości. Masa molekularna receptora w przeciągu 30 minut zwiększa się do 160 kDa [115]. Zmiana masy związana jest zarówno z przebudową oligocukrów (N- i O-) jak i zmianą konformacji białka, będącą konsekwencją wydłużenia łańcuchów oligocukrów połączonych wiązaniem O-glikozydowym [20, 21].

Po 45 minutach od momentu syntezy, dojrzały receptor LDL pojawia się na powierzchni błony komórkowej. Receptory LDL znajdują się na powierzchni komórek w dołkach opłaszczonych klatryną [12, 38]. Jest to jedyne miejsce, w którym receptor może oddziaływać z ligandem. W ciągu 3 – 5 minut receptor wraz z ligandem na drodze endocytozy jest w całości transportowany do wnętrza komórki [39]. Klatryna bardzo szybko oddysocjowuje a pęcherzyki endocytowe łączą się ze sobą tworząc endosom. W endosomach pH spada poniżej 6.5 i cząsteczka LDL oddysocjowuje od receptora, który wraca na powierzchnię komórki. Jeden cykl endocytozy trwa około 10 minut i jest powtarzany niezależnie od tego czy LDLR zwiąże się z kolejną lipoproteina czy też nie [4, 11].

Endosomy zawierające LDL, który został oddysocjowany od receptora, łączą się z lizosomami. W ich wnętrzu cząsteczki LDL są rozkładane, obejmuje to zarówno hydrolizę APOB-100 jak i estrów

cholesterolu [36, 37]. Cholesterol przemieszczany jest następnie do cytozolu komórki. Ten napływ cholesterolu do komórki hamuje aktywność reduktazy HMG-CoA i syntezę cholesterolu oraz pobudza aktywność ACAT [10, 81].

Wydaje się, że liczba LDLR na powierzchni komórki jest regulowana zgodnie z zapotrzebowaniem komórki na cholesterol [81].

### **3.3. Apolipoproteina B-100**

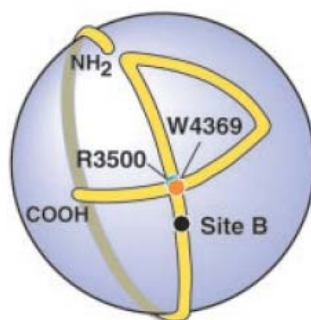
Gen kodujący apolipoproteinę B zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 2 (2p24) [72]. Obejmuje on około 43 kb i zawiera 29 eksonów. W osoczu stwierdza się obecność dwóch form apolipoproteiny B: APOB-48 oraz APOB-100. Apolipoproteina B-48 znajduje się w chylomikronach. Natomiast apolipoproteina B-100 współtworzy aterogenną cząstkę lipoproteiny LDL oraz wchodzi w skład VLDL. Oba białka powstają na matrycy genu *APOB*, w wyniku alternatywnego składania (ang. *splicing*). APOB-48 syntetyzowana jest w jelicie natomiast APOB-100 w wątrobie. Potranskrypcyjna obróbka mRNA w przypadku apolipoproteiny B polega na tkankowo-specyficznym wprowadzeniu kodonu *stop* w pozycji 2153 [17]. Na drodze miejscowo-specyficznej deaminacji cytozyna zostaje przekształcona w uracyl, a kodon CAA zostaje zamieniony na kodon *stop* - UAA. Proces ten zachodzi w jelitach, a skróconym produktem białkowym jest APOB-48. APOB-48 na całej swojej długości jest homologiczna do N-końca APOB-100. Natomiast C-koniec APOB-48 znajduje się nieopodal reszty 2151 APOB-100 [53]. Zatem apolipoproteina B-48 nie zawiera domeny wiązanej przez receptor LDL i w związku z tym nie jest dla niego ligandem.

APOB-100 jest najdłuższym z dotychczas poznanych pojedynczych łańcuchów polipeptydowych i składa się z 4536 aminokwasów. Masa cząsteczkowa APOB-100 to około 550 kDa [17, 62]. Wiele uwagi poświęcono dokładnemu poznaniu mechanizmu oddziaływań pomiędzy receptorem LDL a apolipoproteiną B-100. Jakkolwiek udało się bardzo dokładnie sprecyzować strukturalne i funkcjonalne domeny receptora LDL o tyle dużo trudniej było zidentyfikować domenę wiążącą receptor w APOB-100. Przyczyną tych trudności było kilka czynników: po pierwsze, apolipoproteina B-100 jest

bardzo dużym białkiem nierozpuszczalnym w roztworach wodnych; po drugie, zdolność apolipoproteiny B-100 do wiązania się z receptorem nie zależy wyłącznie od sekwencji aminokwasów, ale również od konformacji. Ponadto APOB-100 wiąże się z receptorem tylko w bogatych w cholesterol cząsteczkach LDL, które powstają po hydrolizie bogatych w trójglicerydy cząsteczek VLDL.

Wyniki badań Chattertona i wsp. [15] z użyciem mikroskopii immunoelektronowej wykazały, że początkowy odcinek łańcucha (89%) apolipoproteiny B-100 jak pasek owija się wokół cząsteczki LDL, natomiast pozostałe 11% C-końca krzyżuje się z paskiem w ten sposób, że znajduje się w bliskim sąsiedztwie kodonu 3500. Boren i wsp. w 2001 roku ostatecznie udowodnili, że do prawidłowej konformacji przestrzennej APOB-100 konieczne jest oddziaływanie argininy w kodonie 3500 z tryptofanem w pozycji 4369 (**ryc. nr 2**) [8, 9].

**Rycina 2** Prawidłowa konformacja białka APOB-100 w cząsteczce LDL [9].



R3500 – arginina w pozycji 3500, W4369 – tryptofan w pozycji 4369, *Site B* – aminokwasy 3359-3369 w miejscu wiązania receptora LDL.

### 3.4. PCSK 9

Abifadel i wsp. w 2003 roku zmapowali region na chromosomie 1p34.1-p32, który pozytywnie segregował z hipercholesterolemią dziedziczną w sposób autosomalny dominujący [2, 52, 121]. Wśród 41

genów położonych w tym regionie do dalszych badań został wybrany gen *PCSK9* (1p32) (*proprotein convertase subtilisin kexin 9*).

Gen *PCSK9* zbudowany jest z 12 eksonów (ok. 22 kb) i koduje białko znane jako NARC1 (ang. *neural apoptosis-regulated convertase*) [2]. Białko to syntetyzowane jest w postaci rozpuszczalnego zymogenu, który w reticulum endoplamatycznym ulega autokatalicznemu cięciu. Do tej pory proproteina *PCSK9* to jedyny poznany substrat dla tego enzymu [89].

Proproteina *PCSK9* jest członkiem rodziny proteaz serynowych i wykazuje dużą homologię do proteiny K [105]. Największą ekspresję genu *PCSK9*, podobnie jak innych genów związanych z biosyntezą cholesterolu, obserwuje się w wątrobie i jelicie [105]. Wysoki poziom ekspresji tego genu obserwuje się także w proliferujących komórkach [105] co może wskazywać, że gen ten jest zaangażowany w biosyntezę cholesterolu. Co więcej, po częściowej hepatektomii pojawia się podwyższona ekspresja tego genu, w podobnym stopniu jak apolipoproteiny B [105]. Wyniki badań Dubuc i wsp. pokazują, że gen *PCSK9* jest regulowany w sposób typowy dla genów „cholesterogennych” [26]. Powyżej opisane obserwacje wskazują, że gen *PCSK9* pełni istotną rolę w utrzymywaniu homeostazy cholesterolu w organizmie.

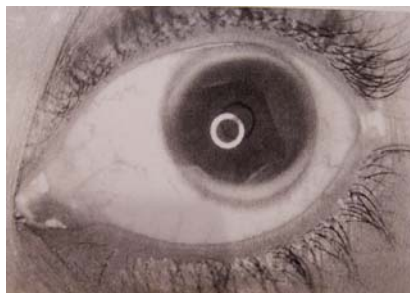
### **3.5. Hipercholesterolemia rodzinna**

#### **3.5.1. Fenotyp hipercholesterolemii rodzinnej**

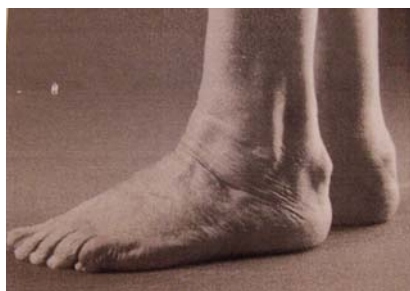
Rozpoznanie kliniczne rodzinnej hipercholesterolemii oparte jest na wynikach badań biochemicznych i fizykalnych pacjentów oraz na wywiadzie rodzinnym. Podstawowym parametrem biochemicznym charakterystycznym dla hipercholesterolemii rodzinnej jest podwyższone stężenie cholesterolu całkowitego i cholesterolu we frakcji lipoprotein LDL (powyżej 95 centyla), współistniejące z prawidłowymi poziomami HDL, VLDL i trójglicerydów. Poziom cholesterolu całkowitego u heterozygot waha się od 200 do 500 mg/dl, a u homozygot od 600 do 1000 mg/dl [40, 60]. Nadmiar cholesterolu gromadzi się w śródbłonku naczyń krwionośnych, co w konsekwencji prowadzi do przedwczesnej miażdżycy i choroby

wieńcowej serca, a także innych chorób związanych z odkładaniem się złogów cholesterolu w tkankach. Podwyższone poziomy cholesterolu LDL często mogą być również przyczyną odkładania się cholesterolu w postaci żółtaków (ang. *xanthomas*) ścięgien Achillesa, dłoni i stóp, a także w mniejszym stopniu kolan i łokci (**ryc. nr 3**). Mogą również pojawić się żółtaki (ang. *xanthelasmas*) powiek oraz rąbek rogówkowy (**ryc. nr 4, 5**). Zmiany te w przeciwieństwie do *xanthomas* nie są jednak zmianami patognomicznymi dla hipercholesterolemii i mogą również występować u osób z prawidłowymi poziomami lipidów, w szczególności u osób starszych [30, 40].

**Rycina 3** Rąbek rogówkowy (*arcus cornealis*) [1].



**Rycina 4** Żółtaki ścięgien [1].



**Rycina 5** Żółtaki powieki [1].



Pacjenci z hipercholesterolemią rodzinną znajdują się w grupie o podwyższonym ryzyku związanym z chorobą wieńcową (CAD). U ponad połowy pacjentów heterozygotycznych objawy CAD pojawiają się przed 55 rokiem życia [48], a śmiertelność może sięgać 50%, szczególnie wśród nieleczonych osób [103]. W przypadku nieleczonych mężczyzn z hipercholesterolemią rodzinną u 75% spośród nich objawy CAD pojawiają się przed 60 rokiem życia [7, 103, 104]. Co więcej, śmiertelność z powodu CAD u pacjentów z FH pomiędzy 20 a 39 rokiem życia jest kilkakrotnie razy większa w porównaniu z osobami zdrowymi z tej samej grupy wiekowej [104].

Obecnie dostępne na rynku środki farmakologiczne (statyny, wymienniki jonowe) pozwalają skutecznie zapobiegać, a nawet niwelować kliniczne konsekwencje tej choroby. Zgodnie z zaleceniami WHO [30] leczenie powinno być włączane jak najwcześniej, gdyż im szybciej jest rozpoczęte, tym w większym stopniu może uchronić pacjentów przed klinicznymi konsekwencjami hipercholesterolemii rodzinnej.

### **3.5.2. Podłoże molekularne hipercholesterolemii rodzinnej**

Obecnie ocenia się, że około 250 mln ludzi na całym świecie zagrożonych jest przedwczesną miażdżycą i zgonem w bardzo młodym wieku z powodu uwarunkowanych genetycznie zaburzeń lipidowych [30]. Choroba wieńcowa jest najczęstszą przyczyną zgonów w Polsce. Jedną z lepiej poznanych jednostek chorobowych uwarunkowanych genetycznie, prowadzących do choroby wieńcowej to hipercholesterolemia dziedziczna w sposób autosomalny dominujący.

Związek pomiędzy żółtakami ścięgien a obecnością zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych opisywany był już przed rokiem 1900 [40]. W 1939 roku Muller i Thannhauser opisali rodzinne występowanie schorzenia układu sercowo-naczyniowego w połączeniu z występowaniem żółtaków i podwyższonego poziomu cholesterolu w surowicy krwi [40]. Ich przypuszczenia na temat uwarunkowań genetycznych hipercholesterolemii zostały potwierdzone w latach czterdziestych i pięćdziesiątych przez innych autorów. Jednak dopiero badania

Khachadurian w latach sześćdziesiątych wyłoniły kliniczne różnice pomiędzy hetero- a homozygotami [59]. Obserwacje te stanowiły pierwszy niepodważalny dowód, że choroba ta dziedziczona jest w sposób jednogenowy.

W latach siedemdziesiątych Brown i Goldstein odkryli receptor LDL w hodowanych *in vitro* fibroblastach oraz udowodnili, że mutacje genu tego receptora prowadzą do hipercholesterolemii rodzinnej. Za to odkrycie otrzymali nagrodę Nobla w roku 1985.

Pod koniec lat osiemdziesiątych odkryto, że fenotyp kliniczny hipercholesterolemii rodzinnej może być także spowodowany mutacjami genu *APOB*. Chorobę tę nazwano rodzinnym defektem apolipoproteiny B-100 (FDB) [54, 106].

Wyniki badań z kilku ostatnich lat umożliwiły identyfikację trzeciego genu związanego z hipercholesterolemią dziedziczną w sposób autosomalny dominujący. Gen ten nosi nazwę *PCSK9*.

Na obecnym poziomie wiedzy można stwierdzić, że rodzinna hipercholesterolemia (FH) (OMIM #143890) to choroba jednogenowa o autosomalnym dominującym (AD) sposobie dziedziczenia. Podłożem molekularnym FH AD są mutacje genu receptora LDL (hipercholesterolemia, AD, typ IIA / FH), genu apolipoproteiny B-100 (hipercholesterolemia, AD, typ IIB / FDB) oraz genu *PCSK9* (hipercholesterolemia, AD, 3 / FH3). Częstość występowania heterozygot FH i FDB w większości populacji europejskich waha się od 1/500 – 1/1000 żywych urodzeń.

### 3.5.2.1. Mutacje genu *LDLR*

Do chwili obecnej opisano ponad 800 różnych mutacji występujących w obrębie genu *LDLR*, które prowadzą do hipercholesterolemii rodzinnej ([www.ucl.ac.uk/fh/](http://www.ucl.ac.uk/fh/); [www.jojo genetics.nl](http://www.jojo genetics.nl/); [www.umd.necker.fr](http://www.umd.necker.fr/)). Mutacje rozmieszczone są na całej długości genu, aczkolwiek najwięcej mutacji opisano w eksonie 4. Wynika to częściowo z dużej wielkości tego eksonu, jak również z faktu, że mutacje w tym regionie związane są z silniejszymi objawami hipercholesterolemii przez co osoby ze wspomnianymi mutacjami stanowią duży procent diagnozowanych pacjentów



[43]. Większość z opisanych mutacji znajduje się w części kodującej genu. Zaledwie około 10% opisanych mutacji znajduje się w intronach i może wpływać na proces składania transkryptu. Zdecydowaną większość mutacji stanowią mutacje punktowe, małe insercje i delecje. Duże strukturalne rearanżacje w obrębie genu *LDLR* w większości populacji stanowią od 2 do 10% mutacji [51, 56 71]. Obecność mutacji w genie *LDLR* zaburza budowę i/lub funkcję receptorów LDL na powierzchni komórek wątrobowych, co prowadzi do obniżenia ich aktywności a w konsekwencji do nieprawidłowego metabolizmu cholesterolu LDL.

W zależności od efektu fenotypowego, jaki wywierają na białko mutacje genu *LDLR* można je podzielić na sześć głównych klas [25, 40].

Do klasy pierwszej należą mutacje typu *null*. Mutacje te zaburzają syntezę białka, w wyniku czego nie obserwuje się obecności receptora LDL na powierzchni komórek. Przyczyną molekularną mogą być bardzo różne mutacje zaczynając od mutacji punktowych, w wyniku których powstaje kodon *stop*, poprzez mutacje w regionie promotorowym genu, które blokują transkrypcję lub prowadzą do upośledzenia produkcji mRNA a kończąc na dużych delecjach, które uniemożliwiają prawidłowe tworzenie LDLR. Mutacje typu *null* wiążą się na ogół z bardzo wysokimi poziomami cholesterolu LDL w surowicy [25, 40].

Do klasy drugiej zaliczane są mutacje, w wyniku których nie obserwuje się obecności dojrzałego białka receptora lub powstające białko jest nieprawidłowe. Skrócone białko (w wyniku powstania kodonu *stop*) lub źle złożone (w wyniku mutacji w obrębie regionów bogatych w cysteinę prowadzące do pozostawienia niesparowanych reszt cysteinowych) zatrzymywane jest w obrębie reticulum endoplazmatycznego. W obrębie klasy drugiej wyróżnia się dwa podtypy: 2A i 2B. Jeśli dochodzi do całkowitego zablokowania transportu to mutacje takie zaliczamy do podklasy 2A. Klasa 2B obejmuje mutacje, w wyniku których produkt białkowy wydostaje się z reticulum endoplazmatycznego i dociera na powierzchnię komórki [25, 40].

Mutacje zaliczane do klasy trzeciej zlokalizowane są w obrębie domeny wiążącej receptora i upośledzają prawidłowy sposób interakcji receptora z ligandem [25, 40]. Mutacje te nie wpływają na poziom syntezy

białka, proces dojrzewania receptora oraz jego transport na powierzchnię komórki.

Mutacje należące do czwartej klasy zlokalizowane są w obrębie C-końca receptora LDL. Synteza, składanie, jak i transport na powierzchnię komórek tych uszkodzonych receptorów odbywa się bez zakłóceń. Receptory te jednak nie mogą prawidłowo skupiać się wokół dołków opłaszczonych (klasa 4A) lub po dotarciu na powierzchnię komórki są uwalniane (klasa 4B). Konsekwencją tych mutacji może być także brak internalizacji kompleksów receptor-ligand do wnętrza komórki [25, 40].

Piąta klasa mutacji powoduje powstanie receptorów, które albo nie mogą powracać na powierzchnię komórki po oddysocjowaniu ligandu albo ulegają degradacji w środowisku endosomów. Domeną, która odpowiada za prawidłowe odłączanie się receptora od liganda w kwaśnym środowisku endosomów jest domena homologiczna do prekursora EGF. Gdy dojdzie do delekcji całej tej domeny, receptor zostaje „uwięziony” w endosomie i ulega gwałtownej degradacji [25, 40].

Niedawno wyodrębniono nową, szóstą klasę mutacji występujących w obrębie domeny cytoplazmatycznej. Receptory, zmienione w wyniku tychże mutacji nie docierają do błony cytoplazmatycznej komórek wątroby i najprawdopodobniej ulegają szybkiej degradacji [25, 64].

Ze względu na bardzo dużą liczbę znalezionych mutacji w obrębie genu *LDLR* oraz fakt ciągłego wykrywania nowych mutacji, a także opisaną powyżej złożoną klasyfikację tych mutacji, jeszcze nie wszystkie dotychczas poznane mutacje zostały dokładnie scharakteryzowane. Ponieważ przewidywanie efektu danej mutacji nie jest proste, dużo łatwiej jest podzielić mutacje genu *LDLR* na dwie grupy. Do pierwszej grupy zalicza się mutacje powodujące zatrzymanie syntezy LDLR (ang. *receptor-negative*), natomiast do drugiej mutacje, które wpływają na zmianę aktywności receptorów (ang. *receptor-defective*) [25].

### 3.5.2.2. Mutacje genu *APOB*

W przeciwieństwie do opublikowanych licznych mutacji genu *LDLR*, do chwili obecnej poznano tylko siedem mutacji genu *APOB* związanych z rodzinnym defektem apolipoproteiny B-100 (FDB) [5, 9, 107]. Wszystkie mutacje zlokalizowane są w obrębie eksonu 26 genu *APOB*. Cztery z nich: R3500Q, R3500W, R3531 oraz R3480W zostały dokładnie zbadane i wiadomo, że zmieniają one konformację przestrzenną apolipoproteiny B-100 w cząsteczce LDL, a tym samym zaburzają prawidłową interakcję cząsteczki LDL z jej receptorem, co w konsekwencji zakłóca prawidłowy metabolizm cholesterolu LDL [8, 9]. Jako pierwsza została opisana mutacja R3500Q. Jest to tranzycja guaniny na adeninę w pozycji 10 708, co powoduje zamianę argininy w kodonie 3500 białka na glutaminę [80, 88]. Jest to najczęstsza mutacja w populacji kaukaskiej. Badania haplotypu genu *APOB* wskazują, że mutacja ta pochodzi od wspólnego przodka, który żył w Europie około 6 750 lat temu [88]. Mutację tę wykrywa się u około 3-5% pacjentów z rozpoznaną hipercholesterolemią [118]. Arginina w kodonie 3500 może również ulec zamianie na tryptofan (R3500W) w wyniku tranzycji cytozyny na tyminę w pozycji 10 707. Częstsze występowanie tej mutacji w populacjach azjatyckich oraz badania haplotypu wskazują, że pochodzi ona właśnie z tamtych regionów [18, 111]. Natomiast kolejna mutacja R3531C prawdopodobnie pochodzi od celtyckiego przodka [80, 93]. Allel *APOB* z tą mutacją wykazuje trzykrotnie większą zdolność wiązania się z receptorem LDL niż z mutacją R3500Q [94]. Jednak niektórzy naukowcy wątpią w związek tej mutacji z hipercholesterolemią [95, 119]. Interesujący jest fakt, że żadna z powyższych mutacji nie jest zlokalizowana w obrębie obszaru wiążącego się z receptorem LDL (aminokwasy 3359-3369). Jednakże bardzo ważna dla prawidłowej konformacji APOB-100 jest interakcja pomiędzy arginina 3500 a tryptofanem 4369. Mutacje w tym kluczowym aminokwasie (R3500) powodują nieprawidłowe fałdowanie białka tym samym obniżając jego zdolność wiązania do receptora LDL [9]. W 2001 roku Boren opisał kolejną mutację apolipoproteiny B-100 związaną z FDB – R3480W [9]. Wszystkie opisane powyżej mutacje zlokalizowane są blisko siebie, na długości 51 aminokwasów i powodują utratę argininy.

Z badań Borena wynika także, że tryptofan w pozycji 4369 oddziałuje nie tylko z arginina w pozycji 3500, ale również z argininami w pozycji 3480 oraz 3531 [9]. Zatem wszystkie przedstawione mutacje według niego są jednoznacznie związane z nieprawidłowym wiązaniem do receptora LDL oraz hipercholesterolemią.

Ostatnio pojawiły się prace, które opisują kolejne mutacje genu *APOB* związane z FDB: T3492I, N3516K oraz H3543Y [5, 33, 107]. O ile dwie pierwsze z nich zostały znalezione tylko w pojedynczych rodzinach, to mutacja H3543Y według Soufi i wsp. występuje cztery razy częściej od mutacji R3500Q w niemieckiej populacji chorych [107].

