

Latvijas Universitāte

Bioloģijas fakultāte



Ilze Radoviča

Promocijas darba kopsavilkums

**Multifaktoriālās dislipidēmijas un iedzimtās hiperholesterolēmijas ģenētisko
risku faktoru noskaidrošana Latvijas populācijā**

Doktora grāda iegūšanai Bioloģijā

Molekulārās bioloģijas apakšnozarē

Rīga, 2015

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātē, Molekulārās bioloģijas katedrā, Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un Studiju centrā laika posmā no 2008. gada līdz 2014. gadam.

Pētījums izstrādāts ar Latvijas Zinātņu Padomes, Eiropas sociālā fonda projekta “Slimību patoģenēzes ģenētisko un molekulāro mehānismu izpēte un jaunu terapijas un diagnostikas līdzekļu izstrāde” Nr. 2009/0204/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/150, Eiropas reģionālās attīstības fonda projekta “Jaunu DNS diagnostikas testu izstrāde un validācija lietošanai klīniskajā praksē” Nr. 2010/0311/2DP/2.1.1.1.0/10/APIA/VIAA/022 un Eiropas sociālā fonda projekta “Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē - 2” Nr. 2009/0138/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/004 atbalstu.



Darbs sastāv no ievada, četrām nodaļām, secinājumiem, aizstāvamo tēžu saraksta, oriģinālo publikāciju saraksta, pētījuma aprobācijas, darba autora izglītības un pieredzes apraksta, pateicībām, atsauču saraksta.

Darba forma: publikāciju kopa Bioloģijas nozarē, molekulārās bioloģijas apakšnozarē.

Darba zinātniskais vadītājs: Dr. biol. Jānis Kloviņš

Darba recenzenti:

- 1) Dr. biol. Dace Pjanova, Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un Studiju Centrs;
- 2) Dr. med., prof. Valdis Pīrāgs, Paula Straiņa Klīniskā Universitātes slimnīca;
- 3) PhD Mathias Rask-Andersen, Uppsala University, Department of Neuroscience.

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2015. gada 04. martā, plkst. 13:00 Latvijas Universitātes Bioloģijas nozares promocijas padomes atklātā sēdē, Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un Studiju Centrā, Rātsupītes ielā 1 k-1.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Kalpaka bulvārī 4.

LU Bioloģijas zinātņu nozares promocijas

padomes priekšsēdētājs /-a: _____ / _____ /

promocijas padomes sekretārs /-e: _____ / _____ /

© Latvijas Universitāte, 2015

© Ilze Radoviča, 2015

KOPSAVILKUMS

Dislipidēmija ir lipīdu metabolisma slimība, ieskaitot gan dažādu asins plazmas lipoproteīnu pārprodukciju, gan nepietiekamību. Pastāv vairāki dislipidēmiju paveidi, kas izpaužas dažādu izmainītu asins plazmas lipoproteīnu profilu veidā. Dislipidēmijas, kuru cēlonis ir mutācijas kādā no dažiem gēniem, tiek sauktas par monogēnām dislipidēmijām vai iedzimtām hiper- (IH) vai hipoholesterolēmijām, kamēr dislipidēmijas, kuru cēlonis ir liels skaits maza efekta polimorfismi kombinācijā ar apkārtējās vides faktoriem (diēta, dzīves stils un citi), tiek sauktas par multifaktoriālām dislipidēmijām. Dislipidēmijas, kuru cēlonis ir apkārtējās vides faktori vai tās ir kā simptoms citām slimībām, tiek sauktas par sekundārajām dislipidēmijām. Tā kā dažādu dislipidēmiju fenotipiskā izpausme var būt līdzīga, ir ļoti grūti izšķirt katru tipu; taču multifaktoriālās un sekundārās dislipidēmijas daudz labāk reaģē uz ārstēšanu. Monogēno dislipidēmiju gadījumi ir daudz smagāki un neatbild uz ārstēšanu vienlīdz viegli, jo slimības patoģenēzē var tikt iesaistīti dažādi lipīdu metaboliskie ceļi.

Lipīdi un lipoproteīni paši par sevi neizraisa nekādus simptomus, tomēr paaugstināta lipoproteīnu un to saturošo lipīdu uzkrāšanās dažādos audos var izraisīt fizisku un metabolisku simptomu attīstību. Piemēram, holesterola uzkrāšanās cīpslās izraisa cīpslu ksantomu veidošanos – dzeltenīgu, ar holesterolu bagātas masas uzkrāšanos zem ādas, cīpslās un citās ķermeņa daļās. Paaugstināts asins plazmas lipoproteīnu līmenis var izraisīt arī zema blīvuma lipoproteīnu (ZBL) uzkrāšanos artēriju sienā, izraisot artēriju sienīņu iekaisumu un tālāk aterosklerozes attīstību. Ir ļoti labi zināms, ka ateroskleroze, tās izraisītās sirds asinsvadu slimības (SAS) un citas vaskulārās slimības pašreiz ir biežākais nāves cēlonis visā pasaulē.

Šajā pētījumā tiek aplūkoti biežāk sastopamie ģenētiskie cēloņi abiem multifaktoriālās un monogēnās dislipidēmijas paveidiem Latvijas populācijā. Tas ietver 144 biežu, iepriekš ar dažādiem lipīdu parametriem saistītu viena nukleotīda polimorfismu (SNP) genotipēšanu salīdzinoši lielā (n = 1273) Latvijas populācijas paraugkopā. Lai apzinātu ģenētiskos faktorus, kas izraisa IH, mēs veicām četru ar IH saistīto gēnu kodējošo daļu jaunās paaudzes sekvenēšanu (NGS) 92 Latvijas populācijas “iespējamos” IH pacientos.

Rezultāti rāda, ka *CETP*, *MLXIPL* un *TOMM40* lokusus esošie polimorfismi ir visbiežāk sastopamie multifaktoriālo dislipidēmiju ietekmējošie ģenētiskie faktori. Vēl jo vairāk, riska alēļu skaits korelē ar visu četru lipīdu parametru līmeņiem, ļaujot izmantot šos riska SNP dažādu lipīdu parametru prognozēšanai. Veicot biežāk sastopamo monogēno dislipidēmiju ģenētisko faktoru pētījumus mēs konstatējam, ka funkcionālas *APOB* gēna mutācijas ir visbiežākie IH izraisošie ģenētiskie faktori Latvijas populācijā. Vēl jo vairāk, mēs atradām sešas pilnīgi jaunas mutācijas *APOB* un *LDLR* gēnos, kas, iespējams, izraisa IH.

Mūsu pētījumā iegūtā informācija palīdzēs uzlabot kopējo zināšanu klāstu par dislipidēmiju ietekmējošiem ģenētiskajiem faktoriem un, cerams, palīdzēs arī izstrādāt daudz precīzākus un daudz efektīvākus dislipidēmiju diagnostikas instrumentus.

SATURA RĀDĪTĀJS

Kopsavilkums	3
Satura rādītājs	4
Darbā lietotie saīsinājumi	5
1. Ievads	6
2. Darba mērķi un uzdevumi	9
3. Materiāli un metodes	10
3.1. Paraugkopas raksturojums	10
3.2. LipoGene genotipēšanas panelis	10
3.3. Ātrais IH diagnostikas panelis	11
3.4. IH NGS panelis	11
3.5. Mutāciju verifikācija	11
3.6. Datu analīze	12
4. Rezultāti un diskusija	13
4.1. Multifaktoriālo dislipidēmiju ģenētiskie riska faktori	13
4.1.1. Saistību analīze	13
4.1.2. Haplotipu analīze	15
4.1.3. Apvienotā efekta analīze	17
4.1.4. Epistāzes analīze	19
4.1.5. Imputācija	20
4.2. Monogēno dilipidēmiju ģenētiskie riska faktori	20
4.2.1. Reālā laika genotipēšana	20
4.2.2. Jaunās paaudzes sekvenēšana	20
Secinājumi	25
Aizstāvamās tēzes	25
Orģinālo publikāciju saraksts	26
Pētījuma aprobācija	26
Autora izglītība un pieredze	27
Pateicības	27
Literatūras saraksts	28

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

A	adenīna nukleotīds	LDLR	zema blīvuma lipoproteīnu receptors (ja slīprakstā (<i>LDLR</i>) tad LDLR gēns)
ABCA1	ATP-binding cassette A1 (ja slīprakstā (<i>ABCA1</i>) tad ABCA1 gēns)	LDLRAP1	zema blīvuma lipoproteīnu receptora adaptera proteīns 1 (ja slīprakstā (<i>LDLRAP1</i>) tad LDLRAP1 gēns)
ABL	augsta blīvuma lipoproteīns	LIPC arī HL	aknu lipāze (ja slīprakstā (<i>LIPC</i>) tad LIPC gēns)
ApoA1	apolipoproteīns A1 (ja slīprakstā un ielajiem burtiem (<i>APOA1</i>) tad ApoA1 gēns)	<i>LIPG</i>	Lipase, Endothelial gēns
ApoA5	apolipoproteīns A5 (ja slīprakstā un ielajiem burtiem (<i>APOA5</i>) tag ApoA5 gēns)	LPL	lipoproteīnu lipāze (ja slīprakstā (<i>LPL</i>) tad LPL gēns)
ApoB	apolipoproteīns B (ja slīprakstā un ielajiem burtiem (<i>APOB</i>) tad ApoB gēns)	ĻZBL	ļoti zema blīvuma lipoproteīns
ApoE	apolipoproteīns E (ja slīprakstā un ielajiem burtiem (<i>APOE</i>) tad ApoE gēns)	MAF	minorās alēles frekvence
ARH	autosomāli recesīva hiperholesterolēmija	Mb	megabāze – ekvivalents 1000000 bp DNS vai RNS
as	aminoskābe	MLX	max like protein X
as#	aminoskābes pozīcija (piemēram, Lys20 – lizīns 20. pozīcijā)	MLXIPL	MLX interacting protein-like (ja slīprakstā (<i>MLXIPL</i>) tad MLXIPL gēns)
as#as	vinas aminoskābes nomaina uz citu attiecīgajā pozīcijā (piemēram, Lys20Leu – 20. pozīcijas lizīna nomaina uz leicīnu)	<i>NCAN</i>	Neurocan core protein gēns
BCL3	B-cell leukemia/lymphoma 3 (ja slīprakstā (<i>BCL3</i>) tad BCL3 gēns)	NCBI	Nacionālais biotehnoloģiju informācijas centrs (National Center for Biotechnology Information)
bp	DNS vai RNS bāzu pāri	NCEP	Nacionālā holesterola izglītības programma (National Cholesterol Education Program)
C	citozīna nukleotīds	NF-κB	nuclear factor kappa-B
<i>CELSR2</i>	cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 gene	NGS	jaunās paaudzes sekvenēšana (Next Generation Sequencing)
CETP	cholesterol ester transfer protein (ja slīprakstā (<i>CETP</i>) tad CETP gēns)	NIACR1	niacīna receptors 1 (ja slīprakstā (<i>NIACR1</i>) tad NIACR1 gēns)
<i>CILP2</i>	Cartilage Intermediate Layer Protein 2 gēns	PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (ja slīprakstā (<i>PCSK9</i>) tad PCSK9 gēns)
DNS	dezoksiribonukleīnskābe	PGM	personālā genoma iekārta (Personal Genome Machine)
dNTP	dezoksiribonukleotīdu maisījums	PĶR	polimerāzes ķēdes reakcija
<i>DOCK7</i>	Dedicator of cytokinesis 7 gēns	rs#	viena nukleotīda polimorfisma references kods
EDTA	etilēndiamīntetraetiķskābe	s	sekunde
ExoI	eksonukleāze I	SAP	garneļu sārmainā fosfatāze (Shrimp Alkaline Phosphatase)
<i>FADS2</i>	Fatty acid desaturase 2 gēns	SAS	sirds asinsvadu slimība
FDB	iedzimts ApoB100 defekts	SNP	viena nukleotīda polimorfisms (single nucleotide polymorphism)
FH	iedzimta hiperholesterolēmija vai iedzimta hiperholesterolaēmija	T	timīna nukleotīds
FH3	iedzimtas hiperholesterolēmijas tips 3	TAE	buferšķīdums, kura sastāvā ir TRIS bāze, etiķskābe un EDTA
G	guanīna nukleotīds	Tag-SNP	tagējošie SNP
<i>GALNT2</i>	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 gēns	TBL2	transducin (beta)-like 2 (ja slīprakstā (<i>TBL2</i>) tad TBL2 gēns)
<i>GCKR</i>	glucokinase (hexokinase 4) regulator gēns	TG	triacilglicerols vai triglicerīds
<i>GPR109A/B</i>	Niacin receptor 1 un 2 gēni	TOMM40	translocase of outer mitochondrial membrane yeast homolog 40 (ja slīprakstā (<i>TOMM40</i>) tad TOMM40 gēns)
GWAS	visa genoma saistību pētījumi (Whole-Genome Association Studies)	<i>TRIB1</i>	Tribbles homolog 1or G-Protein-Coupled Receptor-Induced Gene 2 Protein gēns
HE	holesterola esteris	TRIS	2-amino-2-hidroksimetil-propān-1,3-diols
hg19	cilvēka genoma versija 19	<i>TTC39B</i>	Tetratricopeptide Repeat Domain 39B gēns
HGMD	cilvēka genoma mutāciju datubāze (Human Gene Mutation Database)	UTR	netranslējamais rajons
HL, arī LIPC	aknu lipāze	VBL	vidēja blīvuma lipoproteīns vai ĻZBL palieka
<i>HMGR</i>	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase gēns	VIGDB	Valsts iedzīvotāju genoma datu bāze
HPL	cilvēka aizkuņģa dziedzerā lipāze	WHO	Pasaules veselības organizācija (World Health Organization)
IGV	interaktīvais genomu pārlūks (Integrative Genomics Viewer)	ZBL	zema blīvuma lipoproteīns
IVS#	intra nummurs	ŽS	žultsskābe
kb	kilobāze – ekvivalents 1000 bp DNS vai RNS		
KH	kopējais holesterols		
ĶMI	ķermeņa masas indekss		
LCAT	Lecithin—cholesterol acyltransferase (ja slīprakstā (<i>LCAT</i>) tad LCAT gēns)		
LD	nelīdzsvarotā saistība (linkage disequilibrium)		

1. IEVADS

Primārā lipīdu loma ir lipīdu dubultslāņa – šūnas membrānas veidošana. Lipīdu funkcijas šūnā ietver arī: elektroķīmiskā gradienta nodrošināšanu abpus šūnas membrānai, primāro un sekundāro signālceļu nodrošināšanu, enerģijas uzglabāšanu, olbaltumvielu pārvietošanu un nostiprināšanu šūnas membrānā u.c. [1-3]. Lipīda darbojas arī kā elektronu pārnēsētāji vai pat gaismu absorbējošie pigmenti [4]. Piemēram, holesterols ir nepiesātināts steroīdu saimes alkohols un ir vitāls normālas dzīvnieku šūnas funkcionēšanai, tas ir fundamentāls šūnas membrānas elements un kalpo kā izejviela daudz un dažādām svarīgām substancēm, tādām kā virsnieru un dzimumdziedzeru steroīdie hormoni un žultsskābe (ŽS) [1, 5]. Lipīdi kalpo arī kā izejmateriāls vitamīnu A, C, D, E un K sintēzei, kas regulē svarīgus bioloģiskos procesus un kalpo kā katalizatori dažādām enzimatiskām reakcijām. Visas iepriekš minētās lipīdu funkcijas cilvēka organismā liecina par to vitālo nepieciešamību, lai organisms normāli funkcionētu. Lipīdu fizioloģiskā nozīmība cilvēka organismā tiek ilustrēta arī ar daudzu slimību esamību, kuru cēlonis ir izmaiņas lipīdos, piemēram, diabēts, aptaukošanās, Alshaimera slimība, aknu slimības, nieru slimības un dažāda veida dislipidēmijas, kas tālāk var izraisīt dažādas smagas komplikācijas ieskaitot aterosklerozi, sirds asinsvadu slimības (SAS) un metaboliskās slimības [1, 3].

Ar pārtiku uzņemtie triglicerīdi (TG) un holesterols, kā arī TG un holesterole, kas tiek sintezēti aknās vai zarnās ir ūdens vidē nešķīstoši – kas ir assins vide; Tādēļ tie tiek šķīdināti ar speciālu sfērisku lipīdu-proteīnu kompleksu – lipoproteīnu palīdzību. Šie lipoproteīnu kompleksi nodrošina lipīdu transportēšanu asinīs: no lipīdu uzglabāšanas audiem uz citiem audiem enerģijas ražošanai un pretējā virzienā [1, 3-5]. Visas lipoproteīnu daļiņas sastāv no kodola (bagāts ar TG un holesterola esteriem (HE)) un apvalka (fosfolipīdu slānis, neesterificēts holesterols un specifiski proteīni, tādi kā apolipoproteīni) [1, 3, 6]. Lipoproteīni tiek klasificēti balstoties uz to lipīdu un apolipoproteīnu sastāva, kas nosaka to elektroforētisko kustīgumu – blīvumu un daļiņu izmēru [1, 3, 5, 6]. Galvenās lipoproteīnu grupas ir: hilomikroni, ļoti zema blīvuma lipoproteīni (LZBL), zema blīvuma lipoproteīni (ZBL) un augsta blīvuma lipoproteīni (ABL). Ir zināms arī smalkāks lipoproteīnu sadalījums, kas ir kā starpstāvokļa struktūras iepriekš minētajām klasē (hilomikronu paliekas un ļoti zema blīvuma lipoproteīnu paliekas jeb vidēja blīvuma lipoproteīni (VBL)) [1, 3, 5, 6].

