
FAMILIÁRNÍ HYPERCHOLESTEROLEMIE A FUNKČNÍ ANALÝZA

FAMILIÁRNÍ HYPERCHOLESTEROLEMIE (FH)

- Autosomálně dominantně dědičné onemocnění
- Příčiny:
 - Nejčastěji mutace v genu pro LDL-receptor (*LDLR*)
 - Méně často mutace v genu pro jeho ligand – apolipoprotein B 100 (*APOB*)
 - Vzácně i specifický typ mutace v genu pro proprotein konvertázu subtilisin-kexin typu 9 (*PCSK9*)
- V důsledku mutací je v hepatocytech zásadně zpomaleno odstraňování lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) z krve a hladina LDL-cholesterolu se tak velmi výrazně zvyšuje
- Léčba:
 - Zdravá výživa a dostatek pohybu (jako u běžně zvýšeného cholesterolu)
 - Nutné podávat léky snižující cholesterol (zejména statiny)
 - U těžkých případů plazmaferéza (očištění krve od tukových částic)

PROJEVY FH

- Velmi vysoká hladina LDL-cholesterolu výrazně urychluje rozvoj aterosklerózy
- Kardiovaskulární onemocnění (především infarkt myokardu) se mohou objevit již ve velmi časném věku
- Ukládání cholesterolu do podkoží - podkožní boule (xantomy) nebo žlutavé plochy na kůži (xantelasmata), prstenec kolem rohovky oka



VÝSKYT FH

- FH patří mezi relativně častá vrozená onemocnění
- Frekvence výskytu heterozygotní formy FH v evropské i severoamerické populaci donedávna odhadována na **1:500** (předpoklad v ČR asi 20 000 pacientů s FH)
- Recentní statistiky založené na populačním screeningu v některých evropských zemích ale ukazují, že skutečná frekvence heterozygotní FH může být až **1:250**
- Homozygotní forma FH je vzácnější
- Výskyt odhadován na **1:1 000 000**, nedávné studie zaměřené na dánskou populaci však odhadují prevalenci homozygotní FH na **1:160 000– 300 000**

HLADINA CHOLESTEROLU

- Hladina HDL-cholesterolu i triglyceridů bývá většinou fyziologická
- Heterozygotní forma FH:
 - Celkový cholesterol nad 8 mmol/l (obvykle kolem 9–12 mmol/l)
 - LDL-cholesterol nad 5 mmol/l (obvykle 6–9 mmol/l), může být ale i vyšší
- Homozygotní formy FH:
 - Celkový cholesterol nad 12 mmol/l
 - LDL-cholesterol nad 10 mmol/l
- Hladiny krevních lipidů mohou mít značnou variabilitu - v závislosti na typu mutace, na životním stylu či jiných přidružených onemocněních

PROJEKT MEDPED (*MAKE EARLY DIAGNOSES TO PREVENT EARLY DEATHS*)

- Mezinárodní projekt, úkolem je aktivní vyhledávání pacientů (a jejich příbuzných) se závažnými formami dyslipidémie (především nemocných s FH)
- Funguje v ČR již od roku 1998
- Síť center
- Zajištění diagnostiky FH podle doporučených postupů včetně molekulárně-biologické diagnostiky, cílený screening v rodinách, dispenzarizace a evidenci nemocných v celostátní databázi, komplexní péče včetně farmakoterapie

- V databázi projektu MEDPED v ČR bylo v roce 2015 více než 6300 pacientů s FH
- V počtu diagnostikovaných a léčených pacientů s FH na počet obyvatel je ČR na 3. místě na světě

MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKA

- Analýza ukončena u 3900 probandů
- Mutace v *LDLR* nalezena u 833 probandů (21,4%)
- Mutace v *APOB* nalezena u 377 probandů (9,7%)

- **Celkem nalezeno 180 unikátních alelických variant genu *LDLR***
 - 69,4% substituce
 - 19,5% malé delece/inzerce
 - 11,1% rozsáhlé přestavby

