

A Study on Mutation of the Exon 10 of the LDLR gene in Hypercholesterolemia Patients in Ardebil, Iran

Maryam Ghadiry¹, Hashem Yaghoubi^{2*}

1- M.Sc., Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 5615731567, Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran
Email: yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir*

Received: 06/Apr/2017, Accepted: 17/May/2017

Abstract

Objective: Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant disease mainly attributed to mutations in the low-density lipoprotein receptor gene (LDLR). This study aims to investigate molecular changes in the LDLR gene in patients with high cholesterol in individuals from Ardebil Province, Iran.

Methods: We evaluated 100 patients with suspected FH from Ardebil Province. DNA samples using primers LDLR gene and exon 10 PCR-SSCP method was tested and modified bands on gel electrophoresis detected and subsequently examined by DNA sequencing.

Results: We evaluated 100 patients with suspected FH, 43 males and 66 females. The average age of 50.68 and 281.81 had average cholesterol levels of the subjects. In this study, we identified a polymorphism 1413G>A LDLR gene. Allele G, 70% of the population studied and the A allele is 30% of the subjects to be included.

Conclusion: The findings of this study showed that polymorphism of the LDLR gene in FH 1413GA was not the main role, but could indirectly affect, and possibly other exons of the gene or other genes in the development of FH in the region have.

Keywords: Familial hypercholesterolemia, Low-density lipoprotein receptor gene, PCR-SSCP

Pathobiology Research, Vol. 20 (2017-2018), No.1, Pages: 43-51

بررسی اگزون ۱۰ ژن LDLR در بیماران هیپرکلسترولمی در جمعیت استان اردبیل

مریم قدیری^۱، هاشم یعقوبی^{۲*}

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، اردبیل، ایران

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، اردبیل، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، اردبیل، کدپستی: ۵۶۱۵۷۳۱۵۶۷، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، گروه زیست شناسی

Email: yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۶/۰۲/۲۷

دریافت مقاله: ۹۶/۰۱/۱۷

چکیده

هدف: هیپرکلسترولمی فAMILی بیماری غالب اتوزومی است که اغلب به دلیل جهش در ژن گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پایین ایجاد می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات مولکولی در ژن گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پایین در بیماران با کلسترول بالا در جمعیت استان اردبیل است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۱۰۰ بیمار مشکوک به هیپرکلسترولمی فAMILی از جمعیت استان اردبیل بررسی شدند. DNA نمونه‌ها با استفاده از آغازگر اگزون ۱۰ ژن گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پایین و روش PCR-SSCP آزمایش شد و باندهای تغییر یافته روی ژل الکتروفورز تشخیص داده شد و متعاقباً توسط روش تعیین توالی DNA بررسی شد. **نتایج:** در مجموع در مطالعه حاضر ۱۰۰ بیمار مشکوک به هیپرکلسترولمی فAMILی مطالعه شدند که از این تعداد ۴۳ نفر مرد و ۶۶ نفر زن بودند. میانگین سنی افراد ۵۰/۶۸ و میانگین کلسترول افراد مورد مطالعه ۲۸۱/۸۱ بود. در این مطالعه یک چندریختی 1413G>A ژن گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پایین شناسایی شد که فراوانی آلل G، ۷۰ درصد از جمعیت مورد مطالعه و آلل A نیز ۳۰ درصد از افراد مورد مطالعه را شامل می‌شد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که چندریختی 1413G>A ژن گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پایین در هیپرکلسترولمی فAMILی نقش اصلی ندارد ولی می‌تواند به طور غیر مستقیم تأثیر بگذارد و احتمالاً اگزون‌های دیگر این ژن یا ژن‌های دیگر در ایجاد هیپرکلسترولمی فAMILی در این منطقه نقش دارند.

