

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Anett Tähiste

**Perekondliku hüperkolesteroleemiaga seotud reguleerivate
variantide identifitseerimine Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu
geenidonorite täisgenoomi järjestustest**

Magistritöö (40 EAP)

Biomeditsiin

Juhendaja Maris Alver, M.Sc.
Kaasjuhendaja Tõnu Esko, Ph.D.

TARTU 2016

Perekondliku hüperkolesteroleemiaga seotud regulatoorsete variantide identifitseerimine Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidonorite täisgenoomi järjestustest

Lühikokkuvõte: Perekondlik hüperkolesteroleemia on lipoproteiinide metabolismi häire, millele on iseloomulik kõrge LDL-kolesterooli tase ja varase südame isheemiatõve esinemine. Tegemist on monogeense haigusega, mis on peamiselt põhjustatud mutatsioonidest *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* ja *LDLRAP1* geenides. Ligi 20%-l kliinilise diagnoosiga patsientidel ei esine aga mutatsiooni üheski eelmainitud geenis, mis viitab nii võimaliku polügeense efekti kui ka tuvastamata haiguspõhjuslike geenivariantide esinemisele. Käesoleva töö eesmärgiks oli leida perekondliku hüperkolesteroleemiaga seotud regulatoorsed variandid Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidonorite täisgenoomi järjestustest haigusega assotsieeruvate geenide üleselt. Selleks viidi läbi LDL-kolesterooli ja ApoB tasemetel põhinevad assotsiatsioonanalüüsid, kasutades lineaarse regressiooni mudeleid. Töö tulemusena identifitseeriti 7 potentsiaalset regulatoorset varianti, mille roll perekondliku hüperkolesteroleemia kontekstis viitab võimalikele seni tuvastamata molekulaarsetele mehhanismidele.

Märksõnad: perekondlik hüperkolesteroleemia, LDL-kolesterool, LDL-retseptor, regulatoorsed variandid, ülegenoomne sekveneerimine

CERCS: B110 bioinformaatika, meditsiiniinformaatika, biomatematika, biomeetrika

Identifying familial hypercholesterolemia associated regulatory variants based on whole genome sequencing data of the Estonian Genome Center of the University of Tartu

Abstract: Familial hypercholesterolemia (FH) is a disorder of lipid metabolism characterized by high LDL-cholesterol level and premature coronary artery disease. It is a monogenic disease, which is primarily caused by mutations in the *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* and *LDLRAP1* genes. Nevertheless, approximately 20% of clinically definite FH patients will not be found to have a mutation in any of these genes. This refers to the occurrence of a potential polygenic effect as well as unidentified causal gene variants. The aim of the study was to identify regulatory variants in FH associated gene regions that might play a role in FH development based on whole genome sequencing data of the Estonian Genome Center of the University of Tartu. Association analyses were conducted based on LDL-cholesterol and ApoB levels using linear regression models. As a result of the study 7 potential regulatory variants were discovered. The association between the ascertained gene variants and FH refers to potential unidentified molecular mechanisms underlying the disease.

Keywords: familial hypercholesterolemia, LDL-cholesterol, LDL-receptor, regulatory variants, whole-genome sequencing

CERCS: B110 bioinformatics, medical informatics, biomathematics, biometrics

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 PEREKONDLIKU HÜPERKOLESTEROLEEMIA ÜLDISED ASPEKTID	7
1.2 PEREKONDLIKU HÜPERKOLESTEROLEEMIA KLIINILISED ASPEKTID	9
1.2.1 Perekondliku hüperkolesteroleemia sümptomid	9
1.2.2 Perekondliku hüperkolesteroleemia diagnoosimine	10
1.2.2.1 Kliinilise diagnoosimise kriteeriumid	10
1.2.2.2 Kaskaadskriining	11
1.2.3 Perekondliku hüperkolesteroleemia ravivõimalused.....	11
1.2.3.1 Statiinid.....	11
1.2.3.2 LDL-aferees	13
1.2.3.3 Uudsed ravisuunad	13
1.3 PEREKONDLIKU HÜPERKOLESTEROLEEMIA MOLEKULAARSED JA GENEETILISED ASPEKTID.....	15
1.3.1 Kolesterooli transport ja metabolism.....	15
1.3.2 Perekondliku hüperkolesteroleemia geneetiline etioloogia.....	17
1.3.2.1 <i>LDLR</i>	17
1.3.2.2 <i>APOB</i>	19
1.3.2.3 <i>PCSK9</i>	20
1.3.2.4 <i>LDLRAP1</i>	21
1.3.3 Perekondliku hüperkolesteroleemia geneetilise etioloogia eripära: mittetäielik penetrantsus, polügeensus, uued geenivariandid.....	22
2. EKSPERIMENTAALOSA	24
2.1 TÖÖ EESMÄRK.....	24
2.2 MATERJALID JA METOODIKA	24
2.2.1 Valim	24
2.2.2 Fenotüübiandmestik.....	25
2.2.3 Genotüübiandmestik.....	25
2.2.4 Geenide valik ja statistiline analüüs	25
2.2.5 Tulemuste visualiseerimine ja interpreteerimine.....	26

2.3 TULEMUSED	28
2.3.1 Geenide valik	28
2.3.2 Kovariaatide efekti kirjeldamine ja normaaljaotuse hindamine	28
2.3.3 Statistiline analüüs	29
2.4 TULEMUSTE ANALÜÜS JA ARUTELU	32
KOKKUVÕTE	40
SUMMARY	41
TÄNUSÕNAD	42
KIRJANDUSE LOETELU	43
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	52
LISA 1	53
LISA 2	54
LISA 3	56
LIHTLITSENTS	58

KASUTATUD LÜHENDID

ApoB-100	apolipoproteiin B-100 (<i>apolipoprotein B-100</i>)
APOB	apolipoproteiin B (<i>apolipoprotein B</i>)
ARH	autosoom-retsessiivne hüperkolesteroleemia (<i>autosomal recessive hypercholesterolemia</i>)
CAD	südame isheemiatõbi (<i>coronary artery disease</i>)
EGF	epidermaalne kasvufaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
ER	endoplasmaatiline retiikulum (<i>endoplasmic reticulum</i>)
FDA	Ameerika Toidu- ja Ravimiamet (<i>Food and Drug Administration</i>)
FDB	ApoB-100 perekondlik defekt (<i>familial defective ApoB-100</i>)
FH	perekondlik hüperkolesteroleemia (<i>familial hypercholesterolemia</i>)
GWAS	ülegenoomne assotsiatsiooniuuring (<i>genome-wide association study</i>)
HDL	kõrge tihedusega lipoproteiin (<i>high-density lipoprotein</i>)
HMG-CoA	5-hüdoksü-3-metüülglutarüül-koensüüm A (<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A</i>)
IDL	vahepealse tihedusega lipoproteiin (<i>intermediate-density lipoprotein</i>)
Kb	kilobaas (<i>kilobase</i>)
LDL	madala tihedusega lipoproteiin (<i>low-density lipoprotein</i>)
LDLR	madala tihedusega lipoproteiini retseptor (<i>low-density lipoprotein receptor</i>)
LDLRAP1	madala tihedusega lipoproteiini retseptori adaptorvalk 1 (<i>low density lipoprotein receptor adaptor protein 1</i>)
Lp(a)	lipoproteiin(a) [<i>lipoprotein(a)</i>]
MTP	mikrosomaalne triglütseriidide ülekandevalk (<i>microsomal triglyceride transfer protein</i>)
PCSK9	prooteiin-konvertaas subtilisiin/keksiin tüüp 9 (<i>proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>)
QQ	kvantiil-kvantiil (<i>quantile-quantile</i>)
SNV	ühenukleotiidne variatsioon (<i>single nucleotide variation</i>)
VLDL	väga madala tihedusega lipoproteiin (<i>very-low-density lipoprotein</i>)
WGS	kogu genoomi sekveneerimine (<i>whole-genome sequencing</i>)

SISSEJUHATUS

Perekondlik hüperkolesteroleemia on üks sagedamini esinevaid geneetilisi häireid maailmas. Tegemist on lipoproteiinide metabolismi häirega, millele on iseloomulik LDL-kolesterooli hulga suurenemine veres ja lipiidikogumike ladestumine perifeersetes kudedes. Kõrge LDL-kolesterooli tase põhjustab veresoontes aterosklerootilisi muutusi, mis võib kaasa tuua varase kardiovaskulaarhaiguse tekke. Perekondlik hüperkolesteroleemia on peamiselt põhjustatud mutatsioonidest *LDLR* geenis, kuid haigus võib olla tingitud ka *APOB*, *PCSK9* või *LDLRAP1* geeni muutustest. Vaatamata perekondliku hüperkolesteroleemia patogeneesi detailsele mõistmisele, on nimetatud haigus maailmas märkimisväärselt aladiagnostitud ja -ravitud. Ligi viiendik juhte jääb tuvastamata, sest neil ei esine mutatsiooni üheski peamises perekondliku hüperkolesteroleemia tekkega assotsieerivas geenis, viidates nii seni identifitseerimata potentsiaalsete haigusmehhanismiga seotud kandidaatgeenide olemasolule kui ka polügeensele etioloogiale. Kuigi perekondliku hüperkolesteroleemia kui monogeense haiguse teke on üldjuhul seotud geeni funktsiooni muutvate variantidega eelnevalt nimetatud geenides, ei saa haiguse võimaliku tekkepõhjusest välistada ka regulatoorses alas esinevate geneetiliste variantide efektist tulenevaid muutusi.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli leida potentsiaalsed perekondliku hüperkolesteroleemia kujunemisega assotsieeruvad regulatoorsed variandid Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidoonorite täisgenoomi järjestustest.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 PEREKONDLIKU HÜPERKOLESTEROLEEMIA ÜLDISED ASPEKTID

Perekondliku hüperkolesteroleemia (*familial hypercholesterolemia* – FH) näol on tegemist ühe levinuima monogeense päriliku haigusega maailmas, mida iseloomustab kõrgeenenud madala tihedusega lipoproteiinide (*low-density lipoprotein* – LDL) hulk plasmas. Suurenenud LDL-kolesterooli tase vereringes põhjustab selle ladestumist suurte ja väikeste arterite seintele, mille tagajärjel võivad aterosklerootilised muutused veresoones kaasa tuua varase kardiovaskulaarhaiguse, peamiselt südame isheemiatõve (*coronary artery disease* – CAD) tekke (Gidding jt., 2015).

FH, mille peamiseks tekkepõhjuseks on LDL-retseptori düsfunktsioon, võib lihtsustatult klassifitseerida kaheks fenotüübiliselt erinevaks haigusvormiks vastavalt geenidoosi efektile ja metaboolse defekti raskusastmele. Haigus esineb sagedamini heterosügootse vormina põhjustatuna ühest geenimutatsioonist ning harvemini ja raskema kuluga homosügootses olekus tingituna ühe geeni bialleelsest mutatsioonist (tõeline homosügootsus) või eri mutatsioonidest ühes või kahes erinevas geenis (liitheterosügootsus) (Tada jt., 2011; Cuchel jt., 2014). Autosoom-dominantselt päranduv FH on põhiliselt tingitud mutatsioonidest kolmes erinevas geenis: madala tihedusega lipoproteiini retseptori (*low-density lipoprotein receptor* – *LDLR*), apolipoproteiin B (*apolipoprotein B* – *APOB*) või proproteiin-konvertaas subtilisiin/keksiin tüüp 9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9* – *PCSK9*) geenis (Talmud jt., 2014; Brautbar jt., 2015). Lisaks on kirjeldatud ka leebema kliinilise pildiga autosoom-retsessiivselt päranduvat haigusvormi, mis avaldub kahe muteerunud madala tihedusega lipoproteiini retseptori adaptorvalgu 1 (*low density lipoprotein receptor adaptor protein 1* – *LDLRAP1*) geeni koopiaga homo- või liitheterosügootses olekus (Brautbar jt., 2015). Ligikaudu 90% juhtudest on FH põhjuseks mutatsioonid *LDLR* geenis, umbes 5% juhte on *APOB* ning <5% *PCSK9* ja *LDLRAP1* geenide seoselised (Varret jt., 2008; Hopkins jt., 2011). Kuigi eelnimetatud ühe geeni muutustel on märkimisväärne roll FH etioloogias, juhvivad aheldusuuringute tulemused haiguse võimaliku tekkepõhjuseks tähelepanu ka mitme erineva geneetilise variatsiooni olemasolule (Goldberg jt., 2011). Seega võib FH lisaks ühe geeni defektist põhjustatud häiretest olla tingitud ka polügeensete variantide efektist (Talmud jt., 2013).

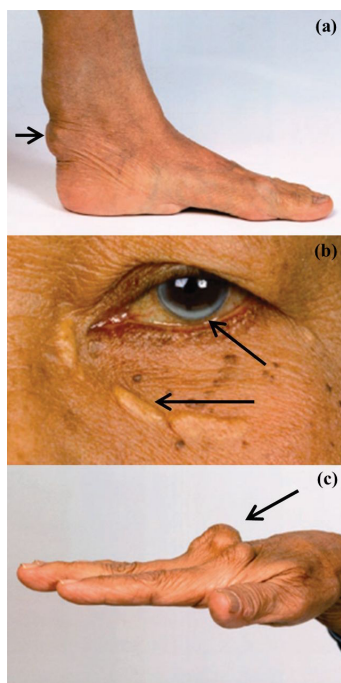
Populatsioonipõhiste andmetele toetudes arvatakse, et maailmas on hinnanguliselt 14 kuni 34 miljonit FH-d põdevat indiviidi (Pejic, 2014). Varasemalt on epidemioloogiliste uuringute tulemusena peetud homosügootset FH-d väga harva esinevaks geneetiliseks häireks, mida diagnoositakse üldpopulatsioonis ühel inimesel miljonist. Viimaste täiustunud diagnostikameetoditega uuringute kohaselt on selle esinemissagedus aga kordades kõrgem: 1:300000 (Sjouke jt., 2015). Märksa levinum on haiguse heterosügootne vorm, mille esinemissagedus Põhja-Ameerikas ja Euroopas jääb suurusjärku 1:200-1:300 (Sjouke jt., 2015; Benn jt., 2016; de Ferranti jt., 2016). Asutajaefekti ja isoleerituse tõttu on FH levimus kõrgem afrikandrite (Brink jt., 1987), prantsuse kanadalaste (quebeclaste) (Moorjani jt., 1989), soomlaste (Vuorio jt., 2001) ja liibanonlaste hulgas (Lehrman jt., 1987). Afrikandrite populatsioonis põeb heterosügootset haigusvormi hinnanguliselt üks inimene 70-st (Liyanage jt., 2011).

Vaatamata detailsele geneetilisele ja kliinilisele kirjeldusele ning üha jõudsamalt täiustuvate ravimeetodite rakendamisele, on FH kogu maailmas märkimisväärselt aladiagnostitud ja -ravitud. Erinevalt Hollandist, kus FH-d põdevate indiviidide tuvastamine on tänu riikliku sõeluuringuprogrammi rakendamisele oluliselt efektiivsem, on enamikus riikides haigus diagnoositud vähem kui ühel protsendil elanikkonnast (Nordestgaard jt., 2013). Korrekse ja õigeaegse ravi puudumisel on haigetel üldpopulatsiooniga võrreldes 20 korda suurem risk haigestuda südame isheemiatõppe ning pooltel mees- ja kolmandikul naissoost FH patsientidel kujuneb mittefataalne või fataalne CAD-i tüsistus (äkkisurm, müokardiinfarkt) enne 50. või 60. eluaastat (Hopkins jt., 2011; Knowles jt., 2014). CAD-i ja selle tüsistuste tekke riski on erinevate riskifaktorite (suitsetamine, vähene füüsiline aktiivsus, hüpertensioon) mõjutamise ja õigeaegse medikamentoosse raviga võimalik märkimisväärselt edasi lükata. 2013. aastal läbiviidud metaanalüüsi kohaselt vähendab primaarne preventatsioon statiinidega CAD-i kliinilise avaldumise suhtelist riski 20-40% võrra (Taylor jt., 2013). FH varajane ja korrektne diagnoosimine ning ravi määramine võimaldab märgatavalt vähendada kardiovaskulaarhaigustest tingitud haigestumist ja suremust kogu maailmas.

1.2 PEREKONDLIKU HÜPERKOLESTEROLEEMIA KLIINILISED ASPEKTID

1.2.1 Perekondliku hüperkolesteroleemia sümptomid

FH diagnoosiga patsientidele on iseloomulik kõrgenenud plasma LDL-kolesterooli tase, mis võib heterosügootse haigusvormiga indiviididel kõikuda 190-450 mg/dl (4,9-11,6 mmol/l) juures või üle selle ning haigetel homosügootidel 400-1000 mg/dl (10,3-25,9 mmol/l) piires (Marks jt., 2003). LDL-kolesterooli taseme tõusuga kaasneb kolesterooli akumulatsioon perifeersetes kudedes, mistõttu esinevad patsientidel reeglina erinevad lipiidiladestuse häired: ksantoomid, ksantelasmid ja silma sarvkesta servmine hägusus (Joonis 1) (Brautbar jt., 2015). Kõige tüüpilisem on ksantoomide esinemine kannakõõlustel ja sõrme sirutajalihase kõõlustel, homosügootse haigusvormiga indiviididele on iseloomulikud ka kutaansed ksantoomid küünarnukkidel, tuharatel ja põlvedel (Nemati ja Astaneh, 2010). Vähem spetsiifilised sümptomid on kolesterooli ladestused ümber silmalauade (ksantelasmid) ja silma sarvkesta (Christoffersen jt., 2011). Kui heterosügootse haigusvormiga indiviididel ilmnevad FH-le iseloomulikud kliinilised nähud alles 30. või 40. eluaastates, siis haigetel homosügootidel võib sarnaseid sümptomeid täheldada juba lapse- või noorukieas (Bhatnagar, 2006). Kuna kõrgest LDL-kolesterooli tasemest põhjustatud veresoontehaiguste ateroskleroosilised muutused võivad kliiniliselt avalduda enneaegse CAD-ina, on FH varane avastamine ja diagnoosimine äärmiselt oluline (Yuan jt., 2006).



Joonis 1. FH kliinilised sümptomid. (a) Kannakõõluse ksantoom. (b) Ksantelasmid ja silma sarvkesta servmine hägusus. (c) Sõrme sirutajalihase kõõluse ksantoom (Liyanaage jt., 2011).

1.2.2 Perekondliku hüperkolesteroleemia diagnoosimine

Peamine väljakutse FH diagnostikas on haigusjuhtude õigeks identifitseerimiseks kõige efektiivsema ja kulutõhusama sõeluuringu ehk skriiningumeetodi valik (Varghese, 2014). Järjepidevat diskussiooni peetakse ka selle üle, kas tulemuslikum oleks skriinida geenide või lipiidide suhtes. Teadaolevalt jääb umbes 7% haigetest sõelumise hetkel diagnoosimata, sest nende lipiidiprofiil on normi piires (Garcia-Garcia jt., 2011). Samas ainult geneetilise info hindamisel on täheldatud, et ligi 20%-l kliinilise diagnoosiga patsientidel, kellel ei esine mutatsiooni üheski peamises FH tekkega assotsieerivas geenis, võib fenotüüp tuleneda hoopis mitmete kõrge LDL-kolesterooli tasemega seotud geenimarkerite kumulatiivsest efektist (Taylor jt., 2010; Hopkins jt., 2011).

1.2.2.1 Kliinilise diagnoosimise kriteeriumid

FH diagnoosimisel kasutatakse peamiselt kolme erinevat kriteeriumipõhist algoritmi, mis võtavad arvesse nii perekondlikku anamneesi, kliiniliste sümptomite olemasolu kui ka mõõdetud lipiidiväärtusi (LISA 1). Neist kõige vähempetsiifilisem on USA-s kasutatav MEDPED (*Make Early Diagnosis to Prevent Early Death*) diagnostiline mudel (LISA 1 Tabel 1), mis põhineb ainult üld- ja LDL-kolesterooli tasemete hindamisel (Williams jt., 1993; Hovingh jt., 2013). Täpse kliinilise diagnoosi väljaselgitamiseks oleks oluline lisaks eelmainitud lipiididele mõõta ka kõrge tihedusega lipoproteiinide (*high-density lipoprotein* – HDL), triglütseriidide ja lipoproteiin(a) [*lipoprotein(a)* – Lp(a)] tasemeid, sest haigetel on sageli HDL-partiklite hulk langenud ning Lp(a) kui sõltumatu riskifaktori tase tõusnud, võrreldes tervete indiviididega (Nenseter jt., 2011). Hollandi Lipiidikliinikute Koostöövõrgustiku (LISA 1 Tabel 2) ja Suurbritannias väljatöötatud Simon Broome'i diagnostilised juhised (LISA 1 Tabel 3) hõlmavad lisaks kliiniliste tunnuste (välised füüsilised sümptomid ning üld- ja LDL-kolesterooli tase) hindamisele ka patsiendi geneetilist testimist (Austin jt., 2004; Haase ja Goldberg, 2012). Kui Simon Broome'i kriteeriumide alusel diagnoositakse patsiendil *LDLR*, *APOB* või *PCSK9* geeni mutatsiooni korral kohe FH, siis Hollandis kasutatava mudeli kohaselt peab täidetud olema veel mõni haiguskriteerium (Austin jt., 2004). Kuna kasutusel olevad diagnostilised juhised ei põhine indiviidide eksoomi või täisgenoomi sekveneerimisel, vaid süsteemsel genotüpiseerimisel ja Sangeri kapillaarsekveneerimisel varem kirjeldatud mutatsioonide suhtes, ei võimalda praegune patsientide geneetiline testimine uute variantide avastamist.

