

DETEKCIA POLYMORFIZMOV rs429358 A rs7412 APOE GÉNU U PACIENTOV S OBEZITOU A VYBRANÝMI KARDIOVASKULÁRNymi A METABOLICKÝMI OCHORENIAMI V RÁMCI VÝCHODNÉHO SLOVENSKA

Jaroslava Hubcejová, Michaela Gregušiak Fecenková, Jarmila Bernasovská, Martina Sinčáková, Mária Šimočková, Eva Petrejčíková, Iveta Boroňová, Michaela Zigová

Prešovská univerzita v Prešove, Fakulta humanitných a prírodných vied, Katedra biológie, Ul. 17. Novembra 1, 08001 Prešov, Slovensko, e-mail: jaroslava.hubcejova@unipo.sk

Abstract: *Detection of polymorphisms rs429358 and rs7412 of APOE gene in patients with obesity and selected cardiovascular and metabolic diseases in East Slovakia.* APOE gene (rs429358 and rs7412) was one of the first genes studied and associated with cardiovascular disease. APOE gene influences lipoprotein metabolism and plasma concentration (LDL cholesterol, total cholesterol, triacylglycerols) and its mutations can disrupted function of these mechanisms. The aim of our study was to analyse polymorphisms rs429358 and r7412 of APOE gene in two groups: patients with obesity and selected cardiovascular and metabolic diseases (N=147) and healthy controls (N=152). We found significant difference in allele frequency ($p=0.0000$) and distribution of genotypes ($p=0.0000$) of APOE gene. Frequency of alleles APOE gene was in controls $\epsilon_2=0.07$, $\epsilon_3=0.85$, $\epsilon_4=0.08$ and in patients $\epsilon_2=0.01$, $\epsilon_3=0.80$, $\epsilon_4=0.19$. After comparison of selected cardiovascular and metabolic diseases in sense of genotypes between patients we found significant difference between arterial hypertension ($p=0.0000$). With respect to allele frequency of APOE gene in our study, we can consider that the risk allele ϵ_4 may predispose individuals to developing cardiovascular and metabolic diseases.

Key words: obesity, rs7412, rs429358, APOE gene, ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4 , cardiovascular and metabolic diseases

Úvod

Moderná spoločnosť, zmena spôsobu života spojená s urbanizáciou a industrializáciou zapríčiňuje čoraz vo väčšej miere nárast obezity a s ňou spojených kardiovaskulárnych a metabolických ochorení ako sú napr. ateroskleróza, ischemická choroba srdca, diabetes mellitus 2. typu či dyslipidémia.

Obezita vzniká v dôsledku narušenia energetickej homeostázy v interakcii s genetickými faktormi, faktormi prostredia a životným štýlom, pričom je kľúčovým činiteľom rozvoja viacerých kardiovaskulárnych a metabolických ochorení (ESC 2012, ESH a ESC 2013, National Heart, Lung, and Blood Institute 2016). V rámci týchto ochorení dochádza k zmenám koncentrácií plazmatických lipidov. V prípade mutácií vybraných génov, ktoré sú zodpovedné za reguláciu metabolizmu plazmatických lipidov, dochádza k narušeniu a nesprávnej funkcii týchto mechanizmov. V našej štúdií sme sa zamerali na polymorfizmy rs429358 a rs7412 APOE génu, v rámci ktorých sú hladiny plazmatických lipidov špecificky vyššie resp. nižšie v závislosti od genotypu APOE génu. APOE gén je lokalizovaný na 19. chromozóme v oblasti 19q13.2 a skladá sa z troch intrónov a štyroch exónov (Allan et al. 1995). Obsahuje niekoľko jednonukleotidových polymorfizmov (*SNPs* – *single nucleotide polymorphisms*), pričom najbežnejšími z nich sú rs429358 (C3937→T) a rs7412 (C4075→T), referenčná sekvencia podľa dbSNP HGVS