کلید واژگان: هیپرکلسترولمی فAMILی، ژن گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پایین، PCR-SSCP

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۲۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶، صفحات: ۹-۱

مقدمه

می‌شود، فنوتیپ بالینی این بیماری همراه با افزایش خطر بیماری‌های قلبی-عروقی و مرگ زودهنگام است [۱]. بیش از ده میلیون نفر در سراسر جهان از این بیماری رنج می‌برند [۲].

هیپرکلسترولمی فAMILی (Familial Hypercholesterolemia: FH) با افزایش غلظت پلاسمایی کلسترول و لیپوپروتئین با چگالی پایین (Low-density lipoprotein: LDL) مشخص

بررسی اگزون ۱۰ ژن LDLR در بیماران هیپرکلسترولمی

دنیا صورت گرفته است؛ این در حالی است که در کشور ایران تعداد و نوع این تحقیقات بسیار اندک و محدود است [۲]. بررسی ها نشان داد که تاکنون مطالعه روی هیچ کدام از اگزون های ژن LDL روی جمعیت استان اردبیل صورت نگرفته است و همچنین از بین ۱۸ اگزون ژن LDL تحقیقات خیلی کم در مورد اگزون ۱۰ ژن گیرنده LDL صورت گرفته است. از این رو در این مطالعه هدف بررسی فراوانی جهش های اگزون ۱۰ ژن گیرنده LDL در استان اردبیل است تا شاید نتایج آن در بهبود پیش آگهی و اطلاع رسانی زود هنگام در راستای کاهش مرگ و میر ناشی از ضایعات قلبی عروقی و افزایش شاخص امید به زندگی مؤثر باشد.

مواد و روش ها

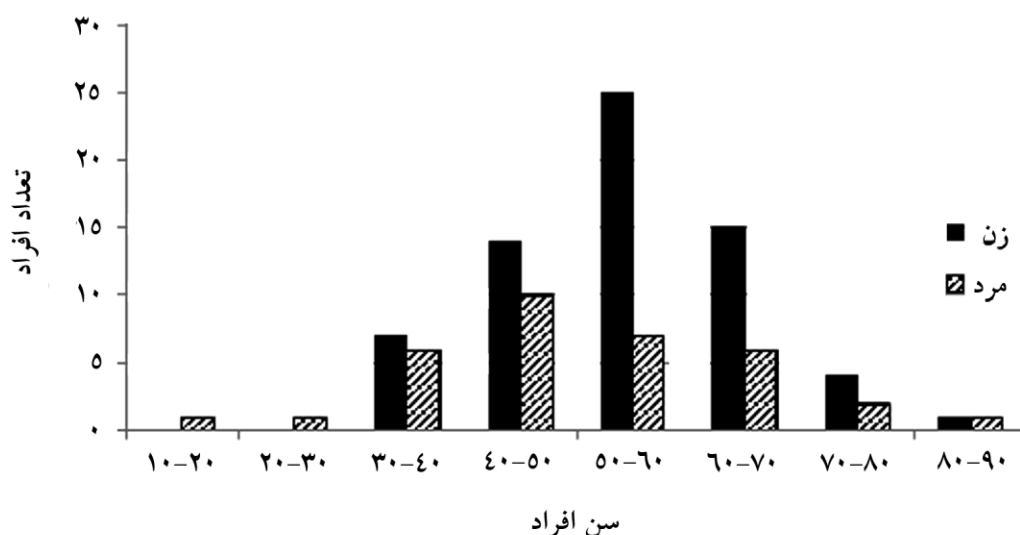
مطالعه حاضر یک پژوهش توصیفی-آزمایشگاهی است که در سال ۱۳۹۳ روی ۱۰۰ نفر از بیماران مشکوک به FH که دارای سابقه فامیلی بودند و همچنین دارای کلسترول بیش از ۲۴۰ میلی گرم/دسی لیتر بودند، انجام شد. این مطالعه طی نامه به شماره ۵/۹۳/۱۷۳۷/ب مورخ ۹۳/۷/۵ به تأیید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل رسیده و با کسب رضایت نامه شخصی، این افراد وارد مطالعه شدند. بیماران شامل ۶۶ زن و ۳۴ مرد با میانگین سنی ۵۰/۷ سال بودند (جدول ۱). پراکندگی سنی بیماران در شکل ۱ آورده شده است.