1.2.2.2 Kaskaadskriining

Kaskaadskriiningu all mõistetakse huvipakkuvat haigust põdeva indiviidi ehk indekspatsiendi perekonnaliikmete ja lähisugulaste süstemaatilist identifitseerimist ning kliinilist ja geneetilist testimist (Sturm, 2014). Sellist lähenemist rakendati FH puhul esmakordselt 1994. aastal Hollandis, mille käigus tuvastati, et 237 patsiendi 5442-st sugulasest ligi pooled (2039) olid *LDLR* geeni mutatsiooni suhtes heterosügootsed (Schmidt jt., 1996). Lisaks on sarnaseid kaskaadse testimise programme edukalt kasutatud Islandil (Thorsson jt., 2003), Norras (Leren jt., 2004), Hispaanias (Pocovi jt., 2004), Walesis (Taylor jt., 2010), Uus-Meremaal (Muir jt., 2010) ja Austraalias (Bell jt., 2015). Kaskaadskriiningu käigus mõõdetakse indekspatsiendi esimese astme sugulaste lipiidide profiil ning testitakse haigusseoselise mutatsiooni olemasolu. Uute haigusjuhtude tuvastamisel kontrollitakse ka nende vanemaid ja järeltulijaid (Huijgen jt., 2010). Autosoom-dominantse pärandumise tõttu on esimese astme sugulastel testitava mutatsiooni leidmise tõenäosus 50%, mistõttu peetakse kaskaadskriiningut kõige efektiivsemaks ja kulutõhusamaks vahendiks FH-d põdevate indiviidide identifitseerimiseks (Ademi jt., 2014).

1.2.3 Perekondliku hüperkolesteroleemia ravivõimalused

FH diagnoosiga patsientide esimene samm LDL-kolesterooli taseme langetamiseks ning haiguse leevendamiseks on tervisliku eluviisi harrastamine (tasakaalustatud ja mitmekülgne toitumine, regulaarne kehaline aktiivsus, mittersuitsetamine) (Catapano jt., 2011; Watts jt., 2014). Vaatamata oluliste korrektuuride sisseviimisele elustiilis, ei suudeta üksnes nende muutustega saavutada haigete LDL-kolesterooli taseme piisavalt drastilist vähenemist, mistõttu on samaaegselt vajalik ka lipiidide taset alandavate ravimite manustamine (Klose jt., 2014).

1.2.3.1 Statiinid

Ameerika Südameassotsiatsiooni ja Ameerika Kardioloogide Kolledži juhiste kohaselt kvalifitseeruvad intensiivsele ravile kõik indiviidid, kelle LDL-kolesterooli tase on >190 mg/dl (Stone jt., 2013). Kaasaegne farmakoterapia võimaldab heterosügootse FH-ga patsientidel üldjuhul saavutada soovitud LDL-kolesterooli taset, kuid haigete homosügootide ravi on jätkuvalt problemaatiline (Marais, 2004). Lipiidide taset alandavatest ravimitest on kõige laialdasemat kasutust leidnud statiinid (näiteks atorvastatiin, rosuvastatiin, pitavastatiin

ja simvastatiin), mis võimaldavad LDL-kolesterooli taset langetada 55-60% (Stein jt., 2003; Watts jt., 2014). Statiinide toimemehhanism põhineb kolesterooli sünteesiraja võtmeensüümi 5-hüdroksü-3-metüülglutarüül-koensüüm A (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A* – HMG-CoA) reduktaasi inhibeerimisel. Struktuurane sarnasus statiinide ja HMG-CoA molekuli vahel võimaldab statiinidel seonduda eelmainitud ensüümiga ning seeläbi blokeerida kolesterooli moodustumist maksas (Endo, 1992). Kolesterooli tootmise pärssimine kompenseeritakse LDL-retseptorite ülesreguleerimisega, mis omakorda vähendab plasma LDL-kolesterooli taset (Marais, 2004). Kuna homosügootse FH-ga patsientidel on LDL-retseptor mittefunktsionaalne või puudub, siis on statiinide mõju nende indiviidide LDL-kolesterooli tasemele minimaalne (Varghese, 2014).

FH diagnoosiga patsientide ravi peamiseks eesmärgiks on vähendada kardiovaskulaarsete tüsistuste tekke riski varase sekkumise kaudu (Vogt, 2015). Sellest lähtuvalt on Euroopas heterosügootse haigusvormiga patsientidel lubatud statiinide manustamine alates 6.-10. eluaastast ning homosügootse FH-ga indiviididel veelgi varem (Reiner, 2014; Wiegman jt., 2015). Kuigi statiinravi peetakse üldiselt ohutuks ja hästi talutavaks, kaasnevad osal haigetest kõrvaltoimed, näiteks lihase funktsioonihäired, suurenenud maksaensüümide aktiivsus ja kõrgem diabeedi tekke risk (Klose jt., 2014). Mitmete uuringute tulemusena on leitud, et *SLCO1B1* geeni polümorfismiga patsientidel võib simvastatiini tarbimine suurendada müopaatia tekke riski (SEARCH Collaborative Group jt., 2008; Voora jt., 2009).

Statiini monoterapia ei võimalda sageli FH-d põdevate indiviidide, peamiselt haigete homosügootide LDL-kolesterooli taset normaliseerida, mistõttu tõhusama ravitulemuse saavutamiseks on FH diagnoosiga patsientidel soovitatav statiine manustada kombineerituna teiste lipiidide taset alandavate ravimite, näiteks esetimiibi, sapphapete sekvestrantide või niatsiiniga (Goldberg jt., 2011). Kombineeritud ravi võimaldab LDL-kolesterooli taset täiendavalt 20-30% vähendada (van der Graaf jt., 2008). Esetimiib, mis lokaliseerub peensoole hattudele, blokeerib kolesterooli imendumist peensoolest, vähendades seeläbi veres ringleva üld- ja LDL-kolesterooli hulka (Couture ja Lamarche, 2013). Sapphapete sekvestrandid suurendavad kolesterooli konversiooni sapphapeteks, kahandades seega maksa kolesterooli taset, mis viib LDL-retseptorite ülesreguleerimisele (Varghese, 2014). Niatsiin alandab lisaks LDL-kolesteroolile ka Lp(a) ja triglütseriidide taset ning suurendab HDL-kolesterooli hulka (Nordestgaard jt., 2010).

1.2.3.2 LDL-aferees

LDL-aferees, mida rakendati kliinilises praktikas esmakordselt 35 aastat tagasi, on tõhus meetod FH raskete vormide raviks (Stoffel jt., 1981). Eestis viidi esimene sellelaadne protseduur läbi 2003. aastal (Viigimaa ja Väikmann, 2006). LDL-afereesi vajavad peamiselt homosügootse FH-ga patsiendid, aga ka raske heterosügootse haigusvormiga invidiidid, kelle LDL-kolesterooli taset ei õnnestu normaliseerida dieedi ja medikamentoosse raviga (Pijlman jt., 2010). Nimetatud meetod võimaldab kehavälisest vereringest tahke kandja (näiteks dekstraansulfaadi või hepariini) abil selektiivselt eemaldada LDL-partikleid (Lee jt., 2011). Kuigi kohe pärast esimest protseduuri langeb patsiendi LDL-kolesterooli tase umbes 60-70%, saavutab see reeglina paari nädala jooksul oma esialgse väärtuse, mistõttu on vajalik afereesi regulaarne teostamine (Sniderman jt., 2014). LDL-afereesiga kaasnevad kõrvaltoimed, näiteks hüpotensioon, iiveldus, peavalu, aneemia, valu rinnus ja südame rütmihäired, on pigem harvaesinevad ja iseloomulikud vaid 3% patsientidele (Hovingh jt., 2013; Stefanutti ja Julius, 2013). Vaatamata LDL-afereesi efektiivsusele FH ravis, ei ole vastav meetod kliinilises praktikas raha- ja ajakulukuse tõttu väga laialdaselt kasutatav (Varghese, 2014).

1.2.3.3 Uudsed ravisuunad

Lipiidide taset alandavate ravimite talumatuse ja ebapiisava efektiivsuse ning LDL-afereesi piiratud kasutamise tõttu on viimastel aastatel hakatud üha rohkem tähelepanu pöörama uute FH ravivõimaluste väljatöötamisele (Klose jt., 2014). Homosügootse haigusvormiga patsientidele suunatud ravimid lomitapiid ja mipomerseen said Ameerika Toidu- ja Ravimiameti (*Food and Drug Administration* – FDA) poolt kasutusloa vastavalt 2012. ja 2013. aastal (Pejic, 2014). Euroopa Meditsiini Agentuur on heaks kiitnud lomitapiidi, kuid mitte mipomerseeni kasutamise (Vogt, 2015). 2015. aastal lõppesid III faasi kliinilised uuringud PCSK9 inhibiitorite alirokumaabi ja evolokumaabiga, mis on samuti FDA poolt turule lubatud (Robinson jt., 2015; Sabatine jt., 2015).

Lomitapiid on suukaudne ravim, mis inhibeerib väga madala tihedusega lipoproteiini (*very-low-density lipoprotein* – VLDL) partikli sünteesimiseks vajalikku mikrosomaalset triglütseriidide ülekandevalku (*microsomal triglyceride transfer protein* – MTP) (Pejic, 2014). MTP pärssimisega kaasneb VLDL assambleerimise häirumine maksas ning VLDL kontsentratsiooni ja LDL-kolesterooli taseme alanemine plasmas (Cuchel jt., 2007). Parentaalselt manustatava *antisense* oligonukleotiidi mipomerseeni toimemehhanism põhineb

ApoB mRNA-le seondumisel ja seeläbi ApoB valgu sünteesi inhibeerimisel. ApoB puudumine pärsib VLDL-partiklite tootmist, põhjustades LDL-kolesterooli taseme languse plasmas (Pejic, 2014). Lomitapiidi ja mipomerseeni manustamisest tingitud aminotransferaaside aktiivsuse tõusu ja rasva akumulereerumise tõttu maksas on nende ravimite kasutamine praktikas hoolika jälgimise all (Rader ja Kastelein, 2014). Uudse ravisuunana on spetsialistide hulgas palju kõneainet pakkunud ka LDLR-i aktiivsust reguleeriva valgu PCSK9 inhibeerimine (Stein ja Swergold, 2013). PCSK9 seondub LDLR-iga ja soodustab selle degradatsiooni maksas, mille tulemusena tõuseb märgatavalt LDL-kolesterooli tase veres (Horton jt., 2009). *PCSK9* geeni funktsioonikaoga mutatsiooni kandjatel esineb aga madalam LDL-kolesterooli tase ja oluliselt väiksem risk kardiovaskulaarsete tüsistuste tekkeks (Cohen jt., 2006). Sellest lähtuvalt on mitmete uuringute tulemusena näidatud, et PCSK9 inhibeerimine omab positiivset efekti FH ravis (Raal jt., 2012; Stein jt., 2012; Raal jt., 2015).

1.3 PEREKONDLIKU HÜPERKOLESTEROLEEMIA MOLEKULAARSED JA GENEETILISED ASPEKTID

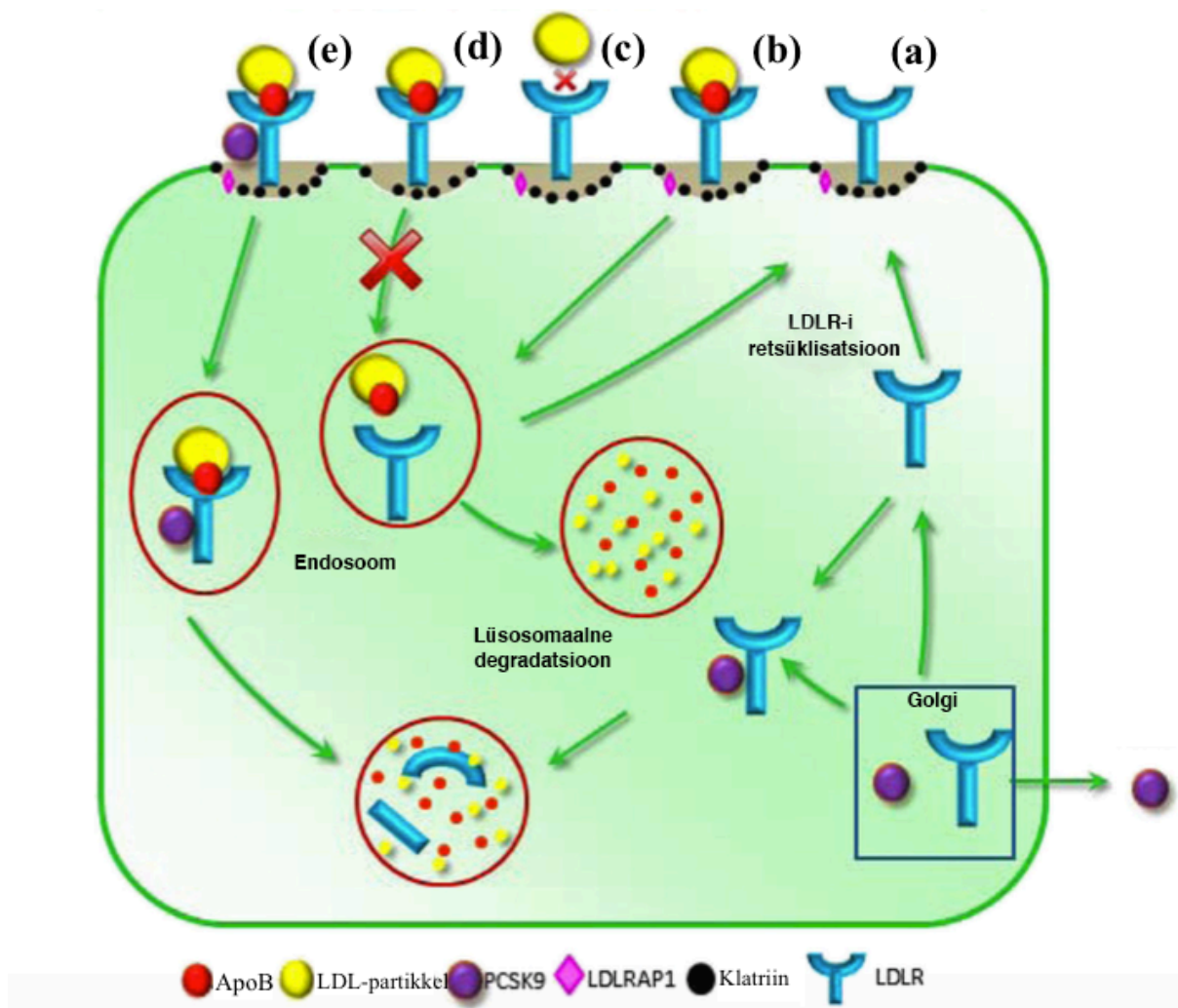
1.3.1 Kolesterooli transport ja metabolism

Organismis leiduv kolesterool kantakse vereringes peamiselt LDL- ja HDL-partiklite koosseisus. Maksas sünteesitav kolesterool transporditakse erinevatesse kehaosadesse LDL-partiklite koostises ning üleliigne või kasutamata jäänud kolesterool kantakse HDL-partiklite koosseisus omakorda perifeersetest kudedest tagasi maksa, kus seda kasutatakse metaboliseerimise järel sapphapete sünteesiks (Kwiterovich, 2000). Kui LDL-partiklitega transporditav kolesterool võib hakata ladestuma arterite siseseinale, soodustades ateroskleroosi teket, siis kõrget HDL-kolesterooli taset seostatakse vähenenud CAD-i tekke riskiga (Goldstein ja Brown, 1975; Asztalos, 2004).

Umbes 70% organismis olevast kolesteroolist, mis sünteesitakse kehaomaselt maksas, esineb LDL-partiklite koostises (Myant, 1973; Brown ja Goldstein, 1979). 1/3 LDL-partiklitest eritatakse otse maksast vereringesse ning 2/3 tekib VLDL konversioonil (Rudel jt., 1986). VLDL-partiklites sisalduvate triglütseriidide hüdrolüüsil tekivad vahepealse tihedusega lipoproteiinid (*intermediate-density lipoprotein* – IDL). Maksa kaudu eemaldatakse plasmast teatud osa tekkinud IDL-molekule ning allesjäänud osakesed läbivad edasise hüdrolüüsi ja muutuvad LDL-partikliteks (Havel, 1984).

LDL-kolesterooli metaboliseerumine toimub LDL-retseptorite vahendatud raja kaudu, mille käigus LDLR interakteerub LDL-partikli koostises oleva ApoB molekuliga (Joonis 2) (Brown ja Goldstein, 1979). Retseptor-ligand kompleksi moodustumise järel klasterduvad LDLR-molekulid rakumembraanil klatriiniga kaetud lohkudesse, mille kaudu internaliseeritakse tekkinud kompleks endotsütoosi teel rakku. Internalisatsioonil on oluline roll LDLRAP1 valgul, mis vastutab LDLR-i korrektse paigutumise eest kaetud lohku (Sniderman jt., 2014). Kergelt happeline keskkond endosoomis põhjustab retseptor-ligand kompleksi dissotsiatsiooni. Kompleksist vabanenud LDL-molekulid läbivad lüsosoomalse degradatsiooni ning vabanenud kolesterool mõjutab HMG-CoA reduktaasi tagasisidestusliku regulatsiooni kaudu maksasisest kolesterooli sünteesi (Goldstein jt., 1979; Brown jt., 1983). Ligandi küljest dissotsieerunud LDLR retsükleerub tagasi raku pinnale, võimaldades järgmise LDL-molekuli kinnipüüdmist ja tekkinud kompleksi internaliseerumist rakku. Ekso- või endogeense PCSK9 seondumise korral suunatakse LDLR lüsosoomalsesse degradatsiooni.

Mutatsioonide tõttu *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* või *LDLRAP1* geenid on üleliigse LDL-kolesterooli eemaldamine organismist häiritud (Brautbar jt., 2015).



Joonis 2. LDL-partiklite eemaldamine LDL-retseptori vahendatud raja kaudu ning *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* ja *LDLRAP1* geeni mutatsioonide mõju LDL-retseptori bioloogilise raja molekulaarsele mehhanismile. (a) LDLR on kinnitunud raku plasmamembraanile. (b) Normaalse LDL-kolesterooli omastamise korral toimub LDL-partikli koostises oleva ApoB ja rakupinnal ekspresseeruva LDLR-i omavaheline interaktsioon. Retseptor-ligand kompleksi moodustumisele järgneb LDLRAP1 valgu poolt vahendatud lokaliseerimine klatriiniga kaetud lohkudesse ja internaliseerumine raku retseptorivahendatud endotsütoosi kaudu. Kompleksi dissotsiatsioon endosoomis võimaldab LDLR-i retsükleerumist rakupinnale ja LDL-partikli lagundamist lüsoosoomis. (c) *LDLR* või *APOB* geeni mutatsioonide korral on retseptor-ligand kompleksi moodustumine häiritud, mistõttu ei toimu üleliigse LDL-kolesterooli eemaldamist vereringest. (d) *LDLRAP1* geeni mutatsioonide puhul toimub küll ligandi seondumine retseptorile, kuid vastava kompleksi internaliseerumine on häiritud. (e) *PCSK9* geeni uudifunktsiooniga mutatsioonide tagajärjel sageneb PCSK9 seondumine retseptorile, põhjustades suurenenud LDLR-i degradatsiooni. Golgi kompleksis protsessitud PCSK9 sekreteeritakse raku sisemusse või rakust välja. Lühendid: ApoB – apolipoproteiin B; LDL – madala tihedusega lipoproteiin; LDLR – madala tihedusega lipoproteiini retseptor; LDLRAP1 – madala tihedusega lipoproteiini retseptori adaptorvalk 1; PCSK9 – prooteiin-konverteas subtilisiin/keksiin tüüp 9 (Brautbar jt., 2015, kohandatud).

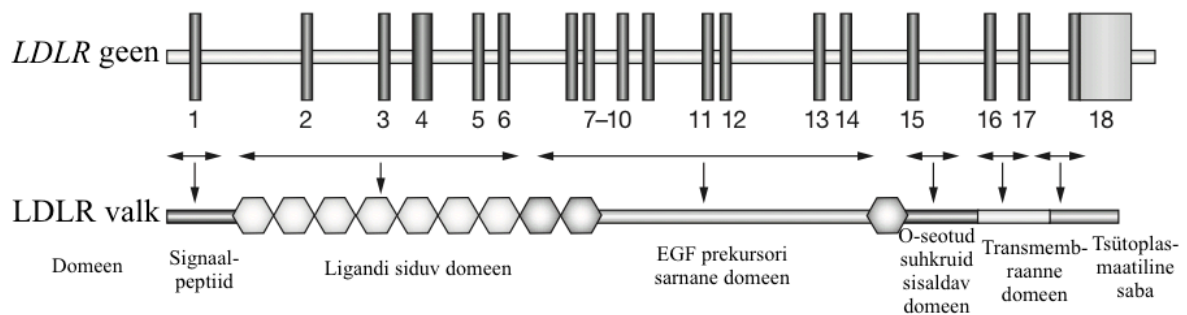
1.3.2 Perekondliku hüperkolesteroleemia geneetiline etioloogia

Enamikul juhtudel on FH põhjuseks järgmised molekulaarsed defektid:

- suured ümberkorraldused, deletsioonid, insertsioonid, missenss- ja nonsenssmutatsioonid *LDLR* geenis, mis mõjutavad retseptori funktsiooni;
- mutatsioonid *APOB* geenis, mis mõjutavad ligandi LDLR-i äratundmist;
- uudikfunktsiooniga mutatsioonid *PCSK9* geenis, mis vähendavad LDLR-i hulka maksaraku pinnal;
- mutatsioonid *LDLRAP1* geenis, mis põhjustavad LDLR-i vale paigutumise maksaraku membraanile (Sniderman jt., 2014).

1.3.2.1 LDLR

LDLR-i ja selle defektide avastamine on võimaldanud oluliselt paremini mõista FH geneetilist tagapõhja ning patofüsioloogilisi mehhanisme (Brown ja Goldstein, 1986). Kromosoomi 19p13.2 lookuses asuv 45 kilobaasi (*kilobase* – kb) suurune *LDLR* geen, mis sisaldab 18 eksonit ja 17 intronit, kodeerib 860 aminohappe pikkust valku (Leigh jt., 2008). LDLR valgu koosseisu kuulub 21 aminohappe pikkune signaalpeptiid ning viis domeeni: ligandi siduv tsüsteiini rikaste kordustega domeen, epidermaalse kasvufaktori (*epidermal growth factor* – EGF) prekursori sarnane domeen, O-seotud suhkruid sisaldav domeen, transmembraanne domeen ja tsütoplasmaatiline saba (Joonis 3) (Soutar ja Naoumova, 2007). LDLR-i peamiseks funktsiooniks on vähendada LDL-kolesterooli tootmist, suurendades prekursorimolekuli ehk IDL-i või LDL-partikli eemaldamist vereringest. LDLR on rakupinna retseptor, mis omab kõrget afiinsust LDL-partiklile seondumisel, võimaldades retseptor-ligand kompleksi moodustumist ja internaliseerumist rakku retseptor-vahendatud endotsütoosi kaudu. Kompleksi dissotsieerumise järel endosoomis suunatakse LDLR tagasi rakupinnale ning LDL-molekulid lagundatakse lüsoosoomis. Vabanenud kolesterool alandab negatiivse tagasiside kaudu HMG-CoA ekspressioonitaset, mis viib kolesterooli sünteesi vähenemisele (Goldstein ja Brown, 2009).