Paši par sevi paaugstināti lipīdu līmeņi asinīs neizraisa nekādus simptomus, taču paaugstināts ZBL holesterola līmenis un pazemināts ABL holesterols var izraisīt ZBL uzkrāšanos artēriju sienās, tādējādi veicinot arteriālo sienīņu iekaisuma procesus un tālāk aterosklerozes attīstību [7, 8]. Ateroskleroze ir visas sistēmas saslimšana, kas tālāk kalpo par pamatu dažādām vaskulārajām saslimšanām ieskaitot SAS, sirds trieku, insultu, aortas aneirismu un perifēro asinsvadu saslimšanas. Visas minētās saslimšanas kopā ir visbiežākais nāves cēlonis industriālajā pasaulē [3, 9-11]. Pasaules Veselības Organizācijas (WHO) dati liecina, ka aterosklerozes izraisītās slimības ir biežākais nāves cēlonis gandrīz visās pasaules daļās (izņemot Dienvid-Austrumu Āzijas reģionu) [10]. Vēl jo vairāk, 2012. gada Eiropas Kardiovaskulāro Slimību statistikas informācija liecina, ka SAS bija galvenais nāves cēlonis pirms 65 gadu vecuma [12]. Kopā Eiropā notiek gandrīz četri miljoni aterosklerozes un ar to saistīto slimību izraisītas nāves katru gadu. Aplūkojot Latvijas populāciju, šie skaitļi ir vēl biedējošāki un vairāk kā 60 % no visiem nāves gadījumiem ir aterosklerozes un tās saistīto slimību izraisītas [13].

Ir zināms, ka lipīdu līmeņi pazeminoša terapija ir efektīva pat bez klīnisku simptomu klātbūtnes [14]. Vairāk kā piecus gadus ilga asins plazmas lipīdu pazeminoša terapija samazināt risku sirds slimībām par ~30 % [14, 15] un iedzimtas hiperholesterolemijas (IH) gadījumā statīnu terapija dod pat līdz 48 % mirstības samazinājumu no SAS, salīdzinot ar kopējo populāciju [16]. Vēl jo vairāk, citos klīniskajos IH pacientu pētījumos ir parādīts, ka ZBL holesterola līmeņa samazināšana spēj novērst aterosklerozes attīstību un dažos gadījumos pat izraisa tās regresiju [17]. Tas nozīmē, ka ir ļoti svarīgi veikt savlaicīgu dislipidēmijas diagnosticēšanu, lai profilaktiski uzsāktu ārstēšanu un tādējādi kavētu dažādu komplikāciju, ieskaitot aterosklerozes un SAS attīstību.

Lipīdu metabolisms var tikt izmainīts dažādos veidos, kas rezultējas kā asins plazmas lipīdu līmeņu izmaiņas – dislipidēmijas. Tas kopā ar citiem aterosklerozes riska faktoriem var ietekmēt aterosklerozes attīstības laiku un smaguma pakāpi [18]. Dislipidēmijas var diagnosticēt ar plazmas lipīdu līmeņu mērījumu palīdzību. Rutīnas mērījumos tiek iekļauta kopējā holesterola (KH), TG, ABL holesterola un

ZBL holesterola noteikšana asins plazmā. Nav noteiktas robežas, kas norādītu uz normālu vai izmainītu lipīdu līmeni, bet, iespējams, pastāv lineāra korelācija starp lipīdu līmeņiem un SAS risku [7]. Katrā atsevišķā populācijā, indivīdu KH un TG mērījumus, kas iekrīt augšējos 5-10 % no normālā sadalījuma, parasti uzskata par izmainītiem [1], tādēļ dažādās populācijās pastāv nedaudz atšķirīgi robežlielumi, ko lieto izmainītu lipīdu fenotipa diagnosticēšanai [19].

Daži dislipidēmiju paveidi ir stingri iedzimti un izraisīti viens mutācijas rezultātā vienā no dažiem gēniem (monogēnā dislipidēmija). Šīs slimības ir iespējams raksturot balstoties uz apolipoproteīnu, enzīmu vai šūnas receptoru nepietiekamību vai izmaiņām [1, 7]. Monogēnās dislipidēmijas ir retas un ar ļoti smagu fenotipisko izpausmi, slikti reaģē uz lipīdu līmeni pazeminošu ārstēšanu un aterosklerozes attīstība notiek jau 20 līdz 39 gadu vecumā [20]. Neskatoties uz to, ka monogēnās dislipidēmijas ir retas, IH ir visbiežākā monogēnā saslimšana, salīdzinot ar citām. Balstoties uz Kopenhāgenas kopējās populācijas pētījumu, IH ir ir apmēram vienam no 200 indivīdu, taču šie skaitļi atšķiras dažādās populācijās un variē no viens no 200 līdz viens no 500 indivīdiem [21]. Homozigotā IH forma ir sastopama vēl retāk – vienam no 1,000,000 indivīdu, tādēļ lielākoties IH pacienti ir heterozigoti [1, 7, 22].

IH izraisa mutācijas zema blīvuma lipoproteīnu receptora (*LDLR*) gēnā. Plazmas ZBL līmenis ir stipri paaugstināts nodrošinot augstu risku (vairāk kā 50 %) agrīnu SAS attīstībai pirms 55 gadu vecuma [19, 23-25] un pacientiem bieži ir novērojamas cīpslu ksantomas. Pacientiem ar heterozigotu iedzimto *LDLR* nepietiekamību simptomi ir vājāki, jo puse no receptoriem ir normāli funkcionējoši. Tomēr, neskatoties uz neizbēgamo klīniski nozīmīgas aterosklerozes attīstību homozigotas IH pacientiem, attīstības sākums un slimības smagums var variēt pat starp indivīdiem ar identiskām *LDLR* gēna mutācijām [26]. Heterozigotiem šī fenotipa variēšana ir heterogēnāka.

Mutācijas apolipoproteīna B (*APOB*) gēnā (otrs biežākais monogēno dislipidēmiju cēlonis) izraisa iedzimtu ApoB nepietiekamību (FDB) [27]. Līdzīgi kā *LDLR* nepietiekamība, FDB tiek raksturota ar paaugstinātu (bet ne tik ļoti paagstinātu kā *LDLR* nepietiekamības gadījumā) plazmas ZBL līmeni, normālu TG līmeni, cīpslu ksantomām un priekšlaicīgu aterosklerozi. Plazmas ZBL holesterola koncentrācijas FDB pacientiem variē ļoti dramatiski un lielāko ties ir par apmēram 2.59 mmol/L augstākas kā atbilstoša vecuma kontrolēm

Funkciju pastiprinošas mutācijas *PCSK9* gēnā (proproteīn convertase substilisin/kexin type 9) izraisa trešā tipa iedzimto hiperholesterolēmiju (FH3) [28]. Arī FH3 fenotips klīniski neatšķiras no heterozigotas *LDLR* nepietiekamības vai FDB; tomēr šī slimība netiek saistīta ar *LDLR* vai *APOB* gēniem [29, 30].

Vēl viens monogēnās dislipidēmijas paveids, kas netiek saistīts ne ar vienu no iepriekš raksturotajiem gēniem [31] ir autosomāli recesīvā hiperholesterolēmija (ARH), kuru izraisa mutācijas zema blīvuma lipoproteīnu receptora adaptera proteīna 1 (*LDLRAP1*) gēnā [31]. ARH tiek raksturota ar ļoti smagu hiperholesterolēmiju, lielām ksantomām un priekšlaicīgu SAS [31]. ARH pacientiem plazmas ZBL holesterola līmenis mēdz būt starp tiem rādītājiem, kas sastopami heterozigotiem un homozigotiem *LDLR* nepietiekamības gadījumiem [32]. Neskatoties uz to, ka ARH pacientiem ir zemāks plazmas ZBL līmenis, tiem ir lielas, masīvas ksantomas, bet klīniski nozīmīgas aterosklerozes attīstība notiek vēlāk, kā pacientiem ar homozigotu *LDLR* nepietiekamību [32].

Ir zināmi arī citi monogēno dislipidēmiju paveidi ar vēl variablākiem fenotipiem, bet tās ir vēl retāk sastopamas. Monogēno dislipidēmiju diagnostika bieži tiek balstīta uz fizikāliem simptomiem, laboratorijas izmeklējumiem un pacienta ZBL holesterola un SAS vēsturi. Fizikālie simptomi ietver cīpslu ksantomu vai arcus cornealis esamība pirms 45 gadu vecuma, taču šie simptomi ir neprecīzi pie diagnozes noraidīšanas, jo daudziem heterozigotiem FDB pacientiem (apmēram 50 %) var nebūt minētās pazīmes. Heterozigotiem IH pacientiem var arī nebūt priekšlaicīgas SAS [1, 19]. Šī plāšā dažādo monogēno dislipidēmiju esamība padara to diagnosticēšanu ļoti grūtu, tādēļ ir nepieciešams izstrādāt daudz precīzākas analīzes, lai būtu iespējams noteikt pareizu diagnozi un izšķirt šos dažādos fenotipus.

Vēl vienu lielu dislipidēmiju paveidu – multifaktoriālo dislipidēmiju izraisa dažādi faktori, ieskaitot ģenētiskos un apkārtējās vides faktoros. Ģenētiskie faktori var ietvert zināmas monogēno hiperholesterolēmiju izraisošas mutācijas kopā ar maza efekta viena nukleotīda polimorfismiem (SNP) [33] vai daudzus maza efekta SNP [9], kamēr apkārtējās vides faktori ietver visus aterosklerozes riska faktoros, tādus kā taukiem bagāta diēta, alkohola lietošana un smēķēšana, kā arī visus riska faktoros, kas saistīti ar sekundārām dislipidēmijām (izklāstīts tālāk). Multifaktoriālā dislipidēmija ir visbiežākais

celonis paaugstinātam ZBL holesterola koncentrācijām plazmā [11]. Tā kā multifaktoriālo dislipidēmiju ietekmē daudz maza efekta faktori, arī tās fenotips ir ļoti variabls un plazmas holesterola līmeņi ir mazāk paaugstināti nekā monogēno dislipidēmiju gadījumos. Fizikālie simptomi arī ir daudz vieglāki, praktiski neizraisa cīpslu ksantomu veidošanos un palēninot aterosklerozes un SAS attīstību. Tomēr populācijās ar salīdzinošu augstu vidējo ZBL holesterola līmeni SAS sastopamība arī ir augstāka, it īpaši jaunu cilvēku vidū, jo to ir skaitliski daudz vairāk nekā to ar augstākiem holesterola līmeņiem [9]. Šie pacienti labi pakļaujas ārstēšanai un dažos, ļoti vieglos gadījumos arī dzīves stila pārmaiņas ļoti labi palīdz kontrolēt lipīdu līmeni un tādejādi nav nepieciešama medikamentoza ārstēšana. Neseni visa genoma saistību pētījumi (GWAS) un citi cilvēka ģenētikas pētījumi ir raksturojuši daudzus bieži sastopamus SNP un daudzus lokusus, kas ietekmē dažādu asins plazmas lipīdu līmeņus. Piemēram, *CELSR2*, *CILP2*, *DOCK7*, *FADS2*, *GALNT2*, *GCKR*, *GPR109A/B*, *MLXIPL*, *NCAN*, *NIACR1*, *TOMM40*, *TRIB1* un *TTC39B*, kā arī daudzi iepriekš zināmi lokusi, kuri ļoti iespējams ir iesaistīti lipīdu metabolismā (*ABCA1*, *APOA1*, *APOA5*, *APOB*, *APOE*, *CETP*, *HMGCR*, *LCAT*, *LDLR*, *LIPC*, *LIPG* un *LPL*) tiek raksturoti. Tomēr ne visas šīs saistības ir bijušas veiksmīgi atkārtotas [34-57]. Šī augstā ģenētisko un vides faktoru variabilitāte, kas ietekmē multifaktoriālo dislipidēmiju, kā arī dažādie fenotipi padara multifaktoriālās dislipidēmijas smaguma pakāpes diagnosticēšanu un tādejādi pareizas ārstēšanas izvēli ļoti grūtu. Apkopojot šo sadaļu ir skaidri redzams, ka jebkura ģenētiskos un epidemioloģiskos pētījumos iegūtā informācija var kalpot kā laba bāze jaunu, daudz efektīvāku asins plazmas lipīdu līmeņu prognozējošu un aterosklerozes riska noteikšanas diagnostikas instrumentu izveidē.

Pastāv arī trešais dislipidēmiju veids – sekundārā dislipidēmija. Sekundārā dislipidēmija ir sastopama kā citu slimību komplikācija [58]. Par sekundārās dislipidēmijas cēloņiem var saukt tikai tos stāvokļus, kurus ārstējot, bez cita veida iejaukšanās, tiek noregulētas arī lipīdu izmaiņas [59]. Visbiežākie sekundārās dislipidēmijas cēloņi ir cukura diabēts, aptaukošanās, hipotiroidisms, ļaundabīgie audzēji, hroniskas nieru slimības, nefrītiskais sindroms, holestāze, pārlietu alkohola lietošana, jebkura albuminūrija un 12 % pacientu ir citi cēloņi [58, 59]. Daudzos gadījumos tas, ka dislipidēmija grūti pakļaujas medikamentozai ārstēšanai, var norādīt uz citu nekonstatētu sekundāro cēloni [59, 60]. Pareiza sekundāro cēloņu identificēšana var novērst nevajadzīgu lipīdu pazeminošu medikamentu lietošanu. Vēl jo vairāk, dažos sekundārās dislipidēmijas gadījumos lipīdus samazinoša terapija var izraisīt nopietnus un pat potenciāli letālus blakus efektus, tādus kā hipotiroidisms, nieru mazspēja vai rābdomiolīze [61-63], tādēļ dažādu sekundāro dislipidēmijas cēloņu izslēgšana ir ļoti svarīga, pirms lipīdu pazeminošas terapijas uzsākšanas [58].

Tā kā pastāv vairāki dislipidēmiju tipi, kuriem katram ir savs slimības smaguma līmenis un atšķirīga reakcija uz ārstēšanu, katram no tiem būtu jāveic arī atšķirīga ārstēšana. Ir zināmas vairākas pieejas dažādu dislipidēmiju ārstēšanai, tādās kā dzīves stila izmaiņas, medikamentoza lipīdu līmeņu samazināšana (statīni, ŽS kompleksveidotāji, ezetimībs), TG samazinoši medikamenti, ABL holesterola līmeni paaugstinoši medikamenti (niacīns, fibrāti), ZBL aferēze vai pat ķirurģiskas iejaukšanās (aknu transplantācija, daļēja ileal artērijas apiešanas operācija) [7, 22, 64, 65]. Diemžēl lielākajā daļā gadījumu ārstēšana tiek nozīmēta tikai tad, kad pacientam jau ir attīstījušās SAS un tikai mazā daļā gadījumu pacientiem bez SAS [7]. Ļoti daudzi dislipidēmijas pacienti ir nediagnosticēti un tādejādi to risks saslimt ar SAS netiek regulēts.

Dažādās dislipidēmiju diagnosticēšanas pieejas, kā arī dažādie dislipidēmiju veidi, kurus katru būtu jāārstē atšķirīgi, norāda uz nepārprotamu nepieciešamību pēc daudz precīzākām dislipidēmiju diagnostikas iespējām. Tad būtu iespējams veikt personalizētu medicīnisko aprūpi, lai samazinātu aterosklerozes attīstību. Tā kā lielākā daļa dislipidēmiju ir ģenētisku cēloņu izraisītas, pastāv iespēja veikt DNS diagnostikas analīzes jau pirms klīnisku simptomu attīstības. Tādejādi zināšanas par ģenētiskajiem faktoriem, kas ir saistīti ar dažādiem dislipidēmiju paveidiem, ne tikai uzlabos kopējo zināšanu krājumu par lipīdu metabolismu, bet arī palīdzēs izveidot efektīvus uz DNS balstītas diagnostiskās analīzes savlaicīgas diagnostikas veikšanai.

2. DARBA MĒRĶI UN UZDEVUMI

Pētījuma mērķis ir izpētīt Latvijas populācijā biežāk sastopamos ģenētiskos cēloņus multifaktoriālām un iedzimtām dislipidēmijām, lai palielinātu kopējo informācijas klāstu par ģenētiskajiem riska faktoriem, kas ir pamatā dažādām dislipidēmijām. Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši darba uzdevumi:

1. Noskaidrot ģenētiskos riska faktorus, kas saistīti ar augsta blīvuma lipoproteīnu līmeni asinīs plazmā Latvijas populācijā;
2. Noskaidrot ģenētiskos riska faktorus, kas saistīti ar dažādiem asins plazmas lipīdu parametriem Latvijas populācijā;
3. Pārbaudīt daudzu sākotnēji saistītu SNP riska alēļu apvienotās ietekmes esamību;
4. Izveidot astoņu iedzimtu hiperholesterolēmiju (IH) izraisošo mutāciju reālā laika genotipēšanas paneli un pārbaudīt tā efektivitāti veicot diagnostiku Latvijas populācijas „iespējamu” IH pacientu paraugkopā;
5. Noskaidrot biežāk sastopamās IH izraisošās mutācijas Latvijas populācijā.

3. MATERIĀLI UN METODEDES

3.1. Paraugkopas raksturojums

Pētījumā izmantoti genomiskās DNS paraugi no Latvijas Valsts iedzīvotāju genoma datu bāzes (VIGDB). Visi VIGDB dalībnieki ir parakstījuši rakstisku piekrišanu dalībai projektā. Šo pētījumu ir akceptējusi Latvijas Centrālā medicīnas ētikas komiteja (Protokols Nr. 2007 A-7 and 01-29.1/25).

144 biežāk sastopamo SNP genotipēšanai tika atlasīti 1581 DNS paraugi, par kuriem bija pieejama fenotipiskā informācija: visu četru plazmas lipīdu līmeņu mērījumi (KH, ABL, ZBL un TG), ķermeņa masas indekss (KMI), glikozes līmenis asinīs, dzimums un vecums. Sakarā ar to, ka plazmas lipīdu līmeņi tiek saistīti ar SAS risku un daudzi SAS pacienti varētu lietot lipīdu līmeni pazeminošus medikamentus tie no pētījuma tika izslēgti, atstājot 1345 neradniecīgus DNS paraugus genotipēšanai. Sākotnēji genotipēti tika pirmie un pēdējie 380 paraugi (28.3 %) vadoties pēc ABL mērījumu sadalījuma, ļaujot veikt „gadījumu-kontroles” saistību analīzi starp biežāk sastopamajiem SNP un ABL holesterola līmeni. Otrais pētījuma etaps iekļāva 144 SNP genotipēšanu visos paraugos, ļaujot veikt kvantitatīvu saistību analīzi starp SNP un visiem četriem plazmas lipīdu parametriem.

Astoņu biežāko IH izraisīto mutāciju reālā laika genotipēšana tika veikta 95 neradniecīgiem „kontroles” paraugiem ar augstu ZBL līmeni (IH diagnoze nav noteikta, taču pacientu ZBL līmenis uzrāda IH iespējamību) un 48 neradniecīgiem IH pacientiem, kuri iegūti ar Latvijas Kardioloģijas Centra palīdzību (kopā 143 indivīdi).

