بررسی جهش های ژن گیرنده لیپوپروتیین با دانسیته کم (LDL) در بیماران با کلسترول بالای خانوادگی در استان چهارمحال و بختیاری

سمیه اسدی*، دکتر کیهان قطره سامانی**، مهدی بنی طالبی***، غلامرضا مبینی†، جواد صفاری چالشتری††، مریم طاهرزاده قهفرخی††، فاطمه شایسته†††، دکتر حبیب اله ناظم•، دکتر رضا حاجی حسینی بغداد آبادی•، دکتر فرشاد روغنی••، دکتر مرتضی هاشم زاده چالشتری•••[1]

*دانشجوی کارشناس ارشد بیوشیمی - دانشگاه پیام نور تهران، **دکتری بیوشیمی- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ***کارشناس ارشدهماتولوژی- مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، †کارشناس ارشد ویروس شناسی - مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ††کارشناس ارشد بیوشیمی- مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، †††کارشناس ارشد فیزیولوژی- مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، •دانشیار گروه بیوشیمی- دانشگاه پیام نور تهران، ••استادیار قلب و عروق- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، •••استاد ژنتیک-مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.

تاریخ دریافت:۸۸/٤/۲۵ تاریخ تایید: ۸۸/۱۰/۱

چکیده:

زمینه و هدف: **هایپرکلسترولمی فامیلی (FH) بیماری غالب اتوزومال است که عمدتاً بدلیل جهش در ژن گیرنده لیپوپروتئین با دانسیته کم (LDLR) ایجاد می شود. این مطالعه با هدف بررسی تغییرات ژن LDLR بیماران مبتلا به کلسترول بالای خانوادگی در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد.**

روش بررسی: **در این مطالعه توصیفی- آزمایشگاهی، ۵۷ بیمار مشکوک به FH غربالگری و با استفاده از روش PCR-SSCP جهش در پروموتر و اگزون های ۱، ۳، ۵، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱٦، ۱۷ و ۱۸ ژن LDLR بررسی شد.**

یافته ها: **در این مطالعه دو تغییر در ژن LDLR شناسایی شد، جهش هتروزیگوت 283T>A و پلی مورفیسم 1959T>C که به ترتیب در ۱ و ۹ فرد مبتلا به FH شناسایی گردید.**

نتیجه گیری: **نتایج این تحقیق نشان داد نقش ژن LDLR در ایجاد FH در جمعیت مورد مطالعه ضعیف است و احتمالا ژن یا لوکوس های دیگری در ایجاد FH در این منطقه نقش دارند.**

واژه های کلیدی: ژن گیرنده لیپوپروتئین با دانسیته کم، هایپوکلسترولمی فامیلی، واکنش زنجیره ای پلیمراز.

مقدمه:

کلسترول بالای خانوادگی (FH= Familial Hypercholesterolemia) بیماری شایعی است و به صورت غالب اتوزومال به ارث می رسد (۱). FH با استفاده از سطوح بالای LDL حامل کلسترول (Low density lipoprotein-cholesterol=LDL-C)، گزانتومای تاندون، حلقه قرنیه و بیماری های قلبی عروقی (Coronary heart disease=CHD) قابل تشخیص است (۱). بیش از ده میلیون نفر در سراسر جهان از این بیماری رنج می برند. FH هموزیگوت با فراونی ۱ در میلیون نفر و FH هتروزیگوت در حدود ۱ در ۵۰۰ نفر در اغلب جمعیت ها گزارش شده است (۲).

تاریخچه فامیلی، سطح کلسترول کلی، سطوح LDL-C پلاسما، حضور تاندون گزانتوما، حلقه قرنیه و بیماری کرونر قلب نابهنگام (CHD) در بیمار و یا فامیل درجه اول بیمار ازشاخص های اصلی شناسایی مبتلایان FH است (۳). بیماری های قلبی عروقی عامل مرگ و میر در بسیاری از کشورهای جهان است و می توان گفت FH عامل مهمی در تشدید این بیماری می باشد (۴).

