

توزیع پلی مورفیسم های ApoE در جمعیت لر

فرهاد شاهسوار^۱، توماج سابوته^۲، مهرزاد جعفرزاده^۳

۱- استادیار، گروه ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

۲- کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

۳- کارشناس ارشد مرکز تحقیقات ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

یافته / دوره پانزدهم / شماره ۵ / زمستان ۹۲ / مسلسل ۵۸

چکیده

دریافت مقاله: ۹۲/۹/۱۰، پذیرش مقاله: ۹۲/۱۰/۱۸

*** مقدمه:** آپولیپوپروتئین E (ApoE) در استعداد ابتلا به انواع مختلف بیماری ها مشارکت دارد. هدف این مطالعه آنالیز ژنوتیپی ApoE در قوم لر برای اولین بار بود.

*** مواد و روش ها:** در این مطالعه ۱۰۰ فرد سالم غیر خویشاوند لر از نظر پلی مورفیسم های ApoE به روش واکنش زنجیره ای پلیمرز بر اساس پلی مورفیسم طول قطعه محدود شونده (PCR-RFLP) تایپ گردیدند. در نهایت، فراوانی ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسم های ApoE در جمعیت لر با جمعیت ایرانی مقایسه شد.

*** یافته ها:** شش ژنوتیپ ApoE و تمام پلی مورفیسم های ApoE در جمعیت لر مشاهده گردیدند. ژنوتیپ E3/E3 با فراوانی ۴۸٪ شایع ترین ژنوتیپ در جمعیت لر بود. شایع ترین آلل در جمعیت لر نیز آلل E3 بود.

*** بحث و نتیجه گیری:** نتایج نشان می دهد که فراوانی پلی مورفیسم های ApoE در جمعیت لر دارای ویژگی های کلی گزارش شده در جمعیت ایرانی می باشد، ولی با کاهش یا افزایش برخی فراوانی ها، هنوز هم منحصر به فرد است.

*** واژه های کلیدی:** آپولیپوپروتئین E، پلی مورفیسم، جمعیت لر، ایران.

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات ایمنولوژی.

پست الکترونیک: mehrzadjafarzadeh@yahoo.com

مقدمه

آپولیپوپروتئین ها (Apo)^۱ با حذف لیپیدها از لیپوپروتئین های پلاسما و الکتروفورز پروتئین های حاصله کشف شدند. در جداسازی الکتروفورزی، آپولیپوپروتئین هایی که در باند α قرار می گیرند ApoA، آپولیپوپروتئین هایی که در باند β قرار می گیرند ApoB و آپولیپوپروتئین هایی که در باند pre- β قرار می گیرند ApoC نامیده می شوند. پس از خالص سازی بیشتر پروتئین ها و تعیین ترادف و بررسی های ژنتیکی، آپولیپوپروتئین ها دوباره طبقه بندی شدند و نهایتاً آپولیپوپروتئین هایی که در سوخت و ساز لیپوپروتئین ها تأثیر می گذارند به صورت آپولیپوپروتئین های A1، A2، A4، B48، B100، C1، C2، C3، D، E، F، H، L و M معرفی گردیدند (۱). مطالعات مختلف ارتباط این آپولیپوپروتئین ها با بیماری های مختلف را نشان داده اند. تاکنون ارتباط ApoA با بیماری عروق کرونری قلب (CHD)^۲ معنی دار گزارش شده است (۲). همچنین ApoA2 در آترواسکلروز و بیماری قلبی-عروقی (CVD)^۳ و نیز ApoA1، ApoB و نسبت ApoB/A1 در CHD و آترواسکلروز به عنوان عوامل ژنتیکی مهمی شناخته شده اند (۴،۵). مطالعات دیگر، پلی مورفیسم های ApoB را در سکت قلبی (۶) و ApoB100 را در هایپرکلسترولمی خانوادگی و CHD دخیل دانسته اند (۷). همچنین مطالعات نشان داده اند که سطح ApoB و LDL-C و میزان ابتلا به بیماری شریان کرونری (CAD)^۴ به طور معنی داری با یکدیگر ارتباط دارند (۸). مطالعات مختلفی نقش ApoE را در متابولیسم کلسترول (۹)، LDL-C (۱۰)، CHD (۱۱)، CAD (۱۲)، آترواسکلروز (۱۳) و آلزایمر (۱۴) مؤثر گزارش نموده اند. در میان انواع مختلف