Jaunās paaudzes sekvenēšana tika veikta jau minētajiem 48 IH pacientiem no Latvijas Kardioloģijas Centra un 44 neradniecīgiem indivīdiem ar paaugstinātu ZBL līmeni (nav noteikta IH diagnoze) no VIGDB. Balstoties uz pieejamo fenotipisko informāciju un izmantojot WHO Holandiešu Lipīdu Klīniku Tīkla izveidotos kritērijus IH diagnostikai indivīdi tika diagnosticēti kā „iespējams” IH (n = 64) vai „varbūtēji” IH (n = 28) pacienti.

3.2. LipoGene genotipēšanas panelis

SNP izvēle biežo polimorfismu genotipēšanas panela izveidei tika veikta balstoties uz dažādiem kandidāta gēnu asociāciju un GWAS [34-38, 40, 42, 44-48, 51, 53, 66-72]. Genotipēšanas panelim tika izvēlēti tikai SNP, kas ir bijuši saistīti ar vienu vai vairākiem lipīdu parametriem. SNP tika sarindoti pēc to augstākajām raksturotajām P vērtībām. Kopā tika atrasti 531 SNP, kas ir saistīti ar vienu vai vairāk lipīdu parametriem, tālāk atrastie SNP rs kodu formā tika nosūtīti genotipēšanas kvalitātes novērtēšanai uz Illumina Assay Design Tool. Balstoties uz dažādiem Illumina kritērijiem, 191 SNP tika izslēgti no saraksta. Tālāk tika izvēlēti 133 SNP ar P vērtībām zemākām kā 3.49×10^{-7} . Panelī tika iekļauti arī 11 tag-SNP, kas atrodas *GPR109A/GPR109B* lokusā, tādejādi kopā panelī tika iekļauti 144 SNP, kas pārstāv 32 lokusus. Galējais izvēlēto SNP skaits atbilst lietotās genotipēšanas platformas prasībām. Visu SNP un tiem atbilstošo lokusu saraksts ir atrodams mūsu pirmajā oriģinālajā publikācijā [73]. Visi 144 SNP tika genotipēti izmantojot Illumina BeadExpress genotipēšanas platformu (Illumina Golden Gate genotyping assay). Genotipēšana tika veikta Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un Studiju Centrā, vadoties pēc ražotāja instrukcijām.

Kvalitātes kontrole un primāro datu apstrāde. Lai pārliecinātos par datu kvalitāti un pārbaudītu datu savietojamības līmeni starp dažādām genotipēšanas platēm, 91 nejauši izvēlēts DNS paraugs tika nejauši izvietoti pa genotipēšanas platēm un genotipēti atkārtoti. Visām genotipēšanas platēm savietojamības līmenis bija augstāks par 99 %. Tāpat arī katrā platē tika lietota pozitīvā kontrole un visu plašu pozitīvās kontroles genotipi sakrita, tādēļ neviena genotipēšanas plate netika izslēgta no pētījuma.

Primāro datu apstrāde tika veikta izmantojot Illumina GenomStudio programmatūru. GeneCall sliekšnis tika iestatīts 0.25. Genotipēšanas datu klāsteru informācija tika apstrādāta katram SNP manuāli, lai izslēgtu neprecīza algoritma radītās kļūdas (nepietiekama sliktu datu punktu izslēgšana vai labu datu punktu neiekļaušana klāsteros). Paraugi ar genotipēšanas līmeni zem 0.950 (paraugi ar mazāk kā 95 % genotipētiem SNP) tika izslēgti no tālākas datu apstrādes (n=56).

3.3. Ātrais IH diagnostikas panelis

Mutāciju izvēle. Biežāko IH izraisošo mutāciju atlase reālā laika genotipēšanai tika veikta balstoties uz mutāciju sarakstu, ko lieto komerciāli pieejamā IH diagnostikas testā “Elucigen FH20 ARMS” tests. Mēs izvēlējāmies astoņus no 20 biežākajiem funkcionālajiem variantiem *LDLR* un *APOB* gēnos [74]. Visas izvēlētās mutācijas ir atrodamas Nacionālajā Biotehnoloģiju Informācijas Centra SNP datubāzē (dbSNP, versija 138): (rs5742904, rs139624145, rs28942078, rs121908024, rs121908039, rs28942084, rs121908027 un rs121908028).

Reālā laika PQR tika veikta izmantojot 7500 Real-Time PCR platformu (Applied Biosystems®). Visi genomiskās DNS paraugi tika normalizēti līdz 7 ng/μl koncentrācijai izmantojot spektrofotometru NANODROP ND-1000. Kopējais reālā laika PQR tilpums bija 10 μl: 5 μl TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®), 0.25 μl 40x TaqMan® zonžu maisījums (Applied Biosystems®), 1 μl (7 ng) genomiskās DNS un 3.75 μl MilliQ ūdens. Reakcija tika veikta sekojošos apstākļos: 10 min 95 °C un 40 cikli (15 s 92 °C, 1 min 60 °C un datu ievākšana).

3.4. IH NGS panelis

AmpliSeq mērķētā sekvencēšanas paneļa izveide. Mēs izveidojām pielāgotu AmpliSeq™ (Life Technologies) paneli mērķētai četru izvēlēto gēnu kodējošo rajonu sekvencēšanai (*APOB*, *LDLR*, *PCSK9* un *LDLRAP1*) [23, 24, 31, 56, 74-83]. Šis panelis ļauj veidot Ion Torrent™ (Life Technologies) platformai pielāgotas bibliotēkas un veikt liela apjoma paralēlo sekvenēšanu visiem interesējošajiem rajoniem. Galvenais šī paneļa princips ir ~200 bp garu oligonukleotīdu, sauktu par amplikoniem, DNS bibliotēkas veidošana ar multipleksās PQR palīdzību. Oligonukleotīdu atlasei tika izmantots Ion AmpliSeq™ Designer brīvpieejas rīks. Oligonukleotīdu atlasei tika lietoti sekojoši iestatījumi: kā references genoms tika izvēlēts cilvēka genoms (hg19), oligonukleotīdu izvēlei tika izvēlēta 1.2 algoritms un amplikonu garums tika iestatīts 200 bp. Mēs izvēlējāmies opciju ģenerēt oligonukleotīdus tikai ar IH saistīto gēnu kodējošo daļu, 3' un 5' netranslējamo rajonu sekvenēšanai. Kopā tika izveidoti 192 pāri oligonukleotīdu, kas tika sadalīti divos oligonukleotīdu maisījumos.

NGS. Interesējošo rajonu sekvenēšanai tika izvēlēta NGS platforma Ion Torrent™ (Life Technologies). DNS bibliotēku pagatavošanai tika lietots Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0, izveidoti oligonukleotīdu maisījumi un Ion Xpress™ Barcode Adapters reaģentu komplekts tika lietots lai atšķirtu dažādus paraugus. Agilent High Sensitivity DNA Kit tika lietots lai pārbaudītu iegūto bibliotēku koncentrāciju un kvalitāti. Emulsijas PQR veikšanai tika lietots Ion OneTouch™ 200 Template Kit v2 DL (Izlaists: 2012. gada 12. septembrī, Publicēšanas Nr. MAN0006957) un Ion OneTouch™ iekārta (Life Technologies). Sekvenēšanai tika lietots Ion PGM™ 200 Sequencing Kit (Izlaists: 2012. gada 26. septembrī, F labojums, Publicēšanas Nr. 4474246) un Ion Torrent Personal Genome Machine® (PGM™) (Life Technologies) sekvencēšanas iekārta. Katras 16 bibliotēkas tika sekvencētas uz viena Ion 314™ čipa (Life Technologies) un paredzamais pārklājums bija ~ 30x (vadoties pēc standarta AmpliSeq protokola).

3.5. Mutāciju verifikācija

Visu interesanto, atrasto, iespējams IH izraisošo un IH izraisošo mutāciju validācija tika veikta ar Sangera sekvencēšanas metodi izmantojot ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) instrumentu un reģionu specifiskus oligonukleotīdus, kuru sekvences ņemtas no AmpliSeq paneļa.

Specifisku DNS fragmentu amplificēšana. PQR tika sagatavots sekojošs reakcijas maisījums: 1.2 μl 10x Taq Buffer ar (NH₄)₂SO₄ (Fermentas), 1.2 μl 25 mM MgCl₂, 0.24 μl dNTP maisījums (25 mM, Fermentas), 0.36 μl 10 μM reģiona specifisks uz priekšu ejošais oligonukleotīds (Metabion), 0.36 μl 10 μM reģiona specifisks atpakaļejošais oligonukleotīds (Metabion), 0.2 μl HOT FIREPol DNS polimerāze (5 U/μl, SolisBiodyne), 0.5 μl matricas DNS (50 ng/μl) un 7.94 μl MilliQ ūdens. Kopējais reakcijas tilpums bija 12 μl. Reakcijas tika veiktas izmantojot GeneAmp® PCR System 9700 (Applied

Biosystems®) termociklери. Reakcijas apstākļи bija: 10 min 95 °C, 40 cikli (30 s 95 °C, 30 s 60 °C un 30 s 72 °C), 72 °C 7 min.

Tālāk paraugiem tiek veikta apstrāde ar eksonukleāzēm: 1 µl 1 U/µl garneļu sārmainā fosfatāze (SAP) (Fermentas) un 0.5 µl 20 U/µl eksonukleāze I, E.coli (Exo I) (Fermentas) tiek pievienoti 10 µl PQR produktam. Reakciju veic termociklērī GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®) pie sekojošiem reakcijas apstākļiem: 37 °C 30 min un 80 °C 30 min.

Sekvenēšanas PQR maisījums sastāv no: 2 µl 5x BigDye® Terminator v1.1 & v3.1 sekvenēšanas buferšķīduma (Applied Biosystems®), 0.5 µl BigDye® Terminator v3.1 maisījuma (Applied Biosystems®), 0.5 µl 5 µM reģiona specifiska oligonukleotīda (uz priekšu ejošā vai atpakaļejošā, bet ne abi vienā reakcijā), 2 µl ar eksonukleāzi apstrādāta PQR produkta un 5 µl MilliQ ūdens. Kopējais reakcijas tilpums bijā 10 µl. Reakcija tika veikta termociklērī GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®) pie apstākļiem: 5 min 95 °C, 25 cikli (15 s 96 °C, 4 min un 5 s 60 °C). Sekvenēšanas PQR produkti tika attīrīti izmantojot Sephadex® G-50 Superfine (Sigma-Aldrich) sefadeksu. Attīrītie paraugi tad tiek žāvēti termociklērī GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®) ar atvērtu vāku 70 °C 1.5 h vai kamēr sausi. Sausiem paraugiem tiek pievienoti 11 µl Hi-Di™ formamīda (Applied Biosystems®). Paraugus denaturē termociklērī GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®) inkubējot tos 95 °C 5 min, nekavējoties pēc inkubācijas paraugi tiek likti uz aukstumbloka vai ledus 5min.

3.6. Datu analīze

Lai pārbaudītu paraugkopas normālo sadalījumu priekš kvantitatīvās saistību analīzes tika pielietots 68–95–99.7 likums. TG līmenis bija vienīgais no visiem parametriem, kas neatbilda normālajam sadalījumam, tādēļ tika logaritmiski transformēts tālākām analīzēm.

PLINK v2.050 programmu paka [84] tika lietota dažādām statistiskajām analīzēm: Hārdija Weinberga tests, allēļu frekvenču analīzes, lineārās un loģistiskās regresijas analīzes ar un bez kovariātiem (dzimum, vecums, KMI, TG, ZBL holesterols un glikozes līmenis), haplotipu saistību analīzes, nosacījuma haplotipu analīzes un gēnu-gēnu mijiedarbības vai epistāzes testi.

Haplotipu un riska alēļu apvienotā efekta analīzes tika veiktas izmantojot viena parauga T testu no SPSS v13.0 programmas.

GMDR Beta 0.9 [85] programma tika lietota lai verificētu ar PLINK programmu paketes epistāzes testu iegūtos rezultātus.

Lokusiem, kas pārstēvēti ar vairāk kā pieciem SNP, tika veikta SNP inkriminēšana ar IMPUTE2 v2.2.2 programmu [86, 87]. Inkriminēto SNP saistību analīzes tika veiktas izmantojot SNPTEST v2.1.1 [87] programmu.

Abu pētījuma posmu asociāciju rezultātiem tika pielietota Bonferoni korekcija ($0.05/139=3.5 \times 10^{-4}$). Pētījuma statistiskā jauda tika aprēķināta izmantojot Quanto v1.2.4 [88] programmu. Gadījumu-kontroles pētījuma posmā mūsu paraugkopa ļāva atrast izredžu attiecības no 1.34 līdz 2.31 ar 80 % statistisko jaudu (pie $\alpha = 0.050$) atkarībā no MAF dažādiem SNP, kamēr kvantitatīvās saistību analīzes gadījumā mēs bijām spējīgi konstatēt betta koeficientus sekojošās robežās: paaugstinātam KH 0.50-0.15; paaugstinātam ZBL holesterola līmenim 0.45-0.15; samazinātam ABL holesterola līmenim 0.20 un paaugstinātam TG līmenim 0.30-0.10.

Reālā laika genotipēšanas rezultāti tika analizēti izmantojot 7500 System SDS programmu v1.3.1.22 (Applied Biosystems®).

Primārie NGS dati tika savietoti ar cilvēka references genomu (Hg19) izmantojot Torrent suite 3.6.2 un 4.0.2 iekļauto savietošanas aplikāciju v3.6.56201 un 4.0-r77189. Visu izmaiņu nosaukšanai tika lietota Variant calling aplikācija (variantCaller v3.6.63335 un 4.0-r76860). Lai izslēgtu PQR radušās kļūdas un platformas specifiskās kļūdas [89], visas atrastās izmaiņas tika manuāli aplūkotas izmantojot Integrative Genomics Viewer (IGV) v2.3 programmu [90]. Dažas interesantās izmaiņas tika verificētas ar Sangera sekvenēšanu. Tālāka variantu anotēšana tika veikta izmantojot NCBI datubāzi, HGMD datubāzi, IH variantu datubāzi, kā arī citus brīvpieejas informācijas avotus. Brīvpieejas rīki: PolyPhen-2 v2.2.2r398 [91], SIFT [92] un Mutation Taster [93] tika lietoti atrasto variantu iespējamo funkcionālo efektu prognozēšanai.

4. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Tauku transports organismā tiek nodrošināts ar lipoproteīnu kompleksu un asins plūsmas palīdzību, tādejādi pazmas lipīdu līmeņu izmaiņas – dislipidēmijas var norādīt uz dažādām tauku metabolisma izmaiņām. Cilvēka ķermenī lipīdi ir nepieciešami šūnas membrānas veidošanai, hormonu sintēzei, tauku uzkrāšanai, enerģijas ražošanai u.c. un izmaiņas lipīdu metabolismā var izraisīt dažādas ķermeņa disfunkcijas. Dislipidēmijas un to izraisītās komplikācija ir pētītas jau daudzas dekādes [94], taču ne visi izmaiņu to radīto fenotipisko izpausmju iemesli ir raksturoti.

Ir zināmas trīs galvenās dislipidēmiju cēloņu klases: monogēnie, multifaktoriālie (ģenētiskie un apkārtējās vides), un sekundārie (apkārtējās vides vai citas slimības). Pirmā klase ietver dislipidēmijas, kuras ir iedzimtas pēc konkrēta iedzimšanas mehānisma un kuras lielākoties izraisa viena vai dažas mutācijas vienā no dažiem gēniem. Šīs strikti iedzimtās dislipidēmijas ir vieglāk pētīt, jo to fenotips parasti ir daudz smagāks un iedzimšanas mehānismi vienkāršāki. Tomēr katram skartajam indivīdam vai ģimenei var būt individuāli dislipidēmijas ģenētiskie cēloņi, tādēļ katra jauna ģenētiskā cēloņa identificēšanas gadījumā ir nepieciešami to funkcionālie pētījumi. Dažās no šīm strikti iedzimtajām dislipidēmijām var būt salīdzinoši vidējas plazmas lipīdu izmaiņas atgādinot multifaktoriālo un sekundāro dislipidēmiju fenotipu. Šādās situācijās izšķirt šos trīs dislipidēmiju paveidus ir vēl grūtāk. Tomēr multifaktoriālo un sekundāro dislipidēmiju pētījumi ir vēl sarežģītāki, jo abas uzrāda nelielas plazmas lipīdu izmaiņas un slimības pthoģenēzē iesaistītie ģenētiskie un/vai apkārtējās vides cēloņi parasti nav zināmi.

Šī darba galvenais mērķis ir papildināt zināšanas par dislipidēmiju izraisošajiem ģenētiskajiem faktoriem. Mūsu darbs tika iedalīts divās lielās daļās: pirmā – multifaktoriālo dislipidēmiju ģenētisko riska faktoru pētījumi un otrā – monogēno dislipidēmiju ģenētisko cēloņu pētījumi. Abos gadījumos pētījumi tika veikti izmantojot DNS paraugus, iegūtus no VIGDB, tādejādi aplūkojot dislipidēmiju ģenētiskos cēloņus Latvijas populācijā.

4.1. Multifaktoriālo dislipidēmiju ģenētiskie riska faktori

Uz šo dienu ir zināmi vairāki lokusi un simtiem SNP, kas ir bijuši saistīti ar multifaktoriālās dislipidēmijas patoģenēzi [34-57], tomēr ne visas šīs saistības ir atkārtotas dažādās populācijās. Vēl jo vairāk, daudzas no šīm variācijām ir saistītas ar vairākiem lipīdu parametriem, vēl vairāk apgrūtinot multifaktoriālo dislipidēmiju izpēti. Lai sniegtu jaunu informāciju par multifaktoriālās dislipidēmijas ģenētiskajiem riska faktoriem, mēs izveidojām SNP genotipēšanas paneli, kas ietver iepriekšējos GWAs pētījumos visspēcīgāk ar vienu vai vairākiem lipīdu parametriem saistītos SNP. Šis panelis tika lietots 1273 paraugu genotipēšanai no LGDB, kas sastāda 0.06 % no Latvijas populācijas [95].