Joonis 3. *LDLR* geeni ja valgu ehitus. *LDLR* geen koosneb 18 eksonist, mis on joonisel tähistatud püstkriipsudega. *LDLR* geeni poolt kodeeritav 860 aminohappe pikkune *LDLR* valk koosneb signaalpeptiidist ja viiest domeenist: ligandi siduv domeen, EGF-prekursori sarnane domeen, O-seotud suhkruid sisaldav domeen, transmembranne domeen ja tsütoplasmaatiline saba. Lühendid: EGF – epidermaalne kasvufaktor; *LDLR* – madala tihedusega lipoproteiini retseptor (Soutar ja Naoumova, 2007, kohandatud).

Mutatsioonid *LDLR* geenis on peamiseks FH tekkepõhjuseks. Erinevates andmebaasides on kokku raporteeritud üle 1700 *LDLR*-i mutatsiooni, mille hulka kuuluvad nii suured ümberkorraldused, ühe aminohappe asendused kui ka väiksemad deletsioonid ja insertioonid^{1,2,3} (Heath jt., 2001). Lihtsustatult võib *LDLR* geeni mutatsioonid jagada kaheks: *LDLR*-puudulikud mutatsioonid, mille korral retseptorvalku ei sünteesita üldse, ning *LDLR*-defektsed mutatsioonid, mis põhjustavad häireid näiteks ligandi seondumisel retseptoriga (Gidding jt., 2015). FH-d põhjustavad mutatsioonid *LDLR* geenis on väga heterogeensed ning jaotunud ühtlaselt üle kogu geeni (Usifo jt., 2012). *LDLR* geeni mutatsioonid võib klassifitseerida kuude klassi:

- klass 1 – retseptori või prekursorvalgu puudulik süntees;
- klass 2 – häirunud retseptorvalgu formeerumine;
- klass 3 – häirunud LDL-partikli seondumine;
- klass 4 – häirunud retseptorkompleksi internalisatsioon;
- klass 5 – retsükleerumata retseptorite lagundamine;
- klass 6 – häirunud retseptorite suunamine rakumembraanile (Gidding jt., 2015).

Klass 1 mutatsioonid on FH patsientide seas sagedased ning neid seostatatakse väga kõrge LDL-kolesterooli tasemega. Laia molekulaarset mitmekesisust omavate mutatsioonide tulemusena võib olla häiritud nii transkriptsiooniprotsess, mRNA splaissimine kui ka retseptori korrektne assambleerimine või esineda enneaegne stoppkoodon. Klass 2 mutatsioonid jagatakse omakorda kaheks sõltuvalt sellest, kas valesti kokkupakitud valgud

¹ <http://www.ucl.ac.uk/ldlr>

² https://grenada.lumc.nl/LOVD2/UCL-Heart/home.php?select_db=LDLR

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=familial+hypercholesterolemia>

transporditakse endoplasmaatilisest retiikulumist (*endoplasmic reticulum* – ER) Golgi kompleksi või säilitatakse kärbitud kujul ER-is kuni lagundamiseni. Kuigi klass 3 mutatsioonide puhul toimub korrektne retseptorite süntees, translatsioon ja transport raku pinnale, on seondumisdomeenis esinevate muutuste tõttu häiritud LDL-partikli kinnitumine retseptorile. Klass 4 mutatsioonide korral takistavad muutused retseptorivalgu C-terminuses nende klasterdumist kaetud lohkudesse, mistõttu LDL-LDLR kompleksi internaliseerumist ei toimu. Kõik klass 5 mutatsioonid on lokaliseerunud LDLR valgu EGF-prekursori sarnases domeenis, mis osaleb retseptor-ligand kompleksi dissotsiatsioonil endosoomis. Domeeni deleteerumise tagajärjel jääb retseptor endosoomidesse lõksu, mistõttu see suunatakse kiirelt lagundamisele (Hobbs jt., 1990; Hobbs jt., 1992; Gidding jt., 2015). Ka klass 6 mutatsioonide tulemusena toimub retseptori lagundamine, sest muutuste tõttu valgu tsütoplasmaatilises sabas ei ole LDLR võimeline liikuma rakumembraanile (Koivisto jt., 2001).

1.3.2.2 *APOB*

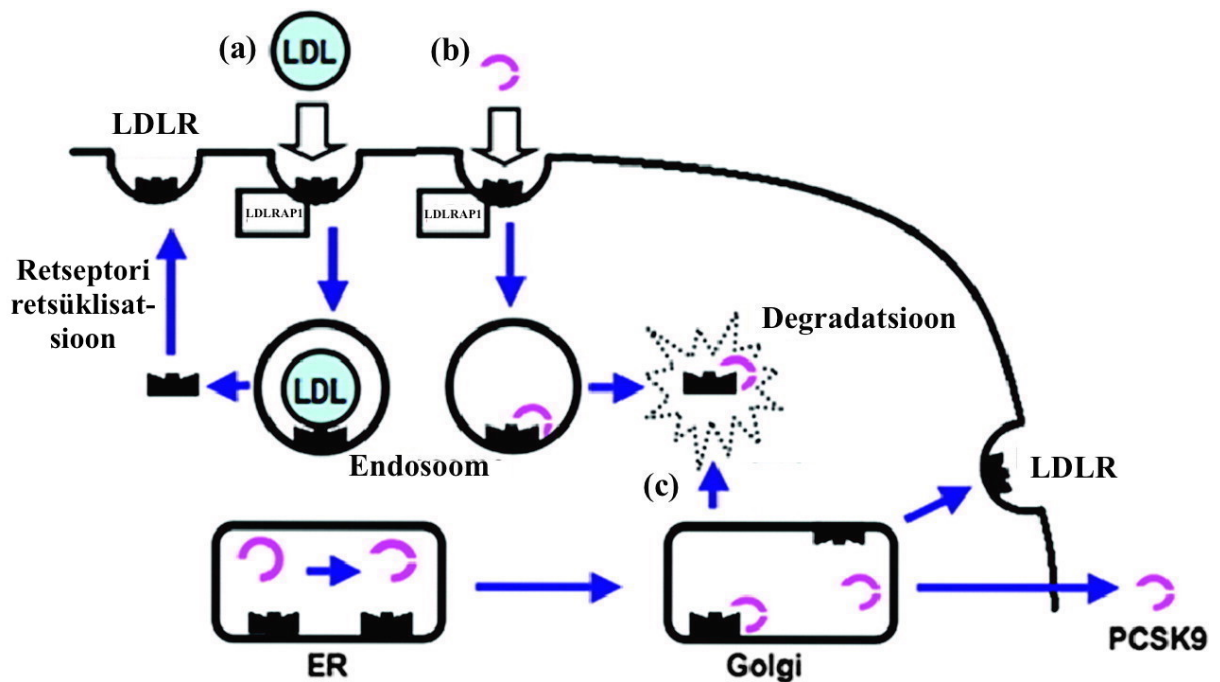
Kuigi juba 1980. aastate lõpus täheldati mõningatel funktsionaalse LDLR-iga FH-d põdevatel indiviididel häireid LDL-partikli seondumisel LDLR-iga, ei suudetud *APOB* geeni polümorfse olemuse tõttu kuni 1990. aastani tuvastada ühtki haigusseoselist mutatsiooni (Innerarity jt., 1987; Innerarity jt., 1990). Kromosoomi 2p24.1 lookuses paiknev 42 kb suurune *APOB* geen, mille koosseisu kuulub 29 eksonit ja 28 intronit, kodeerib kahe isovormiga ApoB valku. LDL-partiklites sisalduv 4563 aminohappe pikkune apolipoproteiin B-100 (*apolipoprotein B-100* – ApoB-100) koosneb neljast domeenist ning seda ekspresseeritakse maksas. Seevastu apolipoproteiini B-48, mis moodustab 48% täispikast ApoB100-st, sünteesitakse peensooles (Whitfield jt., 2004). *APOB* geeni mutatsioonidest tingitud FH-d nimetatakse ApoB-100 perekondlikuks defektiks (*familial defective ApoB-100* – FDB). Võrreldes *LDLR* geeniga, mida iseloomustab lai patogeensete variantide mitmekesisus, on *APOB* geenis tuvastatud üksikud enamasti 26. eksonit mõjutavad mutatsioonid. Kõige enam esineb mutatsioone aminohappe 3527. positsioonis, mis põhjustavad häireid valgu kokkupakkimisel (Borén jt., 2001). ApoB valk on LDLR-i ligand, mis võimaldab LDL-partiklil seonduda oma retseptorile. Mutatsioonide tõttu *APOB* geenis langeb valgu sidumisafiinsus, soodustades omakorda kõrgeenenud LDL-kolesterooli taset (Innerarity jt., 1990; Borén jt., 2001). Mutantse *APOB* alleeli mittetäielikust penetrantsusest tingituna esineb FDB patsientidel leebema kliinilise pildiga haigusvorm kui indiviididel, kellel on FH põhjuseks mutatsioonid *LDLR* geenis (Vrablik jt., 2001). Kuna praegu kasutatavad *APOB* geeni mutatsioone tuvastavad kliinilised testid keskenduvad peamiselt 26.

eksonis tekkivatele muutustele, võib *APOB* geeni täieliku järjestuse analüüs võimaldada uute harvade haiguspõhjuslike variantide leidmist.

1.3.2.3 *PCSK9*

Mutatsioonid *PCSK9* geenis on üheks autosoom-dominantse hüperkolesteroleemia tekkepõhjuseks. 25 kb suurune *PCSK9* geen, mis sisaldab 12 eksonit ja kodeerib 692 aminohappe pikkust valku, koosneb kolmest domeenist: prodomeen, katalüütiline ja C-terminaalne domeen (Pandit jt., 2008; Cariou jt., 2011). Kromosoomi 1p32.3 lookuses asuva *PCSK9* geeni poolt kodeeritav valk on võimeline seonduma LDLR-iga ja juhtima tekkinud kompleksi lüsoomaalsesse degradatsiooni. Selle tulemusena väheneb LDLR-i hulk maksaraku pinnal ning LDL-partiklite eemaldamine vereringest. Esimest korda seostati FH teket *PCSK9* geeni muutustega 2003. aastal, kui vastavas geenis tuvastati kaks uudikfunktsiooniga mutatsiooni, mis põhjustasid suurenenud LDL-kolesterooli taset (Abifadel jt., 2003). Seevastu funktsioonikaoga mutatsioonid *PCSK9* geenis on seotud hoopis kõrgema LDLR ekspressioonitasemega rakupinnal ning seeläbi madalama LDL-kolesterooli tasemega, mistõttu neid mutatsioone kandvatel indiviididel on CAD-i tekke risk oluliselt vähenenud (Cohen jt., 2006; Zhao jt., 2006). Eelmainitud teadmine on aidanud oluliselt kaasa *PCSK9* inhibiitorite kui uue FH ravimeetodi väljatöötamisele ja turuletoomisele (Robinson jt., 2015; Sabatine jt., 2015).

PCSK9 on seriini endoproteaas, mida sünteesitakse peamiselt maksas, kuid ekspresseeritakse madalal tasemel ka soolestikus, neerudes ja ajus (Seidah jt., 2003). Vastvalminud *PCSK9* läbib ER-i luumenis autokatalüütilise lõhustumise, vabastades N-terminaalse prodomeeni segmendi. Viimane assotsieerub mittekovalentselt katalüütilise ja C-terminaalse domeeniga ning toimib katalüütilise saidi inhibiitorina (Seidah jt., 2013). Erinevalt teistest prooteiin-konvertaasi perekonda kuuluvatest valkudest ei läbi *PCSK9* prodomeen teist lõhustumist, vaid säilib intakse ja tihedalt seotuna katalüütilises saidis, vältides substraadi juurdepääsu (Cunningham jt., 2007). *PCSK9* poolt suunatud LDLR-i degradatsioon võib toimuda nii intrakuu ekstratsellulaarse raja kaudu (Joonis 4). Rakusiseselt võib äsjasünteesitud ja autokatalüüsi läbinud *PCSK9* seonduda LDLR-iga, misjärel juhitakse vastav kompleks trans-Golgi võrgustikust lüsoomaalsesse lagundamisse (Poirier jt., 2009). Alternatiivse variandina seondub sekreteeritud *PCSK9* raku pinnal LDLR-i EGF-prekursori sarnase domeeniga (Zhang jt., 2007). Tekkinud kompleks internaliseeritakse endotsütoosi teel rakku ning *PCSK9* signaali tulemusena lagundatakse kõik kompleksi komponendid lüsoosoomis (Zhang jt., 2008).



Joonis 4. PCSK9 toimemehhanism. (a) Normaalse LDL-kolesterooli omastamise korral internaliseeritakse retseptor-ligand kompleks endotsütoosi teel rakku, kus vabanenud retseptor retsükleeritakse tagasi rakupinnale ning LDL-partikkel lagundatakse lüsoosoomis. (b) Sekreteeritud PCSK9 seondub ekstratsellulaarselt rakupinnal ekspresseeruva LDLR-iga ning tekkinud kompleks internaliseeritakse endotsütoosi teel rakku ja lagundatakse lüsoosoomis. (c) Sünteesitud ja autokatalüütiliselt lõhustatud PCSK9 seondub intratsellulaarselt LDLR-iga ning vastav kompleks suunatakse Golgi kompleksist lüsoosomaalsesse lagundamisse. Lühendid: ER – endoplasmaatiline retiikulum; LDL – madala tihedusega lipoproteiin; LDLR – LDL-retseptor; LDLRAP1 – madala tihedusega lipoproteiini retseptori adaptorvalk 1; PCSK9 – proproteiin-konvertaas subtilisiin/keksiin tüüp 9 (Akram jt., 2010, kohandatud).

1.3.2.4 *LDLRAP1*

Lisaks muutustele *LDLR*, *APOB* ja *PCSK9* geenides võib FH olla põhjustatud ka funktsioonikaoga mutatsioonidest *LDLRAP1* geeni mõlemas koopias (Brautbar jt., 2015). Juba 1964. aastal publitseeritud FH geneetikat kirjeldavas töös märkis A.K. Khachadurian, et vähestel juhtudel on haigusele iseloomulik retsessiivne pärandumismuster (Khachadurian, 1964). Edaspidi hakati vastavat häiret nimetama autosoom-retsessiivseks hüperkolesteroleemiaks (*autosomal recessive hypercholesterolemia* – ARH), et seda eristada *LDLR* geeni mutatsioonidest põhjustatud FH-st (Soutar jt., 2003). Kuigi üldiselt on ARH väga harva esinev geneetiline häire, mida põeb hinnanguliselt üks inimene viiest miljonist, on Sardiinias haiguse esinemissagedus tingituna asutajaefektist, geograafilisest isoleeritusest ja veresugulusest 1:40000 (Rader jt., 2003; Filigheddu jt., 2009). Kliiniliselt sarnaneb ARH *LDLR* geeni mutatsioonidest põhjustatud autosoom-dominantselt päranduva homosügootse FH-ga, kuid on mõnevõrra leebemate sümptomitega (madalam üld- ja LDL-kolesterooli tase ning kõrgem HDL-kolesterooli hulk) (Pisciotta jt., 2006; Soutar ja Naoumova, 2007). Ühelgi

alla 20-aastasel ARH-i patsiendil ei ole kirjeldatud CAD-i esinemist, seevastu autosoom-dominantse pärandumismustriga homosügootset FH-d põdevate indiviidide hulgas ilmneb CAD enne 20. eluaastat enam kui 40% haigetest (Pisciotta jt., 2006).

Kromosoomi 1p36.11 lookuses asuv 25 kb suurune *LDLRAP1* geen kodeerib 308 aminohappe pikkust valku, mille ülesandeks on hõlbustada klatriin-vahendatud retseptor-ligand kompleksi internalisatsiooni maksarakkudesse (Garuti jt., 2005; Pisciotta jt., 2006). *LDLRAP1* seondub LDLR-i tsütoplasmaatilise saba, fosfolipiidide, klatriini ja adaptorvalk 2-ga. *LDLRAP1* fosfotürosiini siduva domeeni ja LDLR-i tsütoplasmaatilises sabas oleva NPXY (Asparagiin-Proliin-X-Türosiin) konsensusjärjestuse vaheline interaktsioon on vajalik LDLR-LDL kompleksi internaliseerumiseks rakku (Garcia jt., 2001). *LDLRAP1* geeni mutatsioonide tõttu on retseptor-ligand kompleksi endotsütoos rakku takistatud, mistõttu ARH-i patsientidele on iseloomulik suurenenud LDL-kolesterooli tase (Soutar jt., 2003). Seega ARH-i puhul produtseeritakse küll korrektne LDLR valk, kuid selle internaliseerumine pole võimalik, mistõttu liigse LDL-kolesterooli eemaldamine on häiritud (Norman jt., 1999).

1.3.3 Perekondliku hüperkolesteroleemia geneetilise etioloogia eripära: mittetäielik penetrantsus, polügeensus, uued geenivariandid

Penetrantsus on defineeritud kui sagedus protsentides, millega konkreetne genotüüp avaldub selle kandjate fenotüübis. Kui täieliku penetrantsuse puhul esineb kõigil haigusseoselise mutatsiooni kandjatel vastav mutantne tunnus, siis mittetäieliku või vähenenud penetrantsuse korral ainult teatud osal vastava genotüübiga indiviididest (Cooper ja Krawczak, 2013). Täiustunud molekulaargeneetika meetodite rakendamine on võimaldanud selgitada osalise penetrantsuse geneetilist tagapõhja ja potentsiaalseid mehhanisme: erinev mutatsioonitüüp (Austin jt., 2009), geeniekspressiooni alleelne variatsioon (Gershoni-Baruch jt., 2002), epigeneetilised faktorid (Robinson jt., 2009), geenide ja keskkonna koosmõju (Kilpelainen jt., 2011), indiviidide sooline ja vanuseline erinevus (Page jt., 2012), modifikaatorgeenide (Daw jt., 2007), koopiaarvu (Carvalho jt., 2012) või ühenukleotiidsete variatsioonide (*single nucleotide variation* – SNV) (Snozek jt., 2009) esinemine. Kuigi enamasti on FH-le omane kõrge penetrantsus (üle 90%), esineb osal patogeense mutatsiooni kandjatest tervetele indiviididele iseloomulik LDL-kolesterooli tase (Pimstone jt., 1998; Fahed ja Nemer, 2011). 2011. aastal läbiviidud uuringus, kus osales 215 indiviidi 24-st perekonnast, tuvastati 97-l FH-d põhjustav mutatsioon *LDLR* või *APOB* geenis. Haiguspõhjusliku mutatsiooni kandjate hulgas esines 7 patsienti, kelle lipiidiprofiil oli normi piires, põhjustades konkreetse fenotüübi

avaldumise supressiooni (Garcia-Garcia jt., 2011). Veelgi hiljutisema uuringu käigus tuvastati aga 44 patogeense mutatsiooni kandjat 164 patsiendi seast (27%), kelle LDL-kolesterooli tase oli alla 130 mg/dl (Khera jt., 2016). Haiguse mittetäieliku penetrantsuse täpsemaks hindamiseks tuleks rohkem tähelepanu pöörata geneetilise testimise vajalikkusele perekondades.

Vastupidiselt eelmainitule võib esineda ka juhte, kus kliinilise diagnoosiga FH patsientidel ei tuvastata mutatsiooni *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* ega *LDLRAP1* geenis. See võib viidata haiguse ühe võimaliku tekkepõhjusena hoopis polügeense efekti esinemisele. Väga kõrge LDL-kolesterooli väärtuse, kuid identifitseerimata haiguspõhjusliku mutatsiooniga patsientidel võib esineda keskmisest suurem hulk väikese efektiga suurenenud lipiiditasemega seotud geneetilisi variante (Talmud jt., 2013). Kõrge plasma LDL-kolesterooli kontsentratsiooniga seotud ühenukleotiidsete polümorfismide põhjal arvutatud riskiskooride töödes on näidatud, et kliinilise diagnoosiga FH patsientidel, kellel ei detekteerita haigust põhjustavat mutatsiooni, esineb võrreldes üldpopulatsiooniga oluliselt kõrgem LDL-kolesterooli geneetiline riskiskoor (Talmud jt., 2013; Futema jt., 2015).

Lisaks võib haiguse esinemine olla seotud mutatsioonidega mõnes seni tuvastamata FH tekkega assotsieerivas geenis (Talmud jt., 2013). Nende indiviidide puhul, kellel ei ole leitud mutatsiooni üheski peamises FH kujunemisega seotud geenis, on rakendatud kogu eksoomi sekveneerimist, mille tulemusena on identifitseeritud potentsiaalsed FH-d põhjustavad kandidaatgeenid, sealhulgas *STAP1*, *CH25H* ja *INSIG2* (Fouchier jt., 2014; Futema jt., 2014; Brænne jt., 2016). Nimetatud geenide ja geenivariantide roll FH kontekstis vajab veel selgitamist.

Mendeliaalse pärandumise korral on näidatud, et harvad reguleerivad variandid mittekodeerivas alas võivad samuti vastutada monogeensete haiguste tekkemehhanismi eest või geneetilise modifikaatorina mõjutada patogeensete variantide penetrantsust või haiguse ekspressiivsust (Weatherall, 2001; Gu jt., 2009, Sankaran jt., 2010). Näiteks on mitmeid geneetilisi polümorfisme β -globiini geeni promootori TATA-järjestuses seostatud β -talasseemia tekkega (Savinkova jt., 2009). Ka FH patsientide puhul on varasemalt kirjeldatud promootorregiooni ja 5' mittetransleeritud ala variantide kausaalset mõju (De Castro-Oros jt., 2011). Seega on FH kontekstis oluline lisaks genoomi kodeerivale alale uurida ka mittekodeerivate reguleerivate variantide potentsiaalset haiguspõhjuslikku efekti.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 TÖÖ EESMÄRK

Lähtuvalt asjaolust, et varasemalt ei ole FH kontekstis regulatoorses alas esinevate genoomsete variantide tuvastamisele ning nende võimaliku haiguspõhjusliku efekti hindamisele põhjalikult keskendunud, oli käesoleva magistr töö praktilise osa eesmärgiks leida potentsiaalsed FH kujunemisega assotsieeruvad regulatoorsed variandid Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu (TÜ EGV) geenidonorite kogu genoomi sekveneerimise (*whole-genome sequencing* – WGS) teel saadud järjestustest.

