

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMONA GEDER

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI



FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMONA GEDER

**ANALIZA SPREMEMB V GENU *LIPA* PRI BOLNIKI^H S
SUMOM NA BOLEZEN KOPIČENJA HOLESTEROLNIH
ESTROV**

**ANALYSIS OF THE *LIPA* GENE IN PATIENTS WITH
SUSPECTED CHOLESTEROL ESTER STORAGE DISEASE**

Magistrski študijski program Laboratorijska biomedicina

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Pediatrični kliniki, UKC Ljubljana, Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko, pod mentorstvom izr. prof. dr. Katarine Trebušak Podkrajšek, univ. dipl. kem., spec. med. biokem., spec. lab. med. genet. in somentorstvom asis. dr. Tinke Hovnik, spec. lab. med. genet.

ZAHVALE

Najprej bi se zahvalila svoji mentorici izr. prof. dr. Katarini Trebušak Podkrajšek, univ. dipl. kem., spec. med. biokem., spec. lab. med. genet. in somentorici asis. dr. Tinki Hovnik, spec. lab. med. genet. za vso pomoč, strokovnost in podporo pri nastajanju magistrskega dela. Hvala tudi vsem ostalim zaposlenim v Laboratoriju za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike za pomoč pri opravljanju praktičnega dela magistrske naloge.

Zahvala gre tudi doc. Dr. Urhu Grošlju, dr. med. iz Kliničnega oddelka za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Pediatrične klinike v Ljubljani za strokovno podporo pri izvedbi magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi vsem profesorjem in asistentom na fakulteti, ki so pripomogli k mojemu napredku v izobraževanju.

Hvala Tamari za vso pomoč in podporo skozi vsa leta študija, tudi pri opravljanju eksperimentalnega dela. Zahvala gre tudi Karmen za vso podporo v času študija. Obema pa hvala predvsem za to, da so bila ob druženju leta študija bolj zanimiva in zabavna.

Največja zahvala gre moji družini, staršema in sestri, ki so me vsa leta šolanja podpirali, spodbujali in bili na razpolago kadarkoli sem jih potrebovala. Brez vas mi ne bi uspelo.

»Precej je treba vedeti, preden opaziš, kako malo veš.« - Karl Heinrich Waggenerl

Izjava: Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Katarine Trebušak Podkrajšek, univ. dipl. kem., spec. med. biokem., spec. lab. med. genet. in somentorstvom asis. dr. Tinke Hovnik, spec. lab. med. genet.

Simona Geder

KAZALO VSEBINE

1. UVOD.....	1
1.1 PRESNOVA HOLESTEROLA	2
1.2 LIZOSOMSKA KISLA LIPAZA	5
1.3 SPREMEMBE V GENU <i>LIPA</i>	7
1.4 KLINIČNI ZNAKI CESD	10
1.5 POSTAVITEV DIAGNOZE CESD	12
1.5.1 Merjenje aktivnosti LAL.....	12
1.5.2 Genetsko testiranje.....	13
1.5.3 Biopsija jeter	13
1.5.4 Magnetna resonanca.....	13
1.6 ZDRAVLJENJE CESD	14
2. NAMEN DELA, CILJI IN HIPOTEZE	17
3. METODE IN MATERIALI	18
3.1 Potek dela	18
3.2 Preiskovanci	18
3.3 Sekvenčna analiza gena <i>LIPA</i>	18
3.3.1 Izolacija DNA	18
3.3.2 Določitev koncentracije in čistoče DNA	20
3.3.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	21
3.3.4 Preverjanje dolžine produktov PCR.....	25
3.3.5 Sekvenčna reakcija.....	26
3.3.6 Precipitacija sekvenčne reakcije	27
3.3.7 Analiza fragmentov DNA na genetskem analizatorju ABI 3500	28
3.3.8 Interpretacija genetskih sprememb v genu <i>LIPA</i>	29
4. REZULTATI	30
4.1 Opis preiskovane skupine.....	30
4.2 Sekvenčna analiza gena <i>LIPA</i>	32
5. RAZPRAVA.....	37
5.1 Preiskovanci	37

5.2	Najpogostejše spremembe gena <i>LIPA</i> pri analizirani skupini bolnikov	37
5.3	Epidemiološki podatki CESD	39
5.4	Pomen genetske diagnostike CESD	42
6.	SKLEPI.....	45

KAZALO SLIK

Slika 1:	Biosinteza holesterola.....	3
Slika 2:	Shema presnove holesterola	4
Slika 3:	Shematski prikaz celične homeostaze holesterola pri zdravih posameznikih (A) in pri posameznikih s pomanjkanjem aktivnosti LAL encima (B).....	7
Slika 4:	Lokacija gena <i>LIPA</i> na kromosomu 10.....	7
Slika 5:	Prikaz vseh sprememb v genu <i>LIPA</i>	8
Slika 6:	MRI posnetek hepatosplenomegalije in jetrne steatoze pri odraslem bolniku s CESD.....	11
Slika 7:	Resnost bolezni glede na starost (od novorojenčka do odraslega človeka) ob nastopu simptomov.....	12
Slika 8:	Princip merjenja aktivnosti encima LAL; 4-MU substrat, 4-metilumbeliferil palmitat s kardiolipinom.....	13
Slika 9:	Delovanje sebelipaze alfa.....	15
Slika 10:	Princip izolacije DNA.....	19
Slika 11:	Shema pomnoževanja DNA s PCR	22
Slika 12:	Del eksona 8 z normalnim zaporedjem (a) in zaporedjem, kjer se nahaja sprememba NP_001121077: p.Gln298= (NM_000235.3: c.894G>A) (b).....	34
Slika 13:	Del eksona 2 z normalnim zaporedjem (a) in zaporedjem, kjer se nahaja sprememba NP_001121077: p.Thr16Pro (NM_000235.3:c.46A>C) (b).....	35

Slika 14: Del eksona 2 z normalnim zaporedjem (a) in zaporedjem, kjer se nahaja sprememba NP_001121077: p.Gly23Arg (NM_000235.3:c.67G>A) (b).....	35
Slika 15: Del introna 6 z normalnim zaporedjem (a) in zaporedjem, kjer se nahaja sprememba: NM_000235.3: c.539-5C>T (b).....	36
Slika 16: Kriteriji za presejanje bolnikov s sumom na CESD	43

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Nesmiselne in drugačno smiselne spremembe v genu LIPA	9
Preglednica II: Spremembe, ki vplivajo na izrezovanje intronov in privedejo do CESD. ...	9
Preglednica III: Delecije v genu LIPA, ki privedejo do CESD	10
Preglednica IV: Priprava FG2/proteazne mešanice.	20
Preglednica V: Oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje eksonov gena LIPA.	23
Preglednica VI: Primer reakcijske mešanice za PCR.	24
Preglednica VII: Optimizirani pogoji pomnoževanja PCR za eksone gena LIPA.	24
Preglednica VIII: Temperaturni profil sekvenčne reakcije.....	27
Preglednica IX: Podatki o izbranih bolnikih s sumom na CESD, vključenih v raziskavo. .	31
Preglednica X: Značilnosti preiskovancev.....	32
Preglednica XI: Spremembe v genu LIPA pri izbranih preiskovancih (het. sprememba je prisotna v heterozigotni obliki, hom.-sprememba je prisotna v homozigotni obliki); spremembe so poimenovane glede na referenčno zaporedje NP_000226.2 oz. NM_000235.3).	33
Preglednica XII: Opremljene nepatološke spremembe v genu LIPA	34
Preglednica XIII: Ocenjena frekvenca spremembe c.894G>A in prevalenca CESD v različnih populacijah.....	40

POVZETEK

Lizosomska kislina lipaza (angl. lysosomal acid lipase, LAL) je encim, ki hidrolizira holesterolne estre in trigliceride, ki pridejo v celico z endocitozo plazemskih lipoproteinskih delcev. Nastali prosti holesterol zapusti lizosom in se lahko ponovno esterificira v endoplazmatskem retikulumu za tvorbo citosolnih lipidnih delcev. Če v lizosomu ostane presežek prostega holesterola lahko ta zavira aktivnost LAL. Omenjeni encim kodira gen *LIPA*. Odsotnost ali delna aktivnost LAL lahko privede do dveh različnih fenotipov, Wolmanove bolezni ali bolezni kopičenja holesterolnih estrov (angl. cholesterol ester storage disease, CESD). Pri obeh se spremembe dedujejo avtosomno recesivno. Hujša oblika je Wolmanova bolezen, kjer pride do popolne odsotnosti aktivnosti encima LAL in posledično do smrti v prvem letu življenja. Pri CESD je običajno aktivnost encima zmanjšana, kar privede do aterogenega fenotipa z značilno zvišanim holesterolom LDL, znižanim holesterolom HDL in zvišanimi aminotransferazami.

Namen magistrske naloge je bil analiza sprememb v genu *LIPA* pri bolnikih s sumom na bolezen kopičenja holesterolnih estrov (CESD). V preiskovano skupino smo vključili 30 otrok s hiperholesterolemijo, ki so imeli zvišane vrednosti serumskih transaminaz in pri katerih so že bile izključene vzročne spremembe v genih *LDLR*, *APOB* in *PCSK9*, ki so najpogostejši vzrok za družinsko hiperholesterolemijo. Odvzeti so jim bili vzorci krvi, iz katerih se je najprej izolirala genomska DNA. Nato smo z verižno reakcijo s polimerazo pomnožili izbrane odseke DNA. Sledilo je sekvenciranje po Sangerju, s katerim smo analizirali celotno kodirajočo regijo gena *LIPA* in meje eksonov z introni. Namen je bil opredelitev bolezenskih sprememb, ki bi lahko bile vzrok za klinično sliko pri posameznem bolniku. Najpogostejša sprememba, opisana kot vzrok za CESD, je p.Gln298Gln (c.894G>A). Ta privede do drugačnega izrezovanja intronov in izpustitve eksona 8. Omenjena sprememba je bila v homozigotni obliki prisotna pri treh bolnikih v analizirani skupini. V analiziranih regijah gena *LIPA* smo našli poleg najpogostejše spremembe še dodatne spremembe p.Thr16Pro, p.Gly23Arg in c.539-5C>T. Po trenutno dostopni literaturi jih ne povezujejo z boleznijo kopičenja holesterolnih estrov ali z zapleti povezani z njo. Na osnovi dobljenih rezultatov sklepamo, da bi bilo za vse klinične primere hiperholesterolemije, kjer ni bilo dokazanih vzročnih sprememb za družinsko hiperholesterolemijo in so prisotne zvišane vrednosti transaminaz, priporočljivo rutinsko preverjati tudi prisotnost vzročnih sprememb v genu *LIPA*.

ABSTRACT

Lysosomal acid lipase (LAL) is an enzyme that hydrolyses cholesterol esters and triglycerides that enter the cells with endocytosis of plasma lipoprotein particles. The resulting free cholesterol leaves the lysosomes and can be re-esterified in the endoplasmic reticulum to form cytosolic lipid particles. If excess of free cholesterol remains in lysosomes, this may inhibit LAL activity. The enzyme is encoded by the *LIPA* gene. Absence or partial activity of LAL can lead to two different phenotypes, Wolman's disease or cholesterol ester storage disease (CESD), both inherited in autosomal recessive manner. A more severe form is Wolman's disease, where there is a complete absence of activity of the LAL enzyme consequently leading to death in the first year of life. In CESD, the enzyme activity is usually reduced. This leads to an atherogenic phenotype with significantly increased LDL cholesterol, reduced HDL cholesterol and elevated aminotransferases.

The purpose of the master's thesis was to analyse the variants in the *LIPA* gene in patients with suspected cholesterol ester storage disease. We included 30 children with hypercholesterolemia who had elevated serum transaminases and no detected causative variants in the *LDLR*, *APOB* and *PCSK9* genes, which are the most common cause of familial hypercholesterolemia. First, we isolated genomic DNA and then amplified the selected regions of patients DNA by polymerase chain reaction (PCR). Next step was Sanger sequencing allowing the analysis of the entire coding region of the *LIPA* genome and intron – exon boundaries in order to identify the variants causing the clinical picture in an individual patient. Worldwide, the most common CESD causative variant in *LIPA* gene is p.Gln298Gln (c.894G>A) leading to abnormal splicing and exon 8 skipping. This variant was present in homozygous state in three patients in the analysed group. We have also identified additional *LIPA* variants, namely p.Thr16Pro, p.Gly23Arg and c.539-5C>T. According to the currently available data not associated with accumulation of cholesterol esters or associated complications. Based on the obtained results we concluded that for all clinical cases of hypercholesterolaemia, where there was no evidence of causative variants for familial hypercholesterolaemia, and present elevated serum transaminases, it is recommended to routinely check for presence of variants in the *LIPA* gene.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACAT	acil-holesterol aciltransferaza
CE	holesterolni ester
CESD	bolezen kopičenja holesterolnih estrov
dbSNP	angl. Single Nucleotide Polymorphism database
ddNTP	2', 3'-dideoksinukleozid trifosfat
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
ExAC	angl. Exome Aggregation Consortium
FA	maščobne kisline
FC	prosti holesterol
FFA	proste maščobne kisline
HDL	lipoprotein z visoko gostoto (angl. High density lipoprotein)
HGMD	angl. Human Gene Mutation Database
HMG-CoA	hidroksimetilglutaril-CoA

LAL	lizosomska kislina lipaza
LCAT	lecitin holesterol aciltransferaza
LDL	lipoprotein z nizko gostoto (angl. Low density lipoprotein)
LDLR	receptor za LDL
MAF	frekvenca redkejšega alela (angl. Minor allele frequency)
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (angl. Messenger RNA)
OMIM	angl. Online Mendelian Inheritance in Man
pufer PBS	fosfatni pufer (angl. Phosphate-buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction)
TG	trigliceridi
VLDL	lipoprotein z zelo nizko gostoto (angl. Very low density lipoprotein)
WD	Wolmanova bolezen (angl. Wolman disease)

1. UVOD

Gen *LIPA* nosi zapis za encim lizosomsko kislo lipazo (angl. Lysosomal acid lipase, LAL). Encim lahko v literaturi najdemo tudi pod imenom holesterol-ester-hidrolaza, lipaza A, holesterolna esteraza ali sterolna esteraza. Homozigotne ali sestavljene heterozigotne vzročne spremembe v tem genu povzročajo pomanjkanje encima LAL, ki se klinično lahko izraža v dveh različnih fenotipih (1). Spremembe, ki povzročajo popolno pomanjkanje aktivnosti so vzrok Wolmanove bolezni (angl. Wolman disease, WD; OMIM #278000; angl. Online Mendelian Inheritance in Man), spremembe, ki povzročijo delno ohranjeno encimsko aktivnost, pa se izrazijo kot bolezen kopičenja holesterolnih estrov (angl. Cholesterol ester storage disease, CESD; OMIM #278000). Pri CESD bolnikih kljub vzročni spremembi nastane nekaj funkcionalne mRNA (običajno približno 3 % celotne LAL mRNA) in na ta način pride do delne sinteze funkcionalnega encima (2).

Znanih je več kot 60 vzročnih sprememb v genu *LIPA*, ki povzročijo različne funkcionalne spremembe, kot je na primer nestabilnost na nivoju mRNA, spremenjeno proteinsko strukturo ali strukturo katalitičnega mesta ter zmanjšanje ali popolno odsotnost encimske aktivnosti. Dedujejo se avtosomno recesivno (3). Vrsta spremembe vpliva na to, kdaj se bo bolezen izrazila in v kakšni obliki. To je odvisno predvsem od tega, kolikšno je pomanjkanje aktivnosti LAL. Pri posameznikih s popolno odsotnostjo aktivnosti encima se bolezen izrazi že takoj po rojstvu in se v večini primerov konča s smrtjo. Če je aktivnost encima samo zmanjšana, to privede do kopičenja škodljivih količin lipidov v celicah in tkivih po telesu (1). Omenjeni encim je namreč ključni encim vpleten v znotrajcelično hidrolizo holesterolnih estrov in trigliceridov, ki vstopijo v celico z internalizacijo preko receptorsko posredovane endocitoze lipoproteinskih delcev (4). Lipidi, ki na ta način niso primerno razgrajeni, se ne morejo izločiti iz telesa in se posledično začnejo kopičiti v jetrih. Progresivno kopičenje lipidov lahko privede do odpovedi organa (5). Posamezniki s CESD imajo običajno zamaščena in povečana jetra ter povečano vranico (6).

Pri kliničnih znakih gre navadno za kombinacijo dislipidemije, hepatomegalije, zvišanih transaminaz in mikrovezikularne hepatosteatoze, vidne na jetrnih bioptih. Pri takšnih bolnikih se lahko čez čas pojavijo poškodbe jeter z možnostjo napredovanja v fibrozo, cirozo ali v nekaterih hujših primerih celo do odpovedi jeter. Ker pa gre za redko bolezen, s kliničnimi in biokemičnimi znaki podobnimi kot pri nekaterih drugih boleznih, kot je na primer družinska hiperholesterolemija, ostane ta velikokrat neprepoznana ali napačno diagnosticirana (6).

Za bolezen kopičenja holesterolnih estrov so značilne zvišane vrednosti holesterola LDL (lipoprotein z nizko gostoto, angl. Low density lipoprotein) in znižane vrednosti holesterola HDL (lipoprotein z visoko gostoto, angl. High density lipoprotein), kar lahko pripelje do srčno žilnega obolenja že v zgodnjem otroštvu (6).