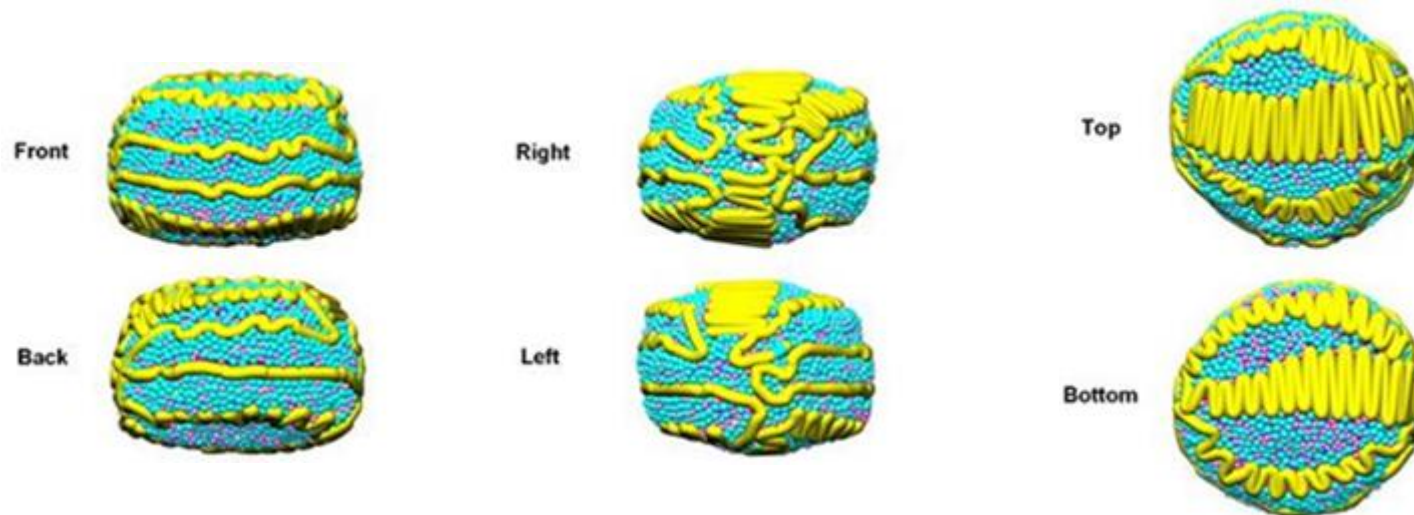
- **71 alelických variant dosud nebylo popsáno**

- *Tichý et al., Atherosclerosis 2012*

APOB100

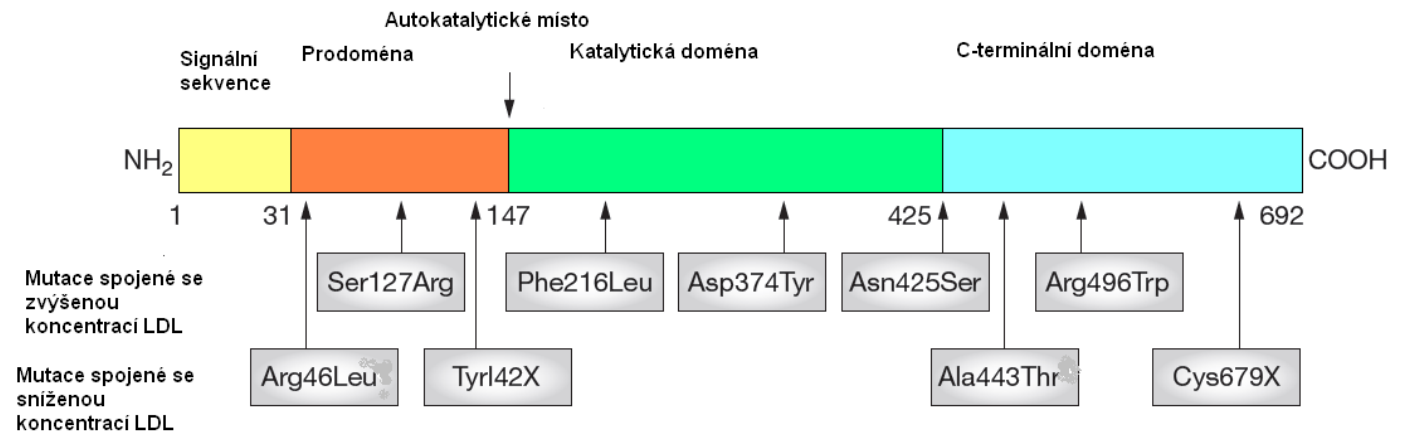
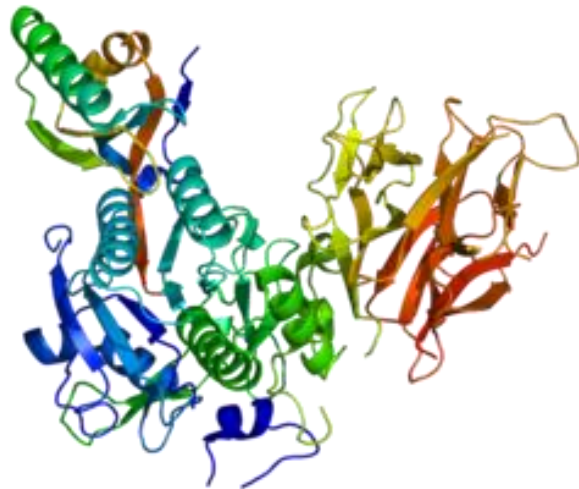
- 2. chromozom
- Gen společný pro ApoB100 i ApoB48 (tkáňově specifický alternativní sestřih)
- Protein: 4563 aminokyselin
- Ligand LDL receptoru

