



AF BIOANALYTIKER HENRIETTE HANSEN  
AFDELING FOR BIOKEMI, FARMAKOLOGI OG GENETIK  
GENETISK AFSNIT  
ODENSE UNIVERSITETSHOSPITAL

# Hypobetalipoproteinæmi

## Case

En 7-årig pige har gennem hele sin opvækst vist tegn på mental retardering samt dårlig motorik. Hendes udvikling ligger 2-3 år bagud for hendes jævnaldrende, og hendes vægt samt højde er omkring 2 SD under middel. I en alder af 3 år er pigen kraftigt langsynet, + 4,25 og + 4,00. Pigen kan optræde meget fraværende og virker ofte meget træt.

Gennem opvæksten har hun jævnligt været tilset af børnelæger på Odense Universitetshospital, men årsagen til den forsinkede/manglende udvikling har ikke kunnet fastsættes.

Der er bl.a. lavet kromosomundersøgelse for at udelukke diverse syndromer, herunder Silver-Russell-syndrom. Der er intet abnormt fundet ved disse kromosomundersøgelser.

Løbende under hele udredningsforløbet er der taget standardblodprøver, men der er aldrig blevet ordineret lipidudredning, herunder P-LDL-kolesterol og P-Triglycerider. Da pigen er næsten 6 år, laves der en lipidudredning, og det viser sig, at hendes værdier er meget lave. P-LDL-kolesterol er 0,1-0,4 (ref. voksne 1,8- 4,5) og ikke-fastende P-Triglycerider er 0,13-0,45 (ref. 0,46-1,86 mmol/l). Pigens ApoB samt vitamin A- og E-niveau kontrolleres. Vitamin A bestemmes til 0,95 µmol/l (ref. 1,80-3,90 µmol/l). Vitamin E er nedsat til 9,9 µmol/l (ref. 17-40 µmol/l). ApoB kan ikke påvises < 0,2 g/l (ref. 0,6-1,0 g/l).

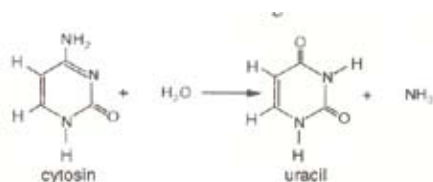
Forældrenes lipidstatus kontrolleres efterfølgende. Pater har betydeligt nedsatte værdier. P-LDL-kolesterol: 0,9 mmol/l, P-Triglycerider: 0,26 mmol/l. Pater viser ingen kliniske symptomer. Meters lipidstatus ligger inden for referenceintervallet. Det har ikke været muligt at fremskaffe ApoB-svar for pater og mater.

På baggrund af det lave LDL-niveau og mangel på ApoB fattes mistanke om hypobetalipoproteinæmi. Afdeling for Biokemi, Farmakologi og Genetik (BFG) Odense Universitetshospital kontaktes med henblik på genetisk udredning af familien.

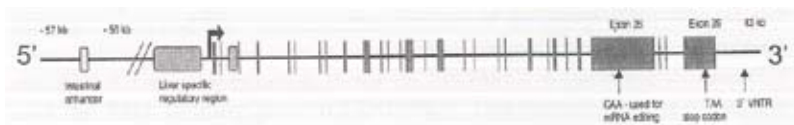
**Udviklingen inden for genetiske analysemetoder går meget stærkt i disse år. Artiklen her beskriver en genetisk udredning af familien til en 7-årig pige med mistænkt hypobetalipoproteinæmi. En udredning, som med udviklingen af molekylærgenetiske teknikker samt kortlægningen af det humane genom i dag er blevet tilgængelig.**

Hypobetalipoproteinæmi er en tilstand, hvor der pga. mangel af Apolipoprotein B (ApoB) ikke absorberes vitamin A og E i tilstrækkelige mængder. Det gælder for både vitamin A og E, at de er fedtopløselige og optages derfor via fedtmetabolismen. Vitamin A og E spiller begge en vigtig rolle i forbindelse med vækst og udvikling. Specielt i de første leveår er det vigtigt med tilstrækkelig mængde vitamin A og E. Ved dårlig optagelse af vitamin A og E kan der bl.a. udvikles mental retardering samt synsnedsettelse.