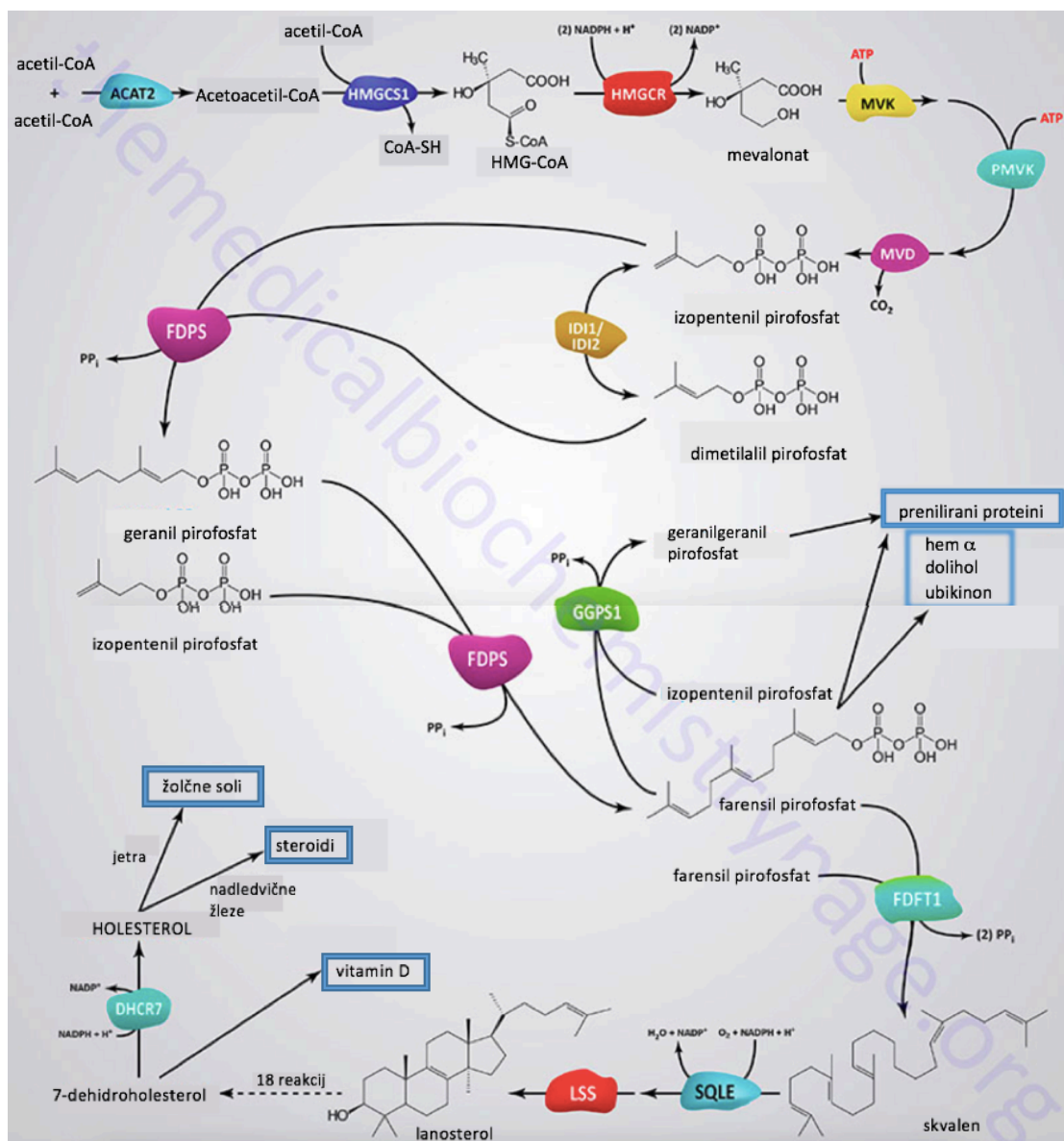
1.1 PRESNOVA HOLESTEROLA

Lipide pridobimo z absorpcijo iz hrane ali pa se sintetizirajo v jetrih. Holesterol je sestavni del celičnih membran, steroidov, žolčnih kislin in signalnih molekul. Po sestavi je sterol, je torej kombinacija steroida in alkohola. Nahaja se v celičnih membranah vseh tkiv in njegova prisotnost določa, ali je membrana bolj rigidna in stabilna. Holesterol je sestavni del žolča, katerega glavna funkcija je izločanje odvečnih snovi in sodelovanje pri presnovi maščob.

Je glavni predhodnik sinteze vitamina D in steroidnih hormonov (kortizol, aldosteron, progesteron, estrogeni). Vsi lipidi so hidrofobni in večinoma netopni v vodi, zato so za transport maščob po krvi potrebne hidrofilne sferične strukture sestavljene iz lipidov in beljakovin, imenovane lipoproteini (7, 8, 9).

Biosinteza holesterola

Malo manj kot polovico vsega holesterola v telesu dobimo z biosintezo. Od tega se 10 % sintetizira v jetrih in 15 % v črevesju glede na količino proizvedeno na dan. Biosinteza holesterola vključuje encime, ki jih najdemo v citoplazmi, mikrosomih (endoplazmatski retikulum) in peroksisomih. Začne se z acetyl-CoA, ki se iz reakcije oksidacije (maščobne kisline ali piruvat) v mitohondriju prenese do citoplazme. Sintetizira se lahko tudi iz citosolnega acetata, ki nastane pri citoplazemski oksidaciji etanola z alkoholno dehidrogenazo. Reakcije redukcije pri biosintezi holesterola uporabljajo kot kofaktor NADPH (10).



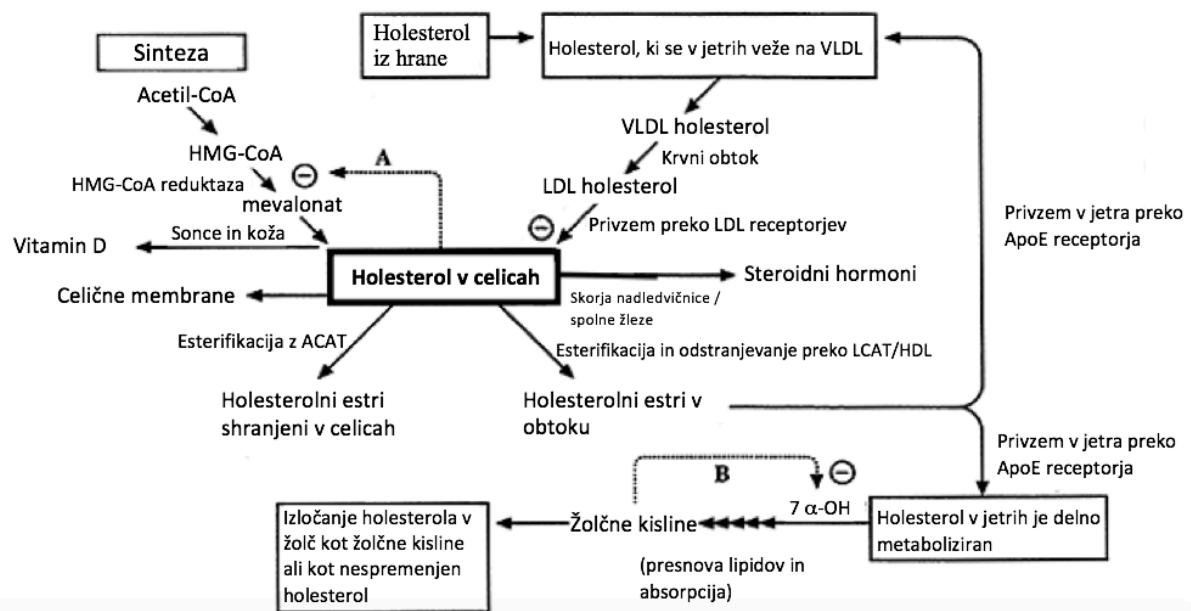
Slika 1: Biosinteza holesterola; ACAT2, acetil-koencim A acetiltransferaza 2; HMGCS1, hidrosimetilglutaril-CoA sintaza 1; HMGCR, HMG-CoA reduktaza; MVK, mevalonatna kinaza; PMVK, fosfomevalonatna kinaza; MVD, difosfomevalonat dekarboksilaza; IDI1/IDI2, izopentenil-difosfat delta izomeraza 1 in 2; FDPS, farnesil difosfat sintaza; GGPS1, geranilgeranil difosfat sintaza 1; FDFT1, farnesil-difosfat farnesiltransferaza 1 oziroma imenovana tudi skvalen sintaza; SQLE, skvalen epoksidaza oziroma skvalen monoooksigenaza; LSS, lanosterol sintaza; DHCR7, 7-dehidroholesterolna reduktaza (prirejeno po 10).

Proces biosinteze lahko povzamemo v petih glavnih reakcijah (Slika 1):

1. Acetil-CoA se pretvori do 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA),
2. HMG-CoA se pretvori do mevalonata,
3. mevalonat se pretvori do molekule imenovane izopentenil pirofosfat,
4. molekule izopentenil pirofosfata se pretvorijo do skvalena,
5. skvalen se pretvori v holesterol (10).

Holesterol, ki ga vnesemo s hrano, se absorbira iz teščega črevesja (jejunum) ob prisotnosti žolčnih soli. Po vstopu v celice mukoze se vgradi v hilomikrone, ki nato vstopijo v krvni obtok preko limfatičnega sistema. Približno 2/3 celotnega plazemskega holesterola je esterificiranega z dolgoveržnimi maščobnimi kislinami. Ravnovesje tega holesterola se ohranja na račun nenehne hidrolize in resinteze. Hidroliza poteka v jetrih, biosinteza pa večinoma v plazmi s prenosom ostankov maščobnih kislin od lecitina do prostega holesterola. To reakcijo katalizira plazemski encim lecitin-holesterol-aciltransferaza (LCAT). Funkcija LCAT je torej sinteza esterificiranega holesterola iz prostega holesterola v ekstrahepatičnih tkivih. Prosti holesterol se v tkivih prenese na lipoproteinski delec imenovan HDL. Sledi esterifikacija z LCAT, kar omogoča še večji privzem prostega holesterola na HDL. Esterificiran holesterol v HDL se prenese na LDL. Ta nato potuje do jeter, kjer pride do hidrolize. Nastali prosti holesterol se nato iz jeter izloča preko žolča, se pretvori v žolčne soli ali vgradi v plazemske lipoproteine (Slika 2) (11).

V večini tkiv je količina endogeno sintetiziranega holesterola določena z zmožnostjo delovanja hidroksimetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reduktaze. Omenjen encim katalizira korak v biosintezi od acetil-CoA do holesterola (11).



Slika 2: Shema presnove holesterola (prirejeno po 12).

Transport holesterola

Po telesu se holesterol prenaša s krvjo v obliki lipoproteinov. Ločimo lipoproteine z majhno gostoto (LDL) in lipoproteine z veliko gostoto (HDL). LDL lahko v prevelikih količinah povzroči kopičenje delcev holesterola na stenah žil, HDL pa holesterol iz sten žil odstranjuje. Sinteza in poraba holesterola morata biti natančno uravnani za preprečevanje kopičenja v telesu (8). Klinično pomembno je predvsem prekomerno kopičenje holesterola in s holesterolom bogatih lipoproteinov v koronarnih arterijah. Če je v telesu prevelika količina holesterola imenujemo to stanje hiperholesterolemija. Slednje velja za enega najbolj ogrožajočih dejavnikov za nastanek ateroskleroze, ki je med najbolj pogostimi vzroki za smrt v razvitem svetu (10).

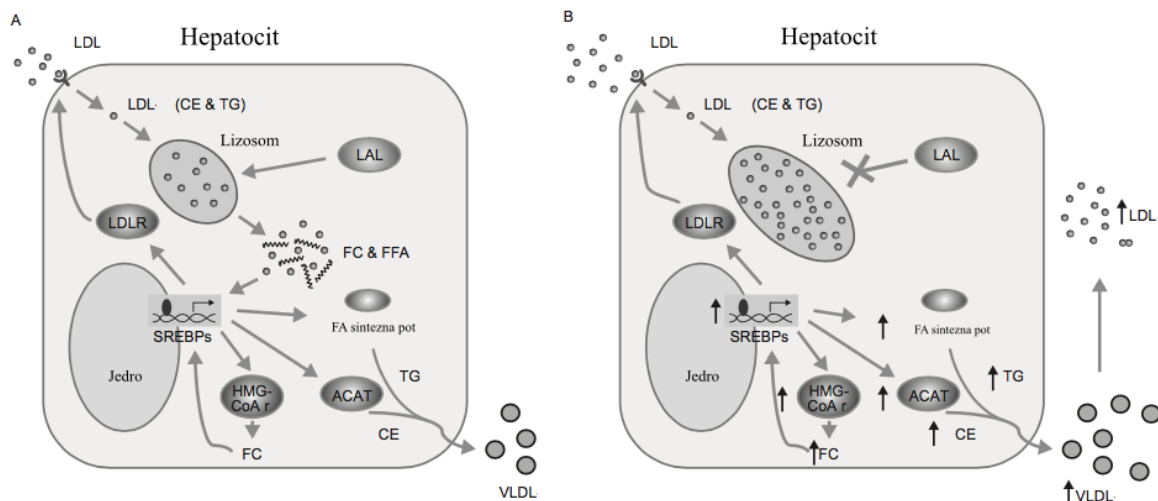
1.2 LIZOSOMSKA KISLA LIPAZA

LAL se sintetizira v skoraj vseh tkivih v človeškem telesu, od jetrnih celic, fibroblastov, makrofagov do limfocitov. Je ključni encim vpleten v znotrajcelično hidrolizo holesterolnih estrov in trigliceridov. Ti vstopijo v celico z internalizacijo preko receptorsko posredovane endocitoze lipoproteinskih delcev. Ob tem nastaneta prosti holesterol in maščobne kisline, ki imata ključno vlogo v homeostazi holesterola. Sproščeni prosti holesterol regulira njegovo lastno endogeno sintezo, privzem holesterola LDL in proces esterifikacije (4).

Encim spada, podobno kot ostale lipaze, med serinske esteraze s katalitično triado serin-aspartat-histidin. Če se katera izmed teh treh aminokislin zamenja, se aktivnost LAL spremeni (13).

Lipaze in holesterolne esteraze katalizirajo hidrolizo estrskih vezi v nevtralnih lipidih. Nukleofilni napad na ogljikov atom v estru je olajšan s tremi aminokislinami katalitične triade. Negativno nabita ostanka, histidin in serin, tvorita nekakšno omrežje za vezavo vodika oziroma za nastanek vodikove vezi. To vodi v aktivacijo $-OH$ skupine serina, ki postane bolj reaktivna. Ti ostanki zagotavljajo okolje, ki stabilizira prehodno stanje katalitske reakcije na način, da dopolnjuje spremembe v porazdelitvi naboja preko elektrostatske proste energije. Katalitična triada je prekrita s površinsko zanko iz α -vijačnic. Ta tako nastali »pokrov« ustvari hidrofobni žep in povzroči, da katalitični ostanki niso dostopni topilu, ki ga obdaja. Ta »pokrov« se mora zavrteti, da lahko pride do hidrolize substrata. Z vrtenjem namreč razkrije aktivno mesto, s čimer se ustvari večja hidrofobna površina. Pri tem je serin bistven del za lipolitično in esterolitično lastnost LAL (13).

Omenjeni lipidi in njihovi derivati sodelujejo s transkripcijskimi faktorji SREBP (angl. Sterol regulatory element-binding protein), ki neposredno uravnavajo ekspresijo genov, vpletenih v sintezo in privzem holesterola ter lipogenezo (14). Obstajajo tri vrste SREBP. SREBP-2 aktivira gene vpletene v sintezo holesterola, ostala dva (SREBP-1a in SREBP-1c) pa imata vpliv na gene vpletene v sintezo maščobnih kislin (15). Če je znotraj celice veliko prostega holesterola vodi to do regulacije LDL receptorjev preko SREBP-2 na način, da se zmanjša prehod holesterola v celico. Pride tudi do povratnega zaviranja HMG-CoA reduktaze (zmanjšana sinteza holesterola) in povečane esterifikacije holesterola (Slika 3). Istočasno pa intracelularne maščobne kisline preko SREBP-1c vodijo do zaviranja sinteze fosfolipidov in trigliceridov. V primerih, ko LAL ni aktivna ali pa je aktivnost zmanjšana, pride do kopičenja lipidov in holesterolnih estrov v lizosomih. Pomanjkanje znotrajceličnega prostega holesterola povzroči povečano proizvodnjo endogenega holesterola preko HMG-CoA reduktaze in endocitozo preko LDL receptorjev. Povečana je tudi sinteza apolipoproteina B in holesterola VLDL. Povečana ekspresija HMG-CoA reduktaze vodi do zvišanja vrednosti prostega holesterola. To lahko povzroči povratno zaviranje aktivnosti LDL receptorjev in do zmanjšanjega odstranjevanja holesterola LDL iz krvnega obtoka. Ugotovljeno je bilo, da je privzem holesterola LDL v celici povečan v tistih fibroblastih, kjer ni bilo aktivnosti LAL. V hepatocitih, kjer ni aktivnosti omenjenega encima, povečanje sinteze holesterola vodi v povečano sintezo in izločanje holesterola VLDL. Njegova naloga je odstranjevanje holesterola iz jeter. To nato vodi v povečano sintezo holesterola LDL, kar pomembno prispeva k razvoju hiperholesterolemije pri bolnikih s pomanjkanjem aktivnosti LAL (16). Vloga encima LAL na uravnavanje privzema holesterola LDL pri supresiji HMG-CoA reduktaze in aktivacija endogenega nastanka holesterolnih estrov je bila prvič omenjena že leta 1976 v strokovnem članku v reviji *Journal of Biological Chemistry* (3).

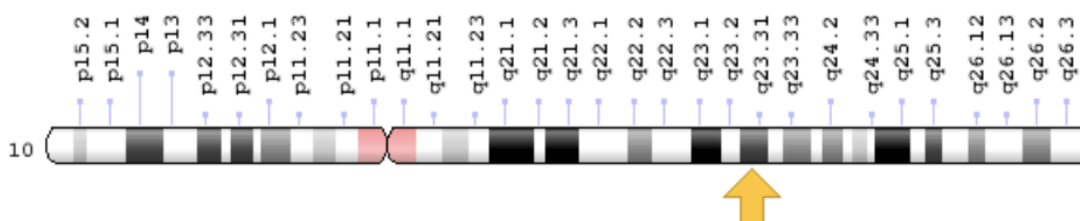


Slika 3: Shematski prikaz celične homeostaze holesterola pri zdravih posameznikih (A) in pri posameznikih s pomanjkanjem aktivnosti encima LAL (B). ACAT, acil-holesterol aciltransferaza; CE, holesterolni estri; FA, maščobne kisline; FC, prosti holesterol; FFA, proste maščobne kisline; HMG-CoA r, hidrosimetilglutaril-koencim A reduktaza; LAL, lizosomska kislina lipaza, LDL, lipoproteini z nizko gostoto; VLDL, lipoproteini z zelo nizko gostoto, LDLR, receptor za LDL; TG, trigliceridi; SREBP, transkripcijski faktor (prirejeno po 60).