### 3.5.2.3. Mutacje genu *PCSK9*

Ponieważ gen *PCSK9* został niedawno zidentyfikowany [2] niewiele jest danych na temat badań molekularnych tego genu u chorych z hipercholesterolemią. Do chwili obecnej opisano trzy mutacje tego genu, które uważa się za istotne dla rozwoju hipercholesterolemii: mutacje S127R i F216L zostały opisane u chorych pochodzenia francuskiego [2] a mutacja D374Y u pacjentów pochodzących z Utah [114] i Norwegii [76]. W ostatniej grupie opisano również pacjenta, u którego stwierdzono obecność dwóch mutacji: D374Y i N157K. Nie wiadomo jednak czy mutacje te są zlokalizowane na dwóch czy na tym samym allelu genu *PCSK9*. U wszystkich pacjentów z powyższymi mutacjami genu *PCSK9* poziomy lipidów są bardzo podobne jak w przypadku osób z mutacją genu *LDLR* czy *APOB*. Poziom cholesterolu LDL jest podwyższony 2-6 krotnie.

Obecnie uważa się, że mutacje genu *PCSK9* związane z hipercholesterolemią powodują wzrost aktywności tego białka. Aby zbadać czy mutacje powodujące utratę aktywności *PCSK9* mają przeciwny efekt Cohen i wsp. zbadali 128 osób z niskim poziomem cholesterolu LDL w surowicy krwi i w części kodującej genu znaleźli dwie mutacje typu *nonsense*: Y142X, C679X, które były związane z 40% obniżeniem cholesterolu LDL w surowicy krwi [19].

### 3.5.3. Zależność pomiędzy fenotypem a genotypem u pacjentów z hipercholesterolemią dziedziczną w sposób autosomalny dominujący

Hipercholesterolemia rodzinna charakteryzuje się dużymi różnicami w stopniu ekspresji objawów klinicznych. Różnice te dotyczą zarówno nasilenia objawów hipercholesterolemii, wieku pojawienia się objawów klinicznych, zaawansowania choroby wieńcowej jak i odpowiedzi na leczenie.

Do chwili obecnej przeprowadzono liczne badania, w których próbowano ustalić zależności pomiędzy określonymi mutacjami genu *LDLR* lub poszczególnymi klasami mutacji, a kliniczną ekspresją objawów choroby. Brane były pod uwagę takie parametry kliniczne jak: poziom cholesterolu całkowitego i LDL, czas pojawienia się i zaawansowanie choroby wieńcowej (CVD) oraz obecność charakterystycznych zmian wykrywanych w badaniu fizykalnym. Niestety często w badaniach tych grupy chorych były nieliczne. Ponadto chorzy znajdowali się pod opieką specjalistycznych klinik chorób zaburzeń lipidowych, a więc CVD była obecna już u większości pacjentów. Do chwili obecnej nie udało się ustalić dokładnych zależności pomiędzy różnymi mutacjami genu *LDLR*, poziomem lipidów, a ryzykiem wystąpienia przedwczesnej choroby wieńcowej.

Dotychczas opublikowane wyniki badań umożliwiają jednak wyciągnięcie następujących wniosków. Po pierwsze wydaje się, że rodzaj mutacji receptora LDL ma większe znaczenie w przypadku homozygot niż heterozygot. I tak na przykład średni poziom cholesterolu LDL u osób z heterozygotyczną mutacją *French Canadian-1* (delecja >15 kb) oraz *French Canadian-4* (mutacja punktowa typu *missense*, W66G) wynosi odpowiednio 324 mg/dl oraz 288 mg/dl. Porównując ten sam parametr biochemiczny u osób z homozygotyczną mutacją różnica poziomów LDL cholesterolu jest znaczna i wynosi odpowiednio 1068 mg/dl oraz 644 mg/dl [86].

Po drugie, heterozygoty z mutacją prowadzącą do całkowitej utraty aktywności receptora LDL, mają z reguły wyższy poziom cholesterolu LDL w porównaniu z osobami, u których stwierdzono mutację powodującą tylko zmniejszenie aktywności receptora [66].

Po trzecie, u pacjentów z tą samą mutacją genu *LDLR* i podobnymi poziomami cholesterolu LDL mogą w znacząco różnym okresie życia rozwinąć się objawy CVD [113]. Różnice te mogą być spowodowane zarówno czynnikami genetycznymi [6, 61], jak i środowiskowymi. Dowodem na to mogą być wyniki badań, w których porównywano poziomy cholesterolu LDL u Chińczyków z hipercholesterolemią, którzy zostali w kraju oraz członków ich rodzin, którzy wyemigrowali do Kanady. Wykazano, że osoby przebywające w Chinach miały znacznie niższe poziomy cholesterolu LDL. Co więcej, u osób zamieszkujących chińskie wsie nie obserwowano ani żółtaków, ani objawów przedwczesnej choroby wieńcowej. Objawy te natomiast pojawiały się u członków ich rodzin mieszkających w Kanadzie [92].

Z dotychczasowych wyników badań wynika, że objawy kliniczne rodzinnego defektu apolipoproteiny B-100 (FDB) zasadniczo nie różnią się od objawów FH [24, 85, 91]. Aczkolwiek, badania przeprowadzone przez Miserez i wsp. a także Pimstone i wsp. wykazały, że pacjenci z FDB mają łagodniejsze objawy kliniczne w porównaniu z pacjentami z FH [85, 91]. Stwierdzono również, że tylko część pacjentów z FDB w pełni spełnia kryteria rozpoznawania hipercholesterolemii rodzinnej [85], co powoduje, że często nie są oni klasyfikowani do badań molekularnych. Dlatego też, stosunek pacjentów z FH i FDB w badanych grupach chorych z klinicznymi objawami hipercholesterolemii rodzinnej nie jest równy 1:1 pomimo bardzo zbliżonej częstości występowania obu chorób w populacji.

Poziomy lipidów u pacjentów z mutacjami genu *PCSK9* są zbliżone do wartości obserwowanych u osób z mutacją w obrębie genu *LDLR* czy *APOB*.

Jak już wspomniano powyżej czynnikami wpływającymi na fenotyp pacjentów z hipercholesterolemią mogą być również oddziaływania innych genów związanych z metabolizmem lipidów, takich jak na przykład lipaza lipoproteinowa (*LPL*) i apolipoproteina E (*APOE*).

Gen *LPL* koduje enzym, który odgrywa kluczową rolę w metabolizmie trójglicerydów. Mutacje w obrębie genu *LPL* powodują obniżenie aktywności tego enzymu, co prowadzi do podwyższenia poziomu trójglicerydów w osoczu. Wykazano, że dwie mutacje genu *LPL*, D9N

oraz N291S, w znaczący sposób wpływają na poziom cholesterolu HDL oraz trójglicerydów zarówno u kobiet jak i u mężczyzn. Dodatkowo, w badaniach przeprowadzonych w grupie chorych z FH wykazano, że mutacje te istotnie podwyższają ryzyko wystąpienia choroby wieńcowej u tych pacjentów [58, 124, 125].

Kolejnym czynnikiem genetycznym wpływającym na fenotyp hipercholesterolemii jest genotyp apolipoproteiny E. Gen *APOE* występuje w trzech wariantach polimorficznych: E2, E3 i E4, które związane są z różnymi poziomami cholesterolu LDL oraz różnym ryzykiem wystąpienia choroby wieńcowej w ogólnej populacji. Nosiciele allelu E4 mają zwiększone ryzyko wystąpienia choroby wieńcowej niż osoby z allelami E2 lub E3 [27]. Ostatnio przeprowadzone badania w grupie 450 dzieci z FH wykazały, że wariant E4 *APOE* nie powoduje podwyższenia cholesterolu LDL. Obniża natomiast poziom cholesterolu HDL, co może wpływać na zwiększenie ryzyka wystąpienia choroby wieńcowej u tych pacjentów [55].

### **3.6. Kryteria rozpoznawania hipercholesterolemii rodzinnej**

Trzy niezależne ośrodki opracowały schematy rozpoznawania hipercholesterolemii rodzinnej (*MedPed Program* – Stany Zjednoczone, *The Simon Broome Register Group* – Wielka Brytania oraz *The Dutch Lipid Clinic Network* – Holandia) [3]. Schematy te zostały przedstawione w **tabelach nr 2-4**.

Kryteria opracowane przez *US MedPed Program* oparte są wyłącznie na poziomach cholesterolu całkowitego w surowicy krwi z uwzględnieniem wieku probanta oraz historii rodzinnej [3]. Na przykład: u pacjenta poniżej 20 roku życia, który ma krewnego drugiego stopnia z hipercholesterolemią rodzinną, zostanie postawione rozpoznanie FH, jeśli poziom cholesterolu w jego surowicy przekroczy wartość 5.9 mmol/l.

Kryteria opracowane przez *Simon Broome Register Group* oraz *The Dutch Lipid Clinic Network* są do siebie zbliżone. Diagnoza FH oparta jest zarówno na parametrach biochemicznych (poziom cholesterolu całkowitego), wywiadzie, historii rodzinnej jak i badaniach molekularnych

[3, 30]. W zależności od ilości uzyskanych przez probanta punktów rozpoznanie FH określone jest jako pewne lub prawdopodobne.

**Tabela 2** Kryteria rozpoznawania hipercholesterolemii rodzinnej opracowana przez ekspertów WHO (*The Dutch Lipid Clinic Network*).

<b>Wywiad rodzinny:</b>		
1. Krewni I° z przedwczesną chorobą wieńcową lub naczyniową		1 pkt
2. Krewni I° z LDL powyżej 95-ego percentyla		2 pkt
3. Krewni I° z żółtakami i/lub rąbkami rogówkowym		2 pkt
4. Dzieci i młodzież poniżej 18 roku życia z cholesterolem LDL powyżej 95-ego percentyla		2 pkt
<b>Wywiad:</b>		
1. Przedwczesna choroba wieńcowa		2 pkt
2. Przedwczesna choroba naczyń mózgowych lub obwodowych		1 pkt
<b>Badanie przedmiotowe:</b>		
1. Żółtaki ścięgien		6 pkt
2. Rąbek rogówkowy		4 pkt
<b>Badania laboratoryjne:</b>		
1. Cholesterol LDL	>8.5 mmol/l (325 mg/dl)	8 pkt
2. Cholesterol LDL	6.5-8.4 mmol/l (250-325 mg/dl)	5 pkt
3. Cholesterol LDL	5.0-6.4 mmol/l (193-250 mg/dl)	3 pkt
4. Cholesterol LDL	4.0-4.9 mmol/l (155-193 mg/dl)	1 pkt
<b>Badanie genetyczne:</b>		
1. Mutacja genu receptora LDL		8 pkt
<b>Rozpoznanie FH</b>		
	Pewne	> 8 pkt
	Wysoce prawdopodobne	6-8 pkt
	Prawdopodobne	3-5 pkt



**Tabela 3** Kryteria rozpoznawania hipercholesterolemii rodzinnej opracowana przez *MedPed Program*.

Wiek	Wartości odcinające dla cholesterolu całkowitego			
	Krewny I° z FH	Krewny II° z FH	Krewny III° z FH	Brak krewnych z FH
<20	5.7 mmol/l [220 mg/dl]	5.9 mmol/l [228 mg/dl]	6.2 mmol/l [240 mg/dl]	7.0 mmol/l [270 mg/dl]
20-29	6.2 mmol/l [240 mg/dl]	6.5 mmol/l [250 mg/dl]	6.7 mmol/l [260 mg/dl]	7.5 mmol/l [290 mg/dl]
30-39	7.0 mmol/l [270 mg/dl]	7.2 mmol/l [278 mg/dl]	7.5 mmol/l [290 mg/dl]	8.8 mmol/l [340 mg/dl]
≥40	7.5 mmol/l [290 mg/dl]	7.8 mmol/l [300 mg/dl]	8.0 mmol/l [310 mg/dl]	9.3 mmol/l [360 mg/dl]

**Tabela 4** Kryteria rozpoznawania hipercholesterolemii rodzinnej opracowana przez *Simon Broome Register Group*.

<b>Kryteria</b>	
a	Poziom cholesterolu całkowitego powyżej 7.5 mmol/l (290 mg/dl) u dorosłego probanta lub powyżej 6.7 mmol/l (260 mg/dl) u dzieci poniżej 16 roku życia, albo poziom cholesterolu frakcji LDL powyżej 4.9 mmol/l (190 mg/dl) u dorosłych lub powyżej 4.0 mmol/l (155 mg/dl) u dzieci
b	Żółtaki u probanta lub krewnego I°
c	Obecność mutacji genu <i>LDLR</i> lub <i>APOB</i>
d	Zawał serca u krewnych I° przed 60 rokiem życia lub krewnych II° przed 50 rokiem życia
e	Poziom cholesterolu całkowitego powyżej 7.5 mmol/l (290 mg/dl) u krewnego I° lub II°
<b>Rozpoznanie FH</b>	
Pewne	Kryteria a i b lub c
Prawdopodobne	Kryteria a i d lub a i e

#### **4. CELE PRACY**

1. Określenie częstości i rodzaju mutacji genów *LDLR* i *APOB* w grupie chorych z klinicznymi objawami hipercholesterolemii rodzinnej.
2. Określenie związku pomiędzy rodzajami mutacji a poziomami poszczególnych frakcji cholesterolu w surowicy chorych.

## 5. MATERIAŁY I METODY

### 5.1. Materiał

Badania przeprowadzono w grupie 96 pacjentów z rozpoznaniem klinicznym FH określanym jako pewne lub wysoce prawdopodobne na podstawie kryteriów rozpoznawania hipercholesterolemii rodzinnej opracowanych przez zespół ekspertów WHO (**tab. nr 2**). Pacjenci byli rekrutowani z poradni specjalistycznej Kliniki Chorób Metabolicznych, Instytutu “Pomnika – Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie. Do badań zostali włączeni tylko ci pacjenci, którzy wyrazili na to pisemną zgodę po zapoznaniu się z planem projektu. Dzieci i młodzież były badane jedynie za zgodą obojga rodziców lub opiekunów prawnych. Dane biochemiczne pacjentów przedstawiono w **tabeli nr 5**.

Od każdego z pacjentów pobierano krew (ok. 5-7 ml) do próbek z EDTA (Sarstedt). Krew była przechowywana w -20°C.

**Tabela 5** Dane biochemiczne 96 probantów z FH AD.

Lp	Nr probanta	Płeć	T-CH [mg/dl]	TG [mg/dl]	LDL [mg/dl]	VLDL [mg/dl]	HDL [mg/dl]
1	FH 2	K	334	83	273	15	46
2	FH 4	M	335	91	274	18	43
3	FH 6	M	399	70	330	14	55
4	FH 7	M	370	56	302	12	56
5	FH 10	K	331	100	261	20	50
6	FH 11	K	334	65	266	19	49
7	FH 12	K	362	109	284	19	59
8	FH 16	M	275	93	214	17	44
9	FH 17	M	195	119	136	21	38
10	FH 18	K	302	66	241	11	50
11	FH 19	M	440	49	381	10	49
12	FH 20	M	285	49	216	11	58
13	FH 25	K	335	34	251	13	71
14	FH 27	M	354	68	300	15	39
15	FH 28	K	351	100	274	18	59
16	FH 29	K	334	134	279	27	28
17	FH 30	M	428	135	357	27	44
18	FH 32	K	313	179	248	36	29
19	FH 33	K	277	91	198	18	61
20	FH 34	K	295	86	226	17	52
21	FH 40	M	275	52	202	11	62
22	FH 41	K	289	227	206	47	36

23	FH 42	M	357	71	282	15	60
24	FH 43	K	350	77	294	15	42
25	FH 44	K	373	75	292	16	65
26	FH 45	K	252	74	199	15	38
27	FH 48	M	324	72	274	10	40
28	FH 55	M	322	68	250	17	55
29	FH 57	K	297	23	221	8	68
30	FH 58	M	319	79	258	16	45
31	FH 59	K	293	75	228	15	50
32	FH 60	M	486	103	425	25	36
33	FH 64	M	261	74	198	16	47
34	FH 66	M	303	105	239	22	42
35	FH 67	K	302	74	246	17	39
36	FH 71	M	278	106	213	17	48
37	FH 82	K	262	124	189	25	48
38	FH 85	K	273	91	220	18	35
39	FH 89	M	381	86	313	17	51
40	FH 99	K	274	89	200	18	56
41	FH 112	M	313	64	232	13	68
42	FH 113	M	220	55	173	11	36
43	FH 115	K	339	59	254	14	71
44	FH 118	K	279	75	213	15	51
45	FH 119	M	291	60	228	12	51
46	FH 121	M	257	43	189	10	58
47	FH 122	M	303	35	238	9	56
48	FH 123	K	358	144	291	29	38
49	FH 124	K	323	71	254	15	54
50	FH 126	K	275	78	216	15	44
51	FH 131	K	335	115	273	23	39
52	FH 132	K	293	80	230	16	47
53	FH 136	M	244	55	188	10	46
54	FH 139	K	310	104	243	21	46
55	FH 141	K	264	78	196	16	52
56	FH 147	K	390	88	331	18	41
57	FH 149	M	298	73	215	17	66
58	FH 151	M	292	32	222	7	63
59	FH 152	K	312	105	255	19	38
60	FH 165	M	369	113	300	20	49
61	FH 166	K	243	49	183	6	54
62	FH 171	M	309	199	225	40	44
63	FH 172	M	266	67	205	13	48
64	FH 177	M	261	100	186	19	56
65	FH 181	K	252	81	195	15	42
66	FH 182	K	272	57	212	10	50
67	FH 186	M	243	65	178	14	51
68	FH 190	K	340	50	267	11	62
69	FH 191	K	335	90	267	17	51
70	FH 192	K	405	47	334	10	59

71	FH 200	M	226	67	175	13	38
72	FH 215	K	270	62	209	12	49
73	FH 217	K	343	41	276	8	59
74	FH 220	M	325	104	271	20	34
75	FH 222	M	356	70	286	12	58
76	FH 224	M	375	85	315	17	43
77	FH 239	M	300	134	244	27	29
78	FH 243	M	241	71	159	14	68
79	FH 244	K	310	139	234	28	48
80	FH 245	K	283	68	229	14	40
81	FH 269	K	362	60	299	12	51
82	FH 286	M	253	35	196	9	-
83	FH 291	K	328	123	269	25	34
84	FH 300	K	352	192	264	38	50
85	FH 308	M	287	72	235	14	38
86	FH 309	K	307	76	243	15	49
87	FH 311	M	237	58	184	11	42
88	FH 312	M	367	98	293	22	52
89	FH 315	M	268	41	207	19	42
90	FH 369	K	182	66	123	13	46
91	FH 373	K	462	145	387	29	46
92	FH 378	K	324	51	262	10	52
93	FH 382	M	329	112	242	22	65
94	FH 407	K	350	87	285	17	48
95	FH 417	M	727	107	691	22	14
96	FH 428	M	196	100	113	20	63

T-CH - cholesterol całkowity; TG – trójglicerydy; LDL – cholesterol frakcji LDL; VLDL - cholesterol frakcji VLDL; HDL - cholesterol frakcji HDL

## 5.2. Metody

### 5.2.1. Aparatura

- × Sekwencjator automatyczny, ABI PRISM 310
- × Termocykler, GeneAmp PCR System 2400
- × Komora do elektroforezy agarozowej SubCell GT
- × System do archiwizacji żeli agarozowych, GelDoc2000
- × Zasilacz do elektroforezy PowerPac 3000
- × Wirówka 5804
- × Wirówka 5810R
- × Termocykler PTC-200 DNA Engine
- × Spektrofotometr Helios γ
- × Applied Biosystems
- × Applied Biosystems
- × Bio-Rad
- × Bio-Rad
- × Bio-Rad
- × Eppendorf
- × Eppendorf
- × MJ Research
- × Thermo Spectronic

### 5.2.2. Odczynniki

- × Zestaw Clean-Up
  - × Zestaw Ex-Terminator
  
  - × BigDye Terminators v. 3.1 cycle sequencing kit
  - × 5x Big Dye Terminator Sequencing buffer
  - × 10x EDTA buffer
  - × Żel do elektroforezy POP-6
  - × Kapilara 47cm x 50µm
  
  - × Marker wielkości M100-500
  
  - × Polimeraza DNA Taq
  
  - × Dodecylsulfian sodu (SDS)
  - × Fenol
  - × Proteinaza K
  - × Izopropanol
  - × NaCl
  
  - × Chloroform
  - × Izopropanol
  
  - × Alkohol etylowy
- × A&A Biotechnology
  
  - × Applied Biosystems
  
  - × DNA Gdańsk II
  
  - × MBI Fermentas
  
  - × ICN
  
  - × Merck
  
  - × POCh Gliwice

- × Startery
- × Pracownia  
Sekuencjonowania DNA i  
Syntezy Oligonukleotydów  
IBB PAN
- × dNTPs
- × Promega
- × Bromek etydyny
- × Bromofenol blue
- × EDTA
- × Kwas borny
- × Proteinaza K
- × Tris-HCl
- × Xylene cyanol
- × Sigma-Aldrich
- × Agaroza
- × Prona



**5.2.3. Roztwory**

5x TBE	54g	Tris
	27.5g	Kwas borny
	20ml	0.5 M EDTA, pH=8.0
		woda do 1000ml
6x bufor obciążający	0.25%	Xylene cyanol
	40%	Sacharoza w wodzie
5x Bufor RBC	41.46g	NH <sub>4</sub> Cl
	4.6g	KHCO <sub>3</sub>
	10ml	0.5M EDTA
		woda do 1000ml
NaCl/EDTA	75mM	NaCl
	1mM	EDTA

#### 5.2.4. Izolacja DNA z limfocytów krwi obwodowej

DNA izolowano z leukocytów krwi obwodowej tradycyjną metodą trawienia proteinazą K, ekstrakcji fenol/chloroform i precypitacji etanolem (tab. nr 6).

**Tabela 6** Protokół izolacji DNA z mrożonej krwi.

1. 5-10ml krwi przenieść do probówki typu Falcon.
2. Dodać 7ml 1xRBC, delikatnie wymieszać.
3. Wirować 15min, 3150g, +4°C.
4. Zlać supernatant, do osadu dodać 5ml RBC, wymieszać.
5. Wirować 15min, 3150g, +4°C.
6. Punkt 4 i 5 powtórzyć 2-3 razy.
7. Zlać supernatant. Do osadu dodać 5ml NaCl/EDTA, 500µl 10% SDS, 12µl proteinazy K (20 mg/ml).
8. Inkubować przez noc w 37°C.
9. Dodać 5ml fenolu. Mieszać 15min.
10. Wirować 15min, 6000g, +4°C.
11. Zebrać górną warstwę i przenieść ją do nowej probówki typu Falcon.
12. Dodać 5ml chloroformu i 1.25ml 6M NaCl. Mieszać 1h.
13. Wirować 15min, 6000g, +4°C.
14. Zebrać górną warstwę i przenieść ją do nowej probówki typu Falcon.
15. Dodać 5ml izopropanolu. Delikatnie wymieszać.
16. Wirować 30min, 6000g, +4°C.
17. Płukać 70% etanolem.
18. Wysuszyć osad.
19. Rozpuścić osad w 300µl wody.