FH یک بیماری ژنتیکی غالب اتوزومی است که در اثر جهش در یکی از سه ژن گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پایین (Low Density Lipoprotein Receptor: LDLR) آپوپروتئین B (Apolipoprotein B: APOB) و PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) رخ می دهد [۳، ۴]. FH اغلب به دلیل جهش در ژن گیرنده LDL ایجاد می شود [۵].

شایع ترین علت ژنتیکی FH، جهش های ژن کدکننده گیرنده LDL است. این ژن با اندازه تقریبی ۴۵ کیلوباز متشکل از ۱۸ اگزون و ۱۷ ایترون روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۹ (19p3.13) واقع شده است. این ژن شش ناحیه عملکردی مربوط به پروتئین گیرنده LDL را کد می کند که متشکل از ۸۶۰ اسید آمینه است [۵]. کاهش در فعالیت گیرنده LDL منجر به کاهش کاتابولیسم کلسترول (LDL-C) و در نتیجه افزایش سطح کلسترول خون می شود [۶]. تاکنون بیش از ۶۰۰ جهش، شامل جایگزینی، حذف های کوچک و درج نوکلئوتیدی در ژن گیرنده LDL گزارش شده است. جهش های بدمعنی (Missense) در ناحیه پیوندی گیرنده LDL به وسیله FH و بیماری عروق کرونر نا به هنگام مشخص شده است و حدود ۰/۲ درصد از جمعیت کل جهان (بیشتر از ۱۰ میلیون) از لحاظ ژنتیکی مستعد ابتلا به این بیماری هستند [۷]. تحقیقات متعدد و گسترده ای برای شناسایی علل مولکولی و ژنتیکی افزایش کلسترول خون انسان در جمعیت های مختلف

جدول ۱ ویژگی های بیوشیمیایی و بالینی افراد مورد مطالعه

پارامتر	بیمار	مرد	زن	مقادیر استاندارد
تعداد	۱۰۰	۳۴	۶۶	
سن	۵۰/۷	۵۱/۵	۵۰	
کلسترول کل (میلی گرم/دسی لیتر)	۲۸۱/۸	۲۸۱/۳	۲۸۲/۳	طبیعی >۲۰۰ بالا <۲۴۰
تری گلیسرید (میلی گرم/دسی لیتر)	۲۷۰	۲۸۷/۶	۲۵۲/۴	۱۶۰-۴۰
LDL (میلی گرم/دسی لیتر)	۱۶۹/۸	۱۶۶/۶	۱۷۳	۳۵-۵۰
HDL (میلی گرم/دسی لیتر)	۴۹/۷	۴۴/۶	۵۴/۸	طبیعی >۱۰۰ بالا <۱۳۰



شکل ۱ نمودار میله‌ای سن افراد

برای آزمایش‌های مولکولی، DNA کلیه نمونه‌های خون با استفاده از روش پروتئیناز K استخراج شد. اگزون ۱۰ ژن LDLR به وسیله آغازگرهای اختصاصی (جدول ۲) طراحی شده با برنامه الیگو ۷ و با روش PCR تکثیر داده شد و با استفاده از روش SSCP ارزیابی شد و نمونه‌هایی که دارای الگوی متفاوتی از افراد نرمال بودند، برای تعیین توالی انتخاب شدند.

از کلیه بیماران با کسب رضایت میزان ۵ میلی‌لیتر خون در لوله آزمایش محتوی اتیلن دی آمین تتراسیتیک اسید (EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid) ۰/۵ مولار برای آزمایش‌های مولکولی گرفته شد و میزان کلسترول و تری گلیسرید و LDL و HDL با استفاده از دستگاه اتوالایزر bt3000 اندازه‌گیری شد.