Encim LAL so poskušali izolirati iz različnih človeških tkiv, od placent do kultur fibroblastov. Študije strukture, funkcije in regulacije encima LAL so otežene, ker je težko izolirati zadostno količino encima. Vzrok za to je predvsem relativno slaba stabilnost in majhna količina encima (17). Za določitev strukturnih in funkcionalnih značilnosti encima je torej potrebno molekularno kloniranje iz kultur fibroblastov in izolacija encima (18).

1.3 SPREMEMBE V GENU *LIPA*

Lizosomska kislina lipaza je 46 kDa velik glikoprotein, ki ga kodira gen *LIPA*. Nahaja se na kromosomu 10, na dolgi ročici (q) med mestoma q23.2 in q23.3 (Slika 4).



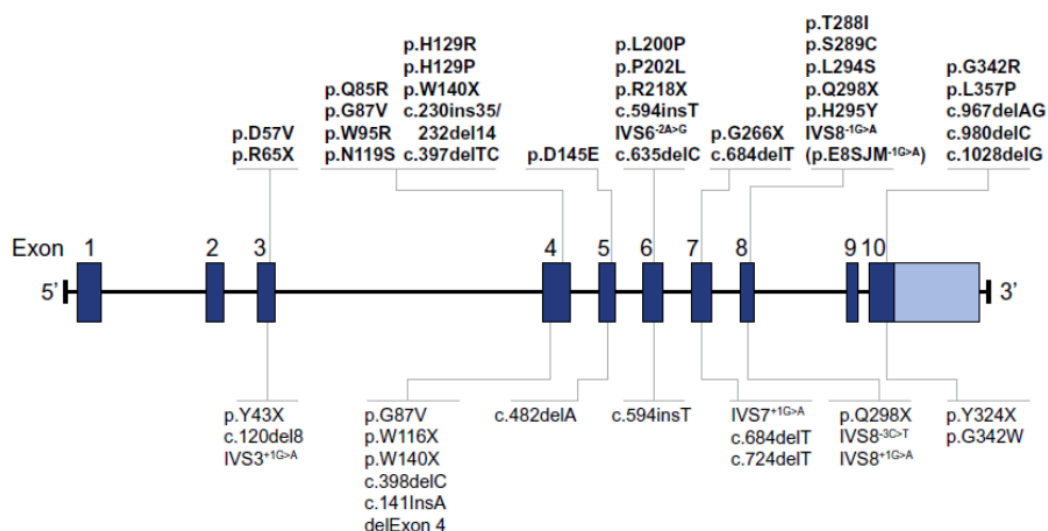
Slika 4: Lokacija gena *LIPA* na kromosomu 10 (5).

Pri človeku je encim LAL sestavljen iz 372 aminokislin. Vsebuje 27 aminokislin dolgo N-terminalno signalno zaporedje in 6 N-glikozilacijskih mest (20). Različne oblike LAL z

molekulskimi masami od 4 kDa do 54 kDa ustrezajo različnim nivojem N-glikozilacije. Na N- koncu so karbohidratni ostanki, ki pomembno vplivajo na optimalno katalitsko aktivnost encima. Po procesu posttranslacijske glikozilacije v endoplazmatskem retikulumu in po vezavi ostankov manoze-6-fosfata v Golgijevem aparatu je LAL usmerjena do pre-lizosomskih predelkov (20).

Spremembe v genu *LIPA* lahko privedejo do popolnega pomanjkanja LAL pri bolnikih z Wolmanovo boleznijo ali v delno odsotnost aktivnosti omenjenega encima, ki se kaže kot bolezen kopičenja holesterolnih estrov (19). Najpogostejša vzročna sprememba pri CESD bolnikih se nahaja v eksonu 8 gena *LIPA* in vodi do zmanjšane aktivnosti LAL. Omenjena sprememba se pojavlja pri približno 70 % vseh bolnikov s CESD. Gre za spremembo, ki ne spremeni aminokislina, ampak vpliva na izrezovanje introna. Zamenjava gvanina z adeninom v zadnjem nukleotidu eksona 8 privede do napačnega izrezovanja in izpustitve eksona. Posledično pride do izgube encimske aktivnosti. Sprememba je opisana kot NM_000235.3 (*LIPA*): c.894G>A (p.Gln298=). Celica ima mehanizme, da obide take napake, zato je majhno število genetskih prepisov kljub spremembi pravilno izrezanih in nekaj aktivnosti LAL preostane (4, 21, 22). Sprememba privede do delecije 24 aminokislina. Bolniki lahko imajo to spremembo prisotno v obeh kopijah gena *LIPA*. Takrat je aktivnost LAL le 5 % normalne aktivnosti (5).

V genu *LIPA* je lahko prisotnih veliko različnih sprememb, ki so povezane tako z Wolmanovo boleznijo kot tudi s CESD (Slika 5). Najpogosteje se nahajajo v domeni PLN02872, lokacija od aminokislina 38 do 396. Nekaj od teh sprememb je naštetih v preglednicah I, II in III.



Slika 5: Prikaz vseh sprememb v genu *LIPA* (23).

Preglednica I: Nesmiselne in drugačno smiselne spremembe v genu LIPA (povzeto po HGMD, Human Genome Mutation Database; 8.1.2018).

Sprememba v kodonu	Sprememba glede na aminokislinsko zaporedje (NP_000226.2)	Sprememba glede na kodirajoče zaporedje (NM_000235.3)
CGA-TGA	p.Arg65Term	c.193C>T
CCA-CGA	p.Gln85Arg	c.254A>G
GGC-GTC	p.Gly87Val	c.260G>T
TGG-AGG	p.Trp95Arg	c.283T>A
AAC-AGC	p.Asn119Ser	c.377C>T
CAT-CGT	p.His129Arg	c.386A>G
CAT-CCT	p.His129Pro	c.386A>C
TGG-TAG	p.Trp140Term	c.419G>A
GAT-GAA	p.Asp145Glu	c.435T>A
CTG-CCG	p.Leu200Pro	c.599T>C
GTG-CTG	p.Val203Leu	c.607G>C
CGA-TGA	p.Arg218Term	c.652C>T
TTT-TCT	p.Phe228Ser	c.683T>C
CTG-CCG	p.Leu246Pro	c.791T>C
GGA-TGA	p.Gly266Term	c.796G>T
AAT-CAT	p.Asn271His	c.811A>C
ACT-ATT	p.Thr288Ile	c.863C>T
TCT-TGT	p.Ser289Cys	c.866C>G
TTA-TCA	p.Leu294Ser	c.881T>C
CAC-TAC	p.His295Tyr	c.883C>T
GGG-AGG	p.Gly342Arg	c.1024G>A
CTG-CCG	p.Leu357Pro	c.1070T>C

Preglednica II: Spremembe, ki vplivajo na izrezovanje intronov in privedejo do CESD (povzeto po HGMD Database; 8.1.2018).

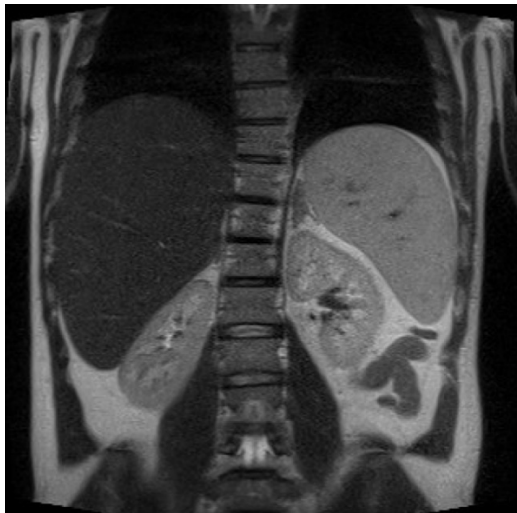
Tradicionalno ime	Sprememba glede na kodirajoče zaporedje (NM_000235.3)
IVS6 as A-G -2	c.676-2A>G
IVS8 ds G-A -1	c.894G>A

Preglednica III: Delecije v genu LIPA, ki privedejo do CESD (poimenovanje glede na referenčno zaporedje NM_000235.3) (povzeto po HGMD Database; 8.1.2018).

c.57_60delTGAG
c.397_398delTC
c.635delC
c.967_968delAG
c.980delC
c.1028delG
intr. 1 to ex. 4

1.4 KLINIČNI ZNAKI CESD

Zmanjšanje ali odsotnost aktivnosti LAL privede do kopičenja trigliceridov, holesterolnih estrov in drugih lipidov v lizosomih. To pa lahko privede do kopičenja maščob v različnih tkivih. Telo ni sposobno proizvajati holesterola iz razgradnih produktov teh lipidov. To vodi v alternativne poti proizvodnje holesterola in do patološko zvišanih vrednosti holesterola v krvi. Presežek lipidov se prenese do jeter za odstranitev iz telesa. Veliko od teh lipidov ni primerno razgrajenih in se ne morejo izločiti iz telesa, zato se nato začnejo kopičiti v jetrih. Progresivno kopičenje lipidov lahko privede do odpovedi organa, zato je pogosto prisotna hepatomegalija in bolniki lahko imajo simptome in znake, ki spominjajo na nealkoholni steatohepatitis ali kriptogeno cirozo (5). Do kopičenja holesterolov lahko pride tudi v vranici. Posamezniki s CESD imajo zamaščena in povečana jetra ter povečano vranico (Slika 6). Biokemične preiskave seruma običajno pokažejo zvišane vrednosti celotnega serumskega holesterola, holesterola LDL, trigliceridov in transaminaz (AST, ALT) ter znižane vrednosti holesterola HDL (6).

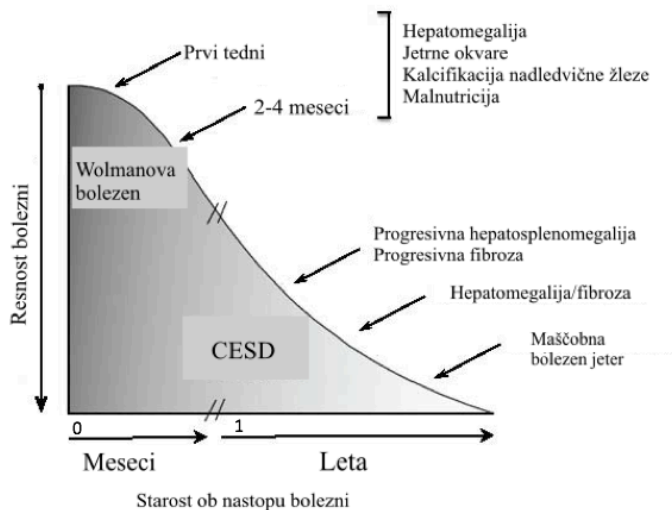


Slika 6: MRI posnetek hepatosplenomegalije in jetrne steatoze pri odraslem bolniku s CESD (24).

Z napredovanjem bolezni se te vrednosti še povečujejo. Prisotna je lahko tudi hiperbilirubinemija in zvišane vrednosti γ -glutamyl transferaze (24).

Bolniki s CESD običajno nimajo skrajšane življenjske dobe, čeprav je ateroskleroza, ki je povezana z dislipidemijo in kronično jetrno boleznijo lahko vzrok za prezgodnjo smrt omenjenih bolnikov (20). Ateroskleroza spada med najpogostejše vzroke smrti v razvitem svetu. Nastane zaradi nalaganja aterosklerotskih plakov na stene arterij. Povečano kopičenje lipidov (v obliki lipidnih kapljic) v makrofagih privede do diferenciacije v penaste celice. Največ teh celic najdemo znotraj aterosklerotičnih plakov oziroma oblog. Penaste celice izločajo provnetne citokine in rastne dejavnike. Ti povzročijo povečanje števila makrofagov, kar dodatno prispeva k razvoju aterosklerotičnih lezij (17). Pomembnost vloge LAL pri razvoju ateroskleroze je podprta s študijami bolnikov s prezgodnjo boleznijo koronark. Pri teh bolnikih so v perifernih levkocitih našli zelo zmanjšano aktivnost encima LAL. Te ugotovitve kažejo na to, da lahko zmanjšana aktivnost encima LAL nakazuje na večjo možnost pojava ateroskleroze. Znižana aktivnost encima lahko torej predstavlja neodvisni faktor tveganja v razvoju prezgodnje ateroskleroze (25).

Klinični znaki bolezni se lahko izrazijo v različnih fenotipih. Ta variabilnost je posledica preostale aktivnosti LAL, ki je običajno višja pri klasični obliki CESD v primerjavi z obliko, ki se pojavi že v zgodnjem otroštvu (Slika 7). Različni nivoji preostale aktivnosti izvirajo iz kombinacije različnih alelov in bi lahko bili odgovorni za variabilnost fenotipov pri bolnikih s CESD (20).

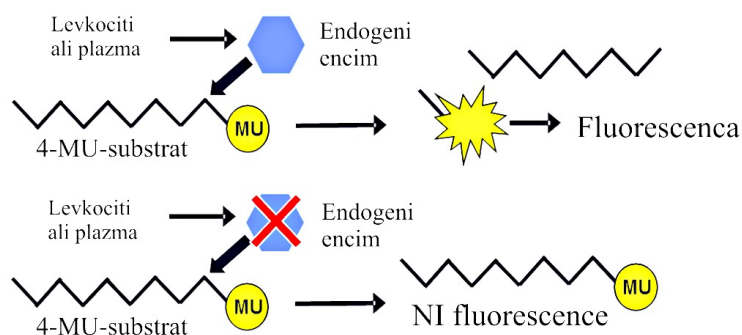


Slika 7: Resnost bolezni glede na starost (od novorojenčka do odraslega človeka) ob nastopu simptomov (prirejeno po 26).

1.5 POSTAVITEV DIAGNOZE CESD

1.5.1 Merjenje aktivnosti LAL

Aktivnost encima lahko merimo v kulturi fibroblastov, levkocitih ali v tkivu jeter. Razvita je bila metoda s katero se lahko meri aktivnost encima v kapljicah posušene krvi. Merjenje poteka z uporabo fluorimetričnega substrata (4-metillumbeliferil palmitat) in kardiolipina kot aktivatorja LAL (Slika 8) (27). Potrebna je tudi uporaba zaviralca encima LAL zaradi interferiranja drugih lipaz. Eden izmed zelo specifičnih zaviralcev je lalistat 2. Poznamo tudi lalistat 1, ki ima podoben zaviralni učinek, vendar lalistat 2 daje večje vrednosti aktivnosti LAL pri isti koncentraciji zaviralca, kar je njegova prednost. Omenjena spojina je dober zaviralec encima LAL, saj so v študiji ugotovili, da je bila pri koncentraciji zaviralca $1 \mu\text{M}$ aktivnost encima le 1 %. Aktivnost encima se določi tako, da se primerja celotna aktivnost lipaze z aktivnostjo ob prisotnosti zaviralca. Metoda odlično razlikuje med posamezniki, ki imajo prisotno bolezen kopičenja holesterolnih estrov in med tistimi, ki je nimajo. Za merjenje aktivnosti je potreben majhen volumen vzorca ($50 \mu\text{L}$ krvi), transport pa lahko poteka pri temperaturi okolja. Dokazano je bilo, da se aktivnost LAL zmanjša za 15 % v primerih, ko je vzorec 7 dni hranjen pri sobni temperaturi. Dolgoročna stabilnost pa je zagotovljena pri $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Po 100 dneh je aktivnost še vedno približno 87 %. Ta metoda ima tudi eno pomanjkljivost. Če je aktivnost LAL manj kot 3 % normalne aktivnosti, potem je rezultat pod mejo detekcije in ga ne moremo z zanesljivostjo določiti (27).



Slika 8: Princip merjenja aktivnosti encima LAL; 4-MU substrat, 4-metilumbeliferil palmitat s kardiolipinom (prirejeno po 23).

1.5.2 Genetsko testiranje

Ugotavljanje genetskega statusa je možno s sekvenciranjem kodirajočih regij gena *LIPA*. Na ta način lahko dokončno potrdimo ali ovržemo prisotnost točkovne spremembe ali manjše delecije oziroma duplikacije v analiziranem področju gena *LIPA*. Za presejanje v določenih populacijah je primeren tudi stopenjski pristop, pri katerem najprej izključimo najpogostejšo spremembo. p.Gln298= je sicer najpogostejša sprememba, prisotna kar pri 50-70 % bolnikov s CESD, ampak to ne velja za populacije Američanov afriškega porekla in Azijcev (28).

Na ta način se po potrditvi diagnoze lahko takoj odločimo za encimsko zdravljenje. Je osnova za genetsko svetovanje v družini in omogoča opredelitev nosilstva bolezenske spremembe ter eventuelno prenatalno testiranje.

1.5.3 Biopsija jeter

Metoda velja za najbolj zanesljivo v primerih, ko želimo ovrednotiti stanje jeter. Gre za invazivno metodo, zato smernice priporočajo, da se biopsija jeter uporablja samo v primerih, ko diagnoze ni mogoče ugotoviti s pomočjo katerega drugega neinvazivnega testa. Prisotnost mikrovezikularne steatoze ni zadostna za potrditev diagnoze, ampak so potrebni še drugi histološki znaki, kot je prisotnost hipertrofične Kupfferjeve celice in penastih makrofagov s spremenjeno barvo citoplazme (29).