[1] ***نویسنده مسئول:*** *شهرکرد- رحمتیه -دانشکده پزشکی- مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی-تلفن: ۰۳۸۱-۳۳٤٦٦۹۲، E-mail:mchalesh@yahoo.com*

FH خطر ابتلاء به بیماری های قلبی عروقی را ۵۰ درصد در مردان و ۳۰ درصد در زنان افزایش می دهد (۳). در جوامع اروپایی فراوانی FH حدود ۲ درصد گزارش شده است. در میان بعضی از جوامع همراهی FH با اثر بنیانگذار (Founder effect) عامل افزایش فراوانی این بیماری است (۲).

در آسیا و بخصوص منطقه خاورمیانه، مطالعات اندک و پراکنده ای صورت گرفته که نشان می دهد بیماران قلبی عروقی تظاهرات بالینی کمتری در مقایسه با سایر نقاط جهان دارند (۷،۶،۵). در ایران حدود ۴۰ درصد از مرگ و میرها به دلیل بیماری های قلبی عروقی است. شیوع این بیماری (در افراد بالاتر از ۲۰ سال) ۲۴ درصد گزارش شده است (۸).

تغییر دو ژن LDLR و ApoB100 در ابتلاء به FH موثر است و در بیشتر موارد نقش ژن LDLR قوی تر عنوان شده است (۹). ژن LDLR با اندازه تقریبی ۴۵ kb بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۹ قرار گرفته و از ۱۸ ناحیه اگزونی و ۱۷ ناحیه اینترونی تشکیل شده است (۱۱،۱۰). LDLR در یک خانواده سوپرژن قرار دارد و یک پروتئین موزاییک را کد می کند (۱۲).

LDLR (۸۳۹ اسیدآمینه ای) با ساختاری گلیکوپروتئینی در سطح سلول قرار دارد. این پروتئین سطح کلسترول پلاسمایی را تنظیم می کند (۱۴،۱۳). توالی ۲۱ اسیدآمینه ای با نقش سیگنال در هنگام جابجایی LDLR به ER (Endoplasmic reticulum)، شکسته می شود. این نتایج نقش سازماندهی نواحی اگزونی در ارتباط با پروتئین LDLR را تایید می نماید (۱۵).

بیش از ۷۰۰ جهش مختلف در ژن LDLR مانند missense، Splice site و حذف های بزرگ در ژن LDL-R شناسایی شده است. انواع جهش در این ژن با توجه به نوع فنوتیپ FH طبقه بندی می شود. جهش های مرتبط با سنتز LDLR، انتقال LDLR به سطح سلول، تجمع LDLR در حفره هایی با پوشش کلاترینی، داخل شدن گیرنده، توانایی LDLR برای اتصال به لیگاند و ورود به چرخه مجدد در این طبقه بندی قرار می گیرد (۱۷،۱۶).

با یک درصد کاهش کلسترول کلی سرم، خطر بیماری های قلبی عروقی ۲ درصد کاهش می یابد (۸). بنابراین شناسایی به موقع افراد مبتلا به FH در کاهش مبتلایان به بیماری های قلبی عروقی ضروری خواهد بود. با توجه به اینکه تغییرات در ژن LDLR مهمترین علت بروز FH در افراد است. در مطالعات قبلی روش هایی مانند RFLP، DGGE، SSCP، PCR-SSCP و توالی یابی مستقیم DNA (DNA sequencing) به منظور شناسایی تغییرات در ژن LDLR استفاده شده است. با روش PCR-SSCP توالی های خاصی از ژن LDLR تکثیر شده و سپس تغییرات مشخص می شود. با روش توالی یابی مستقیم می توان نتایج نهایی را تایید کرد (۵). در مطالعه قبلی توسط شایسته و همکاران، اگزون های ۲، ۴، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۲، ۱۴ بررسی گردید (نتایج در دست چاپ است). در مطالعه حاضر ما وجود تغییرات سایر اگزون های ژن LDLR در ارتباط با بیماری FH را با استفاده از آنالیز PCR-SSCP و توالی یابی مستقیم DNA بررسی نموده ایم.

روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی- آزمایشگاهی تعداد ۵۷ بیمار مشکوک به FH شامل ۲۵ مرد و ۳۲ زن، با میانگین سنی ۱۲/۸۶±۵۳/۲۶ از بین بیماران مراجعه کننده به بخش قلب و عروق بیمارستان هاجر شهرکرد در سال ۱۳۸۵ بر اساس مقدار کلسترول کلی بیش از ۲۴۰mg/dl و LDL بیش از ۱۹۰ mg/dl با روش نمونه گیری آسان وارد مطالعه شدند. افراد مبتلا به بیماری کلیوی، کبدی و دیابت و هایپرتیروئیدیسم بدلیل تداخل در نتایج از مطالعه حذف شدند. پس از اخذ رضایت نامه از بیماران اطلاعات دموگرافیکی و بالینی آنها از طریق پرسشنامه جمع آوری گردید. سپس ۵ میلی لیتر خون جهت انجام تست های بیوشیمی گرفته و به آزمایشگاه تشخیص طبی

جهت سنجش مقادیر LDL-C، HDL-C، تری گلیسرید، گلوکز خون، کلسترول تام فرستاده شد. همچنین از هر بیمار ۵ میلی لیتر خون جهت انجام آزمایشات مولکولی گرفته شد. این نمونه ها در لوله هایی حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ۰/۵ مولار ریخته شد و به مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انتقال یافت. در مرکز تحقیقات، DNA با استفاده از روش استاندارد فنل- کلروفرم استخراج شده (۱۸) و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر (Unico 2100 USA) مقدار و کیفیت DNA استخراج شده مشخص گردید.

توالی های آغازگر (Primer) شامل توالی های جلوبرنده F (Forward) و توالی های معکوس R (Reverse) برای پروموتر و اگزون های شماره ۱، ۳، ۵، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۶، ۱۷ و ۱۸ ژن LDLR (NM-000527.2) از پایگاه اینترنتی UCSC و با استفاده از نرم افزار Primer 3 طراحی شد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده برای واکنش PCR اگزون های ژن LDLR

شماره اگزون	توالی جلو برنده	توالی معکوس	طول قطعه (bp)	دمای اتصال
Promoter, Exon 1	5´-AATCACCCCACTGCAAACTC-3´	5´-CGCCTGGAGCAAGCCTTA-3´	۲۴۵	۵۵ ° C
Exon 3	5´-CTCCCAAAGTGCTGGGATTA-3´	5´-AAGGCAGGGCCACACTTAC-3´	۲۳۶	۶۲ ° C
Exon 5	5´-AAAGGCCCTGCTTCTTTTTC-3	5´-AGCAGCAAGGCACAGAGAAT-3´	۲۴۰	۶۰ ° C
Exon 11	5´-CCTCCAGCCTCACAGCTATT-3´	5´-GTCTGTCCTCCAGCCTGTG-3´	۲۱۲	۶۲ ° C
Exon 13	5´-TCCCAGTGTTTAACGGGATT-3´	5´-TCCACAAGGAGGTTTCAAGG-3´	۲۳۷	۶۱ ° C
Exon 15	5´-ACGTGGCACTCAGAAGACG-3´	5´-TAGGGAGGGCCCAGTCTTTA-3´	۲۲۸	۵۲ ° C
Exon 16	5´-ATTTCTTGGTGGCCTTCCTT-3´	5´-TTCCCTGTCCAGGAGAAAAA-3´	۲۳۸	۵۸ ° C
Exon 17	5´-GGAGCTGGGTCTCTGGTCTC-3´	5´-CATGGGCTCTGGCTTTCTA-3´	۲۵۰	۵۷ ° C
Exon 18	5´-TTTCCTGAATGCTGGACTGA-3´	5´-CGAGGTCTCAGGAAGGGTTC-3´	۱۳۵	۵۷ ° C

مواد و مقادیر مورد نیاز برای هر نمونه واکنش PCR (تهیه شده از شرکت سیناژن) شامل MgCl2 (50mM): ۲/۵µl، PCR بافر (10X): ۲/۵µl، dNTP(10mM,pH=7.5): ۰/۵µl، F Primer (10PM): ۰/۵ µl، R primer (10PM): ۰/۵ µl، Taq DNA polymerase (5unit/µl): ۰/۱ µl، مقدار DNA (حدود 25ng) که با ddH_2O به حجم ۲۵ µl رسانده شد. انجام واکنش PCR در دستگاه چرخه حرارتی زمان (ASTEC PC818-Japan) انجام شد. شرایط دمایی بهینه شامل ۳۶ سیکل مشتمل بر دمای واسرشت شدن ۹۶ °C به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال (مطابق جدول به تفکیک اگزون ها) به مدت ۴۰ ثانیه و دمای ساخت ۷۲ °C به مدت ۴۰ ثانیه بود.