جدول ۲ توالی آغازگر اگزون ۱۰ ژن LDLR و اندازه محصول PCR

اندازه	T _m	توالی	اگزون
۳۹۲ (جفت باز)	۶۰	3'-GAGAATGATCTGCAGGTGAG-F:5'	۱۰
	۶۲	3'-GTTCTCTGAAGCTCCTTCCTG-R:5'	

با آب مقطر دیونیزه (ddH₂O) به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. میکروتیوپ‌ها سپس تحت شرایط دمایی واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و سپس ۳۱ چرخه شامل واسرشت (Denaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال (Annealing) در ۵۶ درجه سانتی‌گراد

برای مطالعه جهش‌های مربوط به ژن LDLR هر نمونه واکنش PCR شامل ۱ میکرولیتر از آغازگر F، ۱ میکرولیتر از آغازگر R، ۱/۸ میکرولیتر MgCl₂، ۲/۵ میکرولیتر Buffer Taq DNA (۱۰x)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP و یک واحد DNA polymerase ۳ میکرولیتر DNA را در میکروتیوپ ریخته و

بررسی اگزون ۱۰ ژن LDLR در بیماران هیپرکلسترولمی

گرفت. سپس محصول PCR آماده شده برای SSCP به داخل چاهک‌های ژل ریخته شدند. و ولتاژ 100V به مدت ۱۵ ساعت اعمال شد. پس از اتمام الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید با استفاده از نیترا نقره رنگ‌آمیزی و باندهای تشکیل شده بررسی شد.

نتایج

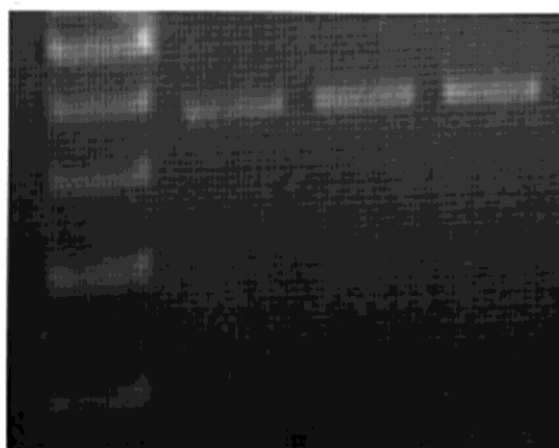
همه نمونه‌ها با استفاده از آغازگر اگزون ۱۰ ژن LDLR به وسیله PCR تکثیر شد و وجود باند مورد نظر برای آن‌ها با الکتروفورز تأیید شد (شکل ۲). سپس محصولات PCR مربوط به اگزون مورد نظر با استفاده از روش SSCP روی ژل پلی‌آکریل آمید بررسی شد و با توجه به اختلاف در الگوی باندهای پدید آمده روی ژل، مواردی که تغییراتی در آن‌ها مشاهده شده بود برای تعیین توالی انتخاب شد (شکل ۳) که در این مطالعه چندریختی (Polymorphism) $1413G>A$ در ۳۰ درصد افراد مورد مطالعه شناسایی شد (شکل ۴). این جهش یک چندریختی است که در سطح پروتئین اسید آمینه آرژنین را به کدون دیگر آرژنین تبدیل می‌کند.

به مدت ۱۵ ثانیه، طویل شدن (Extension) در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و سپس ۱ چرخه طویل‌سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت و توالی‌های مورد نظر تکثیر شد. محصولات PCR به دست آمده روی ژل آگارز ۲ درصد و تحت ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد و سپس توسط رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید (Ethidium bromide) و عکس‌برداری از ژل مشاهده شد.

سپس محصول PCR با استفاده از روش PCR-SSCP (polymerase chain reaction/single-strand conformation polymorphism) بررسی شد. برای هر نمونه ۲/۵ میکرولیتر از محصول PCR را با ۵ میکرولیتر از لودینگ بافر مخصوص SSCP در یک میکروتیوپ مخلوط شد، سپس میکروتیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر قرار داده شد تا دو رشته DNA از هم جدا شوند، سپس بلافاصله میکروتیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد.

