

Hiperlipidemili Hastalarda PON 55 Gen Polimorfizm Sıklığının Araştırılması

Özlem Yüksel¹, Recep Sütcü², İsmail Hakkı Ersoy³, Hikmet Orhan⁴

¹Süleyman Demirel Üniversitesi Tıbbi Biyokimya AD Isparta.

²Katip Çelebi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya AD İzmir.

³Isparta Devlet Hastanesi Endokrinoloji Kliniği, Isparta.

⁴Süleyman Demirel Üniversitesi Halk Sağlığı AD, Isparta.

Eur J Basic Med Sci 2012;2(3):79-84

Received: 01-08-2012

Accepted: 02-11-2012

Correspondence (Yazışma Adresi):
Necmettin Erbakan Meram Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji AD, 42080, Akyokuş,
Konya
Tel: 0.332.2237347
Fax: 0332.2236181
e.mail: drbhdr@gmail.com

Investigation of PON 55 Gene Polymorphism Frequency in Patients with Hyperlipidemia

ABSTRACT

Paraoxonase (PON1) is a calcium-dependent esterase that is a component of high density lipoprotein. PON1 serves as a protective factor against oxidative modification of LDL. Serum PON1 activity decreases with diseases related to lipid metabolism which increases risk of atherosclerosis. Research has focused on two polymorphisms. PON 55 L>M polymorphism which is one of two polymorphism effects concentration of paraoxonase because of connection to polymorphism on PON 1 promoter region. PON 55 L>M polymorphism located on PON1's N-terminal region which has role to bind HDL. Many researches were carried out to investigate relationship between PON1 gene polymorphism and plasma lipoproteins. In this study, patients whose lipid profile measured in biochemistry laboratory are investigated. We examined amino acid changes at codon 55 in the PON1 gene by polymerase chain reaction and using restriction enzymes in 80 patients (26 men, 54 women; mean age 55.31±14.6 years) with high total cholesterol and LDL-C levels and in 60 patients (15 men, 45 women; mean age 42.75±17.7 years) with normal serum lipoprotein profile. Distribution of genotypes in the patient and control groups were 17.5% and 5% for MM, 40% and 51.7% for LM, 42.5% and 43.3% for LL, respectively. While the frequency of PON1 55M allele was higher in the patient group (0.375 vs.0.308), PON1 55 L allele frequency was higher in the control group. There was a marginal significant relationship between the PON1 M/L 55 polymorphism and hyperlipidemia (p=0.065). These data suggest that the PON1 M/L 55 polymorphism may show a significant relationship with hyperlipidemia.

Key words: Hyperlipidemia, genotype, PON 55, polymorphism.

ÖZET

Paraoksonaz 1 (PON1) enzimi yüksek yoğunluklu lipoproteinlerde (HDL) bulunan, kalsiyuma bağımlı bir esterazdır. PON1, lipit peroksidlerini hidroliz ederek düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) oksidasyondan koruma yeteneğine sahiptir. Serum PON1 aktivitesi ateroskleroz riskinin yüksek olduğu, lipit

metabolizması ile ilgili bozukluklarda azalır. PON1 geninde iki polimorfizm yaygın şekilde çalışılmıştır. Bunlardan biri olan PON 55 L>M polimorfizmi, PON1 promotör bölgesindeki polimorfizm bağlantısı yüzünden enzim konsantrasyonunu etkiler. PON 55 L>M polimorfizmi, PON1'in HDL ile bağlanmasında rol oynayan N-terminal bölgesinde lokalizedir. PON1 gen polimorfizmi ve plazma lipoproteinleri arasındaki ilişkiyi araştırmak için çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. Çalışmada biyokimya laboratuvarında lipit profili bakılan hastalar incelendi. Total kolesterol ve LDL-K düzeyleri yüksek olan 80 (26 erkek, 54 kadın; ort.yaş 55.31±14.6), lipit profili normal olan 60 hastadan (15 erkek, 45 kadın; ort.yaş 42.75±17.7) genetik inceleme için kan alındı. PON1 geninde 55. kodondaki aminoasit değişiklikleri polimeraz zincir reaksiyonu ve kısıtlayıcı enzimler kullanılarak incelendi. Hasta ve kontrol gruplarında PON 55 bölgesinde genotip dağılımı MM için sırasıyla %17.5 ve %5, LM için %40 ve %51.7, LL için ise %42.5 ve %43.3 bulundu. PON 55 M alel frekansı hasta grubunda kontrollere göre daha fazla bulunurken (0.375 ve 0.308), L alel frekansı hasta grubunda kontrollere göre daha düşük bulundu (0.625 ve 0.692). PON1 M/L 55 polimorfizmi ile hiperlipidemi arasında marjinal anlamlı ilişki görüldü (p=0.065). Bulgularımız, PON 55 L/M polimorfizmi ile hiperlipidemi arasında ilişki olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Hiperlipidemi, genotip, PON 55, polimorfizm.