محصول PCR هر اگزون بر روی ژل پلی اکریل امید ۸ درصد (Merck-Germany) تحت جریان ۵۰ میلی آمپر به مدت یک ساعت الکتروفورز شده و پس از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام تکنیک SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) محصولات PCR به همراه یک بافر بارگذاری حاوی

جدول شماره ۲: شرایط انجام SSCP برای اگزون های ژن LDLR

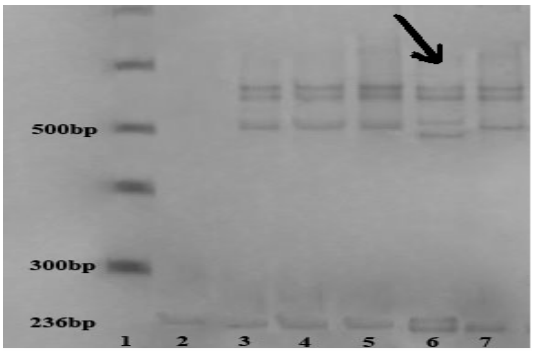
اگزون / متغیر	Pro-E1	E3	E5	E11	E13	E15	E16	E17	E18
درصد ژل (39:1)	٪ ۱۱/۲	٪ ۸	٪ ۸	٪ ۸	٪ ۱۱/۲	٪ ۱۳/٦	٪ ۱۲	٪ ۸	٪۱۳/٦
ولتاژ (V)	۲۵۰	۱۳۰	۱۵۰	۲۸۰	۱۵۰	۲۸۰	۲۸۰	۲۰۰	۲۰۰
زمان (h)	۱۰	۸	۱۲	۷	۱٤	۸	٦	۹	۵
دما (^{o}C)	۸	۲۳	۲۳	۲۳	۸	۲۳	۸	۲۳	۲۳

فورمایـد در دمـای ۱۰۰ ^{o}C-۹۶ بـه مـدت ۱۵-۱۰ دقیقـه حرارت داده و سپس بـه مـدت ۱۰ دقیقـه در دمـای 0°C سرد شد. سرانجام محـصولات بـر روی ژل اکریـل امیـد منتقل شده و الکتروفورز انجام شد (جدول شماره ۲). بـا توجه به شرایط SSCP در جدول شماره ۲ شـرایط بهینـه (بهینه سازی تکنیک SSCP برای هر قطعه از ژن با توجه به مقالات مرتبط و همچنین به صورت تجربی بـه دسـت می آید) جمع بندی شده است.

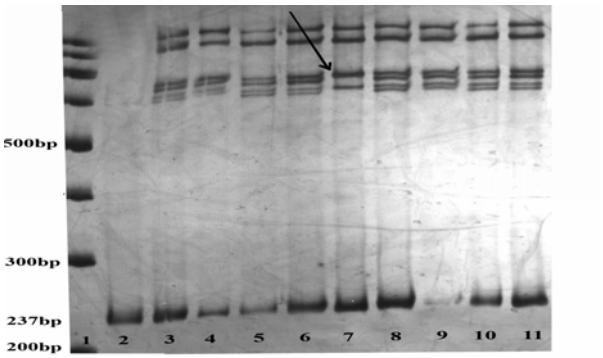
پس از انجام الکتروفـورز ژل را بـا نیتـرات نقـره رنگ آمیزی کردیم و بـا توجـه بـه اخـتلاف در الگـوی باندهای پدید آمده بـر روی ژل ، تغییـرات مزبـور مـورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سپس به منظور تایید نهایـی نتـایج، روش تـوالی یـابی مـستقیم DNA بـر روی مـواد مشکوک انجام شد.

یافته ها:

با انجام شـرایط SSCP بـرای ۵۷ نمونـه از محصولات PCR اگزون های ذکر شده، در مجموع تعداد ۱۰ تغییر ژنی مشاهده شد. این موارد شامل ۱ مورد جهش ژنی هتروزیگوت 283T>A در اگزون ۳ و ۹ مورد پلی مورفیسم 1959T>C در اگزون ۱۳ بودند (تصویر شماره ۱).