- DNA diagnostika - detekce nejčastější mutace p.Arg3527Gln



PCSK9

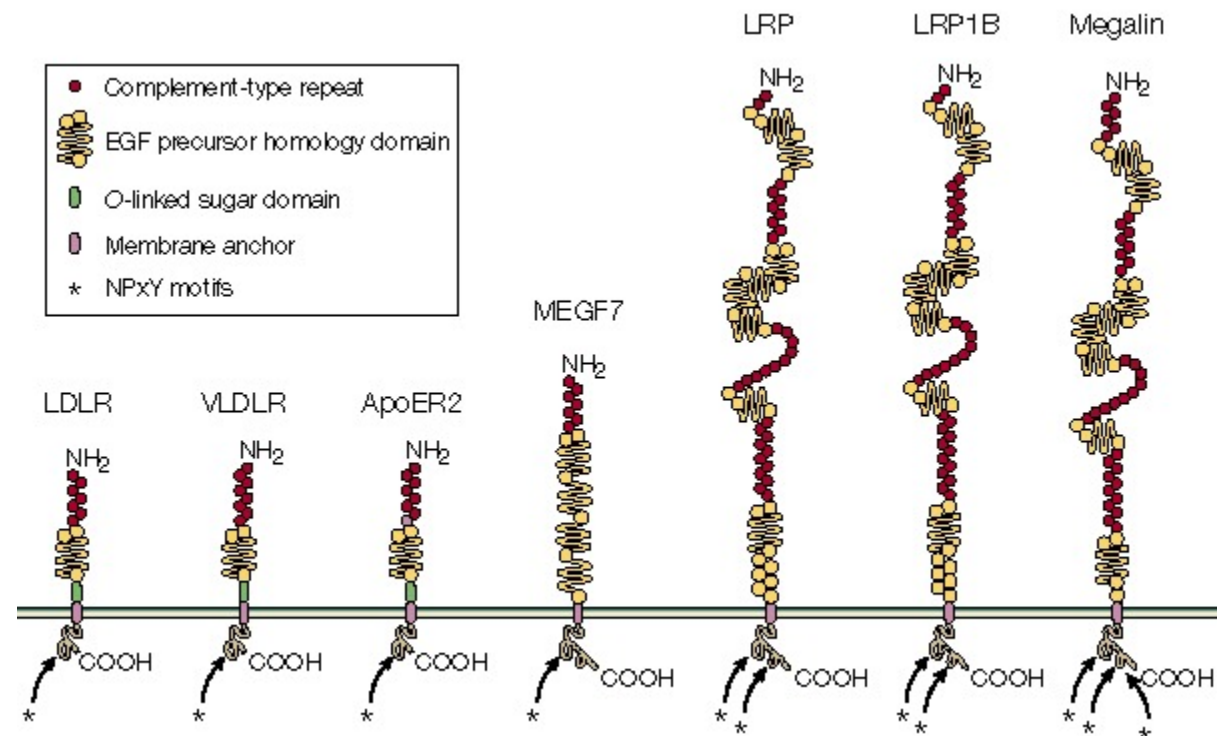
- Chromozom 1
- 12 exonů
- Protein: 692 aminokyselin
- K fenotypovému projevu FH je nutná *gain of function* mutace
- *Loss of function* mutace způsobují opačný fenotyp (hypocholesterolemie)



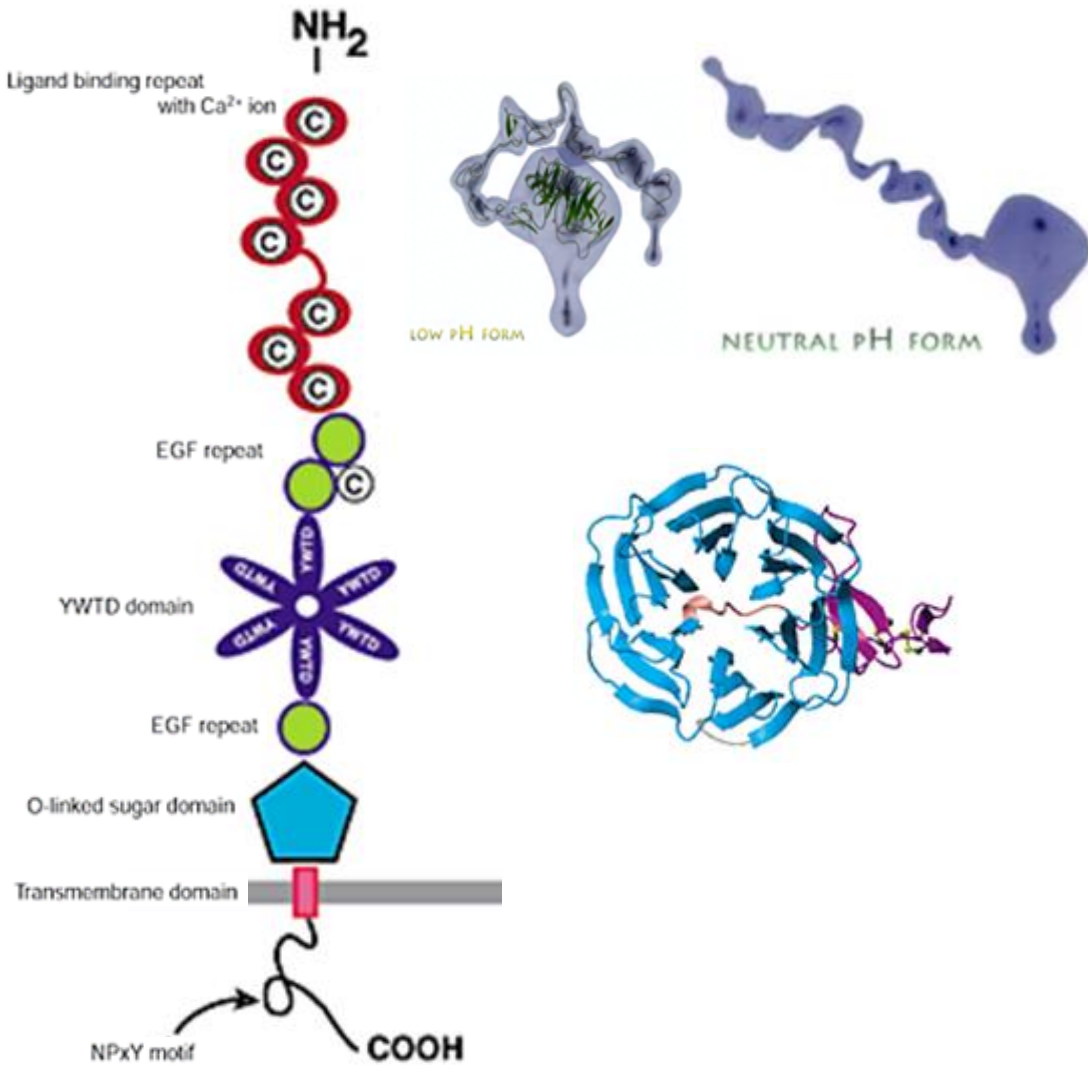
(Soutar et Naoumova, 2007, upraveno)

