

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

DISERTAČNÍ PRÁCE

**VÝZKUM VARIABILITY  
TRANSKRIPČNÍCH REGULAČNÍCH  
OBLASTÍ *LPA* GENU**

Mgr. Kateřina Zídková

2007

III.interní klinika 1.LF UK a VFN v Praze

**VÝZKUM VARIABILITY TRANSKRIPČNÍCH  
REGULAČNÍCH OBLASTÍ *LPA* GENU**

Mgr. Kateřina Zídková

Školitel:

Prof. MUDr. Richard Češka, CSc.

Školitel konzultant:

Doc. MUDr. Milada Kohoutová, CSc.

Praha 2007

# PODĚKOVÁNÍ

Práce byla vypracována v laboratořích molekulární genetiky na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1.LF UK a VFN Praha ve spolupráci s III.interní klinikou 1.LF UK a VFN Praha. Především bych chtěla poděkovat svému školiteli Prof. MUDr. Richardu Češkovi, CSc. a přednostce ústavu ÚBLG Doc. MUDr. Miladě Kohoutové, CSc. za odborné vedení, podporu a cenné rady a připomínky.

Rovněž bych chtěla poděkovat Ing. Jitce Štekrové, Ing. Věře Kebrdlové a Ing. Aleši Hořínkovi z ÚBLG za jejich ochotu, odbornou pomoc a inspiraci při řešení dílčích problémů disertační práce.

Dále děkuji MUDr. Michalovi Vrablíkovi, CSc. z III.interní kliniky především za pomoc a věcné rady týkající se přípravy publikací a MUDr. Lukášovi Zlatohlávkovi z III.interní kliniky za pomoc s analýzou a interpretací klinických dat.

Také bych chtěla poděkovat Martině Řezníčkové, Monice Škodové a Markétě Děkanovské z laboratoře molekulární genetiky ÚBLG za ochotu a pomoc při práci v laboratoři a dále paní Marii Kvasilové a paní Renatě Procházkové z lipidologické laboratoře III.interní kliniky, kde byla provedena izolace DNA a stanoveny hladiny lipoproteinu(a).

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své kamarádce Mgr. Janě Vandrovcové, PhD. a svým kolegům a kolegyním Mgr. Martině Šulové, Mgr. Markétě Urbanové a Mgr. Zdeňkovi Musilovi za mnoho cenných a podnětných diskuzí při řešení problémů spojených s vypracováním disertační práce a za příjemnou atmosféru v milém kolektivu.

## SYMBOLY A ZKRATKY

|                  |   |
|------------------|---|
| ANOVA            | analýza rozptylu (analysis of variance)                                       |
| apo              | apolipoprotein  |
| C/EBP            | CCAAT/enhancer binding protein  |
| c-Ets            | v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog                             |
| DGGE             | denaturační gradientová gelová elektroforéza                                  |
| dNTP             | deoxyribonukleotidtrifosfát   |
| ER               | endoplazmatické retikulum   |
| HDL              | high density lipoprotein (lipoprotein o velké hustotě)                        |
| HGF              | hepatocyte growth factor (hepatický růstový faktor)                           |
| HNF-1 $\alpha$   | hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ (jaterní jaderný faktor typ 1 $\alpha$ ) |
| IDL              | intermediate density lipoprotein (lipoprotein o střední hustotě)              |
| ICHS             | ischemická choroba srdce  |
| IL-6             | interleukin 6   |
| K                | kringlová doména  |
| K <sub>LPA</sub> | kringlová doména <i>LPA</i> genu  |
| LAL              | lysosomal acid lipase (lyzozomální kyselá lipáza)                             |
| LD               | linkage disequilibrium (vazebná nerovnováha)                                  |
| LDL              | low density lipoprotein (lipoprotein o nízké hustotě)                         |
| LDLR             | LDL receptor  |
| LF-A1            | liver factor A1   |
| LINE-1           | long interspersed nuclear element type1                                       |
| Lp(a)            | lipoprotein(a)  |
| <i>LPA</i>       | označení genu pro apo(a)  |
| LRP              | LDL receptor-related protein (receptor pro chylomikronové remnanty)           |
| MDBP             | methylated DNA-binding protein  |
| NF $\kappa$ B    | nuclear factor $\kappa$ B (jaderný faktor $\kappa$ B)                         |
| Oct-1            | octamer-binding transcription factor 1  |
| PCR              | polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)                      |
| <i>PLG</i>       | označení genu pro plazminogen   |
| PPAR $\alpha$    | peroxisome proliferator-activated receptor alpha                              |
| RXR $\alpha$     | retinoid X receptor alpha   |

|              |   |
|--------------|---|
| S.D.         | standard deviation (standardní odchylka)                                    |
| Sp1          | specificity protein 1   |
| STR          | short tandem repeat (krátká tandemová repetice; mikrosatelit)               |
| TF           | tissue factor (tkáňový faktor)  |
| TFPI         | tissue factor pathway inhibitor (inhibitor tkáňového faktoru)               |
| TGF- $\beta$ | transforming growth factor $\beta$ (transformační růstový faktor- $\beta$ ) |
| TGT3         | thyroid transcription factor I (tyroidní transkripční faktor I)             |
| t-PA         | tissue-type plasminogen activator (tkáňový aktivátor plazminogenu)          |
| u-PA         | urokinase-type plasminogen activator (urokinázový aktivátor plazminogenu)   |
| VLDL         | very low density lipoprotein (lipoprotein o velmi nízké hustotě)            |

aminokyseliny a jejich použité zkratky

| <b>název aminokyseliny</b> | <b>zkratka</b> | <b>jednopísmenné označení</b> |
|----------------------------|----------------|-------------------------------|
| alanin                     | Ala            | A                             |
| arginin                    | Arg            | R                             |
| asparagin                  | Asn            | N                             |
| asparagová kyselina        | Asp            | D                             |
| cystein                    | Cys            | C                             |
| fenylalanin                | Phe            | F                             |
| glutamin                   | Gln            | Q                             |
| glutamová kyselina         | Glu            | E                             |
| glycin                     | Gly            | G                             |
| histidin                   | His            | H                             |
| izoleucin                  | Ile            | I                             |
| leucin                     | Leu            | L                             |
| lyzin                      | Lys            | K                             |
| metionin                   | Met            | M                             |
| prolin                     | Pro            | P                             |
| serin                      | Ser            | S                             |
| treonin                    | Thr            | T                             |
| tryptofan                  | Trp            | W                             |
| tyrozin                    | Tyr            | Y                             |
| valin                      | Val            | V                             |

# OBSAH

|  |    |
|--|----|
| I. ÚVOD.....   | 8  |
| II. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....  | 10 |
| II.1. ATEROSKLERÓZA .....  | 10 |
| II.1.1. ZÁKLADNÍ FORMY .....   | 10 |
| II.1.1.1. Časné léze neboli tukové proužky .....                       | 10 |
| II.1.1.2. Fibrózní pláty (ateromy).....                                | 10 |
| II.1.1.3. Komplikované léze.....                                       | 10 |
| II.1.2. TEORIE VZNIKU ATEROSKLERÓZY .....                              | 11 |
| II.1.2.1. Ateroskleróza jako „odpověď“ na poškození“ .....             | 11 |
| II.1.2.2. Ateroskleróza jako „odpověď“ na infiltraci lipidy“ .....     | 11 |
| II.1.2.3. Ateroskleróza jako „odpověď“ na zadržení“ .....              | 12 |
| II.1.3. RIZIKOVÉ FAKTORY ATEROSKLERÓZY .....                           | 12 |
| II.1.4. LIPOPROTEINOVÉ ČÁSTICE.....                                    | 13 |
| II.2. LIPOPROTEIN(a).....  | 14 |
| II.2.1. ÚVOD .....   | 14 |
| II.2.2. <i>LPA</i> LOKUS.....  | 16 |
| II.2.2.1. Struktura <i>LPA</i> lokusu .....                            | 16 |
| II.2.2.2. Hypotéza vzniku délkového polymorfizmu kringlu IV typ 2..... | 17 |
| II.2.2.3. Sekvenční varianty .....                                     | 19 |
| II.2.2.3.1. Regulační oblasti .....                                    | 19 |
| II.2.2.3.1.1. Promotor.....  | 19 |
| II.2.2.3.1.2. DHII zesilovač .....                                     | 21 |
| II.2.2.3.1.3. DHIII zesilovač .....                                    | 22 |
| II.2.2.3.2. Kringlové domény .....                                     | 22 |
| II.2.2.3.3. Nulové alely .....   | 24 |
| II.2.2.4. Místo fyziologické exprese <i>LPA</i> genu .....             | 26 |
| II.2.2.5. Apolipoprotein(a) v evoluci.....                             | 26 |
| II.2.3. ČÁSTICE LIPOPROTEINU(a) .....                                  | 26 |
| II.2.3.1. Interakce apoB a apo(a).....                                 | 26 |
| II.2.3.2. Vazebná místa.....   | 27 |
| II.2.3.3. Koncentrace Lp(a).....                                       | 29 |
| II.2.3.3.1. Co určuje hladinu Lp(a).....                               | 30 |
| II.2.3.3.1.1. Hormony a růstové faktory .....                          | 30 |
| II.2.3.3.1.2. Syntéza apolipoproteinu(a) .....                         | 31 |
| II.2.3.3.1.2.1. Transkripce .....                                      | 31 |
| II.2.3.3.1.2.2. Translace a postranlační modifikace .....              | 31 |
| II.2.3.3.1.2.3. Proteozomální degradace .....                          | 32 |
| II.2.3.3.1.3. Katabolizmus.....  | 33 |
| II.2.3.3.2. Mezipopulační rozdíly .....                                | 34 |
| II.2.3.3.2.1. Africké populace.....                                    | 34 |
| II.2.3.3.2.2. Asijské populace.....                                    | 35 |
| II.2.3.3.2.3. Kavkazské populace .....                                 | 35 |
| II.2.3.4. Patologický účinek Lp(a) .....                               | 36 |
| II.2.3.4.1. Časná stadia onemocnění.....                               | 36 |
| II.2.3.4.2. Pozdní stadia onemocnění .....                             | 37 |
| II.2.3.5. Fyziologická funkce Lp(a).....                               | 38 |
| III. MATERIÁL A METODY .....   | 41 |
| III.1. SOUBOR .....  | 41 |
| III.2. KONCENTRACE LP(a) .....   | 41 |

|   |     |
|---|-----|
| III.3. IZOLACE DNA .....  | 43  |
| III.4. ROZTOKY PRO DGGE ANALÝZU .....   | 43  |
| III.5. AMPLIFIKAČNÍ REAKCE .....  | 45  |
| III.5.1. AMPLIFIKACE DHIII ZESILOVAČE .....                                     | 45  |
| III.5.2. SEKVENAČNÍ REAKCE .....  | 45  |
| III.6. GENETICKÝ ANALYZÁTOR .....   | 46  |
| III.6.1. PODMÍNKY SEKVENAČNÍ ANALÝZY .....                                      | 46  |
| III.6.2. PODMÍNKY ANALÝZY STR LOKUSU .....                                      | 47  |
| III.7. STATISTIKA .....   | 47  |
| III.8. SOFTWARE A DATABÁZE .....  | 47  |
| IV. VÝSLEDKY .....  | 48  |
| IV.1. AMPLIFIKAČNÍ REAKCE .....   | 48  |
| IV.1.1. PRIMÉRY .....   | 48  |
| IV.1.2. PCR REAKCE .....  | 50  |
| IV.1.2.1. Složení PCR reakce .....  | 50  |
| IV.1.2.2. Podmínky PCR reakce .....   | 52  |
| IV.2. DETEKČNÍ ANALÝZY .....  | 53  |
| IV.2.1. DGGE ANALÝZA .....  | 53  |
| IV.2.1.1. Teplotní domény .....   | 53  |
| IV.2.1.2. Optimalizace DGGE analýzy .....                                       | 58  |
| IV.2.1.3. Podmínky DGGE analýzy .....   | 59  |
| IV.2.2. RESTRIKČNÍ ANALÝZA .....  | 60  |
| IV.2.3. FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA .....  | 61  |
| IV.2.4. ALELICKY SPECIFICKÁ PCR .....   | 61  |
| IV.3. VÝSLEDKY ANALÝZ .....   | 62  |
| IV.3.1. PROMOTOR .....  | 62  |
| IV.3.1.1. Polymorfismus +121G/A a +93C/T .....                                  | 63  |
| IV.3.1.2. Vzácné sekvenční varianty promotoru .....                             | 65  |
| IV.3.1.3. Detekce promotorových variant v populačním souboru .....              | 66  |
| IV.3.1.4. Fragmentační analýza STR polymorfizmu .....                           | 67  |
| IV.3.2. DHIII ZESILOVAČ .....   | 68  |
| IV.3.2.1. Polymorfismus -1230A/G (fragment A) .....                             | 70  |
| IV.3.2.2. Polymorfismus -1617C/A (fragment B) .....                             | 71  |
| IV.3.2.3. Vzácné sekvenční varianty DHIII zesilovače .....                      | 72  |
| IV.3.2.4. Detekce polymorfních variant DHIII zesilovače v populačním souboru .. | 75  |
| IV.3.3. DHII ZESILOVAČ .....  | 76  |
| IV.4. SLOŽENÉ GENOTYPY .....  | 77  |
| IV.5. VAZEBNÁ NEROVNOVÁHA .....   | 80  |
| IV.6. STATISTICKÁ HODNOCENÍ .....   | 80  |
| IV.6.1. HARDY-WEINBERGOVA ROVNOVÁHA .....                                       | 80  |
| IV.6.2. ROZDÍLY FREKVENCE ALEL- $\chi^2$ TEST .....                             | 82  |
| IV.6.2.1. Mezi kvintily .....   | 82  |
| IV.6.2.2. Mezi kvintily a populačním souborem .....                             | 83  |
| IV.6.3. ASOCIACE LP(a) A SLOŽENÝCH GENOTYPŮ .....                               | 83  |
| V. DISKUZE .....  | 84  |
| VI. ZÁVĚR .....   | 92  |
| VII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....  | 93  |
| VIII. PŘÍLOHY .....   | 108 |
| VIII.1. PUBLIKACE PRÁCE .....   | 108 |
| VIII.2. PREZENTACE PRÁCE .....  | 109 |



## **I. ÚVOD**

Aterosklerotická onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí v moderní společnosti. Podle zprávy Světové zdravotnické organizace (WHO) se nemoci oběhové soustavy podílely na celkové úmrtnosti v roce 2005 více než 51%. Vzhledem k zátěži jakou toto onemocnění pro současnou společnost představuje mu je věnována i odpovídající pozornost ze strany vědců a lékařů.

Ateroskleróza je progresivní onemocnění cévní stěny. Mechanismem vzniku je ukládání tukových depozit do subendoteliální vrstvy cév. Rozšiřující se stěna prominuje do vnitřního prostoru cévy a v konečném stadiu ho zcela uzavírá. Tento proces bývá uspišen tvorbou krevních sraženin. Důsledkem je přerušování krevního zásobování příslušné části tkáně. V případě poškození mozkových a koronárních cév může mít onemocnění smrtelné následky.

Tuková depozita pocházejí z lipoproteinových částic. Jedná se o transportní systém pro v krvi nerozpustné lipidy. Koncentrace lipoproteinových částic v krvi je určována řadou endogenních i exogenních faktorů. Poruchy, které narušují jejich složení či metabolismus, mohou mít patologický účinek. Nefyziologické hladiny lipoproteinových částic jsou jedním z hlavních rizikových faktorů při rozvoji aterosklerotických lézí.

Aterosklerózu lze bezpochyby brát do určité míry za fyziologický projev stárnutí, nicméně její vysoká prevalence v západní společnosti je způsobena přijetím životního stylu spojeného s řadou rizikových návyků (příjem potravy s vysokým obsahem živočišných tuků, nízká fyzická aktivita, kouření, apod.). Rizikové faktory lze rozdělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi neovlivnitelné faktory patří genetická predispozice. Genetická predispozice sama o sobě či v kombinaci s ostatními rizikovými faktory je schopna vyvolat předčasný nástup klinických projevů onemocnění (u mužů < 55 let, u žen < 65 let).

Vývoj aterosklerózy je závislý na celé řadě genů s malým či velkým příspěvkem. Současný výzkum se soustředil na hledání rizikových alel těchto genů. Ve středu zájmu jsou především geny, jejichž produkty ovlivňují strukturu a metabolismus lipoproteinových částic. Ze základních lipoproteinů (chylomikrony, VLDL, IDL, LDL, HDL) má nejvyšší aterogenní potenciál LDL částice. Hladiny LDL částic jsou proto u rizikových osob pod přísnou kontrolou.

Dalším v podstatě geneticky determinovaným nezávislým rizikovým faktorem je zvýšená hladina lipoproteinu(a), jehož fyziologická funkce nebyla doposud zcela

objasněna. Lipoprotein(a) je tvořen LDL částicí, která se kovalentně váže se specifickým proteinem apolipoproteinem(a). Patologický účinek lipoprotein(a) je zdá se dvojího charakteru. Částice svou schopností vázat se do cévní stěny přispívají k aterosklerotickému hromadění tuků a současně prostřednictvím apolipoprotein(a), který je nefunkční homolog plazminogenu, zamezují fibrinolýze a podporují přetrvávání trombu. Lipoprotein(a) se tak aktivně účastní obou hlavních dějů uzavírajících lumen cévy: aterosklerózy a trombózy.

Koncentrace lipoprotein(a) je téměř pod výhradní kontrolou jediného lokusu, kterým je gen kódující apolipoprotein(a). Plazmatické hladiny lipoprotein(a) jsou určovány mírou jeho syntézy. Za velké rozpětí hladin lipoprotein(a) v populaci je částečně zodpovědný variabilní počet kringlových domén obsažených v genu pro apolipoprotein(a). Rozdílná produkce apolipoprotein(a) může být rovněž způsobena přítomností sekvenčních změn jak v kódujících, tak v regulačních oblastech genu pro apolipoprotein(a).

Cílem práce bylo určit míru variability v doposud popsaných regulačních oblastech genu pro apolipoprotein(a), u nalezených polymorfních lokusů stanovit míru genetické vazby a jejich vztah k hladině lipoprotein(a). Práce tak významně přispívá k výzkumu tohoto lipoproteinu v České republice.

## **II.LITERÁRNÍ PŘEHLED**

### **II.1.ATEROSKLERÓZA**

#### **II.1.1.ZÁKLADNÍ FORMY**

Ateroskleróza je dlouhodobé onemocnění cévní stěny. Klinicky se nejčastěji manifestuje jako ischemická choroba srdeční (ICHS), infarkt myokardu a cévní mozková příhoda, ale postiženy mohou být i jiné oblasti cévního systému. Jedná se o komplexní onemocnění s celou řadou rizikových faktorů ať už genetického, endogenního či environmentálního charakteru. V současné době se rozlišují tři základní formy a současně stadia vzniku aterosklerózy: časná léze, fibrózní a ateromové pláty a komplikované léze (Češka,1999).

##### **II.1.1.1.Časná léze neboli tukové proužky**

Léze jsou lokalizovány do intimy (subendoteliální vrstva cévní stěny) velkých cév. Tato časná stadia nemají vliv na průtok krve. Základním buněčným elementem jsou pěnové buňky (Lawn *et al.*,1992) vznikající akumulací lipidů, především esterů cholesterolu, ve velkých vakuolách makrofágů a buněk hladké svaloviny cév (Sakai *et al.*,1996). Makrofágy mají původ v monocytech, které jsou k poškozené cévní stěně chemicky přitahovány (Weijenberg *et al.*,1996; Szalai *et al.*,2001). Tukové proužky nejsou stabilním poškozením cévní stěny, během života může dojít k jejich regresi nebo se dále vyvíjet.

##### **II.1.1.2.Fibrózní pláty (ateromy)**

Jedná se o větší, často ostře ohraničená ložiska prominující do lumina arterií, kde způsobují zesílení cévní stěny na úkor jejich průsvitu. Charakteristická je přítomnost velkého množství proliferujících buněk hladké svaloviny a makrofágů v různém stadiu přeměny v pěnové buňky. Okolní hmotu tvoří kolagenní matrix a volná depozita tuků (Öörni *et al.*,2000). Hlubší vrstvy mohou podléhat nekróze a následné kalcifikaci.

##### **II.1.1.3.Komplikované léze**

Ke stadiu komplikací dochází v případě masivní kalcifikace fibrózních plátů s těžkými degenerativními změnami cévní stěny (ulcerace, ruptura). Tato místa jsou cílem

nasedajících trombocytů, jejich agregace a organizace trombu (Weijnenberg *et al.*,1996). Trombóza je nejčastější příčinou náhlého uzavření cévy.

## II.1.2. TEORIE VZNIKU ATEROSKLERÓZY

Na rozvoji aterosklerotických lézí se podílí celá řada dějů, nicméně který z nich je rozhodující, je předmětem mnoha diskuzí. Primárním mechanismem vzniku aterosklerózy by mohlo být jak poškození epitelu cév, tak dysfunkce metabolismu lipidů. Současné názory lze shrnout do tří hypotéz (Williams a Tabas,1995):

### II.1.2.1. Ateroskleróza jako „odpověď na poškození“

Vznik aterosklerózy úzce souvisí se zdravotním stavem cévního epitelu a složením extracelulární matrix (Ismail *et al.*,1994; Augé *et al.*,1996). Periferní řečiště je postihováno především v místech větvení, kde je epitel nejvíce namáhán (Herrmann *et al.*,1994). Kromě mechanického poškození může dojít i k působení chemických, imunologických, degenerativních, metabolických či infekčních faktorů (*Cytomegalovirus*, bakterie *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Porphyrromonas gingivalis*).

Deskvamace epitelu a narušení intaktní vrstvy povrchových buněk je touto tezí považováno za klíčový děj při vzniku tukových proužků (Ross,1993). Řada prací však odhalila, že jen komplikované léze v pokročilém stadiu ztrácejí svou epiteliální ochranu (Chang *et al.*,1992; Stary *et al.*,1994). Novější verze této hypotézy proto počítá s poškozením cévní stěny, jež sice nepůsobí zřetelné změny, nicméně je dostatečné k tomu, aby došlo k funkční modifikaci epitelových buněk. Hlavní zamýšlenou změnou je zvýšená permeabilita, především pro lipoproteinové částice. Tato idea je blízká i následující hypotéze.

### II.1.2.2. Ateroskleróza jako „odpověď na infiltraci lipidy“

Uvažovaným centrálním dějem je nadměrný vstup lipoproteinových částic do intimy cév. Dysfunkce metabolismu lipidů může vést ke zvýšené koncentraci lipoproteinů v plazmě a zmnožení jejich oxidovaných forem, které jsou ve stěně pevněji zadržovány (Inoue *et al.*,2001). Nárůst gradientu hladiny částic mezi plazmou a cévní stěnou dále podporuje záchyt i nemodifikovaných zástupců. Hromadění tuků vede k dalším změnám a vývoji aterosklerotických lézí. Poškození epitelu není nutné, protože i u zdravé cévní stěny k těmto dějům běžně dochází, rozhodující je pouze míra infiltrace.

### II.1.2.3. Ateroskleróza jako „odpověď na zadržení“

Vzniku vlastních lézí předchází nahromadění aterogenních lipoproteinů v cévní stěně, které bylo pozorováno v oblastech cévního řečiště náchylných k rozvoji ateromat. Míra transportu lipoproteinů do těchto míst se však od ostatních neliší. Rozhodující tedy není zvýšený vstup lipoproteinových částic, ať už z důvodů narušeného epitelu či jejich přílišné koncentrace, ale schopnost udržení těchto částic v cévní stěně.

Lokality vystavené nadměrnému krevnímu tlaku vykazují odlišné proteoglykanové složení, a tedy pevnější záchyt aterogenních částic (Öörni *et al.*,2000). V *in vitro* studiích byla oxidace lipoproteinů blokována už nízkými koncentracemi plazmatických proteinů jako je albumin. I v případě jejich vzniku je pravděpodobnější rychlé odstranění játry, než zadržení v cévní stěně. Patologicky významnou oxidaci pravděpodobně podstupují až lipoproteiny vázané na proteoglykanové složky cév (Augé *et al.*,1996; Inoue *et al.*,2001).

### II.1.3. RIZIKOVÉ FAKTORY ATEROSKLERÓZY

Mezi významné celosvětové exogenní rizikové faktory pro rozvoj aterosklerotických onemocnění patří abdominální obezita, hypertenze, diabetes, kouření, nefyziologické hladiny lipidů, příjem potravy s vysokým obsahem živočišných tuků a snížená tělesná aktivita (Maas a Boger,2003; Yusuf *et al.*,2004). Neovlivitelnými rizikovými faktory jsou pohlaví (muž), věk a genetická predispozice. Odhadem se udává, že 5-10% populace má významnou genetickou predispozici a zhruba stejné množství genetickou rezistenci ke vzniku aterosklerózy. Genetická predispozice je z většiny dána přítomností rizikových variant genů, jejichž produkty se podílí na metabolismu lipidů. Jedná se především o geny apolipoproteinů a jejich receptorů, geny kódující různé typy lipáz a jiné enzymy katabolických či anabolických drah lipidů (Knoblauch *et al.*,2000). Vliv na progresivní vývoj aterosklerózy mohou mít i mutace genů koagulačních faktorů, růstových hormonů či adhezivních molekul. Samostatnou kategorií tvoří metabolické poruchy zvyšující riziko onemocnění. Řadí se sem hlavně diabetes mellitus, dna, hyperhomocysteinémie, hypothyroidizmus, hyperfibrinogémie aj. (Harpel *et al.*,1992; Hobbs a White,1999; Flier,2001).

## II.1.4.LIPOPROTEINOVÉ ČÁSTICE

Lipidy jsou nepolární molekuly, jejichž transport krevním řečištěm je umožněn speciálními částicemi tzv. lipoproteiny. Tuky jsou v lipoproteinech obaleny fosfolipidovou dvouvrstvou a jedním či více proteiny tzv. apolipoproteiny. Apolipoproteiny (apo) plní účel strukturní i funkční. Slouží jako kofaktory enzymů, zprostředkovávají vazbu na specifické receptory a umožňují přenos a výměnu lipidických složek mezi jednotlivými typy transportních částic.

Na základě odlišných fyzikálních a chemických vlastností odlišujeme preparativní centrifugací pět základních typů lipoproteinů (Knoblauch *et al.*,2000) (Tab.2.1.):

**Chylomikrony** - Chylomikrony jsou produkovány epiteliálními buňkami střevních klků a transportují lipidy přijaté stravou do jater. Obsahují především triacylglyceridy, které jsou během přenosu metabolizovány lipoproteinovou lipázou exprimovanou buňkami srdeční a kosterní svaloviny a tukové tkáně. Jejich charakteristickou komponentou je apoB-48 (editovaná forma apoB-100).

**VLDL (Very Low Density Lipoprotein)** - Hepatocyty sekretují především VLDL částice s vysokým obsahem triglyceridů, které dopravují tuky, jako zdroj energie a stavební složku membrán, do buněk tkání. Cestou jsou metabolizovány různými typy lipáz (endoteliální lipáza, lipoproteinová lipáza, hepatická lipáza).

**IDL (Intermediate Density Lipoprotein)** – IDL vznikají z VLDL částic působením lipáz a samy jsou jejich substrátem. Za přispění řady enzymů u nich dochází k přenosu lipidických složek mezi jednotlivými lipoproteiny a dávají tak vznik následující třídě lipoproteinů.

**LDL (Low Density Lipoprotein)** – LDL částice je hlavním přenašečem cholesterolu v lidském těle. Cholesterol je přenášen především ve formě esteru a v tkáních je využit pro tvorbu nově vznikajících membrán a k výrobě látek steroidní povahy.

**HDL (High Density Lipoprotein)** - HDL částice má k předchozím částicím antagonistický vztah. Odebírá cholesterol z povrchových membrán buněk a přeměňuje jej na estery, které přenáší zpět do jater. Vysoká hladina HDL působí protektivně na rozvoj aterosklerotických onemocnění a je rovněž sledována spolu s hladinami LDL cholesterolu.

Lipoproteiny mají dynamickou povahu a během jejich transportu plazmou dochází k jejich vzájemné interakci a výměně složek jak tukové, tak proteinové povahy. Jednotlivé základní třídy lipoproteinů tedy ve skutečnosti vytvářejí řadu podtříd, které se liší velikostí, hustotou a strukturou.

Lipoprotein(a) je unikátní transportní částicí, jejíž podrobnou charakteristikou se zabývají následující kapitoly.

**Tab.2.1.** (Češka,1999)

Charakteristika základních lipoproteinových částic.

| <b>třída lipoproteinu</b> | <b>hlavní přenášené lipidy</b>                                      | <b>apolipoproteiny</b>                  | <b>hustota (g/ml)</b> | <b>průměr částice (nm)</b> |
|---------------------------|---|---|-----------------------|----------------------------|
| <b>chylomikrony</b>       | triacylglyceroly<br>z diety   | A-I, A-II, B-48, C-I,<br>C-II, C-III, E | < 0,95                | 80 - 500                   |
| <b>VLDL</b>               | endogenní<br>triacylglyceroly<br>estery cholesterolu<br>cholesterol | B-100, C-I, C-II                        | 0,95 – 1,006          | 30 - 80                    |
| <b>IDL</b>                | estery cholesterolu<br>triacylglyceroly<br>cholesterol              | B-100, C-III, E                         | 1,006 – 1,019         | 20 -35                     |
| <b>LDL</b>                | estery cholesterolu<br>cholesterol<br>triacylglyceroly              | B-100                                   | 1,019 – 1,063         | 18 - 28                    |
| <b>HDL</b>                | estery cholesterolu<br>cholesterol                                  | A-I, A-II, C-I, E                       | 1,063 – 1,210         | 5 - 12                     |

## II.2.LIPOPOTEIN(a)

### II.2.1.ÚVOD

Lipoprotein(a) [Lp(a)] je aterogenní lipoprotein, bohatý na cholesterolové estery, s doposud ne zcela známou fyziologickou funkcí. Ačkoliv byla jeho přítomnost v plazmě prokázána již roku 1963, zůstával překvapivě dlouhý čas na okraji vědeckého zájmu. Větší pozornosti se mu dostává až po roce 1979, kdy Berg a jeho skupina odhalila spojitost mezi fenotypem Lp(a) a zvýšeným výskytem předčasných infarktů. Nicméně až nové laboratorní metody druhé poloviny 80. let, usnadňující do té doby obtížnou izolaci a kvantifikaci Lp(a) částic, s sebou přinesly i zasloužený zájem o tento netypický lipoprotein.

Charakteristickou komponentou Lp(a) je velký, hydrofilní glykoprotein apolipoprotein(a) [apo(a)], jenž je kovalentně svázán s apoB-100 na povrchu LDL částice. V roce 1987 byla odhalena vysoká míra homologie (80%) mezi geny pro apo(a) a plazminogen (McLean *et al.*, 1987). Oba zmíněné geny spolu se svými pseudogeny leží na konci dlouhého raménka 6. chromozómu. Plazminogenný gen je tvořen proteázovou doménou a pěti odlišnými, tandemově uspořádanými motivy, tzv. kringly I-V (KI-KV). Jedná se o struktury bohaté na cystein, které vytvářejí tři disulfidické můstky. Tvar připomínající preclík inspiroval jejich objevitele, dánského vědce, k pojmenování na tzv. kringlové domény (kringl je dánský výraz pro preclík). Gen kódující apo(a) má mnohonásobně opakovaný motiv kringlu IV ( $K_{LPAIV}$ ), jednu kopii motivu kringlu V ( $K_{LPAV}$ ) a nefunkční serin-proteázovou doménu (McLean *et al.*, 1987). Kringlové domény jsou charakteristické strukturní a funkční jednotky proteáz účastnících se regulace tvorby krevní sraženiny a fibrinolýzy (de Vos *et al.*, 1992) (Tab.2.2.).

Koncentrace Lp(a) v plazmě je na rozdíl od ostatních lipoproteinů z velké části podmíněna geneticky. Přes 97% její variability je určeno sekvencemi vázanými na gen pro apo(a) (Austin *et al.*, 1992; de Meester *et al.*, 1995). Žádný jiný dosud známý kvantitativně děděný znak není z tak velké části pod vlivem jediného lokusu.