Zamrożoną w -20°C krew rozmrażano i przenoszono do 50ml próbek typu Falcon. Erytrocyty usuwano buforem 1xRBC. Następnie lizowano limfocyty traktując komórki roztworem SDS. Inaktywację DNaz umożliwiło EDTA chelatując dwudodatnie jony metali, które są konieczne do aktywacji tych enzymów. Białka trawione były proteinazą K. Następnego dnia w celu oddzielenia frakcji DNA od frakcji białek dodawano fenol oraz chloroform z roztworem NaCl. Do nowych próbek przenoszono górną

warstwę zawierającą DNA, które następnie wytrącano z roztworu izopropanolem. Po odwirowaniu próbek otrzymany supernatant zlewano, a wysuszony osad rozpuszczano w 300µl wody. Próbkę przechowywano w +4°C do dalszych analiz.

### 5.2.5. Ocena ilościowa i jakościowa wyizolowanego DNA

Wstępnie jakość i stężenie wyizolowanego DNA oceniano po krótkotrwałej elektroforezie na 1% żelu agarozowym. Następnie przeprowadzano dokładny pomiar ilościowy DNA metodą spektrofotometryczną. DNA wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 260nm. Przyjmuje się, że  $OD_{260} = 1$  odpowiada 33ng/µl DNA.

W każdej próbce dokonywano również pomiaru absorpcji przy długości fali 280nm w celu oceny zanieczyszczenia wyizolowanego DNA białkami. Do dalszej analizy wykorzystywano próbki, dla których stosunek  $OD_{260}/OD_{280}$  był większy od 1.7.

### 5.2.5. Badanie mutacji genów *LDLR* i *APOB*

#### 5.2.5.1. Amplifikacja genów *LDLR* i *APOB*

Sekwencja promotorowa oraz eksony wraz z przylegającymi fragmentami intronów genu *LDLR* zostały zamplifikowane za pomocą reakcji PCR z zastosowaniem starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji genu *LDLR* dostępnej w bazie internetowej *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Fragment eksonu 26 genu *APOB*, obejmujący jak dotąd wszystkie poznane mutacje związane z hipercholesterolemią rodzinną został zamplifikowany przy użyciu starterów zaprojektowanych przez Schuster'a [101].

Sekwencje starterów zostały przedstawione w **tabeli nr 7** oraz **tabeli nr 8**.

**Tabela 7** Sekwencje starterów dla genu *LDLR*.

Starter	Sekwencja startera (5' – 3')	Amplikon
LDLR-1for	gTC AgC TCC TCA CCg gAg AC	promotor + ekson 1
LDLR-1rev	CgT gCC ATT ACC CCA CAA gTC	
LDLR-2for	ATC AgA CTg TTC CTT gAT Cgg Atg	ekson 2
LDLR-2rev	Agg ggT TAA gAA TCg TgT CAC Ag	
LDLR -3for	CTTgAA CCC CTg ACC TCA C	ekson 3
LDLR-3rev	ggT ATg AgC CCC CAA gAg A	
LDLR-4for	CAG Tgg TTC AgA gTC CAT gg	ekson 4
LDLR-4rev	gTT ggA AAT CCA CTT Cgg	
LDLR-5for	AAg CAA TCC TCC TgC C TT gg	ekson 5
LDLR-5rev	AAg TCA CTT gCC CAC AgA Cg	
LDLR-6for	gAA TCC ATT TgC ATg CgT TC	ekson 6
LDLR-6rev	CgT gCg AgA CTg TCT CAA AAT	
LDLR-7for	Tgg Agg TTg TAA TgA gCC AAg g	ekson 7
LDLR-7rev	ACC CTC CTA ACT gCT TTC AAg C	
LDLR-8for	gAT gAC ACC Tgg CTg TTT C	ekson 8
LDLR-8rev	CAA gCC CAA gTC CTA ACA g	
LDLR-9for	ggg Agg CAC TCT Tgg TTC	ekson 9+10
LDLR-10rev	ggT CAg gCT ggT CTT gAT g	
LDLR-11for	ggA TCC TCC CCC gCC CTC	ekson 11
LDLR-11rev	CCC CgT CTg TCC TCC AgC	
LDLR-12for	ggT CTT CCT gCC Cgg AgC A	ekson 12
LDLR-12rev	gAC CTC CTC CTA gTC ACA ACC	
LDLR-13for	gTg TCT CAT CCC AgT gTT TA	ekson 13+14
LDLR-14rev	CAT TTg ACA gAT gAg CAg Ag	
LDLR-15for	CTC ACT CAA gAg ATC CTC CTg CC	ekson 15
LDLR-15rev	CAA ggg AgT gAg gAC gAC A	
LDLR-16for	CCA AgT gTC Cag ggA gAT gT	ekson 16
LDLR-16rev	TCC ATC TgA CCC CTT AgC Tg	
LDLR-17for	CAG gCC gCA Agg CgA TCT CTA AAC	ekson 17
LDLR-17rev	CAG CTg ggA ggg ggC CgC CAT g	
LDLR-18for	CAG gAg gTg AgA AgT Agg Tgg	ekson 18
LDLR-18rev	ACA AAg CTC Tgg CAg g CA Atg	

**Tabela 8** Sekwencje starterów dla genu *APOB*.

Starter	Sekwencja startera (5' – 3')	Amplikon
UOL-for	gAC CAC AAg CTT AgC TTg g	fragment eksonu 26
LOL-rev	ggg Tgg CTT TgC TTg TAT g	

Reakcję PCR przeprowadzano w objętości 50 $\mu$ l. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w **tabeli nr 9**. Mieszanina reakcyjna zawierała około 500ng genomowego DNA. Profil termiczny reakcji przedstawiono w **tabeli nr 10**. Temperatury przyłączania starterów ustalono empirycznie dla każdego amplifikowanego fragmentu i są one przedstawione w **tabeli nr 11**. Ze względu na krótką sekwencję intronową pomiędzy eksonami 9 i 10 oraz 13 i 14, eksony te odpowiednio amplifikowano jako jeden amplikon.

**Tabela 9** Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentów genów *LDLR* oraz *APOB*.

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Objętość/próbkę [ $\mu$ l]
Bufor do PCR, 10x	5
MgCl <sub>2</sub> [25mM]	3
dNTPs mix [5mM]	0.75
Starter F [10 $\mu$ M]	2
Starter R [10 $\mu$ M]	2
Woda	32.05
Polimeraza Taq [5U/ $\mu$ l]	0.2
DNA	5

**Tabela 10** Profil reakcji PCR amplifikowanych fragmentów genów *LDLR* i *APOB*.

94 °C	3min	
94 °C	30 s	} 30x
T <sub>A</sub> (°C)*	60 s	
72 °C	30 s	
72 °C	10min	
4 °C		

\*T<sub>A</sub>(°C) – temperatura przyłączania starterów

**Tabela 11** Temperatury przyłączania starterów oraz oczekiwane długości amplifikowanych fragmentów genów *LDLR* i *APOB*.

Gen	Amplikon	T <sub>A</sub> (°C)*	Długość produktu (bp)	
<i>LDLR</i>	promotor+ekson 1	60	520	
	ekson 2	60	423	
	ekson 3	60	390	
	ekson 4	62	530	
	ekson 5	62	330	
	ekson 6	58	380	
	ekson 7	62	320	
	ekson 8	55	390	
	ekson 9+10	62	710	
	ekson 11	65	230	
	ekson 12	63	341	
	ekson 13+14	58	385	
	ekson 15	65	405	
	ekson 16	62	391	
	ekson 17	72	293	
	ekson 18	62	225	
	<i>APOB</i>	fragment eksonu 26	62	320

\*T<sub>A</sub>(°C) – temperatura przyłączania starterów

W celu kontroli prawidłowego przeprowadzenia reakcji PCR oraz wiarygodności otrzymanych wyników, w każdej reakcji stosowano kontrolę pozytywną oraz negatywną. Kontrolę pozytywną stanowiła próbka DNA o znanej zdolności do amplifikacji. Natomiast jako kontrolę negatywną stosowano próbkę, w której zamiast DNA dodawano odpowiednią objętość jałowej wody.

Efektywność amplifikacji weryfikowana była poprzez elektroforezę agarozową. Do studzienek 2% żelu agarozowego, wybarwionego bromkiem etydyny i zanurzonego w buforze 1xTBE наносono 5 $\mu$ l produktu PCR wymieszanego uprzednio z 5 $\mu$ l buforu obciążającego. Fragmenty rozdzielano przez 30 minut przy napięciu 120V.

Wizualizacja fragmentów DNA następowała w świetle UV transiluminatora. Uzyskany obraz był następnie archiwizowany za pomocą systemu Gel Doc2000 firmy BioRad.

#### **5.2.5.2. Bezpośrednie sekwencjonowanie produktów PCR**

W celu analizy sekwencji zamplifikowane metodą PCR fragmenty DNA zostały oczyszczone z genomowego DNA oraz starterów przy użyciu zestawu Clean-Up (A&A Biotechnology, Polska). Zestaw opiera się na zdolności wiązania się DNA do złóż krzemionkowych w wysokich stężeniach soli chaotropowych.

Oczyszczone w ten sposób produkty PCR były wykorzystywane do bezpośredniego sekwencjonowania, stosując starter sensowny. Reakcja przeprowadzana była w objętości 20  $\mu$ l. Skład mieszaniny do reakcji sekwencjonowania przedstawiono w **tabeli nr 12**. Warunki oraz profil termiczny reakcji były zgodne z zaleceniami firmy Applied Biosystems.

W celu potwierdzenia wykrytej mutacji, próbki były ponownie amplifikowane za pomocą reakcji PCR, a następnie sekwencjonowane przy użyciu zarówno startera sensownego jak i antysensownego.

**Tabela 12** Skład mieszaniny reakcyjnej do sekwencjonowania.

Składnik mieszaniny reakcyjnej	objętość/próbkę [ $\mu$ l]
BigDye Terminator Reaction Mix v3.1	2
5x BigDye Terminator sequencing buffer	4
Matrycowe DNA	4
Starter [ $1\mu$ M]	2
Woda	8

W celu usunięcia nadmiaru znakowanych dideoksynukleotydów (ddNTPs) produkt reakcji czyszczono z zastosowaniem zestawu ExTerminator (A&A Biotechnology, Polska), który wykorzystuje precypitację produktów reakcji sekwencyjnej na powierzchni specjalnej membrany. Tak przygotowaną próbkę denaturowano w temperaturze  $95^{\circ}\text{C}$  przez 5 minut, po czym chłodzono do  $4^{\circ}\text{C}$ . Próbkę analizowano przy użyciu sekwencjatora automatycznego ABI PRISM 310 z wykorzystaniem programów *ABI PRISM 31000 Data Collection Software v2.0* i *ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software v3.7*. Otrzymane elektroforogramy analizowano i porównywano z sekwencją prawidłową uzyskaną z bazy danych *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) z zastosowaniem programu *Sequencher* (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA).

### 5.2.6. Nomenklatura mutacji genu *LDLR*

W przypadku genu *LDLR* stosowane są dwa schematy opisywania mutacji. Pierwszy schemat opracowany przez Yamamoto i wsp. [126] nadaje ujemną numerację dla kodonów eksonu 1 kodującego sekwencję sygnałową. Obecnie ujednocicone zostały reguły zapisu ([www.hgvs.org/mutnomen](http://www.hgvs.org/mutnomen)) i we wszystkich genach jako pozycje +1 uznaje się A w kodonie kodującym pierwszą metioninę.

Schemat Yamamoto pomimo, że jest starszy jest bardziej rozpowszechniony wśród naukowców. W prezentowanej pracy, ze względu



na potrzebę dyskusji z innymi pracami, stosowany jest również starszy schemat opisu mutacji. W rozdziale **Załączniki w tabeli nr 21** zamieszczono listę mutacji uwzględniając oba schematy ich opisu.

### 5.2.7. Analiza statystyczna

Dane przedstawiono jako mediany  $\pm$  SD (odchylenie standardowe). Oceniano rozkład zmiennych ciągłych pod kątem jego zgodności z rozkładem normalnym, stosując test Kołmogorowa-Smirnowa. Znamienność statystyczną różnic między zmiennymi oceniano za pomocą nieparametrycznego testu Manna-Whitney'a U lub przy pomocy testu ANOVA rang. Zmienne katagoryczne oceniano za pomocą testu  $\chi^2$  lub testem Fisher'a. Związek poszczególnych typów mutacji z poziomem cholesterolu całkowitego  $\geq 300$  mg/dl i LDL  $\geq 250$  mg/dl oceniany był przy pomocy analizy statystycznej. Jako miarę ryzyka związanego z danym typem mutacji obliczano ilorazy szans (OR - *odds ratio*) z 95% przedziałami ufności (95% *confidence intervals*). Wartość  $p < 0.05$  przyjęto za istotną statystycznie.

Obliczenia statystyczne zostały wykonane za pomocą programu STATISTICA, wersja 6.1 (StatSoft, USA).

## 6. WYNIKI

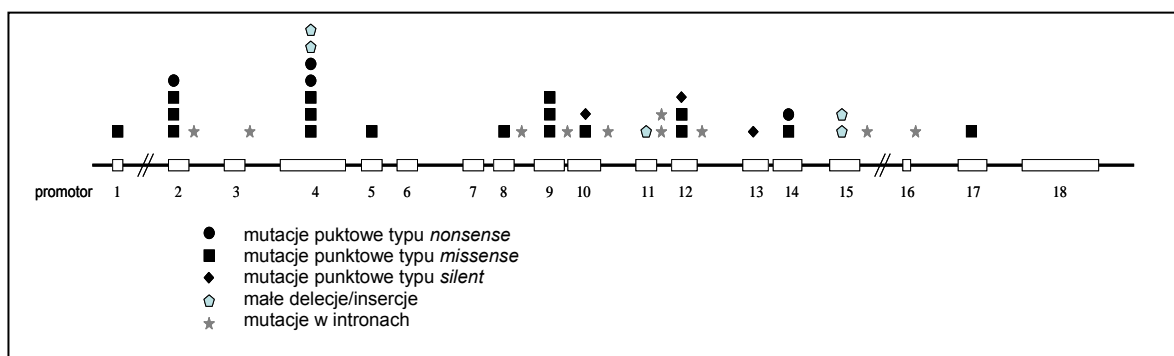
### 6.1. Wyniki analizy sekwencji genów *LDLR* i *APOB*

Analiza molekularna genów *LDLR* oraz *APOB* została przeprowadzona w grupie 96 probantów. W grupie było 50 dziewczynek i 46 chłopców. Na podstawie kryteriów WHO u wszystkich pacjentów rozpoznanie hipercholesterolemii rodzinnej określono jako pewne lub wysoce prawdopodobne (**tab. nr 2**).

Sekwencja promotorowa oraz eksony wraz z przylegającymi fragmentami intronów genu *LDLR* oraz fragment eksonu 26 genu *APOB* zostały zamplifikowane za pomocą reakcji PCR, a następnie bezpośrednio zsekwencjonowane z wykorzystaniem startera sensownego. W celu potwierdzenia wykrytej mutacji, próbki były ponownie amplifikowane, a następnie sekwencjonowane przy użyciu zarówno startera sensownego jak i antysensownego.

W badanej grupie wykryto 58 mutacji genu *LDLR* u 53 (55%) probantów (**tab. nr 13**). Nie stwierdzono obecności mutacji w regionie promotorowym genu. W obrębie sekwencji sygnałowej znaleziono jedną mutację (1.7%). W domenie wiążącej ligand stwierdzono występowanie 16 mutacji (27.6%), natomiast w domenie homologicznej do prekursora EGF 35 mutacji (60.3%). Dwie mutacje zlokalizowane były w obrębie domeny O-cukrów (3.5%), trzy w obrębie domeny przezbłonowej (5.2%) i jedna w domenie cytoplazmatycznej (1.7%) (**ryc. nr 6**).

**Rycina 6** Spektrum wykrytych 39 rodzajów mutacji genu *LDLR*.



Najwięcej mutacji zlokalizowanych było w obrębie eksonów 4 i 12 genu *LDLR* (**ryc. nr 6**). W eksonie 4 były to różne mutacje punktowe typu tranzycji lub transwersji oraz jedna mutacja polegająca na insercji ośmiu nukleotydów. W obrębie eksonu 12 zlokalizowano trzy mutacje punktowe przy czym mutację G571E znaleziono u 14 (14.6%) probantów.

Mutacje genu *APOB* wykryto u 10 probantów (10.4%). We wszystkich przypadkach wykryto mutację punktową R3500Q (**tab. nr 13**).

W badanej grupie znaleziono jedną homozygotę - G571E (pac. FH30) oraz dwie heterozygoty złożone – [G571E]+[C646Y] (pac. FH60) i [G571E]+[del e1-2, 20 kb] (pac. FH373 - delecja 20 kb obejmująca eksony 1-2 (FH Siracusa-3). Wyniki analizy delecji uzyskano dzięki uprzejmości profesora J.C. Defesche, Amsterdam, Holandia). W tych przypadkach analiza molekularna w kierunku konkretnej mutacji została również przeprowadzona u członków rodzin probantów. Badanie te wykazały, że każdy z rodziców powyższych dzieci jest nosicielem heterozygotycznej mutacji genu *LDLR* (**tab. nr 19** w rozdziale **Załączniki**)

**Tabela 13** Mutacje genów *LDLR* i *APOB* w grupie 96 chorych na hipercholesterolemię rodzinną.

Lp	Nr probanta	Płeć	Wynik analizy mutacji	
			<i>LDLR</i>	<i>APOB</i>
1	FH 2	K	intron11:1705+1G>A, htz	WT
2	FH 4	M	C210X, htz / intron8:1186+97C>G, htz	WT
3	FH 6	M	WT	WT
4	FH 7	M	D245E, htz	WT
5	FH 10	K	G571E, htz	WT
6	FH 11	K	E119D, htz	WT
7	FH 12	K	WT	WT
8	FH 16	M	N494N, htz	WT
9	FH 17	M	C210Y, htz	WT
10	FH 18	K	WT	WT
11	FH 19	M	V485M, htz	WT
12	FH 20	M	WT	R3500Q, htz
13	FH 25	K	WT	WT
14	FH 27	M	WT	WT
15	FH 28	K	FsS704 (del C), htz	WT
16	FH 29	K	WT	WT
17	FH 30	M	G571E, hom	WT
18	FH 32	K	WT	WT
19	FH 33	K	D36N, htz	WT
20	FH 34	K	WT	WT
21	FH 40	M	WT	WT
22	FH 41	K	WT	WT
23	FH 42	M	WT	R3500Q, htz
24	FH 43	K	C176W, htz	WT
25	FH 44	K	G571E, htz	WT
26	FH 45	K	WT	R3500Q, htz
27	FH 48	M	Q665X, htz	WT
28	FH 55	M	R553C, htz	WT
29	FH 57	K	intron 11: 1706-10 G>A, htz	WT
30	FH 58	M	WT	WT
31	FH 59	K	WT	WT
32	FH 60	M	G571E, htz / C646Y, htz	WT
33	FH 64	M	G571E, htz	WT
34	FH 66	M	WT	WT
35	FH 67	K	G-2R, htz	WT
36	FH 71	M	WT	WT
37	FH 82	K	WT	R3500Q, htz
38	FH 85	K	WT	R3500Q, htz
39	FH 89	M	Q133X, htz	WT
40	FH 99	K	WT	R3500Q, htz
41	FH 112	M	WT	WT
42	FH 113	M	WT	R3500Q, htz
43	FH 115	K	G571E, htz	WT
44	FH 118	K	intron 16:2390-2 A>G, htz	WT
45	FH 119	M	intron 3:313+1 G>A, htz	WT
46	FH 121	M	WT	WT
47	FH 122	M	WT	WT

48	FH 123	K	WT	WT
49	FH 124	K	G571E, htz	WT
50	FH 126	K	E10K, htz	WT
51	FH 131	K	WT	WT
52	FH 132	K	D333G, htz	WT
53	FH 136	M	WT	WT
54	FH 139	K	intron 11:1705+1 G>A, htz	WT
55	FH 141	K	G571E, htz	WT
56	FH 147	K	WT	WT
57	FH 149	M	A410T, htz	WT
58	FH 151	M	G571E, htz	WT
59	FH 152	K	G571E, htz	WT
60	FH 165	M	C88R (del2/ins2), htz	WT
61	FH 166	K	WT	R3500Q, htz
62	FH 171	M	S426P, htz	WT
63	FH 172	M	Y807C, htz	WT
64	FH 177	M	WT	WT
65	FH 181	K	WT	R3500Q, htz
66	FH 182	K	A591A, htz	WT
67	FH 186	M	WT	R3500Q, htz
68	FH 190	K	intron 2:190+1 G>A, htz	WT
69	FH 191	K	W23X, htz / N619N, htz	WT
70	FH 192	K	intron 11: 1706-10 G>A, htz	WT
71	FH 200	M	intron 11: 1705+1 G>A, htz	WT
72	FH 215	K	G571E, htz	WT
73	FH 217	K	C210Y, htz	WT
74	FH 220	M	WT	WT
75	FH 222	M	intron15:2312-71G>A, htz	WT
76	FH 224	M	FsD157 (ins8), htz	WT
77	FH 239	M	WT	WT
78	FH 243	M	WT	WT
79	FH 244	K	G571E, htz	WT
80	FH 245	K	WT	WT
81	FH 269	K	WT	WT
82	FH 286	M	WT	WT
83	FH 291	K	WT	WT
84	FH 300	K	intron 16: 2390-2 A>G, htz	WT
85	FH 308	M	ITL545MPN (del7/ins7), htz	WT
86	FH 309	K	WT	WT
87	FH 311	M	G571E, htz	WT
88	FH 312	M	W422R, htz	WT
89	FH 315	M	intron 9:1359-3 del C, htz/intr 10:1586+12 C>T, htz	WT
90	FH 369	K	WT	WT
91	FH 373	K	G571E, htz/ del e1-2, 20kb (FH Siracusa-3), htz	WT
92	FH 378	K	FsN745 (del AC), htz	WT
93	FH 382	M	intron 12: 1846-2 A>C, htz	WT
94	FH 407	K	A29S, htz / C176W, htz	WT
95	FH 417	M	WT	WT
96	FH 428	M	WT	WT

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); htz – heterozygota; hom – homozygota; del – delecja; ins - insercja

W obrębie genu *LDLR* wykryto 39 rodzajów mutacji (**tab. nr 14**). Znaleziono mutacje to zarówno mutacje punktowe typu tranzykcji lub transwersji, jak i delecje lub insercje kilku nukleotydów.

Niezależnie od rodzaju mutacji zdecydowana większość z nich zlokalizowana była w obrębie sekwencji kodującej genu *LDLR* (n=29, 74%).