LDL RECEPTOR

- 19. chromozom, 45kb, 18 exonů
- Gen patří do rozsáhlejší rodiny LDL receptorových genů
- Vznikající prekurzorový protein má délku 860 aminokyselin – obsahuje signální sekvenci (21 aminokyselin) na N-konci
 - odštěpena během přesunu do ER
- Výsledný protein 839 aminokyselin



STRUKTURA LDL RECEPTORU



N-koncová doména / ligand-vazebná

- Tvořena sedmi repeaty (~50% sekvenčně identické)
- Každý repeat obsahuje přibližně 40 aminokyselin včetně 6 cysteinových residuí, které formují disulfidické můstky
- Pro vazbu ApoB jsou stěžejní repeaty 2 – 7, pro vazbu ApoE repeat 5

EGFP doména

- 3 repeaty, dva jsou blízce spojeny, poslední je od nich oddělen oblastí bohatou na YWTD (tyrosin, tryptofan, threonin, kysl. aspartová)

YWTD repeat region

- Zaujímá *beta-propeller* konformaci
- Tato oblast je zodpovědná za změnu konformace v důsledku změny pH okolí, díky čemuž je uvolněna LDL částice v endozomu

Doména bohatá na O-vázané oligosacharidy

- Neprojevuje žádnou funkci – experimentálně se neukázala významná ztráta funkce receptoru bez této domény

Transmembránová doména

- Složena z 22 (většinou) nepolárních residuí
- Prochází plazmatickou membránou jako alfa-helix

Cytosolická C-koncová doména

- Obsahuje ~50 aminokyselin
- Zahrnuje sekvenci důležitou pro formaci klatrinových váčků a pro spuštění receptorem zprostředkované endocytózy po navázání LDL částic

METABOLICKÁ DRÁHA LDL RECEPTORU

- Záměny v LDLR proteinu nacházíme ve všech jeho doménách. Jednotlivé mutace mají různý vliv na funkci proteinu – klasifikace do 5 tříd:

3. transport na plazmatickou membránu a vazba LDL

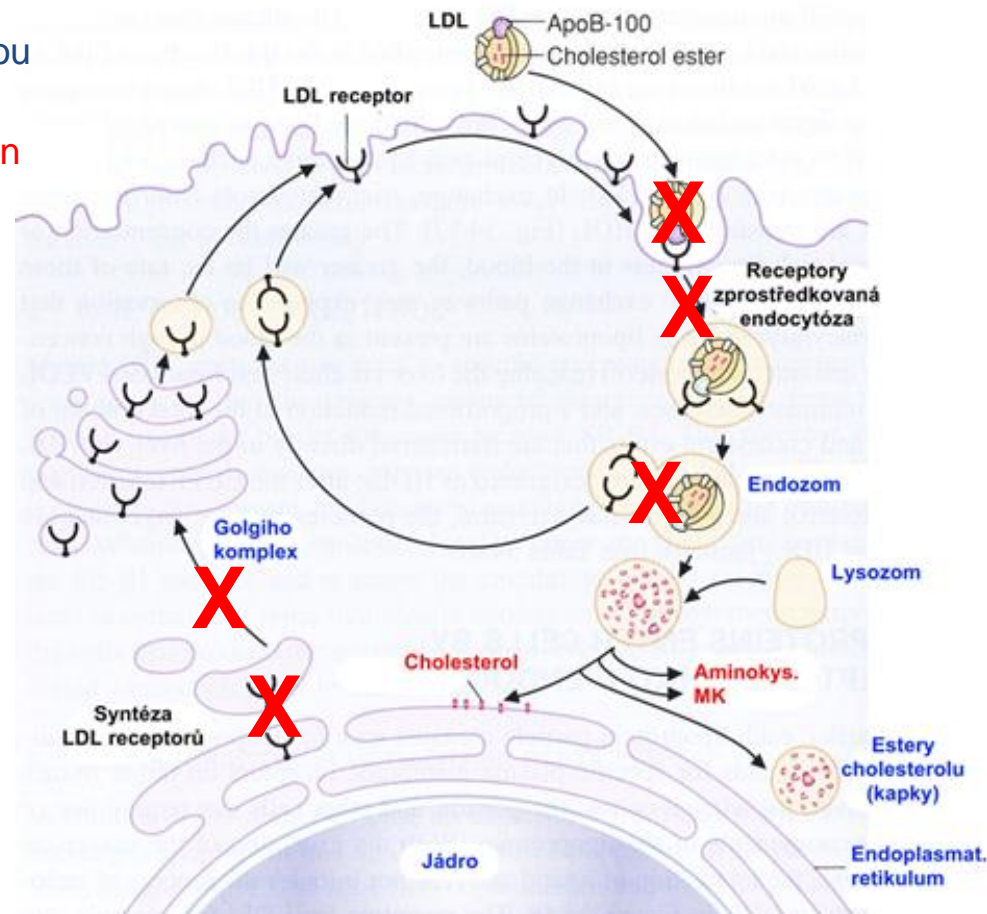
třída 3: receptor není schopen vazby s LDL částicí