pre rs429358 (NM_000041.3:c.388T>C) a rs7412 (NM_000041.3:c.526C>T) (Kim, Basak a Holtzman, 2009, Panza et al. 2012, Ensembl 2019a, Ensembl 2019b). Polymorfizmy rs429358 a rs7412 APOE génu dávajú vznik trom izoformám APOE a to ϵ_2 , ϵ_3 a ϵ_4 (Kim et al. 2009, Panza et al. 2012). Jednotlivé izoformy sa líšia substitúciami báz v pozícii 112 a 158, teda v jednej alebo v dvoch aminokyselinách (cysteín/arginín), dôsledkom čoho sú odlišné charakteristiky na receptory, a tým aj koncentrácie triacylglycerolov a cholesterolu. Izoforma ϵ_2 obsahuje na oboch polymorfných miestach cysteín, ϵ_3 obsahuje v pozícii 112 cysteín a v pozícii 158 arginín a izoforma ϵ_4 má v oboch polymorfných miestach arginín. Izoformy sú kódované 3 alelami génu APOE a to alelami ϵ_2 , ϵ_3 a ϵ_4 . Kombináciou týchto alel vzniká 6 možných genotypov: ϵ_2/ϵ_2 , ϵ_2/ϵ_3 , ϵ_2/ϵ_4 , ϵ_3/ϵ_3 , ϵ_3/ϵ_4 , ϵ_4/ϵ_4 (Calero et al. 2009; Zhang, Wu a Wu 2011, Machal et al. 2012).

Súbor a metódy

Analyzovaný súbor tvorilo 299 jedincov mužského a ženského pohlavia, ktorí boli na základe zdravotného statusu rozdelení do dvoch skupín. Prvú skupinu tvorilo 147 pacientov s diagnostikovanou obezitou ($BMI \geq 30 \text{kg/m}^2$) (a inými metabolickými a kardiovaskulárnymi ochoreniami – arteriálna hypertenzia, ischemická choroba srdca, dyslipidémia, diabetes mellitus 2. typu). Druhá skupina predstavovala kontrolný súbor zdravých jedincov bez výskytu kardiovaskulárnych a metabolických ochorení, v celkovom počte 152. Jedincom bola pre genetickú analýzu odobraná vzorka venóznej krvi. Zber genetického materiálu prebiehal v rokoch 2017 – 2018 v spolupráci so všeobecnými lekármi Prešovského a Košického kraja. Výskum bol realizovaný anonymne, teda osobné údaje typu: krstné meno, priezvisko, adresa bydliska, rodné číslo neboli zaznamenávané. Každý jedinec súhlasil s odberom biologického materiálu (vzorky DNA) a s poskytnutím sledovaných parametrov pre výskum, oboznámil sa s cieľom výskumu a svoje stanovisko potvrdil vlastnoručným podpisom. Vzorky venóznej krvi boli spracované metódou izolácie DNA využitím kitu NucleoSpin® Blood Macherey-Nagel podľa predpísaného protokolu. Detekcia SNP polymorfizmov rs429358 a rs7412 APOE génu bola realizovaná využitím fluorescenčne značených TaqMan sond metódou *Real-time* PCR (PCR v reálnom čase). Údaje boli vyhodnotené chí-kvadrát testom s využitím online softvéru (Preacher 2001). Realizovaný výskum bol schválený Etickou komisiou Prešovskej univerzity (č. 1/2013).

Výsledky a diskusia

Vo svetovej populácii je v rámci polymorfizmov rs429358 a rs7412 APOE génu najfrekvencovanejšou alela ϵ_3 s frekvenciou približne 78%. Najmenej rozšírenou alelou je ϵ_2 s alelovou frekvenciou približne 7% a alela ϵ_4 sa vyskytuje približne v 15% svetovej populácie. Samotné frekvencie sa líšia v závislosti od etnicity a konkrétnej populácie (Strittmatter a Roses 1995). Jedinci disponujúci alelou ϵ_2 majú vyššie hodnoty ApoE (apolipoproteín E) a nízke hodnoty celkového cholesterolu, LDL cholesterolu, ApoB (apolipoproteín B) a v niektorých prípadoch aj Lp (a) – lipoproteínu A. Nositelia alely ϵ_4 majú zase opačné charakteristiky, a teda nižšie hodnoty ApoE, vyššie hodnoty celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a ApoB, pričom sú z hľadiska rozvoja aterosklerózy rizikovejší (Tiret et al. 1994, Haffner et al. 1996).