Wśród mutacji zlokalizowanych w obrębie eksonów przeważały tranzykcje i transwersje, które stanowiły aż 83% (n=24). Wśród nich najwięcej było mutacji typu *missense* (n=17, 71%). Mutacje typu *nonsense* stanowiły 17% (n=4). Znaleziono również trzy mutacje typu *silent* (12%). Mutacje typu delecja lub insercja stanowiły 17% (n=5).

Dwie mutacje to współwystępowanie delecji i insercji o takiej samej liczbie nukleotydów (C88R, ITL545MPN). Mutacje te powodują wstawienie odpowiednio jednego i trzech nieprawidłowych aminokwasów do białka, nie prowadzą jednak do przesunięcia ramki odczytu. Pozostałe trzy mutacje to delecje (FsS704, FsN745) lub insercje kilku nukleotydów (FsD157), których skutkiem jest przesunięcie ramki odczytu oraz powstanie kodonu *stop*, odpowiednio w 4, 15, 31 aminokwasie licząc od miejsca mutacji.

W obrębie sekwencji intronowych znaleziono 10 (26%) różnych rodzajów mutacji (**ryc. nr 6**). Większość z tych mutacji to również mutacje typu podstawienia (n=9, 90%). W jednym przypadku stwierdzono obecność delecji w obrębie intronu 9 (1359-3 del C). Osiem z tych mutacji zlokalizowanych jest w bliskim sąsiedztwie eksonów.

W badanej grupie wykryto 31 rodzajów polimorfizmów. Osiem z nich zlokalizowanych jest w obrębie sekwencji kodującej genu *LDLR* natomiast 23 polimorfizmy wykryto w sekwencjach intronowych. Większość polimorfizmów zlokalizowanych w obrębie sekwencji kodującej nie powoduje zmiany aminokwasu w produkcie białkowym, wyjątek stanowi polimorfizm A370T. Polimorfizmy genu *LDLR* występują z tą samą częstością zarówno u pacjentów z mutacją w tym genie jak i u pacjentów bez mutacji.

Szczegółowe wyniki sekwencjonowania probantów zostały umieszczone na końcu pracy w rozdziale **Załączniki**.

**Tabela 14** Charakterystyka wykrytych mutacji w genie *LDLR* [www.ucl.ac.uk/fh/, www.jojogenetics.nl, www.umd.necker.fr].

Charakterystyka mutacji			Klasa mutacji	Aktywność receptora LDL	Pochodzenie etniczne	Komentarz
Pozycja nukleotydowa	Lokalizacja	Zmiana aminokwasu				
58 G>A	ekson 1	G-2R	2A	-	Holandia	-
<b>91 G&gt;A</b>	<b>ekson 2</b>	<b>E10K</b>	-	-	-	<b>dotychczas nieopisana</b>
131 T>G	ekson 2	W23X	1	2-5%	Ameryka Północna, Belgia, Dania, Hiszpania, Holandia, Niemcy, Norwegia,	-
146 G>T	ekson 2	A29S	-	-	Holandia, Niemcy	niefunkcyjna
<b>169 G&gt;A</b>	<b>ekson 2</b>	<b>D36N</b>	-	-	-	<b>dotychczas nieopisana</b>
190+1 G>A	intron 2	-	-	-	Afryka Południowa	miejsce splicingowe
313+1 G>C	intron 3	-	-	-	Hiszpania, Holandia	miejsce splicingowe
324 del GT/insTC	ekson 4	C88R	2B	15-30%	Niemcy, Wielka Brytania	-
420 G>C	ekson 4	E119D	-	-	Czechy, Niemcy	-
460 C>T	ekson 4	Q133X	1	-	Francja, Hiszpania	-
<b>591 C&gt;G</b>	<b>ekson 4</b>	<b>C176W</b>	-	-	-	<b>dotychczas nieopisana</b>
693 C>A	ekson 4	C210X	1	-	Bułgaria, Holandia, Kanada, Wielka Brytania	-

## 6. Wyniki

692 G>A	ekson 4	C210Y	-	-	Korea	-
533 insGGCTCGGA	ekson 4	FsD157	-	-	Niemcy	-
798 T>A	ekson 5	D245E	2B	15-30%	Austria, Czechy, Holandia, Niemcy, Stany Zjednoczone	-
1061 A>G	ekson 8	D333G	2B	15-30%	Niemcy, Wielka Brytania	-
<b>1186+97C&gt;G</b>	<b>intron 8</b>	-	-	-	-	<b>dotychczas nieopisana</b>
1291 G>A	ekson 9	A410T	5	5-15%	Algieria, Holandia, Japonia	-
<b>1327 T&gt;C</b>	<b>ekson 9</b>	<b>W422R</b>	-	-	-	<b>dotychczas nieopisana</b>
<b>1339 T&gt;C</b>	<b>ekson 9</b>	<b>S426P</b>	-	-	-	<b>dotychczas nieopisana</b>
<b>1359-3 del C</b>	<b>intron 9</b>	-	-	-	-	<b>dotychczas nieopisana</b>
<b>1516 G&gt;A</b>	<b>ekson 10</b>	<b>V485M</b>	-	-	-	<b>dotychczas nieopisana</b>
<b>1545 C&gt;T</b>	<b>ekson 10</b>	<b>N494N</b>	-	-	-	<b>dotychczas nieopisana</b>
<b>1586+12 C&gt;T</b>	<b>intron 10</b>	-	-	-	-	<b>dotychczas nieopisana</b>
1698-1704 del CACCCTA / ins GCCCAAT	ekson 11	ITL545MPN	-	-	Hiszpania	-
1705+1 G>A	intron 11	-	-	-	Dania	miejsce splicingowe
1706 -10 G>A	intron 11	-	1	-	Hiszpania, Włochy	miejsce splicingowe
1720 C>T	ekson 12	R553C	-	-	Niemcy	-



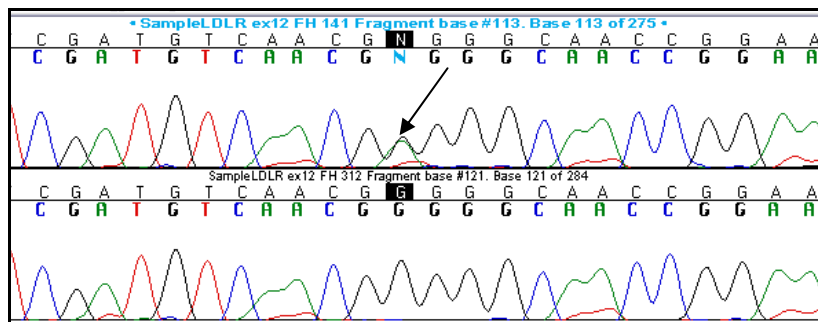
## 6. Wyniki

1775 G>A	ekson 12	G571E	2B	55-15%	Austria, Belgia, Niemcy, Polska, Rosja, Włochy	-
<b>1836 C&gt;T</b>	<b>ekson 12</b>	<b>A591A</b>	-	-	-	<b>dotychczas nieopisana</b>
<b>1846-2 A&gt;C</b>	<b>intron 12</b>	-	-	-	-	<b>dotychczas nieopisana, miejsce splicingowe</b>
<b>1920 C&gt;T</b>	<b>ekson 13</b>	<b>N619N</b>	-	-	-	<b>dotychczas nieopisana</b>
2000 G>A	ekson 14	C646Y	2A	<2%	Hiszpania, Holandia, Kanada (część francuskojęzyczna)	-
2056 C>T	ekson 14	Q665X	-	-	Polska	-
<b>2174 del C</b>	<b>ekson 15</b>	<b>FsS704</b>	-	-	-	<b>dotychczas nieopisana</b>
<b>2296 del AC</b>	<b>ekson 15</b>	<b>FsN745</b>	-	-	-	<b>dotychczas nieopisana</b>
<b>2312-71G&gt;A</b>	<b>intron 15</b>	-	-	-	-	<b>dotychczas nieopisana</b>
2390-2 A>G	intron 16	-	4B	-	Holandia	miejsce splicingowe
2483 A>G	ekson 17	Y807C	4A	<2%	Włochy, Syria	-

**Rycina 7** Przykładowe elektroforogramy przedstawiające mutacje genów *LDLR* oraz *APOB*.

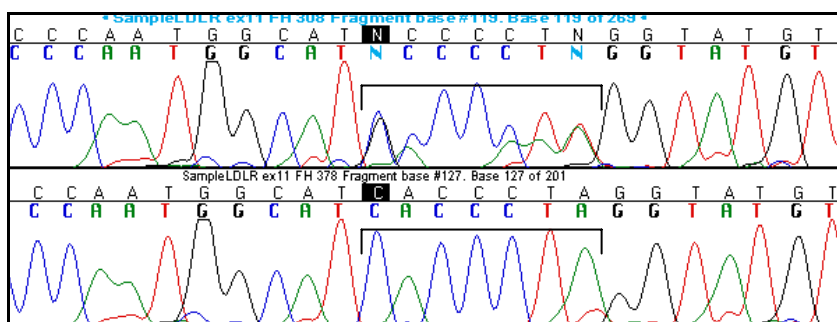
A - heterozygotyczna mutacja punktowa G571E (GGG>AGG) w eksonie 12 genu *LDLR* (pac. FH141)

B - sekwencja *wild type* (pac. FH312)



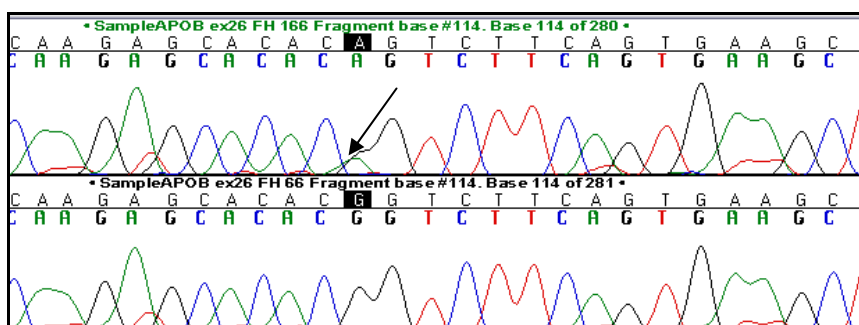
C – heterozygotyczna mutacja typu delekcja/insercja ITL545MPN (delCACCCTA/insGCCCAAT) w eksonie 11 genu *LDLR* (pac. FH308)

D - sekwencja *wild type* (pac. FH378)



E - heterozygotyczna mutacja punktowa R3500Q (CGG>CAG) genu *APOB* (pac. FH166)

F - sekwencja *wild type* (pac. FH66)



## 6.2. Porównanie rodzajów mutacji z poziomami poszczególnych frakcji cholesterolu w surowicy

Pacjenci w zależności od wyników badań molekularnych zostali podzieleni na sześć grup. Grupy nr 1-4 obejmowały pacjentów z mutacją genu *LDLR*. Przy czym w grupie pierwszej byli pacjenci z mutacjami typu *nonsense* (n=7), w grupie drugiej pacjenci z mutacjami typu *missense* (n=29), w grupie trzeciej z mutacjami zakłócającymi składanie transkryptu (n=14), a w grupie czwartej pacjenci z funkcjonalną mutacją w obu allelach genu *LDLR* (n=3). Grupa piąta obejmowała pacjentów z mutacją genu *APOB* (n=10), natomiast grupę szóstą stanowili pacjenci (n=33), u których nie wykryto mutacji zarówno w obrębie genu *LDLR* jak i *APOB* (tab. nr 15 i 16).

Mutacje genu *LDLR* klasyfikowane były jako mutacje typu *nonsense*, gdy w wyniku mutacji punktowej, delecji lub insercji powstawał kodon *stop* (W23X, Q133X, FsD157, C210X, Q665X, FsS704, FsN745).

Mutacje typu *missense* obejmowały wszystkie rodzaje mutacji prowadzące do zamiany jednego lub kilku aminokwasów w sekwencji produktu białkowego: G-2R, E10K, D36N, C88R, E119D, C176W (n=2), C210Y (n=2), D245E, D333G, A410T, W422R, S426P, V485M, ITL545MPN, R553C, G571E (n=11) oraz Y807C.

Do grupy trzeciej zakwalifikowano chorych z mutacjami w obrębie sekwencji intronowych (190+1 G>A, 313+1 G>A, 1705+1 G>A (n=3), 1706-10 G>A (n=2), 1359-3 del C/1586+12 C>T, 1846-2 A>C, 2390-2 A>G (n=2)) oraz mutacjami typu *silent* (N494N, A591A, N619N).

Grupa czwarta obejmowała tylko trzech pacjentów. U jednego z nich stwierdzono homozygotyczną mutację genu *LDLR*, a dwóch pozostałych scharakteryzowano jako heterozygoty złożone.

Grupę piątą stanowiło dziesięciu pacjentów, u których wykryto mutację R3500Q w obrębie genu *APOB*.

W grupie szóstej znajdowali się chorzy, u których nie stwierdzono występowania mutacji w obrębie genów *LDLR* i *APOB*.

Wszystkie dostępne dane biochemiczne dla poszczególnych grup pacjentów w poniższych tabelach przedstawiono jako mediany  $\pm$  SD.

**Tabela 15** Profil lipidowy pacjentów z FH AD w zależności od genotypu.

	Brak wykrytej mutacji <i>APOB</i> i <i>LDLR</i>	Mutacje <i>LDLR</i>	Mutacje <i>APOB</i>	p ANOVA rang
Cholesterol całkowity *	303 ± 184.7	322.5 ± 46.6**	257 ± 36.6	p<0.01
Cholesterol frakcji LDL*	241 ± 195.9	252 ± 44.5**	197 ± 31.8	p<0.05
Cholesterol frakcji HDL*	47 ± 16.9	49.5 ± 8.5**	49 ± 10.1	NS
Cholesterol frakcji VLDL*	16 ± 5.8	16 ± 6.3**	15 ± 4.3	NS
Stosunek LDL/HDL	5.32±8.0	4.89±1.1** 8.11±2.0***	4.29±0.9	p<0.05

\* wartości podano w mg/dl; NS - brak istotności statystycznej; \*\*osoby z heterozygotyczną mutacją genu *LDLR*; \*\*\*grupa osób z mutacją obu alleli genu *LDLR*

Istotne różnice między osobami, u których nie stwierdzono obecności mutacji, osobami z mutacją genu *LDLR* i genu *APOB* obserwowano dla poziomu cholesterolu całkowitego ( $p<0.001$ ) i poziomu LDL ( $p<0.001$ ). W grupie chorych z mutacją genu *LDLR* poziom cholesterolu całkowitego i LDL były znacząco wyższe w porównaniu do chorych z mutacją genu *APOB* (odpowiednio  $p<0.01$  i  $p<0.01$ ). Stwierdzono również wyższy poziom cholesterolu całkowitego i LDL u osób bez wykrytej mutacji w porównaniu do pacjentów z mutacją genu *APOB* (odpowiednio  $p<0.05$  i  $p<0.05$ ).

Stosunek cholesterolu frakcji LDL do frakcji HDL był zdecydowanie mniej korzystny w grupie osób z mutacją w obydwu allelach genu *LDLR* w porównaniu do grupy osób z heterozygotyczną mutacją tego genu (8.1 vs 4.9,  $p<0.05$ ) oraz w porównaniu do grupy osób z mutacją genu *APOB* (8.1 vs 4.3,  $p<0.1$ ).

**Tabela 16** Profil lipidowy pacjentów w zależności od rodzaju mutacji genu *LDLR*.

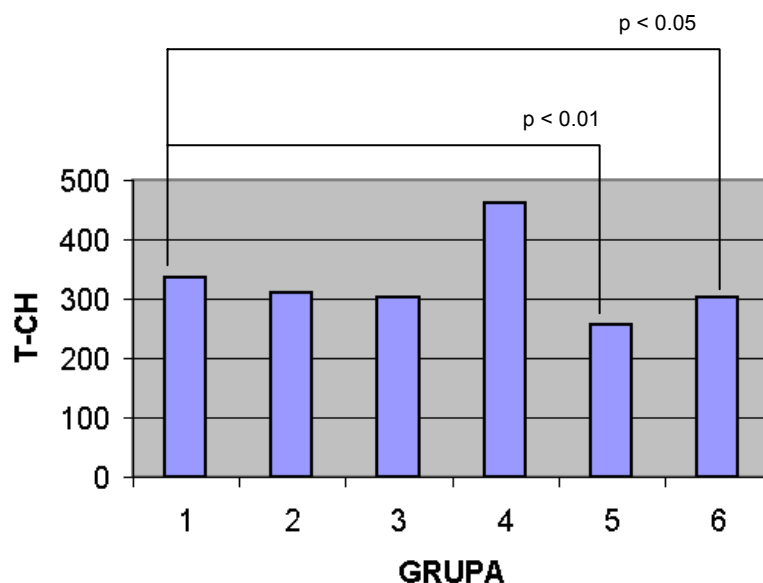
	Chorzy z mutacją genu <i>LDLR</i> (n=53)				p ANOVA rang
	typu <i>nonsense</i> (n=7)	typu <i>missense</i> i del/ins w ramce odczytu (n=29)	mutacja w intronie i typu <i>silent</i> (n=14)	homozygota i heterozygoty złożone (n=3)	
Cholesterol całkowity *	335 ± 23.4	310 ± 30.5	303 ± 29.9	462 ± 57.4	NS
Cholesterol frakcji LDL *	274 ± 21.8	246 ± 33.2	235 ± 31.3	387 ± 62.3	NS
Cholesterol frakcji HDL *	51 ± 6.7	49 ± 7.3	50 ± 7.7	44 ± 9.4	NS
Cholesterol frakcji VLDL *	17 ± 3.6	16 ± 4.2	14 ± 9.8	27 ± 10.8	NS

\* wartości podano w mg/dl; NS - brak istotności statystycznej

Analizując znaczenie poszczególnych rodzajów mutacji w obrębie genu *LDLR* najwyższe wartości cholesterolu całkowitego i LDL stwierdzono w grupie heterozygot złożonych, jednak obserwowane różnice nie były istotne statystycznie.

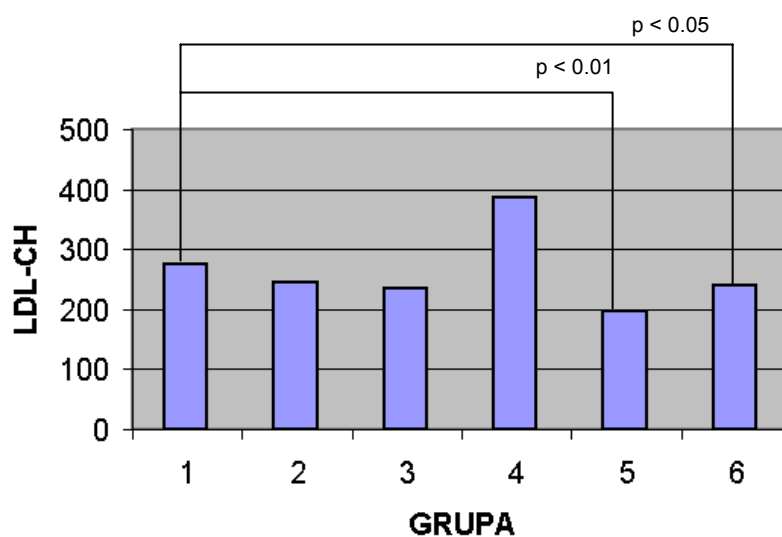
Poziomy cholesterolu całkowitego i LDL w grupie pacjentów z mutacją typu *nonsense* genu *LDLR* były znacząco wyższe w porównaniu do chorych z mutacją genu *APOB* (odpowiednio  $p < 0.01$  i  $p < 0.01$ ) i osób bez stwierdzonej mutacji (odpowiednio  $p < 0.05$  i  $p < 0.05$ ) (**wykres nr 1 i 2**). Podobnie pacjenci z mutacją w obydwu allelach genu *LDLR* charakteryzowali się wyższym poziomem cholesterolu całkowitego i LDL w porównaniu do chorych z mutacją genu *APOB* (odpowiednio  $p < 0.01$  i  $p < 0.01$ ) (**tab. nr 17 i 18**).

**Wykres 1** Poziom cholesterolu całkowitego w poszczególnych grupach pacjentów.



grupa 1 – pacjenci z mutacją *LDLR* typu *nonsense* ; grupa 2 – pacjenci z mutacją *LDLR* typu *missense*; grupa 3 – pacjenci z mutacją *LDLR* w sekwencji intronowej oraz typu *silent*; grupa 4 – pacjenci z mutacją w obu allelach *LDLR*; grupa 5 – pacjenci z mutacją *APOB*; grupa 6 – pacjenci bez mutacji *APOB* i *LDLR* .

**Wykres 2** Poziom cholesterolu frakcji LDL w poszczególnych grupach pacjentów.



grupa 1 – pacjenci z mutacją *LDLR* typu *nonsense* ; grupa 2 – pacjenci z mutacją *LDLR* typu *missense*; grupa 3 – pacjenci z mutacją *LDLR* w sekwencji intronowej oraz typu *silent*; grupa 4 – pacjenci z mutacją w obu allelach *LDLR*; grupa 5 – pacjenci z mutacją *APOB*; grupa 6 – pacjenci bez mutacji *APOB* i *LDLR* .

**Tabela 17** Częstość występowania określonych genotypów w grupach pacjentów z poziomami cholesterolu całkowitego poniżej lub powyżej 300 mg/dl w surowicy krwi.

		Poziom cholesterolu całkowitego $\geq 300$ mg/dl	Poziom cholesterolu całkowitego $< 300$ mg/dl	OD dla cholesterolu całkowitego $\geq 300$ mg/dl p
Chorzy z mutacją genu <i>LDLR</i>	typu <i>nonsense</i> (n=7)	100% (n=7)	0% (n=0)	-
	typu <i>missense</i> i <i>del/ins</i> w ramce odczytu (n=29)	59% (n=17)	41% (n=12)	OR 1.08 (95%CI 0.44-2.65, p - NS)
	Mutacja w intronie i typu <i>silent</i> (n=14)	50% (n=7)	50% (n=7)	OR 0.71 (95%CI 0.22-2.24, p - NS)
	Homozygoty i heterozygoty złożone (n=3)	100% (n=3)	0% (n=0)	-
Chorzy z mutacją genu <i>APOB</i> (n=10)		10% (n=1)	90% (n=9)	OR 0.07 (95%CI 0.01-0.57, p<0.05)
Chorzy bez wykrytej mutacji genów <i>APOB</i> i <i>LDLR</i> (n=33)		61% (n=20)	39% (n=13)	OR 1.23 (95%CI 0.52-2.93, p - NS)

OR – ang. *odds ratio*; NS – brak istotności statystycznej

Wśród osób z poziomem cholesterolu całkowitego w surowicy wynoszącym 300 mg/dl lub więcej stwierdzono istotnie niższą częstość występowania mutacji genu *APOB* (**tab. nr 17**).

**Tabela 18** Częstość występowania określonych genotypów w grupach pacjentów z poziomami cholesterolu frakcji LDL poniżej lub powyżej 250 mg/dl w surowicy krwi.