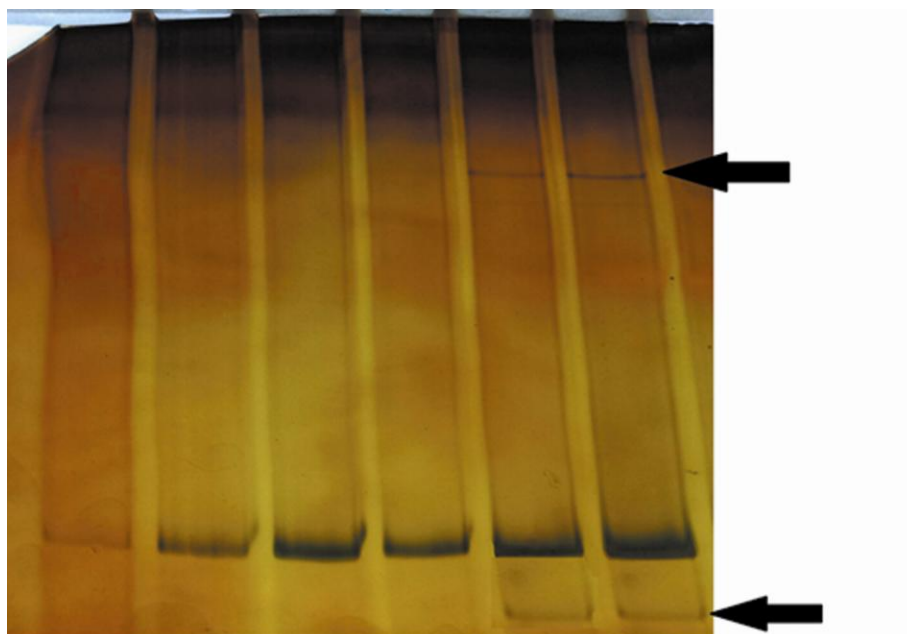
ژل پلی‌آکریل آمید مربوط به SSCP از بیس آکریل آمید/آکریل آمید تهیه شد و در تانک الکتروفورز عمودی قرار

۵۰۰ جفت باز
۴۰۰ جفت باز
۳۰۰ جفت باز
۲۰۰ جفت باز
۱۰۰ جفت باز

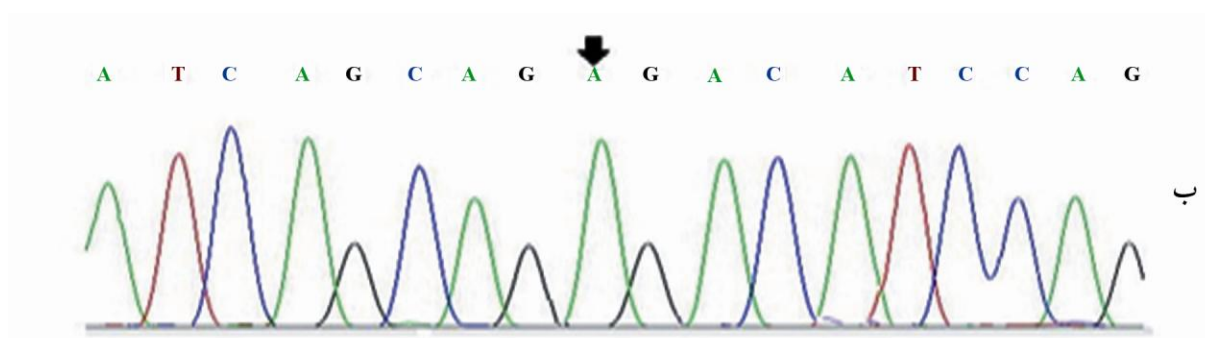
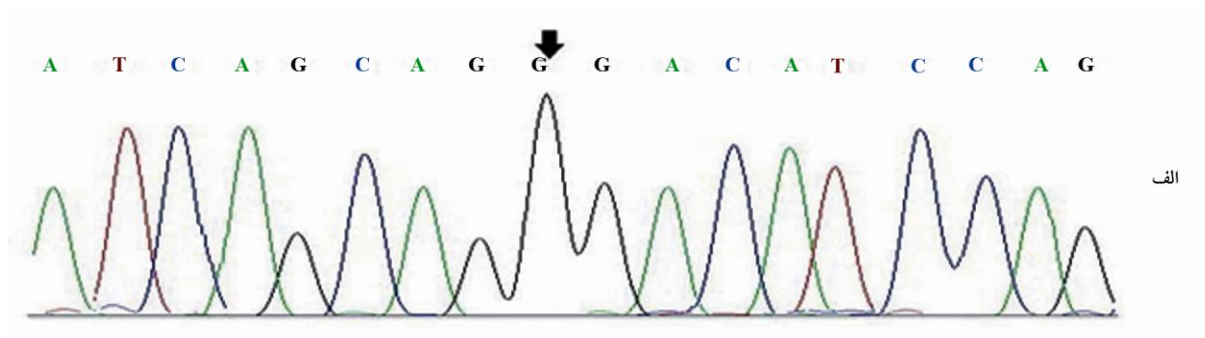