آپولیپوپروتئین ها، ApoE به دلیل نقش داشتن در بیماری های متعدد، از اهمیت ویژه ای برخوردار است. ژن ApoE بر روی کروموزوم ۱۹ و در مجاورت مجموعه ژنی ApoC1/C2 قرار دارد. شامل چهار اگزون و سه اینترون است که از ۳۵۹۷ نوکلئوتید تشکیل شده است و سبب تولید پروتئینی ۳۴kDa با ۲۹۹ آمینواسید می شود (۱۵،۱۶). برخلاف سایر لیپوپروتئین ها، ApoE از همه بافت ها تولید می شود و علاوه بر انتقال لیپید، نقش های مختلفی را بر عهده دارد. اگرچه جزئیات نقش ApoE در انتقال لیپید مشخص گردیده است اما بررسی سایر نقش های ApoE هنوز در مراحل ابتدایی مطالعات است. با این وجود، مطالعات نقش ApoE را در تنظیم عملکردهای سلولی بافت ها و ارگان های مختلف، مؤثر دانسته اند (۱۷). ژن ApoE دارای سه آلل $\epsilon 2$ ، $\epsilon 3$ و $\epsilon 4$ می باشد که سه پروتئین $\epsilon 2$ ، $\epsilon 3$ و $\epsilon 4$ را تولید می کنند و می توانند به صورت شش ژنوتیپ $\epsilon 2/\epsilon 2$ ، $\epsilon 2/\epsilon 3$ ، $\epsilon 2/\epsilon 4$ ، $\epsilon 3/\epsilon 3$ ، $\epsilon 3/\epsilon 4$ و $\epsilon 4/\epsilon 4$ بروز نمایند. تفاوت این پلی مورفیسم ها در آمینواسیدهای جایگاه ۱۱۲ و ۱۵۸ است. ApoE2 در هر دو جایگاه سیستئین دارد، ApoE3 در جایگاه ۱۱۲ سیستئین و در جایگاه ۱۵۸ آرژنین دارد و ApoE4 در هر دو جایگاه آرژنین دارد (۱۸). مطالعات مختلف، تأثیر متفاوتی از پلی مورفیسم های ApoE، در ابتلا به بیماری های گوناگون را گزارش نموده اند (۱۹،۲۰). از آنجایی که فراوانی پلی مورفیسم های ApoE در اقوام مختلف متفاوت است و تاکنون مطالعه ای در این خصوص در جمعیت لر انجام نشده است، این مطالعه با هدف مقایسه فراوانی پلی مورفیسم های ApoE در جمعیت سالم لر و ایرانی،

1. Apolipoprotein

2. Coronary Heart Disease

3. Cardiovascular Disease

4. Coronary artery disease

بمنظور انجام مطالعه ای مقدماتی برای پژوهش های آینده، طراحی گردید.

مواد و روش ها

در این مطالعه ۱۰۰ فرد سالم غیرخویشاوند لر ساکن استان لرستان شامل ۵۰ مرد و ۵۰ زن در محدوده ی سنی ۲۵-۱۸ سال که سابقه ابتلا به بیماری های قلبی-عروقی، کلیوی، کبدی، فشارخون بالا، دیس لیپیدمی و مصرف سیگار و الکل را نداشتند، به صورت تصادفی انتخاب شدند. اطلاعات نژادی از محل تولد افراد و محل تولد والدین و اجداد آنها گرفته شد. نمونه های خون با رضایت کتبی آگاهانه از افراد جمع آوری شدند. همچنین تأییدیه کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی لرستان گرفته شده بود.