GİRİŞ

Paraoksonaz (PON1) enzimi yüksek yoğunluklu lipoproteinlerde (HDL) bulunan, kalsiyuma bağımlı bir ester hidrolazdır (1). Karaciğerde sentezlenmektedir. İnsanlarda PON1 ayrıca böbrekler, beyin, kalp, ince bağırsak ve akciğerde de bulunmaktadır (2,3). PON1 enzimi 43 kDA molekül ağırlığında, 354 aminoasitten oluşan bir proteindir (4). PON1, kromozom 7q21.3-q22.1 bölgesinde bulunan gen tarafından kodlanmaktadır (5). PON1 geni, aynı kromozom üzerinde bulunan ve PON2 ile PON3'ün de yer aldığı bir çoklügen ailesinin üyesidir. PON1'in diğerlerinden farkı, N-terminalinde hidrofobik bir sinyal dizisinin bulunmasıdır (6). PON'un başlıca iki fonksiyonu bulunmaktadır. Bunlar, bir pestisid olan paraokson gibi organofosfat bileşiklerin detoksifikasyonuna katılmak ve lipit peroksitlerini hidrolize ederek LDL'yi oksidasyondan korumaktır (7). PON1, LDL lipit oksidasyon ürünlerinin birikimini ve kolesterol taşınmasına etki ederek periferik dokularda kolesterol birikimini önler (8). Bu özellikleri nedeniyle PON1 geninin, öncelikle koroner arter hastalığı (KAH) olmak üzere kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde rolü olduğu ileri sürülmektedir (9-11). PON1'in

enzimatik aktivitesi bireysel farklılıklar göstermektedir. HDL-kolesterol konsantrasyonunun çok düşük olduğu durumlarda, serum PON1 düzeyi de düşük gözlenir (6). Serum PON1 aktivitesinin, miyokart enfarktüsü, ailesel hiperkolesterolemi, Balıkgözü hastalığı, Tangier hastalığı ve diabetes mellitus (DM) gibi ateroskleroz riskinin yüksek olduğu, lipit metabolizması ile ilgili hastalıklara yakalanan bireylerde düşük olduğu görülmüştür (8). PON1 aktivitesindeki değişimler bu enzimi kodlayan gendeki polimorfizmler nedeniyledir (4). PON1 geninin kodlama bölgesi iki polimorfik bölge içerir; pozisyon 55'de lösin (L) ve metiyonin (M) (55 L>M) transizyonu ve pozisyon 192'de glutamin (Q) ve arginin (R) (192 Q>R) transizyonu. Kodlama bölgesindeki bu polimorfizme ilaveten, özellikle pozisyon 107/108'de olduğu gibi promotör bölgede önemli değişiklikler olduğu da rapor edilmiştir (12). PON 55 L>M polimorfizmi, PON1'in HDL ile bağlanmasında rol oynayan N-terminal bölgesinde lokalizedir (13-15). PON 55 L/M polimorfizminde MM homozigot bireylerde, LL homozigotlara kıyasla paraoksona karşı daha düşük PON1 aktivitesi bulunmaktadır (12-16). Birçok çalışmada serum PON aktivitesindeki değişimin serum apo A1, LDL-K ve HDL-K'ü içeren plazma lipoprotein konsantrasyonlarında değişim ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (17-19). PON1 gen polimorfizmi ve plazma lipoproteinleri arasındaki ilişkiyi saptamak için çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. Leus ve ark.'nın (17) yaptıkları çalışmada PON1 MM 55 genotipine sahip hastalar daha iyi plazma lipoprotein profiline sahipti. Fanella ve ark. (18) ise PON1 M55 taşıyanların taşımayanlara göre total ve LDL-K ve apoB ortalama plazma konsantrasyonlarının daha yüksek olduğunu gösterdi. Bununla beraber diğer popülasyonlardaki bazı diğer çalışmalar PON1 polimorfizmi ve plazma lipoproteinleri arasında ilişki göstermedi (20-22). PON genotipi ve total kolesterol, HDL-K, LDL-K, apo B ve Apo A1 oranları arasındaki ilişkiler PON genotipinin bazı bilinmeyen mekanizmalar ile lipit metabolizmasını etkilediğini düşündürür. Bu çalışmada hiperlipidemi üzerine PON55 genotipinin etkisi araştırılmak üzere total K, LDL-K'ü yüksek olan hastalar ile serum lipoprotein profili normal olan kontroller PON 55 genotipi için karşılaştırıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada biyokimya laboratuvarında serum lipit profili bakılan hastalar incelendi. Hastaların kanları 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıştırıldı. Serum total kolesterol, trigliserid ve HDL düzeyleri