قطعه استاندارد

شکل ۲ الکتروفورز محصول PCR ژن LDLR



شکل ۳ الکتروفورز محصولات PCR اگزون ۱۰ با استفاده از روش SSCP



شکل ۴ نتایج حاصل از روش توالی‌یابی DNA: الف) توالی فرد سالم، ب) توالی حاوی چندریختی 1413G>A

بحث

ژن گیرنده LDL دارای ۱۸ اگزون و ۱۷ ایترون روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۹ انسان واقع شده و بیش از ۶۰۰ جهش تاکنون در ژن گیرنده LDL گزارش شده است که این جهش‌ها در جمعیت‌های مختلف متنوع هستند [۸].

در این مطالعه به بررسی جهش اگزون ۱۰ ژن LDLR پرداخته شد و اینکه آیا جهش اگزون ۱۰ ژن LDLR نقشی در ایجاد هیپرکلسترولمی دارد که پس از انجام روش‌های SSCP و سپس تعیین توالی یک مورد پلی‌مورفیسم 1413G>A تشخیص داده شد.

در جوامع مختلف گزارش‌های متفاوتی از فراوانی و انواع جهش‌ها در ژن مزبور ارائه شده است که بیشترین این جهش‌ها از نوع جابه‌جایی بوده است.

مطالعات وسیعی در بسیاری از مناطق از جمله اروپا، آمریکا، شمال آفریقا و نواحی از آسیا صورت گرفته است. نتایج نقص در عملکرد و ساختمان ژن LDLR با ایجاد فنوتیپ FH را تأیید می‌کند [۹]. در نواحی غرب و جنوب آسیا، جمعیت‌های خاصی از ساکنین ترکیه، عربستان، سوریه، قبرس، کویت و ایران مطالعاتی صورت گرفته است، اما نتایج پراکنده و اطلاعات بسیار محدودی به دست آمده است [۱۰].

در مطالعه‌ای در کشور ژاپن بر روی کلیه اگزون‌ها و ناحیه پروموتور انجام گرفته در ۶۲/۵ درصد بیماران مورد مطالعه جهش‌های متفاوت این ژن گزارش شده است. در این مطالعه جهش‌های نقطه‌ای جدید در هر خانواده شناخته شد. (۱) تبدیل C به A در نوکلئوتید ۲۸۵، باعث جهش بی معنی در کدون ۷۴ در ۸ نفر از اعضای خانواده A، (۲) تبدیل G به A در نوکلئوتید ۱۱۳۶، باعث جایگزینی تیروزین با سیستئین در کدون ۳۵۸ در ۶ نفر از اعضای خانواده B، (۳) تبدیل C به T در نوکلئوتید ۱۸۲۲، باعث جایگزینی سرین با پرولین در کدون ۵۸۷ در ۵ نفر از اعضای خانواده C، (۴) اضافه شدن یک تک باز G در نوکلئوتید ۱۷۷۴-۱۷۷۸ (کدون ۵۷۱-۵۷۲) موجب تغییر چارچوب در ۶ نفر از اعضای خانواده D و ۵)