		Poziom cholesterolu całkowitego $\geq 250$ mg/dl	Poziom cholesterolu całkowitego $< 250$ mg/dl	OD dla cholesterolu frakcji LDL $\geq 200$ mg/dl p
Chorzy z mutacją genu <i>LDLR</i>	typu <i>nonsense</i> (n=7)	100% (n=7)	0% (n=0)	-
	typu <i>missense</i> i del/ins w ramce odczytu (n=29)	48% (n=14)	52% (n=15)	OR 1.22 (95%CI 0.51-2.96, p - NS)
	Mutacja w intronie i typu <i>silent</i> (n=14)	36% (n=5)	64% (n=9)	OR 0.64 (95%CI 0.20-2.12, p - NS)
	Homozygoty i heterozygoty złożone (n=3)	100% (n=3)	0% (n=0)	-
Chorzy z mutacją genu <i>APOB</i> (n=10)		10% (n=1)	90% (n=9)	OR 0.12 (95%CI 0.01-0.99, p<0.05)
Chorzy bez wykrytej mutacji genów <i>APOB</i> i <i>LDLR</i> (n=33) (n=33)		39% (n=13)	61% (n=20)	OR 0.72 (95%CI 0.30-1.70, p - NS)

OR – ang. *odds ratio*; NS – brak istotności statystycznej

Wśród osób z poziomem cholesterolu LDL w surowicy krwi wynoszącym 250 mg/dl lub więcej stwierdzono istotnie niższą częstość występowania mutacji genu *APOB* (**tab. nr 18**).



## 7. DYSKUSJA

Hipercholesterolemia rodzinna jest chorobą jednogenową dziedziczną w sposób autosomalny dominujący. Obraz kliniczny FH charakteryzuje się podwyższonym poziomem cholesterolu LDL w surowicy krwi, występowaniem żółtaków oraz pozytywnym wywiadem rodzinnym w kierunku przedwczesnej choroby wieńcowej. Fenotyp FH wiązano początkowo wyłącznie z obecnością mutacji w obrębie genu receptora LDL (hipercholesterolemia, AD, typ IIA / FH). Jednakże wyniki kolejnych badań wykazały, że hipercholesterolemia może być również spowodowana obecnością mutacji w obrębie genu apolipoproteiny B-100 (hipercholesterolemia, AD, typ IIB / FDB), a także genu *PCSK9* (hipercholesterolemia, AD, 3 / FH3). Stwierdzono również, że jak i w przypadku innych chorób dziedziczonych w sposób autosomalny dominujący, objawy hipercholesterolemii są znacznie cięższe u homozygot niż u heterozygot.

Częstość występowania heterozygot FH i FDB w większości populacji europejskich waha się od 1/500 do 1/1000 żywych urodzeń oraz 1/2500 w przypadku FH3 [96]. Przyjmując, że w Polsce 0.6% populacji to osoby z heterozygotycznymi mutacjami genu *LDLR* oraz *APOB* liczbę chorych z hipercholesterolemią dziedziczną w sposób autosomalny dominujący można oszacować na ok. 240 000 [5, 30].

*Częstość występowania mutacji genów LDLR i APOB w populacji chorych na hipercholesterolemię dziedziczną w sposób autosomalny dominujący.*

W zależności od ośrodka badawczego częstość występowania mutacji genu *LDLR* wśród chorych z objawami hipercholesterolemii rodzinnej wynosi od 30 do 80% [16, 28, 31, 34, 47, 69, 77, 79, 87, 123]. Tak znaczące rozbieżności mogą wynikać z błędnej diagnostyki klinicznej lub być efektem stosowania jednego spośród trzech, nieco odmiennych kryteriów rozpoznawania hipercholesterolemii rodzinnej opracowanych przez *MedPed Program* (Stany Zjednoczone), *The Simon Broome Register Group* (Wielka Brytania) oraz *The Dutch Lipid Clinic Network* (Holandia). Ponadto, selekcja pacjentów do badań molekularnych może znacząco wpływać

na uzyskiwaną wartość wykrywalności mutacji. Otóż, do niektórych badań zaklasyfikowano wyłącznie osoby z rozpoznaniem klinicznym FH określanym jako pewne, co powodowało uzyskiwanie zdecydowanie wyższej częstości wykrywania mutacji w obrębie genu *LDLR*. Dodatkowo, stosowanie molekularnych metod diagnostycznych o różnej czułości może również mieć wpływ na częstość wykrywania mutacji genu *LDLR*.

Do przedstawionych badań zostało włączonych 96 dzieci, u których zgodnie z wytycznymi WHO, rozpoznanie kliniczne FH określono jako pewne lub wysoce prawdopodobne. W badanej grupie, obecność mutacji w obrębie genu *LDLR* stwierdzono u 55% (n=53) probantów. Uzyskana wartość jest zgodna z wynikami uzyskanymi przez Wang i wsp., którzy stwierdzili obecność mutacji tego genu u 57% badanych pacjentów [123]. Zarówno w niniejszej pracy jak i badaniach przedstawionych przez Wang i wsp. analizę molekularną poszczególnych eksonów i sekwencji promotorowej genu *LDLR* przeprowadzono przy użyciu sekwencjonowania bezpośredniego. Technika ta pozwala na wykrycie wszystkich rodzajów mutacji punktowych, zarówno zamiany nukleotydu jak i delecji lub insercji kilku lub kilkunastu nukleotydów. Sekwencjonowanie bezpośrednie nie pozwala jednak na wykrycie dużych rearanżacji strukturalnych genów. Na podstawie uprzednio przeprowadzonych badań wiadomo, że w większości populacji duże delecje jednego lub kilku eksonów genu *LDLR* stanowią od 2 do 10% mutacji [16, 51, 56, 71]. W niektórych populacjach, gdzie widoczny jest efekt założyciela, procentowy udział tego typu mutacji może być dużo wyższy. Przykładem jest populacja francuskojęzycznych Kanadyjczyków, w której mutacja *FH French Canadian* – 1 (delecja >15 kb) występuje aż u 60% heterozygotycznych pacjentów z FH. Natomiast w Finlandii obecność mutacji *FH Helsinki* (delecja eksonów 15-18) stwierdzono u około 35% pacjentów z FH [40].

Dotychczas w polskiej populacji badania mutacji genu *LDLR* przeprowadzono zaledwie w grupie 30 rodzin. W grupie tej, Górski i wsp. znaleźli jedną dużą delecję obejmującą eksony 7-8 genu *LDLR* (delecja ok. 1000 bp). W niniejszych badaniach tylko jeden pacjent (FH373) został zbadany w kierunku dużych rearanżacji genu *LDLR*. Klinicznie, probant wykazywał objawy homozygotycznej postaci FH. Badanie techniką

sekwencjonowania wykazało jednak obecność wyłącznie heterozygotycznej mutacji G571E w eksonie 12. Dodatkowe badanie przeprowadzone przy użyciu techniki MLPA, umożliwiło wykrycie drugiej mutacji - delecji eksonów 1-2 genu *LDLR*.

Na podstawie powyższych wyników można zatem stwierdzić, że duże rearanżacje genu *LDLR* są obecne także w polskiej populacji chorych z FH. Jednak w celu określenia ich rodzaju oraz rzeczywistej częstości występowania konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych badań.

#### *Charakterystyka mutacji genu LDLR*

Do chwili obecnej na całym świecie opisano ponad 800 rodzajów mutacji genu *LDLR*. Zlokalizowane są one na całej długości genu, jednak największą różnorodność mutacji stwierdza się w obrębie eksonu 4. W badanej grupie 96 pacjentów wykryto 39 rodzajów mutacji w obrębie genu *LDLR*. Zgodnie z wynikami uprzednio opublikowanych badań [3], również w niniejszej pracy najwięcej rodzajów mutacji znajdowało się w eksonie 4 tego genu (n=7). Pozostałe mutacje rozłożone były prawie równomiernie na długości całej sekwencji kodującej genu *LDLR*, przy czym obecności mutacji nie stwierdzono w obrębie eksonów 3, 6, 7, 16 i 18. Ponadto, aż 10 (27%) rodzajów mutacji znaleziono w obrębie sekwencji intronowych (intron: 2, 3, 8, 9, 10, 11, 12, 15 oraz 16). W badanej grupie nie wykryto żadnej mutacji w regionie promotorowym genu.

W przeprowadzonym badaniu znalezione mutacje punktowe to zarówno tranzycje, transwersje, jak i delecje lub insercje kilku nukleotydów. Zdecydowanie przeważały mutacje typu substytucji, które stanowiły aż 85% (n=33) wykrytych mutacji. Wśród nich najwięcej było mutacji typu *missense* (n=17, 51.5%). Mutacje typu *nonsense* stanowiły 12.1% (n=4), natomiast mutacje typu *silent* (9.1%) wykryto w trzech przypadkach. Dziewięć mutacji (27.3%) typu substytucji zlokalizowanych było w obrębie sekwencji intronowych.

W badanej grupie chorych mutacje typu delecje i insercje wykryto w sześciu przypadkach. W dwóch przypadkach stwierdzono obecność mutacji będących efektem współwystępowania delecji z insercją takiej samej

liczby nukleotydów (C88R, ITL545MPN). Mutacje te, nie powodują zatem przesunięcia ramki odczytu, a skutkują wstawieniem odpowiednio jednego lub trzech nieprawidłowych aminokwasów do produktu białkowego. Pozostałe trzy mutacje to typowe delecje (FsS704, FsN745) lub insercje (FsD157) kilku nukleotydów, które spowodowały przesunięcie ramki odczytu i powstanie kodonu *stop*, odpowiednio w 4, 15 i 31 aminokwasie licząc od miejsca mutacji. Zdecydowana większość z wykrytych mutacji typu delecja/insercja (n=5, 83%) zlokalizowana była w obrębie eksonów. Jednak w jednym przypadku obecność delecji stwierdzono w obrębie intronu 9 (1359-3 del C). Prawdopodobnie delecja ta zmienia miejsce splicingowe przez co prowadzi do zaburzenia procesu składania transkryptu.

Większość ze znalezionych mutacji w niniejszych badaniach została uprzednio opisana w literaturze. Interesujący jest fakt, że mutacje te zostały opisane zarówno w populacjach krajów sąsiadujących z Polską jak i populacjach geograficznie odległych, jak na przykład populacja afrykańska czy kanadyjska pochodzenia francuskiego. Najczęściej występująca w badanej grupie chorych mutacja G571E została opisana w populacjach niemieckiej, austriackiej, belgijskiej, włoskiej oraz rosyjskiej [128, [www.ucl.ac.uk/fh/](http://www.ucl.ac.uk/fh/), [www.umd.necker.fr](http://www.umd.necker.fr)]. Natomiast mutacja w intronie 3: 313+1 G>A, wykryta tylko u jednego pacjenta, jest najczęstszą mutacją w populacji norweskiej, a trzecią co do częstości występowania w populacji niemieckiej [23].

W niniejszym badaniu wykryto aż 16 (41%) dotychczas nieopisanych w literaturze mutacji genu *LDLR*: E10K, D36N, C176W, W422R, S426P, V485M, N494N, A591A, N619N, FsS704, FsN745, intron 8:1186+97 C>G, intron 9: 1359-3 del C, intron 10: 1586+12 C>T, intron 12: 1846-2 A>C, intron 15:2312-71 G>A. W grupie tej można wyróżnić zarówno mutacje znajdujące się w obrębie sekwencji eksonów jak i intronów. Wiele danych wskazuje na zaangażowanie tych mutacji w patogenezę FH, gdyż większość z nich było jedynymi znalezionymi zmianami w obrębie całej sekwencji kodującej genu *LDLR*. Zarówno mutacja FsN745 (delecja AC) jak i mutacja FsS704 (delecja C) spowodowała powstanie kodonu *stop* na skutek przesunięcia ramki odczytu. Jest to bezpośredni dowód na to, że mutacje te są zmianami funkcjonalnymi. Wysoce prawdopodobne jest również to,

że dwie kolejne mutacje: C176W i W422R, powodują zaburzenia aktywności LDL receptora. W literaturze zostały bowiem opisane funkcjonalne mutacje w obrębie powyższych kodonów, aczkolwiek powodowały one wprowadzenie innych aminokwasów do białka receptora. W przypadku kodonu 176 opisano mutację prowadzącą do zamiany cysteiny (C) na argininę (R) (C176R), co powoduje spadek aktywności receptora LDL do 20% [www.ucl.ac.uk/fh/, www.umd.necker.fr]. Natomiast w przypadku kodonu 422 zostały dotychczas opisane dwa rodzaje mutacji prowadzące do zamiany tryptofanu (W) na serynę (S) lub cysteinę (C). Mutacja W422C powoduje obniżenie aktywności receptorów LDL do ok. 5-15% [www.ucl.ac.uk/fh/, www.umd.necker.fr].

Większość z mutacji, których wynikiem jest zamiana aminokwasu w produkcie białkowym wpływa na jego funkcjonalność. Można przypuszczać, że i pozostałe mutacje typu *missense* zakłócają prawidłowe funkcjonowanie receptora LDL. W ostatnich latach stwierdzono, że nawet mutacje typu *silent* mogą zaburzać prawidłową ekspresję genów. Do tej pory opisano już ponad 20 genów, w których to mutacje typu *silent* powodują zaburzenia w procesie składania transkryptu [13].

Osiem z nieopisanych dotąd mutacji intronowych wykrytych w prezentowanej pracy zlokalizowanych jest w bardzo bliskim sąsiedztwie eksonów (pozycja -2, -3 i +12) co prawdopodobnie powoduje zaburzenia prawidłowego składania transkryptu genu *LDLR*. W opublikowanej ostatnio pracy Tuffery-Giraud i wsp. opisują mutacje znajdujące się pośrodku sekwencji intronowych genu dystrofiny (DMD), które zaburzą prawidłowe składanie transkryptu tego genu prowadząc do dystrofii mięśniowej typu Beckera [117]. Możliwe, że podobny mechanizm dotyczy również genu *LDLR*. Tym samym opisane w tej pracy mutacje w intronie 8 i 15 genu *LDLR* mogą okazać się patogenne dla FH. Aby definitywnie określić efekt mutacji intronowych konieczne jest przeprowadzenie analizy mRNA tego genu. Z kolei, aby potwierdzić związek wspomnianych mutacji z podłożem molekularnym hipercholesterolemii konieczne jest przeprowadzenie badań *in vitro* receptorów LDL i/lub badań kosegregacji w rodzinach chorych.

Za wyjątkiem kilku populacji, takich jak Kanadyjczycy pochodzenia francuskiego [74], libańscy chrześcijanie [73], Druzowie [70], Finowie [63]

i Afrykanerzy [65], w których mała liczba mutacji odpowiada za zdecydowaną większość przypadków FH, w pozostałych krajach Europy i Ameryki Północnej nie stwierdzono występowania efektu założyciela. Hipoteza, że polska populacja jest bardziej heterogenna pod względem rodzajów mutacji genu *LDLR* niż populacje, w których występuje efekt założyciela wydaje się wysoce prawdopodobna. Do chwili obecnej zostały opublikowane wyniki tylko jednej pracy opisującej spektrum mutacji genu *LDLR* w polskiej populacji. Badania Górskiego i wsp. objęły grupę 30 probantów [41]. Wykrycie szerokiego spektrum mutacji genu *LDLR*, zarówno przez Górskiego i wsp. jak i w badanej grupie 96 pacjentów, potwierdziło powyższą hipotezę. Zważywszy na fakt, że polska populacja nigdy nie była „genetycznie” odizolowana nie jest zaskoczeniem, że w populacji tej stwierdza się obecność mutacji w obrębie genu *LDLR* charakterystycznych dla populacji krajów ościennych.

W przedstawionym badaniu mutacje genu *LDLR* stwierdzono w grupie 53 (55%) pacjentów. W badanej grupie tylko dwie z wykrytych mutacji (G571E, Q665X), zostały uprzednio opisane przez Górskiego i wsp. [41]. W prezentowanej pracy najczęściej powtarzającą się mutacją była mutacja punktowa G571E, której obecność stwierdzono aż u 14 probantów (13.6%). Kolejna mutacja, w intronie 11: 1705+1G>A, wystąpiła u trzech probantów (2.9%). Natomiast mutacje C176W, C210Y i w intronie 16: 2390-2 A>G wykryto u dwóch probantów (1.9%). Łącznie mutacje te występowały w 22.2% przypadków FH AD. Do chwili obecnej wyniki badań Górskiego i wsp. oraz własnych pozwalają na stwierdzenie, że w polskiej populacji aż 48 rodzajów mutacji genu *LDLR* (w tym dwie duże delecje) leży u podłoża hipercholesterolemii rodzinnej. Wskazuje to na dużą heterogenność genetyczną polskiej populacji chorych na FH.

Jak już wspomniano powyżej, aby dokładnie określić rodzaj i częstość występowania mutacji genu *LDLR* w polskiej populacji, konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań obejmujących również analizę dużych rearanżacji tego genu na większej liczbie pacjentów z FH. Przeprowadzenie takich badań może spowodować wykrycie nowych mutacji a także zmienić częstości występowania wykrytych już mutacji w obrębie genu *LDLR*. Wysoce prawdopodobne jest jednak to, że mutacja G571E pozostanie

najczęstszą mutacją punktową w polskiej populacji jak również, że pewna pula mutacji będzie występowała z niską częstością (kilka procent). Jednak zdecydowana większość mutacji pozostanie specyficzna tylko dla poszczególnych rodzin. Taki obraz podłoża molekularnego FH występuje także w innych populacjach europejskich [23].

#### *Charakterystyka polimorfizmów genu LDLR*

W badanej grupie wykryto 31 rodzajów polimorfizmów. Osiem z nich zlokalizowanych jest w obrębie sekwencji kodującej genu *LDLR*, a 23 polimorfizmy wykryto w sekwencjach intronowych. Większość polimorfizmów zlokalizowanych w obrębie sekwencji kodującej nie powoduje zmiany aminokwasu w produkcie białkowym. Do chwili obecnej tylko polimorfizm A370T powoduje zmianę aminokwasu w białku receptora LDL. Polimorfizm ten zlokalizowany jest w obrębie eksonu 8 i polega na zamianie guaniny na adeninę w pozycji 1184. Frikke-Schmidt i wsp. na podstawie wyników przeprowadzonych badań uważają, że u homozygot TT istnieje trzy razy większe ryzyko wystąpienia udaru mózgu w porównaniu do homozygot AA i heterozygot AT [32]. W prezentowanej pracy polimorfizm ten wykryto u pięciu probantów. Wszyscy pacjenci byli heterozygotami w tym locus. Polimorfizmy genu *LDLR* występują zarówno u pacjentów z mutacją w tym genie jak i u pacjentów bez mutacji. Dotychczas brak jest informacji o istnieniu ewentualnego związku pomiędzy występowaniem określonych polimorfizmów a obecnością mutacji w obrębie genu *LDLR*. Ponadto, nie stwierdzono zależności pomiędzy polimorfizmem a zmianą aktywności produktu białkowego.

#### *Charakterystyka mutacji genu APOB*

W grupie pacjentów z krajów Europy Zachodniej, z fenotypem klinicznym hipercholesterolemii rodzinnej od 2 do 5% stanowią pacjenci z mutacją genu *APOB* [57, 46, 75, 79, 112]. Wyjątek stanowią populacje: fińska [44] i rosyjska [102], w których z reguły nie wykrywa się mutacji genu *APOB* oraz populacja hiszpańska, gdzie mutacje genu *APOB* wykrywa u ok. 1.4% pacjentów [14]. Odstępstwem są również populacje: belgijska

i szwajcarska, gdzie mutacje *APOB* opisywane są odpowiednio aż u 8 i 12% chorych z objawami FH [67, 84].

Do chwili obecnej opublikowano tylko dwie prace, które przedstawiały wyniki badań genu *APOB* w polskiej populacji chorych z hipercholesterolemią. Górski i wsp. opisali charakterystyczną mutację R3500Q genu *APOB* u pięciu z 30 badanych pacjentów (17%) [41]. Dla porównania, Bednarska-Makaruk i wsp. w grupie 65 pacjentów z klinicznym rozpoznaniem FH obecność mutacji genu *APOB* stwierdzili u siedmiu pacjentów (10.8%) [5]. W sześciu przypadkach była to wspomniana mutacja R3500Q, natomiast w jednym nieopisana dotychczas mutacja T3492I. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań u chorych z hipercholesterolemią (cholesterol LDL  $\geq 160$  mg/dl), Bednarska-Makaruk i wsp. stwierdzili, że częstość występowania heterozygot FBD w polskiej populacji jest zdecydowanie wyższa niż 1/500 i wynosi 1/250 [5]. W niniejszej pracy wśród 96 probantów mutacje genu *APOB* wykryto u 10 chorych co stanowi 10.4%. Uzyskana wartość jest zatem bardzo zbliżona do wyników badań uzyskanych przez Bednarską-Makaruk i wsp. We wszystkich dotychczas przeprowadzonych badaniach w polskiej populacji mutacja R3500Q była jedyną wykrytą mutacją genu *APOB* albo stanowiła zdecydowaną większość (6/7 mutacji - 86%). Na podstawie wyników, pochodzących zarówno z danych literaturowych jak i badań własnych, można stwierdzić, że w polskiej populacji mutacja R3500Q genu *APOB* związana z FDB stanowi istotną przyczynę hipercholesterolemii. Dlatego też konieczne jest przeprowadzenie analizy tego fragmentu genu *APOB* u wszystkich polskich pacjentów z objawami FH.

#### *Homozygoty oraz heterozygoty złożone*

Częstość występowania homozygot a także heterozygot złożonych genu *LDLR* ocenia się na 1/1 000 000. W badanej grupie zidentyfikowano jedną homozygotę (pac. FH30) oraz dwie heterozygoty złożone (pac. FH60 i FH373). Na podstawie przeprowadzonych badań biochemicznych oraz aktywności receptorów LDL pacjent FH373 uważany był za homozygotę. Analiza genu *LDLR* metodą sekwencjonowania pozwoliła na wykrycie tylko jednej heterozygotycznej mutacji w eksonie 12 – G571E.



Przeprowadzenie dodatkowej analizy genu *LDLR* z wykorzystaniem techniki MLPA (J.C. Defesche) umożliwiło wykrycie drugiej mutacji polegającej na delecji 20 kb obejmującej eksony 1-2 (FH Siracusa-3) w obrębie genu *LDLR*. We wszystkich powyższych przypadkach w przynajmniej jednym allelu stwierdzono obecność najczęstszej dla polskiej populacji mutacji punktowej w eksonie 12 – G571E. Wyniki analizy molekularnej członków rodzin wspomnianych pacjentów zostały przedstawione w rozdziale **Załączniki (tab. nr 13)**.

#### *Związek pomiędzy rodzajami mutacji a poziomami poszczególnych frakcji cholesterolu w surowicy pacjentów*

Na podstawie dotychczas opublikowanych wyników badań wiadomo, że poziom cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL jest znacznie wyższy u pacjentów z mutacjami w obydwu allelach genu *LDLR* w porównaniu do pacjentów z heterozygotyczną mutacją tego genu [40, 60]. Przeprowadzone badania potwierdzają występowanie tej zależności.