Tablo 1. Hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri ve lipoprotein düzeyleri

	HASTA			KONTROL			p
	Sayı	%	Ort±SS	Sayı	%	Ort±SS	
Yaş			55.31±14.6				0.001
Cinsiyet							0.001
Erkek	26	32.5		15	25		
Kadın	54	67.5		45	75		
DM	20	25		15	25		
T.Kolesterol			243.3±26.6			160.85±19.7	0.001
HDL-K			58.35±15.2			54±13.8	0.083
LDL-K			158.2±20.1			86.2±15.3	0.001
TG			134.7±44.1			103.4±37.1	0.001

spektrofotometrik yöntemle dayalı Olympus marka ticari kitler kullanılarak Olympus AU 2700 (Japonya) oto-analizörde çalışıldı. LDL-K düzeyleri Friedewald hesaplama yöntemi ile belirlendi. Total kolesterol ve LDL-K düzeyleri yüksek olan 80, lipit profili normal olan 60 hastadan genetik inceleme için K2-EDTA'lı hemogram tüpüne yaklaşık 5'er cc venöz kan örnekleri alındı. DNA izolasyonuna kadar toplanan kanlar -80 °C'de muhafaza edildi. Norgen Biotek Corp. Blood Genomic DNA Isolation Kit (Kanada) kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen DNA örnekleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılarak amplifiye edildi. Amplifikasyonda PON 55 L/M polimorfizmi için şu primerler kullanıldı:

5'-GAA ATG GAT CCA CAT CCT GC-3' (forward),

5'-TTG AAA GTG GGC ATG GGT AT-3' (reverse)

Reaksiyon için 25 µl hacimde PZR karışımı hazırlandı. Karışım için 20-100 ng DNA, 100 µm dNTPs, 20 pmol primer (Forward ve Reverse primer), 1.5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl PH 8.6, 50 mM KCl, 0.2 U Taq polimerase (MBI Fermentas) kullanıldı. PZR, 94 °C'de 5 dakika, 94 °C'de 1 dakika, 59 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 1 dakika (35 siklus), 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde, ısı döngüleyici kullanılarak gerçekleştirildi. PZR ürünlerine PON 55 L/M polimorfizmi için NlaIII (New England Bio Labs.) kısıtlayıcı (restriksiyon) enzimi kullanıldı. PZR ürünleri 5U NlaIII enzimiyle gece boyunca 37 °C'de inkübe

edildi. Kesim ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek Kodak İmage 2000MM (USA) cihazında görüntüldü.