1.5.4 Magnetna resonanca

Tehnike magnetne resonance bi lahko predstavljale alternativo biopsiji. Gre za neinvazivno, varno in ponovljivo metodo. V študiji so ugotovili, da zmanjšana aktivnost LAL privede do različnih ¹H in ¹³C MR signalov v jetrih, ki izhajajo iz različnih delcev holesterola. ¹H signali se lahko uporabljajo za identifikacijo in kvantifikacijo specifičnih vrst lipidov (30).

1.6 ZDRAVLJENJE CESD

Obstoječi pristopi zdravljenja so usmerjeni v upočasnitev napredovanja in preprečevanje pojava različnih zapletov bolezni.

- Terapije za zniževanje nivoja lipidov

Statini (zaviralci HMG-CoA reduktaze) učinkovito znižujejo nivo holesterola LDL. Za zdravljenje se lahko uporablja tudi kombinacija z drugimi zdravili za zniževanje lipidov v krvi. V opazovalnih študijah so ugotovili, da pri velikemu številu bolnikov s CESD kljub terapiji dislipidemija ostaja. Pri nekaterih bolnikih s CESD so ugotovili, da je terapija s statini povezana z značilnim zmanjšanjem sinteze endogenega holesterola v fibroblastih in je vzrok za znižanje holesterola LDL v znižani jetrni proizvodnji lipoproteinov, ki vsebujejo ApoB (6, 31). Pri nekaterih bolnikih zdravljenih s statini so opazili zmanjšanje velikosti jeter, ampak je pri vseh bolnikih dolgoročno fibroza jeter vseeno napredovala. Za zdravljenje se lahko uporablja tudi Ezetimib (zaviralec absorpcije holesterola), ki naj bi normaliziral vrednosti transaminaz in znižal vrednosti celotnega in holesterola LDL (32).

- Vitamin E

In vitro raziskave so pokazale, da tokoferol oziroma vitamin E spodbuja lizosomsko eksocitozo in na ta način zmanjša kopičenje lipidov v fibroblastih. Problem predstavlja prenos teh rezultatov v *in vivo* raziskave, predvsem neugodna farmakokinetika tokoferola. Za doseganje terapevtskih učinkov bi morale biti dosežene visoke koncentracije tokoferola, kar je težko, ker se derivati vitamina E hitro oksidirajo s citokromom P450 encima CYP4F2 (33).

- Hematopoetske matične celice in presaditev jeter

Presaditev hematopoetskih matičnih celic pri bolnikih s CESD je imela omejeno uspešnost, o dolgoročnih rezultatih ni zanesljivih podatkov (34). Dokumentirani so primeri uspešnih presaditev od 4-11 let po opravljeni transplantaciji matičnih celic ali kostnega mozga. V teh primerih je prišlo do normalizacije aktivnosti encima LAL, izboljšanja lipidnih parametrov, regresije hepatosplenomegalije in histoloških izboljšav v jetrih. Opisani so tudi primeri smrti po transplantaciji zaradi različnih vzrokov. Možnost zavrnitve presadka, tveganje v povezavi s

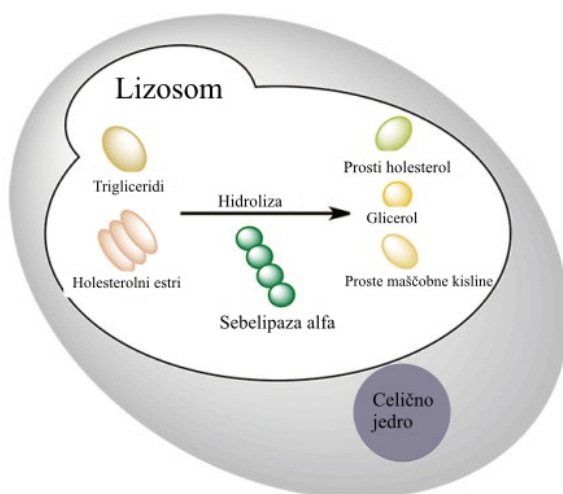
samim postopkom in resnost post-transplantacijskih zapletov pomenijo, da potrebujemo še druge, alternativne oblike zdravljenja (24).

Tudi transplantacija jeter je povezana s tveganji in zapleti. Presaditve pri starejših bolnikih naj bi se opravljale samo v primerih, ko gre že za zadnji stadij ciroze (24).

- Terapija z nadomestnim encimom

Cilj nadomestne encimske terapije je vzpostavitev ravnovesja encimov, ki je čimbolj podobno fiziološkemu. Na ta način se pri CESD prepreči kopičenje holesterolnih estrov in trigliceridov, zaradi česar se posledično lahko vzpostavi normalno delovanje organa (35).

Encim sebelipaza alfa je rekombinantni človeški encim LAL, ki prehaja v lizosom preko receptorjev na retikuloendotelnih celicah in drugih celicah, ki izražajo manoza-6-fosfatni receptor (Slika 9) (24). Miši z aterosklerozo in pomanjkanjem LDL receptorjev so injicirali rekombinantni encim LAL in preprečili razvoj ateroma ter zmanjšali število lezij v poznem stadiju. Ob vnosu rekombinantnega encima mišim s pomanjkanjem aktivnosti encima LAL je prišlo do zmanjšanja vrednosti holesterola in trigliceridov v različnih tkivih (36).



Slika 9: Delovanje sebelipaze alfa (prirejeno po 37).

Klinične študije pri dojenčkih, ki so izkazovali hitro napredujočo obliko CESD, ter otrocih in odraslih, pri katerih se je bolezen pojavila šele kasneje v življenju kažejo na znatno povečanje možnosti preživetja pri dojenčkih s CESD in izboljšanje biokemičnih parametrov pri starejših bolnikih (24). Sebelipaza alfa ima enako aminokislinsko zaporedje kot človeški protein. Sintetizira se v genetsko spremenjenih kokoših s sekrecijo proteina v jajčni beljak (24). Encim je klasificiran kot zdravilo sirota zaradi redkosti bolezni CESD in je primeren za bolnike vseh

starosti. Aplicira se v obliki intravenske infuzije. Priporočen odmerek za dojenčke mlajše od šest mesecev je 1 mg/kg vsak teden, medtem ko je pri starejših prisoten isti odmerek za čas trajanja dveh tednov. Za odmerjanje sebelipaze alfa pri nosečnicah ni priporočil in niso znani vplivi tega zdravila na razvoj zarodka (24).

Pri bolnikih s CESD lahko zmanjšana aktivnost encima LAL zmanjša izražanje ATP-vezavnega transporterja A1, kot odgovor na kopičenje holesterola LDL, kar vodi do zmanjšane izločanja holesterola. Ta učinek lahko s pomočjo rekombinantnega človeškega encima LAL obrnemo oziroma vrnemo nazaj v normalno stanje (38).

2. NAMEN DELA, CILJI IN HIPOTEZE

Namen magistrske naloge je molekularno genetska analiza sprememb v genu *LIPA* pri bolnikih s sumom na CESD. V preiskovano skupino bomo vključili 30 otrok s hiperholesterolemijo, ki so imeli zvišane vrednosti serumskih transaminaz in pri katerih so že bile izključene vzročne spremembe v genih *LDLR* (OMIM #606945; angl. Online Mendelian Inheritance in Man), *APOB* (OMIM #107730) in *PCSK9* (OMIM #607786), ki so najpogostejši vzrok za družinsko hiperholesterolemijo. S sekvenciranjem po Sangerju bomo analizirali celotno kodirajočo regijo gena *LIPA* in meje eksonov z introni.

V sklopu magistrske naloge smo si zastavili sledeče specifične cilje:

- Izbor bolnikov iz skupine otrok s hiperholesterolemijo in brez prisotne vzročne spremembe v genih *LDLR*, *APOB* in *PCSK9* in sicer na osnovi zvišanih vrednosti transaminaz.
- Opredelitev genetskih sprememb v genu *LIPA* s sekvenciranjem po Sangerju.
- Opredelitev povezav med posameznimi genetskimi spremembami in razvojem CESD.
- Ocena deleža bolnikov s CESD v Sloveniji.

Hipoteza:

V genu *LIPA* so pri preiskovancih s hiperholesterolemijo in zvišanimi vrednostmi serumskih transaminaz prisotne spremembe, ki povzročajo bolezen kopičenja holesterolnih estrov. Serumske koncentracije celokupnega holesterola, holesterola LDL in HDL ter transaminaz so povezani s specifičnimi genetskimi spremembami v genu *LIPA*.

3. METODE IN MATERIALI

3.1 Potek dela

Izbrali smo preiskovance, ki so ustrezali kriterijem za postavitev suma na CESD. Sledila je molekularno genetska analiza gena *LIPA*. Prva faza v analizi je bila osamitev DNA iz vzorca periferne krvi izbranih preiskovancev. Po izolaciji smo morali določiti koncentracijo DNA in oceniti njeno čistost. Vzorec smo ustrezno razredčili in sledil je postopek verižne reakcije s polimerazo (PCR) z namenom pomnožitve kodirajočih odsekov gena *LIPA*. Po pomnoževanju s PCR smo preverili dolžine produktov z elektroforezo. Zadnja stopnja je bilo sekvenciranje po Sangerju na genetskem analizatorju ABI 3500. S pomočjo računalniških orodij (Chromas in Nucleotide Blast) smo nato prepoznali genetske spremembe. Sledila je še primerjava najdenih sprememb s podatki iz literature in iz baz podatkov (HGMD, dbSNP).

3.2 Preiskovanci

V raziskavo smo vključili 30 otrok s hiperholesterolemijo, ki se vodijo na Kliničnem oddelku za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Pediatrične klinike v Ljubljani in pri katerih so bile že predhodno izključene vzročne spremembe v genih *LDLR*, *APOB* in *PCSK9* in so imeli vrednosti serumskih transaminaz AST nad 0,58 $\mu\text{kat/L}$ (dečki) in 0,52 $\mu\text{kat/L}$ (deklice), ter vrednosti ALT nad 0,74 $\mu\text{kat/L}$ (dečki) in 0,56 $\mu\text{kat/L}$ (deklice) (39). Za posameznega bolnika smo pridobili podatke o spolu, starosti, serumskih vrednostih celokupnega holesterola, holesterola LDL, holesterola HDL, AST in ALT.

3.3 Sekvenčna analiza gena *LIPA*

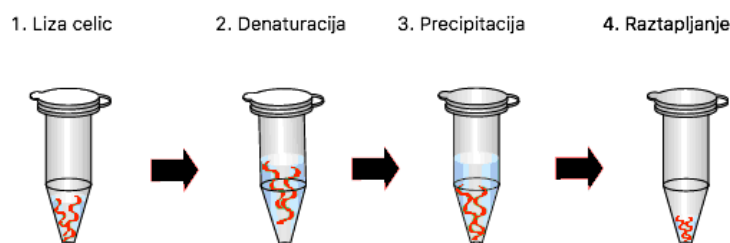
3.3.1 Izolacija DNA

Vzorec za analizo je deoksiribonukleinska kislina (DNA), ki smo jo izolirali iz vzorca periferne venske krvi. Za izolacijo genomske DNA smo uporabili reagenčni komplet FlexiGene DNA Kit 250 (Qiagen, Hilden, Germany). Vzorec je bil odvzet v epruveto z dodanim antikoagulantom EDTA.

Princip metode

Osnova postopka je liza celic, ki smo jo izvedli v pufru za lizo. Temu je bila dodana proteinaza K (Qiagen, Hilden, Germany). Pelet smo resuspendirali in inkubirali v pufru za denaturacijo. Sledila je precipitacija DNA z izopropanolom. Spiranje je potekalo v 70 %

etanolu. Vzorec smo nato posušili in raztopili v pufru za hidracijo. Tako dobljena DNA je bila čista in uporabna za nadaljnje molekularno genetske analize.



Slika 10: Princip izolacije DNA (prirejeno po 40).

Delovni postopek

a) Reagenti

- Pufer FG1, pufer za lizo,
- pufer FG2, pufer za denaturacijo,
- pufer FG3, pufer za hidracijo,
- liofilizirana proteaza,
- 100 % izopropanol,
- 70 % etanol (pripravimo ga z redčenjem 100 % etanola).

b) Instrumenti in oprema

- 1,5 mL sterilne mikrocentrifugirne epruvete (Eppendorf),
- 50 mL centrifugirke (Falcon TPP),
- pipete (10, 100, 200 μ L) in ustrezni sterilni nastavki za pipete,
- vodna kopel (Precithern® PFV),
- centrifuga (Megafuge, 1.OR, Heraeus),
- vibracijski mešalnik (Maxi Mix II, Thermolyne).

Postopek izolacije DNA

Najprej smo segreli vodno kopel na 65 °C. Liofilizirano QIAGEN proteazo smo resuspendirali v 1,4 mL pufru FG3. FG2/proteazno mešanico smo pripravili glede na število reakcij, kot je opisano v preglednici IV.

Preglednica IV: Priprava FG2/proteazne mešanice.

Število vzorcev	Pufer FG2	QIAGEN proteaza
1	2,5 mL	25 μ L
8	20 mL	200 μ L

V 50 mL centrifugirko smo napipetirali 12,5 mL pufru FG1 in 5 mL krvi, malo premešali in centrifugirali 7 minut pri 2300 x g. Odlili smo supernatant in obrnili centrifugirko na čisto papirnato brisačo. Dodali smo 2,5 mL FG2/proteazne mešanice in na kratko pomešali pelet na vibracijskem mešalniku, da se je popolnoma homogeniziral. Vzorce smo obrnili 5x in inkubirali 15 minut v vodni kopeli pri 65 °C. Sledil je dodatek 2,5 mL 10 % izopropanola in nato smo obračali dokler se ni pojavil DNA precipitat. Centrifugirali smo 5 minut pri 2300 x g nato odlili supernatant in obrnili centrifugirko na čisto papirnato brisačo. Dodali smo 2,5 mL 70 % etanola, na kratko pomešali na vibracijskem mešalniku 5 sekund in nato centrifugirali 5 minut pri 2000 x g. Spet smo odlili supernatant in obrnili centrifugirko na čisto papirnato brisačo. Pelet smo posušili na zraku, dodali 400 μ L pufru za hidracijo FG3 in pustili na sobni temperaturi preko noči. Vzorec DNA smo prenesli v mikrocentrifugirke in shranili v hladilniku.

3.3.2 Določitev koncentracije in čistoče DNA

Učinkovitost posamezne izolacije smo preverili s spektrofotometričnim določanjem koncentracije in čistosti izolirane DNA. Merili smo absorbanco pri 260 nm in pri 280 nm. Z meritvijo absorbance pri 260 nm smo vzorcu določili koncentracijo DNA. Spektrofotometrično merjenje temelji na tem, da baze v molekuli DNA absorbirajo UV svetlobo z maksimalno absorbanco pri valovni dolžini 260 nm. Vzorec DNA je primeren za nadaljnjo analizo, če je izmerjena koncentracija vsaj 50 μ g/ml. Čistost izolirane DNA nam pove razmerje absorbanc A_{260}/A_{280} . Vzorec DNA je primeren za nadaljnjo analizo, če je razmerje A_{260}/A_{280} med 1,7 in 2,0.

Delovni postopek

- a) Instrumenti in oprema
 - UV spektrofotometer (Lambda 25, Perkin Elmer),
 - mikro-kvarčne kivete (Helma),

- centrifuga,
- pipete in sterilni nastavki,
- deionizirana voda (dH₂O),
- 1,5 ml sterilne mikrocentrifugirke.

Postopek

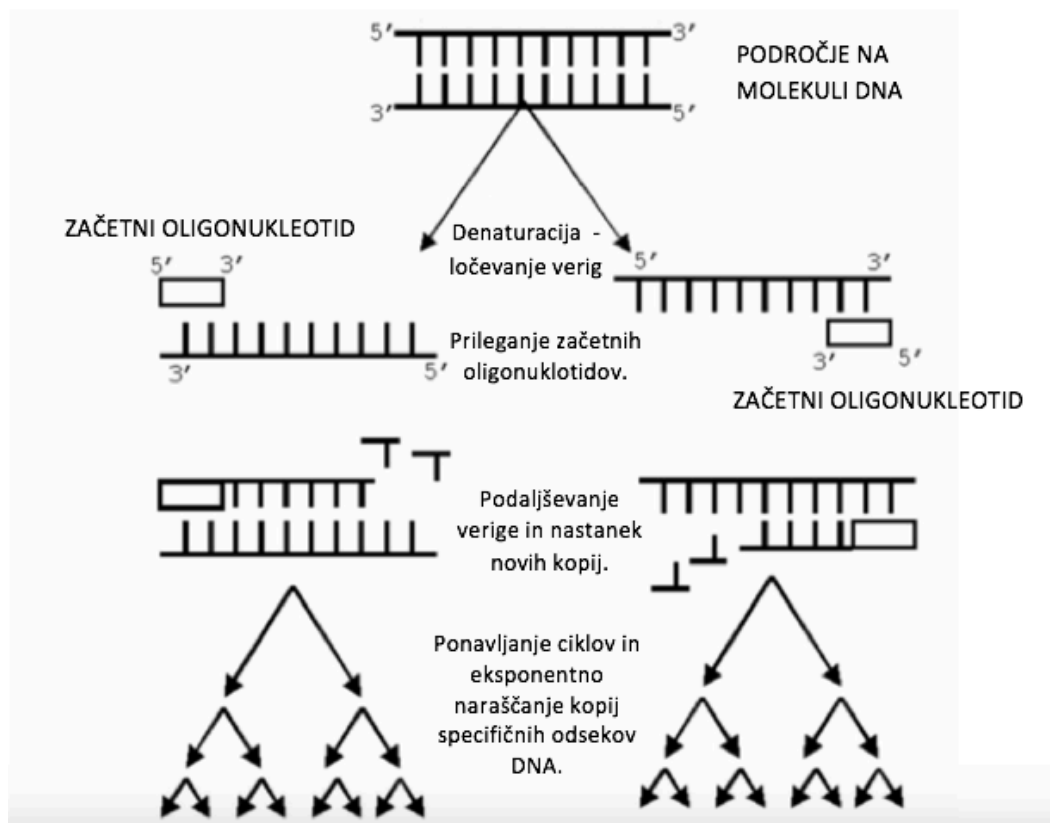
V mikrocentrifugirke smo odpipetirali 990 µL dH₂O, dodali 10 µL izhodne raztopine DNA in dobro premešali. Pripravili smo spektrofotometer in izmerili absorbanco destilirane vode, ki je predstavljala koncentracijo slepe raztopine. Sledilo je merjenje absorbance vzorca pri 260 nm in 280 nm. Iz rezultatov smo določili razmerje absorbanc (R) in koncentracijo izolirane DNA.