Hypobetalipoproteinæmi er en yderst sjælden autosomal codominant arvelig sygdom. At en sygdom er autosomal codominant betyder, at tilstedeværelsen af blot et sygt allel vil komme til udtryk ved et nedsat ApoB-niveau. Man skulle forvente, at ApoB-niveauet er halveret, hvis der forekommer mutationer på det ene allel (heterozygot), dette er dog ikke tilfældet. Det er vist, at ApoB-niveauet for heterozygote ligger på mellem 1/4 og 1/3 af det normale.<sup>1)</sup> Trods det lave ApoB-niveau er heterozygote ofte uden symptomer. Rent fænotypemæssigt er man altså ikke "syg", hvis man kun har mutationer på det ene allel. Der skal mutationer på begge alleler (homozygot eller compound heterozygot) til, for at personen viser kliniske symptomer på hypobetalipoproteinæmi.



**FIGUR 1:**  
Deaminering af Cytosin. Ved fraspaltning af aninogruppen dannes uracil



**FIGUR 2:**  
ApoB-genets opbygning.  
De grå felter/streger illustrerer de enkelte exons og deres indbyrdes placering.

## Apolipoprotein B (ApoB)

ApoB spiller en central rolle i fedtmetabolismen. Der findes to former af ApoB, ApoB100 og ApoB48. Tallene 100 og 48 refererer til størrelsen af proteinet. ApoB100 er det største og dermed 100 %, mens ApoB48 kun er 48 % af det totale protein.<sup>2)</sup>

ApoB48 fremkommer ved en deaminering af et cytosin. Fig. 1. Dette bevirker en udskiftning af cytosin til et uracil i position 6666, som medfører dannelsen af et stopcodon. Enzymet (APOBEC1) som katalyserer denne proces, findes kun i tarmepithel, hvorfor man kun ser ApoB48 i tarmen.<sup>1)</sup>

De to isoformer af ApoB deltager i fedtmetabolismen på forskellige niveauer. ApoB48 findes i tarmen, hvor det binder sig til chylomicronerne og medvirker til transporten af triglycerider i blodbanen. ApoB100 bindes til VLDL og LDL i leveren. Her medierer det bindingen til LDL-receptoren og er derfor vigtig for optagelsen af kolesterol samt de fedtopløselige vitaminer. Er der ikke noget ApoB til stede, hæmmes optagelsen af de fedtopløselige vitaminer.

Den primære optagelse af Vitamin E og provitamin A sker vha. very low den-

sity lipoprotein (VLDL) og low density lipoprotein (LDL). Chylomicronerne kan også transportere vitamin E, men ikke i samme omfang som VLDL. Kolesterol optages ligesom vitamin A og E via LDL, der vil derfor også være påvirkning af optagelsen af kolesterol til centralnervesystemet.

## Genets opbygning

Genet, som koder for ApoB, er lokaliseret på den korte arm af kromosom 2, 2p23-24. DNA sekvensen er 43 kb, hvoraf det kodende område (mRNA) dækker 14 kb.

ApoB-genet indeholder 29 exons (kodende områder), hvoraf exon 26 dækker over halvdelen af genet og er med sine 7572 basepar (bp) langt det største exon i dette gen. Fig. 2. På grund af størrelsen af exon 26 har det været nødvendigt at opdele dette exon i flere fragmenter ved analyse på dHPLC (denaturing High Performance Liquid Chromatography). Som hovedregel er det ikke muligt at analysere fragmenter længere end 700 bp på dHPLC-systemet. Fragmenterne er navngivet kronologisk som exon 26-1, exon 26-2 osv.