İstatistiksel Değerlendirme

Tanımlayıcı istatistikler, incelenen sürekli değişkenler için ortalama± standart sapma (SD), kesikli değişkenler için adet ve yüzdeleriyle verildi. Genotip dağılımını karşılaştırmak için ki-kare, diğer özellikler için Mann-Whitney U-testi kullanıldı. İstatistiksel incelemeler SPSS 15.0 sürümü kullanılarak gerçekleştirildi. P değeri için anlamlılık düzeyi ≤0.05 olarak kabul edildi.

BULGULAR

Hasta (%57.15) ve kontrol grubunun (%42.85) büyük çoğunluğu kadınlardan oluşmaktaydı. Her iki grupta da hastaların %25'i diyabetikti (Tablo 1). Yüksek total kolesterol, LDL-kolesterol ve trigliserit sıklığının hasta grubunda anlamlı olarak daha fazla olduğu gözlemlendi. HDL-K değerlerinde gruplar arasında anlamlı fark yoktu. Kontrol grubu anlamlı olarak daha gençti (Tablo 1). Hasta grubunda PON 55 bölgesinde M homozigotların oranı %17.5, L homozigotların oranı %42.5, LM heterozigotların oranı ise %40 idi. Kontrol grubunda ise PON 55 bölgesinde M homozigotların oranı %5, L homozigotların oranı %43.3, LM heterozigotların oranı

Tablo 2. Hasta ve kontrol gruplarında PON55 genotip dağılımı

	HASTA (n:80)		KONTROL (n:60)		p
	Sayı	%	Sayı	%	
PON1 55 L/M genotipleri					
LL	34	42.5	26	43.3	0.065
LM	32	40	31	51.7	
MM	14	17.5	3	5	
PON1 55 L/M frekansı	0.625/0.375		0.692/0.308		

ise %51.7 idi. Hasta ve kontrol gruplarında PON55 L alel frekansı sırasıyla 0.625/0.692, PON55 M alel frekansı sırasıyla 0.375/0.308 bulundu (Tablo 2). PON 55 L alel frekansının kontrol grubunda (0.625/0.692), PON 55 M alel frekansının ise hasta grubunda (0.375/0.308) daha fazla bulunması, PON 55 M/L polimorfizmi ile hiperlipidemi arasında marjinal olarak anlamlı bir ilişki olduğunu gösterdi ($p=0.065$).

TARTIŞMA

Hiperlipidemi, gelişmiş ülkelerde çevresel ve genetik faktörlerin birleşimi sonucu oluşan karmaşık bir hastalıktır. Kardiyovasküler hastalıklar tüm dünyada ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Hipertansiyon, sigara içimi, diyabet, hiperlipidemi koroner kalp hastalığı gelişimi için bağımsız risk faktörleridir (23). Kolesterol düzeyi ile koroner arter hastalığı (KAH) mortalitesi arasında lineer bir ilişki söz konusudur. Total kolesterole her 20 mg/dl artış, KAH mortalitesinde %12'lik bir artışa sebep olmaktadır (24). Ayrıca Framingham Kalp Çalışması total kolesteroldeki her %1 yükselmenin KAH riskinde yaklaşık %2 artışa sebep olduğunu göstermiştir (25).

Serum paraoksonaz enzimi HDL'ye bağlı bir enzim olarak HDL'nin antioksidatif özelliğinden sorumludur. In vitro çalışmalarda, HDL-bağımlı PON1'in LDL oksidasyonunu önlediği ve okside LDL'deki biyolojik olarak aktif olan lipitleri parçaladığı gösterilmiştir (14). PON1'in in vitro ve in vivo LDL oksidasyonunu önlemesi, ayrıca PON1'i kodlayan PON1 genindeki polimorfizmlerin serum aktivitelerine olan etkisi nedeniyle, PON1 enziminin KAH'yi oluşturan bağımsız bir risk faktörü olduğu ileri sürülmüştür (1,6). Hiperlipidemi de KAH için bağımsız bir risk faktörü olduğundan dolayı PON1 düzeyleri ve polimorfizmi ile hiperlipidemi arasındaki ilişki önemlidir. Birçok çalışma serum PON aktivitesindeki değişimin serum apo A1, LDL-K ve HDL-K'ü içeren plazma lipoprotein konsantrasyonlarında değişim ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür (17-19). PON1 gen polimorfizmi ve plazma lipoproteinleri arasındaki ilişkiyi saptamak için çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. PON1 enzimini kodlayan genlerdeki polimorfizmlerin hiperkolesterolemi ile ilişkili olup olmadığı konusunda farklı görüşler vardır. Çalışmaların bir kısmında olumlu bir ilişki saptanırken, bazılarında herhangi bir ilişki ortaya konamamıştır (20-22). PON1 promotör bölgesindeki polimorfizm bağlantısı yüzünden, PON 55 L>M polimorfizmi enzim aktivitesini etkiler. Bu polimorfizm, promotör bölgede olduğu