**Tab.2.2.** (<http://www.expasy.ch/>)

Proteázy obsahující kringlové domény.

| <b>název proteázy</b>                              | <b>počet kringlových domén</b> |
|--|--------------------------------|
| <b>koagulační faktor XII (Hageman factor)</b>      | <b>1</b>                       |
| <b>protrombin</b>                                  | <b>2</b>                       |
| <b>plazminogen</b>                                 | <b>5</b>                       |
| <b>apolipoprotein(a)</b>                           | <b>13 – 53</b>                 |
| <b>HGF (Hepatocyte Growth Factor)</b>              | <b>4</b>                       |
| <b>aktivátor HGF</b>                               | <b>1</b>                       |
| <b>t-PA (Tissue-type Plasminogen Activator)</b>    | <b>2</b>                       |
| <b>u-PA (Urokinase-type Plasminogen Activator)</b> | <b>1</b>                       |



## II.2.2.LPA LOKUS

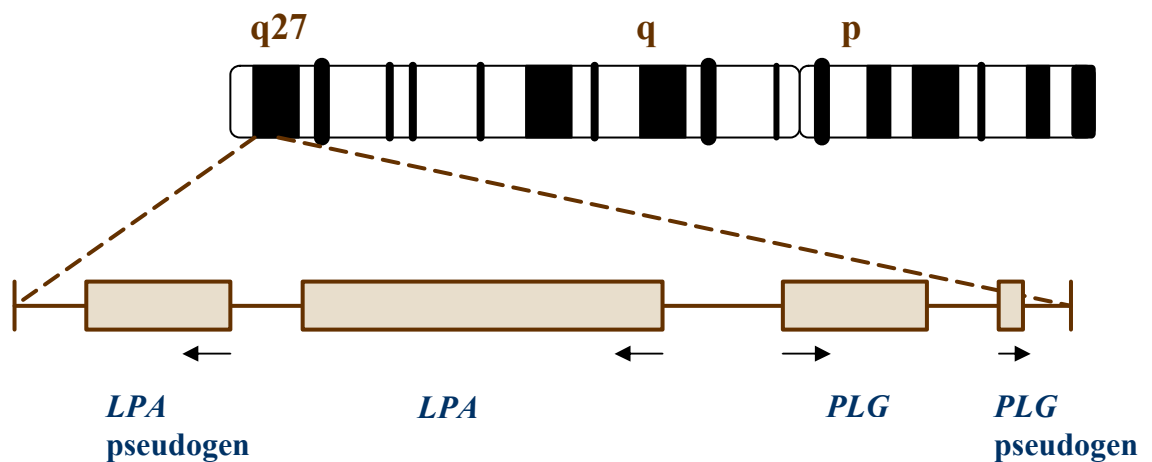
### II.2.2.1.Struktura LPA lokusu

Apolipoprotein(a) je pravděpodobně jeden z nejpolymorfnějších lidských proteinů. Jeho velikost kolísá od méně než 300 do více jak 800 kDa (White *et al.*,1994). Protein je kódován genem, tzv. *LPA* lokus (GeneID:4018), umístěným do oblasti 6q26-q27 asi 50 kb od genu pro plazminogen (*PLG*), v němž má i svůj evoluční původ (Obr.2.1.).

#### Obr.2.1.

Umístění genu pro apo(a) a plazminogen na 6.chromozómu.

#### Chromozóm 6



*LPA* - gen pro apolipoprotein(a)  
*PLG* - gen pro plazminogen  
 → - směr transkripce genu

Velikost genu pro apo(a) se pohybuje zhruba od 50 do 300 kb. Překvapivě velké rozpětí ve velikosti genu je důsledkem mnoha opakování kringlu IV ( $K_{LPAIV}$ ), jež sdílí s plazminogenovým motivem KIV 78-88% homologii (Guevara *et al.*,1993). Podle míry homologie rozpoznáváme  $K_{LPAIV}$  doménu typu 1-10 ( $K_{LPAIV1-10}$ ). Zatímco typ 1 a 3-10 je v sekvenci *LPA* přítomen pouze jednou, typ 2 (nejnižší 78% homologie s KIV) se objevuje jako repetice s variabilním počtem opakování (3-43). Jedná se o jeden z mála příkladů exprimovaného minisatelitního lokusu, ojedinělého jak velikostí repetitivní jednotky (5,5 kb) (Lackner *et al.*,1991), tak svým rozsahem (minimálně 40 alel) (Brunner *et al.*,1996) (Obr.2.2.).

Každá kringlová doména je kódována dvěma exony. Oba exony repetice tvoří 342 bp, které kódují 114 aminokyselin. Zbývající část repetice zaujímají introny o celkové délce 5158 bp. Velikost apo(a) proteinu koreluje s množstvím  $K_{LPAIV2}$  repetic. Délkové apo(a) izoformy jsou děděny kodominantním Mendelovým způsobem (Kamboh *et al.*, 1991). U bílé rasy dosahuje heterozygotita 94% (Kamboh *et al.*, 1991; Lackner *et al.*, 1991).

Součástí *LPA* genu je rovněž kringl V ( $K_{LPAV}$ ) identický s KV plazminogenu (91% homologie). Přes svou 94% homologii s proteázovou doménou plazminogenu není C-koncová proteázová doména apo(a) aktivovatelná tkáňovým aktivátorem plazminogenu. Jako příčina se ukázala substituce původního Arg 4308 za Ser v místě proteolytické aktivace. Katalytická triáda (Ser-His-Asp) zůstala zachována a protein vykazuje proteázovou aktivitu vůči odlišným substrátům např. fibronektinu (Scanu a Fless, 1990). První exon *LPA* genu kóduje 19-ti aminokyselinovou signální sekvenci, která sdílí se signální sekvencí plazminogenu 99% homologii (Tab.2.3.).

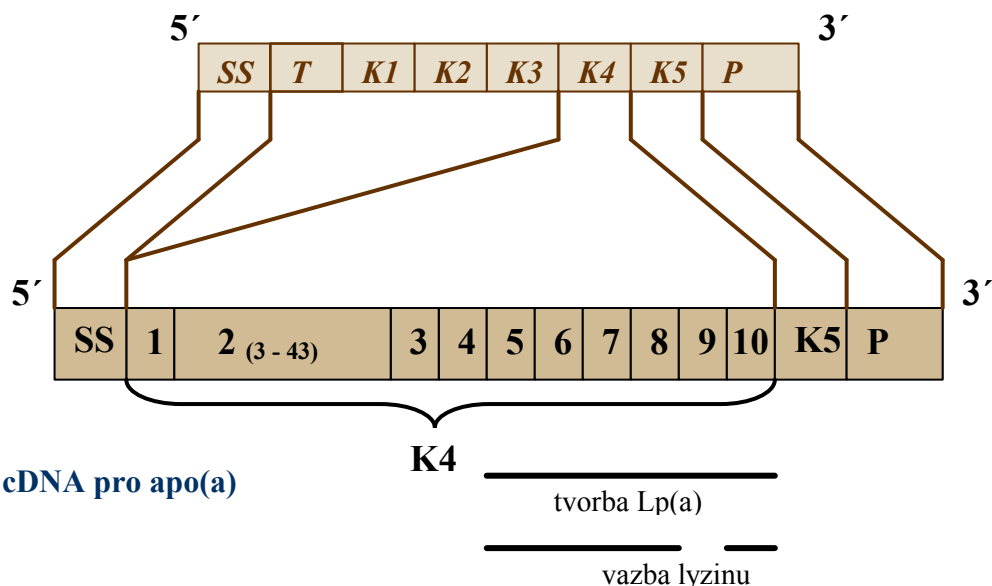
Studium apo(a) v elektronovém mikroskopu odhalilo struktury, které připomínají „koráلكové uspořádaní“ proteinu. Rigidní kringlové domény jsou odděleny velice flexibilními interkringlovými sekvencemi (Weisel *et al.*, 2001).

#### II.2.2.2. Hypotéza vzniku délkového polymorfizmu kringlu IV typ 2

V oblasti délkového polymorfizmu  $K_{LPAIV}$  byla nalezena tandemová repetice 17-ti (CA)<sub>n</sub> dinukleotidů (Lackner *et al.*, 1991). Takovým mikrosatelitním sekvencím je v eukaryotním genomu přisuzována role během rekombinace a genové konverze. V genu pro apo(a) však nebyla prokázána extrémní rekombinační aktivita. Doposud byl pozorován jediný případ spontánně vzniklé nové délkové izoformy genu. U nové alely nebyly u sledovaných markerů z přilehlých oblastí nalezeny žádné změny (Boerwinkle *et al.*, 1992). Při bližší analýze je patrná značná konzervovanost sekvencí  $K_{LPAIV1}$ ,  $K_{LPAIV3-10}$  a  $K_{LPAV}$  obklopujících kringlovou repetici a to v celém spektru délkových variant. Nalezené skutečnosti podporují hypotézu, která považuje za mechanismus vzniku rozsáhlé variability  $K_{LPAIV2}$  spíše výměnu sesterských chromatid a genovou konverzi a nikoliv inekvální crossing-over homologních chromozómů.

**Obr.2.2.**

Srovnání struktury genu pro apo(a) a plazminogen.

**cDNA plazminogenu**

- SS - signální sekvence
- P - proteázová doména
- K - kringlová doména
- T - preaktivační peptid

**Tab.2.3.** (McLean *et al.*,1987)

Porovnání stupně homologie sekvence nukleotidů mezi genem pro apo(a) a plazminogenem.

| oblast genu pro apo(a) (cDNA)   | homologie s plazminogenem |
|---------------------------------|---------------------------|
| <b>5'netranslatovaná oblast</b> | <b>98 %</b>               |
| <b>signální peptid</b>          | <b>99 %</b>               |
| <b>kringlová repetice</b>       | <b>78 – 88 %</b>          |
| <b>kringl V</b>                 | <b>91 %</b>               |
| <b>proteázová doména</b>        | <b>94 %</b>               |
| <b>3'netranslatovaná oblast</b> | <b>87 %</b>               |

### II.2.2.3. Sekvenční varianty

Současný výzkum *LPA* genu se soustředil na pátrání po sekvenčních variantách, které mohou být částečně příčinou velkého rozpětí plazmatických koncentrací Lp(a) částic (Kraft *et al.*, 1992). Přestože byla publikována celá řada studií, nebylo zatím nalezeno mnoho variant s potvrzeným vlivem na hladinu Lp(a) (Mancini *et al.*, 1995; Puckey *et al.*, 1997; Brazier *et al.*, 1999; Ogorelkova *et al.*, 1999, 2001; Parson *et al.*, 2004).

Podle předpokladu se doposud zveřejněné studie soustředily na výzkum regulačních oblastí genu pro apo(a), především oblast promotoru, a kringlové domény typu  $K_{LPA}IV6-10$ . Funkční variabilita v regulačních oblastech genu by vypovídala o rozdílné efektivnosti transkripce jednotlivých alel. Zmíněné kringlové motivy se přímo účastní tvorby Lp(a) a jeho následných interakcí a mohou ovlivňovat rozdílnou míru tvorby i patogenicity lipoproteinu.

Systém Lp(a) může být vhodným modelem pro studium vztahu mezi sekvenčními variantami genu, funkčními vlastnostmi genového produktu a jeho vlivem na komplexní projev choroby.

#### II.2.2.3.1. Regulační oblasti

Dosud byly popsány tři oblasti regulující transkripci *LPA* genu. Kromě sekvence promotoru se jedná o oblast dvou zesilovačů nalézajících se v intergenovém 50 kb dlouhém úseku mezi genem pro apo(a) a plazminogen (Wade *et al.*, 1997; Huby *et al.*, 2003; Negi *et al.*, 2004). Na základě restrikční analýzy byly zesilovače lokalizovány do vzdálenosti 20 respektive 28 kb od počátku místa transkripce *LPA* genu (Obr. 2.3.). Bližší zesilovač vzhledem k *LPA* genu nese označení DHIII, vzdálenější DHII. Sekvence DHIII zesilovače je součástí regulační oblasti inaktivního LINE-1 retrotranspozivního elementu (Yang *et al.*, 1998). Za zesilovačem DHII je pravděpodobně umístěn inzulátor, který brání rozšíření vlivu obou zesilovačů na lokus pro plazminogen. Ani jeden ze zesilovačů neobsahuje elementy pro jaterně specifickou expresi a tkáňová specifita obou zesilovačů je pravděpodobně dána pouze na úrovni nízké spirilizace chromatinu z této oblasti přítomné pouze v buňkách jaterní tkáně.

##### II.2.2.3.1.1. Promotor

Proteinové komplexy schopné zajistit bazální transkripci *LPA* genu se váží do oblasti tzv. minimálního promotoru, která byla lokalizována mezi nukleotidy -98 až +141 vzhledem k počátku transkripce genu (Wade *et al.*, 1994). V tomto úseku byla popsána

přítomnost dvou sekvenčních variant +93C/T a +121G/A. Polymorfismus +121G/A je pravděpodobně nefunkční (Brazier *et al.*,1999), zatímco substituce T za C v pozici +93 znamená vytvoření nového alternativního startovního kodónu (Zysow *et al.*,1995). Nový startovní kodón je spojen se změnou čtecího rámce a se vznikem krátkého nefunkčního oligopeptidu. Důsledkem této změny je pokles exprese genu na úrovni translace o 60%. V kavkazských populacích je nicméně efekt této záměny částečně maskován vazebnou nerovnováhou s délkovými variantami genu (Kraft *et al.*,1998). Frekvence obou polymorfizmů ve vybraných populacích je shrnuta v Tab.2.4. Součástí tzv. minimálního promotoru je i vazebný element pro jaterně specifický transkripční faktor HNF-1 $\alpha$ , nukleotid +26 až +41, jehož přítomnost byla v *in vitro* studiích nezbytná pro dosažení optimální transkripční aktivity promotoru (Huby *et al.*,2001).

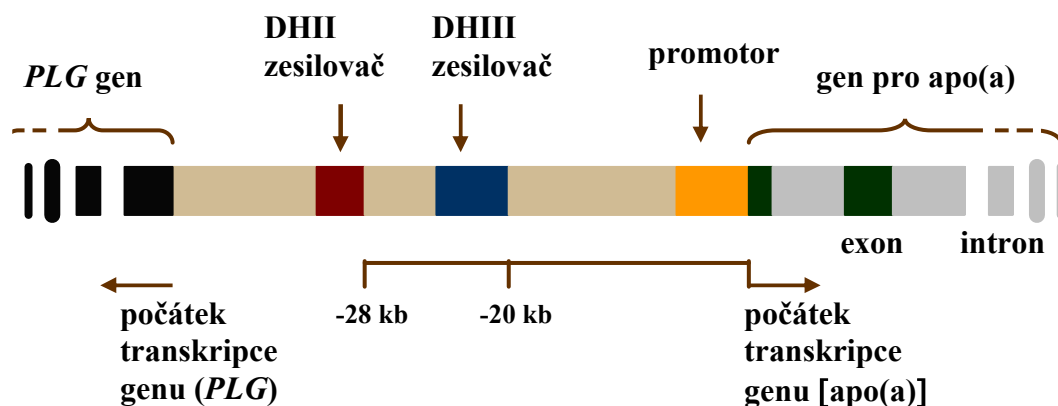
Další sekvence promotoru zahrnují řadu potencionálních transkripčních elementů, především pro IL-6 a C/EBP (Wade *et al.*,1993). Velký počet vazebných míst pro IL-6 je v souladu s předpokládanou úlohou Lp(a) při hojících procesech. Ve studii Negi *et al.* (Negi *et al.*,2004) byly v úseku -650 až -998 proti směru transkripce *LPA* genu lokalizovány negativní transkripční elementy. V této sekvenci se nalézá již dříve popsán polymorfismus -772G>A (0,586/0,414 $\pm$ 0,020 u kavkazské populace), který je pravděpodobně jen nefunkční sekvenční variantou (Negi *et al.*,2004). V některých studiích byla nicméně minoritní alela -772 A statisticky významně ( $p<0,001$ ) asociována se sníženými hladinami Lp(a) oproti G variantě a tento efekt přetrvával i po adjustaci na délkové izoformy apo(a) proteinu ( $p<0,0014$ ) (Brazier *et al.*,1999). Sekvence mezi nukleotidy -498 až -574 proti směru transkripce byla označena za nositelku transkripčních elementů zodpovědných za jaterně specifickou expresi (Negi *et al.*,2004).

V distální části promotoru ve vzdálenosti -1231 bp od počátku transkripce apo(a) genu se nachází repetice pěti nukleotidů o variabilním počtu opakování tzv. STR lokus (krátká tandemová repetice). U kavkazských populací kolísá počet opakující se TTTTA jednotky od 7 do 11. U černošských populací byly pozorovány i další varianty o 5 a 12 repeticích. Zmiňovaný STR lokus je součástí 3' koncového úseku Alu sekvence. Frekvence jednotlivých délkových variant STR lokusu ve vybraných populacích je shrnuta v Tab.2.4. Řada studií prokázala určitou asociaci mezi počtem TTTTA repetice a hladinami Lp(a) v plazmě (Kalina *et al.*,2001). Ve studii Trommsdorf *et al.* (Trommsdorff *et al.*,1995) byl tento polymorfismus schopen vysvětlit až 14,3% variability v hladině Lp(a) u sledovaných osob, jiné studie jsou mnohem zdrženlivější a přisuzují mu jen méně než 5% účinek (Brazier *et al.*,1999). Asociace alel STR lokusu s hladinami Lp(a) může být

způsobena genetickou vazbou s jinými, dosud nepopsanými a z funkčního hlediska významnými polymorfizmy či vazebnou nerovnováhou s délkovými variantami genu pro apo(a). Alternativním vysvětlením může být funkční význam celé repetice jako vazebného místa pro negativní dimerní transkripční faktor. Na základě *in vitro* analýz byla oblast repetice a přilehlé sekvence označeny za místo s negativním vlivem na transkripci genu (Negi *et al.*,2004). Tato hypotéza předpokládá slábnoucí vzájemnou interakci obou jednotek dimeru represního transkripčního faktoru se snižujícím se počtem jednotek repetice. Výsledky těchto pokusů musí být nicméně ještě ověřeny. Obecně lze říci, že alely obsahující 7 a 8 TTTTA jednotek jsou asociovány s vyššími hladinami Lp(a) než je tomu u dlouhých alel s 9, 10 a 11 repeticemi (Holmer *et al.*,2003).

### Obr.2.3.

Poloha známých regulačních oblastí genu pro apo(a).



**PLG** gen pro plazminogen

**apo(a)** apolipoprotein(a)

#### II.2.2.3.1.2.DHII zesilovač

Úsek DHII zesilovače se omezuje na 186 bp dlouhou sekvenci, která byla schopna v *in vitro* studiích zvýšit 4-8 krát transkripční aktivitu *LPA* genu (Wade *et al.*,1997). Pro funkci zesilovače je nezbytná koordinovaná vazba a vzájemná interakce více transkripčních faktorů. Byly zde nalezeny vazebné elementy pro PPAR $\alpha$  a jiné jaderné receptory a pro Sp1 transkripční faktor a zdá se, že je to místo, kde dochází ke zprostředkování odpovědi na léky a hormony (Wade *et al.*,1997; Puckey a Knight,2002). Prokázán byl silný negativní účinek estrogenu a androgenu na aktivitu DHII zesilovače a tím i na míru exprese *LPA* genu (Huby *et al.*,2003). Toto zjištění je v souladu s již dříve

popsaným represivním vlivem estrogenu na hladinu Lp(a) (Jenner *et al.*, 1993). Naopak po navázání dimeru PPAR $\alpha$ / RXR $\alpha$  se aktivita zesilovače v *in vitro* studii významně zvýšila a to až o 70% (Huby *et al.*, 2003). Účinek PPAR $\alpha$  byl dokonce schopen potlačit negativní vliv pohlavních hormonů a zdá se, že oba zmíněné jaderné receptory zde soutěží o vazebné místo.

Celá oblast DHII zesilovače je vysoce konzervována, doposud zde nebyla popsána žádná významná sekvenční variabilita a mutační analýzy ukázaly vysokou citlivost zesilovače k zaneseným změnám (Wade *et al.*, 1997).

#### **II.2.2.3.1.3. DHIII zesilovač**

Elementy potřebné pro aktivitu DHIII zesilovače jsou zahrnuty v asi 600 bp dlouhém úseku a v *in vitro* studii zvyšovaly transkripci *LPA* genu o 10-15% (Wade *et al.*, 1997). Oblasti vlastního zesilovače pravděpodobně předchází místo s negativním vlivem na transkripci genu pro apo(a). Aktivita zesilovače je tedy ovlivněna kombinovanou vazbou transkripčních faktorů do pozitivních a negativních vazebných elementů celé oblasti. Identifikována byla celá řada potencionálních vazebných míst jak pro rodinu Sp1 transkripčních faktorů, tak např. c-Ets, E2F, Oct-1, C/EBP ad. (Yang *et al.*, 1998). Doposud byly popsány tři substituční polymorfizmy v DHIII zesilovači. Jedná se o variantu -1230A/G (0,570/0,430 $\pm$ 0,018) rušící potencionální vazebné místo pro CEBP $\beta$ , -1617C/A variantu (0,858/0,142 $\pm$ 0,013) narušující p300 vazebný element a -1712G/T variantu (0,896/0,104 $\pm$ 0,008), která vytváří nové potencionální vazebné místo pro transkripční faktor TGT3 (Puckey a Knight, 2003). Varianta -1230 G v *in vitro* studii zvyšovala 2,5 krát bazální aktivitu promotoru, naopak obě zbývající minoritní varianty měly opačný účinek (Puckey a Knight, 2003).

Nukleotidové pozice v DHIII zesilovači jsou vyjádřeny od 3'-konce 1,8-kb dlouhého *KpnI* fragmentu, jak bylo navrženo ve studii Wade *et al.* (1997).

#### **II.2.2.3.2. Kringlové domény**

McLean *et al.* (1987) odhalil, že repetitivní jednotka kringlu IV typ 2 je v populaci přítomna ve dvou variantách. Varianta A a B se navzájem liší třemi nukleotidovými substitucemi, které ale nemají vliv na aminokyselinové složení proteinové domény a jsou tedy evolučně tiché.

**Tab.2.4.**

Frekvence alel a směrodatná odchylka vybraných polymorfizmů z promotorové oblasti *LPA* genu ve vybraných populacích (Kraft et al.,1998; Kalina et al.,2001; Puckey et al.,2003). Nukleotidové pozice v promotoru jsou vyjádřeny vzhledem k počátku transkripce genu pro apo(a).

| polymorfizmus      | populace (fr. ± S.D.)    |                          |                          |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                    | africká                  | indická                  | kavkazská                |
| <b>+121 G/A</b>    | -                        | <b>0,765/0,235±0,033</b> | <b>0,844/0,156±0,014</b> |
| <b>+ 93 C/T</b>    | <b>0,913/0,087±0,014</b> | <b>0,765/0,235±0,033</b> | <b>0,867/0,133±0,013</b> |
| <b>-1231 STR 6</b> | <b>0,018±0,009</b>       | <b>0,000</b>             | <b>0,000</b>             |
| <b>7</b>           | <b>0,085±0,019</b>       | <b>0,006±0,005</b>       | <b>0,005±0,003</b>       |
| <b>8</b>           | <b>0,734±0,029</b>       | <b>0,612±0,037</b>       | <b>0,687±0,018</b>       |
| <b>9</b>           | <b>0,085±0,019</b>       | <b>0,206±0,031</b>       | <b>0,144±0,014</b>       |
| <b>10</b>          | <b>0,040±0,013</b>       | <b>0,176±0,029</b>       | <b>0,149±0,014</b>       |
| <b>11</b>          | <b>0,036±0,012</b>       | <b>0,000</b>             | <b>0,016±0,005</b>       |

Vzhledem k obtížné analýze rozsáhlé repetice identických kringlových domén  $K_{LPA}IV2$  a popsanému funkčnímu významu kringlových domén  $K_{LPA}IV5-10$  při tvorbě  $Lp(a)$  byly zatím prozkoumány především sekvence náležející právě kringlu typu  $K_{LPA}IV6-10$ . Výčet nalezených jednonukleotidových substitucí v *LPA* genu je shrnut v Tab.5.

Při nomenklatuře substitucí v genu/proteinu pro apo(a) se udává vždy pořadí nukleotidů/aminokyselin v daném kringlu. Pořadí nukleotidů/aminokyselin v rámci celého proteinu by bylo vzhledem k přítomné repetici matoucí a nejednoznačné.

V kringlu IV typ 8 byla nalezena substituce p.P52L, která u nositelů významně snižovala hladiny  $Lp(a)$ . Záměna funkčního prolinového zbytku může modifikovat efektivitu skládání kringlu (Ogorelkova et al.,2001). U obou nositelů této mutace byla pozorována v promotoru genu STR alela s 11 repeticemi. Výše uvedená mutace tak může být příčinou asociace STR alela s 11 repeticemi s nižšími hladinami  $Lp(a)$  (Brazier et al.,1999; Kalina et al.,2001).

Negativní vztah k výskytu aterosklerózy má substituce p.T23P (Ogorelkova et al.,2001). Nahrazený treonin je první aminokyselinou  $\beta$ -listu a potencionálním místem



O-glykozylace. Mechanismem účinku substituce může být konformační změna měnící strukturu místa, na které se vážou adhezivní proteiny.

Substituce p.M75T v kringlu IV typ 9 má pozitivní vliv na hladinu Lp(a) a v homozygotním stavu významně zvyšuje riziko infarktů (Simó *et al.*, 2001<sup>a</sup>).

V kringlu IV typ 10 leží v populaci vzácná substituce p.W72R (fr. 0,02), která přímo zasahuje kapsu vázající lyzin a vytváří Lp(a) částici s defektní vazbou na extracelulární matrix a buněčné struktury (Simó *et al.*, 2001<sup>a</sup>).

Ostatní substituce uvedené v Tab.2.5. nemají zatím prokázaný funkční význam.

### II.2.2.3.3. Nulové alely

Některé nulové alely jsou transkripčně aktivní a nedetekovatelná hladina apo(a) je způsobena nedostatečnou citlivostí detekčních metod. To je v souladu s vyšší frekvencí nulových alel u extrémně dlouhých izoform apo(a) proteinu (Gaw *et al.*, 1994; Kraft *et al.*, 1996<sup>b</sup>).

Vznikem alternativního místa stříhu 1G/A v prvním exonu K<sub>LPA</sub>IV8 vzniká zkrácený protein, který je sice z buněk sekretován, ale není schopen tvořit kovalentní Lp(a) komplex (Ogorelkova *et al.*, 1999). Tato mutace je v bílé populaci nejčastějším případem nulové alely (fr. 0,06). Mutace se objevila až po migraci populací z Afriky a po polevení selekčního tlaku namířeno proti nízkým koncentracím lipoproteinu.

Sestřihové sekvence v intronech unikátních kringlů genu pro apo(a) mají GT – AG charakter. Uvažovaná změna postihuje konzervované donorové místo sestřihu (GT) v 6 kb dlouhém intronu oddělujícím oba exony K<sub>LPA</sub>IV8. Během maturace je GT dinukleotid z pozice 97/98 prvního exonu K<sub>LPA</sub>IV8 aktivován jako alternativní 5' místo stříhu, důsledkem je delece zbývající části zmíněného exonu. Nové spojení zkráceného exonu s následujícím exonem posouvá čtecí rámec a ve vzdálenosti tří kodonů vytváří terminační kodon UGA. Zkrácený protein postrádá K<sub>LPA</sub>IV8-10, K<sub>LPA</sub>V a proteázovou doménu a s nimi spjaté vlastnosti.

Analýzou sekvenční variability v opakujícím se kringlu IV typ 2 se doposud zabývala pouze jediná práce (Parson *et al.*, 2004). Autoři této studie našli substituci 61C/T v prvním exonu repetitivní jednotky (fr. 0,03). Důsledkem substituce je vznik terminačního kodonu (p.R21X) a následně zkráceného proteinu, který postrádá sekvence schopné vázat LDL částici. Nalezená substituce tak představuje další příklad nulové alely.

Příčiny dalších nulových alel *LPA* genu nebyly dosud popsány.

Relativně častější přítomnost polymorfizmů zvyšujících a naopak nedostatek variant snižujících koncentraci Lp(a) u afrických populací v porovnání s kavkazskými populacemi je v souladu s obecnou charakteristikou obou etnik (viz.II.2.3.3.2.).

**Tab. 2.5.** (Ogorelkova *et al.*,2001)

Doposud popsané substituční změny v kódující oblasti *LPA* genu.

| kringl                     | exon | změna báze | změna aminokyseliny <sup>1</sup> |
|----------------------------|------|------------|----------------------------------|
| <b>KIV<sub>LPA2</sub></b>  | 1    | c.61C/T    | p.R21X (R132X)                   |
| <b>KIV<sub>LPA6</sub></b>  | 1    | c.109C/T   | p.S37F (S3682F)                  |
|                            | 2    | c.111T/C   | p.V91A (V3736A)                  |
| <b>KIV<sub>LPA8</sub></b>  | 1    | c.48G/A    | p.G17R (G3882R)                  |
|                            |      | c.66A/C    | p.T23P (T3888P)                  |
|                            |      | c.133G/A   | p.R45Q (R3910Q) <sup>‡</sup>     |
|                            |      | c.154C/T   | p.P52L (P3917L)                  |
|                            |      | c.1G/A     | 5' místo stříhu                  |
| <b>KIV<sub>LPA9</sub></b>  | 1    | c.16G/T    | p.S6I (S3985I)                   |
|                            |      | c.51C/T    | p.R18W (R3997W) <sup>‡</sup>     |
|                            | 2    | c.99T/C    | není                             |
|                            |      | c.149C/A   | p.P71T (P4083T)                  |
| <b>KIV<sub>LPA10</sub></b> | 2    | c.162T/C   | p.M75T (M4087T)                  |
|                            |      | c.63T/C    | p.T66M (M4168T)                  |
|                            |      | c.80T/C    | p.W72R (W4174R)                  |
|                            |      | c.124T/G   | není                             |

<sup>1</sup> v závorce je pozice v cDNA podle McLean *et al.*,1987

<sup>‡</sup> mezi oběma lokusy je silná vazba

#### II.2.2.4. Místo fyziologické exprese *LPA* genu

Apolipoprotein(a) přítomný v oběhu je zdá se exkluzivně vyráběn játry (Hobbs a White, 1999). Malá množství mRNA byla sice detekována v buňkách adrenálních žláz, plic, podvěsku mozkovém a varlatech u lidí i primátů, nicméně není důkaz, že by tyto tkáně apo(a) protein skutečně vytvářely a sekretovaly (Dieplinger a Utermann, 1999).

#### II.2.2.5. Apolipoprotein(a) v evoluci

Apolipoprotein(a) má velice netypický druhový výskyt. Nalézáme ho pouze u lidí, primátů starého světa a překvapivě i jednoho druhu evropského ježka. U ježka *Erinaceus europaeus* je dokonce Lp(a) hlavním lipoproteinem transportujícím cholesterol. Tento hmyzožravec se oddělil od ostatních savců asi před 90 mil. lety. V obou případech se gen vytvořil nezávisle duplikací plazminogenového genu. Jedná se o názorný příklad konvergentní evoluce. Společnou charakteristikou všech apo(a) proteinů je přítomnost zmnožené kringlové domény (u ježka KIII) a schopnost vázat LDL částici (Lawn *et al.*, 1997; Hobbs a White, 1999).

### II.2.3. ČÁSTICE LIPOPROTEINU(a)

#### II.2.3.1. Interakce apoB a apo(a)

Tvorba Lp(a) částice probíhá extracelulárně. Zúčastněné proteiny apo(a) a apoB-100 při ní vzájemně zaujímají opačnou orientaci (Lobentanz *et al.*, 1998; Demant *et al.*, 2001). Nově vzniklý apo(a) je transportován z Golgiho aparátu na povrch hepatocytů, kde interaguje s lipoproteiny nesoucími apoB-100 (LDL, VLDL částice) (Chiesa *et al.*, 1992; White a Lanford, 1994). Zmíněný proces může být spojen s přeměnou VLDL částice v LDL částici. Zvažována je i možnost, že k interakci apo(a) proteinu a nascentního apoB-100 dochází před vytvořením LDL částice, která vzniká až dodatečným obohacením apoB-100 proteinu o jednotlivé typy lipidů. Struktura a složení Lp(a) částice jsou shrnuty na Obr.2.4. a v Tab.2.6.

Nejprve dochází k tvorbě nekovalentních vazeb mezi nízkoafinitními (substituce p.D56E) místy vázajícími lyzin v  $K_{LPAIV5-8}$  a protilehlými zbytky v apoB-100 (McConathy a Trieu, 1991; Trieu a McConathy, 1995; Gabel a Koschinsky, 1998). Podrobnější studie ukázaly především esenciální roli  $K_{LPAIV7-8}$  (Gabel *et al.*, 1996). Nekovalentní interakce, při nichž hraje nezastupitelnou úlohu lyzin, jsou nezbytné

k zaujmutí správné konformace obou proteinů (Frank *et al.*, 1994; Trieu a McConathy, 1995). Následuje vytvoření pevného kovalentního spojení mezi Cys4057 z kringlu IV typ 9 apo(a) a Cys4326 apoB-100 (Brunner *et al.*, 1993; Koschinsky *et al.*, 1993). Reakce je pravděpodobně katalyzována povrchovou disulfidizomerázou.

Zmíněný kringl IV typ 9 vytváří s aminokyselinovými zbytky z okolí cysteinu v apoB-100 řadu van der Waalsových interakcí (Gabel a Koschinsky, 1998). Odlišná konformace apoB-100, ať už je způsobena změnami v aminokyselinové sekvenci nebo lipidickým složením LDL částice, může vést k neschopnosti vázat apo(a) a tvořit Lp(a) částici (Becker *et al.*, 2001).