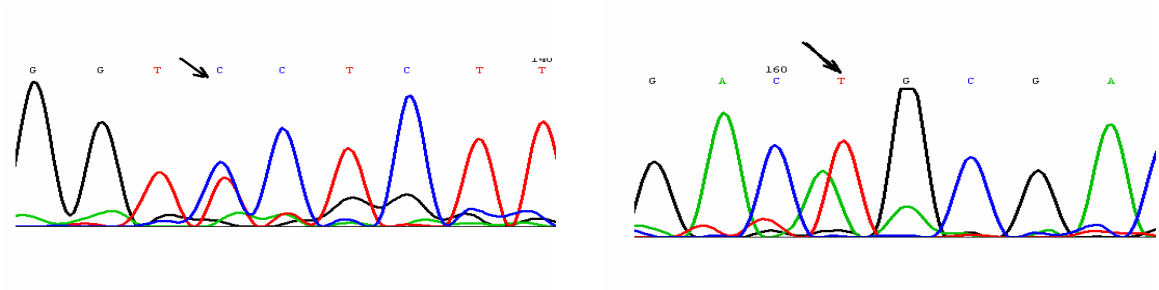
الف)



ب)

تصویر شماره ۱: ژل پلی اکریل آمید PCR-SSCP مربوط به ژن LDLR.

الف) اگزون شماره ۳ : شماره ۱ مارکر / شماره ۲ کنترل شامل محصول PCR بـدون اعمـال شـرایط SSCP /شـماره ۳، ٤، ۵، ۷ بدون تغییر/ شماره ٦ جهش 283T>A (باند اضافی در نتـایج SSCP مـشاهده مـی گـردد). ب) اگـزون شـماره ۱۳ : شـماره ۱ مارکر/شماره ۲ کنترل شامل محصولات PCR بدون اعمال شرایط SSCP، شماره۳، ٤، ٥، ٦، ۸، ۹، ۱۰و ۱۱ بدون تغییر/ شماره ۷ پلی مورفیسم 1959T>C (تغییر در باندهای SSCP مشاهده می گردد).



الف) ب)

تصویر شماره ۲: نتایج آنالیز با استفاده از تکنیک توالی یابی DNA.

الف) تغییر 283T>A در اگزون شماره ۳ ب) تغییر 1959T>C در اگزون شماره ۱۳

پس از انجام آنالیز نتایج PCR-SSCP موارد مشکوک شناسایی شده و نتایج بدست آمده با استفاده از تکنیک توالی یابی DNA تایید شد (تصویر شماره ۲). در اگزون های ۱، ۵، ۱۱، ۱۵، ۱۶، ۱۸، ۱۷ و پروموتر هیچگونه تغییر ژنی بیماریزا مشاهده نگردید.

بحث:

در این مطالعه نقش جهش های ژن LDLR مرتبط با بیماران مشکوک به FH را با استفاده از روش PCR-SSCP در استان چهارمحال و بختیاری بررسی گردید. در مجموع تعداد ۱۰ تغییر ژنی شامل یک مورد جهش هتروزیگوت 283T >A در اگزون ۳ و ۹ مورد پلی مورفیسم 1959T>C در اگزون۱۳ مشاهده شد. جهش 283T> A همراه با تغییر اسید آمینه ی سیستئین به آرژنین است. این جهش با احتمال بیماری زایی در سال های ۲۰۰۱ و ۲۰۰۵ گزارش شده است (۱۹،۲۰). همچنین پلی مورفیسم 1959T>C در موارد متعددی مشاهده شده است (۲۱). در این مطالعه جهش ژنی LDLR در اشکال هوموزیگوت مشاهده نشد.

مطالعات وسیعی در بسیاری از مناطق از جمله اروپا، آمریکا، شمال آفریقا و نواحی از آسیا صورت گرفته است. در این جوامع نقش عوامل ارثی موثر، فاکتورهای موثر محیطی و درصد شیوع بیماری های قلبی عروقی بررسی شده است. نتایج، نقص در عملکرد و ساختمان ژن LDLR با ایجاد فنوتیپ FH را تایید می کند (۲۲). بر روی نواحی غرب و جنوب آسیا، جمعیت های خاصی از ساکنین ترکیه، عربستان، سوریه، قبرس، کویت و ایران مطالعاتی صورت گرفته، اما نتایجی پراکنده و اطلاعات بسیار محدودی بدست آمده است. به عنوان مثال در منطقه کوچکی از ایران یک مطالعه محدود (جهش های اگزون ۴ ژن LDLR) انجام شده است (۲۳).