4.1.1. Saistību analīze

Gan gadījumu-kontroles, gan kvantitatīvās pazīmes saistību pētījumos mūsu rezultāti liecina par to, ka SNP *CETP* (Cholesterol Ester Transfer Protein) gēnā ir galvenie izmainīta ABL holesterola līmeņa ietekmējošie ģenētiskie faktori Latvijas populācijā (skatīt **Tabulu 4.1.**). Iegūtie rezultāti sakrīt ar citos pētījumos iegūtajiem [36-38, 40, 41, 43, 45, 53, 96-98]. Vēl jo vairāk, šie rezultāti ir saskaņā arī ar *CETP* funkciju cilvēka ķermenī. *CETP* gēna kodētais proteīns apmaiņā pret TG nodrošina HE pārnesi no ABL daļiņām uz ApoB saturošajām daļiņām (LZBL un ZBL) [99, 100]. Šī reakcija rada ABL līmeņa samazināšanos un paaugstina ZBL līmeni, tādejādi defekti *CETP* gēnā izraisa ABL holesterola līmeņa paaugstināšanos, turpretī funkciju pastirinošās mutācijas izraisa ABL holesterola līmeņa samazināšanos [1].

Tabula 4.1. Ar dažādiem plazmas lipīdu līmeņiem spēcīgāk asociētie SNP

SNP	Atbilstošais gēns	MA	MAF	ABL holesterols		Log Triglicerīdi		ZBL holesterols	
				Beta koeficients	P-vērtība	Beta koeficients	P-vērtība	Beta koeficients	P-vērtība
rs2240466	MLXIPL	T	0.109	0.08560	0.00048	-0.04579	9.03E-05	-0.02034	0.75340
rs714052	MLXIPL	G	0.107	0.08511	0.00046	-0.04716	4.76E-05	-0.01139	0.85900
rs17145738	MLXIPL	A	0.110	0.08601	0.00029	-0.04625	4.44E-05	-0.03144	0.61520
rs2286276	MLXIPL	T	0.154	0.07353	5.45E-05	-0.01940	0.02625	0.03586	0.45600
rs11974409	MLXIPL	C	0.164	0.07183	0.00041	-0.03482	0.00034	-0.00917	0.86430
rs173539	CETP	T	0.337	0.09744	3.39E-09	-0.01106	0.16330	0.02580	0.55440
rs3764261	CETP	T	0.329	0.10050	1.46E-09	-0.01126	0.15850	0.03005	0.49460
rs1800775	CETP	C	0.118	-0.08538	1.02E-08	0.00723	0.31570	0.01733	0.66070
rs711752	CETP	T	0.456	0.08489	7.19E-08	-0.00520	0.49240	-0.01202	0.77320
rs708272	CETP	A	0.455	0.08567	5.59E-08	-0.00541	0.47550	-0.01941	0.64200
rs9929488	CETP	G	0.278	-0.07313	1.85E-05	0.01412	0.08442	0.00417	0.92640
rs7203984	CETP	G	0.195	-0.08570	6.23E-06	0.02179	0.01649	0.05610	0.26290
rs9939224	CETP	T	0.194	-0.09567	4.80E-07	0.02311	0.01123	0.06698	0.18210
rs7205804	CETP	T	0.457	0.07848	5.69E-07	-0.00807	0.28510	-0.03287	0.42900
rs11076175	CETP	G	0.178	-0.08815	7.84E-06	0.02283	0.01570	0.05980	0.25090
rs4803750	TOMM40	C	0.080	0.02782	0.32170	0.03400	0.01119	-0.30820	2.85E-05

Neviens SNP nav spēcīgi asociēts ar kopējo holesterola līmeni asinīs, tādēļ dati nav attēloti. SNP ar P vērtībām < 0.05 iezīmēti treknrakstā; SNP ar P vērtībām < 0.05 pēc Bonferroni korekcijas attēloti ar melnu iekrāsojumu un baltiem burtiem. Visi rezultāti ir iegūti veicot lineārās regresijas analīzi iekļaujot kovariātus (vecums, dzimums, ĶMI, un glikozes līmenis). MA, minorā allēle; MAF, minorās allēles frekvence; ABL, augsta blīvuma lipoproteīns; ZBL, zema blīvuma lipoproteīns.

Trīs, visspēcīgāk saistītie SNP (rs3764261, rs173539 un rs1800775) atrodas *CETP* gēna promotera rajonā liekot domāt, ka tieši *CETP* ekspresijas izmaiņas ir galvenais ABL holesterola līmeņa izmaiņu ietekmējošais cēlonis mūsu paraugkopā. rs3764261 un rs173539 visticamāk ir saistīti to lielās nelīdzsvarotās saistības (LD – linkage disequilibrium) dēļ ar iespējams funkcionālu variantu rs183130 [98], kas atrodas iespējamā transkripcijas saistīšanās vietā, kas ir stipri konservatīva salīdzinot cilvēka un šimpandzes genomus [98]. Tomēr šī teorija netika pārbaudīta šī pētījuma ietvaros un, lietojot RegulomeDB, brīvpieejas rīku nekodējošo variantu anotēšanai, par šo SNP nav nekādu pierādījumu par tā ietekmi uz transkripcijas faktoru saistīšanās vietu izmaiņām [101]. Iepriekšējos pētījumos jau ir aprakstīts, ka rs1800775 A alēle ir funkcionāla un izraisa samazinātu Sp1 un Sp3 transkripcijas faktoru saistīšanos ar DNS. Tas izraisa samazinātu *CETP* gēna transkripciju un tālāk *CETP* daudzumu plazmā [102, 103] un tad ABL holesterola līmeņa paaugstināšanos plazmā. Tomēr Sp1 transkripcijas faktora saistīšanās ar šo vietu netika parādīta ENCODE Chip-seq datos [101], kā norādīts RegulomeDB un citās datubāzēs. Ir jāpiebilst, ka ENCODE dati var variēt atkarībā no izmantotās šūnu līnijas un citiem faktoriem, kas visticamāk arī izskaidro iztrūkstošo Sp1 saistīšanos ar šo vietu. Pārējās atrastās saistības starp SNP *CETP* lokusā un ABL holesterola līmeni varētu būt izskaidrojamas dēļ LD ar jau minētajiem funkcionālajiem variantiem *CETP* gēna promotera rajonā vai dēļ LD ar citām funkcionālām kodējošām mutācijām *CETP* gēnā, kas nav aplūkotas mūsu pētījumā (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>).

Kvantitatīvās pazīmes saistību pētījumos mēs atradām vēl divus SNP *MLXIPL/TBL2* lokusā (rs17145738 and rs2286276), kas ir saistīti ar ABL holesterola līmeni. *MLXIPL* (MLX-Interacting Protein Like) ir spirāles-cilpas-spirāles leicīna rāvējslēdzēja tipa transkripcijas faktors, kas kopā ar *MLX* (Max Like protein X) saista DNS [104]. Tas spēj kavēt E-box-atkarīgo transkripciju [104] vai karbohidrātu atbildes elementa (ChoRE) motīvus lipogēno enzīmu prometeros. Tauku šūnās *MLXIPL* ir galvenais taukskābju sintēzes un insulīna sensitivitātes regulators [105]. Taukskābes var tikt izmantotas TG sintēzei šūnā, tādēļ ir iespējams, ka, piemēram, izmaiņas *MLXIPL* ekspresijā var netieši, caur metaboliskajiem ceļiem ietekmēt ABL holesterola līmeni. Tomēr abi saistītie SNP fiziski atrodas tuvāk *TBL2* (Transducin Beta Like 2) gēnam nekā *MLXIPL*. Vēl jo vairāk, viens no tiem (rs2286276) atrodas vienā no *TBL2* gēna introniem. Saskaņā ar RegulomeDB informāciju, rs2286276 ir klasificēts kā variants, kas visticamāk ietekmē transkripcijas faktoru saistīšanos, kas savukārt turpina pastiprināt šī SNP potenciālo funkcionālo lomu lipīdu metabolismā [101]. Tas atrodas blakus MYB (avian myeloblastosis

viral oncogene homolog) motīvam, kas nodrošina saistīšanās vietu daudziem proteīniem, ieskaitot dažādus transkripcijas faktoros, RNS polimerāzes 2 funkcionālos domēnus, transkripcijas aktivātorus un citus (<http://www.regulomedb.org/>). Vēl viens iespējams izskaidrojums šīm saistībām mūsu paraugkopā varētu būt LD ar kodējošiem variantiem *MLXIPL* gēnā, kas izraisa TG līmeņa izmaiņas [42]. Vēl vairāk, kvantitatīvās pazīmes pētījumu rezultāti uzrāda arī četru, tā paša *MLXIPL/TBL2* lokusa SNP (rs17145738, rs714052, rs2240466 and rs11974409) isaistību ar logaritmiski transformētu TG līmeni (logTG). Šie rezultāti sakrīt ar citiem saistību pētījumiem [42] kā arī ar *MLXIPL* funkcijām lipīdu metabolismā (apspriests iepriekš). Ņemot vērā visas atrastās saistības starp *MLXIPL/TBL2* lokusu un diviem lipīdu parametriem, paaugstinās šī lokusa nozīmīgums lipīdu metabolisma ģenētisko cēloņu noskaidrošanā.

Līdzīgi, mēs konstatējam arī viena *TOMM40* (Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 40) lokusā lokalizēta SNP saistību ar ZBL holesterola līmeni mūsu kvantitatīvās pazīmes saistību pētījumos. Precīzāk, šis SNP atrodas *BCL3* (B-cell Leukemia/Lymphoma 3) gēna pirmajā intronā, kas kodē nukleārā faktora kappa-B (NF-κB) otrās subvienības inhibitoru [106, 107]. Tā kā nedz *TOMM40*, nedz *BCL3* vai NF-κB ir kāda zināma saistība ar lipīdu metabolismu, visticamākais šīs saistības izskaidrojums varētu būt LD ar kādu funkcionālu variantu apolipoproteīnu gēnos, kas atrodas tūlīt aiz *TOMM40* gēna. Ir zināms, ka mutācijas *APOE* gēnā (atrodas tieši aiz *TOMM40*) var izraisīt trešā tipa monogēno hiperholesterolēmiju [108]. Mēs neesam pārliecināti par to, vai mūsu paraugkopā ir indivīdi ar nediagnostisku monogēno dislipidēmiju, līdz ar to šis izskaidrojums *TOMM40* lokusa saistībai ar ZBL holesterolu varētu būt patiess. Tai pat laikā, šis SNP varētu atrasties arī kādā no šo apolipoproteīnu gēnu regulatorajiem rajoniem vai varētu būt LD ar tādu, jo attālums starp, piemēram, *TOMM40* un *APOE* gēniem ir samērā liels (2.1 Mb). Lai kā, šīs spekulācijas būtu nepieciešams pārbaudīt tālākos pētījumos, lai iegūtu pēc iespējas precīzāku informāciju par šī SNP vai *TOMM40* lokusa saistību ar lipīdu metabolismu.

Diemžēl, litojot RegulomeDB datubāzi, neviens no saistītajiem SNP, izņemot rs2286276, netiek klasificēts kā pirmās vai otrās kategorijas SNP, kas nozīmē, ka neviens saistītais SNP, izņemot vienu, neatrodas regulējošos rajonos [101]. Kaut arī saistītie SNP nav starp tiem, kas varētu ietekmēt funkcionālas izmaiņas, nav izslēgts, ka funkcionāli SNP varētu būt LD ar tiem, vai arī pašreizējie pētījumi nav spējuši pierādīt to funkcionalitāti. Visi saistību pētījumu rezultāti detalizētāk ir izklāstīti šī darba pirmajā un otrajā publikācijā.

4.1.2. Haplotipu analīze

Lai pārbaudītu dažādu haplotipu ietekmi uz asins plazmas lipīdu līmeņiem, mēs veicām detalizētu analīzi lokusiem (*CETP* and *MLXIPL*), kuri bija pārstāvēti ar vairāk kā vienu, ar vienu vai vairāk lipīdu parametriem pēc Bonferoni korekcijas pielietošanas būtiski saistītu SNP. Haplotipu analīzes rezultātā tika atrasti trīs haplobloki, kuru haplotipi ir saistīti ar dažādiem lipīdu parametriem. Divi no tiem atrodas *CETP* un viens *MLXIPL* lokusā (skatīt **Tabulu 4.2.**). Divi citi *CETP* lokusa haplobloki tika uzskatīti par neinformatīviem, jo tie sastāv tikai no diviem SNP. Mēs atradām vienu haplotipu, kas ir saistīts ar paaugstinātu ABL holesterola līmeni, visos trīs haploblokos, tādejādi piedēvējot tiem potenciāli „protektīvu” iedarbību. Katrā haploblokā tika atrasts arī vismaz viens haplotips, kas ir saistīts ar samazinātu ABL holesterola līmeni, tādejādi nodevētus par „rika haplotipiem”. Šie rezultāti ļoti labi sakrīt ar iepriekš izvirzīto hipotēzi, ka lielākā daļa ar ABL holesterola līmeni saistītie SNP mūsu populācijā, patiesībā ir saistīti spēcīga LD dēļ ar funkcionāliem variantiem. Tas norāda uz to, ka patiesībā ir tikai daži ar lipīdu parametriem saistīti SNP ar neatkarīgām ietekmēm. Otrā haplobloka gadījumā ir skaidri redzams, ka haplotipu izkliede ir atkarīga no divu, savstarpēji ar spēcīgu LD saistītu ($R^2=0.94$) SNP (rs173539 un rs3764261) riska alēļu klātbūtni. Abu SNP funkcija lipīdu metabolismā nav zināma, taču tie ir arī spēcīgā LD ar iespējams funkcionālu variantu rs183139 [98], liekot domāt, ka tieši šis SNP ir potenciāli īstais polimorfisms, kas ietekmē ABL holesterola līmeni. Trešā haplobloka gadījumā ir divi SNP (rs1800775 un rs9939224) ar iespējams neatkarīgiem efektiem uz ABL holesterola līmeni. Pirmais no tiem, jau ir labi zināms kā funkcionāls un nav pārsteigums, ka tā A alēle ir atrodama „protektīvajā” haplotipā. Šī A alēle ir atrodama arī divos citos šī haplobloka haplotipos, taču tie nav būtiski saistīti (P vērtība < 0.05) ne ar vienu no pētītajiem parametriem. rs9939224 atrodas *CETP* gēna otrajā intronā un tā

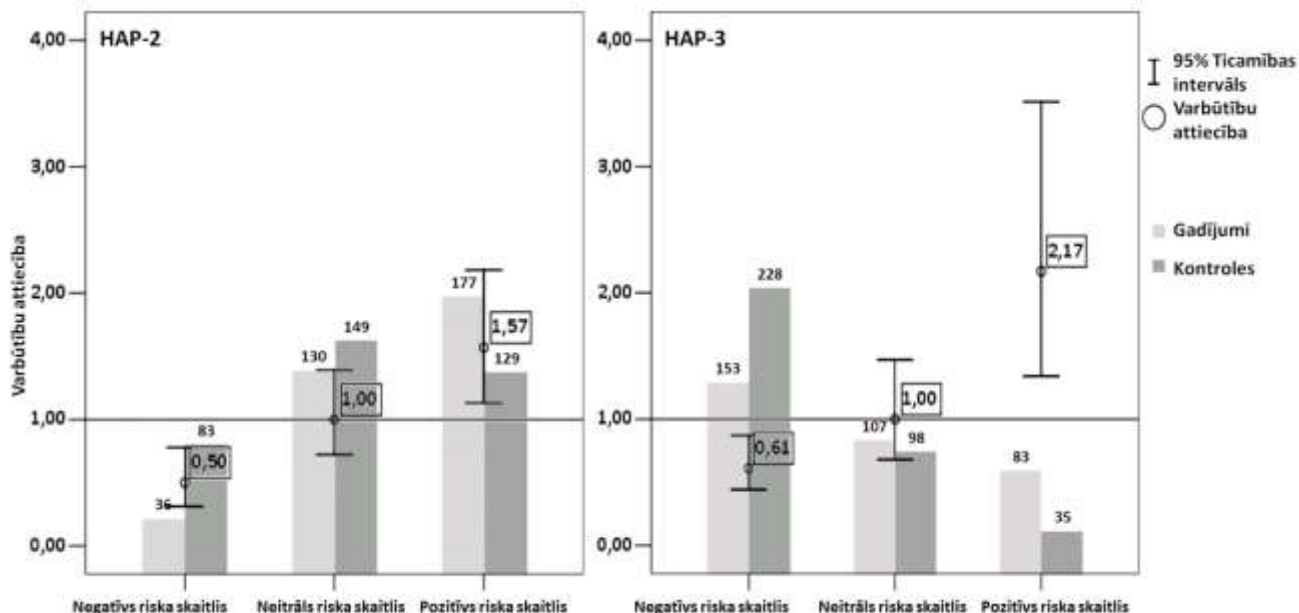
loma lipīdu metabolismā nav zināma, taču mūsu rezultāti norāda uz iespējamu neatkarīgu šī SNP ietekmi, jo tā T alēle ir atrodama tikai „riskā” haplotipos (rezultāti no gadījumu-kontroles saistību pētījumiem). Mēs atradām vēl vienu ar samazinātu ABL holesterola līmeni būtiski saistītu „riskā” haplotipu mūsu kvantitatīvās pazīmes saistību pētījumos, kuram nav rs9939224 T alēle. Šī saistība ir viduvēja (P vērtība 0.04370) un, iespējams, ir maldīgi pozitīvs rezultāts nepietiekama paraugkopas apmēra dēļ; tomēr šo apgalvojumu ir nepieciešams apstiprināt veicot atkārtotas analīzes lielākās paraugkopās.