2.2 MATERJALID JA METOODIKA

2.2.1 Valim

Uurimus põhines TÜ EGV geenidonoritel, kes on biopangaga liitunud üle kogu Eesti. Analüüside läbiviimiseks kasutati ülegenoomselt sekveneeritud geenidonorite DNA andmeid. LDL-kolesterooli tasemel põhinevates analüüsides oli valimi suuruseks 2004 indiviidi (1002 meest ja 1002 naist; vanuses 18 kuni 89 eluaastat). ApoB väärtusega teostatud analüüsis oli valimi suuruseks 2107 indiviidi (1056 meest ja 1051 naist; vanuses 18 kuni 89 eluaastat). Valimi kirjeldus on toodud tabelis 1. Käesoleva töö raames teostatavate uuringute läbiviimiseks on geenidonorid andnud informeeritud nõusoleku ning olemas on Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee kooskõlastus.

Tabel 1. Käesoleva magistr töö praktilise osa läbiviimisel kasutatud valimi kirjeldus.

	LDL-C analüüsid		ApoB analüüs	
	Mehed	Naised	Mehed	Naised
Sugu	50%	50%	50%	50%
Vanus	46,4 (18,1)	47,4 (17,6)	45,9 (18,3)	47,5 (17,7)
LDL-C	106,5 (34,6)	108,1 (34,5)	-	-
ApoB	-	-	102,3 (25,3)	101,5 (25,3)
Ravimid	8,8%	6,7%	8,6%	6,7%

Tabelis on toodud meeste ja naiste osakaal; meeste ja naiste keskmine vanus ning sulgudes standardhälve; meeste ja naiste keskmine LDL-kolesterooli väärtus ning sulgudes standardhälve; meeste ja naiste keskmine ApoB tase ning sulgudes standardhälve; lipiidisisaldust muutvate ainete manustamise osakaal meeste ja naiste seas. Lühendid: ApoB – apolipoproteiin B; LDL-C – madala tihedusega lipoproteiini koosseisus olev kolesterool.

2.2.2 Fenotüübiandmestik

Statistiliste analüüside läbiviimiseks kasutati pidevate tunnustena Broad Instituudis vertikaalrootoriga tihedusgradient-ultratsentrifuugimisel põhineva VAP (*vertical auto profile*) testiga mõõdetud TÜ EGV geenidoonorite plasma LDL-kolesterooli ja ApoB (ApoB-100) väärtusi. Kovariaatidena kaasati analüüsidesse sugu, vanus, ravimite manustamine, viimasest söömisest möödunud tundide arv ning populatsiooni stratifikatsiooni suhtes kohandamiseks neli esimest peakomponenti, mis arvutati proovide omavahelise suguluse põhjal multidimensionaalse skaleerimise meetodil. Lähtuvalt anatoomilis-terapeutilisest keemilisest ehk ATC-klassifikatsioonist võeti analüüsides arvesse lipiidisisaldust muutvate ainete, täpsemalt statiinide (C10AA) manustamist. Statistikapaketis R⁴ (versioon 2.15.3) hinnati kovariaatide efekti ning *Shapiro-Wilk*'i testi kasutades tunnuste vastavust normaaljaotusele.

2.2.3 Genotüübiandmestik

TÜ EGV geenidoonorite DNA täielik järjestamine viidi läbi Broad Instituudis, kasutades teise põlvkonna sekveneerimisel põhinevat Illumina HiSeq X platvormi, kus iga positsioon genoomis loeti keskmiselt 30 korda. PCR-vaba meetodiga tagati analüüsi usaldusvärsus ja genoomi ühtlane kattuvus. Broad Instituudi poolt väljatöötatud standardse protokollil alusel teostati sekveneeritud andmete kvaliteedikontroll ja bioinformaatiline töötlus. Käesoleva töö läbiviimisel kasutatud WGS andmestik sisaldas referentsist erinevaid ühenukleotiidsid variatsioone ja indeleid (insertsioonid, deletsioonid). Piirkondadepõhine variantide väljavõtmine teostati programmiga R. Nimetatud bioinformaatilised protsessid viidi läbi TÜ EGV bioinformaatika töögrupi poolt.

2.2.4 Geenide valik ja statistiline analüüs

Potentsiaalsete FH-d mõjutavate reguleerivate variantide identifitseerimiseks teostati kolm kahel eri lähenemisel põhinevat assotsiatsioonanalüüsi. Esimeses lähenemises võeti uurimise alla 4 FH tekkega assotsieeruvat geeni (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*) ja neid ümbritsev ala 250 kb ulatuses (LISA 2 Tabel 1). Teadaolevalt jääb ligi 95% uuritava geeni ekspressiooni mõjutavaid kvantitatiivsete tunnuste lookuseid 250 kb ümbrusesse (Westra jt., 2013). Lineaarne regressioonanalüüs viidi läbi nii LDL-kolesterooli kui ka ApoB taseme suhtes.

⁴<https://www.r-project.org>

Lisaks teostati LDL-kolesterooli puhul teine analüüs, millesse kaasati DEPICT⁵ (*Data-driven Expression-Prioritized Integration for Complex Traits*) tööriistaga ning *Gene Ontology*⁶ andmebaasi alusel tuletatud kahe eri geenilisti võrdlemisel saadud võimalikud FH etioloogiat mõjutavad geenid ja neid ümbritsev ala 250 kb ulatuses (LISA 2 Tabel 2). Esimese geenilisti tuletamiseks kasutati 2015. aastal läbiviidud lipiiditunnustel põhineva ülegenoomse assotsiatsiooniuuringu (*genome-wide association study* – GWAS) tulemusi (Surakka jt., 2015). Nimetatud GWAS-is identifitseeritud LDL-kolesterooli tasemega seotud ülegenoomselt statistiliselt olulistele (p-väärtus < 5 x 10⁻⁸) geneetilistele variantidele teostati geeni prioritseerimise (*gene prioritization*) analüüs, kasutades DEPICT tööriista. DEPICT võimaldab etteantud kromosoomi lookuses süstemaatiliselt prioritseerida kõige tõenäolisema põhjusliku geeni, mida konkreetne geneetiline variant mõjutab. DEPICT on uudne bioinformaatiline geenide funktsioone ennustav meetod, mille arvutuslikud algoritmid põhinevad ~78000 geeniekspressiooni kiibi ja ~14000 varasemalt anoteeritud geenikomplekti andmetel. DEPICT võimaldab geenide ekspressiooni korrelatsioonimustreid kasutades ennustada geenidele seni veel tuvastamata funktsioone (Pers jt., 2015). Geeni prioritseerimise teel saadud tulemustest filtreeriti edasiseks võrdluseks välja geenid, mille FDR (*false discovery rate*) jäi alla 0,05. Teine geenilist põhines *Gene Ontology* andmebaasis LDLR-iga seotud bioloogilistesse radadesse kuuluvatel geenidel. Vastavate radade spetsiifilisuse tõstmiseks ja geenide redundantsuse vähendamiseks võeti LDLR-iga assotsieeruvatest molekulaarsetest radadest arvesse iga raja tipmine alaharu.

Statistilised analüüsid viidi läbi programmiga SNPTEST v2.5 (Marchini jt., 2007), kus harvade variantide arvestamise seisukohalt valiti meetodiks EM (*expectation-maximization*) algoritm. Lisaks eemaldati andmestikust 1., 2., ja 3. astme sugulased. Analüüside teostamise järgselt filtreeriti tulemustest edasiseks tõlgendamiseks välja geneetilised variandid, mis esinesid WGS andmestikus vähemalt kolm korda (*allele count* ≥ 3). Geneetiliste markerite statistilise olulisuse nivoo väljaselgitamiseks kasutati Bonferroni korrigeerimist.

2.2.5 Tulemuste visualiseerimine ja interpreteerimine

Lineaarse regressioonanalüüsi tulemuste visualiseerimiseks koostati Manhattan ja kvantiilide (*quantile-quantile* – QQ) joonised. Manhattan joonis võimaldab visualiseerida leitud

⁵ <http://www.broadinstitute.org/mpg/depict/>

⁶ <http://geneontology.org>

assotsiatsioonid vastavalt nende kromosomaalsetele asukohtadele. QQ joonis visualiseerib leitud assotsiatsioonide p-väärtuste kõrvalekaldeid nullhüpoteesist (Ehret, 2010). Tulemuste analüüsimiseks ja interpreteerimiseks kasutati järgmiseid andmebaase:

- *Ensembl* (GRCh37/hg19)⁷ – Euroopa Bioinformaatika Instituudi ja Wellcome Trust Sanger Instituudi poolt hallatav DNA järjestuste andmetel põhinev andmebaas, mis võimaldab analüüsida nii inimese kui ka peamiste mudelorganismide genoomi annotatsioone (Yates jt., 2016);
- *UCSC Genome Browser*⁸ – California Santa Cruz Ülikooli bioinformaatika grupi poolt hallatav ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) projekti andmetega integreeritud andmebaas, mis võimaldab uurida selgroogsete ning teatud mudelorganismide genoomi järjestusi ja annotatsioone (Speir jt., 2016);
- *Gene Network*⁹ – ~80000 GEO (*Gene Expression Omnibus*) andmebaasis olevate inimeste, hiirte ja rottide geeniekspressiooni kiibi analüüsitulemustel põhinev andmestik, mis võimaldab ennustada geeni funktsioone *Gene Ontology*, *Reactome*, *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) ja *BioCarta* andmebaasides oleva info alusel;
- *Gene Ontology*¹⁰ – mitmete eri allikate ja uurimisgruppide andmetel põhinev andmebaas, mis võimaldab uurida geeni bioloogilisi funktsioone molekulaarsel, rakulisel ja koe tasemel (Ashburner jt., 2000);
- *GTEX (Genotype-Tissue Expression)*¹¹ – ~450 surmajärgse doonori 51 eri koe RNA sekveneerimistulemustel ja genotüübiandmetel põhinev andmebaas, mis võimaldab uurida geneetiliste variatsioonide ja geeniekspressiooni vahelisi seoseid inimese kudedes (Lonsdale jt., 2013);
- *HaploReg v4.1*¹² – Broad Instituudi poolt hallatav 1000 Genoomi Projekti andmetel põhinev andmebaas, mis võimaldab uurida mittekodeerivate genoomivariantide annotatsioone (Ward ja Kellis, 2016);
- *RegulomeDB*¹³ – GEO andmebaasi ja ENCODE projekti andmetel ning publitseeritud teadusartiklil põhinev andmebaas, mis võimaldab annoteerida inimese intergeensetes regulatoorsetes elementides esinevaid variante (Boyle, jt., 2012).

⁷ <http://grch37.ensembl.org/index.html>

⁸ <https://genome.ucsc.edu>

⁹ <http://129.125.135.180:8080/GeneNetwork/?gene>

¹⁰ <http://geneontology.org>

¹¹ <http://www.gtexportal.org>

¹² <http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>

¹³ <http://regulomedb.org>

2.3 TULEMUSED

2.3.1 Geenide valik

I. Surakka jt. (2015) poolt läbiviidud GWAS-is identifitseeritud 6205-le LDL-kolesterooli tasemega seotud geneetilisele variandile p-väärtusega $< 5 \times 10^{-8}$ teostati geeni prioritseerimise analüüs, kasutades DEPICT tööriista. Selle tulemusena tuvastati kõige tõenäolisemad põhjuslikud geenid 208-s erinevas lookuses. Nende hulgast filtreeriti edasiseks võrdluseks välja 45 geeni, mille FDR oli väiksem kui 0,05. *Gene Ontology* andmebaasi põhjal leiti 32 erinevat LDLR-iga seotud bioloogilist rada (LISA 2 Tabel 3). Vastavatesse radadesse kuulus kokku 5481 unikaalset geeni. 45 ja 5481 geeni omavahelise võrdlemise tulemusena identifitseeriti 24 potentsiaalset FH etioloogiaga seotud kattuvat geeni.

2.3.2 Kovariaatide efekti kirjeldamine ja normaaljaotuse hindamine

Kovariaatide olulisuse hindamiseks kontrolliti, kas ravimi manustamine ning viimasest söömisest möödunud tundide arv omavad efekti LDL-kolesterooli ja ApoB väärtustele. Ravimi võtmisel esines oluline mõju nii LDL-kolesterooli kui ka ApoB tasemetele (p-väärtused vastavalt $< 2 \times 10^{-16}$ ja $5,83 \times 10^{-11}$). Ravimi võtmisele kohandatud lipiiditaseme saamiseks jagati sama fenotüüpi analüüsivate tööde eeskujul kõigi ravimimanustajate LDL-kolesterooli väärtus 0,7-ga (Peloso jt., 2014). Kuigi üldjuhul mõõdetakse patsientide seerumi lipiidiprofiili rahvusvaheliste juhiste kohaselt söömata olekus, on erinevate uuringute käigus näidatud vastuolulisi tulemusi (Langsted jt., 2008; Doran jt., 2014). Seega otsustati ka antud töös hinnata viimasest söömisest möödunud tundide arvu efekti nii LDL-kolesterooli kui ka ApoB tasemele. Viimasest söömisest möödunud tundide arv omas mõju LDL-kolesterooli tasemele (p-väärtus = 0,00099), kuid mitte ApoB väärtusele (p-väärtus = 0,38474).

Tunnuste normaaljaotust hinnati *Shapiro-Wilk*'i testiga (nullhüpotees: tegemist on normaaljaotusega). Kuna tunnused ei jaotunud originaalskaalal ega log-transformeeritud kujul normaaljaotuse kohaselt (p-väärtus $< 0,05$), tehti normaaljaotusele vastavate LDL-kolesterooli ja ApoB väärtuste saamiseks nimetatud tunnuseid mõjutavate faktorite suhtes kohandatud mudeli jääkidele pöördnormaaltransformatsioon. Seejuures võeti ravimi manustamise suhtes kohandatud LDL-kolesterooli mõjutavate faktoritena arvesse sugu, vanus ja viimasest söömisest möödunud tundide arv ning ApoB puhul sugu, vanus ja ravimi võtmine. Saadud normaliseeritud väärtusi kasutati edasiseks analüüsiks programmiga SNPTEST v2.5 kolmes eri mudelis:

- 1) normaliseeritud LDL-kolesterooli väärtus, kovariaadina võeti arvesse neli esimest peakomponenti ning seletavaks tunnuseks olid geenimarkerid 4 FH põhigeenis ja ± 250 kb suuruses alas (kokku analüüsiti 13392 markerit) – edaspidi LDL-C ja 4 geeni analüüs;
- 2) normaliseeritud ApoB väärtus, kovariaadina võeti arvesse neli esimest peakomponenti ning seletavaks tunnuseks olid geenimarkerid 4 FH põhigeenis ja ± 250 kb suuruses alas (kokku analüüsiti 13567 markerit) – edaspidi ApoB ja 4 geeni analüüs;
- 3) normaliseeritud LDL-kolesterooli väärtus, kovariaadina võeti arvesse neli esimest peakomponenti ning seletavaks tunnuseks olid geenimarkerid kahe geenilisti võrdlusel tuvastatud 24 geenis ja ± 250 kb suuruses alas (kokku analüüsiti 75187 markerit) – edaspidi LDL-C ja 24 geeni analüüs.

2.3.3 Statistiline analüüs

Bonferroni korrektsiooni tulemusena loeti statistiliselt olulisteks tulemusteks geneetilised variandid, mille p-väärtus oli $< 3,7 \times 10^{-6}$ (LDL-C ja 4 geeni ning ApoB ja 4 geeni analüüs) ja $< 6,7 \times 10^{-7}$ (LDL-C ja 24 geeni analüüs). Kuna teostatud analüüside raames ei leitud statistiliselt olulisi assotsiatsioone, keskenduti tulemuste tõlgendamisel geneetilistele markeritele, mille p-väärtus oli väiksem kui 10^{-4} .

Kolme assotsiatsioonanalüüsi tulemusena tuvastati kokku 7 unikaalset TÜ EGV WGS andmestikus heterosügootses olekus esinevat introonset või intergeenset geneetilist varianti, mille p-väärtused olid väiksemad kui 10^{-4} . LDL-C ja 4 geeni analüüsi tulemusena identifitseeriti *MAN1C1* geeni intronis paiknev geneetiline variant, mille p-väärtus oli $4,7 \times 10^{-5}$. Sama variant tuvastati ka ApoB ja 4 geeni ning LDL-C ja 24 geeni analüüsis p-väärtustega vastavalt $1,7 \times 10^{-5}$ ja $4,7 \times 10^{-5}$. Eelmainitud variant esines WGS andmestikus kolmel indiviidil. Lisaks identifitseeriti ApoB ja 4 geeni analüüsi tulemusena kuuel indiviidil introonne variant *C2orf43* geenis p-väärtusega $4,4 \times 10^{-5}$. LDL-C ja 24 geeni analüüsis tuvastati veel 3 geneetilist varianti *ASGR1*, *CBLC* ja *CEACAM16* geenide intronites p-väärtustega $1,1 \times 10^{-5}$, $3,9 \times 10^{-5}$ ja $4,4 \times 10^{-5}$. *ASGR1* ja *CEACAM16* geenide markerid esinesid kolmel ning *CBLC* geeni polümorfism neljal indiviidil. Lisaks identifitseeriti kaks intergeenset ehk geenidevahelist varianti (p-väärtused $3,9 \times 10^{-5}$ ja $4,2 \times 10^{-5}$). 19. kromosoomis paiknev intergeenne marker oli WGS valimis esindatud neljal indiviidil. 11. kromosoomis tuvastatud intergeenne variant oli käesoleva töö tulemusena identifitseeritud

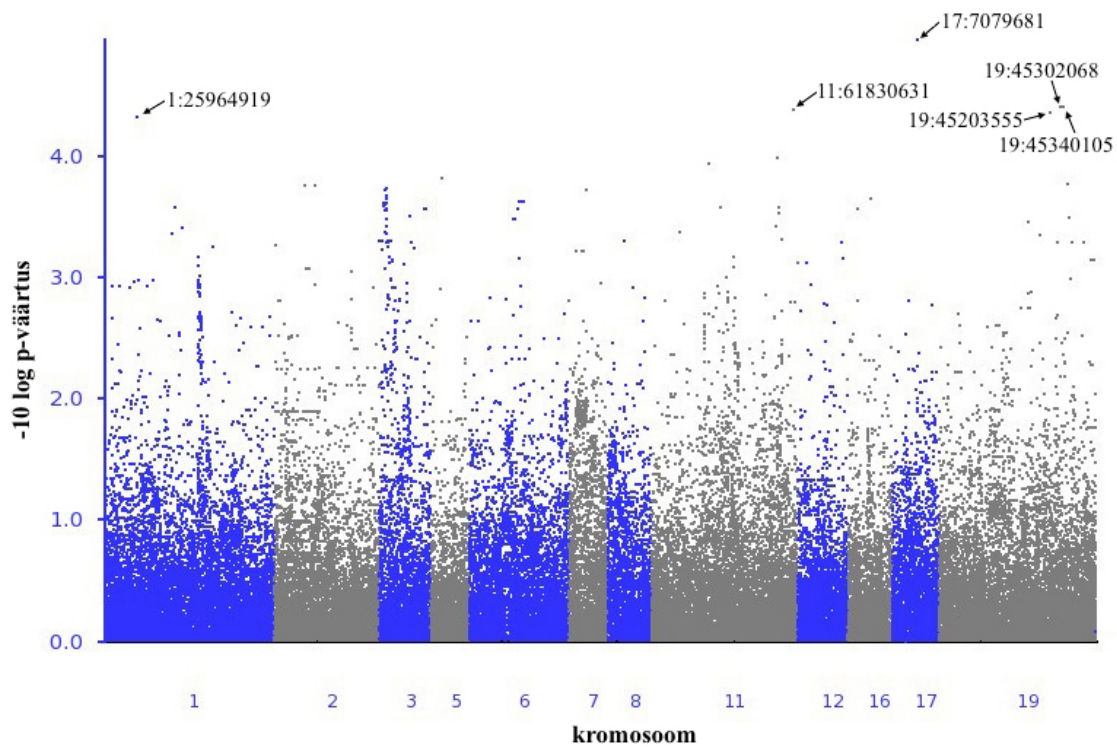
geneetilistest markeritest kõige sagedasem, esinedes 33-l indiviidil. Statistiliste analüüside põhitulemused on detailsemalt esitatud tabelis 2.

Tabel 2. Kolme lineaarse regressioonanalüüsi põhitulemused. Paksu musta joonega on eristatud kolme analüüsi, vastavalt LDL-C ja 4 geeni, ApoB ja 4 geeni ning LDL-C ja 24 geeni tulemused.