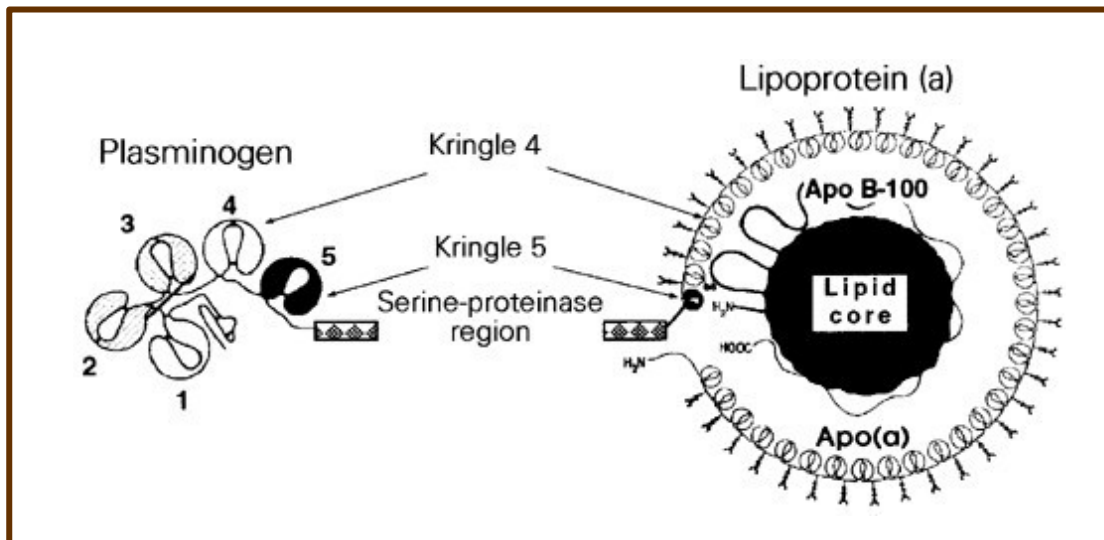
Přestože se  $K_{LPAIV10}$  výše popsaných dějů aktivně neúčastní, není tato doména během nich zcela bez funkce. Předpokládá se, že jako celek přispívá ke správné konformaci zúčastněných sekvencí (Gabel *et al.*, 1996). Alternativně se může sama podílet na tvorbě hydrofóbních či elektrostatických spojů nezávislých na lyzinu.

Poslední studie ukazují, že apo(a) je sekretován z buněk v „uzavřené“ konformaci, která je udržována intramolekulárními interakcemi právě mezi C-koncovým  $K_{LPAIV10}$  a N-koncovými sekvencemi (Becker *et al.*, 2003). Tato konformace neumožňuje vazbu s apoB-100. Vzniku Lp(a) částice musí předcházet přechod apo(a) molekuly z „uzavřené“ konformace v konformaci „otevřenou“. Změna konformace umožňuje, jak vznik Lp(a), tak její další interakce. Efektivita s jakou molekula apo(a) přechází z jedné konformace do druhé je navíc závislá na počtu domén  $K_{LPAIV2}$ . Čím delší izoforma apo(a), tím se zdá „uzavřená“ konformace stabilnější (Becker *et al.*, 2004). Vedle odlišné náchylnosti k presekreční degradaci (II.2.3.3.1.2.2.) se tedy jedná o další mechanismus, který stojí za negativní korelací mezi délkou apo(a) a hladinou Lp(a).

### II.2.3.2. Vazebná místa

Zdá se, že schopnost Lp(a) vázat lyzin hraje klíčovou roli v patogenním účinku částice (Simó *et al.*, 2001<sup>b</sup>). Studie popsaly přítomnost míst vazajících lyzin v  $K_{LPAIV5-8}$  a v  $K_{LPAIV10}$ . Kapsa s afinitou k lyzinu se skládá ze tří segmentů. Aromatické zbytky (Trp60, Phe62, Trp70) tvoří hydrofóbní pozadí zesilující polární účinek zbývajících dvou segmentů a interagují s -CH<sub>2</sub>- kostrou lyzinového zbytku. Nepochybně jsou z jedné strany ohraničeny dvěma aniontovými zbytky (Asp54, Asp56), které komunikují s NH<sub>2</sub>-skupinou ligandu. Druhá strana nese díky dvěma kationtovým zbytkům (Arg69, Arg35) kladný náboj a váže -COOH konec lyzinu či jeho analogu (Guevara *et al.*, 1993; Ernst *et*

**Obr.2.4.** (<http://www.scielo.br/img/fbpe/bjmbr/v30n11/html/3001i01.htm>)  
Struktura částice lipoprotenu(a) a sdílená homologie mezi apo(a) proteinem a plazminogenem.



**Tab.2.6.** (Lippi a Guidi,2000)

Porovnání základních fyzikálních parametrů a složení u LDL a Lp(a) částice.

| fyzikální a chemické vlastnosti | LDL                 | Lp(a)                   |
|---------------------------------|---------------------|-------------------------|
| molekulární hmotnost (Da)       | $(2,9) \times 10^6$ | $(3,8-4,0) \times 10^6$ |
| průměr (nm)                     | $25,9 \pm 0,1$      | $28,3 \pm 0,5$          |
| hustota (g/l)                   | 1019-1063           | 1006-1125               |
| poločas (dny)                   | 2-3                 | 3-4                     |
| složení (%)                     |                     |                         |
| proteiny                        | 26-31               | 17-29                   |
| volný cholesterol               | 9                   | 6-9                     |
| esterifikovaný cholesterol      | 40-43               | 35-46                   |
| triacylglyceridy                | 4-6                 | 4-8                     |
| fosfolipidy                     | 20-22               | 17-24                   |

*al.*,1995). Místa  $K_{LPA}IV5-8$  schopná vázat lyzin jsou maskována v rámci Lp(a) částice a tedy nedostupná pro další interakce (viz.II.2.3.1.). Oproti tomu místo vázající lyzin na  $K_{LPA}IV10$  není při tvorbě částice využito a je stericky dostupné pro vazbu okolních substrátů (Ernst *et al.*, 1995; Gabel *et al.*,1996).

Kringl IV typ 10 sdílí s plazminogenovým motivem KIV nejen nejvyšší stupeň homologie (88%), ale rovněž silnou afinitu k lyzinu, která umožňuje interakci Lp(a) s lyzinovými zbytky biologických substrátů extracelulární matrix a buněčných povrchů (Guevara *et al.*,1993; Scanu *et al.*,1993).

Byla popsána heterogenní afinita Lp(a) k lyzinu i u částic izolovaných z plazmy jednoho jedince (Xia *et al.*,2000). To může být způsobeno sekvenční variabilitou obou alel (Simó *et al.*,2001<sup>ab</sup>), odlišnou N-glykozylací během maturace (Gabel *et al.*,1996) nebo přítomností vyšších komplexů. Přítomnost takových komplexů byla *in vitro* již pozorována. Jedná se o agregaci dvou Lp(a) či Lp(a) a LDL částic a dochází při nich pravděpodobně k sterickému blokování místa lyzinové afinity (Xia *et al.*,2000).

Vazebné místo kringlu IV typ 9 je oproti ostatním kringlovým doménám nositelem sedmi cysteinových zbytků. Nadpočetný Cys se nachází v pozici 67, tedy na okraji vazebného místa a je zodpovědný za kovalentní interakci s apoB-100. Původní aniontový segment doznal změn, které redukuje jeho polaritu, ale současně zvyšují objemovou kapacitu vazebného místa. Tato doména tak sice ztratila specifitu pro vazbu s lyzinem, nicméně získala schopnost vázat větší hydrofóbní ligandy jako je tyrozin, fenylyalanin či metionin (Guevara *et al.*,1993).

Na povrchu každého kringlu je nejméně dvakrát vystavena arginin-treoninová či treonin-argininová sekvence. Může se jednat o štěpná místa pro jiné serinové proteázy schopné proteolyticky modifikovat enzymatickou aktivitu apo(a) (Guevara *et al.*,1993).

### II.2.3.3. Koncentrace Lp(a)

Navzdory velice stabilním individuálním hodnotám (Donesh *et al.*,2000) vykazuje koncentrace Lp(a) rozsáhlou mezi- i vnitropopulační variabilitu (Gaw *et al.*,1994; Trommsdorff *et al.*,1995; Kraft *et al.*,1996<sup>b</sup>). To lze vysvětlit vysokou genetickou determinovaností znaku (dědivost >0,9) a značně polymorfni povahou relevantního lokusu (Austin *et al.*,1992; Boerwinkle *et al.*,1992; Boomsma *et al.*,1993).

Kvantifikace Lp(a) odhalila dvě skutečnosti: velkou rozmanitost ve velikosti částice a pokles její koncentrace se zvyšující se velikostí lipoproteinu. Výzkum se soustředil na unikátní složku lipoproteinu, apolipoprotein(a), respektive jeho gen (*LPA* lokus). Prokázala

se multialelní povaha lokusu, která nemá zatím v kódujících oblastech obdoby (Kamboh *et al.*,1991). Rozsah exprimovaného minisatelitu je v korelaci s velikostí Lp(a) (Lackner *et al.*,1991). Hladiny Lp(a) jsou ve všech doposud studovaných populacích značně variabilní a pohybují se od  $0.1-6 \times 10^2$  mg/dl (Trommsdorff *et al.*,1995; Gaw *et al.*,1998). I mezi jedinci se stejnou délkovou izoformou apo(a) kolísá koncentrace Lp(a) až s faktorem 200, a to především u nositelů krátkých alel (Cohen *et al.*,1993). Některé extrémně dlouhé izoformy se mohou vzhledem k omezené citlivosti detekčních technik jevit jako nulové. Právě nulové alely byly popsány v celém délkovém spektru apo(a) izoform s převahou u dlouhých variant (Gaw *et al.*,1994; Kraft *et al.*,1996<sup>b</sup>).

V závislosti na populaci je u bílé rasy hladina Lp(a) určena ze 40-60% délkovým polymorfizmem apo(a) genu. Zbývající variabilita je vysvětlována přítomností sekvenčních mikrovariant v kódujících a regulačních oblastech *LPA* genu (Kraft *et al.*,1992; deMeester *et al.*,1995). Vysoká koncentrace Lp(a) (>25-30 mg/dl), především v přítomnosti krátkých izoform (<22 K<sub>LPA</sub>IV2 repetice), byla v řadě studií asociována se zvýšenou incidencí předčasně ISCH (muži<55 let; ženy<65 let). (Kraft *et al.*,1996<sup>a</sup>; Wild *et al.*,1997; Kronenberg *et al.*,1999; Paultre *et al.*,2000; Price *et al.*,2001; Simó *et al.*,2001<sup>b</sup>).

### **II.2.3.3.1. Co určuje hladinu Lp(a)**

#### **II.2.3.3.1.1. Hormony a růstové faktory**

Hladina Lp(a) je na rozdíl od ostatních tříd lipoproteinů jen omezeně ovlivněna věkem, pohlavím, obezitou, dietou a dalšími exogenními faktory a zůstává během života poměrně stabilní (Boerwinkle *et al.*,1992; Boomsma *et al.*,1993; Wild *et al.*,1997; Foody *et al.*,2000<sup>a</sup>). Výjimkou jsou pouze ženy v menopauze, kdy je přechod spojen s 10-30% zvýšením koncentrace Lp(a) (Jenner *et al.*,1993; Wilmink *et al.*,2000).

Androgeny a estrogeny hladinu Lp(a) snižují pravděpodobně prostřednictvím snížené exprese apo(a) genu. Růstové faktory mají zjevně opačný efekt (Hobbs a White,1999). To je podpořeno nalezením vazebných míst pro transkripční faktory jako HNF-1 či pohlavní hormony v 5' netranslatované části apo(a) genu a jeho zesilovačích. Zdá se, že jak endogenní, tak exogenní faktory koncentraci Lp(a) skutečně, i když okrajově regulují (Wade *et al.*,1994; Ramharack *et al.*,1998; Fontana *et al.*,1999; Mooser *et al.*,2000).

### II.2.3.3.1.2. Syntéza apolipoproteinu(a)

Jedinci s odlišnými koncentracemi Lp(a) jeví stejný podíl katabolizovaných částic (Rader *et al.*, 1993, 1994). Rozdíly v hladině musí být tedy způsobeny rychlostí jeho syntézy a nikoliv degradace. Pro efektivnost tvorby Lp(a) je rozhodující dostupnost apo(a) pro vazbu s LDL částicemi, kterých je v plazmě dostatek. Veškerý apo(a) cirkulující v plazmě je tvořen játry. Rychlost syntézy charakteristická pro určitou apo(a) variantu je ovlivněna řadou faktorů.

#### *II.2.3.3.1.2.1. Transkripce*

Některé studie poukazují na pozitivní korelaci mezi koncentrací mRNA v cytoplazmě a Lp(a) v plazmě (Azrolan *et al.*, 1991). Odlišnosti v množství mRNA v hepatocytech jedinců s nestejnými alelickými variantami apo(a) může být důsledkem jak různé rychlosti transkripce, tak stability jejího produktu.

U každé alely apo(a) genu se nachází více než 30 míst rozpoznávaných sekvenčně specifickým proteinem vázajícím metylovanou DNA tzv. MDBP. Navázání tohoto proteinu může vést ke snížení exprese genu. Pravděpodobnost uplatnění tlumícího účinku se zvyšuje s počtem MDBP vazebných míst, jejichž počet s délkou genu stoupá (Dieplinger a Utermann, 1999). Více o regulaci transkripce viz. II.2.2.3.1. Regulační oblasti.

#### *II.2.3.3.1.2.2. Translace a posttranslační modifikace*

Translace ovlivňuje rychlost syntézy proteinu, posttranslační mechanismy především míru sekrece apo(a) z buňky. Právě posttranslační modifikace jsou rozhodujícím způsobem zodpovědné za rozdíly v koncentraci Lp(a) u různých délkových izoform apo(a) proteinu..

V endoplazmatickém retikulu (ER) je u každého kringlu vytvořena trojice disulfidických vazeb a přidány N-vázané glykany. Mohutná N-glykozylace je nezbytná pro interakci se šaperónem, správné složení proteinu a transport z buňky. Čím více kringlů nově vznikající protein obsahuje, tím delší čas je potřeba k jeho úplné maturaci. Se zvyšujícím se počtem kringlů tak stoupá podíl molekul, jež jsou degradovány dříve, než této maturace dosáhnou (Brunner *et al.*, 1996; Lobentanz *et al.*, 1998).

U řady sekretovaných i membránových proteinů byla popsána kontrola kvality nově vznikajícího proteinu, která je spojena s jeho zadržením v ER (Griffiths *et al.*, 1995). Chybně složené proteiny jsou označeny ubiquitinem a následně degradovány



v proteozómech. Při studiu kinetiky skládání různých délkových apo(a) izoform nebyly pozorovány žádné charakteristické rozdíly. Disulfidické můstky se tvoří až po vytvoření proteinu a kringlové domény se skládají nezávisle jedna na druhé. Čas potřebný ke složení apo(a) proteinu je asi 30 minut od syntézy (White *et al.*,1994), nicméně první sekrece či degradace se objevuje až po 2 hodinách (White *et al.*,1999). Hypotéza vysvětlující tuto proluku předpokládá přítomnost další modifikační události, která následuje po složení proteinu a je nezbytná pro uvolnění proteinu z ER. Schopnost podstoupit takovou úpravu je pravděpodobně izoformově specifická (White *et al.*,1997; Lobentanz *et al.*,1998).

Během všech výše zmíněných procesů zůstává molekula apo(a) svázaná v ER se šaperónem, jenž chrání nematurované molekuly před nežádoucí sekrecí. Pravým nulovým alelám většinou mutace zabraňuje podstoupit úplnou maturaci a proteinový produkt je v buňce zcela zadržen a degradován (White *et al.*,1994).

V Golgiho aparátu dochází k dalším specifickým úpravám navázaných cukrů i k vlastní glykozylaci. Tyto změny však, jak se zdá, nehrají roli ani při transportu z buňky, ani při interakci s apoB-100. Cukry, bohaté na kyselinu sialovou, přispívají ke konečné molekulové váhy apo(a) asi 30% a jsou zodpovědné za značný elektronegativní potenciál apo(a) proteinu (Scanu,1992).

Sekretované molekuly apo(a) zůstávají přechodně ukotveny v plazmatické membráně hepatocytů, kde se patrně z části odehrává i vlastní tvorba lipoproteinové částice (White a Lanford,1994).

#### II.2.3.3.1.2.3. Proteozomální degradace

Výsledky studií, které se zabývaly posttranslačními ději ve vztahu k apolipoproteinu(a) podporují hypotézu, která připouští více než jednu cestu pro degradaci sekretovaných proteinů zprostředkovanou proteozómy.

Proteiny určené k proteozomální degradaci jsou označeny mnoha kopiemi ubikvitinu. Transmembránové a sekretované proteiny se hromadí v endoplazmatických váčcích, jejichž membrána tvoří pro ubikvitin nepropustnou bariéru. Mechanismem prezentace takovýchto proteinových substrátů se ukázala být retrotranslokace. Proces retrotranslokace je uskutečňován pomocí proteinového kanálu, tzv. translokonu, který je rovněž zodpovědný za kotranslační translokaci proteinů do ER. Jakmile je protein translokován do cytoplazmy, je ubikvitinován a rychle degradován v proteozómech.

Apolipoprotein(a) je stejně jako jiné proteiny chráněn před degradací pevnou interakcí s endoplazmatickým šaperónem – kalnexinem (White *et al.*,1999). Kalnexin se

váže k substrátu primárně na monoglukozylované N-vázané postranní řetězce jako součást deglukozylačního a reglukozylačního cyklu v ER a brání tak jeho předčasnou degradaci. Chybně složené proteiny jsou zadržovány v ER a po čase uvolněny z vazby s kalnexinem. Následuje jejich translokace, ubikvitinace a degradace.

Data poukazují, že kromě těchto časných degradačních procesů existuje ještě další mechanismus, který je schopen odbourat nově vytvořený apo(a) (White *et al.*, 1999). Uvažovaný děj se pravděpodobně odehrává po uvolnění apo(a) z ER, ale ještě před jeho přenosem do střední části Golgiho aparátu a je rovněž závislý na proteozómech. Převážná většina apo(a) přítomného v buňce je překvapivě detekována právě v tomto kompartmentu.

U některých transmembránových proteinů byla pozorována obdobná akumulace chybně složených molekul v místě přechodu mezi ER a vlastním Golgiho aparátem. Tato oblast je ve spojení s komponentami degradačního systému závislým na ubikvitinu (Griffiths *et al.*, 1995). U jiných sekretovaných proteinů než je apo(a) nebyl však podobný jev zatím pozorován.

Zdá se, že rozdílná hladina Lp(a) vázaná na různé apo(a) izoformy je překvapivě způsobena především jejich odlišnou náchylností k presekreční proteozomální degradaci.

### **II.2.3.3.1.3. Katabolizmus**

Jen málo je známo o katabolismu Lp(a). Malá část může být odstraňována cestou LDL receptoru (LDLR) (Lingenhel *et al.*, 1998). Vzhledem k vysokým fyziologickým hladinám LDL částic v porovnání s částicemi Lp(a) a faktu, že LDL částice jsou katabolizovány LDL receptorem daleko efektivněji, hraje tato cesta jen minoritní roli a LDLR se rozhodně na katabolismu Lp(a) významně nepodílí (Kraft *et al.*, 2000). Možná úloha v katabolismu Lp(a) je uvažována i pro další členy rodiny LDL receptorů, jedná se především o LRP (receptor pro chylomikronové remnanty), gp330/megalin a VLDL receptor (Marz *et al.*, 1993; Argraves *et al.*, 1997; Ritter *et al.*, 1997).

Jak ukazují studie na zvířecích modelech jsou hlavním orgánem pro odstraňování Lp(a) z oběhu játra (Cain *et al.*, 2005). Nezanedbatelnou funkci mají i ledviny. V ledvinách je přítomný arterio-venózní gradient v hladině Lp(a) a jedinci s renální nedostatečností mají prokazatelně zvýšenou koncentraci tohoto lipoproteinu (Kostner *et al.*, 1996; Gonbert *et al.*, 2001; Reblin *et al.*, 2001). Určité množství apo(a) podstupuje proteolytické štěpení elastázou především mezi kringlem typu IV2 a IV3 kringlové repetyce, které dává vznik fragmentům následně vylučovaných močí (Gonbert *et al.*, 2001). Mechanismus, jakým se tyto relativně velké a značně glykozylované fragmenty dostávají do moči, není znám.

Vezmeme-li v úvahu jejich velikost (85-215 kDa) a značný negativní náboj zamezující glomerulární filtraci, nabízí se jako předpokládaný proces sekrece.

Množství apo(a) eliminované močí odpovídá asi 1% z katabolizované frakce (Kostner *et al.*,1996). Většina Lp(a) je degradována v integrální podobě buňkami jater či v periferních tkáních (Demant *et al.*,2001). Nedávno byl identifikován savčí jaterní asialoglykoproteinový receptor. Obdobně jako LDLR je tento receptor po endocytóze opět recyklován na buněčný povrch. Receptor selektivně váže a internalizuje glykoproteiny zbavené zbytků kyseliny sialové a může být zodpovědný za katabolismus Lp(a) *in vivo* (Hrzenjak *et al.*,2003).

### ***II.2.3.3.2. Mezipopulační rozdíly***

Populační studie prokázaly nejednotnost hodnot parametrů charakterizujících koncentraci Lp(a) mezi základními lidskými etniky. Ve všech sledovaných populacích se délkový polymorfismus apo(a) genu podílel na výsledné koncentraci Lp(a) stejným způsobem, ale rozdílnou měrou (Trommsdorff *et al.*,1995; Gaw *et al.*,1994).

Již první pozorování odhalila znatelně vyšší střední hladiny Lp(a) u příslušníků černošské a asijské rasy v porovnání s kavkazskou rasou, bez předpokládané spojitosti s častějším výskytem předčasných infarktů (Kraft *et al.*,1996<sup>b</sup>). Průměrná koncentrace Lp(a) vázaná na určitou délkovou formu se mezi základními etnickými skupinami značně liší. Rozdíly jsou determinovány jinými než délkovými variantami genu pro apo(a) a jejich množství i typ jsou populačně specifické. U černošského etnika jejich účinek dokonce do značné míry smazává příspěvek alel o odlišné délce.

#### ***II.2.3.3.2.1. Africké populace***

Africké populace vykazují oproti kavkazským populacím přibližně dvojnásobnou průměrnou hodnotu hladiny Lp(a), její větší rozptyl směrem k maximu a relativně pozvolný nárůst frekvence izoform se snižující se koncentrací. Zastoupení jednotlivých apo(a) alel v populaci má téměř normální rozdělení. Černošské etnikum se vyznačuje větší rozmanitostí délkového polymorfismu především ve prospěch dlouhých forem. Nejčastější alela je tvořena 29 repeticemi  $K_{LPAIV2}$ . Příspěvek odlišně dlouhých apo(a) alel ke koncentraci je ze všech srovnávaných etnik nejnižší. Vyšší průměrná hodnota koncentrace lipoproteinu je způsobena vyššími hladinami u nositelů delších apo(a) alel, a proto nezvyšuje riziko výskytu předčasných infarktů v populaci. Naopak průměrná hladina u

nositelů krátkých variant dosahuje nižších hodnot než v kavkazské populaci (Trommsdorff *et al.*,1995; Kraft *et al.*,1996<sup>b)</sup>).

#### **II.2.3.3.2.2. Asijské populace**

Průměrná hladina Lp(a) i její rozptyl je obdobný jako u afrických populací, avšak nárůst frekvence izoform se snižující se koncentrací je mnohem prudší. Distribuce alel v populaci má bimodální charakter s prvním vrcholem mezi 20-25 repeticemi K<sub>LPA</sub>IV2 a druhým, výraznějším u dlouhých variant (30-40 repetit K<sub>LPA</sub>IV2). V populaci je zachováno stejné délkové rozpětí jako u předešlého etnika. Nejčastěji pozorovaná forma obsahuje 36 repetit K<sub>LPA</sub>IV2. Příspěvek délkového polymorfizmu ke koncentraci Lp(a) je ze všech sledovaných skupin nejvyšší. Vyšší průměrná koncentrace Lp(a) je způsobena celkově vyššími hladinami u nositelů alel všech délek (Gaw *et al.*,1994; Kraft *et al.*,1996<sup>b)</sup>).

#### **II.2.3.3.2.3. Kavkazské populace**

Bílé etnikum má menší rozptyl i nižší průměrnou koncentraci Lp(a) než předešlá dvě etnika, s jednoznačnou preferencí jedinců s nízkými hodnotami (Lackner *et al.*,1991). V populaci mají zřetelnou převahu středně dlouhé (19-35 repetit K<sub>LPA</sub>IV2) alely na úkor obou extrémů (Trommsdorff *et al.*,1995). Nejdelší známé varianty nejsou pravděpodobně u kavkazských populací vůbec zastoupeny. Nejčastější forma čítá 29 repetit K<sub>LPA</sub>IV2. Koncentrace Lp(a) jsou výrazně vyšší u nositelů kratších alel (do 22 K<sub>LPA</sub>IV2 repetit), v kontrastu s velmi nízkými hodnotami u ostatních izoform (Kraft *et al.*,1996<sup>b)</sup>).

Evolučně staré lidské populace vykazují vysoké střední hladiny Lp(a), které jsou ale způsobené vysokou koncentrací lipoproteinu u nositelů dlouhých alel. To je také důvod proč u těchto populací není vysoká střední hladina Lp(a) spojena se zvýšeným rizikem aterosklerotických onemocnění (II.2.3.4.).

Původ izoform Lp(a) sahá až ke společnému předku všech moderních populací, s čímž koreluje i nalezená nejvyšší variabilita na africkém kontinentě. Vznik asijských i kavkazských populací byl pravděpodobně spojen s efektem „hrdla láhve“. Další rozdíly se nahromadily během oddělené evoluce důsledkem náhodných procesů, jako je genetický tah a akumulace náhodně vzniklých mutací.

#### II.2.3.4. Patologický účinek Lp(a)

Spojitosť mezi častějším výskytem aterosklerotických onemocnění a vysokou hladinou Lp(a), především u nositelů krátkých variant, byla prokázána řadou retrospektivních i prospektivních studií (Wild *et al.*,1997; Kronenberg *et al.*,1999; Donesh *et al.*,2000; Foody *et al.*,2000<sup>a</sup>); Paultre *et al.*,2000; Price *et al.*,2001). Způsob jakým částice do průběhu onemocnění přispívá lze usuzovat z povahy jejích složek. Lipoprotein(a) je pravděpodobně jeden z mála rizikových faktorů aktivně se podílejících na rozvoji aterosklerózy v jejích časných i pozdních stádiích (Scanu,1992; Kronenberg *et al.*,1999).

##### II.2.3.4.1. Časná stadia onemocnění

Pro rané fáze onemocnění je rozhodující aterosklerotický potenciál Lp(a), jehož nositelem je obdoba LDL částice, stejně jako prozánětlivý potenciál apo(a) proteinu.

Prostřednictvím apo(a) se lipoprotein s vysokou afinitou váže na složky cévní stěny (elastin, endoteliální buňky, fibrin, fibronectin, glykozaminoglykany, kolagen, laminin, makrofágy, ad.) (Beisiegel *et al.*,1990; McConathy a Trieu,1991; d' Angelo *et al.*,2005; Tsurupa *et al.*,2006). Efektivita vazby Lp(a) je ovlivněna velikostí neseného apo(a) proteinu, přičemž malé izoformy zaujímají daleko flexibilnější konformaci (Kang *et al.*,2002). Jakmile je Lp(a) zachycen v extracelulární matrix či na povrchu buněk, stává se cílem chemických modifikací, které mu umožňují vázat specifické receptory makrofágů a propagovat jejich přeměnu v pěnové buňky (Williams a Tabas,1995; van Barlingen *et al.*,1997). Především přítomnost i nepatrného množství oxidovaných forem LDL má řadu účinků vedoucích ke zmnožení tukových depozit v intimě cévy (Augé *et al.*,1996; Inoue *et al.*,2001; Szalai *et al.*, 2001). Další vstup Lp(a) do buněk je zprostředkován molekulami defensinu, který se uvolňuje degranulací neutrofilů (Higazi *et al.*,1997; Nassar *et al.*,2002). Lipoprotein(a), který je internalizován ve vazbě na defensin odolává vnitrobuněčné degradaci a může být transportován skrz endoteliální buňku do extracelulární matrix intimy cévy. Navzdory velmi nízkým koncentracím Lp(a) v plazmě v porovnání s ostatními lipoproteiny obsahujícími apoB, je tak většina apoB přítomného v lézích součástí právě této částice (Beisiegel *et al.*,1990; Lawn *et al.*,1992).

Důležitou úlohu při akumulaci Lp(a) v endoteliální stěně hrají pravděpodobně VLDL receptory exprimované na povrchu makrofágů v aterosklerotické lézi. Ve studii Argraves *et al.* (1997) byly právě tyto receptory příčinou hromadění Lp(a) v makrofázích. Lipoprotein(a) je po nasednutí na VLDL receptor internalizován endocytózou a poté

degradován lyzozómy. Interakce mezi VLDL receptorem a Lp(a) částicí je zprostředkována apo(a) složkou a nikoliv LDL částicí. Cholesterol uvolněný z LDL komponenty Lp(a) částice je pak zodpovědný za přeměnu makrofágů v pěnové buňky a za zvýšenou expresi VLDL receptoru na jejich povrchu.

Částice Lp(a) navíc podporuje vstup prozánětlivých buněk do aterosklerotických lézí. Prostřednictvím molekuly apo(a) se Lp(a) váže na  $\beta$ 2-integrin Mac-1 a tím propaguje adhezi monocytů a jejich následnou transendoteliální migraci (Sotiriou *et al.*,2006). Síla interakce mezi Mac-1 a apo(a) je opět závislá na počtu kringlových domén v apo(a). Vazba mezi Mac-1 a apo(a) byla ještě zesílena přítomností dalšího proaterogenního faktoru - homocysteinu. To vysvětluje výsledky ze studií, kde asociované riziko pro oba tyto rizikové faktory významně převyšovalo prostý součet rizika pro každý faktor zvlášť (Foody *et al.*,2000<sup>b</sup>). Aktivace Mac-1 receptoru po navázání Lp(a) částice vede k expresi prozánětlivého transkripčního faktoru NF $\kappa$ B (jaderný faktor  $\kappa$ B) a k tvorbě protrombotického tkáňového faktoru.

Bylo pozorováno, že Lp(a) je schopen tlumit expresi lyzozomální kyselé lipázy (LAL) v monocytech a naopak zvyšovat produkci IL-6, který je účinným prozánětlivým činidlem. Lyzozomální kyselá lipáza chrání svou aktivitou buňky jater a sleziny stejně jako makrofágy před zahlcením lipidy (Buechler *et al.*,2003). Prozánětlivý účinek mají i oxidované fosfolipidy hojně asociované s plazmatickým Lp(a). Oxidované fosfolipidy se mohou vázat jak na lyzinové zbytky izolovaných apo(a) fragmentů, tak na lipidickou složku Lp(a) částice (Tsimikas *et al.*,2005).

#### **II.2.3.4.2. Pozdní stadia onemocnění**

Vysoký stupeň homologie apo(a) proteinu s plazminogenem a současně neschopnost být přeměněn na příslušnou aktivní proteázu, činí z Lp(a) účinného inhibitora fibrinolýzy (Rouy *et al.*,1992; Palabrica *et al.*,1995; Falco *et al.*,1998).

V pokročilých lézích se regulace tvorby a degradace trombu ukazuje být rozhodujícím dějem pro progresivní vývoj ateromat. Spolu s plazminogenem a t-PA (tkáňový aktivátor plazminogenu ) soutěží Lp(a) o vazbu na fibrin a buněčné povrchy. Aktivní katabolický komplex je tvořen trojicí enzym-substrát-aktivátor, t-PA-plazminogen-fibrin. Lipoprotein(a) je schopen se vázat k aktivátoru, a tím ho znepřístupnit pro vazbu se zbytkem komplexu. Inhibice má nekompetitivní charakter a znemožňuje zvýšit bazální aktivitu t-PA vazbou s fibrinem (Loscalzo *et al.*,1990). Dochází tak ke zpomalení tvorby plazminu a jím zprostředkované fibrinolýze a přeměně transformačního růstového

faktoru- $\beta$  v aktivní formu (TGF-  $\beta$ ) (Lyons *et al.*,1990; Ezratty *et al.*,1993; Grainger *et al.*,1994; Shindo *et al.*,2001). Aktivní forma TGF-  $\beta$  je potřebná k inhibici proliferace a migrace buněk hladké svaloviny (Kojima *et al.*,1991; Grainger *et al.*,1993) a její nedostatek má za následek další růst ateromat. Efektivita inhibice fibrinolýzy je závislá na délkové izoformě a případně dalších sekvenčních změnách přítomného apo(a) proteinu (Hervio *et al.*,1993).

Jak bylo zmíněno už výše, Lp(a) může zvyšovat expresi tkáňového faktoru, který má významný protrombotický účinek. V souladu s těmito daty je i skutečnost, že Lp(a) váže a inaktivuje TFPI (inhibitor tkáňového faktoru) (Caplice *et al.*,2001). TFPI inhibuje *in vivo* katalytickou aktivitu komplexu TF/faktor VIIa.

Účinkem elastáz produkovaných granulocyty je v místě aterosklerotické léze apo(a) protein v Lp(a) částici štěpen na fragmenty, které jsou shodné s fragmenty apo(a) vylučovanými močí (II.2.3.3.1.3) (Hoff *et al.*,1994). Granulocyty rovněž vytvářejí u-PA (urokinázový aktivátor plazminogenu), který proteolyticky aktivuje buněčně vázaný plazminogen na plazmin. Ukázalo se, že fragmenty apo(a) jsou účinným inhibítorem této aktivace (Lamanuzzi *et al.*,2004).

### II.2.3.5. Fyziologická funkce Lp(a)

Jedinci s absencí Lp(a) nejeví žádný patologický fenotyp. Ve zdravé cévní stěně nebyl Lp(a) detekován. Nicméně hojící se tkáň je charakteristická vysokou koncentrací Lp(a). Pravděpodobnou fyziologickou úlohou Lp(a) je zdá se právě účast při hojivých procesech (Hobbs a White,1999).