Tabula 4.2. CETP un MLXIPL gēnu haplotipu asociācija ar dažādiem plazmas lipīdu līmeņiem

Gēns	ID	Haplotipa sekvenca	FRQ	KH	ABL	logTG
				P-vērtība	P-vērtība	P-vērtība
CETP	1.1	G C	0,084	0,51670	0,31280	0,27640
	1.2	A T	0,916	0,51670	0,31280	0,27640
	2.1	G T T T	0,326	0,10200	1,37E-10	0,05022
	2.2	G C T G	0,444	0,08522	2,05E-04	0,72650
	2.3	A C C G	0,134	0,58840	5,02E-03	0,00779
	2.4	G C C G	0,028	0,43030	0,44500	0,66910
	2.5	A C T G	0,057	0,75970	0,59550	0,29950
	3.1	A T A G C T G T A	0,442	0,56410	2,74E-07	0,17040
	3.2	C C G A G G T C G	0,171	0,71620	1,16E-05	0,02409
	3.3	C C G G C T T C A	0,015	0,95810	0,03271	0,33340
	3.4	A C G A C T G C A	0,028	0,05161	0,05849	0,50800
	3.5	C C G G C T G C A	0,186	0,24700	0,04370	0,68180
	3.6	A C G G G T G C A	0,044	0,45800	0,21500	0,34870
	3.7	C C G A C T G C A	0,028	0,45640	0,47500	0,60930
	3.8	C C G G G T G C A	0,036	0,50550	0,59040	0,77200
	4.1	C C	0,971	0,28010	6,06E-04	0,00970
	4.2	G T	0,020	0,68610	0,00961	0,18160
	MLXIPL	5.1	T C G A T C	0,106	0,94050	0,03874
5.4		C T A G C T	0,770	0,11470	0,00460	0,13640
5.2		C C A G T C	0,054	0,99630	0,35350	0,55600
5.3		C T A G T T	0,065	0,01195	0,37320	0,06647

Haplotipu saistība ar ZBL holesterolu nav attēlota, jo netika konstatēta neviena statistiski būtiska saistība ZBL holesterolam ar kādu no testētajiem haplotipiem. FRQ, haplotipu frekvence; KH, kopējais holesterols; ABL, augsta blīvuma lipoproteīns; logTG, logaritmiski transformēta TG līmeņa vērtība; ID, Haplotipa identifikācijas nummurs (pirmais skaitlis – pētāmā haplobloka nummurs; otrais skaitlis – individuālā haplotipa nummurs); Pirmais CETP gēna haplobloks ietver rs2241770 un rs16962767; Otrais CETP gēna haplobloks ietver rs12448528, rs173539, rs12708967 un rs3764261; Trešais CETP gēna haplobloks ietver rs1800775, rs711752, rs708272, rs1864163, rs9929488, rs7203984, rs9939224, rs7205804 un rs11076175; Ceturtais CETP gēna haplobloks ietver rs5880 un rs1800777; Pirmais MLXIPL gēna haplobloks ietver rs2240466, rs1178979, rs714052, rs17145738, rs2286276 un rs11974409; “protektīvie” haplotipi ir iezīmēti pelēki; „riskā” haplotipi ir iezīmēti melni ar baltiem burtiem; P-vērtības, kas ir zemākas par 0.05, iezīmētas melnas ar baltiem burtiem.

Haplotipu analīzes rezultāti norāda uz funkcionāli atšķirīgu („protektīvu”, „neitrālu” un „riskā”) haplotipu esamību trešajā CETP gēna haploblokā, atkarībā no divu SNP (rs1800775 un rs9939224) alēļu kombinācijām. Šis pieņēmums var kalpot arī kā iemesls šo SNP iespējamai diagnostiskas nozīmes izpētei, piemēram, lai prognozētu ABL holesterola līmeni asinīs un tādejādi arī risku SAS. Vēl jo vairāk, savā gadījumu-kontroles pētījumā mēs atklājām, ka viena vai divu „riskā” haplotipu klātbūtnes gadījumā abos CETP gēna haploblokos ir vērojama palielināta ietekme uz ABL holesterola līmeni (skatīt **Attēlu 4.1.**). Visi haplotipu saistību analīzes rezultāti ir nemainīgi abos mūsu pētījumos, norādot uz to ticamību.



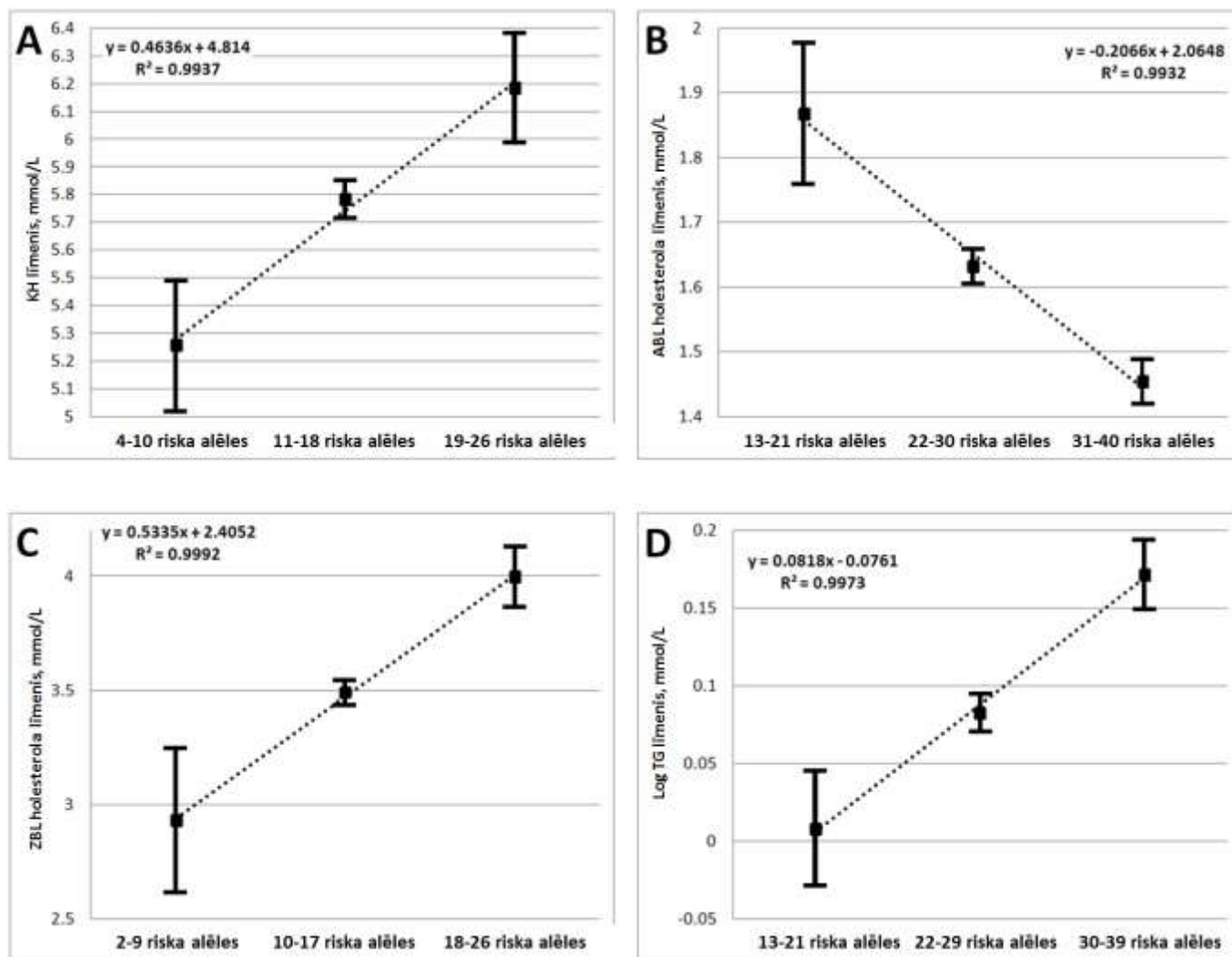
Attēls 4.1. CETP gēna haplotipu kombināciju saistība ar ABL holesterola līmeni. HAP-2 attēloti *CETP* lokusa otrā haplobloka haplotipu dozas analīzes rezultāti, kamēr HAP-3 attēloti *CETP* lokusa trešā haplobloka haplotipu dozas analīzes rezultāti. Negatīvs riskskaits norāda individuus ar vienu vai diviem „protektīviem” haplotipiem, Neitrāls riskskaits norāda individuus ar „neitrāliem” haplotipiem vai vienu „protektīvu” un vienu „risika” haplotipu, Pozitīvs riskskaits norāda individuus ar vienu vai diviem „risika” haplotipiem. Individī ar neitrālu riskskaiti tiek lietoti kā references grupa. Gaiši pelēka kolonna norāda indivīdu skaitu ar zemu ABL holesterola līmeni; tumši pelēkas kolonnas norāda uz indivīdu skaitu ar augstu ABL holesterola līmeni. Kļūdu robežas norāda 95 % ticamības intervālu.

Līdzīgi mēs atradām arī vienu „protektīvu” un vienu „risika” haplotipu *MLXIPL* lokusa haploblokā. Tomēr šis haplobloks ir ļoti liels un ietver vairākus gēnus (*FZD9* gēna beigu daļu, *BAZ1B*, *BCL7B*, *TBL2* un *MLXIPL* gēna beigu daļu). Mūsu pētījumā tika lietoti tikai seši SNP no šī haplobloka, tādēļ *MLXIPL* haplotipu saistība ar ABL holesterolu būtu jāuztver piesardzīgi, kā arī ir nepieciešami tālāki pētījumi, lai atkārtotu un apstiprinātu atrasto saistību pirms izdarīt kādus secinājumus.

Katra apspriestā haplobloka viens haplotips bija saistīts arī ar logTG. Šīs saistības varētu būt izskaidrojamas ar pārklājošajiem TG un dažādu veidu asins plazmas lipoproteīnu daļiņu metaboliskajiem ceļiem. Tomēr, sakarā ar *MLXIPL* funkcijām lipīdu metabolismā (apspriests augstāk), iespējamību, ka *MLXIPL* lokusa SNP varētu tieši ietekmēt TG līmeni, arī nevar izslēgt. Netika atasta neviena būtiska haplotipu saistība ar ZBL holesterola līmeni.

4.1.3. Apvienotā efekta analīze

Lai pārbaudītu tālāku daudzu mazas izpausmes SNP iespējamo apvienotā efekta esamību, mēs veicām riska alēļu apvienotā efekta analīzi visiem SNP, kas bija sākotnēji saistīti (P vērtība <0.05 pirms Bonferoni korekcijas) un katrs no tiem pārstāvēja vienu haplobloku. Šajā analīzē iegūtie rezultāti rāda, ka paaugstināts risks alēļu skaits indivīdam nosaka augstāku KH, ZBL holesterolu un logTG, un zemāku ABL holesterola līmeni (skatīt **Attēlu 4.2.**).



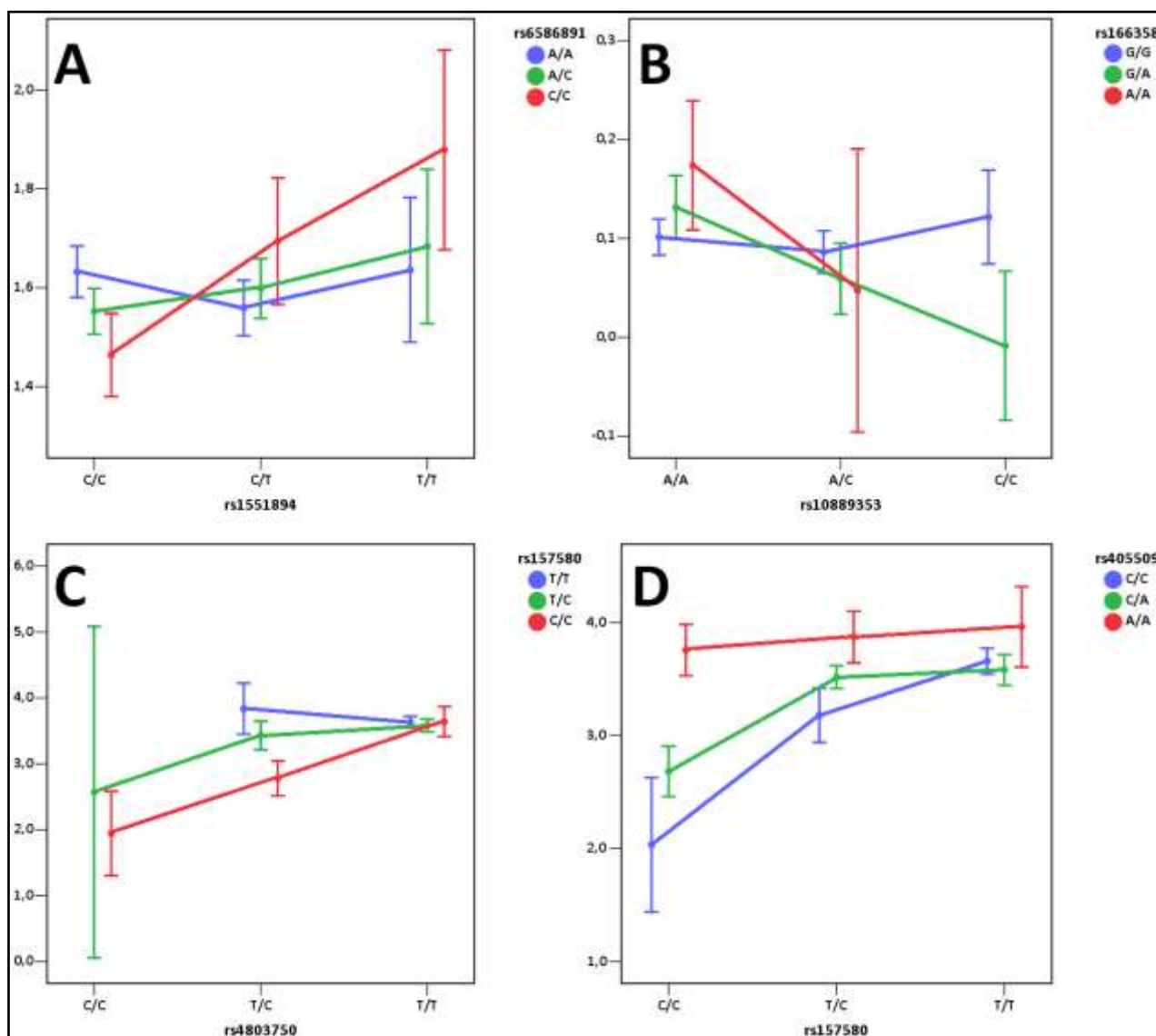
Attēls 4.2. Apvienotā efekta analīze visiem lipīdu parametriem. **A**, hopējam holesterolam; **B**, augsta blīvuma lipoproteīna holesterolam; **C**, zema blīvuma lipoproteīna holesterolam, un **D**, log triglicerīdiem. Y ass norāda atbilstošā lipīdu parametra līmeni (mmol/L); X ass norāda trīs vienādu, balstoties uz riska alēļu skaitu, grupu sadalījumu; melnie kvadrāti norāda katras grupas lipīdu parametra vidējo vērtību ar 95 % vidējās atšķirības ticamības intervālu. Punktētā līnija norāda uz lineāro korelāciju starp dažādām grupām, un R2 vērtība ir aplūkojama katram lipīdu parametram.

Lai gan mūsu rezultāti uzrāda nelielu lipīdu parametru paaugstinājumu vai samazinājumu atkarībā no riska alēļu skaita, kas ir indivīdam, šie rezultāti norāda uz daudzu mazas izpausmes SNP apvienotā efekta esamību. Tādēļ būtu svarīgi veikt turpmākus pētījumus un atrast vēl vairāk šādus SNP, lai varētu izveidot diagnostikas rīku izmainītu lipīdu līmeņu prognozēšanai.

Nav izlēgts, ka mūsu paraugkopā ir arī daži nediagnosticētas monogēnās dislipidēmijas gadījumi, un liela daļa šajā pētījumā ietvertu lokusu ir ar zināmu funkciju lipīdu metabolismā, tādēļ ir iespējams, ka daži no šiem sākotnēji saistītajiem SNP patiesībā ir saistīti LD dēļ ar zināmiem funkcionāliem variantiem. Tomēr hipotēze, ka pastāv daudzu mazas izpausmes SNP apvienotais efekts, netiek izslēgta. Ir nepieciešami tālāki pētījumi šajā jomā un daudz vairāk riska alēles ir jāiekļauj šāda veida analīzē, lai varētu konstatēt īsto daudzu mazas izpausmes SNP apvienoto efektu, kas ietekmē lipīdu parametrus. Lai tālāk stiprinātu šo daudzu mazas izpausmes SNP nozīmi multifaktoriālo dislipidēmiju patoģenēzē, ir nepieciešams veikt pētījumus ar daudz lielākām paraugkopām.

4.1.4. Epistāzes analīze

Izmantojot GHMDR programmu, SNP-SNP mijiedarbības saistības analīzes rezultāti, neuzrādīja nevienu būtisku saistību ar lipīdu parametriem, kamēr, lietojot PLINK programmu datu apstrādei, tika atrasti četri SNP pāri (Attēls 4.3.).



Attēls 4.3. T testa rezultāti nozīmīgākajām SNP-SNP mijiedarbībām. Katrai SNP-SNP mijiedarbībai ir iespējamās deviņas divu SNP genotipu kombinācijas. Četri grafiki attēlo divu SNP mijiedarbības saistības ar lipīdu parametru T testa rezultātus visām deviņām iespējamajām genotipu kombinācijām: **A** – ABL holesterolam, **B** – logTG, **C** un **D** – ZBL holesterolam. Y ass norāda lipīdu parametra vērtību mmol/L (log TG tas ir log mmol/L); X ass attēlo trīs iespējamās viena SNP-SNP mijiedarbībā iesaistītā SNP genotipus; Zilie, sarkanie un zaļie punkti norāda vidējo lipīdu parametra vērtību katram otra SNP-SNP mijiedarbībā iesaistītā SNP genotipam, attiecīgās robežas norāda zemāko un augstāko robežu 95 % vidējās vērtības ticamības intervālam.

Kaut gan atrastās saistības ir uzskatāmas par mērenām un tās jāuztver ar piesardzību, nav izslēgta dažu SNP pāru mijiedarbības esamība ar lipīdu parametriem. Piemēram, var redzēt tendenci ABL holesterola līmenim paaugstināties, ja abi iesaistītie SNP (rs6586891 un rs1551894) ir homozigotā stāvoklī (Attēls 4.3. A). Homozigots C/C genotips rs6586891 kopā ar C/C genotipu rs1551894 rezultējas ar 0.4 mmol/L zemāku ABL holesterola līmeni nekā attiecīgā C/C un T/T genotipu kombinācijās gadījumā. Līdzīgas tendences var redzēt visos četros SNP pāros, kas saistīti ar lipīdu parametriem.

Tomēr var redzēt arī, ka apakšējās un augšējās robežas 95 % ticamības intervālam vairumā gadījumu pārklājas, liecinot par nepieciešamību analizēt daudz lielāku paraugkopu, lai sašaurinātu šīs robežas.