Distribúcia alel APOE génu je celosvetovo rozdielna. V rámci všetkých populácií je najviac zastúpenou alela ϵ_3 , ktorá napríklad v oblasti Stredomoria dosahuje frekvenciu takmer 90 % ($f = 0,849 - 0,898$). V európskej populácii výskyt alely ϵ_4 klesá so zemepisnou šírkou od severu k juhu, konkrétne 20 – 30 % v severoeurópskej a 5 – 10 % v juhoeurópskej populácii (v niektorých prípadoch menej ako 1 %; Takeda et al. 2010). Vysoké zastúpenie alely ϵ_4 je napríklad v subsaharskej Afrike a v australo-melanézskych populáciách (Corbo a Scacchi 1999). Alela ϵ_4 sa ako ancestrálna, pôvodná alela vyskytuje hlavne v populácii Pygmejov ($f = 0,407$), Khoi San ($f = 0,370$), Papuáncov ($f = 0,368$), Laponcov ($f = 0,310$), niektorých Indiánov ($f = 0,280$), austrálskych domorodcov ($f = 0,260$) a pôvodných obyvateľov Malajzie ($f = 0,240$; Corbo a Scacchi 1999,

Takeda et al. 2010). Výskyt alely $\epsilon 2$ v európskej populácii nie je závislý na zemepisnej šírke a dosahuje hodnoty 5 – 10 %. Vyšší výskyt alela $\epsilon 2$ dosahuje v juhoázijskej populácii, no naopak veľmi vzácné sa vyskytuje na Sibíri u amerických Indiánov (Corbo a Scacchi 1999).

Percentuálne zastúpenie a frekvencie jednotlivých alel polymorfizmov rs429358 a rs7412 APOE génu v nami analyzovanom súbore sú zobrazené v tab. 1 a vlastná distribúcia šiestich genotypov APOE génu v rámci oboch porovnávaných súborov sa nachádza v tab. 2. Zastúpenie alel v našom súbore korešpondovalo so zastúpením vo svetovej populácii a najviac vyskytujúcou sa alelou bola v rámci oboch porovnávaných súborov alela $\epsilon 3$ (kontroly: 84,54 %, pacienti: 80,27 %) a najmenej alela $\epsilon 2$ (kontroly: 7,24 %, pacienti: 1,02 %). V rámci oboch porovnávaných súborov bola vyššia frekvencia alely $\epsilon 2$ prítomná v skupine kontrol (kontroly $\epsilon 2$: 7,24 %, pacienti $\epsilon 2$: 1,02 %) a alely $\epsilon 4$ v skupine pacientov (kontroly $\epsilon 4$: 8,22 %, pacienti $\epsilon 4$: 18,71 %). V rámci porovnania bol potvrdený štatisticky významný rozdiel $p = 0,0000$. Nakoľko sú nositelia alely $\epsilon 4$ z hľadiska rozvoja aterosklerózy rizikovejší, je možné brať do úvahy charakter alely aj v našom prípade vyššieho zastúpenia alely $\epsilon 4$ v skupine pacientov s obezitou a kardiovaskulárnymi a metabolickými ochoreniami. Mnohé štúdie pritom označili polymorfizmy rs429358 a rs7412 APOE génu za možný rizikový faktor rozvoja kardiovaskulárných ochorení (Tiret et al. 1994, Haffner et al. 1996, Zeljko et al. 2011).

Tab. 1: Frekvencia APOE alel v kontrolnom súbore a súbore pacientov

Table 1: Frequency of APOE alleles in controls and patients

Alely	Kontroly			Pacienti			chi ²	p-hodnota
	n	%	f	n	%	f		
$\epsilon 2$	22	7,24	0,07	3	1,02	0,01	26,425	0,0000***
$\epsilon 3$	257	84,54	0,85	236	80,27	0,80		
$\epsilon 4$	25	8,22	0,08	55	18,71	0,19		
Spolu	304	100,00	1,00	294	100,00	1,00		

n – početnosť alely, % – početnosť alely v percentách, f – frekvencia alely, chi² – chí-kvadrát test, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

*n – allele frequency, % – allele frequency in percentage, f – allele frequency, chi² – chi-squared test, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$*