Během časných stádií hojení je rána pokrytá krevní sraženinou a poškozené místo infiltrováno buňkami vyvolávajícími zánět. Částice Lp(a) obalují fibrinovou "čepičku" a brání tak její externí fibrinolýze (Yano *et al.*,1997). Zdá se, že Lp(a) dále dodává molekuly potřebné pro tvorbu buněčných membrán a přispívá tak k regeneraci poškozené tkáně. Částice rovněž svou přítomností podporuje proliferaci endoteliálních a svalových buněk novotvořených cév a chemotakticky atrahuje monocyty a zvyšuje jejich vstup do lézí (Mooser *et al.*,2000). V lézích, kde je epitel již regenerován, nejsou částice Lp(a) detekovány (Yano *et al.*,1997).

Počítačová modelace částice Lp(a) naznačila, že opakující se doména  $K_{LPAIV}$  odstupuje od povrchu částice a pročesává okolní tkáň. Repetitivní jednotka apo(a) proteinu váže  $\beta_2$ -glykoprotein-1, který následně váže oxidované fosfolipidy (Tsimikas *et al.*,2004). Oxidované lipidy jsou poté dopraveny do LDL komponenty Lp(a) částice, kde mohou být

degradovány přítomnou acetylhydrolázou aktivačního faktoru krevních destiček nebo neutralizovány molekulami s antioxidačním účinkem, jako je vitamin E (Blencowe *et al.*, 1995). Hromaděním a deaktivací biologicky aktivních lipidů může lipoprotein(a) sloužit jako detoxikační jednotka.

Vysoké hladiny lipoproteinu u afrických populací mohou svědčit o jeho protektivní úloze při styku s některou z tropických infekcí. Protektivní působení může být dáno schopností prodloužit trvání trombu nebo akcelerací odstraňování oxidovaných lipidů vytvořených během hemolytické krize, která je průvodním příznakem celé řady afrických infekčních onemocnění (Hobbs a White, 1999).



## CÍL PRÁCE

⇒ zjistit jaká je variabilita v regulačních oblastech *LPA* genu

- zavedení PCR reakce pro amplifikaci promotoru, DHII a DHIII zesilovače
- zavedení DGGE analýzy pro mutační analýzu promotoru, DHII a DHIII zesilovače
- zavedení fragmentační analýzy pro genotypizaci STR polymorfizmu
- zavedení restrikční analýzy pro stanovení frekvence polymorfizmů v populačním souboru
- zavedení alelicky specifické PCR pro stanovení frekvence polymorfizmů v populačním souboru

⇒ zjistit zda jsou významné rozdíly v distribuci alel polymorfních lokusů mezi skupinami jedinců s různým rozpětím koncentrací Lp(a)

⇒ určit míru vazebné nerovnováhy mezi alelami nalezených polymorfních lokusů

⇒ otestovat asociaci mezi složenými genotypy (kombinace více polymorfních lokusů) a hladinami Lp(a)

## **III.MATERIÁL A METODY**

### **III.1.SOUBOR**

Základní soubor vybraný z DNA banky III.interní kliniky, 1.LF a VFN UK v Praze tvořila DNA 1830 nepříbuzných jedinců z české populace.

Ze základního souboru byli vyloučeni jedinci s renální nedostatečností a jedinci s poruchou endokrinního systému. Základní soubor byl rozdělen podle hladiny Lp(a) na kvintily. Mechanistickým náhodným výběrem byl z každého kvintilu vybrán výběrový soubor: 1. kvintil hladina Lp(a) od 0 do 8 mg/dl (134 jedinců), 2. kvintil hladina Lp(a) od 9 do 15 mg/dl (134 jedinců), 3. kvintil hladina Lp(a) od 16 do 24 mg/dl (120 jedinců), 4. kvintil hladina Lp(a) od 25 do 64 mg/dl (146 jedinců) a 5. kvintil hladina Lp(a) od 65 do 335 mg/dl (179 jedinců). Výběrový soubor, u něhož byla provedena DNA analýza, byl tvořen 713 nepříbuznými jedinci. Zařazeni byly pouze jedinci, kteří podepsali informovaný souhlas s vyšetřením DNA v rámci předchozích výzkumných studií zabývajících se výzkumem předčasného rozvoje aterosklerózy. Charakteristika klinických parametrů a hodnoty sérových lipidů v jednotlivých kvintilech viz Tab.3.1.

Populační soubor byl poskytnutý Ústavem biologie a lékařské genetiky, 1.LF a VFN UK v Praze a tvořila ho DNA 263 nepříbuzných jedinců z české populace. Jednalo se o DNA kontrol a DNA dobrovolníků z odlišných výzkumných projektů. Tento soubor tvořilo 51,3% mužů, věkové rozpětí souboru bylo 3-91 let s věkovým průměrem 40 let. Jiné klinické parametry a hodnoty sérových lipidů nebyly u tohoto souboru k dispozici. Populační soubor byl použit pro získání hodnot vazebné nerovnováhy a populačních frekvencí nalezených sekvenčních variant a složených genotypů.

### **III.2.KONCENTRACE LP(a)**

Koncentrace Lp(a) byla stanovena ze zmraženého séra, které bylo separováno vždy do 2 hod od odběru a následně zamraženo (-20°C) za účelem dlouhodobého skladování. Vlastní stanovení hladiny Lp(a) bylo provedeno vždy do 2 měsíců od zamražení séra. Stanovení hladiny Lp(a) v plazmě bylo provedeno pomocí metody immuno LEIA<sup>®</sup> (Technoclone GmbH). Během každého stanovení byly použity jak interní kontroly, tak kontroly a standardy dodávané výrobcem.



### III.3. IZOLACE DNA

DNA byla izolována z čerstvé nebo zmražené krve pomocí vysolovací metody modifikované podle Miller *et al.* (1988).

### III.4. ROZTOKY PRO DGGE ANALÝZU

#### 40% zásobní akrylamid/bisakrylamid (37,5:1)

do 100 ml destilované H<sub>2</sub>O:

38,96 g akrylamidu

1,04 g bisakrylamidu

⇒ přefiltrovat přes filtrační papír

⇒ uschováno v tmavé nádobě při 4°C

#### 50xTAE pufr (zásobní roztok)

do 1000 ml destilované H<sub>2</sub>O:

242,2 g tris-base → 2 M

82,0 g sodium acetate → 1 M

100,0 ml 0,5 M EDTA pH8 → 50 mM

⇒ pomocí kyseliny octové (cca 100 ml) upravit pH na 7,4

⇒ přefiltrovat přes filtrační papír a sterilizovat 20 min

⇒ skladování při pokojové teplotě

#### 8% PAD (polyakrylamid)

#### 0% denaturační roztok (zásobní) 8% PAD

do 100 ml destilované H<sub>2</sub>O:

20 ml (40% akrylamid/bisakrylamid) → 8%

2 ml (50xTAE pufru) → 1x

⇒ odplynit (vakuovou vývěvou)

⇒ lze skladovat v tmavé nádobě při 4°C po dobu cca 6 měsíců

**100% denaturační roztok (zásobní) 8% PAD, 7 M urea, 40% formamid**

do 100 ml destilované H<sub>2</sub>O :

20 ml (40% akrylamid/bisakrylamid) → 8%

2 ml (50xTAE pufru) → 1x

40 ml (formamidu)

42 g (urea) Mr=60.06 g

⇒ rozpouštět na míchačce s ohřevem

⇒ odplynit (vakuovou vývěvou)

⇒ lze skladovat v tmavé nádobě při 4°C po dobu cca 6 měsíců

**6% PAD (polyakrylamid)****0% denaturační roztok (zásobní) 6% PAD**

do 100 ml destilované H<sub>2</sub>O:

15 ml (40% akrylamid/bisakrylamid) → 6%

2 ml (50xTAE pufru) → 1x

⇒ odplynit (vakuovou vývěvou)

⇒ lze skladovat v tmavé nádobě při 4°C po dobu cca 6 měsíců

**100% denaturační roztok (zásobní) 6% PAD, 7 M urea, 40% formamid**

do 100 ml destilované H<sub>2</sub>O :

15 ml (40% akrylamid/bisakrylamid) → 6%

2 ml (50xTAE pufru) → 1x

40 ml (formamidu)

42 g (urea) Mr=60.06 g

⇒ rozpouštět na míchačce s ohřevem

⇒ odplynit (vakuovou vývěvou)

⇒ lze skladovat v tmavé nádobě při 4°C po dobu cca 6 měsíců

## III.5.AMPLIFIKAČNÍ REAKCE

### III.5.1.AMPLIFIKACE DHIII ZESILOVAČE

Amplifikace 1142-bp dlouhého fragmentu, který obsahuje DHIII zesilovač, byla provedena pomocí primerů a modifikovaných reakčních podmínek uvedených v publikaci Puckey a Knight (2003).

primer DHIIIF: 5' tcgtcaaagtcattctccgccc 3'

primer DHIIIR: 5' gcttgctgggaaaacctatt 3'

#### PCR reakce pro amplifikaci DHIII zesilovače

⇒ 25 µl reakční směs

120-250 ng genomické DNA

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

200 ng každého priméru

0,1 mM každého dNTP

0,5 jednotky Taq DNA Polymerase (recombinant) a pufr (Fermentas)

#### PCR reakce pro amplifikaci DHIII zesilovače

96°C / 2 min denaturační krok

30 s / 94°C  
30 s / 50°C  
90 s / 68°C

} 25 cyklů

5 min / 68°C

### III.5.2.SEKVENAČNÍ REAKCE

#### Presekvenační přečištění PCR produktu

Pro přečištění produktu PCR reakce byl použit výrobcem doporučovaný protokol (QIAquick PCR Purification kit Protocol) dodávaný ke kitu (QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit, QIAGEN GmbH).

### Složení sekvenační reakce

Sekvenační reakce byla provedena pomocí sekvenačního kitu (BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems).

#### ⇒ 10 µl reakční směs

- 4 µl BigDye<sup>™</sup> Terminator sekvenační mix
- 1-3 µl příslušného PCR produktu (po presekvenačním přečištění)
- 0,3-0,5 µl sekvenačního priméru
- dolpněno H<sub>2</sub>O do příslušného objemu

### Podmínky sekvenační reakce

96°C / 1 min denaturační krok

20 s / 96°C  
10 s / 50°C  
4 min / 60°C

} 25 cyklů

### Postsekvenační přečištění produktu sekvenace

Pro přečištění produktu sekvenační reakce byl použit výrobcem doporučovaný protokol (DyeEx 2.0 Spin Protocol for Dye-Terminator removal) dodávaný ke kitu (DyeEx<sup>™</sup> 2.0 Spin Kit, QIAGEN GmbH).

## III.6.GENETICKÝ ANALYZÁTOR

### III.6.1.PODMÍNKY SEKVENAČNÍ ANALÝZY

Produkt sekvenační reakce byl po postsekvenačním přečištění analyzován na genetickém analyzátoru ABI PRISM 310.

**Podmínky analýzy:** délka kapiláry 47 cm; 50 µm; Seq POP-6<sup>™</sup> polymer; teplota 50°C; nástřik 30-60s; napětí při nástřiku 2 kV; napětí při analýze 15 kV

**Doba analýzy:** fragment promotoru – 29 min

fragment DHII zesilovače – 22 min

fragment DHIIIA zesilovače – 42 min

fragment DHIIIB zesilovače – 20 min

### III.6.2.PODMÍNKY ANALÝZY STR LOKUSU

Produkt amplifikační reakce STR lokusu byl analyzován metodou fragmentační analýzy na genetickém analyzátoru ABI PRISM 310.

**Podmínky analýzy:** délka kapiláry 47 cm; 50  $\mu\text{m}$ ; POP-4<sup>TM</sup> polymer; GeneScan<sup>TM</sup>-500 TAMRA Size Standard; teplota 60°C; nástřik 5s; napětí při nástřiku 15 kV; napětí při analýze 15 kV

**Doba analýzy:** 20 min

### III.7.STATISTIKA

1-way ANOVA,  $\Delta$  statistika vazebné nerovnováhy, Hardy-Weinbergova rovnováha,  $\chi^2$ -test, metoda maximální věrohodnosti

### III.8.SOFTWARE A DATABÁZE

#### Software

Haploview, verze 32.2 ([www.broad.mit.edu/mpg/haploview/](http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/))

NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>)

Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi.](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi.))

RestrictionMapper ([www.restrictionmapper.org/](http://www.restrictionmapper.org/))

STATISTICA, verze 7.1 (StatSoft, Inc.)

WinMelt<sup>TM</sup> verze 2.0.13 (Bio-Rad Laboratories)

#### Databáze

ExPASy ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch))

NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/))





Klempovaný primér zajišťuje detekci záměn v celém rozsahu analyzovaného fragmentu. To umožňuje sekvence klempu, která je tvořena výhradně G a C nukleotidy a vytváří tak umělou doménu s nejvyšší teplotou tání. Klempovaný primér pozměňuje teplotní profil fragmentu (viz.IV.2.1.) a navazuje na přirozeně se vyskytující doménu s nejvyšší teplotou tání. Mutační primér byl navržen tak, aby zanesená změna ležela poblíž klempovaného priméru. Mutovaný fragment byl použit při optimalizaci podmínek DGGE (denaturační gelová gradientová elektroforéza) a jako vnitřní pozitivní kontrola během vlastní analýzy.

Zesilovač DHIII je součástí LINE-1 elementu. Specifita analyzované sekvence byla zaručena amplifikací 1142 bp dlouhého fragmentu pomocí specifické PCR reakce (viz.III.5.1.). Vlastní 600 bp dlouhá sekvence DHIII zesilovače byla analyzována ve dvou nezávislých DGGE reakcích s 39 bp překryvem.

**Sekvence promotoru:** NCBI databáze, GI:2323518

**Sekvence DHII zesilovače:** NCBI databáze, GI:2625011

**Sekvence DHIII zesilovače:** NCBI databáze, GI:40644101

#### Tab.4.2.

Sekvence primérů použitých pro alelicky specifické PCR reakce při analýze populačního souboru.

| název priméru                | sekvence priméru                               | T <sub>m</sub> °C | velikost amplikonu |
|------------------------------|--|-------------------|--------------------|
| <b>62alC<sup>1</sup></b>     | 5' aattgactatctggttgc 3'                       | 52                | 205 bp             |
| <b>62com</b>                 | 5' ttactacattgtgggaga 3'                       | 50                |                    |
| <b>1712alA<sup>1</sup></b>   | 5' gccagccgaatcaggt 3'                         | 56                | 181 bp             |
| <b>1712com</b>               | 5' gtgcgggatataaactcc 3'                       | 55                |                    |
| <b>1617alC<sup>1</sup></b>   | 5' acctggaaaatcgagtc 3'                        | 50                | 160 bp             |
| <b>1617alA<sup>1,2</sup></b> | 5' atcgaaacggaatgcgttaaactgga<br>aaatcgagta 3' | 50                | 188 bp             |
| <b>1617com</b>               | 5' ccttgcagttgatctc 3'                         | 50                |                    |

<sup>1</sup> alelicky specifický primér; **t** označuje místo se zanesenou změnou

<sup>2</sup> atcgcg nekomplementární část priméru

Nekomplementární část priméru odlišuje velikost fragmentů vzniklých při amplifikaci jednotlivých alel a umožňuje detekovat heterozygotního jedince během jedné PCR reakce. Změna báze poblíž 3' konce každého alelicky specifického priméru destabilizuje primér a snižuje riziko výskytu falešně pozitivního produktu.

## **IV.1.2. PCR REAKCE**

### **IV.1.2.1.Složení PCR reakce**

#### **PCR reakce pro amplifikaci promotoru a DHII zesilovače**

⇒ 50 µl reakční směs

120-250 ng genomické DNA

3,5 mM (promotor) or 2,0 mM (DHII zesilovač) MgCl<sub>2</sub>

200 ng každého priméru

0,1 mM každého dNTP

1% DMSO

0,5 jednotky Taq DNA Polymerase (recombinant) a pufr (Fermentas)

#### **PCR reakce pro amplifikaci DHIIIA a DHIIIB zesilovače**

⇒ 50 µl reakční směs

1µl ng 1142 bp dlouhý PCR produkt jako templát (viz.III.5.1.)

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

200 ng každého priméru

0,1 mM každého dNTP

1% DMSO

0,5 jednotky Taq DNA Polymerase (recombinant) a pufr (Fermentas)

#### **PCR reakce pro amplifikaci mutovaných fragmentů**

Příprava mutovaného fragmentu byla dvoukroková. Během 1.PCR reakce byla zanesena do fragmentu změna pomocí mutovaného priméru. Během 2.PCR reakce byl fragment obohacen o GC-klemp. Oproti uvedeným reakcím obsahovala první PCR 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, mutovaný primér a neobsahovala DMSO. Druhá PCR reakce byla nezměněna, pouze jako templát obsahovala 0,5 -1 µl první PCR reakce.

**PCR reakce pro amplifikaci STR polymorfizmu**

⇒ 25 µl reakční směs

120-250 ng genomické DNA

2,5 mM MgCl<sub>2</sub>

200 ng každého priméru

0,1 mM každého dNTP

0,5 jednotky Taq DNA Polymerase (recombinant) a pufr (Fermentas)

**PCR reakce pro alelicky specifickou PCR +62T/C polymorfizmu**

⇒ 25 µl reakční směs

120-250 ng genomické DNA

1,0 mM MgCl<sub>2</sub>

70 ng priméru 62a1C

50 ng priméru 62com

0,1 mM každého dNTP

0,3 jednotky Taq DNA Polymerase (recombinant) a pufr (Fermentas)

**PCR reakce pro alelicky specifickou PCR -1712G/T polymorfizmu**

⇒ 25 µl reakční směs

120-250 ng genomické DNA

1,0 mM MgCl<sub>2</sub>

70 ng priméru 1712a1A

50 ng priméru 1712com

0,08 mM každého dNTP

0,3 jednotky Taq DNA Polymerase (recombinant) a pufr (Fermentas)

**PCR reakce pro alelicky specifickou PCR -1617C/A polymorfizmu**

⇒ 25 µl reakční směs

120-250 ng genomické DNA

1,0 mM MgCl<sub>2</sub>

90 ng priméru 1617a1C

70 ng priméru 1617a1A

50 ng priméru 1617com

0,08 mM každého dNTP

0,3 jednotky Taq DNA Polymerase (recombinant) a pufr (Fermentas)

**IV.1.2.2.Podmínky PCR reakce****PCR reakce pro amplifikaci promotoru a DHII zesilovače**

96°C / 2 min denaturační krok

30 s / 94°C }  
30 s / 62°C } 35 cyklů  
30 s / 72°C }

3 min / 70°C

**PCR reakce pro amplifikaci DHIIIA a DHIIIB zesilovače**

96°C / 2 min denaturační krok

30 s / 94°C }  
30 s / 68°C } 35 cyklů  
30 s / 72°C }

3 min / 70°C

**PCR reakce pro amplifikaci mutovaných fragmentů**

Reakce je nezměněna a odpovídá amplifikačním podmínkám jednotlivých fragmentů. Počet amplifikačních cyklů je u první PCR reakce snížen na 28.

**PCR reakce pro amplifikaci STR polymorfizmu**

96°C / 2 min denaturační krok

30 s / 94°C  
30 s / 62°C  
20 s / 72°C

} 25 cyklů

3 min / 70°C

**PCR reakce pro amplifikaci alelicky specifických produktů**

96°C / 2 min denaturační krok

30 s / 94°C

20 s / 58°C (-1712G/T) nebo 50°C (-1617C/A; +62T/C)

20 s / 72°C

} 35 cyklů

3 min / 70°C

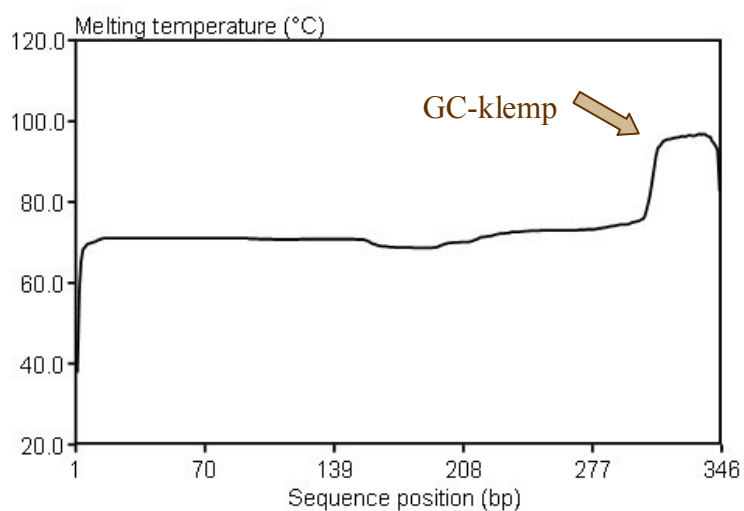
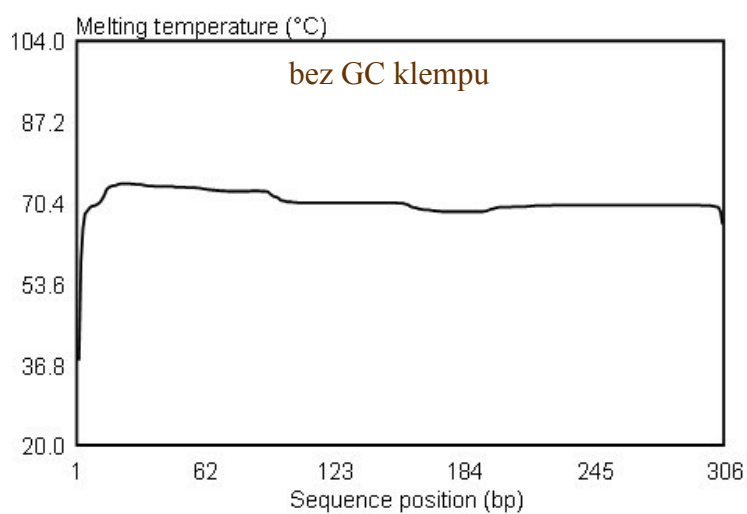
## IV.2.DETEKČNÍ ANALÝZY

### IV.2.1.DGGE ANALÝZA

#### IV.2.1.1.Teplotní domény

Pomocí programu WinMelt<sup>TM</sup> (Bio-Rad) bylo zjištěno rozložení teplotních domén u fragmentů určených pro DGGE analýzu. Současně byly detekovány změny tání fragmentů po vnesení GC-klempu a zanesením mutace.

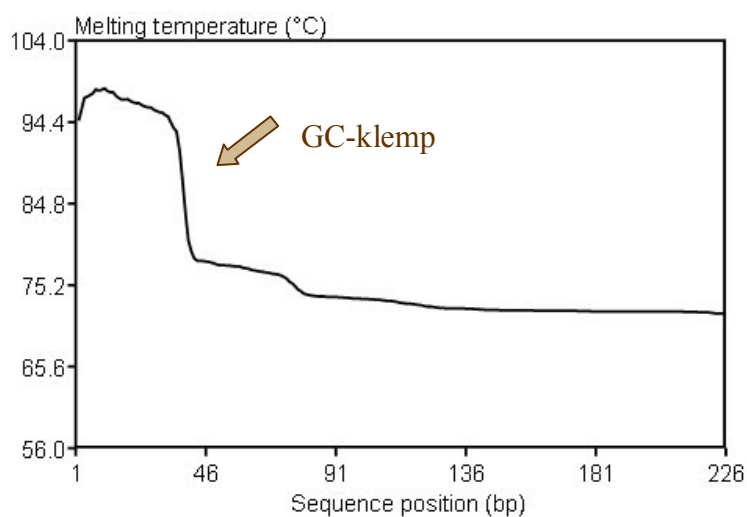
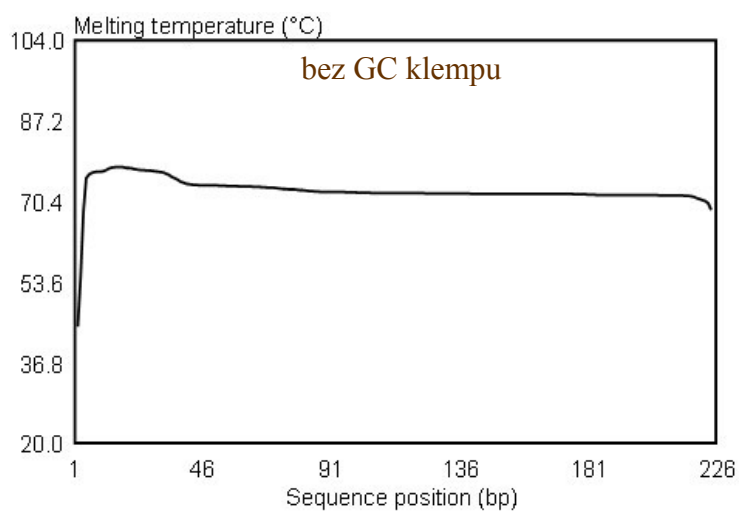
Převod teplot tání jednotlivých domén na jednotky chemického gradientu byl proveden pomocí přepočtového vzorce:  $(3,2x T_m)-182,4$  ( $T_m$  je teplota tání domény)

Fragment **promotor**

Klempovaný fragment **promotoru** má tři teplotní domény, které tají při cca 71°C, 68,6°C a 73,5°C.

Tyto teploty tání odpovídají 45%, 37% a 53% chemického gradientu.

## Fragment zesilovač DIII

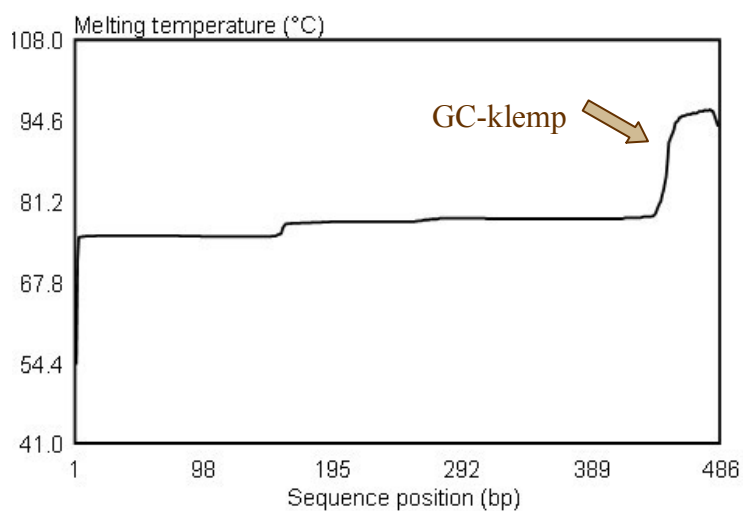
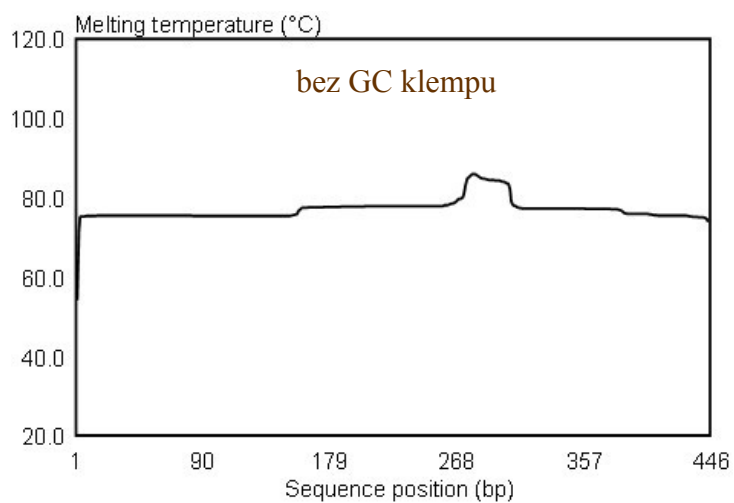


Klempovaný fragment **DIII** má tři teplotní domény, které tají při cca 77°C; 74°C a 72°C.

Tyto teploty tání odpovídají 64%; 54,4% a 48% chemického gradientu.



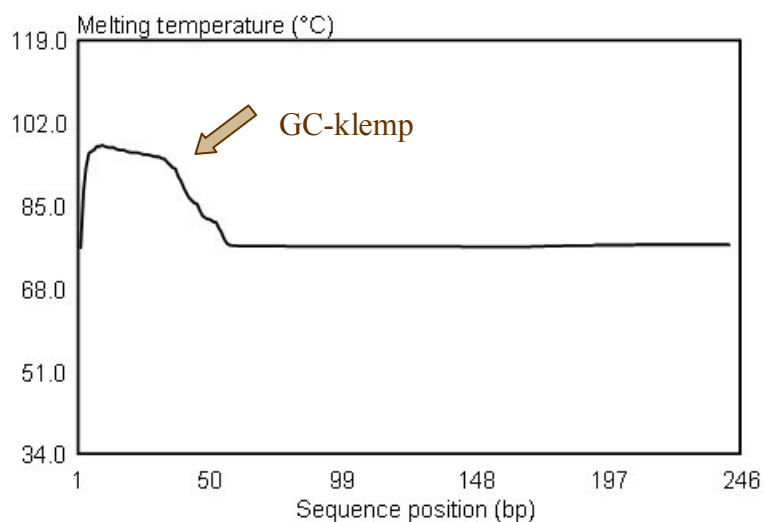
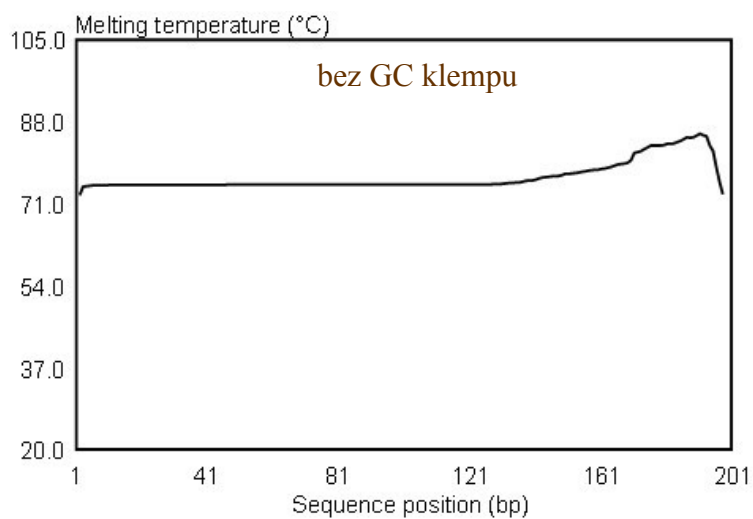
## Fragment zesilovač DHIII A



Klempovaný fragment **DHIII A** má tři teplotní domény, které tají při cca 75,5°C; 78°C a 78,5°C.

Tyto teploty tání odpovídají 59%, 67% a 69% chemického gradientu.

## Fragment zesilovač DHIIB

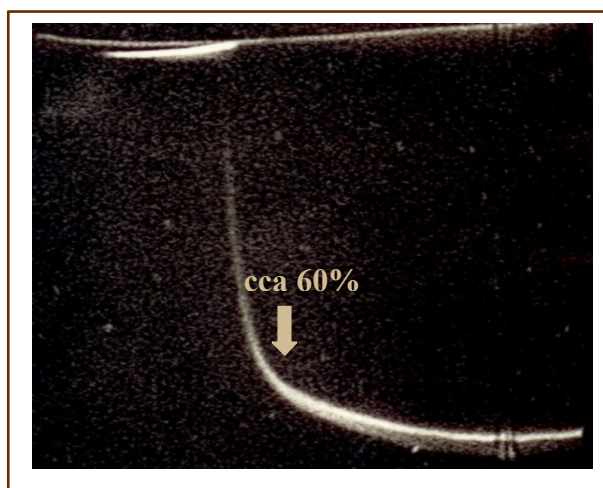


Klempovaný fragment **DHIIB** má jednu teplotní doménu, která taje při cca 77°C.

Tato teplota tání odpovídá 64% chemického gradientu.