نمونه های DNA افراد به روش salting-out از لکوسیت های خون محیطی استخراج شدند (۲۱). سپس در مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز بر اساس پلی مورفیسم طول قطعه محدود شونده (PCR-RFLP) که قبلاً توسط هیکسون و همکاران (۲۲) ارائه شده بود، به منظور تعیین پلی مورفیسم های آپولیپوپروتئین های E1، E2 و E3 از روی DNA ژنومی افراد استفاده شد. سکانس پرایمر

رو به جلو (F) و معکوس (R)، آنزیم محدود کننده و طول قطعات حاصل از هضم آنزیمی برای آلل های مختلف در جداول ۱ و ۲ آمده است. واکنش زنجیره ای پلیمرز تحت شرایط دمایی زیر انجام شد. سیکل های PCR شامل یک مرحله دناتوراسیون اولیه در 95°C به مدت ۳۰ دقیقه و در ادامه ۳۳ سیکل دناتوراسیون در 95°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در 55°C به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در 70°C به مدت ۱ دقیقه با یک مرحله گسترش نهایی در 70°C به مدت ۷ دقیقه و نگهداری در 4°C بود (۲۲). سپس، بمنظور هضم سکانس های ApoE در محصولات PCR، به هر میکروتیوب ۵ واحد از آنزیم محدود کننده Hha1 (New England Biolabs) مستقیماً اضافه شد. سپس در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند (۲۲). محصولات PCR در ژل پلی آکرلامید ۱۰٪ الکتروفورز شدند و قطعات هضم شده تحت نور فرابنفش قابل رؤیت گردیدند. اندازه قطعات حاصل از هضم آنزیمی Hha1، با مقایسه قطعات با DNA Ladder تخمین زده شد. اعتبار نتایج حاصل از روش طراحی شده، با تعیین سکانس محصولات حاصل از چند نمونه انتخاب شده به صورت تصادفی، تأیید گردید.

جدول ۱. سکانس پرایمرها، آنزیم محدود کننده و طول قطعات حاصل از هضم آنزیمی برای ژنوتایپینگ پلی مورفیسم های ApoE

سکانس های پرایمرها	اندازه محصولات PCR	آنزیم محدود کننده	طول قطعات حاصله برای آلل های مختلف
F: 5'ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC3' R: 5'TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA3'	۲۹۴ bp	Hha1	۹۱bp+۸۳bp+۷۲bp+۴۸bp

F: Forward; R: Reverse; bp: base pairs

فراوانی ژنوتیپی و آلی پلی مورفیسم های ApoE در جمعیت لر از طریق شمارش مستقیم تعیین گردیدند. نتایج مطالعه بر روی ۱۰۰ فرد سالم غیرخویشاوند لر با گروه کنترل مطالعه فلاح و همکاران (۱۲) بر روی جمعیت ایرانی مقایسه شد. اختلافات در فراوانی ژنوتیپی و آلی پلی مورفیسم های ApoE

بین جمعیت لر و جمعیت ایرانی به وسیله آزمون chi-squared و آزمون دقیق فیشر تخمین زده شدند. با توجه به چندگانه بودن مقایسات، برای تصحیح معنی داری تصادفی از روش تصحیح Yate's استفاده گردید. در نهایت، پس از تصحیح، $P < 0.05$

تصحیح، این اختلاف نیز معنی داری خود را از دست داد ($PC=0/06$).

فراوانی آلل های ϵ_2 و ϵ_4 نیز در جمعیت ایرانی بیشتر از جمعیت لر مشاهده شد، اما این اختلاف معنی دار نبود. اگرچه فراوانی آلل ϵ_3 به طور معنی داری در جمعیت لر بیشتر از جمعیت ایرانی مشاهده شد (70% در مقابل 56% ، $P=0/04$)، اما پس از تصحیح، این اختلاف معنی داری خود را از دست داد ($PC=0/056$).