بررسی اگزون ۱۰ ژن LDLR در بیماران هیپرکلسترولمی

حذف تک باز T در نوکلئوتید ۱۹۶۳-۱۹۶۴ (کدون ۶۳۴)، ایجاد تغییر چارچوب در ۳ نفر از اعضای خانواده E تشخیص داده شد. از طریق روش ژنتیک مولکولی در مجموع ۲۸ نفر در این خانواده‌ها به جهش LDLR هتروزیگوت تشخیص داده شد [۱۱].

در مطالعه‌ای که در مراکش روی بیماران هیپرکلسترولمی انجام گرفت، سه جهش جدید C25x>T، 1vs3+5G>T، D558A و دو جهشی که قبلاً شناخته شده بود (D151N، A480E) تشخیص داده شد [۴].

مطالعه‌ای که در هان چین انجام گرفت، در مجموع ۱۴۳ جهش مختلف در ژن LDLR مشخص شد که از جمله شایع‌ترین آن‌ها شامل 986G>A، 1747C>T، 1879G>A، 268G>A است، بسیاری از این جهش‌ها در چین، هنگ کنگ و تایوان گزارش شده است [۱۲].

در مطالعه‌ای دیگر که روی بیماران FH در اسرائیل انجام گرفت، دو جهش جدید (E140A) P و دیگری در پروموتور C_191C>A شناخته شده است. جهش‌های C.2479G>A و P(V827I) در اگزون ۱۷ از ژن LDLR در ۸ بیمار تشخیص داده شد [۱۳].

در ایران در مورد جهش‌های ژن LDLR، ۲ مطالعه انجام شده است. در یک بررسی بین ۳۰ بیمار مورد مطالعه در ایران یک مورد تغییر ژنی (A>445G) گزارش شده است و ادعا شده که این تغییر ژنی احتمالاً بیماری‌زا است [۲].

در مطالعه دیگر در استان چهارمحال و بختیاری روی ۱۸ اگزون ژن LDLR انجام شد، در مجموع ۵ چندریختی مختلف در بیماران تشخیص داده شد، 1413G>A، 1725C>T، 1773C>T، 2140+5G>A و 1959T>C و یک جهش هتروزیگوت A>238T شناسایی کردند و به این نتیجه رسیدند که نقش ژن LDLR در ایجاد FH در جمعیت مورد مطالعه ضعیف است و احتمالاً ژن یا لوکوس‌های دیگری در ایجاد FH نقش دارند [۱۴].

به نظر می‌رسد در جمعیت استان اردبیل نیز نقش ژن

با توجه به وجود جهش‌های مختلف و پراکنده در اگزون‌های مختلف ژن LDLR و نیز در ژن‌های دیگر مانند APOB و PCSK9 شناسایی جهش‌ها نیاز به بررسی‌های گسترده در سایر اگزون‌ها و ژن‌ها دارد که در این تحقیق اگزون ۱۰ از ژن LDLR برای اولین بار در جمعیت استان اردبیل بررسی شد.

تشکر و قدر دانی

این مقاله نتیجه پایان نامه کارشناسی ارشد است. بدینوسیله از کلیه بیماران که در این مطالعه شرکت نمودند صمیمانه تشکر می‌نمایم.