#### IV.2.1.2. Optimalizace DGGE analýzy

a) Perpendikulární DGGE (DCode™ Universal Mutation Detection System, Bio-Rad)



100% chemický gradient 0%

fragment **promotoru**

podmínky DGGE

6% polyakrylamid

(37,5:1)

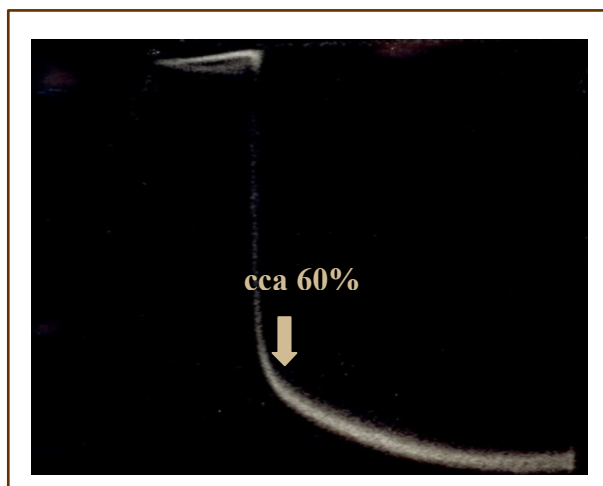
gradient 0-100%

60°C; 1xTAE

130V (konstantní)

1 hod 45 min

➔ gradient pro analýzu  
fragmentu určen na  
20-80%



100% chemický gradient 0%

fragment **zesilovač DHII**

podmínky DGGE

8% polyakrylamid

(37,5:1)

gradient 0-100%

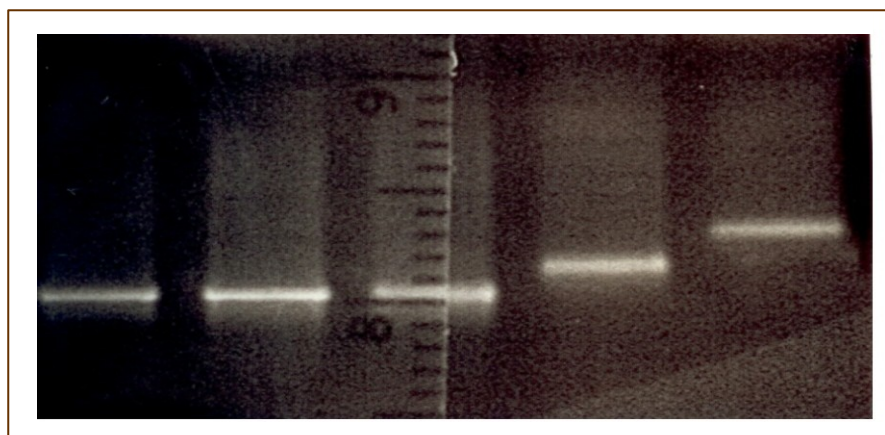
60°C; 1xTAE

130V (konstantní)

1 hod 45 min

➔ gradient pro analýzu  
fragmentu určen na  
30-80%

## b) Časový odhad DGGE analýzy



6 hod      5 hod      4 hod

Rychlost putování fragmentu **zesilovače DHII** v 8% polyakrylamidovém gelu (37,5:1), poté co došlo k jeho zpomalení vlivem částečné denaturace.

Údaje byly využity pro stanovení doby trvání DGGE analýzy (obdobný časový odhad byl proveden i u zbývajících fragmentů).

#### IV.2.1.3. Podmínky DGGE analýzy

Před každou DGGE analýzou byl zvýšen počet heteroduplexů ve vzorku denurací naamplifikovaných fragmentů 5 min/96°C a jejich následnou inkubací 1 hod při anelační teplotě.

##### fragment **promotoru**

16 cm gel, 6% polyakrylamid (37,5:1), denaturační gradient 20-80%, doba analýzy 8 hod, při konstantním napětí 150V a teplotě 60°C

##### fragment **zesilovače DHII**

10 cm gel, 8% polyakrylamid (37,5:1), denaturační gradient 30-80%, doba analýzy 8 hod, při konstantním napětí 150V a teplotě 60°C

**fragment zesilovače DHIII A**

16 cm gel, 6% polyakrylamid (37,5:1), denaturační gradient 30-90%, doba analýzy 16 hod, při konstantním napětí 150V a teplotě 60°C

**fragment zesilovače DHIII B**

10 cm gel, 8% polyakrylamid (37,5:1), denaturační gradient 40-80%, doba analýzy 2.5 hod, při konstantním napětí 150V a teplotě 60°C

Detekce analyzovaných fragmentů byla provedena barvením gelu v EtBr po dobu 15-20 min a následnou vizualizací pod UV lampou. Během každé DGGE analýzy byly použity vnitřní pozitivní kontroly připravené pomocí mutačních primérů (viz.IV.1.2.).

## IV.2.2.RESTRIKČNÍ ANALÝZA

**Restrikční reakce v 10 µl objemu:**

- 5 jednotek příslušného restrikčního enzymu
- 5 µl příslušného amplifikovaného fragmentu
- 1 µl odpovídajícího pufru
- + H<sub>2</sub>O (doplněno do objemu)

**fragment promotoru**

Štěpen ve dvou nezávislých restrikčních reakcích a to *Hpy*188III (NEB) enzymem pro detekci +121G/A polymorfizmu a *Hpy*CH4IV (NEB) enzymem pro detekci +93C/T varianty.

**fragment zesilovače DHIII A**

Štěpen *Dpn*II (NEB) restrikčním enzymem pro detekci -1230G/A polymorfizmu.

Výsledky restrikčních reakcí viz.IV.3.1.3. a IV.3.2.4.

### **IV.2.3.FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA**

Produkt amplifikační reakce STR polymorfizmu byl následně analyzován na ABI PRISM 310 genetickém analyzátoru metodou fragmentační analýzy.

Podmínky fragmentační analýzy viz.III.6.2.

### **IV.2.4.ALELICKY SPECIFICKÁ PCR**

Detekce produktů PCR alelicky specifické reakce byla provedena na 2% agarózovém gelu po jeho předchozím barvení EtBr (viz.IV.3.1.3.; IV.3.2.4.). Během každé alelicky specifické analýzy byly použity vnitřní pozitivní i negativní kontroly.

## IV.3.VÝSLEDKY ANALÝZ

### IV.3.1. PROMOTOR

Sekvence a sekvenční změny nalezené v promotoru *LPA* genu.

```

tggatcatggaagttaccagcaaatatgagctacttttatgattttattttatccaaaagaaagagaatgaaag
                                     IL-6
aagagggggaggaaacaagactaatcaggaaagatgaaggtctaggggtgaggggaaggagtaaggagacataaa
CEBP          -93G/A          IL-6RC  -70C/T          CEBP-RC
ggcaatgtgggagcagctgagGggggaaatggctttcaccacttCccagcatctattgacattgcactctcaaa
                                     LF-A1          HNF-1α
tattttataagactctatattcaaggaatggttgaacctgtctgagccagtgccatgggtctctgagagaat
                                     +1
cattaacttaatttgactatctggtttgTgggtgctgttactctcatgtaagtcaacaaCgtcctgggattgg
                                     +62T/C          +93C/T  IL-6
gacacactttctggGcactgctggccagtcoccaaaaatggaacataaggaagtggttcttctacttcttttatt
                                     +121G/A          Met

```

ctggga vazebný element pro příslušný transkripční faktor  
atg startovní kodón

**Tab.4.3.**

Přehled a charakterizace sekvenčních změn nalezených v promotoru.

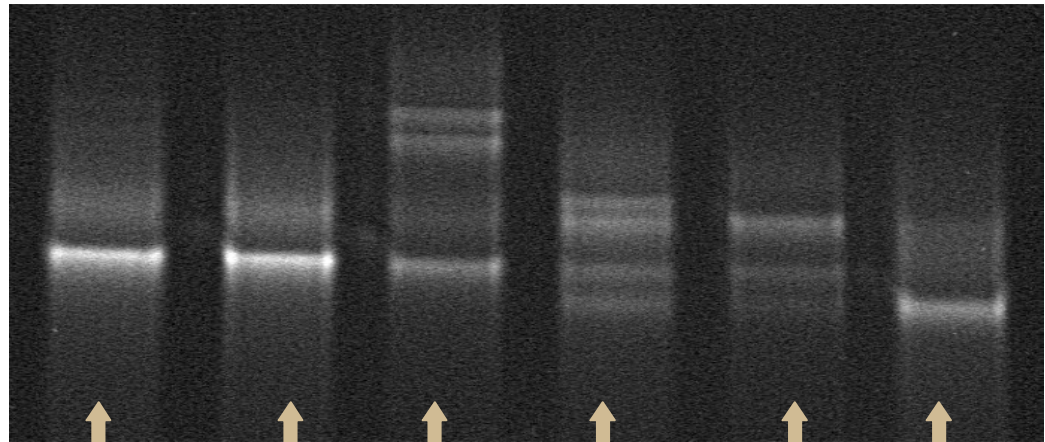
| regulační oblast | nalezené varianty | počet pozorování/kvintil <sup>1</sup> | publikováno                              |
|------------------|-------------------|---------------------------------------|--|
| <b>promotor</b>  | +121G/A           | viz. Tab.4.4                          | Ichinose a Kuriyama,1995                 |
|                  | +93C/T            | viz. Tab.4.5.                         | Ichinose a Kuriyama,1995                 |
|                  | +62T/C            | 4/3; 3/4; 2/5                         | Zidkova <i>et al.</i> ,2007              |
|                  | -70C/T            | 1/3                                   | Zidkova <i>et al.</i> ,2007 <sup>‡</sup> |
|                  | -93G/A            | 1/3                                   | Zidkova <i>et al.</i> ,2007 <sup>‡</sup> |

<sup>1</sup> číslo před lomítkem znamená počet pozorování a číslo za lomítkem kvintil

<sup>‡</sup> oba lokusy jsou ve vazbě

## IV.3.1.1. Polymorfismus +121G/A a +93C/T (část 1)

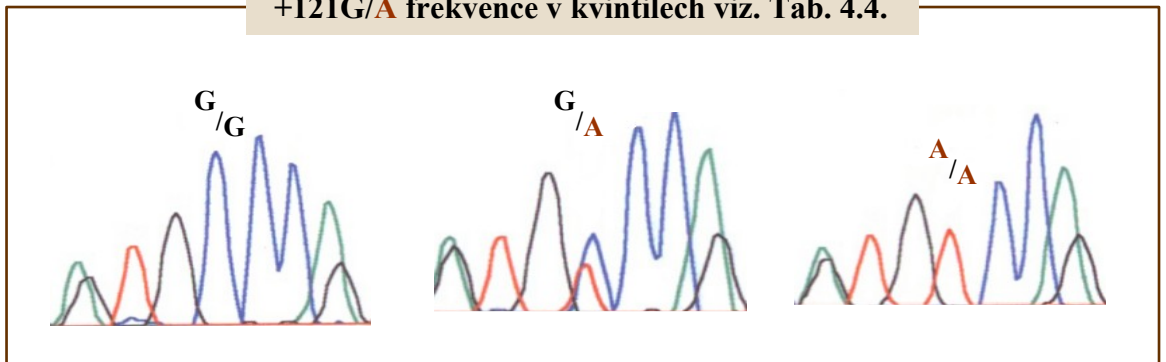
DGGE analýza (Bio-Rad)



↑ +121G/G +93T/T    ↑ +121A/A +93C/C    ↑ +121G/A +93C/T    ↑ +121G/G +93C/T    ↑ +121G/A +93C/C    ↑ +121G/G +93C/C

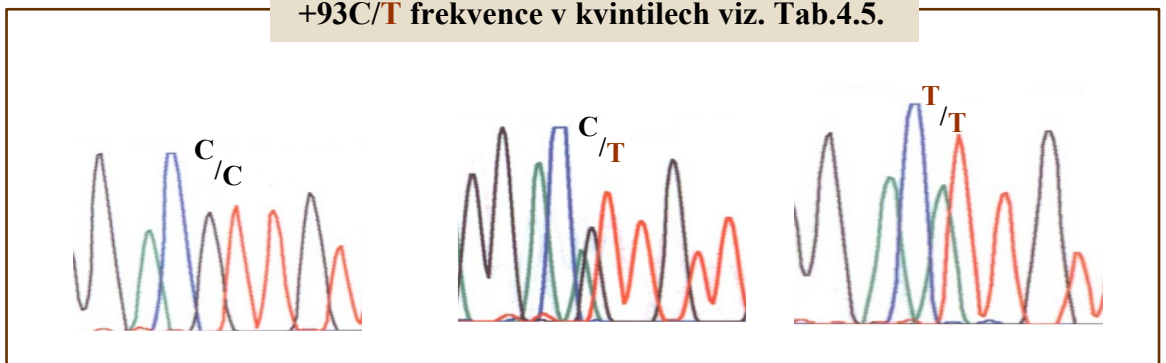
rozlišeno restrikcí  
podmínky viz. IV.2.2.

+121G/A frekvence v kvintilech viz. Tab. 4.4.



Sekvenační reakce s promotorF primérem.

+93C/T frekvence v kvintilech viz. Tab.4.5.



Sekvenační reakce s promotorF primérem.



**Polymorfizmus +121G/A a +93C/T (část 2)****Tab.4.4.**

Frekvence a heterozygotita polymorfizmu +121G/A v jednotlivých kvintilech a v populačním souboru.

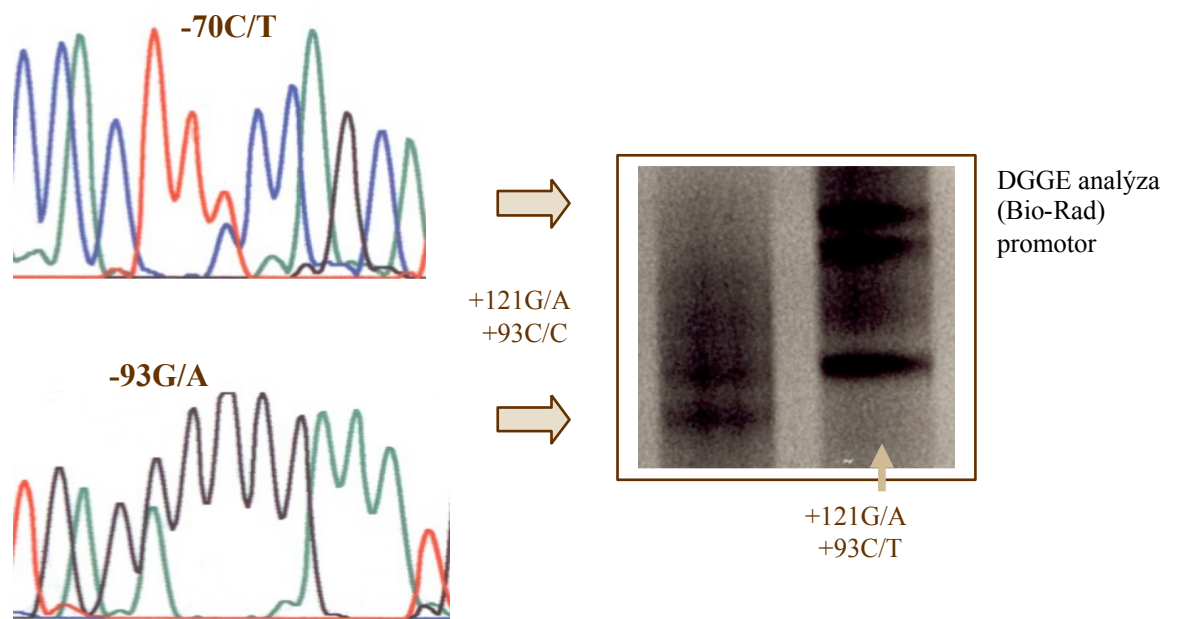
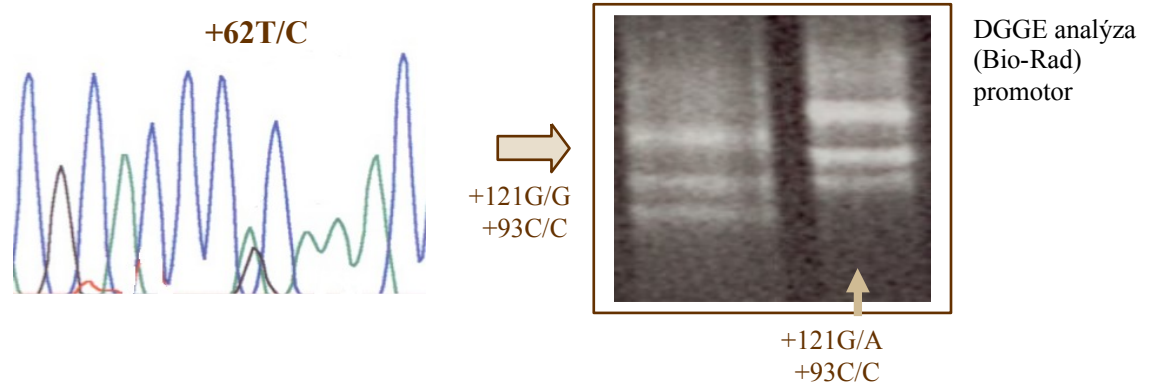
| skupina            | fr. +121G/A $\pm$ S.D.                    | velikost souboru | heterozygotita |
|--------------------|---|------------------|----------------|
| <b>1. kvartil</b>  | <b>0,795/0,205 <math>\pm</math> 0,025</b> | <b>N = 134</b>   | <b>0,336</b>   |
| <b>2. kvartil</b>  | <b>0,776/0,224 <math>\pm</math> 0,025</b> | <b>N = 134</b>   | <b>0,343</b>   |
| <b>3. kvartil</b>  | <b>0,817/0,183 <math>\pm</math> 0,025</b> | <b>N = 120</b>   | <b>0,300</b>   |
| <b>4. kvartil</b>  | <b>0,853/0,147 <math>\pm</math> 0,021</b> | <b>N = 146</b>   | <b>0,212</b>   |
| <b>5. kvartil</b>  | <b>0,777/0,223 <math>\pm</math> 0,022</b> | <b>N = 179</b>   | <b>0,358</b>   |
| <b>pop. soubor</b> | <b>0,814/0,186 <math>\pm</math> 0,017</b> | <b>N = 263</b>   | <b>0,312</b>   |

**Tab.4.5.**

Frekvence a heterozygotita polymorfizmu +93C/T v jednotlivých kvintilech a v populačním souboru.

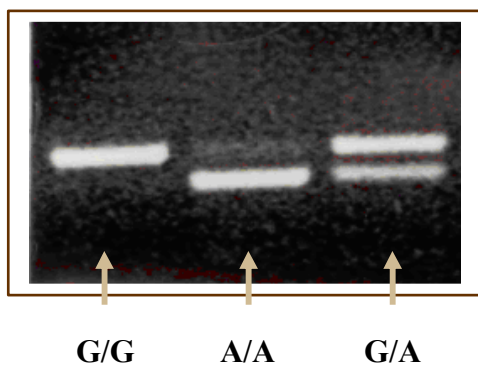
| skupina            | fr. +93C/T $\pm$ S.D.                      | velikost souboru | heterozygotita |
|--------------------|--|------------------|----------------|
| <b>1. kvartil</b>  | <b>0,854/0,146 <math>\pm</math> 0,021</b>  | <b>N = 134</b>   | <b>0,261</b>   |
| <b>2. kvartil</b>  | <b>0,858/0,142 <math>\pm</math> 0,021</b>  | <b>N = 134</b>   | <b>0,209</b>   |
| <b>3. kvartil</b>  | <b>0,838/ 0,163 <math>\pm</math> 0,024</b> | <b>N = 120</b>   | <b>0,308</b>   |
| <b>4. kvartil</b>  | <b>0,853/0,147 <math>\pm</math> 0,021</b>  | <b>N = 146</b>   | <b>0,240</b>   |
| <b>5. kvartil</b>  | <b>0,927/0,073 <math>\pm</math> 0,014</b>  | <b>N = 179</b>   | <b>0,145</b>   |
| <b>pop. soubor</b> | <b>0,882/0,118 <math>\pm</math> 0,014</b>  | <b>N = 263</b>   | <b>0,205</b>   |

**VI.3.1.2. Vzácné sekvenční varianty promotoru**



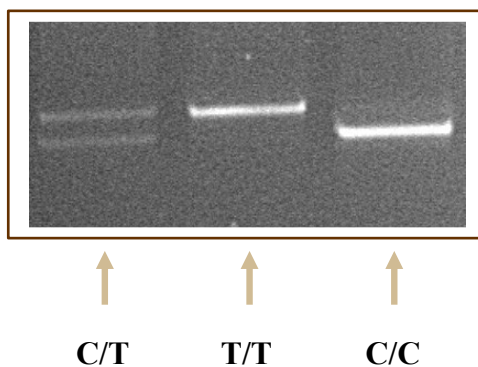
**VI.3.1.3. Detekce promotorových variant v populačním souboru**

- **restrikční analýza pro identifikaci +121G/A polymorfizmu v populačním souboru** (podmínky reakce viz.IV.2.2.)



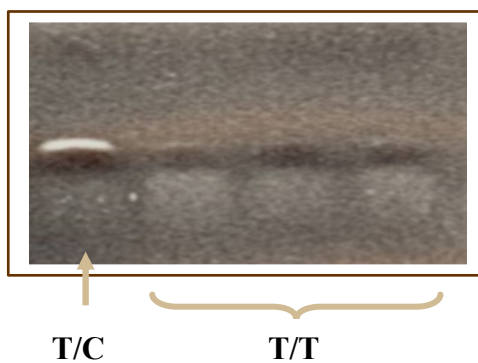
Počet nalezených jedinců  
v populačním souboru viz.  
Tab.4.4.

- **restrikční analýza pro identifikaci +93C/T polymorfizmu v populačním souboru** (podmínky reakce viz.IV.2.2.)



Počet nalezených jedinců  
v populačním souboru viz.  
Tab.4.5

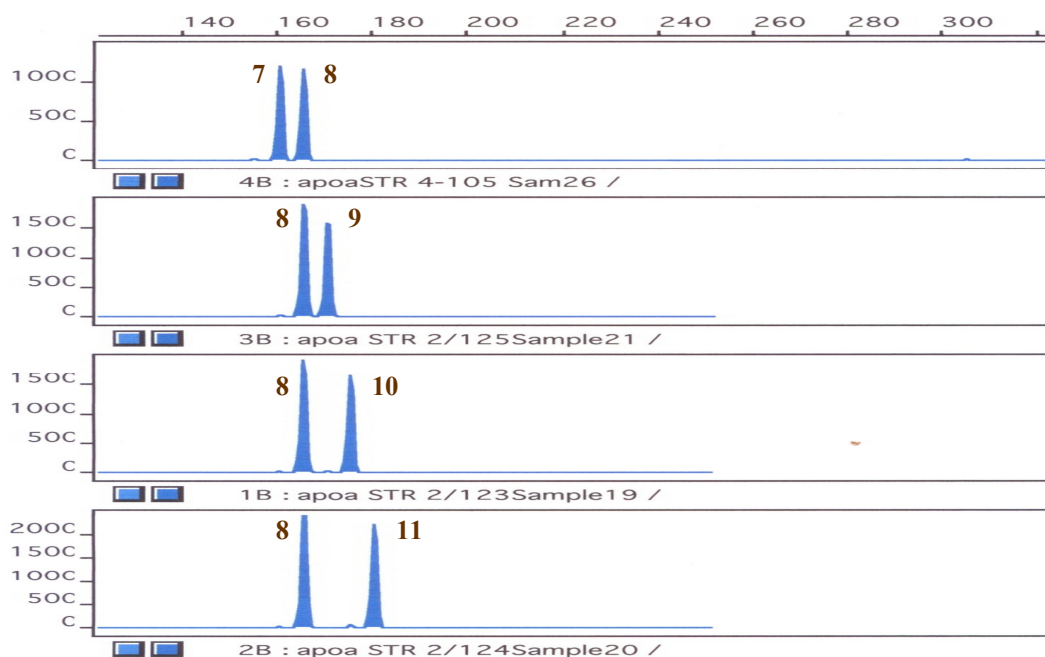
- **alelicky specifická PCR pro identifikaci +62T/C polymorfizmu v populačním souboru** (podmínky reakce viz.IV.1.2.)



V populačním souboru nebyla  
+62C varianta nalezena.

### VI.3.1.4. Fragmentační analýza STR polymorfizmu

TTTTA repetice (STR lokus) v pozici -1231 bp od počátku transkripce (viz.III.6.2.)



Výsledek fragmentační analýzy na ABI PRISM 310 genetickém analyzátoru (Applied Biosystems).

**Tab.4.6.**

Frekvence a heterozygita alel STR polymorfizmu v pozici -1231 od počátku transkripce v jednotlivých kvintilech a v populačním souboru.

| skupina                        | fr. -1231 STR alel ± S.D. |                         |                         |                         |                         | velikost souboru | heterozyg.   |
|--------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|--------------|
|                                | 7                         | 8                       | 9                       | 10                      | 11                      |                  |              |
| <b>1. kvartil</b> <sup>1</sup> | <b>0,007</b><br>± 0,005   | <b>0,716</b><br>± 0,028 | <b>0,149</b><br>± 0,022 | <b>0,086</b><br>± 0,017 | <b>0,041</b><br>± 0,012 | N = 134          | <b>0,433</b> |
| <b>2. kvartil</b>              | <b>0,000</b><br>± 0,000   | <b>0,668</b><br>± 0,029 | <b>0,160</b><br>± 0,022 | <b>0,142</b><br>± 0,021 | <b>0,030</b><br>± 0,010 | N = 134          | <b>0,455</b> |
| <b>3. kvartil</b>              | <b>0,004</b><br>± 0,004   | <b>0,654</b><br>± 0,031 | <b>0,183</b><br>± 0,025 | <b>0,146</b><br>± 0,023 | <b>0,013</b><br>± 0,007 | N = 120          | <b>0,517</b> |
| <b>4. kvartil</b>              | <b>0,003</b><br>± 0,003   | <b>0,709</b><br>± 0,027 | <b>0,140</b><br>± 0,020 | <b>0,130</b><br>± 0,020 | <b>0,017</b><br>± 0,008 | N = 146          | <b>0,473</b> |
| <b>5. kvartil</b>              | <b>0,022</b><br>± 0,008   | <b>0,802</b><br>± 0,021 | <b>0,087</b><br>± 0,015 | <b>0,084</b><br>± 0,015 | <b>0,006</b><br>± 0,004 | N = 179          | <b>0,374</b> |
| <b>populační soubor</b>        | <b>0,006</b><br>± 0,003   | <b>0,705</b><br>± 0,020 | <b>0,120</b><br>± 0,014 | <b>0,150</b><br>± 0,016 | <b>0,019</b><br>± 0,006 | N = 263          | <b>0,510</b> |

<sup>1</sup> narušena Hardy-Weinbergova rovnováha v důsledku výskytu dvou homozygotů s 11-ti repeticemi

### IV.3.2. DHIII ZESILOVAČ

Sekvence a sekvenční změny nalezené v DHIII zesilovači.

-1219G/A      -1230G/A

gacgagtccccagtcctccagtcctgggtgaactcctccgtcagacggGcaagagtctaGaggtcgacgcacg

-1253G/T                      -1274G/A                      -1301C/T

accctcttgGtgacgagagaagtttcgacaGtctgtccctgtaaattcagacgtctcCaatgacgacagaaaa

-1357C/T

acaaacagacacggggacggacgtctccacctcggatgtctCcggtccgtccggaggaactcgacaccacccgag

-1408C/T

gtgggtcaagctcgaaggCccgacgaaacaaatggattcgttcggaccggttaccgcccgcggggaggggggtc

-1521G/A

ggagcgacggcggaaactgaaactagagtctgacgacacgatcgtagtctgaGgcaccgcatcctgg

-1540G/A                      -1557A/G                      -1586G/A

gagGctcgggtccacgcctaTatttgagggccacgtggcaaaaaattcggGcagccttttcgctcataagcc

-1617C/A

caacctcaCctgggctaaaagggtccacggcagacagtggggaaagaaactgattctttcccttgtgggactgg

-1711C/T -1712G/T

ggaacgtgaagggtcactccgttacggagCGgacgaagccgaccgctgtcacgcgctgggtgactggacg

acggGca oblasti zesilovače DHIII chráněné proti štěpení DNázouI (Wade *et al.*, 1997)

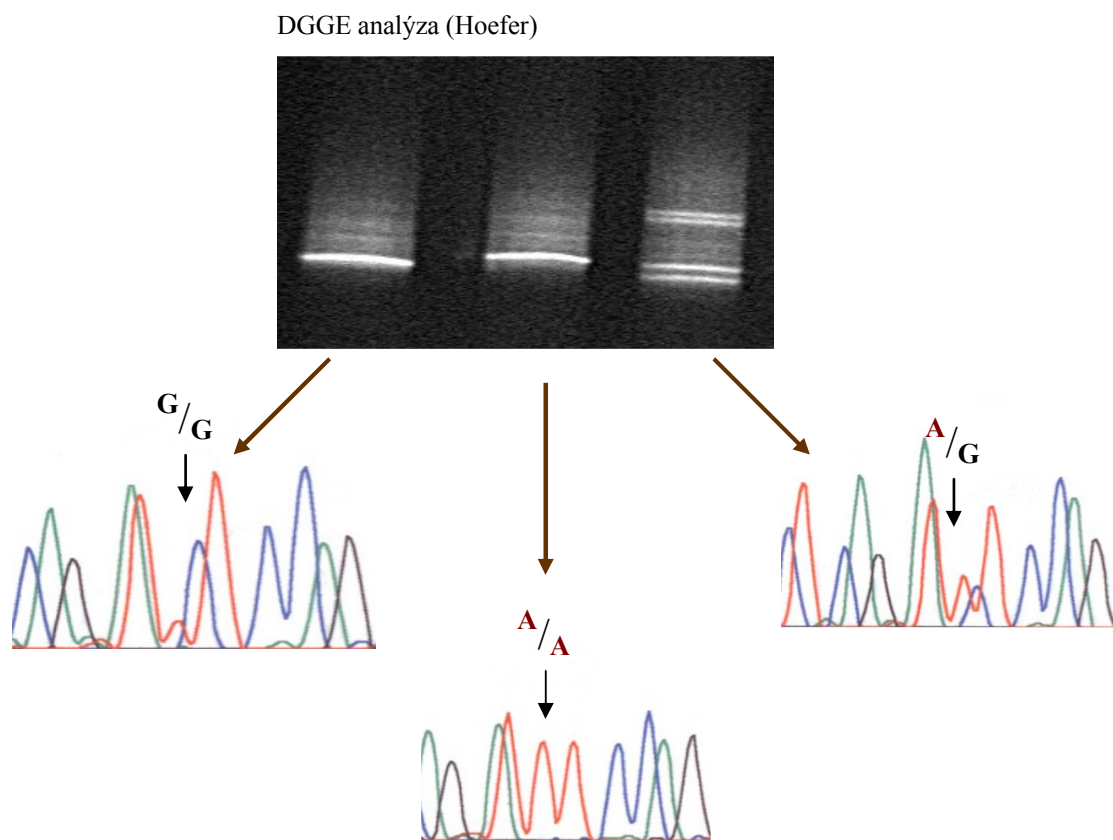
**Tab.4.7.**

Přehled a charakterizace sekvenčních změn nalezených v DHIII zesilovači.

| regulační oblast | nalezené varianty | počet pozorování/kvintil <sup>1</sup> | publikováno                 |
|------------------|-------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| <b>DHIII</b>     | -1219G/A          | 1/3                                   | Zidkova <i>et al.</i> ,2007 |
|                  | -1230A/G          | viz. Tab.4.8.                         | Puckey a Knight,2003        |
|                  | -1253G/T          | 2/1; 1/4                              | Zidkova <i>et al.</i> ,2007 |
|                  | -1274G/A          | 1/3;                                  | Zidkova <i>et al.</i> ,2007 |
|                  | -1301C/T          | 1/3                                   | Zidkova <i>et al.</i> ,2007 |
|                  | -1357C/T          | 1/3                                   | Zidkova <i>et al.</i> ,2007 |
|                  | -1408C/T          | 1/5                                   | Zidkova <i>et al.</i> ,2007 |
|                  | -1521G/A          | 1/3                                   | Zidkova <i>et al.</i> ,2007 |
|                  | -1540G/A          | 1/1                                   | Zidkova <i>et al.</i> ,2007 |
|                  | -1557A/G          | 1/3; 2/4                              | Zidkova <i>et al.</i> ,2007 |
|                  | -1586G/A          | 1/5                                   | Zidkova <i>et al.</i> ,2007 |
|                  | -1617C/A          | viz. Tab.4.9.                         | Puckey a Knight,2003        |
|                  | -1711C/T          | 1/1                                   | Zidkova <i>et al.</i> ,2007 |
|                  | -1712G/T          | 1/2; 1/4                              | Puckey a Knight,2003        |

<sup>1</sup> číslo před lomítkem znamená počet pozorování a číslo za lomítkem kvintil

## IV.3.2.1. Polymorfismus -1230A/G (fragment A)



Sekvenační reakce s DHIII AF primérem.