Tab. 2: Distribúcia genotypov génu APOE v kontrolnej skupine a skupine pacientov

Table 2: Distribution of genotypes of APOE gene in controls and patients

Genotyp	Kontroly		Pacienti		chi ²	p-hodnota
	n	%	n	%		
$\epsilon 2/\epsilon 2$	1	0,66	0	0,00	30,055	0,0000***
$\epsilon 2/\epsilon 3$	13	8,55	2	1,36		
$\epsilon 2/\epsilon 4$	7	4,61	1	0,68		
$\epsilon 3/\epsilon 3$	113	74,34	97	65,99		
$\epsilon 3/\epsilon 4$	18	11,84	40	27,21		
$\epsilon 4/\epsilon 4$	0	0,00	7	4,76		
Spolu	152	100,00	147	100,00		

n – počet, chi² – chí-kvadrát test, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

*n – number, chi² – chi-squared test, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$*

V rámci porovnania distribúcie jednotlivých genotypov APOE génu v oboch skupinách bol potvrdený štatisticky významný rozdiel, pričom najviac zastúpeným bol genotyp $\epsilon 3/\epsilon 3$.

V kontrolnej skupine sa alela $\epsilon 4$ vyskytovala v konštitúcii $\epsilon 2/\epsilon 4$ a $\epsilon 3/\epsilon 4$ a v skupine pacientov v rámci genotypov $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ a $\epsilon 4/\epsilon 4$. Alela $\epsilon 2$ bola prítomná v skupine pacientov u 3 probandov v rámci genotypov $\epsilon 2/\epsilon 4$ a $\epsilon 2/\epsilon 3$, v prípade kontrol v rámci 3 genotypov $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 4$ a $\epsilon 2/\epsilon 3$ (tab. 2). V skupine pacientov bola taktiež zisťovaná prevalencia vybraných ochorení (ischemická choroba srdca, arteriálna hypertenzia, diabetes mellitus 2. typu, dyslipidémia) vzhľadom na genotyp APOE (tab. 3). Štatistický signifikantný rozdiel bol preukázaný v rámci arteriálnej hypertenzie ($p = 0,0000$).

Tab. 3: Prevalencia vybraných kardiovaskulárnych a metabolických ochorení v skupine pacientov
Table 3: Prevalence of selected cardiovascular and metabolic diseases in patients

Ochorenie	Genotyp										chi ²	p-hodnota
	$\epsilon 2/\epsilon 4$		$\epsilon 2/\epsilon 3$		$\epsilon 3/\epsilon 3$		$\epsilon 3/\epsilon 4$		$\epsilon 4/\epsilon 4$			
	(N = 1)	(N = 2)	(N = 97)	(N = 40)	(N = 7)	n	%	n	%			
ICHS	0	0	2	100	46	47,42	13	32,5	3	42,86	1,983	0,7388
AH	1	100	2	100	97	100	37	92,5	3	42,86	31,014	0,0000***
DM2	1	100	1	50	25	25,77	7	17,5	2	28,57	1,033	0,9047
DLP	0	0	2	100	28	28,87	18	45	1	14,29	2,318	0,6774

ICHS – ischemická choroba srdca, AH – arteriálna hypertenzia, DM2 – diabetes mellitus 2. typu, DLP – dyslipidémia, N – celkový počet pacientov s daným genotypom, n – počet (výskyt ochorenia v skupine), chi² – chí-kvadrát test, * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,01$, **** – $p < 0,001$

*ICHS – ischemic heart disease, AH – arterial hypertension, DM2 – diabetes mellitus type 2, DLP – dyslipidemia, N – the total number of patients with selected genotype, n – number (incidence of disease in the group), chi² – chi-squared test, * – $p < 0.05$, *** – $p < 0.01$, **** – $p < 0.001$*

Záver

V rámci našej štúdie bol potvrdený štatisticky významný rozdiel vo výskyte jednotlivých alel a v distribúcii genotypov APOE génu v rámci porovnávaných skupín. Jedinci, ktorí vo svojom genotype disponujú alelou $\epsilon 4$, sú z hľadiska rozvoja aterosklerózy rizikovejší. Zastúpenie alely $\epsilon 4$ bolo vyššie v skupine pacientov s obezitou a kardiovaskulárnymi a metabolickými ochoreniami oproti skupine kontrolnej, v ktorej bol naopak vyšší výskyt alely $\epsilon 2$. Z daných výsledkov je možné predpokladať, že by prítomnosť alely $\epsilon 4$ mohla vo vyššej miere predisponovať jedincov k rozvoju kardiovaskulárnych a metabolických ochorení, preto má detekcia genetických markerov potenciál využitia v klinickej praxi v rámci prevencie a terapie týchto ochorení.