مطالعات انجام شده در سایر نقاط جهان ارتباط بین بیماری های قلبی عروقی با بیماران مبتلا به FH و تغییر در ژن LDLR را تایید می کند. تکنیک ها و روش های متعددی بر روی ژن های موثر در هومئوستازی کلسترول (LDL-R، APOB، PCSK9) استفاده شده است. با استفاده از روش های مفید، FH با سرعت بالایی تشخیص داده می‌شود. تکنیک هایی مانند (DGGE) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (۲۴-۲۷)، Cleavage Chemical (۲۸) و Heteroduplex Analysis (۲۹،۳۰) بر روی ژن LDLR استفاده شده است. یکی از روش های سریع و آسان PCR-SSCP است. در این روش DNA دو رشته ای از طریق PCR تکثیر شده و سپس قطعات تک رشته ای در پلی اکریلامید غیر دناتوره کننده جداسازی می شود. در این حالت تغییرات کونفورماسیونی از طریق تغییر در توالی باز تعیین می شود (۳۱،۳۲).

وجود یک جهش غالب در نواحی خاصی از اروپا مانند ساکنین ایسلند (فراوانی ۶۰ درصد) و یا شناسایی یک تغییر جدید در جمعیت هایی مانند ژاپن نشان دهنده الگوی متغیری از جهش در این ژن است (۳۳،۳۴). عواملی

مانند اثر بنیانگذار بر روی ژن LDLR (۳۵)، نقش سایر ژن های درگیر در هومئوستازی کلسترول (۳۶)، موقعیت های جغرافیایی خاص، حضور فاکتورهای محیطی (۳۵)، ساختار ویژه ژن LDLR بدلیل وجود توالی های Alu (۳۷)، مطالعه نواحی فرادست پروموتر در ژن LDLR (۳۵)، مصرف دارو در ضمن مطالعات به عنوان عامل ایجاد خطا در نتایج و عدم برنامه ریزی موثر جهت شناسایی زود هنگام مبتلایان به FH، در پدید آمدن الگوی متغییری از جهش در ژن LDLR موثر است. این عوامل قابل تفکیک نبوده و ممکن است در برخی از مناطق بیش از یک فاکتور موثر باشد.

ما در این مطالعه بخش کوچکی از کشور پهناور ایران با قومیت های متنوع را بررسی کردیم. نتایج مطالعه حاضر ارتباط بین جهش در ژن LDLR و ایجاد FH در بیماران را تایید نمی‌کند و عمده تغییرات ژنی مشاهده شده از نوع پلی مورفیسم هستند. به طوری که تنها یک مورد جهش هتروزیگوت مشاهده گردید. در مطالعات آینده با توجه به تایید نتایج حاصل از روش PCR-SSCP توسط توالی یابی مستقیم DNA می توان از روش PCR-SSCP به عنوان روشی مطمئن با حساسیت بالا در شناسایی تغییرات ژن LDLR استفاده کرد. مطالعات بسیار کم در آسیا و از جمله ایران در ارتباط با نقش ژن LDLR و سایر ژن های درگیر، همچنین وجود توالی های Alu در ژن LDLR اظهار نظر قطعی را ممکن نمی سازد و لازم است بر روی قومیت های مختلف ایرانی نیز بررسی هایی صورت گیرد است. قابل ذکر است، مطالعه حاضر از نظر نوع و تعداد اگزون در ژن LDLR تکمیل کننده مطالعه قبلی می باشد که توسط شایسته و همکاران انجام شده است.

نتیجه گیری:

نتایج این تحقیق نشان داد نقش ژن LDLR در ایجاد FH در جمعیت مورد مطالعه ضعیف است و احتمالا ژن یا لوکوس های دیگری در ایجاد FH در این منطقه نقش دارند.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام گرفت که بدین وسیله قدردانی می گردد.

منابع:

1. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science. 1986 Apr; 232(4746): 34-47.

2. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. Hum Mutat. 1992; 1(6): 445-66.

3. Khachadurian AK. The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. Am J Med. 1964 Sep; 37: 402-7.

4. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. Hum Mutat. 1992; 1(6): 445-66.

5. Khoo KL, van Acker P, Defesche JC, Tan H, van de Kerkhof L, Heijnen-van Eijk SJ, et al. Low-density lipoprotein receptor gene mutations in a Southeast Asian population with familial hypercholesterolemia. Clin Genet. 2000 Aug; 58(2): 98-105.