**Tab.4.8.**

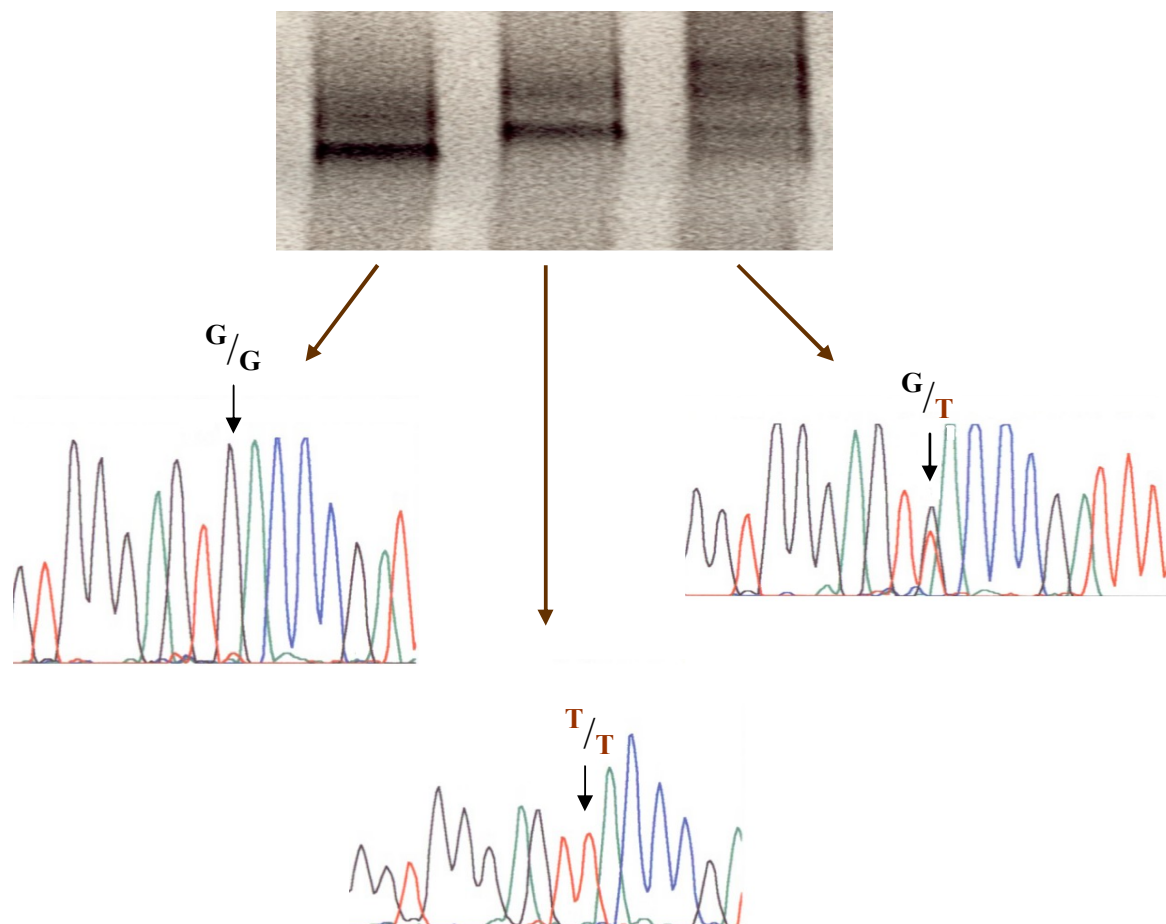
Frekvence a heterozygotita polymorfizmu -1230A/G v jednotlivých kvintilech a v populačním souboru.

| skupina            | fr. -1230A/G $\pm$ S.D.                               | velikost souboru | heterozygotita |
|--------------------|---|------------------|----------------|
| <b>1. kvintil</b>  | <b>0,541/0,459 <math>\pm</math> 0,030</b>             | <b>N = 134</b>   | <b>0,560</b>   |
| <b>2. kvintil</b>  | <b>0,463/0,537 <math>\pm</math> 0,030<sup>‡</sup></b> | <b>N = 134</b>   | <b>0,448</b>   |
| <b>3. kvintil</b>  | <b>0,525/0,475 <math>\pm</math> 0,032</b>             | <b>N = 120</b>   | <b>0,508</b>   |
| <b>4. kvintil</b>  | <b>0,568/0,432 <math>\pm</math> 0,029</b>             | <b>N = 146</b>   | <b>0,521</b>   |
| <b>5. kvintil</b>  | <b>0,578/0,422 <math>\pm</math> 0,026</b>             | <b>N = 179</b>   | <b>0,531</b>   |
| <b>pop. soubor</b> | <b>0,532/0,468 <math>\pm</math> 0,022</b>             | <b>N = 263</b>   | <b>0,517</b>   |

<sup>‡</sup> alela -1230G je častější alelou v tomto kvintilu

## IV.3.2.2. Polymorfismus -1617C/A (fragment B)

DGGE analýza (BioRad)



Sekvenační reakce s DHIIBR primérem.

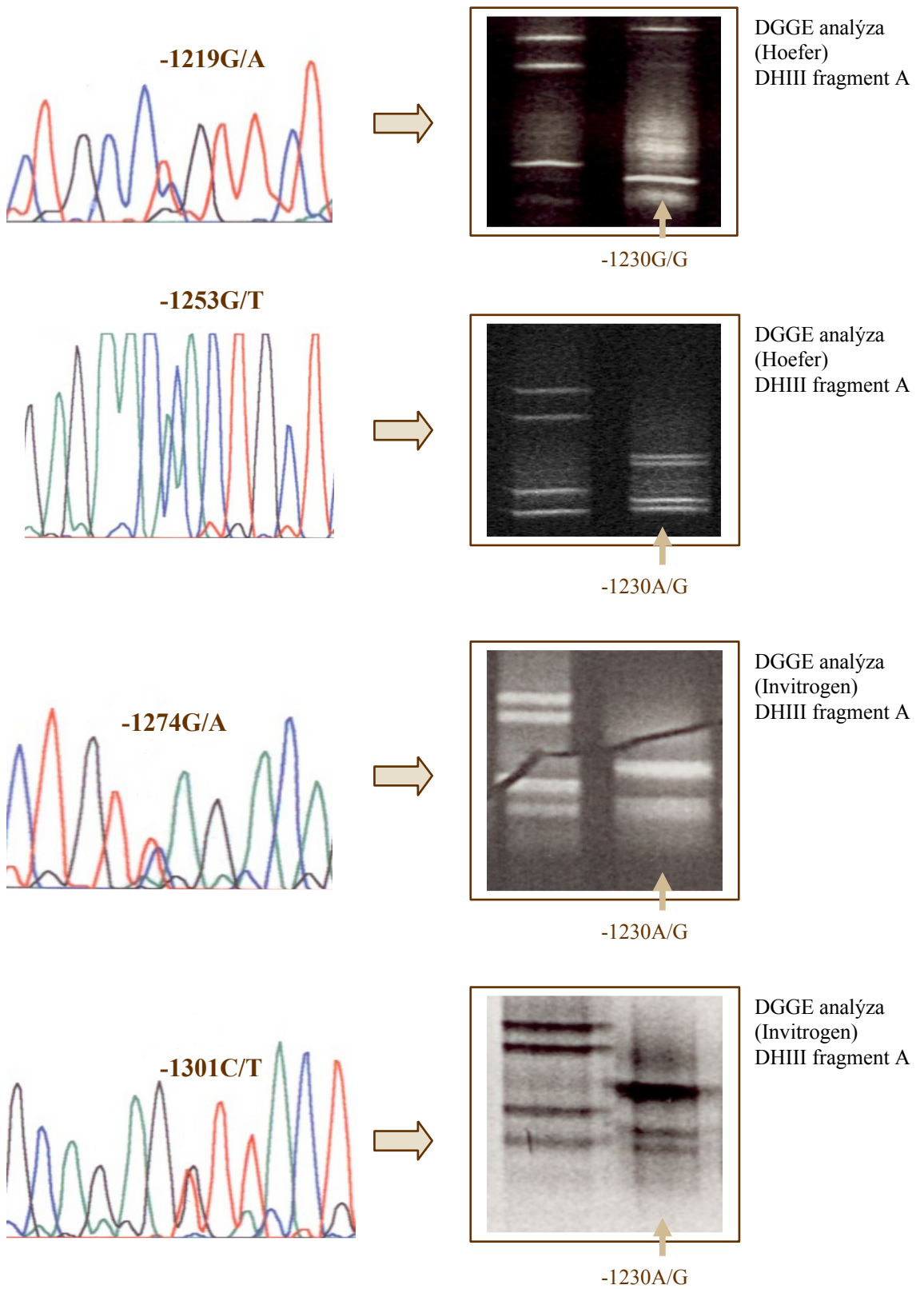
Tab.4.9.

Frekvence a heterozygita polymorfizmu -1617C/A v jednotlivých kvintilech a v populačním souboru.

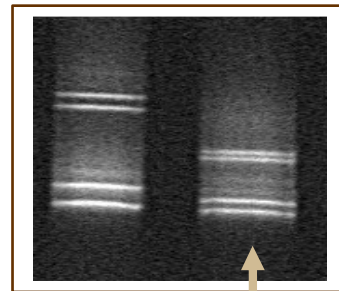
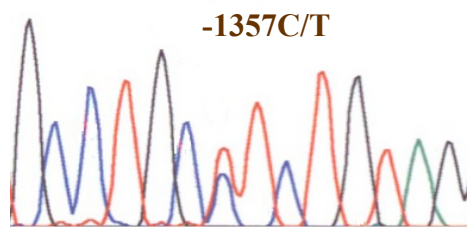
| skupina     | fr. -1617C/A $\pm$ S.D. | velikost souboru | heterozygita |
|-------------|-------------------------|------------------|--------------|
| 1. kvartil  | 0,892/0,108 $\pm$ 0,019 | N = 134          | 0,172        |
| 2. kvartil  | 0,869/0,131 $\pm$ 0,021 | N = 134          | 0,187        |
| 3. kvartil  | 0,829/0,171 $\pm$ 0,024 | N = 120          | 0,258        |
| 4. kvartil  | 0,880/0,120 $\pm$ 0,019 | N = 146          | 0,199        |
| 5. kvartil  | 0,793/0,207 $\pm$ 0,021 | N = 179          | 0,346        |
| pop. soubor | 0,856/0,144 $\pm$ 0,015 | N = 263          | 0,243        |



IV.3.2.3. Vzácné sekvenční varianty DHIII zesilovače (část 1)

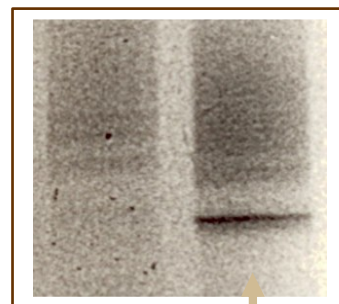
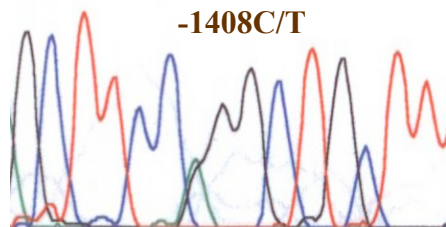


**Vzácné sekvenční varianty DHIII zesilovače (část 2)**



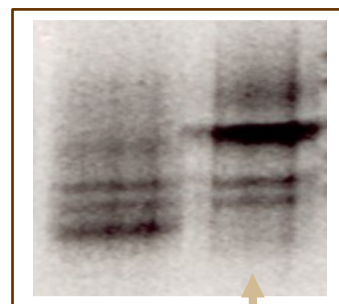
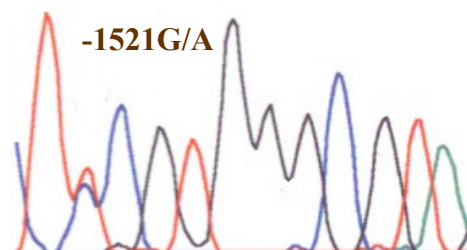
-1230A/G

DGGE analýza  
(Hoefer)  
DHIII fragment A



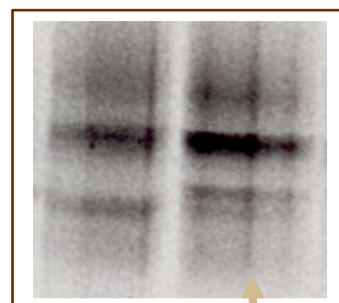
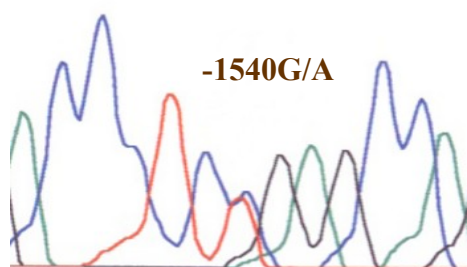
-1230G/G

DGGE analýza  
(Hoefer)  
DHIII fragment A



-1230A/G

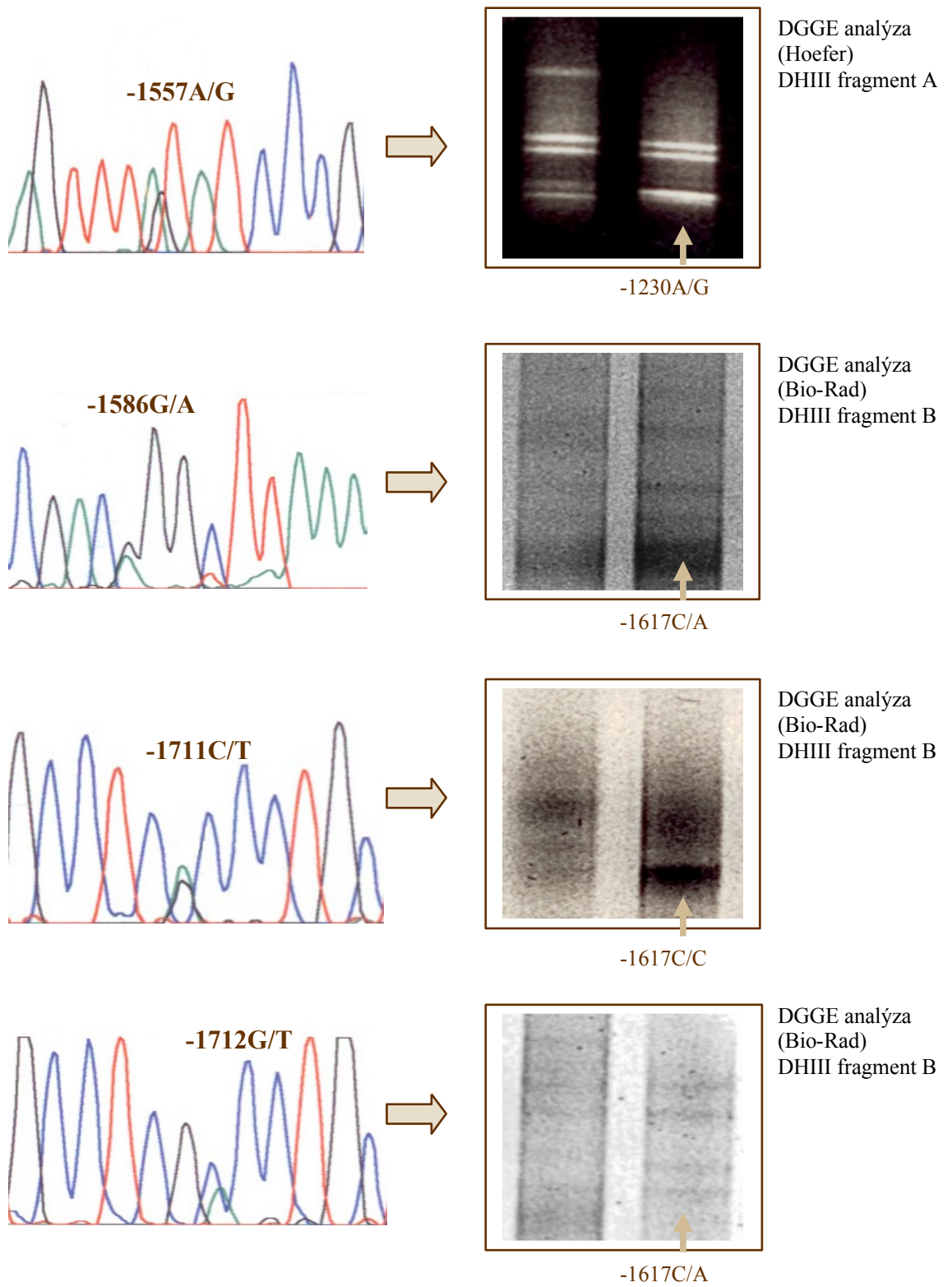
DGGE analýza  
(Invitrogen)  
DHIII fragment A



-1230A/G

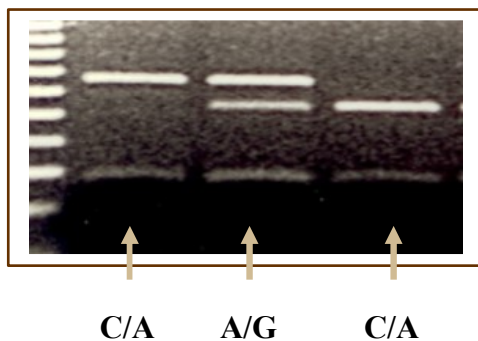
DGGE analýza  
(Invitrogen)  
DHIII fragment A

**Vzácné sekvenční varianty DHIII zesilovače (část 3)**



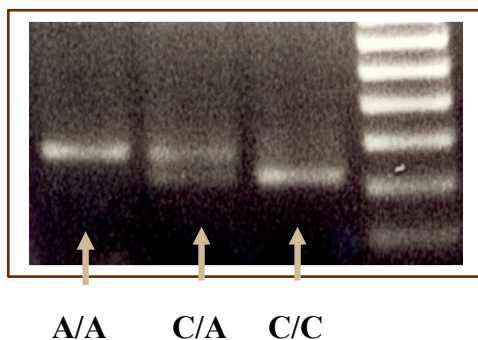
#### IV.3.2.4. Detekce polymorfních variant DHIII zesilovače v populačním souboru

- **restrikční analýza pro identifikaci -1230A/G polymorfizmu v populačním souboru** (podmínky reakce viz.IV.2.2.)



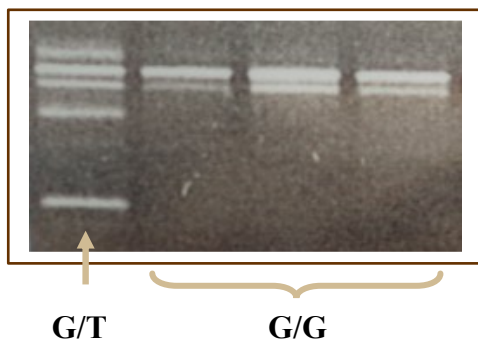
Počet nalezených jedinců  
v populačním souboru viz.  
Tab.4.8.

- **alelicky specifická PCR pro identifikaci -1617C/A polymorfizmu v populačním souboru** (podmínky reakce viz.IV.1.2.)



Počet nalezených jedinců  
v populačním souboru viz.  
Tab.4.9.

- **alelicky specifická PCR pro identifikaci -1712G/T varianty v populačním souboru** (podmínky reakce viz.IV.1.2.)



V populačním souboru byla  
-1712G/T varianta přítomna u  
dvou jedinců.

### IV.3.3.DHII ZESILOVAČ

Sekvence a sekvenční změny nalezené v DHII zesilovači.

```

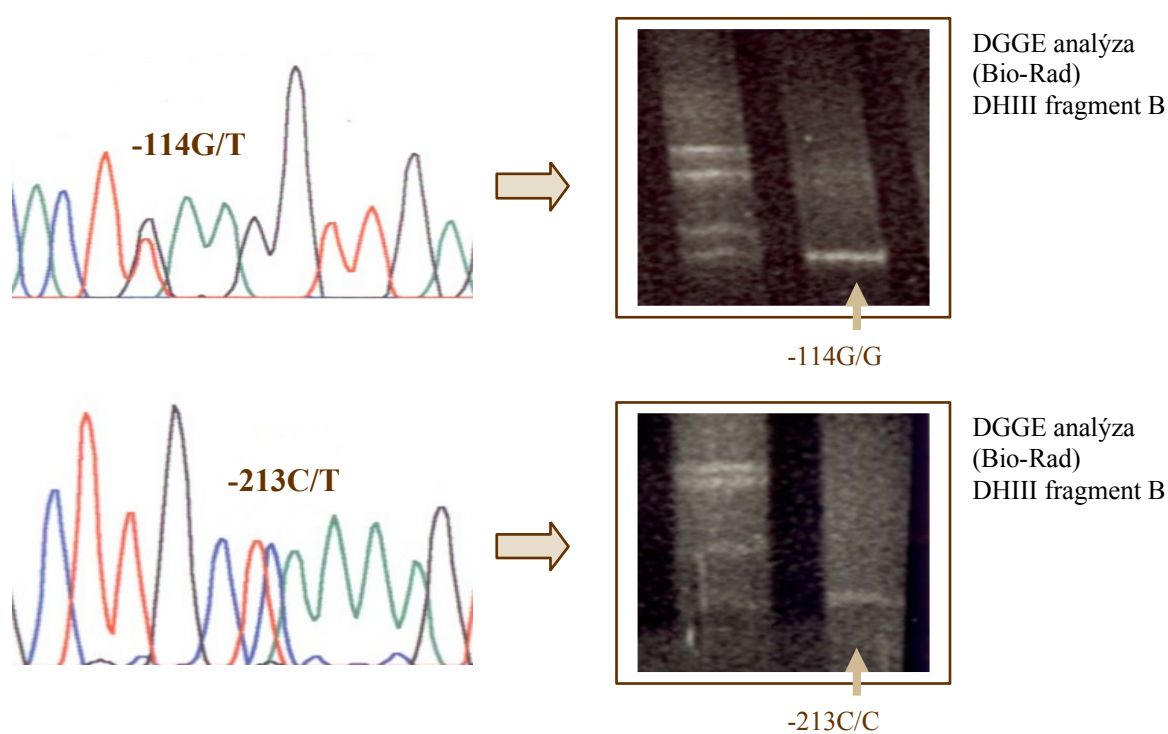
ccatgggtggacgggtatattatggttcagggaaatggattggttctgtgtcactataaccccccaagtccggtgg
                                     -114G/T
tgatcacctccccctcctctgattggaaaccgagttggaGtcaccttcgtctacacgaacttcgataaaccc
                                     -213C/T
gttgtctcaagttcctaaactggacacagttgtaccctctccctttctaataatcgccctgtgaaaaCcgttcg
agaccttcctctgcttaataccttgtaocggtttatctctggctacgtgtcttttcgattattgtaagtccga
acctccc  oblasti zesilovače DHII chráněné proti štěpení DNázouI (Wade et al.,1997)
  
```

**Tab.4.10.**

Přehled a charakterizace sekvenčních změn nalezených v DHII zesilovači.

| regulační oblast | nalezené varianty | počet pozorování/kvintil <sup>1</sup> | publikováno                 |
|------------------|-------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| <b>DHII</b>      | -114G/T           | 1/2                                   | Zidkova <i>et al.</i> ,2007 |
|                  | -213C/T           | 1/5                                   | Zidkova <i>et al.</i> ,2007 |

<sup>1</sup> číslo před lomítkem znamená počet pozorování a číslo za lomítkem kvintil



## IV.4.SLOŽENÉ GENOTYPY

Kvintilový soubor byl pro účely analýzy složených genotypů zmenšen na 664 jedinců a to v důsledku snížení počtu jedinců v 5. kvintilu ze 179 na 130. Tato úprava zamezovala zkreslení dat analýzou nestejně velkých souborů.

Celkový počet nalezených složených genotypů (+121G/A; +93C/T; -1231 TTTTA<sub>n</sub>; -1617C/A; -1230A/G), uváděných jako 5-pol, byl 91 a příslušná heterozygita dosahovala v kvintilech hodnoty 0,75 a v populačním souboru hodnoty 0,78. Nicméně jen 15 složených 5-pol genotypů mělo celkovou frekvenci ve všech kvintilech vyšší než 0,01. Společná frekvence těchto 15-ti 5-pol genotypů v populačním souboru byla 0,689.

Frekvence zmíněných 15 složených 5-pol genotypů a průměrná hladina Lp(a) se směrodatnou odchylkou v jednotlivých kvintilech jsou uvedeny v Tab.4.11. Celková frekvence analyzovaných 5-pol genotypů ve všech kvintilech dohromady s příslušnou střední hladinou Lp(a) a směrodatnou odchylkou a odpovídající frekvence složených genotypů v populačním souboru viz Tab.4.12.

Složený 5-pol genotyp GACC7/88CAAG byl pozorován 20-krát v 5. kvintilu [střední hladina Lp(a) u nositelů 147,0 ±49,1 mg/dl], zatímco v ostatních kvintilech nebyl nalezen a v populačním souboru byl přítomen pouze u tří jedinců. Několik dalších 5-pol genotypů bylo asociováno s úzkým rozmezím hladin Lp(a). Nositelé GACC89CCAG genotypu [střední hladina Lp(a) u nositelů 11,6 ±15,4 mg/dl], GGCT810CCAG genotypu [střední hladina Lp(a) u nositelů 12,8 ±17,3 mg/dl] a GGCT910CAGG genotypu [střední hladina Lp(a) u nositelů 23,3 ±17,0 mg/dl] byli vázáni na nízké a střední hladiny Lp(a). Nicméně všechny tyto genotypy vykazovaly velmi nízké populační frekvence.

Pomocí programu Haploview jsme rekonstruovali haplotyp zodpovědný za asociaci GACC7/88CAAG genotypu s vysokými hladinami Lp(a). Haplotyp GC8CA byl nejčastějším haplotypem ve všech kvintilech (1. kvintil fr. 0,466; 2. kvintil fr. 0,363; 3. kvintil fr. 0,370; 4. kvintil fr. 0,484 a 5. kvintil fr. 0,525) i v populačním souboru (fr. 0,451). Frekvence druhého haplotypu AC7/8AG měla naopak u většiny kvintilů frekvenci na hranici detekovatelnosti (1. kvintil fr. 0,004; 2. kvintil fr. 0,009; 3. kvintil fr. 0,010; 4. kvintil fr. 0,001) až na 5. kvintil, kde jeho frekvence dosahovala hodnoty 0,113. Populační frekvence zmíněného haplotypu jsou relativně nízké (fr. 0,019).







## IV.5.VAZEBNÁ NEROVNOVÁHA

Vazebná nerovnováha mezi polymorfními lokusy byla měřena v populačním souboru. Vazebná nerovnováha byla testována vždy mezi párem polymorfních variant z promotoru (+121G/A; +93C/T; TTTTA<sub>n</sub> repetice) a pro každý pár mezi těmito variantami a dvěma polymorfizmy z DHIII zesilovače (-1617C/A; -1230A/G).

Pro účely měření vazebné nerovnováhy byl STR lokus (TTTTA<sub>n</sub> repetice) uvažován jako tříalelní systém. Alely se 7 a 8 repeticemi byly označeny jako S (short) alela, alela s 9 repeticemi jako alela 9 a alely s 10 a 11 repeticemi jako alela L (long). Vazebná nerovnováha pro každou STR alelu (S, 9, L alela) byla počítána jako u dvoualelního lokusu, kdy frekvence uvažované alely byla postavena proti společné frekvenci zbývajících alel. Hodnoty standardizované statistiky vazebné nerovnováhy ( $\Delta$  statistika) jsou uvedeny v Tab.4.13.

Vzácná alela +62C byla nalezena u 8 jedinců [střední hladina Lp(a) 33,5±5,3 mg/dl]. Všichni nositelé +62C varianty, kromě jednoho majícího STR alelu o 9 repeticích, měli ve svém genotypu STR alelu o 10 repeticích a +121G/G; +93C/C genotyp.

Vazebná nerovnováha (LD) byla měřena pomocí standardizované statistiky vazebné nerovnováhy ( $\Delta$  statistika) (Chakravarti *et al.*,1984), potom co příslušné haplotypové frekvence byly odhadnuty metodou maximální věrohodnosti (Haploview, verze 32.2) (Barrett *et al.*,2005).

Statistická významnost  $\Delta$  koeficientu byla testována pomocí  $N\Delta^2$ , který je distribuován jako  $\chi^2$  o 1 stupni volnosti a kde  $N$  je počet pozorovaných genotypů. Výsledná hladina statistické významnosti pro všechny testy byla  $p < 0,05$ .

## IV.6.STATISTICKÁ HODNOCENÍ

### IV.6.1.HARDY-WEINBERGOVA ROVNOVÁHA

Alelické frekvence byly získány na základě frekvence příslušných genotypů. U každého polymorfního lokusu byla testována Hardy-Weinbergova rovnováha distribuce genotypů pomocí  $\chi^2$  testu. Testovanou hladinou byla  $p < 0,05$  pro dvoualelní systém při 1 stupni volnosti a pro STR lokus při 10 stupních volnosti.



Kromě 1. kvintilu, kde byla narušena Hardy-Weinbergova rovnováha v důsledku vyšší frekvence 11/11 homozygotů, byla ve všech kvintilech i v populačním souboru pro všechny polymorfizmy rovnováha zachována.

## IV.6.2.ROZDÍLY FREKVENCE ALEL- $\chi^2$ TEST

### IV.6.2.1.Mezi kvintily

Rozdíly ve frekvenci jednotlivých alel mezi kvintily byly testovány pomocí  $\chi^2$  testu. Za statisticky významnou hladinu byla považována hodnota  $p < 0,05$  (1 stupeň volnosti).

Distribuce +121A alely v kvintilech měla bimodální charakter s nejvyšší frekvencí ve 2. a 5. kvintilu, kde byla statisticky významně zvýšena v porovnání se 4. kvintilem ( $p < 0,020$ ). Frekvence +93T alely byla porovnatelná ve všech kvintilech s výjimkou 5. kvintilu, kde byla významně snížena v porovnání s ostatními kvintily ( $p < 0,005$ ). Nejčastější alela TTTTA<sub>n</sub> repetice (STR lokus) ve všech kvintilech měla 8 repetic. Přesto byla pozorována statisticky významně vyšší frekvence krátkých variant (7 a 8 repetic) v 5. kvintilu v porovnání s ostatními kvintily ( $p < 0,003$ ), to podporuje i nález významně snížené ( $p < 0,030$ ) frekvence STR alely s 9-ti repeticemi v 5. kvintilu oproti ostatním kvintilům. Alela s 10-ti repeticemi vykazovala sníženou frekvenci v kvintilech obou extrémů (1. a 5. kvintil), v případě srovnání s 2. a 3. kvintilem dosáhl rozdíl statisticky významné úrovně ( $p = 0,020$  pro 5. kvintil a  $p = 0,040$  pro 1. kvintil). Nejvyšší frekvence STR alely s 11-ti repeticemi byla pozorována v 1. kvintilu včetně dvou homozygotů, kteří nebyli v ostatních kvintilech detekováni. Pokud byla srovnána frekvence této STR alely v 1. a 2. kvintilu s ostatními kvintily, rozdíl dosáhl statisticky významné úrovně pouze v porovnání s 5. kvintilem ( $p = 0,005$  s použitím Yatesovi korekce pro 1. kvintil a  $p = 0,0372$  s použitím Yatesovi korekce pro 2.kvintil).

Rovněž se zdá, že alela -1617A má v kvintilech bimodální distribuci s prvním vrcholem ve 3. kvintilu a s druhým výraznějším vrcholem v 5. kvintilu. V druhém případě je rozdíl oproti ostatním kvintilům (1., 2. a 4. kvintil) na statisticky významné úrovni ( $p = 0,013$ ). Nejvyšší frekvence -1230G alely byla pozorována ve 2. kvintilu, který v porovnání s 4. a 5. kvintilem dosáhl statistické významnosti ( $p = 0,014$ ).

Maximální počet  $\chi^2$  testů pro každý analyzovaný polymorfismus byl čtyři. Pokud bychom použili Bonferroniho korekci na mnohočetná porovnávání, pak by se hladina, na které je alternativní hypotéza přijímána, snížila na  $p < 0,013$ . Řada jednotlivých testů by tak

ztratila na významnosti, nicméně pro naše výsledky jsou spíše důležité trendy v rozložení alel mezi kvintily s různou hladinou Lp(a) a ty zůstávají nezměněny.

#### IV.6.2.2.Mezi kvintily a populačním souborem

Rozdíly ve frekvenci jednotlivých alel mezi kvintily a populačním souborem byly detekovány pomocí  $\chi^2$  testu. Za statisticky významnou hladinu byla považována hodnota  $p < 0,05$  (1 stupeň volnosti).

Alela +93T měla opět v populačním souboru oproti frekvenci v 5. kvintilu významně vyšší frekvenci ( $p=0,027$ ). Frekvence krátkých STR alel (7 a 8 repetice) v 5. kvintilu zůstává statisticky významně vyšší ( $p < 0,001$ ) i v porovnání s populačním souborem. Alela s 9-ti repeticemi měla významně nižší frekvenci v populačním souboru v porovnání se 3. kvintilem ( $p=0,019$ ). Naopak STR alela s 10-ti repeticemi měla v populačním souboru významně vyšší hladinu oproti frekvenci v 1. kvintilu ( $p=0,104$ ) a v 5. kvintilu ( $p=0,003$ ). Alela -1617A vykazovala v populačním souboru významně nižší frekvenci oproti 5. kvintilu ( $p=0,019$ ).

Jiné rozdíly ve frekvenci alel mezi jednotlivými kvintily a populačním souborem nebyly nalezeny.

#### IV.6.3.ASOCIACE Lp(a) A SLOŽENÝCH GENOTYPŮ

Asociace hladin Lp(a) s nalezenými 5-pol složenými genotypy byla testována pomocí ANOVA (1-way) testu (STATISTICA, version 7.1). Tento test odhalil statisticky významnou asociaci hladin Lp(a) se složenými genotypy, která byla způsobena především vzácnými 5-pol genotypy (stupňů volnosti 14/464;  $F=10.54$ ; hladina významnosti  $p < 0.0001$ ).

## V. DISKUZE

Zvýšená koncentrace Lp(a) je považována za významný rizikový faktor pro předčasný rozvoj aterosklerotických onemocnění. Plazmatické hladiny této částice jsou téměř pod výhradní genetickou kontrolou ve vazbě na jediný lokus, kterým je gen kódující apo(a), tzv. *LPA* lokus. Přesto jsou hladiny Lp(a) v populaci značně variabilní. Apolipoprotein(a) je zodpovědný za strukturní i funkční specifitu Lp(a) a vykazuje rozsáhlou strukturní variabilitu, která je způsobena především exprimovanou repeticí kringlových domén. Počet kringlových domén nepřímo úměrně koreluje s koncentrací lipoproteinu i s jeho patogenitou. Určitý vliv na hladinu i proaterogenní charakter Lp(a) mohou mít i polymorfizmy měnící jak efektivitu tvorby lipoproteinové částice, tak její schopnost vázat extracelulární složky cévní stěny nebo buněčné povrchy. V neposlední řadě mohou k velkému rozpětí hladin Lp(a) přispívat sekvenční varianty v regulačních oblastech genu pro apo(a).