için gen ifadesini doğrudan etkileyerek lipoprotein metabolizmasında anormalliklere yol açabilecektir. Bundan dolayı biz, PON 55 gen polimorfizmini incelemeyi tercih ettik. Çalışmamızda PON55 L alel frekansı kontrol grubunda hasta grubuna göre daha yüksek (0.692/0.625), PON 55 M alel frekansı ise hasta grubunda kontrollere göre daha yüksek bulunmuştur (0.375/0.308). Ayrıca MM homozigot oranı hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksekti (%17.5/%5). Genotip dağılımındaki bu fark sınırda anlamlıydı ($p=0.065$). Bu bulgu hiperlipideminin (yüksek total kolesterol ve LDL-K), PON 55 L/M polimorfizmi ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Fanella ve ark. (18) Oji-Cree ve Inuit olarak adlandırılan iki yerli Kanada popülasyonundan alınan örneklerde PON1 M55 taşıyanların taşımayanlara göre total ve LDL-K ve apoB ortalama plazma konsantrasyonlarının daha yüksek olduğunu gösterdi. Malin ve ark. (19) LL homozigotların artmış HDL konsantrasyonlarına sahip olduklarını ve de daha yüksek apo A1 konsantrasyonlarına meyilli olduklarını buldular. Ancak Leus ve ark.'nın Hollanda'da ailesel hiperkolesterolemili hastalarda yaptıkları çalışmada (17) PON1 Leu/leu 55 ve met/met 55'li bireyler arasında ortalama total kolesterol ve LDL-K düzeylerinde anlamlı farklılık olduğu bulundu. Bu çalışmada PON1 M55 homozigotlar daha iyi plazma lipoprotein profiline sahipti. Bununla beraber diğer popülasyonlardaki bazı çalışmalar PON1 polimorfizmi ve plazma lipoproteinleri arasında ilişki olmadığını göstermişlerdir (20-22).

Elde edilen sonuçlardaki bu farklılık, birinci olarak olgu kontrol çalışmalarında örnek seçiminde gözlenen değişikliklerden kaynaklanabilir. İkinci olarak ise etnik gruplar ve hatta bireyler arasındaki farklılıktan olabilir. Gen polimorfizmlerinde bulunan etnik farklılıklar nedeniyle, her bir etnik alt gruptaki yüksek veya düşük riskli bütün bireylerde, hiperlipidemi ile ilgili olabilen polimorfizmlerin araştırılması gerekmektedir. PON genotipi ve total kolesterol, HDL-K, LDL-K, apo B ve Apo A1 oranları arasındaki ilişkiler PON genotipinin bazı bilinmeyen mekanizmalar ile lipit metabolizmasını etkilediğini düşündürür. PON'un lipoprotein metabolizmasını hangi mekanizmalar ile etkileyebildiğini bulmak ve farklı etnik kökenli değişik genetik izolatlardaki ilişkili çalışmalardan alınan sonuçların karşılaştırılması bu yüzden önemlidir. Bu çalışmada bazı kısıtlamalar bulunmaktadır. Bunlardan birincisi enzim aktivitesinin ölçülememiş olmasıdır. Özellikle heterozigot olgularda enzim düzeyleri, yani fenotipik görünüm