2. transport do Golgiho aparátu, glykosylace (160 kDa)

třída 2: LDLR je částečně nebo zcela zadržen na ER

1. syntetizován na ribozomech na ER, částečná glykosylace (120 kDa)

třída 1: protein není syntetizován



4. receptorem zprostředkovaná endocytóza pomocí klathrinem pokrytých váčků

třída 4: LDL receptor není schopen internalizace LDL částice endocytózou

5. pohlcená LDL částice je uvolněna v endozomu a receptor se vrací na plazmatickou membránu

třída 5: receptor není schopen uvolnit LDL částici v endosomu a vrátit se na plazmatickou membránu

ZAVEDENÍ FUNKČNÍ ANALÝZY MISSENSE MUTACÍ

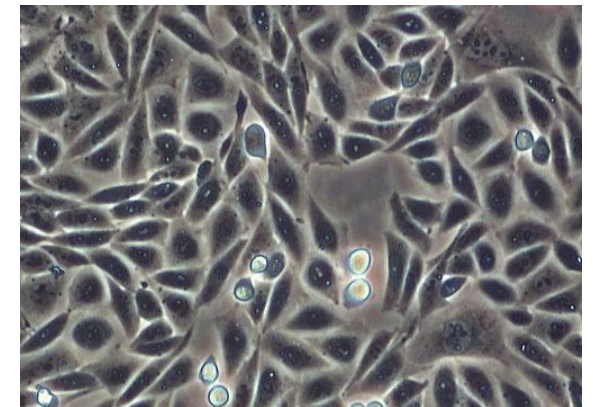
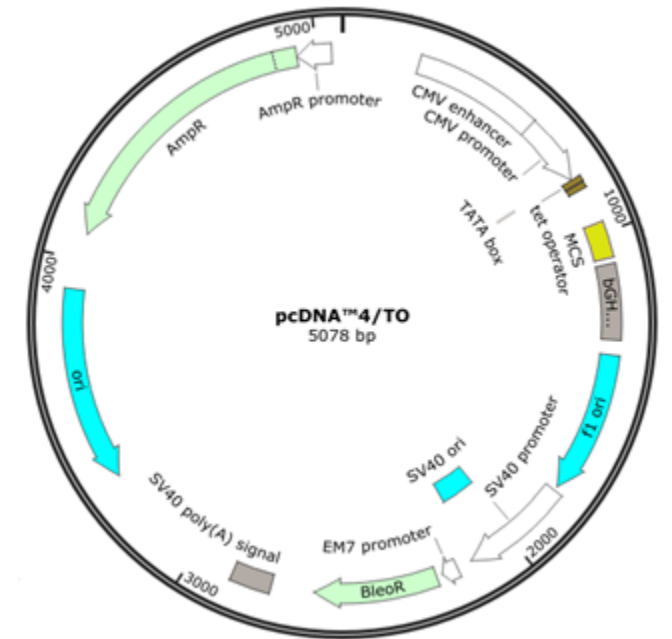
- Doplnění potvrzení kauzality dané mutace
- Objasnění vlivu mutace na funkci výsledného proteinu
- Klasifikace do příslušné třídy