Som inden for al anden molekylær-

medicinsk forskning går det stærkt med at påvise nye mutationer. I 2003 kendte man til omkring 40 mutationer i ApoB-genet.<sup>3)</sup> Hvor man i 2005 havde påvist mere end 60 forskellige mutationer i ApoB genet.<sup>1)</sup> Langt de fleste mutationer er påvist i exon 26. Da exon 26 er langt det største exon, må det ikke tolkes, som om frekvensen af mutationer i exon 26 er større end i andre exons.

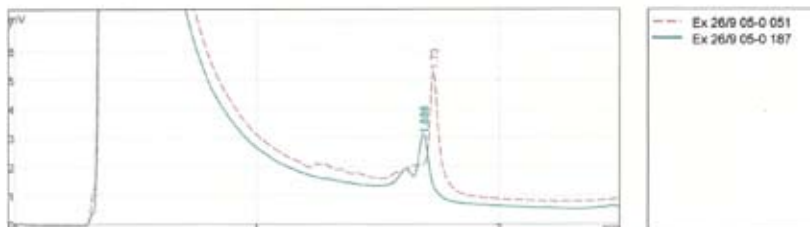
Størsteparten af de publicerede mutationer er stopmutationer, som forårsager trunkeerede former af proteinet. Da mange af disse trunkeerede proteiner slet ikke eller i ringe grad udtrykkes i lipoproteiner, kan man med rimelig sikkerhed udtale sig om, hvorvidt disse er sygdomsfremkaldende. For eksempel ved man, at trunkeerede ApoB-proteiner kortere end ApoB30 ikke indbygges i lipoproteinerne og dermed ingen effekt har.<sup>2)</sup> Hvorvidt en missense-mutation er sygdomsfremkaldende eller ej, er straks sværere at vurdere.

## Materialer og metoder

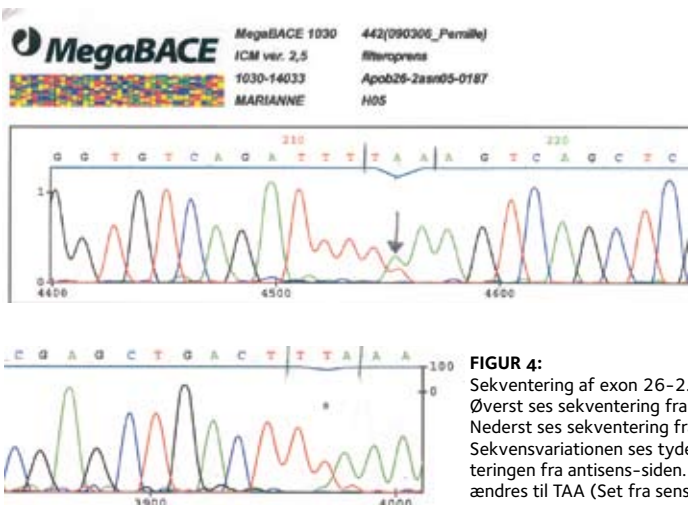
Ud fra eksisterende litteratur findes der belæg for at udføre analysen på DNA-niveau og ikke proteinniveau. Det er

### ApoB 100, exon 26/9, 57.5 C

CONSOLIDATED ANALYSIS REPORT  
 User: USER  
 Date: Mon Feb 13 10:51:22 CET  
 Selection: Chromatogram



**FIGUR 3:**  
 Kurver fra HPLC. Prøve med sekvensvariation (grøn kurve) fremkommer med to toppe. Wildtype (brun kurve) fremkommer med en top.



**FIGUR 4:**  
 Sekventering af exon 26-2. Øverst ses sekventering fra antisens-siden. Nederst ses sekventering fra sens-siden. Sekvensvariationen ses tydeligst på sekventeringen fra antisens-siden. Det ses, at TTA ændres til TAA (Set fra sens-siden)



**FIGUR 5:**  
 3% metaphor gel. Elektroforese af restriktionsenzymkæring (RFLP) Exon 26-2 : Wildtype skæres af Dral Exon 26-9 : Mutant skæres af Bfal

påvist, at det ikke er muligt at detektere trunkeerede proteiner kortere end ApoB30, da disse ikke syntetiseres<sup>4</sup>). Et andet stort problem ved at arbejde på protein-niveau er, at mutationer, som ikke fører til trunkeerede proteiner, ikke kan detekteres. Missense-mutationer fører for eksempel ikke til afkortede proteiner, men til proteiner med ændret aminosyresammensætning. Analysen udføres på mater, pater og pigen.