W badanej grupie pacjentów z heterozygotyczną mutacją genu *LDLR*, chorzy z mutacją powodującą powstanie kodonu *stop* miały stosunkowo wyższe poziomy cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL w porównaniu z grupami osób z mutacją typu *missense* lub mutacjami zakłócającymi składanie transkryptu. Obserwacje te są zgodne z wynikami prac innych autorów [35, 42, 116, 122].

Real i wsp. [97] dodatkowo przeprowadzili podział mutacji typu *missense* genu *LDLR* na dwie podgrupy: mutacje w obrębie domeny wiążącej ligand (ekson 4) oraz mutacje zlokalizowane poza obrębem tej domeny. Porównanie wartości cholesterolu całkowitego jak i frakcji LDL w powyższych grupach pacjentów oraz grupie osób z mutacją typu *nonsense* wykazało, że najwyższe wartości poziomów cholesterolu obserwuje się u pacjentów z mutacją typu *missense* zlokalizowaną w obrębie eksonu 4 genu *LDLR*. Prezentowane wyniki potwierdzają istnienie tej zależności.

Dotychczas opublikowane wyniki badań porównujące grupy chorych z FH i FBD wskazują na łagodniejszy obraz kliniczny hipercholesterolemii u pacjentów z FDB w porównaniu do pacjentów z FH [42, 45, 85, 91]. Również w niniejszej pracy zaobserwowano, że pacjenci z mutacją genu

*APOB* mieli niższe poziomy cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL w surowicy niż pacjenci z mutacją genu *LDLR*.

Obecnie uważa się, że nie poziom cholesterolu całkowitego, ale stosunek liczbowy LDL do HDL daje lepszy obraz ryzyka wystąpienia choroby wieńcowej. Stosunek cholesterolu LDL do cholesterolu HDL nie powinien przekraczać wartości 4.0 [nadciśnienie tętnicze: [http://www.nadcisnienie.pl/pacjenci/zyc\\_dluzej/3.html](http://www.nadcisnienie.pl/pacjenci/zyc_dluzej/3.html)]. W przeprowadzonych badaniach stosunek cholesterolu frakcji LDL do frakcji HDL był zdecydowanie mniej korzystny w grupie osób, u których stwierdzono obecność mutacji w obydwu allelach genu *LDLR* w porównaniu do grupy osób z heterozygotyczną mutacją tego genu (8.1 vs 4.9). W przypadku grupy osób z mutacją genu *APOB* stosunek ten wynosił 4.3. Ponadto Vohl i wsp. zaobserwowali, że u pacjentów z mutacją genu *LDLR* typu *null* wartość stosunku cholesterolu LDL do HDL była mniej korzystna niż w przypadku osób z mutacją typu *missense*. Obserwacje te zostały potwierdzone przez badania przeprowadzone w innych niezależnych ośrodkach [120]. W badanej grupie można również zaobserwować wspomnianą tendencję, przy czym najwyższą wartość stosunku cholesterolu LDL do HDL stwierdzono w grupie osób z mutacją typu *nonsense* (6.1), w porównaniu z grupą osób z mutacją typu *missense* (4.9) oraz z mutacją w obrębie sekwencji intronowej genu *LDLR* (4.9).

Obserwowane wysokie poziomy cholesterolu w grupie osób bez mutacji genów *LDLR* lub *APOB* mogą wynikać z kilku przyczyn. Po pierwsze pacjenci ci mogą mieć defekt genu *LDLR* polegający na dużych rearanżacjach w obrębie tego genu, których to zmian nie można było wykryć techniką sekwencjonowania. Po drugie w niniejszej pracy analizowane były wyłącznie eksony z przylegającymi niedużymi fragmentami intronów genu *LDLR*, a zatem nie można wykluczyć również występowania mutacji intronowych zlokalizowanych dalej od połączeń ekson/intron a mogących zakłócać prawidłowe składanie transkryptu. Po trzecie pacjenci ci mogą mieć zupełnie inne podłoże genetyczne hipercholesterolemii, na przykład mutacje genu *PCSK9* jak również innych nieopisanych dotąd genów.

*Diagnostyka molekularna pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną*

Kryteria kliniczne takie jak wywiad rodzinny czy badania biochemiczne pomagają we wczesnej diagnostyce FH (**tab. nr 2**). Nie pozwalają one jednak na postawienie ostatecznego rozpoznania. Na podstawie powyższych kryteriów często szczególnie trudne jest postawienie ostatecznej diagnozy u młodszych pacjentów. Między innymi wynika to z faktu, że charakterystyczne objawy takie jak żółtaki rozwijają się dopiero w wieku późniejszym, w drugiej – trzeciej dekadzie życia. W literaturze opisane są także przypadki heterozygotycznej postaci FH u dzieci z prawidłowym stężeniem cholesterolu całkowitego [116].

Molekularna diagnostyka genów związanych z hipercholesterolemią staje się zatem jedynym i uznanym na świecie standardem rozpoznawania tej choroby u pacjentów, szczególnie tych z niejednoznacznymi objawami klinicznymi. Diagnostyka molekularna pozwala na skuteczną i wiarygodną identyfikację osób chorych oraz na szybki i efektywny *screening* członków ich rodzin [30]. Szybka i jednoznaczna diagnoza umożliwia zaoferowanie leczenia, które im wcześniej jest rozpoczęte tym bardziej korzystne dla pacjenta [30].

W Polsce jak dotąd diagnostyka molekularna hipercholesterolemii miała jedynie wymiar eksperymentalny. W prezentowanej pracy przedstawiono wyniki badań obejmujące największą z dotychczas opublikowanych grup chorych z FH AD w Polsce. Pozwoliły one na wstępne poznanie rodzaju i częstości występowania mutacji genu *LDLR* i *APOB* będących przyczyną rozwoju FH AD.

Prowadząc diagnostykę molekularną hipercholesterolemii rodzinnej w polskiej populacji konieczne jest przeprowadzenie analizy zarówno genu *LDLR* jak i fragmentu eksonu 26 genu *APOB*. Gen *LDLR* powinien być nie tylko analizowany metodą sekwencjonowania bezpośredniego, ale również przy użyciu techniki pozwalającej wykryć duże rearanżacje tego genu. Ponadto, u pacjentów, u których nie stwierdzono mutacji w obrębie sekwencji promotorowej, eksonów oraz przylegających fragmentach intronów należałoby przeprowadzić analizę genu *LDLR* na poziomie mRNA. Badania te pozwolą na wykrycie ewentualnych mutacji intronowych, które powodują zaburzenia składania transkryptu. Diagnostyka molekularna

hipercholesterolemii rodzinnej powinna także zostać rozszerzona o analizę genu *PCSK9*.

W przyszłości wyniki kolejnych badań mogą mieć zasadniczy wpływ na opracowanie standardów diagnostyki, prewencji i leczenia pacjentów z hipercholesterolemią pierwotną w Polsce. Powinno to w zdecydowany sposób przyczynić się do obniżenia śmiertelności pacjentów z objawami FH. Obecnie w grupie tych chorych śmiertelność wynosi nawet 50% u osób poniżej 50 roku życia. A zatem diagnostyka molekularna mutacji genów *LDLR*, *APOB* oraz *PCSK9* umożliwi objęcie rodzin z hipercholesterolemią dziedziczną w sposób autosomalny dominujący poradnictwem genetycznym oraz wczesną profilaktyką co w wysokim stopniu może je uchronić przed klinicznymi konsekwencjami hipercholesterolemii rodzinnej.

## 8. WNIOSKI

1. Polska populacja chorych na hipercholesterolemię rodzinną (FH AD) jest heterogenna genetycznie i posiada odmienne spektrum mutacji genu *LDLR* w porównaniu do innych populacji.
2. Częstość występowania mutacji punktowych genu *LDLR* u chorych na FH AD w Polsce jest wysoka i występuje w ponad 55% przypadków. Najczęściej obserwowaną zmianą jest mutacja G571E w eksonie 12 (15%).
3. W diagnostyce molekularnej FH AD konieczne jest analizowanie całego genu *LDLR* ponieważ istnieje możliwość współwystępowania dwóch różnych mutacji tego genu u jednego pacjenta.
4. Analiza molekularna genu *APOB* powinna być stosowana u wszystkich pacjentów z objawami FH AD ponieważ aż u 10% chorych obserwuje się występowanie mutacji (R3500Q) tego genu.
5. Pacjenci z mutacją genu *LDLR* mają istotnie wyższe poziomy cholesterolu całkowitego oraz LDL w porównaniu do chorych z mutacją genu *APOB*.
6. Ryzyko wystąpienia choroby wieńcowej, określane ilorazem wartości stężeń cholesterolu LDL do HDL oznaczanych w surowicy krwi, jest wyższe u osób z mutacjami genu *LDLR* w porównaniu do osób z mutacjami genu *APOB*.
7. Diagnostyka mutacji genów *LDLR* i *APOB* rodzin z FH AD umożliwia objęcie ich poradnictwem genetycznym oraz wczesną profilaktyką, co w znacznym stopniu może uchronić członków tych rodzin przed klinicznymi konsekwencjami hipercholesterolemii rodzinnej.

## 9. PIŚMIENICTWO

- 1 van Aalst-Cohen E.S., Jansen A.C., de Jongh S., de Sauvage Nolting P.R., Kastelein J.J. (2004) Clinical, diagnostic, and therapeutic aspects of familial hypercholesterolemia. *Semin Vasc Med* 4: 31-41
- 2 Abifadel M., Varret M., Rabes J.P., Allard D., Ouguerram K., Devillers M., Cruaud C., Benjannet S., Wickham L., Erlich D., Derre A., Villegier L., Farnier M., Beucler I., Bruckert E., Chambaz J., Chanu B., Lecerf J.M., Luc G., Moulin P., Weissenbach J., Prat A., Krempf M., Junien C., Seidah N.G., Boileau C. (2003) Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 34: 154-156
- 3 Austin M.A., Hutter C.M., Zimmern R.L., Humphries S.E. (2004) Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. *Am J Epidemiol* 160: 407-420
- 4 Basu S.K., Goldstein J.L., Anderson R.G., Brown M.S. (1981) Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptors in human fibroblasts. *Cell* 24: 493-502
- 5 Bednarska-Makaruk M., Bisko M., Pulawska M.F., Hoffman-Zacharska D., Rodo M., Roszczyńko M., Solik-Tomassi A., Broda G., Polakowska M., Pytlak A., Wehr H. (2001) Familial defective apolipoprotein B-100 in a group of hypercholesterolaemic patients in Poland. Identification of a new mutation Thr3492Ile in the apolipoprotein B gene. *Eur J Hum Genet* 9: 836-842
- 6 Bertolini S., Pisciotta L., Di Scala L., Langheim S., Bellocchio A., Masturzo P., Cantafora A., Martini S., Averna M., Pes G., Stefanutti C., Calandra S. (2004) Genetic polymorphisms affecting the phenotypic expression of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 174: 57-65
- 7 Bhatnagar D., Morgan J., Siddiq S., Mackness M.I., Miller J.P., Durrington P.N. (2000) Outcome of case finding among relatives of patients with known heterozygous familial hypercholesterolaemia. *BMJ* 321: 1497-1500
- 8 Boren J., Lee I., Zhu W., Arnold K., Taylor S., Innerarity T.L. (1998) Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *J Clin Invest* 101: 1084-1093

- 9 Boren J., Ekstrom U., Agren B., Nilsson-Ehle P., Innerarity T.L. (2001) The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100.  
J Biol Chem 276: 9214-9218
- 10 Brown M.S., Faust J.R., Goldstein J.L. (1975) Role of the low density lipoprotein receptor in regulating the content of free and esterified cholesterol in human fibroblasts.  
J Clin Invest 55: 783-793
- 11 Brown M.S., Anderson R.G., Goldstein J.L. (1983) Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins.  
Cell 32: 663-667
- 12 Brown M.S., Goldstein J.L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis.  
Science 232: 34-47
- 13 Cartegni L., Chew S.L., Krainer A.R. (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing.  
Nat Rev Genet 3: 285-298
- 14 Castillo S., Tejedor D., Mozas P., Reyes G., Civeira F., Alonso R., Ros E., Pocovi M., Mata P. (2002) The apolipoprotein B R3500Q gene mutation in Spanish subjects with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia.  
*Atherosclerosis* 165: 127-135
- 15 Chatterton J.E., Phillips M.L., Curtiss L.K., Milne R., Fruchart J.C., Schumaker V.N. (1995) Immunoelectron microscopy of low density lipoproteins yields a ribbon and bow model for the conformation of apolipoprotein B on the lipoprotein surface.  
J Lipid Res 36: 2027-2037
- 16 Chaves F.J., Real J.T., Garcia-Garcia A.B., Civera M., Armengod M.E., Ascaso J.F., Carmena R. (2001) Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia in a South European outbreed population: influence of low-density lipoprotein (LDL) receptor gene mutations on treatment response to simvastatin in total, LDL, and high-density lipoprotein cholesterol.  
J Clin Endocrinol Metab 86: 4926-4932
- 17 Chen S.H., Habib G., Yang C.Y., Gu, Z.W., Lee B.R.; Weng S., Silberman S.R., Cai S.J., Deslypere J.P., Rosseneu M., Gotto A.M. Jr., Li W.H. Chan L. (1987) Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon.  
Science 238: 363-366

- 18 Choong M.L., Koay E.S., Khoo K.L., Khaw M.C., Sethi S.K. (1997) Denaturing gradient-gel electrophoresis screening of familial defective apolipoprotein B-100 in a mixed Asian cohort: two cases of arginine3500-->tryptophan mutation associated with a unique haplotype.  
Clin Chem 43: 916-923
- 19 Cohen J., Pertsemlidis A., Kotowski I.K., Graham R., Garcia C.K., Hobbs H.H. (2005) Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9.  
Nat Genet 37:161-165
- 20 Cummings R.D., Kornfeld S., Schneider W.J., Hobgood K.K., Tolleshaug H., Brown M.S., Goldstein J.L. (1983) Biosynthesis of N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor.  
J Biol Chem 258: 15261-15273
- 21 Davis C.G., Elhammer A., Russell D.W., Schneider W.J., Kornfeld S., Brown M.S., Goldstein J.L. (1986) Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts.  
J Biol Chem 261: 2828-2838
- 22 Davis C.G., Goldstein J.L., Sudhof T.C., Anderson R.G., Russell D.W., Brown M.S. (1987) Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region.  
Nature 326: 760-765
- 23 Dedoussis G.V., Schmidt H., Genschel J. (2004) LDL-receptor mutations in Europe.  
Hum Mutat 24: 443-459
- 24 Defesche J.C., Pricker K.L., Hayden M.R., van der Ende B.E., Kastelein J.J. (1993) Familial defective apolipoprotein B-100 is clinically indistinguishable from familial hypercholesterolemia.  
Arch Intern Med 153: 2349-2356
- 25 Defesche J.C. (2004) Low-density lipoprotein receptor--its structure, function, and mutations.  
Semin Vasc Med 4: 5-11
- 26 Dubuc G., Chamberland A., Wassef H., Davignon J., Seidah N.G., Bernier L., Prat A. (2004) Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 24: 1454-1459



- 27 Duly E.B., Ward A.J., Kirk C.W., Nevin N.C., Trinick T.R., Nicholls D.P., Young I.S., Graham C.A. (1997) APOE genotype and familial hypercholesterolaemia.  
Ann Clin Biochem 34: 534-536
- 28 Ebhardt M., Schmidt H., Doerk T., Tietge U., Haas R., Manns M.P., Schmidtke J., Stuhmann M. (1999) Mutation analysis in 46 German families with familial hypercholesterolemia: identification of 8 new mutations.  
Mutations in brief no. 226. Online. Hum Mutat 13: 257-262
- 29 Esser V., Limbird L.E., Brown M.S., Goldstein J.L., Russell D.W. (1988) Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor.  
J Biol Chem 263: 13282-13290
- 30 Familial Hypercholesterolaemia; Report of a second WHO Consultation, Human genetics programme, Geneva, 1999
- 31 Fouchier S.W., Defesche J.C., Umans-Eckenhausen M.W., Kastelein J.P. (2001) The molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands.  
Hum Genet 109: 602-615
- 32 Frikke-Schmidt R., Nordestgaard B.G., Schnohr P., Tybjaerg-Hansen A. (2004) Single nucleotide polymorphism in the low-density lipoprotein receptor is associated with a threefold risk of stroke. A case-control and prospective study.  
Eur Heart J 25: 943-951
- 33 Gaffney D., Pullinger C.R., O'Reilly D.S., Hoffs M.S., Cameron I., Vass J.K., Kulkarni M.V., Kane J.P., Schumaker V.N., Watts G.F., Packard C.J. (2002) Influence of an asparagine to lysine mutation at amino acid 3516 of apolipoprotein B on low-density lipoprotein receptor binding.  
Clin Chim Acta 321: 113-121
- 34 Garcia-Garcia A.B., Real J.T., Puig O., Cebolla E., Marin-Garcia P., Martinez Ferrandis J.I., Garcia-Sogo M., Civera M., Ascaso J.F., Carmena R., Armengod M.E., Chaves F.J. (2001) Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Spain: Ten novel LDLR mutations and population analysis.  
Hum Mutat 18: 458-459
- 35 Gaudet D., Vohl M.C., Couture P., Moorjani S., Tremblay G., Perron P., Gagne C., Despres J.P. (1999) Contribution of receptor negative versus receptor defective mutations in the LDL-receptor gene to angiographically assessed coronary artery disease among young (25-49 years) versus middle-aged (50-64 years) men.  
Atherosclerosis 143: 153-161

- 36 Goldstein J.L., Brown M.S. (1974) Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 249: 5153-5162
- 37 Goldstein J.L., Dana S.E., Faust J.R., Beaudet A.L., Brown M.S. (1975) Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *J Biol Chem* 250: 8487-8495
- 38 Goldstein J.L., Anderson R.G., Brown M.S. (1979) Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279: 679-685
- 39 Goldstein J.L., Brown M.S., Anderson R.G., Russell D.W., Schneider W.J. (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* 1: 1-39
- 40 Goldstein J.L., Hobbs H.H., Brown M.S.: Familial hypercholesterolemia. Rozdział 120 w Scriver, Beaudet, Valle, Sly (eds): *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York 2001, 2863-2914
- 41 Górski B., Kubalska J., Naruszewicz M., Lubiński J. (1998) LDL-R and Apo-B-100 gene mutations in Polish familial hypercholesterolemias. *Hum Genet* 102: 562-565
- 42 Graham C.A., McClean E., Ward A.J., Beattie E.D., Martin S., O'Kane M., Young I.S., Nicholls D.P. (1999) Mutation screening and genotype:phenotype correlation in familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 147: 309-316
- 43 Gudnason V., Day I.N., Humphries S.E. (1994) Effect on plasma lipid levels of different classes of mutations in the low-density lipoprotein receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 14: 1717-1722
- 44 Hamalainen T., Palotie A., Aalto-Setälä K., Kontula K., Tikkanen M.J. (1990) Absence of familial defective apolipoprotein B-100 in Finnish patients with elevated serum cholesterol. *Atherosclerosis* 82: 177-183
- 45 Hansen P.S., Defesche J.C., Kastelein J.J., Gerdes L.U., Frazz L., Gerdes C., Tato F., Jensen H.K., Jensen L.G., Klausen I.C., Faergeman O., Schuster H. (1997) Phenotypic variation in patients heterozygous for familial defective apolipoprotein B (FDB) in three European countries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 741-747

- 46 Heath K.E., Gudnason V., Humphries S.E., Seed M. (1999) The type of mutation in the low density lipoprotein receptor gene influences the cholesterol-lowering response of the HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia.  
*Atherosclerosis* 143: 41-54
- 47 Heath K.E., Humphries S.E., Middleton-Price H., Boxer M. (2001) A molecular genetic service for diagnosing individuals with familial hypercholesterolaemia (FH) in the United Kingdom.  
*Eur J Hum Genet* 9: 244-252
- 48 Hill J.S., Hayden M.R., Frohlich J., et al. (1991) Genetic and environmental factors affecting the incidence of coronary artery disease in heterozygous Familial Hypercholesterolemia.  
*Arteriosclerosis and Thrombosis* 11: 290-297
- 49 Hobbs H.H., Brown M.S., Goldstein J.L., Russell D.W. (1986) Deletion of exon encoding cysteine-rich repeat of low density lipoprotein receptor alters its binding specificity in a subject with familial hypercholesterolemia.  
*J Biol Chem* 261: 13114-13120
- 50 Hobbs H.H., Russell D.W., Brown M.S., Goldstein J.L. (1990) The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein.  
*Annu Rev Genet* 24: 133-170
- 51 Horsthemke B., Dunning A., Humphries S. (1987) Identification of deletions in the human low density lipoprotein receptor gene.  
*J Med Genet* 24: 144-147
- 52 Hunt S.C., Hopkins P.N., Bulka K., McDermott M.T., Thorne T.L., Wardell B.B., Bowen B.R., Ballinger D.G., Skolnick M.H., Samuels M.E. (2000) Genetic Localization to Chromosome 1p32 of the Third Locus for Familial Hypercholesterolemia in a Utah Kindred.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1089-1093
- 53 Innerarity T.L., Young S.G., Poksay K.S., Mahley R.W., Smith R.S., Milne R.W., Marcel Y.L., Weisgraber K.H. (1987) Structural relationship of human apolipoprotein B48 to apolipoprotein B100. *J Clin Invest* 80: 1794-1798
- 54 Innerarity T.L., Weisgraber K.H., Arnold K.S., Mahley R.W., Krauss R.M., Vega G.L., Grundy S.M. (1987) Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6919-6923

- 55 Jansen A.C., van Wissen S., Defesche J.C., Kastelein J.J. (2002) Phenotypic variability in familial hypercholesterolaemia: an update. *Curr Opin Lipidol* 13: 165-171
- 56 Kajinami K., Mabuchi H., Inazu A., Fujita H., Koizumi J., Takeda R., Matsue T., Kibata M. (1990) Novel gene mutations at the low density lipoprotein receptor locus: FH-Kanazawa and FH-Okayama. *J Intern Med* 227: 247-251
- 57 Kalina A., Csaszar A., Czeizel A.E., Romics L., Szaboki F., Szalai C., Reiber I., Nemeth A., Stephenson S., Williams R.R. (2001) Frequency of the R3500Q mutation of the apolipoprotein B-100 gene in a sample screened clinically for familial hypercholesterolemia in Hungary. *Atherosclerosis* 154: 247-251
- 58 Kastelein J.J., Ordovas J.M., Wittekoek M.E., Pimstone S.N., Wilson W.F., Gagne S.E., Larson M.G., Schaefer E.J., Boer J.M., Gerdes C., Hayden M.R. (1999) Two common mutations (D9N, N291S) in lipoprotein lipase: a cumulative analysis of their influence on plasma lipids and lipoproteins in men and women. *Clin Genet* 56: 297-305
- 59 Khachadurian A.K. (1964) The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *Am J Med* 37: 402-407
- 60 Khachadurian A.K., Uthman S.M. (1973) Experiences with the homozygous cases of familial hypercholesterolemia. A report of 52 patients. *Nutr Metab* 15: 132-140
- 61 Knoblauch H., Bauerfeind A., Toliat M.R., Becker C., Luganskaja T., Gunther U.P., Rohde K., Schuster H., Junghans C., Luft F.C., Nurnberg P., Reich J.G. (2004) Haplotypes and SNPs in 13 lipid-relevant genes explain most of the genetic variance in high-density lipoprotein and low-density lipoprotein cholesterol. *Hum Mol Genet* 13: 993-1004
- 62 Knott T.J., Pease R.J., Powell L.M., Wallis S.C., Rall S.C. Jr., Innerarity T.L., Blackhart B., Taylor W.H., Marcel Y., Milne R. (1986) Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature* 323: 734-738
- 63 Koivisto U.M., Turtola H., Aalto-Setälä K., Top B., Frants R.R., Kovanen P.T., Syvanen A.C., Kontula K. (1992) The familial hypercholesterolemia (FH)-North Karelia mutation of the low density lipoprotein receptor gene deletes seven nucleotides of exon 6 and is a common cause of FH in Finland. *J Clin Invest* 90: 219-228