3.3.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo je hitra in učinkovita in vitro metoda za podaljševanje specifičnih odsekov DNA ali RNA. PCR reakcija je sestavljena iz oligonukleotidnih začetnikov, termostabilne DNA polimeraze, dNTP-jev in tarčne DNA. Ponavljajoča se serija ciklov, ki vključuje denaturacijo, prileganje oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanje, prinaša pomnožene odseke DNA. Po vsaki ponovitvi se število kopij odseka podvoji. Iz minimalne količine DNA lahko na ta način dobimo milijon ali več kopij. (41)

Princip metode

Območje, ki ga želimo pomnožiti, se omeji z izbiro dveh oligonukleotidnih začetnikov oziroma primerjev (kratke molekule enoverižne DNA, smerni in protismerni), ki sta komplementarna vsak eni verigi DNA. Vzorcju ustrezno razredčene DNA dodamo izbrane začetne oligonukleotide, DNA polimerazo, pufer, raztopino MgCl₂ in deoksiribonukleotidtrifosfat (dNTP). Mi smo uporabili že pripravljen PCR Master Mix (Thermo Scientific), kateremu smo dodali samo začetne oligonukleotide (Preglednica V) in vzorec DNA. Pripravljeno reakcijsko zmes smo prenesli na aparat za PCR. Reakcija je potekala v treh korakih (denaturacija, prileganje oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanje verige DNA), ki so se ciklično ponavljali (Slika 11). Najprej se je reakcijska zmes segrela (94 °C), da je prišlo do ločitve verig. Nato se je temperatura spustila na 57 °C, ker je to optimalna temperatura za vezavo oligonukleotidnih začetnikov. Sledila je faza podaljševanja pri 72 °C. Dodana DNA polimeraza je v tem koraku podaljševala obe novo-nastajajoči verigi v smeri 5' proti 3' koncu. Po izteku zadnjega cikla je sledilo še dodatno podaljševanje in nato hlajenje na 10 °C.



Slika 11: Shema pomnoževanja DNA s PCR (42).

Delovni postopek

a) Reagenti

- Voda brez sledov nukleaz (ang. nuclease-free water),
- PCR Master Mix (Thermo Scientific),
- delovna raztopina oligonukleotidnih začetnikov s koncentracijo 10 μ L.

b) Instrumenti in oprema

- 5 mL sterilne mikrocentrifugirne epruvete (Eppendorf),
- pipete Gilson in ustrezni sterilni nastavki za pipete,
- nosilci za vzorce in podstavki za nosilce vzorcev (Applied Biosystems),
- reakcijske epruvete 0,2 mL in pripadajoči pokrovčki (Applied Biosystems),
- vibracijski mešalnik (Maxi MixII, Termolyne),
- komora za sterilno delo,
- aparat za PCR GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Preglednica V: Oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje eksonov gena LIPA.

	Oligonukleotidni začetniki oz. primerji	Nukleotidno zaporedje (5'→3')
Ekson 1	1F	cagaacttttgtgggagca
	1R	acataactggatcggggaaa
Ekson 2	2F	tgcttgtaatgtgggagactg
	2R	tggttactaacacaaaaccagaa
Ekson 3	3F	ttgcttatggatcttttacgaatg
	3R	tcttctgctggaagcctgtt
Ekson 4	4F	tgtgataactcatcaaaactgcat
	4R	ttcattattctgtttggcattt
Ekson 5	5F	ggaaatcccagatgatggaa
	5R	cggaaaaagaaaagcccact
Ekson 6	6F	tcacggagacttatgcacca
	6R	ttcccacctctcccatatca
Ekson 7	7F	caatgccacctaatactgtgtt
	7R	atgccagacctttctgatg
Ekson 8	8F	gattccgagggttgggcta
	8R	aggctggctttcttgatgag
Ekson 9	9F	tggagattgcgcttattgtg
	9R	ggcttctattccagcccta

Potek dela

Reagente, ki so bili shranjeni v zamrzovalni skrinji, smo najprej odmrznili pri sobni temperaturi in jih na kratko pomešali na vibracijskem mešalniku. Prižgali smo aparat za PCR. Pred začetkom dela smo delovni pult, pipete in nosilce za vzorce temeljito obrisali s 70 % etanolom. Izračunali smo koliko reagentov bomo porabili za skupno reakcijsko mešanico. To smo nato preračunali glede na število izbranih vzorcev, kot je opisano v preglednici VI.

Preglednica VI: Primer reakcijske mešanice za PCR.

Količina	1 x	N x
GoTaq® MasterMix	10 µL	N x 10 µL
H ₂ O	7 µL	N x 7 µL
primer F	1 µL	N x 1 µL
primer R	1 µL	N x 1 µL
vzorec DNA	1 µL	N x 1 µL

Delovni postopek smo začeli tako, da smo pripravili PCR reakcijske epruvete. Vzeli smo eno za vsak vzorec ter eno za merjenje slepe kontrole. Pripravili smo mešanico MasterMixa in vode, kratko pomešali na vibracijskem mešalniku ter centrifugirali. Tako pripravljeno reakcijsko mešanico smo razdelili v epruvete. Dodali smo ustrezne začetne oligonukleotide in vzorec DNA (v vse pripravljene epruvete razen v epruveto za slepo kontrolo). Epruvete smo dobro zaprli in na kratko pomešali na vibracijskem mešalniku. Preverili smo, da v reakcijski mešanici ni bilo mehurčkov in da ni bilo kapljic mešanice na stenah epruвет. Nosilec z vzorci smo nato označili z datumom in imenom gena ter številko eksona, ki smo ga pomnoževali. Vstavili smo ga v PCR aparat in nastavili ustrezen program (Preglednica VII).

Preglednica VII: Optimizirani pogoji pomnoževanja PCR za eksone gena LIPA.

Začetna denaturacija		94 °C, 5'
35 X	Denaturacija	94 °C, 30"
	Prileganje začetnikov	57 °C, 30"
	Podaljševanje verige	72 °C, 30"
Končno podaljševanje		72 °C, 7'
Hlajenje		10°C, ∞

Reagente smo pospravili nazaj na -20 °C, DNA pa v hladilnik na približno 4 °C. Ko je aparat končal s protokolom, smo vzorec shranili v hladilnik v sobi, kjer se opravlja elektroforeza.

3.3.4 Preverjanje dolžine produktov PCR

Z agarozno gelsko elektroforezo preverjamo uspešnost oziroma učinkovitost posamezne PCR reakcije. Dobljeni odseki DNA so negativno nabiti in zato v električnem polju potujejo proti pozitivno nabitemu polu. Hitrost potovanja pa je odvisna od velikosti odseka DNA.

Delovni postopek

a) Reagenti

- 10X pufer TBE (1 M Tris HCl, 20 nM EDTA, 650 mM borova kislina). Pripravimo ga tako, da 108 g TRIS baze (Sigma Alderich) in 55 g borne kisline (Kemika) natehtamo v 1000 mL merilno bučko. Dodamo 40 mL 0,5 M EDTA s pH 8 (Riedel) in merilno bučko dopolnimo z destilirano vodo do 1000 mL. Pustimo, da se sestavine raztopijo in nato premešamo s pomočjo magnetnega mešala.
- 1x TBE pufer dobimo z 10-kratnim redčenjem koncentriranega TBE pufra z destilirano vodo,
- barvilo Syber Safe DNA gel (Invitrogen),
- velikostni standard DNA (angl. Step Ladder 50 bp) (Sigma),
- agarozna (Sigma – Aldrich): 2 % agarozni gel pripravimo tako, da v erlenmajerico natehtamo 1,6 g agaroze, dolijemo 80 mL 1x pufra TBE in dodamo 8 µL barvila Syber Safe. Vse skupaj premešamo in raztopimo v mikrovalovni pečici. Dolijemo destilirano vodo in ohladimo gel na približno 60 °C. Med hlajenjem pripravimo kalup z glavnički za vlivanje gela. Ko se gel strdi, odstranimo glavničke in prenesemo gel v kadičko za elektroforezo, napolnjeno z 1 x pufrom TBE, tako, da je popolnoma potopljen.

b) Instrumenti in oprema

- Pipete Gilson (10, 100, 200 in 1000 µL) in ustrezni sterilni nastavki za pipete,
- tehtnica (Sartorius TE6101),
- mikrovalovna pečica Sharp R – 939,
- erlenmajerica,
- merilni valj,
- urno steklo,
- 0,2 mL reakcijske epruvete (Applied Biosystems),
- sistem za agarozno gelsko elektroforezo: nosilec za gel in glavniček (Biorad),
- transluminator G: Box Syngene.

Potek dela

Vzeli smo 8 μL PCR produkta in ga prenesli v žepke 2 % agaroznega gela. Poleg vzorca smo na gel nanесли velikostni standard, ki je namenjen določanju velikosti DNA fragmentov. Elektroforeza je potekala 30 minut pri 90 V. Pod UV lučjo transluminatorja smo preverili prisotnost in dolžino produktov PCR. Gel smo v komori za dokumentiranje gelov G-box (Syngene) presvetlili z UV svetlobo in zajeli sliko. Na sliki smo ocenili (glede na prisotnost lis) ali so produkti uspešno pomnoženi. S slepo kontrolo smo izključili možnost kontaminacije.

3.3.5 Sekvenčna reakcija

DNA sekvenciranje je proces določanja nukleotidnega zaporedja. Metoda po Sangerju je najpogosteje uporabljena metoda za sekvenciranje. Temelji na vgradnji dideoksinukleotidov (ddNTP), ki z vgradnjo zaustavijo podaljševanje oziroma izgradnjo verige DNA. ddNTP-ji nimajo 3' OH skupine na deoksiribozi, kar prepreči sintezo verige. Različni ddNTP so na 3' koncu označeni z različnimi fluorescenčnimi barvili. Zmes različno dolgih DNA fragmentov po končani sekvenčni reakciji vstavimo v genski analizator. Pod vplivom električnega polja gre del vzorca v tanko kapilaro, napolnjeno s polimerom, kjer se fragmenti DNA elektroforetsko ločijo po velikosti. Fragmenti različnih dolžin nato dosežajo detektorsko okence, kjer se z laserjem osvetli vezano barvilo. Rezultati se interpretirajo glede na oddano fluorescenco, ki ga računalniški program iz oblike elektroferograma prevede v nukleotidno zaporedje. Rezultat sekvenčne analize na koncu primerjamo z referenčnim zaporedjem iz genetskih baz.

Delovni postopek

a) Reagenti

- Delovne raztopine primerjev s koncentracijo 10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$,
- ExoSAP – IT encim (Affymetrix),
- Big Dye Terminator 3.1v (Applied Biosystems),
- Big Dye Terminator 3.1v 5X pufer (Applied Biosystems),
- voda.

b) Instrumenti in oprema

- 1,5 mL sterilne mikrocentrifugirne epruvete (Eppendorf),
- pipete Gilson (10, 100, 200 in 1000 μL) in ustrezni sterilni nastavki za pipete,

- nosilci za vzorce in podstavki za nosilce vzorcev (Applied Biosystems),
- reakcijske epruvete 0,2 mL in pripadajoči pokrovčki (Applied Biosystems),
- vibracijski mešalnik (Maxi MixII, Termolyne),
- komora za sterilno delo,
- aparat za PCR GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems),
- centrifuga universal 320R (Hettich).

Potek dela

V vsako epruvetko smo dali 1 μL encima ExoSAP-IT s katerim smo dosegli razgradnjo neuporabljenih oligonukleotidnih začetnikov in dNTP-jev ter 2,5 μL PCR produkta. Nato smo premešali, na kratko centrifugirali in dali v aparat za PCR. Inkubacija je potekala najprej 15 minut pri 37 °C in nato 15 minut pri 80 °C (deaktivacija encima). Po končani inkubaciji smo dali v vsako epico 16,2 μL predhodno pripravljenega BDT (Big Dye Terminator) reagenta in 0,3 μL ustreznega začetnega oligonukleotida. Reakcijske mešanice smo premešali, centrifugirali in pomnožili v aparatu za PCR pod pogoji navedenimi v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Temperaturni profil sekvenčne reakcije.

Začetna denaturacija		96 °C, 1'
25 X	Denaturacija	96 °C, 10"
	Prileganje začetnikov	50 °C, 5"
	Podaljševanje verige	60 °C, 4'
Hlajenje		4 °C, ∞

Po končani sekvenčni reakciji smo reakcijske mešanice shranili pri -20 °C.

3.3.6 Precipitacija sekvenčne reakcije

Sekvenčno reakcijo s postopkom etanolne precipitacije očistimo odvečnih ddNTP-jev in začetnih oligonukleotidov.

Delovni postopek

a) Reagenti

- 100 % etanol,

- 70 % etanol,
- 3 M natrijev acetat,
- formamid (Applied Biosystems).

b) Instrumenti in oprema

- 1,5 mL sterilne mikrocentrifugirne epruvete (Eppendorf),
- pipete Gilson (10, 100, 200 in 1000 μ L) in ustrezni sterilni nastavki za pipete,
- 0,2 mL reakcijske epruvete in pripadajoči pokrovčki (Applied Biosystems),
- vibracijski mešalnik (Maxi MixII, Termolyne),
- komora za sterilno delo,
- aparat za PCR GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems),
- centrifuga Universal 320R (Hettich).

Potek dela

Glede na število sekvenčnih reakcij smo zmešali N x 50 μ L 100 % etanola in N x 2 μ L natrijevega acetata. V vsako sekvenčno reakcijo smo dali 52 μ L mešanice. Vzorce smo na kratko pomešali na vibracijskem mešalniku in inkubirali 10 minut na ledu. Sledilo je centrifugiranje nosilca z vzorci 45 minut pri 3990 rpm. Po končanem centrifugiranju smo nosilec obrnili na staničevino in narobe obrnjenega ponovno centrifugirali 1 minuto pri 500 rpm, da smo se znebili supernatanta. V posamezno epico smo dodali 70 μ L 70 % etanola, nato najprej na kratko pomešali na vibracijskem mešalniku in centrifugirali 15 minut pri 3300 rpm. Po končanem centrifugiranju smo nosilec z vzorci spet obrnili na staničevino in narobe obrnjenega centrifugirali 1 minuto pri 500 rpm, da smo se znebili preostalega supernatanta. V epicah je ostala precipitirana sekvenčna reakcija, ki smo jo sušili dodatnih 10 minut pri sobni temperaturi in nato shranili pri -20 °C. Vzorce smo pripravili za sekvenciranje tako, da smo jih raztopili v 20 μ L formamida in denaturirali 5 minut pri 95 °C v aparatu za PCR.

3.3.7 Analiza fragmentov DNA na genetskem analizatorju ABI 3500

Z genetskim analizatorjem ABI 3500 ločimo in detektiramo različno dolge fragmente DNA. Aparat deluje na principu kapilarne elektroforeze. Fragmenti DNA se ločujejo v tanki kapilari, napolnjeni s polimerom. Ločitev poteka na osnovi velikosti zaradi različne afinitete do negativnega potenciala. Dobljene ločene fragmente nato presvetlimo z laserjem. Ta povzroči

fluoresciranje označenih ddNTP-jev. Oddano fluorescenco zazna detektor, podatki pa se nato analizirajo s programsko opremo (Sequencing Analyses Software 5.4; Applied Biosystems), ki nam izriše elektroferogram.

3.3.8 Interpretacija genetskih sprememb v genu *LIPA*

Za prepoznavanje genetskih sprememb v genu *LIPA* smo uporabili računalniški program BLAST (43). Primerjali smo nukleotidno zaporedje pomnoženega odseka gena *LIPA* z referenčnim zaporedjem gena, ki je objavljen v bazi zaporedij GenBank pod referenčno številko NG_008194.1 (44).

Prepoznane genetske spremembe smo preverili v bazi podatkov HGMD professional (45) in v podatkovni bazi dbSNP (46), da bi ugotovili ali je opredeljena sprememba že znana in prisotna v splošni populaciji. Spremembe, ki še niso bile opisane, se obravnavajo kot nove. Poimenujejo se po priporočilih združenja HGVS (Human GenomeVariation Society) (62). Za napoved njihove vzročnosti se lahko uporabi *in silico* predikcijska orodja Swift (63), PolyPhen-2 (64) in MutationTaster (65). Z uporabo teh treh orodij lahko ocenimo, kolikšna je verjetnost, da vplivajo na funkcijo proteina in ali so lahko vzrok za klinično sliko.

Preiskovančevo DNA smo po opredelitvi najdenih sprememb nato ponovno razredčili in pomnožili s PCR ter opravili potrditveno sekvenciranje gena za ugotovljene genetske spremembe.

Določitev pogostosti najdenih sprememb

Izračunamo lahko incidenco in prevalenco izbranih sprememb. Incidenca pomeni absolutno število vseh na novo ugotovljenih primerov neke spremembe oziroma bolezni v točno določeni populaciji v enem koledarskem letu (66). Prevalenca nam pove delež ljudi v populaciji, ki imajo določeno bolezen v času preiskovanja. Izračunamo jo kot količnik med številom obolelih in številom vseh bolnikov, ki so bili v izbrani skupini (59).

4. REZULTATI

4.1 Opis preiskovane skupine

V raziskavo smo vključili 30 otrok pri katerih smo iskali spremembe v genu *LIPA*, ki bi lahko bile vzrok za bolezen kopičenja holesterolnih estrov.