DNA isoleres fra EDTA-stabiliseret blod vha. saltfældning. Koncentrationen måles, og prøverne fortyndes til 100 ng/µl.

Der udføres PCR (opformering af DNA) på udvalgte fragmenter af genet.

Fragmenter af genet scannes vha. af dHPLC WAVE System fra Trangenomic. Med dette system er det ikke muligt at bestemme, hvilke sekvensvariationer der er til stede, men kun hvorvidt der er sekvensvariationer til stede eller ej. En wildtype ("normal") prøve vil ved analyse på dHPLC fremkomme med en

kurve med en enkelt top, mens prøver med sekvensvariationer fremkommer med kurver med flere toppe. Fig. 3.

Til fastlæggelse af, hvilke sekvensvariationer der forekommer, benyttes sekventering. Vi har i dette arbejde benyttet to sekventeringssystemer. MegaBace 500 fra Amersham, samt ABI 3130 fra Applied Biosystems Fig. 4.

Som en sidste konfirmation af resultat fundet ved sekventering er der udført restriktionsenzymkæring (RFLP). Der er udført RFLP på exon 26 fragment 2 og fragment 9. Dral kløver exon 26-2 wildtype allel i fragmenter på 213 og 268 bp, mens det mutante allel ikke kløves. Udføres der gelelektroforese, vil en homozygot wildtype fremkomme med bånd/fragmenter på 213 og 268 bp. En homozygot mutant vil ikke blive kløvet og ses med et fragment på 481 bp. Er prøven heterozygot, vil alle tre bånd fremkomme 213, 268 og 481 bp. Lignende analyse

er udført på exon 26-9. Bfal kløver det mutante allel af exon 26-9 i to fragmenter 137 bp og 463 bp, mens wildtypen ikke kløves og fremkommer med 600 bp. Fig. 5

### Resultater

Der er i alt påvist 3 mutationer i de undersøgte fragmenter. Hos mater påviste vi 2 missense-mutationer, p.I2010T samt p.P2712L. Begge mutationer forårsager en udskiftning af en aminosyre til en anden aminosyre i ApoB-proteinet. Denne udskiftning kan bevirke en ændret funktion af proteinet.

Hvorvidt p.I2010T er sygdomsfremkaldende, kan vi ikke med sikkerhed udtale os om, da den ikke tidligere er påvist. Det vil kræve videre studier at afgøre dette. Sekvensvariationen ligger i den første del af genet som koder for ApoB48, hvilket vil betyde, at der vil ses påvirkning i ApoB48-niveauet.

Trond P. Leren påviser i deres studie,

at p.P2712L er en sygdomsfremkaldende mutation<sup>5</sup>). Vi kan ikke umiddelbart se effekten af denne mutation hos mater. Hendes P-LDL-kolesterol samt P-Triglycerider ligger begge inden for referenceintervallet. Hvis der er tale om en mutation, kan man forvente, at ApoB vil være 1/3 til 1/4 af referenceniveauet. Denne analyse er desværre ikke udført på mater og pater, hvorfor disse svar ikke er tilgængelige. Vi må ud fra det publicerede formode, at der minimum er en mutation til stede hos mater.

Hos pater påviste vi en stopmutation p.L1543X. En stopmutation i denne position medfører en trunckeret form af proteinet på 34 %, ApoB34. Variationen ligger i position 1543, der er i alt 4536 baser i genet, vi har  $1543/4536 = 34 \%$

Pigen har arvet alle 3 mutationer. De 2 missense-mutationer fra mater og stopmutationen fra pater. Hun er altså compound heterozygot (har 2 syge alleler, et fra pater og et fra mater). Fordi pigens har arvet begge missense-mutationer fra mater, kan vi konkludere, at maters to mutationer ligger på samme allel. Denne information er vigtig, hvis man ønsker at lave en risikovurdering i forbindelse med senere graviditet. Der vil være 25 % risiko for, at pigens forældre får et andet barn med samme sygdom. I den pågældende sag har forældrene ingen planer om at skulle have flere børn. Pigen har to ældre søskende, som begge er raske. Hvorvidt pigens to søskende har arvet den ene mutation, vides ikke, da disse ikke er udredt genetisk.