Právě výzkumem variability v doposud objevených regulačních oblastech *LPA* genu se zabývala i tato práce. Jednalo se o oblast promotoru, která bezprostředně přiléhá ke kódující sekvenci a je nepostradatelnou součástí genu. Promotor obsahuje jak základní transkripční elementy, tak sekvence zodpovědné za specifickou expresi v jaterní tkáni. Zbylé dvě oblasti mají charakter zesilovačů a nalézají se v intergenovém 50 kb dlouhém úseku mezi genem pro apo(a) a plazminogen. Oba zesilovače jsou považovány za místo zprostředkované odpovědi na hormony a léky.

Cílem naší práce bylo zjistit míru variability v jednotlivých regulačních oblastech *LPA* genu v české populaci a její rozložení vzhledem k odlišným hladinám Lp(a). Za tímto účelem byl základní soubor jedinců rozdělen podle hladiny Lp(a) na kvintily. Toto rozdělení zaručovalo, že variabilita bude testována v celém rozpětí hladin Lp(a).

Ze souboru byli vyloučeni jedinci s renální nedostatečností a jedinci s poruchou endokrinního systému. V obou případech se jednalo o onemocnění, která do určité míry ovlivňují hladinu Lp(a) (Milionis *et al.*, 2003; Parsons *et al.*, 2003).

Pro účely mutační analýzy byl vytvořen protokol pro DGGE analýzu testovaných sekvencí. Metoda DGGE byla zvolena pro svojí vysokou citlivost při detekci neznámých variant (Myers *et al.*, 1987). Metoda je vhodná především pro analýzu exonických sekvencí, kde charakter genetického kódu zaručuje rovnoměrné rozdělení G:C a A:T párů a tím omezuje výskyt více teplotních domén v testovaném fragmentu. Tuto metodu jsme

použili pro testování regulačních sekvencí, kde se naopak často střídají G:C a A:T bohaté sekvence. Nicméně u žádného fragmentu nezamezoval počet a charakter teplotních domén provedení DGGE analýzy. Vzhledem k tomu, že většina fragmentů měla více teplotních domén, vytvořili jsme si umělé pozitivní kontroly, které obsahovaly mutaci v doméně s nejvyšší teplotou tání v blízkosti klempaného priméru. Takto vytvořená pozitivní kontrola byla použita během každé analýzy a její detekce zaručovala, že analyzovaný fragment doputoval do potřebné koncentrace chemického denaturantu.

Analýzou promotorové oblasti *LPA* genu se už zabývala řada předchozích studií (Malgaretti *et al.*,1992; Cohen *et al.*,1993; Huby *et al.*, 2001; Negi *et al.*,2004). Nicméně dříve zveřejněné studie testovaly jen omezený počet jedinců. Malý soubor sice zaručoval odhalení v populaci běžných polymorfizmů, ale neumožňoval detekci vzácných variant. Naše práce provedla mutační analýzu tzv. minimálního promotoru (nukleotid -98 až +141 vzhledem k počátku transkripce) u 713 nepříbuzných jedinců z české populace. Během této analýzy jsme zachytili dva již dříve popsáné polymorfizmy (+121G/A; +93C/T) a tři vzácné nepopsáné varianty (+62T/C; -70C/T; -93G/A) (Zidkova *et al.*,2007).

Role prvního zmiňovaného polymorfizmu +121G/A je zatím nejednoznačná. Studie provedená Suzukim *et al.* (1997) připustila jeho možnou pozitivní roli na aktivitu transkripce genu, tento závěr ale nebyl ostatními pracemi jednoznačně potvrzen (Wu a Lee,2003). V některých studiích je +121A alela oproti majoritní G alele spojována s vyššími hladinami Lp(a) (Puckey *et al.*,1997; Prins *et al.*,1999), nicméně jsou dostupné i studie s protichůdnými závěry (Brazier *et al.*,1999). Důvodem takto heterogenních dat mohou být funkční varianty, jak z regulačních, tak z kódujících oblastí *LPA* genu, pro které je +121A alela pouze markrem. To je podpořeno i nalezenou silnou vazebnou nerovnováhou mezi +121A alelou a -1230G alelou z DHIII zesilovače či s krátkými alelami (7 a 8 repetice) STR lokusu v naší studii (Zidkova *et al.*,in press). Výskyt a frekvence uvažovaných variant může být navíc populačně specifická. Na druhou stranu +121A alela byla popsána spíše v asociaci se středně dlouhými až dlouhými izoformami (26-35 repetice  $K_{LPA}IV2$ ) *LPA* genu (Puckey *et al.*,1997).

Nižší frekvence +93T promotorové varianty v 5. kvintilu jak oproti ostatním kvintilům, tak v porovnání s populačním souborem je v souladu s její silnou vazebnou nerovnováhou s STR alelou s 9-ti repeticemi a popsáním negativním vlivem na expresi *LPA* genu (Zysow *et al.*,1995). Alela T pravděpodobně vznikla na chromozómu s 9-ti repeticemi a expandovala během evoluce lokusu na další STR alely. U alely s 9-ti repeticemi byla popsána vazba na středně dlouhé apo(a) délkové izoformy (24-34 repetice

$K_{LPAIV2}$ ) (Puckey *et al.*,1997; Holmer *et al.*,2003). Nízká frekvence +93T alely v 5. kvintilu je tedy výsledkem vazby na středně dlouhé izoformy apo(a) proteinu a jejího funkčního významu. Populační frekvence obou promotorových polymorfních variant (+121G/A; +93C/T) v české populaci jsou srovnatelné s jejich frekvencemi v ostatních kavkazských populacích (Kraft *et al.*,1998; Puckey a Knight,2003).

Zdá se, že tři nové vzácné promotorové varianty nejsou součástí známých vazebných elementů pro transkripční faktory. Nízká frekvence těchto variant neumožňovala provést asociační analýzu s hladinami Lp(a). Nicméně +62C varianta byla nalezena pouze u jedinců s hladinami Lp(a) nad 16 mg/dl. Celková frekvence této varianty ve všech kvintilech byla 0,006. Zdá se, že je vázána spíše na střední a vyšší hladiny Lp(a) a její skutečná populační frekvence je tedy ještě nižší. To je také pravděpodobně důvod proč jsme tuto variantu v našem populačním souboru nezachytili. Zbylé dvě vzácné varianty (-70C/T; -93G/A) byly nalezeny u jednoho jedince. Obě varianty jsme našli již dříve u jiného jedince, který byl ze souboru vyloučen z důvodu poruchy endokrinního systému. Obě varianty jsou tedy zcela určitě v úplné vazbě na jednom chromozómu, nicméně jejich populační frekvence je velmi nízká.

Polymorfismus v počtu TTTTA repetice (STR lokus) z distální části *LPA* genu jsme si vybrali do naší studie, protože již řada předchozích prací popisovala jeho korelaci s hladinami Lp(a) (Trommsdorff *et al.*, 1995; Brazier *et al.*,1999). Tato korelace byla nezávislá na délkových izoformách apo(a) proteinu a byla schopna vysvětlit 5-14% rozptylu koncentrace Lp(a) v souboru. Výsledky naší práce jsou v souladu s těmito daty a frekvence i délkové rozpětí STR alel v české populaci je srovnatelné s ostatními kavkazskými populacemi (Kalina *et al.*,2001). Předpokládá se, že detekovaná korelace by mohla být v důsledku vazebné nerovnováhy jednotlivých délkových alel STR lokusu s jinými funkčními variantami z regulačních či kódujících oblastí *LPA* genu nebo jejich vazbou na omezené rozpětí délkových izoform apo(a) proteinu. Práce Negi *et al.* (2004) navíc připouští i přímý funkční efekt tohoto mikrosatelitu na transkripci *LPA* genu jako vazebného místa pro negativní transkripční faktor, přičemž efektivita vazby dimerního faktoru je ovlivněna právě počtem repetitivních jednotek. Původní práce zabývající se DHIII zesilovačem i naše studie zjistily, že alely STR lokusu jsou v silné vazbě nejen s proximálním promotorem, ale i s polymorfizmy ze značně vzdálených sekvencí zesilovače (Puckey a Knight,2003; Zidkova *et al.*,2007).

Jak už bylo zmíněno výše je alela s 9-ti repeticemi vázána na středně dlouhé izoformy *LPA* genu. Oproti tomu byl výskyt alely s 11-ti repeticemi omezen na krátké

izoformy genu (15-24 repetice  $K_{LPA}IV2$ ) (Mooser *et al.*,1995). V rozporu s tím je již dříve popsána asociace této dlouhé STR alely se spíše nižšími středními hladinami Lp(a) (Mooser *et al.*,1995), stejně jako její distribuce v kvintilech nalezená v naší práci s jednoznačně nejvyšší frekvencí v 1. kvintilu. V případě dvou 11/11 homozygotů došlo dokonce k narušení Hardy-Weinbergovy rovnováhy distribuce genotypů STR polymorfizmu v 1. kvintilu. Rovnováha by byla narušena dokonce již při výskytu jediného takového homozygota. Odchylna od rovnováhy je zde způsobena selekčními podmínkami výběru. Existuje-li genotyp, který je zodpovědný za určitý fenotyp lze předpokládat, že jeho zastoupení v souboru, který je vybrán podle tohoto fenotypu, bude vyšší než by se dalo usuzovat z jeho populačního výskytu. To vše nasvědčuje tomu, že STR alela s 11-ti repeticemi je asociována s velmi nízkou expresí apo(a) proteinu, která je způsobena jiným mechanismem než počtem kringlových domén. Uvažovaný mechanismus má navíc dominantní efekt vůči délkovému polymorfizmu *LPA* genu. Možným vysvětlením by mohla být opět vazba této alely na jinou funkční variantu. Ogorelkova *et al.* (2001) uvažuje o vazbě mezi touto STR alelou a P52L polymorfizmem. Substituce P52L leží v kódující oblasti genu (1. exon  $K_{LPA}IV8$ ) a je zvažován její možný vliv na skládání proteinu. Hledaným mechanismem by potom byla jen velmi nízká efektivita skládání apo(a) proteinu a vysoká frakce proteozomálně degradovaného apo(a) u alel s minoritní lyzinovou variantou.

Zastoupení STR alely s 8 repeticemi na všech délkových izoformách *LPA* genu je v souladu s jejími populačními frekvencemi (Mooser *et al.*,1995). Alela s 10-ti repeticemi je sice také přítomna na izoformách v celém délkovém rozpětí genu, má však významný vrchol na izoformách s 20-24 repeticemi  $K_{LPA}IV2$  (Mooser *et al.*,1995; Puckey *et al.*,1997). Informace o distribuci STR alely se 7 repeticemi na délkových izoformách nejsou vzhledem k její velmi nízké populační frekvenci dostupné.

Intenzivní hledání dalších regulačních oblastí *LPA* genu vedlo k odhalení dvou oblastí ležících proti proudu transkripcí. Aktivita obou oblastí je nezávislá na jejich orientaci a jejich poloha je od kódující části genu značně vzdálena, 20 a 28 kb. Zmiňované vlastnosti jsou charakteristické pro sekvence zesilovačů. Zesilovače byly lokalizovány v 50 kb dlouhé intergenové oblasti mezi genem pro *LPA* a plazminogen a nesou pojmenování DHII (28 kb od *LPA*) a DHIII (20 kb od *LPA*) (Wade *et al.*,1997). Na počátku naší studie byla publikována práce, která jako první analyzovala variabilitu v uvedených zesilovačích. (Puckey a Knight,2003). Publikace zaváděla PCR pro specifickou amplifikaci DHIII zesilovače, který je součástí LINE-1 retrotranspozibilního



elementu. Mutační analýza pak byla provedena pomocí sekvenace vlastní oblasti zesilovače u 16 jedinců. My jsme v naší práci využili tuto DHIII specifickou PCR reakci, která je založena na kombinaci specifického priméru, který leží v intergenové oblasti, a priméru ležícího uvnitř LINE-1 retroelementu. Pro účely DGGE analýzy byla oblast DHIII zesilovače v naší studii rozdělena na dva částečně se překrývající fragmenty.

Všech 713 jedinců z našeho souboru bylo vyšetřeno na přítomnost variability v obou zmíněných zesilovačích pomocí metody DGGE. U aktivity zesilovače DHII byla již dříve během *in vitro* analýz detekována velká citlivost k zaneseným změnám (Wade *et al.*,1997). Nicméně tento zesilovač je v populaci značně konzervován a nevykazuje žádnou běžnou sekvenční variabilitu (Zidkova *et al.*,2007). V naší studii se nám podařilo odhalit pouze dvě vzácné varianty, které byly vždy přítomné pouze u jediného jedince. Obě varianty byly potvrzeny ze dvou nezávislých DGGE analýz a sekvenačních reakcí. Zesilovač DHII je považován za hlavní místo účinku estrogenu a jiných hormonů a léků na transkripci *LPA* genu (Puckey a Knight,2002; Huby *et al.*,2003). Naše studie tak ukazuje, že v populaci neexistuje variabilní odpověď na zmíněné molekuly zprostředkovaná tímto zesilovačem.

Oproti tomu zesilovač DHIII vykazuje o něco vyšší variabilitu a mohl by být do určité míry zodpovědný za velké populační rozpětí Lp(a) koncentrací. Kromě tří sekvenčních změn popsanych již v původní publikaci zabývající se DHIII zesilovačem (-1712G/T; -1617C/A; -1230A/G) jsme v naší studii zachytili jedenáct nových nepopsaných variant (Puckey a Knight,2003; Zidkova *et al.*,2007). Odlišná frekvence -1712T varianty v našem populačním souboru v porovnání s původní prací může být způsobena selekčními kritérii výběrového souboru v původní práci nebo genetickou rozmanitostí obou etnik. Funkční charakteristika tří dříve popsanych substitucí je uvedena v původní publikaci a shrnuta v přehledu literatury, a proto se jí zde nebudeme blíže zabývat. Pouze čtyři nové varianty -1586G/A; -1408C/T; -1253G/T a -1219G/A byly na základě dostupných informací z literatury označeny za mutace ležící v sekvencích chráněných proti štěpení DNázou-I (Wade *et al.*,1997). Jedná se o místa, v kterých je enzymatické štěpení DNA znemožněno vazbou proteinů. Změna nukleotidové sekvence těchto míst může mít vliv na vazbu transkripčních faktorů a tím na aktivitu transkripce příslušného genu. Substitute bází v uvažovaných elementech jsou tedy brány za mutaci s potencionálně funkčním vlivem. V případě -1408T varianty došlo dokonce ke změně sekvence elementu pro transkripční faktor Ets. V dříve provedené práci byla obdobná uměle zanesená substitute spojena s významnou změnou aktivity zesilovače (Yang *et*

al.,1998). Funkční vliv nelze samozřejmě vyloučit ani u nových variant, které neleží v DNÁza-I chráněných oblastech. Ať už se jedná o variabilitu funkční či nefunkční, všechny nové varianty byly velmi vzácné a jejich vliv na populační rozptyl hladiny Lp(a) je tedy zanedbatelný.

Naše práce ukázala, že doposud objevené regulační oblasti *LPA* genu nejsou extrémně polymorfní. Avšak pokud se zabýváme velkou populační variabilitou hladiny Lp(a) musíme si uvědomit, že je výsledkem kombinovaného vlivu nalezených sekvenčních variant z regulačních oblastí a polymorfních variant z ostatních částí *LPA* lokusu, včetně apo(a) délkových izoform.

Kombinovatelnost polymorfních variant však nemusí být zcela náhodná. Některé varianty se mohou vyskytovat spolu častěji, jako důsledek přetrvávající vazebné nerovnováhy. Vazba mezi lokusy je narušována rekombinací. Předchozí publikované práce poukázaly na relativně nízkou rekombinační aktivitu v celém rozsahu *LPA* genu (Boerwinkle *et al.*,1992). V naší práci jsme testovali vazebnou nerovnováhu mezi nalezenými polymorfními variantami z promotorové oblasti a z DHIII zesilovače. Testy detekovaly silnou genetickou vazbu i mezi vzdálenými regulačními oblastmi (Zidkova *et al.*,v tisku).

O stáří polymorfizmů z DHIII zesilovače se zatím můžeme jen dohadovat. Naopak popsané promotorové polymorfizmy byly pozorovány i u evolučně starých afrických populací a lze tedy usuzovat na jejich značné evoluční stáří (Mooser *et al.*,1995; Trommsdorff *et al.*,1995; Kim *et al.*,2001). Přesto hodnota vazebného koeficientu u těchto variant svědčí o zachovalé silné vazebné nerovnováze. Nízká hodnota koeficientu vazebné nerovnováhy mezi +121A a +93T variantou je způsobena negativním typem vazby mezi alelami (+121G alela ve vazbě s +93T alelou). Tento typ vazby je obtížně detekovatelný a vyžaduje analýzu rozsáhlých souborů. Výše uvedená data jsou zcela v souladu s předpokládanou nízkou frekvencí rekombinace v celém *LPA* lokusu.

V další části studie jsme vycházeli z uvedených skutečností a vytvořili kombinované genotypy, které se skládali z pěti polymorfních lokusů z regulačních oblastí *LPA* genu (tzv. 5-pol genotypy). Předpokládali jsme, že během evoluce genu pro apo(a) došlo k náhodnému vzniku polymorfizmů v jeho regulačních oblastech. Jednotlivé polymorfizmy se vyvíjely na sobě nezávisle a vždy v asociaci s určitou délkovou izoformou genu. Nízká frekvence rekombinace v této oblasti nebyla dostačující k narušení genetické vazby mezi polymorfizmy z regulačních oblastí a délkovými izoformami *LPA* genu. Doposud byl popsán jen jediný případ spontánně vzniklé nové délkové izoformy

genu (Boerwinkle *et al.*, 1992). U studovaného jedince došlo k prodloužení rodičovské alely o jednu  $K_{LPA}IV2$  repetici. Prodloužení či zkrácení o jednu repetitivní jednotku je pravděpodobně nejčastější způsob vytvoření nové délkové izoformy *LPA* genu. Za tohoto předpokladu očekáváme, že určitá kombinace alel polymorfních lokusů z regulačních oblastí bude vázána na omezený rozptyl délkových variant *LPA* genu a tudíž i na omezené rozpětí hladin Lp(a). Navíc by uvažované složené genotypy odrážely nejen vliv délkových izoform, ale i funkčních variant ovlivňujících expresi genu. Naše studie ale ukázala, že tomu tak není (Zidkova *et al.*, v tisku).

Konečný počet nalezených 5-pol genotypů byl 91, ale jen u 15 z nich dosáhla celková frekvence ve všech kvintilech hodnoty 0,01. Pouze těchto 15 složených genotypů bylo zahrnuto do následné analýzy. Statistická analýza sice objevila významně odlišné rozdíly středních hladin Lp(a) mezi 15-ti 5-pol genotypy, ty byly ale způsobeny v populaci vzácnými složenými genotypy. Především 5-pol genotyp GACC7/88CAAG byl vázán na vysokou střední hladinu Lp(a) ( $147,0 \pm 49,1$  mg/dl). To může odrážet jeho izolaci na krátké izoformy *LPA* genu a jeho případnou funkční charakteristiku.

Pomocí programu Haploview jsme se pokusili o rekonstrukci haplotypu zodpovědného za asociaci GACC7/88CAAG genotypu s vysokými hladinami Lp(a). Analýza ukázala, že haplotyp GC8CA je nejčastějším haplotypem ve všech kvintilech (fr. od 0,370 do 0,525) i v populačním souboru (fr. 0,451) a je tedy vázán na široké rozpětí Lp(a) hladin. Oproti tomu měl haplotyp AC7/8AG u většiny kvintilů frekvenci na hranici detekovatelnosti, výjimku tvořil pouze 5. kvintil, kde jeho frekvence dosahovala hodnoty 0,113. Není překvapením, že zmíněný haplotyp se skládá převážně z variant, které jsou spojovány s vyšší aktivitou exprese *LPA* genu. Populační frekvence zmíněného haplotypu jsou však velice nízké (fr. 0,019).

Výsledek analýzy složených genotypů ukazuje na skutečnost, že většina kombinací polymorfních alel je pravděpodobně distribuována na široké rozmezí délkových izoform *LPA* genu. Jako možné mechanismy vzniku nových délkových izoform *LPA* genu se tedy nabízejí inekvální výměna sesterských chromatid nebo genová konverze. Oba zmíněné mechanismy zachovávají vazebnou nerovnováhu mezi polymorfními variantami z regulačních oblastí a současně je redistribují na odlišné délkové izoformy genu.

Závěry z naší práce tedy ukazují na velké množství možných kombinací jednotlivých alel polymorfních lokusů a délkových izoform. Každá taková kombinace na jednom chromozómu vytváří haplotyp. Počet zamýšlených haplotypů v populaci je značný. Jednotlivé haplotypy mají charakteristický účinek na produkci apo(a) a tvorbu Lp(a) a

mohou asociovat s velice úzkým rozmezím koncentrací Lp(a) v plazmě. Zároveň může být příspěvek jednotlivých haplotypů odlišně modulován negenetickými faktory. Právě přítomnost velkého množství takových haplotypů s významně odlišným vlivem na produkci apo(a) či tvorbu lipoproteinu v populaci by mohla vysvětlovat značný populační rozptyl hladin Lp(a). Další variabilita je dána nezávislou kombinovatelností haplotypů v genotypech jedinců. Na druhou stranu nízká frekvence rekombinace v celém rozsahu *LPA* lokusu je zodpovědná za to, že v rodinách jsou pravděpodobně děděnou jednotkou celé haplotypy. To je v souladu s vysokou dědivostí znaku.

Při řešení otázky příčin velkého rozpětí hladin Lp(a) nesmíme opomíjet ani případný vliv dalších lokusů v lidském genomu, které mohou být dosud maskovány dominantní úlohou *LPA* genu. Jejich možná lokalizace byla naznačena v některých studiích (Broeckel *et al.*, 2002). Objevení lokusů s minoritním účinkem vyžaduje vždy genetickou analýzu rozsáhlých a klinicky i geneticky přesně definovaných souborů a je velice finančně i technicky náročná. Rovněž i samotný gen pro apo(a) může obsahovat další neobjevené regulační oblasti a jejich varianty.

## **VI. ZÁVĚR**

Zvýšené hladiny Lp(a) jsou považovány za nezávislý rizikový faktor v procesu aterosogeneze. Strukturní i funkční charakteristika Lp(a) částice je určena přítomností apo(a). Přestože jsou plazmatické hladiny tohoto lipoproteinu téměř zcela pod genetickou kontrolou genu pro apo(a), tzv. *LPA* lokus, vykazují značnou populační variabilitu. Velká část této variability je způsobena délkovým polymorfismem *LPA* genu. Zbývající variabilita může být dána jak přítomností sekvenčních polymorfizmů v kódující sekvenci, tak v regulačních elementech genu.

Naše práce se zabývala analýzou variability v doposud popsaných regulačních sekvencích *LPA* genu. Jednalo se o oblast tzv. minimálního promotoru a o oblast dvou zesilovačů (zesilovač DHII a DHIII). Současně byl genotypizován STR polymorfismus z distální části promotoru. Vlastní mutační analýza metodou DGGE byla provedena na vzorku 713 jedinců z III.interní kliniky, 1.LF a VFN UK v Praze. Tento soubor byl členěn na kvintily a pokrýval celé rozpětí hladin Lp(a). Populační frekvence nalezených polymorfních variant a hodnoty vazebné nerovnováhy jsme získali na souboru 263 nepřibuzných jedinců z české populace poskytnutého ÚBLG, 1.LF a VFN UK v Praze.

Studie prokázala relativně nízký stupeň variability ve všech studovaných sekvencích. Především zesilovač DHII vykazoval vysokou konzervovanost v celém rozpětí koncentrací Lp(a). Všechny polymorfizmy byly zastoupeny ve všech kvintilech, i když řada minoritních variant měla významně odlišné frekvence mezi jednotlivými kvintily. Dále jsme detekovali silnou vazbu mezi polymorfními místy i ze značně vzdálených regulačních sekvencí *LPA* genu. Analýza složených genotypů odhalila významnou asociaci s hladinami Lp(a), která byla ale způsobena pouze vzácnými složenými genotypy.

Naše práce ukazuje, že většina možných kombinací polymorfních alel je pravděpodobně distribuována na široké rozmezí délkových izoform *LPA* genu. Tato skutečnost by mohla být příčinou velkého rozpětí hladin Lp(a) v populaci. Opomíjen nesmí být ani případný vliv dalších lokusů v lidském genomu, které mohou být dosud maskovány dominantní úlohou *LPA* genu. Znalost způsobu genetické determinace hladin Lp(a) by mohla vést k vytvoření strategie pro jeho snížení u osob v riziku a rovněž k objasnění jeho role ve fyziologických procesech lidského organismu.

## **VII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- d'Angelo A, Geroldi D, Hancock MA, Valtulina V, Cornaglia AI, Spencer CA, Emanuele E, Calligaro A, Koschinsky ML, Speziale P, Visai L.** The apolipoprotein(a) component of lipoprotein(a) mediates binding to laminin: contribution to selective retention of lipoprotein(a) in atherosclerotic lesions. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1687(1-3):1-10.
- Argraves KM, Kozarsky KF, Fallon JT, Harpel PC, Strickland DK.** The atherogenic lipoprotein Lp(a) is internalized and degraded in a process mediated by the VLDL receptor. *J Clin Invest*. 1997;100(9):2170-2181.
- Auge N, Fitoussi G, Bascands JL, Pieraggi MT, Junquero D, Valet P, Girolami JP, Salvayre R, Negre-Salvayre A.** Mildly oxidized LDL evokes a sustained Ca<sup>2+</sup> dependent retraction of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1996;79(4):871-880.
- Austin MA, Sandholzer C, Selby JV, Newman B, Krauss RM, Utermann G.** Lipoprotein(a) in women twins: heritability and relationship to apolipoprotein(a) phenotypes. *Am J Hum Genet*. 1992;51(4):829-840.
- Azrolan N, Gavish D, Breslow JL.** Plasma lipoprotein(a) concentration is controlled by apolipoprotein(a) (apo(a)) protein size and the abundance of hepatic apo(a) mRNA in a cynomolgus monkey model. *J Biol Chem*. 1991;266(21):13866-113872.
- van Barlingen HH, Kleinveld HA, Erkelens DW, de Bruin TW.** Lipoprotein lipase-enhanced binding of lipoprotein(a) [Lp(a)] to heparan sulfate is improved by apolipoprotein E (apoE) saturation: secretion-capture process of apoE is a possible route for the catabolism of Lp(a). *Metabolism*. 1997;46(6):650-655.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ.** Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21:263-265.
- Becker L, Cook PM, Koschinsky ML.** Identification of sequences in apolipoprotein(a) that maintain its closed conformation: a novel role for apo(a) isoform size in determining the efficiency of covalent Lp(a) formation. *Biochemistry*. 2004;43(31):9978-9988.
- Becker L, Gabel BR, Spencer CA, Marcovina SM, Koschinsky ML.** Effect of low-density lipoprotein buoyant density and cholesterol content on the formation of lipoprotein(a) particles. *Clin Exp Med*. 2001;1(2):121-125.

- Becker L, Webb BA, Chitayat S, Nesheim ME, Koschinsky ML.** A ligand-induced conformational change in apolipoprotein(a) enhances covalent Lp(a) formation. *J Biol Chem.* 2003;278(16):14074-14081.
- Beisiegel U, Niendorf A, Wolf K, Reblin T, Rath M.** Lipoprotein(a) in the arterial wall. *Eur Heart J.* 1990;11 SupplE:174-183.
- Blencowe C, Hermetter A, Kostner GM, Deigner HP.** Enhanced association of platelet-activating factor acetylhydrolase with lipoprotein (a) in comparison with low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1995;270(52):31151-31157.
- Boerwinkle E, Leffert CC, Lin J, Lackner C, Chiesa G, Hobbs HH.** Apolipoprotein(a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein(a) concentrations. *J Clin Invest.* 1992;90(1):52-60.
- Boomsma DI, Kaptein A, Kempen HJ, Gevers Leuven JA, Princen HM.** Lipoprotein(a): relation to other risk factors and genetic heritability. Results from a Dutch parent-twin study. *Atherosclerosis.* 1993;99(1):23-33.
- Brazier L, Tiret L, Luc G, Arveiler D, Ruidavets JB, Evans A, Chapman J, Cambien F, Thillet J.** Sequence polymorphisms in the apolipoprotein(a) gene and their association with lipoprotein(a) levels and myocardial infarction. The ECTIM Study. *Atherosclerosis.* 1999;144(2):323-333.
- Broeckel U, Hengstenberg C, Mayer B, Holmer S, Martin LJ, Comuzzie AG, Blangero J, Nurnberg P, Reis A, Riegger GA, Jacob HJ, Schunkert H.** A comprehensive linkage analysis for myocardial infarction and its related risk factors. *Nat Genet.* 2002;30(2):210-214.
- Brunner C, Kraft HG, Utermann G, Muller HJ.** Cys4057 of apolipoprotein(a) is essential for lipoprotein(a) assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(24):11643-11647.
- Brunner C, Lobentanz EM, Petho-Schramm A, Ernst A, Kang C, Dieplinger H, Muller HJ, Utermann G.** The number of identical kringle IV repeats in apolipoprotein(a) affects its processing and secretion by HepG2 cells. *J Biol Chem.* 1996;271(50):32403-32410.
- Buechler C, Ullrich H, Aslanidis C, Bared SM, Lingenhel A, Ritter M, Schmitz G.** Lipoprotein (a) downregulates lysosomal acid lipase and induces interleukin-6 in human blood monocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1642(1-2):25-31.

- Cain WJ, Millar JS, Himebauch AS, Tietge UJ, Maugeais C, Usher D, Rader DJ.** Lipoprotein [a] is cleared from the plasma primarily by the liver in a process mediated by apolipoprotein [a]. *J Lipid Res.* 2005;46(12):2681-2691.
- Caplice NM, Panetta C, Peterson TE, Kleppe LS, Mueske CS, Kostner GM, Broze GJ, Jr, Simari RD.** Lipoprotein (a) binds and inactivates tissue factor pathway inhibitor: a novel link between lipoproteins and thrombosis. *Blood.* 2001;98(10):2980-2987.
- Cohen JC, Chiesa G, Hobbs HH.** Sequence polymorphisms in the apolipoprotein (a) gene. Evidence for dissociation between apolipoprotein(a) size and plasma lipoprotein(a) levels. *J Clin Invest.* 1993;91(4):1630-1636.
- Češka R.** Cholesterol a ateroskleróza: léčba hyperlipidémie. 1999; Praha:Maxdorf, I.vydání.
- Danesh J, Collins R, Peto R.** Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies. *Circulation.* 2000;102(10):1082-1085.
- Demant T, Seeberg K, Bedynek A, Seidel D.** The metabolism of lipoprotein(a) and other apolipoprotein B-containing lipoproteins: a kinetic study in humans. *Atherosclerosis.* 2001;157(2):325-339.
- Dieplinger H, Utermann G.** The seventh myth of lipoprotein(a): where and how is it assembled? *Curr Opin Lipidol.* 1999;10(3):275-283.
- Ernst A, Helmholt M, Brunner C, Petho-Schramm A, Armstrong VW, Muller HJ.** Identification of two functionally distinct lysine-binding sites in kringle 37 and in kringles 32-36 of human apolipoprotein(a). *J Biol Chem.* 1995;270(11):6227-6234.
- Ezratty A, Simon DI, Loscalzo J.** Lipoprotein(a) binds to human platelets and attenuates plasminogen binding and activation. *Biochemistry.* 1993;32(17):4628-4633.
- Falco C, Estelles A, Dalmau J, Espana F, Aznar J.** Influence of lipoprotein (a) levels and isoforms on fibrinolytic activity—study in families with high lipoprotein (a) levels. *Thromb Haemost.* 1998;79(4):818-823.
- Flier JS.** Diabetes. The missing link with obesity? *Nature.* 2001;409(6818):307-312.
- Fontana P, Mooser V, Bovet P, Shamlaye C, Burnand B, Lenain V, Marcovina SM, Riesen W, Darioli R.** Dose-dependent inverse relationship between alcohol consumption and serum Lp(a) levels in black African males. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19(4):1075-1082.
- Foody JM, Milberg JA, Pearce GL, Sprecher DL.** Lipoprotein(a) associated with coronary artery disease in older women: age and gender analysis. *Atherosclerosis.* 2000<sup>a</sup>;153(2):445-451.



**Foody JM, Milberg JA, Robinson K, Pearce GL, Jacobsen DW, Sprecher DL.**

Homocysteine and lipoprotein(a) interact to increase CAD risk in young men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000<sup>b</sup>;20(2):493-499.

**Frank S, Durovic S, Kostner GM.** Structural requirements of apo-a for the lipoprotein-a assembly. *Biochem J.* 1994;304(Pt 1):27-30.

**Gabel BR, Koschinsky ML.** Sequences within apolipoprotein(a) kringle IV types 6-8 bind directly to low-density lipoprotein and mediate noncovalent association of apolipoprotein(a) with apolipoprotein B-100. *Biochemistry.* 1998;37(21):7892-7898.

**Gabel BR, May LF, Marcovina SM, Koschinsky ML.** Lipoprotein(a) assembly. Quantitative assessment of the role of apo(a) kringle IV types 2-10 in particle formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(12):1559-1567.