جدول ۳. توزیع فراوانی ژنوتیپ های ApoE در جمعیت های سالم لر و ایرانی

ژنوتیپ های ApoE	درصد افراد لر	درصد افراد ایرانی*
ϵ_2/ϵ_2	۷	۸
ϵ_2/ϵ_3	۱۰	۱۸
ϵ_2/ϵ_4	۴	۶
ϵ_3/ϵ_3	**۴۸	۳۴
ϵ_3/ϵ_4	**۱۲	۴
ϵ_4/ϵ_4	۱۹	۳۰

* فلاح و همکاران ۲۰۰۹

** اختلاف معنی دار پیش از تصحیح ($P<0/05$)

جدول ۴. توزیع آلل های ApoE در جمعیت های سالم لر و ایرانی

آلل های ApoE	جمعیت لر	جمعیت ایرانی*
ϵ_2	۲۸	۴۰
ϵ_3	**۱۱۸	۹۰
ϵ_4	۵۴	۷۰

* فلاح و همکاران ۲۰۰۹

** اختلاف معنی دار پیش از تصحیح ($P<0/05$)

بحث و نتیجه گیری

آپولیپوپروتئین E گلیکوپروتئینی است که بخشی از آپولیپوپروتئین های غنی از تری گلیسرید مانند VLDL، IDL و باقیمانده ی شیلومیکرون و نیز HDL های ترشح شده از کبد را تشکیل می دهد. این آپولیپوپروتئین با اتصال به گیرنده های

از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. تمام تجزیه و تحلیل های آماری از طریق نرم افزار SPSS 18 صورت پذیرفت.

جدول ۲. طول قطعات حاصل از هضم آنزیمی برای ژنوتیپ های ApoE

ژنوتیپ ها	طول قطعات (bp)
ϵ_2/ϵ_2	۹۱+۸۳
ϵ_2/ϵ_3	۹۱+۸۳+۴۸
ϵ_2/ϵ_4	۹۱+۸۳+۷۲+۴۸
ϵ_3/ϵ_3	۹۱+۴۸
ϵ_3/ϵ_4	۹۱+۷۲+۴۸
ϵ_4/ϵ_4	۷۲+۴۸

یافته ها

در این مطالعه ۱۰۰ فرد لر سالم غیر خویشاوند ساکن استان لرستان مورد بررسی قرار گرفتند. فراوانی های ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسیم های ApoE در جداول ۳ و ۴ نشان داده شده اند. در این مطالعه سه آلل ϵ_2 ، ϵ_3 و ϵ_4 را به همراه شش ژنوتیپ ϵ_2/ϵ_2 ، ϵ_2/ϵ_3 ، ϵ_2/ϵ_4 ، ϵ_3/ϵ_3 ، ϵ_3/ϵ_4 و ϵ_4/ϵ_4 بررسی کردیم. تعادل هاردی-واینبرگ در توزیع ژنوتیپی و آللی برقرار بود.

فراوانی های ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسیم های ApoE در دو جمعیت لر و ایرانی اختلاف معنی داری نداشتند. فراوانی ژنوتیپ ϵ_2/ϵ_4 در جمعیت ایرانی $1/5$ برابر جمعیت لر بود. همچنین فراوانی ژنوتیپ های ϵ_2/ϵ_3 و ϵ_4/ϵ_4 به طور قابل توجهی در جمعیت ایرانی بیشتر از جمعیت لر بود. این در حالی است که هیچ کدام از اختلافات فوق از نظر آماری معنی دار نبودند. اگرچه فراوانی ژنوتیپ های ϵ_3/ϵ_3 و ϵ_3/ϵ_4 به طور معنی داری در جمعیت لر بیشتر از جمعیت ایرانی بود (بترتیب 48% در مقابل 34% ، $P=0/04$ و 12% در مقابل 4% ، $P=0/03$) اما پس از