Podakovanie

Genetický výskum bol podporený projektmi VEGA č. 1/0563/14 a APVV-0644-12.

Literatúra

ALLAN, CH. M., WALKER, D., SEGREST, J. P., TAYLOR, J. M., 1995: Identification and characterization of a new human gene (APOC4) in the apolipoprotein E, CI, and C-II gene locus. *Genomics*, 28(2):291-300.

CALERO, O., HORTIGÜELA, R., BULLIDO, M. J., CALERO, M., 2009: Apolipoprotein E genotyping method by real time PCR, a fast and cost-effective alternative to the TaqMan and FRET assays. *J. Neurosci. Methods*, 183(2):238-240.

CORBO, R. M., SCACCHI, R., 1999: Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann. Hum. Genet.*, 63:301-310.

ENSEMBL, 2019a: Human (GRCh38.p12). Variant: rs429358. Online. Available: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=19:4490818444909184;toggle_HG_names=open;v=rs429358;vdb=variation;vf=142298277. 20. 6. 2019.

ENSEMBL, 2019b: Human (GRCh38.p12). Variant: rs7412. Online. Available: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=19:4490832244909322;v=rs7412;vdb=variation;vf=142288785. 20. 6. 2019.

ESC, 2012: The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). *Eur. Heart J.*, 33:1635-1701.

ESH, ESC, 2013: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. *J. Hypertens.*, 31(7):1281-1357.

HAFFNER, S. M., STERN, M. P., MIETTINEN, H., ROBBINS, D., HOWARD, B. V., 1996: Apolipoprotein E polymorphism and LDL size in a biethnic population. *Arter. Throm. Vasc. Biol.*, 16:1184-1188.

KIM, J., BASAK, J. M., HOLTZMAN, D. M., 2009: The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63:287-303.

MACHAL, J. VASKU, A., HLINOMAZ, O., LINHARTOVA, P., GROCH, L. VITOVEC, J., 2012: Apolipoprotein E polymorphism is associated with both number of diseased vessels and extent of coronary artery disease in Czech patients with CAD. *Biomedical papers*, 156(2):151-158.

NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE, 2016: Who Is at Risk for Coronary Heart Disease? Online. Available: <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/cad/atrisk> 20. 6. 2019.

PANZA, F., FRISARDI, V., SERIPA, D., D'ONOFRIO, G., SANTAMATO, A., MASULLO, C., LOGROSCINO, G., SOLFRIZZI, V., PILOTTO, A., 2012: Apolipoprotein E genotypes and neuropsychiatric symptoms and syndromes in late-onset Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.*, 11:87-103.

PREACHER, K. J., 2001: Calculation for the chi-square test: An interactive calculation tool for chi-square tests of goodness of fit and independence. Computer software. Online. Available: <http://quantpsy.org>. 20. 6. 2019.

STRITTMATTER, W. J., ROSES, A. D., 1995: Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Annu. Rev. Neurosci.*, 19:53-77.

TAKEDA, M., MARTÍNEZ, R., KUDO, T. TANAKA, T., OKOCHI, M., TAGAMI, S., MORIHARA, T., HASHIMOTO, R. CACABELOS, R., 2010: Apolipoprotein E and central nervous system disorders: reviews of clinical findings. *Psychiatry Clin. Neurosci.*, 64(6):592-607.

TIRET, L., DeKNIJFF, P., MENZEL, H. J., EHNHOLM, C., NICAUD, V., HAVEKES, L. M., ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS Study. European Atherosclerosis Research Study. *Arter. Throm. Vasc. Biol.*, 14:1617-1624.

ZELJKO, H. M., ŠKARIĆ-JURIĆ, T., NARANČIĆ, N. S., TOMAS, Ž., BAREŠIĆ, A., SALIHOVIĆ, M. P., STARČEVIĆ, B., JANIĆIJEVIĆ, B., 2011: E2 allele of the Apolipoprotein E gene polymorphism is predictive for obesity status in Roma minority population of Croatia. *Lipids Health Dis.*, 10:9. Online. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3025844/pdf/1476-511X-10-9.pdf> 20. 6. 2019

ZHANG, H., WU, L. M., WU, J., 2011: Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines. *Mediators of Inflammation*, 2011:10 pars. Online. Available: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2011/949072/>. 20. 6. 2019.