6. Sun XM, Patel DD, Webb JC, Knight BL, Fan LM, Cai HJ, et al. Familial hypercholesterolemia in China. Identification of mutations in the LDL-receptor gene that result in a receptor-negative phenotype. Arterioscler Thromb. 1994 Jan; 14(1): 85-94.

7.Pimstone SN, Sun XM, du Souich C, Frohlich JJ, Hayden MR, Soutar AK. Phenotypic variation in heterozygous familial hypercholesterolemia: a comparison of Chinese patients with the same or similar mutations in the LDL receptor gene in China or Canada. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998 Feb; 18(2): 309-15.

8.Iranian statistics center. [Internal]. Calendar for national statistics. [Cited 2010 Jan-20] Available from: http://www.sci.org.ir/portal/faces/public/sci

9.Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. Am J Epidemiol. 2004 Sep; 160(5): 407-20.

10. Lindgren V, Luskey KL, Russell DW, Francke U. Human genes involved in cholesterol metabolism: chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase with cDNA probes. Proc Natl Acad Sci USA. 1985 Dec; 82(24): 8567-71.

11. Lombardi MP, Redeker EJ, Defesche JC, Kamerling SW, Trip MD, Mannens MM, et al. Molecular genetic testing for familial hypercholesterolemia: spectrum of LDL receptor gene mutations in The Netherlands. Clin Genet. 2000 Feb; 57(2): 116-24.

12. Sudhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. Science. 1985 May; 228(4701): 815-22.

13. Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. Circulation. 2004 Sep; 110(13): 1868-73.

14. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science. 1986 Apr; 232(4746): 34-47.

15. Gent J, Braakman I. Low-density lipoprotein receptor structure and folding. Cell Mol Life Sci. 2004 Oct; 61(19-20): 2461-70.

16. Wilson DJ, Gahan M, Haddad L, Heath K, Whittall RA, Williams RR, et al. A World Wide Web site for low-density lipoprotein receptor gene mutations in familial hypercholesterolemia: sequence-based, tabular, and direct submission data handling. Am J Cardiol. 1998 Jun; 81(12): 1509-11.

17. Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. Ann Rev Genet. 1990; 24: 133-70.

18. Dale JW, Schantz MV. Purification and separation of nucleic acid in: From Genes to genomes. University of Surrey. UK: John Wiley; 2002. p: 31-3.

19. Bochmann H, Geisel J, Herrmann W, Purcz T, Reuter W, Julius U, et al. Eight novel LDL receptor gene mutations among patients under LDL apheresis in Dresden and Leipzig. Hum Mutat. 2001; 17(1): 76-7.

20. Fouchier SW, Kastelein JJ, Defesche JC. Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands. Hum Mutat. 2005 Dec; 26(6): 550-6.

21. Mozas P, Castillo S, Tejedor D, Reyes G, Alonso R, Franco M, et al. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain: identification of 39 novel and 77 recurrent mutations in LDLR. Hum Mutat. 2004 Aug; 24(2): 187.

22. Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. J Clin Invest. 1973 Jul; 52(7): 1544-68.

23. Fard Esfahani P, Zeinali C, Rouhi Dehboneh S, Taghikhikhani M, Khatami S. [A novel mutation in exon 4 of the Low dencity lipoprotein receptor gene in an Iranian familial hypercholesterolemia patient, Iranian Biomedical J. 2005 Jul; 9(3): 139-42.]Persian

24. Fischer SG, Lerman LS. Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences. Proc Natl Acad Sci USA. 1980 Aug; 77(8): 4420-4.

25. Myers RM, Maniatis T, Lerman LS. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. Methods Enzymol. 1987; 155: 501-27.

26. Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. Proc Natl Acad Sci USA. 1989 Jan; 86(1): 232-6.

27. Sheffield VC, Beck JS, Nichols B, Cousineau A, Lidral AC, Stone EM. Detection of multilevel polymorphisms within gene sequences by GC-clamped denaturing gradient gel electrophoresis. Am J Hum Genet. 1992 Mar; 50(3): 567-75.

28. Cotton RG, Rodrigues NR, Campbell RD. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations Proc Natl Acad Sci USA. 1988 Jun; 85(12): 4397-401.