Ob prvem odvzemu krvi so vsi imeli vrednost celokupnega holesterola nad 3,9 mmol/L, kar je zgornja meja za holesterol v krvi pri otrocih. Vrednost holesterola LDL je bila nad 2,8 mmol/L pri 28 bolnikih, vrednost holesterola HDL pa je bila pod spodnjo mejo, ki je 1,2 mmol/L, pri 5 bolnikih. Izbrani bolniki so imeli zvišani serumski transaminazi AST in ALT. Povprečne vrednosti AST v tej skupini so bile nad priporočenimi vrednostmi, to je 0,58 μ kat/L (dečki) in 0,52 μ kat/L (deklince), ter vrednosti ALT nad 0,74 μ kat/L (dečki) in 0,56 μ kat/L (deklince) (Preglednica IX) (39).

Preglednica IX: Podatki o izbranih bolnikih s sumom na CESD, vključenih v raziskavo.

Zaporedna številka bolnika	Spol	Celokupni holesterol (mmol/L)	Holesterol LDL (mmol/L)	Holesterol HDL (mmol/L)	AST (μkat/L)	ALT (μkat/L)
1	Ž	6,8	3,8	2,5	0,58	0,31
2	M	4,8	3,6	1	0,61	0,29
3	M	7	5	1,7	0,72	0,38
4	Ž	6,5	4,5	1,5	1,3	1,58
5	Ž	4,8	2,4	2	0,6	1,25
6	Ž	5,5	4,1	1,3	0,58	0,42
7	M	7,1	5,3	1,3	1,36	1,4
8	Ž	8,3	5,8	1,5	1,05	1,7
9	M	5,5	4,1	1,1	0,67	0,44
10	M	6,7	4,9	1,5	0,6	0,31
11	Ž	5,3	3,5	1,2	0,7	0,69
12	Ž	6,6	4,1	1,9	0,63	0,34
13	M	5,2	3,1	1,2	0,58	0,59
14	Ž	6,5	4,5	1,7	0,76	0,42
15	M	4,4	2,7	0,9	0,29	0,75
16	Ž	6,6	4,5	1,8	0,8	0,67
17	M	6,8	5,6	1	0,72	0,56
18	Ž	7,4	5,1	1,4	0,8	1,07
19	Ž	5,8	3,9	1,2	0,63	0,42
20	M	5,4	3,1	1,9	0,59	0,33
21	M	5,5	3,3	1,9	0,45	0,21
22	M	6,3	4,6	1,4	0,49	0,27
23	M	5,6	3,3	1,6	0,6	0,23
24	Ž	4,9	2,9	1,8	0,63	0,2
25	M	5,3	3,5	1,1	0,7	1,0
26	Ž	5,7	3,6	1,8	0,65	0,24
27	M	7	4,7	1,4	0,6	0,49
28	M	6,6	4,8	1,6	0,65	0,73
29	M	5,1	4,4	1,4	0,56	0,75
30	Ž	7	5,1	1,3	0,85	1,32

V obravnavani skupini 30 bolnikov je bilo 16 dečkov in 14 deklic. Starost preiskovancev ob sprejemu je bila od 4 – 12 let. Ostale značilnosti preiskovancev vključenih v raziskavo so podane v preglednici X.

Preglednica X: Značilnosti preiskovancev vključenih v raziskavo.

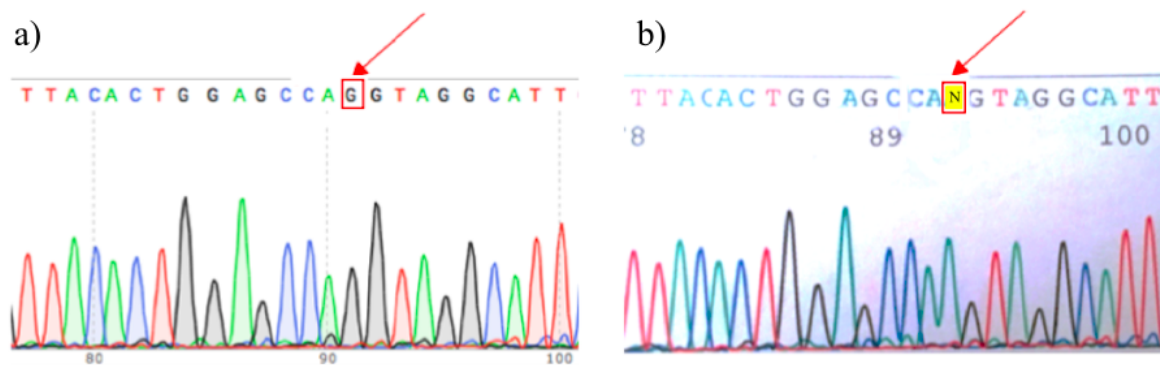
Starost (leta)	4 - 12
Št. moških	16 (53,33 %)
Št. žensk	14 (46,67 %)
Celokupni holesterol (mmol/L)	vsi otroci nad 3,9 mmol/L ($6,07 \pm 0,93$)
holesterol LDL (mmol/L)	nad 2,8 mmol/L pri 28 otrocih ($4,13 \pm 0,88$)
holesterol HDL (mmol/L)	pod 1,2 mmol/L pri 5 otrocih ($1,50 \pm 0,36$)
AST (μ kat/L)	vsi dečki nad 0,58 μ kat/L in vse deklice nad 0,52 μ kat/L ($0,70 \pm 0,22$)
ALT (μ kat/L)	vsi dečki nad 0,74 μ kat/L in vse deklice nad 0,56 μ kat/L ($0,65 \pm 0,43$)

4.2 Sekvenčna analiza gena *LIPA*

S sekvenciranjem po Sangerju smo analizirali celotno kodirajočo regijo gena *LIPA* in s primerjavo z referenčnim zaporedjem prepoznali genetske spremembe, ki so za posameznega bolnika navedena v preglednici XI.

Preglednica XI: Spremembe v genu LIPA pri izbranih preiskovancih (het. sprememba je prisotna v heterozigotni obliki, hom.-sprememba je prisotna v homozigotni obliki); spremembe so poimenovane glede na referenčno zaporedje NP_000226.2 oz. NM_000235.3).

Zaporedna številka bolnika	Ekson 2	Intron 6	Ekson 8
1	p.Gly23Arg hom.	/	/
2	/	/	/
3	p.Thr16Pro het.	c.539-5C>T het.	/
4	/	/	p.Gln298= hom.
5	p.Thr16Pro het.	/	/
6	/	/	/
7	/	/	p.Gln298= hom.
8	p.Thr16Pro het.	/	/
9	p.Thr16Pro het.	c.539-5C>T het.	/
10	p.Thr16Pro het.	c.539-5C>T het.	/
11	p.Thr16Pro het.	/	/
12	/	/	/
13	p.Thr16Pro het.	/	/
14	/	/	/
15	/	/	/
16	p.Thr16Pro het.	/	/
17	/	/	/
18	p.Thr16Pro hom.	c.539-5C>T het.	/
19	/	/	/
20	p.Gly23Arg hom.	/	/
21	p.Thr16Pro het.; p.Gly23Arg het.	c.539-5C>T het.	/
22	p.Thr16Pro hom.	c.539-5C>T het.	/
23	p.Thr16Pro het.	/	/
24	/	/	/
25	p.Thr16Pro het.	/	/
26	p.Thr16Pro hom.	c.539-5C>T het.	/
27	p.Thr16Pro het.	/	/
28	/	c.539-5C>T het.	/
29	p.Gly23Arg het.	/	/
30	/	/	p.Gln298= hom.



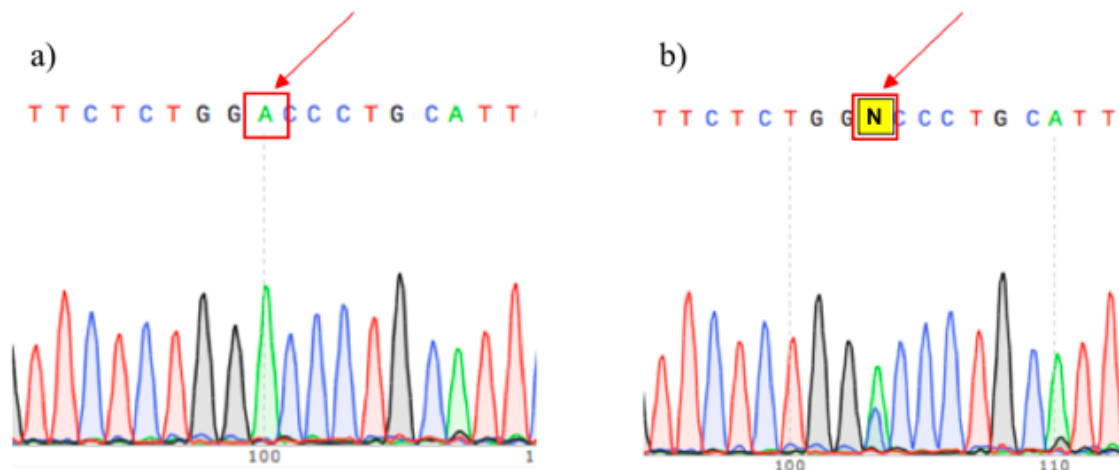
Slika 12: Del eksona 8 z normalnim zaporedjem (a) in zaporedjem, kjer se nahaja sprememba NP_001121077: p.Gln298= (NM_000235.3: c.894G>A) (b).

Pri treh preiskovancih (Preglednica XI, preiskovanci 4, 7, 30) smo v kodirajoči regiji gena *LIPA* opredelili spremembo IVS8-1G>A oziroma p.Gln298= (rs116928232; MAF= 0.0008274, povzeto po ExAC, angl. Exome Aggregation Consortium) v homozigotni obliki. Sprememba ohrani aminokislino glutamin na aminokislinskem zaporedju 298 in vpliva na pravilno izrezovanje intronskih regij ter povzroči izrezovanje eksona 8. Gre za vzročno spremembo, ki povzroči bolezen kopičenja holesterolnih estrov (47).

Dodatno smo v analiziranih regijah gena *LIPA* našli prisotne še 4 spremembe, ki so našteje v spodnji preglednici. Tri se nahajajo v eksonih, medtem ko je ena sprememba intronska.

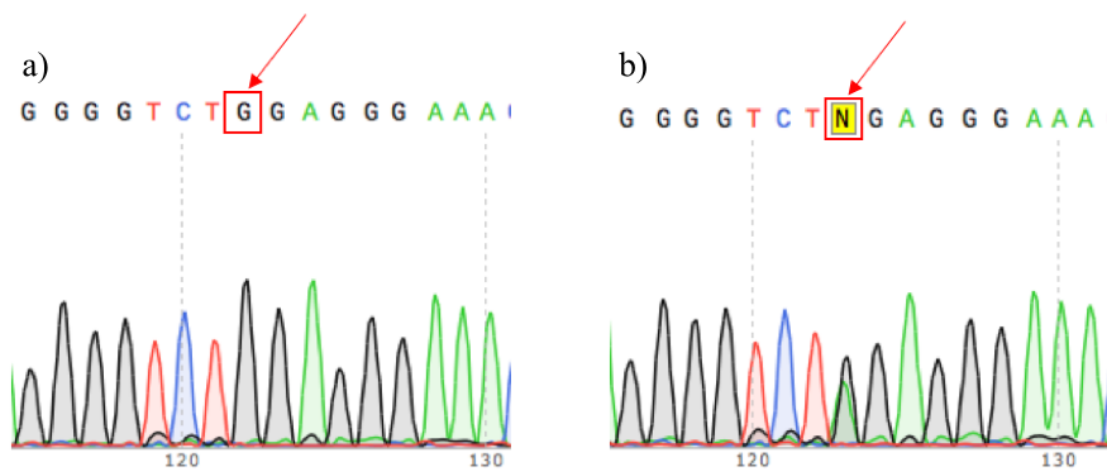
Preglednica XII: Opredeljene nepatološke spremembe v genu *LIPA*; NP, na nivoju proteina; NM, na nivoju mRNA; MAF, angl. Minor allele frequency; ExAC, angl. Exome Aggregation Consortium (povzeto po dbSNP, Single Nucleotide Polymorphism database).

Oznaka spremembe glede na dbSNP	Sprememba glede na aminokislinsko zaporedje (NP_000226.2)	Sprememba glede na kodirajoče zaporedje (NM_000235.3)	Regija	Število preiskovancev, pri katerih je sprememba prisotna	MAF (ExAC)
rs1051338	p.Thr16Pro	c.46A>C	Ekson 2	15	0.2861
rs1051339	p.Gly23Arg	c.67G>A	Ekson 2	4	0.3163
rs2297472	/	c.539-5C>T	Intron 6	8	0.2781



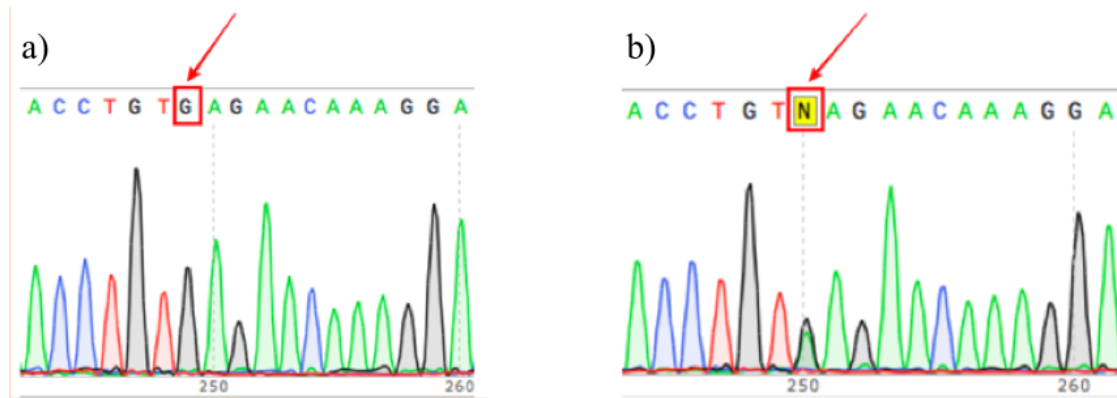
Slika 13: Del eksona 2 z normalnim zaporedjem (a) in zaporedjem, kjer se nahaja sprememba NP_001121077: p.Thr16Pro (NM_000235.3:c.46A>C) (b).

Sprememba p.Thr16Pro (rs1051338) povzroči zamenjavo enega nukleotida, adenina s citozinom, kar privede do zamenjave aminokislina treonin s prolinom (ACC→CCC) na mestu 16. Gre za benigno spremembo z MAF= 0.2861 (povzeto po ExAC, angl. Exome Aggregation Consortium).



Slika 14: Del eksona 2 z normalnim zaporedjem (a) in zaporedjem, kjer se nahaja sprememba NP_001121077: p.Gly23Arg (NM_000235.3:c.67G>A) (b).

Sprememba p.Gly23Arg (rs1051339) povzroči zamenjavo gvanidina z adeninom, kar privede do zamenjave aminokislina glicin z argininom (GGA→AGA) na mestu 23. Gre za benigno spremembo z MAF= 0.3163 (povzeto po ExAC, angl. Exome Aggregation Consortium).



Slika 15: Del introna 6 z normalnim zaporedjem (a) in zaporedjem, kjer se nahaja sprememba: NM_000235.3: c.539-5C>T (b).

Sprememba c.539-5C>T (rs2297472) povzroči zamenjavo gvanidina z adeninom. Gre za benigno spremembo z MAF= 0.2781 (povzeto po ExAC, angl. Exome Aggregation Consortium).

Najpogostejša med nepatološkimi spremembami v preučevani populaciji je p.Thr16Pro, prisotna pri kar 15 bolnikih, torej pri 50 % izbranih preiskovancev. Sprememba c.539-5C>T je prisotna v 8 primerih, kar znaša 26,7 %, p.Gly23Arg pa pri 4 preiskovancih, torej pri 13,3 % v izbrani populaciji. V večini primerov so bile spremembe prisotne v heterozigotni obliki (Preglednica XI).

5. RAZPRAVA

V nalogi smo želeli z analizo gena *LIPA* ugotoviti ali ima kateri izmed bolnikov v izbrani skupini preiskovancev s hiperholesterolemijo prisotne spremembe, ki bi lahko potrdile sum na bolezen kopičenja holesterolnih estrov. V naši raziskavi smo želeli opredeliti genetsko ozadje bolnikov s sumom na CESD, pri katerih so bile izključene najpogostejše spremembe, ki povzročajo družinsko hiperholesterolemijo. Vzrok, da je velik delež bolnikov s CESD neprepoznan, je prekrivanje vrednosti osnovnih biokemičnih označevalcev hiperholesterolemije (LDL, TG, HDL) bolnikov s CESD z vrednostmi, ki so prisotne pri bolnikih z družinsko obliko hiperholesterolemije. CESD zato velja kot pomemben člen v diferencialni diagnostiki bolnikov s sumom na družinsko hiperholesterolemijo, pri katerih predhodno ni bila določena vzročna sprememba v glavnih genih vzročnih za družinsko hiperholesterolemijo.

5.1 Preiskovanci

V našo raziskavo je bilo vključenih 30 otrok s hiperholesterolemijo, od tega je bilo 16 dečkov in 14 deklic, ki so imeli zvišane vrednosti koncentracije serumskih transaminaz (Preglednica IX). Povprečna vrednost celokupnega holesterola pri izbranih bolnikih je bila 6,07 mmol/L, holesterola LDL 4,13 mmol/L, holesterola HDL 1,50 mmol/L ter povprečna vrednost AST 0,70 μ kat/L in ALT 0,65 μ kat/L. Pri preiskovancih so bile predhodno že izključene vzročne spremembe v genih *LDLR*, *APOB* in *PCSK9*, ki so najpogostejši vzrok za družinsko hiperholesterolemijo. Z namenom opredelitve vzročne spremembe za CESD, smo analizirali celotno kodirajočo regijo gena *LIPA* in meje eksonov z introni. Pri bolnikih, ki jih prepoznajo na presejanju petletnikov za hiperholesterolemijo, se rutinsko izvajajo genetske analize za določanje bolezenskih spremembe v genih *LDLR*, *APOB* in *PCSK9* (61). Tako se pri 57 % slovenskih bolnikov prepozna genetski vzrok za hiperholesterolemijo. V tej nalogi smo želeli v skupini genetsko neopredeljenih bolnikov dodatno razjasniti genetsko ozadje z analizo gena *LIPA*, ki bi lahko pomembno vplivala na nadaljnjo obravnavo in ustrezno zdravljenje bolnikov.