لیپوپروتئین کبدی به عنوان لیگاند برای ApoB، نقش اساسی در برداشت کبدی این لیپوپروتئین ها و تعدیل میزان لیپوپروتئین های پلاسما، تری گلیسریدها و کلسترول بر عهده دارد. همچنین ApoE در مهار تجمع پلاکت ها، تسهیل خروج کلسترول ماکروفاژها، تنظیم پاسخ های ایمنی و تنظیم پرولیفراسیون سلول های عضلات صاف عروقی نقش دارد. آپولیپوپروتئین E دارای سه آلل $E2$ ، $E3$ و $E4$ می باشد که آلل $E3$ در اکثر جمعیت ها رایج ترین آلل است. توانایی اتصال پلی مورفیسم $E2$ به گیرنده ی لیپوپروتئین کبدی ضعیف است و منجر به انباشته شدن VLDL و باقیمانده ی شیلولمیکرون می گردد. اما در شرایط آزمایشگاهی توانایی اتصال پلی مورفیسم $E4$ و $E3$ به این گیرنده ها مشابه یکدیگر است، هرچند که تأثیر ApoE4 در پاک سازی لیپوپروتئین های غنی از تری گلیسرید در بدن نامعلوم است. آلل $E2$ با افزایش میزان تری گلیسرید ناشتا همراه است، در حالی که آلل $E4$ منجر به افزایش کلسترول و LDL سرم می شود (۲۳).

مطالعات مختلف فراوانی پلی مورفیسم های ApoE را در جمعیت های متفاوت، بررسی نموده اند. به طور معمول در اکثر جمعیت ها ژنوتیپ های $E3/E3$ ، $E3/E4$ ، $E2/E3$ ، $E4/E4$ ، $E2/E2$ و $E2/E4$ به ترتیب بیشترین تا کمترین فراوانی را دارند (۲۴). مطالعه ونتاکارامانا^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۲ بر روی جمعیت هندی نشان داد که فراوانی آلل $E2$ ، $E3$ و $E4$ به ترتیب $۳/۵\%$ ، $۹۲-۸۵\%$ و $۳/۹\%$ می باشد (۲۵) که با نتایج مطالعه ما بر روی قوم لر ساکن استان لرستان مطابقت ندارد. مطالعات مختلف نشان داده اند که فراوانی آلل $E4$ در جمعیت اروپای شمالی شامل فنلاندی و آلمانی ($۱۹-۱۴\%$) (۲۶-۲۸) بیشتر از جمعیت اروپای جنوبی شامل ایتالیایی و فرانسوی ($۱۲-۷\%$) است (۲۹،۳۰). همچنین آلل $E2$ در جمعیت فنلاندی، ژاپنی و نیجریه ای با فراوانی نسبتاً اندکی ($۴-۳\%$) گزارش شده است (۳۱،۳۲). از سوی دیگر فراوانی آلل $E2$ در

جمعیت هندی-آمریکایی و مکزیکی نیز اندک ($۴-۲\%$) گزارش شده است (۳۳،۳۴). مطالعه آساکاوا^۲ و همکاران که بر روی جمعیتی شامل ۹۵ نفر از ۹ قبیله هندی های آمریکای جنوبی انجام شد، در هیچ موردی آلل $E2$ را مشاهده نکردند (۳۵). مطالعه کاتائوکا^۳ و همکاران احتمال وجود آلل $E2$ در جمعیت هندی های آمریکای جنوبی را نتیجه ی ترکیب نژادی دانست (۳۳). البته در مطالعه حاضر، فراوانی پلی مورفیسم های ApoE در جمعیت لر و جمعیت ایرانی تقریباً اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند. علت این اختلاف فراوانی ها در نژادها و اقوام مختلف، ممکن است به دلیل تفاوت در محتوای ژنتیکی نژادها و اقوام مختلف، موقعیت جغرافیایی، تأثیر عوامل محیطی بر ژنتیک افراد و شرایط انتخاب افراد سالم باشد.