- 64 Koivisto U.M., Hubbard A.L., Mellman I. (2001) A novel cellular phenotype for familial hypercholesterolemia due to a defect in polarized targeting of LDL receptor.  
*Cell* 105: 575-585
- 65 Kotze M.J., Langenhoven E., Warnich L., du Plessis L., Retief A.E. (1991) The molecular basis and diagnosis of familial hypercholesterolaemia in South African Afrikaners.  
*Ann Hum Genet* 55: 115-121
- 66 Kotze M.J., De Villiers W.J., Steyn K., Kriek J.A., Marais A.D., Langenhoven E., Herbert J.S., Graadt Van Roggen J.F., Van der Westhuyzen D.R., Coetzee G.A. (1993) Phenotypic variation among familial hypercholesterolemics heterozygous for either one of two Afrikaner founder LDL receptor mutations.  
*Arterioscler Thromb* 13: 1460-1468
- 67 Kotze M.J., Peeters A.V., Langenhoven E., Wauters J.G., Van Gaal L.F. (1994) Phenotypic expression and frequency of familial defective apolipoprotein B-100 in Belgian hypercholesterolemics.  
*Atherosclerosis* 111: 217-225
- 68 Kozarsky K., Kingsley D., Krieger M. (1988) Use of a mutant cell line to study the kinetics and function of O-linked glycosylation of low density lipoprotein receptors.  
*Proc Natl Acad Sci USA*. 85: 4335-4339
- 69 Kuhrova V., Francova H., Zapletalova P., Freiburger T., Fajkusova L., Hrabincova E., Slovackova R., Kozak L., Slovakova R. (2002) Spectrum of low density lipoprotein receptor mutations in Czech hypercholesterolemic patients.  
*Hum Mutat* 19: 80-84
- 70 Landsberger D., Meiner V., Reshef A., Levy Y., van der Westhuyzen D.R., Coetzee G.A., Leitersdorf E. (1992) A nonsense mutation in the LDL receptor gene leads to familial hypercholesterolemia in the Druze sect.  
*Am J Hum Genet* 50: 427-433
- 71 Langlois S., Kastelein J.J., Hayden M.R. (1988) Characterization of six partial deletions in the low-density-lipoprotein (LDL) receptor gene causing familial hypercholesterolemia (FH).  
*Am J Hum Genet* 43: 60-68
- 72 Law S.W., Lackner K.J., Hospattankar A.V., Anchors J.M., Sakaguchi A.Y., Naylor S.L., Brewer H.B. Jr. (1985) Human apolipoprotein B-100: cloning, analysis of liver mRNA, and assignment of the gene to chromosome 2.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8340-8344

- 73 Lehrman M.A., Schneider W.J., Brown M.S., Davis C.G., Elhammer A., Russell D.W., Goldstein J.L. (1987) The Lebanese allele at the low density lipoprotein receptor locus. Nonsense mutation produces truncated receptor that is retained in endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 262: 401-410
- 74 Leitersdorf E., Tobin E.J., Davignon J., Hobbs H.H. (1990) Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population  
*J Clin Invest* 85: 1014-1023
- 75 Leren T.P., Tonstad S., Gundersen K.E., Bakken K.S., Rodningen O.K., Sundvold H., Ose L., Berg K. (1997) Molecular genetics of familial hypercholesterolaemia in Norway.  
*J Intern Med* 241: 185-194
- 76 Leren T.P. (2004) Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia.  
*Clin Genet* 65: 419-422
- 77 Lind S., Rystedt E., Eriksson M., Wiklund O., Angelin B., Eggertsen G. (2002) Genetic characterization of Swedish patients with familial hypercholesterolemia: a heterogeneous pattern of mutations in the LDL receptor gene.  
*Atherosclerosis* 163: 399-407
- 78 Lindgren V., Luskey K.L., Russell D.W., Francke U. (1985) Human genes involved in cholesterol metabolism: chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase with cDNA probes.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8567-8571
- 79 Lombardi M.P., Redeker E.J., Defesche J.C., Kamerling S.W., Trip M.D., Mannens M.M., Havekes L.M., Kastelein J.J. (2000) Molecular genetic testing for familial hypercholesterolemia: spectrum of LDL receptor gene mutations in The Netherlands.  
*Clin Genet* 57: 116-124
- 80 Ludwig E.H., McCarthy B.J. (1990) Haplotype analysis of the human apolipoprotein B mutation associated with familial defective apolipoprotein B100.  
*Am J Hum Genet* 47: 712-720
- 81 Mayes P.A.: Transport i magazynowanie lipiów, rozdział 27; Synteza, transport i wydalanie cholesterolu, rozdział 28 w Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. (eds): *Biochemia Harpera*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1994, 294-328

- 82 Mehta K.D., Chen W.J., Goldstein J.L., Brown M.S. (1991) The low density lipoprotein receptor in *Xenopus laevis*. I. Five domains that resemble the human receptor.  
J Biol Chem 266: 10406-10414
- 83 Mehta K.D., Chang R., Norman J. (1996) *Chiloscyllium plagiosum* low-density lipoprotein receptor: evolutionary conservation of five different functional domains.  
J Mol Evol 42: 264-272
- 84 Miserez A.R., Laager R., Chiodetti N., Keller U. (1994) High prevalence of familial defective apolipoprotein B-100 in Switzerland.  
J Lipid Res 35: 574-583
- 85 Miserez A.R., Keller U. (1995) Differences in the phenotypic characteristics of subjects with familial defective apolipoprotein B-100 and familial hypercholesterolemia.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 15: 1719-1729
- 86 Moorjani S., Roy M., Torres A., Betard C., Gagne C., Lambert M., Brun D., Davignon J., Lupien P. (1993) Mutations of low-density-lipoprotein-receptor gene, variation in plasma cholesterol, and expression of coronary heart disease in homozygous familial hypercholesterolaemia.  
Lancet 341: 1303-1306
- 87 Mozas P., Castillo S., Tejedor D., Reyes G., Alonso R., Franco M., Saenz P., Fuentes F., Almagro F., Mata P., Pocovi M. (2004) Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain: identification of 39 novel and 77 recurrent mutations in LDLR.  
Hum Mutat 24: 187-199
- 88 Myant N.B., Forbes S.A., Day I.N., Gallagher J. (1997) Estimation of the age of the ancestral arginine3500-->glutamine mutation in human apoB-100.  
Genomics 45: 78-87
- 89 Naureckiene S., Ma L., Sreekumar K., Purandare U., Lo C.F., Huang Y., Chiang L.W., Grenier J.M., Ozenberger B.A., Jacobsen J.S., Kennedy J.D., DiStefano P.S., Wood A., Bingham B. (2003) Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K.  
Arch Biochem Biophys 420: 55-67
- 90 Patthy L. (1985) Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules.  
Cell 41: 657-663

- 91 Pimstone S.N., Defesche J.C., Clee S.M., Bakker H.D., Hayden M.R., Kastelein J.J. (1997) Differences in the phenotype between children with familial defective apolipoprotein B-100 and familial hypercholesterolemia.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 17: 826-833
- 92 Pimstone S.N., Sun X.M., du Souich C., Frohlich J.J., Hayden M.R., Soutar A.K. (1998) Phenotypic variation in heterozygous familial hypercholesterolemia: a comparison of Chinese patients with the same or similar mutations in the LDL receptor gene in China or Canada.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 18: 309-315
- 93 Pullinger C.R., Hennessy L.K., Chatterton J.E., Liu W., Love J.A., Mendel C.M., Frost P.H., Malloy M.J., Schumaker V.N., Kane J.P. (1995) Familial ligand-defective apolipoprotein B. Identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity.  
J Clin Invest 95: 1225-1234
- 94 Pullinger C.R., Gaffney D., Gutierrez M.M., Malloy M.J., Schumaker V.N., Packard C.J., Kane J.P. (1999) The apolipoprotein B R3531C mutation. Characteristics of 24 subjects from 9 kindreds.  
J Lipid Res 40: 318-327
- 95 Rabes J.P., Varret M., Devillers M., Aegerter P., Villegier L., Krempf M., Junien C., Boileau C. (2000) R3531C mutation in the apolipoprotein B gene is not sufficient to cause hypercholesterolemia.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 20: E76-82
- 96 Rader D.J., Cohen J., Hobbs H.H. (2003) Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment.  
J Clin Invest 111: 1795-803
- 97 Real J.T., Chaves F.J., Ejarque I., Garcia-Garcia A.B., Valldecabres C., Ascaso J.F., Armengod M.E., Carmena R. (2003) Influence of LDL receptor gene mutations and the R3500Q mutation of the apoB gene on lipoprotein phenotype of familial hypercholesterolemic patients from a South European population.  
Eur J Hum Genet 11: 959-965
- 98 Russell D.W., Schneider W.J., Yamamoto T., Luskey K.L., Brown M.S., Goldstein J.L. (1984) Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor.  
Cell 37: 577-585
- 99 Russell D.W., Brown M.S., Goldstein J.L. (1989) Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins.  
J Biol Chem 264: 21682-21688



- 100 Schneider W.J., Beisiegel U., Goldstein J.L., Brown M.S. (1982) Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight. *J Biol Chem* 257: 2664-2673
- 101 Schuster H., Rauh G., Muller S., Keller C., Wolfram G., Zollner N. (1992) Allele-specific and asymmetric polymerase chain reaction amplification in combination: a one step polymerase chain reaction protocol for rapid diagnosis of familial defective apolipoprotein B-100. *Anal Biochem* 204: 22-25
- 102 Schwartz E.I., Shevtsov S.P., Kuchinski A.P., Kovalev Yu.P., Plutalov O.V., Berlin Yu.A. (1991) Approach to identification of a point mutation in apo B100 gene by means of a PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 19: 3752
- 103 Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. (1999) Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolaemia: implications for clinical management. *Atherosclerosis* 142: 105-112
- 104 Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. (1991) Risk of fatal coronary heart disease in Familial Hypercholesterolemia. *BMJ* 303: 893-896
- 105 Seidah N.G., Benjannet S., Wickham L., Marcinkiewicz J., Jasmin S.B., Stifani S., Basak A., Prat A., Chretien M. (2003) The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 928-933
- 106 Soria L.F., Ludwig E.H., Clarke H.R., Vega G.L., Grundy S.M., McCarthy B.J. (1989) Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 587-591
- 107 Soufi M., Sattler A.M., Maerz W., Starke A., Herzum M., Maisch B., Schaefer J.R. (2004) A new but frequent mutation of apoB-100-apoB His3543Tyr. *Atherosclerosis* 174: 11-16
- 108 Sudhof T.C., Goldstein J.L., Brown M.S., Russell D.W. (1985) The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 228: 815-822
- 109 Sudhof T.C., Russell D.W., Goldstein J.L., Brown M.S., Sanchez-Pescador R., Bell G.I. (1985) Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EGF precursor. *Science* 228: 893-895

- 110 Sudhof T.C., Van der Westhuyzen D.R., Goldstein J.L., Brown M.S., Russell D.W. (1987) Three direct repeats and a TATA-like sequence are required for regulated expression of the human low density lipoprotein receptor gene.  
*J Biol Chem* 262: 10773-10779
- 111 Tai D.Y., Pan J.P., Lee-Chen G.J. (1998) Identification and haplotype analysis of apolipoprotein B-100 Arg3500-->Trp mutation in hyperlipidemic Chinese.  
*Clin Chem* 44: 1659-1665
- 112 Talmud P.J., Tamplin O.J., Heath K., Gaffney D., Day I.N., Humphries S.E. (1996) Rapid testing for three mutations causing familial defective apolipoprotein B100 in 562 patients with familial hypercholesterolaemia.  
*Atherosclerosis* 125: 135-137
- 113 Thompson G.R., Seed M., Niththyananthan S., McCarthy S., Thorogood M. (1989) Genotypic and phenotypic variation in familial hypercholesterolemia.  
*Arteriosclerosis* 9: 175-80
- 114 Timms K.M., Wagner S., Samuels M.E., Forbey K., Goldfine H., Jammulapati S., Skolnick M.H., Hopkins P.N., Hunt S.C., Shattuck D.M. (2004) A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree.  
*Hum Genet* 114: 349-353
- 115 Tolleshaug H., Goldstein J.L., Schneider W.J., Brown M.S. (1982) Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia.  
*Cell* 30: 715-724
- 116 Torres A.L., Moorjani S., Vohl M.C., Gagne C., Lamarche B., Brun L.D., Lupien P.J., Despres J.P. (1996) Heterozygous familial hypercholesterolemia in children: low-density lipoprotein receptor mutational analysis and variation in the expression of plasma lipoprotein-lipid concentrations.  
*Atherosclerosis* 126: 163-171
- 117 Tuffery-Giraud S., Saquet C., Chambert S., Claustres M. (2003) Pseudoexon activation in the DMD gene as a novel mechanism for Becker muscular dystrophy.  
*Hum Mutat* 21:608-614
- 118 Tybjaerg-Hansen A., Humphries S.E. (1992) Familial defective apolipoprotein B-100: a single mutation that causes hypercholesterolemia and premature coronary artery disease.  
*Atherosclerosis* 96: 91-107

- 119 Tybjaerg-Hansen A., Steffensen R., Meinertz H., Schnohr P., Nordestgaard B.G. (1998) Association of mutations in the apolipoprotein B gene with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease.  
N Engl J Med 338: 1577-1584
- 120 Umans-Eckenhausen M.A., Sijbrands E.J., Kastelein J.J., Defesche J.C. (2002) Low-density lipoprotein receptor gene mutations and cardiovascular risk in a large genetic cascade screening population.  
Circulation 106: 3031-3036
- 121 Varret M., Rabes J.P., Saint-Jore B., Cenarro A., Marinoni J.C., Civeira F., Devillers M., Krempf M., Coulon M., Thiant R., Kotze M.J., Schmidt H., Buzzi J.C., Kostner G.M., Bertolini S., Pocovi M., Rosa A., Farnier M., Martinez M., Junien C., Boileau C. (1999) A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32.  
Am J Hum Genet 64: 1378-1387
- 122 Vohl M.C., Gaudet D., Moorjani S., Tremblay G., Perron P., Gagne C., Lesiege D., Bergeron J., Lupien P.J., Despres J.P. (1997) Comparison of the effect of two low-density lipoprotein receptor class mutations on coronary heart disease among French-Canadian patients heterozygous for familial hypercholesterolaemia.  
Eur J Clin Invest 27: 366-373
- 123 Wang J., Huff E., Janecka L., Hegele R.A. (2001) Low density lipoprotein receptor (LDLR) gene mutations in Canadian subjects with familial hypercholesterolemia, but not of French descent.  
Hum Mutat 18: 359-362
- 124 Wittekoek M.E., Pimstone S.N., Reymer P.W., Feuth L., Botma G.J., Defesche J.C., Prins M., Hayden M.R., Kastelein J.J. (1998) A common mutation in the lipoprotein lipase gene (N291S) alters the lipoprotein phenotype and risk for cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia.  
Circulation 97: 729-735
- 125 Wittekoek M.E., Moll E., Pimstone S.N., Trip M.D., Lansberg P.J., Defesche J.C., van Doormaal J.J., Hayden M.R., Kastelein J.J. (1999) A frequent mutation in the lipoprotein lipase gene (D9N) deteriorates the biochemical and clinical phenotype of familial hypercholesterolemia.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 2708-2713
- 126 Yamamoto T., Davis C.G., Brown M.S., Schneider W.J., Casey M.L., Goldstein J.L., Russell D.W. (1984) The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA.  
Cell 39: 27-38

- 127 Yokode M., Pathak R.K., Hammer R.E., Brown M.S., Goldstein J.L., Anderson R.G. (1992) Cytoplasmic sequence required for basolateral targeting of LDL receptor in livers of transgenic mice. *J Cell Biol* 117: 39-46
- 128 Zakharova F.M., Golubkov V.I., Mandel'shtam M.Iu, Lipovetskii B.M., Gaitskhoki V.S. (2001) Identification of novel missense mutation G571E, novel silent mutation H229H, nonsense mutation C74X, and four single nucleotide polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor in patients with familial hypercholesterolemia from St. Petersburg. *Bioorg Khim* 27: 393-396

## 10. ZAŁĄCZNIKI

Poniżej zamieszczono:

- wyniki analizy sekwencjonowania grupy 96 pacjentów z FH (str. 98)
- dane kliniczne rodzin probantów homozygotycznych lub heterozygot złożonych - tabela 19 (str.146)
- prawidłowe poziomy frakcji cholesterolu - tabela 20 (str. 147)
- nowe i stare nazewnictwo mutacji genu *LDLR* - tabela 21 (str. 149)

## FH2

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		C6C: 81 C>T, htz	
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	MUT	intron 11: 1705+1 G>A, htz		
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH4

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	MUT	C210X: 693 C>A, htz		
5	WT			
6	SNP		intron 6: 940+36 G>A, htz	
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	SNP		intron 8: 1186 +97 C>G, htz	
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, htz	
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-55 A>C, hom	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	WT			
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH6

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		intron 2:190+56 G>A, htz	
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	SNP		A370T: 1171 G>A, htz	
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-69 G>T, htz	intron 11: 1706-55 A>C, htz
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, hom	
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH7

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	MUT	D245E: 798 T>A, htz		
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota  
 del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH10

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	MUT	G571E: 1775 G>A, htz	N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	3'UTR: 2635 G>A, htz
APOB/ekson				
26	WT			

## FH11

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	MUT	E119D: 420 G>C, htz		
5	WT			
6	SNP		intron 6: 940+36 G>A, htz	
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-69 G>T, htz	intron 11: 1706-55 A>C, hom
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+47 G>A, htz	intron 16: 2389+116 G>A, htz
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26				

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)



## FH12

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		C6C: 81 C>T, htz	
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, hom	
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, hom	
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH16

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	SNP			
10	MUT	N494N: 1545 C>T, htz	R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	SNP		L554L: 1725 C>T, htz	
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, hom	
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH17

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	MUT	C210Y: 692 G>A, htz		
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-55 A>C, hom	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	3'UTR: 2635 G>A, htz
APOB/ekson				
26	WT			

## FH18

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-55 A>C, htz	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH19

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 10: 1586+53 A>G, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	MUT	V485M: 1516 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz	
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+116 G>A, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH20

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	
APOB/ekson				
26	MUT	R3500Q: 10708 G>A, htz		

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH25

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	
11	WT			
12	WT			
13	WT			
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH27

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, hom	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH28

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		C6C: 81 C>T, htz	
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	SNP		intron 6: 940+36 G>A, htz	
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, htz	
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	MUT	FsS704: 2174 del C, htz		
16	SNP		intron 16: 2389+47 G>A, htz	intron 16: 2389+116 G>A, htz
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH29

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		L554L: 1725 C>T, htz	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	WT			
17	WT			
18	WT			
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH30

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	MUT	G571E: 1775 G>A, hom	intron 11: 1706-55 A>C, hom	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH 32

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		C6C: 81 C>T, htz	
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, hom	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-55 A>C, htz	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	3'UTR: 2635 G>A, htz
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH33

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	MUT	D36N: 169 G>A, htz		
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	NW			
10	NW			
11	WT			
12	SNP		L554L: 1725 C>T, htz	
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH34

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	SNP		intron 8:1187-10 G>A, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	WT			
13	WT			
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH40

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	WT			
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	SNP		L554L: 1725 C>T, htz	
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	intron 16: 2389+57 C>T, htz
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH41

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	3'UTR: 2635 G>A, htz
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota  
 del – delecja, ins – insercja  
 UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)



## FH42

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, hom	
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, hom	
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, hom	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, hom	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	
APOB/ekson				
26	MUT	R3500Q: 10708 G>A, htz		

## FH43

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	MUT	C176W: 591 C>G, htz		
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, hom	
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-55 A>C, hom	N570N: 1774 C>T, hom
13	SNP		V632V: 1959 T>C, hom	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH44

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	MUT	G571E: 1775 G>A, htz	L554L: 1725 C>T, htz	
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH45

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-55 A>C, hom	N570N: 1774 C>T, hom
13	SNP		V632V: 1959 T>C, hom	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	
APOB/ekson				
26	MUT	R3500Q: 10708 G>A, htz		

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota  
 del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH48

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		intron 2:190+56 G>A, htz	
3	WT			
4	SNP		intron 3: 314-50 T>C, htz	
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, htz	
11	SNP		P518P: 1617 C>G, htz	
12	SNP		intron 11: 1706-55 A>C, hom	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	MUT	Q665X: 2056 C>T, htz		
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	3'UTR: 2635 G>A, htz
APOB/ekson				
26	WT			

## FH55

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2	Wariant polimorficzny-3
P + 1	WT				
2	WT				
3	WT				
4	WT				
5	WT				
6	WT				
7	SNP		intron 7: 1060+10 G>C, htz		
8	WT				
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz		
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz		
11	WT				
12	MUT	R553C: 1720 C>T, htz	intron 11: 1706-55 A>C, htz	L554L: 1725 C>T, htz	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz		
14	WT				
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz		
16	WT				
17	WT				
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz		
APOB/ekson					
26	WT				

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota  
 del – delecja, ins – insercja  
 UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH57

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+10 G>C, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, hom	
11	WT			
12	MUT	intron 11: 1706-10 G>A, htz	intron 11: 1706-55 A>C, hom	N570N: 1774 C>T, hom
13	SNP		V632V: 1959 T>C, hom	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH58

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	SNP		L554L: 1725 C>T, htz	
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	WT			
17	WT			
18	WT			
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT – mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH59

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		C6C: 81 C>T, htz	
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, hom	
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, hom	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, hom	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH60

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	MUT	G571E: 1775 G>A, htz	intron 11: 1706-55 A>C, htz	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	MUT	C646Y: 2000 G>A, htz		
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	3'UTR: 2635 G>A, htz
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota  
 del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH64

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	WT			
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	MUT	G571E: 1775 G>A, htz		
13	WT			
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH66