ZAVEDENÍ FUNKČNÍ ANALÝZY MISSENSE MUTACÍ

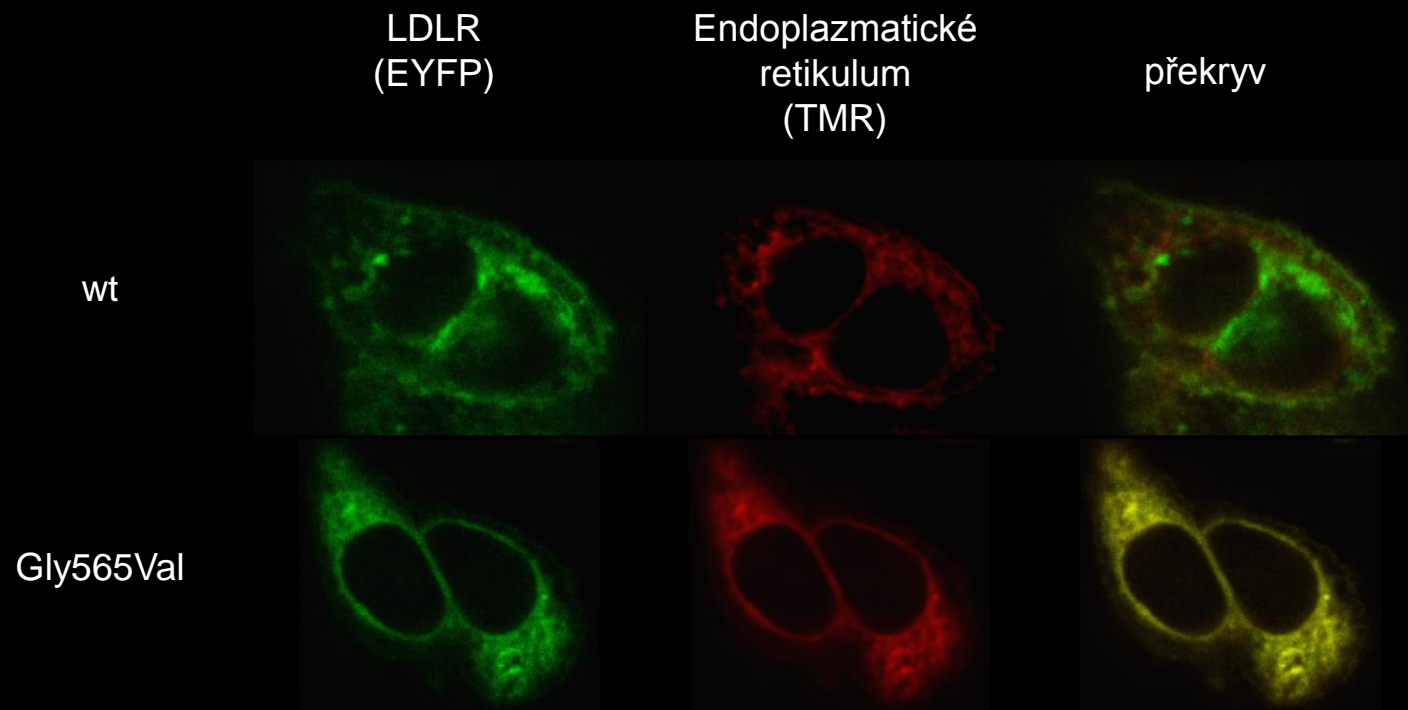
- Vytvoření mutací v genu pro LDL receptor místně řízenou mutagenézí v plazmidu pcDNA4-LDLR-EYFP
- K usnadnění vizualizace proteinu v živých buňkách byla použita značka EYFP (*enhanced yellow fluorescence protein*) na C-konci cDNA LDLR genu oddělená sekvencí 10 aminokyselin