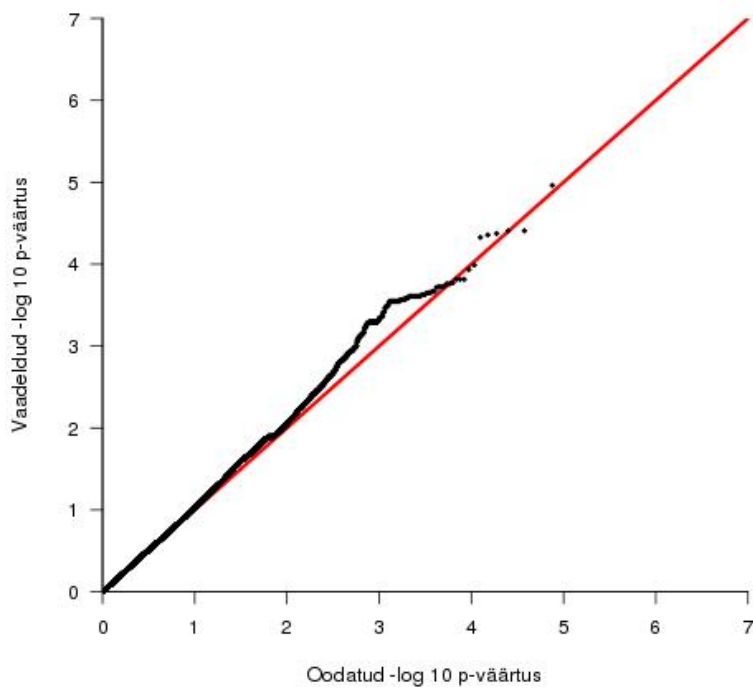
SNV/indel (rs-number või positsioon)	Genoomipiirkond	Efektiivne/ mitteefektiivne	EAF	β -väärtus (SE) p-väärtus
1:25964919	<i>MAN1C1</i> geeni intronis	G/A	0,0007	-2,3389 (0,5736) 4,7224 x 10 ⁻⁵
1:25964919	<i>MAN1C1</i> geeni intronis	G/A	0,0007	-2,4809 (0,5747) 1,6528 x 10 ⁻⁵
2:20991905	<i>C2orf43</i> geeni intronis	C/T	0,0013	1,6657 (0,4069) 4,3914 x 10 ⁻⁵
17:7079681	<i>ASGR1</i> geeni intronis	AC/A	0,0007	-2,5276 (0,5732) 1,0888 x 10 ⁻⁵
rs766871310 19:45302068	<i>CBLC</i> geeni intronis	A/G	0,0009	-2,0474 (0,4969) 3,9239 x 10 ⁻⁵
rs374433944 19:45340105	Intergeenne	A/ATGT	0,0009	-2,0474 (0,4969) 3,9239 x 10 ⁻⁵
rs142571857 11:61830631	Intergeenne	T/C	0,0085	-0,7151 (0,1743) 4,2177 x 10 ⁻⁵
rs776400882 19:45203555	<i>CEACAM16</i> geeni intronis	A/G	0,0007	-2,3486 (0,5736) 4,3924 x 10 ⁻⁵
1:25964919	<i>MAN1C1</i> geeni intronis	G/A	0,0007	-2,3389 (0,5736) 4,7224 x 10 ⁻⁵

Lühendid: EAF – efektiivse alleeli sagedus; SE – standarderror.

LDL-C ja 24 geeni analüüsi tulemuste visualiseerimiseks koostatud Manhattan ja QQ joonised on esitatud vastavalt joonistel 5 ja 6. Lisas 3 on välja toodud ka LDL-C ja 4 geeni ning ApoB ja 4 geeni tulemusi iseloomustavad Manhattan ja QQ joonised.



Joonis 5. LDL-C ja 24 geeni analüüsi tulemusi iseloomustav Manhattan joonis. X-teljel on toodud kromosoominumber ning y-teljel p-väärtuste negatiivne kümnendlogaritm.



Joonis 6. LDL-C ja 24 geeni analüüsi tulemusi iseloomustav QQ joonis. X-teljel on toodud oodatud ning y-teljel vaadeldud p-väärtuste negatiivne kümnendlogaritm.

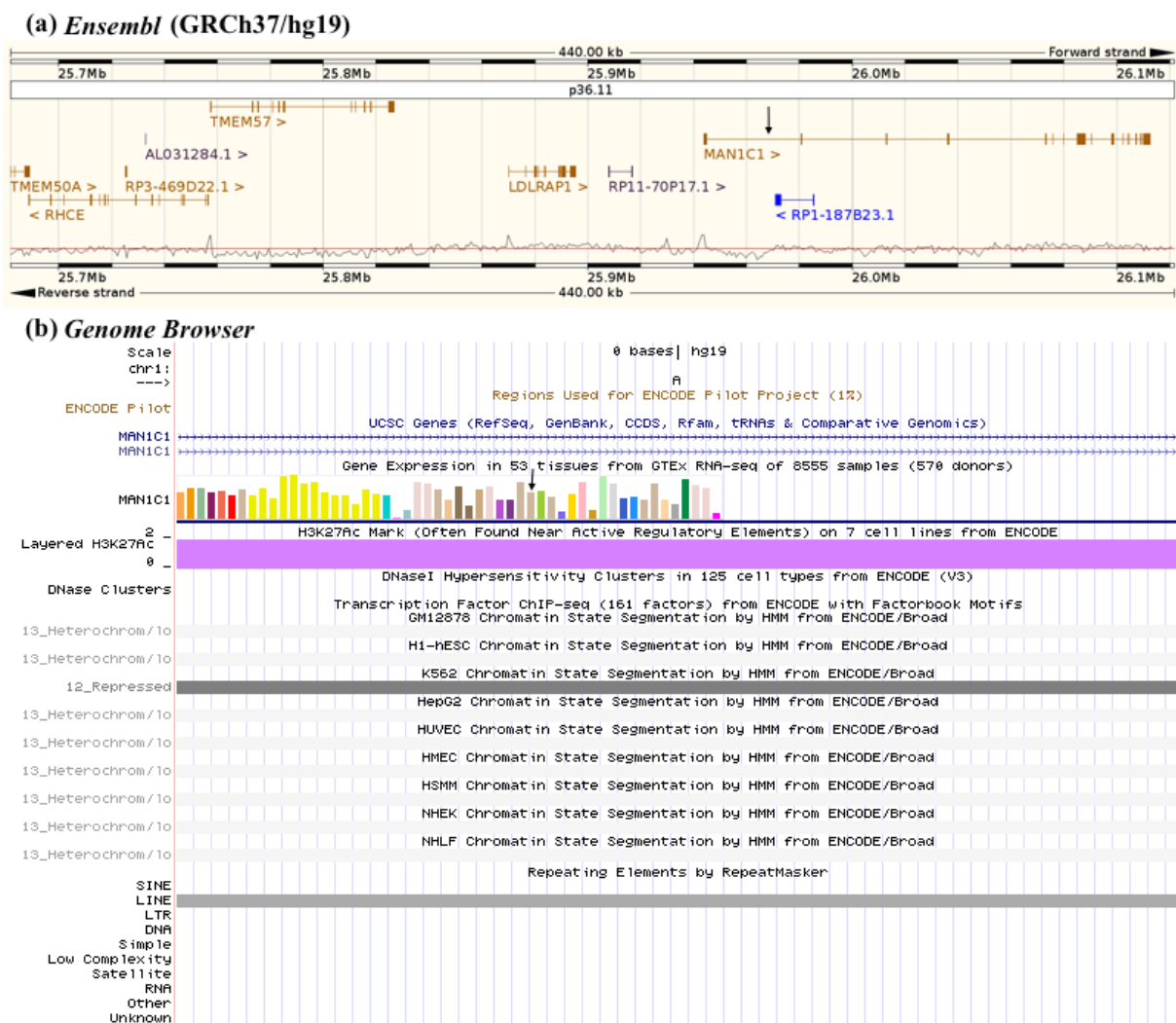
2.4 TULEMUSTE ANALÜÜS JA ARUTELU

Perekondliku hüperkolesteroleemia kui monogeense haiguse peamiseks põhjuseks peetakse mutatsioone *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* ja *LDLRAP1* geenides (Singh ja Bittner, 2015). Samas lubavad mitmete uuringute tulemused oletada, et FH etioloogia võib seni arvatust olla palju komplekssem (Talmud jt., 2013; Futema jt., 2015). Ligi 20% kõrge LDL-kolesterooli tasemega patsientidest ei klassifitseeru geneetilise testimise järel FH-d põdevate indiviidide hulka, sest neil ei esine mutatsiooni üheski eelmainitud geenis (Taylor jt., 2010; Hopkins jt., 2011). See võib tuleneda nii haiguse võimalikust polügeensest efektist, mutatsioonidest mõnes seni tuvastamata FH tekkega assotsieerivas geenis kui ka geneetilistest variantidest väljaspool genoomi kodeerivat ala.

FH patogeneesi detailsema mõistmise seisukohalt oli käesoleva töö eesmärgiks leida potentsiaalseid haiguse kujunemisega seotud reguloorseid variante. Selleks viidi läbi nii LDL-kolesterooli kui ka ApoB tasemel põhinevad assotsiatsioonanalüüsid, mille tulemusena tuvastati seitse võimalikku reguloorset varianti p -väärtustega $< 10^{-4}$. Kuna tegemist oli hüpoteesipõhise lähenemisega, on oluline lahti mõtestada identifitseeritud geneetiliste variantide bioloogiline roll nii LDL-metabolismi kui ka FH kontekstis.

Nii LDL-kolesterooli kui ka ApoB tasemetel põhinevate analüüside tulemusena identifitseeriti 1. kromosoomi positsioonis 25964919 paiknev geneetiline variant, mis asub *MAN1C1* geeni intronis. Nimetatud geen osaleb asparagiin-seotud oligosahhariidide küpsemisel. Uuringute tulemusena on näidatud *MAN1C1* geeni ekspressiooni taseme tõusu perifeerse vere mononukleaarsetes rakkudes hepatiit B viiruse korral (Jiang jt., 2016). Lisaks kõrgele ekspressioonitasemele ajus ja kilpnäärmes, avaldub vastav geen ka maksas. *Genome Browser* andmebaasi järgi paikneb identifitseeritud variant LINE (*long interspersed nuclear element*) alas ning on NHEK (*normal human epidermal keratinocytes*) rakuliinis seotud aktiivset transkriptsiooni iseloomustava histooni modifikatsiooniga (H3K27Ac), samas K562 rakuliinis hoopis transkriptsiooni repressiooniga (Joonis 7). *MAN1C1* geen asub ~208 kb kaugusel *RHCE* geenist (tuvastatud kahe geenilisti võrdlemisel), mis *Gene Ontology* andmebaasi järgi kuulub LDLR-iga seotud bioloogilistes radades plasmamembraani integraalse komponendi alla. *Gene Network* andmebaasi alusel on *MAN1C1* geen seotud rakumembraani kaetud lohu klatriinist ümbriseega. Nimetatud geen paikneb ~69 kb kaugusel *LDLRAP1* geenist, mis vahendab retseptor-ligand kompleksi lokalisatsiooni klatriiniga kaetud lohkudesse ja internalisatsiooni rakku retseptor-vahendatud endotsütoosi kaudu (Garuti jt., 2005). Klatriini

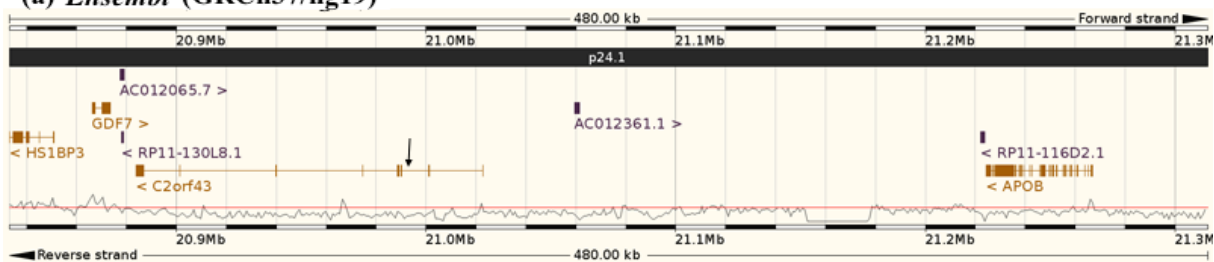
polügonaalne sõrestik (*polygonal lattice*), mis omab primaarset tähtsust endotsütootilise protsessi toimumisel, vastutab korrektse membraani kuju tekkimise eest, võimaldades kaetud vesiikuli moodustumist (Mousavi jt., 2004). Erinevate uuringute tulemusena on näidatud, et klatriini sõrestiku puudumisel rakumembraani pinnal ei ole retseptor-ligand kompleks võimaline rakku internaliseeruma (Larkin jt., 1983; Sandvig jt., 1987). Kuigi *MAN1C1* geeni seost lipiidide metabolismiga pole varasemalt kirjeldatud, võib nimetatud geen hüpoteetiliselt mängida rolli klatriin-vahendatud retseptor-ligand kompleksi internaliseerumisel rakku. Funktsionaalsed katsed võimaldaksid paremini mõista *MAN1C1* geeni ja selle poolt kodeeritava valgu funktsiooni maksakoes ning võimalikku assotsiatsiooni uuritava fenotüübiga.



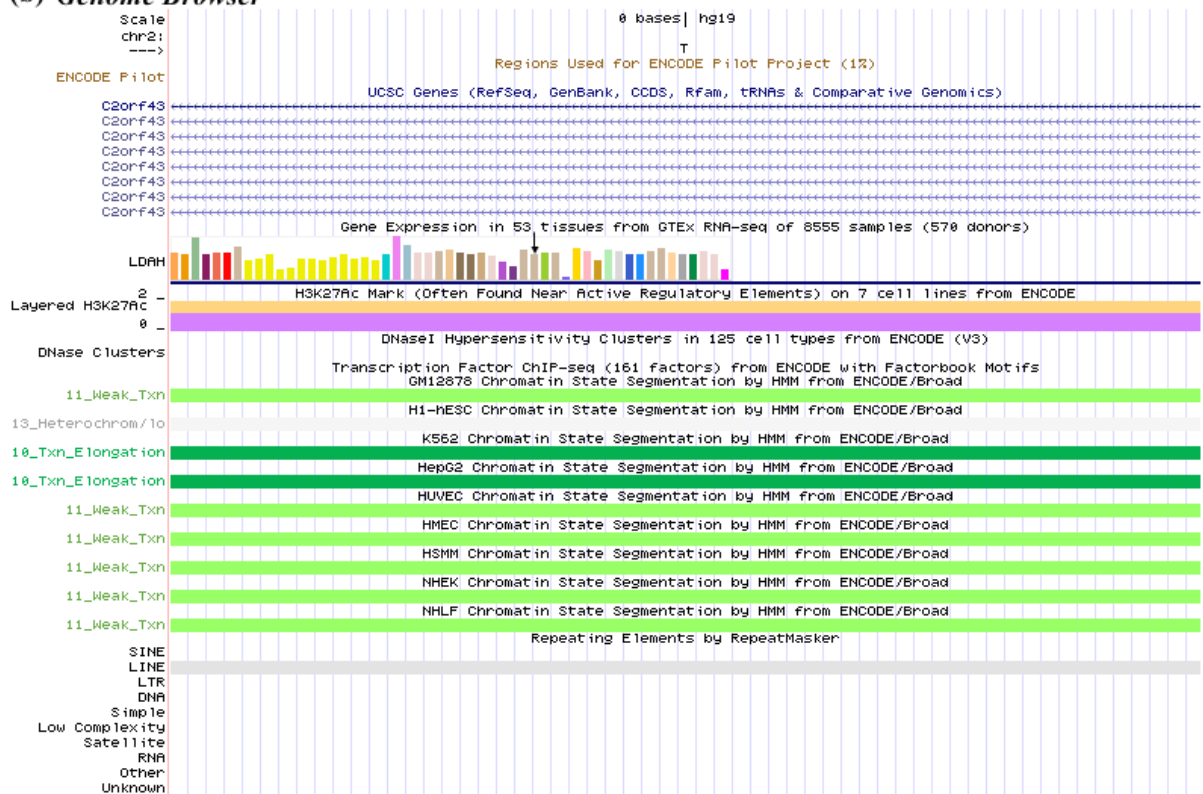
Joonis 7. *Ensembl* (GRCh37/hg19) ja *Genome Browser* andmebaasidel põhinevad illustatsioonid. (a) Pildil on kujutatud *MAN1C1* geeni asukoht ning kaugus *LDLRAP1* ja *RHCE* geenist. Musta noolega on tähistatud analüüsi tulemusena identifitseeritud *MAN1C1* geeni intronis paikneva geneetilise variandi (1:25964919) asukoht. (b) Pildil on kujutatud *MAN1C1* geeni ekspresioonitase erinevates kudedes ning eelmainitud geneetilise variandiga seotud epigeneetiline profiil ja korduselemendid. Musta noolega märgitud tulp tähistab *MAN1C1* geeni ekspresioonitaset maksas.

ApoB tasemel põhinevas analüüsis identifitseeriti 2. kromosoomi positsioonis 20991905 paiknev variant, mis asub *C2orf43* ehk *LDAH* geeni intronis. Nimetatud geen on ~232 kb kaugusel *APOB* geenist, mis toimib LDLR-i ligandina ning võimaldab LDL-partiklil interakteeruda retseptoriga. Mutatsioonid *APOB* geenis on seotud ApoB-100 perekondliku defektiga (Borén jt., 2001). Ühe uuringu tulemusena on näidatud ka *C2orf43* geeni ühenukleotiidsel polümorfismi (rs4971516) ja suurenenud LDL-kolesterooli taseme ning FH tekke vahelist seost (Shen jt., 2010). *C2orf43* geeni ekspressiooni on muuhulgas täheldatud ka maksas. *Genome Browser* andmebaasi alusel on antud töös tuvastatud geneetiline variant H1-hESC (*H1 human embryonic stem cells*) ja NHEK rakuliinides seotud aktiivset transkriptsiooni iseloomustava histooni modifikatsiooniga (H3K27Ac) ning K562 ja HepG2 (*hepatoblastoma G2*) rakuliinides transkriptsiooni elongatsiooniprotsessiga (Joonis 8). *LDAH* geen on metaboolne seriini hüdrolaas, mis osaleb kolesterooli homöostaasis. Nimetatud geen on kõrgelt ekspresseeritud makrofaagirikastes piirkondades aterosklerootilistes haiguskolletes ning selle ülesreguleerimine suurendab kolesterooli hüdrolyüsi ja seeläbi kolesterooli väljavoolu makrofaagidest. Seega *LDAH* geen soodustab vastupidist kolesterooli transporti, omades tõhusat antiaterogeenset toimet (Goo jt., 2014). Kuna FH-d põdevad invidiidid on LDL-kolesterooli metabolismi häirimise tõttu rohkem vastuvõtlikud LDL-kolesterooli ladestumisele arterite seintele, võib oletada, et tuvastatud geenivariandi ja *LDAH* geeni vaheline seos avaldub pigem tüsistuse kontekstis. Hüpoteesi kinnitamiseks on vajalik identifitseeritud geneetilise polümorfismi efekti *LDAH* geeni toimemehhanismile põhjalikumalt uurida, näiteks hinnata nimetatud geeni ja geenivariantide ekspressiooni efekti maksa ja koronaararteri koes.

(a) *Ensembl* (GRCh37/hg19)



(b) *Genome Browser*



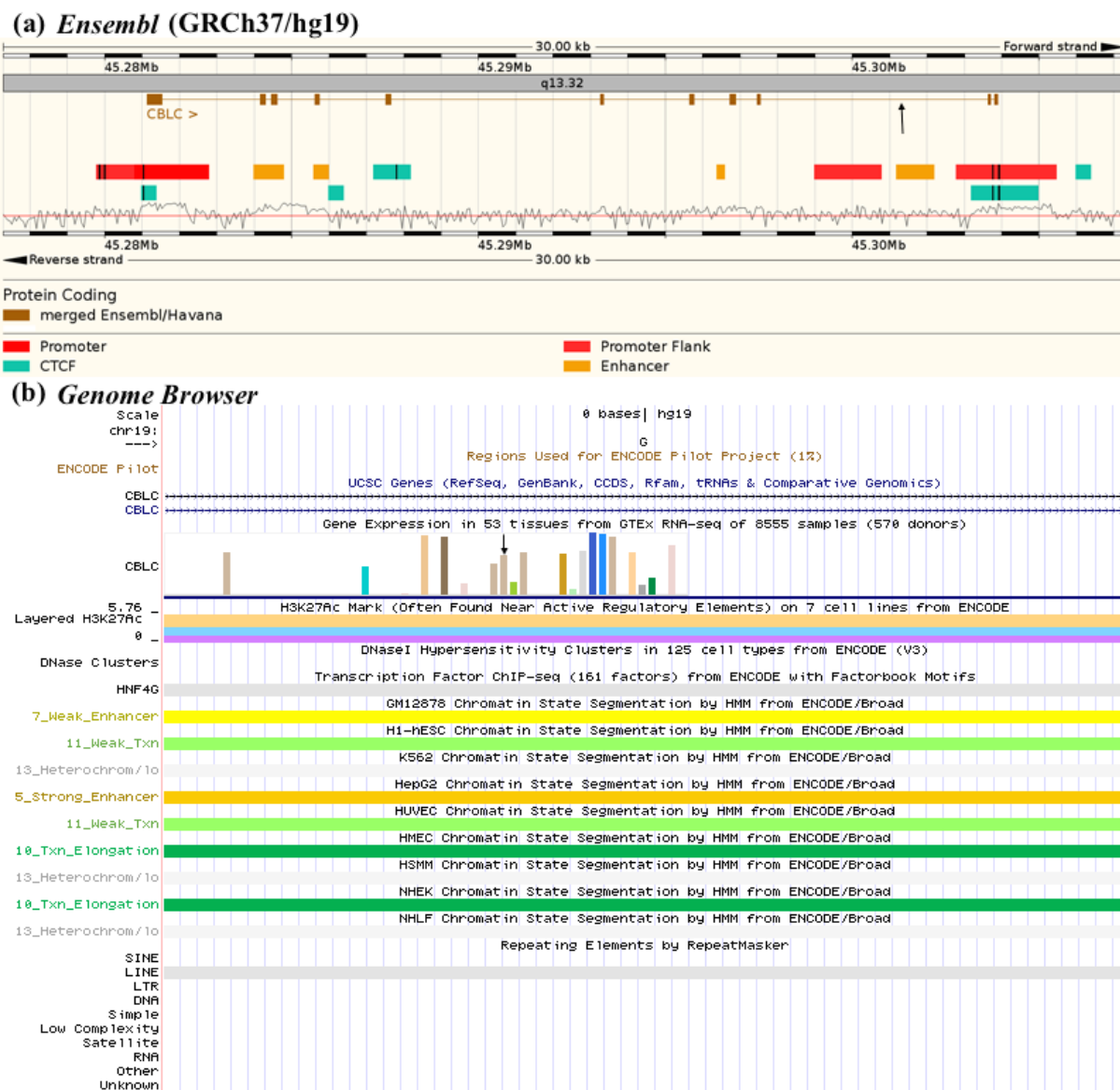
Joonis 8. *Ensembl* (GRCh37/hg19) ja *Genome Browser* andmebaasidel põhinevad illustatsioonid. (a) Pildil on kujutatud *C2orf43* geeni asukoht ning kaugus *APOB* geenist. Musta noolega on tähistatud analüüsi tulemusena identifitseeritud *C2orf43* geeni intronis paikneva geneetilise variandi (2:20991905) asukoht. (b) Pildil on kujutatud *C2orf43* geeni ekspressioonitase erinevates kudedes ning eelmainitud geneetilise variandiga seotud epigeneetiline profiil ja korduselemendid. Musta noolega märgitud tulp tähistab *C2orf43* geeni ekspressioonitaset maksas.