**Gaw A, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH.** Comparative analysis of the apo(a) gene, apo(a) glycoprotein, and plasma concentrations of Lp(a) in three ethnic groups. Evidence for no common "null" allele at the apo(a) locus. *J Clin Invest.* 1994;93(6): 2526-2534.

**Gaw A, Brown EA, Ford I.** Impact of apo(a) length polymorphism and the control of plasma Lp(a) concentrations: evidence for a threshold effect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(12):1870-1876.

**Gonbert S, Saint-Jore B, Giral P, Doucet C, Chapman J, Thillet J.** Molecular analysis of apo(a) fragmentation in polygenic hypercholesterolemia: characterization of a new plasma fragment pattern. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(8):1353-1358.

**Grainger DJ, Kemp PR, Liu AC, Lawn RM, Metcalfe JC.** Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature.* 1994; 370(6489):460-462.

**Grainger DJ, Kirschenlohr HL, Metcalfe JC, Weissberg PL, Wade DP, Lawn RM.** Proliferation of human smooth muscle cells promoted by lipoprotein(a). *Science.* 1993; 260(5114):1655-1658.

**Griffiths G, Doms RW, Mayhew T, Lucocq J.** The bulk-flow hypothesis: not quite the end. *Trends Cell Biol.* 1995;5(1):9-13.

**Guevara J Jr, Jan AY, Knapp R, Tulinsky A, Morrisett JD.** Comparison of ligand-binding sites of modeled apo[a] kringle-like sequences in human lipoprotein[a]. *Arterioscler Thromb.* 1993;13(5):758-770.

- Harpel PC, Chang VT, Borth W.** Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein(a) to fibrin: a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(21):10193-10197.
- Herrmann RA, Malinauskas RA, Truskey GA.** Characterization of sites with elevated LDL permeability at intercostal, celiac, and iliac branches of the normal rabbit aorta. *Arterioscler Thromb.* 1994;14(2):313-323.
- Hervio L, Chapman MJ, Thillet J, Loyau S, Angles-Cano E.** Does apolipoprotein(a) heterogeneity influence lipoprotein(a) effects on fibrinolysis? *Blood.* 1993;82(2):392-397.
- Higazi AA, Lavi E, Bdeir K, Ulrich AM, Jamieson DG, Rader DJ, Usher DC, Kane W, Ganz T, Cines DB.** Defensin stimulates the binding of lipoprotein (a) to human vascular endothelial and smooth muscle cells. *Blood.* 1997;89(12):4290-4298.
- Hobbs HH, White AL.** Lipoprotein(a): intrigues and insights. *Curr Opin Lipidol.* 1999;10(3):225-236.
- Hoff HF, O'Neil J, Smejkal GB, Yashiro A.** Immunochemically detectable lipid-free apo(a) in plasma and in human atherosclerotic lesions. *Chem Phys Lipids.* 1994; 67-68:271-280.
- Holmer SR, Hengstenberg C, Kraft HG, Mayer B, Poll M, Kurzinger S, Fischer M, Lowel H, Klein G, Riegger GA, Schunkert H.** Association of polymorphisms of the apolipoprotein(a) gene with lipoprotein(a) levels and myocardial infarction. *Circulation.* 2003;107(5):696-701.
- Hrzenjak A, Frank S, Wo X, Zhou Y, Van Berkel T, Kostner GM.** Galactose-specific asialoglycoprotein receptor is involved in lipoprotein (a) catabolism. *Biochem J.* 2003; 376(Pt 3):765-771.
- Huby T, Afzal V, Doucet C, Lawn RM, Gong EL, Chapman MJ, Thillet J, Rubin EM.** Regulation of the expression of the apolipoprotein(a) gene: evidence for a regulatory role of the 5' distal apolipoprotein(a) transcription control region enhancer in yeast artificial chromosome transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(9): 1633-1639.
- Huby T, Datchet C, Lawn RM, Wickings J, Chapman MJ, Thillet J.** Functional analysis of the chimpanzee and human apo(a) promoter sequences: identification of sequence variations responsible for elevated transcriptional activity in chimpanzee. *J Biol Chem.* 2001;276(25):22209-22214.

- Chakravarti A, Buetow KH, Antonarakis SE, Waber PG, Boehm CD, Kazazian HH.** Nonuniform recombination within the human beta-globin gene cluster. *Am J Hum Genet.* 1984;36(6):1239-1258.
- Chang MY, Lees AM, Lees RS.** Time course of 125I-labeled LDL accumulation in the healing, balloon-deendothelialized rabbit aorta. *Arterioscler Thromb.* 1992;12(9):1088-1098.
- Chiesa G, Hobbs HH, Koschinsky ML, Lawn RM, Maika SD, Hammer RE.** Reconstitution of lipoprotein(a) by infusion of human low density lipoprotein into transgenic mice expressing human apolipoprotein(a). *J Biol Chem.* 1992;267(34):24369-24374.
- Ichinose A, Kuriyama M.** Detection of polymorphisms in the 5'-flanking region of the gene for apolipoprotein(a). *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;209(1):372-378.
- Inoue M, Itoh H, Tanaka T, Chun TH, Doi K, Fukunaga Y, Sawada N, Yamshita J, Masatsugu K, Saito T, Sakaguchi S, Sone M, Yamahara Ki, Yurugi T, Nakao K.** Oxidized LDL regulates vascular endothelial growth factor expression in human macrophages and endothelial cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(4):560-566.
- Ismail NA, Alavi MZ, Moore S.** Lipoprotein-proteoglycan complexes from injured rabbit aortas accelerate lipoprotein uptake by arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 1994;105(1):79-87.
- Jenner JL, Ordovas JM, Lamon-Fava S, Schaefer MM, Wilson PW, Castelli WP, Schaefer EJ.** Effects of age, sex, and menopausal status on plasma lipoprotein(a) levels. The Framingham Offspring Study. *Circulation.* 1993;87(4):1135-1141.
- Kalina A, Csaszar A, Fust G, Nagy B, Szalai C, Karadi I, Duba J, Prohaszka Z, Horvath L, Dieplinger H.** The association of serum lipoprotein(a) levels, apolipoprotein(a) size and (TTTTA)(n) polymorphism with coronary heart disease. *Clin Chim Acta.* 2001;309(1):45-51.
- Kamboh MI, Ferrell RE, Kottke BA.** Expressed hypervariable polymorphism of apolipoprotein (a). *Am J Hum Genet.* 1991;49(5):1063-1074.
- Kang C, Dominguez M, Loyau S, Miyata T, Durlach V, Angles-Cano E.** Lp(a) particles mold fibrin-binding properties of apo(a) in size-dependent manner: a study with different-length recombinant apo(a), native Lp(a), and monoclonal antibody. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(7):1232-1238.

- Kim JH, Roh KH, Nam SM, Park HY, Jang Y, Kim DK, Song KS.** The apolipoprotein(a) size, pentanucleotide repeat, C/T(+93) polymorphisms of apolipoprotein(a) gene, serum lipoprotein(a) concentrations and their relationship in a Korean population. *Clin Chim Acta.* 2001;314(1-2):113-123.
- Knoblauch H, Schuster H, Luft FC, Reich J.** A pathway model of lipid metabolism to predict the effect of genetic variability on lipid levels. *J Mol Med.* 2000;78(9):507-515.
- Kojima S, Harpel PC, Rifkin DB.** Lipoprotein (a) inhibits the generation of transforming growth factor beta: an endogenous inhibitor of smooth muscle cell migration. *J Cell Biol.* 1991;113(6):1439-1445.
- Koschinsky ML, Cote GP, Gabel B, van der Hoek YY.** Identification of the cysteine residue in apolipoprotein(a) that mediates extracellular coupling with apolipoprotein B-100. *J Biol Chem.* 1993;268(26):19819-19825.
- Kostner KM, Maurer G, Huber K, Stefenelli T, Dieplinger H, Steyrer E, Kostner GM.** Urinary excretion of apo(a) fragments. Role in apo(a) catabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(8):905-911.
- Kraft HG, Kochl S, Menzel HJ, Sandholzer C, Utermann G.** The apolipoprotein (a) gene: a transcribed hypervariable locus controlling plasma lipoprotein (a) concentration. *Hum Genet.* 1992;90(3):220-230.
- Kraft HG, Lingenhel A, Kochl S, Hoppichler F, Kronenberg F, Abe A, Muhlberger V, Schonitzer D, Utermann G.** Apolipoprotein(a) kringle IV repeat number predicts risk for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996<sup>a</sup>;16(6): 713-719.
- Kraft HG, Lingenhel A, Pang RW, Delpont R, Trommsdorff M, Vermaak H, Janus ED, Utermann G.** Frequency distributions of apolipoprotein(a) kringle IV repeat alleles and their effects on lipoprotein(a) levels in Caucasian, Asian, and African populations: the distribution of null alleles is non-random. *Eur J Hum Genet.* 1996<sup>b</sup>;4(2):74-87.
- Kraft HG, Lingenhel A, Raal FJ, Hohenegger M, Utermann G.** Lipoprotein(a) in homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(2): 522-528.
- Kraft HG, Windegger M, Menzel HJ, Utermann G.** Significant impact of the +93 C/T polymorphism in the apolipoprotein(a) gene on Lp(a) concentrations in Africans but not in Caucasians: confounding effect of linkage disequilibrium. *Hum Mol Genet.* 1998;7(2): 257-264.

- Kronenberg F, Kronenberg MF, Kiechl S, Trenkwalder E, Santer P, Oberhollenzer F, Egger G, Utermann G, Willeit J.** Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation*. 1999;100(11):1154-1160.
- Lackner C, Boerwinkle E, Leffert CC, Rahmig T, Hobbs HH.** Molecular basis of apolipoprotein (a) isoform size heterogeneity as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Invest*. 1991;87(6):2153-2161.
- Lamanuzzi LB, Mtairag el M, Pepe G, Angles-Cano E.** Neutrophils stimulated by apolipoprotein(a) generate fragments that are stronger inhibitors of plasmin formation than apo(a). *Thromb Haemost*. 2004;92(5):1066-1075.
- Lawn RM, Schwartz K, Patthy L.** Convergent evolution of apolipoprotein(a) in primates and hedgehog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(22):11992-11997.
- Lawn RM, Wade DP, Hammer RE, Chiesa G, Verstuyft JG, Rubin EM.** Atherogenesis in transgenic mice expressing human apolipoprotein(a). *Nature*. 1992;360(6405):670-672.
- Lingenhel A, Kraft HG, Kotze M, Peeters AV, Kronenberg F, Kruse R, Utermann G.** Concentrations of the atherogenic Lp(a) are elevated in FH. *Eur J Hum Genet*. 1998;6(1):50-60.
- Lippi G, Guidi G.** Lipoprotein(a): from ancestral benefit to modern pathogen? *QJM*. 2000;93(2):75-84.
- Lobentanz EM, Krasznai K, Gruber A, Brunner C, Muller HJ, Sattler J, Kraft HG, Utermann G, Dieplinger H.** Intracellular metabolism of human apolipoprotein(a) in stably transfected Hep G2 cells. *Biochemistry*. 1998;37(16):5417-5425.
- Loscalzo J, Weinfeld M, Fless GM, Scanu AM.** Lipoprotein(a), fibrin binding, and plasminogen activation. *Arteriosclerosis*. 1990;10(2):240-245.
- Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL.** Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol*. 1990;110(4):1361-1367.
- Maas R, Boger RH.** Old and new cardiovascular risk factors: from unresolved issues to new opportunities. *Atheroscler Suppl*. 2003;4(4):5-17.

- Malgaretti N, Acquati F, Magnaghi P, Bruno L, Pontoglio M, Rocchi M, Saccone S, Della Valle G, D'Urso M, LePaslier D, Ottolenghi S, Tramelli R.** Characterization by yeast artificial chromosome cloning of the linked apolipoprotein(a) and plasminogen genes and identification of the apolipoprotein(a) 5' flanking region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(23):11584-11588.
- Mancini FP, Mooser V, Guerra R, Hobbs HH.** Sequence microheterogeneity in apolipoprotein(a) gene repeats and the relationship to plasma Lp(a) levels. *Hum Mol Genet.* 1995;4(9):1535-1542.
- Marz W, Beckmann A, Scharnagl H, Siekmeier R, Mondorf U, Held I, Schneider W, Preissner KT, Curtiss LK, and Gross W.** Heterogeneous lipoprotein (a) size isoforms differ by their interaction with the low density lipoprotein receptor and the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *FEBS Lett.* 1993;325(3):271-275.
- McConathy WJ, Trieu VN.** Lp(a) interactions. *Prog Lipid Res.* 1991;30(2-3): 195-203.
- McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, Scanu AM, Lawn RM.** cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature.* 1987;330(6144):132-137.
- deMeester CA, Bu X, Gray RJ, Lusic AJ, Rotter JI.** Genetic variation in lipoprotein (a) levels in families enriched for coronary artery disease is determined almost entirely by the apolipoprotein (a) gene locus. *Am J Hum Genet.* 1995;56(1):287-293.
- Milionis HJ, Efstathiadou Z, Tselepis AD, Bairaktari ET, Tsironis LD, Tsatsoulis A, Elisaf MS.** Lipoprotein (a) levels and apolipoprotein (a) isoform size in patients with subclinical hypothyroidism: effect of treatment with levothyroxine. *Thyroid.* 2003;13(4):365-369.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for DNA extraction from human nucleated cells. *Nucl Acid Res.* 1988;16:1215.
- Mooser V, Berger MM, Tappy L, Cayeux C, Marcovina SM, Darioli R, Nicod P, Chiolero R.** Major reduction in plasma Lp(a) levels during sepsis and burns. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(4):1137-1142.
- Mooser V, Mancini FP, Bopp S, Petho-Schramm A, Guerra R, Boerwinkle E, Muller HJ, Hobbs HH.** Sequence polymorphisms in the apo(a) gene associated with specific levels of Lp(a) in plasma. *Hum Mol Genet.* 1995;4(2):173-181.
- Myers RM, Maniatis T, Lerman LS.** Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 1987;155:501-527.

**Nassar T, Akkawi S, Bar-Shavit R, Haj-Yehia A, Bdeir K, Al-Mehdi AB, Tarshis M, Higazi AA.** Human alpha-defensin regulates smooth muscle cell contraction: a role for low-density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *Blood*. 2002;100(12):4026-4032.

**Negi S, Singh SK, Pati N, Handa V, Chauhan R, Pati U.** A proximal tissue-specific module and a distal negative regulatory module control apolipoprotein(a) gene transcription. *Biochem J*. 2004;379(Pt1):151-159.

**Ogorelkova M, Gruber A, Utermann G.** Molecular basis of congenital lp(a) deficiency: a frequent apo(a) 'null' mutation in caucasians. *Hum Mol Genet*. 1999;8(11):2087-2096.

**Ogorelkova M, Kraft HG, Ehnholm C, Utermann G.** Single nucleotide polymorphisms in exons of the apo(a) kringle IV types 6 to 10 domain affect Lp(a) plasma concentrations and have different patterns in Africans and Caucasians. *Hum Mol Genet*. 2001;10(8):815-824.

**Oorni K, Pentikainen MO, Ala-Korpela M, Kovanen PT.** Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions. *J Lipid Res*. 2000;41(11):1703-1714.

**Palabrica TM, Liu AC, Aronovitz MJ, Furie B, Lawn RM, Furie BC.** Antifibrinolytic activity of apolipoprotein(a) in vivo: human apolipoprotein(a) transgenic mice are resistant to tissue plasminogen activator-mediated thrombolysis. *Nat Med*. 1995;1(3):256-259.

**Parson W, Kraft HG, Niederstatter H, Lingenhel AW, Kochl S, Fresser F, Utermann G.** A common nonsense mutation in the repetitive Kringle IV-2 domain of human apolipoprotein(a) results in a truncated protein and low plasma Lp(a). *Hum Mutat*. 2004;24(6):474-480.

**Parsons DS, Reaveley DA, Pavitt DV, Misra M, Brown EA.** Lipoprotein (a) levels in those with high molecular weight apo (a) isoforms may remain low in a significant proportion of patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(9):1848-1853.

**Paultre F, Pearson TA, Weil HF, Tuck CH, Myerson M, Rubin J, Francis CK, Marx HF, Philbin EF, Reed RG, Berglund L.** High levels of Lp(a) with a small apo(a) isoform are associated with coronary artery disease in African American and white men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(12):2619-2624.

**Price JF, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG.** Lipoprotein (a) and development of intermittent claudication and major cardiovascular events in men and women: the Edinburgh Artery Study. *Atherosclerosis*. 2001;157(1):241-249.

- Prins J, Leus FR, Bouma BN, van Rijn HJ.** The identification of polymorphisms in the coding region of the apolipoprotein (a) gene--association with earlier identified polymorphic sites and influence on the lipoprotein (a) concentration. *Thromb Haemost.* 1999;82(6):1709-1717.
- Puckey LH, Knight BL.** Interaction of oestrogen and peroxisome proliferator-activated receptors with apolipoprotein(a) gene enhancers. *Biochem J.* 2002;366(Pt1):157-163.
- Puckey LH, Knight BL.** Sequence and functional changes in a putative enhancer region upstream of the apolipoprotein(a) gene. *Atherosclerosis.* 2003;166(1):119-127.
- Puckey LH, Lawn RM, Knight BL.** Polymorphisms in the apolipoprotein(a) gene and their relationship to allele size and plasma lipoprotein(a) concentration. *Hum Mol Genet.* 1997;6(7):1099-1107.
- Rader DJ, Cain W, Ikewaki K, Talley G, Zech LA, Usher D, Brewer HB Jr.** The inverse association of plasma lipoprotein(a) concentrations with apolipoprotein(a) isoform size is not due to differences in Lp(a) catabolism but to differences in production rate. *J Clin Invest.* 1994;93(6):2758-2763.
- Rader DJ, Cain W, Zech LA, Usher D, Brewer HB Jr.** Variation in lipoprotein(a) concentrations among individuals with the same apolipoprotein (a) isoform is determined by the rate of lipoprotein(a) production. *J Clin Invest.* 1993;91(2):443-447.
- Ramharack R, Barkalow D, Spahr MA.** Dominant negative effect of TGF-beta1 and TNF-alpha on basal and IL-6-induced lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) mRNA expression in primary monkey hepatocyte cultures. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(6):984-990.
- Reblin T, Donarski N, Fineder L, Brasen JH, Dieplinger H, Thaiss F, Stahl RA, Beisiegel U, Wolf G.** Renal handling of human apolipoprotein(a) and its fragments in the rat. *Am J Kidney Dis.* 2001;38(3):619-630.
- Ritter MM, Gewitsch J, Richter WO, Geiss HC, Wildner MW, Schwandt P.** Apolipoprotein E polymorphism has no independent effect on plasma levels of lipoprotein(a). *Atherosclerosis.* 1997;131(2):243-248.
- Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362(6423):801-809.
- Rouy D, Koschinsky ML, Fleury V, Chapman J, Angles-Cano E.** Apolipoprotein(a) and plasminogen interactions with fibrin: a study with recombinant apolipoprotein(a) and isolated plasminogen fragments. *Biochemistry.* 1992;31(27): 6333-6339.



- Sakai M, Miyazaki A, Hakamata H, Sato Y, Matsumura T, Kobori S, Shichiri M, Horiuchi S.** Lysophosphatidylcholine potentiates the mitogenic activity of modified LDL for human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(4):600-605.
- Scanu AM.** Genetic basis and pathophysiological implications of high plasma Lp(a) levels. *J Intern Med.* 1992;231(6):679-683.
- Scanu AM, Fless GM.** Lipoprotein (a). Heterogeneity and biological relevance. *J Clin Invest.* 1990;85(6):1709-1715.
- Scanu AM, Miles LA, Fless GM, Pfaffinger D, Eisenbart J, Jackson E, Hoover-Plow JL, Brunck T, Plow EF.** Rhesus monkey lipoprotein(a) binds to lysine Sepharose and U937 monocytoid cells less efficiently than human lipoprotein(a). Evidence for the dominant role of kringle 4(37). *J Clin Invest.* 1993;91(1):283-291.
- Shindo J, Ishibashi T, Kijima M, Nakazato K, Nagata K, Yokoyama K, Hirosaka A, Sato E, Kunii H, Yamaguchi N, Watanabe N, Saito T, Maehara K, Maruyama Y.** Increased plasminogen activator inhibitor-1 and apolipoprotein (a) in coronary atherectomy specimens in acute coronary syndromes. *Coron Artery Dis.* 2001;12(7):573-579.
- Simo JM, Joven J, Vilella E, Ribas M, Figuera L, Virgos C, Sundaram IM, Hoover-Plow J.** Polymorphisms in human apolipoprotein(a) kringle IV-10 and coronary artery disease: relationship to allele size, plasma lipoprotein(a) concentration, and lysine binding site activity. *J Mol Med.* 2001<sup>a</sup>;79(5-6):294-299.
- Simo JM, Joven J, Vilella E, Ribas M, Pujana MA, Sundaram IM, Hammel JP, Hoover-Plow JL.** Impact of apolipoprotein(a) isoform size heterogeneity on the lysine binding function of lipoprotein(a) in early onset coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2001<sup>b</sup>;85(3):412-417.
- Sotiriou SN, Orlova VV, Al-Fakhri N, Ihanus E, Economopoulou M, Isermann B, Bdeir K, Nawroth PP, Preissner KT, Gahmberg CG, Koschinsky ML, Chavakis T.** Lipoprotein(a) in atherosclerotic plaques recruits inflammatory cells through interaction with Mac-1 integrin. *FASEB J.* 2006;20(3):559-561.
- Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW.** A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb.* 1994;14(5):840-856.

- Suzuki K, Kuriyama M, Saito T, Ichinose A.** Plasma lipoprotein(a) levels and expression of the apolipoprotein(a) gene are dependent on the nucleotide polymorphisms in its 5'-flanking region. *Clin Invest.* 1997;99(6):1361-1366.
- Szalai C, Duba J, Prohaszka Z, Kalina A, Szabo T, Nagy B, Horvath L, Csaszar A.** Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients. *Atherosclerosis.* 2001;158(1):233-239.
- Trieu VN, McConathy WJ.** A two-step model for lipoprotein(a) formation. *J Biol Chem.* 1995;270(26):15471-15474.
- Trommsdorff M, Kochl S, Lingenhel A, Kronenberg F, Delport R, Vermaak H, Lemming L, Klausen IC, Faergeman O, Utermann G, et al.** A pentanucleotide repeat polymorphism in the 5' control region of the apolipoprotein(a) gene is associated with lipoprotein(a) plasma concentrations in Caucasians. *J Clin Invest.* 1995;96(1):150-157.
- Tsimikas S, Brilakis ES, Miller ER, McConnell JP, Lennon RJ, Kornman KS, Witztum JL, Berger PB.** Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;353(1):46-57.
- Tsimikas S, Witztum JL, Miller ER, Sasiela WJ, Szarek M, Olsson AG, Schwartz GG;** Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. High-dose atorvastatin reduces total plasma levels of oxidized phospholipids and immune complexes present on apolipoprotein B-100 in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL trial. *Circulation.* 2004;110(11):1406-1412.
- Tsurupa G, Yakovlev S, Pechik I, Lamanuzzi LB, Angles-Cano E, Medved L.** Interaction of fibrin(ogen) with apolipoprotein(a): further characterization and identification of a novel lysine-dependent apolipoprotein(a)-binding site within the gamma chain 287-411 region. *Biochemistry.* 2006;45(35):10624-10632.
- de Vos AM, Ultsch MH, Kelley RF, Padmanabhan K, Tulinsky A, Westbrook ML, Kossiakoff AA.** Crystal structure of the kringle 2 domain of tissue plasminogen activator at 2.4-Å resolution. *Biochemistry.* 1992;31(1):270-279.
- Wade DP, Clarke JG, Lindahl GE, Liu AC, Zysow BR, Meer K, Schwartz K, Lawn RM.** 5' control regions of the apolipoprotein(a) gene and members of the related plasminogen gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(4):1369-1373.
- Wade DP, Lindahl GE, Lawn RM.** Apolipoprotein(a) gene transcription is regulated by liver-enriched trans-acting factor hepatocyte nuclear factor 1 alpha. *J Biol Chem.* 1994;269(31):19757-19765.

**Wade DP, Puckey LH, Knight BL, Acquati F, Mihalich A, Taramelli R.**

Characterization of multiple enhancer regions upstream of the apolipoprotein(a) gene. *J Biol Chem.* 1997;272(48):30387-30399.

**Weijenberg MP, Feskens EJ, Kromhout D.** White blood cell count and the risk of coronary heart disease and all-cause mortality in elderly men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(4):499-503.

**Weisel JW, Nagaswami C, Woodhead JL, Higazi AA, Cain WJ, Marcovina SM, Koschinsky ML, Cines DB, Bdeir K.** The structure of lipoprotein(a) and ligand-induced conformational changes. *Biochemistry.* 2001;40(35):10424-10435.

**White AL, Hixson JE, Rainwater DL, Lanford RE.** Molecular basis for "null" lipoprotein(a) phenotypes and the influence of apolipoprotein(a) size on plasma lipoprotein(a) level in the baboon. *J Biol Chem.* 1994;269(12):9060-9066.

**White AL, Lanford RE.** Cell surface assembly of lipoprotein(a) in primary cultures of baboon hepatocytes. *J Biol Chem.* 1994;269(46):28716-28723.

**White AL, Guerra B, Lanford RE.** Influence of allelic variation on apolipoprotein(a) folding in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1997;272(8): 5048-5055.

**White AL, Guerra B, Wang J, Lanford RE.** Presecretory degradation of apolipoprotein [a] is mediated by the proteasome pathway. *J Lipid Res.* 1999;40(2): 275-286.

**Wild SH, Fortmann SP, Marcovina SM.** A prospective case-control study of lipoprotein(a) levels and apo(a) size and risk of coronary heart disease in Stanford Five-City Project participants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(2):239-245.

**Williams KJ, Tabas I.** The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(5):551-561.

**Wilmink HW, de Kleijn MJ, Bots ML, Bak AA, van der Schouw YT, Engelen S, Planellas J, Banga J, Grobbee DE.** Lipoprotein (a) is associated with endothelial function in healthy postmenopausal women. *Atherosclerosis.* 2000;153(1):249-254.

**Wu JH, Lee IN.** Studies of apolipoprotein (a) promoter from subjects with different plasma lipoprotein (a) concentrations. *Clin Biochem.* 2003;36(4):241-246.

**Xia J, May LF, Koschinsky ML.** Characterization of the basis of lipoprotein [a] lysine-binding heterogeneity. *J Lipid Res.* 2000;41(10):1578-1584.

**Yang Z, Boffelli D, Boonmark N, Schwartz K, Lawn R.** Apolipoprotein(a) gene enhancer resides within a LINE element. *J Biol Chem.* 1998;273(2):891-897.

**Yano Y, Shimokawa K, Okada Y, Noma A.** Immunolocalization of lipoprotein(a) in wounded tissues. *J Histochem Cytochem.* 1997;45(4):559-568.

**Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L; INTERHEART Study Investigators.** Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364(9438):937-952.

**Zysow BR, Lindahl GE, Wade DP, Knight BL, Lawn RM.** C/T polymorphism in the 5' untranslated region of the apolipoprotein(a) gene introduces an upstream ATG and reduces in vitro translation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(1):58-64.

**Zidkova K, Kebrdlova V, Zlatohlavek L, Ceska R.** Detection of variability in apo(a) gene transcription regulatory sequences using the DGGE method. *Clin Chim Acta* 2007;376(1-2):77-81.

**Zidkova K, Zlatohlavek L, Ceska R.** Variability in apo(a) gene regulatory sequences, compound genotypes, and association with Lp(a) plasma levels. In press.  
doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.03.012

## **VIII.PŘÍLOHY**

### **VIII.1.PUBLIKACE PRÁCE**

1) **Zidkova K**, Zlatohlavek L, Ceska R. Variability in apo(a) gene regulatory sequences, compound genotypes, and association with Lp(a) plasma levels. In press.

doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.03.012

IF: 2,359

2) **Zidkova K**, Kebrdlova V, Zlatohlavek L, Ceska R. Detection of variability in apo(a) gene transcription regulatory sequences using the DGGE method. Clin Chim Acta 2007;376(1-2):77-81.

IF: 2,149

3) **Zidková K**. Variabilita v regulačních oblastech genu pro apo(a) a její vztah k hladině Lp(a). Sborník 1.Královéhradeckých lékařských postgraduálních dnů, 2004:204-207.

4) **Zidková K**. Detekce variability v regulačních oblastech genu pro apo(a). Sborník 4. studentské vědecké konference (UK, 1.LF, Praha), 2003:91-93.

5) Zlatohlávek L, **Zidková K**, Vrablík M. Lipoprotein (a). Přijato do Vnitř Lék; vyjde v květnu 2007

6) **Zidková K**, Zlatohlávek L, Česka R. Genetické aspekty velkého rozpětí hladin lipoproteinu(a). odesláno k publikaci do Čas Lék Čes. květen 2007

## VIII.2.PREZENTACE PRÁCE

### Konference (abstrakta ve sbornících):

XIV International Symposium On Atherosclerosis, 18.-22. červen 2006, Řím, Itálie.

**MO-P6-429: Zidkova K, Kebrdlova V, Zlatohlavek L, Ceska R.** Complex haplotypes from apolipoprotein(a) gene locus control regions and correlation to lipoprotein(a) plasma levels. *Atherosclerosis (Supplements)*, 2006;7(3):140.

European Human Genetics Conference (ESHG) 2006, 6-9. květen, Amsterdam, Nizozemí.

**P1087: Zidkova K, Kebrdlova V, Zlatohlavek L, Ceska R.** Complex haplotypes from apolipoprotein(a) gene locus control regions and correlation to lipoprotein(a) plasma levels. *Eur J Hum Genet* 2006; 14(Suppl.1):338.

75th Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS), 23-26. duben 2005, Praha, Česká Republika

**T06-P-022: Zidkova K, Kebrdlova V, Zlatohlavek L, Ceska R.** Variability in apo(a) gene control regions and correlation to Lp(a) plasma levels. *Atherosclerosis (Supplements)* 2005;6(1):170.

**T04-P-048: Zlatohlávek L, Zidkova K, Vrablik M, Prochazkova R, Kvasilova M, Ceska R.** Lipoprotein(a), its relation to plasma lipids and other risk factors for atherosclerosis., *Atherosclerosis (Supplements)* 2005;6(1):164.

European Human Genetics Conference (ESHG) 2005, 7-10. květen, Praha, Česká Republika

**P1010: Zidkova K, Kebrdlova V, Zlatohlavek L, Ceska R.** Variability in apo(a) gene control regions and correlation to Lp(a) plasma levels., *Eur J Hum Genet* 2005;13(Suppl.1):299.

European Human Genetics Conference (ESHG) 2004, 12-15. červen, Mnichov, Německo.

**P0593: Zidkova K, Kebrdlova V, Zlatohlavek L, Ceska R.** Detection of variability in apo(a) gene control regions., *Eur J Hum Genet* 2004;12(Suppl.1):211.

VIII. Kongres o ateroskleróze, 2.-4. prosinec 2004, hotel Harmony, Špindlerův Mlýn.

**P34: Zídková K, Kebrdlová V, Češka R, Zlatohlávek L.** Detection of variability in apo(a) gene control regions. *DMEV* 2004;7(suppl.3):52.

VII. Kongres o ateroskleróze, 4.-6. prosinec 2003, hotel Harmony, Špindlerův Mlýn.

**P39: Zídková K, Češka R, Zlatohlávek L.** detekce variability v regulačních oblastech genu pro apo(a). *DMEV* 2003;6(suppl.3):50.

**Přednášky:**

IX. Kongres o ateroskleróze, 1.-3. prosinec 2005, hotel Harmony, Špindlerův Mlýn.

**Zídková K**, Kebrdlová V, Zlatohlávek L, Češka R. Variabilita v regulačních oblastech genu pro apo(a) a její vztah k hladině Lp(a). DMEV 2005;8(suppl.3): 18-19.

Zlatohlávek L, **Zídková K**, Vrablík M, Procházková R, Kvasilová M, Lacinová Z, Češka R. Lipoprotein(a), ovlivnění jeho hladiny genetickými a negenetickými faktory. DMEV 2005;8(suppl.3):19.

1.Královéhradecké lékařské postgraduální dny, 16.-17. prosinec 2004, Hradec Králové

**Zídková K**. Variabilita v regulačních oblastech genu pro apo(a) a její vztah k hladině Lp(a). Sborník 1.Královéhradeckých lékařských postgraduálních dnů, 2004, str.204-207.

VIII. Kongres o ateroskleróze, 2.-4. prosinec 2004, hotel Harmony, Špindlerův Mlýn.

Zlatohlávek L, **Zídková K**, Vrablík M, Zlatohlávková D, Češka R. Hladina Lp(a), jeho vztah k lipidovým parametrům, rizikovým faktorům a klinické manifestaci aterosklerózy. DMEV 2004;7(suppl.3):29.

Šobrův den XXII. konference o hyperlipoproteinémiích, konaná 9. června 2004, Praha.

**Zídková K**, Kebrdlová V, Češka R, Zlatohlávek L. Detekce variability v regulačních oblastech genu pro apo(a). DMEV 2004;3:158.

4. studentské vědecké konference 1.LF UK, konaná 19.května 2003, Praha.

**Zídková K**. Detekce variability v regulačních oblastech genu pro apo(a). Sborník 4. studentské vědecké konference (UK, 1.LF, Praha), 2003, str.91-93.