LDLR ضعیف باشد البته بایستی اگزون‌های دیگر این ژن و همچنین سایر ژن‌های مرتبط با FH نیز مطالعه شوند. در هر حال آزمایش‌های ژنتیکی برای جهش‌های FH در LDLR می‌تواند به تشخیص FH کمک کند. از این رو وجود یک برنامه غربال‌گری پیشرفته می‌تواند برای تشخیص زودهنگام این بیماری کمک‌کننده باشد. در این تحقیق یک اگزون از ۱۸ اگزون ژن LDLR بررسی شد، یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که چندریختی A>1413G ژن LDLR در FH نقش اصلی ندارد ولی می‌تواند به‌طور غیر مستقیم تأثیر بگذارد. این چندریختی از انواع شایع است که از این چندریختی می‌توان در ردیابی جهش‌های مختلف استفاده کرد.

منابع

- [1] De Castro-Oros I, Pocovi M, Civeira F. The genetic basis of familia hypercholesterolemia: inheritance, linkage, and mutation. *Appl Cilin Genet* 2010; 3: 53-64.
- [2] Fard Esfahani P, Zeinali C, Rouhi Dehboneh S, Taghikhani M, Khatami S. A novel mutation in exon 4 of the Low dencity lipoprotein receptor gene in an Iranian familial hypercholesterolemia patient. *IBJ* 2005; 9(3): 139-42.
- [3] Rader DJ, Cohen J, Hobbs HH. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest* 2003; 111(12): 1795-803.
- [4] Chater R, Ait Chihab K, Rabès JP, Varret M, Chabraoui L, El Jahiri Y, Adlouni A, Boileau C, Kettani A, El Messal M. Mutational heterogeneity in low-density lipoprotein receptor gene related to familial hypercholesterolemia in Morocco. *Clinica*
- Chemica Acta* 2006; 373(1-2): 62-9.
- [5] Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232(4746): 34-47.
- [6] Lombardi MP, Redeker EJ, Defesche JC, Kamerling SW, Trip MD, Mannens MM, Havekes LM, Kastelein JJ. Molocular genetic testing for familial hypercholesterolemia: spectrum of LDL receptor gene mutations in the Netherlands. *Clin Genet* 2000; 57(2): 116-24.
- [7] Whitfield AJ, Barrett PH, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Lipid disorders and mutations in the APOB gene. *Clin Chem* 2004; 50(10): 1725-32.
- [8] Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992; 1(6): 445-66.
- [9] Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary

- heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973; 52(7): 1544-68.
- [10] Varret M, Rabes JP, Saint-Jore B, Cenarro A, Marinoni JC, Civeira F, Devillers M, Krempf M, Coulon M, Thiaert R, Kotze MJ, Schmidt H, Buzzi JC, Kostner GM, Bertolini S, Pocovi M, Rosa A, Farnier M, Martines M, Junien C, Boileau C. A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p32. 1-p32. *Am J Hum Genet* 1999; 64(5): 1378-87.
- [11] Hirayama T, Yamaki E, Hata A, Tsuji M, Hashimoto K, Yamamoto M, Emi M. Five familial hypercholesterolemic Kindreds in Japan with novel mutation of the LDL receptor gene. *J Hum Genet* 1998; 43(4): 250-4.
- [12] Chiou KR, Chang MJ. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia in Han Chinese. *J Clin Lipidol* 2016; 10(3): 490-6.
- [13] Durst R, Ibe UK, Shpitzen S, Schurr D, Eliav O, Futema M, Whittall R, Szalat A, Meiner V, Knobler H, Gavish D, Henkin Y, Ellis A, Rubinstein A, Harats D, Bitzur R, HersHKovitz B, Humphries SE, Leitersdorf E. Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Israel—revisited. *Atherosclerosis* 2017; 257: 55-63.
- [14] Shayesteh F, Farrokhi E, Shirani M, Modarresi M, Roghani F, Hashemzadeh M. The study mutations of the 9 exons of LDLR gene in patients with familial hypercholesterolemia in Cheharmahal Bakhtiari province. *AMUJ* 2011; 13(4): 30-37. (Persian)