4.1.5. Imputācija

Imputācijas un atrasto SNP saistības analīzes rezultāti galveno kārt lika izdarīt tādas pašas secinājumus kā mūsu saistību analīzes pētījumā. *CETP* gēns izrādījās spēcīgākais ABL holesterola līmeni ietekmējošais ģenētiskais faktors un *BCL3* no *TOMM40* lokusa izrādījās spēcīgākais ZBL holesterola līmeni ietekmējošais ģenētiskais faktors mūsu populācijā. Mēs arī atradām SNP LPL lokusā, kas ir saistīti ar ABL holesterola līmeni un APOB lokusā, kas saistīti ar ABL holesterolu un KH. Neviens funkcionāls variants imputācijas analīzē netika atrasts un, tā kā ir iespējams, ka mūsu paraugkopā ir indivīdi ar monogēno dislipidēmiju, šīs saistības var būt arī maldīgi pozitīvi rezultāti dēļ LD ar funkcionāliem variantiem, kas izraisa monogēno slimības tipu. Kopumā, visi mūsu kvantitatīvās pazīmes saistību pētījumos iegūtie rezultāti sakrīt ar citu pētnieku veiktajiem atklājumiem [36-38, 40, 41, 43, 45, 53, 96-98].

4.2. Monogēno dilipidēmiju ģenētiskie riska faktori

Ir vairāki gēni, kuru mutācijas izraisa dažāda veida monogēnās dislipidēmijas. Isbiežāk IH patoģenēzē iesaistītie gēni ir *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* un *LDLRAP1* [23, 24, 31, 56, 74-83]; tādēļ tie ir arī mūsu pētījumu galvenie izpētes objekti. Lai pētītu biežāk sastopamos IH izraisošos ģenētiskos cēloņus Latvijas populācijā, mēs vispirms izveidojām reālā-laika PQR genotipēšanas paneli, kurā ietvertas astoņas biežāk sastopamās IH izraisošās mutācijas. Šis genotipēšanas panelis tika lietots ātram IH pacientu un „kontroles” skrīningam, lai noskaidrotu šo astoņu, biežāk sastopamo IH izraisošo mutāciju frekvenci mūsu populācijā. Daudz detalizētākai Latvijas populācijas IH pacientu mutāciju analīzei mēs izveidojām mērķētu NGS paneli, kas ļauj vienlaicīgi veikt sekvenčšanu četru IH izraisošo gēnu 5', 3' netranslējamajiem rajoniem, kesoniem un splaisa saitēm.

4.2.1. Reālā laika genotipēšana

Lai pārbaudīt biežāk izplatīto, lietotu arī komerciāli pieejamajos IH testēšanas paneļos [74], monogēno dislipidēmiju ģenētiskos cēloņus Latvijas populācijā, mēs veicām astoņu biežāk sastopamo mutāciju genotipēšanu pacientiem ar paaugstinātu ZBL holesterola līmeni, kas atbilst „iespēmai” vai „varbūtējai” IH [19]. Mēs atradām, ka tikai vienam no 48 pacientiem tika atrasta mutācija (rs5742904) heterozigotā stāvoklī kopā dodot tikai 2.1 % IH detekcijas līmeni mūsu „iespējamās” un „varbūtējās” IH pacientu paraugkopā. Šis zemais detekcijas līmenis norāda uz diviem iespējamiem izskaidrojumiem: pirmais – mūsu populācijā biežāk ir izplatītas citas mutācijas; otrs – IH diagnosticēšanai lietotie WHO izstrādātie kritēriji ir pārāk visaptveroši, ļaujot diagnosticēt pēc iespējas vairāk IH gadījumu, bet vienlaicīgi iekļaujot salīdzinoši lielu skaitu maldīgi diagnosticētu IH gadījumu. Jāņem vērā arī fakts, ka, lai sekmīgi pielietotu WHO IH diagnosticēšanas kritērijus, ir nepieciešami vairāki lipīdu mērījumi. Diemžēl mūsu pētījumā iekļautajiem pacientiem bija pieejams tikai viens mērījums katram lipīdu parametram, vedinot domāt, ka daļa no tiem var būt neprecīzi diagnosticēti ar IH.

Interesanti bija arī pārbaudīt, vai mūsu saistību pētījumos lietotajā paraugkopā (apspriests augstāk) ir atrodami IH gadījumi. Mēs veicām genotipēšanu 95 „kontroles” paraugiem ar visaugstākajiem ZBL holesterola līmeņiem (bet bez IH diagnozes), izmantojot jau minēto IH izraisošo mutāciju genotipēšanas paneli (dati nav publicēti). Nebija pārsteigums, ka trijos no 95 paraugiem (3.2 %) tika atrasta IH izraisoša mutācija rs5742904 heterozigotā stāvoklī, apstiprinot hipotēzi par dažu, nediagnosticētu monogēnās dislipidēmijas pacientu esamību mūsu saistības analīzes pētījumos lietotajā paraugkopā.

4.2.2. Jaunās paaudzes sekvenēšana

Tā kā reālā-laika genotipēšanas paneļa sensitivitāte bija zema, mēs veicām četru, ar IH saistītu gēnu (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9* un *LDLRAP1*) kodējošo rajonu NGS izmantojot IonTorrent™ NGS tehnoloģiju 92 pacientiem „ar aizdomām” uz IH (daļa datu nav publicēti). Šīs analīzes mērķis bija noskaidrot biežāk

sastopamās aminoskābi mainošās mutācijas mūsu paraugkopā, lai izveidotu daudz efektīvāku, viegli lietojamu un salīdzinoši lētu IH dieagnostikas genotipēšanas paneli.

Mēs izmantojām dažādus brīvpieejas informācijas avotus, lai veiktu atrasto nomaiņu raksturošanu, tomēr lielākā daļa informācijas ir iegūta no divām datubāzēm: The Human Gene Mutation Database (HGMD) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>) un IH variantu datubāzi UCL (FHVD) (<http://www.ucl.ac.uk/ldlr>) [109].

Pēc sekvencēšanas kļūdu aizvākšanas, kas radušās no PCR, neprecīziem variantu saukšanas algoritmiem blakus homopolimēriem un ķēdes specifiskām kļūdām, kas raksturīgas Ion Torrent platformai [89], mēs savā paraugkopā atradām 114 dažādas nomaiņas. Trīs mutāciju gadījumā alternatīvās alēles frekvence bija 100 %. Tika pieņemts, ka tās ir nepareizi raksturotas references genomā un netika iekļautas atrasto nomaiņu sarakstā. Līdzīgi arī aminoskābi nemainošas kodējošas nomaiņas (n = 22) netika iekļautas kopējā variantu sarakstā. Kopā tika atrastas 31 aminoskābi mainošas nomaiņas, astoņas nomaiņas tuvu (10 bp) intronu-eksonu robežai un 50 citas nomaiņas.

Lai klasificētu identificētās mutācijas, mēs iedalījām tās sešās dažādās kategorijās, balstoties uz to potenciālo patoloģisko ietekmi. Nomaņas, kas FHVD un HGMD datubāzēs tiek raksturotas kā IH izraisošas un kuru nozīme tiek papildināta ar pierādījumiem no vairākiem literatūras avotiem, tika pieņemtas kā patogēnas (Kategorija 1). Retas (minorās alēles frekvence zem 1.0 % balstoties uz 1000 genomu pirmās fāzes genotipēšanas datiem no 1094 visas pasaules indivīdiem <http://browser.1000genomes.org>), aminoskābi mainošas nomaiņas ar nezināmu vai neskaidru ietekmi un kuras, lietojot visus trīs prognozēšanas rīkus, tika prognozētas kā proteīnu bojājošas, tika pieņemtas kā iespējams patogēnas (Kategorija 2). Atlikušās retās, aminoskābi mainošās un potenciālās splaisa saiti (10 nukleotīdi intronā) nomaiņas tika klasificētas kā nomaiņas ar neskaidru klīnisko ietekmi (Kategorija 3). Visi pārējie nekodējošie varianti, varianti ar minorās alēles frekvenci virs 1.0 %, varianti, kas atrasti potenciāli veselā cilvēkā, un varianti ar potenciāli pretēju ietekmi, tika klasificēti kā nekaitīgi. Sākotnēji tikai 1., 2. un 3. kategorijas nomaiņas (n = 15) tika pieņemtas kā “interesantas” (skatīt **Tabulu 4.3**).

Tabula 4.3. "Interesantie" varianti, atrasti 92 Latvijas populācijas pacientos "ar aizdomām" uz IH

KAT	Gēns	rs kods	AAF	FRQ	HETHOM	Variants	Apraksts un atsauces
1	<i>APOB</i>	rs5742904	T=0,016	T=0,001	3	0	p. Arg3527Gln Hiperholesterolēmija [74, 78, 110], saistīts ar paaugstinātu ZBL holesterolu [76]
1	<i>LDLR</i>	rs147509697	A=0,011	A=0,001	2	0	p. Gly20Arg Hiperholesterolēmija, iespējams proteīnu bojājoss [75], atrasts IH pacientos [110-114], lietots LIPOCHIP – IH diagnostikas panelī [115]
1	<i>LDLR</i>		T=0,005		1	0	p. Arg350X Hiperholesterolēmija, saīsināts proteīns [24, 82, 83, 116]
1	<i>LDLR</i>	rs17248882	A=0,005	A=0,002	1	0	c. IVS11 -10 (G>A) Hiperholesterolēmija? [77, 79], 3' splaisa akceptora mutācija 11 intronā [81, 117], datoprognose – ārpus splaisa regulatorā rajona [75], atrasts septiņos IH pacientos un lietots IH diagnostikas panelī [112, 118]
2	<i>APOB</i>		G=0,005		1	0	p. Tyr144His Nav informācijas
2	<i>APOB</i>	rs151009667	T=0,011	T=0,002	2	0	p. Arg1689His Hipertrigliceridēmija? [56]
2	<i>APOB</i>	rs201990496	C=0,005	A=0,000	1	0	p. Ser3915Cys Nav informācijas
3	<i>APOB</i>	rs146152405	A=0,005	T=0,001	1	0	p. Arg214Leu Nav informācijas
3	<i>APOB</i>		A=0,005		1	0	p. Met755Leu Nav informācijas
3	<i>APOB</i>		T=0,005		1	0	p. Val2095Glu Nav informācijas
3	<i>APOB</i>	rs72653092	T=0,011	T=0,001	2	0	p. Ser2429Thr Hipertrigliceridēmija? [56]
3	<i>APOB</i>	rs1801696	T=0,016	T=0,002	3	0	p. Glu2566Lys Hipertrigliceridēmija? [56]
3	<i>APOB</i>	rs61743502	G=0,005	G=0,003	1	0	p. Val4265Ala Nav informācijas
3	<i>APOB</i>	rs72654423	C=0,005	C=0,003	1	0	p. Ile4314Val Nav informācijas
3	<i>LDLR</i>		G=0,005		1	0	c. IVS14 -9 (T>G) Nav informācijas

KAT – Mūsu piešķirtā variantu kategorija: 1 – isti displidēmiju izraisoši varianti (raksturais vairākos pētījumos); 2 – reti (frekvence populācijā < 0,01), proteīna funkciju bojājoši (balstīties uz vismaz diviem funkcionālas prognozēšanas rīkiem) varianti; 3 – citi reti (frekvence populācijā < 0,01), aminoskābi mainoši un potenciāli splaisa saita (10 nukleotīdi intronā) varianti; AAF – alternatīvās aļenes frekvence mūsu paraugkopā; FRQ – frekvence populācijā (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); HET – heterozigoto indivīdu skaits mūsu paraugkopā; HOM – homozigoto indivīdu skaits mūsu paraugkopā; Variants – aminoskābju numerācija saskaņā ar Human Genome Variation Society [119].

Mēs atradām četras patogēnas, IH izraisošas mutācijas 7.6 % indivīdu mūsu paraugkopā (Kategorija 1). *LDLR* gēna proteīnu pārtraucošā mutācija Arg350X tika atrasta vienam indivīdam. Šis variants iepriekš jau ir raksturots kā IH izraisošs variants 13 neradniecīgos IH pacientos [24, 83, 116]. Gly20Arg, kas tika atrasts divos indivīdos, atrodas *LDLR* gēnā un iepriekš vairākkārt ir identificēts IH pacientos [75, 110-114]. Neskatoties uz PolyPhen-2 maigo prognozi, Gly20Arg jau tiek lietots LIPOCHIP – IH diagnostikas panelī [115] un tādēļ tiek uzskatīts par īstu IH izraisošu variantu. Līdzīgi arī IVS11 -10 (G>A) vairākkārt ir atrasta IH pacientos [77, 79, 81, 112, 117, 118] un arī tiek lietota IH diagnostikas panelī [118]. Vēl viena mutācija Arg3527Gln *APOB* gēnā tika atrasta trijiem indivīdiem, tādējādi ir visbiežākā IH izraisošā mutācija ar daudziem epidemioloģiskiem un funkcionāliem pierādījumiem [74, 76, 78, 110, 120]. Arg3527Gln atrodas *APOB* gēna 26 eksonā, blakus *LDLR* saistīšanās domēnam (domēns, kas atbildīgs par ApoB saistīšanos ar *LDLR* un lipoproteīnu uzņemšanu šūnā) [121]. Vēl vairāk, visi trīs darbā lietotie proteīna funkciju prognozēšanas rīki prognozē šo variantu kā proteīnu bojājošu vai slimību izraisošu. Interesanti, ka visi trīs šīs mutācijas nēsātāji ir arī citas *APOB* gēna mutācijas Glu2566Lys nēsātāji, liekot domāt par spēcīgu LD starp tām.

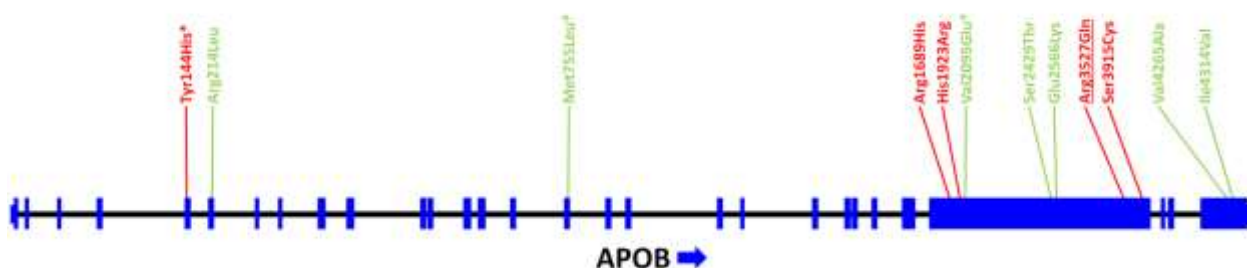
Visi šajā pētījumā lietotie proteīnu funkciju prognozēšanas rīki citas trīs retas *APOB* gēna mutācijas nodēvēja kā potenciāli proteīnu funkciju bojājošas (Kategorija 2). Viena no tām Arg1689His HGMD datubāzē ir raksturota kā hipertrigliceridēmiju izraisoša, taču tā ir atrasta arī kontroles paraugos [56], liekot domāt par tās vājo ietekmi uz IH fenotipu. Pārējās divas retās *APOB* gēna mutācijas nav iepriekš raksturotas un tika atrastas divos (2.2 %) indivīdos. Iespējams, ka vismaz dažas no šīm mutācijām varētu būt īstas IH izraisošas. Pirms tās tiek sauktas par īstām IH izraisošām mutācijām, ir nepieciešami tālāki pētījumi, lai pārbaudītu to patieso lomu IH attīstībā. Tomēr, ja mēs pieņemam, ka šie trīs varianti ir īstas IH izraisošas mutācijas, mēs kopā spētu diagnosticēt 11 IH pacientus un iegūtu 12.0 % kopējo IH detekcijas līmeni.

Klāt jau iepriekš minētajām mutācijām, mēs atradām vēl septiņas, retas (frekvence populācijā zem 1.0 %) aminoskābi mainošas mutācijas ar neskaidru klīnisko ietekmi (Kategorija 3). Visi aminoskābi mainošie varianti no kategorijas 3 atrodas *APOB* gēnā. Neņemot vērā Glu2566Lys, kas ir spēcīgā LD ar patogēno Arg3527Gln mutāciju, tikai Ser2429Thr ir iepriekš saistīta ar hipertrigliceridēmiju [56]. Trīs mutācijas Val4265Ala, Arg214Leu, Ile4314Val ir ziņotas SNP datubāzēs, kamēr divas citas Val2095Glu un Met755Leu ir jaunas un nav iepriekš zināmas. Mēs atradām arī vienu jaunu variantu *LDLR* gēna 15 eksona splaisa donora vietas tuvumā (IVS14 -9 (T>G)). Trešās kategorijas mutācijas tika atrastas 11 pacientos, kas sastāda 12.0 % no visiem gadījumiem (**Tabula 4.3.**). Jāpiebilst, ka ir nepieciešami tālāki funkcionālie un segregācijas pētījumi, lai apzinātu otrās un trešās kategorijas mutāciju potenciālo funkcionalitāti. Tomēr zemas penetrances mutāciju gadījumā, kas attiecināmas uz *APOB* gēna mutācijām, tas varētu būt ļoti grūti īstenojams, un NGS rezultātā atrasto reto mutāciju interpretācijas izaicinājums ir lielākais šķērslis šīs tehnoloģijas ieviešanai klīniskajā diagnostikā. Šāds 7.6 % IH mutāciju detekcijas līmenis ir nedaudz augstāks, bet samērojams ar nesenā pētījumā aprakstīto, kur IH mutācijas tika detektētas 2.1 % gadījumu neradniecīgu augsta riska indivīdu grupā [122]. Protams, pētījumos, kur NGS tehnoloģija tiek lietota lai detektētu mutācijas IH pacientos ar stingri definētiem klīniskajiem parametriem, mutāciju detekcijas līmenis ir augstāks – no 67.0 % klīniski noteiktos IH pacientos līdz 26.0 % varbūtējās IH pacientos [123].