آنالیز فراوانی پلی مورفیسم های ApoE می تواند برای ارزیابی ارتباط ژنتیکی در میان جمعیت ها از مناطق جغرافیایی مختلف مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این، تعیین این فراوانی ها در یک جمعیت، می تواند به عنوان مرجعی خوب برای مطالعات ژنتیکی ارتباط بین پلی مورفیسم های ApoE و بیماری های خاص (۳۶-۳۸) در آن جمعیت بکار رود.

به طور خلاصه، در این مطالعه برای اولین بار فراوانی پلی مورفیسم های ApoE در ۱۰۰ فرد لر سالم غیرخویشاوند تعیین گردید. نتایج ما نشان داد که فراوانی پلی مورفیسم های ApoE در جمعیت لر دارای ویژگی های کلی گزارش شده در جمعیت ایرانی، با برخی اختلافات اضافی جالب توجه می باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه شرکت کنندگان در این مطالعه تشکر می گردد.

1. Ventakaramana
2. Asakawa
3. Kataoka

References

1. Shojaei S, Daneshpour M, Halalkhor S, Azizi F, Hedayati M. Genetic Association Between Metabolic Syndrome and Apolipoproteins. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2011;13(2):209-220. (In Persian)
2. Erqou S, Thompson A, Di Angelantonio E, Saleheen D, Kaptoge S, Marcovina S, et al. Apolipoprotein (a) Isoforms and the Risk of Vascular Disease Systematic Review of 40 Studies Involving 58,000 Participants. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(19):2160-2167.
3. Tsimikas S, Tsimonis LD, Tselepis AD. New insights into the role of lipoprotein (a)-associated lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(10):2094-2099.
4. Thompson A, Danesh J. Associations between apolipoprotein B, apolipoprotein AI, the apolipoprotein B/AI ratio and coronary heart disease: a literature-based meta-analysis of prospective studies. *Journal of internal medicine*. 2006;259(5):481-492.
5. Sharrett AR, Ballantyne C, Coady S, Heiss G, Sorlie P, Catellier D, et al. Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein (a), apolipoproteins AI and B, and HDL density subfractions the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Circulation*. 2001;104(10):1108-1113.
6. Hegele RA, Huang LS, Herbert PN, Blum CB, Buring JE, Hennekens CH, et al. Apolipoprotein B-gene DNA polymorphisms associated with myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 1986;315(24):1509-1515.
7. Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review. *Am J Epidemiol*. 2004;160(5):421-429.
8. Campos H, McNamara JR, Wilson PW, Ordovas JM, Schaefer EJ. Differences in low density lipoprotein subfractions and apolipoproteins in premenopausal and postmenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1988;67(1):30-35.
9. Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlbom A, et al. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2007;298(11):1300-1311.
10. Caligiuri G, Rudling M, Ollivier V, Jacob MP, Michel JB, Hansson GK, et al. Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice. *Mol Med*. 2003;9(1-2):10-17.
11. Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16(10):1250-1255.