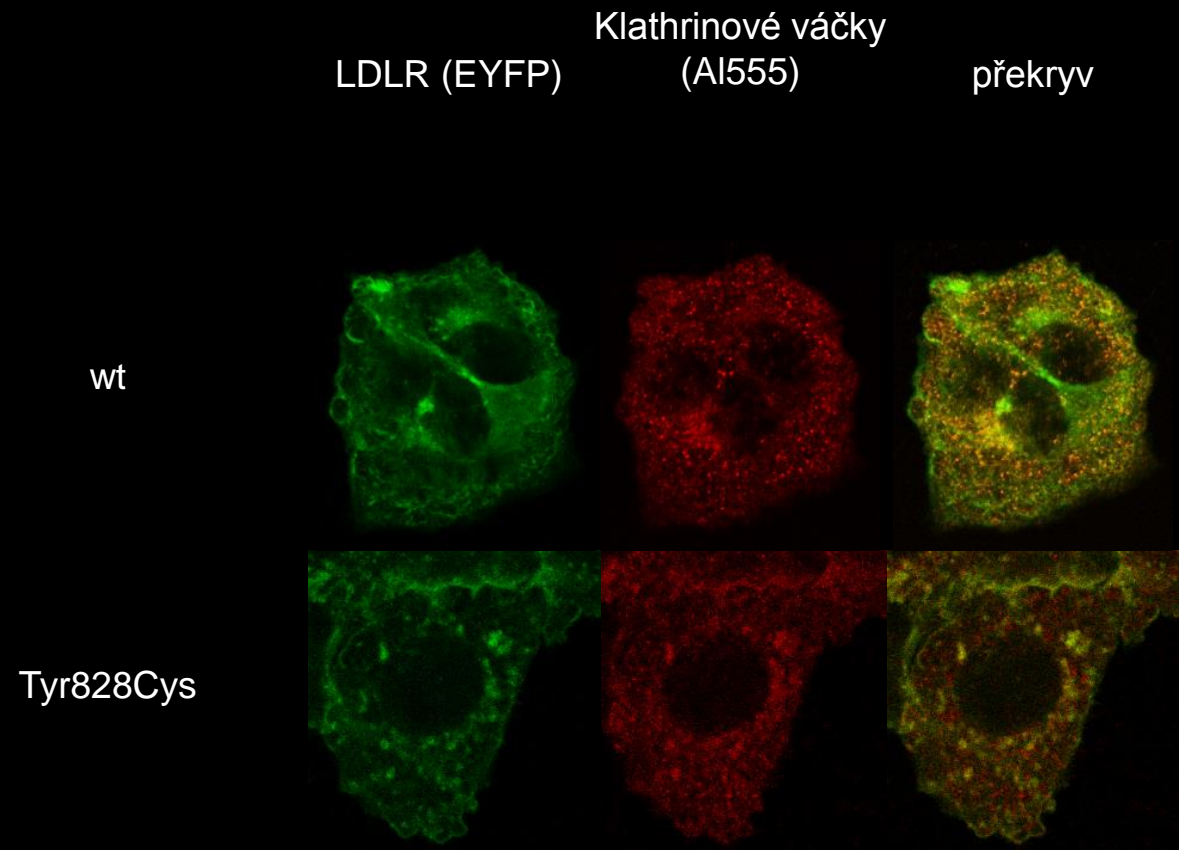
- LDLR plazmidy s mutací a bez mutace a s/bez EYFP značky transfekovány do CHO (Chinese hamster ovary) buněčných linií
- Vytvořeny stabilní buněčné linie
- Laserová skenovací konfokální mikroskopie (Zeiss LSM780) k určení buněčné lokalizace LDL receptoru
 - Konkanavalin A tetramethylrhodaminový konjugát na obarvení endoplazmatického retikula (ER)
 - Anti-EEA1 (*early endosome antigen*) + sekundární protilátka s fluor. značkou k obarvení endozomu
 - Anti-clathrin heavy chain protilátka + sekundární protilátka s fluor. značkou k obarvení klathrinových váčků
 - Inkubace s fluorescenčně značenými LDL částicemi