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		C6C: 81 C>T, htz	
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, hom	
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, hom	
11	WT			
12	WT			
13	WT			
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH67

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	MUT	G-2R: 58 G>A, htz		
2	SNP		C6C: 81 C>T, htz	intron 2:190+56 G>A, htz
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-55 A>C, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	3'UTR: 2635 G>A, htz
APOB/ekson				
26	WT			

## FH71

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	3'UTR: 2635 G>A, htz
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota  
 del – delecja, ins – insercja  
 UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH82

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-69 G>T, htz	intron 11: 1706-55 A>C, htz
13	WT			
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	3'UTR: 2635 G>A, htz
APOB/ekson				
26	MUT	R3500Q: 10708 G>A, htz		

## FH85

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	WT			
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	MUT	R3500Q: 10708 G>A, htz		

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)



## FH89

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	MUT	Q133X: 460 C>T, htz		
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	WT			
13	WT			
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH99

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	WT			
9	NW			
10	NW			
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, hom	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, hom	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	
APOB/ekson				
26	MUT	R3500Q: 10708 G>A, htz		

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH112

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	SNP		intron 6:940+36 G>A, htz	
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, htz	
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+47 G>A, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	3'UTR: 2635 G>A, htz
APOB/ekson				
26	WT			

## FH113

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	NW			
10	NW			
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, hom	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, hom	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	
APOB/ekson				
26	MUT	R3500Q: 10708 G>A, htz		

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH115

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		intron 2: 190+56 G>A, htz	
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	
11	WT			
12	MUT	G571E: 1775 G>A, htz	intron 11: 1706-55 A>C, htz	
13	WT			
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	intron 16: 2389+116 G>A, htz
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH118

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	WT			
17	MUT	intron 16: 2390-2 A>G, htz		
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH119

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	MUT	intron 3: 313+1, G>C, htz		
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	WT			
13	WT			
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH121

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, hom	
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, hom	
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-55 A>C, hom	N570N: 1774 C>T, hom
13	SNP		V632V: 1959 T>C, hom	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH122

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		C6C: 81 C>T, htz	
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, hom	
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, hom	
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-55 A>C, hom	N570N: 1774 C>T, hom
13	SNP		V632V: 1959 T>C, hom	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH123

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	SNP		intron 6: 940+36 G>A, htz	
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	
11	WT			
12	SNP		L554L: 1725 C>T, htz	
13	WT			
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH124

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	MUT	G571E: 1775 G>A, htz	intron 11: 1706-55 A>C, htz	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	3'UTR: 2635 G>A, htz
APOB/ekson				
26	WT			

## FH126

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	MUT	E10K: 91 G>A, htz		
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-55 A>C, htz	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, hom	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH131

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	WT			
13	WT			
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH132

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		C6C: 81 C>T, htz	
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	MUT	D333G: 1061 A>G, htz		
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, hom	
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, hom	
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-55 A>C, hom	N570N: 1774 C>T, hom
13	SNP		V632V: 1959 T>C, hom	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH136

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH139

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	MUT	intron 11: 1705+1 G>A, htz		
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)



## FH141

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	MUT	G571E: 1775 G>A, htz		
13	SNP			
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	
17	NW			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH147

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		C6C: 81 C>T, htz	
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>AA, hom	
11	WT			
12	WT			
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	WT			
17	WT			
18	WT			
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH149

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2	Wariant polimorficzny-3
P + 1	WT				
2	WT				
3	WT				
4	WT				
5	WT				
6	SNP		intron 6: 940+36 G>A, htz		
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz	
8	WT				
9	MUT	A410T: 1291 G>A, htz	intron 9: 1358+56 C>T, htz		
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, htz		
11	WT				
12	SNP		intron 11: 1706-69 G>T, htz	intron 11: 1706-55 A>C, hom	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz		
14	WT				
15	WT				
16	SNP		intron 16: 2389+47 G>A, htz	intron 16: 2389+116 G>A, htz	
17	WT				
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom		
APOB/ekson					
26	WT				

## FH151

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		intron 2: 190+56 G>A, htz	
3	WT			
4	SNP		intron 3: 314-50 T>C, htz	
5	WT			
6	WT			
7	WT			
8	WT			
9	NW			
10	NW			
11	WT			
12	MUT	G571E: 1775 G>A, htz	intron 11: 1706-55 A>C, htz	
13	NW			
14	NW			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	
17	NW			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH152

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	MUT	G571E: 1775 G>A, htz	intron 11: 1706-55 A>C, htz	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	3'UTR: 2635 G>A, htz
APOB/ekson				
26	WT			

## FH165

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	MUT	C88R: 324 del GT/ ins TC, htz		
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	SNP		L554L: 1725 C>T, htz	
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT – mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH166

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	WT			
9	NW			
10	NW			
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-55 A>C, hom	N570N: 1774 C>T, hom
13	SNP		V632V: 1959 T>C, hom	
14	WT			
15	WT			
16	NW			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	MUT	R3500Q: 10708 G>A, htz		

## FH171

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	MUT	S426P: 1339 T>C, htz	intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	WT			
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH172

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	SNP		intron 6: 940+36 G>A, htz	
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	WT			
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	MUT	Y807C: 2483 A>G, htz		
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH177

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		intron 2: 190+56 G>A, htz	
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	WT			
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	3'UTR: 2635 G>A, htz
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH181

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-55 A>C, htz	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	
APOB/ekson				
26	MUT	R3500Q: 10708 G>A, htz		

## FH182

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2	Wariant polimorficzny-3
P + 1	WT				
2	WT				
3	WT				
4	WT				
5	WT				
6	WT				
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz	
8	WT				
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz		
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz	
11	WT				
12	MUT	A591A: 1836 C>T, htz	intron 11: 1706-55 A>C, htz	L554L: 1725 C>T, htz	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz		
14	WT				
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz		
16	SNP		intron 16: 2389+47 G>A, htz	intron 16: 2389+116 G>A, htz	
17	SNP		intron 16: 2390-16 G>A, htz		
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz		
APOB/ekson					
26	WT				

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH186

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	SNP		L554L: 1725 C>T, htz	
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	MUT	R3500Q: 10708 G>A, htz		

## FH190

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2	Wariant polimorficzny-3
P + 1	WT				
2	MUT	intron 2: 190+1, G>A, htz	intron 2: 190+56 G>A, htz		
3	WT				
4	WT				
5	WT				
6	WT				
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz	
8	SNP		A370T: 1171 G>A, htz		
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz		
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, htz		
11	WT				
12	SNP		intron 11: 1706-69 G>T, htz	intron 11: 1706-55 A>C, hom	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz		
14	WT				
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz		
16	WT				
17	WT				
18	WT				
APOB/ekson					
26	WT				

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH191

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	MUT	W23X: 131 G>A, htz		
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-69 G>T, htz	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP	N319N: 1920 C>T, htz	V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH192

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, hom	
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, hom	
11	WT			
12	MUT	intron 11: 1706-10 G>A, htz	intron 11: 1706-55 A>C, hom	N570N: 1774 C>T, hom
13	SNP		V632V: 1959 T>C, hom	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)



## FH200

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		intron 2:190+56 G>A, htz	
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	SNP		A370T: 1171 G>A, htz	
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	
11	MUT	intron 11: 1705+1 G>A, htz		
12	WT			
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH215

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	MUT	G571E: 1775 G>A, htz	L554L: 1725 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, hom	
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH217

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		intron 2:190+56 G>A, htz	
3	WT			
4	MUT	C210Y: 692 G>A, htz		
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	SNP		A370T: 1171 G>A, htz	
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-69 G>T, htz	intron 11: 1706-55 A>C, htz
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH220

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		C6C: 81 C>T, htz	
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	WT			
13	WT			
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota  
 del – delecja, ins – insercja  
 UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH222

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	SNP		intron 7: 1061-8 T>C, htz	
9	SNP		intron 9: 1358+32 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	WT			
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	SNP		intron 15: 2312-71 G>A, htz	intron 16: 2389+41 C>A, htz
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH224

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	MUT	FsD157:533 insGGCTCGGA, htz		
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH239

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		L554L: 1725 C>T, htz	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	WT			
17	WT			
18	WT			
APOB/ekson				
26	WT			

## FH243

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-55 A>C, htz	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	3'UTR: 2635 G>A, htz
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH244

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	MUT	G571E: 1775 G>A, htz	intron 11: 1706-55 A>C, htz	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH245

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		L554L: 1725 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	WT			
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH269

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	SNP		intron 8: 1186+19 C>T, htz	
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		L554L: 1725 C>T, htz	N570N: 1774 C>T, htz
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH286

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-69 G>T, htz	intron 11: 1706-55 A>C, htz
13	WT			
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH291

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	WT			
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	WT			
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	3'UTR: 2635 G>A, htz
APOB/ekson				
26	WT			

## FH300

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, hom	
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, hom	
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, hom	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, hom	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	MUT	intron 16: 2390-2 A>G, htz		
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH308

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		C6C: 81 C>T, htz	
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	NW			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, hom	
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, hom	
11	MUT	ITL545MPN: 1698-1704 delCACCCCTA insGCCCAAT, htz		
12	SNP		N570N: 1774 C>T, hom	
13	NW			
14	NW			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	NW			
APOB/ekson				
26	WT			

## FH309

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	WT			
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	3'UTR: 2635 G>A, htz
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota  
 del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)



## FH311

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	MUT	G571E: 1775 G>A, htz		
13	WT			
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH312

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2	Wariant polimorficzny-3
P + 1	WT				
2	SNP		intron 2:190+56 G>A, htz		
3	WT				
4	WT				
5	WT				
6	WT				
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom		
8	SNP		A370T: 1171 G>A, htz		
9	MUT	W422R: 1327 T>C, htz			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz		
11	WT				
12	SNP		intron 11: 1706-69 G>T, htz	intron 11: 1706-55 A>C, htz	N570N: 1774 C>T, htz
13	WT				
14	WT				
15	SNP		R723R: 2232 G>A, hom		
16	WT				
17	WT				
18	WT				
APOB/ekson					
26	WT				

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH315

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2	Wariant polimorficzny-3
P + 1	WT				
2	SNP		C6C: 81 C>T, htz		
3	WT				
4	WT				
5	WT				
6	WT				
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom	
8	WT				
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, hom		
10	MUT	intron 9: 1359-3 del C, htz	R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+12 C>T, htz	intron 10: 1586+53 A>G, hom
11	WT				
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz		
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz		
14	WT				
15	WT				
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz		
17	WT				
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, htz	3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson					
26	WT				

## FH369

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	
11	SNP		P518P: 1617 C>G, htz	
12	SNP		intron 11: 1706-69 G>T, hom	L554L: 1725 C>T, htz
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	WT			
17	WT			
18	WT			
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota  
 del – delecja, ins – insercja  
 UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH373

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT	del e1-2, 20kb (FH Siracusa-3)		
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	MUT	G571E: 1775 G>A, htz	L554L: 1725 C>T, htz	
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH378

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2	Wariant polimorficzny-3
P + 1	WT				
2	SNP		C6C: 81 C>T, htz	intron 2:190+56 G>A, htz	
3	WT				
4	SNP		intron 3: 314-50 T>C, htz		
5	WT				
6	WT				
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom		
8	WT				
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz		
10	SNP		intron 10: 1586+53 A>G, htz		
11	WT				
12	SNP		intron 11: 1706-69 G>T, htz	intron 11: 1706-55 A>C, hom	N570N: 1774 C>T, htz
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz		
14	WT				
15	MUT	FsN745: 2296 del AC, htz			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz		
17	WT				
18	SNP		intron 17: 2548-42 A>G, hom	3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson					
26	WT				

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota  
 del – delecja, ins – insercja  
 UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH382

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	WT			
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, hom	
11	WT			
12	WT			
13	MUT	intron 12: 1846-2 A>C, htz	V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH407

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	MUT	A29S: 146G>T, htz		
3	WT			
4	MUT	C176W: 591C>G, htz		
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, hom
8	WT			
9	WT			
10	WT			
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, hom	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, hom	
14	WT			
15	WT			
16	WT			
17	WT			
18	WT			
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

## FH417

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	SNP		intron 2: 190+56 G>A, htz	
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	
8	SNP		A370T: 1171G>A, htz	
9	WT			
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	
11	WT			
12	SNP		intron 11: 1706-69 G>T, htz	intron 11: 1706-55 A>C, htz
13	WT			
14	WT			
15	SNP		R723R: 2232 G>A, htz	
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, htz	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, htz	
APOB/ekson				
26	WT			

## FH428

LDLR/ekson	Genotyp	Mutacja	Wariant polimorficzny-1	Wariant polimorficzny-2
P + 1	WT			
2	WT			
3	WT			
4	WT			
5	WT			
6	WT			
7	SNP		intron 7: 1060+7 C>T, hom	intron 7: 1060+10 G>C, htz
8	WT			
9	SNP		intron 9: 1358+56 C>T, htz	
10	SNP		R450R: 1413 G>A, htz	intron 10: 1586+53 A>G, htz
11	WT			
12	SNP		N570N: 1774 C>T, htz	
13	SNP		V632V: 1959 T>C, htz	
14	WT			
15	WT			
16	SNP		intron 16: 2389+46 C>T, hom	
17	WT			
18	SNP		3'UTR: 2635 G>A, hom	
APOB/ekson				
26	WT			

P – promotor

WT – brak mutacji (ang. *wild type*); NW – nie wykonano  
 SNP – polimorfizm (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
 MUT - mutacja

Htz - heterozygota, Hom – homozygota

del – delecja, ins – insercja

UTR – region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*)

**Tabela 19** Dane kliniczne rodzin probantów homozygotycznych lub heterozygot złożonych\*.

Probant	Fenotyp	Genotyp	
		Allel 1	Allel 2
FH 30	<p><b><u>Matka</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- brak objawów</li> <li>- T-CH 298, LDL 249</li> </ul> <p><b><u>Ojciec</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- brak objawów</li> <li>- T-CH 316, LDL 251</li> </ul> <p><b><u>Rodzeństwo probanta:</u></b></p> <p><b>Brat</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- brak objawów</li> <li>- T-CH 138, LDL-C 81</li> </ul>	ekson 12/G571E	WT
FH 60	<p><b><u>Matka</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CAD, bypasy w 51 r.ż., cukrzyca</li> <li>- T-CH 441 LDL 377</li> </ul> <p><b><u>Ojciec</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- zawał serca w 50 r.ż., żółtaki powiek</li> <li>- T-CH 362, LDL 231</li> </ul> <p><b><u>Rodzeństwo probanta:</u></b></p> <p><b>Siostra 1</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- brak objawów</li> </ul> <p><b>Siostra 2</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- brak objawów</li> </ul>	WT	ekson 14/C646Y
FH 373	<p><b><u>Matka</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- brak objawów</li> <li>- T-CH 342, LDL 221</li> <li>- aktywność receptora LDL w limfocytach - 51% normalnej wartości</li> </ul> <p><b><u>Ojciec</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- brak objawów</li> <li>- T-CH 316, LDL 206</li> <li>- aktywność receptora LDL w limfocytach – 53.9% normalnej wartości</li> </ul> <p><b><u>Rodzeństwo probanta</u></b></p> <p><b>Siostra</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- zmarła w 13 r.ż. z powodu ostrej niewydolności serca</li> <li>- T-CH&gt;800</li> </ul> <p><b>Brat</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pozornie bez objawów</li> <li>- T-CH 280, LDL 183</li> <li>- aktywność receptora LDL w limfocytach – 53.9% normalnej wartości</li> </ul>	WT	WT
		ekson12/G571E	WT
		ND	ND
		ekson12/G571E	WT

\* wartości podano w mg/dl; T-CH - cholesterol całkowity; LDL – cholesterol frakcji LDL; ND – brak danych (ang. *no data*)

**Tabela 20** Prawidłowe poziomy frakcji cholesterolu [www.jojo genetics.nl].**Cholesterol LDL**

percentyle	mężczyźni			kobiety		
	50	5	95	50	5	95
wiek	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
5 - 9	2,41	1,74	3,26	2,59	1,74	3,45
10 - 14	2,49	1,61	3,37	2,49	1,71	3,47
15 - 19	2,51	1,68	3,86	2,59	1,79	3,78
20 - 29	3,01	1,89	4,22	2,75	1,76	4,09
30 - 39	3,42	2,15	4,92	2,93	1,87	4,35
40 - 49	3,65	2,31	5,13	3,32	2,10	4,90
50 - 59	3,70	2,15	5,47	3,89	2,49	5,67
60 - 69	3,70	2,25	5,39	4,12	2,51	5,88
70 - 79	3,52	2,10	5,23	4,07	2,54	5,58

**Cholesterol HDL**

percentyle	mężczyźni			kobiety		
	50	5	95	50	5	95
wiek	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
5 - 9	1,45	1,01	1,89	1,37	0,85	1,87
10 - 14	1,40	0,96	1,89	1,35	0,91	1,81
15 - 19	1,17	0,75	1,76	1,35	0,85	1,92
20 - 29	1,17	0,78	1,66	1,42	0,91	1,99
30 - 39	1,14	0,70	1,66	1,45	0,91	2,10
40 - 49	1,14	0,75	1,74	1,48	0,91	2,25
50 - 59	1,17	0,70	1,74	1,53	0,88	2,25
60 - 69	1,19	0,73	1,81	1,48	0,91	2,20
70 - 79	1,22	0,75	2,18	1,42	0,88	2,05

**Trójglicerydy**

percentyle	mężczyźni			kobiety		
	50	5	95	50	5	95
wiek	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
0 - 4	0,63	0,33	1,12	0,72	0,38	1,27
5 - 9	0,63	0,34	1,14	0,68	0,36	1,19
10 - 14	0,75	0,36	1,41	0,85	0,41	1,48
15 - 19	0,88	0,42	1,67	0,81	0,44	1,40
20 - 29	1,22	0,51	2,54	0,84	0,42	1,56
30 - 39	1,55	0,59	3,31	0,93	0,45	1,84
40 - 49	1,72	0,53	3,66	1,14	0,52	2,29
50 - 59	1,66	0,66	3,42	1,36	0,61	2,80
60 - 69	1,58	0,66	3,15	1,46	0,66	2,72
70 - 79	1,46	0,66	2,97	1,48	0,67	2,68
>80	1,49	0,62	2,88	1,53	0,68	2,73

**Cholesterol całkowity**

percentyle	mężczyźni			kobiety		
	50	5	95	50	5	95
wiek	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
0 - 4	4,02	2,95	5,26	4,04	2,90	5,18
5 - 9	4,15	3,13	5,26	4,22	3,26	5,31
10 - 14	4,09	3,08	5,23	4,15	3,21	5,21
15 - 19	3,89	2,93	5,10	4,07	3,08	5,18
20 - 29	4,51	3,34	5,98	4,33	3,24	5,67
30 - 39	5,10	3,68	6,79	4,66	3,50	6,11
40 - 49	5,41	4,02	7,05	5,13	3,89	6,71
50 - 59	5,52	4,07	7,18	5,80	4,33	7,59
60 - 69	5,52	4,12	7,12	5,98	4,43	7,77
70 - 79	5,34	3,96	6,87	5,96	4,38	7,56
>80	5,36	3,73	7,12	5,75	4,27	7,23

W celu przeliczenia podanych wartości z jednostek mmol/l na mg/dl należy wartości cholesterolu całkowitego, frakcji LDL i HDL pomnożyć razy 38.67. Natomiast wartości trójglicerydów pomnożyć razy 88.57.



**Tabela 21** Mutacje genu *LDLR* – nowe i stare nazewnictwo.

Stare nazewnictwo			Nowe nazewnictwo	
Pozycja nukleotydowa	Pozycja aminokwasowa	Lokalizacja	Pozycja nukleotydowa	Pozycja aminokwasowa
58 G>A	G-2R	ekson 1	c.58G>A	p.G20R
91 G>A	E10K	ekson 2	c.91G>A	p.E31K
131 T>G	W23X	ekson 2	c.131T>G	p.W44X
146 G>T	A29S	ekson 2	c.146G>T	p.A50S
169 G>A	D36N	ekson 2	c.169G>A	p.D57N
190+1 G>A	-	intron 2	c.190+1G>A	-
313+1 G>C	-	intron 3	c.313+1G>A	-
324delGT/insTC	C88R	ekson 4	c.324_325delGTinsTC	p.C109R
420 G>C	E119D	ekson 4	c.420G>C	p.E140D
460 C>T	Q133X	ekson 4	c.460C>T	p.Q154X
591 C>G	C176W	ekson 4	c.591C>G	p.C197W
693 C>A	C210X	ekson 4	c.693C>A	p.C231X
692 G>A	C210Y	ekson 4	c.692G>A	p.C231Y
533insGGCTCGGA	FsD157	ekson 4	c.533_540insGGCTCGGA	p.D178fsX31
798 T>A	D245E	ekson 5	c.798T>A	p.D266E
1061 A>G	D333G	ekson 8	c.1061A>G	p.D354G
1186+97C>G	-	intron 8	c.1186+97C>G	-
1291 G>A	A410T	ekson 9	c.1291G>A	p.A431T
1327 T>C	W422R	ekson 9	c.1327T>C	p.W343R
1339 T>C	S426P	ekson 9	c.1339T>C	p.S447P
1359-3 del C	-	intron 9	c.1359-3delC	-
1516 G>A	V485M	ekson 10	c.1516G>A	p.V506M
1545 C>T	N494N	ekson 10	c.1545C>T	p.N515N
1586+12 C>T	-	intron 10	c.1586+12C>T	-
1698-1704delCACC CTA/insGCCCAAT	ITL545MPN	ekson 11	c.1698_1704delCACCCTA insGCCCAAT	p.ITL566MPN
1705+1 G>A	-	intron 11	c.1705+1G>A	-
1706 -10 G>A	-	intron 11	c.1706-10G>A	-
1720 C>T	R553C	ekson 12	c.1720C>T	p.R574C
1775 G>A	G571E	ekson 12	c.1775G>A	p.G592E
1836 C>T	A591A	ekson 12	c.1836C>T	p.A612A
1846-2 A>C	-	intron 12	c.1846-2A>C	-
1920 C>T	N619N	ekson 13	c.1920C>T	p.N640N
2000 G>A	C646Y	ekson 14	c.2000G>A	p.C667Y

2056 C>T	Q665X	ekson 14	c.2056C>T	p.Q686X
2174 del C	FsS704	ekson 15	c.2174delC	p.S725fsX4
2296 del AC	FsN745	ekson 15	c.2296_2297delAC	p.N766fsX15
2312-71G>A	-	intron 15	c.2312-71G>A	-
2390-2 A>G	-	intron 16	c.2390-2G>A	-
2483 A>G	Y807C	ekson 17	c.2483A>G	p.Y828C

c. – poziom cDNA; g. – poziom genomowego DNA, p. – poziom białka (ang. *protein*)

Dziękuję wszystkim, którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy,  
szczególnie Panu Profesorowi Januszowi Limonowi.

Dziękuję zarówno za wkład merytoryczny jak i duchowy.

Bliskim za radość w moim życiu...