12. Fallah S, Selfi M, Firoozari M, Godarzi T, Jafarzadeh M, Ghohari L. Influence of Apo E polymorphism on coronary artery disease. *World Acad Sci Eng Technol*. 2009;57:580-584.
13. Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2000;11(3):243-251.
14. Mayeux R, Saunders AM, Shea S, Mirra S, Evans D, Roses AD, et al. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. The New England journal of medicine*. 1998;338(8):506-511.
15. Scott J, Knott T, Shaw D, Brook J. Localization of genes encoding apolipoproteins CI, CII, and E to the p13cen region of human chromosome 19. *Human genetics*. 1985;71(2):144-146.
16. Rall S, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *Journal of Biological Chemistry*. 1982;257(8):4171-4178.
17. Swertfeger DK, Hui DY. Apolipoprotein E: a cholesterol transport protein with lipid transport-independent cell signaling properties. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2001;6:D526-535.
18. Weisgraber KH, Rall SC, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo E isoforms. *Biol Chem*. 1981;256:9077-9083.
19. Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med*. 2004;141(2):137-147.
20. Wilson PW, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease. The Framingham Offspring Study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1994;272(21):1666-1671.
21. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acid Res*. 1988;16:1215-1218.
22. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha 1. *J lipid Res*. 1990;51:545-548.
23. Olivieri O, Martinelli N, Bassi A, Trabetti E, Girelli D, Pizzolo F, et al. ApoE epsilon2/epsilon3/epsilon4 polymorphism, ApoCIII/ApoE ratio and metabolic syndrome. *Clin Exp Med*. 2007;7:164-172.
24. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1988;8:1-21.
25. Ventakaramana P, Chengal R, Ferrell R. Apolipoprotein E polymorphism in two populations of Andru Pradesh. *Ind J Hum Genet*. 2002;3:1-5.
26. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Johnson S, Ordovas JM, Schaefer MM, Castelli WP, et al. Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels.

- Results from the Framingham Offspring Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1994;14(7):1105-1113.
27. Assmann G, Schmitz G, Menzel H, Schulte H. Apolipoprotein E polymorphism and hyperlipidemia. *Clinical chemistry*. 1984;30(5):641-643.
 28. Lehtimäki T, Moilanen T, Viikari J, Akerblom HK, Ehnholm C, Ronnema T, et al. Apolipoprotein E phenotypes in Finnish youths: a cross-sectional and 6-year follow-up study. *J Lipid Res*. 1990;31(3):487-495.
 29. Luc G, Bard JM, Arveiler D, Evans A, Cambou JP, Bingham A, et al. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb*. 1994;14(9):1412-1419.
 30. Cattin L, Fisicaro M, Tonizzo M, Valenti M, Danek GM, Fonda M, et al. Polymorphism of the apolipoprotein E gene and early carotid atherosclerosis defined by ultrasonography in asymptomatic adults. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1997;17(1):91-94.
 31. Kamboh MI, Sepehrnia B, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins VI. Common polymorphism of apolipoprotein E in blacks. *Dis Markers*. 1989;7:49-55.
 32. Eto M, Watanabe K, Makino I. Increased frequencies of apolipoprotein $\epsilon 2$ and $\epsilon 4$ alleles in patients with ischemic heart disease. *Clinical genetics*. 1989;36(3):183-188.
 33. Kataoka S, Robbins DC, Cowan LD, Go O, Yeh JL, Devereux RB, et al. Apolipoprotein E Polymorphism in American Indians and Its Relation to Plasma Lipoproteins and Diabetes The Strong Heart Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996;16(8):918-925.
 34. Hanis CL, Hewett-Emmett D, Douglas TC, Bertin TK, Schull WJ. Effects of the apolipoprotein E polymorphism on levels of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins among Mexican-Americans in Starr County, Texas. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1991;11(2):362-370.
 35. Asakawa J, Takahashi N, Rosenblum BB, Neel JV. Two-dimensional gel studies of genetic variation in the plasma proteins of Amerindians and Japanese. *Hum Genet*. 1985;70(3):222-230.
 36. Sima A, Iordan A, Stancu C. Apolipoprotein E polymorphisms risk factor for metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45:1149-1153.
 37. Crean S, Ward A, Mercaldi CJ, Collins JM, Cook MN, Baker NL, et al. Apolipoprotein E epsilon4 prevalence in Alzheimer's disease patients varies across global populations: a systematic literature review and meta-analysis. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2011;31(1):20-30.
 38. Kuhlmann I, Minihane AM, Huebbe P, Nebel A, Rimbach G. Apolipoprotein E genotype and hepatitis C, HIV and herpes simplex disease risk: a literature review. *Lipids Health Dis*. 2010;9(1):1-14.