29. Keen J, Lester D, Inglehearn C, Curtis A, Bhattacharya S. Rapid detection of single base mismatches as heteroduplexes on Hydrolink gels. Trends Genet. 1991 Jan; 7(1): 5.

30. White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien SJ, Dean M. Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. Genomics. 1992 Feb; 12(2): 301-6.

31. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA. 1989 Apr; 86(8): 2766-70.

32. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics. 1989 Nov; 5(4): 874-9.

33. Gudnason V, Sigurdsson G, Nissen H, Humphries SE. Common founder mutation in the LDL receptor gene causing familial hypercholesterolemia in the Icelandic population. Hum Mutat. 1997; 10(1): 36-44.

34. Yu W, Nohara A, Higashikata T, Lu H, Inazu A, Mabuchi H. Molecular genetic analysis of familial hypercholesterolemia: spectrum and regional difference of LDL receptor gene mutations in Japanese population. Atherosclerosis. 2002 Dec; 165(2): 335-42.

35. Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. Am J Epidemiol. 2004 Sep; 160(5): 407-20.

36. Tosi I, Toledo-Leiva P, Neuwirth C, Naoumova RP, Soutar AK. Genetic defects causing familial hypercholesterolaemia: identification of deletions and duplications in the LDL-receptor gene and summary of all mutations found in patients attending the Hammersmith Hospital Lipid Clinic. Atherosclerosis. 2007 Sep; 94(1): 102-11.

37. Amsellem S, Briffaut D, Carrie A, Rabes JP, Girardet JP, Fredenrich A, et al. Intronic mutations outside of Alu-repeat-rich domains of the LDL receptor gene are a cause of familial hypercholesterolemia. Hum Genet. 2002 Dec; 111(6): 501-10.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences

Received: 16/July/2009 *Accepted: 22/Dec/2009*

Study of LDL receptor gene mutations in patients with familial hypercholesterolemia in Chaharmahal va Bakhtiari province.

Asadi S (MSc)*, Gatreh Samani K (PhD)**, Banitalebi M (MSc)***, Mobini GR (MSc)***, Saffari Chaleshtori J (MSc)***, Taherzadeh Ghahfarrokhi M (MSc)***, Shayesteh F (MSc)***, Nazem H (PhD)†, Hajihoseini Baghdadabadi R (PhD) †, Roghani F (MD)††, Hashemzadeh Chaleshtori M (PhD)†††[1]

**MSc student, Biochemistry Dept., Payame noor University. Tehran, Iran, **Biochimist, Medical Plants Research Center, Shahrekord Univ. of Med.Sci. Shahrekord, Iran, ***Cellular and Molecular Research Center Shahrekord Univ. of Med.Sci. Shahrekord Iran, †Associate Professor, Biochemistry Dept., Payame noor University. Tehran, Iran, ††Assistant Professor, Cardiology Dept., Isfahan Univ. of Med. Sci, Isfahan, Iran, †††Professor of Human Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci.Shahrekord, Iran.*

Background and aim: Familial hypercholesterolemia is an autosomal dominant inherited disorder, characterized by increased level of low-density lipoprotein cholesterol and lipid accumulation in tendons and arteries. It can cause premature atherosclerosis and increased risk of coronary heart disease (CHD). Familial hypercholesterolemia is caused mainly by mutations in low-density lipoprotein receptor (LDLR) gene. The aim of this study was to analyze the LDLR gene mutations in a group of patients from Chaharmahal va Bakhtiari province.

Methods: in this descriptive–lab based study, 57 suspected FH patients were screened for mutations in promoter and exons 1,3,5,11,13,15,16,17 and 18 of LDLR gene using PCR-SSCP strategy.

Results: Tow different LDLR gene variations, including heterozygote mutation 283T>A and polymorphism 1959T>C, were identified in 1 and 9 FH Families studied, respectively.

Conclusion: We conclude that LDLR gene mutation may not be the major cause of FH in the population studied and the cause of FH in chaharmahal va Bakhtiari province remains to be detected in other loci or genes.

Keywords: **Familial hypercholesterolemia, LDLR gene, PCR, SSCP.**

[1]***Corresponding author:***
Cellular and Molecular Research Center
Medical Faculaty.
Rahmatieh, Shahrekord, Iran.
Tel: 0381-3346692