## Konklusion

Pigen blev sat i behandling med vitamin A og E. Efter ganske kort tids behandling kunne man se store fremskridt. Pigen havde indimellem haft tendenser til at være meget fraværende, disse symptomer er ikke set over en periode på 2 måneder. Efter ca. 2 års behandling er pigens motoriske niveau aldersvarende, mens hendes mentale niveau stadig ligger under det forventede. Fortsat behandling med vitamin A og E vil formentlig ikke kunne fratage pigens alle hendes symptomer, men mindske skaderne.

## REFERENCELISTE

- 1) Amanda J. Hooper, Frank M. van Bockxmeer and John R. Burnett.  
Monogenic hypocholesterolaemic lipid disorders and apolipoprotein B metabolism. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 2005; 42(5-6):515-545
- 2) Vivienne M. Homer, PhD, Peter M.. George, FRCPA, Stephen du Toit, BSc Hons,MMED, James S. Davidson, PhD, FRC-Path and Callum J. Wilson, FRACP.  
Mental Retardation and Ataxia due to Normotriglyceridemic Hypobetalipoproteinemia. Ann Neurol 2005; 58:160-163
- 3) A.J. Whitfield, A.D. Marais, K. Robertson, P.H.R. Barrett, F.M. van Bockxmeer, and J.R. Burnett.  
Four Novel Mutations in APOB Causing Heterozygous and Homozygous Familial Hypobetalipoproteinemia. Human Mutation, mutation in brif #634 (2003) Online
- 4) S.W. Fouchier, R.R. Sankatsing, J.Peter, S.Castillo, M.Pocovi, R.Alonso, J.J.P. Kastelein, J.C. Defesche.  
High frequency of APOB gene mutations causing familial hypobetalipoproteinaemia in patients of Dutch and Spanish descent. J.Med Genet 2005;42:e23
- 5) Screening for mutations of the apolipoprotein B gene causing hypocholesterolemia. Trond P. Leren, Kari S. Bakker, Vigdis Hoel, Ingvar Hjermann, Kåre Berg Hum Genet 1998;102:44-49

## ORDFORKLARING

**Allel:** Genet fra den ene forælder.

**Mutation:** Sygdomsfremkaldende ændring i genet.

**Missense-mutation:** En base-substitution, som medfører en aminosyreændring.

**Polymorfi:** Ændring i genet, som ikke er sygdomsfremkaldende. Forekommer hos mere end 1 % af befolkningen. Der er dog set sygdomsfremkaldende mutationer, som forekommer i mere end 1 % af befolkningen.

**Sekvensvariation:** Ændring i genet, som enten kan være en mutation eller en polymorfi.

**Heterozygot:** Man har arvet en sekvensvariation på det ene allel, men ikke på det andet.

**Homozygot:** Man har den samme sekvensvariation på begge alleler.

**Compound heterozygot:** Man har arvet en mutation på det ene allel og en anden mutation på det andet allel. Man er altså ikke homozygot for nogen af mutationerne, men har alligevel ingen raske alleler og vil fænotypemæssigt fremstå som syg.

**Exon:** Det kodende område i genet.

**Intron:** Det ikke-kodende område i DNA. Introns splejses ud af DNA under dannelse af mRNA, som koder for proteiner.

**Codon:** De tre baser, som sammen læses og koder for en aminosyre.

**Stopcodon:** Tre baser, som koder for et stop. Dette betyder, at resten af mRNA ikke aflæses og omsættes til aminosyrer. Herved vil proteinet blive for kort.

**Chylomicroner:** Lipoproteinpartikel, der transporterer triglycerider og kolesterol.