17. kromosoomis identifitseeritud geneetiline variant positsiooniga 7079681 paikneb *ASGR1* geeni intronis (tuvastatud kahe geenilisti võrdlemisel). Nimetatud geen kodeerib asialoglükovalgu retseptorit (ASGPR), mis avaldub maksarakkude pinnal ja mängib olulist rolli seerumi glükoproteiinide homöostaasil, vahendades glükoproteiinide endotsütoosi ja lüsoosomaalset degradatsiooni. Seega esineb asialoglükovalgu retseptoril sarnane toimemehhanism LDLR-iga, kuid lipoproteiinide asemel tunneb ASGPR ära asialüülitud glükokonjugaate, mis sisaldavad terminaalset galaktoosi või N-atsetüülgalaktoosamiini jääki (Onizuka jt., 2012). Lisaks võib ASGPR olla potentsiaalne sihtmärk maksa-spetsiifiliseks ravimite kohaletoimetamiseks (Plank jt., 1992; Rozema jt., 2007). *Genome Browser* andmebaasile vastavalt on analüüsi tulemusena identifitseeritud variant erinevates rakuliinides

seotud aktiivset transkriptsiooni iseloomustava histooni modifikatsiooniga (H3K27Ac) ning paikneb piirkonnas, mis kattub HepG2 rakuliinis enhaanser-alaga. Sellest lähtuvalt oleks oluline tuvastatud varianti uurida ka normaalse maksakoe kontekstis, kusjuures GTEX-i alusel on *ASGR1* geeni ekspressiooni täheldatud vaid maksas. *Gene Network* andmebaasis seostatakse nimetatud geeni muuhulgas lipoproteiinide assambleerimise ja organiseerimisega. Kui varasemalt ei olnud üheski uuringus *ASGR1* geeni ja lipoproteiinide metabolismi vahelist assotsiatsiooni kirjeldatud, siis hiljuti läbiviidud islandlaste täisgenoomi järjestustel põhinevas töös tuvastati kaks funktsioonikaoga varianti *ASGR1* geenis, mis on seotud madalama mitte-HDL-kolesterooli tasemega ja vähenenud CAD-i tekke riskiga (Nioi jt., 2016). Arvatakse, et ASGPR-i võimalik interaktsioon asialüülitud LDLR-iga võib mõjutada LDLR-i retsükliatsiooni ja seeläbi LDL-kolesterooli sisaldust plasmas (Nioi jt., 2016). Seega ei saa välistada käesolevas töös identifitseeritud geneetilise variandi võimalikku rolli lipiiditasemete mõjutamisel.

19. kromosoomi positsioonis 45302068 paiknev variant (rs766871310) asub *CBLC* geeni intronis (tuvastatud kahe geenilisti võrdlemisel). Vastav geen kodeerib E3 ubikvitiini ligaaside Cbl perekonda kuuluvat valku. *CBLC* valk mõjutab türosiinkinaaside ubikvitineerimise ja allareguleerimise kaudu raku signalisatsiooni (Keane jt., 1999; Kim jt., 1999). *CBLC* geeni ekspressiooni on muuhulgas täheldatud ka maksas. *Genome Browser* andmebaasi alusel on analüüsi tulemusena identifitseeritud geneetiline variant mitmes rakuliinis seotud aktiivset transkriptsiooni iseloomustava histooni modifikatsiooniga (H3K27Ac) ning asub HNF4G transkriptsioonifaktori seondumissaidis. *Ensembl* andmebaasi järgi paikneb tuvastatud variant enhaanser-alas, mis toimib *cis*-regulatoorse elemendina (Joonis 9). *Gene Ontology* andmebaasi alusel on nimetatud geen seotud kaltsiumiooni seondumisega. Kaltsium on oluline kofaktor LDLR valgu kokkupakkimisel ER-is. Uuringute tulemusena on näidatud, et ilma kaltsiumita ei ole LDLR võimeline saavutama korrektset konformatsiooni, mistõttu valesti pakkunud valk suunatakse lagundamise (Pena jt., 2010). Lisaks on kaltsium vajalik LDLR-i ja LDL-partikli vaheliseks interaktsiooniks. LDLR-i ligandi siduv domeen sisaldab seitset tsüsteiinirikast kordust, kus iga kordus koosneb kolmest disulfiidsidemest ja kahest DNA-lingust. Lingude koosseisus on happelised aminohappejäägid, mis moodustavad kaltsiumiooni seondumissaite. Kaltsiumioonide seondumisel aminohappejääkidega tekib seondumistasku LDL-partiklile, mis võimaldab LDLR-il interakteeruda ligandiga (Rudenko jt., 2002). Kuigi varasemates uuringutes ei ole *CBLC* geeni ja LDL-LDLR kompleksi vahelist seost kirjeldatud, ei ole välistatud, et vastav

geen ja selles esinevad geneetilised variandid võivad kaltsiumiooni seondumise mõjutamise kaudu mängida rolli LDLR-i ja ligandi vahelises interaktsioonis.



Joonis 9. *Ensembl* (GRCh37/hg19) ja *Genome Browser* andmebaasidel põhinevad illustatsioonid. (a) Pildil on kujutatud *CBLC* geeni asukoht. Musta noolega on tähistatud analüüsi tulemusena identifitseeritud *CBLC* geeni intronis paikneva geneetilise variandi (19:45302068) asukoht enhaanseralas. (b) Pildil on kujutatud *CBLC* geeni ekspressioonitase erinevates kudedes ning eelmainitud geneetilise variandiga seotud epigeneetiline profiil ja korduselemendid. Musta noolega märgitud tulp tähistab *CBLC* geeni ekspressioonitaset maksas.

19. kromosoomis identifitseeritud geneetiline variant (rs776400882) positsiooniga 45203555 paikneb *CEACAM16* geeni intronis. Nimetatud geen kodeerib samanimelist adhesioonivalku, mis kuulub immunoglobuliiniga seotud glükoproteiinide perekonda. *CEACAM16* geen, mis võib mängida rolli tektoriaalmembraani terviklikkuse säilitamisel, on vajalik korrektseks kuulmiseks ning mutatsioon selle geenis on seostatud kuulmiskaoga (Zheng jt., 2011; Wang jt., 2015). *Genome Browser* andmebaasi järgi paikneb identifitseeritud variant SINE (*short*

interspersed nuclear element) alas, on GM12878 ja K562 rakuliinides seotud aktiivset transkriptsiooni iseloomustava histooni modifikatsiooniga (H3K27Ac) ning GTEx-i andmetel ekspresseerub vastav geen ka maksas. Kuna *CEACAM16* geen paikneb ~77 kb kaugusel *CBLC* geenist, võib tuvastatud geneetiline variant mõjutada hoopis *CBLC* geeni ekspressiooni ja seeläbi kaltsiumiooni seondumist ning retseptor-ligand kompleksi moodustumist. Sama mehhanismi kaudu võib potentsiaalselt toimida ka antud töös tuvastatud intergeenne variant (rs374433944), mis paikneb *CBLC* geenist ~36 kb ülesvoolu. Lisaks identifitseeriti analüüsi tulemusena veel teine intergeenne variant (rs142571857) 11. kromosoomi positsioonis 61830631, mis *Genome Browser* andmebaasi järgi asub pikas terminaauses kordusjärjestuses. Mõlemad eelmainitud variandid on samuti mitmes rakuliinis seotud aktiivset transkriptsiooni iseloomustava histooni modifikatsiooniga (H3K27Ac). Nimetatud intergeensete variantide seos FH kontekstis ning nende võimalik efekt lähimatele geenidele vajab veel selgitamist.

FH potentsiaalse kompleksuse tõttu on haiguse patogeneesi detailsemaks mõistmiseks üha rohkem hakatud teostama erinevatel lähenemistel põhinevaid analüüse ja uuringuid, et identifitseerida uusi võimalikke FH kujunemisega seotud gene ja geenimarkereid. Varasemalt läbiviidud kogu eksoomi sekveneerimisel põhinevates töödes on tuvastatud uusi potentsiaalseid FH tekkega assotsieeruvaid valgu funktsiooni muutvaid geneetilisi markereid (Fouchier jt., 2014; Futema jt., 2014; Brønne jt., 2016). Samas ei võimalda ainult eksoomi uurimine identifitseerida kausaalseid mittekodeerivaid variante, mis võivad samuti vastutada monogeensete haiguste tekke eest, nagu on näidatud β -talasseemia ja Bernard-Soulieri sündroomi puhul (Poncz jt., 1982; Ludlow jt., 1996). Kuigi täisgenoomi järjestusandmestik lubab uute mittekodeerivate haiguspõhjuslike variantide leidmist, on WGS tulemusi oluliselt keerulisem tõlgendada, rõhutades bioinformaatilise ja/või molekulaarse valideerimise vajalikkust. Käesoleva töö tulemuste interpreteerimiseks kasutatud ennustuslike andmebaaside jätkuv areng ja valideerituse kasv lubavad senisest efektiivsemalt tuvastatud mittekodeerivate variantide seostamist haiguspõhjuslike mehhanismidega.

Kuna käesolevas töös läbiviidud assotsiatsioonanalüüside tulemusena leitud geneetiliste variantide puhul on tegemist harvaesinevate markeritega, tuleks esimese jätkusammuna teostada replikatsiooniuring sõltumatus kohordis. Variandi mittereplitseerumisel oleks populatsiooni-spetsiifilisuse aspektist lähtudes vajalik identifitseeritud markerite põhjalikumaks uurimiseks teostada funktsionaalseid katseid. Oluline on märkida, et osa analüüsi käigus tuvastatud potentsiaalsetest reguleerivatest variantidest paiknevad kordusjärjestustes. Tulenevalt kasutatud sekveneerimismeetodist ei ole välistatud, et need on

valesti määratud, ning nõuavad seetõttu kindlasti ülekontrollimist. Samuti oleks oluline hinnata tuvastatud variantide efekti geeniekspressioonile, näiteks WGS andmestikku kuuluvate indiviidide RNA sekveneerimistulemuste põhjal. Lisaks täisvere ekspressiooniandmete kõrvutamisele tuleks variantide efekti hinnata ka koospetsiifiliselt maksas.

Geneetiliste variantide efekti hindamiseks tervete ja haigete indiviidide vahel tuleks FH madala esinemissageduse tõttu Eestis teostada juht-kontrolluuring suuremal valimil üle Euroopa. Kuigi käesolev töö põhines juba teadaolevatel ning potentsiaalsetel FH kujunemisega seotud geenidel, ei pruugi mudeldamine LDL-kolesterooli ja ApoB taseme suhtes peegeldada variantide relevantsust FH kontekstis. Lisaks oleks oluline põhjalikumalt hinnata LDL-kolesterooli tasemel põhinevas analüüsis arvesse võetud 24 geeni võimalikku rolli FH kujunemisel. Käesolevas töös võeti lähtepunktiks aspekt, et FH peamise tekkepõhjuse LDLR-i düsfunktsiooniga korreleerub tugevalt LDL-kolesterooli tase. Antud teadmine lubas oletada, et LDLR-i bioloogiliste radade ning LDL-kolesterooli tasemega seotud geenide arvesse võtmine võimaldab leida uusi potentsiaalseid FH kandidaatgeene, mida pole haiguse kontekstis varasemalt uuritud. Samas väärub rõhutamist, et LDLR-i ja LDL-kolesterooli sisalduse ning vastavate geenidega assotsieeruvad ka muud fenotüübid, sealhulgas sitosteroleemia ja hüperalfalipoproteineemia, mistõttu on käesolevas töös saadud tulemused pigem hüpoteese genereerivad ja vajavad kindlasti validatsiooni.

Kuigi magistritöö käigus identifitseeritud geneetiliste variantide ja FH vahelist assotsiatsiooni pole varasemalt kirjeldatud, lubavad olemasolevad andmed järeldada nende võimalikku rolli haiguse kontekstis, viidates FH etioloogia komplekssemale geneetilisele tagapõhjale.

KOKKUVÕTE

Vaatamata perekondliku hüperkolesteroleemia patogeneesi molekulaarsete mehhanismide mõistmisele ning olemasolevate ravimeetodite rakendamisele, on haigus jätkuvalt kogu maailmas suuresti aladiagnoositud ja väheravitud. Perekondliku hüperkolesteroleemia geneetilise etioloogia eripäradest tuleneva mittetäieliku penetrantsuse, võimaliku polügeense efekti ja kausaalsete mittekodeerivate variantide esinemise tõttu on üha rohkem hakatud keskenduma uute haiguse kujunemisega seotud geenivariantide ja potentsiaalsete haiguspõhjuslike kandidaatgeenide väljaselgitamisele.

Käesolevas töös on kirjeldatud põhilisi perekondliku hüperkolesteroleemia kliinilisi, molekulaarseid ja geneetilisi aspekte ning toodud välja olulisemad haiguse etioloogilised eripärad. Praktilise osa eesmärgiks oli identifitseerida võimalikud perekondliku hüperkolesteroleemia kujunemisega seotud regulatoorsed variandid Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidonorite täisgenoomi järjestustest. Selleks teostati LDL-kolesterooli ja ApoB tasemetel põhinevad assotsiatsioonanalüüsid, kasutades lineaarse regressiooni mudeleid.

Antud töös identifitseeriti seitse erinevat madalaima p-väärtusega introonset või intergeenset võimalikku perekondliku hüperkolesteroleemiaga seotud regulatoorset varianti. Tuvastatud geenide osalust ei ole varem otseselt lipiidide metabolismi ja perekondliku hüperkolesteroleemia tekkega seostatud, kuid olemasoleva teaduskirjanduse ja erinevate andmebaaside alusel ennustatud geenifunktsioonide põhjal võib järeldada nende potentsiaalset efekti. Tulemuste kinnitamiseks tuleb teostada replikatsiooniuuring ning läbi viia tuvastatud geenimarkerite ja vastavate geenide funktsionaalsed analüüsid.

Uute perekondliku hüperkolesteroleemia tekkega seotud geneetiliste variantide tuvastamine võimaldaks patsientide efektiivsemat diagnoosimist ja haiguse etioloogilise kompleksuse paremat mõistmist.

Identifying familial hypercholesterolemia associated regulatory variants based on whole genome sequencing data of the Estonian Genome Center of the University of Tartu

Anett Tähiste

SUMMARY

Familial hypercholesterolemia (FH), one of the most common monogenic disorders, is characterized by elevated serum LDL-cholesterol levels, which result in excess deposition of cholesterol in tissues, leading to accelerated atherosclerosis and increased risk of premature coronary artery disease. FH is inherited in an autosomal dominant manner and can be present in a homozygous or a heterozygous form, with a prevalence of approximately 1 in 200 for heterozygotes. Mutations in four genes have been noted in patients with FH: *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* and *LDLRAP1*. However, a significant number of patients clinically diagnosed with FH present with no observed mutation in one of these four primary genes, which could be a reflection of the possible polygenic etiology of FH or the existence of yet undiscovered genes responsible for FH.

The aim of the study was to identify regulatory variants in FH associated gene regions that might play a role in FH development based on whole genome sequencing data of the Estonian Genome Center of the University of Tartu. Association analyses were conducted based on LDL-cholesterol (n=2004) and ApoB (n=2107) levels using linear regression models.

As a result of the study 7 potential regulatory variants located within introns or in intergenic regions of the genome were discovered. Identified variants and corresponding genes have previously not been linked to LDL-cholesterol metabolism nor FH. In order to confirm the results of the study, a replication study in an independent cohort as well as functional analyses of the identified genetic variants and genes are required.

Detection of new genetic variants associated with FH would allow more effective diagnosis of FH cases and better understanding of the complexity of a monogenic disease.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajat Maris Alverit, kelle põhjalikkus ja pühendumus olid käesoleva töö valmimise seisukohalt asendamatud.

Lisaks soovin tänada Tõnu Eskot, Kristi Lälli, Mart Kalsi, Toomas Hallerit ja Reedik Mägi igakülgse abi ja toetuse eest.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J.P., *et al.* (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 34(2): 154-156.
- Ademi, Z., Watts, G.F., Pang, J., *et al.* (2014). Cascade screening based on genetic testing is cost-effective: evidence for the implementation of models of care for familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol.* 8(4): 390-400.
- Akram, O.N., Bernier, A., Petrides, F., *et al.* (2010). Beyond LDL cholesterol, a new role for PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(7): 1279-1281.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., *et al.* (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 25(1): 25-29.
- Asztalos, B. F. (2004). High-density lipoprotein metabolism and progression of atherosclerosis: new insights from the HDL Atherosclerosis Treatment Study. *Curr Opin Cardiol.* 19(4): 385-391.
- Austin, E.D., Phillips, J.A., Cogan, J.D., *et al.* (2009). Truncating and missense BMP2 mutations differentially affect the severity of heritable pulmonary arterial hypertension. *Respir Res.* 10: 87.
- Austin, M.A., Hutter, C.M., Zimmern, R.L., *et al.* (2004). Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. *Am J Epidemiol.* 160(5): 407-420.
- Bell, D.A., Pang, J., Burrows, S., *et al.* (2015). Effectiveness of genetic cascade screening for familial hypercholesterolaemia using a centrally co-ordinated clinical service: an Australian experience. *Atherosclerosis.* 239(1): 93-100.
- Benn, M., Watts, G.F., Tybjærg-Hansen, A., *et al.* (2016). Mutations causative of familial hypercholesterolaemia: screening of 98 098 individuals from the Copenhagen General Population Study estimated a prevalence of 1 in 217. *Eur Heart J.* 37(17): 1384-1394.
- Bhatnagar, D. (2006). Diagnosis and screening for familial hypercholesterolaemia: finding the patients, finding the genes. *Ann Clin Biochem.* 43(6): 441-456.
- Borén, J., Ekström, U., Agren, B., *et al.* (2001). The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100. *J Biol Chem.* 276(12): 9214-9218.
- Boyle, A.P., Hong, E.L., Hariharan, M., *et al.* (2012). Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res.* 22(9): 1790-1797.
- Brænne, I., Kleinecke, M., Reiz, B., *et al.* (2016). Systematic analysis of variants related to familial hypercholesterolemia in families with premature myocardial infarction. *Eur J Hum Genet.* 24(2): 191-197.
- Brautbar, A., Leary, E., Rasmussen, K., *et al.* (2015). Genetics of familial hypercholesterolemia. *Curr Atheroscler Rep.* 17(4): 491.
- Brink, P.A., Steyn, L.T., Coetzee, G.A., *et al.* (1987). Familial hypercholesterolemia in South African Afrikaners. PvuII and StuI DNA polymorphisms in the LDL-receptor gene consistent with a predominating founder gene effect. *Hum Genet.* 77(1): 32-35.
- Brown, M.S., Anderson, R.G., Goldstein, J.L. (1983). Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell.* 32(3): 663-667.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1979). Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76(7): 3330-3337.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232(4746): 34-47.
- Cariou, B., Le May, C., Costet, P. (2011). Clinical aspects of PCSK9. *Atherosclerosis.* 216(2): 258-265.
- Carvalho, C.M., Bartnik, M., Pehlivan, D., *et al.* (2012). Evidence for disease penetrance relating to CNV size: Pelizaeus-Merzbacher disease and manifesting carriers with a familial 11 Mb duplication at Xq22. *Clin Genet.* 81(6): 532-541.