5.2 Najpogostejše spremembe gena *LIPA* pri analizirani skupini bolnikov

Pri preiskovancih 4, 7, 30 (Preglednica XI) smo v kodirajoči regiji gena *LIPA* opredelili nukleotidno spremembo c.894G>A (p.Gln298=; IVS8-1G>A) v homozigotni obliki. Ker se

spremembe v genu *LIPA*, ki so vzrok za CESD, dedujejo avtosomno recesivno, smo s tem potrdili sum na CESD in opredelili njen genetski vzrok. Sprememba p.Gln298= ohrani aminokislino glutamin na aminokislinskem mestu 298 in vpliva na pravilno izrezovanje intronskih regij ter povzroči izrezovanje eksona 8 (47).

Aktivnost encima LAL je zaradi omenjene spremembe zmanjšana. Rezultat izrezovanja je 24 aminokislin krajši protein, ki nima preostale aktivnosti LAL. Pri CESD bolnikih kljub vzročni spremembi nastane nekaj funkcionalne mRNA, običajno od 2-4 % celotne LAL mRNA (47).

LAL je ključni encim, vpleten v znotrajcelično hidrolizo holesterolnih estrov in trigliceridov. Ob tem nastaneta prosti holesterol in maščobne kisline, ki imata ključno vlogo v homeostazi holesterola. Sproščeni prosti holesterol regulira njegovo lastno endogeno sintezo, privzem holesterola LDL in proces esterifikacije (60). Zmanjšanje ali odsotnost aktivnosti LAL privede do kopičenja trigliceridov, holesterolnih estrov in drugih lipidov v lizosomih. To pa lahko privede do kopičenja maščob v različnih tkivih (4).

V literaturi lahko najdemo podatke, da se pri CESD bolnikih vzročna sprememba c.894G>A v heterozigotni obliki pojavlja v približno 54 % primerov, se pa frekvenca mutiranih alelov pojavlja lahko še v višjem odstotku, kar je odvisno od obravnavane populacije. V naši populaciji je bila ta sprememba prisotna pri 10 % bolnikov s hiperholesterolemijo in brez bolezenskih sprememb v genih, povezanih z družinsko hiperholesterolemijo (48). V Sloveniji bi naj v skupini petletnikov imelo kar 21 % otrok zvišane vrednosti celokupnega holesterola (49). Od leta 1995 se je v program preventivnega pregleda otrok starih 5 let uvedlo tudi določanje vrednosti celokupnega holesterola. V omenjeni populaciji petletnikov naj bi imelo vrednosti celokupnega holesterola med 5 in 6 mmol/L kar 18,2 %, kar pomeni letno približno 3600 otrok. Če pri presejalnem testiranju izmerijo vrednosti nad 6 mmol/L, potem se otroka napoti k usmerjenemu specialistu. Dodatno se izmerijo še vrednosti holesterolov LDL in HDL ter preveri morebitna prisotnost drugih dejavnikov tveganja. Po oceni iz raziskave je v prej omenjeni skupini 2,8 % otrok, kar pomeni približno 550 otrok letno (49).

Za vsako spremembo, ki je že bila opisana v bazah, ki zajemajo spremembe v splošni populaciji (dbSNP, ExAc, Genome Aggregation Database) so opisani tudi podatki o frekvenci redkejšega alela (MAF, angl. Minor allele frequency). Če obstajajo trije aleli, s frekvencami 0,50, 0,49 in 0,01, se bo MAF poročal kot 0,49 (50).

V analiziranih regijah gena *LIPA* smo našli poleg znane pogoste vzročne spremembe še dodatne nepatološke spremembe p.Thr16Pro, c.539-5C>T in p.Gly23Arg. Slednja lahko po podatkih iz literature prispeva k razvoju debelosti (51). Na ta način bi ta sprememba posredno

lahko bila povezana s CESD. Bolnik številka 29 s prisotno spremembo p.Gly23Arg v heterozigotni obliki je imel ob sprejemu ITM=27,2 kg/m², kar kaže na povišano telesno maso. Otroci z ITM nad 25 kg/m² spadajo med otroke s povišano telesno maso (67). Bolnik številka 13 je imel ITM=28,05 kg/m² in bolnik številka 15 ITM=35,37 kg/m², ampak pri teh dveh bolnikih prej omenjena sprememba ni bila prisotna. Ostali izbrani bolniki so imeli normalno telesno težo. Opredeljena sprememba bi morda lahko bila eden izmed faktorjev, ki vplivajo na povišano telesno težo, vendar vsekakor ni edini vzrok.

V splošni populaciji ima velik delež bolnikov z boleznijo koronark ali cerebrovaskularno boleznijo nizko aktivnost encima LAL (51). Dokazali so povezavo med *LIPA* polimorfizmi in metabolnimi motnjami povezanimi s prekomerno telesno težo. Iskali so povezave med glukozo v plazmi na tešče, lipidnim profilom, spremenljivkami povezanimi s krvnim tlakom in skupinami genotipov. Ugotovili so, da je sprememba p.Thr16Pro povezana v zvišanim diastolnim in sistolnim krvnim tlakom (51). V študiji so potrdili, da obstaja povezava med polimorfizmi v genu *LIPA* in z zdravstvenimi težavami povezanimi s prekomerno telesno težo. Izražanje gena *LIPA* je bilo povečano v visceralnem adipoznem tkivu pri posameznikih s povišano telesno težo in metabolnim sindromom. Polimorfizmi v genu *LIPA* lahko pripomorejo k interindividualni variabilnosti opazovani za metabolne motnje povezane s prekomerno telesno težo (51).

Pri spremembi p.Thr16Pro pride do povečane razgradnje encima LAL, kar se kaže v zmanjšani količini encima in v zmanjšani aktivnosti (25). Sprememba povzroči zamenjavo treonina s prolinom znotraj signalnega peptida encima LAL. Signalni peptidi so nujno potrebni za pravilno in učinkovito usmerjanje določenih proteinov v specifične organele. V tem primeru je torej moteno usmerjanje in transport encima LAL do lizosomov (52). Hidrofobnost jedra in prisotnost α -vijačnic poveča učinkovitost izločanja proteinov. Prolini so znani po tem, da prekinjajo povezave v α -vijačnicah (53). Pri spremembi p.Thr16Pro pride torej do motenj pri α -vijačnicah in do zmanjšanja hidrofobnega jedra ter spremembe predvidenega območja cepitve signalnih peptidov (25).

5.3 Epidemiološki podatki CESD

Epidemiološki podatki so omejeni zaradi majhnega števila prepoznanih bolnikov in njihovih opisov v literaturi (24).

Točna incidenca CESD ni znana. Ocena prevalence pri Evropejcih je izračunana na podlagi dejstva, da je bila ponavljajoča se vzročna sprememba c.894G>A v eksonu 8 pogosta pri

bolnikov, ki so imeli evropske prednike. Opravljen je bil presejalni test za c.894G>A pri zdravih posameznikih iz zahodnega dela Nemčije z namenom opredelitve frekvence heterozigotov. Ta je znašala 1 na 200 posameznikov. Glede na to, da sprememba c.894G>A predstavlja 50-60 % vseh sprememb pri CESD, je predvidena frekvenca heterozigotov za vse spremembe v genu *LIPA* 1 na 100, kar kaže na incidenco 1 na približno 40.000 (22).

V drugi študiji so ocenili prevalenco in frekvenco prenašalcev iste spremembe c.894G>A pri različnih drugih svetovnih populacijah. Najvišje vrednosti, 1 na 300, so določili pri Evropejcih in tudi pri Špancih, nekoliko nižje pri Aškenazi Judih in Azijcih, v populaciji Američanov afriškega porekla sprememb niso opredelili (Preglednica XIII) (24).

Preglednica XIII: Ocenjena frekvenca spremembe c.894G>A in prevalenca CESD v različnih populacijah (24).

Populacija	Frekvenca spremembe c.894G>A	Prevalenca CESD populacije (na milijon)
Evropejci	1 na 300	8
Španci	1 na 300	8
Aškenazi Judje	1 na 500	3
Azijci	1 na 1000	1

Študije splošnega prebivalstva so pokazale, da je frekvenca alela c.894G>A naslednja: 0,0013 pri Evropejcih, 0,0017 v ameriških Špancih, 0,0010 pri ameriških Aškenazi Judih, 0,0005 v Aziji in 0,0000 pri Američanih afriškega porekla (47, 54). Na podlagi predpostavke, da ima 50-70 % otrok in odraslih s pomanjkanjem aktivnosti encima LAL prisotno spremembo c.894G>A, je bilo ocenjeno, da je splošna razširjenost oziroma prevalenca bolezni lahko med 1 na 40.000 in 1 na 300.000 glede na etnično pripadnost in geografsko lokacijo (28, 47). Ta ocena je v nasprotju z majhnim številom primerov pomanjkanja aktivnosti encima LAL, o katerih poročajo v literaturi. To kaže, da je lahko bolezen v znatnem številu spregledana oziroma napačno diagnosticirana, še posebej pri bolnikih z evropskim poreklom. Formalne študije o pojavnosti pomanjkanja aktivnosti LAL encima v Evropi niso bile izvedene. Zdi se, da so pomanjkanju aktivnosti encima LAL najbolj izpostavljeni dojenčki iraškega ali iranskega porekla, s približno incidenco 1 na 4200 v skupnosti v Los Angelesu (55).

Vloga spremembe v genu *LIPA* v heterozigotni obliki na pomanjkanje aktivnosti encima LAL še ni bila podrobno raziskana. Klinična obravnava 13 posameznikov heterozigotnih za spremembo c.894G>A je pokazala spremenjen profil lipidov. Profil je bil podoben tistemu, ki ga vidimo pri hiperholesterolemiji, kar pomeni povečano tveganje za kardiovaskularne bolezni (56). Za nadaljnjo raziskavo je druga študija ocenila pogostost in vpliv heterozigotnosti spremembe IVS8-1G>A (c.894G>A) na ravni lipidov. Pri 13.194 posameznikih evropskega porekla so ocenjevali vpliv delne izgube funkcije gena *LIPA* na tveganje za nastanek miokardnega infarkta ali koronarne bolezni. Ocenjevali so tudi pogostost in vpliv spremembe c.894G>A pri 12.747 bolnikih z miokardnim infarkt ali koronarno boleznijo in pri 14.725 kontrolnih preiskovancih, pri katerih miokardni infarkt ali koronarna bolezen nista bili prisotni (57). V obeh študijah niso opazili povezave med heterozigotnostjo in koncentracijami lipidov v plazmi ter tveganjem za miokardni infarkt oziroma koronarno bolezen. Treba je poudariti, da je bilo število heterozigotov precej majhno, zato bi bile dodatne študije upravičene, saj bi na ta način lahko ugotovili ali heterozigoti razvijejo nekatere klinične značilnosti pomanjkanja aktivnosti encima LAL in imajo lahko posledično večjo nagnjenost za pojav ateroskleroze in motenj delovanja jeter (57).

V eni izmed študij so v skupini 1357 bolnikov s hiperholesterolemijo ocenjevali frekvenco pogostih sprememb v genu *LIPA* (58). Bolniki iz izbrane skupine so imeli prisotne različne vrste dislipidemij. Šest bolnikov je bilo heterozigotov za spremembo c.894G>A. Dva izmed teh sta imela zvišane samo vrednosti holesterola LDL. Heterozigote so nato obravnavali naprej in naredili sekvenčno analizo za preverjanje prisotnosti ostalih sprememb v genu *LIPA*. En bolnik s kombinirano dislipidemijo (zvišane vrednosti holesterola LDL in trigliceridov ter zmanjšane vrednosti holesterola HDL) je bil sestavljen heterozigot za dve spremembi v genu *LIPA*. Med posamezniki, ki so imeli zvišane samo vrednosti holesterola LDL niso našli homozigotov za vzročne spremembe v omenjenem genu. Ocenjevali so prevalenco pomanjkanja aktivnosti encima LAL in ugotovili, da vrednosti nihajo od 1 na 40.000 do 1 na 300.000 posameznikov. Ob uporabi Hardy Weinbergovega ravnovesja, bi pričakovali, da najdemo vsaj enega heterozigota pri 100-274 posameznikih. Pomembno je, da pri sami diagnozi upoštevamo, da je pomanjkanje encima LAL avtosomno recesivna bolezen, medtem ko se družinska hiperholesterolemija deduje avtosomno dominantno (58).

Za določitev pogostosti spremembe c.894G>A v slovenski populaciji bi potrebovali veliko večjo skupino preiskovancev. V skupini preiskovancev, ki smo jih glede na vključitvene kriterije analizirali v tej raziskavi, smo opredelili tri bolnike, ki so imeli prisotno pogosto

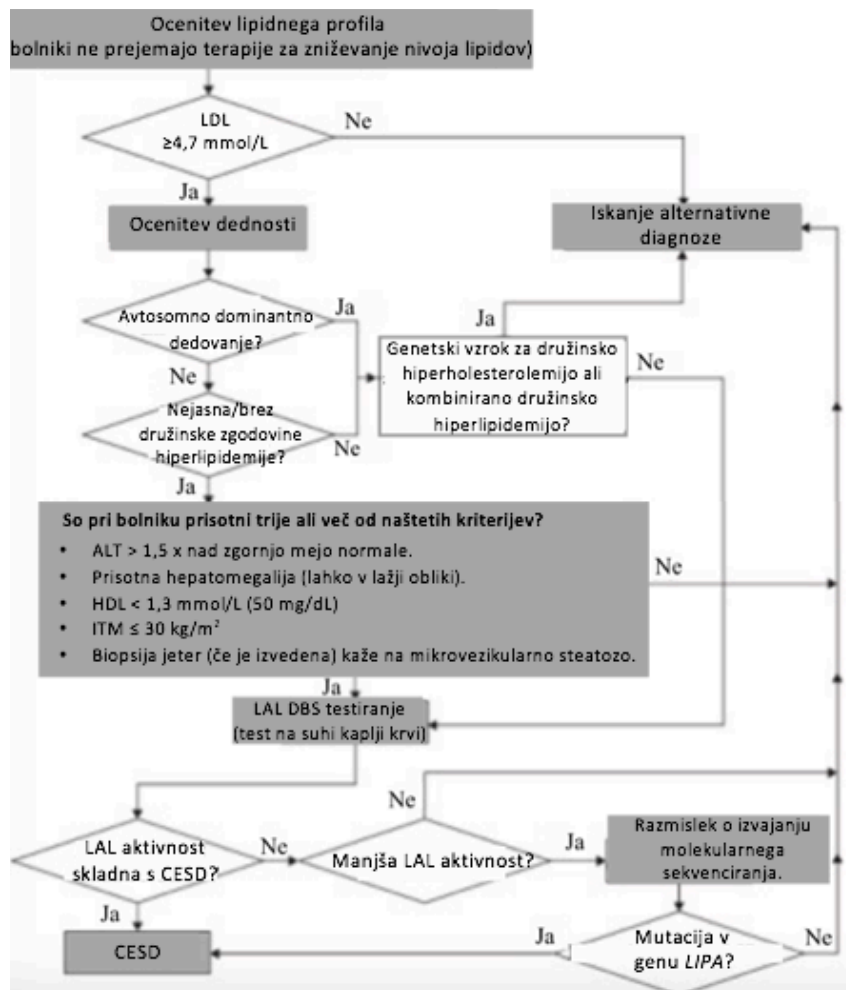
spremembo c.894G>A (p.Gln298=) gena *LIPA* v homozigotni obliki, ki je po podatkih iz literature že opisana kot vzročna sprememba pri bolnikih s CESD (47).

Približna ocena prevalence v naši izbrani skupini otrok bi bila 0,10 (trije oboleli v skupini 30 preiskovancev), ampak bi za točno oceno potrebovali večjo skupino preiskovancev.

5.4 Pomen genetske diagnostike CESD

Priporočljivo bi bilo, da se za vse klinične primere družinske hiperholesterolemije, kjer ni bilo dokazanih sprememb, ki povzročajo to bolezen, preveri še prisotnost vzročne spremembe v genu *LIPA*. To je pomembno predvsem pri otrocih, ki že v zgodnjem otroštvu izkazujejo klinične znake CESD. Na ta način bi lahko v skupini bolnikov s hiperholesterolemijo, ki so bili prepoznani v presejalnem testiranju petletnikov, kasneje lahko prepoznali bolnike, ki imajo dejansko CESD (21). Izkazalo se je, da nosilci heterozigotne spremembe v genu *LIPA* (starši bolnikov s pomanjkanjem aktivnosti encima LAL) običajno ne izkazujejo značilnega fenotipa za hiperholesterolemijo. Iz tega razloga bi bil boljši celotni klinični pristop, torej obširna družinska anamneza ter določitev lipidnega profila tudi pri starših otroka, ki ima prisotno spremembo v omenjenem genu (58). Optimalni pristop bi seveda bil, da bi vsem bolnikom, ki so kot petletniki prepoznani na nacionalnem presejanju za hiperholesterolemijo in se jim določajo vzročne spremembe v genih povezanih z družinsko hiperholesterolemijo s pristopom sekvenciranja naslednje generacije, sočasno v isti analizi določili še vzročne spremembe v genu *LIPA* (61). To bi omogočalo najhitrejšo možno opredelitev genetske diagnoze in s tem tudi zgodnje klinično ukrepanje.