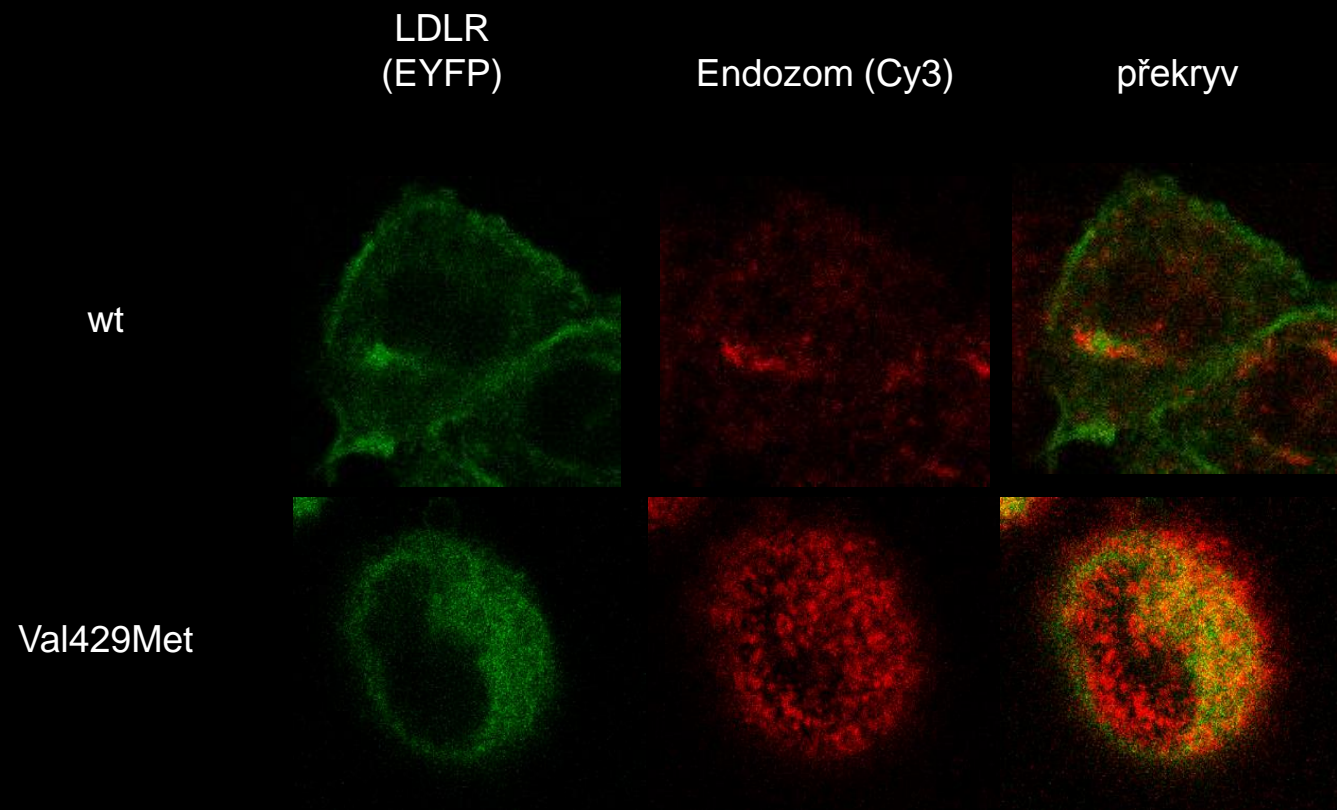
MUTACE 2. TŘÍDY



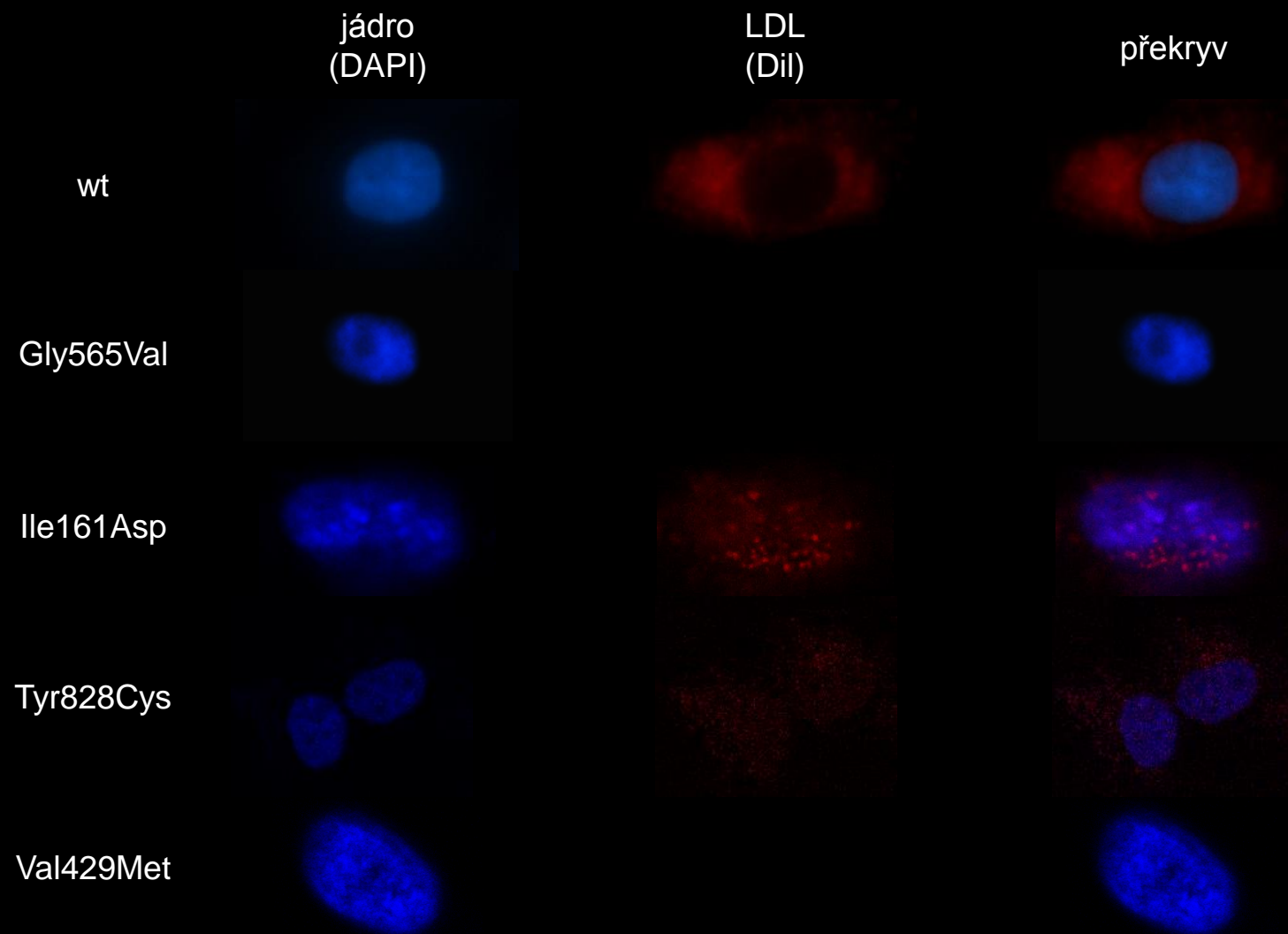
MUTACE 4. TŘÍDY



MUTACE 5. TŘÍDY



VAZBA LDL ČÁSTIC / 3. TŘÍDA MUTACÍ



JEDEN ZAJÍMAVÝ PŘÍKLAD

- Sekvenční varianta Gly20Arg (mutace v signální sekvenci) - dříve považována za kauzální pro FH
- Funkční analýza ukázala, že tento receptor je schopný vázat LDL
- Jako kontrolní vytvořena mutace Leu15Pro (zničení alfa-helixu signální sekvence)