- Catapano, A.L., Chapman, J., Wiklund, O., *et al.* (2011). The new joint EAS/ ESC guidelines for the management of dyslipidaemias. *Atherosclerosis*. 217(1): 1.
- Christoffersen, M., Frikke-Schmidt, R., Schnor, P., *et al.* (2011). Xanthelasmata, arcus corneae, and ischaemic vascular disease and death in general population: prospective cohort study. *BMJ*. 343: d5497.
- Cohen, J.C., Boerwinkle, E., Mosley, T.H.jr., *et al.* (2006). Sequence variations in PCSK9, Low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*. 354(12): 1264-1272.
- Cooper, D.N., Krawczak, M. (2013). Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Human Genet*. 132(10): 1077-1130.
- Couture, P., Lamarche, B. (2013). Ezetimibe and bile acid sequestrants: impact on lipoprotein metabolism and beyond. *Curr Opin Lipidol*. 24(3): 227-232.
- Cuchel, M., Bloedon, L.T., Szapary, P.O., *et al.* (2007). Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 356(2): 148-156.
- Cuchel, M., Bruckert, E., Ginsberg, H.N., *et al.* (2014). Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. 35(32): 2146-2157.
- Cunningham, D., Danley, D.E., Geoghegan, K.F., *et al.* (2007). Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol*. 14(5): 413-419.
- Daw, E.W., Chen, S.N., Czernuszewicz, G., *et al.* (2007). Genome-wide mapping of modifier chromosomal loci for human hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet*. 16(20): 2463-2471.
- De Castro-Oros, I., Pampin, S., Bolado-Carrancio, A., *et al.* (2011). Functional analysis of LDLR promoter and 5' UTR mutations in subjects with clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat*. 32(8): 868-872.
- de Ferranti, S.D., Rodday, A.M., Mendelson, M.M., *et al.* (2016). Prevalence of Familial Hypercholesterolemia in the 1999 to 2012 United States National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES). *Circulation*. 133(11): 1067-1072.
- Doran, B., Guo, Y., Xu, J., *et al.* (2014). Prognostic value of fasting versus nonfasting low-density lipoprotein cholesterol levels on long-term mortality: insight from the National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES-III). *Circulation*. 130(7): 546-553.
- Ehret, G.B. (2010). Genome-wide association studies: contribution of genomics to understanding blood pressure and essential hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 12(1): 17-25.
- Endo, A. (1992). The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res*. 33(11): 1569-1582.
- Fahed, A.C., Nemer, G.M. (2011). Familial hypercholesterolemia: the lipids or the genes? *Nutr Metab (Lond)*. 8(1): 23.
- Filigheddu, F., Quagliariini, F., Campagna, F., *et al.* (2009). Prevalence and clinical features of heterozygous carriers of autosomal recessive hypercholesterolemia in Sardinia. *Atherosclerosis*. 207(1): 162-167.
- Fouchier, S.W., Dallinga-Thie, G.M., Meijers, J.C., *et al.* (2014). Mutations in STAP1 are associated with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Circ Res*. 115(6): 552-555.
- Futema, M., Plagnol, V., Li, K., *et al.* (2014). Whole exome sequencing of familial hypercholesterolaemia patients negative for LDLR/APOB/PCSK9 mutations. *J Med Genet*. 51(8): 537-544.
- Futema, M., Shah, S., Cooper, J.A., *et al.* (2015). Refinement of variant selection for the LDL

- cholesterol genetic risk score in the diagnosis of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries. *Clin Chem.* 61(1): 231-238.
- Garcia-Garcia, A.B., Ivorra, C., Martinez-Hervas, S., *et al.* (2011). Reduced penetrance of autosomal dominant hypercholesterolemia in a high percentage of families: Importance of genetic testing in the entire family. *Atherosclerosis.* 218(2): 423-430.
- Garcia, C.K., Wilund, K., Arca, M., *et al.* (2001). Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science.* 292(5520): 1394-1398.
- Garuti, R., Jones, C., Li, W.P., *et al.* (2005). The modular adaptor protein autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) promotes low density lipoprotein receptor clustering into clathrin-coated pits. *J Biol Chem.* 280(49): 40996-41004.
- Gershoni-Baruch, R., Brik, R., Shinawi, M., *et al.* (2002). The differential contribution of MEFV mutant alleles to the clinical profile of familial Mediterranean fever. *Eur J Hum Genet.* 10(2): 145-149.
- Gidding, S.S., Champagne, M.A., de Ferranti, S.D., *et al.* (2015). The Agenda for Familial Hypercholesterolemia: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 132(22): 2167-2192.
- Goldberg, A.C., Hopkins, P.N., Toth, P.P., *et al.* (2011). Familial hypercholesterolemia: screening, diagnosis and management of pediatric and adult patients: clinical guidance from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol.* 5(3): S1-S8.
- Goldstein, J.L., Anderson, R.G., Brown, M.S. (1979). Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature.* 279(5715): 679-685.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1975). Lipoprotein receptors, cholesterol metabolism, and atherosclerosis. *Arch Pathol.* 99(4): 181-184.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S. (2009). The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29(4): 431-438.
- Goo, Y.H., Son, S.H., Kreienberg, P.B., *et al.* (2014). Novel lipid droplet-associated serine hydrolase regulates macrophage cholesterol mobilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34(2): 386-396.
- Gu, Y., Harley, I.T., Henderson, L.B., *et al.* (2009). Identification of IFRD1 as a modifier gene for cystic fibrosis lung disease. *Nature.* 458(7241): 1039-1042.
- Haase, A., Goldberg, A.C. (2012). Identification of people with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Curr opin lipidol.* 23(4): 282-289.
- Havel, R.J. (1984). The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J Lipid Res.* 25(13): 1570-1576.
- Heath, K.E., Gahan, M., Whittall, R.A., *et al.* (2001). Low-density lipoprotein receptor gene (LDLR) world-wide website in familial hypercholesterolaemia: update, new features and mutation analysis. *Atherosclerosis.* 154(1): 243-246.
- Hobbs, H., Brown, M., Goldstein, J. (1992). Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 1(6): 445-466.
- Hobbs, H., Russell, D., Brown, M., *et al.* (1990). The LDL receptor locus and familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet.* 24: 133-170.
- Hopkins, P.N., Toth, P.P., Ballantyne, C.M., *et al.* (2011). Familial hypercholesterolemias: prevalence, genetics, diagnosis and screening recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol.* 5(3): S9-S17.
- Horton, J.D., Cohen, J.C., Hobbs, H.H. (2009). PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J Lipid Res.* 50(1): S72-S77.

- Hovingh, G.K., Davidson, M.H., Kastelein, J.J., *et al.* (2013). Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolemia. *Eur Heart J.* 34(13): 962-971.
- Huijgen, R., Kindt, I., Verhoeven, S.B., *et al.* (2010). Two years after molecular diagnosis of familial hypercholesterolemia: majority on cholesterol-lowering treatment but a minority reaches treatment goal. *PLoS One* 5(2): e9220
- Innerarity, T.L., Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., *et al.* (1990). Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 31(8): 1337-1349.
- Innerarity, T.L., Weisgraber, K.H., Arnold, K.S., *et al.* (1987). Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84(19): 6919-6923.
- Jiang, L., Hu, S., Tian, D., *et al.* (2016). α -Mannosidase I Protein Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells Is Upregulated During Hepatitis B Virus Infection. *Viral Immunol.* 29(1): 33-39.
- Keane, M.M., Ettenberg, S.A., Nau, M.M., *et al.* (1999). cbl-3: a new mammalian cbl family protein. *Oncogene.* 18(22): 3365-3375.
- Khachadurian, A.K. (1964). The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *Am J Med.* 37: 402-407.
- Khera, A.V., Won, H.H., Peloso, G.M., *et al.* (2016). Diagnostic Yield of Sequencing Familial Hypercholesterolemia Genes in Patients with Severe Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* pii: S0735-1097(16)32399-3.
- Kilpelainen, T.O., Qi, L., Brage, S., *et al.* (2011). Physical activity attenuates the influence of FTO variants on obesity risk: a meta-analysis of 218, 166 adults and 19,268 children. *PloS Med.* 8(11): e100116.
- Kim, M., Tezuka, T., Suziki, Y., *et al.* (1999). Molecular cloning and characterization of a novel cbl-family gene, cbl-c. *Gene.* 239(1): 145-154.
- Klose, G., Laufs, U., März, W., *et al.* (2014). Familial hypercholesterolemia: developments in diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 111(31-32): 523-529.
- Knowles, J.W., O'Brien, E.C., Greendale, K., *et al.* (2014). Reducing the burden of disease and death from familial hypercholesterolemia: a call to action. *Am Heart J.* 168(6): 807-811.
- Koivisto, U.M., Hubbard, A.L., Mellman, I. (2001). A novel cellular phenotype for familial hypercholesterolemia due to a defect in polarized targeting of LDL receptor. *Cell.* 105(5): 575-585.
- Kwiterovich, P.O.Jr. (2000). The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *Am J Cardiol.* 86(12A): 5L-10L.
- Langsted, A., Freiberg, J.J., Nordestgaard, B.G. (2008). Fasting and nonfasting lipid levels: influence of normal food intake on lipids, lipoproteins, apolipoproteins, and cardiovascular risk prediction. *Circulation.* 118(20): 2047-2056.
- Larkin, J.M., Brown, M.S., Goldstein, J.L., *et al.* (1983). Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell.* 33(1): 273-285.
- Lee, W.P., Datta, B.N., Ong, B.B., *et al.* (2011). Defining the role of lipoprotein apheresis in the management of familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiovasc Drugs.* 11(6): 363-370.
- Lehrman, M.A., Schneider, W.J., Brown, M.S., *et al.* (1987). The Lebanese allele at the low density lipoprotein receptor locus. Nonsense mutation produces truncated receptor that is retained in endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 262(1): 401-410.
- Leigh, S., Foster, A., Whittall, R., *et al.* (2008). Update and analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database. *Ann Hum Genet.* 72(4): 485-498.

- Leren, T.P., Manshaus, T., Skovholt, U., *et al.* (2004). Application of molecular genetics for diagnosing familial hypercholesterolemia in Norway: results from a family-based screening program. *Semin Vasc Med.* 4(1): 75-85.
- Liyanage, K.E., Burnett, J.R., Hooper, A.J., *et al.* (2011). Familial hypercholesterolemia: epidemiology, Neolithic origins and modern geographic distribution. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 48(1): 1-18.
- Lonsdale, J., Thomas, J., Salvatore, M., *et al.* (2013). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet.* 45(6): 580-585.
- Ludlow, L.B., Schick, B.P., Budarf, M.L., *et al.* (1996). Identification of a mutation in a GATA binding site of the platelet glycoprotein Ibbeta promoter resulting in the Bernard-Soulier syndrome. *J Biol Chem.* 271(36): 22076-22080.
- Marais, A.D. (2004). Familial hypercholesterolaemia. *Clin Biochem Rev.* 25(1): 49-68.
- Marchini, J., Howie, B., Myers, S., *et al.* (2007). A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat Genet.* 39(7): 906-913.
- Marks, D., Thorogood, M., Neil, H.A., *et al.* (2003). A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis.* 168(1): 1-14.
- Moorjani, S., Roy, M., Gagne, C., *et al.* (1989). Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Quebec Province. *Arteriosclerosis.* 9(2): 211-216.
- Mousavi, S.A., Malerød, L., Berg, T., *et al.* (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J.* 377(1): 1-16.
- Muir, L.A., George, P.M., Laurie, A.D., *et al.* (2010). Preventing cardiovascular disease: a review of the effectiveness of identifying the people with familial hypercholesterolaemia in New Zealand. *N Z Med J.* 123(1326): 97-102.
- Myant, N.B. (1973). Cholesterol metabolism. *J Clin Pathol Suppl.* 5: 1-4.
- Nemati MH, Astaneh B. (2010). Optimal management of familial hypercholesterolemia: treatment and management strategies. *Vasc Health Risk Manag.* 6: 1079-1088.
- Nenseter, M.S., Lindvig, H.W., Ueland, T., *et al.* (2011). Lipoprotein(a) levels in coronary heart disease-susceptible and -resistant patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 216(2): 426-432.
- Nioi, P., Sigurdsson, A., Thorleifsson, G., *et al.* (2016). Variant ASGR1 Associated with a Reduced Risk of Coronary Artery Disease. *N Engl J Med.*
- Nordestgaard, B.G., Chapman, M.J., Humphries, S.E., *et al.* (2013). Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J.* 34(45): 3478-3490.
- Nordestgaard, B.G., Chapman, M.J., Ray, K., *et al.* (2010). European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J.* 31(23): 2844-2853.
- Norman, D., Sun, X.M., Bourbon, M., *et al.* (1999). Characterization of a novel cellular defect in patients with phenotypic homozygous familial hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 104(5): 619-628.
- Onizuka, T., Shimizu, H., Moriwaki, Y., *et al.* (2012). NMR study of ligand release from asialoglycoprotein receptor under solution conditions in early endosomes. *FEBS J.* 279(15): 2645-2656.
- Page, S.P., Kounas, S., Syrris, P., *et al.* (2012). Cardiac myosin binding protein-C mutations in families with hypertrophic cardiomyopathy: disease expression in relation to age, gender and longterm outcome. *Circ Cardiovasc Genet.* 5(2): 156-166.
- Pandit, S., Wisniewski, D., Santoro, J., *et al.* (2008). Functional analysis of sites within PCSK9 responsible for hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 49(6): 1333-1343.
- Pejic, R. N. (2014). Familial Hypercholesterolemia. *Ochsner J.* 14(4): 669-672.
- Peloso, G.M., Auer, P.L., Bis, J.C., *et al.* (2014). Association of Low-Frequency and Rare

- Coding-Sequence Variants with Blood Lipids and Coronary Heart Disease in 56,000 Whites and Blacks. *Am J Hum Genet.* 94(2): 223-232.
- Pena, F., Jansens, A., van Zadelhoff, G., *et al.* (2010). Calcium as a crucial cofactor for low density lipoprotein receptor folding in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 285(12): 8656-8664.
- Pers, T.H., Karjalainen, J.M., Chan, Y., *et al.* (2015). Biological interpretation of genome-wide association studies using predicted gene functions. *Nat Commun.* 6: 5890.
- Pijlman, A.H., Huijgen, R., Verhagen, S.N., *et al.* (2010). Evaluation of cholesterol lowering treatment of patients with familial hypercholesterolemia: a large cross-sectional study in The Netherlands. *Atherosclerosis.* 209(1): 189-194.
- Pimstone, S.N., Sun, X.M., du Souich, C., *et al.* (1998). 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.* 18(2): 309-315.
- Pisciotta, L., Priore Oliva, C., Pes, G.M., *et al.* (2006). Autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) and homozygous familial hypercholesterolemia (FH): a phenotypic comparison. *Atherosclerosis.* 188(2): 398-405.
- Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., *et al.* (1992). Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand. *Bioconjug Chem* 3(6): 533-539.
- Pocovi, M., Civeira, F., Alonso, R., *et al.* (2004). Familial hypercholesterolemia in Spain: case-finding program, clinical and genetic aspects. *Semin Vasc Med.* 4(1): 67-74.
- Poirier, S., Mayer, G., Poupon, V., *et al.* (2009). Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation: evidence for an intracellular route. *J Biol Chem.* 284(42): 28856-28864.
- Poncz, M., Ballantine, M., Solowiejczyk, D., *et al.* (1982). beta-Thalassemia in a Kurdish Jew. Single base changes in the T-A-T-A box. *J Biol Chem.* 257(11): 5994-5996.
- Raal, F., Scott, R., Somaratne, R., *et al.* (2012). Low-density lipoprotein cholesterol-lowering effects of AMG 145, a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia: the Reduction of LDL-C With PCSK9 Inhibition in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Disorder (RUTHERFORD) randomized trial. *Circulation.* 126(20): 2408-2417.
- Raal, F.J., Stein, E.A., Dufour, R., *et al.* (2015). PCSK9 inhibition with evolocumab (AMG 145) in heterozygous familial hypercholesterolaemia (RUTHERFORD-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 385(9965): 331-340.
- Rader, D., Cohen, J., Hobbs, H. (2003). Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest.* 111(12): 1795-1803.
- Rader, D.J., Kastelein, J.J. (2014). Lomitapide and mipomersen: two first-in-class drugs for reducing low-density lipoprotein cholesterol in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation.* 129(9): 1022-1032.
- Reiner Z. (2014). Impact of early evidence of atherosclerotic changes on early treatment in children with familial hypercholesterolemia. *Circ Res.* 114(2): 233-235.
- Robinson, J.G., Farnier, M., Krempf, M., *et al.* (2015). Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 372(16): 1489-1499.
- Robinson, R.L., Carpenter, D., Halstall, P.J., *et al.* (2009). Epigenetic silencing of variable penetrance of malignant hyperthermia susceptibility. *Br J Anaesth.* 103(2): 220-225.
- Rozema, D.B., Lewis, D.L., Wakefield, D.H., *et al.* (2007). Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. *PNAS.* 104(32): 12982-12987.
- Rudel, L.L., Parks, J.S., Johnson, F.L., *et al.* (1986). Low density lipoproteins in atherosclerosis. *J Lipid Res.* 27: 465-474.

- Rudenko, G., Henry, L., Henderson, K., *et al.* (2002). Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science*. 298(5602): 2353-2359.
- Sabatine, M.S., Giugliano, R.P., Wiviott, S.D., *et al.* (2015). Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 372(16): 1500-1509.
- Sandvig, K., Olsnes, S., Petersen, O.W., *et al.* (1987). Acidification of the cytosol inhibits endocytosis from coated pits. *J Cell Biol*. 105(2): 679-689.
- Sankaran, V.G., Lettre, G., Orkin S.H., *et al.* (2010). Modifier genes in Mendelian disorders: the example of hemoglobin disorders. *Ann N Y Acad Sci*. 1214: 47-56.
- Savinkova, L.K., Ponomarenko, M.P., Ponomarenko, P.M., *et al.* (2009). TATA box polymorphisms in human gene promoters and associated hereditary pathologies. *Biochemistry (Mosc)*. 74(2): 117-29.
- Schmidt, H.H., Hill, S., Makariou, E.V., *et al.* (1996). Relation of cholesterol-year score to severity of calcific atherosclerosis and tissue deposition in homozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 77(8): 575-580.
- SEARCH Collaborative Group, Link, E., Parish, S., *et al.* (2008). SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy – a genomewide study. *N Engl J Med*. 359(8): 789-799.
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Wickham, L., *et al.* (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(3): 928-933.
- Seidah, N.G., Sadr, M.S., Chretien, M., *et al.* (2013). The multifaceted proprotein convertases: their unique, redundant, complementary, and opposite functions. *J Biol Chem*. 288(30): 21473-21481.
- Shen, H., Damcott, C.M., Rampersaud, E., *et al.* (2010). Familial defective apolipoprotein B-100 and increased low-density lipoprotein cholesterol and coronary artery calcification in the old order amish. *Arch Intern Med*. 170(20): 1850-1855.
- Singh, S., Bittner, V. (2015). Familial hypercholesterolemia – epidemiology, diagnosis, and screening. *Curr Atheroscler Rep*. 17(2): 482.
- Sjouke, B., Kusters, D.M., Kindt, I., *et al.* (2015). Homozygous autosomal dominant hypercholesterolaemia in the Netherlands: prevalence, genotype-phenotype relationship, and clinical outcome. *Eur Heart J*. 36(9): 560-565.
- Sniderman, A.D., Tsimikas, S., Fazio, S. (2014). The severe hypercholesterolemia phenotype: clinical diagnosis, management, and emerging therapies. *J Am Coll Cardiol*. 63(19): 1935-1947.
- Snozsek, C.L., Lagerstedt, S.A., Khoo, T.K., *et al.* (2009). LDLR promoter variant and exon 14 mutation on same chromosome are associated with an unusually severe FH phenotype and treatment resistance. *Eur J Hum Genet*. 17(1): 85-90.
- Soutar, A.K., Naoumova, R.P., Traub, L.M. (2003). Genetics, clinical phenotype, and molecular cell biology of autosomal recessive hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23(11): 1963-1970.
- Soutar, A.K., Naoumova, R.P. (2007). Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 4(4): 214-225.
- Speir, M.L., Zweig, A.S., Rosenbloom, K.R., *et al.* (2016). The UCSC Genome Browser database: 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 44(D1): D717-25.
- Stefanutti, C., Julius, U. (2013). Lipoprotein apheresis: state of the art and novelties. *Atheroscler Suppl*. 14(1): 19-27.
- Stein, E.A., Mellis, S., Yancopoulos, G.D., *et al.* (2012). Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on LDL cholesterol. *N Engl J Med*. 366(12): 1108-1118.
- Stein, E.A., Strutt, K., Southworth, H., *et al.* (2003). Comparison of rosuvastatin versus atorvastatin in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 92(11): 1287-1293.

- Stein, E.A., Swergold, G.D. (2013). Potential of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 based therapeutics. *Curr Atheroscler Rep.* 15(3): 310.
- Stoffel, W., Borberg, H., Greve, V. (1981). Application of specific extracorporeal removal of low density lipoprotein in familial hypercholesterolaemia. *Lancet.* 2(8254): 1005-1007.
- Stone, N.J., Robinson, J.G., Lichtenstein, A.H., *et al.* (2013). ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 129(25): S1-S45.
- Sturm, A.C. (2014). The role of genetic counselors for patients with familial hypercholesterolemia. *Curr Genet Med Rep.* 2(2): 68-74.
- Surakka, I., Horikoshi, M., Mägi, R., *et al.* (2015). The impact of low-frequency and rare variants on lipid levels. *Nat Genet.* 47(6): 589-597.
- Tada, H., Kawashiri, M., Ohtani, R., *et al.* (2011). A novel type of familial hypercholesterolemia: double heterozygous mutations in LDL receptor and LDL receptor adaptor protein 1 gene. *Atherosclerosis.* 219(2): 663-666.
- Talmud, P.J., Futema, M., Humphries, S.E. (2014). The genetic architecture of the familial hyperlipidaemia syndromes: rare mutations and common variants in multiple genes. *Curr Opin Lipidol.* 25(4): 274-281.
- Talmud, P.J., Shah, S., Whittall, R., *et al.* (2013). Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: A case-control study. *Lancet.* 381(9874): 1293-1301.
- Taylor, A., Wang, D., Patel, K. *et al.* (2010). Mutation detection rate and spectrum in familial hypercholesterolaemia patients in the UK pilot cascade project. *Clin Genet.* 77(6): 572-580.
- Taylor, F., Huffman, M.D., Macedo, A.F., *et al.* (2013). Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane database Syst Rev.* 1: CD004816.
- Thorsson, B., Sigurdsson, G., Gudnason, V. (2003). Systematic family screening for familial hypercholesterolemia in Iceland. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(2): 335-338.
- Usifo, E., Leigh, S., Whittall, R., *et al.* (2012). Low-density lipoprotein receptor gene familial hypercholesterolemia variant database: update and pathological assessment. *Ann Hum Genet.* 76(5): 387-401.
- van der Graaf, A., Cuffie-Jackson, C., Vissers, M.N., *et al.* (2008). Efficacy and safety of coadministration of ezetimibe and simvastatin in adolescents with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 52(17): 1421-1429.
- Varghese, M.J. (2014). Familial hypercholesterolemia: A review. *Ann Pediatr Cardiol.* 7(2): 107-117.
- Varret, M., Abifadel, M., Rabes, J.P., *et al.* (2008). Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet.* 73(1): 1-13.
- Viigimaa, M., Väikmann, R. (2006). LDL-aferees väljendunud hüperkolesteroleemia ravis. *Eesti Arst* 85(8): 523-528.
- Vogt, A. (2015). The genetics of familial hypercholesterolemia and emerging therapies. *Appl Clin Genet.* 8: 27-36.
- Voorra, D., Shah, S.H., Spasojevic, I., *et al.* (2009). The SLCO1B1*5 genetic variant is associated with statin-induced side effects. *J Am Coll Cardiol.* 54(17): 1609-1616.
- Vrablik, M., Ceska, R., Horinek, A. (2001). Major apolipoprotein B-100 mutations in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Physiol Res.* 50(4): 337-343.
- Vuorio, A.F., Aalto-Setälä, K., Koivisto, U.M., *et al.* (2001). Familial hypercholesterolaemia in Finland: common, rare and mild mutations of the LDL receptor and their clinical consequences. Finnish FH-group. *Ann Med.* 33(6): 410-421.