Mēs atradām arī daudz biežu polimorfismu, ieskaitot aminoskābi mainošus variantus, kas ir bijuši saistīti ar paaugstinātu ZBL holesterola līmeni, aterosklerozi, un citiem parametriem. Nav zināms, kādā mērā šie bieži varianti varētu ietekmēt reto zemas penetrances variantu nēsājošu indivīdu fenotipisko iznākumu. Trīs interesanti varianti no biežo polimorfismu kategorijas (Ala618Val und His1923Arg *APOB* gēnā un Arg238Trp *LDLRAP1* gēnā) tika prognozēti kā proteīnu bojājoši ar vismaz vienu no lietotajiem funkciju prognozēšanas rīkiem. Neskatoties uz daudzajām saistībām ar dažādiem fenotipiem iepriekš [76, 124-127], *APOB* gēna variants Ala618Val tomēr tiek uzskatīts par nekaitīgu, jo tas ir ļoti biežs variants (alternatīvās alēles frekvence populācijā ir 0.492). *APOB* gēna His1923Arg varianta gadījumā situācija ir savādāka: visi trīs funkcijas prognozēšanas rīki prognozēja šo variantu kā proteīnu bojājošu, tas iepriekš ir divas reizes atrasts IH pacientos [124, 128], un vēl jo vairāk, mēs atradām tikai piecus šī variant nēsātājus mūsu paraugkopā, tātad tā alternatīvās alēles frekvence ir diezgan zema (0.027). Tas viss kopā noved pie hipotēzes, ka šis varētu būt īsts IH izraisošs variants un ja tā, tad mēs varam diagnosticēt ar IH vēl papildus piecus pacientus un iegūt kopējo diagnosticēšanas līmeni 13.0 %; tomēr šī ir tikai spekulācija un

tālāki pētījumi ir nepieciešami lai pārbaudītu patieso His1923Arg varianta IH patoģenēzā. *LDLRAP1* gēna variants Arg238Trp jau ir zināms kā autosomāli recesīvā IH tipa izraisītājs [80], tādejādi tikai 238Trp homozigotiem ir hiperholesterolemijas fenotips. Divi funkcijas prognozēšanas rīki ir prognozējuši Arg238Trp variantu kā proteīna funkciju bojājošu, papildinot tā lomu IH fenotipa veidošanā.

Ļoti interesants šķiet arī novērojums, ka lielākā daļa no 1., 2. un 3. kategorijas variantiem atrodas *APOB* gēnā. Tas varētu liecināt par to, ka mutācijas *APOB* gēnā ir visbiežāk sastopamās, IH fenotipu izraisošās mutācijas mūsu populācijā. Liela daļa *APOB* gēna mutāciju atrodas tieši tā 3' beigu daļā (skatīt Attēlu 4.4.).



Attēls 4.4. Reto, interesanto un IH izraisošo mutāciju izvietojums *APOB* gēnā. Īstas IH izraisošās mutācijas ir pasvītrotas; iespējams jaunas mutācijas atzīmētas ar *; izmaiņas kas balstoties uz PolyPhen-2 prognozi ir „iespējams proteīnu bojājošas” atzīmētas ar sarkaniem, „nekaitīgas” ar zaļiem burtiem; zilās krāsas taisnstūri norāda *APOB* gēna eksonus; bulta blakus *APOB* gēna nosaukumam norāda proteīna sekvences virzienu.

Ļoti labi zināmais variants Arg3527Gln arī atrodas proteīna beigu daļā. Tas varētu liecināt par to, ka tieši proteīna C gals ir vissvarīgākais normālai proteīna funkcionālajai aktivitātei. LDLR saistīšanās domēns atrodas 26 eksona beigās [121], diezgan tuvu labi zināmajam Arg3527Gln variantam. Divi proteīnu bojājoši variant atrodas arī 26 eksona sākumā, liekot domāt, ka variant, kas atrodas abos 26 eksona galos (Arg1689His, His1923Arg, Arg3527Gln un Ser3915Cys) visticamāk ietekmē LDLR saistīšanās domēna konformāciju ApoB un rezultējas ar samazinātu afinitāti ar receptoru, tādejādi tie tiek uzskatīti par īstiem IH izraisošiem variantiem. Tiesa, šie secinājumi ir izdarīti balsoties uz spekulācijām, un tālāki pētījumi ir nepieciešami šajā jomā.

Viens, iespējams jauns variants atrodas piektajā eksonā un arī tiek prognozēts kā proteīnu bojājošs un iespējams īsts IH izraisošs variants, norādot uz novitāti šī darba ietvaros. Tomēr detalizētāki pētījumi ir nepieciešami, lai pierādītu tā patoloģisko lomu IH attīstībā.

Diemžēl PolyPhen-2 un SIFT nespēj prognozēt funkcionālos efektus intronos, 3'un 5' rajonos esošajiem variantiem. Šīs nekodējošās mutācijas varētu ietekmēt proteīna splaisingu vai transkripciju. Mēs arī nespējam detektēt lielas delēcijas, insercijas vai duplikācijas ar lietoto sekvenēšanas metodi. Ir zināms, ka lielas delēcijas (piemēram, otrais līdz sestais eksons, piektais vai septītais eksons) arī var novest pie IH [24, 26]; tādēļ daži IH varianti varētu būt palaisti garām.

Nobeigumā gribētos rosināt, ka biežāk sastopamo IH izraisošo mutāciju panelī (specifiskā Latvijas populācijai) vajadzētu iekļaut Tyr144His, His1923Arg, Arg3527Glu, Arg1689His un Ser3915Cys (*APOB*), Gly20Arg, Arg350X un IVS11-10 (G>A) (*LDLR*), un Arg238Trp (*LDLRAP1*) recesīvajam IH tipam, variantu detekciju. Šāds genotipēšanas panelis kopā dotu 17.4 % diagnosticēšanas līmeni Latvijas populācijas pacientu paraugkopā “ar aizdomām” uz IH.

SECINĀJUMI

1. 10 *CETP* lokusa polimorfismi ir spēcīgi saistīti ar pazeminātu plazmas ABL holesterola līmeni (<1.3 mmol/L), salīdzinot ar grupu, kurā ir indivīdi ar paaugstinātu ABL holesterola līmeni (> 1.8 mmol/L).
2. 10 *CETP* lokusa un divi *MLXIPL* lokusa SNP ir saistīti ar samazinātu ABL holesterolu populācijas paraugkopā ar 1273 indivīdiem no Latvijas populācijas genoma datubāzes.
3. Viens TOMM40 lokusa SNP un četri *MLXIPL* lokusa SNP ir saistīti ar attiecīgi paaugstinātu ZBL holesterola un triglicerīdu līmeni.
4. *CETP* haplotipi nosaka pretējus efektus ABL holesterola līmenim: viens haplotips no diviem *CETP* haploblokiem ir saistīts ar paaugstinātu, kamēr vismaz divi haplotipi no abiem *CETP* haploblokiem ir saistīti ar pazeminātu ABL holesterola līmeni.
5. Indivīdi ar lielāku sākotnēji saistīto SNP riska alēļu skaitu no nesaistītiem lokusiem (19-26 KH gadījumā, 31-40 ABL holesterola gadījumā, 18-26 ZBL holesterola gadījumā un 30-39 TG gadījumā) uzrāda būtiski izmainītus lipoproteīnu un triglicerīdu līmeņus, salīdzinājumā ar indivīdiem ar mazāku riska alēļu skaitu (4-10 KH gadījumā, 13-21 ABL holesterola gadījumā, 2-9 ZBL holesterola gadījumā un 13-21 TG gadījumā).
6. Lietojot astoņu biežāk sastopamo IH izraisošo mutāciju genotipēšanas paneli iespējams iegūt 2.1 % diagnosticēšanas līmeni paraugkopā ar paaugstinātu ZBL holesterola līmeni (>4.1 mmol/L).
7. *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* un *LDLRAP1* gēnu kodējošo daļu un splaisa saitņu sekvenēšana dod 7.6 % IH identifikācijas līmeni paraugkopā ar augstu ZBL holesterola līmeni.
8. Visbiežāk sastopamā IH izraisošā mutācija Latvijas populācijā ir Arg3527Gln *APOB* gēnā (1.6 %).
9. Ar NGS sekvenēšanu ir identificēti trīs potenciāli jauni IH izraisoši varianti *APOB* gēnā (Tyr144His, Met755Leu un Val2095Glu).

AIZSTĀVĀMĀS TĒZES

1. *CETP* gēna bieži sastopamie polimorfismi ir spēcīgākie, ABL holesterola līmeni ietekmējošie, ģenētiskie riska faktori Latvijas populācijā.
2. *MLXIPL* lokusa bieži sastopamie SNP ir spēcīgākie, TG līmeni ietekmējošie, ģenētiskie faktori Latvijas populācijā.
3. Daudzu, sākotnēji saistītu ar lipīdu parametriem, mazas izpauses SNP skrīnēšana uzrāda apvienotā efekta esamību, un var tikt izmantota lipīdu līmeņu prognozēšanai multifaktoriālo dilipidēmiju gadījumos.
4. Latvijas populācijā, galvenie IH ģenētiskie cēloņi ir aminoskābi mainošas mutācijas *APOB* gēnā.
5. Mērķēta jaunās paaudzis sekvenēšanas tehnoloģija ir spēcīgs rīks IH izraisošo un jaunu ar slimību saistītu variantu identificēšanas sensitivitātes paaugstināšanai.

ORIGINĀLO PUBLIKĀCIJU SARAKSTS

1. **Radoviča I.**, Fridmanis D., Vaivade I., Ņikitina-Zaķe L., Kloviņš J., (2013). The Association of Common SNPs and Haplotypes in CETP Gene with HDL Cholesterol Levels in Latvian Population. PLoS ONE 8(5): e64191. doi:10.1371/journal.pone.0064191.
2. **Radoviča I.**, Fridmanis D., Silamiķelis I., Ņikitina-Zaķe L., Kloviņš J., (2014). Association between CETP, MLXIPL, and TOMM40 polymorphisms and serum lipid levels in a Latvian population. Meta Gene 2 (565-578). <http://dx.doi.org/10.1016/j.mgene.2014.07.006>.
3. **Radoviča I.**, Bērziņš R., Latkovskis G., Fridmanis D., Ņikitina-Zaķe L., Ventiņš K., Ozola G., Ērglis A., Kloviņš J., (2014). Evaluation of massive parallel sequencing as the diagnostic tool for Familial Hypercholesterolemia. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B, Vol. 68, No. 3 (690), pp. 20-30.

PĒTĪJUMA APROBĀCIJA

1. **Radoviča I.**, Fridmanis D., Vaivade I., Ņikitina-Zaķe L., Kloviņš J., The association of haplotypes in CETP gene with HDL cholesterol levels in Latvian population. Eiropas Medicīniskās Ģenētikas Skola, Otrās Jaunās Paaudzes Sekvenēšanas Kurss, Bertinoro, 17. – 20. Maijs, 2013. (Abstrakts publicēts European School of Genetic Medicine, 2nd COURSE IN NEXT GENERATION SEQUENCING Programme and Abstract book, 2013, p.34).
2. **Radoviča I.**, Fridmanis D., Vaivade I., Ņikitina-Zaķe L., Kloviņš J., The association of common SNPs with HDL cholesterol levels in Latvian population. Eiropas Cilvēka Ģenētikas konference, Parīze, 8. – 11. Jūnijs, 2013. (Abstrakts publicēts European Human Genetics 2013, Vol. 21. Suppl.2, June, p.246).
3. **Radoviča I.**, Bērziņš R., Silava D., Silamiķelis I., Fridmanis D., Kloviņš J., Massive parallel sequencing in hypercholesterolemic patients of Latvia. Eiropas Cilvēka Ģenētikas konference, Milāna, 31. Maijs – 3. Jūnijs, 2014. (Abstrakts publicēts European Human Genetics 2014, Vol. 22. Suppl.1, May, p.130).

AUTORA IZGLĪTĪBA UN PIEREDZE

Izglītība:

- 2003 – 2006 Bakalaura grāds Bioloģijā, Latvijas Universitāte, “ Esenciālā tremora (Essential tremor) ģenētiskā kartēšana, izmantojot mikrosatelītu marķierus”;
- 2006 – 2008 Maģistra grāds Bioloģijā, Latvijas Universitāte, “ Esenciālā tremora ģenētiskā izpēte Latvijas populācijā”;
- 2008 – 2011 Doktorantūras studijas Bioloģijā, Latvijas Universitāte.

Darba pieredze:

- 2003 - 2007 Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un Studiju Centrs - laborante;
- 2007 - ... Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un Studiju Centrs - asistente.

Zinātniskā pieredze:

- 2003 – 2004 Latvijas Zinātnes Padomes grants „Aktivētu T-šunu kodolu faktoru (NFAT) loma šūnu attīstībā”.
- 2004 – 2005 Latvijas Zinātnes Padomes Sadarbības Projekts „Vēlīnās neurodeģeneratīvās saslimšanas, to epidemioloģija, klīniskais un molekulāri ģenētiskais raksturojums”.
- 2006 – 2008 Eiropas Reģionālās Attīstības Fonda (ERAF) projekts “Jauno tehnoloģiju izstrāde un aprobācija ģenētisko diagnostikas testu ieviešanai Latvijas medicīnā” Nr. VPDI/ERAF/CFLA/05/APK/2.5.1./000015/006.
- 2010 - 2012 Eiropas Sociālā Fonda (ESF) projekts “Slimību patogēneses ģenētisko un molekulāro mehānismu izpēte un jaunu terapijas un diagnostikas līdzekļu izstrāde” Nr. 2009/0204/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/150.
- 2013 - 2013 Eiropas Reģionālās Attīstības Fonda (ERAF) projekts “Jaunu DNS diagnostikas testu izstrāde un validācija lietošanai klīniskajā praksē” Nr. 2010/0311/2DP/2.1.1.1.0/10/APIA/VIAA/022.

PATEICĪBAS

Pētījums izstrādāts ar Latvijas Zinātņu Padomes, Eiropas Sociālā fonda projekta “Slimību patogēneses ģenētisko un molekulāro mehānismu izpēte un jaunu terapijas un diagnostikas līdzekļu izstrāde” Nr. 2009/0204/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/150, Eiropas reģionālās attīstības fonda projekta “Jaunu DNS diagnostikas testu izstrāde un validācija lietošanai klīniskajā praksē” Nr. 2010/0311/2DP/2.1.1.1.0/10/APIA/VIAA/022 un Eiropas Sociālā fonda projekta “Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē - 2” Nr. 2009/0138/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/004 atbalstu strādājot Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un Studiju Centrā, Latvijas Universitātē (Rīgā, Latvijā).

Īpašs paldies PhD. Biol. Ērikam Jankevicam un PhD. Biol. Innai Iņāškinai par molekulārās bioloģijas metožu pamatu apmācību.

Pateicība maniem bakalaura studentiem Rūdfolfam Bērziņam un Dairai Silvai par palīdzību laboratorijā, veicot milzīgu apjomu ar Sangera sekvenēšanas un reālā laika PĶR reakcijām.

Vislielākās pateicības:

- PhD. Biol. Jānim Kloviņam par palīdzību un pacietību vadot manu zinātnisko;
- PhD. Biol. Dāvidam Fridmanim par konsultācijām un padomiem dažādos metožu un problēmu risināšanas jautājumos;
- Maniem tuvākajiem kolēģiem par lielāku vai mazāku iesaistīšanos un palīdzību manā pētījumā;
- Manai ģimenei un draugiem par viņu morālo atbalstu un sapratni.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Bhagavan, N.V., *Medical biochemistry*. 4th ed. 2002, San Diego: Harcourt/Academic Press. 1016 p.
2. Watson, A.D., *Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems*. J Lipid Res, 2006. **47**(10): p. 2101-11.
3. Vance, D.E. and J.E. Vance, *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 5th ed. 2008, Amsterdam ; Boston: Elsevier. 631 p.
4. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. 2005, New York: W.H. Freeman.
5. Cox, R.A. and M.R. Garcia-Palmieri, *Cholesterol, Triglycerides, and Associated Lipoproteins*, in *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, H.K. Walker, W.D. Hall, and J.W. Hurst, Editors. 1990: Boston.
6. Mahley, R.W., et al., *Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function*. J Lipid Res, 1984. **25**(12): p. 1277-94.
7. Goldberg, A.C. *Dyslipidemia*. 2013 September 2013 [cited 2014 31.01.2014]; Available from: http://www.merckmanuals.com/professional/endocrine_and_metabolic_disorders/lipid_disorders/dyslipidemia.html.
8. Berliner, J.A., et al., *Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics*. Circulation, 1995. **91**(9): p. 2488-96.
9. Durrington, P., *Dyslipidaemia*. Lancet, 2003. **362**(9385): p. 717-31.
10. WHO, *World Health Statistics 2013*. World Health Organization, 2013.
11. Runge, M.S. and C. Patterson, *Principles of molecular cardiology*. Contemporary cardiology. 2005, Totowa, N.J.: Humana Press. xiii, 617 p.
12. Nichols, M.T., N. Scarborough, P. Rayner, M. Leal, J. Luengo-Fernandez, R. Gray, A., *European Cardiovascular Disease Statistics 2012 edition*. European Heart Network, 2012.
13. CDPC, *Statistical yearbook of health care in Latvia 2012*. Centre for Disease Prevention and Control, 2012. **14**.
14. Grundy, S.M., et al., *Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines*. Circulation, 2004. **110**(2): p. 227-39.
15. National Cholesterol education Program, N.H.L.a.B.I., National Institute of Health, *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report*. Circulation, 2002. **106**(25): p. 3143-421.
16. Neil, A., et al., *Reductions in all-cause, cancer, and coronary mortality in statin-treated patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia: a prospective registry study*. Eur Heart J, 2008. **29**(21): p. 2625-33.
17. Thorogood, M., *Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group*. BMJ, 1991. **303**(6807): p. 893-6.
18. Reiner, Z., et al., *ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS)*. Eur Heart J, 2011. **32**(14): p. 1769-818.
19. WHO, H.G.P., *Familial hypercholesterolemia: Report of a second WHO consultation*. WHO, 1999. **WHO/HGN/FH/Cons/99.2, Geneva**.
20. Hill, J.S., et al., *Genetic and environmental factors affecting the incidence of coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia*. Arterioscler Thromb, 1991. **11**(2): p. 290-7.
21. Benn, M., et al., *Familial hypercholesterolemia in the danish general population: prevalence, coronary artery disease, and cholesterol-lowering medication*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(11): p. 3956-64.