Ker tak pristop v tem trenutku ni na voljo, je smiselno analizo gena *LIPA* izvajati selektivno pri bolnikih z nepojasnjeno dislipidemijo in povečano jetrno funkcijo. To bi vodilo do identifikacije večjega števila bolnikov s CESD, ki nujno potrebujejo ponovno klinično vrednotenje. To bi nato omogočalo drugačno oziroma primernejšo terapijo za dislipidemijo in ustrezna zdravila za preprečevanje kopičenja holesterolnih estrov, rezultat takšnega testa pa je tudi osnova za primerno genetsko svetovanje družini (21). S to magistrsko nalogo smo tako določili postopek sekvenčne analize gena *LIPA*, ki omogoča enostavno in dokončno potrjevanje kliničnega suma na CESD. Seveda je CESD mogoče potrjevati tudi na podlagi merjenja aktivnosti LAL po kriterijih, kot so opisani na sliki 16, vendar ta pristop v Sloveniji trenutno ni na voljo. Rezultati biopsije in radioloških posnetkov se običajno uporabljajo samo kot podpora za diagnozo skupaj z ostalimi rezultati (60).



Slika 16: Kriteriji za presejanje bolnikov s sumom na CESD (prirejeno po 56).

Pri diferencialni diagnozi je potrebno pomisliti tudi na možnost prisotnosti okvare gena *LIPA* v primerih, ko se pri rutinskem testiranju ugotovi nenormalna funkcija jeter pri asimptomatskih bolnikih ali v primerih testiranja na virusni hepatitis (24).

Trenutno obvladovanje CESD se osredotoča predvsem na obvladovanje nivoja lipidov in na izboljšanje reševanja morebitnih zapletov pri delovanju jeter. Trenutni standard za zdravljenje dislipidemije pri bolnikih s CESD so statini, ki pa imajo omejen uspeh (60). Zmanjševanje vrednosti holesterola LDL lahko v teh primerih privede do zvišanja holesterolnih estrov znotraj celic, kar lahko samo še poslabša funkcijo jeter. Potrebujemo torej alternativno, za bolezen specifično zdravljenje. Slednje nam omogoča razvoj nadomestnega zdravljenja s sebelipazo alfa. Gre za terapijski pristop, ki je bil decembra leta 2015 odobren s strani FDA (angl. US Food and Drug Administration). Predlagano je bilo, da bi se lahko za bolnike s fenotipom značilnim za družinsko hiperholesterolemijo, ampak brez prisotnosti vzročnih sprememb v

LDLR, *APOB* in *PCSK9*, izvajalo presejalno testiranje za iskanje sprememb v genu *LIPA*. Na ta način bi identificirali bolnike s CESD, ki bi bili primerni za terapijo z nadomestnim encimom (58, 60).

Glede na klinične, patološke in biokemične študije bolnikov opisanih v literaturi, so podane smernice, kako najboljšo obvladovati napredovanje bolezni. Letni laboratorijski testi naj bi vključevali teste za oceno delovanja jeter (AST, ALT, protrombinski čas, bilirubin), krvno sliko in lipidni profil za oceno prisotnosti dislipidemije. Periodično bi se moralo izvajati tudi slikanje z magnetno resonanco, da se določi volumen jeter in vranice (6).

Iskanje sprememb v genu *LIPA* za dokazovanje CESD se kot presejalna preiskava ne uporablja in je najverjetneje ni smiselno vpeljati glede na redkost bolezni v slovenski populaciji. Smiselna pa je genetska analiza v diferencialno diagnostičnem postopku, pri bolnikih s hiperholesterolemijo pri katerih nismo določili vzročne spremembe v genih *LDLR*, *APOB* ali *PCSK9*. V primerih, ko se izključijo najpogostejši vzroki za hiperholesterolemijo in ustrezni klinični sliki, pa se tako priporoča opravljanje molekularno genetskega testa za iskanje sprememb v genu *LIPA*.

Zgodnja identifikacija bolnikov s CESD je pomembna predvsem s kliničnega vidika. Če je bolezen prisotna, se lahko uvede ustrezno zdravljenje. Predvidevamo lahko, da bo v prihodnosti nadomestna terapija z rekombinantnim encimom LAL dostopna kot preverjena terapevtska metoda.

6. SKLEPI

V magistrski nalogi smo na podlagi rezultatov sekvenčne analize in podatkov pridobljenih iz literature potrdili hipotezo, da so v genu *LIPA* pri preiskovancih s sumom na CESD prisotne spremembe, ki povzročajo bolezen kopičenja holesterolnih estrov. Nivoji celokupnega holesterola, holesterola LDL in holesterola HDL ter serumskih transaminaz so povezani s specifičnimi genetskimi spremembami v genu *LIPA*.

V raziskavi smo dosegli tudi naslednje specifične cilje:

- V izbrani skupini 30 preiskovancev brez prisotne vzročne spremembe v genih *LDLR*, *APOB* in *PCSK9* in s zvišanimi vrednostmi serumskih transaminaz smo pri treh bolnikih v kodirajoči regiji gena *LIPA* opredelili vzročno spremembo p.Gln298= (c.894G>A) v homozigotni obliki. Gre za spremembo, ki je opisana kot najpogostejši vzrok za klinično sliko bolnikov s CESD.
- V analiziranih regijah gena *LIPA* smo opredelili še dodatne spremembe. Spremembi p.Thr16Pro in c.539-5C>T po trenutno dostopni literaturi ne povezujejo z boleznijo kopičenja holesterolnih estrov ali z zapleti povezani z njo. Sprememba p.Gly23Arg lahko prispeva k razvoju debelosti.
- Glede na preiskovano skupino je bil delež bolnikov s homozigotno spremembo v genu *LIPA* 10 %. Za določitev pogostosti spremembe p.Gln298= (c.894G>A) in oceno deleža bolnikov s CESD v slovenski populaciji bi potrebovali veliko večjo skupino in drugačen izbor preiskovancev.

Na osnovi rezultatov sklepamo, da bi bilo za vse klinične primere hiperholesterolemije, kjer ni bilo dokazanih vzročnih sprememb za družinsko hiperholesterolemijo in so prisotne zvišane vrednosti transaminaz, priporočljivo rutinsko preverjati tudi prisotnost vzročnih sprememb v genu *LIPA*.

VIRI

1. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/LIPA#resources> (dostopano 22.11.2017)
2. Aslanidis C, Ries S, Fehringer P, Buchler C, Klima H, Schmitz G: Genetic and biochemical evidence that CESD and Wolman disease are distinguished by residual lysosomal acid lipase activity. *Genomics* 1996; 33(1): 85-93.
3. Anderson R, Byrum R, Coates P, Sando G. Mutations at the lysosomal acid cholesteryl ester hydrolase gene locus in Wolman disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994; 91: 2718-2722.
4. Ameis D, Brockmann G, Knoblich R, Merkel M, Ostlund E. R, Yang WJ, Coates P, Cortner J, Feinman VS, Greten H: A 5' splice-region mutation and a dinucleotide deletion in the lysosomal acid lipase gene in two patients with cholesteryl ester storage disease. *Journal of Lipid Research* 1995; 36: 241-248.
5. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/LIPA> (dostopano 22.11.2017)
6. Bernstein LD, Hulkova H, Bialer GM, Desnick RJ: Cholesteryl ester storage disease: Review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease. *Journal of Hepatology* 2013; 58: 1230-1243.
7. <http://www.merckmanuals.com/professional/endocrine-and-metabolic-disorders/lipid-disorders/overview-of-lipid-metabolism> (dostopano 2.12.2017)
8. <http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Holesterol> (dostopano 2.12.2017)
9. <https://www.britannica.com/science/lipid> (dostopano 2.12.2017)
10. <https://themedicalbiochemistrypage.org/cholesterol.php> (dostopano 10.12.2017)
11. Myant N. B: Cholesterol metabolism. *Journal of Clinical Pathology* 1973; 5: 1-4.
12. http://chemistry.gravitywaves.com/CHE450/16_Cholesterol.htm
(dostopano 10.12.2017)
13. Lohse P, Chahrokh-Zadeh S, Lohse P, Seidel D: Human lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase and human gastric lipase: identification of the catalytically active serine, aspartic acid, and histidine residues. *Journal of Lipid Research* 1997; 38: 892-903.
14. Jeon TI, Osborne TF. SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2012; 23: 65-72.

15. Bayly RG: Diagnostic criteria for familial hypercholesterolemia (FH): Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects (Third Edition), Churchill Livingstone 2014: 702-736.
16. Cummings MH, Watts GF. Increased hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in cholesteryl ester storage disease. Clinical Chemistry 1995; 41: 111-114.
17. Ameis D, Merkel M, Eckerskorn C, Greten H. Purification, characterization and molecular cloning of human hepatic lysosomal acid lipase. Journal of Biochemistry 1994; 219: 905-914.
18. Anderson R, Sando G. Cloning and expression of cDNA encoding human lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase. Journal of Biological Chemistry 1991; 266(33): 22479-22484.
19. Dubland AJ, Francis AG: Lysosomal acid lipase: at the crossroads of normal and atherogenic cholesterol metabolism. Cell and developmental biology 2015; 3(3): 1-10.
20. Pagani F, Pariyarath R, Garcia R, Stuani C, Burlina A, Ruotolo G, Rabusin M, Baralle F: New lysosomal acid lipase gene mutants explain the phenotype of Wolman disease and cholesteryl ester storage disease. Journal of Lipid Research 1998; 39(7): 1382-1388.
21. Chora RJ, Alves CA, Medeiros MA, Mariano C, Lobarinhas G, Guerra A, Mansilha H, Cortez-Pinto H, Bourbon M: Lysosomal acid lipase deficiency: A hidden disease among cohorts of familial hypercholesterolemia? Journal of Clinical Lipidology 2017; 11: 477-484.
22. https://www.genedx.com/wp-content/uploads/2013/02/info_sheet_lipa.pdf (dostopano 13.1.2018)
23. <http://arup.utah.edu/media/lysosomalALipase/Lysosomal%20acid%20lipase%20deficiency.pdf> (dostopano 10.1.2018)
24. Su K, Donaldson E, Sharma R: Novel treatment options for lysosomal acid lipase deficiency: critical appraisal of sebelipase alfa. The Application of Clinical Genetics 2016; 9: 157-166.
25. Morris E. G, Braund P, Moore S. J, Samani N, Codd V, Webb T. Coronary artery disease-Associated *LIPA* coding variant rs1051338 reduces lysosomal acid lipase

- levels and activity in lysosomes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2017; 37: 1050-1057.
26. <https://ommbid.mhmedical.com/data/books/971/ch142fg1.png>
(dostopano 10.1.2018)
27. Hamilton J, Jones I, Srivastava R, Galloway P. A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalistat 2. *Clinica Chimica Acta* 2012; 413: 1207-1210.
28. Scott SA, Liu B, Nazarenko I, Martis S, Kozlitina J, Yang Y, et al. Frequency of the cholesteryl ester storage disease common LIPA E8SJM mutation (c.894G>A) in various racial and ethnic groups. *Hepatology* 2013; 58: 958-965.
29. Hulkova H, Elleder M. Distinctive histopathological features that support a diagnosis of cholesterol ester storage disease in liver biopsy specimens. *Histopathology* 2012; 60: 1107-1113.
30. Thelwall E. P, Smith E. F, Leavitt C. M, Canty D, Hu W, Hollingsworth G. K, Thoma C, Trenell IM, Taylor R, Rutkowski VJ, Blamire MA, Quinn GA: Hepatic cholesteryl ester accumulation in lysosomal acid lipase deficiency: Non-invasive identification and treatment monitoring by magnetic resonance. *Journal of Hepatology* 2013; 59(3): 543-549.
31. Quinn AG, Burton B, Deegan P, Di Rocco M, Enns GM, Guardamagna O, et al. Sustained elevations in LDL cholesterol and serum transaminases from early childhood are common in lysosomal acid lipase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 2014; 111: S89.
32. Abello F, Guardamagna O, Baracco V, Bonardi R. The treatment of colesteryl storage disease (CESD) by ezetimibe monotherapy. *Atherosclerosis Supplements Journal* 2010; 11: 28.
33. Xu M, Liu K, Swaroop M, Porter FD, Sidhu R, Firnkes S, et al. d-Tocopherol reduces lipid accumulation in Niemann Pick type C1 and Wolman cholesterol storage disorders. *Journal of Biological Chemistry* 2012; 287: 39349-39360.
34. Tolar J, Petryk A, Khan K, Bjoraker KJ, Jessurun J, Dolan M, et al. Long-term metabolic, endocrine, and neuropsychological outcome of hematopoietic cell transplantation for Wolman disease. *Bone Marrow Transplantat* 2009; 43: 21-7.

35. Grabowski GA. Therapy for lysosomal acid lipase deficiency: replacing a missing link. *Hepatology* 2013; 58: 850-852.
36. Du H, Schiavi S, Wan N, Levine M, Witte DP, Grabowski GA. Reduction of atherosclerotic plaques by lysosomal acid lipase supplementation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004; 24: 147–154.
37. http://en.pharmacodia.com/web/drug/1_1567.html (dostopano 8.1.2018)
38. Bowden KL, Bilbey NJ, Bilawchuk LM, Boadu E, Sidhu R, Ory DS, Du H, Chan T, Francis GA. Lysosomal acid lipase deficiency impairs regulation of ABCA1 gene and formation of high density lipoproteins in cholesteryl ester storage disease. *Journal of Biological Chemistry* 2011; 286: 30624–30635.
39. <http://m.mf.uni-lj.si/dokumenti/0a3bd1df2e66c9c75385ab17ed124de8.pdf>
40. http://www.fairbiotech.com/shopping_show-2a16832a590a2a.html
41. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/molecular-biology-products.html?TablePage=9619242>
42. <https://www.zrss.si/bzid/geni/pdf/drobnic-clanek.pdf> (dostopano 24.3.2018)
43. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (dostopano 24.11.2017)
44. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3988> (dostopano 24.11.2017)
45. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> (dostopano 8.1.2018)
46. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=lipa> (dostopano 24.11.2017)
47. Muntoni S, Wiebusch H, Jansen-Rust M, Rust S, Seedorf U, Schulte H, et al. Prevalence of cholesteryl ester storage disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2007; 27: 1866-1868.
48. Fasano T, Pisciotta L, Bocchi L, Guardamagna O, Assandro P, Rabacchi C, Zanoni P, Filocamo M, Bertolini S, Calandra S: Lysosomal lipase deficiency: Molecular characterization of eleven patients with Wolman or cholesteryl ester storage disease. Elsevier, *Molecular Genetics and Metabolism* 2012; 105: 450-456.
49. Uršič-Bratina N, Saje-Hribar N, Bratanič N, Žerjav-Tanšek N, Berce V, Kržišnik C, Battelino T. Presejalno določanje holesterola pri pet let starih otrocih v Sloveniji. *Zdravstveni vestnik* 2003; 72: 7-10.
50. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/docs/rs_attributes.html#gmaf (dostopano 10.12.2017)
51. Guenard F, Houde A, Bouchard L, Tchernof A, Deshaies Y, Biron S, Lescelleur O, Biertho L, Marceau S, Perusse L, Vohl MC: Association of *LIPA* Gene

- Polymorphism With Obesity-Related Metabolic Complication Among Severely Obese Patients. *Obesity Journal* 2012; 20: 2075-2082.
52. Zhang L, Leng Q, Mixson AJ. Alteration in the IL-2 signal peptide affects secretion of proteins in vitro and in vivo. *The Journal of Gene Medicine* 2005; 7: 354–365.
53. Bruch MD, McKnight CJ, Gierasch LM. Helix formation and stability in a signal sequence. *Biochemistry* 1989; 28: 8554–8561.
54. Lohse P, Maas S, Elleder M, Kirk JM, Besley GT, Seidel D. Compound heterozygosity for a Wolman mutation is frequent among patients with cholesteryl ester storage disease. *Journal of Lipid Research* 2000; 41: 23-31.
55. Valles-Ayoub Y, Esfandiari S, No D, Sinai P, Khokher Z, Kohan M, et al. Wolman disease (*LIPA* p.G87V) genotype frequency in people of Iranian-Jewish ancestry. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 2011; 15: 395-398.
56. Muntoni S, Wiebusch H, Jansen-Rust M, Rust S, Schulte H, Berger K, et al. Heterozygosity for lysosomal acid lipase E8SJM mutation and serum lipid concentrations. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2013; 23: 732-736.
57. Stitzel NO, Fouchier SW, Sjouke B, Peloso GM, Moscoso AM, Auer PL, et al. Exome sequencing and directed clinical phenotyping diagnose cholesterol ester storage disease presenting as autosomal recessive hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2013; 33: 2909-2914.
58. Sjouke B, Defesche JC, Randamie J, Wiegman A, Fouchier S, Hovingh GK. Sequencing for *LIPA* mutations in patients with clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2016; 251: 263-265.
59. <http://www.geneplanet.si/genetika/slovarcek-genetskih-pojmov/prevalenca/> (dostopano 19.3.2018)
60. Reiner Ž, Guardamagna O, Nair D, Soran H, Hovingh K, Bertolini S, Jones S, Ćorić M, Calandra S, Hamilton J, Eagleton T, Ros E: Lysosomal acid lipase deficiency – An under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. Elsevier 2014; 235: 21-30.
61. Klančar G, Grošelj U, Kovač J, Bratanič N, Bratina N, Trebušak Podkrajšek K, Battelino T. Universal Screening for Familial Hypercholesterolemia in Children. *Journal of the American College of Cardiology* 2015; 66(11): 1250-1257.

62. <http://www.hgvs.org/mutnomen/> (dostopano 27.3.2018)
63. http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html (dostopano 27.3.2018)
64. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> (dostopano 27.3.2018)
65. <http://www.mutationtaster.org> (dostopano 27.3.2018)
66. <http://www.slora.si/definicije-kazalnikov-in-metod> (dostopano 21.4.2018)
67. Must A, Anderson SE. Pediatric mini review: Body mass index in children and adolescents: considerations for population-based applications. *International Journal of Obesity* 2006; 30: 590-594.