- Wang, H., Wang, X., He, C., *et al.* (2015). Exome sequencing identifies a novel CEACAM16 mutation associated with autosomal dominant nonsyndromic hearing loss DFNA4B in a Chinese family. *J Hum Genet.* 60(3): 119-126.
- Ward, L.D., Kellis, M. (2016). HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic Acids Res.* 44(D1): D877-881.
- Watts, G.F., Gidding, S., Wierzbicki, A.S., *et al.* (2014). Integrated guidance on the care of familial hypercholesterolemia from the International FH foundation. *Int J Cardiol.* 171(3): 309-325.
- Weatherall, D.J. (2001). Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet.* 2(4): 245-255.
- Westra, H.J., Peters, M.J., Esko, T., *et al.* (2013). Systematic identification of *trans*-eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nat Genet.* 45(10): 1238-1243.
- Whitfield, A., Barrett, H., van Bockxmeer, F., *et al.* (2004). Lipid disorder and mutations in the APOB gene. *Clin Chem.* 50(10): 1725-1732.
- Wiegman, A., Gidding, S.S., Watts, G.F., *et al.* (2015). Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: gaining decades of life by optimizing detection and treatment. *Eur Heart J.* 36(36): 2425-2437.
- Williams, R.R., Hunt, S.C., Schumacher, M.C., *et al.* (1993). Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol.* 72(2): 171-176.
- Yates, A., Akanni, W., Amode, M.R., *et al.* (2016). Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res.* 44: D710-D716.
- Yuan, G., Wang, J., Hegele, R.A. (2006). Heterozygous familial hypercholesterolemia: an underrecognized cause of early cardiovascular disease. *CMAJ.* 174(8): 1124-1129.
- Zhang, D.W., Garuti, R., Tang, W.J., *et al.* (2008). Structural requirements for PCSK9-mediated degradation of the low-density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(35): 13045-13050.
- Zhang, D.W., Lagace, T.A., Garuti, R., *et al.* (2007). Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem.* 282(25): 18602-18612.
- Zhao, Z., Tuakli-Wosornu, Y., Lagace, T.A., *et al.* (2006). Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet.* 79(3): 514-523.
- Zheng, J., Miller, K., Yang, K., *et al.* (2011). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with alpha-tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA4). *Proc Nat Acad Sci USA.* 108(10): 4218-4223.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://129.125.135.180:8080/GeneNetwork/?gene>

<http://geneontology.org>

<http://grch37.ensembl.org/index.html>

<http://regulomedb.org>

<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>

<http://www.broadinstitute.org/mpg/depict/>

<http://www.gtexportal.org>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=familial+hypercholesterolemia>

<http://www.ucl.ac.uk/ldlr>

<https://genome.ucsc.edu>

https://grenada.lumc.nl/LOVD2/UCL-Heart/home.php?select_db=LDLR

<https://www.r-project.org>

LISA 1

Tabel 1. USA MEDPED diagnoosikriteeriumid (Hovingh jt., 2013).

Üld- ja (LDL-kolesterooli) tasemed (mg/dl)				
Vanus	I astme sugulane	II astme sugulane	III astme sugulane	Üldpopulatsioon
<20	220 (155)	230 (165)	240 (170)	270 (200)
20-29	240 (170)	250 (180)	260 (185)	290 (220)
30-39	270 (190)	280 (200)	290 (210)	340 (240)
>40	290 (205)	300 (215)	310 (225)	360 (260)

Piirmäärade ületamisel diagnoositakse indiviidil FH.

Lühendid: FH – perekondlik hüperkolesteroleemia; LDL – madala tihedusega lipoproteiin.

Tabel 2. Hollandi Lipiidikliinikute Koostöövõrgustiku diagnoosikriteeriumid (Haase ja Goldberg, 2012).

Kriteeriumid	Punktid
<u>Patsiendi perekondlik anamnees</u>	
Enneaegne CAD või LDL-kolesterooli tase üle 95 protsentiili I astme sugulasel	1
Kõõlusksantoomid ja/või silma sarvkesta servmine hägusus I astme sugulasel või LDL-kolesterooli tase üle 95 protsentiili alla 18-aastaselt indiviidil	2
<u>Patsiendi kliiniline haiguslugu</u>	
Enneaegne CAD	2
Enneaegne peaju või perifeersetes veresoontes haigus	1
<u>Patsiendi füüsiline läbivaatus</u>	
Kõõlusksantoomid	6
Silma sarvkesta servmine hägusus enne 45. eluaastat	4
<u>Patsiendi LDL-kolesterooli tase</u>	
≥330 mg/dl	8
250-329 mg/dl	5
190-249 mg/dl	3
155-189 mg/dl	1
<u>DNA analüüs</u>	
<i>LDLR</i> , <i>APOB</i> või <i>PCSK9</i> geeni mutatsioon	8
Patsiendi diagnoos	
Kindel FH	>8
Tõenäoline FH	6-8
Potentsiaalne FH	3-5
Ebatõenäoline FH	<3

Lühendid: CAD – südame isheemiatõbi; FH – perekondlik hüperkolesteroleemia; LDL – madala tihedusega lipoproteiin.

Tabel 3. Simon Broome'i diagnoosikriteeriumid (Austin jt., 2004).

Kriteeriumid	
a	Üld- ja (LDL-kolesterooli) tase üle 290 (190) mg/dl täiskasvanutel ning üle 260 (155) mg/dl alla 16-aastastel lastel
b	Kõõlusksantoomide esinemine indeksipatsiendil või I astme sugulasel
c	<i>LDLR</i> , <i>APOB</i> või <i>PCSK9</i> geeni mutatsioon
d	Enneaegne müokardiinfarkt I astme sugulasel (enne 60. eluaastat) või II astme sugulasel (enne 50. eluaastat)
e	Üldkolesterooli tase üle 290 mg/dl I või II astme täiskasvanud sugulasel või üle 260 mg/dl alla 16-aastastel lastel

Kindel FH diagnoos kriteeriumite a ja b või c täitmisel

Tõenäoline FH diagnoos a ja d või a ja e täitmisel

Lühendid: FH – perekondlik hüperkolesteroleemia; LDL – madala tihedusega lipoproteiin.

LISA 2

Tabel 1. 4 FH põhigeeni koos algus- ja lõpp-positsiooniga vastavalt inimese genoomse referentsjärjestuse assambleeringu versioonile 37 (GRCh37/hg19).

Kromosoom	Geen	Alguspositsioon	Lõpp-positsioon
1	<i>LDLRAP1</i>	25870071	25895377
1	<i>PCSK9</i>	55505221	55530525
2	<i>APOB</i>	21224301	21266945
19	<i>LDLR</i>	11200038	11244492

Tabel 2. DEPICT-iga teostatud geeni prioritseerimisel tuletatud nimekirja ning *Gene Ontology* andmebaasis LDLR-i bioloogilistes radades osalevate geenide listi võrdlusel tuvastatud kattuvad geenid koos algus- ja lõpp-positsiooniga vastavalt inimese genoomse referentsjärjestuse assambleeringu versioonile 37 (GRCh37/hg19).

Kromosoom	Geen	Alguspositsioon	Lõpp-positsioon
1	<i>PCSK9</i>	55505221	55530525
1	<i>ANGPTL3</i>	63063158	63071830
1	<i>DHCR24</i>	55315306	55352891
1	<i>RHCE</i>	25688740	25756683
1	<i>NR0B2</i>	27237980	27240457
2	<i>APOB</i>	21224301	21266945
2	<i>ABCG8</i>	44066103	44105605
2	<i>ABCG5</i>	44039611	44066004
3	<i>PPARG</i>	12328867	12475855
5	<i>HMGCR</i>	74632154	74657929
6	<i>SLC22A1</i>	160542821	160579750
6	<i>PLG</i>	161123270	161174347
7	<i>NPCIL1</i>	44552134	44580914
8	<i>CYP7A1</i>	59402737	59412795
11	<i>ST3GAL4</i>	126225535	126310239
11	<i>FADS2</i>	61560452	61634826
11	<i>APOA5</i>	116660083	116663136
12	<i>HNFA1A</i>	121416346	121440315
16	<i>CETP</i>	56995762	57017757
17	<i>ASGR1</i>	7076750	7082883
19	<i>LDLR</i>	11200038	11244492
19	<i>ATP13A1</i>	19756007	19774502
19	<i>APOC1</i>	45417504	45422606
19	<i>CBLC</i>	45281126	45303891

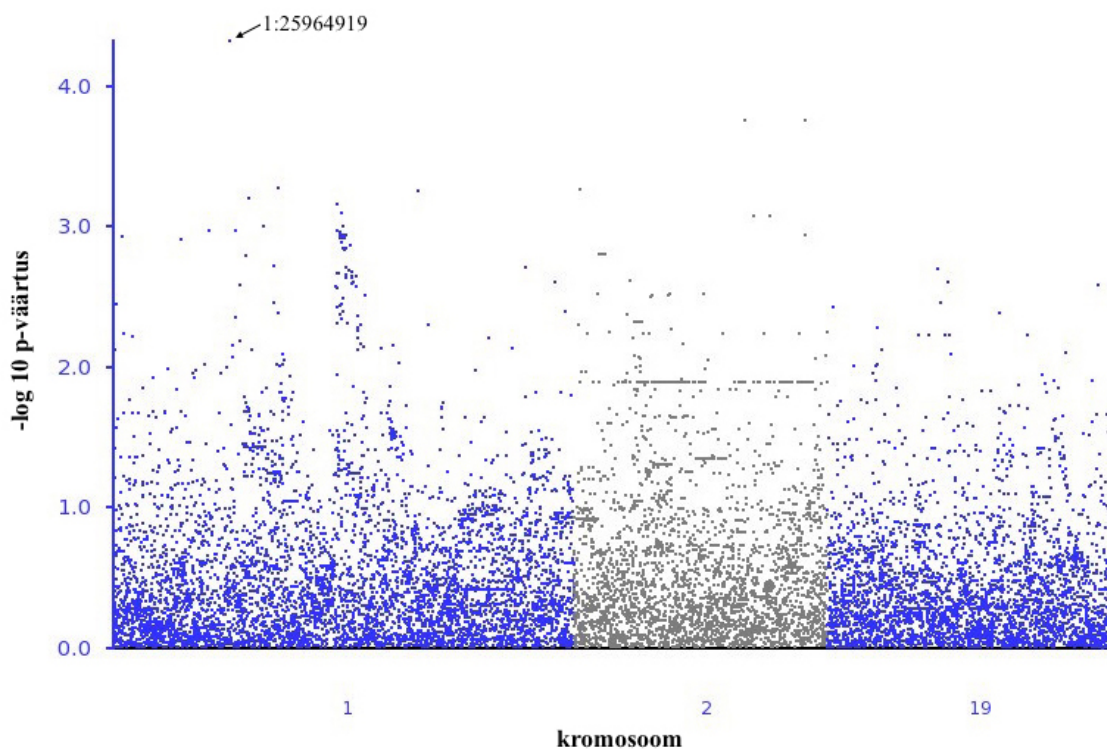
Tabel 3. LDLR-iga seotud bioloogilised rajad vastavalt *Gene Ontology* andmebaasile. Kolmandas tulbas on toodud geenid, mis kattusid DEPICT-iga teostatud geeni prioritseerimisel ning *Gene Ontology* andmebaasis LDLR-iga seotud bioloogilistesse radadesse kuuluvate geenide võrdlemisel.

GO ID	GO bioloogiline rada	Geenid
GO:0045177	Raku apikaalne osa (<i>apical part of cell</i>) (366)	<i>LDLR, ABCG5, ABCG8, NPCIL1</i>
GO:0005794	Golgi aparaat (<i>Golgi apparatus</i>) (1490)	<i>LDLR, APOB, PCSK9, PPARG, ST3GAL4, ANGPTL3, DHCR24</i>
GO:0005764	Lüüsi (lysosoom) (<i>lysosome</i>) (619)	<i>LDLR, PCSK9</i>
GO:0005769	Varane endosoom (<i>early endosome</i>) (305)	<i>LDLR, APOB, PCSK9, ANGPTL3</i>
GO:0005770	Hiline endosoom (<i>late endosome</i>) (214)	<i>LDLR, PCSK9</i>

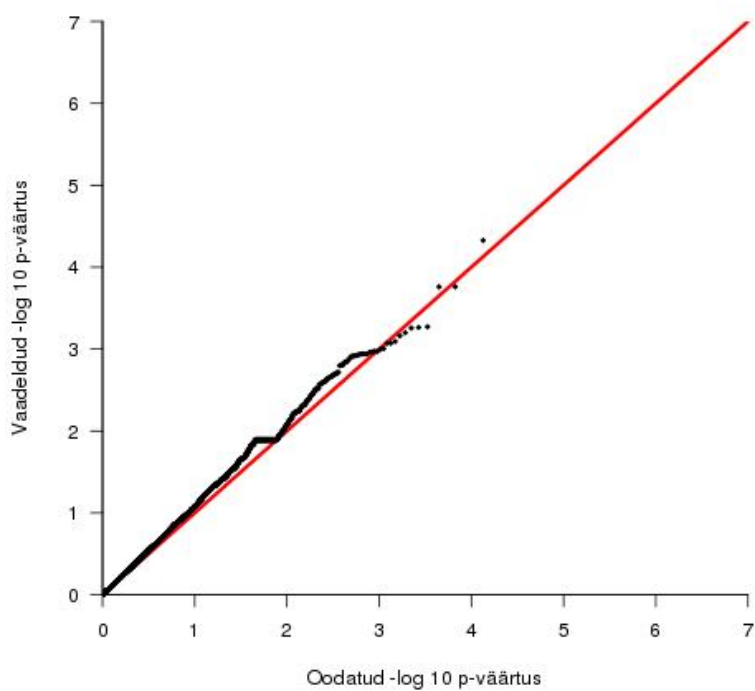
GO:0005905	Kaetud lohuke (<i>coated pit</i>) (67)	LDLR
GO:0009897	Plasmamembraani väliskülg (<i>external side of plasma membrane</i>) (242)	LDLR, PCSK9, PLG
GO:0005887	Plasmamembraani integraalne komponent (<i>integral component of plasma membrane</i>) (1611)	LDLR, RHCE, FADS2, SLC22A1, ASGR1, ATP13A1
GO:0030669	Klatriiniga kaetud endotsüütiline vesiikuli membraan (<i>clathrin-coated endocytic vesicle membrane</i>) (48)	LDLR, APOB
GO:0010008	Endosoomi membraan (<i>endosome membrane</i>) (397)	LDLR, APOB
GO:0016323	Basolateraalne plasmamembraan (<i>basolateral plasma membrane</i>) (215)	LDLR, SLC22A1
GO:0034362	LDL-partikkel (<i>low-density lipoprotein particle</i>) (14)	LDLR, APOB, APOA5
GO:1990666	PCSK9-LDLR kompleks (<i>PCSK9-LDLR complex</i>) (3)	LDLR, PCSK9
GO:0043235	Retseptorkompleks (<i>receptor complex</i>) (331)	LDLR, ABCG5, ABCG8
GO:0001948	Glükoproteiini seondumine (<i>glycoprotein binding</i>) (102)	LDLR
GO:0042802	Identse valgu seondumine (<i>identical protein binding</i>) (1238)	LDLR, PPARG, SLC22A1, NROB2, HNF1A, HMGCR
GO:0032050	Klatriini raske ahela seondumine (<i>clathrin heavy chain binding</i>) (6)	LDLR
GO:0002020	Proteaasi seondumine (<i>protease binding</i>) (106)	LDLR
GO:0030169	LDL-partikli seondumine (<i>low-density lipoprotein particle binding</i>) (15)	LDLR, PCSK9
GO:0005509	Kaltsiumiooni seondumine (<i>calcium ion binding</i>) (720)	LDLR, CBLC
GO:0005041	LDLR-i aktiivsus (<i>low-density lipoprotein receptor activity</i>) (13)	LDLR
GO:0030229	VLDL-retseptori aktiivsus (<i>very-low-density lipoprotein particle receptor activity</i>) (4)	LDLR
GO:0001618	Viiruse retseptori aktiivsus (<i>virus receptor activity</i>) (70)	LDLR
GO:0030299	Kolesterooli imendumine soolest (<i>intestinal cholesterol absorption</i>) (15)	LDLR, ABCG5, ABCG8, NPC1L1, APOA5
GO:0015914	Fosfolipiidi transport (<i>phospholipid transport</i>) (70)	LDLR, ABCG8, APOA5, CETP, APOC1
GO:0070508	Kolesterooli import (<i>cholesterol import</i>) (7)	LDLR
GO:0042159	Lipoproteiini katabolism (<i>lipoprotein catabolic process</i>) (9)	LDLR, APOB
GO:0008203	Kolesterooli metabolism (<i>cholesterol metabolic process</i>) (122)	LDLR, APOB, PCSK9, NPC1L1, ANGPTL3, DHCR24, APOA5, NROB2, HNF1A, HMGCR, CETP, APOC1, CYP7A1
GO:0034383	LDL-partikli eemaldamine (<i>low-density lipoprotein particle clearance</i>) (19)	LDLR, APOB, PCSK9
GO:0010899	Fosfatidüülkoliini katabolismi regulatsioon (<i>regulation of phosphatidylcholine catabolic process</i>) (3)	LDLR, APOC1
GO:0010867	Triglütseriidi biosünteesi positiivne regulatsioon (<i>positive regulation of triglyceride biosynthetic process</i>) (13)	LDLR
GO:2000188	Kolesterooli homöostaasi regulatsioon (<i>regulation of cholesterol homeostasis</i>) (12)	LDLR

Sulgudes on toodud geenide arv bioloogilises rajas vastavalt *Gene Ontology* andmebaasile. Lühendid: GO – *Gene Ontology*.

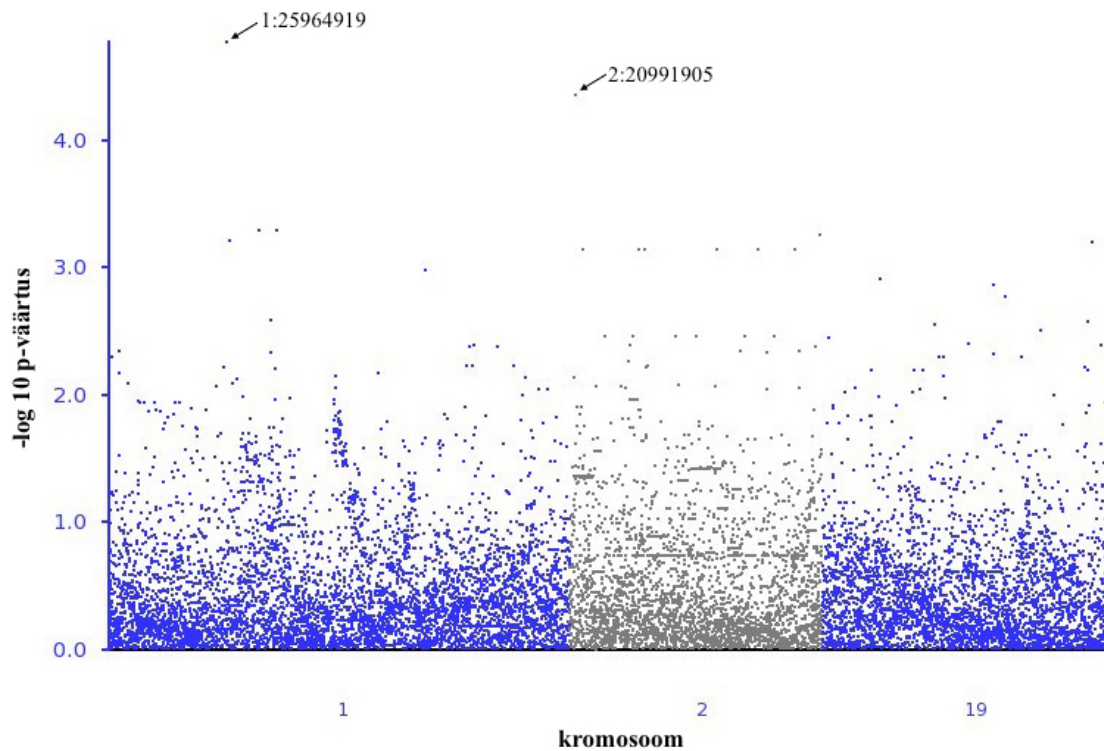
LISA 3



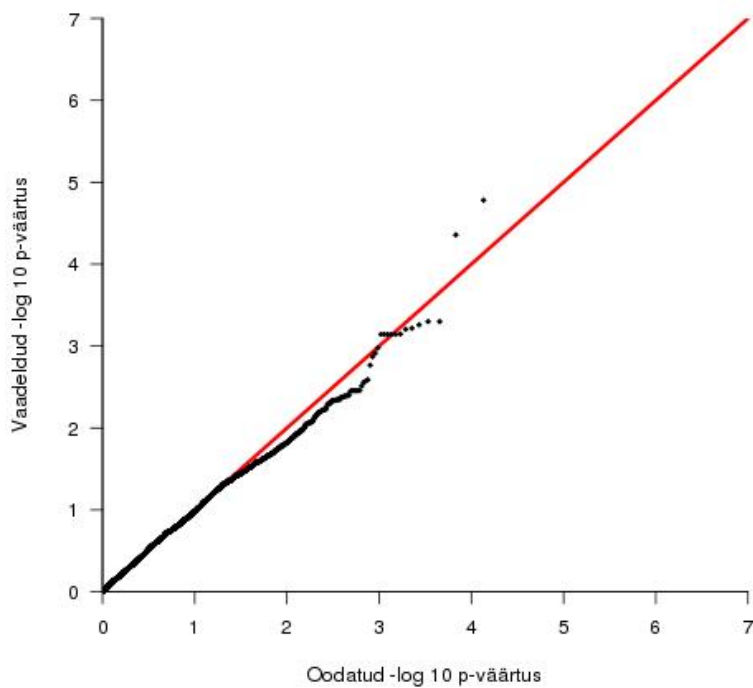
Joonis 1. LDL-C ja 4 geeni analüüsi tulemusi iseloomustav Manhattan joonis. X-teljel on toodud kromosoominumber ning y-teljel p-väärtuste negatiivne kümnendlogaritm.



Joonis 2. LDL-C ja 4 geeni analüüsi tulemusi iseloomustav QQ joonis. X-teljel on toodud oodatud ning y-teljel vaadeldud p-väärtuste negatiivne kümnendlogaritm.



Joonis 3. ApoB ja 4 geeni analüüsi tulemusi iseloomustav Manhattan joonis. X-teljel on toodud kromosoominumber ning y-teljel p-väärtuste negatiivne kümnendlogaritm.



Joonis 4. ApoB ja 4 geeni analüüsi tulemusi iseloomustav QQ joonis. X-teljel on toodud oodatud ning y-teljel vaadeldud p-väärtuste negatiivne kümnendlogaritm.

LIHTLITSENTS

Mina, Anett Tähiste
(sünnikuupäev: 04.11.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Perekondliku hüperkolesteroleemiaga seotud regulaatorsete variantide identifitseerimine Tartu
Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidoonorite täisgenoomi järjestustest,

mille juhendajad on Maris Alver ja Tõnu Esko,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2016