22. Rader, D.J., J. Cohen, and H.H. Hobbs, *Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment*. J Clin Invest, 2003. **111**(12): p. 1795-803.
23. Graham, C.A., et al., *Genetic screening protocol for familial hypercholesterolemia which includes splicing defects gives an improved mutation detection rate*. Atherosclerosis, 2005. **182**(2): p. 331-40.
24. Humphries, S.E., et al., *Genetic causes of familial hypercholesterolaemia in patients in the UK: relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk*. J Med Genet, 2006. **43**(12): p. 943-9.
25. Innerarity, T.L., et al., *Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia*. J Lipid Res, 1990. **31**(8): p. 1337-49.
26. Hobbs, H.H., et al., *Deletion in the gene for the low-density-lipoprotein receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia*. N Engl J Med, 1987. **317**(12): p. 734-7.
27. Soria, L.F., et al., *Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(2): p. 587-91.
28. Abifadel, M., et al., *Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia*. Nat Genet, 2003. **34**(2): p. 154-6.
29. Haddad, L., et al., *Evidence for a third genetic locus causing familial hypercholesterolemia. A non-LDLR, non-APOB kindred*. J Lipid Res, 1999. **40**(6): p. 1113-22.
30. Varret, M., et al., *A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32*. Am J Hum Genet, 1999. **64**(5): p. 1378-87.
31. Garcia, C.K., et al., *Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein*. Science, 2001. **292**(5520): p. 1394-8.
32. Arca, M., et al., *Autosomal recessive hypercholesterolaemia in Sardinia, Italy, and mutations in ARH: a clinical and molecular genetic analysis*. Lancet, 2002. **359**(9309): p. 841-7.
33. Talmud, P.J., et al., *Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study*. Lancet, 2013. **381**(9874): p. 1293-301.
34. Aulchenko, Y.S., et al., *Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts*. Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 47-55.
35. Burkhardt, R., et al., *Common SNPs in HMGCR in micronesians and whites associated with LDL-cholesterol levels affect alternative splicing of exon13*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(11): p. 2078-84.
36. Chasman, D.I., et al., *Genetic loci associated with plasma concentration of low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, apolipoprotein A1, and Apolipoprotein B among 6382 white women in genome-wide analysis with replication*. Circ Cardiovasc Genet, 2008. **1**(1): p. 21-30.
37. Heid, I.M., et al., *Genome-wide association analysis of high-density lipoprotein cholesterol in the population-based KORA study sheds new light on intergenic regions*. Circ Cardiovasc Genet, 2008. **1**(1): p. 10-20.
38. Hiura, Y., et al., *Identification of genetic markers associated with high-density lipoprotein-cholesterol by genome-wide screening in a Japanese population: the Suita study*. Circ J, 2009. **73**(6): p. 1119-26.
39. Igl, W., et al., *Modeling of environmental effects in genome-wide association studies identifies SLC2A2 and HP as novel loci influencing serum cholesterol levels*. PLoS Genet, 2010. **6**(1): p. e1000798.
40. Kathiresan, S., et al., *Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans*. Nat Genet, 2008. **40**(2): p. 189-97.
41. Kathiresan, S., et al., *Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia*. Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 56-65.
42. Kooner, J.S., et al., *Genome-wide scan identifies variation in MLXIPL associated with plasma triglycerides*. Nat Genet, 2008. **40**(2): p. 149-51.
43. Ma, L., et al., *Genome-wide association analysis of total cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol levels using the Framingham heart study data*. BMC Med Genet, 2010. **11**: p. 55.

44. Pollin, T.I., et al., *A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection*. *Science*, 2008. **322**(5908): p. 1702-5.
45. Ridker, P.M., et al., *Polymorphism in the CETP gene region, HDL cholesterol, and risk of future myocardial infarction: Genomewide analysis among 18 245 initially healthy women from the Women's Genome Health Study*. *Circ Cardiovasc Genet*, 2009. **2**(1): p. 26-33.
46. Sabatti, C., et al., *Genome-wide association analysis of metabolic traits in a birth cohort from a founder population*. *Nat Genet*, 2009. **41**(1): p. 35-46.
47. Sandhu, M.S., et al., *LDL-cholesterol concentrations: a genome-wide association study*. *Lancet*, 2008. **371**(9611): p. 483-91.
48. Saxena, R., et al., *Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels*. *Science*, 2007. **316**(5829): p. 1331-6.
49. Shen, H., et al., *Familial defective apolipoprotein B-100 and increased low-density lipoprotein cholesterol and coronary artery calcification in the old order amish*. *Arch Intern Med*, 2010. **170**(20): p. 1850-5.
50. Suchindran, S., et al., *Genome-wide association study of Lp-PLA(2) activity and mass in the Framingham Heart Study*. *PLoS Genet*, 2010. **6**(4): p. e1000928.
51. Wallace, C., et al., *Genome-wide association study identifies genes for biomarkers of cardiovascular disease: serum urate and dyslipidemia*. *Am J Hum Genet*, 2008. **82**(1): p. 139-49.
52. Waterworth, D.M., et al., *Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(11): p. 2264-76.
53. Willer, C.J., et al., *Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease*. *Nat Genet*, 2008. **40**(2): p. 161-9.
54. Braun, T.R., et al., *A replication study of GWAS-derived lipid genes in Asian Indians: the chromosomal region 11q23.3 harbors loci contributing to triglycerides*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e37056.
55. Edmondson, A.C., et al., *Dense genotyping of candidate gene loci identifies variants associated with high-density lipoprotein cholesterol*. *Circ Cardiovasc Genet*, 2011. **4**(2): p. 145-55.
56. Johansen, C.T., et al., *Excess of rare variants in genes identified by genome-wide association study of hypertriglyceridemia*. *Nat Genet*, 2010. **42**(8): p. 684-7.
57. Lanktree, M.B., et al., *Replication of genetic associations with plasma lipoprotein traits in a multiethnic sample*. *J Lipid Res*, 2009. **50**(7): p. 1487-96.
58. Elisaf, M. and V. Tsimihodimos, *Editorial: secondary dyslipidemias*. *Open Cardiovasc Med J*, 2011. **5**: p. 22-3.
59. Vodnala, D., M. Rubenfire, and R.D. Brook, *Secondary causes of dyslipidemia*. *Am J Cardiol*, 2012. **110**(6): p. 823-5.
60. Liberopoulos, E., G. Miltiados, and M. Elisaf, *Impressive lipid changes following hypolipidaemic drug administration can unveil subclinical hyperthyroidism*. *Diabetes Obes Metab*, 2001. **3**(2): p. 97-8.
61. Ram, R., et al., *Rhabdomyolysis induced acute renal failure secondary to statins*. *Indian J Nephrol*, 2013. **23**(3): p. 211-3.
62. Wu, J., et al., *Rhabdomyolysis associated with fibrate therapy: review of 76 published cases and a new case report*. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009. **65**(12): p. 1169-74.
63. Hansen, K.E., et al., *Outcomes in 45 patients with statin-associated myopathy*. *Arch Intern Med*, 2005. **165**(22): p. 2671-6.
64. Bilheimer, D.W., et al., *Reduction in cholesterol and low density lipoprotein synthesis after portacaval shunt surgery in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia*. *J Clin Invest*, 1975. **56**(6): p. 1420-30.
65. Buchwald, H., et al., *Effective lipid modification by partial ileal bypass reduced long-term coronary heart disease mortality and morbidity: five-year posttrial follow-up report from the POSCH. Program on the Surgical Control of the Hyperlipidemias*. *Arch Intern Med*, 1998. **158**(11): p. 1253-61.

66. Igl, W., et al., *Modeling of environmental effects in genome-wide association studies identifies SLC2A2 and HP as novel loci influencing serum cholesterol levels*. PLoS Genet. **6**(1): p. e1000798.
67. Jee, S.H., et al., *Adiponectin concentrations: a genome-wide association study*. Am J Hum Genet. **87**(4): p. 545-52.
68. Johansen, C.T., et al., *Excess of rare variants in genes identified by genome-wide association study of hypertriglyceridemia*. Nat Genet. **42**(8): p. 684-7.
69. Kathiresan, S., K. Musunuru, and M. Orho-Melander, *Defining the spectrum of alleles that contribute to blood lipid concentrations in humans*. Curr Opin Lipidol, 2008. **19**(2): p. 122-7.
70. Ma, L., et al., *Genome-wide association analysis of total cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol levels using the Framingham heart study data*. BMC Med Genet. **11**: p. 55.
71. Suchindran, S., et al., *Genome-wide association study of Lp-PLA(2) activity and mass in the Framingham Heart Study*. PLoS Genet. **6**(4): p. e1000928.
72. Waterworth, D.M., et al., *Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. **30**(11): p. 2264-76.
73. Radovica, I., et al., *The association of common SNPs and haplotypes in CETP gene with HDL cholesterol levels in Latvian population*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64191.
74. Taylor, A., et al., *Mutation detection rate and spectrum in familial hypercholesterolaemia patients in the UK pilot cascade project*. Clin Genet, 2010. **77**(6): p. 572-80.
75. Amsellem, S., et al., *Intronic mutations outside of Alu-repeat-rich domains of the LDL receptor gene are a cause of familial hypercholesterolemia*. Hum Genet, 2002. **111**(6): p. 501-10.
76. Benn, M., et al., *Common and rare alleles in apolipoprotein B contribute to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol in the general population*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(3): p. 1038-45.
77. Brusgaard, K., et al., *Molecular genetic analysis of 1053 Danish individuals with clinical signs of familial hypercholesterolemia*. Clin Genet, 2006. **69**(3): p. 277-83.
78. Chatzistefanidis, D., et al., *First Detection of Hypercholesterolemia Causing ApoB-100 R3527Q Mutation in a Family in Greece*. Genetic Syndromes & Gene Therapy, 2013. **4**:6.
79. Dedoussis, G.V., et al., *FH clinical phenotype in Greek patients with LDL-R defective vs. negative mutations*. Eur J Clin Invest, 2004. **34**(6): p. 402-9.
80. Eden, E.R., et al., *Restoration of LDL receptor function in cells from patients with autosomal recessive hypercholesterolemia by retroviral expression of ARH1*. J Clin Invest, 2002. **110**(11): p. 1695-702.
81. Fouchier, S.W., et al., *The molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands*. Hum Genet, 2001. **109**(6): p. 602-15.
82. Lombardi, M.P., et al., *Molecular genetic testing for familial hypercholesterolemia: spectrum of LDL receptor gene mutations in The Netherlands*. Clin Genet, 2000. **57**(2): p. 116-24.
83. Lombardi, P., et al., *Mutations in the low density lipoprotein receptor gene of familial hypercholesterolemic patients detected by denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing*. J Lipid Res, 1995. **36**(4): p. 860-7.
84. Purcell, S., et al., *PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(3): p. 559-75.
85. Lou, X.Y., et al., *A generalized combinatorial approach for detecting gene-by-gene and gene-by-environment interactions with application to nicotine dependence*. Am J Hum Genet, 2007. **80**(6): p. 1125-37.
86. Howie, B.N., P. Donnelly, and J. Marchini, *A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies*. PLoS Genet, 2009. **5**(6): p. e1000529.
87. Marchini, J., et al., *A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes*. Nat Genet, 2007. **39**(7): p. 906-13.
88. Gauderman W, M.J., *QUANTO 1.1: a computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies*. 2009.
89. Quail, M.A., et al., *A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers*. BMC Genomics. **13**: p. 341.

90. Thorvaldsdottir, H., J.T. Robinson, and J.P. Mesirov, *Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration*. *Brief Bioinform*, 2012. **14**(2): p. 178-92.
91. Adzhubei, I.A., et al., *A method and server for predicting damaging missense mutations*. *Nat Methods*. **7**(4): p. 248-9.
92. Kumar, P., S. Henikoff, and P.C. Ng, *Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(7): p. 1073-81.
93. Schwarz, J.M., et al., *MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age*. *Nat Methods*, 2014. **11**(4): p. 361-2.
94. Burns, F., *A contribution to the study of the etiology of xanthomata*. *Arch Derm Syph*, 1920. **2**: p. 415-29.
95. Latvijas Statistika, 2011. *gada tautas skaitīšanas rezultāti īsumā. Informatīvais apskats*. Latvijas Republikas Centrālā statistikas pārvalde, 2012. http://www.csb.gov.lv/sites/default/files/publikacijas/nr_13_2011gada_tautas_skaitisanas_rezultati_isuma_12_00_lv.pdf.
96. Khovidhunkit, W., et al., *Resequencing CETP, LIPC and LIPG Genes in Thai Subjects With Hyperalphalipoproteinemia*. *Am J Cardiol*, 2012.
97. Thompson, J.F., et al., *CETP polymorphisms associated with HDL cholesterol may differ from those associated with cardiovascular disease*. *Atherosclerosis*, 2005. **181**(1): p. 45-53.
98. Thompson, J.F., et al., *High-density genotyping and functional SNP localization in the CETP gene*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(2): p. 434-43.
99. Morton, R.E. and D.B. Zilversmit, *Inter-relationship of lipids transferred by the lipid-transfer protein isolated from human lipoprotein-deficient plasma*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(19): p. 11751-7.
100. Swenson, T.L., R.W. Brocia, and A.R. Tall, *Plasma cholesteryl ester transfer protein has binding sites for neutral lipids and phospholipids*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(11): p. 5150-7.
101. Boyle, A.P., et al., *Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB*. *Genome Res*, 2012. **22**(9): p. 1790-7.
102. Dacet, C., et al., *New functional promoter polymorphism, CETP/-629, in cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene related to CETP mass and high density lipoprotein cholesterol levels: role of Sp1/Sp3 in transcriptional regulation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(2): p. 507-15.
103. Thompson, J.F., et al., *Cholesteryl ester transfer protein promoter single-nucleotide polymorphisms in Sp1-binding sites affect transcription and are associated with high-density lipoprotein cholesterol*. *Clin Genet*, 2004. **66**(3): p. 223-8.
104. Cairo, S., et al., *WBSCR14, a gene mapping to the Williams--Beuren syndrome deleted region, is a new member of the Mlx transcription factor network*. *Hum Mol Genet*, 2001. **10**(6): p. 617-27.
105. Herman, M.A., et al., *A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism*. *Nature*, 2012. **484**(7394): p. 333-8.
106. Franzoso, G., et al., *The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition*. *Nature*, 1992. **359**(6393): p. 339-42 (abstract).
107. Wulczyn, F.G., M. Naumann, and C. Scheidereit, *Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF-kappa B*. *Nature*, 1992. **358**(6387): p. 597-9 (abstract).
108. Utermann, G., et al., *Polymorphism of apolipoprotein E. II. Genetics of hyperlipoproteinemia type III*. *Clin Genet*, 1979. **15**(1): p. 37-62 (abstract).
109. Fokkema, I.F., J.T. den Dunnen, and P.E. Taschner, *LOVD: easy creation of a locus-specific sequence variation database using an "LSDB-in-a-box" approach*. *Hum Mutat*, 2005. **26**(2): p. 63-8.
110. Fouchier, S.W., J.J. Kastelein, and J.C. Defesche, *Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands*. *Hum Mutat*, 2005. **26**(6): p. 550-6.
111. Salazar, L.A., et al., *Molecular basis of familial hypercholesterolemia in Brazil: Identification of seven novel LDLR gene mutations*. *Hum Mutat*, 2002. **19**(4): p. 462-3.

112. Laurie, A.D., R.S. Scott, and P.M. George, *Genetic screening of patients with familial hypercholesterolaemia (FH): a New Zealand perspective*. *Atheroscler Suppl*, 2004. **5**(5): p. 13-5.
113. Sozen, M.M., et al., *The molecular basis of familial hypercholesterolaemia in Turkish patients*. *Atherosclerosis*, 2005. **180**(1): p. 63-71.
114. Widhalm, K., et al., *Diagnosis of families with familial hypercholesterolaemia and/or Apo B-100 defect by means of DNA analysis of LDL-receptor gene mutations*. *J Inherit Metab Dis*, 2007. **30**(2): p. 239-47.
115. Alonso, R., et al., *Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia using a DNA-array based platform*. *Clin Biochem*, 2009. **42**(9): p. 899-903.
116. Solberg, K., et al., *Familial hypercholesterolaemia caused by a non-sense mutation in codon 329 of the LDL receptor gene*. *Scand J Clin Lab Invest*, 1994. **54**(8): p. 605-9 (abstract).
117. Cenarro, A., et al., *Identification of recurrent and novel mutations in the LDL receptor gene in Spanish patients with familial hypercholesterolemia*. *Mutations in brief no. 135*. Online. *Hum Mutat*, 1998. **11**(5): p. 413.
118. Tejedor, D., et al., *Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia*. *Clin Chem*, 2005. **51**(7): p. 1137-44.
119. den Dunnen, J.T. and S.E. Antonarakis, *Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion*. *Hum Mutat*, 2000. **15**(1): p. 7-12.
120. Futema, M., et al., *Analysis of the frequency and spectrum of mutations recognised to cause familial hypercholesterolaemia in routine clinical practice in a UK specialist hospital lipid clinic*. *Atherosclerosis*, 2013. **229**(1): p. 161-8.
121. Law, A. and J. Scott, *A cross-species comparison of the apolipoprotein B domain that binds to the LDL receptor*. *J Lipid Res*, 1990. **31**(6): p. 1109-20.
122. Norsworthy, P.J., et al., *Targeted genetic testing for familial hypercholesterolaemia using next generation sequencing: a population-based study*. *BMC Med Genet*, 2014. **15**: p. 70.
123. Vandrovcova, J., et al., *The use of next-generation sequencing in clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia*. *Genet Med*. **15**(12): p. 948-57.
124. Makela, K.M., et al., *Genome-wide association study pinpoints a new functional apolipoprotein B variant influencing oxidized low-density lipoprotein levels but not cardiovascular events: AtheroRemo Consortium*. *Circ Cardiovasc Genet*, 2012. **6**(1): p. 73-81.
125. Yoshida, T., et al., *Association of candidate gene polymorphisms with chronic kidney disease in Japanese individuals with hypertension*. *Hypertens Res*, 2009. **32**(5): p. 411-8.
126. Bentzen, J., T. Jorgensen, and M. Fenger, *The effect of six polymorphisms in the Apolipoprotein B gene on parameters of lipid metabolism in a Danish population*. *Clin Genet*, 2002. **61**(2): p. 126-34.
127. Ilmonen, M., et al., *Genetic variation in the amino-terminal part of apolipoprotein B: studies in hyperlipidemic patients*. *Atherosclerosis*, 1998. **138**(2): p. 367-74.
128. Ilmonen, M., et al., *Two new immunogenetic polymorphisms of the apoB gene and their effect on serum lipid levels and responses to changes in dietary fat intake*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(9): p. 1287-93.