değişiklik göstermekte, ayrıca DM, PON1 aktivasyon düzeyini etkilemektedir. İkincisi ise, olgu sayısının sınırlı olması ve MM aleli taşıyan hasta ve kontrol sayısının az olmasıdır. Bu durumun genotip dağılımında aradaki farkın sınırdan anlamlı çıkmasına neden olabileceğini düşünmekteyiz. Üçüncüsü HDL-K düzeylerinde hasta ve kontroller arasında fark olmamasıdır. Dördüncüsü ise çalışmanın ailevi hiperkolesterolemili hastalarda yapılmamış olmasıdır. Hiperlipidemi ile bu polimorfizm arasındaki ilişkiyi doğrulamak için özellikle otozomal dominant geçiş gösteren ailevi hiperkolesterolemili hasta popülasyonunda daha büyük örnek sayılarına sahip araştırmaların planlanması uygun olacaktır. Toplumlar arasında ve içinde çok büyük varyasyonlar gösteren polimorfik yapıların incelendiği her çalışmanın, bir toplumdaki genel bilgi birikimine sağlayacağı katkı ortadadır. Bundan dolayı çalışmamızın kısıtlılıklarına rağmen önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak bulgularımız, PON 55 L/M polimorfizmi ile hiperlipidemi arasında sınırdan anlamlı bir ilişki olduğu yönündedir. Bu sonuç, PON 55 L/M polimorfizminin hiperlipidemi gelişiminde risk faktörü olarak değerlendirilmesinin uygun olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Antikainen M, Murtomäki S, Syväne M, et al. The Gln-Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest* 1996;98:883-5.
2. La Du BN, Adkins S, Kuo CL, Lipsig D. Studies on human serum paraoxonase/arylesterase. *Chem Biol Interact* 1993;87:25-34.
3. La Du BN. Structural and functional diversity of paraoxonases. *Nat Med* 1996;2:1186-7.
4. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:473-80.
5. Motti C, Dessi M, Gnasso A, et al. A multiplex PCR-based DNA assay for the detection of paraoxonase gene cluster polymorphisms. *Atherosclerosis* 2001;158:35-40.
6. Aviram M. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Mol Med Today* 1999;5:381-6.
7. Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 1995;115:243-53.
8. Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1067-73.
9. Ruiz J, Blanché H, James RW, et al. Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995;346:869-72.
10. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995;96:3005-8.
11. Zama T, Murata M, Matsubara Y, et al. A 192Arg variant of the human paraoxonase (HUMPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3565-9.
12. Gupta N, Gill K, Singh S. Paraoxonases: Structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. *Indian J Med Res* 2009;130(4):361-8.
13. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993;3:73-6.
14. Watson AD, Navab M, Hama SY, et al. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995;95:774-82.
15. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993;52(3):598-608.
16. Leviev I, Deakin S, James RW. Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. *J Lipid Res* 2001;42(4):528-35.
17. Leus FR, Zwart M, Kastelein JJ, Voorbij HA. PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis* 2001;154:641-649.
18. Fanella S, Harris SB, Young TK, et al. Association between PON1 L/M55 polymorphism and plasma lipoproteins in two Canadian aboriginal populations. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:413-420.
19. Malin R, Laaksonen R, Knuuti J, et al. Paraoxonase genotype modifies the effect of pravastatin on high-density lipoprotein cholesterol. *Pharmacogenetics* 2001;11:625-633.
20. Watzinger N, Schmidt H, Schumacher M, et al. Human paraoxonase1 gene polymorphisms and the risk of coronary heart disease: a community-based study. *Cardiology* 2002;98:116-122.
21. Mackness B, Davies GK, Turkie W, et al. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1451-7.
22. Bonafe M, Marchegiani F, Cardelli M, et al. Genetic analysis of paraoxonase (PON1) locus reveals an increased frequency of Arg192 allele in centenarians. *Eur J Hum Genet* 2002;10:292-6.
23. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz

- H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998;97:1837-47.
24. Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998, 339:229- 34.
25. Stein E. The lower the better? Reviewing the evidence for more aggressive cholesterol reduction and goal attainment. *Atheroscler* 2002 (Suppl):2;19-25.